

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

**Expression und Funktion des  
 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters NKCC1  
im Gastrointestinaltrakt  
von CFTR-Knockout-Mäusen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard- Karls- Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Katrin Wüchner**

**aus Waiblingen**

**2004**

Dekan: Professor Dr. E. Zrenner  
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Seidler  
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

---

meinen Eltern gewidmet



## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Elektrolytsekretion im Gastrointestinaltrakt .....	1
1.1.1	Der Mechanismus der Elektrolytsekretion .....	1
1.1.2	Regulation der Elektrolytsekretion .....	3
1.2	Die Kolonkrypte und -zelle .....	5
1.2.1	Funktion von Kolon und Kolonzellen .....	5
1.2.2	Struktur .....	6
1.3	Die Transportproteine der Elektrolytsekretion .....	7
1.3.1	Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC) .....	7
1.3.2	CFTR .....	15
1.3.3	$\text{K}^+$ -Kanäle .....	16
1.4	Die Pathophysiologie der Elektrolytsekretion .....	17
1.4.1	Die Zystische Fibrose .....	17
1.4.2	Die sekretorische Diarrhö .....	19
1.5	Experimentelles Modell und Fragestellung .....	20
2	MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1	Materialien .....	23
2.1.1	Flüssigchemikalien .....	23
2.1.2	Feststoffe .....	25
2.1.3	Gase .....	26
2.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.5	Geräte .....	28
2.1.6	Stammlösungen .....	29

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.1.7	Zur Präparation verwendete Tiere .....	29
2.2	Organentnahme und Zellpräparation .....	31
2.3	Extraktion, Reinigung und Analyse von mRNA .....	31
2.3.1	Allgemeine Bemerkungen zum Arbeiten mit RNA.....	31
2.3.2	Lyse der Zellen und Homogenisieren des Gewebes für die RNA-Extraktion .....	32
2.3.3	Extraktion von Gesamt-RNA.....	33
2.3.4	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen .....	34
2.3.5	Elektrophorese von RNA im Glyoxal-Gel .....	35
2.4	RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA-Synthese durch reverse Transkription).....	37
2.4.1	Primer-Design .....	38
2.4.2	Reverse Transkription, RT .....	38
2.4.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	39
2.4.4	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	41
2.4.5	Aufkonzentrieren von DNA durch Ethanol-Fällung.....	43
2.4.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	44
2.4.7	Semiquantitative RT-PCR.....	44
2.4.8	Semiquantitative Auswertung der Banden .....	46
2.5	Präparation und Anfärbung der Kolonkrypten .....	50
2.5.1	Vorbereitung .....	50
2.5.2	Präparation des Mäusekolons.....	51
2.5.3	Krypten-Isolierung.....	51
2.5.4	Färbung .....	52
2.6	Messung von pH <sub>i</sub> .....	52

2.6.1	Vorbereitung .....	52
2.6.2	Versuchsablauf .....	54
2.7	Auswertung der Messdaten und Statistik .....	58
2.7.1	Umrechnung der "ratio"-Werte in pH-Werte .....	58
2.7.2	Weiterverarbeitung und Zusammenfassung der Messdaten.....	58
2.7.3	Berechnung der Fluxraten .....	59
2.7.4	Statistische Auswertung.....	59
3	ERGEBNISSE .....	61
3.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	61
3.2	Expressionsniveau von NKCC1 in verschiedenen Organen von CFTR(+ / +) und CFTR(- / -) Mäusen.....	61
3.2.1	Wahl der internen Kontrolle.....	62
3.2.2	Primer-Design .....	62
3.2.3	Optimierung der PCR.....	63
3.2.4	Auswertung .....	63
3.3	Isolierung und Anfärbung der Krypten.....	69
3.4	Erstellung der Pufferkurve.....	70
3.5	pH <sub>i</sub> -Messung .....	72
3.6	Kalibration .....	73
3.7	Messung der NKCC-Aktivität mittels der NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Puls-Technik .....	74
3.7.1	Die NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Technik.....	74
3.7.2	Berechnung der NKCC-Aktivität in Form von Relativwerten .....	78
3.8	Messung der Aktivität eines Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Austauschers .....	79
3.9	cAMP-abhängige Stimulation der NKCC-Aktivität mit Forskolin.....	80
3.10	Messung der NKCC-Aktivität bei CFTR(+ / +) und (- / -) Mäusen .....	82

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.11	Messung der NKCC-Aktivität unter Hemmung basolateraler $K_vLQT_1$ $K^+$ -Kanäle mit 293 B .....	85
3.12	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	88
4	DISKUSSION .....	90
4.1	Diskussion der Versuchsmodelle .....	90
4.1.1	Die semiquantitative PCR .....	90
4.1.2	Isolierung von Kolonkrypten mittels einer EDTA-haltigen Lösung .....	92
4.1.3	Messung von $pH_i$ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF ..	93
4.1.4	Die $NH_4^+$ -Puls-Technik als Methode zur Bestimmung der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransport-Aktivität.....	94
4.2	NKCC bei Zystischer Fibrose .....	96
4.3	Regulation von NKCC durch intrazelluläres cAMP.....	98
5	Zusammenfassung.....	105
6	Literaturverzeichnis .....	107



### 1 EINLEITUNG

#### 1.1 Die Elektrolytsekretion im Gastrointestinaltrakt

Eine der zentralen physiologischen Funktionen des Gastrointestinaltrakts stellt die Elektrolyt- und Wassersekretion dar. Die sezernierte Flüssigkeit stellt das Medium dar, in dem sich der Verdauungsvorgang abspielt: auf der einen Seite diffundieren darin die Verdauungsenzyme zu dem jeweiligen Substrat, auf der anderen Seite gelangen die wasserlöslichen Produkte zur absorbierenden Oberfläche des Epithels. Ein Großteil der sezernierten Flüssigkeit wird von Magen, exkretorischem Pankreas und in Form von Galle produziert, ein entscheidender Teil aber auch vom Darm selbst. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die Flüssigkeitsabsorption, so dass ein Großteil der sezernierten Flüssigkeit wieder reabsorbiert wird (6).

Das dominierende Elektrolyt bei der Sekretion ist  $\text{Cl}^-$ , das von einer parazellulären  $\text{Na}^+$ -Sekretion begleitet wird (27). Die daraus resultierende luminale Akkumulation von  $\text{NaCl}$  stellt den osmotischen Gradienten für das nachfolgende Wasser dar. Auch ein Teil der  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion wird sekundär durch aktive  $\text{Cl}^-$ -Sekretion ermöglicht, indem  $\text{Cl}^-$  über apikale Austauscher mit  $\text{HCO}_3^-$  zirkuliert (45).

Die wichtige Funktion der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion wird deutlich bei Erkrankungen, bei der sie gestört ist: So ist sie bei der Zystischen Fibrose vermindert, bei der sekretorischen Diarrhö erhöht (s. Kap. 1.4).

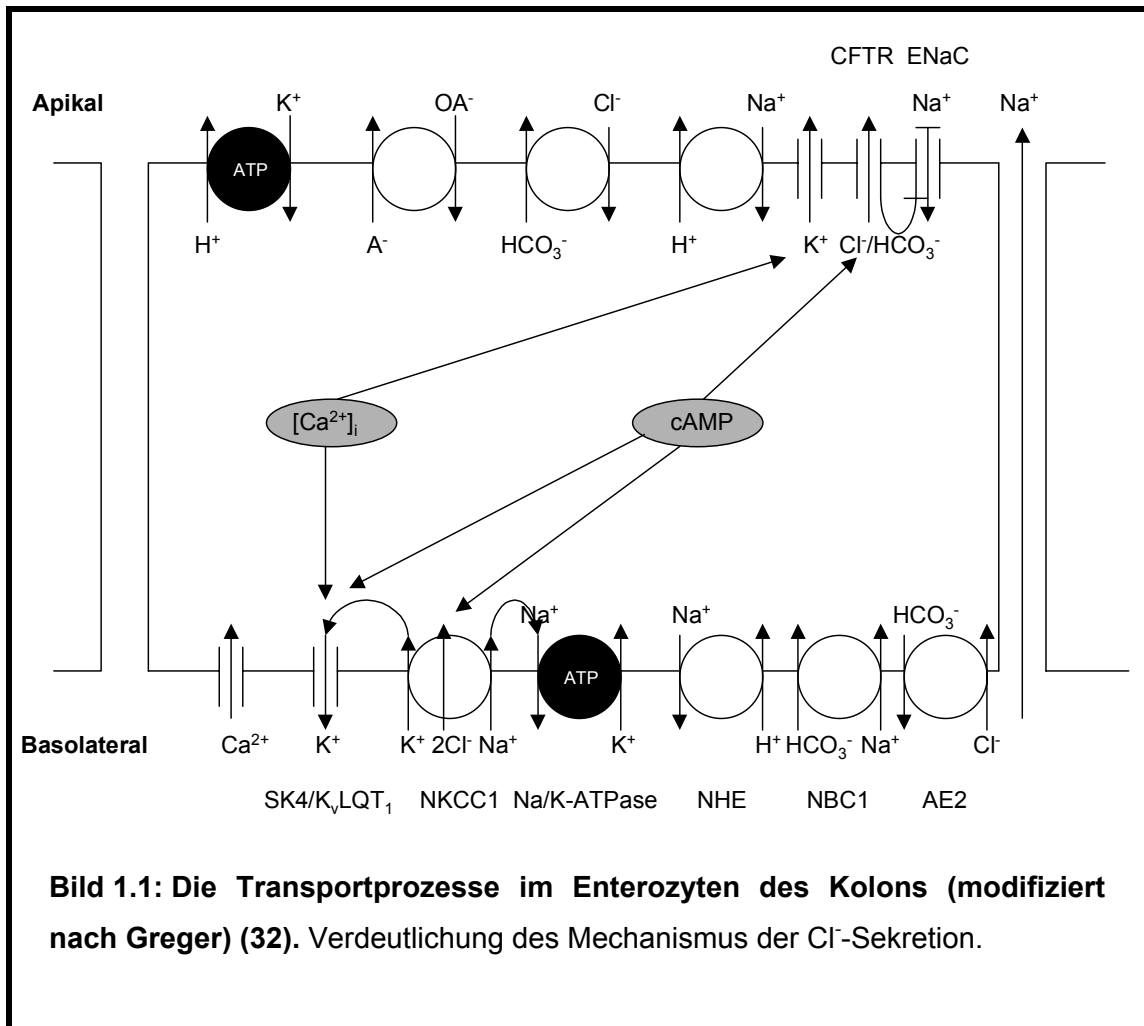
##### 1.1.1 Der Mechanismus der Elektrolytsekretion

Der Mechanismus der Elektrolytsekretion lässt sich in Bild 1.1, das schematisch die Transportprozesse des Enterozyten darstellt, nachvollziehen.  $\text{Cl}^-$  wird basolateral durch den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter aus dem Blut in die Zelle aufgenommen. Das Kolon verfügt darüber hinaus vermutlich mit dem  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter in Verbindung mit einem basolateralen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher über einen alternativen  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme-Mechanismus (85). Die

## 1 EINLEITUNG

---

Triebkraft für den  $\text{Cl}^-$ -Transport via NKCC stammt aus dem großen nach innen gerichteten  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradienten, der von der basolateralen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktiv aufgebaut wird. Man spricht daher von NKCC als einem sekundär aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transporter. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist außerdem für den Aufbau des negativen Membranpotentials der Zelle verantwortlich, das eine Triebkraft für die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion darstellt. Durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase findet eine Zirkulation des von NKCC aufgenommenen  $\text{Na}^+$  statt (6). In der basolateralen Membran befinden sich außerdem mindestens zwei  $\text{K}^+$ -Kanäle: der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige SK4 und der cAMP-abhängige  $\text{K}_v\text{LQT}_1$ , der sich gut durch Chromanole wie 293 B, in geringerem Ausmaß durch Barium hemmen läßt. Die  $\text{K}^+$ -Kanäle ermöglichen ein Recycling von  $\text{K}^+$ , verhindern so eine Zelldepolarisation und erhalten damit die elektrochemische Triebkraft für die apikale  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (10).  $\text{Cl}^-$  akkumuliert infolge der basolateralen Aufnahme intrazellulär über seinem elektrochemischen Gleichgewicht und kann so bei Öffnung apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle nach außen strömen. Der Hauptteil dieser apikalen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion erfolgt durch den cAMP-abhängigen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). CFTR steht in enger Beziehung zu dem apikalen  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC: Aktivierung von CFTR hemmt ENaC und umgekehrt. So wird auf elegante Weise das Dilemma der Zelle gelöst, während Netto-Absorption durch apikale und basolaterale NaCl-Aufnahme eine intrazelluläre Akkumulation von Salz, ein Schwellen der Zelle und ein mögliches Platzen zu riskieren. Dieser Mechanismus ermöglicht es der Zelle, eine Umkehr des Elektrolyt- und Wassertransports von Absorption auf Sekretion zu bewerkstelligen (32). Im Kolon weist der Transporterbesatz Besonderheiten auf, er ändert sich entlang der Krypten-Villi-Axe und mit ihm die funktionellen Eigenschaften: Aldosteron-regulierte  $\text{Na}^+$ -Absorption findet in den oberflächlichen Zellen durch EnaC statt, im unteren und mittleren Kryptenteil hingegen die hormonell oder autokrin regulierte cAMP-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (27,32).



### 1.1.2 Regulation der Elektrolytsekretion

Der Mechanismus der Cl<sup>-</sup>-Sekretion beinhaltet ein Netzwerk aus verschiedenen Regulationsmechanismen, die sowohl kurz- als auch langfristigen Anforderungen an die Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion gerecht werden müssen. Diese komplexen Kontrollmechanismen ermöglichen deren Feineinstellung unter einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen (37).

Die Regulation des epithelialen Transports im Darm und anderen Epithelien erfolgt über vier Hauptmechanismen (6):

## 1 EINLEITUNG

---

Erstens kann die Funktion der Transporter direkt durch zelluläre Faktoren, sog. *second messenger* beeinflusst werden. Bei der Regulation der Cl<sup>-</sup>-Sekretion sind mindestens drei *second messenger* beteiligt (s. Bild 1.1) (32):

Der wichtigste unter ihnen ist das zyklische Adenosinmonophosphat, kurz cAMP. Es wird gebildet indem ein Hormon an einen G<sub>s</sub>-Protein gekoppelten Rezeptor bindet und durch Dissoziation von G-Proteinen die membranständige Adenylatzyklase aktiviert. Beispiele für solche Hormone im Gastrointestinaltrakt sind das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Prostaglandin E<sub>2</sub> oder Forskolin. Die Adenylatzyklase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase und überführt diese so in ihren aktiven Zustand. Diese katalysiert die Phosphorylierung von Proteinen, wobei das Phosphat von ATP geliefert wird. Umgekehrt werden die aktivierten Proteine durch Dephosphorylierung mittels einer Proteinphosphatase wieder in ihren inaktiven Zustand versetzt (57). Auf diese Weise werden im Gastrointestinaltrakt der apikale CFTR-Kanal und der basolaterale K<sup>+</sup>-Kanal vom KvLQT1-Typ aktiviert (63). Außerdem erhöht cAMP vermutlich die Transkription der Transporter und übt somit auch einen langfristigen Effekt aus (s.u.).

Weiterer *second messenger* ist das zyklische Guanosinmonophosphat cGMP. cGMP wirkt ähnlich wie cAMP stimulierend auf die Cl<sup>-</sup>-Sekretion. Es wirkt vermutlich über Aktivierung der Proteinkinase II (PKG II) oder Hemmung einer Phosphodiesterase und daraus resultierendem cAMP-Anstieg.

Auch intrazelluläres Kalzium, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, kann als *second messenger* fungieren. Der basolaterale SK4 K<sup>+</sup>-Kanal unterliegt vermutlich diesem Weg der Stimulation. Über die Existenz Ca<sup>2+</sup>-abhängiger apikaler Cl<sup>-</sup>-Kanäle herrscht noch Unklarheit (s. Kap. 1.4.1) (63).

Eine zweite Möglichkeit der Transporter-Regulation besteht in der kovalenten Veränderung der Transportproteine. Ein Hauptmechanismus stellt hierbei die Phosphorylierung durch Proteinkinasen, wie z.B. Proteinkinase A (PKA) oder C (PKC), bzw. Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen dar (s.o.). So wird

beispielsweise die Kanalfunktion von CFTR durch Phosphorylierung mittels Proteinkinase A sowie C reguliert (7).

Drittens wird die Aktivität der Transporter durch die Anzahl der in die Plasmamembran eingebauten Transporter reguliert, die durch Netto-Einbau bzw. Ausbau verändert werden kann. Membranvesikel, die unterhalb der Plasmamembran lokalisiert sind, enthalten vorgefertigte Transporter, fusionieren auf einen Stimulationsreiz hin mit der Zellmembran und erhöhen so sowohl die Anzahl der Transporter als auch deren maximale Transportgeschwindigkeit. Umgekehrt kann die Zahl der Transporter durch Endozytose verringert werden. Diese Art der Transporterregulation konnte sowohl für NKCC1 als auch CFTR gezeigt werden.

Viertens kann die Anzahl der Transporter auf dem Niveau der Genexpression durch die Transkriptions- und/ oder Translationsrate der entsprechenden Transporterproteine reguliert werden. Diese Form der Regulation zeichnet sich im Gegensatz zu den vorherig beschriebenen durch eine sehr viel langsamere Kinetik aus, da die Regulation hier auf der Stufe der Proteinneusynthese erfolgt. Es ist noch relativ unklar, inwiefern dieser Mechanismus eine Rolle bei der Regulation der Cl<sup>-</sup>-Sekretion spielt.

Die einzelnen an der Cl<sup>-</sup>-Sekretion beteiligten Transporter verfügen darüberhinaus über eigene spezifische Regulationsmechanismen (s. Kap. 1.3.).

### **1.2 Die Kolonkrypte und -zelle**

Ein Großteil dieser Arbeit - v.a. die zellphysiologischen Versuche - wurde am Kolon der Maus durchgeführt, deshalb soll im folgenden auf die Besonderheiten dieses Abschnittes des Gastrointestinaltrakts eingegangen werden.

#### 1.2.1 Funktion von Kolon und Kolonzellen

Die Funktion des Kolons als letzter Abschnitt des Gastrointestinaltrakts besteht in Absorption von Flüssigkeit und Elektrolyten und damit Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, weiterer Verdauung der Nahrung durch Gärung mittels saprophytischer Bakterien, Absorption von kurzkettigen

## 1 EINLEITUNG

---

Fettsäuren sowie Produktion und Aufbewahrung des Stuhls für die Defäkation (32).

Das Epithel der Kolonkrypten ist in der Lage, Flüssigkeit sowohl zu sezernieren als auch absorbieren (70). Im Ruhezustand findet in der Kolonkrypte eine Aldosteron-kontrollierte Netto-Absorption statt (91). Erst unter Stimulation durch Agonisten wie Adenosin, VIP und Prostaglandine, kommt es zur Sekretion vermutlich durch Erhöhung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit und/ oder  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung von  $\text{K}^+$ - und evtl.  $\text{Cl}^-$ -Kanälen (27).

### 1.2.2 Struktur

Um den funktionellen aber auch mechanischen Anforderungen gerecht zu werden, besitzt das Kolon eine spezifische Mukosa, ein Netzwerk aus zirkulären und longitudinalen glatten Muskelfasern, sowie ein intrinsisches und autokrines Nervensystem. Die Mukosa ist im Vergleich zum Dünndarm relativ einfach strukturiert, da sie nur aus Krypten, nicht aus Villi besteht. Sie setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, und zwar den Keimzellen in der Kryptenbasis, chromaffinen Zellen, Becherzellen und Enterozyten (32). Die Kolonkrypte ist somit kein homogener Zellverband, sondern besteht aus Zellen in unterschiedlichen Reifestadien. Man spricht auch von der axialen Heterogenität der Kolonkrypte (27). In der Basis der Krypte befinden sich die unreifen Keimzellen, die dann in Richtung Oberflächenepithel wandern und zum Enterozyten heranreifen (70). Dieser Reifungsprozess wird von einer Änderung der funktionellen Eigenschaften der Zellen begleitet: Hormonell oder autokrin regulierte cAMP-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion findet im unteren und mittleren Kryptenteil statt, in den oberflächlichen Zellen reguliert Aldosteron die  $\text{Na}^+$ -Absorption durch EnaC. Karbachol oder Acetylcholin aktivieren die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion entlang der gesamten Kryptenaxe (27,32).

Die Oberfläche der Kolonschleimhaut wird von einem Schleim überzogen, der von den Becherzellen produziert und dessen Zusammensetzung durch Wasser- und Elektrolyttransport modifiziert wird (32).

### 1.3 Die Transportproteine der Elektrolytsekretion

Im folgenden sollen die an der Elektrolytsekretion beteiligten wichtigsten Transportproteine kurz im einzelnen dargestellt werden.

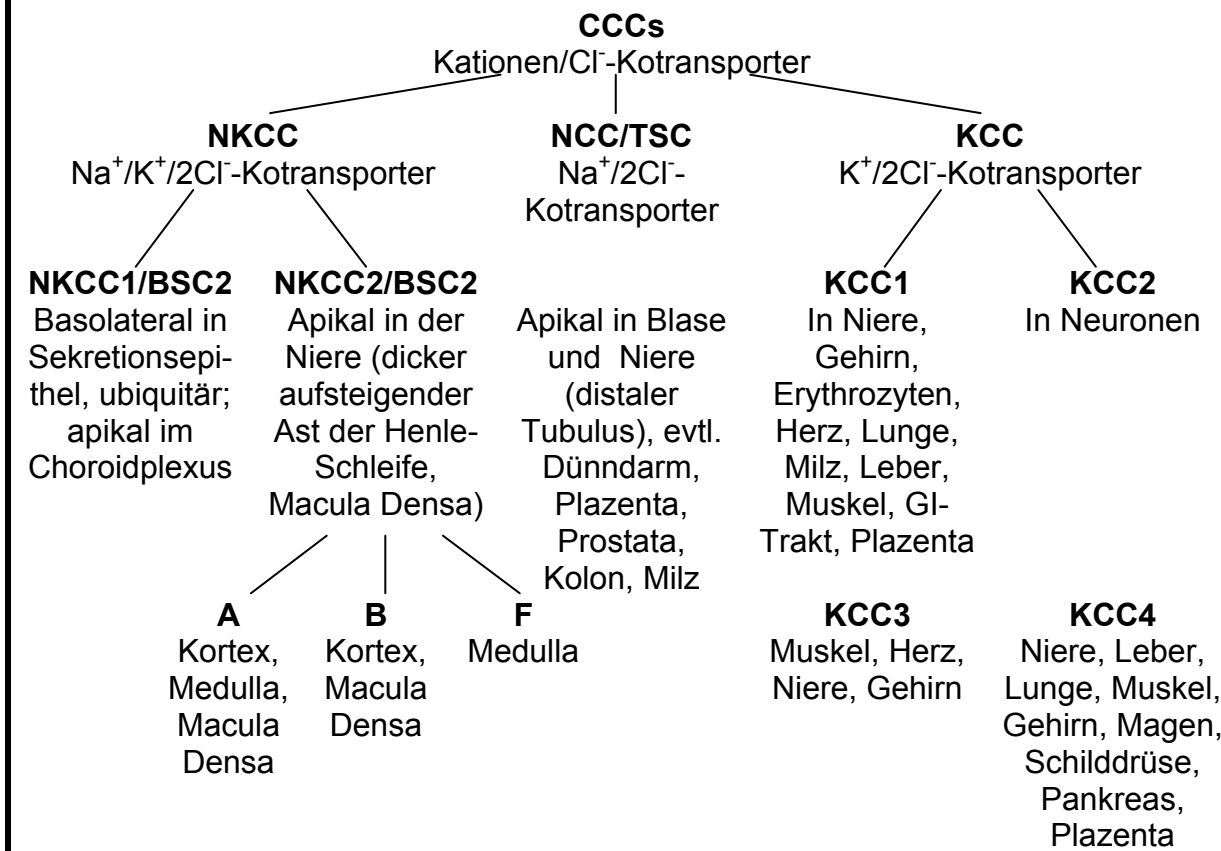
#### 1.3.1 Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC)

1970 beschrieben Wiley und Cooper zum ersten mal einen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Kotransporter in roten Blutkörperchen, der sich durch Furosemid hemmen ließ. Erst zehn Jahre später konnten Geck et al. 1980 in einer bahnbrechenden Veröffentlichung die grundlegenden Eigenschaften des  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransports in Ehrlich Aszites Tumorzellen demonstrieren. Die weitere Erforschung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter gestaltete sich zu Beginn schwierig, da sie durch ihren elektroneutralen Transport der patch-clamp-Methode nicht zugänglich sind, und auch keine Erfolge mit subzellulären Präparationen erzielt werden konnten. Erhebliche Fortschritte im Verständnis von Funktion und Regulation wurden erst gemacht, als 1994 die cDNA-Klonierung von NKCC aus der Rektaldrüse des Haifisches gelang und dadurch spezifische Antikörper entwickelt werden konnten (37).

Der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC) gehört zu der Superfamilie der Kationen/ $\text{Cl}^-$ -Kotransporter (CCC). Neben NKCC1 (CCC1) und NKCC2 (CCC2) gehören dazu außerdem der  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter NCC (CCC3) und die  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter KCC1, 2, 3 und 4. Nach der Inhibitor-Spezifität werden sie in Bumetanid-sensitive (BSC) und Thiazid-sensitive Kotransporter (TSC) unterteilt (s. Tabelle 1.1) (37,103).

## 1 EINLEITUNG

**Tabelle 1.1: Die Kationen/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (CCC)-Superfamilie.** Unterteilung und Organexpression (modifiziert nach Haas et al.) (37).



Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter werden in zwei Isoformen unterteilt:

NKCC1, auch Bumetanid-sensitiver Kotransporter 2 (BSC2) genannt, kommt ubiquitär in vielen Zellen vor, wird aber v.a. in Sekretionsepithelien, aber auch in Herz-, Skelettmuskel- und Nervenzellen exprimiert. Er ist in der Regel in der basolateralen Zellmembran lokalisiert, nur im Choroidplexus kommt NKCC1 apikal vor.

Die zweite Isoform, NKCC2 oder BSC1, ist nierenspezifisch und wird dort in der apikalen Membran der Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife und der Makula Densa exprimiert (31,37,51,81).



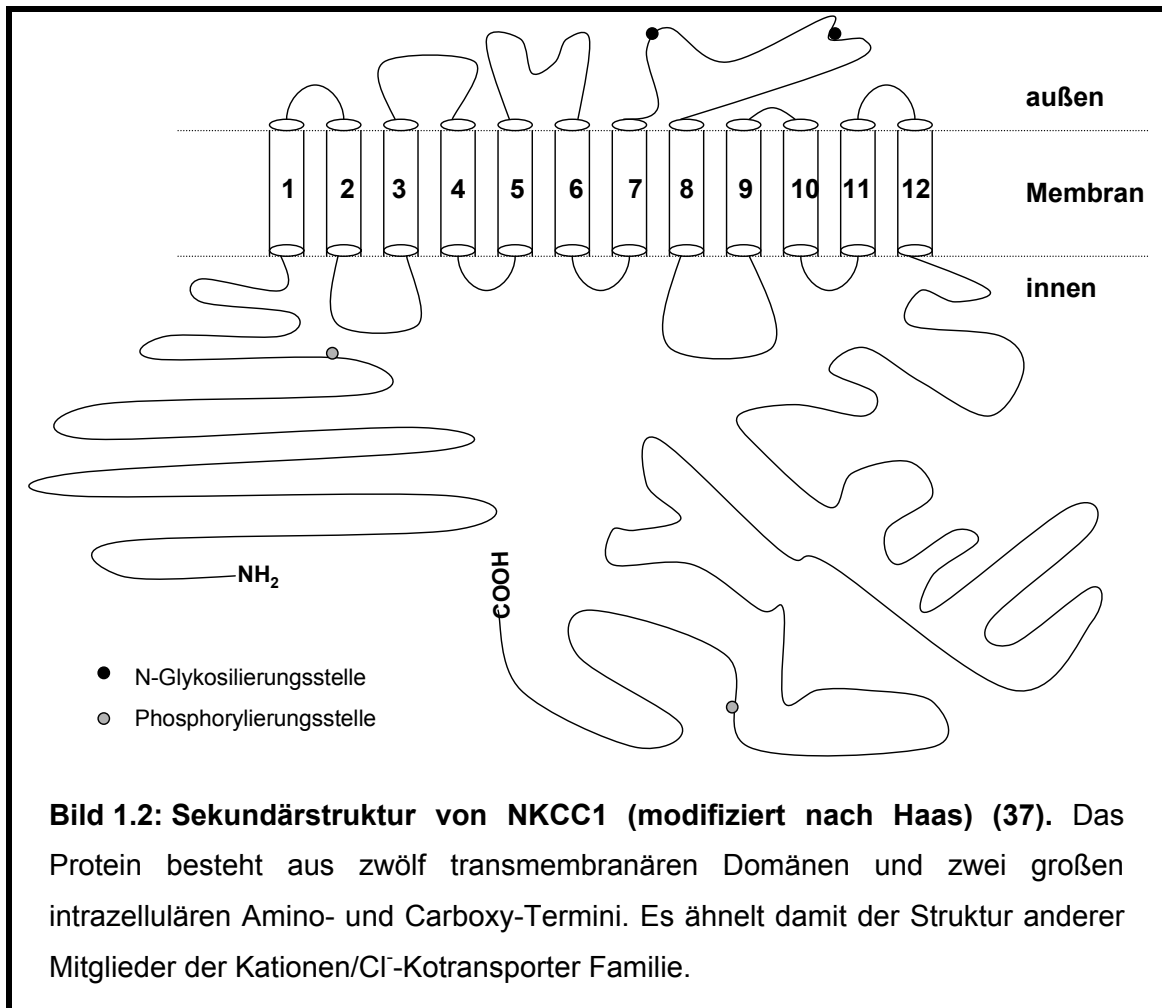
### 1.3.1.1 Struktur und Kinetik

Die Molekularstruktur von NKCC1 gleicht der der anderen Kationen/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (s. Bild 1.2):

Eine 7-7,5 kb lange cDNA kodiert ein ca. 1205 Aminosäuren langes Protein mit einer Masse von etwa 130 kDa (47).

Die hydropathische Analyse der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Kyte-Doolittle Alogarithmus zeigt, dass NKCC1 zwölf transmembranäre Domänen besitzt, an deren Enden zwei große hydrophile, intrazelluläre Amino- bzw. Carboxy-Termini hängen. Durch sekundäre Strukturanalyse lassen sich zwei N-verbundene Glykosilierungsstellen an der extrazellulären Schleife zwischen den transmembranären Segmenten 7 und 8 identifizieren. Außerdem finden sich an den Carboxy- und Aminotermini eine cAMP-abhängige Proteinkinase, acht Stellen für Phosphorylierung durch Protein Kinase C und elf für Casein Kinase II (78). Die Analyse mit dem Eisenberg Algorithmus ergibt 15  $\alpha$ -Helices bestehend aus drei kugelförmigen Proteinen am Carboxy- und Aminoende, zwei Oberflächenproteinen, und zehn membranumspannende Segmenten (25). Durch gerichtete Mutagenese erwies sich die zweite transmembranäre Domäne als zuständige Region für die Kationen- und Bumetanid-Bindung, die vierte und siebte für die Cl<sup>-</sup>-Affinität und die Regionen der siebten, elften und zwölften transmembranären Domäne für die Bumetanid-Bindung (47).

## 1 EINLEITUNG



Die Stöchiometrie von NKCC beträgt in der Regel  $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ . Damit handelt es sich um einen elektroneutralen Transport, der folglich das Membranpotential der Zelle nicht beeinflusst.

NKCC wird als sekundär aktiver Transporter bezeichnet, d.h. er nutzt den von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktiv aufgebauten  $\text{Na}^+$ -Gradienten, um  $\text{Cl}^-$  gegen seinen elektrochemischen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Von diesem transmembranären chemischen  $\text{Cl}^-$ -Gradienten hängt es ab, ob die für NKCC verfügbare Netto-Energie Einwärts- oder Auswärtstransport begünstigt. Unter physiologischen Bedingungen findet in den meisten Zellen ein Netto-Einwärtstransport durch NKCC statt (37).

Es sei noch zu erwähnen, dass NKCC anstelle von  $\text{K}^+$   $\text{NH}_4^+$  transportieren kann. Dies ist v.a. bei NKCC2 in der Niere von physiologischer Relevanz, wo

NKCC eine mögliche Rolle in der  $\text{NH}_4^+$ -Zirkulation und somit bei der Säureausscheidung spielt. Von dieser Eigenschaft wird aber auch in zahlreichen Versuchen Gebrauch gemacht (79).

### 1.3.1.2 Expression und Funktion

NKCC1 kommt ubiquitär in den meisten Zellen vor. Die Expression in den Sekretionsepithelien des Gastrointestinaltrakts, v.a. in Speicheldrüse, Magen und Kolon ist am höchsten, nämlich 30-50 mal so hoch wie in anderen Zellen (31,95). In Niere, Skelettmuskel, Hoden, Lunge, Herz und Gehirn ist die Expression hoch, in Jejunum, Trachea und Thymus dagegen niedrig. Gar nicht exprimiert wird NKCC1 nur in Leber und Milz (25). Im Gastrointestinaltrakt weist die lokale Expression von NKCC1 Besonderheiten auf, sie beschränkt sich auf die Villi und die Kryptenbasis und bricht abrupt an der Spitze der Krypten ab (24,27,32).

Das weit verbreitete Vorkommen von NKCC deutet auf seine wichtige Aufgabe bei dem Erhalt der zellulären Homeostase hin: seine zentrale Funktion besteht in einem elektroneutralen Salzeinwärtstransport, dadurch wird Wasser osmotisch nachgezogen. Er dient damit der Aufrechterhaltung von intrazellulären Ionenkonzentrationen, v.a. aber dem Aufbau einer intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration über dem elektrochemischen Gleichgewicht.

Die Rolle von NKCC in der Zellvolumenregulation ist noch nicht vollständig geklärt. Zellschrumpfung führt in den meisten Zellen zu einer Aktivierung von NKCC, indem es zur Phosphorylierung und Insertion von zusätzlichen Transporterproteinen kommt. Möglicherweise unterscheidet sich seine Funktion bei der Zellvolumenregulation in den verschiedenen Zelltypen (79). Besonders in nicht-polarisierten Zellen wie Muskelzellen und roten Blutkörperchen reagiert NKCC1 besonders empfindlich auf Zellschrumpfung (25).

Aus seiner Funktion in der Regulation des Zellvolumens resultiert die Rolle von NKCC in Wachstum und Entwicklung der Zellen. Für die Zellteilung ist eine gewisse Zunahme des Zellvolumens notwendig, die durch Ioneneinwärtstransport bewerkstelligt wird. NKCC spielt hierbei erwiesenermaßen evtl. zusammen mit NHE und Aminosäureaufnahme eine

## 1 EINLEITUNG

---

Rolle. Das genaue Zusammenspiel sowie die Bedeutung von NKCC in der DNA-Synthese ist noch weitgehend ungeklärt (79).

In Salz- und Flüssigkeits-sezernierenden Epithelien wie Speicheldrüse und im Gastrointestinaltrakt ist NKCC1 ein wesentlicher Baustein der transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion indem er die basolaterale Aufnahme von Ionen, v.a. von  $\text{Cl}^-$ , bewerkstelligt, das dann apikal durch cAMP-abhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sezerniert wird (s. Kap. 1.1.1) (37,79).

