

Aus dem Bereich Physiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Steuerung der Elektrolytsekretion in
Pankreasgangzellen und Clarazellen der Lunge durch Guanylin**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Matthias Hönscheid

geb. am: 15.12.1974 in Bonn

<u>1.Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1 Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	1
2 Zusammenfassung	6
3 Einleitung	7
3.1 Escherichia coli und Diarrhoe	7
3.1.1 E. coli - eine Familie mit mehreren Stämmen	7
3.1.2 Die pathogenen Wirkmechanismen von enterotoxischen E.coli	9
3.2 Guanylin und STa setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang	11
3.2.1 Die membrangebundene Guanylatzyklase C	12
3.2.2 Die cGMP-abhängige Proteinkinase cGK-II	13
3.2.3 CFTR	14
3.3 Zystische Fibrose	15
3.4 Pankreas	17
3.4.1 Aufbau und Funktion des Pankreas	17
3.4.2 Die Pankreasgangzellen	18
3.4.3 Vorarbeiten Pankreas	19
3.5 Lunge	20
3.5.1 Aufbau der Lunge	20
3.5.2 Innerer Bau von Lunge und Bronchien	21
3.5.3 Funktion der Lunge: Atmung	21
3.5.4 Das Bronchialepithel	22
3.5.5 Clarazellen	23
3.5.6 Vorarbeiten Lunge	23
3.6 Fragestellung	24

4	Material und Methodik	25
4.1	Zelllinien	25
4.1.1	CAPAN	25
4.1.2	CF-PAK	25
4.1.3	H441	25
4.2	Kulturbedingungen	25
4.3	Patch-Clamp-Technik	26
4.3.1	Cell-Attached Konfiguration	26
4.3.2	Whole-Cell Konfiguration	27
4.4	Patch-Pipetten und Elektroden	28
4.4.1	Patch-Pipetten	28
4.4.2	Elektroden	28
4.5	Apparativer Versuchsaufbau	28
4.5.1	Optische und mechanische Komponenten	28
4.5.2	Elektronische Komponenten	30
4.5.3	Datenaufzeichnung	32
4.6	Statistische Datenauswertung	32
4.6.1	Vorzeichenkonvention	33
4.6.2	Strom-Spannungskurve	33
4.6.3	Strom-Zeitverlauf	33
4.6.4	Statistische Auswertung von Gesamtzelleitfähigkeit und spezifischer Leitfähigkeit	34
4.6.5	Einzelkanal- und Ganzzelleitfähigkeit	34
4.6.6	Ionenselektivität	35
4.7	Lösungen	36
4.7.1	Standardlösungen	36
4.7.2	Zugaben zu der Badlösung	36

5 Ergebnisse	37
5.1 Pankreasgangzellen	37
5.1.1 IBMX und Forskolin	37
5.1.2 Das Bakterientoxin STa	41
5.1.3 Versuche zur Konzentration	44
5.1.4 Guanylin	46
5.1.5 Glibenclamid	48
5.1.6 Dibutyryl-cGMP	51
5.1.7 CF-PAK-Zellen	53
5.1.8 Ionenaustausch	54
5.1.9 KT 5720	55
5.1.10 Inkubation	56
5.2 Ergebnisse Lunge	58
5.2.1 IBMX und Forskolin	58
5.2.2 STa	58
5.2.3 Guanylin	60
5.2.4 Dibutyryl-cGMP	62
5.2.5 Glibenclamid	64
5.2.6 KT 5720	65
5.2.7 Methansulfonat	67
6 Diskussion	68
6.1 Chlorid- und Bikarbonatsekretion im Pankreas	68
6.1.1 Bestandteile der Regulation	68
6.1.2 Funktionelle Verifizierung der Signalkaskade	69
6.2 Guanylinabhängige Chlorid- und Bikarbonatsekretion in der Lunge	71
6.2.1 Bestandteile der Regulation	71
6.2.2 Funktionelle Verifizierung der Signalkaskade	72
6.3 Besonderheiten der Zellkultur	74

6.4 Klinische Relevanz und Ausblicke in der Guanylinforschung	76
6.4.1 Kolonkarzinom	76
6.4.2 Natriumhaushalt und Bluthochdruck	79
6.4.3 Colon irritabile und Obstipation	80
6.4.4 Leberregeneration	81
6.4.5 Pankreas	81
6.4.6 Zystische Fibrose und Asthma bronchiale	81
7 Literaturverzeichnis	83
8 Publikationen	94
9 Danksagung	95
10 Lebenslauf	96

Die im Text verwendeten Abkürzungen :

(Abkürzungen in Abbildungen sind jeweils unter der Abbildung erklärt)

ADP	Adenosindiphosphat
AE	Anionentauscher II
ANP	atrial natriuretic peptide
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BNP	brain natriuretic peptide
CA II	Carboanhydrase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	zystische Fibrose
CFTR	Zystische Fibrose Transmembranregulator
cGK-I	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGK II	cGMP-abhängige Proteinkinase II
cGMP	zyklisches Guansinmonophosphat
CNP	C-type natriuretic peptide
db-cGMP	Dibutyryl-cGMP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E.coli	Escherichia coli
EAST	enteroaggregatives hitzestabiles Toxin
ETEC	enterotoxische E. coli
GC-A	Guanylatzyklase-A
GC-B	Guanylatzyklase-B
GC-C	Guanylatzyklase-C
GTP	Guansintriphosphat
IBS	Irritated bowel syndrome
LT	hitzelabiles Toxin von E. coli
min.	Minute(n)
NO	Stickstoffmonoxid
PDE	Phosphodiesterase
pGC	Rezeptorguanylatzyklase
PKA	Proteinkinase A
RT-PCR	reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
STa	hitzestabiles Toxin von E. coli
STaR	STa-Rezeptor, später GC-C

2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation konnte ich zeigen, dass in Pankreasgangzellen und in Clarazellen der Lunge durch Guanylin eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, in deren Folge es zu einer durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) regulierten, von der zystischen Fibrose Transmembranregulator (CFTR) abhängigen Chlorid- und Bikarbonatsekretion kommt. Im Verlauf der Arbeit baute ich einen elektrophysiologischen Messplatz auf und benutzte die Patch-Clamp Technik zur Charakterisierung von intrazellulären Signalkaskaden in kultivierten Zellen. Unterstützung und Fortbildung wurde mir durch die Mitgliedschaft im Graduiertenkolleg „Zelluläre Regulation und Wachstum“ an der Universität des Saarlandes gewährt.

2. Summary

In the present study I could demonstrate that guanylin activates chloride secretion in cells from the hepatopancreatic duct as well as in pulmonary Clara cells. The signal cascade involves the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and depends on the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). A patch-clamp set-up was build up to perform electrophysiological measurements on cultured cells. Support was provided by the Graduiertenkolleg "Zelluläre Regulation und Wachstum" at the Saarland University, Germany

3. Einleitung

3.1 Escherichia coli und Diarrhö

Die Diarrhö ist eine weitverbreitete und besonders in Entwicklungsländern und auf Reisen gefürchtete Krankheit. Die hieran erkrankten Patienten klagen über wässrigen Durchfall und sind vor allem durch Elektrolytverlust und Exsikkose bedroht. Einer der Haupterreger der Diarrhö ist das zur Familie der Enterobakterien zählende Bakterium Escherichia coli (E. coli). Es ist ein circa 1,5 x 4µm großes plumpes Stäbchen, das je nach Untergruppe zusätzlich begeißelt sein kann. Von diesen Untergruppen sind über 170 verschiedene, sogenannte Serotypen bekannt, die sich anhand ihrer Membranproteine unterscheiden lassen. Obwohl mehrere von ihnen zur natürlichen Darmflora des Menschen gehören, gibt es einige für den Menschen pathogene Serotypen.

3.1.1 E. coli - eine Familie mit mehreren Stämmen

E. coli ist im klinischen Alltag ein sehr bedeutsamer Erreger, der die verschiedensten Infektionserkrankungen intestinal (unter anderem Appendizitis, Cholezystitis, Peritonitis) und extraintestinal (hier vor allem Harnwegsinfekte) verursacht. Außerdem ist E. coli hierzulande einer der Hauptsepsiserreger (circa 15% aller Sepsen). Betrachtet man die von E. coli verursachten intestinalen Infektionen, zeigt sich, dass verschiedene Stämme unterschiedliche Erkrankungen verursachen können.

Enterotoxische E. coli

Enterotoxische E. coli sind nicht nur die Haupterreger von Reisediarrhö und Gastroenteritis, sondern auch für die Hälfte aller Darmerkrankungen in subtropischen und tropischen Ländern verantwortlich. Jährlich erkranken hier 200 Millionen Menschen an Diarrhö und 380.000 Kinder unter 5 Jahren sterben an den Folgen einer Infektion. Meist über verunreinigtes Trinkwasser und Nahrung aufgenommen, gelangen die Bakterien in den Darm. Dort heften sich die

enterotoxischen *E. coli* mit speziellen Proteinen, den sogenannten Adhäsinen, an die Zellen des Darmepithels und bewirken dann über zwei Toxine eine zelluläre Exkretion von Wasser und Elektrolyten. Dies sind zum einen das hitzelabile Toxin, das ähnlich dem Cholera-toxin über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) wirkt und zum anderen das hitzestabile Toxin, das über die Aktivierung einer membranständigen Guanylatzyklase zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration führt. Letzteres wird ein wesentlicher Bestandteil dieser Dissertation sein.

Enteropathogene *E. coli*

Enteropathogene *E. coli* führen über eine Zerstörung der Mikrovilli und anderer Bestandteile des Zytoskelettes von Dünndarmepithelien zu einer oft langwierigen Diarrhö, von der hauptsächlich Kinder und Säuglinge betroffen sind.

Enterohämorrhagische *E. coli*

Diese Stämme werden wegen ihrer Verbreitung über die Nahrung, insbesondere über Rindfleisch, und aufgrund möglicher Folgekrankheiten besonders beachtet. Ihr Virulenzfaktor ist im wesentlichen das Shigatoxin, welches dem von Shigellen sezernierten Protein ähnelt und ein Hämolyysin ist. Als Folgeerkrankung der Kolitis mit meist blutiger Diarrhö können schwere Erkrankungen, wie das hämolytisch urämische Syndrom und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura auftreten.

Enteroinvasive *E. coli*

Eine Infektion mit enteroinvasiven *E. coli* führt zu einer schleimig-blutigen Kolitis, die über eine Penetration der Kolonschleimhaut und die anschließende intraepitheliale Vermehrung der Bakterien verursacht wird.

Enteroaggregative E. coli

Diese Erreger verfügen über spezielle Adhäsionsfaktoren, die eine Aggregation der Bakterien möglich machen und zu einer Veränderung der Epithelzellen führen. Zusätzlich produzieren auch sie ein Toxin, das enteroaggregatives hitzestabiles Toxin (EAST) heißt.

3.1.2 Die pathogenen Wirkmechanismen von enterotoxischen E. coli

Die enterotoxischen E. coli (ETEC), können sich mit sogenannten Adhäsinen an die Zellen des Darmepithels haften und entgehen so einer Eliminierung durch die Peristaltik. Die Bakterien sezernieren zwei Toxine: das hitzelabile (LT) und das hitzestabile Toxin (STa). Durch diese werden in den Epithelzellen intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die schließlich zu Wasser- und Elektrolytverlust führen.

LT, das hitzelabile Toxin

Das hitzelabile Toxin heisst hitzelabil, weil es bei einer Erhitzung auf 60°C über eine Dauer von 30 Minuten (min.) inaktiviert wird. Es ist strukturell zweigeteilt: während die sogenannte B-Untereinheit ein Pentamer von Untereinheiten ist und über die Bindung an das membrangebundene Gangliosid G_{M1} die Internalisierung der sogenannten A-Untereinheit bewirkt, katalysiert die A-Untereinheit in der Zelle die von Adenosindiphosphat (ADP) abhängige Ribosylierung des Regulatorproteins G_{sa} , welches Guanosintriphosphat (GTP) bindet. Das so veränderte Regulatorprotein kann nicht mehr inaktiviert werden und es kommt zu einer dauerhaften Aktivierung einer Adenylatzyklase. Der Anstieg von intrazellulärem cAMP bewirkt die Aktivierung von CFTR-Ionenkanälen und verursacht dadurch einen permanenten Chloridausstrom aus der Zelle in das Darmlumen. Den Chloridionen folgt dann, durch Osmose getrieben, Wasser und es resultiert eine sekretorische Diarrhö.

Während das hitzelabile Toxin ein relativ großes (~86 kDa), und damit auch immunogenes Protein ist, besitzt STa, das erst nach über 30 Minuten bei 120 °C inaktiv wird, nur ein relativ geringes Molekulargewicht (~2 kDa). Da STa von zentraler Bedeutung für das Verständnis dieser Arbeit ist, folgt nun eine kurze Zusammenfassung seiner Entdeckungsgeschichte:

STa, das hitzestabile Toxin - die Geschichte des Guanylins

Nachdem 1980 das neu entdeckte STa gereinigt und isoliert werden konnte [Staples S et al. (1981),Nr.81], gelang es im weiteren 1981 seine Aminosäuresequenz zu entschlüsseln (siehe Tabelle 1) [Chan SK und Giannella R (1981),Nr.12; Thompson M und Gianella R (1985),Nr.87]. Mit Entdeckung des Toxins kam unweigerlich die Frage auf: Wie entfaltet STa seine Wirkung? Der Antwort hierauf kam man dann erst 1987 näher, als Waldmann et al. [Waldmann SA et Murad F (1987),Nr.92] herausfanden, dass das Oligopeptid STa an einen spezifischen Rezeptor bindet. Dieser zunächst STa-Rezeptor (STaR) genannte Rezeptor fand sich vorwiegend in der apikalen Membran von intestinalen Epithelzellen, dem typischen Angriffsort der E. coli-Toxine. Zwei Jahre später [Schulz S et al. (1990),Nr.74 und Schulz S et al. (1992),Nr.75] gelang es dann auch die Sequenz dieses Rezeptors zu identifizieren und gentechnisch zu charakterisieren. Anhand seiner Aminosäuresequenz konnte man ihn einer Gruppe von Proteinen, den Guanylatzyklasen zuordnen und somit wurde aus dem StaR die membranständige Guanylatzyklase-C (GC-C). Da man bereits 1988 festgestellt hatte, dass dieser Rezeptor auch in solchen Geweben zu finden ist, die gewöhnlich keinen Kontakt mit dem Bakterientoxin haben (unter anderem Niere, Hoden, Leber und andere Epithelien) [Forte LR et al. (1989),Nr.24 und Forte LR et al. (1988),Nr.23] lag die Vermutung nahe, dass es für diesen Rezeptor auch einen endogenen Liganden geben muss, also zum Beispiel ein menschliches Hormon, das ihn aktiviert. Erst 1992 fand man im Blut und im Urin ein Oligopeptid, das eine dem STa ähnliche, wenn auch weniger potente Wirkung an der GC-C hervorruft. Diese körpereigene im Blut

zirkulierende Substanz benannte man daraufhin nach dem Rezeptor Guanylin [Currie MG et al. (1990),Nr.17], beziehungsweise sein im Urin enthaltenes Pendant Uroguanylin. Es gelang die Struktur des Guanylins zu entschlüsseln und mit gentechnischen Methoden konnte man das dazugehörige Prohormon, den biologischen Vorläufer des aktiven Hormons, das Proguanylin identifizieren [Sauvage de FJ et al. (1992),Nr.71].