NKCC2 wird ausschließlich in der Niere exprimiert. Die Funktion von NKCC2 in den Zellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife und der Makula Densa besteht in der Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und der Osmolarität. Im salzabsorbierenden Epithel der Henle-Schleife dient NKCC2 zusammen mit apikalen  $\text{K}^+$ -Kanälen, basolateralen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase der  $\text{NaCl}$ -Rückresorption (37,51). Außerdem ist er an der Regulation der  $\text{NH}_4^+$ -Absorption beteiligt, da NKCC wie schon erwähnt die Fähigkeit besitzt, anstelle von  $\text{Na}^+$   $\text{NH}_4^+$  zu transportieren (31). In der Macula Densa spielt NKCC2 möglicherweise zusammen mit NKCC1 eine Rolle beim tubuloglomerulären Feedback und der Reninsekretion (51).

### 1.3.1.3 Regulation und Inhibitoren

Die Regulation von NKCC ist eng mit der anderer Transporter verknüpft, die an der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion beteiligt sind, insbesondere mit CFTR. Auf diese Weise kann der Erhalt von Zellvolumen und -integrität während aktiver Salz- und Wassersekretion gewährleistet werden (37). Als Angriffspunkte für die Regulation gelten dabei die gleichen vier Hauptmechanismen wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben:

Eine Aktivierung von NKCC kann durch zelluläre Faktoren wie VIP, Adenosin, Prostaglandine oder Forskolin erfolgen, die über Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$  wirken (37). Welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen ist u.a. Gegenstand dieser Arbeit und soll deshalb im Kapitel 4.3 diskutiert werden.

Es gilt als gesichert, dass die NKCC1- und evtl. auch die NKCC2-Aktivität durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung mittels intrazellulärer Proteinkinase- und/ oder Phosphatase-Kaskaden reguliert wird (80,61,78). Da

die verschiedenen Stimuli nicht additiv wirken, ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung den letzten gemeinsamen Schritt unterschiedlicher Transduktionsmechanismen darstellt. Sie erfolgt an Serin- und Threonin-, nicht jedoch an Tyrosin-Resten (37). Unklarheit herrscht noch über die Identität der hierfür zuständigen Proteinkinasen. Es wurden 20 Konsensus Sequenzen für Kinasen in der zytoplasmatischen Domäne von NKCC identifiziert, darunter Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) sowie die Kasein-Kinase II (CK2). Die Rolle von PKA und PKC bei der Regulation von NKCC scheint erwiesen, ihre Funktion ist jedoch verwirrend: je nach Zelltyp und Stimulus wurde Aktivierung, Hemmung oder auch keine Beeinflussung beschrieben. Weder für CK2 noch für die diskutierte Myosin-Leichketten-Kinase gibt es bis jetzt gesicherte Daten über eine Funktion in der Regulation von NKCC (79). Gleichzeitig müssen als Gegenspieler der Proteinkinasen Phosphatasen vorhanden sein, die für die Inaktivierung von NKCC durch Dephosphorylierung zuständig sind. Funktionell sind sie teilweise charakterisiert, ihre genaue Struktur und Funktion liegen jedoch noch im Dunkeln (37,79).

Unter bestimmten Bedingungen wird die NKCC-Aktivität möglicherweise durch die Anzahl der in die Plasmamembran eingebauten Transporter reguliert (24). So konnte unter Einfluss von cAMP-abhängigen Agonisten eine vermehrte Bumetanid-Bindung an die basolaterale Membran festgestellt werden, als möglichen Hinweis auf einen vermehrten Transporter-Einbau von NKCC. Gleichzeitig lässt sich eine verminderte Transporter-Dichte unter Einfluss von bestimmten Stoffen feststellen, die die Endozytose fördern, wie z.B. der Phorbolester PMA.

Es ist beschrieben, dass chronische Furosemid- oder Salzgabe zu einer erhöhten mRNA- und Protein-Expression von NKCC2 führt. Ob dies einen wesentlichen Regulationsmechanismus von NKCC darstellt ist jedoch nicht klar.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Regulation von NKCC stellt  $[Cl^-]_i$  in Form eines negativen Feedbacks dar. Die Arbeitsgruppe von Forbush stellte 1992 die sog. „Hypothese der  $[Cl^-]_i$ -Kopplung“ auf. Diese besagt, dass eine enge Kommunikation zwischen verschiedenen Transportmechanismen der

## 1 EINLEITUNG

---

apikalen und basolateralen Membran stattfindet, wobei  $[Cl^-]_i$  das entscheidende Bindeglied darstellt. Unter apikaler  $Cl^-$ -Sekretion soll dadurch eine konstante  $[Cl^-]_i$  gewährleistet werden. Die 10 bis 30-fache Zunahme der NKCC-Aktivität unter apikaler  $Cl^-$ -Sekretion kann jedoch nicht alleinig durch die gesteigerte Triebkraft resultierend aus den veränderten Ionenkonzentrationen erklärt werden. Forbush et al. schlugen deshalb eine Aktivierung von NKCC durch Phosphorylierung unter niedriger  $[Cl^-]_i$  vor. Tatsächlich konnte unter niedriger  $[Cl^-]_i$  eine parallele Zunahme von NKCC-Aktivität und Phosphorylierung des Transporters festgestellt werden (30,79).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ein saurer  $pH_i$  NKCC hemmt, Veränderungen des extrazellulären  $pH$ s scheinen hingegen wenig oder keinen Einfluss so haben (79).

Als weiterer Angriffspunkt der NKCC-Regulation werden die Proteine des Zytoskeletts diskutiert. Sie sollen auf Veränderungen des Zellvolumens reagieren und diese Antwort über das kortikale Zytoskelettnetzwerk von Aktin und anderen Proteinen an die Transporter der Plasmamembran weitergeben können (37). Dabei ist es denkbar, dass die Aktivierung von NKCC bei Zellschrumpfung Resultat eines Zusammenspiels von Aktin,  $[Cl^-]_i$  und ATP-abhängiger Phosphorylierung ist. Eine evtl. Rolle spielen auch die Myosin-Leichtketten (MLCs), die bei Zellschrumpfung aktiviert werden (37). Der Regulationsmechanismus über die Zytoskelett-Proteine dient somit vermutlich der Regulation des Zellvolumens. Heitzmann et al. schlugen sogar vor, dass Zellschrumpfung das Schlüsselereignis in der Regulation von NKCC darstellt (43).

Shumaker et al. untersuchten NKCC-Expression sowie dessen Funktion in Abhängigkeit von exprimiertem CFTR in kultivierten Drüsenzellen des Pankreas. Das Expressionsniveau von NKCC lag dabei in CFTR-transfizierten Zellen etwa doppelt so hoch wie in Zellen ohne CFTR. Mit Hilfe der  $NH_4^+$ -Technik wurde die funktionelle Aktivität von NKCC gemessen, und auch hier zeigte sich eine gesteigerte Aktivität von NKCC in den CFTR-transfizierten Zellen. Shumaker et al. folgerten aus diesen Ergebnissen, dass CFTR für die

Regulation von NKCC eine entscheidende Rolle spielen könnte und vermuteten einen indirekten Regulationsmechanismus über  $[\text{Cl}^-]_i$  (88).

Effektive und spezifische, komplett reversible Hemmstoffe der NKCC-Transporter stellen die 5-Sulfamoyl-Benzoinsäure Schleifendiuretika dar. In der Reihenfolge der aufsteigenden Potenz und Spezifität sind dies Furosemid, Bumetanid und Benzmetanid. Eine weitere Untergruppe der Schleifendiuretika mit einem Tetrazolat an Position 1 stellen die Azosemide dar, die im Kolon NKCC am effektivsten hemmen (69). Die halbmaximale Hemmkonzentration  $\text{IC}_{50}$  liegt bei ca. 20  $\mu\text{mol/l}$ , wobei sich die  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter verschiedener Organe in ihrer Sensitivität gegenüber Schleifendiuretika unterscheiden (27). Auch wenn die Spezifität der Schleifendiuretika zu NKCC relativ hoch ist, so sind sie in höherer Konzentration auch in der Lage, andere Anionen Transporter wie den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher,  $\text{Cl}^-$ -Kanäle oder KCC zu hemmen.

Die spezifische Hemmung von NKCC durch Schleifendiuretika hat ganz wesentlich zu der Erforschung und dem Verständnis von NKCC beigetragen. Sie werden routinemäßig eingesetzt, um NKCC-Fluxe zu identifizieren, außerdem spielten sie eine wichtige Rolle in der Identifikation des Proteins, in der daraus folgenden Klonierung und der Interpretation der Ionenbindungen.

Zur Aktivierung von NKCC können alle Stoffe verwendet werden, die  $[\text{cAMP}]_i$  erhöhen. Im GI-Trakt kann dies durch VIP,  $\text{PGE}_2$  oder Forskolin erfolgen.

### 1.3.2 CFTR

Der apikale  $\text{Cl}^-$ -Kanal CFTR stellt den Hauptweg der apikalen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion dar. Seit seiner Klonierung im Jahre 1989 (72) explodieren neue Erkenntnisse über Struktur, Funktion und funktionelle Konsequenzen bei Vorliegen verschiedener Mutationen regelrecht (12).

CFTR ist ein großes Protein, das als Dimer in der apikalen Membran vieler Zellen vorliegt. Seine zwölf membranumspannenden Regionen bilden die Pore, außerdem besitzt der Kanal zwei Nukleotidbindungsstellen sowie eine große regulatorische Domäne innerhalb der Zelle (102). Es konnte gezeigt werden,

## 1 EINLEITUNG

---

dass CFTR auch in der Lage ist,  $\text{HCO}_3^-$  zu transportieren, wenn auch in geringerem Ausmaß als  $\text{Cl}^-$  (34,86).

Die Regulation von CFTR erfolgt in zwei Stufen: Zuerst wird die regulatorische Domäne von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert, gefolgt von Nukleotidbindung und -Hydrolyse an der Nukleotidbindungsstelle. Beide Stufen sind notwendig für die Öffnung des Kanals. Weiterer Angriffspunkt der Regulation von CFTR ist der cAMP-abhängige Einbau von Kanal-bestückten Membranvesikeln, wobei dieser Mechanismus evtl. gewebespezifisch ist (6). Folglich kommt es zu einer Aktivierung von CFTR unter Einfluss sämtlicher Agonisten, die zu einer Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$  führen. Außerdem erfolgt eine sekundäre Aktivierung von CFTR durch cGMP evtl. mittels einer Typ II cGMP-abhängigen Proteinkinase oder Aktivierung von PKA unter hohen cGMP-Konzentrationen (88).

### 1.3.3 $\text{K}^+$ -Kanäle

Bei den an der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion beteiligten  $\text{K}^+$ -Kanälen unterscheidet man zwei Typen: der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige SK4 kann durch Clotrimazol oder Charybdotoxin gehemmt und 1-Ethyl-2-Benzimidazolinone aktiviert werden (9). Der cAMP-abhängige  $\text{K}_v\text{LQT}_1$  ist ein Kanal mit sehr kleiner Leitfähigkeit, der in vielen Epithelien vorkommt. Er lässt sich durch das Chromanol 293 B und Barium hemmen (10,101).

Die  $\text{K}^+$ -Kanäle sind in der basolateralen Membran lokalisiert und bewirken einen aktiven  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom. Das durch NKCC aufgenommene  $\text{K}^+$  kann so rezirkulieren, so dass das negative Membranpotentials erhalten bleibt. Die  $\text{K}^+$ -Kanäle bilden somit einen essentiellen Baustein der cAMP-abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (66).



### 1.4 Die Pathophysiologie der Elektrolytsekretion

#### 1.4.1 Die Zystische Fibrose

Die Zystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der eine Mutation des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR)-Gens vorliegt, das den apikalen Cl<sup>-</sup>-Kanal kodiert. Es sind über 700 verschiedene Mutationen des CFTR bekannt, wobei 75% der Patienten eine Mutation aufweisen, die eine drei Basenpaar-Deletion im Exon 10 betrifft, die in einem Verlust von Phenylalanin 508 ( $\Delta F508$ ) resultiert (12,71). Dadurch kann CFTR nicht in seiner vollständig glykosylierten Form gebildet und in die Plasmamembran eingebaut werden, das mutierte Protein bleibt im endoplasmatischen Retikulum bis es abgebaut wird (34). Die Mukoviszidose betrifft ca. einen von 2000 Europäern, jeder 20. Kaukasier (5%) ist heterozygoter Merkmalsträger (5). Sie ist damit die häufigste genetisch vererbte Erkrankung in Europa. Angesichts dieser Häufigkeit von CF-Heterozygoten wird seit langem ein genetischer Selektionsvorteil dieser Population diskutiert. Bakteriell induzierte Diarrhöen wie die Cholera sollen bei Heterozygoten einen weniger schweren Verlauf nehmen, und sie vor der Toxinvermittelten, oft lebensbedrohlichen Dehydratation schützen. Dies könnte in der Evolution einen genetischen Vorteil dargestellt haben und so zu der hohen Inzidenz von CF geführt haben (32).

Die klinischen Manifestationen resultieren primär aus der mangelhaften Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>- und Wassersekretion, sekundär aus der verstärkten NaCl- und Wasserabsorption durch fehlende Hemmung der Na<sup>+</sup>-Rückresorption. Dies führt dazu, dass ein zäher Schleim in Respirations- und Gastrointestinaltrakt produziert wird, der zu Obstruktion, Dilatation und Infektion führt (32).

Im Gastrointestinaltrakt manifestiert sich der CFTR-Defekt in Form von distalen intestinalen Obstruktionen (DIOS) - beim Neugeborenen bei 10% der Patienten in Form eines Mekonium-Ileus, Maldigestion infolge einer progressiven exkretorischen, später auch endokrinen Pankreasinsuffizienz, Malabsorption, abnormer Gallensäuresekretion, Leberzirrhose, hepatobiliärer Cholestase und

## 1 EINLEITUNG

---

Pankreatitis (5). In der Lunge kommt es durch die Sekretion eines besonders zähen Schleims zu rezidivierenden, bakteriellen Infektionen, die das Lungenparenchym zerstören, fibrotisch umwandeln und in Form einer respiratorischen Insuffizienz den limitierenden Faktor von Lebensqualität und -erwartung der Patienten darstellen. Die Patienten weisen eine erhöhte Salzkonzentration im Schweiß auf, da in den Schweißdrüsen anders als in den anderen Organen die NaCl-Rückresorption über CFTR erfolgt. Dies dient mittels des Schweißtests zur Diagnose der Zystischen Fibrose (12). Die meisten männlichen Patienten sind unfruchtbar, was auf eine Obstruktion und/oder Atresie der Vas deferens und distale Epididymitis zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu ist bei den weiblichen Patientinnen eine Konzeption möglich, die Fruchtbarkeit ist allerdings durch ungünstige vaginale und zervikale Bedingungen, die die Motilität der Spermien hemmen, eingeschränkt.

Während bis vor wenigen Jahrzehnten noch ein Großteil der CF-Patienten im ersten Lebensjahr starb, liegt die Lebenserwartung heutzutage bei etwas über 30 Jahren. Dieser Erfolg in Verbesserung von Lebensdauer und -qualität ist hauptsächlich auf eine verbesserte Therapie und gezieltere Behandlung zurückzuführen. Sie umfasst eine Pankreasenzymsubstitution, die Gabe neuer Antibiotika, bessere Inhalationsmöglichkeiten mit wirksameren Medikamenten, eine konsequente Physiotherapie sowie eine spezielle, fettreiche Ernährung (5). Neue Medikamente wie UTP zur Aktivierung möglicher alternativer Cl<sup>-</sup>-Sekretionsmechanismen, Amilorid zur Hemmung der gesteigerten Na<sup>+</sup>-Absorption oder Glycerol und Natriumbutyrat zur Stabilisierung bzw. Einbau des defekten  $\Delta F508$  Proteins sind in der Entwicklung.

Widersprüchliche Meinungen gibt es hinsichtlich der Frage, ob noch andere apikale Cl<sup>-</sup>-Kanäle neben CFTR an der Cl<sup>-</sup>-Sekretion im Darm beteiligt sind. Für deren Existenz gibt es funktionelle, molekulare und immunhistochemische Hinweise sowohl im intakten Darmepithel als auch in intestinalen Zelllinien (29,40,41,48). Diese Frage ist besonders interessant, da hiermit eine Möglichkeit bestünde die gastrointestinalen Symptome von Patienten mit Zystischer Fibrose zu lindern. Trotz zahlreicher Versuche verschiedener Arbeitsgruppen diese alternativen Anionen-Sekretionswege pharmakologisch

zu aktivieren, blieb dies im CF-Intestinaltrakt zum Großteil erfolglos (34,49,86). Möglicherweise wird die kürzlich geglückte Klonierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Familie zur weiteren Aufklärung beitragen. Von den bisher bekannten vier menschlichen Isoformen wird zumindest eine davon, hCaCC1, im Gastrointestinaltrakt exprimiert.

Die Hoffnungen, die in die Gentherapie gesetzt wurden, konnten bisher nicht erfüllt werden. Sowohl liposomale als auch adenovirale Vektoren erwiesen sich als ineffektiv. Ihre Wirkung war, wenn überhaupt, nur von kurzer Dauer (34).

### 1.4.2 Die sekretorische Diarrhö

Eine Vielzahl von Bakterien produziert Enterotoxine, die tiefgreifende Wirkung auf die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion haben und zu einem Krankheitsbild führen, das unter dem Begriff der sekretorischen Diarrhö zusammengefasst wird. Die Reservekapazität der intestinalen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion wird oft als Abwehrmechanismus zum Ausspülen von pathologischen Mikroorganismen verstanden, um so eine Invasion der Mukosa und ein Ausbreiten der Erkrankung zu vermeiden (6).

Das Bakterium *Vibrio cholerae* stellt v.a. in den Entwicklungsländern eine lebensbedrohliche Ursache von Diarrhö dar. Das von ihm produzierte Choleratoxin aktiviert über seine A-Untereinheit die Adenylatzyklase und damit die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion irreversibel (56). Infolgedessen verliert der Patient enorme Flüssigkeits- und Elektrolytmengen von bis zu 20 Litern am Tag. Die Krankheit ist jedoch in der Regel selbstlimitierend und kann gut mit ausreichender Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution behandelt werden.

Enterotoxische Stämme von *Escherichia coli* können zwei Enterotoxine produzieren: Das hitzestabile Toxin  $\text{ST}_b$ , wirkt ähnlich wie das Choleratoxin, das hitzelabile Toxin  $\text{ST}_a$  führt zu einer Erhöhung von  $[\text{cGMP}]_i$ . Sie sind häufige Ursache für die sogenannte Reisediarrhö (8).

Ein weiterer häufiger Erreger von Durchfall ist *Clostridium difficile*, der v.a. im Zusammenhang mit der Einnahme von Antibiotika auftritt. Durch seine beiden

## 1 EINLEITUNG

---

Toxine A und B, Freisetzung von Substanz P und Aktivierung der Mastzellen kommt es zu einer schweren Entzündungsreaktion.

Andere Bakterien wie die Salmonellen erhöhen die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch Invasion des Epithels ohne dass es dabei zur Freisetzung von Toxinen kommt. Aus der Hochregulation verschiedener Chemokine und Adhäsionsmoleküle folgt eine Migration von Neutrophilen. Die produzierten Prostaglandine rufen dann eine autokrine Stimulation der intestinalen Sekretion hervor (28).

Auch Gallensäuren wirken direkt auf die Epithelzellen, indem sie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöhen. Ist die Funktion des Ileums infolge von Krankheit oder Resektion eingeschränkt, gelangen sie ins Kolon, wo sie die Sekretion nennenswert erhöhen können (26).

Im Rahmen der sekretorischen Diarrhö können somit bakterielle Toxine, Entzündungsmediatoren, Hormone oder Neurotransmitter zu einer Flüssigkeitssekretion führen, die über cAMP-abhängige Stimulation der  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion erfolgt. Diese stellt damit einen möglicher therapeutischen Ansatz dar.

### 1.5 Experimentelles Modell und Fragestellung

Neueste Untersuchungen an einer CFTR-defizienten Pankreas-Zelllinie zeigten verminderte Expressionslevel und eine mangelhafte Aktivierung von NKCC1. Dies führte zu der interessanten Hypothese, dass womöglich die Fehlfunktion der basolateralen Anionenaufnahme-Mechanismen und nicht die des apikalen CFTR Ursache des schweren Sekretionsdefekts im Pankreas von CF Patienten darstellen könnte oder zumindest der Grund für die fehlgeschlagenen Stimulationsversuche alternativer apikaler  $\text{Cl}^-$ -Sekretionsmechanismen sein könnte (87,88,93).

Um die Regulation von NKCC in nativem CF-Epithel unabhängig von apikalem CFTR und somit unabhängig von sekundären Mechanismen wie apikaler  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, intrazellulären Ionenkonzentrationen und Zellvolumen zu untersuchen, wurde mangels spezifischer Hemmstoffe für CFTR Zellen von CF Knockout Mäusen mit defektem CFTR-Allel verwendet. Dieses experimentelle

Modell eröffnet die Möglichkeit, Expressionslevel, Transportraten und die cAMP-abhängige Regulation von NKCC in ein und dem selben zellulären System zu untersuchen.

Der gastroenterologische Phenotyp von CF Knockout Mäusen ähnelt stark dem von CF Patienten und ist durch defekte cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, gesteigerte  $\text{Na}^+$ -Absorption und Produktion von zähflüssigem Mukus gekennzeichnet (34,35). 80% der homozygot mutierten Jungen sterben zwischen dem zweiten und fünften Lebenstag an einem perforierten Mekoniumileus, die überlebenden Tiere gedeihen schlecht und wiegen typischerweise nur die Hälfte ihrer gesunden Geschwister. Eine zweite Zeitspanne mit hoher Mortalität liegt etwa um den 21. Lebenstag, dem Zeitpunkt der ersten alleinigen Nahrungsaufnahme. Ältere Tiere leiden v.a. an intestinalen Obstruktionen (5,35,71). Im Gegensatz zu den menschlichen CF Patienten weist das Pankreas von CF Mäusen keine oder nur eine geringe Pathologie auf (34). Die CFTR (-/-) Mäuse zeigen außerdem keinerlei oder kaum Komplikationen im Respirationstrakt. Es wird vermutet, dass im Respirationstrakt der Maus tatsächlich alternative, apikale  $\text{Cl}^-$ -Kanäle existieren (20,34).

Ziel dieser Arbeit war es, genauere Aufschlüsse über NKCC im nativen intestinalen CF-Epithel zu bekommen. Die vergleichenden Versuche an CFTR(+/+) und (-/-) Mäusen zielten dabei auf folgende Fragen ab:

- Unterscheiden sich die mRNA Expressionslevel von NKCC in CFTR(+/+) und (-/-) Mäusen?

Dazu wurde die NKCC1-Expression in Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Niere mit Hilfe der semiquantitativen PCR untersucht.

- Wie verhält sich die funktionelle Transporteraktivität von NKCC in CF-Epithelien unter Ruhebedingungen und während cAMP-abhängiger Stimulation?

Die NKCC-Aktivität wurde zu diesem Zweck mit Hilfe der  $\text{NH}_4^+$ -Puls-Technik in BCECF-gefärbten Kolonkrypten unter Standardbedingungen und unter Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Forskolin gemessen.

## 1 EINLEITUNG

---

Es sollte damit zum einen geklärt werden, inwiefern basolaterale Transportmechanismen in CF-Epithelien zu dem schweren Sekretionsdefekt beitragen oder sogar dessen Ursache sind.

Gleichzeitig sollten neue Aufschlüsse über die cAMP-abhängige Regulation von NKCC gewonnen werden. Es wurden zusätzliche Versuche an Zellen normaler Futtermäuse mit dem Chromanol 293B durchgeführt, um festzustellen, ob eine cAMP-abhängige Stimulation der NKCC-Aktivität auch unter Hemmung basolateraler  $K^+$ -Kanäle und somit fehlender cAMP-abhängiger  $Cl^-$ -Sekretion erfolgen kann.

Die Antworten sollten nicht nur zum besseren Verständnis von physiologischen Ionentransport-Mechanismen der  $Cl^-$ -Sekretion im Gastrointestinaltrakt beitragen, sondern auch die Pathophysiologie der Zystischen Fibrose hinsichtlich Funktion und Regulation der beteiligten Transporter beleuchten, um so unter Umständen der Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung gastroenterologischer Erkrankungen wie der Zystischen Fibrose oder der sekretorischen Diarrhö zu eröffnen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Substanzen, deren Abkürzung bzw. Inhaltsstoffe und die Bezugsquelle aufgeführt. Sämtliche Substanzen waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad. Die Chemikalien für die molekularbiologischen Versuche hatten mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“ oder „für die Molekularbiologie“.

Der Begriff *ddH<sub>2</sub>O* steht für bidestilliertes Wasser, das über eine Milli-Q-Plus Filteranlage gereinigt wurde.

Als *autoklaviert* bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Sanoklav).

#### 2.1.1 Flüssigchemikalien

Substanz	Abkürzung/ Inhaltsstoffe	Bezugsquelle
Aquaphenol		Appligene
Bromphenolblau 0,4 % und 1 % (w/v)		Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma
100 bp DNA Leiter		Gibco BRL
dNTP-Mix	10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Boehringer Mannheim
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma/Merck
Essigsäure	CH <sub>3</sub> COOH	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %		Apotheke
Ethanol absolut		Apotheke
Ethidiumbromid-Lösung		Merck

## 2 MATERIAL UND METHODEN

First Strand Buffer 5 x	250 mM TRIS/HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Gibco BRL
Glyoxal 40 %		Sigma
Guanidiniumisothiocyanat		Fluka
Isopropanol		Merck
2-Mercaptoethanol		Merck/Fluka
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer	500 µg/ml	Boehringer Mannheim
PCR-Puffer 10 x	15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,7 (genaue Zusammensetzung ist Firmengeheimnis)	Qiagen
Q-Lösung 5 x	Die Zusammensetzung ist Firmengeheimnis	Qiagen
Ready Red	Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Appligene
Reaktionspuffer 10 x		
Restriktionsendonukleasen		New England Bio- labs, Boehringer Mannheim
RNA Leiter		Gibco BRL
Salzsäure	HCl	Merck
Spezifische Primer: forward Primer reverse Primer	für 18s rRNA	Ambion, Austin, TX, USA Gibco BRL
Steriles, bidestilliertes Wasser	Ampuwa	Fresenius
Super Script II Rnase H <sup>-</sup>	M-MLV reverse Transkriptase, 200 u/µl	Gibco BRL
Taq-Polymerase	5 u/µl	Qiagen/Sigma



## 2 MATERIAL UND METHODEN

TBE-Puffer 10 x	108 g TRIS-Puffer 55 g Borsäure 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	Merck
Wasserstoffperoxyd 5 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck

### 2.1.2 Feststoffe

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Agarose	DNA Typing Grade	Gibco BRL
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Azosemid		Sanofi-Synthe- labo, Berlin
2'-7'-biscarboxyethyl-5(6)- Carboxyfluorescein-Azetoxymethylester	BCECF	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Bariumchlorid	BaCl <sub>2</sub>	Merck
Bovines Serum Albumin, Zellkultur Grad	BSA	Paesel und Lorei, Frankfurt
Borsäure		Merck
4,4'Diisothiocyanostilbene-2,2'- Disulfonsäure	DIDS	Sigma
Di-Kalium-Hydrogen-Phospat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Dithiothreitol	DTT	Gibco BRL
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>3</sub>	Sigma, Merck
Forskolin		Sigma
Gluconsäurelacton		Merck
Glucose	Glc	Merck
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan- Sulfonsäure	HEPES	Merck
Kalium-Chlorid	KCl	Merck
Kalium-di-Hydrogen-Phospat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Kalium-Glukonat	K-Glc	Merck
Kalzium-Chlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub>	Merck
Kalzium-Glukonat	Ca-Glc	Merck
Magnesium-Chlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub>	Merck
Magnesium-Sulfat	MgSO <sub>4</sub>	Merck
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na	Merck
Natrium-Chlorid	NaCl	Merck
Natrium-Glukonat	Na-Glc	Merck
Natriumhydroxid (Natronlauge)	NaOH	Merck
(Di-)Natrium-Phosphat	NaPO <sub>4</sub> , NaHPO <sub>4</sub>	Merck
Natrium-Pyruvat	Na-Pyruvat	
Nigericin		Sigma
Sarcosyl (N-Lauryl-Sarcosin) 10 %	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa	Sigma
Natrium-Dodocylsulfat 10 %	SDS	Sigma/Merck
Tetra-Methyl-Ammonium-Chlorid	TMA-Cl	Sigma
Tetra-Methyl-Ammonium-Hydroxid	TMA-OH	Merck
Trinatriumdicitrat	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck
Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan	TRIS	Merck

### 2.1.3 Gase

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
100 % Sauerstoff, medizinischer Grad	O <sub>2</sub>	Aga
Kohlendioxid	CO <sub>2</sub>	Aga

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

In dieser Tabelle sind die Verbrauchsmaterialien und die jeweilige Bezugsquelle aufgelistet.

Material	Typ	Bezugsquelle
Deckgläschen	18 x 18 mm	Menzel
Deckgläschen	∅ 24 mm, rund	Laboroptik, Friedrichsdorf

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Einmalspritzen	2/5/10 und 20 ml	Inject
Filter	Millex-GS, 22 µm	Millipore
Filterpipettenspitzen		AGS
Gelelektrophorese-Kammern	DNA Mini Sub Cell DNA Sub Cell	Bio Rad
Kanülen	20 G 1½, 0,9 x 40 mm	Braun
Knopfkanülen		
Küvette	Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas	Beckman
Ligatur	Mersilone 3/0,45 cm	Ethicon
Messkammer Einsatz		Bellco Glass, NJ, USA, handge- fertigt in Uppsala
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel
Pasteurpipetten	150 und 230 mm	Hirschmann
Pipetten, sterile, serologische	5 und 20 ml	Falken
Pipettenspitzen	10/100/1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	5 ml	Roth
Polycarbonat-Membranfilter	25 mm, 3 µm Porengröße	Osmonics Inc, Minnetonka, Minnesota, USA
Polypropylen-Röhrchen	2 ml Schraubdeckel-Rea- genzgefäße 20 ml Ultrazentrifugenröhr- chen 30 ml Zentrifugenröhrchen mit Standfuß und Schraubdeckel 50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
Reagenzgefäße	Dünnwandig 0,2 und 0,5 ml	Biozym
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Spritzen	3, 5, 10 und 20 ml Plastipak, Luer-Lock	Becton Dickinson
----------	--	---------------------

### 2.1.5 Geräte

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte, Modellbezeichnungen und Hersteller aufgeführt.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Sanoklav	Eberle Laborgeräte- technik
Einkanal-UV-Vis-Spektrometer		Beckman DU- 640
Feinwaage		Kern
Fluoreszenz-Messsystem mit Photomultiplier Arc Lamp Arc Lamp Power Supply Optical Chopper Shutter Controller 2 Personal-Computern	Deltascan	PTI
Image Master VDS System		Pharmacia Biotech
Magnetrührer	Combimag RCO	IKA
Mikroskop	PIM	WPI Inc
Mikroskop	Diaphot	Nikon
Milli-Q-Plus-Filteranlage Ionen-Austausch-Material		Millipore BioRad RG 501- XG
Osmometer		Roebbling
pH-Meter	pH 91, pH 96	WTW
Pufferumwälzpumpe		Bio Rad

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Stabhomogenisator		Ultraturrax
Stromquelle für Gelelektrophorese		E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida
Rollenpumpen		Masterflex
Rotationsmischer 3300		Eppendorf
Thermo-Cycler	Gene-Amp 2400/9600/9700	Perkin Elmer
Vortex		Retsch
Zentrifuge 3200		Eppendorf

### 2.1.6 Stammlösungen

Um die Herstellung der Präparations- und Messpuffer zu rationalisieren, wurden insgesamt vier 10:1 konzentrierte Stammlösungen verwendet. Eine Stammlösung enthielt die Puffersubstanzen HEPES/TRIS und die Kaliumphosphatsalze (pH<sub>i</sub>-Stammlösung), eine zweite das Kalziumglukonat und Magnesiumsulfat (Cl<sup>-</sup>-freie Lösung B), die Barium-Stammlösung enthielt Bariumchlorid, Ca<sup>2+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Dihydrat und Mg<sup>2+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Hexahydrat. Diese drei Lösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. In der Kalibrationsstammlösung waren HEPES, Kaliumglukonat und Kaliumchlorid enthalten. Diese konnte bei -18 °C im Gefrierfach gelagert werden.

### 2.1.7 Zur Präparation verwendete Tiere

Zur anfänglichen Testung des Versuchsaufbaus wurden Kolonkrypten von normalen Mäusen beiden Geschlechts mit einem Gewicht von 50-100 g von der Firma Charles River verwendet. Die Tiere wurde mit einer Standard Diät für Nagetiere gefüttert und hatten freien Zugang zu Leitungswasser.

Die CF-Knockout-Mäuse stammten aus dem Labor von R. Ratcliff, W.H. Colledge und M. Evans und waren dort in Form von CF Nullmutanten vorher erzeugt und charakterisiert worden (71). Dabei wurde die Mutation in Form eines doppelten Gen-Ersatzes erzeugt, der zur Mutation von  $\Delta F508$  sowie einer

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Reihe verschiedener anderer Mutationen im Exon 10 führen sollte (sog. Cambridge, kurz CAM-Mutation). Dazu wurde zuerst das normale Gen unterbrochen, indem das Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) Mini-Gen innerhalb des CFTR Exons 10 von embryonalen Stammzellen mutiert wurde. Es wurde dann durch ein Konstrukt ersetzt, das in homologer Rekombination zu einer Addition von 88 Aminosäuren gefolgt von einem Terminierungs-Codon nach dem Codon für Arginin 487 von CFTR führt. Die HPRT-Funktion wurde wiederhergestellt. Diese Mutation unterbricht damit den CFTR-Lokus im Exon 10. Zwei der veränderten Zelllinien wurden in C57Bl/6 Blastozysten injiziert, so dass Chimera-Tiere entstanden. Diese Mäuse können durch ihre Fellfarbe identifiziert werden, wenn die mutierten Stammzellen von einer weißen Maus und die embryonalen Blastozysten von einer dunklen Maus stammen. Die Chimera-Mäuse werden folglich gescheckt sein. Bei der anschließenden Kreuzung entstehen in einem Verhältnis von 1:2:1 homozygot gesunde, heterozygote und homozygot mutierte Mäuse (34). Die homozygoten CFTR(-/-) Nachkommen können mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion und Southern Blot Analyse von Mäuseschwanz-DNA identifiziert werden. Von den so erzeugten CF-Knockout-Mäusen kann kein Wildtypprotein hergestellt werden, da keines der aus der geschädigten Region entstehenden RNA Transkripte für ein funktionstüchtiges CFTR Protein kodiert.

Die Aufzucht der Mäuse fand im Tierstall des Biochemischen Instituts in Tübingen unter standardisierten Licht- und Klimabedingungen statt. Die Durchführung der PCR zur Genotypisierung und Auslese der CFTR(-/-) Mäuse erfolgte ungefähr vier Wochen nach der Geburt. Sie wurde von Heidi Rossmann und Christine Neffs durchgeführt. Die Methode ist in der Veröffentlichung von Seidler et al. (86) unter „Genotyping of progeny by polymerase chain reaction“ ausführlich beschrieben. Zur PCR-Genotypisierung wurde die aus den Mäuseschwänzen mit Hilfe des QIAamp Gewebekits (Quiagen, Hilden) gewonnene DNA verwendet.