	Amino terminus	Carboxyl terminus
Guanylin	P G T C E I C A Y A A C T G C	
Uroguanylin	N D D C E L C V N V A C T G C L	
E. coli STa	N S S N Y C C E L C C N P A C T G C Y	

Tabelle 2: Aminosäuresequenz von humanem Guanylin, Uroguanylin und STa.

Mit Hilfe verschiedener Verfahren ließen sich in der Folgezeit sowohl einige guanylinproduzierende, als auch die GC-C enthaltende Gewebe finden. Das Hormon und der Rezeptor fanden sich aber nicht nur bei Mensch und anderen Säugetieren, sondern auch bei Vögeln, Reptilien und Fischen. Da das im Darm zu findende Guanylin von der luminalen Seite des Epithels an die GC-C bindet, scheint hier das parakrin von einigen Darmepithelzellen sezernierte Guanylin von entscheidender Bedeutung zu sein. Die genaue Bedeutung des im Blut zirkulierenden Guanylins beziehungsweise seiner Vorstufen ist letztlich noch weitgehend unklar.

3.2 Guanylin und STa setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang

Da Guanylin und STa über eine Bindung an der GC-C ihre Wirkung vermitteln, stellte sich nun die Frage, wie die hierdurch ausgelöste intrazelluläre Kaskade im Einzelnen aussieht. Es zeigte sich, dass sie an die GC-C binden, welche dann wiederum ihrerseits die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP katalysiert und so einen intrazellulären cGMP-Anstieg verursacht. Im weiteren

Verlauf wird durch die erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentration die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGK II) aktiviert, die dann wiederum einen Ionenkanal phosphoryliert, den CFTR. Ist der CFTR phosphoryliert und damit aktiviert, strömen durch ihn Chloridionen aus der Zelle und es kommt zu einem osmotisch bedingten Wasserausstrom. Netto resultiert also eine Chlorid- und Wassersekretion.

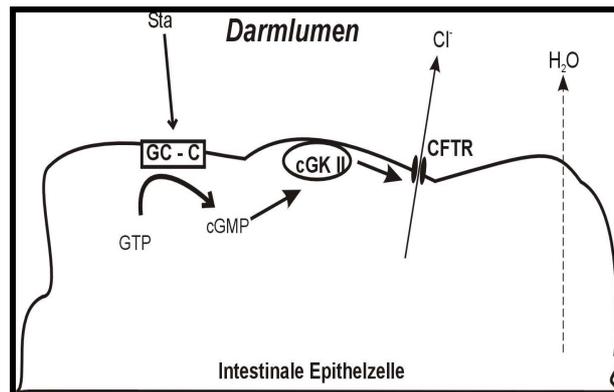


Abbildung 1: STa aktiviert cGMP-abhängig den Chloridkanal CFTR. (STa = hitzestabiles Toxin von *E. coli*; GC-C = membranständige Guanylatzyklase-C; cGK II = cGMP-abhängige Proteinkinase II).

Die GC-C wirkt also nach ihrer Aktivierung über eine intrazelluläre Signalkaskade mit den wesentliche Bestandteilen GC-C, cGK-II und CFTR.

3.2.1 Die membrangebundene Guanylatzyklase C

Die Guanylatzyklasen sind Enzyme, die die Umwandlung von GTP zu cGMP katalysieren. Säugetiere besitzen zwei verschiedene Typen von Guanylatzyklasen: Zum einen die lösliche GC (sGC), ein aus 2 Untereinheiten bestehendes heterodimeres Protein, welches eine Hämgruppe besitzt und intrazellulär durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird. Zum anderen die Rezeptor-GCs (pGCs), membrangebundene Proteine, die eine zytosolische und eine extrazelluläre Domäne besitzen. Die ersten Rezeptorguanylatzyklasen, die in Säugergewebe identifiziert und charakterisiert werden konnten, waren die Guanylatzyklase-A (GC-A) und die Guanylatzyklase-B (GC-B) [Chang MS et al. (1989),Nr.13]. Sie sind die Rezeptoren der myokardialen natriuretischen

Peptide, genauer des atrial natriuretic peptide (ANP) und des brain natriuretic peptide (BNP) sowie für das vorwiegend im Gefäßsystem vorkommende C-type natriuretic peptide (CNP). Die Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen der verschiedenen Guanylatzyklasen zeigen untereinander große Ähnlichkeiten, wenig Ähnlichkeit besteht dagegen zu den katalytischen Domänen der funktionell verwandten Adenylatzyklasen. Mithilfe von Primern gegen die katalytische Region konnte man mittels der Polymerasekettenreaktion weitere Mitglieder der Guanylatzyklasenfamilie ausfindig machen, welche in alphabetischer Reihenfolge fortlaufend mit GC-C bis GC-G benannt wurden [Yuen PS et al. (1990),Nr.94]. Für die GC-C konnte gezeigt werden, dass sie als Rezeptor für das hitzestabile Toxin von enterotoxischen E. coli fungiert [Schulz S et al. (1990),Nr.74] und die entsprechenden endogenen Liganden Guanylin [Currie MG et al. (1992),Nr.17] und Uroguanylin [Kita T et al. (1994),Nr.37] wurden daraufhin ebenfalls identifiziert.

3.2.2 Die cGMP-abhängige Proteinkinase cGK-II

Säugetiere besitzen in ihren Geweben zwei verschiedene Typen von cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Zum einen die im Zytosol gelöste cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK-I), welche ubiquitär vorkommt und eine wichtige Rolle für die Regulation kardiovaskulärer Funktionen und für das Calciumgleichgewicht in Thrombozyten spielt [Feil et al. (2005),Nr.20], zum anderen die membranständige cGK-II, die hauptsächlich in den epithelialen Zellen von Niere, Pankreas, Lunge und Intestinum vorkommt, wo sie eine Rolle bei der Regulation epithelialer Ionentransportmechanismen spielt. Nach Ergebnissen von Arancio et al. und El-Husseini scheinen beide cGMP-abhängigen Proteinkinasen auch an NO- und cGMP-vermittelten Signalkaskaden im Gehirn beteiligt zu sein [Arancio O et al. (2001),Nr.1 und El-Husseini AE et al. (1999),Nr.19]. Nur in Bindung an die Plasmamembran kann die cGK-II ihre Wirkung auf membrangebundene Zielproteine wie den CFTR entfalten [Gardner P et al. (1995),Nr.27]. Für die Funktionsfähigkeit besonders wichtig ist die N-

terminale Myristylierung, durch welche das Protein an der Plasmamembran verankert wird. [Vaandrager AB et al. (1998),Nr.91].

3.2.3 CFTR

Die zystische Fibrose (CF) ist eine Systemerkrankung, die durch einen Gendefekt eines Transmembranproteins ausgelöst wird. Das betroffene Transmembranprotein wurde daraufhin „cystic fibrosis transmembrane regulator“, kurz CFTR, genannt. Der CFTR ist ein Chlorid-Kanal, der vorwiegend in der apikalen Membran von Epithelzellen des Verdauungs- und Respirationstraktes lokalisiert ist. Der CFTR besteht aus zwei Transmembranregionen und aus zwei Nukleotidbindungsdomänen, sowie aus einer Regulatordomäne, die inmitten des Proteins die symmetrischen Hälften mit je einer Nukleotidbindungsdomäne und einer Transmembranregion verbindet. Nachdem durch cAMP eine Phosphorylierung des CFTR ausgelöst wurde kommt es über den geöffneten Kanal zum Ionenfluß, der bei fehlender Phosphorylierung blockiert ist. CFTR spielt in den Epithelien des Verdauungs- und Respirationstrakts eine entscheidende Rolle in der Anionensekretion [Riordan JR et al. (1989),Nr.67]. CFTR fungiert zum einen als Chloridkanal [Fuller CM und Benos DJ (1992),Nr.26 und Schwiebert EM et al. (1999),Nr.76] und dient gleichzeitig als Regulatorprotein von epithelialen Natriumkanälen und verschiedenen Transportern wie zum Beispiel dem Natrium-Bikarbonat-Kotransporter und dem epithelialen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher [Lee MG et al. (1999),Nr.46/47; Shumaker H et al. (1999),Nr.80]. Der CFTR Chloridkanal wird intrazellulär über eine cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert [Schwiebert EM et al. (1999),Nr.76]. Dies wurde auch schon für die Bauchspeicheldrüse gezeigt [Case RM und Argent BE (1993),Nr.11], wo CFTR in großen Mengen exprimiert wird [Trezise AE und Buchwald M (1991),Nr.88]. Die Möglichkeit einer alternativen Aktivierung des CFTR über cGMP konnte für den Pankreas jedoch bisher nicht gezeigt werden [Case RM und Argent BE (1993),Nr.11].

3.3 Zystische Fibrose

Das auch als Mukoviszidose bezeichnete Leiden ist die häufigste auf einen Gendefekt zurückzuführende Erkrankung der kaukasischen Rasse. In Mitteleuropa kommt ein Erkrankungsfall auf 2500 Geburten.

Ursache

Die zystische Fibrose (CF) wird autosomal-rezessiv vererbt. Der Ort des Defektes ist die Region 7q31.2 auf dem langen Arm von Chromosom 7. Genprodukt dieser Region ist der CFTR. An CF Erkrankte besitzen fehlerhafte CFTR-Proteine. Unter den vielen Mutationsmöglichkeiten dieser Genregion sticht eine an Häufigkeit heraus: 70 % aller Erkrankungen liegt eine Deletion von 3 Basenpaaren im Exon 10 zugrunde, die zu einem Fehlen der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des Proteins führt, und daher als delta-508-Mutation bezeichnet wird.

Krankheitsverlauf

Bereits kurz nach der Geburt zeigt sich bei einigen der erkrankten Kinder der sogenannte Mekoniumileus, ein Darmverschluss des Neugeborenen aufgrund eines zähen, kittartigen Darminhaltes. Im Säuglingsalter führt eine Schädigung des Pankreas dann zu einem Malabsorptionssyndrom, durch das es zu Gedeihstörungen und Wachstumsverzögerung kommt. Ebenfalls schon im Säuglingsalter treten pulmonale Komplikationen hinzu, in Form von chronischen Bronchitiden und rezidivierenden Lungenentzündungen bis zur Ausbildung einer schweren und irreversiblen Lungenüberblähung, dem Emphysem. Die wiederkehrenden Entzündungen der Atemwege sind verursacht durch eine unphysiologische Zusammensetzung des Atemwegssekrets. Durch die chronische Entzündung der Lunge kommt es zu einer Widerstandserhöhung in den Lungengefäßen und dadurch zu einer fortschreitenden

Rechtsherzbelastung. Im fortgeschrittenen Stadium leiden die Kinder unter Luftnot, sind abgemagert und minderwüchsig. Weitere charakteristische Symptome der Erkrankung sind ein erhöhter Salzbedarf infolge gesteigerter Salzverluste über den Schweiß, sowie chronische Entzündungen der Nasennebenhöhlen. Auch die Ausführungsgänge der Galle können durch zähflüssige Sekrete verstopfen, der Gallerückstau führt dann in der Leber zu chronisch entzündlichen Umbauvorgängen, die in eine biliäre Leberzirrhose münden können. Die männlichen Patienten sind häufig steril.

Diagnose

Wegweisend für die Diagnose ist die typische salzig schmeckende Babyhaut, ein bereits den Medizinern im Mittelalter bekanntes schlechtes Omen bei Neugeborenen. Der klinische Verdacht wird durch eine positive Familienanamnese erhärtet. Eindeutig bestätigt wird die Diagnose durch den sogenannten Schweißtest: Die Störung der Schweißdrüsen bei Mukoviszidose, kann durch chemische Analyse des Schweißes diagnostiziert werden, da die Chloridkonzentration im Schweiß signifikant erhöht ist. Da das Gen der Mukoviszidose in seiner Struktur aufgeklärt ist, lässt sich darüber hinaus durch Genanalyse auch die Anlageträgerschaft einer nicht erkrankter Personen feststellen.

Therapie

Eine kausale Behandlung der CF ist bislang nicht bekannt. Durch konsequente symptomatische Therapie lässt sich der Krankheitsverlauf aber positiv beeinflussen. Hierdurch konnte Lebenserwartung inzwischen auf über 40 Jahren gesteigert werden.

3.4 Pankreas

Der CFTR ist also einerseits ein zentraler Bestandteil der Pankreassekretion und andererseits zelluläres Erfolgsorgan einer guanylinvermittelten Sekretion [Quinton PM (1999),Nr.65]). Es stellt sich daher unweigerlich die Frage: Inwieweit ist Guanylin auch an der natürlichen Sekretion des Pankreas beteiligt?

3.4.1 Aufbau und Funktion des Pankreas

Die langgestreckte, ungefähr 15 cm lange, im Oberbauch lokalisierte Bauchspeicheldrüse des Menschen liegt dorsal des Magens und produziert wichtige Verdauungsenzyme, sowie zentrale Hormone des Stoffwechsels. Für diese Aufgabe ist das Pankreas funktionell zweigeteilt. In den endokrinen Drüsen werden Hormone gebildet und ins Blut sezerniert, in den exokrinen Drüsen werden die Verdauungssekrete gebildet und in das Duodenum abgegeben. Dabei bildet das exokrine Drüsengewebe mit 84 Prozent den größeren Anteil der Bauchspeicheldrüse und nur 2 Prozent entfallen auf die endokrinen Drüsen. Die restlichen 14 Prozent der Organmasse werden von Gangzellen, Blutgefäßen und extrazellulärer Matrix gebildet. Die endokrinen Drüsenzellen befinden sich in den innerhalb des Organs verstreut liegenden Langerhansschen Inseln. Diese bestehen aus zwei Zelltypen: die A-Zellen geben das Hormon Glukagon und die B-Zellen das Hormon Insulin ins Blut ab. Glukagon und Insulin wirken antagonistisch und regulieren den Kohlehydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel. In den exokrinen Drüsenzellen werden die Bestandteile des alkalischen Verdauungssekrets der Bauchspeicheldrüse gebildet. Es enthält neben Bikarbonat und Elektrolyten zahlreiche Verdauungsenzyme (unter anderem die inaktiven Vorstufen von Trypsin und Chymotrypsin, sowie α -Amylase, Elastase, mehrere Carboxypeptidasen, Aminopeptidasen, Lipasen und Nucleasen). Das Pankreas sezerniert circa 1 Liter Verdauungsflüssigkeit pro Tag, die genaue Menge unterliegt hormoneller

und neuraler Steuerung. Produziert wird das primäre Pankreassekret in den Azini. Die polar aufgebauten Azinuszellen zeigen basal neben dem Zellkern dichtes raues endoplasmatisches Retikulum. Der apikale Pol besteht aus dicht gepackten Zymogengranula, deren Inhalt ins Azinulumen abgegeben werden kann. Von dort gelangt das enzymreiche Primärsekret über mehrere Schaltstücke in die Ausführungsgänge, wo es mit Bikarbonat und Elektrolyten aus den Pankreasgangzellen angereichert wird, ehe es dann über die Mündung des Ductus pancreaticus, ins Duodenum abgegeben wird.