Um intestinale Elektrolytverluste möglichst gering zu halten und ein optimales Gedeihen der Mäusejungen zu gewährleisten, erhielten sie nach der Geburt zusätzlich zur Muttermilch eine proteinreiche Nacktrattendiät, nach vier Wochen

wurden sie auf eine faserfreie Diät (Special Diet Services, Cambridge, GB) gesetzt. Die Käfige wurden mit „Corncob“ (Mucedola, Settimo Milanese, Italien) ausgestreut und eine spezielle Polyethylen Glykol-haltige Elektrolyt-Trinkflüssigkeit (Kleanprep, Norgine, Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Geburtenrate der CFTR(-/-) Mäuse lag unter der statistisch zu erwartenden, was auf eine erhöhte intrauterine Sterberate hinweist. Einige CFTR(-/-) Mäuse starben in den ersten drei Tagen nach Geburt, die höchste Sterberate lag allerdings um den zweiten Lebensmonat, so dass die Mäuse meist im Alter von 6-12 Wochen für die Versuche herangezogen werden konnten. Zum Zeitpunkt der Versuche wiesen die CF-Mäuse ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber ihren normalen Geschwistern auf und sie fielen durch ein aufgetriebenes Abdomen auf. Der Darm wirkte makroskopisch kleiner und zarter, er wies allerdings keine lichtmikroskopischen Veränderungen auf. Die wenigen Überlebenden konnten nach der kritischen Zweimonatsgrenze gut gedeihen und holten das anfängliche Wachstumsdefizit in den folgenden Lebenswochen auf, so dass sie im Alter von 3-4 Monaten ein ähnliches Aussehen und Gewicht wie ihre normalen Geschwister aufwiesen.

Die CFTR(+/+) Geschwistertiere dienten in den durchgeführten Versuchen als Kontrollpopulation.

Das Versuchsprotokoll wurde durch den Universitätstierarzt und das Regierungspräsidium Tübingen gemäß des geltenden Staatsrechts genehmigt.

### **2.2 Organentnahme und Zellpräparation**

### **2.3 Extraktion, Reinigung und Analyse von mRNA**

#### **2.3.1 Allgemeine Bemerkungen zum Arbeiten mit RNA**

Bei allen Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden. RNasen sind ubiquitär vorhanden, besonders aber auf der Haut anzutreffen. Deshalb müssen immer saubere Handschuhe getragen werden. Glaswaren werden bei 180 °C mindestens vier

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

Stunden lang gebacken, Plastikgeräte mit Formaldehyd begast (Zentralsterilisation des Klinikums) oder mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, indem sie über Nacht in eine 0,1 %ige DEPC-Lösung eingelegt werden. DEPC ist ein starker Ribonukleasen Inhibitor. Es gilt als kanzerogen und muss mit großer Vorsicht behandelt werden. Lösungen sollten unter dem Abzug hergestellt werden.

1 ml DEPC wird mit 1 l ddH<sub>2</sub>O vermischt und unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um DEPC-Rückstände vollständig zu entfernen, wird das behandelte Wasser anschließend zwei mal bei 121 °C und 1 bar Überdruck 20 Minuten lang autoklaviert. Das DEPC-behandelte Wasser dient der Herstellung der verwendeten Puffer, die wenn möglich und nötig, zum Beispiel nach Einstellung des pHs, autoklaviert werden.

Alle Chemikalien haben den Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“. Sie werden ausschließlich für die Arbeit mit RNA verwendet und stets mit Handschuhen geöffnet.

RNA, die später in enzymatischen Reaktionen (z.B. in der reversen Transkription) eingesetzt werden soll, wird nicht in DEPC-behandeltem, sondern in autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, da bereits geringste DEPC-Rückstände diese Reaktionen hemmen können.

### **2.3.2 Lyse der Zellen und Homogenisieren des Gewebes für die RNA-Extraktion**

Die Lyse der Zellen und das Homogenisieren des Gewebes, sowie die ersten Schritte der RNA-Extraktion sind für die spätere Qualität der RNA von besonders großer Bedeutung. Auch wenn das Homogenisieren in der Lösung D erfolgt, die den starken RNase Inhibitor Guanidiniumisothiocyanat enthält, sollte so schnell wie möglich und auf Eis gearbeitet werden, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

Zu Beginn erfolgt die Herstellung der Lösung D nach Chomczynski und Sacchi (19):



## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

250 g 4 M Guanidiniumisothiocyanat werden in der Flasche des Herstellers mit 293 ml DEPC-behandeltem Wasser, 17,6 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0 und 26,4 ml 10 % Sarcosyl versetzt und bei 65 °C über Nacht gelöst. Die Lösung kann mindestens drei Monate bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor Gebrauch werden der Lösung 7,2 µl 2-Mercaptoethanol pro ml zugesetzt.

Beim Homogenisieren von Zellen wird die Zellsuspension bei 4 °C und 173 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird gründlich abgesaugt und pro  $1 \times 10^7$  Zellen 1 ml kalte Lösung D auf das Zellpellet gegeben. Um die Zellen zu lysieren und genomische DNA zu scheren wird das Gemisch auf Eis gestellt und 20 mal durch eine lange, dünne Kanüle gepresst.

Zum Homogenisieren von Gewebe wird es mit zwei Skalpellens in so kleine Stücke wie möglich geschnitten und gewogen. Pro Gramm Gewebe werden 10 ml kalte Lösung D hinzugefügt. Das Gemisch wird auf Eis gestellt, mit dem Stabhomogenisator homogenisiert und anschließend zehn mal durch eine lange, dünne Kanüle gepresst.

Die homogenisierten Zellen oder Gewebe könne nun entweder sofort zur RNA-Extraktion verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

### 2.3.3 Extraktion von Gesamt-RNA

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde die von Chomczynski et al. beschriebene Methode (19) modifiziert:

Dem Zell- bzw. Gewebehomogenat werden nacheinander 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat, 1 Volumen Aquaphenol und 1/5 Volumen Ready Red hinzugefügt und nach jeder Zugabe jeweils fünf Minuten geschüttelt. Anschließend wird 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert: 2 ml Reagenzgefäße bei 10000 g, 30 und 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 6000 g. Nach der Zentrifugation befindet sich die RNA in der wässrigen Phase, während sich DNA und Proteine in der Interphase und der organischen Phase befinden. Die obere, wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, erneut mit Aquaphenol und Ready Red ausgeschüttelt und zentrifugiert. Wieder wird die obere Phase abgenommen, dann allerdings mit 2/3 Volumen Aquaphenol und 1/3 Volumen Ready Red

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

versetzt, um Phenolreste so gründlich wie möglich aus der wässrigen Phase zu entfernen, wieder wird geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 9/10 Volumen Isopropanol gemischt und mindestens eine Stunde auf Trockeneis oder bei  $-20\text{ °C}$  über Nacht gefällt. Je nach Volumen wird in 2 ml Reagenzgefäßen oder 20 ml Ultrazentrifugenröhrchen bei 18000 g und  $4\text{ °C}$  40 Minuten zentrifugiert. Es folgt das Waschen des RNA Pellets mit 70 % eiskaltem Ethanol. Schließlich wird die RNA zehn Minuten lang unter Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O für die RT-PCR aufgenommen.

Die RNA wird bei  $-80\text{ °C}$  entweder in H<sub>2</sub>O oder besser als Ethanol-Fällung gelagert.

### 2.3.4 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der heterozyklischen, aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen im Bereich von 260 nm ausgenutzt (80). Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA, RNA und Oligonukleotide besitzen infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA und RNA ca. 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden ca. 20 µg/ml. Zur Bestimmung sehr kleiner Nukleinsäure-Mengen ist die Methode nicht geeignet. Die Messlösung muss zur Konzentrationsbestimmung im Einkanal-UV-Vis-Spektrometer mindestens 1 µg/ml enthalten.

Um die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen zu können, ist eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm nötig, bei der die aromatischen Reste von Proteinen stark absorbieren. Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein  $E_{260}/E_{280}$ -Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin. Für in ddH<sub>2</sub>O gelöste RNA wird im Allgemeinen etwas niedrigere Werte als für in TE-Puffer gelöste RNA errechnet.

RNA-Lösungen sind häufig zähflüssig, so dass bei der Verdünnung für die photometrische Konzentrationsbestimmung häufig Pipetierfehler auftreten. Mehrfachbestimmung sind angeraten, um verlässliche Messwerte zu erhalten.

Arbeitsvorschrift:

Die RNA-Lösung wird gewöhnlich 1:100 in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer verdünnt. Für die Leerwert-Bestimmung wird die Küvette mit 150 µl der Flüssigkeit gefüllt, in der die RNA gelöst ist, und die Extinktion bei 260 und 280 nm im Einkanal-UV-Vis-Spektrometer gemessen. Anschließend werden 150 µl der RNA-Verdünnung in die Küvette gefüllt und die Extinktion bei den genannten Wellenlängen gemessen. Vom jeweiligen Messwert zieht das Gerät den Leerwert ab. Die tatsächliche Nukleinsäure-Konzentration in der Ausgangsprobe wird wie folgt berechnet:

$$[\text{dsDNA}] = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$[\text{ssDNA/ RNA}] = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$[\text{Oligonukleotide}] = \text{OD}_{260} \times 20 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.3.5 Elektrophorese von RNA im Glyoxal-Gel

Die Elektrophorese von RNA dient der Überprüfung der RNA Qualität. Sie sollte grundsätzlich zwei Bedingungen erfüllen: Die Trennschärfe sollte gut und die RNA weitgehend vor Degradation durch RNasen geschützt sein. Diese Bedingungen erfüllen sowohl Glyoxal- als auch Formaldehyd-Gele (80). Glyoxal-Gele (16) sind im Vergleich mit Formaldehyd-Gelen etwas schwieriger zu handhaben, laufen langsamer und benötigen eine Umwälzung des Puffers während dem Lauf, um die Entstehung eines zu großen pH-Gradienten während der Elektrophorese zu vermeiden. Andererseits sind die benötigten Reagenzien für Glyoxal-Gele weniger toxisch und wenn anschließend ein Northern Blot durchgeführt wird, ergeben sich schärfere Banden als bei Formaldehyd-Gelen (67).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Arbeitsvorschrift:

40 %ige Glyoxal-Lösung wird durch Filtration mit Ionenaustausch Material so lange deionisiert bis ein pH-Wert über 5,0 erreicht ist. Deionisiertes Glyoxal wird in 56 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Es wird eine 0,5 M Natriumphosphat-Stammlösung aus 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> im Verhältnis 1:1 gemischt. Aus 40 ml Natriumphosphat-Stammlösung und 1960 ml ddH<sub>2</sub>O wird ein 10 mM Natriumphosphat-Puffer hergestellt.

Der Glyoxalmix besteht aus 56 µl 40 % deionisiertem Glyoxal, 200 µl DMSO, 8 µl 10 % SDS und 8 µl 0,5 Natriumphosphat-Stammlösung.

Außerdem wird eine 0,2 M Natriumacetat-Lösung angesetzt, indem 0,2 M Natriumacetat so lange mit 0,2 M Essigsäure versetzt wird, bis ein pH von 5,2 erreicht ist.

Die RNA wird mit Glyoxal und DMSO denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und eine Degradation durch RNase A zu verhindern. Die in 5 µl gelöste RNA (1 bis 30 µg Gesamt-RNA) wird mit 10,8 µl Glyoxalmix vermischt und eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard werden 1 bis 3 µl RNA Leiter mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 5 µl aufgefüllt und wie die übrigen Proben behandelt.

Zur Trennung von RNA Spezies kleiner 1 kb Länge wird gewöhnlich ein 1,4 %iges Agarose-Gel verwendet, für RNA Spezies größer als 1 kb ein 1,2 %iges Gel. Es wird die entsprechende Menge Agarose abgewogen, mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer auf 50 ml aufgegossen und gekocht bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlen der Lösung auf 60 °C wird das Gel in einen 25 cm langen Gelträger gegossen und ein passender Kamm eingesetzt. Es benötigt etwa 30 Minuten bis es erkaltet und fest geworden ist.

Die Kammer wird zunächst mit Wasser und Seife ausgewaschen, um eventuell anwesende RNasen so gründlich wie möglich zu entfernen. 15 Minuten lang wird 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 Minuten DEPC-H<sub>2</sub>O, 15 Minuten 70 % Ethanol und

abschließend wieder 5 Minuten DEPC-H<sub>2</sub>O durch die Kammer gepumpt. Für die Elektrophorese wird die Kammer mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer gefüllt.

Das Gel wird in die Kammer eingesetzt. Die glyoxalisierte Proben werden durch kurzes Zentrifugieren gesammelt und auf Eis gestellt. 2 µl Ladepuffer werden hinzupipetiert und die Proben in die Geltaschen geladen. Das 50 ml Gel läuft bei 70 V eine Stunde lang. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel wird der Puffer mit 20 ml/min umgewälzt. Wenn die Bromphenolblau-Bande 1 bis 2 cm vor Gel-Ende angelangt ist, wird die Elektrophorese beendet.

Um die rRNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird es mit Ethidiumbromid gefärbt. Hierfür muss die RNA zunächst durch eine 15-minütige Inkubation in 0,1 M NaOH deglyoxalisiert werden. Um durch Ansäuern das Interkalieren der Ethidiumbromid Moleküle in die RNA-Helix zu verbessern, wird das Gel zwei mal 15 Minuten lang in 0,2 M Natriumacetat, pH 5,2 geschüttelt. Die eigentliche Färbung erfolgt 15 bis 20 Minuten in der Ethidiumbromid-Färbelösung. Nach 15minütigem Entfärben in ddH<sub>2</sub>O wird das Gel unter Fluoreszenzanregung mit UV-Licht mit dem Image Master VDS System digitalisiert und über den eingebauten Thermosublimationsdrucker ausgegeben.

### **2.4 RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA-Synthese durch reverse Transkription)**

Die RT-PCR ist eine beliebte Methode zur Analyse von Gen-Transkripten, da sie eine hohe Sensitivität aufweist, sehr schnell Ergebnisse erzielt werden können, und außerdem die Möglichkeit besteht, die erhaltenen PCR-Produkte zu klonieren und zu sequenzieren. Die so klonierten cDNA-Fragmente können zum Beispiel im Northern Blot als Sonde verwendet werden.

Zunächst wird RNA aus Gewebe oder Zellen isoliert (s. Kap. 2.3.2 und 2.3.3) und als Matrize zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription (RT) benutzt. Diese cDNA dient anschließend in der PCR als Probe (77). Die Primer werden so ausgewählt, dass eine bestimmte cDNA-Region amplifiziert wird. Nach Denaturierung der cDNA und anschließender Hybridisierung der Primer an die cDNA-Matrize (Annealing) folgt die

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Verlängerung der Primer durch eine thermostabile Polymerase, z.B. die Taq-Polymerase (Extension). Durch zyklische Anwendung der Schritte Denaturierung, Annealing und Extension gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments (11).

### 2.4.1 Primer-Design

Zur Auswahl der Primer wurde das Programm „PRIMER“, ein Bestandteil der Sequenzanalyse-Software Husar, EMBL (European Molecular Biology Laboratories) Heidelberg, zu Hilfe genommen. Die Primer sollten folgende Eigenschaften besitzen: eine Dimer-Bildung zwischen den beiden Primern und eine Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers sollte unwahrscheinlich sein. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 70% liegen und dem der zu amplifizierenden Sequenz ähnlich sein. Wenn möglich sollte die Stabilität des Primers am 5'-Ende größer sein als am 3'-Ende. Die Schmelztemperatur  $T_m$  (berechnet nach der „nearest-neighborhood“-Methode) der beiden Primer ist ähnlich (maximaler Unterschied 1 °C) und liegt bei ca. 60 °C. Die Primer sind jeweils 18-24 bp lang. Um nur ein einziges, spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren, sollte die Primer-Sequenz in dem cDNA-Fragment nicht wiederholt vorkommen und keine große Ähnlichkeit mit anderen Sequenzen aufweisen. Deshalb wurde mit Hilfe der Algorithmen „BLASTN“ und „FASTA“ die Datenbanken des EMBL nach der Primer-Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht. Nur nach negativem Suchergebnis wurde der Primer in der PCR eingesetzt. Die Primer-Synthese erfolgte durch die Firma Gibco BRL.

### 2.4.2 Reverse Transkription, RT

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert.

Arbeitsvorschrift:

Es wurde ein 25 µl Reaktionsansatz hergestellt, in dem bis zu 4 µg Gesamt-RNA revers transkribiert werden können.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Folgende Komponenten wurden auf Eis in ein steriles 1,5 ml Reagenzgefäß gegeben, gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt:

Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer (500 µg/ml)	1,25 µl
Gesamt-RNA	0,5 – 4 µg
mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O auf 15,5 µl auffüllen	

Ein zusätzlicher Ansatz enthielt zwar alle RT-Reagenzien, aber keine Gesamt-RNA („Leer-Transkript“), um später in der PCR die Komponenten der RT-Reaktion auf Kontamination überprüfen zu können.

Das Gemisch wurde bei 70 °C 10 Minuten lang denaturiert, 2 Minuten auf Eis abgekühlt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt. Auf Eis wurde dem Ansatz folgendes hinzugefügt:

5 x First Strand Buffer	5 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP-Mix	1,25 µl
Super Script II	1 µl

Der Inhalt wurde gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt.

Die reverse Transkription erfolgte 50 Minuten bei 42 °C. Nach 15minütiger Inaktivierung bei 70 °C kann die cDNA-Probe nun sofort in der PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### 2.4.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Bei der PCR erfolgt die cDNA-Amplifikation exponentiell. Deshalb müssen selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipetieren des PCR-Ansatzes und die Analyse des PCR-Produktes finden räumlich getrennt statt, wobei jeweils ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird. Alle Reagenzien für die PCR werden in Aliquots gelagert. Steriles, bidestilliertes Wasser wird literweise verpackt bezogen (Ampuwa, Fresenius). Reagenzien, die vermutlich mit PCR-Produkt

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

kontaminiert sind, werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände mit UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt.

Arbeitsanweisung:

Für einen 100 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten dünnwandigen 0,2 ml Reagenzgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Der PCR-Mix wurde für alle Reaktionen, die unter gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml Reagenzgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reagenzgefäße verteilt.

	<b>Komponenten</b>	<b>Volumen/Reaktion</b>	<b>Endkonzentration</b>
PCR-Mix	10 x PCR-Puffer	10 µl	1 x
	5 x Q-Lösung	20 µl	1 x
	10 mM dNTP-Mix	2 µl	200 µM
	10 µM forward Primer	4 µl	0,2 µM
	10 µM reverse Primer	4 µl	0,2 µM
	Ampuwa (steriles Wasser)	54,5 µl + x µl	-
cDNA	Reverses Transkript aus RT	5 µl	0,5 - 4 µg/100 µl
Enzym	Taq DNA Polymerase	0,5 µl	2 u/µl

Die verwendeten Primersequenzen sind in Kap. 3.2.2 aufgeführt.

Neben der eigentlichen Reaktion wurden bei jeder PCR Negativ-Kontrollen durchgeführt:

- Zur Prüfung der PCR-Reagenzien auf Kontamination wurde die cDNA-Probe durch Ampuwa ersetzt.
- Um die RT-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wurde die cDNA-Probe durch „Leer-Transkript“ ersetzt (s. Kap. 2.4.2).



## 2 MATERIAL UND METHODEN

- Zur Prüfung der bei der RT eingesetzten RNA auf Verunreinigung mit DNA, wurde die cDNA-Probe durch die nicht revers transkribierte RNA ersetzt.

Sofort nach der Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Proben in den Thermo-Cycler gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist, und so ein Verdunsten der Proben verhindert wird, ist das Übersichten mit Mineralöl nicht nötig. Im Folgenden wird ein Standard-Programm für den Thermo-Cycler dargestellt:

Denaturierung der cDNA zu Beginn	3 Minuten	94 °C
<b>3-Schritt PCR:</b>		
Denaturierung	1 Minute	94 °C
Annealing*	1 Minute	54-70 °C*
Extension	1,5 Minuten	72 °C
Zahl der Zyklen	20-42	
Verlängerung der PCR-Produkte am Ende	10 Minuten	72 °C

\* die optimale Annealing-Temperatur muss für jedes Primer-Paar ermittelt werden (s. Kap. 3.2.3)

Die Proben können nach Beendigung der PCR über Nacht bei 4 °C oder bei -20 °C über längere Zeit gelagert werden. Ein Aliquot der PCR-Reaktion diente der Auftrennung mit der Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.4.4).

Fand sich eine Bande in der erwarteten Größe, wurde der Rest der PCR-Reaktion gefällt (s. Kap. 2.4.5) und mit Restriktionsendonukleasen verdaut (s. Kap. 2.4.6). Die entstandenen Fragmente wurden in einem Gel elektrophoretisch getrennt.

### 2.4.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung doppelsträngiger, linearisierter DNA-Fragmente eignen sich Agarose-Gele. Standard-Agarose-Gele zwischen 0,5 und 1,8 % trennen DNA-Fragmente zwischen 0,3 und 30 kb. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet, der gegenüber dem TAE-Puffer den Vorteil hat, dass er schärfere Banden und hochauflösendere Gele liefert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### Arbeitsanweisung

Für 10 x TBE- Puffer wurden 108 g TRIS, 55 g Borsäure und 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit ddH<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt. Zur Verwendung wurde der Puffer 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

Folgende Tabelle stellt die Auflösung von Standard-Agarose-Gelen (2) dar:

<b>Standard- Agarose (%)</b>	<b>Gel-Auflösung für lineare DNA-Fragmente (kb)</b>
0,5	30 - 1
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2

### Gießen des Gels (1,5 %Gel):

Das Volumen der herzustellenden Agarose-Lösung wurde der Größe des jeweiligen Gelträgers angepasst. Ein Gelträger für die DNA Sub Cell Kammer umfasste entweder 100 oder 200 ml. 1,5 bzw. 3,0 g Agarose wurden mit 1 x TBE-Puffer auf 100 bzw. 200 ml aufgegossen und im Mikrowellenherd erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Verdampfte Flüssigkeit wurde mit ddH<sub>2</sub>O ersetzt. Nach Zugabe von 2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 50 ml Puffer lies man die Lösung auf 60-70 °C abkühlen, goss sie in den Gelträger, setzte den gewünschten Kamm ein und lies das Gel mindestens 30 Minuten erkalten und fest werden. Das Gel wurde in die Kammer gesetzt, die mit 1 x TBE-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefüllt war.

### Probenvorbereitung:

17 µl der Probe wurden mit 2 µl Gelladepuffer versetzt, so dass der Gelladepuffer 1:10 verdünnt vorlag. Durch den Gelladepuffer wird die Dichte der Probe erhöht und ihr Einsinken in die Geltasche ermöglicht. Er färbt die Probe

und erleichtert damit das Auftragen auf das Gel. Die in ihm enthaltenen Farbstoffe wandern mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode.

1  $\mu\text{l}$  der Molekulargewichtstandard-Leiter (1  $\mu\text{g}$ ) wurden mit 2  $\mu\text{l}$  Gelladepuffer versetzt und mit Ampuwa- $\text{H}_2\text{O}$  auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Standardleiter und die Proben wurden dann in die Taschen des Gels eingefüllt.

Gel-Lauf und Dokumentation des Ergebnisses:

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung, wobei 10-20 V pro cm Gel angelegt wurden. Während des Laufs interkalieren Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA-Helix. Mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm wurde die Fluoreszenz der gefärbten DNA angeregt. Mit Hilfe des Image Master VDS Systems wurden die Banden digitalisiert und das Bild über einen Thermo-sublimationsdrucker ausgegeben.

### 2.4.5 Aufkonzentrieren von DNA durch Ethanol-Fällung

Verdünnt vorliegende DNA kann auf zwei Arten aufkonzentriert werden. Bei der einen Art kann mit Hilfe einer Speed Vac der Probe Wasser entzogen und damit die Konzentration erhöht werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass verunreinigende Salze im gleichen Maße wie die DNA konzentriert werden. Die zweite Art stellt die Ethanol-Fällung dar (80), bei der man zwar mit einem Materialverlust von 10 bis 20 % rechnen muss, verunreinigende Salze und Proteine werden jedoch weitgehend entfernt.

Arbeitsanweisung:

3 M Natriumacetat wurde unter Kontrolle des pH-Wertes so lange 3 M Essigsäure hinzugefügt, bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht war.

Der DNA-Probe wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen absoluten Ethanols zugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und die DNA bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht oder eine Stunde auf Trockeneis gefällt. Nach 40 Minuten Zentrifugation bei 18000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand abgesaugt, 1 Volumen eiskaltes Ethanols auf das Pellet gegeben und 15 Minuten bei 18000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut gründlich abge-

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

saugt und das Pellet 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Abschließend wurde die DNA in der gewünschten Menge ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.4.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Sie erzeugen dabei entweder 3'- oder 5'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends). Je nach Enzym variiert Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei denen die Reaktion bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit optimal abläuft.

Arbeitsvorschrift:

Folgende Komponenten wurden gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt:

Plasmid-DNA	x µg
Restriktionsenzym (10 u/µl)	2 u/µg Plasmid-DNA
Reaktionsenzym (10 x)	1/10 Endvolumen
Der Ansatz wurde mit ddH <sub>2</sub> O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt	

Sofern nicht anders vermerkt wurde die analytische Verdauung mit 0,2 bis 1 µg in einem Gesamtvolumen von 15 µl durchgeführt. Der Verdau erfolgte 3 bis 12 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

### 2.4.7 Semiquantitative RT-PCR

Zur Analyse der Gen-Expression wird neben dem Northern Blot die semiquantitative RT-PCR verwendet. Es wurde gezeigt, dass ihre Sensitivität weit größer ist als die herkömmlicher RNA-Blot Techniken (15,99). Dies eröffnet die Möglichkeit, sehr seltene mRNA Spezies zu detektieren. Die sehr hohe Sensitivität dieser Methode führt jedoch dazu, dass es schwierig wird, quantitative Informationen mit Hilfe der RT-PCR zu erhalten. Vor allem die zwei enzymatischen Reaktionen, die reverse Transkription der RNA in DNA (s. Kap. 2.4.2) und die Polymerase-Ketten-Reaktion (s. Kap. 2.4.3), stellen ein Problem

dar. Die exponentielle Amplifikation des PCR-Produkts während der PCR führt zu gravierender Verstärkung von ursprünglich nur kleinen Fehlern. Trotzdem kann die RT-PCR gute quantitative Ergebnisse liefern, wenn die Methode entsprechend modifiziert wird (22,53). Im folgenden werden nur die Arbeitsläufe beschrieben, die von der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen PCR abweichen, und die Besonderheiten erwähnt, die für die semiquantitative Auswertung der PCR besonders wichtig sind (76).

### Reverse Transkription

Nach einer möglichst exakten photometrischen Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA Proben wurde die reverse Transkription (s. Kap. 2.4.2) angesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die zu vergleichenden Proben genau gleich behandelt wurden. Die Reverse Transkriptase wurde immer von der Firma Gibco BRL bezogen und eine Versuchsreihe möglichst mit der gleichen Charge Enzym durchgeführt, um auch geringfügige Aktivitätsschwankungen zwischen verschiedenen Enzymen oder Chargen zu vermeiden. Bevor die neu synthetisierte cDNA in der PCR als Matrize eingesetzt wurde, musste die Probe durch mehrfaches Aufziehen in der Pipette gründlich gemischt werden.

### Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR

Die Komponenten des PCR-Ansatzes entsprachen denen aus Kapitel 2.4.3. Die cDNA-Proben wurden in dünnwandigen 0,2 ml Reagenzgefäßen auf Eis vorgelegt. Der PCR-Mix und die Taq-Polymerase wurden für alle Proben gemeinsam in einem 1,5 ml Reagenzgefäß auf Eis gemischt und anschließend auf die Reagenzgefäße verteilt, die die cDNA-Matrize enthielten.

Das PCR-Programm für den Thermo-Cycler entsprach mit einer Ausnahme dem in Kapitel 2.4.3 beschriebenen:

Die PCR wurde ab dem Zyklus, nachdem die PCR-Produkte vermutlich zum ersten mal auf einem Agarose-Gel nachweisbar werden, alle zwei Zyklen unterbrochen. Bei jeder Unterbrechung wurden 12 µl Aliquots aus der PCR-Reaktion entnommen, während die Temperatur bei 72 °C gehalten wurde. Nach der densitometrischen Auswertung der Banden konnte so die Kinetik der Primer-Paare errechnet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.4.8 Semiquantitative Auswertung der Banden

Theoretische und praktische Eigenschaften der PCR (modifiziert nach (22,53)):

Die Menge an PCR-Produkt nimmt während der Reaktion exponentiell zu. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sie sich bei jedem Zyklus nach folgender Gleichung:

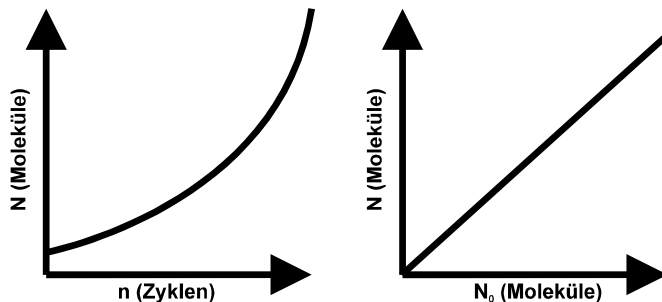
$$N = N_0 2^n \quad (1)$$

mit  $N$  = Anzahl an amplifizierten Molekülen

$N_0$  = Anzahl der Moleküle zu Beginn der Amplifikationszyklen

$n$  = Anzahl der Amplifikationszyklen

Folgende Schemazeichnung stellt sich graphisch dar:



In der Praxis liegen meist nicht ideale Bedingungen vor, deshalb lässt sich der PCR-Prozess durch folgende Gleichung beschreiben:

$$N = N_0(1 + E)^n \quad (2)$$

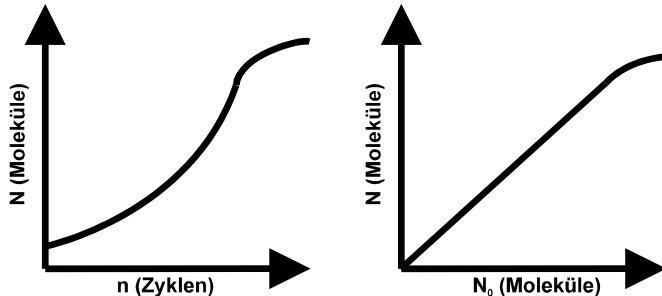
mit  $E$  = Amplifikationseffizienz

Bereits geringe Schwankungen der Amplifikationseffizienz ( $E$ ) führen zu großen Unterschieden, bezüglich der Menge an resultierendem PCR-Produkt.  $E$  ist dabei von verschiedenen experimentellen Faktoren abhängig: von der amplifizierenden Sequenz, der Primer-Sequenz, der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und von der Verunreinigung der Probe.

Die Menge zweier PCR-Produkte kann also nur verglichen werden, wenn ihre Amplifikationseffizienzen sehr ähnlich sind.

Im Experiment findet zunächst eine Vervielfachung des PCR-Produktes nach Gleichung (2) statt. An einem bestimmten Punkt im Verlauf der Reaktion wird die Vermehrung jedoch zunehmend langsamer und schließlich bleibt die Menge

an PCR-Produkt im Reaktionsgemisch gleich. Dieses Phänomen wird Plateau-Effekt genannt. Der Verlauf einer typischen PCR-Reaktion sieht also folgendermaßen aus:



Dieser Plateau-Effekt kann folgende Gründe haben:

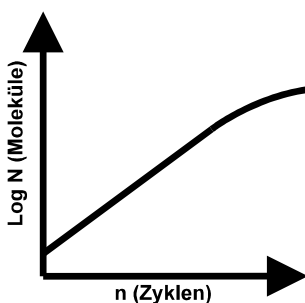
- Das PCR-Produkt hat eine Konzentration im Reaktionsgemisch erreicht, bei der die Reassoziierung mit dem Primer-Annealing konkurriert.
- Das molare Verhältnis von Taq-Polymerase zu Probe fällt unter einen kritischen Wert.
- Inhibitoren der Polymerase, wie zum Beispiel Pyrophosphat, akkumulieren.
- Eine weitere Komponente im Reaktionsgemisch wird limitierend.

Die Menge zweier PCR-Produkte kann also nur verglichen werden, wenn sich die Reaktion in ihrer exponentiellen Phase befindet. In der Plateau-Phase ist kein Vergleich möglich.

Schreibt man Gleichung (2) in ihrer logarithmischen Form ergibt sich

$$\text{Log } N = [\text{Log } (1 + E)]n + \text{Log } N_0 \quad (3)$$

Trägt man  $\text{Log } N$  gegen die Zyklenzahl  $n$  auf, erhält man während der exponentiellen Phase der Reaktion eine Gerade. In der Sättigungsphase der Reaktion flacht die Kurve ab:



## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### Die Quantifizierung von PCR-Produkten mit Hilfe von internen Standards (18):

Um Unterschiede zwischen dem Inhalt verschiedener Reagenzgefäße (durch Ladefehler, Pipetierfehler etc. ) abschätzen zu können, wird eine Sequenz, die in allen Proben gleich exprimiert ist, als Standard amplifiziert. Aus Gleichung (2) ergibt sich für den Vergleich zweier PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Reaktion

$$N_{0p} / N_{0s} = N_p (1 + E_s (1+E_p)^n) \quad (4)$$

mit  $N_p$  = Anzahl an amplifizierten Proben-Molekülen

$N_s$  = Anzahl an amplifizierten Standardmolekülen

$N_{0p}$  = Anzahl der Proben-Moleküle zu Beginn der Amplifikationszyklen

$N_{0s}$  = Anzahl der Standardmoleküle zu Beginn der Amplifikationszyklen

$E_p$  = Amplifikationseffizienz der Probe

$E_s$  = Amplifikationseffizienz des Standards

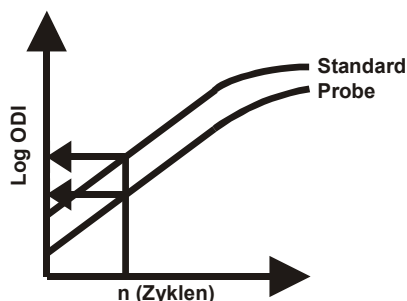
$n$  = Anzahl der Amplifikationszyklen

Ist außerdem  $E_p = E_s$ , und geht man davon aus, dass die optische Dichte (integrierte optische Dichte, ODI) der Bande im Gel proportional zur Menge des PCR-Produkts ist, dann kann das Verhältnis Probe zu Standard wie folgt berechnet werden:

$$N_{0p} / N_{0s} = ODI_p / ODI_s \quad (5)$$

mit  $ODI_p$  = optische Dichte der Proben-Bande

$ODI_s$  = optische Dichte der Standardbande



Das Verhältnis der verschiedenen Proben zum Standard liefert schließlich eine Aussage über das Verhältnis der Proben zueinander.