3.4.2 Die Pankreasgangzellen

Aufgabe der Pankreasgangzellen ist sowohl die passive Weiterleitung des in den Azini gebildeten Verdauungssekretes, als auch die Sekretion eines alkalischen, bikarbonatreichen Sekretes, welches den im Magen angesäuerten Darminhalt neutralisiert. Diese Neutralisierung ist sehr wichtig, da das pH-Optimum der Verdauungsenzyme des Pankreas im alkalischen Bereich liegt. In dem sauren Milieu des Magensaftes wären sie nahezu unwirksam. Physiologischer Stimulus der Sekretion ist, neben vagaler Innervation, die von den endokrinen Zellen des Duodenums postprandial gebildeten Hormone Sekretin und Vasointestinales Peptid, welche ihre sekretionsauslösende Wirkung über eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs vermitteln. Hierdurch kommt es zur gesteigerten Bikarbonatsekretion in den Pankreasgängen. Auf zellulärer Ebene sind dazu mehrere Einzelschritte notwendig:

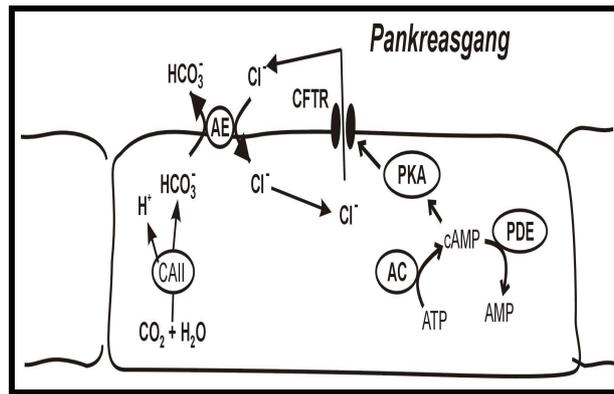


Abbildung 2: Der bislang bekannte Signalweg der Chlorid- und Bikarbonatsekretion von Pankreasgangzellen (PDE= Phosphodiesterase; AC =Adenylatcyclase; PKA=Proteinkinase A; CA II=Carboanhydrase 2; AE= Anionentauscher 2).

Durch den hormonell gesteuerten cAMP-Anstieg kommt es mittels cAMP-abhängiger Phosphorylierung über die Proteinkinase A (PKA) zur Öffnung des CFTR an der apikalen Membran der Zelle und Chloridionen strömen in das Lumen des Pankreasganges. Diese Chloridionen werden dann im Austausch gegen Bikarbonat über den Anionentauscher II (AE) [Case RM und Argent BE (1993),Nr.11] wieder in die Zelle aufgenommen und es resultiert netto eine Bikarbonatsekretion. Dabei ist der Anionentauscher funktionell an den CFTR gekoppelt [Lee MG et al. (1999),Nr.46/47]. Das hierzu benötigte Bikarbonat wird intrazellulär mit Hilfe der Carboanhydrase (CAII) gebildet [Mahieu I et al. (1994),Nr.55].

3.4.3 Vorarbeiten Pankreas

Da der CFTR eine zentrale Rolle in der Elektrolytsekretion des Pankreas einnimmt [Trezise AE und Buchwald M (1991),Nr.88], untersuchte ich in Zusammenarbeit mit Prof. Cetin (Universität Marburg) inwieweit auch hier eine Regulation über Guanylin stattfindet. Prof. Cetin und seine Mitarbeiter hatten bereits menschliches Pankreasgewebe (über eine Whipple-OP von Patienten mit Pankreaskarzinom gewonnen) untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Guanylin in gleichem Maße im Pankreas exprimiert wird, wie im Intestinum.

Anschließend gelang auch der Nachweis von GC-C und den weiteren Bestandteilen der guanylinabhängigen Signalkaskade. Sowohl cGKII, CFTR als auch der AE werden in hohem Maße im Pankreas exprimiert.

Das bedeutet, hier wurde zum ersten Mal die im Darm gut untersuchte GC-C [Schulz S et al. (1990),Nr.74; Scheving LA und Russel WE (1996),Nr.72] auch im Pankreasgewebe nachgewiesen. Die GC-C wurde vorwiegend in der luminalen Membran von proximalen Pankreasgangzellen und zentroazinären Zellen nachgewiesen. Ebenso konnte die cGKII, die bisher als 86 kDa Protein im Intestinum gefunden worden war [Lohmann SM et al. (1997),Nr.53], erstmals im Pankreas nachgewiesen werden.

Guanylin wurde immunhistochemisch in den zentroazinären Zellen und den proximalen Pankreasgangzellen lokalisiert. Es fand sich in sekretorischen Vesikeln der Pankreasgangzellen. Dementsprechend konnte es auch im Pankreassaft nachgewiesen werden.

Im Anschluss daran wurden die an Gewebeschnitten erzielten Ergebnisse auch an CAPAN-1 und CF-PAK-Zellen (siehe Material und Methoden) wiederholt.

3.5 Lunge

Da bei der CF neben dem Pankreas auch die Lunge im Mittelpunkt der Erkrankung steht, führten wir weitere Untersuchungen an Zellen der Lunge durch.

3.5.1 Aufbau der Lunge

Die Lunge liegt zusammen mit dem Herz und den großen Gefäßen im Thorax. Je ein Lungenflügel befindet sich rechts und links vom Mediastinum. Der rechte Lungenflügel besteht aus 3 Lungenlappen, von denen wiederum der Oberlappen in 3 Segmente, der Mittellappen in 2 Segmente und der Unterlappen in 5 Segmente gegliedert ist. Der linke Lungenflügel dagegen besteht aus 2 Lungenlappen, von denen wiederum der Oberlappen aus 5 Segmenten und der Unterlappen aus 4 Segmenten besteht. Sowohl die Oberfläche der beiden

3.5.4 Das Bronchialepithel

Das Bronchialepithel kleidet die luftleitenden Abschnitte des Atemtraktes aus. Es ist eine physikalische Barriere gegenüber schädlichen Umweltfaktoren und dient der Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase. Außerdem ist es aktiv an der Erregerabwehr und der lokalen Regulation der Immunantwort bei Entzündungsreaktionen beteiligt [Rennard SI et al. (1991),Nr.66]. Morphologisch ist das Bronchialepithel durch ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel gekennzeichnet, dessen Kinozilien mundwärts schlagen und so das Noxen und Erreger beinhaltende Bronchialsekret in Richtung Mund transportieren. Das Bronchialepithel wird durch die Basalmembran vom Lungenstroma getrennt und besteht aus verschiedenen Zelltypen. Zum einen die hochprismatischen kinezilientragenden Zellen des Flimmerepithels mit circa 300 Zilien pro Zelle und einem direkten Anschluss an das Lumen. Zum anderen die Becherzellen mit polysaccharidhaltigen Schleimtröpfchen im apikalen Bereich und die Bürstensaumzellen, die unreife Ersatzzellen für zugrunde gegangene Flimmerepithel- und Becherzellen sind. Die Becherzellen besitzen einen dichten apikalen Bürstensaum und sind Zellen mit mechano- und chemosensitiver Funktion. Weitere Zelltypen im Zellverband der Bronchien sind Basalzellen, neuroendokrine Zellen, dendritische Zellen, vereinzelte Lymphozyten, sensorische Nervenfasern und die Clarazellen.

Der Elektrolyttransport in gesundem Bronchialepithel

Ein Ionentransporter in der basalen Membran bewegt je ein Natrium- und ein Kaliumion sowie zwei Chloridionen in die Zelle [Liedtke CM (1989),Nr.49]. Mit Hilfe der ebenfalls in der basalen Membran gelegenen Na/K-ATPase werden Natriumionen aus der Zelle und im Austausch Kaliumionen in die Zelle transportiert. Die verbleibenden Chloridionen werden dann über den CFTR ins Lumen befördert. Diesen folgen dann passiv, durch Ladung und osmotischem Druck angetrieben, Natriumionen und freies Wasser auf parazellulärem Wege.

Da der CFTR gleichzeitig die Aktivität des apikalen Natriumkanals, des sogenannten ENaC, inhibiert, kommt es also insgesamt zum Ausstrom eines NaCl-haltigen Sekrets.

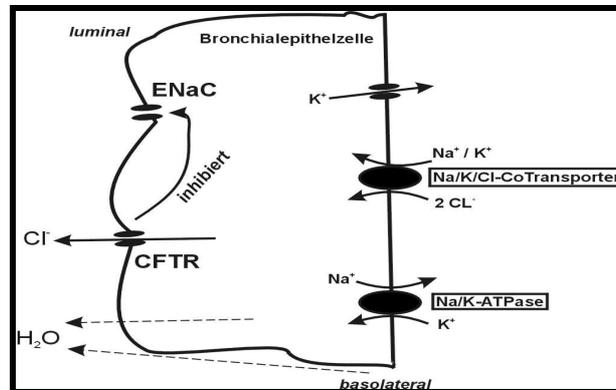


Abbildung 4: Elektrolyttransport in Zellen der distalen Luftwege (EnaC= ein Natriumkanal).

3.5.5 Clarazellen

Clarazellen sind zilienlose, nichtmuköse sekretorische Zellen, die charakteristische Peptidgranula beinhalten. Sie bilden bis zu 80% der Epithelzellen der kleinen distalen Luftwege, genau da, wo sich die Mukoviszidose hauptsächlich manifestiert. Sie sezernieren neben Enzymen auch wichtige Glyko- und Lipoproteine.

3.5.6 Vorarbeiten Lunge

Analog zu den Arbeiten an Zellen des Pankreas gibt es auch hier die entscheidenden Vorarbeiten durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Professor Cetin an der Universität Marburg. Nachdem dort mittels RT-PCR in distalem Lungenparenchym von Mensch und Ratte eine hohe Expression von Guanylin, GC-C, cGKII, CFTR und AE2 nachgewiesen werden konnte, ließen sich auch die entsprechenden Translationsprodukte mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot darstellen. Anschließend gelang es mittels immunhistochemischer Verfahren die oben genannten Teile der Signalkaskade zu lokalisieren. Mittels spezifischer Antikörper konnte man nachweisen, dass sich Guanylin in Clarazellen befindet. Es ist in Zymogengranula apikal des

Zellkerns zu finden. Mutmaßend, dass sich diese Vesikel ins Lumen entleeren, untersuchte man bronchoalveoläre Lavagen und fand dort Guanylin in hoher Konzentration. Da diese deutlich die im Blut gemessene Konzentration übersteigt, liegt der Verdacht nahe, dass Guanylin von den Clarazellen ins Lumen sezerniert wird. In weiteren immunhistochemischen Untersuchungen an Clarazellen zeigte sich in ihrer apikalen Membran die membranständige GC-C, was eindeutig für eine luminale und damit auto- beziehungsweise parakrine Aktivierung von Clarazellen spricht. Dementsprechend konnten auch mit dem CFTR-Ionenkanal, dem AE2 und der cGKII die weiteren Bestandteile der Signalkaskade ausschließlich an der apikalen Membran der Clarazellen nachgewiesen werden.

3.6 Fragestellung:

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation bestand in der elektrophysiologischen und damit funktionellen Verifizierung der unter 3.4.3 und 3.5.6 beschriebenen Vorarbeiten mittels Patch-Clamp-Technik.

4. Material und Methodik

4.1 Zelllinien

4.1.1 Capan

Die Capan-Zellen sind humane Pankreasgangzellen, die ursprünglich aus der Lebermetastase des Pankreasadenokarzinoms eines 40-jährigen Mannes kaukasischer Rasse mit der Blutgruppe A-Rhesusfaktor positiv etabliert wurden. Der Patient war zuvor mit 5-Fluorouracil und BCG behandelt worden.

4.1.2 CFPAK

Die CFPAK-Zellen sind ebenfalls humane Pankreaszellen. Sie wurden aus der Lebermetastase eines duktales Pankreasadenokarzinoms gewonnen. Der Patient, ein 26-jähriger Mann kaukasischer Rasse, litt zusätzlich an zystischer Fibrose. Die Zellen sind also funktionell humane Pankreasgangzellen, besitzen aber die häufigste Form der zystischen Fibrose, nämlich eine Deletion von drei Nukleotiden die zum Verlust von Phenylalanin an Position 508 führt.

4.1.3 H441

Diese Zellen wurden aus dem Perikarderguß eines an einem papillären Adenokarzinom der Lunge leidenden Mannes gewonnen. Sie entsprechen funktional Clarazellen der Lunge.

4.2 Kulturbedingungen

Alle drei Zellreihen (CF-PAK, Capan-1 und H441) wurden im Brutschrank unter Kulturbedingungen von 37 °C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5,5 % CO₂ in folgendem Medium kultiviert: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und Ham's F-12 Medium mit L-Glutamin gemischt im Verhältnis 1:1. Dazu kamen an Zusätzen 10% fötales Kälberserum, Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden alle 3 Tage gesplittet und das

Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Abgelöst wurden die Zellen mit einer Mischung aus Trypsin (0,5 g/l) und EDTA (0,2 g/l) im Verhältnis 1:250 (Trypsin zu EDTA). Bezugsquelle der Lösungen war die Firma PAA Laboratories aus D-35091 Cölbe.

4.3 Patch-Clamp-Technik

Mit der von Sakmann und Neher im Jahre 1976 entwickelten Patch-Clamp-Technik wurde es möglich Ionenkanäle in Zellmembranen zu charakterisieren [Neher E und Sakmann B (1976),Nr.58 und Hamill OP et al. (1981),Nr.31]. Diese Technik erlaubt es, Membranflecken von weniger als 1 μm^2 Fläche elektrisch auszumessen. Dazu wird der Membranfleck durch Unterdruck an die Spitze einer fein ausgezogenen Glaskapillare angesaugt. Die dabei entstehenden Adhäsionskräfte zwischen der Membran und der Glaswand sorgen für eine hohe elektrische Abdichtung mit einem Widerstand von bis zu 10 $\text{G}\Omega$. Mit einem elektronischen Verstärker kann man das Membranpotential zwischen der Messelektrode in der Pipette und einer Referenzelektrode in der Messkammer auf definierte Spannungen klemmen und gleichzeitig den Strom registrieren, der zur Aufrechterhaltung dieses Klemmpotentials notwendig ist.

Das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle, die sich im Membranfleck befinden, führt dann zu einer Änderung des Membranwiderstandes und damit zu einer Zu- oder Abnahme des gemessenen Stromes.

4.3.1 Cell-Attached Konfiguration

Bei dieser Form der Messung kann man an einer intakten Zelle die Ionenströme über einem elektrisch isolierten Membranfleck messen. Dabei lassen sich aber der gesamte Zellmembranstrom und das Zellpotential nicht bestimmen und man hat keine Kontrolle über die intrazelluläre Ionenkonzentration. Die Cell-Attached Konfiguration nutzt man daher unter anderem um Einzelkanäle zu untersuchen, die zur Aktivierung einer intakten Zellstruktur bedürfen.

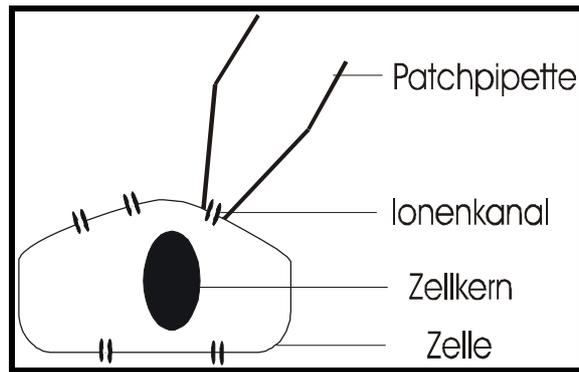


Abbildung 5: Die Cell-Attached Konfiguration

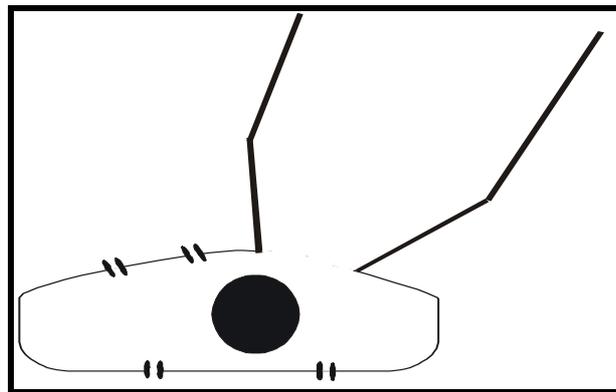


Abbildung 6: Die Whole-Cell Konfiguration.

4.3.2 Whole-Cell Konfiguration

Bei dieser Technik appliziert man einen kurzen und kräftigen Unterdruck in der Pipette und kann so die Membran der Cell-Attached Konfiguration aufbrechen und einen Zugang zur gesamten Zelle gewinnen. Hier werden die Potentiale und Ströme der ganzen Zelle beziehungsweise mehrerer gekoppelter Zellen (Zell-Cluster) gemessen. Mit dieser Methode kann man das Potential einer Zelle auf unterschiedliche Werte „klemmen“ und den Zellgesamtstrom bestimmen. Durch den direkten Zugang zum Zellinneren ist es möglich über die Pipettenlösung die Ionenkonzentration zu beeinflussen. Es ist aber zu berücksichtigen, dass es auch zum Auswaschen wichtiger zytoplasmatischer Substanzen kommen kann.

4.4 Patch-Pipetten und Elektroden

4.4.1 Patch-Pipetten

Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren hergestellt, die einen Innendurchmesser von 0,9 mm und eine Wandstärke von 0,3 mm besaßen. Um Pipettenöffnungen mit einem Durchmesser von 1 μm und weniger herstellen zu können, wurden die Glaskapillaren mit einem Vertikalpuller [Hampel, MPI für Biophysik Frankfurt/Main, Deutschland] in zwei Stufen bei unterschiedlicher Hitze ausgezogen. Im Anschluss wurden die Glaskapillaren mit einem elektrisch geheizten Platindraht unter mikroskopischer Sicht feuerpoliert, um scharfe Kanten und Verschmutzungen zu entfernen. Der elektrische Widerstand der Patch-Pipette betrug nach Füllung mit einer 140 mM KCl-Lösung zwischen 2 und 5 M Ω . Der Widerstand verhält sich dabei antiproportional zum Öffnungsradius der Patch-Pipette.

4.4.2 Elektroden

Als Mess- und Referenzelektrode dienten jeweils ein chlorierter Silberdraht, die Ag/AgCl-Elektrode. Da es bei den Messungen zur Ionenselektivität zu Beeinflussungen der Referenzelektrode durch Schwankungen der Chloridkonzentration in der Badlösung kommen kann, wurde diese in eine 140 mM NaCl-Lösung getaucht, die durch eine stromleitende Agarbrücke von der Badlösung getrennt war .

4.5 Apparativer Versuchsaufbau

4.5.1 Optische und mechanische Komponenten

Um eine Übertragung mechanischer Schwingungen aus der Umgebung auf die Meßanordnung zu verhindern, wurde das Mikroskop zusammen mit der mechanischen Versuchsanordnung auf einer durch Druckluft schwingungsgedämpften Stahlplatte [Ealing, Vibration Isolation Systems, Massachusetts, USA] befestigt. Ein um die Versuchsanordnung gebauter

Faraday-Käfig und ein gemeinsamer Massepunkt für alle leitenden Gegenstände innerhalb des Käfigs sorgten für die notwendige elektrische Abschirmung.

Die optische Kontrolle erfolgte mit einem inversen Mikroskop [Zeiss, Axiovert 135, Deutschland], an das eine Videokamera mit dazugehörigem Monitor angeschlossen war. Die aus Plexiglas bestehenden Messkammern waren auf dem Gleittisch des Mikroskops befestigt. Den Boden der Messkammer bildete ein angeklebtes Deckglas, das so für optimale optische Durchlässigkeit sorgte. Angeschlossen an die Messkammer war ein Perfusionssystem, das einen Austausch der Badlösung innerhalb weniger Sekunden erlaubte. Das Perfusionssystem bestand aus sechs 100 ml-Spritzen, die senkrecht aufgehängt über einen 6-Wege-Hahn mit dem Zulauf am Boden der Messkammer in Verbindung standen. Der Pegelstand der Badlösung konnte durch permanentes Absaugen, mit Hilfe einer an der Oberkante der Meßkammer befestigten Kanüle, konstant gehalten werden. Der Patch-Clamp-Vorverstärker war mit dem daran befestigten Pipettenhalter auf einen Mikromanipulator [Eppendorf, Modell 5171, Deutschland] montiert, der eine genaue Bewegung der Pipette in alle 3 Raumrichtungen erlaubte. Die gefüllte Patch-Pipette wurde in den Pipettenhalter eingespannt und konnte mit dem Mikromanipulator positioniert werden. Bei den ersten Experimenten wurde die Feinpositionierung mit Hilfe von Piezoelementen durchgeführt, welche die Pipette langsam, gleichmäßig und exakt an die Zelle heranführen. Später wurde ausschließlich der Mikromanipulator genutzt. Der Druck in der Pipette konnte über einen angeschlossenen Schlauch reguliert werden. Dieser war mit einem 4-Wege-Hahn verbunden an dem wiederum eine Wassersäule und ein Schlauch inklusive Mundstück angeschlossen waren. So konnte man einen über die Wassersäule vordefinierten Druck auf das Pipetteninnere legen. Zum Durchreißen des Membranflecks wurden kurze Unterdruckpulse mit einem Mundstück appliziert.

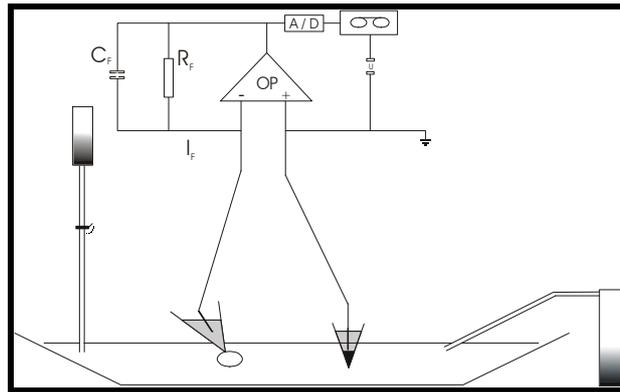


Abbildung 7: Schaltplan der optischen und mechanischen Komponenten. (OP = Verstärker; R_f = Referenzwiderstand; I_f = Referenzstrom; I_m = Messstrom; C_f = Referenzkapazität; A/D = Analog-Digital-Wandler).

Abbildung 7 zeigt den Versuchsaufbau. Im unteren Teil der Abbildung ist die flüssigkeitsgefüllte Messkammer dargestellt. In ihr befindet sich zwei Elektroden: links die Patch-Pipette mit angesaugter Zelle und rechts die Referenzelektrode. Ganz links befindet sich die schematische Darstellung des Zulaufs, rechts die der Absaugpumpe. Oben ist der elektrische Messkreis schematisch wiedergegeben.

4.5.2 Elektronische Komponenten

Der Aufbau des elektrischen Messkreises ist oben in Abbildung 7 wiedergegeben. Der invertierte Eingang (-) des Operationsverstärkers (OP) ist über einen Rückkopplungswiderstand (R_f) so mit seinem Ausgang verschaltet, dass der Messstrom (I_m) an diesem Eingang kompensiert wird. Der Kompensationsstrom (I_f) hat denselben Betrag, jedoch eine entgegengesetzte Polarität wie der ursächliche Strom (I_m) durch die Elektrode. Am Ausgang des OP liegt die Spannung $U = I_m \times R_v$ an und kann als Messgröße weiterverarbeitet werden. Widerstandsänderungen im Elektrodenstromkreis zum Beispiel durch Öffnen von Ionenkanälen in der Zellmembran lassen sich als Änderungen der Ausgangsspannung (U) messen.

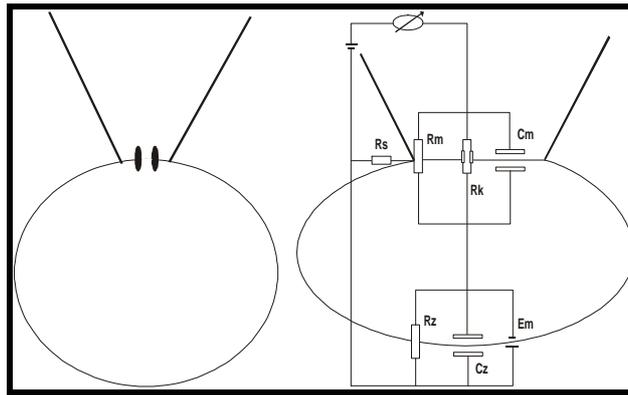


Abbildung 8: Schaltplan der Cell-Attached Konfiguration (R_s = Widerstand für die Abdichtung zwischen Glas und Membran; R_m = Membranwiderstand des Membranflecks; R_k = Kanalwiderstand; R_z = Zellmembranwiderstand; C_m = Kapazität des Membranflecks; C_z = Zellkapazität; E_m = Zellpotential).

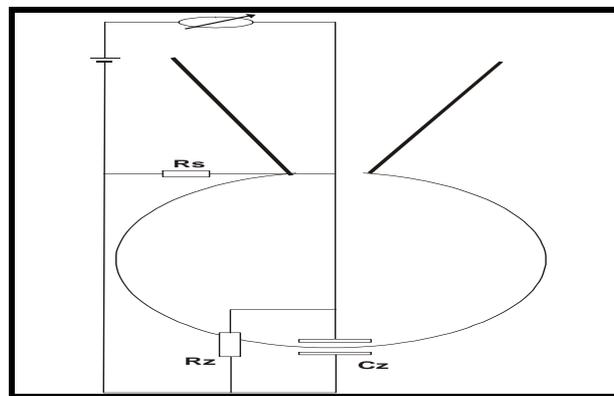


Abbildung 9: Schaltplan der Whole-Cell Konfiguration (R_s = Widerstand für die Abdichtung zwischen Glas und Membran; R_z = Zellmembranwiderstand; C_z = Zellkapazität).

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die elektrischen Ersatzschaltbilder der benutzten Patch-Clamp-Konfigurationen. Der Membranwiderstand des Membranflecks (R_m) und der Widerstand für die Abdichtung zwischen Glas und Membran (R_s) sind bei einer stabilen Ableitung konstant. Da in der Cell-Attached Konfiguration der Zellmembranwiderstand (R_z) um ein Vielfaches kleiner ist als R_m , fällt fast die gesamte Spannung über dem Membranfleck ab. Somit kann R_z hier vernachlässigt werden. Das Öffnen und Schließen des Ionenkanals, das heißt das Zu- oder Abschalten seines Kanalwiderstands (R_k), führt zu diskreten Änderungen der Membranleitfähigkeit und somit zu einer messbaren Änderung im Elektrodenstromkreis. In der Ganzzelleableitung fehlt

R_m , hier werden die Ströme der gesamten Zelle beziehungsweise mehrerer gekoppelter Zellen gemessen. Das Zellpotential (E_m) und die Zellkapazität (C_z) können hierbei bestimmt werden. Bei dem isolierten Membranfleck der Inside-out-Konfiguration fehlen die elektrischen Zellkomponenten R_z , C_z und E_m , da dieser von der Zelle isoliert ist.

Der Serienwiderstand im Elektrodenmesskreis, der im wesentlichen von der Konzentration und der Beweglichkeit der Ionen sowie dem Spitzendurchmesser der Patch-Pipette abhängt, wirkt als Spannungsteiler. Da er aber meist deutlich geringer ist als der Abdichtungswiderstand, kann er vernachlässigt werden und wurde nicht eingezeichnet.

4.5.3 Datenaufzeichnung

Die Daten wurden über einen Patch-Clamp-Verstärker [EPC-9 beziehungsweise EPC-7, HEKA, Deutschland] mit dem dazugehörigen Vorverstärker erfasst. Die so gewonnenen Daten wurden dann über einen PC weiterverarbeitet. Gleichzeitig erfolgte eine optische Kontrolle über ein angeschlossenes Oszilloskop. Die Daten wurden über eine Schnittstelle [DAQ LAB-PC-1200, National Instruments, USA] auf einen PC [handelsüblicher Pentium-PC MMX, 200 MHz, 64 MB RAM] gebracht und mit der dort installierten Software [NI-DAQ 6.1, National Instruments, USA] erfolgte die Aufzeichnung der Daten mit 800 Datenpunkten pro Sekunde. Außerdem wurden mit Hilfe der Software alle 3s, eine je 800 ms dauernde Spannungsrampe von -100 mV bis $+40$ mV, ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV, appliziert.

4.6 Statistische Datenauswertung

Zur Gewinnung statistisch überprüfbarer Ergebnisse wurden die Datenpunkte in die Software „Sigma Plot 4.0“ [SPSS Inc.] exportiert und ausgewertet.

4.6.1 Vorzeichenkonvention

Die Vorzeichen der Klemmspannungen sind so festgelegt, dass sich ein positiver Membranstrom dann ergibt, wenn Kationen von der zytosolischen auf die extrazelluläre Membranseite wechseln.

4.6.2 Strom-Spannungskurve

Zur Erzeugung der Strom-Spannungskurve trägt man die Amplituden der Einzelkanal- bzw. Zellströme gegen die jeweilige Klemmspannung in ein Koordinatensystem auf. Als Umkehrpotential bezeichnet man den Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse also der Spannungswert an dem der Ionenstrom seine Polarität ändert (Abbildung 10).

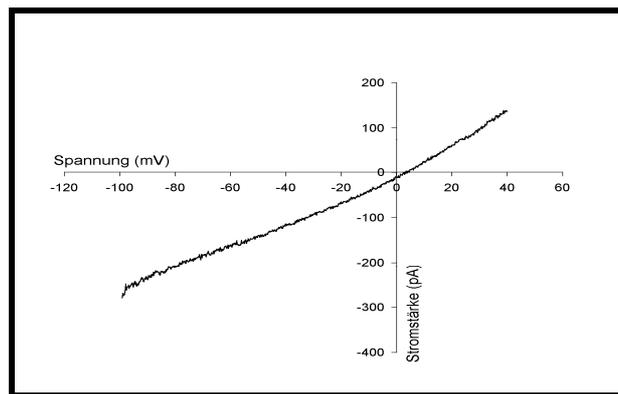


Abbildung 10: Eine Strom-Spannungskurve.

4.6.3 Strom-Zeitverlauf

Die Abbildung des Strom-Zeitverlaufs verdeutlicht die Änderung des Membranwiderstands über einen bestimmten Zeitraum. Dazu trägt man den über die Membran, beziehungsweise über die gesamte Zelle fließenden Strom für einen jeweils konstanten Spannungswert gegen die Zeit auf (Abbildung 11).

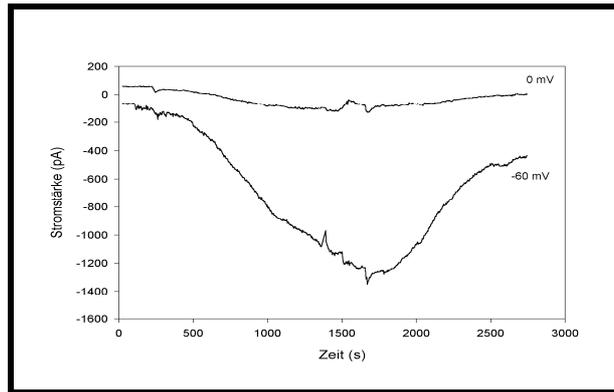


Abbildung 11: Ein Strom-Zeitverlauf.