### Auswertung einer semiquantitativen PCR:

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde mit Hilfe des Image Master VDS Systems digitalisiert und die Bilddatei gespeichert. Die integrierte optische Dichte (ODI) der Banden wurde mit der Image Master Software bestimmt, und die Werte in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel importiert. Da der Zusammenhang zwischen dem Interkalieren von Ethidiumbromid-Molekülen und der Länge des DNA-Fragments linear ist, kann die optische Dichte unterschiedlich langer PCR-Produkte so umgerechnet werden, dass die Werte vergleichbar sind. Um die Primer-Kinetik graphisch darzustellen, wurde der Logarithmus dieser Werte (Log ODI), wie oben schematisch gezeigt, gegen die Zyklenzahl (n) aufgetragen. Liegen die während dem exponentiellen Teil der PCR für Probe und internen Standard ermittelten Werte auf zwei parallelen Geraden, dann sind die Steigungen der Gerade gleich und nach Gleichung (3) und (4) auch die Amplifikationseffizienzen der Reaktionen, da

$$M = \log(1 + E) \quad (6)$$

mit  $m$  = Steigung

$E$  = Amplifikationseffizienz der Reaktion

Aus Gleichung (6) folgt die Formel zur Berechnung der Amplifikationseffizienz:

$$E = e^m - 1 \quad (7)$$

Praktisch wurde die Parallelität der Amplifikationskurve von dem interessierenden Gen und der Kontrolle nach der Durchführung jedes semiquantitativen PCR Experiments abgeschätzt, indem für beide eine Regressionskurve nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt wird (exponentielle Trendlinie, Microsoft Excel). Dabei wurden die Koeffizienten C und R der folgenden Gleichung berechnet:

$$y = Ce^{Rx} \quad (8)$$

R, das für parallele Kurven gleich ist, wurde für das interessierende Gen und die Kontrolle verglichen. Weichen die Werte um weniger als 10% voneinander ab, ist ein Vergleich der optischen Dichte von Probenbande und Standardbande

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

möglich und sinnvoll. Das Verhältnis  $ODI_p/ODI_s$  wurde errechnet und daraus das Verhältnis der Proben zueinander ermittelt.

Für jedes Gen, dessen Expressionsniveau bestimmt werden sollte, wurden mindestens drei unabhängige PCR Experimente durchgeführt, und für jedes Einzelexperiment das Verhältnis  $ODI_p/ODI_s$  bestimmt. Aus den Ergebnissen der Einzelexperimente wurde der Mittelwert gebildet und der Standardfehler berechnet.

### 2.5 Präparation und Anfärbung der Kolonkrypten

Die Präparation der Mäuse und anschließende Krypten-Isolierung erfolgte in Anlehnung an die von Siemer et al. beschriebene Methode (89,90).

#### 2.5.1 Vorbereitung

##### 2.5.1.1 Verwendete Lösungen

Für die Präparation wurden eine EDTA-haltige Lösung zum Isolieren der Kolonkrypten und ein NaCl-Puffer zum Waschen und Aufbewahren der Krypten benötigt. Beide Lösungen waren gekühlt, der NaCl-Puffer wurde zusätzlich auf Eis mit 100 % Sauerstoff begast. Sie waren auf einen pH von 7,4 eingestellt.

**EDTA-haltige Lösung (Calcium-Chelat-Lösung, CC)** nach Siemer (89,90):

127 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM  $MgCl_2$

5 mM Glucose

5 mM Na-Pyruvat

10 mM HEPES

5 mM EDTA

1 % BSA

Einstellung mit TRIS auf pH 7,4

**NaCl-Puffer:**

120 mM NaCl

14 mM HEPES  
7 mM TRIS  
3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
1,2 mM Ca-Gluconate  
20 mM Glucose

### 2.5.1.2 Verwendete Materialien

5 ml-Spritze mit Knopfkanüle, gefüllt mit EDTA-haltiger Lösung  
Scherchen, Pinzette und Klemmchen  
Ligatur

### 2.5.2 Präparation des Mäusekolons

Nach  $\text{CO}_2$ -Narkose und zervikaler Dislokation erfolgte eine Längslaparatomie der Maus. Nach Aufsuchen des Zökums und Abpräparation des Mesenteriums wurde ein drei bis vier Zentimeter langer Abschnitt des Kolon ascendens distal der Ileozökalklappe exzidiert. Eventuelle „Pellets“ wurden ausgedrückt und der Kolonabschnitt mittels der Knopfkanüle mit eisgekühlter und  $\text{O}_2$  begaster Standard-HEPES-Lösung (s. Kap. 2.5.1.1) durchgespült. Vorsichtig wurde das Kolon über die geschlossene Pinzette gestülpt, dann die Ligatur gegriffen und durchgezogen. Nach Verknoten des distalen Endes des Kolonexplanats, konnte das Kolon über den Knoten evertiert werden. Das offene Ende wurde mit der Knopfkanüle kanüliert, das Darmstück prall mit EDTA-haltiger Lösung (s. Kap. 2.5.1.1) gefüllt, dann mit dem Klemmchen knapp unterhalb der Kanüle abgeklemmt und mit dem freien Fadenende ligiert.

### 2.5.3 Krypten-Isolierung

Das Kolonpräparat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und das Gefäß mit EDTA-haltiger Lösung gefüllt. Nach zehnminütiger Vibration bei 10 Hz auf dem Rotationsmischer bei Raumtemperatur lösten sich zunächst Schmutz und oberflächliche Zellen. Das Präparat wurde in ein neues Gefäß gegeben, wieder mit der EDTA-haltigen Lösung gefüllt und erneut zehn Minuten vibriert. Die so gewonnenen ersten zwei Fraktionen der Kolonkryptensuspension wurden

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

verworfen. Ab der dritten Fraktion erfolgte die Vibration nur noch fünf Minuten lang, danach wurde die Fraktion in der Eppendorfzentrifuge bei langsamer Geschwindigkeit pelletiert, die EDTA-haltige Lösung abgesaugt und mit 1 ml NaCl-Puffer aufgefüllt. Die Krypten wurden unter dem Mikroskop kontrolliert, und ihre Viabilität durch Trypan Blau Abgrenzung getestet. Bei ausreichend vorhandener Kryptenzahl wurde die Fraktion mit dem BCECF-Farbstoff gefärbt. Weitere Krypten-Fraktionen wurden bis zur Verwendung in NaCl-Puffer auf Eis gelagert.

### **2.5.4 Färbung**

Zu 1 ml Kryptensuspension wurde 1 µl 5 mM BCECF-Acetomethylester pipetiert und durch Schütteln vermischt. Es folgte eine 20-30-minütige Inkubation unter Abdunklung bei Raumtemperatur. Der veresterte Fluoreszenzfarbstoff kann aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran ins Zellinnere diffundieren und wird dort durch zelleigene Esterasen gespalten. Dadurch wird der eigentliche Farbstoff BCECF freigesetzt. Er kann die Zelle bei intakter Membran nicht wieder verlassen, deshalb gilt die Qualität der Anfärbung als ein Maß für die Viabilität der Zellen (97).

## **2.6 Messung von $\text{pH}_i$**

### **2.6.1 Vorbereitung**

#### **2.6.1.1 Verwendete Lösungen**

##### **Puffer**

Alle verwendeten Messpuffer enthielten folgende Substanzen:

- 14 mM HEPES
- 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$
- 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$
- 1 mM  $\text{BaCl}_2$
- 20 mM Glukose

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Zum Anrühren der Messlösungen wurden 10:1 konzentrierte Stammlösungen verwendet (s. Kap. 2.1.6). Diese konnten über längere Zeit im Kühlschrank oder im Gefrierfach aufbewahrt werden.

Die einzelnen Lösungen wurden dann am Versuchstag oder wenige Tage vorher angerührt und bei 4 °C aufbewahrt. Zusätzlich enthielten sie folgende Substanzen:

### **NaCl-Puffer (Standard-HEPES-Lösung, STH)**

120 mM NaCl

7 mM TRIS

### **Na<sup>+</sup>-freie Lösung**

120 mM TMA-Cl

7 mM TRIS

### **NH<sub>4</sub>Cl-haltige, Na<sup>+</sup>-freie Lösung**

NH <sub>4</sub> Cl-Konzentration (mM)	TMA-Cl-Konzentration (mM)
0,5	119,5
1	119
2,5	117,5
5	115
10	110
20	100
40	80
80	40

### **Kalibrationspuffer**

100 mM K-Glc

40 mM KCl

Die Lösungen wurden – entsprechend ihrer Pufferung – nach dem Anrühren mit 100 % O<sub>2</sub> begast und auf 37 °C erwärmt. Der pH wurde eingestellt (in der Regel 7,4) und die Osmolarität geprüft (Zielwert: 290-300 mosm).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Zu den Kalibrationspuffern wurde unmittelbar vor der Messung 10  $\mu\text{M}$  Nigericin, 2000:1 konzentriert in 100 % Ethanol, zugegeben. Der pH wurde hier auf 6,6 bzw. 7,4 eingestellt.

### 2.6.1.2 Inhibitoren und Stimulanzen

Alle verwendeten Substanzen wurden in Form von Stammlösungen 1000:1 bezogen, auf die Endkonzentration angerührt und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Substanz	Messkonzentration (Mol/l)	Lösungsmittel
Azosemid	$10^{-4}$	DMSO
Forskolin	$10^{-5}$	DMSO
DIDS	$10^{-4}$	H <sub>2</sub> O

### 2.6.2 Versuchsablauf

#### 2.6.2.1 Messkammer

Die Messkammer war aus oberflächenbehandeltem Edelstahl gefertigt; ihr Durchmesser betrug 30 mm, die Höhe 5 mm. In der Mitte befand sich eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 20 mm. Ein Schraubring von 26 mm und 6 mm Dicke diente der Befestigung der beladenen Kammer nach unten hin. Mit einem flachen, 8 mm breiten Plastikring von 26 mm Durchmesser wurde das eingelegte Deckgläschen nach unten hin abgedichtet, mit einem 2 mm dicken, 16 mm breiten Gummiring des gleichen Durchmessers erfolgte die Abdichtung nach oben hin.

Der handgefertigte Einsatz bestand aus einer Edelstahlplatte von 25 mm Durchmesser und einer zentralen Bohrung von 11 mm. An einem 10 x 5 x 5 mm großen Metallquader waren zwei 35 mm lange Röhren mit 1 mm Durchmesser so befestigt, dass die eine als Zu- und die andere als Ablauf für die Messlösungen benutzt werden konnten.

### 2.6.2.2 Montage der Kammer

Zuunterst wurde ein Abdichtungsring in die Kammer eingelegt, darauf ein Deckgläschen gelegt, mit 50 µl gefärbter Kryptensuspension beladen, mit einem Polycarbonat-Membranfilter abgedeckt, einem Gummiring abgedichtet, der Einsatz eingelegt und zuletzt mit einem Metallring festgeschraubt. Die Messkammer wurde dann auf dem beheizten Stativ eines invertierten Fluoreszenzmikroskopes befestigt. Das 25fach-Objektiv wurde eingestellt und die Lichtquelle in die optimale Position gebracht. Nach Anschluss der Zu- und Ablaufverbindungen wurden die Krypten mit einer konstanten Geschwindigkeit von 3 ml/min perfundiert. Die Temperatur der Lösungen wurde sowohl in den Vorratsgefäßen als auch auf dem Weg in die Messkammer und in der Kammer selbst mit Hilfe eines Wärmekreislaufes konstant auf 37 °C gehalten, um das Messergebnis nicht durch Temperatursprünge zu verfälschen (64). Der Anschluss der vorgewärmten und mit O<sub>2</sub> begasten Lösungen an die Kammer erfolgte über einen Umschalter, durch den rascher Pufferwechsel ohne Unterbrechung des Flusses möglich war.

### 2.6.2.3 Auswahl der zu messenden Krypte

Es wurde versucht, immer eine gesamte Krypte einzustellen, um so der in Kapitel 1.2.2 beschriebenen funktionellen Heterogenität der Zellen entlang der Kryptenachse Rechnung zu tragen.

Es wurde eine Krypte ausgewählt, die eine glatte Begrenzung und ein sichtbares Lumen aufwies, keine Überlappung mit benachbarten Krypten oder Zellen zeigte und ein möglichst homogenes BCECF-Signal abgab. Sie wurde mit dem 40fach-Objektiv eingestellt und dann der Lichtweg vom Okular des Mikroskops auf den Photomultiplier umgeschaltet. Durch das Okular des Photomultipliers wurde das Messfeld mittels seitlicher Blenden so eingestellt, dass der zellfreie Bereich minimal war. Die am Photomultiplier angelegte Spannung betrug konstant 900 mV. Die Lichtemission der ausgewählten Krypte wurde kontrolliert: es sollten laut Herstellerangaben maximal  $1,6 \times 10^6$  counts/min gemessen werden. Über das Verhältnis der beiden emittierten

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Anteile ließ sich eine grobe Abschätzung für den späteren Ausgangs-pH<sub>i</sub> treffen, wobei sich Werte zwischen 4 und 6 als günstig erwiesen.

### 2.6.2.4 Messung des Fluoreszenz-Signals

Die Zellen wurden abwechselnd mit 440±10 und 490±10 nm mit einer Frequenz von 100/sec exzitert. Das von der Krypte emittierte Licht wurde nach Durchlaufen eines 510 nm dichromatischen Spiegels, eines 530 nm Filters und einer anpassbaren Blende von einem Photomultiplier aufgenommen. Das nach Exzitation mit 440 nm emittierte Signal ist weitgehend pH-unabhängig, das nach Exzitation mit 490 nm pH-abhängig. Das Verhältnis dieser Emissionswerte stellte im interessierenden pH-Bereich eine gute Näherung für den tatsächlichen pH dar. Die Datenaufnahme (1 Ratio-Wert pro Sekunde) und -verarbeitung erfolgte durch die Software der Herstellerfirma (Photon Technologies Inc., Wedel, Deutschland). Ein selbstgeschriebenes Programm steuerte den Exzitations-Shutter, wodurch der Wechsel zwischen kontinuierlicher und intermittierender Belichtung während des Experiments ermöglicht wurde. Dadurch konnte das sog. "Photobleaching" möglichst gering gehalten werden. Am Ende des Versuchs erfolgte die Kalibration mittels der "high-K<sup>+</sup>-Nigericin-Methode", bei der durch den Einbau eines künstlichen K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschers intra- und extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration und pH angeglichen werden (17). Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis Fluoreszenz/pH<sub>i</sub> im interessierenden pH-Bereich linear war.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde wiederholt gemessen und als vernachlässigbar befunden.

### 2.6.2.5 Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität

Die intrazelluläre Pufferkapazität ( $\beta_i$ ) ist definiert als die Menge an Säure ( $\Delta A$ ) oder Base ( $\Delta B$ ), die dem Zytosol zugegeben werden muss, damit sich der intrazelluläre pH um eine Einheit ändert. Es gilt also

$$\beta_i = \frac{\Delta B}{\Delta pH} = -\frac{\Delta A}{\Delta pH} \quad (9)$$



Die Pufferkapazität wurde nach der Beschreibung von Boyarsky (13,14), Townsley (98) sowie Roos und Boron (75) mittels der  $\text{NH}_4^+$ -Pulstechnik bestimmt:

Zugabe von extrazellulärem  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  führt dazu, dass  $\text{NH}_3$  rasch ins Zellinnere diffundiert und sich dort ein neues  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Gleichgewicht einstellt. Absenken der extrazellulären  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Konzentration bewirkt die Freisetzung von Protonen, da  $\text{NH}_3$  in den Extrazellulärraum diffundiert. Die freiwerdenden Protonen werden nahezu vollständig von intrazellulären Puffern aufgefangen, deshalb entspricht

$$\Delta[\text{NH}_4]_i = \Delta A \quad (10)$$

Also

$$\beta_i = \frac{\Delta[\text{NH}_4^+]_i}{\Delta\text{pH}_i} \quad (11)$$

$[\Delta\text{NH}_4^+]_i$  steht hierbei für die Änderung der intrazellulären  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration nach plötzlicher Zugabe von  $\text{NH}_3$ ,  $\Delta\text{pH}_i$  für die entsprechende intrazelluläre pH-Änderung.

Das Dissoziationsgleichgewicht von  $[\text{NH}_3/\text{NH}_4^+]_0$  liegt bei physiologischem pH von 7,4 praktisch ganz auf der Seite von  $\text{NH}_4^+$ , deshalb kann man die zugegebene  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  - Konzentration mit  $[\text{NH}_4^+]_0$  gleichsetzen, und es gilt nach Henderson-Hasselbalch

$$[\text{NH}_3]_0 = [\text{NH}_4]_0 \cdot 10^{\text{pH}_0 - \text{pK}_a} \quad (12)$$

$\text{NH}_3$  kann wegen seiner Lipophilie frei durch die Zellmembran diffundieren, deshalb ist

$$[\text{NH}_3]_0 = [\text{NH}_3]_i \quad (13)$$

Es wird angenommen, dass der intra- und extrazelluläre  $\text{pK}_a$  von  $\text{NH}_4^+$  derselbe ist, nämlich 9,21.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

Die intrazelluläre  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration kann folglich analog nach Henderson-Hasselbalch ausgerechnet werden als

$$[\text{NH}_4^+]_i = \frac{[\text{NH}_3]_i}{10^{\text{pH}_i - \text{pK}_a}} = [\text{NH}_3]_i \cdot 10^{9,21 - \text{pH}_i} \quad (14)$$

Um Transportmechanismen, die zur intrazellulären pH-Änderung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls beitragen können, weitgehend auszuschalten, erfolgte die Berechnung von  $\Delta\text{pH}_i$  in Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  - zur Ausschaltung eines  $\text{HCO}_3^-$ -Aufnahmesystems -, Anwesenheit von 5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  - zur Hemmung basolateraler  $\text{K}^+$ -Kanäle - und 100  $\mu\text{M}$  Azosemid – zur Hemmung von NKCC.  $\Delta\text{pH}_i$  wurde ermittelt indem die Mittelwerte der  $\text{pH}_i$ -Werte 100 Sekunden vor dem durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Zugabe verursachten  $\text{pH}_i$ -Anstieg bzw. –Abfall von denen 100 Sekunden nach dem höchsten  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten  $\text{pH}_i$ -Anstieg subtrahiert wurden. Es wurde eine Pufferkurve erstellt mit einem  $\beta_i$  von 55 mM/pH-Einheit bei einem  $\text{pH}_i$  von 6,6 und von 22 mM/pH-Einheit bei pH 7,4. Diese Pufferkapazität wurde für die Berechnung der Protonenfluxe bei den entsprechenden pH-Werten verwendet. Die Kurve ähnelt der in vielen anderen Zelltypen gemessenen Pufferkurve und ist in Bild 3.7 dargestellt.

### 2.7 Auswertung der Messdaten und Statistik

#### 2.7.1 Umrechnung der "ratio"-Werte in pH-Werte

Die im Photomultiplier gemessenen Intensitäten wurden über eine Schnittstellenkarte direkt an den Computer übermittelt und von diesem weiter aufbereitet. Die mit der "high- $\text{K}^+$ -Nigericin-Methode“ gewonnenen 440/490-Ratio-Werte wurden mit Hilfe der Herstellersoftware zur Umrechnung der übrigen Messwerte in  $\text{pH}_i$ -Werte herangezogen.

#### 2.7.2 Weiterverarbeitung und Zusammenfassung der Messdaten

Die von der PTI-Software aufgenommenen Rohdaten für die pH-Verlaufskurven wurden als ASCII (American Standard Code for Information Interchange)-File abgespeichert, mit Hilfe von selbstgefertigten Makros nach Microsoft Excel

(Microsoft Corporation) importiert und mit Hilfe von Plot It (Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI, USA) weiterverarbeitet. Bild 3.6 zeigt beispielhaft die Rohdaten eines Versuchs. Die Versuche einer Gruppe wurden dann ebenfalls mit Hilfe selbst gefertigter Makros interpoliert, um ein gleichförmiges Zeitprotokoll zu erhalten. Zum Schluss erfolgte die grafische Darstellung mit Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

### 2.7.3 Berechnung der Fluxraten

Zunächst wurde der Ausgangs-pH errechnet, der aus den  $\text{pH}_i$ -Werten des geraden Kurvenverlaufs vor dem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -induzierten pH-Anstieg gemittelt wurde.

Aus der Pufferkurve wurde die Pufferkapazität für den gefundenen Anfangsspitzen-pH ermittelt.

Dann berechnete man den Kurvenabfall nach 5-minütigem  $\text{NH}_4^+$ -Puls mit 40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , und zwar den initialen, steilsten und linearen Teil. Dies erfolgt mittels einer linearen Regressionsanalyse nach der Formel

$$\frac{n - (\sum xy)(\sum x)(\sum y)}{n(\sum(x^2)) - (\sum x)^2} \quad (15)$$

mit der Einheit  $\Delta\text{pH}/\text{sec}$  an individuellen nicht-polierten  $\text{pH}_i$ -Kurven.

Die Fluxrate  $J$  ergab sich nun nach Multiplikation mit der intrinsischen Pufferkapazität als

$$J = \frac{\beta_i \cdot \Delta\text{pH}}{\Delta t \cdot 60} \quad [\text{mM}/\text{min}] \quad (16)$$

### 2.7.4 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwerte ( $M$ )  $\pm$  „standard error of the mean“ (SEM) dargestellt. Letzterer errechnet sich aus Standardabweichung (Stabw) geteilt durch Anzahl der Versuche ( $n$ ). Die Ergebnisse wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet.

Bei der Ermittlung der Expressionsniveaus von NKCC in den einzelnen Organen wurden mindestens drei unabhängige PCR-Experimente durchgeführt,

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

so dass Pipettierfehler oder -ungenauigkeiten, die während der Reaktion exponentiell amplifiziert werden, weniger ins Gewicht fallen. Das Verhältnis  $ODI_p/ODI_s$  wurde für jedes Einzelexperiment in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion wie in Kap. 2.4.8 beschrieben bestimmt. Dabei wurde die Parallelität der halblogarithmisch aufgetragenen Amplifikationskurven von Probe (NKCC) und Standard (18s rRNA) überprüft, indem eine Regressionskurve nach der Methode der kleinsten Quadrate mit Hilfe der exponentiellen Trendlinie (Microsoft Excel) ermittelt wurde. Nur wenn die Steigung R der ermittelten Geradengleichung  $y = Ce^{Rx}$  von beiden Kurven um weniger als 10% abwich konnte ein Vergleich angestellt werden. An einem beliebigen X-Wert der exponentiellen Phase wird dann der Quotient  $ODI_{NKCC}/18s\ rRNA$  gebildet. Da es sich hierbei um Relativ- und nicht Absolutwerte handelt, können zusätzliche Punkte durch Extrapolation ermittelt werden für den Fall, dass sich die beiden Geraden in keinem X-Wert überschneiden. Aus den einzelnen Ergebnissen wurde dann ein Mittelwert bestimmt und der dazugehörige Standardfehler berechnet.

Die Berechnung der funktionellen Transporter-Aktivitäten erfolgte in Form von Relativwerten, d.h. der jeweilige Anteil an der Protonen-Fluxrate nach  $NH_4^+$ -Puls wurde im Verhältnis zu einem vorangehenden Kontrollpuls gesetzt (s. Kap. 3.7.2). Wieder wurden Mittelwert und Standardfehler berechnet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Student's t-Test, und zwar der ungepaarte t-Test zum Vergleich der Relativwerte bzw. der gepaarte t-Test für die Absolutwerte verwendet. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn  $P < 0,05$  war.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Der Erfolg jeder Gesamt-RNA Isolierung (Kap. 2.3) muss vor dem Einsatz in der PCR durch photometrische Konzentrationsbestimmung, Berechnung des Quotienten zwischen der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ( $E_{260}/E_{280}$ ) (Kap. 2.3.4) und durch ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Glyoxal-Gel (Kap. 2.3.5) überprüft werden. Der Wert von  $E_{260}/E_{280}$  sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um Verunreinigungen durch Proteine, Salze und Ethanol auszuschließen.

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde für alle Proben aus Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Niere von CFTR(+/+) und CFTR(-/-) Mäusen bestimmt und dann so mit Wasser verdünnt, dass sie in einer Konzentration von 4 µg in der reversen Transkription eingesetzt werden konnte. Die verdünnten RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Die in Wasser gemessenen Werte für den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  lagen zwischen 1,7 und 1,8 und erfüllten damit den erforderlichen Reinheitsgrad.

Das Glyoxal-Gel (nicht abgebildet) zeigte zwei scharfe Banden, die 28s und 18s rRNA-Bande, wobei die 28s rRNA-Bande das ~1,5 bis 2fache der 18s rRNA-Bande ausmachte. Die tRNA war als sehr schwache Wolke an der Lauffront des Gels erkennbar. Dies konnte als Beweis für eine intakte Gesamt-RNA gewertet werden.

#### 3.2 Expressionsniveau von NKCC1 in verschiedenen Organen von CFTR(+/+) und CFTR(-/-) Mäusen

Das Expressionsniveau eines Gens in unterschiedlichen Geweben kann mit Hilfe der Methode der semiquantitativen PCR (Kap. 2.4.7) bestimmt werden. Das Signal, das von der Bande des untersuchten Gens ausgeht, wird hierbei ins Verhältnis zum Signal einer internen Kontrolle gesetzt. Kleine Ladefehler,

### 3 ERGEBNISSE

---

sogenannte „tube to tube varieties“, fallen dadurch weniger ins Gewicht. Jede Reaktion wird mindestens dreimal durchgeführt, so dass „tube to tube varieties“ als Standardfehler angegeben werden können. Die exponentielle Phase der Reaktion wird durch „monitoring“ ermittelt, d.h. alle zwei Zyklen wird der PCR eine Probe entnommen. Die PCR-Produkte werden im Agarose-Gel aufgetrennt und die integrierte optische Dichte (ODI) der Ethidiumbromid-gefärbten Banden ermittelt. Der Quotient aus ODI des interessierenden Gens und interner Kontrolle im exponentiellen Bereich der Reaktion kann als Maß für das relative Expressionsniveau gewertet werden. Es erfolgt also keine absolute Quantifizierung im Sinne einer Ermittlung der Kopienzahl des Gens zu Beginn der Reaktion, sondern eine Bestimmung der relativen Expression im Vergleich zu der konstant exprimierten internen Kontrolle. Mit Hilfe der semiquantitativen PCR können so minimale Expressionsunterschiede von 1,3 bis 1,7 je nach Primer-Paar detektiert werden.

Um die relative Menge an NKCC1-mRNA in Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Niere von CFTR(+/-) und CFTR(-/-) Mäusen zu ermitteln, wurde das Expressionsniveau von NKCC1 deshalb in dieser Arbeit mit Hilfe der semiquantitativen PCR bestimmt.

#### 3.2.1 Wahl der internen Kontrolle

Als interne Ladekontrolle wurde 18s rRNA verwendet. 18s rRNA wird in den verschiedensten Gewebetypen in sehr konstanter Höhe exprimiert. Dies und die Tatsache, dass bei der Amplifikation von 18s rRNA das PCR Produkt in allen untersuchten Geweben der Maus in Zyklus 24 der Reaktion im Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel als gerade sichtbare Bande erscheint, macht es zu einer geeigneten Ladekontrolle bei Expressionsuntersuchungen, die von Gesamt-RNA ausgehen.

#### 3.2.2 Primer-Design

Die Primer für die PCR von NKCC1 und 18s rRNA der Maus wurden mit Hilfe der Husar-Sequenzanalyse-Software (EMBL, Heidelberg) wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben konstruiert. Bei der Primerwahl für NKCC1 wurde darauf geachtet,

dass sich die Sequenz im ausgesuchten Bereich möglichst in den verschiedenen Organen nicht unterscheidet. Die 18s rRNA Primer der Firma Ambion können für fast alle Säugertierspezies eingesetzt werden.

Im folgenden werden die für die RT-PCR verwendeten Primer aufgelistet:

NKCC1 Maus, ID B0466D05<sup>1</sup>

forward Primer (22-mer):5' GGG CTA ATG AAC AAC TTT CAG G 3'

reverse Primer (22-mer):5' GGA GAA CCT GTC ATT ACA AGG C 3'

Länge des PCR-Produkts: 641 bp

18s rRNA (für alle Säugetiere), Ambion

forward Primer (20-mer):5' TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG 3'

reverse Primer (20-mer):5' GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA 3'

Länge des PCR-Produkts: 488 bp

#### 3.2.3 Optimierung der PCR

Nach der reversen Transkription (Kap. 2.4.2) der mRNA in cDNA erfolgt die Optimierung der PCR-Bedingungen für jedes Primer-Paar. Dazu wird die Zyklenzahl bestimmt, bei der die Reaktion exponentiell abläuft, also der Bereich zwischen Detektion der ersten gerade sichtbaren Bande und Sättigung der Reaktion. Außerdem wird die optimale Annealing-Temperatur ermittelt, bei der die Primer an die cDNA binden.

Für NKCC1 ließ sich der exponentielle Bereich zwischen 26 und 32 Zyklen bestimmen für 18s rRNA zwischen 24 und 30 Zyklen. Die optimale Annealing-Temperatur lag für NKCC1 bei 58 °C für 18s rRNA bei 56 °C.

#### 3.2.4 Auswertung

Die DNA-Fragmente der Gene konnten in der erwarteten Größe auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel detektiert werden: ein 641 bp Fragment für NKCC1 und ein 488 bp Fragment für die 18s rRNA.

---

<sup>1</sup> Die Sequenz ist mit der ID des EMBL-Datenbanksystems in Heidelberg bezeichnet.

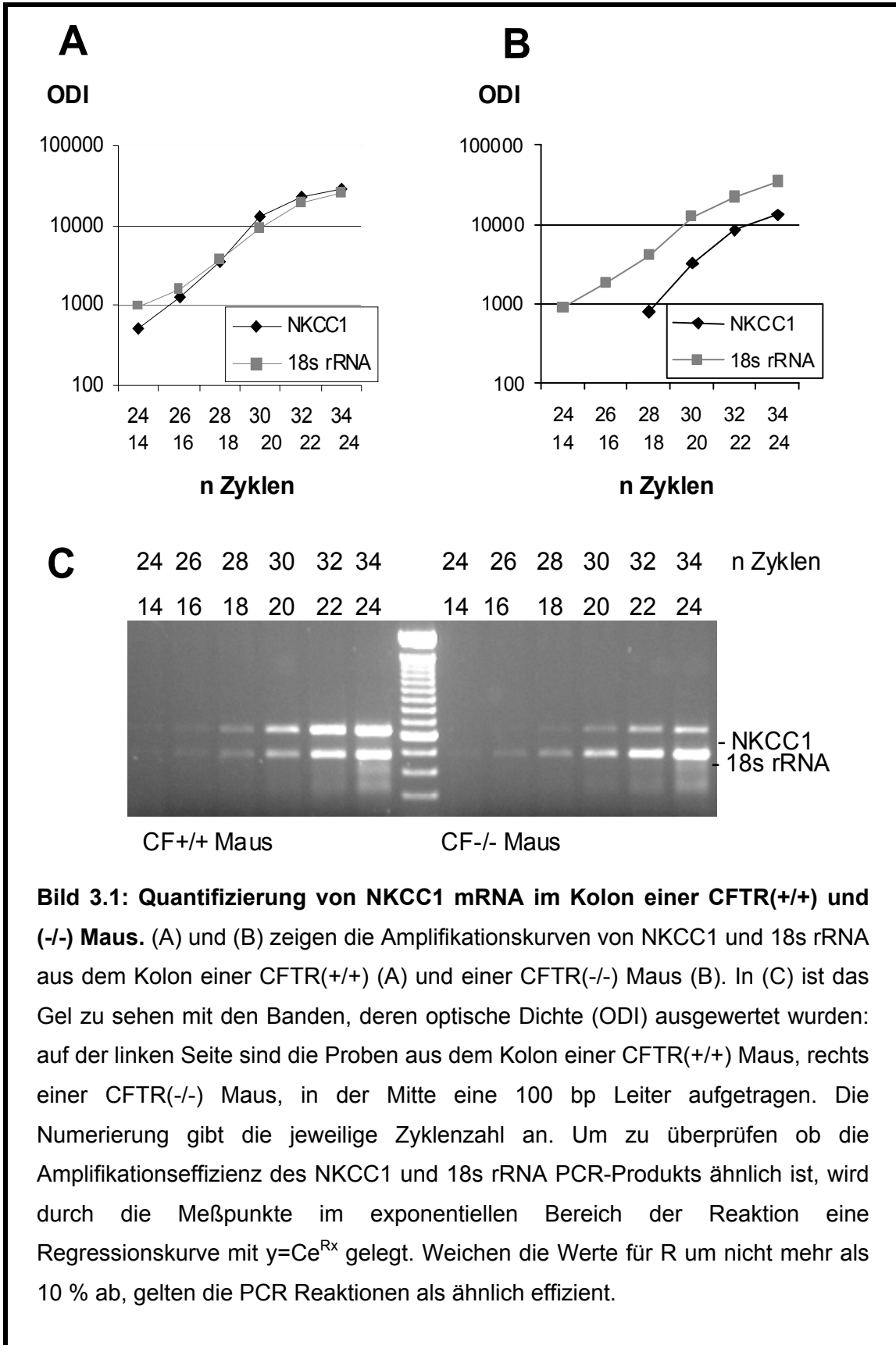
### 3 ERGEBNISSE

---

So wie in Kapitel 2.4.8 beschrieben, werden die Gele mit Hilfe des Image Master VDS Systems, der dazugehörigen Software und der Tabellenkalkulation in Excel ausgewertet.