4.6.4 Statistische Auswertung von Gesamtzelleitfähigkeit und spezifischer Leitfähigkeit

Hier wurde die durchschnittliche Änderung der Leitfähigkeit aller Experimente einer Versuchsreihe gegen die Zeit aufgetragen. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an. Setzt man die Ergebnisse in Bezug zur Zellkapazität (spezifische Leitfähigkeit = Leitfähigkeit/Zellkapazität) erhält man die spezifische Leitfähigkeit. Unterschiede im Gesamtzellwiderstand, die vor allem durch die Zellgröße bedingt sind, werden durch die Berechnung der spezifischen Leitfähigkeit eliminiert. Inwieweit die hierbei beobachteten Veränderungen signifikant waren, wurde mit dem gepaarten t-Test geprüft. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus wurden dabei wie folgt gekennzeichnet:

$p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,005 = +$; $p < 0,001 = ++$.

4.6.5 Einzelkanal- und Ganzzelleitfähigkeit

Unter symmetrischen Ionenbedingungen konnten die Punkte der Strom-Spannungskurve für nicht gleichrichtende Kanäle und Ströme durch eine Gerade angepasst werden, die durch eine lineare Regression berechnet wurde. Die Steigung der Geraden stellt die Leitfähigkeit (in pA/V) des Einzelkanals, beziehungsweise der gesamten Zelle dar und wird in Picosiemens (pS) angegeben. Besteht über der Membran ein Ionen-Konzentrationsgradient so ergibt sich kein linearer Zusammenhang zwischen Meßstrom und

Klemmspannung. Die entsprechenden Stromwerte können über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (kurz Goldmann-Gleichung) angeglichen werden (siehe Formel).

4.6.6 Ionenselektivität

Liegt ein Ionengradient über der Membran an, so kann man aus dem Umkehrpotential das Permeabilitätsverhältnis der Ionen bestimmen. Man hat so ein Maß für die Ionenselektivität des Kanals. Das Verhältnis der Permeabilitätskonstanten kann für einwertige Ionen aus der Goldman-Gleichung errechnet werden:

$$E_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}[Na]_a + P_K[K]_a + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_a}$$

In der Goldman-Gleichung sind die Anteile der verschiedenen Arten von Ionen am Gesamtpotential nach dem Permeabilitätskoeffizienten P gewichtet. Im Grenzfall $P(K) \gg P(Na)$ und $P(K) \gg P(Cl)$ geht sie in die Nernst-Gleichung für Kalium über.

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_a}{[K]_i}$$

4.7 Lösungen

4.7.1 Standardlösungen

Standardlösung	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgATP	Glucose	EGTA	HEPES	Na-Iodid	Na-Bromid	Na-Methansulfonat
I.Pipettenlösung pH 7,1 geeicht mit KOH	-	145	-	1	2	10	0,1	10	-	-	-
II.Badlösungen pH 7,4 geeicht mit NaOH											
a)Standardlösung NaCl	140	4,7	1,3	1	-	10	-	10	-	-	-
b)Austauschlösung NaI	-	4,7	1,3	1	-	10	-	10	140	-	-
c)Austauschlösung NaBr	-	4,7	1,3	1	-	10	-	10	-	140	-
d)Austauschlösung Na-methansulfonat	-	4,7	1,3	1	-	10	-	10	-	-	140

Tabelle 3: Zusammensetzungen der verschiedenen Badlösungen, Angaben in mM.

4.7.2 Zugaben zu der Badlösung

Lösung	IBMX	Forskolin	HSTa	Guanylin	Glibenclamid	Ionomycin	db-cGMP
IBMX+Forskolin	10 mM	10 µM	-	-	-	-	-
HSTa 100%	-	-	1,25 U/ml	-	-	-	-
Guanylin	-	-	-	1 µM	-	-	-
Glibenclamid	-	-	1,25 U/ml	-	0,1 mM	-	-
Ionomycin	-	-	-	-	-	0,1 µM	-
db-cGMP	-	-	-	-	-	-	1 mM

Tabelle 4: Die verschiedenen Zugaben zur Badlösung

5. Ergebnisse

5.1 Pankreasgangzellen

Alle Experimente mit Pankreasgangzellen sind, bis auf die Negativkontrollen, an Zellen der Capan-1 Zelllinie durchgeführt worden. Zur Negativkontrolle bediente ich mich der CF-PAK-Zellen die sich durch einen funktionsunfähigen CFTR-Ionenkanal von den CAPAN-1 Zellen unterscheiden. Mit Hilfe der Whole-Cell Ableitung wurde der über der Zellmembran fließende Strom gemessen und Veränderungen nach Applikation der jeweiligen Substanzen registriert. Zusätzlich wurde mit Hilfe sogenannter Spannungsrampen eine Strom-Spannungskurve erzeugt, die den bei unterschiedlich angelegter Spannung fließenden Strom abbildet.

5.1.1 IBMX und Forskolin

Zuerst kontrollierte ich über 3 bis 5 Minuten die Membranleitfähigkeit unter den Ausgangsbedingungen. Im Anschluss daran fügte ich der Badlösung ein Gemisch aus IBMX, einem Inhibitor der intrazellulären Phosphodiesterase, und Forskolin, einem Aktivator der intrazellulären Adenylatzyklase, bei. Hiermit wollte ich zeigen, dass es über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer Aktivierung des CFTR kommt. Danach versuchte ich dieses Gemisch wieder mit Badlösung auszuspülen, um so die Reversibilität der Aktivierung zu demonstrieren.

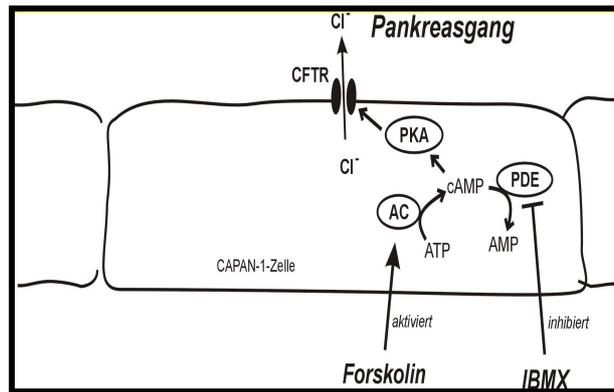


Abbildung 12: IBMX hemmt die Phosphodiesterase (PDE) und Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase (AC). Somit kommt es über einen intrazellulären cAMP-Anstieg indirekt über die Phosphokinase A (PKA) zu einer Aktivierung des CFTR.

Strom-Zeit-Verlauf

Der Strom-Zeitverlauf eines ausgewählten Experimentes zeigt hier den über die Zellmembran fließenden Strom jeweils für zwei exemplarisch herausgegriffene Spannungen, nämlich 0 beziehungsweise -60 mV. Nach wenigen Minuten unter Kontrollbedingungen (A) sieht man die Zunahme des gemessenen Stromes zeitgleich mit der Applikation von IBMX (1 mM) und Forskolin (10 μ M) (B). Nach Auswaschen der Substanzen mit Badlösung nimmt der gemessene Strom wieder vollständig ab (C).

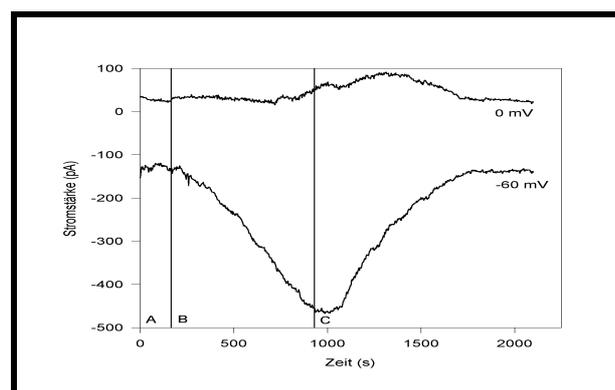


Abbildung 13: Der gemessene Stromfluss über die Zellmembran der Capan-1-Zelle. A: zu Beginn unter Kontrollbedingungen, B: nach Zugabe von IBMX (1 mM) und Forskolin (10 μ M) und C: nach Auswaschen des Gemisches mit IBMX- und Forskolin-freier Badlösung).

Strom-Spannungskurve

Die Strom-Spannungskurve stellt zu jeder angelegten Spannung den Strom dar, der über die Membran fließt. Jede Kurve ist dabei zu einem bestimmten, unten genannten Zeitpunkt gemessen worden. Zunächst sieht man den Verlauf unter Kontrollbedingungen (A), dann den deutlichen Stromanstieg nach Aktivierung durch IBMX/Forskolin (B). Nach Auswaschen der Substanzen zeigt die Strom-Spannungskurve die Reversibilität der Aktivierung an (C).

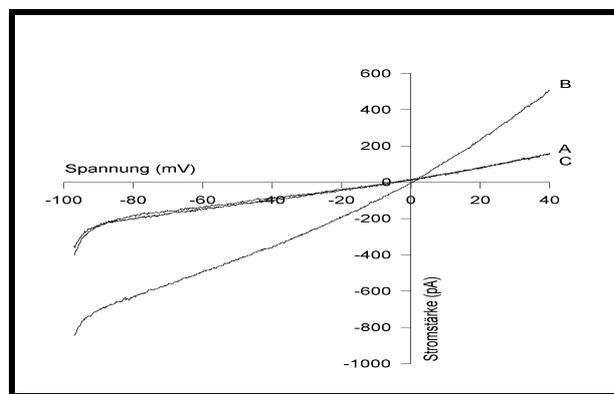


Abbildung 14: Die Strom-Spannungskurven der Capan-1-Zellen. A: unter Kontrollbedingungen, B: nach Zugabe von IBMX (1 mM) und Forskolin (10 μ M) und C: nach Auswaschen des Gemisches mit IBMX- und Forskolin-freier Badlösung.

Statistische Auswertung

Zusammenfassend wird hier geprüft, ob die in dieser Reihe von Experimenten gemessenen Veränderungen statistisch signifikant sind. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aller Experimente, der Aufsatz den Standardfehler. Man sieht deutlich die Zunahme der Leitfähigkeit nach Gabe von IBMX und Forskolin.

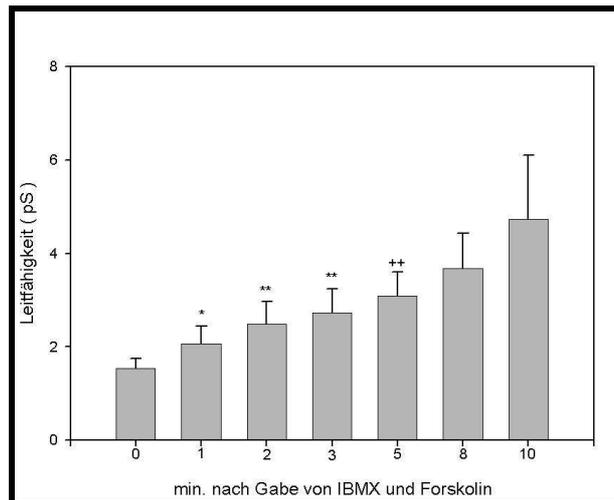


Abbildung 15: Die Veränderung der Leitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von IBMX (1 mM) und Forskolin (10 μ M). Da mehrere Experimente nur über 5 Minuten stabil blieben, ist kein Signifikanzniveau für 8 beziehungsweise 10 Minuten angegeben.

Die folgende Abbildung zeigt diese Werte dann in Relation zur Gesamtzellkapazität und gibt so die spezifische Leitfähigkeit an. Da die Gesamtzellkapazität hauptsächlich von der Zellgröße abhängt, sieht man anhand der spezifischen Leitfähigkeit die Veränderung unabhängig von der Größe der Zelle, beziehungsweise des Zellclusters.

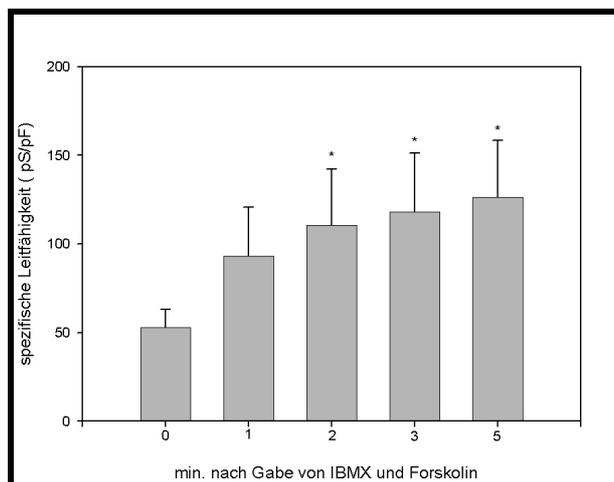


Abbildung 16: Die Veränderung der spezifischen Leitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von IBMX (1 mM) und Forskolin (10 μ M).

Diese Ergebnisse stimmen mit bereits bekannten Daten von Pankreasgangszellen [Cheng HS et al.(1998),Nr.15; Becq F et al.(1992),Nr.2; Becq F et al.(1993), Nr.3/4] überein.

5.1.2 Das Bakterientoxin STa

Weiterhin habe ich die Pankreasgangzellen mit dem hitzestabilen Toxin der enterotoxischen E.coli stimuliert. Nach Messung unter Standardbedingungen gab ich dazu das STa-Toxin (1,25 U/ml) der Badlösung bei. Durch die anschließende Veränderung der Gesamtleitfähigkeit der Zellen konnte ich zeigen, dass STa an den Zellen eine Wirkung hervorruft und diese Zellen somit einen funktionstüchtigen STa-Rezeptor, wahrscheinlich die membranständige Guanylatcyclase C, besitzen. Die Charakteristika des gemessenen Stromes lassen eine Aktivierung des CFTR-Ionenkanals vermuten. Damit ist es wahrscheinlich, dass die Zellen über eine CFTR-aktivierende Signalkaskade verfügen. Auch hier konnten die Messungen nach anschließendem Spülen mit STa-freier Badlösung die Reversibilität demonstrieren.

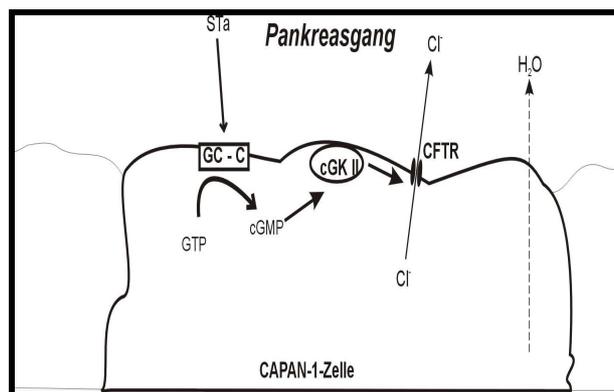


Abbildung 17: STa führt über die membranständige Guanylatzyklase-C (GC-C) in Capan-1-Zellen zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP und somit indirekt über die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGK-II) zu einer Aktivierung des CFTRs.

Strom-Zeitverlauf

Der Strom-Zeitverlauf zeigt den reversiblen Anstieg des gemessenen Stromes nach extrazellulärer Zugabe von STa. Nach kurzer Kontrollperiode (1) zeigt sich nach Gabe von STa (1,25 U/ml) (2) ein deutlicher Anstieg des über die Membran fließenden Stromes. Nach Auswaschen der Substanz durch die STa-freie Badlösung (3) kommt es wieder zu einem Rückgang des Membranstromes, die Reaktion ist reversibel.

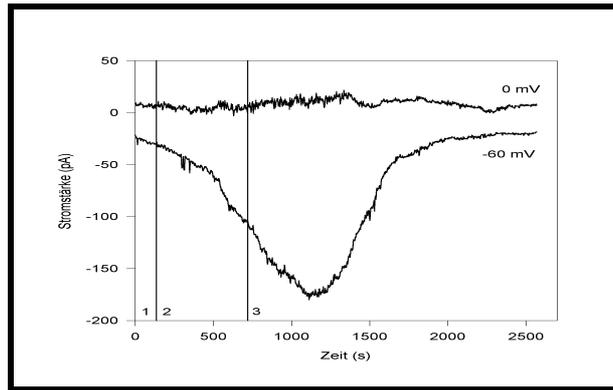


Abbildung 18: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Zugabe von STa (1,25 U/ml) und 3: nach Auswaschen mit STa-freier Badlösung.

Strom-Spannungskurve

Hier zeigt die Stromspannungskurve den bei ausgewählten Zeitpunkten über die Membran fließenden Strom in Abhängigkeit zu der angelegten Spannung, jeweils vor (A), und nach Gabe von STa (B) sowie nach Auswaschen von STa (C). Man sieht nach Zugabe von STa eine reversible Zunahme des über die Membran fließenden Stromes bei jeweils gleicher Spannung.

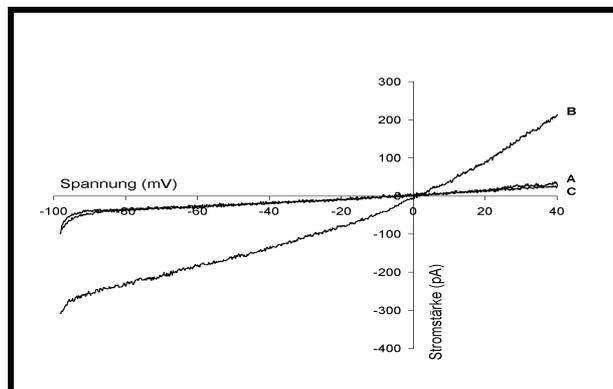


Abbildung 19: Die Strom-Spannungskurven der Capan-1-Zellen. A: unter Kontrollbedingungen, B: nach Zugabe von STa (1,25 U/ml) und C: nach Auswaschen mit STa-freier Badlösung.

Statistische Auswertung

Hier ist jeweils die Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (0 bis 10 min.) nach der Gabe von STa sowie anschließend die Leitfähigkeit in Bezug zur Gesamtzellkapazität dargestellt.

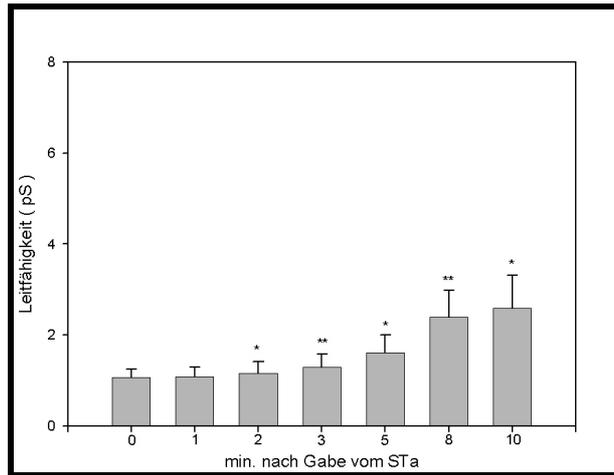


Abbildung 20: Die Veränderung der Leitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von STa (1,25 U/ml).

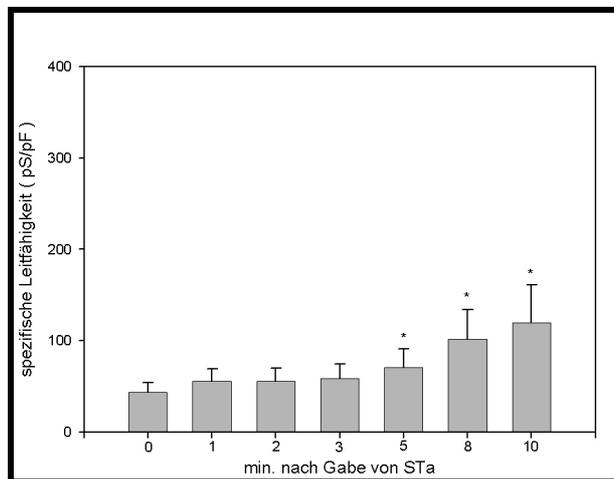


Abbildung 21: Die Veränderung der spezifischen Leitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von STa (1,25 U/ml).

Es kann also eine signifikante und reversible Erhöhung des über die Membran fließenden Stromes durch die extrazelluläre Gabe von STa gemessen werden. Diese gewonnenen Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen in den bisherigen Veröffentlichungen an anderen Zellen [Chao AC et al.(1994),Nr.16] überein.

5.1.3 Versuche zur Konzentration

Nachdem ich also eine Aktivierung des CFTR-Ionenkanals mit Hilfe des Bakterientoxins STa darstellen konnte, galt es die minimale aktivierende Konzentration von STa herauszufinden. Dazu folgte dann eine Versuchsreihe mit abnehmenden Konzentrationen von STa.

Strom-Zeitverlauf

Exemplarisch ausgewählt sieht man hier einen der aussagekräftigsten Versuche. Man sieht den über die Membran fließenden Strom unter Standardbedingungen (1), nach Gabe der STa-haltigen Lösung in niedriger Konzentration (0,0025 U/ml) (2) und nach Gabe der höher konzentrierten STa-haltigen Lösung (0,0125 U/ml) (3).

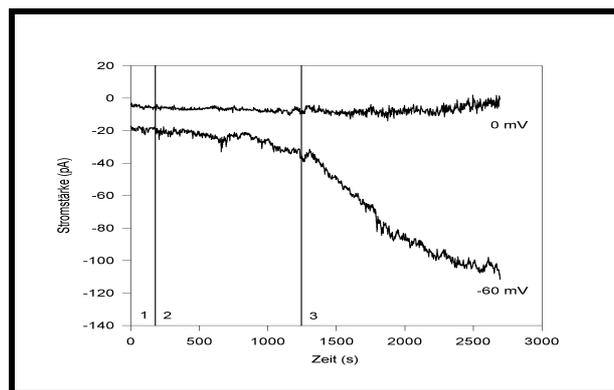


Abbildung 22: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Zugabe von STa (0,0025 U/ml) und 3: nach Zugabe von STa in höherer Konzentration (0,0125 U/ml).

Zum Vergleich dazu noch der Strom-Zeitverlauf eines Experimentes mit der Zugabe von STa in der gleichen Konzentration wie Lösung 2, nämlich von 0,0125 U/ml. Auch hier zeigt sich nach kurzer Kontrolle (1) eine Aktivierung durch Zugabe von STa (0,0125 U/ml) in die Badlösung (2). Das Verhalten des anschließend zugegebenen Glibenclamid (3) wird weiter unten genauer erläutert.

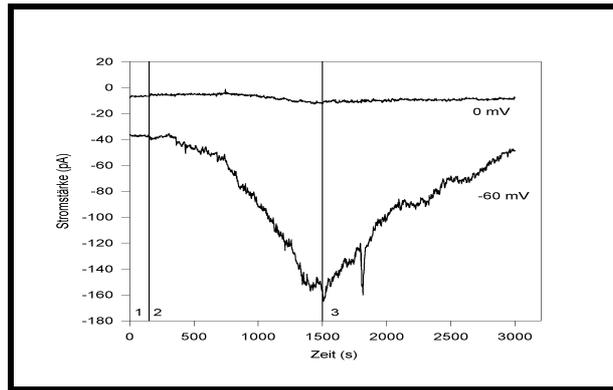


Abbildung 23: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Zugabe von STa (0,0125 U/ml) und 3: nach Zugabe von STa (0,0125 U/ml) und Glibenclamid (0,1 mM).

Strom-Spannungskurve

Die Strom-Spannungskurven zeigen den typischen Verlauf einer reversiblen Erhöhung der Membranleitfähigkeit ausgelöst durch Guanylin in einer Konzentration von 0,0125 U/ml (B). Die Kurve vor der Aktivierung (A) gleicht der nach Hemmung durch Glibenclamid (C).

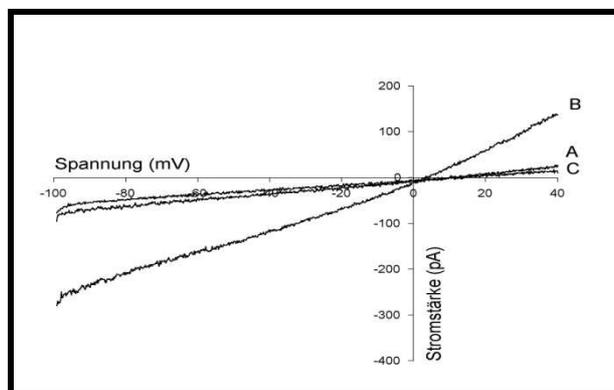


Abbildung 24: Die Strom-Spannungskurve der Capan-1-Zelle. A: unter Kontrollbedingungen, B: nach Aktivierung durch STa (0,0125 U/ml) und C: nach anschließender Inhibierung durch Glibenclamid (0,1 mM) und STa (0,0125 U/ml).

Hier konnte ich also zeigen, dass mit einer Konzentration von 0,0125 U/ml noch eine Aktivierung möglich war, die Applikation von 0,0025 U/ml dagegen keinen Effekt mehr hatte.

5.1.4 Guanylin

Nachdem bestätigt war, dass die Zellen über alle notwendigen Komponenten der CFTR-aktivierenden Signalkaskade verfügen, machte ich einen Stimulationsversuch durch die Applikation von Guanylin. Nachdem eine Reaktion gemessen werden konnte, habe ich dann im Anschluss mit reiner Badlösung gespült, um das Guanylin auszuwaschen und um so zu sehen inwieweit die eingetretene Reaktion reversibel ist.

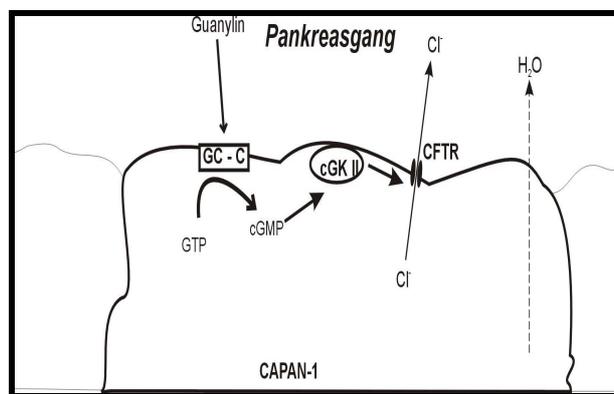


Abbildung 25: In den Capan-1-Zellen führt Guanylin über die membranständige Guanylatzyklase-C (GC-C) zu einer intrazellulären cGMP-Erhöhung und somit indirekt über die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGK-II) zu einer Aktivierung des CFTRs.

Strom-Zeitverlauf

Hier sieht man nach kurzer Kontrolle (1) den reversiblen Anstieg des über die Zellmembran fließenden Stromes nach Zugabe von Guanylin (1 μ M) zu der Badlösung (2). Dieser nimmt nach Auswaschen mit reiner Badlösung wieder ab (3).

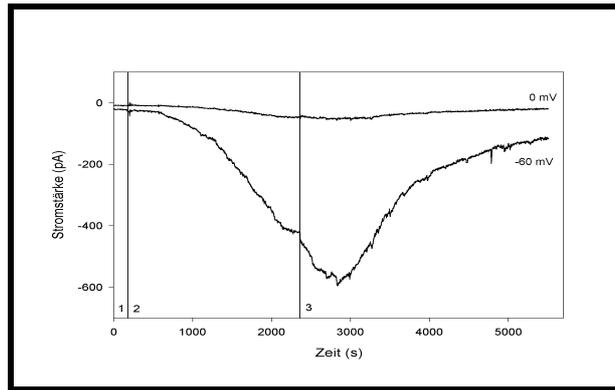


Abbildung 26: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Zugabe von Guanylin ($1 \mu\text{M}$) und 3: nach Auswaschen mit guanylinfreier Badlösung.

Strom-Spannungskurve

Die abgebildeten Strom-Spannungskurven wurden unter Kontrollbedingungen (A), nach Zugabe von Guanylin (B) und dem Auswaschen der Substanz (C) aufgezeichnet.

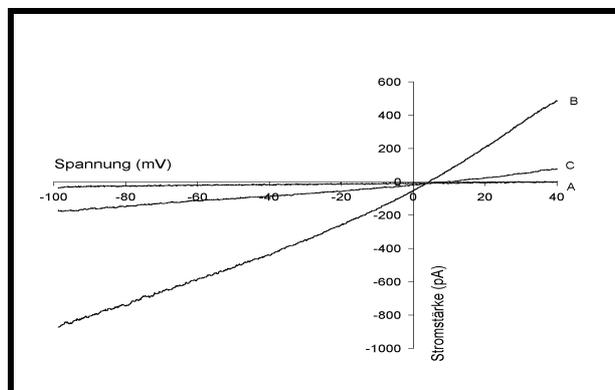


Abbildung 27: Die Strom-Spannungskurven der Capan-1-Zellen. A: unter Kontrollbedingungen, B: nach Zugabe von Guanylin ($1 \mu\text{M}$) und C: nach Auswaschen mit guanylinfreier Badlösung.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung zeigt eine deutliche und kontinuierliche Zunahme der Membranleitfähigkeit nach Gabe von Guanylin ($1 \mu\text{M}$).

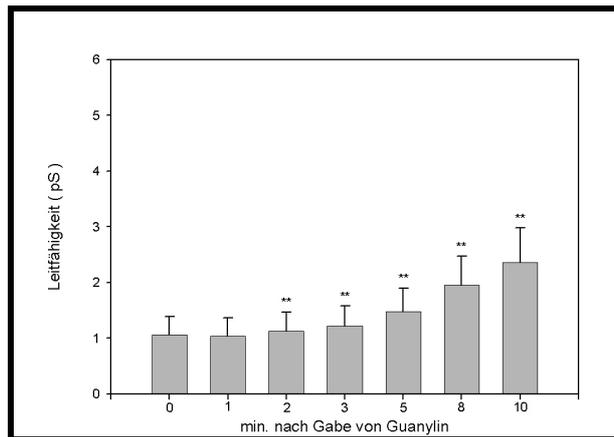


Abbildung 28: Die Veränderung der Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M).

Dies bestätigt sich auch wenn man diese in Relation zur Gesamtzellkapazität setzt.