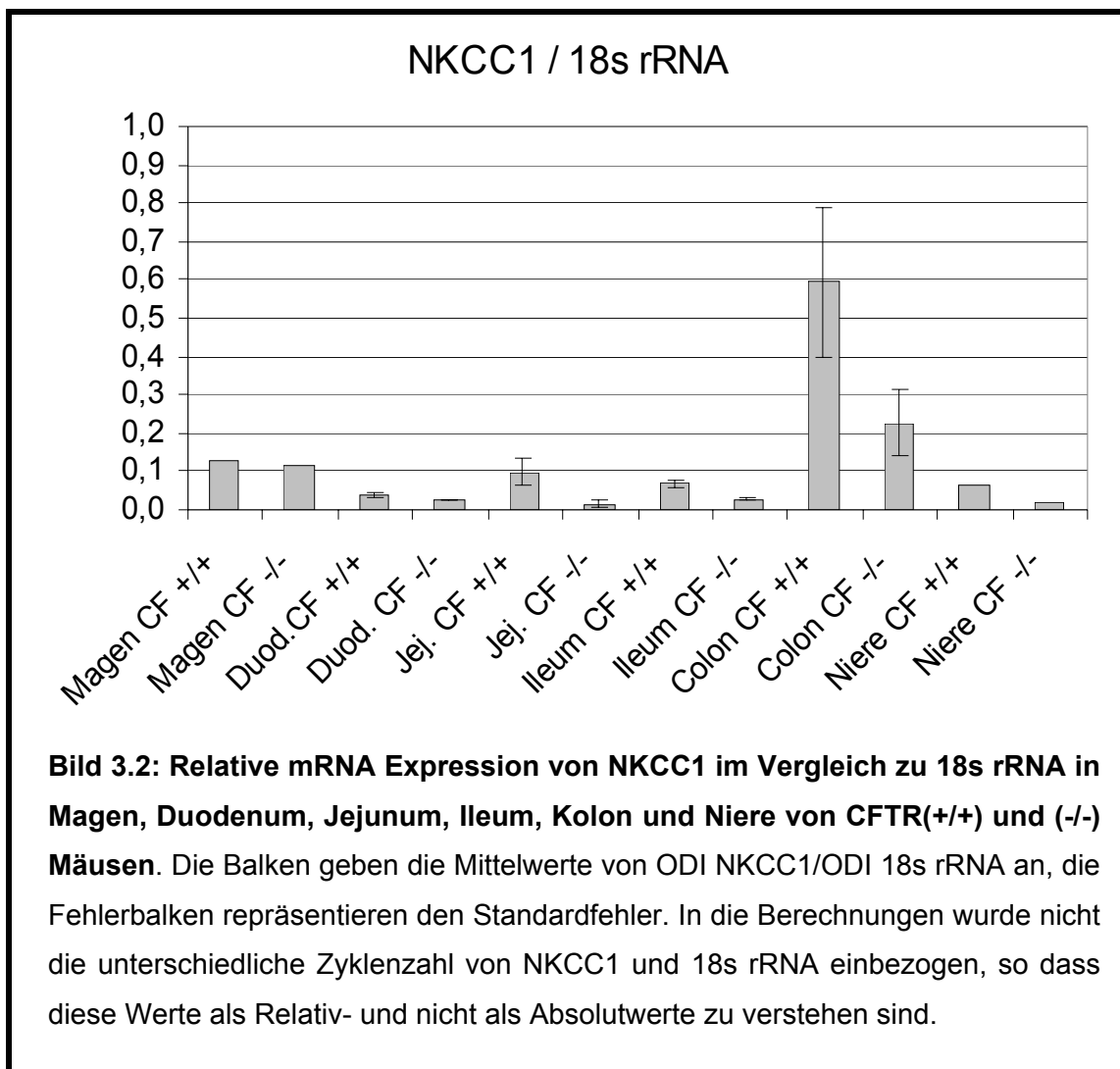
Bild 3.1 zeigt die Amplifikation von NKCC1 aus 4 µg Gesamt-RNA des Kolons einer CFTR(+/+) Maus (links abgebildet) und einer CFTR(-/-) Maus (rechte Bildhälfte). In Bild 3.1C ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel zu sehen, in der Mitte ist eine 100 Basenpaar-Leiter als Vergleichsparameter aufgetragen. Darüber sind in Bild 3.1 A und B die zugehörigen Diagramme abgebildet: Die integrierte optische Dichte (ODI) der Banden von NKCC1 und 18s rRNA ist gegen die Zyklenzahl der Kettenreaktion aufgetragen. Bei halblogarithmischer Darstellung verlaufen die exponentiell ablaufenden Amplifikationsreaktionen parallel. Der Wert „R“ wird Amplifikationseffizienz genannt. Er entspricht der Steigung der Geraden und sollte in einem verwertbaren Experiment für beide Geraden um nicht mehr als 10 % voneinander abweichen. Dies ist in dem dargestellten Versuch gegeben. In der exponentiellen Phase, d.h. in dem Bereich, in dem die Geraden parallel verlaufen, wird für einen beliebigen X-Wert der Quotient ODI NKCC1/18s rRNA berechnet. Dieses Verhältnis erlaubt eine Abschätzung der Expressionsraten. Genauso wird das Expressionsniveau in den übrigen Organen bei CFTR(+/+) und CFTR(-/-) Mäusen ermittelt.





### 3 ERGEBNISSE

Alle Werte werden dann im Säulendiagramm als Mittelwert aufgetragen. Dieses Säulendiagramm ist für alle Organe des Gastrointestinaltrakts und die Niere von CFTR(+/-) und CFTR(-/-) Mäusen in Bild 3.2 dargestellt.



NKCC1 wird im ganzen Gastrointestinaltrakt exprimiert, und zwar mit Abstand am höchsten in Kolon und Magen. Die Expression nimmt dabei entlang der Krypten-Villi-Axe nach oben hin ab und bricht an der Spitze der Krypte abrupt ganz ab (25,31,95).

Die typische Verteilung der Expression von NKCC1 im Gastrointestinaltrakt ließ sich bestätigen: bei den CFTR(+/-) Mäusen war die relative mRNA Expression von NKCC1 im Vergleich zu 18s rRNA mit Abstand am höchsten im Kolon ( $0,59 \pm 0,2$ ;  $n=4$ ), gefolgt von Magen ( $0,13$ ;  $n=1$ ) und Jejunum ( $0,11 \pm 0,04$ ;  $n=3$ ),

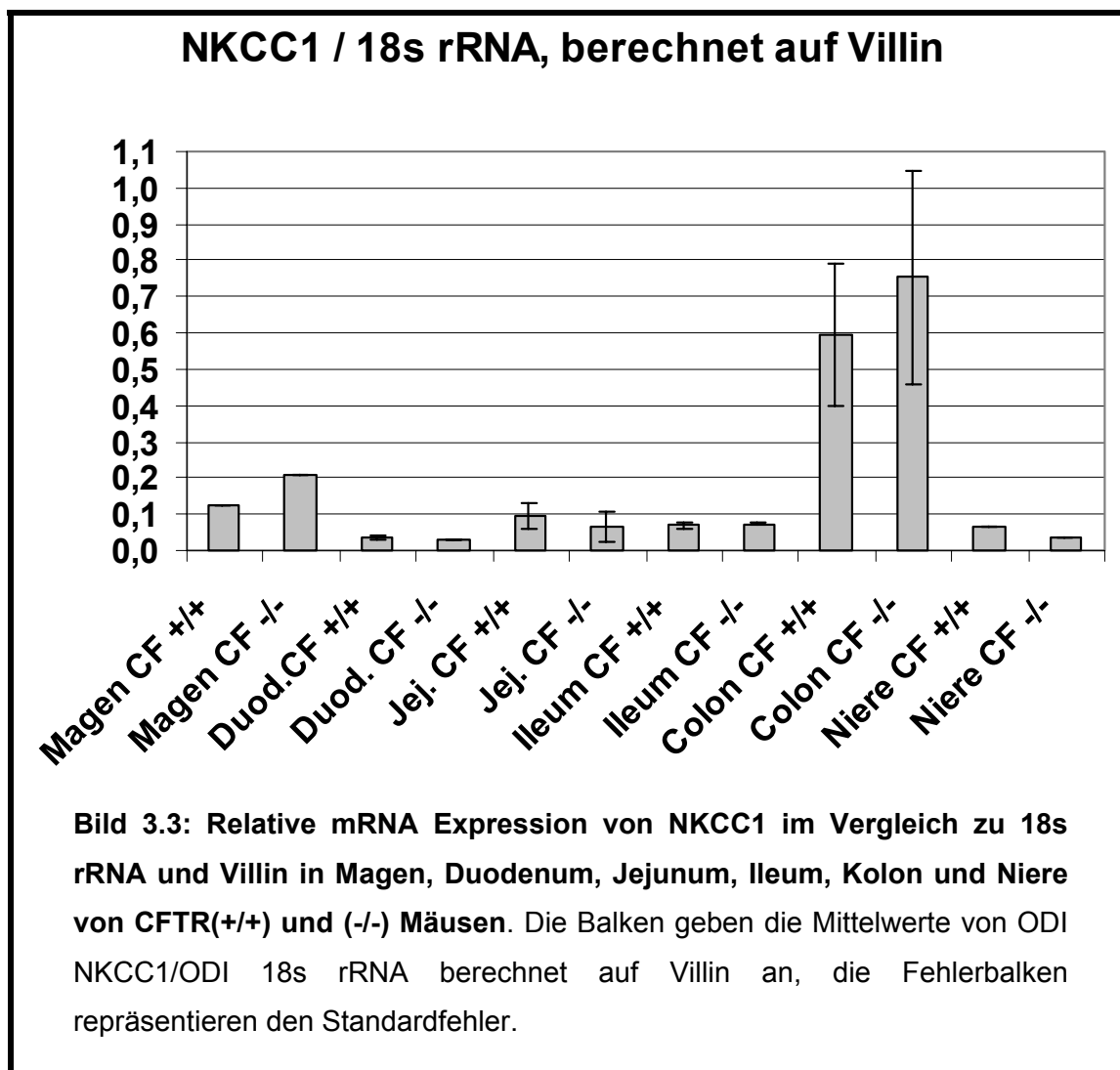
dann Ileum ( $0,07 \pm 0,01$ ;  $n=3$ ) und Niere ( $0,07$ ;  $n=1$ ) und zuletzt Duodenum ( $0,04 \pm 0,01$ ;  $n=2$ ). Hierbei ist anzumerken, dass in die Berechnungen nicht die unterschiedliche Zyklenzahl von NKCC1 und 18s rRNA einbezogen wurden, so dass diese Werte als Relativ- und nicht als Absolutwerte zu verstehen sind.

In einer Zelllinie aus Duktusepithel des Pankreas mit fehlendem CFTR stellten Shumaker et al. verminderte Expressionlevel für NKCC1 fest verglichen mit normalem Duktusepithel (88).

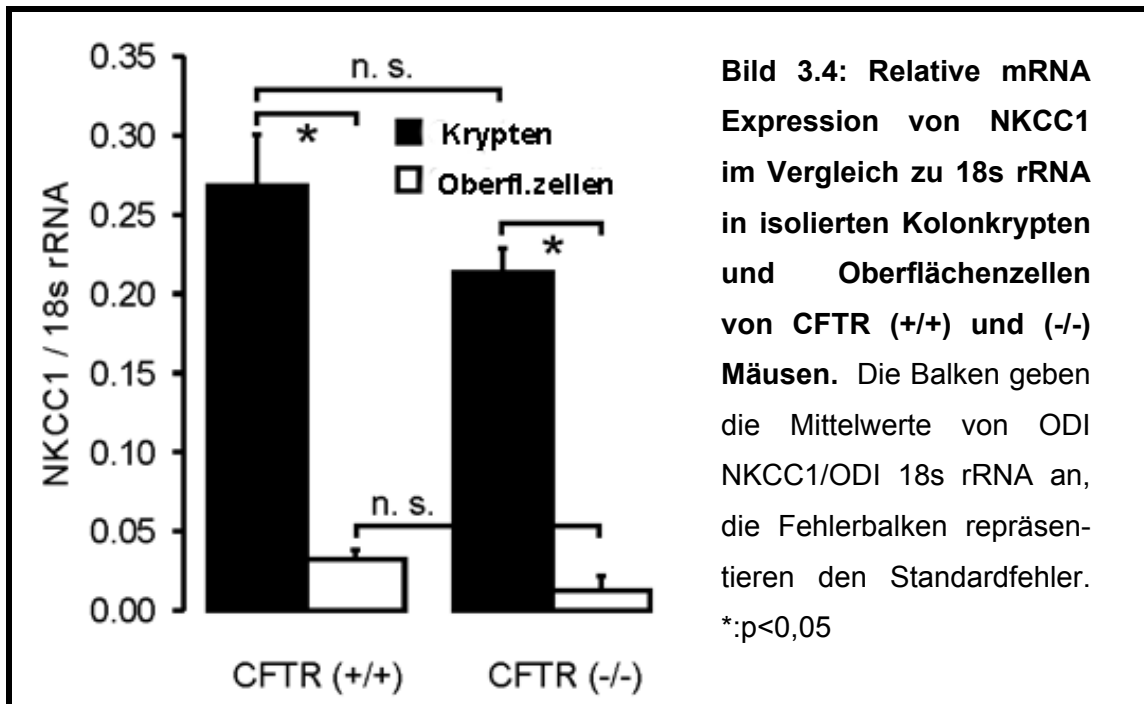
In den durchgeführten Versuchen konnte tatsächlich ein Reduktion der NKCC1 Expression im Gastrointestinaltrakt von CFTR (-/-) Mäusen im Vergleich zu 18s rRNA festgestellt werden. Im Gesamtkolon lag das relative Expressionsniveau von NKCC1 bei  $0,23 \pm 0,09$  im Vergleich zu  $0,59 \pm 0,2$  ( $n=4$ ) in den CFTR(+/+) Mäusen.

Als die Ergebnisse jedoch auf Villin, ein zytoskelettales Protein der Bürstensaummembran, bezogen wurden, konnte der Unterschied in der NKCC1 Expression in CFTR (-/-) und (+/+) Mäusen nicht mehr festgestellt werden. Das daraus resultierende Diagramm ist in Bild 3.3 dargestellt. Das relative Expressionsniveau von NKCC1 im Kolon von CFTR(-/-) Mäusen lag nun bei  $0,75 \pm 0,3$ .

### 3 ERGEBNISSE



Es wurde eine weitere Versuchsreihe angestellt, in der anstatt der NKCC1 Expression des Gesamtkolons, die der (wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben) isolierten Krypten des proximalen Kolons im Vergleich zu den Oberflächenzellen sowohl bei CFTR(+/+) als auch (-/-) Mäusen gemessen wurde. Das entsprechende Diagramm zeigt Bild 3.4.



Wie erwartet lag die NKCC1 Expression in den Krypten deutlich höher als in den Oberflächenzellen. Die Expression im CFTR(-/-) Gewebe war etwas niedriger als die von CFTR (+/+), dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch relevant (n=4-6 Mäuse).

### 3.3 Isolierung und Anfärbung der Krypten

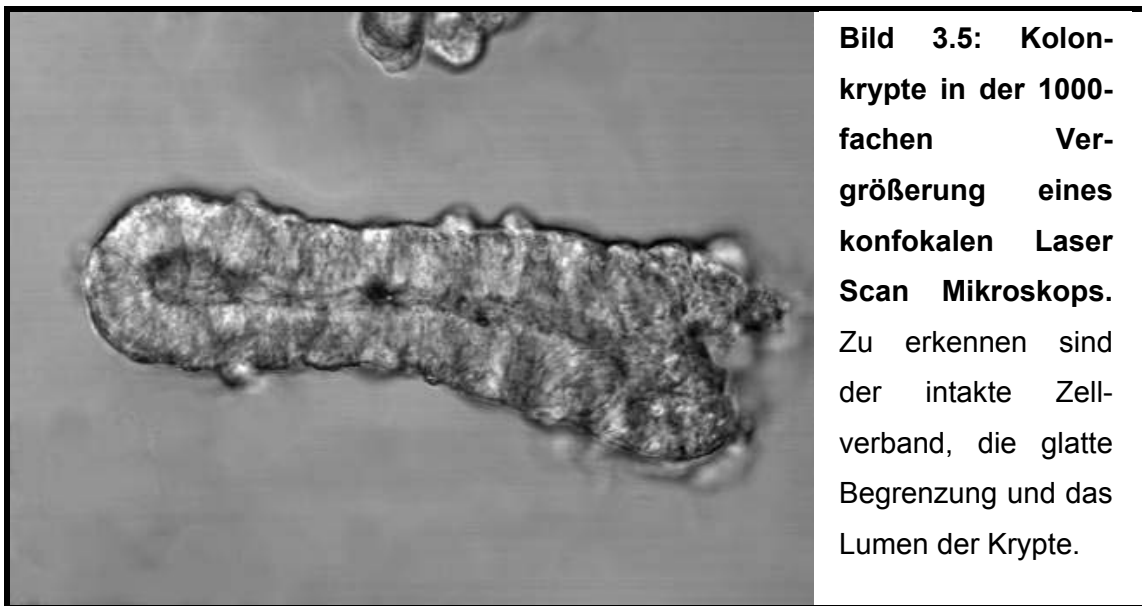
Die Kolonkrypten wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben mit Hilfe eines EDTA-haltigen Puffers aus ihrem Zellverband herausgelöst. Um eine bestmögliche Qualität der Krypten zu erreichen, sollte bei der Präparation des Kolons und der anschließenden Kryptenisolierung so schnell wie möglich gearbeitet werden. Die Zeit für die Isolierung mit EDTA-haltiger Lösung konnte standardisiert werden: nach den ersten 20 Minuten Vibration bei 10 Hz, in denen sich hauptsächlich Schmutz und Oberflächenzellen lösten, konnten in 5-minütigen Abständen fünf bis sechs Kolonkryptenfraktionen gewonnen werden. Bei zu langer Verdauung wurde die Qualität der Krypten durch Zerfall und Zerstörung der zellulären Integrität eingeschränkt. Der Erfolg der Präparation wurde unter dem Lichtmikroskop in der 1000-fachen Vergrößerung kontrolliert, um so

### 3 ERGEBNISSE

---

geeignete Fraktionen zu gewinnen. Diese wurden mit Standard-HEPES-Puffer gewaschen und bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

Bild 3.5 zeigt eine Trypanblau-gefärbte, isolierte Krypte in der 1000-fachen Vergrößerung eines konfokalen Laser Scan Mikroskops. Schön zu erkennen sind der intakte Zellverband, die glatte Begrenzung und das Lumen der Krypte.



Die geeigneten Fraktionen wurden mit dem Farbstoff BCECF 20 bis 30 Minuten lang gefärbt (Kap. 2.5.4). Da die Qualität der Anfärbung als Zeichen für die Viabilität der Zelle zu sehen ist, wurden die Krypten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und eine einzelne ausgewählt. Sie sollte eine glatte Begrenzung, ein sichtbares Lumen, keine Überlappung mit anderen Krypten aufweisen und ein möglichst homogenes BCECF-Signal abgeben.

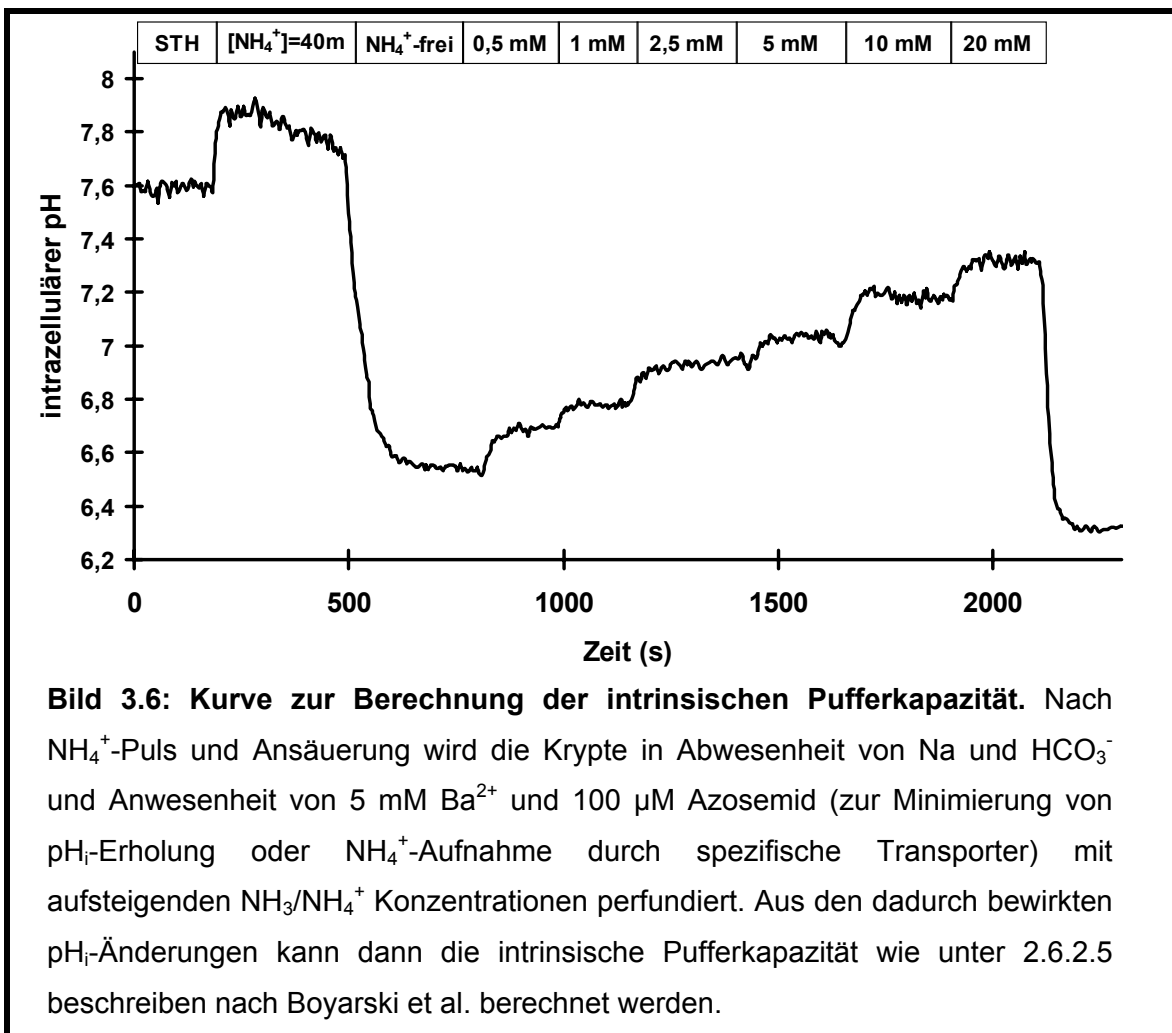
Die auf diese Weise isolierten Kolonkrypten wiesen eine ausgezeichnete Viabilität auf.

#### 3.4 Erstellung der Pufferkurve

Um die Fluoreszenz-Ratio-Werte in intrazelluläre pH-Werte umzurechnen, ist es notwendig, die intrazelluläre Pufferkapazität der Kolonkrypten zu kennen.

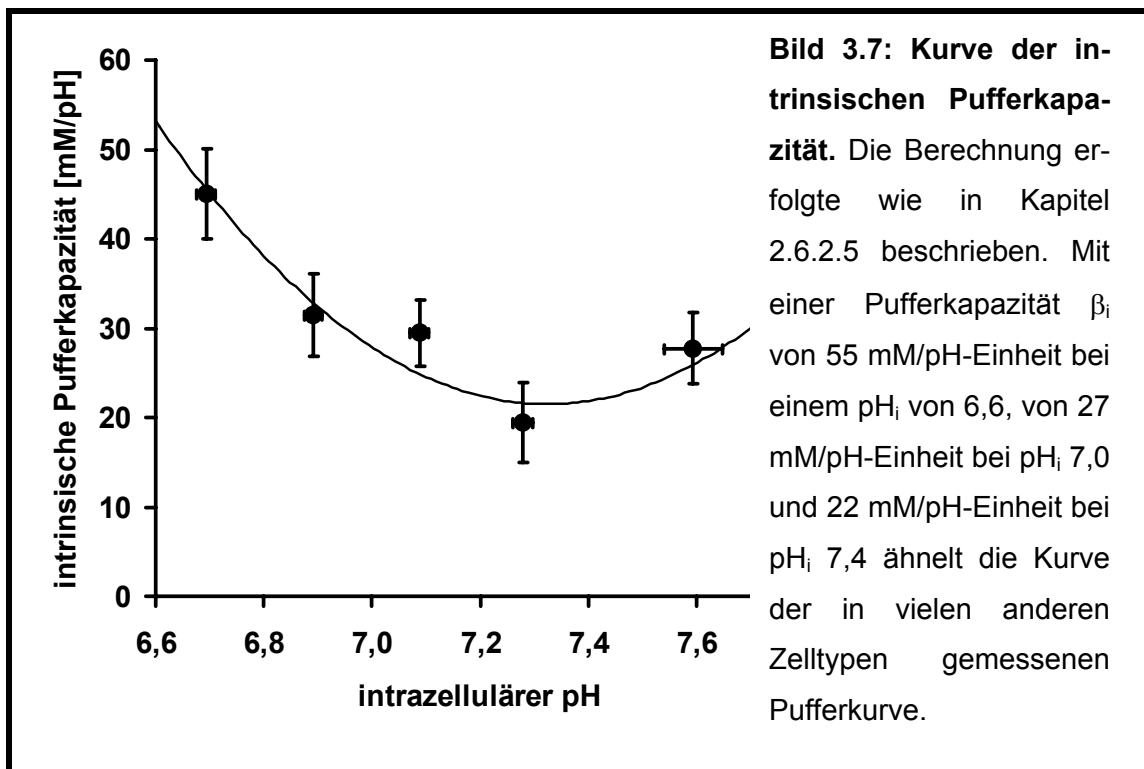
Sie wird wie in Kapitel 2.6.2.5 beschrieben errechnet.

Bild 3.6 zeigt exemplarisch einen der Versuche, aus dem die darunter abgebildete Pufferkurve (Bild 3.7) erstellt wurde mit einer Pufferkapazität  $\beta_i$  von 55 mM/pH-Einheit bei einem  $\text{pH}_i$  von 6,6, von 27 mM/pH-Einheit bei  $\text{pH}_i$  7,0 und 22 mM/pH-Einheit bei  $\text{pH}_i$  7,4. Die Kurve ähnelt damit der in vielen anderen Zelltypen gemessenen Pufferkurve. Die errechnete Pufferkapazität wurde in den folgenden Versuchen für die Berechnung der Protonenfluxe bei den entsprechenden pH-Werten verwendet.



**Bild 3.6: Kurve zur Berechnung der intrinsischen Pufferkapazität.** Nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls und Ansäuerung wird die Krypte in Abwesenheit von Na und  $\text{HCO}_3^-$  und Anwesenheit von 5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  und 100  $\mu\text{M}$  Azosemid (zur Minimierung von  $\text{pH}_i$ -Erholung oder  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme durch spezifische Transporter) mit aufsteigenden  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  Konzentrationen perfundiert. Aus den dadurch bewirkten  $\text{pH}_i$ -Änderungen kann dann die intrinsische Pufferkapazität wie unter 2.6.2.5 beschreiben nach Boyarski et al. berechnet werden.

### 3 ERGEBNISSE



#### 3.5 $pH_i$ -Messung

Die Anfärbung der Krypten mit BCECF ermöglicht die Messung des intrazellulären pHs, da der Farbstoff die Eigenschaft besitzt, bei Excitation mit bestimmten Wellenlängen ein pH-unabhängiges und ein pH-abhängiges Signal abzugeben. Das Verhältnis der pH-abhängigen zur pH-unabhängigen Lichtemission stellt im interessierenden Bereich eine gute Näherung für den intrazellulären pH ( $pH_i$ ) dar. Diese Fluoreszenz-Ratio-Werte werden am Ende eines jeden Versuches durch Kalibrationskurven mit Hilfe der „high-Kalium-Nigericin-Methode“ in  $pH_i$ -Werte umgerechnet (Kap. 3.6).

Durch das Okular des Photomultipliers wurde die Krypte mittels Blenden eingestellt und die Lichtemission gemessen (Kap. 2.6.2.4). Sie sollte bei kleiner  $10^6$  counts pro Sekunde für den pH-unabhängigen Teil (440 nm) und größer  $6 \times 10^4$  für den pH-abhängigen Teil (490 nm) liegen. Das Verhältnis von pH-abhängigem zu pH-unabhängigem Signal (Ratio F490/F440) sollte zu Beginn der Messung zwischen 4 und 6 liegen.



Zu Beginn des Experiments erfolgte die Inkubation der Kolonkrypten in einer NaCl-haltigen, HEPES-Tris-gepufferten; mit 100 % O<sub>2</sub>-begasten und auf 37 °C gewärmten Lösung (STH, Kap. 2.6.1.1).

Der durchschnittliche Anfangs-pH wurde bei allen Messungen ermittelt, indem der Mittelwert des pHs der ersten ca. 100 Sekunden unter Standardbedingungen bis zum anschließenden NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Puls berechnet wurde.

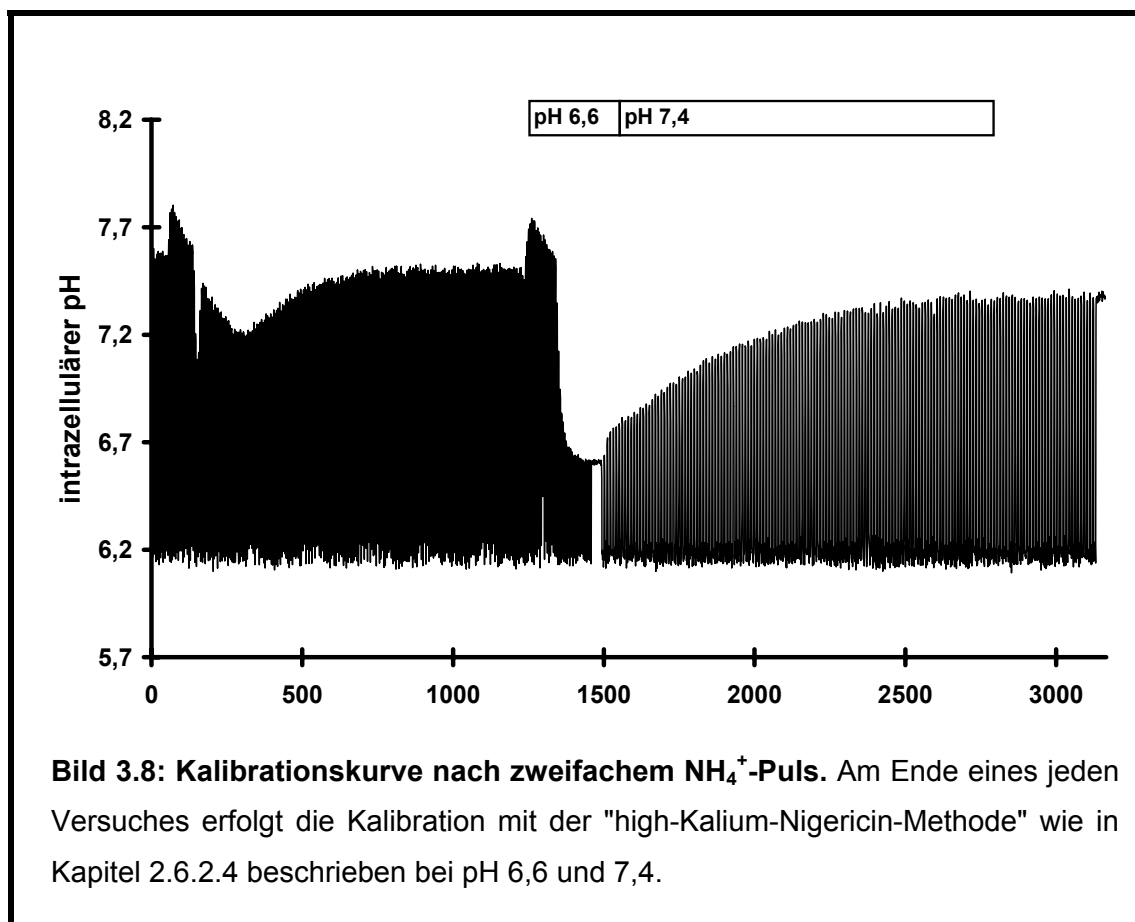
Bei Normalmäusen lag der Anfangs-pH bei 7,62±0,03; bei CFTR(+/+) Mäusen betrug er 7,48±0,03 bzw. 7,42±0,03 bei CFTR(-/-) Mäusen.

#### 3.6 Kalibration

Die Umrechnung der Verhältnisse der Emissionswerte in pH-Werte erfolgte wie in Kapitel 2.6.2.4 beschrieben mit der „high-Kalium-Nigericin-Methode“.

Bild 3.8 zeigt beispielhaft die Rohdaten eines Versuches mit der abschließenden Kalibration bei pH 6,6 und 7,4. Bei der zuerst durchgeführten Kalibration mit pH 6,6 stellte sich ein Gleichgewicht innerhalb kurzer Zeit ein, bei pH 7,4 dauerte es hingegen bis zu 30 Minuten bis ein stabiler Wert erreicht war.

### 3 ERGEBNISSE



**Bild 3.8: Kalibrationskurve nach zweifachem  $\text{NH}_4^+$ -Puls.** Am Ende eines jeden Versuches erfolgt die Kalibration mit der "high-Kalium-Nigericin-Methode" wie in Kapitel 2.6.2.4 beschrieben bei pH 6,6 und 7,4.

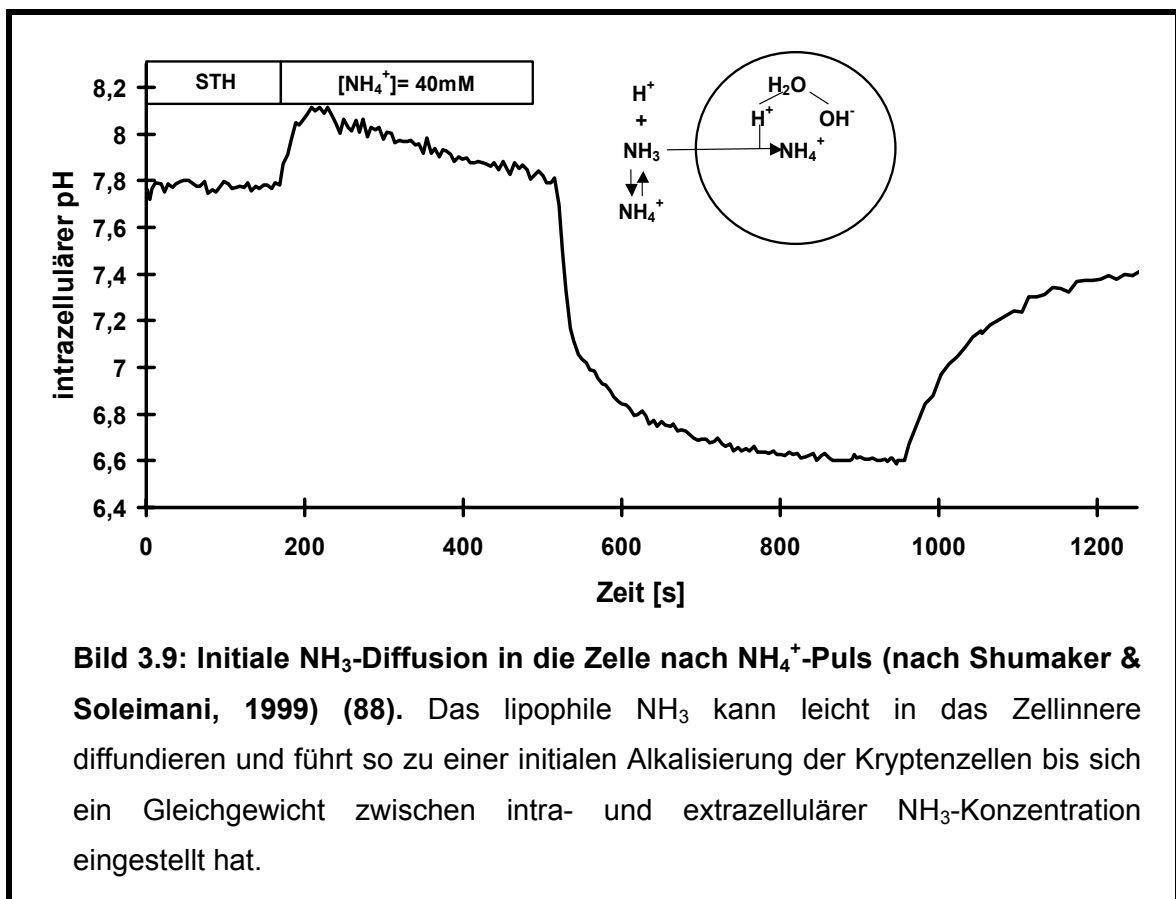
### 3.7 Messung der NKCC-Aktivität mittels der $\text{NH}_4^+$ -Puls-Technik

#### 3.7.1 Die $\text{NH}_4^+$ -Technik

Die Aktivität von NKCC lässt sich mit der  $\text{NH}_4^+$ -Puls-Technik nachweisen und quantifizieren. Da der  $\text{Na}^+$ - $2\text{Cl}^-$ - $\text{K}^+$ -Kotransporter anstelle von Kalium auch  $\text{NH}_4^+$  transportieren kann, lässt sich seine Aktivität durch das Ausmaß der intrazellulären Azifizierung durch  $\text{NH}_4^+$ -Einwärtstransport nach plötzlicher Applikation von 40 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mittels BCECF-Fluoreszenz-Messung bestimmen (83). Dabei lässt sich die NKCC-Aktivität als der Natrium-abhängige, Azosemid-sensitive Anteil von anderen Transportern unterscheiden (88):

Nach anfänglicher Inkubation in O<sub>2</sub>-begastem und auf 37 °C gewärmtem STH-Puffer werden die Krypten mit einer Ba-haltigen NaCl-Lösung (Kap. 2.6.1.1) perfundiert, die zusätzlich 40 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> enthält. Der pK des NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Puffersystems ist 8,9 bei 37 °C, so dass bei physiologischem pH von 7,4 die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration 30 mal so hoch ist wie die von NH<sub>3</sub>. NH<sub>3</sub> ist ein lipophiles Gas und kann deshalb leicht ins Zellinnere diffundieren. Für das wasserlösliche NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ist die Zellmembran hingegen viel undurchlässiger (70). Durch die NH<sub>3</sub>-Diffusion in die Zelle kommt es zu einer schnellen initialen Alkalisierung der Kryptenzellen, bis intra- und extrazelluläres NH<sub>3</sub> im Gleichgewicht stehen (88).

Bild 3.9 stellt dies schematisch in einem Diagramm dar.

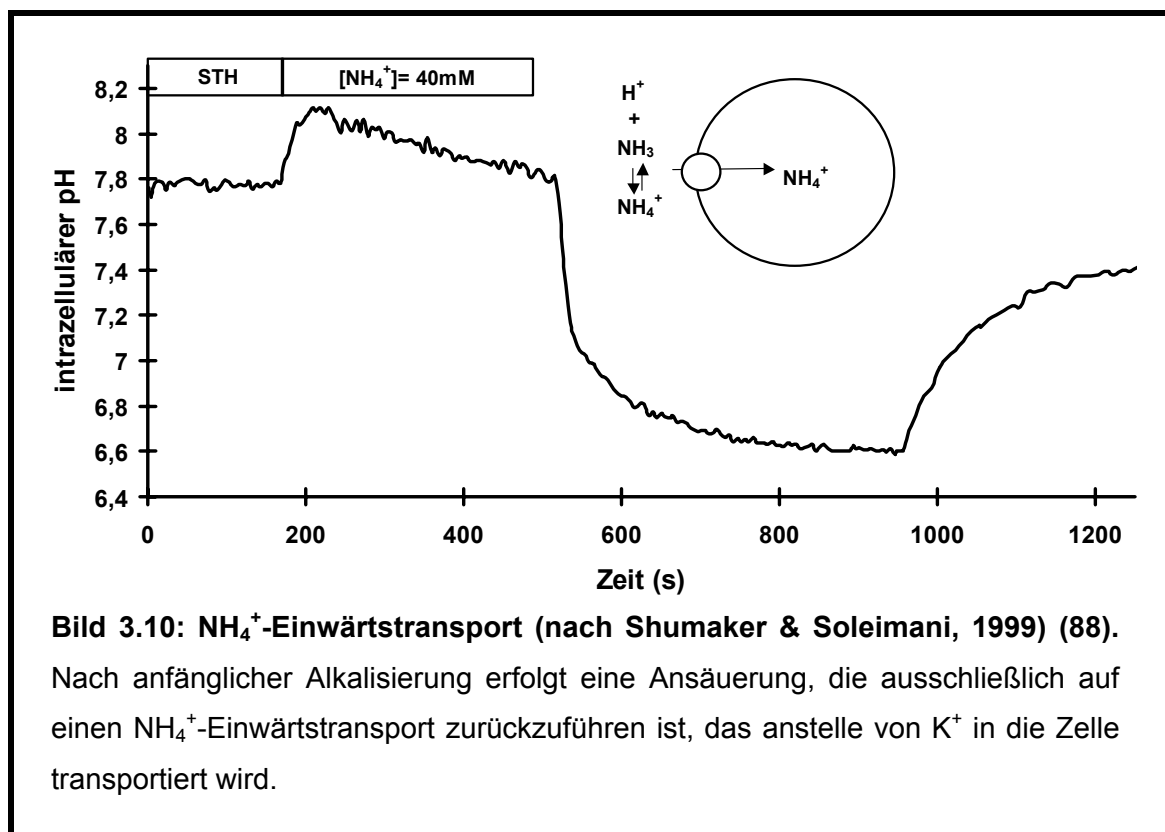


Auf diese Weise wurde der pH in den durchgeführten Versuchen anfangs auf 7,61±0,2 angehoben.

### 3 ERGEBNISSE

Auf diese initiale Alkalisierung folgt dann eine Ansäuerung, wobei der initiale pH-Abfall ( $\Delta\text{pH}_i/t$ ) ausschließlich auf einen Einwärtstransport von  $\text{NH}_4^+$  zurückzuführen ist, das anstelle von  $\text{K}^+$  in die Zelle transportiert wird. Daran sind neben NKCC auch  $\text{HCO}_3^-$ -abhängige Transportmechanismen beteiligt.

Dieser Zusammenhang wird in Bild 3.10 schematisch dargestellt.



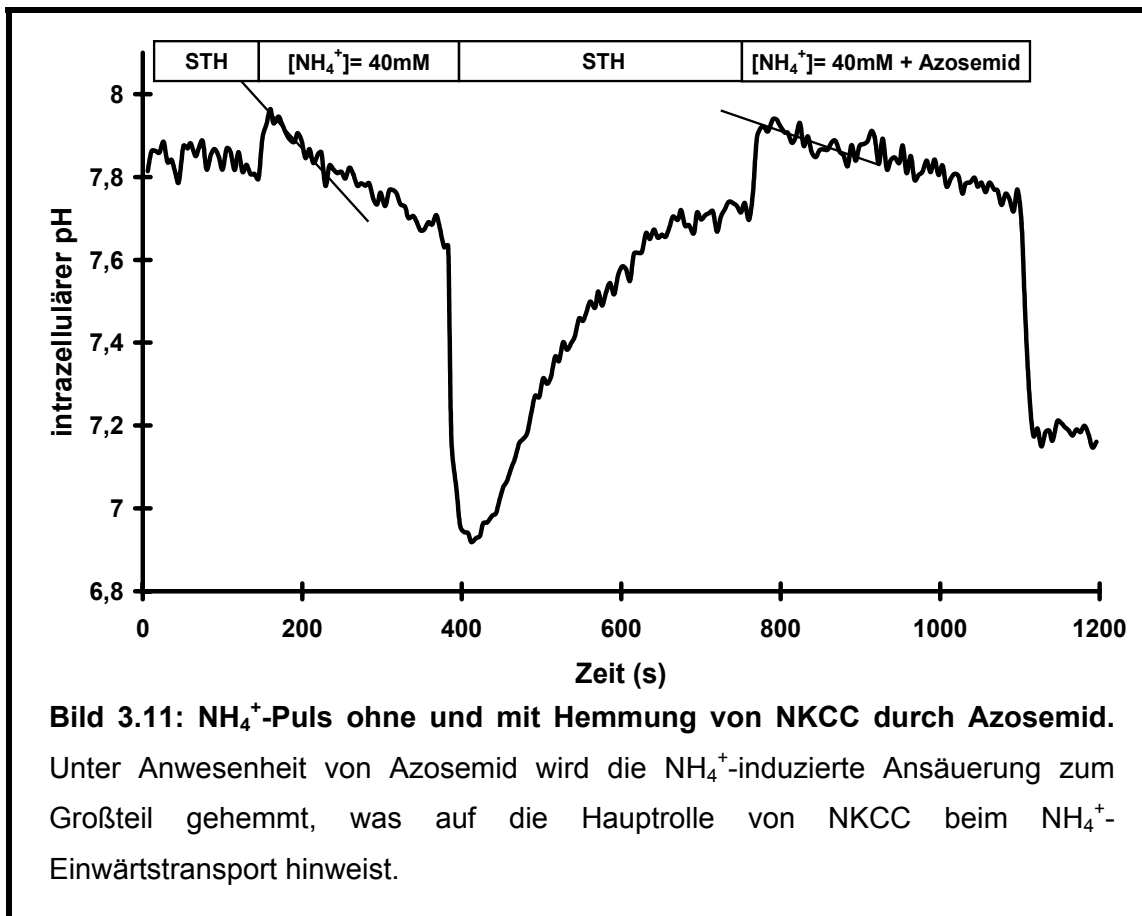
Wird die Ammonium-haltige Lösung durch Standard-Hepes-Puffer ersetzt, diffundiert das intrazelluläre  $\text{NH}_3$  aus der Zelle und lässt Protonen intrazellulär zurück. Es kommt zu einer Ansäuerung der Zelle, dem sogenannten Säure-Puls (70). Dieser deutliche pH-Abfall ist in den Bildern 3.9 und 3.10 zu erkennen.

Anschließend erholt sich der pH langsam wieder auf sein Ausgangsniveau, indem Protonen aus der Zelle und  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle transportiert werden (43).

In Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  oder Anwesenheit von Azosemid wird die  $\text{NH}_4^+$ -induzierte Ansäuerung zu einem großen Teil gehemmt, was darauf hindeutet, dass der  $\text{NH}_4^+$ -Einwärtstransport hauptsächlich durch  $\text{Na}^+\text{-K}^+(\text{NH}_4^+)\text{-2Cl}^-$ -Kotransport erfolgt. Azosemid hat sich als das Schleifendiuretikum heraus-

gestellt, das die höchste Spezifität gegenüber der NKCC-Isoform im Kolon besitzt (27,69).

Bild 3.11 zeigt einen Versuch, bei dem ein  $\text{NH}_4^+$ -Puls von einem weiteren mit zusätzlicher Azosemid-Applikation gefolgt wird. Deutlich zu erkennen ist die wesentlich geringere Ansäuerung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls unter Anwesenheit von Azosemid.



Die Rate der  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme mit und ohne Azosemid wird durch exponentielle Kurvenintegration berechnet und nach Umrechnung der Fluoreszenz Verhältnisse in pH-Werte in  $\Delta\text{pH}/t$  angegeben. Zieht man die  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme unter Azosemid von der gesamten  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme ab, so erhält man den Azosemid-sensitiven Anteil, der der NKCC-Aktivität entspricht.

In Anlehnung an die Versuche von Heitzmann et al. (43) wurde allen Lösungen, die zur Bestimmung der NKCC-Aktivität dienten, 1 mM Barium zugegeben, um so eine  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme durch basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle zu verhindern.

### 3 ERGEBNISSE

---

Außerdem wurden  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freie Lösungen verwendet, um eine  $\text{pH}_i$ -Erholung durch  $\text{HCO}_3^-$ -abhängige Transportmechanismen zu minimieren.

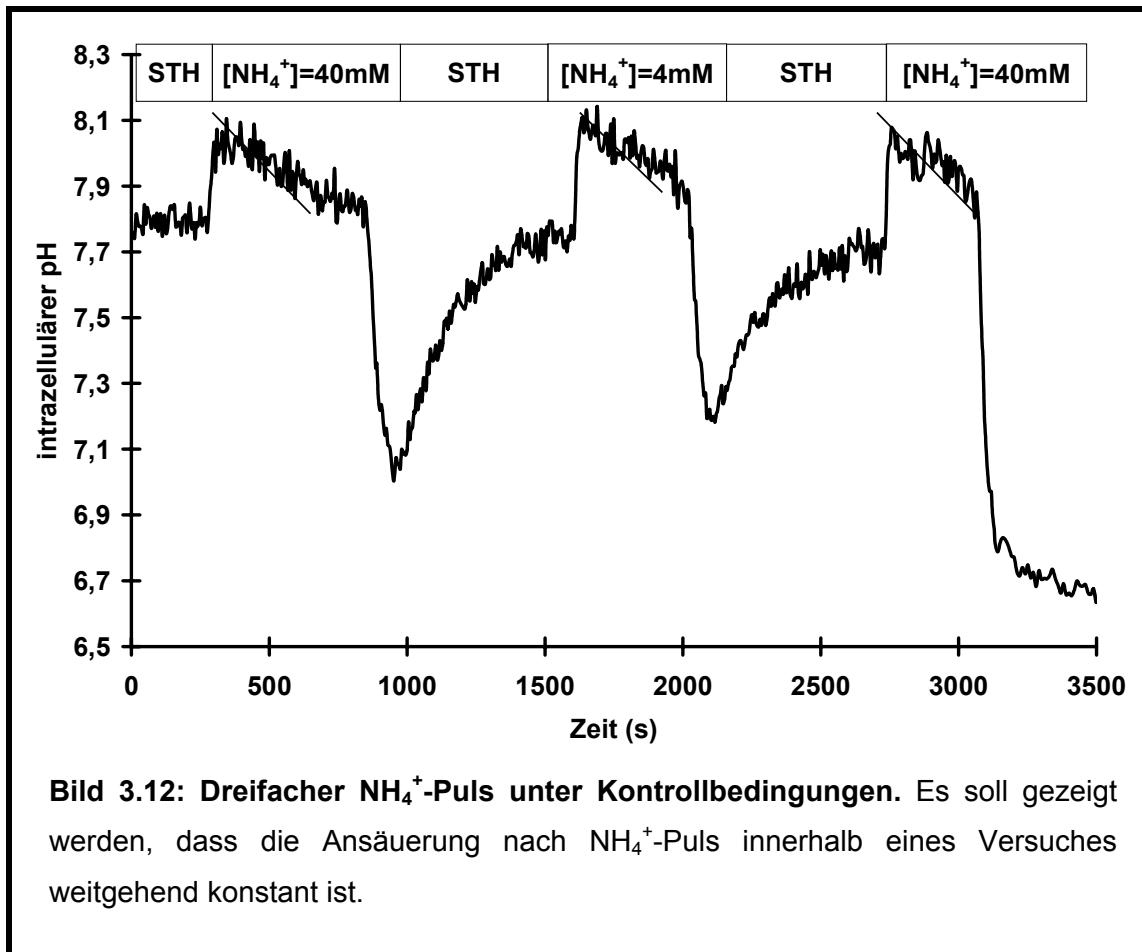
#### 3.7.2 Berechnung der NKCC-Aktivität in Form von Relativwerten

Sämtliche Versuche wurden gepaart durchgeführt, d.h. die  $\text{pH}$ -Änderung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls unter Azosemid wurde jeweils mit einem direkt vorangehenden  $\text{NH}_4^+$ -Puls unter Kontrollbedingungen verglichen. Es wurden folglich zwei bzw. bei den Stimulationsversuchen drei Pulse hintereinander durchgeführt, nachdem sich der  $\text{pH}$  nach dem  $\text{NH}_4^+$ -Puls auf das Ausgangsniveau erholt hatte. Der Vergleich erfolgte somit an ein und der selben Krypte unter identischen Versuchsbedingungen.

Es stellte sich heraus, dass sich die Raten der intrazellulären  $\text{pH}$ -Senkung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls unter Kontrollbedingungen von Versuch zu Versuch unterschieden. Bei zwei oder drei hintereinander erfolgten Pulsen innerhalb eines Versuches waren sie hingegen relativ konstant.

Deshalb wurde in der Gesamtauswertung die NKCC-Aktivität nicht als Absolutwert, sondern im Verhältnis zum vorangehenden  $\text{NH}_4^+$ -Puls als Relativwert berechnet. Der Kontrollpuls wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt.

In Bild 3.12 ist ein Versuch mit einer Dreifach-Serie von  $\text{NH}_4^+$ -Pulsen dargestellt, um zu zeigen, dass die  $\text{pH}$ -Senkung innerhalb eines Versuches unter Kontrollbedingungen weitgehend identisch ist.



Die basale NKCC-Aktivität wurde unter Kontrollbedingungen entsprechend mit  $0,58 \pm 0,03$  ( $n=6$ ) gemessen.

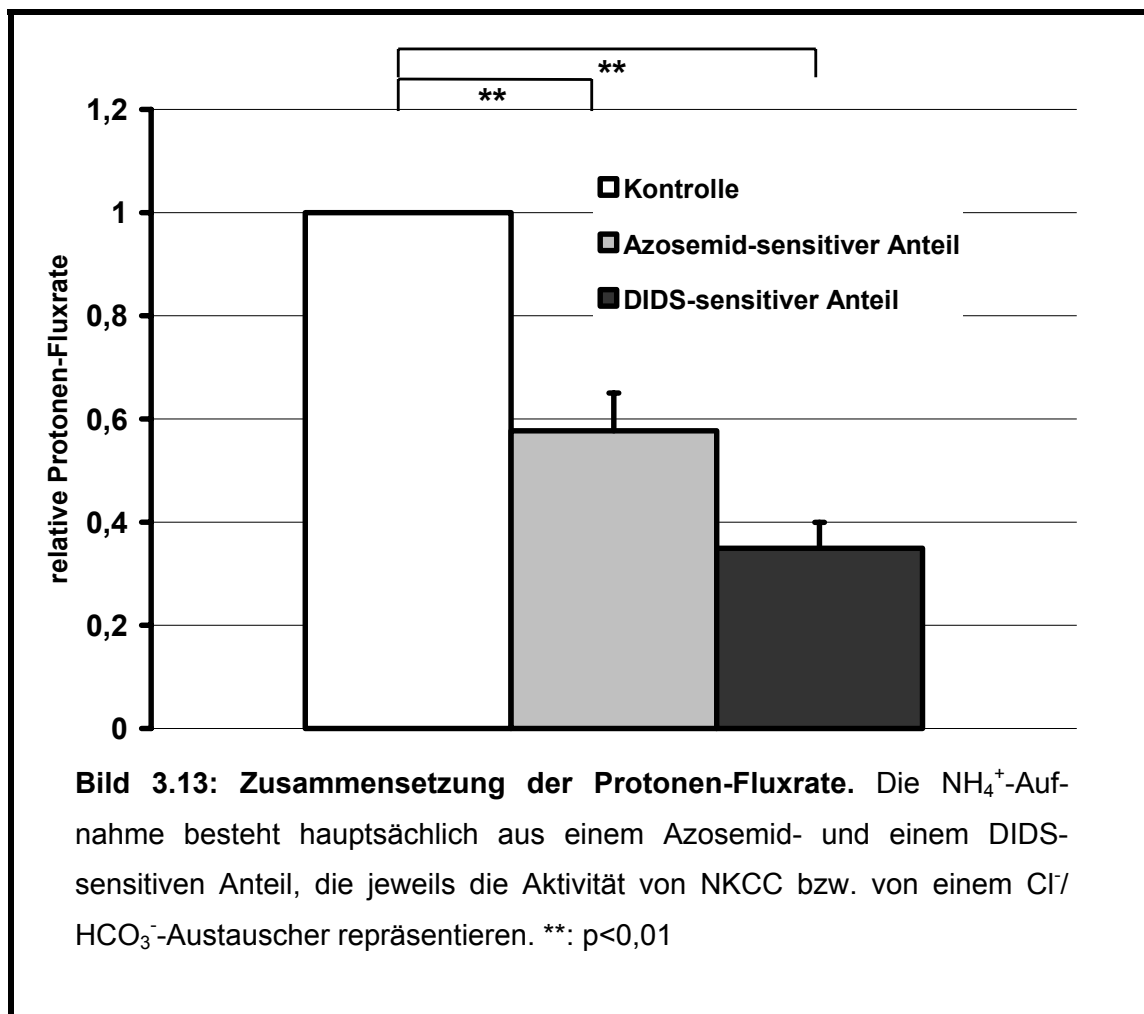
### 3.8 Messung der Aktivität eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers

Die Hemmung der Ansäuerung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls unter Azosemid ist nicht vollständig, es muß folglich weitere Transportmechanismen geben, die an dem  $\text{NH}_4^+$ -Einwärtstransport beteiligt sind. Als mögliche Kandidaten kommen hierfür  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter oder am wahrscheinlichsten ein  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in Frage. Mit 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonsäure, kurz DIDS, steht ein potenter Hemmstoff für diese Transporter zu Verfügung.

Um zu untersuchen, welchen Anteil  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter an der Ansäuerung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls haben, wurden Versuche so wie mit Azosemid nun mit DIDS durchgeführt (nicht abgebildet). Danach ergab sich der DIDS-sensitive Anteil mit  $0,35 \pm 0,05$  ( $n=5$ ) an der Gesamtaktivität.

### 3 ERGEBNISSE

Bild 3.13 fasst den Azosemid- und DIDS-sensitiven Anteil an der Ansäuerung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls in einem Diagramm zusammen. Es wird deutlich, dass sich die Protonen-Fluxrate nach Ammonium-Puls hauptsächlich aus zwei Komponenten zusammensetzt: einer Azosemid-sensitiven Fraktion, die der NKCC-Aktivität entspricht ( $0,58 \pm 0,07$ ;  $n=8$ ), und einer DIDS-sensitiven Fraktion, die die Aktivität eines  $\text{Cl}^-$ -Basen-Austauschers widerspiegelt ( $0,35 \pm 0,05$ ;  $n=5$ ).



#### 3.9 cAMP-abhängige Stimulation der NKCC-Aktivität mit Forskolin

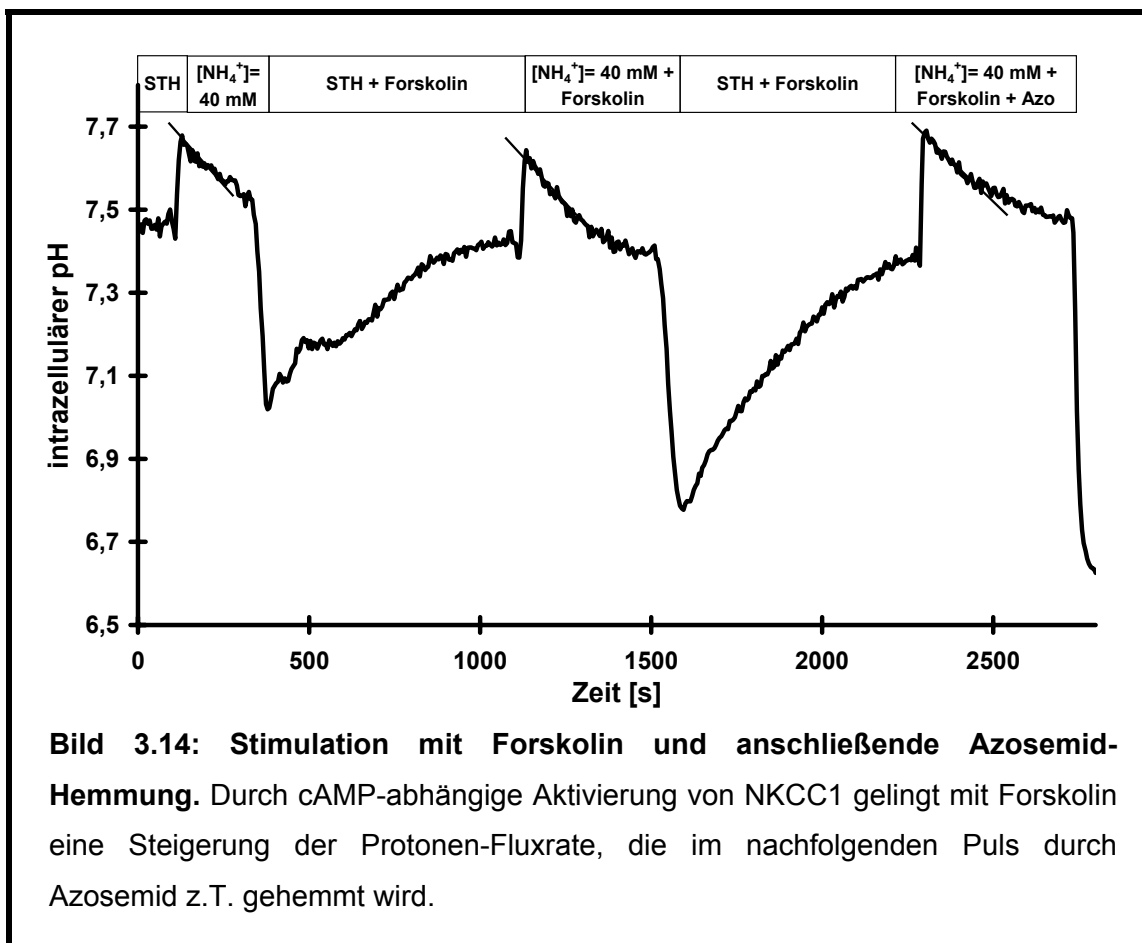
Forskolin führt über Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$  und damit zur Aktivierung einer Vielzahl von Transportern, darunter neben dem apikalen CFTR auch der basolaterale NKCC1. Ob dabei direkte Mechanismen wie cAMP-abhängige Proteinkinasen oder indirekte sekundäre Regulationsmechanismen wie Änderung von Zellvolumen oder intrazellulärer



Anionenkonzentrationen die Hauptrolle spielen, ist Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Diskussionen (s. Kap. 1.3.1.3).

Um diesen Zusammenhang zu untersuchen wurden Experimente durchgeführt, bei denen die NKCC-Aktivität unter Stimulation durch 10  $\mu\text{M}$  Forskolin gemessen wurde.

Bild 3.14 zeigt ein solches Experiment mit einem Kontrollpuls, anschließender Forskolin-Stimulation und abschließender Azosemid-Hemmung.



Unter Forskolin-Stimulation nimmt der Protonenflux auf  $1,53 \pm 0,42$  zu, er fällt bei anschließender Azosemid-Hemmung auf  $0,77 \pm 0,22$  ( $n=7$ ) ab.

### 3 ERGEBNISSE

---

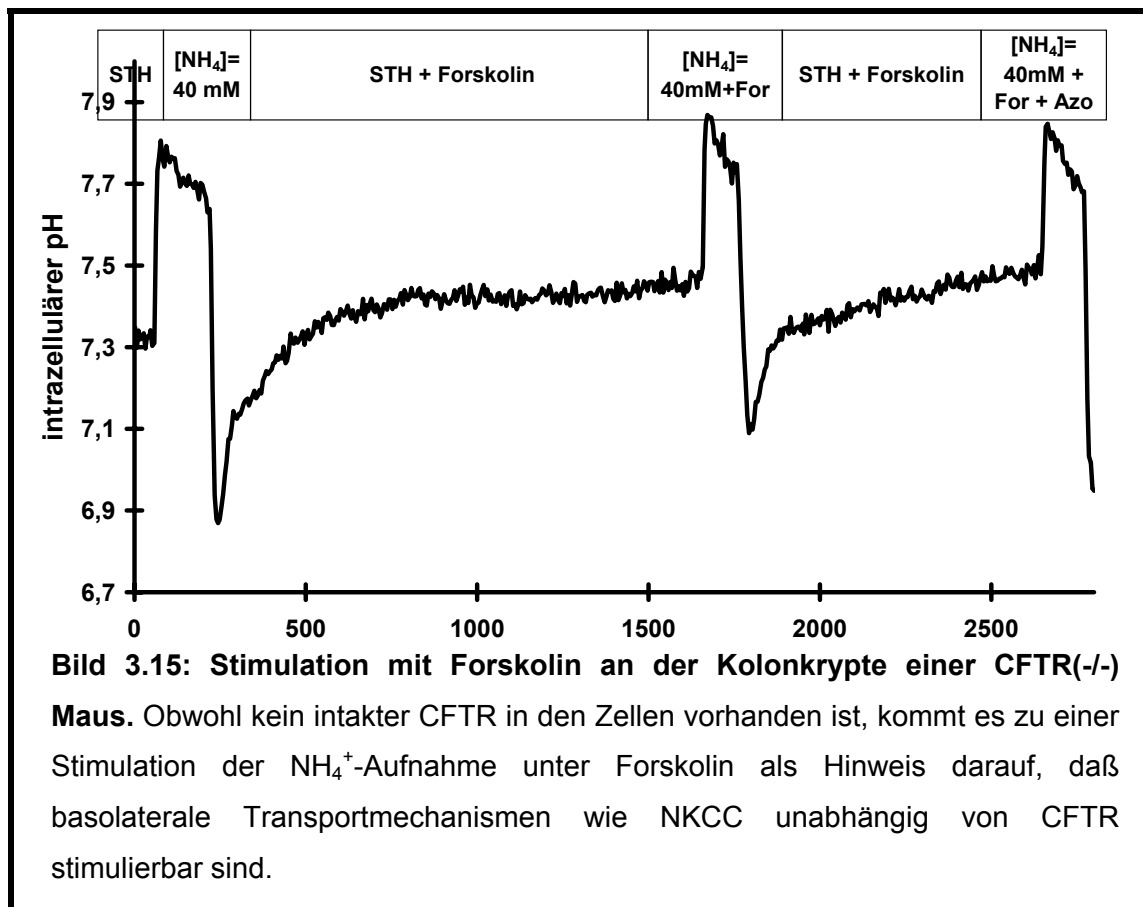
#### 3.10 Messung der NKCC-Aktivität bei CFTR(+/+) und (-/-) Mäusen

Der apikale Cl<sup>-</sup>-Kanal CFTR stellt nicht nur den Hauptmechanismus für die apikale Cl<sup>-</sup>-Sekretion in vielen Epithelien dar, sondern er spielt auch eine wichtige Rolle in dem komplexen Netzwerk der Transporterregulation der Zelle. So steht er beispielsweise in enger Beziehung zu dem apikal lokalisierten Na<sup>+</sup>-Kanal EnaC, und auch eine Rolle bei der Regulation basolateraler Transporter wird in verschiedenen Arbeiten vermutet (32,33,62,82,83).

Um zu untersuchen, ob die NKCC-Aktivität direkt durch cAMP-abhängige Stimulation gesteigert werden kann, unabhängig davon, ob CFTR in der apikalen Membran exprimiert wird, werden Stimulationsexperimente an isolierten Kolonkrypten von CFTR(+/+) Mäusen mit intaktem CFTR mit Versuchen von CFTR(-/-) Mäusen ohne exprimierten CFTR verglichen.

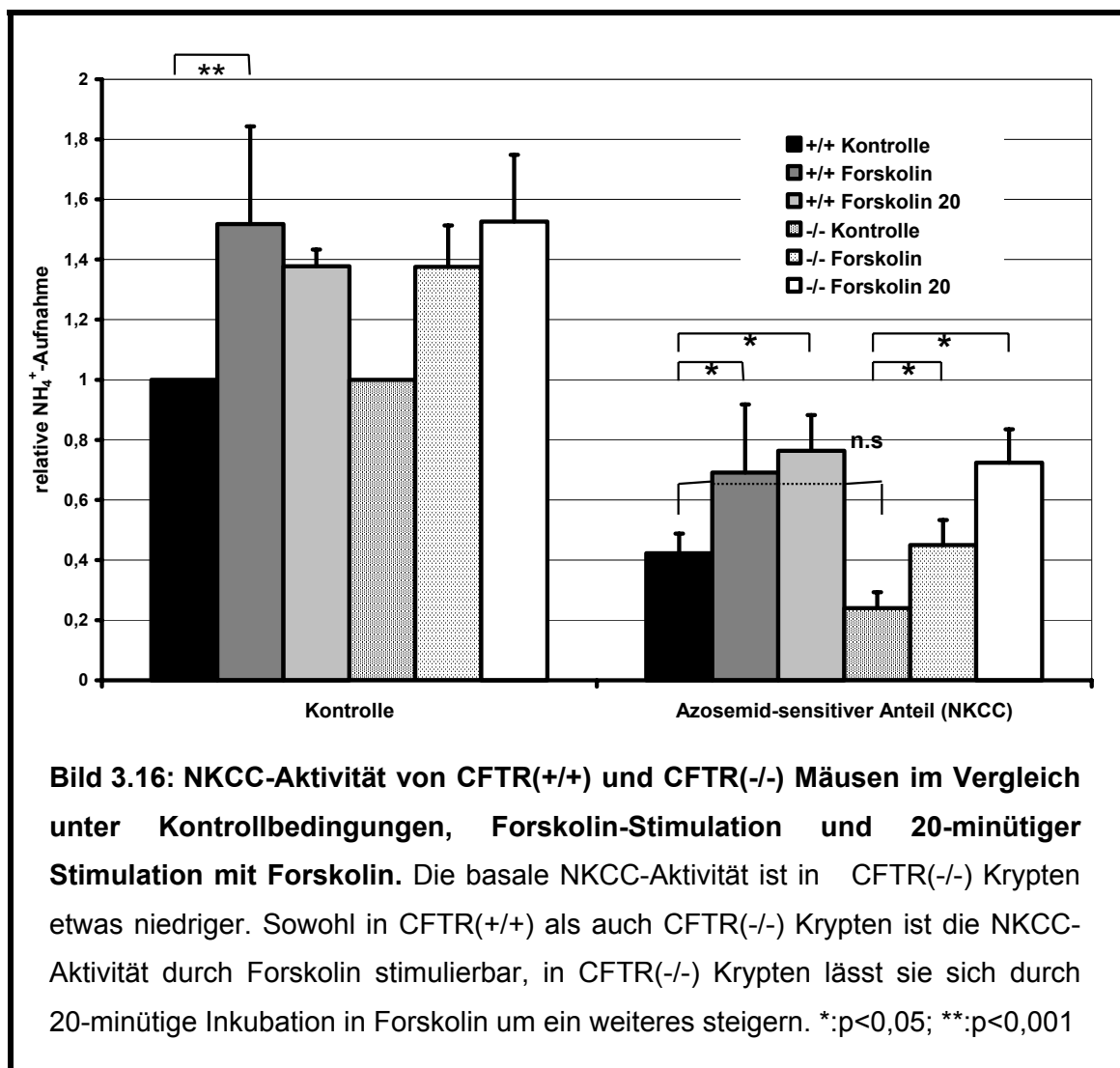
Wie in den vorangegangenen Experimenten wird der Na<sup>+</sup>-abhängige, Azosemid-sensitive Anteil des NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Einstroms repräsentativ für die funktionelle Aktivität von NKCC in drei aufeinanderfolgenden Ammoniumpulsen unter Kontrollbedingungen, nach Forskolin-Applikation und abschließender Azosemid-Hemmung gemessen, und die Ergebnisse zwischen CFTR(+/+) und CFTR(-/-) Mäusen verglichen.

Bild 3.15 zeigt exemplarisch ein solches Experiment an einer Kolonkrypte, die von einer CFTR(-/-) Maus isoliert wurde.



### 3 ERGEBNISSE

Bild 3.16 fasst alle Stimulationsversuche an CFTR(+/+) und (-/-) Mäusen in einem Diagramm zusammen.



Die absolute Protonen-Fluxrate lag in den Krypten der CFTR(-/-) Mäuse mit  $1,4 \pm 0,16$  mM/min niedriger als in CFTR(+/+) Mäusen, wo sie  $2,1 \pm 0,18$  mM/min betrug (Daten nicht dargestellt).

Auch die basale relative NKCC-Aktivität war mit  $0,24 \pm 0,05$  (n=12) in CFTR(-/-) Mäusen etwas niedriger als  $0,42 \pm 0,07$  (n=7) in (+/+) Mäusen. Dies war allerdings mit  $p=0,069$  nicht statistisch relevant. Unter Umständen ist der Unterschied auf die etwas niedrigeren Expressionslevel zurückzuführen.