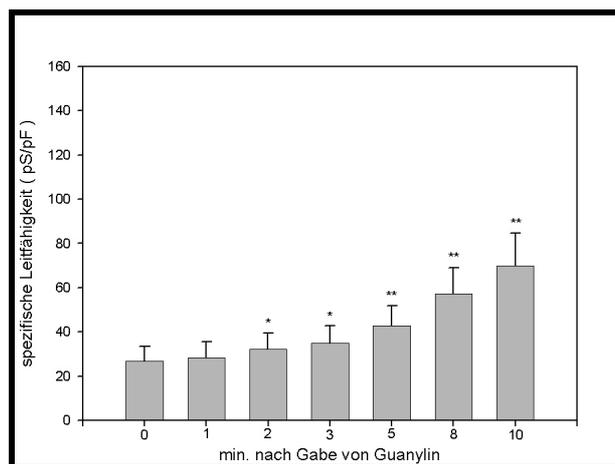


Abbildung 29: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M).

5.1.5 Glibenclamid

Im nächsten Versuchsschritt wurde nun bei aktivierten Zellen mit Hilfe des CFTR-Inhibitors Glibenclamid [Sheppard DN und Robinson KA (1997), Nr.78] der bereits aktivierte CFTR-Ionenkanal blockiert. Durch das anschließende Auswaschen des Glibenclamids sollte die Reversibilität der Blockierung gezeigt werden.

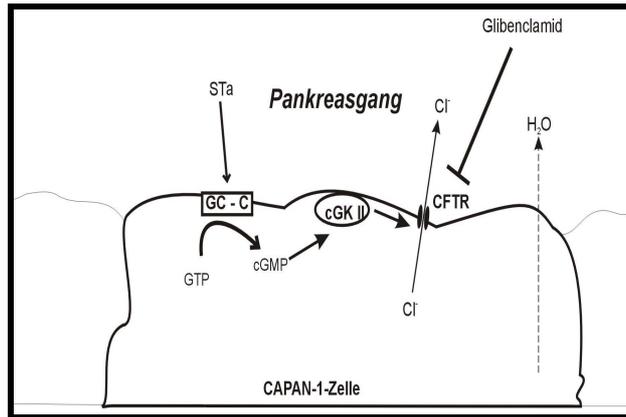


Abbildung 30: Die Gabe von Glibenclamid führt, wie hier im Beispiel der Capan-1-Zellen, direkt zu einer Inhibierung des CFTR.

Strom-Zeitverlauf

Der Strom-Zeitverlauf zeigt gut, wie der über die Zellmembran fließende Strom nach kurzer Kontrollperiode (1) durch Aktivierung mit STa (1,25 U/ml) zunimmt (2,4 und 6) und nach Gabe von Glibenclamid (0,1 mM) (3 und 5) wieder abnimmt. Das untenstehende Experiment verdeutlicht dabei die Reversibilität der Effekte. Die Abnahme des Membranstromes durch die Applikation von Glibenclamid war dabei von der aktivierenden Substanz (STa, Guanylin, db-cGMP oder IBMX/Forskolin) unabhängig.

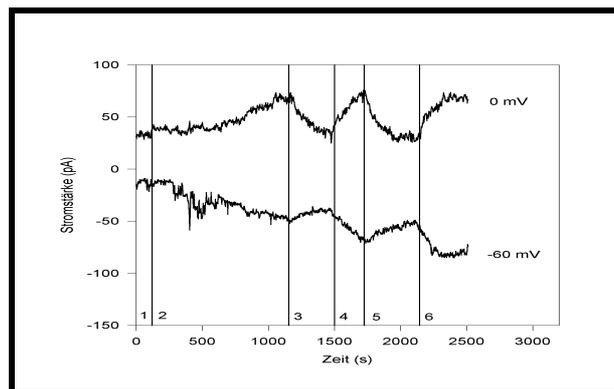


Abbildung 31: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: Unter Kontrollbedingungen, 2/4/6: nach Gabe von STa (1,25 U/ml) und 3/5: nach Gabe von STa (1,25 U/ml) und Glibenclamid (0,1 mM).

Strom-Spannungskurve

Die Kurve nach Blockierung mit Glibenclamid (C) gleicht der mit reiner Badlösung vor Aktivierung mit Guanylin (A) und zeigt damit eine Blockade der Guanylin-aktivierten CFTR-Ionenkanäle. Die Kurve (B) zeigt den Strom-Spannungsverlauf nach Aktivierung mit STa.

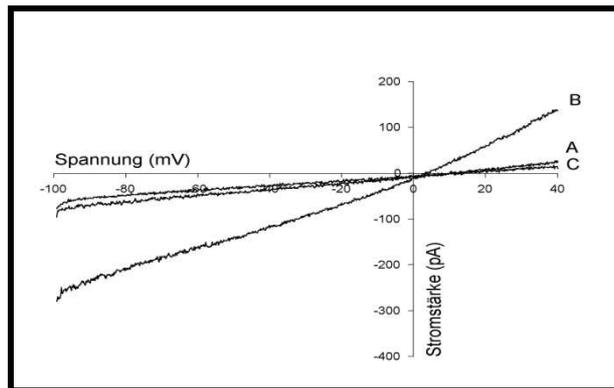


Abbildung 32: Die Strom-Spannungskurve der Capan-1-Zelle. A: unter Kontrollbedingungen, B: nach Aktivierung durch STa (1,25 U/ml) und C: nach Gabe von STa (1,25 U/ml) und Glibenclamid (0,1 mM).

Statistische Auswertung

Dies zeigt auch deutlich die statistische Auswertung aller Experimente dieser Versuchsreihe. Die spezifische Leitfähigkeit steigt nach Aktivierung mit Guanylin (B) signifikant gegenüber den Kontrollbedingungen (A) und nimmt nach Inhibierung des CFTRs durch Glibenclamid ebenso deutlich wieder ab (C).

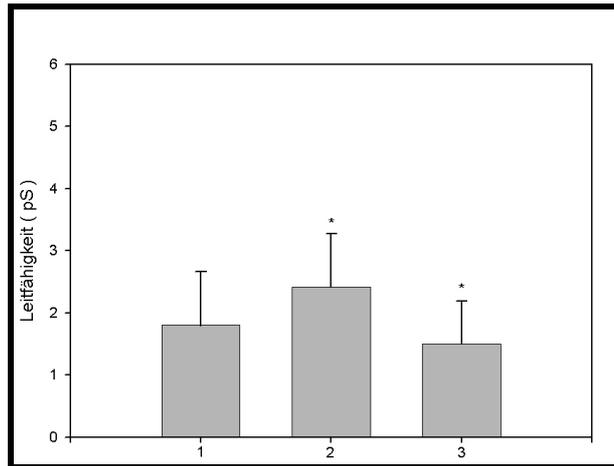


Abbildung 33: Die maximale Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M) und 3: nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M) und Glibenclamid (0,1 mM).

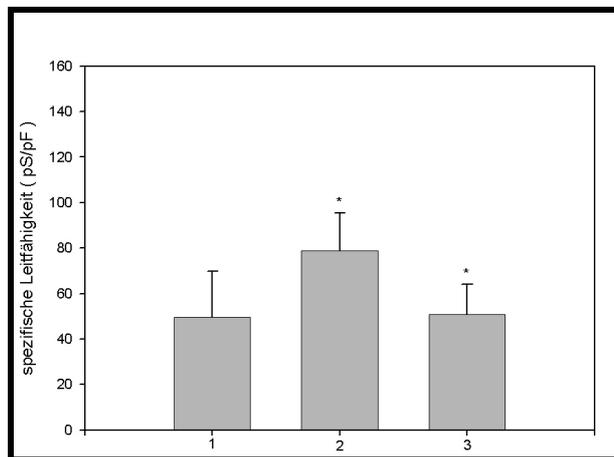


Abbildung 34: Die maximale spezifischen Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M) und 3: nach Gabe von Guanylin (0,1 μ M) und Glibenclamid (0,1 mM).

5.1.6 Dibutyryl-cGMP

Nachdem wir wussten, dass sowohl das Bakterientoxin STa als auch Guanylin eine Erhöhung des über die Zellmembran fließenden Stromes bewirken, sollte dargestellt werden, dass dies durch eine cGMP-abhängige Aktivierung des CFTR-Ionenkanals bewirkt wird und nicht über die alternative cAMP-abhängige Aktivierung. Um dies zu zeigen, gab ich der Badlösung Dibutyryl-cGMP (db-cGMP) bei, ein membrangängiges Analogon des zelleigenen cGMPs. Zuvor hatte sich bei Versuchen mit cGMP-reicher Pipettenlösung die notwendige Abdichtung zwischen Pipette und Zellmembran, das sogenannte „Megaseal“ als

zu instabil erwiesen und ich musste daher den Weg über die extrazelluläre Beigabe eines membrangängigen cGMP wählen.

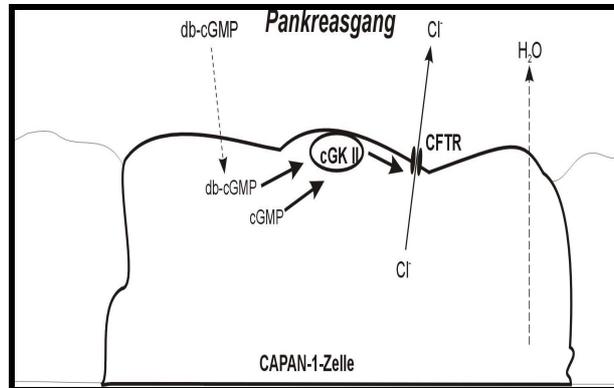


Abbildung 35: In den Capan-1-Zellen führt db-cGMP über die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGK-II) zu einer Aktivierung des CFTRs.

Strom-Zeitverlauf

Nachdem sich stabile Versuchsbedingungen eingestellt hatten (1), gab ich db-cGMP (1 mM) der Badlösung bei (2). Wie in der untenstehenden Abbildung exemplarisch gezeigt, kommt es zu einer Zunahme des über die Membran fließenden Stromes. Diese erhöhte Membranleitfähigkeit ist, wie sich nach Auswaschen der Substanz mittels Badlösung zeigt, reversibel (3).

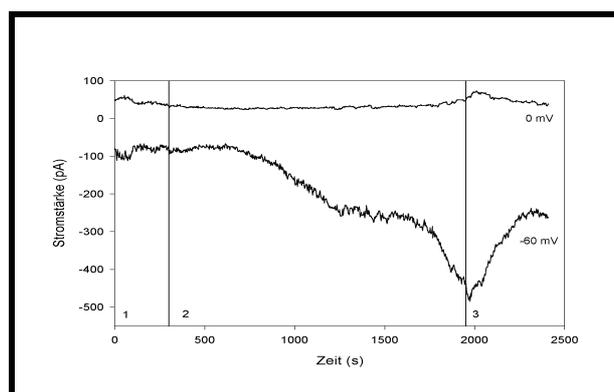


Abbildung 36: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von db-cGMP (1 mM) und C: nach Auswaschen mit db-cGMP-freier Badlösung.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung verdeutlicht noch einmal den signifikanten Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Gabe von db-cGMP.

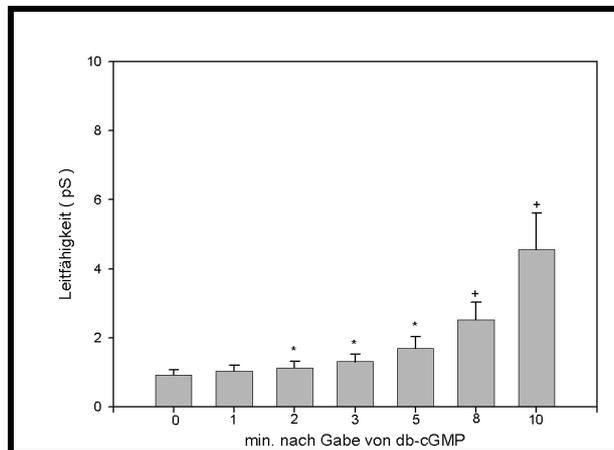


Abbildung 37: Die Veränderung der Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von db-cGMP (1 mM).

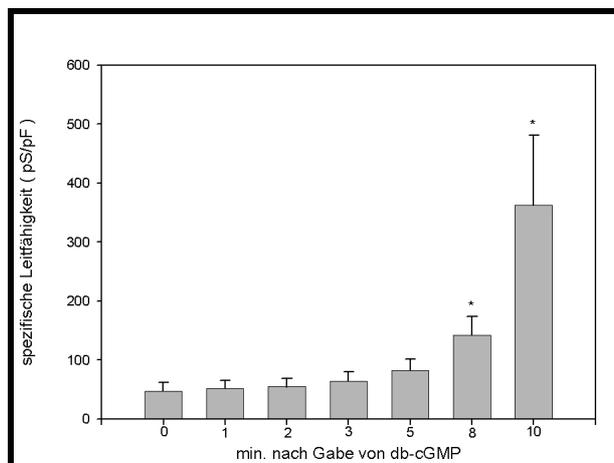


Abbildung 38: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der Capan-1-Zellen nach Gabe von db-cGMP (1 mM).

5.1.7 CF-PAK-Zellen

Mit den CF-PAK Zellen erfolgte anschließend eine Kontroll-Versuchsreihe. Wie bereits erwähnt, besitzen diese Zellen keinen funktionsfähigen CFTR-Ionenkanal. Erwartungsgemäß kommt es daher in keinem der stabil und über ausreichend lange Zeit laufenden Experimente zu einem signifikanten Anstieg

des über die Membran fließenden Stromes. Weder nach Applikation von STa (1,25 U/ml), Forskolin (10 μ M) oder Guanylin (1 mM) kam es zu einem Anstieg des über die Zellmembran fließenden Stromes. Damit ist die Annahme untermauert, dass der CFTR-Ionenkanal das entscheidende Zielorgan der durch Guanylin ausgelösten Membranleitfähigkeitserhöhung ist.

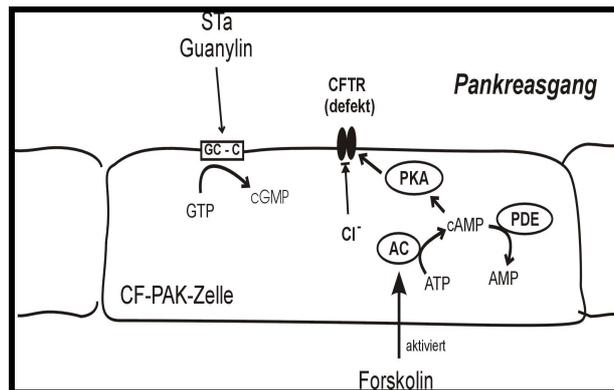


Abbildung 39: In den CF-PAK-Zellen ist der CFTR aufgrund einer Mutation funktionsuntüchtig.

5.1.8 Ionenaustausch

Strom-Zeitverlauf

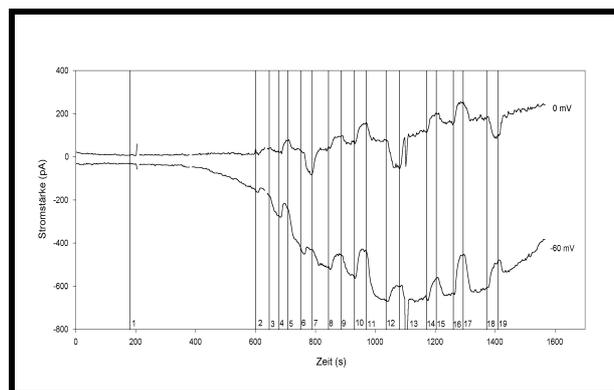


Abbildung 40: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der Capan-1-Zelle. 1:Gabe von STa (1,25 U/ml), 2/8/14: Austausch der NaCl-Badlösung durch eine natriumbromidhaltige Badlösung, 4/10/16: Austausch der NaCl-Badlösung durch eine natriumiodidhaltige Badlösung, 6/12/18: Austausch der NaCl-Badlösung durch eine natriummethansulfonathaltige Badlösung und 3/5/7/9/11/13/15/17/19: Hier wurde wieder mit der normalen NaCl-Badlösung gespült

Zur weiteren Charakterisierung des aktivierten Ionenkanals tauschte ich die natriumchloridhaltige Badlösung gegen Lösungen mit Natriumiodid,

Natriumbromid und Natriummethansulfonat aus. Hier zeigte sich eine für den CFTR typische Ionenselektivität.