Auf beiden Bildern ist jedoch zu erkennen, dass Forskolin zu einer deutlichen Stimulation der NKCC-Aktivität sowohl in den CFTR(+ / +) als auch CFTR(- / -) Mäusen führte. Die Stimulation mit 10  $\mu$ M Forskolin steigerte die NKCC-Aktivität in CFTR(+ / +) Krypten um 64,3 % auf  $0,69 \pm 0,14$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) und in CFTR(- / -) Krypten um 87,5 % auf  $0,45 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ). Daher kann die NKCC-Aktivität offensichtlich auch durch cAMP-abhängige Stimulation gesteigert werden, wenn CFTR in der apikalen Membran nicht vorhanden ist. Dies steht im Gegensatz zu mehreren anderen Untersuchungen, die keine Aktivierung der Cl<sup>-</sup>-Sekretion durch cAMP im CFTR(- / -) Intestinaltrakt feststellen konnten (20,23,86).

Als ein weiterer Regulationsmechanismus von NKCC wird der Neueinbau bzw. Ausbau von Transportermolekülen in die Membran diskutiert. Um dies zu untersuchen wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Krypten vor dem Ammoniumpuls 20 Minuten lang in Forskolin inkubiert wurden, um so möglicherweise einen Neueinbau von NKCC zu bewirken.

Interessanterweise ließ sich dadurch nur bei den CFTR(- / -) Mäusen eine signifikante Stimulation der NKCC-Aktivität auf  $0,72 \pm 0,12$  bewirken, hingegen bei den Krypten der CFTR(+ / +) Mäuse kein Unterschied festzustellen war ( $0,76 \pm 0,11$ ;  $n = 8-10$  in jeder Gruppe). Die erniedrigte basale NKCC-Aktivität in den CFTR(- / -) Krypten könnte somit weniger auf einen absoluten Mangel an NKCC1 Protein als vielmehr auf eine Herunterregulation der NKCC-Funktion zurückzuführen sein. Diese Vermutung würde auch zu dem annähernd normalen Expressionsniveau von NKCC1 in CFTR (- / -) Krypten passen.

#### **3.11 Messung der NKCC-Aktivität unter Hemmung basolateraler $K_vLQT_1$ K<sup>+</sup>-Kanäle mit 293 B**

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die CFTR-Aktivierung durch cAMP zu einer Koaktivierung von basolateralen  $K_vLQT_1$  K<sup>+</sup>-Kanälen führt. Dieses Phänomen ist auch im Kolon beschrieben, wo nach Zugabe von Forskolin die apikalen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit sofort zunimmt, gefolgt von einer etwas verspäteten Zunahme der basolateralen K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass diese K<sup>+</sup>-

### 3 ERGEBNISSE

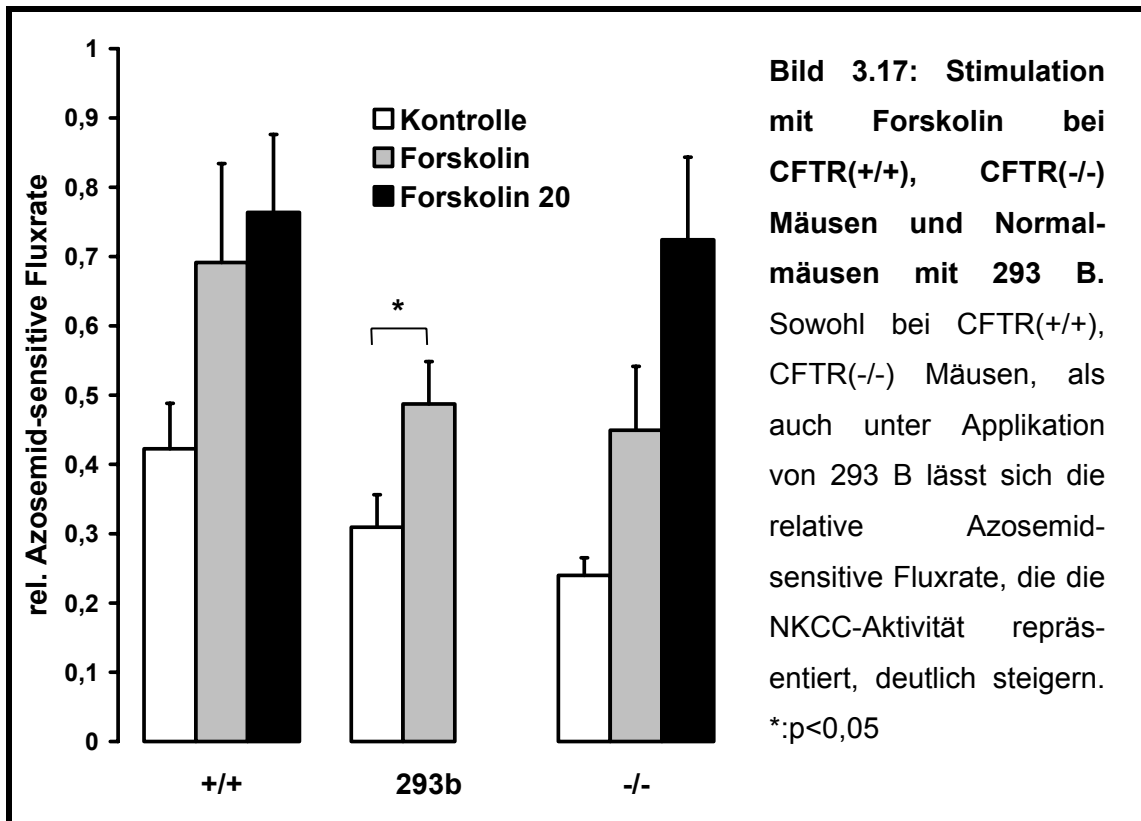
---

Leitfähigkeit  $K_vLQT_1$   $K^+$ -Kanälen zugeschrieben werden kann.  $K_vLQT_1$  (KCNQ1) ist ein basolateraler  $K^+$ -Kanal mit sehr kleiner Leitfähigkeit, der weit verbreitet in Epithelien aber auch anderen Geweben vorkommt. Im Kolon bewirkt er zusammen mit KCNE3 einen unmittelbaren aktiven  $K^+$ -Auswärtsstrom. Er hält damit die Triebkraft für die apikale  $Cl^-$ -Sekretion aufrecht. Unter pharmakologischer Hemmung kommt es folglich zum Zusammenbrechen der cAMP-abhängigen  $Cl^-$ -Sekretion (6,32). Für die Hemmung von  $K_vLQT_1$  eignet sich das Chromanol 293 B (10).

Um auszuschließen, dass eine vermeintliche NKCC-Stimulation unter Forskolin-Applikation indirekt durch Aktivierung basolateraler  $K^+$ -Kanäle zustande kommt, wurden Stimulationversuche unter  $K^+$ -Kanal Hemmung durch 293 B durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Bild 3.17 im Vergleich zu den Ergebnissen bei CFTR(+/-) und CFTR(-/-) Mäusen graphisch dargestellt.

In Anwesenheit von 100  $\mu$ M 293B, das dem Chromanol-sensitiven  $K^+$ -Kanal vollständig hemmt (55), war die NKCC-Aktivität deutlich vermindert. Die Steigerung der Azosemid-sensitiven Fluxrate unter Forskolin ließ sich jedoch auch unter 293 B feststellen, nämlich um das 1,6-fache von  $0,31 \pm 0,05$  (n=5) auf  $0,49 \pm 0,06$  (n=4;  $p < 0,05$ ). Dies zeigt, dass der Stimulationseffekt von cAMP auf die NKCC-Aktivität auch unter 293 B-sensitiver  $K^+$ -Kanal Blockade erhalten bleibt.



### 3 ERGEBNISSE

---

#### 3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte Folgendes gezeigt werden:

1. NKCC wird im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert, und zwar mit Abstand am höchsten im Kolon. Dabei liegt die Expression bei den CF Mäusen unter denen ihrer gesunden Geschwister. Bezieht man in die Berechnungen jedoch das zytoskelettale Protein Villin mit ein, verschwindet dieser Unterschied. In isolierten Kolonkrypten unterscheiden sich das Expressionsniveau von CFTR(+/+) und (-/-) Mäusen nicht wesentlich.
2. Es konnte eine Pufferkurve für Kolonkrypten der Maus erstellt werden, die sich mit einer Pufferkapazität  $\beta_i$  von 55 mM/pH-Einheit bei  $\text{pH}_i$  von 6,6, von 27 mM/pH-Einheit bei  $\text{pH}_i$  7,0 und 22 mM/pH-Einheit bei  $\text{pH}_i$  7,4 nicht wesentlich von der in anderen Zelltypen unterscheidet.
3. Der Ausgangs-pH in CFTR(+/+) Krypten lag mit  $7,48 \pm 0,03$  leicht über dem von CFTR(-/-)Krypten mit  $\text{pH } 7,42 \pm 0,03$ .
4. Die absolute Protonen-Fluxrate betrug in den Krypten der CFTR(-/-) Krypten  $1,4 \pm 0,16$  mM/min und lag damit etwas niedriger als in CFTR(+/+) Mäusen mit einer Fluxrate von  $2,1 \pm 0,18$  mM/min.
5. Die basale relative NKCC-Aktivität war mit  $0,37 \pm 0,08$  in (-/-) Krypten etwas niedriger als  $0,58 \pm 0,03$  in (+/+) Krypten.
6. Forskolin führte sowohl in den CFTR(+/+) als auch CFTR(-/-) Krypten zu einer deutlichen Stimulation der NKCC-Aktivität. Die Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Forskolin steigerte die NKCC-Aktivität in CFTR(+/+) Krypten um 34 % und in CFTR(-/-) Krypten um 61,4 % auf  $0,60 \pm 0,11$ . Die NKCC-Aktivität kann also offensichtlich auch durch cAMP-abhängige Stimulation gesteigert werden, wenn CFTR in der apikalen Membran nicht vorhanden ist.
7. Nach 20-minütiger Stimulation mit Forskolin ließ sich bei den CFTR(-/-) Mäusen eine weitere Stimulation der NKCC-Aktivität bewirken, wohingegen bei den Krypten der CFTR(+/+) Mäuse kein Unterschied festzustellen war.



8. Auch unter Hemmung basolateraler  $K^+$ -Kanäle durch 293 B ließ sich die NKCC-Aktivität von  $0,31 \pm 0,05$  auf  $0,49 \pm 0,06$  durch Forskolin steigern.

## 4 DISKUSSION

---

### 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter im Gastrointestinaltrakt von CFTR-Knockout-Mäusen zu untersuchen und mit den Gegebenheiten im Verdauungstrakt von normalen Mäusen zu vergleichen. Zum einen wurden dazu die Expressionslevel von NKCC1 in Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Niere mit Hilfe der semiquantitativen PCR bestimmt, des weiteren wurde die funktionelle Aktivität des Kotransporters unter Ruhebedingungen und während cAMP-abhängiger Stimulation mit Hilfe der  $\text{NH}_4^+$ -Technik in BCECF-gefärbten Kolonkrypten gemessen.

Im folgenden sollen erst die verwendeten Methoden, die semiquantitative PCR, die Isolierung der Kolonkrypten mit Hilfe eines EDTA-haltigen Puffers, die Messung des intrazellulären pHs mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF und die  $\text{NH}_4^+$ -Technik zur Messung der NKCC-Aktivität, diskutiert werden bevor die Ergebnisse interpretiert werden und in den Kontext der derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisse eingefügt werden.

#### 4.1 Diskussion der Versuchsmodelle

##### 4.1.1 Die semiquantitative PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR, dient dazu, ausgewählte Bereiche einer RNA so zu amplifizieren, dass man anschließend in der Lage ist, sie durch Gelelektrophorese zu analysieren. Mit ihr steht eine schnelle, verlässliche und sensitive Möglichkeit zur Verfügung, um die Expression eines Gens zu untersuchen und in einem gewissen Rahmen auch quantitative Aussagen zu machen (42). Die in dieser Arbeit eingesetzte semiquantitative Methode stellt eine Kombination aus verschiedenen experimentellen Ansätzen dar (18,22,52). Um auswertbare Ergebnisse zu erzielen und diese anschließend richtig interpretieren zu können müssen dabei folgende Punkte beachtet werden:

- Zunächst muss eine geeignete interne Kontrolle gewählt werden. Hierfür bietet sich wie in Kapitel 3.2.1 erläutert die 18s rRNA an, die in allen untersuchten Geweben in gleich hoher Konzentration exprimiert wird.
- Ein großes Problem bei der Auswertung der semiquantitativen PCR stellt der anfängliche exponentielle Verlauf der Reaktion und die anschließende Plateaubildung im sogenannten Sättigungsbereich der Reaktion dar (s. Kap. 2.4.8). Durch den exponentiellen Verlauf können schon kleine Ladefehler zu einer groben Fehleinschätzung des Expressionsniveaus führen. Wegen der Plateaubildung muss durch „Monitoring“ (d.h. Entnahme von Aliquots z.B. alle zwei Zyklen) versucht werden, die exponentielle Phase der Reaktion abzugreifen. Um am Ende eine quantitative Aussage machen zu können, muss die Amplifikationseffizienz von interessierendem Gen und Kontrolle identisch sein, d.h. die Amplifikationskurven müssen bei halblogarithmischer Darstellung parallel verlaufen (s. Bild 3.1).
- Die Quantifizierung der Signale erfolgte in dieser Arbeit durch Messung der Ethidiumbromid-Inkorporation, indem die integrierte optische Dichte (ODI) der Banden ermittelt wurde (68). Da durch diese Methode Banden erst in der Spätphase der exponentiellen Amplifikation erfasst werden, muss die Reaktion möglichst ab dem Zeitpunkt aufgezeichnet werden, an dem die erste gerade sichtbare Bande auf dem Gel erscheint. Nur so erhält man mindestens zwei oder besser drei bis vier Punkte, die bei halblogarithmischer Darstellung auf einer Gerade liegen, bevor die Plateau-Phase erreicht wird. Die Amplifikationskurve des in einem separaten Reagenzgefäß angesetzten Kontrollgens wird in allen Diagrammen um einen definierten Wert entlang der x-Achse verschoben um die Reaktion des interessierenden Gens und der Kontrolle an einem Punkt der Reaktion vergleichen zu können und so das Expressionsniveau zu berechnen. Wenn dies nicht möglich ist müssen zusätzliche Punkte durch Extrapolation ermittelt werden. Dies ist deshalb legitim, weil sich dadurch nur die berechneten Absolutwerte, die lediglich virtuelle Größen darstellen, nicht aber das Verhältnis der berechneten Werte zueinander ändern.

## 4 DISKUSSION

---

- Um eine quantitative Aussage zu machen, erfordert die PCR immer eine Kontrolle der erhobenen Daten durch mindestens ein, besser zwei weitere Experimente. Pipettierfehler oder -ungenauigkeiten, die während der Reaktion exponentiell amplifiziert werden können, fallen so weniger ins Gewicht. Alle Versuche dieser Arbeit wurden mindestens drei mal durchgeführt und anschließend Mittelwert und Standardfehler berechnet (s. Bild 3.2).

Die beschriebene Methode der semiquantitativen PCR ist somit dafür geeignet, Expressionsunterschiede einer mRNA Spezies – hier NKCC1 - in verschiedenen Zellen oder Geweben zu detektieren und miteinander zu vergleichen.

### 4.1.2 Isolierung von Kolonkrypten mittels einer EDTA-haltigen Lösung

Für die Präparation und Isolierung der Kolonkrypten wurde eine EDTA-haltige Lösung verwendet, wie sie von Siemer et al. beschrieben wurde (89,90).

Um der Traumatisierung der Krypten entgegenzuwirken, wurden der EDTA-haltigen Lösung zur Isolierung der Kolonkrypten 1% Rinderserum-Albumin zugesetzt in der Hoffnung, dass dies die Integrität und Funktionalität der Krypten fördere. Außerdem wurde die EDTA-haltige Lösung unmittelbar nach erfolgreicher Isolierung der Krypten durch ein- bis zweimaliges Waschen mit eisgekühltem und O<sub>2</sub>-begastem Standard-HEPES-Puffer weitgehend entfernt. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Krypten-Fractionen dann auf Eis gelagert.

Die isolierten Kolonkrypten verfügen über den deutlichen Vorteil, dass ihr Zellverband, und zwar sowohl der epitheliale Charakter, der Kontakt zu Nachbarzellen, als auch das Zytoskelett erhalten bleiben, und sie somit die physiologischen Gegebenheiten des Kolons widerspiegeln. Gleichzeitig wird es dadurch schwierig evtl. Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen festzustellen. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben besteht die Kolonkrypte nicht aus einem homogenen Zellverband, sondern aus Zellen unterschiedlicher Reifestadien mit unterschiedlicher Transporter-Expression und folglich unterschiedlicher Funktion. Durch den Einbezug der ganzen Kolonkrypte in die

Messung erhält man so zwar einen Durchschnittswert der gesamten Funktion der Krypte, jedoch keine Aussage über die Beteiligung der einzelnen Abschnitte an der Gesamt-Aktivität.

Für die durchgeführten Untersuchungen der NKCC-Aktivität stellte sich die Methode der Kryptenisolierung mittels der beschriebenen EDTA-Lösung als die am besten geeignete heraus. Möglichen Einschränkungen der Viabilität konnten durch die anschließende Färbung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF kontrolliert werden, da das von den Krypten abgegebene Fluoreszenzsignal als direktes Maß für die Viabilität der Zellen angesehen werden kann. Die Viabilität der Krypten konnte auch in molekularen und funktionellen Untersuchungen bestätigt werden. Es wurden nur Kolonkrypten mit homogenem Fluoreszenz-Signal, glatter Begrenzung und sichtbarem Lumen für die Messungen ausgewählt. Durch den intakten Zellverband der Krypte war es möglich, die Transporter-Aktivität unter Bedingungen zu untersuchen, die den physiologischen Gegebenheiten im Kolon möglichst nahe kommen.

### 4.1.3 Messung von $\text{pH}_i$ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF

Die Messung des intrazellulären pHs mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF wurde in einer Vielzahl von Arbeitsgruppen beschrieben und erfolgreich angewandt (3,87,100).

Nach Isolierung und Waschung der Krypten wurden die geeigneten Fraktionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF gefärbt, mit dessen Hilfe es möglich ist, den intrazellulären pH zu messen. Dabei wurde das Signal einer einzelnen Krypte mikrofluorometrisch bestimmt, während die Krypte mit verschiedenen Lösungen perfundiert wurde (s. Kap. 2.6.2). BCECF besitzt bei 490nm einen pH-abhängigen und bei 440nm einen pH-unabhängigen Exzitationsbereich, aus denen im linearen Bereich zwischen pH 6,3 und 7,7 durch Kalibration mit der „high- $\text{K}^+$ -Nigericin-Methode das Verhältnis gebildet werden kann, um es anschließend in pH-Einheiten umzurechnen (s. Kap. 2.6.2.4). Diese Methode ist im Gegensatz zu pH-Messungen mit Mikroelektoden nichtinvasiv und erlaubt Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung.

## 4 DISKUSSION

---

Ein Problem der mikrofluorometrischen Messungen mit BCECF stellt die Phototoxizität des Lichtes und das sog. „Photobleaching“ des Farbstoffes dar. Das Licht, das zur Exzitation verwendet wird, schädigt die Zelle entweder direkt oder durch Bildung freier Radikale. Unter „Photobleaching“ versteht man das Ausbleichen des Farbstoffes durch zu lange Belichtung oder zu große Lichtintensität. Um diesen beiden Effekte entgegenzuwirken, wurden verschiedene Maßnahmen getroffen: Zum einen wurde die Lichtintensität durch einen Graufilter abgeschwächt, und statt dessen im höheren Spannungsbereich des Photomultipliers gearbeitet. Des weiteren wurde der „Shutter“ des Meßsystems mittels eines von Georg Lamprecht aus unserer Arbeitsgruppe geschriebenen Programmes gesteuert, so dass flexible Belichtungszeiten und -intervalle möglich waren. Durch Optimierung des Versuchsprotokolls und Modifikation der obigen Parameter gelang eine deutliche Reduzierung der einstrahlenden Lichtenergie und somit der unerwünschten Effekte.

### 4.1.4 Die $\text{NH}_4^+$ -Puls-Technik als Methode zur Bestimmung der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransport-Aktivität

NKCC ist in der Lage,  $\text{NH}_4^+$  anstelle von  $\text{K}^+$  zu transportieren. Diese Eigenschaft wird bei der  $\text{NH}_4^+$ -Puls-Technik ausgenutzt (s. Kap. 3.7). Die Aufzeichnung der NKCC-Aktivität mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffs BCECF hat gewisse Vorteile gegenüber anderen Methoden, hat aber auch ihre Grenzen (100). Der Hauptvorteil ist das „On line Monitoring“ der relativen Transportaktivität. Die Krypten bleiben während der Messung in ihrer Integrität und Funktion intakt, d.h. sie sind weiterhin in der Lage, Wasser und Natriumchlorid zu sezernieren. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit des einfachen und spezifischen Nachweises der NKCC-Aktivität durch Zusatz von Schleifendiuretika: Die langsame Ansäuerung der Zelle nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls läßt sich durch Azosemid abschwächen und repräsentiert wie in Kapitel 3.7 erläutert die  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme durch den  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -Kotransporter. Diese Hemmung ist jedoch nicht vollständig, deshalb muß es andere Transportmechanismen geben, die zur pH-Änderung beitragen (43).

Zum einen gibt es Faktoren, die der Ansäuerung entgegen steuern: Dafür kommen sowohl  $\text{HCO}_3^-$ -transportierende Mechanismen als auch  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher in Frage. Von NHE (hier wahrscheinlich NHE1) ist allerdings bekannt, dass er auch  $\text{NH}_4^+$  transportieren kann (70). Damit könnte er also auch an einer Ansäuerung der Zelle beteiligt sein, allerdings in einem deutlich geringeren Ausmaß als NKCC.

Auf der anderen Seite existieren verschiedene Faktoren, die zur Ansäuerung beitragen: Der mögliche Einfluß der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase kann durch Applikation von Ouabain untersucht werden, und so konnten Ramirez et al. feststellen, dass Ouabain die Ansäuerung um ca. ein Drittel abschwächt. In Segmenten der Niere konnte die Arbeitsgruppe außerdem einen  $\text{NH}_4^+$ -Transfer mittels basolateraler  $\text{K}^+$ -Kanäle durch deren Hemmung mit Barium nachweisen (70). Schließlich testeten sie ein mögliches  $\text{HCO}_3^-$ -Aufnahme-System unter 24 mmol/l  $\text{HCO}_3^-$ /5%  $\text{CO}_2$ . Auch hier ließ sich eine Beteiligung an der langsamen Ansäuerung der Zelle nachweisen. In Kap. 3.8 sind die Versuche beschrieben, die durchgeführt wurden, um mögliche  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter zu testen. Ihr Anteil an der langsamen Ansäuerung nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls wurde mittels des Hemmstoffes 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) bestimmt. Er betrug  $0,35 \pm 0,05$  %. Folglich stellen die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, Barium-sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle und ein  $\text{HCO}_3^-$ -Aufnahme-System neben NKCC die Mechanismen für die Ansäuerung der Zelle nach  $\text{NH}_4^+$ -Puls dar. Die beiden erst genannten transportieren dabei wie NKCC  $\text{NH}_4^+$  anstelle von  $\text{K}^+$ .

In den Experimenten dieser Arbeit wurde versucht, diese Möglichkeiten auszuschließen, indem  $\text{CO}_2$ / $\text{HCO}_3^-$ -freie Lösungen verwendet wurden, denen 1 mM Barium zugegeben wurde. Außerdem wurde die NKCC-Aktivität als der Azosemid-sensitive Anteil der langsamen Ansäuerung bestimmt. In den verwendeten Konzentrationen hemmt Azosemid die NKCC-Isoform des Kolons sehr spezifisch, eine Hemmung anderer Transporter wie  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Symporter erfolgt erst in höheren Konzentrationen.

Trotzdem kann die Azosemid-sensitive  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme nicht als absoluter Wert für die NKCC-Aktivität gesehen werden (100): Die Zellhomeostase wird durch

## 4 DISKUSSION

---

die Perfusion mit 40 mM  $\text{NH}_4^+$  verändert. So kann es während der Messung durch verschiedene kurz- und langfristige Regulationsmechanismen zu einer Veränderung der Triebkräfte kommen. Deshalb kann nur der initiale pH-Abfall für die Berechnung der NKCC-Aktivität herangezogen werden.

Wie in Kapitel 1.2.2 erwähnt besteht die Kolonkrypte aus einem inhomogenen Verband aus Zellen unterschiedlicher Reifestadien mit unterschiedlichen Eigenschaften. In den durchgeführten Experimenten wurde nach Möglichkeit die ganze Krypte in die Messung mit eingeschlossen. Trotzdem kann es möglicherweise zu Unterschieden in der Reaktion auf den  $\text{NH}_4^+$ -Puls kommen, je nachdem, ob einmal ein größerer Teil der Kryptenbasis oder der Oberfläche in der Messung mit inbegriffen war.

### 4.2 NKCC bei Zystischer Fibrose

Bei der zystischen Fibrose lässt sich die  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion nicht stimulieren (46,86). Es existieren zahlreiche immunhistochemische, molekulare und funktionelle Hinweise auf die Existenz alternativer Anionen-Sekretions-Mechanismen (29,41,48), zahlreiche Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen diese im Verdauungstrakt bei fehlendem CFTR pharmakologisch zu aktivieren schlugen jedoch fehl (34,49,86). Außerordentliche Bedeutung kam deshalb den Experimenten von Soleimani et al. an einer Tumorzelllinie des Pankreas zu, die das Expressionsniveau von NKCC1 und NBC1 in Abwesenheit von CFTR mit CFTR-transfizierten Zellen verglichen und eine eindrucksvolle Verminderung dieser basolateralen Aufnahmemechanismen in Abwesenheit von CFTR feststellten (87,88). Damit wäre eine mögliche Erklärung geliefert worden, warum jegliche Versuche, apikale Transportmechanismen in CF-Epithelien zu stimulieren, angesichts mangelnder basolateraler Anionen-Aufnahme-Mechanismen scheitern mußten. Die verminderte NKCC1-Expression könnte zusätzlich zu der im CF-Epithel beobachteten gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Absorption beitragen (62), da im Kolon der Maus unter Hemmung von NKCC1 eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Absorption beobachtet werden konnte.



Es bestand deshalb großes Interesse zu untersuchen, ob sich eine verminderte Expression basolateraler Aufnahmemechanismen auch im nativen Epithel des Gastrointestinaltrakts von CFTR(-/-) Mäusen nachweisen lässt. Innerhalb dieser Arbeit wurden deshalb zum einen die NKCC1-Expressionslevel einer CFTR-Knockout-Mäuselinie mit denen ihrer normalen Geschwister in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts mittels semiquantitativer PCR verglichen. Des weiteren wurden Krypten aus dem proximalen Kolon dieser beiden Mäuselinien isoliert und die NKCC-Transportraten miteinander verglichen.

Es ließ sich eine reduzierte Expression von NKCC1 im CFTR(-/-) Kolon im Vergleich zum CFTR(+/+) Kolon feststellen. Unter Einbezug von Villin, einem zytoskelettalen Protein der Bürstensaummembran, verschwand dieser jedoch. Dies könnte auf strukturelle Veränderungen im Gewebe der CF Mäuse hindeuten.

Auch in isolierten Kolonkrypten lag das Expressionsniveau von NKCC1 bei den CFTR(-/-) Mäusen leicht unter dem ihrer gesunden Geschwister, dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

Die NKCC-Aktivität wurde wie in Kapitel 3.7 beschrieben fluorometrisch gemessen. Die basale Transportrate war relativ gering, was möglicherweise an dem hohen Anfangs-pH lag. Außerdem wurde allen Lösungen 1 mM Barium zugesetzt, um einer  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme durch basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle entgegenzuwirken, und dies mag durch Schwellung der Zellen ein weiterer Grund für die niedrigen Transportraten gewesen sein. Nichtsdestotrotz waren die Bedingungen bei Messungen an CFTR(-/-) und (+/+) Krypten gleich und stimmten in etwa mit den gemessenen Expressionsleveln überein. Die NKCC-Aktivität fiel in den CFTR(-/-) Krypten etwas geringer aus als in den Krypten der normalen Geschwister, und zwar deutlicher als dies nach den leicht erniedrigten Expressionsleveln zu erwarten gewesen wäre. Trotzdem fällt die Einschränkung der funktionellen Transporter-Aktivität gering aus und steht in keinem Verhältnis zu dem dramatischen Unterschied, der in der Tumorzelllinie des Pankreas ohne und mit transfiziertem CFTR beschrieben wurde (88).

## 4 DISKUSSION

---

Diese Diskrepanz zwischen den Resultaten dieser Arbeit an nativem CF-Gewebe und den Ergebnissen von Soleimani et al. an einer CFTR-defizienten Tumorzelllinie (88) sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in den CF-Epithelien des Verdauungstrakts doch noch beträchtliche Mengen an  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  auf anderem Weg als via CFTR ins Lumen transportiert werden, auch wenn derzeit keine Agonisten bekannt sind, die diesen Prozeß zu steigern vermögen. Kultivierte Tumor Zelllinien besitzen unter Umständen mangels vorhandener Ionengradienten keinen bedeutenden transepithelialen Ionentransport, so dass CFTR-Expression zu einer Veränderung des intrazellulären und transepithelialen Ionentransport Szenarios führen könnte. Interessanterweise stellten Slotki et al. bei der Untersuchung der NKCC-Aktivität in HT-29 und CFPAC Zellen mit bzw. ohne viral transfiziertem CFTR eine hohe NKCC-Aktivität in HT-29 und eine niedrige in CFPAC Zellen fest, unabhängig von  $\text{Cl}^-$ -Kanal Aktivität und CFTR Expression (92). Folglich wurden an derselben CFPAC Tumorzelllinie gegensätzliche Ergebnisse in verschiedenen Arbeitsgruppen erzielt.

In CF Epithelien scheint darüber hinaus die Regulation mehrerer anderer Ionen-Transportprozesse defekt zu sein (84). Dabei scheint weniger die basale Aktivität als vielmehr die cAMP-abhängige Regulation beeinträchtigt zu sein. Auf diese Weise unterbleibt in CF-Gewebe die cAMP-abhängige Hemmung des apikalen  $\text{Na}^+$ -Kanals Enac (96), ebenso wie die  $\text{Na}^+$ -Absorption im Jejunum (21), die Aktivierung des ORDIC-Kanals (50) und die VIP-abhängige  $\text{K}^+$ -Öffnung (58).

Die Messungen der NKCC-Expressionslevel und -transportraten scheint in den nativen Kolonkrypten somit eher die pathophysiologischen Gegebenheiten der Zystischen Fibrose widerzuspiegeln als die einer CFTR-defizienten Tumorzelllinie mit anschließend artifiziell eingefügtem CFTR.

### 4.3 Regulation von NKCC durch intrazelluläres cAMP

Unter gesteigerter Salz- und Wassersekretion im Gastrointestinaltrakt müssen nicht nur apikale  $\text{Cl}^-$ -Kanäle aktiviert werden, sondern auch die Transportrate

von basolateralen Anionen-Aufnahme-Mechanismen muß erhöht werden, um so die intrazellulären Ionenkonzentrationen v.a. von  $\text{Cl}^-$  aufrecht zu halten (37,65). Die NKCC1-Isoform stellt in den Enterozyten dabei den dominierenden basolateralen Aufnahmemechanismus für  $\text{Cl}^-$  dar (37). Trotzdem läßt sich bei NKCC1 Knockout Mäusen eine beachtliche Restfunktion der Anionen-Sekretion feststellen (36) und es konnte gezeigt werden, dass mit dem  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter in Verbindung mit einem basolateralen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher wahrscheinlich ein alternativer Mechanismus der  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme im Kolon zur Verfügung steht (85).

Eine zentrale Rolle bei der Koordination von apikalen und basolateralen Transportmechanismen spielt die Erhöhung von  $[\text{cAMP}]_i$  durch Agonisten wie das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP), Adenosin, Prostaglandine oder Forskolin (s. Kap. 1.3.1.3). Es ist jedoch noch weitgehend unklar, über welche Mechanismen eine solche koordinierte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion zwischen apikalem CFTR einerseits und basolateral lokalisiertem NKCC und  $\text{K}^+$ -Kanälen andererseits vonstatten geht. Es wird sowohl eine indirekte Beeinflussung von NKCC in Form einer sekundären Reaktion auf die apikale  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Aktivierung als auch eine direkte Aktivierung von NKCC durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase Kaskade diskutiert (39). Im Folgenden sollen die verschiedenen möglichen Mechanismen kurz vorgestellt und diskutiert werden, um dann die Ergebnisse dieser Arbeit in diesen Kontext einzufügen und zu interpretieren.

cAMP führt bekanntermaßen durch PKA-vermittelte Phosphorylierung zur Aktivierung des apikalen CFTR  $\text{Cl}^-$ -Kanals. Folglich wäre eine Steigerung der Transportrate von NKCC durch eine simple Erhöhung der elektrochemischen Triebkraft in Folge der erniedrigten  $[\text{Cl}^-]_i$  denkbar.

In verschiedenen Zelltypen wurde eine Aktivierung von NKCC durch hypertone Zellschrumpfung beschrieben (44). NKCC könnte somit sekundär als Reaktion auf den cAMP-vermittelten Salz- und Wasserverlust der Zelle aktiviert werden (39,65). Eine besondere Rolle bei der Übermittlung von Volumenänderungen der Zelle könnte dabei dem Zytoskelett zukommen. Es konnte gezeigt werden, dass unter Phalloidin, einem F-Aktin-Stabilisator, Cl.19A Zellen mit

## 4 DISKUSSION

---

funktionierender Cl<sup>-</sup>-Sekretion keine oder nur eine geringe cAMP-anhängige Stimulation von NKCC aufweisen (65).

Eine zentrale Rolle in der Aktivierung von NKCC spielt die zytoplasmatische Cl<sup>-</sup>-Konzentration. Hohes [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> führt möglicherweise durch allosterische Hemmung zu einer Herabsetzung der NKCC-Aktivität. Es ist daher durchaus denkbar, dass die beobachteten Reaktionen auf Volumenänderungen auf eine veränderte [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> zurückzuführen sind (65).

Es konnte beobachtet werden, dass die NKCC-Aktivität mit dem Phosphorylierungszustand des Proteins in Zusammenhang steht (37,38,79). Möglicherweise führt also cAMP über eine Proteinkinase Kaskade zu einer Phosphorylierung und damit zu einer direkten Aktivierung von NKCC unabhängig von CFTR (60,65). Vor kurzem wurden volumen-sensitive Proteinkinasen entdeckt, die die Verbindung zwischen der cAMP-abhängigen Sekretion und der Phosphorylierung basolateraler Anionentransporter darstellen könnten (59,73).

Schließlich wird als weiterer Mechanismus der Einflußnahme von cAMP auf NKCC die Zunahme der Bumetanid-Bindungsstellen als evtl. Hinweis auf die Zahl der funktionalen Kotransporter in der Zellmembran diskutiert (37,39,65,79). Eine erhöhte Kotransporter-Aktivität ist aber vermutlich nicht unbedingt an eine erhöhte Anzahl von NKCC in der Membran gebunden (65).

Das vorangegangene macht deutlich, dass die Aktivierung von NKCC in Zusammenhang mit apikaler Cl<sup>-</sup>-Sekretion nicht allein durch die simple Zunahme der elektrochemischen Triebkraft erklärt werden kann; vielmehr muss ein komplexes Zusammenspiel multipler Regulationsmechanismen mit unterschiedlichen Signalübertragungswegen vorliegen (65,100).

Eine Möglichkeit, die Bedeutung des cAMP-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Effluxes an der Regulation von NKCC durch cAMP zu untersuchen, stellt die Ausschaltung der apikalen Cl<sup>-</sup>-Sekretionsmechanismen dar (65). Mangels eines effizienten und spezifischen CFTR-Inhibitors wurden zu diesem Zweck vergleichende Untersuchungen an Kolonkrypten von CFTR(+/-) Mäusen mit funktionierendem CFTR und CFTR(-/-) Mäusen mit defektem CFTR angestellt. In letzteren wurde

dadurch der Einfluß von apikalem CFTR, sowie sekundären Faktoren wie Zellschrumpfung und erniedrigter  $[Cl^-]_i$  weitgehend ausgeschlossen. Der Effekt von erhöhtem  $[cAMP]_i$  wurde durch Applikation von 10  $\mu$ M Forskolin untersucht.

Wie erwartet führte die Applikation von Forskolin in den Krypten von normalen Mäusen zu einer Zunahme der Azosemid-sensitiven  $NH_4^+$ -Aufnahme, die wie in Kapitel 3.7 beschrieben die NKCC-Aktivität repräsentiert. Überraschender Weise konnte jedoch in gleicher Weise eine Stimulation an den CFTR(-/-) Krypten beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Arbeitsgruppen gemacht: Heitzmann et al. beschrieben die Stimulation der NKCC-Transportrate in den Kolonkrypten von Ratten (43). Von Matthews et al. wurde die NKCC-Aktivität zwischen der intestinalen Zelllinie HT29, die keinen cAMP-regulierten  $Cl^-$ -Efflux besitzt, und dessen Subklon Cl.19A, in dem CFTR durch Behandlung mit Natriumbutyat in die Zellmembran eingebaut wurde, verglichen. Bei beiden Zelllinien konnten sie eine Aktivierung von NKCC in Form einer Zunahme der  $^{86}Rb$ -Aufnahme feststellen (65). Im Nasenepithel von CF-Patienten konnten Haas et al. nachweisen, dass eine Zunahme der  $[^3H]$ -Bumetanid-Bindung unter Isopropanol, einem  $\beta$ -adrenergen Agonisten, und unter Einfluß eines cAMP-Analogons zu beobachten war (39).

All diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass es einen cAMP-abhängigen Aktivierungsmechanismus von NKCC geben muß, der unabhängig von CFTR und damit unabhängig von apikaler  $Cl^-$ -Sekretion ist.

Bei dieser direkten cAMP-abhängigen Aktivierung können verschiedene Faktoren eine Rolle spielen: Es ließen sich 20 Konsensus Sequenzen für Kinasen an den Carboxy- und Aminotermini von NKCC identifizieren, darunter Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) sowie die Casein-Kinase II (CK2). Pharmakologische Hemmung deutet auf eine Rolle von PKA, PKC, MLCK und  $Ca^{2+}/CaM$  unter RVI hin (54). Gleichzeitig müssen Proteinphosphatasen für die Dephosphorylierung von NKCC verantwortlich sein. Durch spezifische Inhibitoren konnte die Rolle von Ser/Thr Proteinphosphatasen vom Typ 1 (PP-1) und Typ 2A (PP-2A) und/ oder Typ 3 (PP-3) unter Ruhebedingungen nachgewiesen werden (54). Möglicherweise spielt auch  $[Ca^{2+}]_i$  bei der

## 4 DISKUSSION

---

Aktivierung von NKCC eine Rolle (54,100). Der in Kapitel 1.3.1.3 erwähnte Zusammenhang zwischen NKCC-Aktivität und Phosphorylierungszustand des Proteins legen eine Aktivierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase- bzw. Phosphatase-Kaskade nahe. Vor kurzem wurden volumen-sensitive Proteinkinasen entdeckt, die als Verbindungsglied zwischen cAMP-abhängiger Sekretion und Phosphorylierung basolateraler Anionen-Transporter denkbar wären (59).

Gleichzeitig ist nicht auszuschließen, dass es neben dem Mechanismus der direkten cAMP-abhängigen Aktivierung noch einen weiteren gibt, der NKCC sekundär als Antwort auf apikale CFTR-Aktivierung also abhängig von  $\text{Cl}^-$ -Efflux und damit verbundener Änderung des Zellvolumens und  $[\text{Cl}^-]_i$  stimuliert.

In Anlehnung an die Versuche von Matthews et al., die eine vermehrte [ $^3\text{H}$ ]-Bumetanid Bindung als möglicher Hinweis auf eine erhöhte Anzahl eingebauter Kotransporter in der Membran der intestinalen Zelllinie Cl.19A und HT29 beobachteten, wurde zusätzlich zu den Stimulationsexperimenten mit Forskolin untersucht, inwiefern sich eine längere Forskolin-Inkubation von ca. 20 Minuten auf die NKCC-Aktivität auswirkt, um so den möglichen Einfluß von Transporter-Neueinbau aus submembranösen Vesikeln zu testen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Matthews et al., die erhöhte [ $^3\text{H}$ ]-Bumetanid Bindungsstellen nur in dem Cl.19A Subklon mit eingebautem CFTR feststellten, erhöhte eine 20 minütige Stimulation mit Forskolin die NKCC-Aktivität interessanter Weise nur in den Kolonkrypten der CFTR(-/-) Mäuse, und zwar auf das Niveau, das in den normalen Krypten nach 5 Minuten gemessen wurde. Dies lässt vermuten, dass die erniedrigte NKCC-Grundaktivität in CFTR(-/-) Krypten hauptsächlich auf posttranskriptionale Ereignisse zurückzuführen ist.

Um auszuschließen, dass Forskolin über Aktivierung von basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanälen zu einer Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen oder Zellvolumen führt, die dann wiederum die NKCC-Aktivität erhöht, wurden Versuche mit dem  $\text{K}^+$ -Kanal Hemmstoff 293 B durchgeführt. Hierunter sank zwar die basale NKCC-Aktivität, die Aktivierung durch Forskolin blieb jedoch erhalten.

Zusätzlich zu den beschriebenen Versuchen wurden Experimente von Mitarbeitern unseren Labors durchgeführt (4), in denen Volumina der Krypten durch konfokales Querschnitts-Scanning (43) und Änderungen von  $[Cl^-]_i$  mittels des Fluoreszenz-Farbstoff MQAE unter Forskolin-Stimulation in CFTR(+/+) und (-/-) Krypten gemessen wurden, um so eine Aktivierung von NKCC durch diese indirekten Mechanismen unter cAMP in den (-/-) Krypten auszuschließen. Der Krypten-Querschnitt nahm in den (+/+) Krypten unter Forskolin-Stimulation und gleichzeitiger Anwesenheit von Azosemid um  $9,8 \pm 1,5\%$  deutlich ab, hingegen in den (-/-) Krypten kein Unterschied festzustellen war. Bei den Messungen der  $[Cl^-]_i$  ließ sich eine Zunahme der MQAE-Fluoreszenz unter Forskolin und Azosemid in den CFTR(+/+) Krypten als Hinweis auf eine Abnahme der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentration feststellen, wohingegen in den (-/-) Krypten kein Unterschied zu sehen war.

Diese Ergebnisse verdeutlichen folglich zwei Dinge: Erstens, zeigen sie, dass die cAMP-abhängige Regulation von NKCC auch in Abwesenheit von apikalem CFTR intakt ist. NKCC könnte somit im aktivierten Zustand zu einem zellulären Ungleichgewicht von Ionenkonzentrationen beitragen, das wiederum einige der Beobachtungen in CF-Zellen erklären könnte. Andererseits scheint es damit unwahrscheinlich, dass eine schwere Fehlfunktion von NKCC zu der fehlerhaften Sekretion in CF-Epithelien beiträgt.

Zweitens zeigt die deutliche Steigerung der NKCC-Aktivität in CFTR(-/-) Zellen in Abwesenheit sekundärer Mechanismen wie Zellschrumpfung und Änderungen von  $[Cl^-]_i$ , dass Zellschrumpfung nicht die gemeinsame Endstrecke der NKCC-Aktivierung sein kann, wie es von Heitzmann et al. vorgeschlagen wurde (43). Vielmehr müssen erhöhte  $[cAMP]_i$  NKCC auf einem direkteren Weg aktivieren. Ein möglicher Aktivierungs-Mechanismus könnte dabei eine PKA-vermittelte Phosphorylierung darstellen, für die mehrere stark konservierte Konsensus Stellen in der zytoplasmatischen Domäne des Transporters nachgewiesen wurden (1,74). Es liegen jedoch noch keine Erkenntnisse darüber vor, ob diese Konsensus Stellen tatsächlich von der Proteinkinase A phosphoryliert werden, ob dies überhaupt Auswirkungen auf die Transporter-Aktivität hat, welche zusätzlichen cAMP-abhängigen Mechanismen zur

## 4 DISKUSSION

---

vollständigen Aktivierung von NKCC beitragen und wie ihr genaues Zusammenspiel aussieht.

Folglich läßt sich die cAMP-abhängige NKCC-Aktivierung weder aus simpler Veränderung chemischer Gradienten noch durch sekundäre Mechanismen der Anionen-Sekretion wie Zellschrumpfung oder veränderte Ionengradienten erklären. Die Daten legen vielmehr nahe, dass eine Rezeptoraktivierung wahrscheinlich zu Signaltransduktionsmechanismen führt, die gleichzeitig sowohl apikale Transportmechanismen für die Inangsetzung des Sekretionsprozesses als auch basolaterale Transporter für die Gewährleistung des zellulären Homeostase aktivieren. Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit denen von Heitzmann et al. an der Ratte überein (43), als auch mit Versuchen an Parietalzellen des Kaninchens unseren eigenen Labors, in denen sich eine Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers kurze Zeit nach Sekretagoga-induzierter Stimulation zeigte (3,94). Die selben Ergebnisse konnten darüber hinaus in Untersuchungen unseren Labors an NBC bestätigt werden: es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei NKCC sowohl was Expressionslevel als auch die funktionelle Transporter-Aktivität angeht (4).

Die genaue Charakterisierung mutmaßlicher Proteinkinasen und Phosphatasen wird eine der großen Herausforderungen der Zukunft bei der Erforschung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter darstellen (37).

Die zukünftige Erforschung der Regulationsmechanismen basolateraler Anionen-Transportproteine unter Stimulation apikaler Sekretion könnte neue Optionen zur Behandlung der sekretorischen Diarrhö eröffnen. Die gezeigten Ergebnisse zeigen die Intaktheit der basolateralen  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme-Mechanismen im nativen CF-Gewebe als absolute Voraussetzung für eine mögliche Aktivierung alternativer  $\text{Cl}^-$ -Sekretionsmechanismen.



### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die basolaterale  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme stellt den limitierenden Faktor für intestinale Sekretion dar. Untersuchungen an einer CFTR-defizienten Zelllinie ließen eine defekte Regulation mit verminderten Expressionsleveln der basolateralen Anionen-Aufnahme-Mechanismen  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter vermuten, die damit Teil des schweren Sekretionsdefekts bei der Zystischen Fibrose darstellen könnten. Deshalb wurden in dieser Arbeit sowohl die NKCC mRNA Expression als auch die Transporter-Aktivität und deren Regulation durch  $[\text{cAMP}]_i$  im Gastrointestinaltrakt von CFTR(+ / +) und CFTR(- / -) Mäusen untersucht.

Zur Bestimmung der NKCC1 Expressionslevel in Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Niere wurde die Methode der semiquantitativen PCR mit 18s rRNA als interne Kontrolle verwendet, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transportraten wurden fluorometrisch in BCECF-gefärbten Kolonkrypten gemessen, zur cAMP-abhängigen Kotransporter Stimulation diente 10  $\mu\text{M}$  Forskolin.

Das mRNA Expressionsniveau von NKCC1 lag in allen untersuchten Organen des Gastrointestinaltrakts bei den CFTR(- / -) Mäusen niedriger als bei ihren gesunden Geschwistern, unter Einbezug des zytoskelettalen Proteins Villin verschwand dieser jedoch. In isolierten Kolonkrypten bestand ein geringer, aber statistisch nicht signifikanter Unterschied des NKCC1-Expressionniveaus zwischen CF Mäusen und ihren gesunden Geschwistern. Ebenso war die basale Transporter-Aktivität in den CFTR(- / -) im Vergleich zu den CFTR(+ / +) Kolonkrypten leicht reduziert. Forskolin führte zu einer Steigerung der NKCC-Aktivität sowohl in den CFTR(+ / +) als auch (- / -) Krypten, und zwar um das 2,1fache in den CFTR(+ / +) und das 1,9fache in den (- / -) Krypten. Ein ähnlicher Effekt konnte unter Applikation des  $\text{K}^+$ -Kanal Hemmstoffs 293 B in den Krypten normaler Mäuse gemessen werden.

Zusammenfassend lassen sich leicht reduzierte NKCC1 Expressionslevel und Transportraten bei jedoch erhaltener cAMP-abhängiger Aktivierung der

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Transportaktivität im Gastrointestinaltrakt der CFTR(-/-) Mäusen feststellen. Damit ist eine schwere Fehlfunktion und -regulation basolateraler Anionen-Aufnahme-Mechanismen als Teil des Sekretionsdefekts der Zystischen Fibrose im Gastrointestinaltrakt unwahrscheinlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine direkte, von Zellvolumen und  $[Cl^-]_i$  unabhängige Aktivierung von NKCC im Kolon durch  $[cAMP]_i$  hin.

Die Intaktheit der basolateralen Anionenaufnahmemechanismen stellt die Grundvoraussetzungen für eine mögliche Aktivierung der Anionensekretion über putative alternative Sekretionsmechanismen im Gewebe von Zystische Fibrose Patienten dar. Der Zukunft könnten damit mögliche Angriffspunkte bei der Behandlung der Mukoviszidose eröffnet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J., Boorer, K., Pushkin, A., und Kurtz, I. 1998  
Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter.  
J Biol Chem. 273[28], 17689-17695
2. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. 1987  
Current Protocols in Molecular Biology.
3. Bachmann, O., Sonnentag, T., Siegel, W.-K., Lamprecht, G., Weichert, A., Gregor, M., und Seidler, U. 1998  
Different acid secretagogues activate different  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoforms in rabbit parietal cells.  
Am.J Physiol. 275, G1085-G1093
4. Bachmann, O., Wüchner, K., Rossmann, H., Leipziger, J., Osikowska, B., Colledge, W. H., Ratcliff, R., Evans, M., Gregor, M., und Seidler, U. 2003  
Expression and regulation of the  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  Cotransporter NKCC1 in normal and CFTR-deficient colon.  
Am.J Physiol. 549, 525-536
5. Bargon, J., Stein, J., Dietrich, C. F., Muller, U., Caspary, W. F., und Wagner, T. O. 1999  
[Gastrointestinal complications of adult patients with cystic fibrosis]  
Gastrointestinale Komplikationen erwachsener Patienten mit zystischer Fibrose.  
Z.Gastroenterol. 37[8], 739-749
6. Barrett, K. E. und Keely, S. J. 2000  
Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects.  
Annu Rev Physiol 62, 535-572
7. Berger, H. A., Travis, S. M., und Welsh, M. J. 1993  
Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  $\text{Cl}^-$ -channel by specific protein kinases and protein phosphatases.  
J Biol Chem 268, 2037-2047
8. Bishai.W.R. und Sears, C. L. 1993  
Food poisoning syndromes.  
Gastroenterol.Clin.N.Am. 22, 579-608

## LITERATURVERZEICHNIS

---

9. Bleich, M., Riedemann, N., Warth, R., Kerstan, D., Leipziger, J., Hor, M., Driessche, W. V., und Greger, R. 1996  
Ca<sup>2+</sup> regulated K<sup>+</sup> and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells.  
Pflugers Arch. 432[6], 1011-1022
10. Bleich, M. und Warth, R. 2000  
The very small-conductance K<sup>+</sup> channel KvLQT1 and epithelial function  
Pflugers Arch 440[2], 202-206
11. Bloch, W. 1991  
A biochemical perspective of the polymerase chain reaction.  
Biochemistry 30[11], 2735-2747
12. Boas, S. R. und McColley, S. A. 1997  
Advances in Cystic Fibrosis.  
The Child's Doctor 1[1], 1-3
13. Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., und Boron, W. F. 1988  
pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.  
Am.J Physiol. 255[6 Pt 1], C844-C856
14. Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., und Boron, W. F. 1988  
pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na<sup>+</sup>-dependent and -independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers.  
Am.J Physiol. 255[6 Pt 1], C857-C869
15. Byrne, B. C., Li, J. J., Sninsky, J., und Poiesz, B. J. 1988  
Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification.  
Nucleic.Acids.Res. 16, 4165-4170
16. Carmichael, G. G. und McMaster, G. K. 1980  
The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange.  
Methods Enzymol. 65[1], 380-391
17. Chaillet, J. R. und Boron, W. F. 1985  
Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules.  
J Gen.Physiol. 86[6], 765-794

18. Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., und Kahn, A. 1988  
Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue.  
Nature 333[6176], 858-860
19. Chomczynski, P. und Sacchi, N. 1987  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-  
chloroform extraction.  
Anal.Biochem. 162[1], 156-159
20. Clarke, L. L., Grubb, B. R., Gabriel, S. E., Smithies, O., Koller, B. H.,  
und Boucher, R. C. 1992  
Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic  
fibrosis.  
Science 257, 1125-1128
21. Clarke, L. L. und Harline, M. C. 1996  
CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na<sup>+</sup> absorption in a cystic  
fibrosis mouse model.  
Am J Physiol 270, G259-G267
22. Clontech Laboratories, I. 1993  
PCR - Methods and applications.  
[1-3]
23. Cuthbert, A. W., MacVinish, L. J., Hickman, M. E., Ratcliff, R.,  
Colledge, W. H., und Evans, M. J. 1994  
Ion-transporting activity in the murine colonic epithelium of normal animals and  
animals with cystic fibrosis.  
Pflugers Arch. 428[5-6], 508-515
24. D'Andrea, L., Lytle, C., Matthews, J. B., Hofman, P., Forbush, B. und  
Madara, J. L. 1996  
Na:K:2Cl cotransporter (NKCC) of intestinal epithelial cells. Surface expression  
in response to cAMP.  
J.Biol.Chem. 271[46], 28969-28976
25. Delpire, E., Rauchmann, M. I., Beier, D. R., Hebert, S. C., und Gullans,  
S. R. 1994  
Molecular Cloning and Chromosome Localization of a Putative Basolateral Na<sup>+</sup>-  
K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter from Mouse Inner Medullary Collecting Duct (mIMCD-3)  
Cells.  
Journal Of Biological Chemistry 269[October 14], 25677-25683

## LITERATURVERZEICHNIS

---

26. Dharmsathaphorn, K., Huott, P. A., Vongkovit, P., Beuerlein, G., und Pandol, S. 1989  
Cl<sup>-</sup> secretion induced by bile salts. A study of the mechanism of action based on a cultured colonic epithelial cell line.  
J.Clin.Invest. 84, 945-953
27. Ecke, D., Bleich, M., und Greger, R. 1996  
Crypt base cells show forskolin-induced Cl<sup>-</sup> secretion but no cation inward conductance.  
Pflugers Arch. 431[3], 427-434
28. Eckmann, L., Stenson, W. F., Savidge, T. C., Lowe, D. C., und Barrett, K. E. 1997  
Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin H synthase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> production.  
J.Clin.Invest. 100, 296-309
29. Gaspar, K. J., Racette, K. J., Gordon, J. R., Loewen, M. E., und Forsyth, G. W. 2000  
Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes.  
Physiol.Genomics 3, 101-111
30. Gillen, C. M. und Forbush, B. 1999  
Functional interaction of the K-Cl cotransporter (KCC1) with the Na-K-Cl cotransporter in HEK-293 cells.  
Am J Physiol 276, C328-C336
31. Ginns, S. M., Knepper, M. A., Ecalbarger, C. A., Terris, J., He, X., Coleman, R. A., und Wade, J. B. 1996  
Immunolocalization of the Secretory Isoform of Na-K-Cl Cotransporter in Rat Renal Intercalated Cells.  
J Am.Soc.Nephrol. 7, 2533-2542
32. Greger, R. 2000  
Role of CFTR in the Colon.  
Annu Rev Physiol 62, 467-491
33. Greger, R., Mall, M., Bleich, M., Ecke, D., Warth, R., Riedemann, N., und Kunzelmann, K. 1996  
Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.  
J.Mol.Med. 74[9], 527-534

34. Grubb, B. R. und Boucher, R. C. 1999  
Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis.  
Physiol.Rev. 79[1 Suppl], S193-S214
35. Grubb, B. R. und Gabriel, S. E. 1997  
Intestinal physiology and pathology in gene-targeted mouse models of cystic fibrosis.  
Am.J Physiol. 273[2 Pt 1], G258-G266
36. Grubb, B. R., Lee, E., Pace, A. J., Koller, B. H., und Boucher, R. C. 2000  
Intestinal ion transport in NKCC1-deficient mice.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279, G707-G718
37. Haas, M. und Forbush, B. 2000  
The Na-K-Cl Cotransporter of Secretory Epithelia.  
Annu Rev Physiol 62, 515-534
38. Haas, M., McBrayer, D. G., und Lytle, C. 1995  
Cl<sup>-</sup>-independent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells.  
J Biol Chem 270, 28955-28961
39. Haas, M., McBrayer, D. G., und Yankaskas, J. R. 1993  
Dual mechanisms for Na-K-Cl-cotransport regulation in airway epithel cells.  
Am Physiological Society , C189-C200
40. Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W. J., Demaurex, N., Woodside, M., Tsai, O., und Grinstein, S. 1997  
Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases.  
J Biol Chem. 272[47], 29810-29820
41. Hagos, Y., Krick, W., und Burckhardt, G. 2002  
Chloride conductance in HT29 cells: investigations with apical membrane vesicles and RT-PCR.  
Pflugers Arch 437, 724-730
42. Hames, B. D. und Higgins, S. J. 1994  
Gene transcription. A practical approach.  
Second Edition. Oxford University Press, New York, 1994.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

43. Heitzmann, D., Warth, R., Bleich, M., Henger, A., Nitschke, R., und Greger, R. 2000  
Regulation of the  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$  cotransporter in isolated rat colon crypts.  
Pflugers Arch. 439[3], 378-384
44. Hoffmann, E. K. und Dunham, P. B. 1995  
Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation.  
Int.Rev.Cytol. 161, 173-262
45. Hogan, D. L., Crombie, D. L., Isenberg, J. I., Svendsen, P., de , O. B., und Ainsworth, M. A. 1997  
CFTR mediates cAMP- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated duodenal epithelial  $\text{HCO}_3^-$  secretion.  
Am.J Physiol. 272[4 Pt 1], G872-G878
46. Hogan, D. L., Crombie, D. L., Isenberg, J. I., Svendsen, P., de-, O. B., und Ainsworth, M. A. 1997  
Acid-stimulated duodenal bicarbonate secretion involves a CFTR-mediated transport pathway in mice.  
Gastroenterology 113[2], 533-541
47. Isenring, P., Jacoby.S.C., und Forbush, B. 1998  
The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter.  
Physiologie 95, 7179-7184
48. Joo, N. S., Clarke, L. L., Han, B. H., Forte, L. R., und Kim, H. D. 1999  
Cloning of ClC-2 chloride channel from murine duodenum and its presence in CFTR knockout mice.  
Biochim.Biophys.Acta 1446[3], 431-437
49. Joo, N. S., London, R. M., Kim, H. D., Forte, L. R., und Clarke, L. L. 1998  
Regulation of intestinal  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  secretion by uroguanylin.  
Am.J.Physiol. 274[4 Pt 1], G633-G644
50. Jovov, B., Ismailov, I. I., Berdiev, B. K., Fuller, C. M., Sorscher, E. J., Dedman, J. R., Kaetzel, M., und Benos, D. J. 1995  
Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels.  
J Biol Chem 270, 29194-29200



51. Kaplan, M. R., Plotkin, M. D., Brown, D., Hebert, S. C., und Delpire, E. 1996  
Expression of the Mouse Na-K-2Cl Cotransporter, mBSC2, in the Terminal Inner Medullary Collecting Duct, the Glomerular and Extraglomerular Mesangium, and the Glomerular Afferent Ateriole.  
Am Soc.for Clinical Investigation, Inc. 98[3], 723-730
52. Kinoshita, T., Imamura, J., Nagai, H., und Shimotohno, K. 1992  
Quantification of gene expression over a wide range by polymerase chain reaction.  
Anal Biochem 206(2), 231-235
53. Köhler, T., Laßner, D., Rost, A. K., Thamm, B., Pustowitz, B., und Remke, H. 1995  
Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction. Nonradioactive PCR Methods.
54. Krarup, T., Jakobsen, L. D., Jensen, B. S., und Hoffmann, E. K. 1998  
Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases.  
Am.J.Physiol. 275[1 Pt 1], C239-C250
55. Kunzelmann, K., Bleich, M., Warth, R., Levy-Holzmann, R., Garty, H., und Schreiber, R. 2001  
Expression and function of colonic epithelial KvLQ1 K<sup>+</sup> channels.  
Clin.Exp.Pharmacol.Physiol 28, 79-83
56. Lencer, W. I., Moe, S., Rufo, P. A., und Madara, J. L. 1995  
Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia.  
Proc Natl Acad Sci USA 92, 10094-10098
57. Löffler, G. und Petrides, P. E. 1998  
Biochemie und Pathochemie.
58. Loussouarn, G., Demolombe, S., Mohammad-Panah, R., Escande, D., und Baro, I. 1996  
Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K<sup>+</sup> currents.  
Am J Physiol 271[C1565], C1573

## LITERATURVERZEICHNIS

---

59. Lytle, C. 1997  
Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites.  
J Biol Chem. 272[24], 15069-15077
60. Lytle, C. 1998  
A volume-sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells.  
Am J Physiol 274, C1002-C1010
61. Lytle, C. und Forbush, B. 1996  
Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl<sup>-</sup>.  
Am J Physiol 270, C437-C448
62. Mall, M., Bleich, M., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1999  
CFTR-mediated inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> conductance in human colon is defective in cystic fibrosis.  
Am.J Physiol. 277[3 Pt 1], G709-G716
63. Mall, M., Bleich, M., Seydewitz, H. H., Brandis, M., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1998  
Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP.  
Am.J Physiol. 275[6 Pt 1], G1274-G1281
64. Marjanovic, M., Elliott, A. C., und Dawson, M. J. 1998  
The temperature dependence of intracellular pH in isolated frog skeletal muscle: lessons concerning the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger.  
J Membr Biol 161[3], 215-225
65. Matthews, J. B., Smith, J. A., Tally, K. J., Awtrey, C. S., Nguyen, H. V., Rich, J., und Madara, J. L. 1994  
Na-K-2Cl Cotransport in Intestinal Epithelial Cells.  
Journal Of Biological Chemistry 269, No. 22, 15703-15709
66. McNamara, B., Winter, D. C., Cuffe, J. E., O'Sullivan, G. C., und Harvey, B. J. 1999  
Basolateral K<sup>+</sup> channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon.  
J Physiol (Lond) 519 Pt 1, 251-260

67. Miller, K. 1987  
Gel electrophoresis of RNA.  
Bethesda Res.Lab.Focus 9, 14
68. Nakayama, H., Yokoi, H., und Fujita, J. 1992  
Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging.  
Nucleic.Acids.Res. 20[4939]
69. Payne, J. A. und Forbush, B. 1995  
Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms.  
Cell Biol.Int. 7, 493-503
70. Ramirez, M., Fernandez, R., und Malnic, G. 1999  
Permeation of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  and cell pH in colonic crypts of the rat.  
Pflugers Arch. 438[4], 508-515
71. Ratcliff, R., Evans, M., Cuthbert, A. W., MacVinish, L. J., Foster, D.,  
Anderson, J. R., und Colledge, W. H. 1993  
Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting.  
Nat.Genet. 4, 35-41
72. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., und Rozmahel, R.  
1989  
Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of  
complementary DNA.  
Science 245, 1066-1073
73. Roig, J., Huang, Z., Lytle, C., und Traugh, J. A. 2000  
p21-activated protein kinase gamma-PAK is translocated and activated in  
response to hyperosmolarity. Implication of Cdc42 and phosphoinositide 3-  
kinase in a two-step mechanism for gamma-PAK activation.  
J Biol Chem 275, 16933-16940
74. Romero, M. F., Fong, P., Berger, U. V., Hediger, M. A., und Boron, W.  
F. 1998  
Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$   
cotransporter from rat kidney.  
Am.J Physiol. 274[2 Pt 2], F425-F432
75. Roos, A. und Boron, W. F. 1981  
Intracellular pH.  
Physiol.Rev. 61, 296-434

## LITERATURVERZEICHNIS

---

76. Rossmann, H., Alper, S. L., Nader, M., Wang, Z., Gregor, M., und 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
77. Rossmann, H., Bachmann, O., Vieillard-Baron, D., Gregor, M., und Seidler, U. 1999  
Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransport and Expression of NBC1 and NBC2 in Rabbit Gastric Parietal and Mucous Cells.  
Gastroenterology 116, 1389-1398
78. Roth Yerby, T., Vibat, C. R. T., Sun, D., Payne, J. A., und O'Donnell, M. E. 1997  
Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells.  
Am J Physiol 273, C188-C197
79. Russell, J. M. 2000  
Sodium-potassium-chloride cotransport.  
Physiol.Rev. 80[1], 211-276
80. Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. 1989  
Molecular Cloning. A Laboratory Manual.  
Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
81. Schmitt, R., Ellison D.H., Farman, N., Rossier, B. C., Reilly, R., Reeves, W. B., Oberbäumer, I., Tapp, R., und Bachmann, S. 1999  
Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron.  
Am J Physiol 276, 367-381
82. Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1999  
The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96[9], 5310-5315
83. Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1999  
The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells.  
J.Biol.Chem. 274[17], 11811-11816

84. Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M. E., Stutts, M. J., und Guggino, W. B. 1999  
CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel.  
Physiol.Rev. 79[1 Suppl], S145-S166
85. Seidler, U., Bachmann, O., Jacob, P., Christiani, S., Blumenstein, I., und Rossmann, H. 2001  
Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransport in Normal and Cystic Fibrosis Intestine.  
JOP.J.Pancreas (Online) 2, 247-256
86. Seidler, U., Blumenstein, I., Kretz, A., Viellard-Baron, D., Rossmann, H., Colledge, W. H., Evans, M., Ratcliff, R., und Gregor, M. 1997  
A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca<sup>2+</sup>-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion.  
J Physiol (Lond) 505 ( Pt 2), 411-423
87. Shumaker, H., Amlal, H., Frizzell, R., Ulrich, C. D., und Soleimani, M. 1999  
CFTR drives Na<sup>+</sup>-nHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in CF.  
Am.J.Physiol. 276[1 Pt 1], C16-C25
88. Shumaker, H. und Soleimani, M. 1999  
CFTR upregulates the expression of the basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in cultured pancreatic duct cells.  
Am.J Physiol. 277[6 Pt 1], C1100-C1110
89. Siemer, C. und Gogelein, H. 1993  
Effects of forskolin on crypt cells of rat distal colon. Activation of nonselective cation channels in the crypt base and of a chloride conductance pathway in other parts of the crypt.  
Pflugers Arch. 424[3-4], 321-328
90. Siemer, C. und Gogelein, H. 1993  
Nonselective cation channels in cells of the crypt-base of rat distal colon.  
EXS. 66, 219-222
91. Singh, S. K., Binder, H. J., Boron, W. F., und Geibel, J. P. 1995  
Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts.  
J.Clin.Invest. 96[5], 2373-2379

## LITERATURVERZEICHNIS

---

92. Slotki, I. N., Breuer, W. V., Greger, R., und Cabantchik, Z. I. 1993  
Long-term cAMP activation of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -cotransporter activity in HT-29 human adenocarcinoma cells.  
Am J Physiol 264, C857-C865
93. Soleimani, M. und Ulrich, C. D. 2000  
How cystic fibrosis affects pancreatic ductal bicarbonate secretion.  
Med.Clin.North Am. 84, 641-655
94. Sonnentag, T., Siegel, W. K., Bachmann, O., Rossmann, H., Mack, A., Wagner, H. J., Gregor, M., und Seidler, U. 2000  
Agonist-induced cytoplasmic volume changes in cultured rabbit parietal cells.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279[1], G40-G48
95. Soybel, D. I., Gullans, S. R., Maxwell, F., und Delpire, E. 1995  
Role of basolateral  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransport in HCl secretion by amphibian gastric mucosa.  
Am.J Physiol. 269[1 Pt 1], C242-C249
96. Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C., und Boucher, R. C. 1995  
CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels.  
Science 269[5225], 847-850
97. Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N., Zimniak, A., und Racker, E. 1979  
Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ.  
Biochemistry 18[11], 2210-2218
98. Townsley, M. C., Paradiso, A. M., und Machen, T. E. 1988  
Na/H exchange in antral cells isolated from Necturus, rabbit, and guinea pig.  
Gastroenterology 95[2], 302-310
99. Wang, A. M., Doyle, M. V., und Mark, D. F. 1989  
Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction.  
Natl.Acad.Sci.USA 86[24], 9717-9721
100. Warth, R., Bleich, M., Thiele, I., Lang, F., und Greger, R. 1998  
Regulation of the  $\text{Na}^+\text{2Cl}^-\text{K}^+$  cotransporter in in vitro perfused rectal gland tubules of squalus acanthias.  
Pflugers Arch. 436[4], 521-528

101. Warth, R., Riedemann, N., Bleich, M., Van Driessche, W., Busch, A. E., und Greger, R. 1996

The cAMP-regulated and 293B-inhibited K<sup>+</sup> conductance of rat colonic crypt base cells.

Pflugers Arch. 432[1], 81-88

102. Welsh, M. J. und Smith, A. E. 1993

Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis.

Cell 73, 1251-1254

103. Yang, T., Huang, Y. G., Singh, I., Schnermann, J., und Briggs, J. P. 1996

Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron.

Am J Physiol 271, F931-F939





### DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. M. Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinische Klinik Tübingen, für die Möglichkeit, an seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Frau Prof. Dr. U. Seidler, Abteilung Gastroenterologie, Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover, in deren Labor diese Arbeit durchgeführt wurde, für die Themenstellung, die stetige Unterstützung, Beratung und Motivation.

Mein besonderer Dank gilt meinen zwei Betreuern, Frau Dr. H. Rossmann und Herr Dr. O. Bachmann, die mit ihrer ständigen Hilfsbereitschaft, ihrem umfangreichen Fachwissen, ihrer Geduld, Zusprache und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre, mit der sie mich aufgenommen haben.

Meiner langjährigen Freundin A. Proksch möchte ich für das Korrekturlesen, M. Lacha und R. Hartwich für die Hilfe bei allen technischen Fragen danken.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Anne-Marie und Dr. Erwin Wüchner bedanken, sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern mich stets liebevoll und unterstützend begleitet. Ihnen widme ich als Dank diese Arbeit.



---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Katrin Wüchner  
Geburtsdatum: 14. Februar 1976  
Geburtsort: Waiblingen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schul Ausbildung

1982 - 1986 Grunds chule Altbach  
1986 - 1995 Theodor-Heuss-Gymnasium in Esslingen  
1992: T.L.Kennedy High School, Mississauga, Ontario,  
Kanada

### Studium

1995 - 1999 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg  
Sept. 1997: Ärztliche Vorprüfung  
Aug. 1998: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
1998 - 1999: Studium an der Universität Claude Bernard in Lyon,  
Frankreich  
1999 - 2002 Studium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
11.09.2001: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
05.11.2002: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Berufliche Laufbahn

Seit Dez. 2002: ÄiP in der Kinderklinik des städtischen  
Krankenhaus Friedrichshafen