Natriummethansulfonat

Nach Austausch der Badlösung gegen eine chloridfreie und methansulfonathaltige Lösung konnte man sehen, dass der Austausch zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials führt. Lag dieses für Chloridionen noch nahe dem Nullpunkt, so verschob es sich bei Methansulfonat in den deutlich positiven Bereich.

Strom-Spannungskurve

Die Strom-Spannungskurven mit Guanylin aktivierter Capan-1-Zellen zeigen die für den CFTR erwartete Selektivität für Chloridionen.

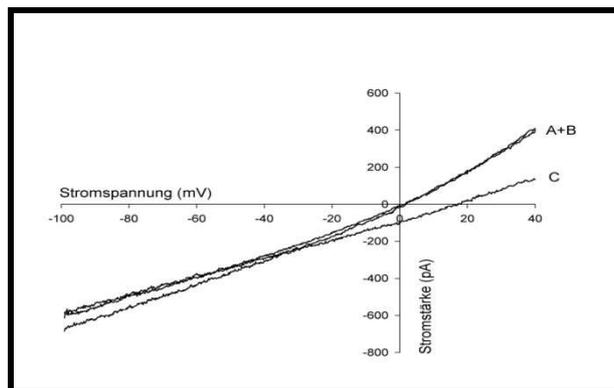


Abbildung 41: Die Strom-Spannungskurve der durch STa (1,25 U/ml) aktivierten Capan-1-Zellen. A: mit NaCl-Badlösung, C: nach Austausch durch Na-Methansulfonat als Badlösung und B: nach erneutem Austausch mit NaCl als Badlösung.

5.1.9 KT-5720

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen vor den Versuchen mit KT-5720, einem spezifischen Inhibitor der Proteinkinase A, vorbehandelt. Auf diese Weise wurde eine cAMP-abhängige CFTR-Aktivierung ausgeschlossen. Trotzdem ließen sich die Zellen problemlos mit Guanylin und den guanylin-ähnlichen Substanzen in der bereits beschriebenen Weise aktivieren.

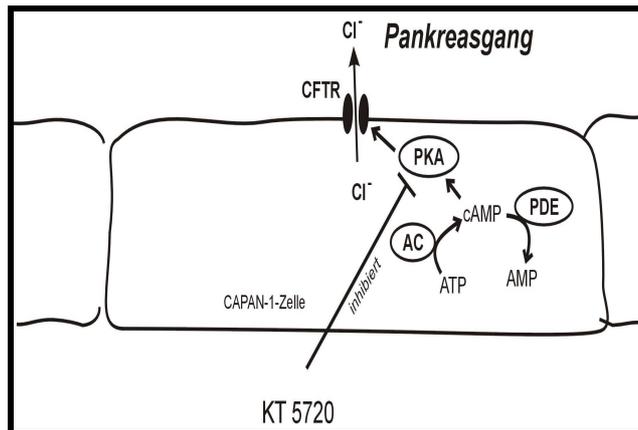


Abbildung 42: In den Capan-1-Zellen inhibiert KT-5720 die Proteinkinase A (PKA) und verhindert somit eine Aktivierung des CFTRs via cAMP.

5.1.10 Messung der zellulären cGMP- und cAMP-Produktion

Hier wurden die Capan-1-Zellen (100.000 Zellen/well) mit STa (1 U/ml und 10 U/ml), Guanylin (10 μ M/ml) und Forskolin (10 μ M/ml) inkubiert und im Anschluss die cAMP beziehungsweise die cGMP-Konzentration bestimmt.

cAMP-Produktion

Abbildung 43 zeigt den jeweiligen Anstieg von intrazellulärem cAMP 10 Minuten nach Inkubation mit Guanylin (1 μ M), STa (1 U/ml) oder Forskolin (1 μ M und 10 μ M). Bei der Inkubation mit Guanylin und dem Bakterientoxin STa zeigt sich kein signifikanter cAMP-Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen kommt es in der Inkubation mit Forskolin zu einem deutlichem cAMP-Anstieg. Dieser Versuch verdeutlicht dass die Zellen zwar über eine funktionsfähige Adenylatzyklase verfügen, diese aber nicht durch Guanylin oder STa aktiviert wird.

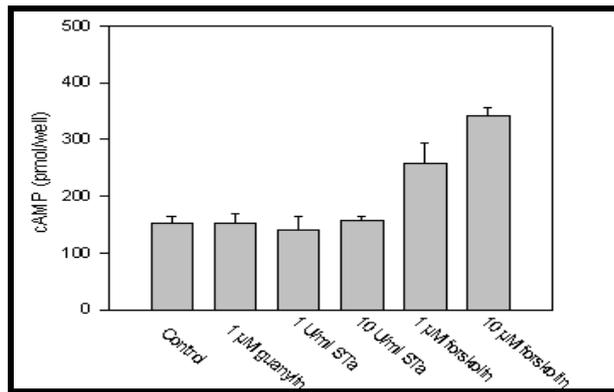


Abbildung 43: Nach 10-minütiger Inkubation der Capan-1-Zellen mit den an der x-Achse aufgeführten Substanzen zeigt sich jeweils ein unterschiedlicher intrazellulärer cAMP-Gehalt der Zellen.

cGMP-Produktion

Hier stellt die Abbildung 44 den entsprechenden intrazellulären Anstieg von cGMP nach Inkubation mit Guanylin (1 µM) und STa (1 U/ml und 10 U/ml) dar. Nach der Inkubation zeigt sich dabei ein deutlicher Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrollreihe.

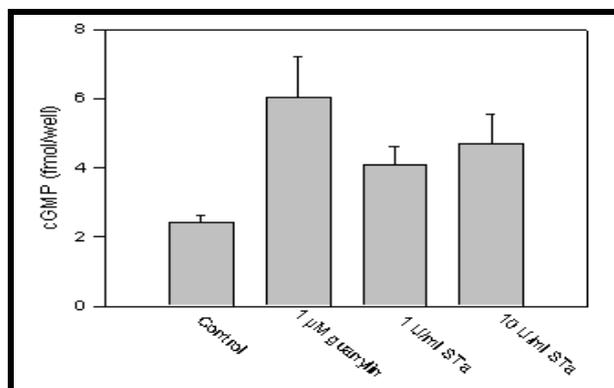


Abbildung 44: Nach 10-minütiger Inkubation der Capan-1-Zellen mit den an der x-Achse aufgeführten Substanzen zeigt sich jeweils ein unterschiedlicher intrazellulärer cGMP-Gehalt der Zellen.

Hier wird deutlich, dass es durch Guanylin und STa zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration kommt, eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung, wie zum Beispiel durch Forskolin, bewirken diese Substanzen aber nicht.

5.2 Ergebnisse Lunge

Die folgenden Versuchsreihen wurden an H441-Zellen gemacht, einer Zellreihe die funktionell den Clarazellen entspricht. Die Experimente wurden jeweils mittels Whole-Cell Ableitung an Einzelzellen oder kleinen Zellclustern gemacht. Ein Zellcluster ist hier ein Zellhaufen von 3 bis 5 Zellen. Mit Hilfe der Whole-Cell Ableitung wird der über der Zellmembran fließende Strom gemessen und die Veränderungen nach Applikation bestimmter Substanzen registriert. Zusätzlich wird mit Hilfe sogenannter Spannungsrampen eine Strom-Spannungskurve erzeugt, die den bei unterschiedlich angelegter Spannung fließenden Strom abbildet. Da die Arbeits- und Gedankenschritte analog der vorbeschriebenen in den Pankreasgangzellen sind, wird auf eine erneute ausführliche Beschreibung hier bewusst verzichtet.

5.2.1 IBMX und Forskolin

Zunächst gab ich den H441-Zellen in ersten Versuchen probeweise das IBMX/Forskolin-Gemisch bei, was einen ähnlichen Anstieg der Membranleitfähigkeit bewirkt. Wie bei den Capan-1 Zellen, so dass ich mit den H441-Zellen die folgenden weiteren Versuche machte. Aufgrund eines rechnerbedingten Datenverlustes fehlen leider die Strom-Spannungskurven. Die Ergebnisse entsprachen denen aus den Experimenten mit Pankreasgangzellen.

5.2.2 STa

Den Zellen der H441-Zellkultur wurde nach kurzer Beobachtung unter Kontrollbedingungen STa beigegeben.

Strom-Zeitverlauf

Wie die folgende Abbildung zeigt, wurde nach kurzer Beobachtung unter Kontrollbedingungen (1), das Bakterientoxin STa (1,25 U/ml) zur Badlösung hinzugefügt (2). Man sieht anschließend deutlich die Zunahme des über die gesamte Zellmembran fließenden Stromes.

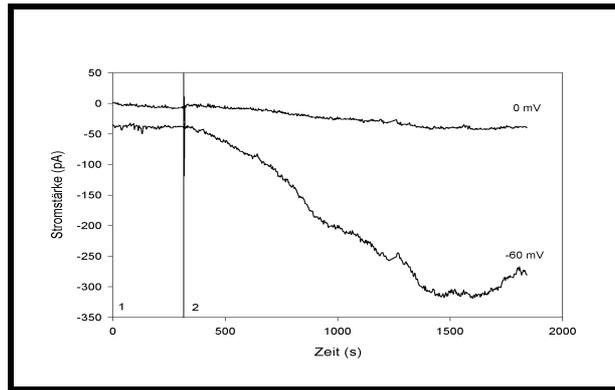


Abbildung 45: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der H441-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen und 2: nach Gabe von STa (1,25 U/ml).

Statistische Auswertung

Diese Abbildungen zeigen die statistische Auswertung aller Versuche dieser Reihe. Es zeigt sich signifikant, dass es nach Gabe von STa zu einem Anstieg der Leitfähigkeit kommt.

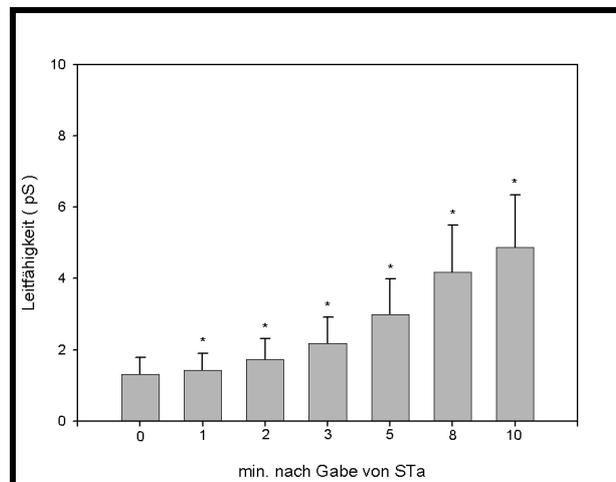


Abbildung 46: Die Veränderung der Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von STa (1,25 U/ml).

Aufgerechnet auf die jeweilige Zellkapazität, zeigt sich der Anstieg der spezifischen Leitfähigkeit.

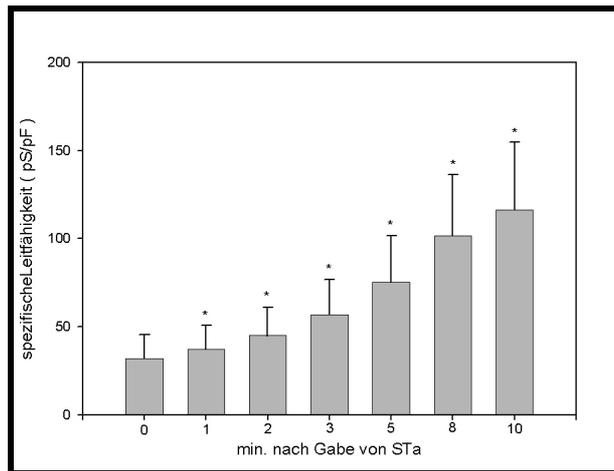


Abbildung 47: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von STa (1,25 U/ml).

5.2.3 Guanylin

Der nächste Versuchsschritt sollte dann zeigen, ob sich die durch STa ausgelöste Zunahme der Gesamtzelleitfähigkeit auch durch Guanylin auslösen lässt. Dazu fügte ich der Badlösung in dieser Versuchsreihe nach kurzer Beobachtung unter Kontrollbedingungen Guanylin bei. Wenn sich eine Reaktion einstellte, versuchte ich anschließend mittels Auswaschen des Toxins durch Kontrolllösung die Reversibilität zu zeigen.

Strom-Zeitverlauf

Exemplarisch zeigt folgende Abbildung den über die Zellmembran fließenden Strom nach Gabe des Hormons Guanylin (1 μ M) (2). Da der über die Zellmembran fließende Strom nach Spülen mit Badlösung (3) in allen Versuchen wieder das Ausgangsniveau erreicht, ist die Reaktion reversibel. Zu Beginn erfolgten wie gewohnt eine kurze Zeit lang Messungen unter Kontrollbedingungen (1).

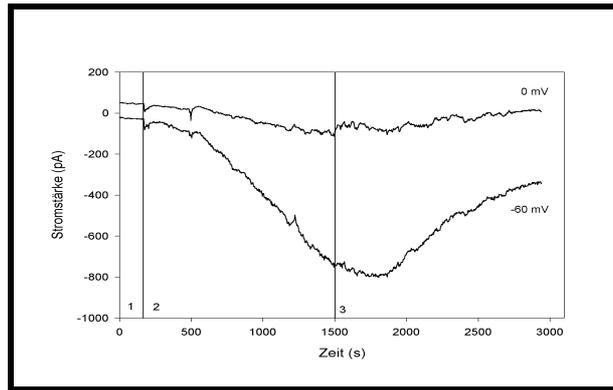


Abbildung 48: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der H441-Zelle. 1: Unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin ($1 \mu\text{M}$) und 3: nach Auswaschen mit guanylinfreier Badlösung.

Statistische Auswertung

Auch die statistische Auswertung der Experimente dieser Reihe zeigt einen signifikanten Anstieg der Leitfähigkeit nach Gabe von Guanylin.

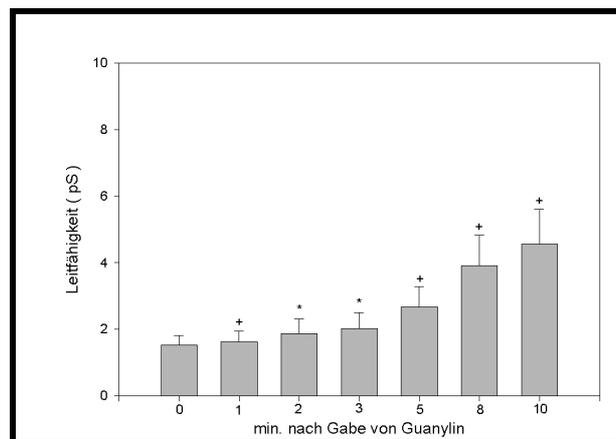


Abbildung 49: Die Veränderung der Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von Guanylin (1 mM).

Die Leitfähigkeitsänderung steigt auch in Bezug auf die Gesamtzellkapazität.

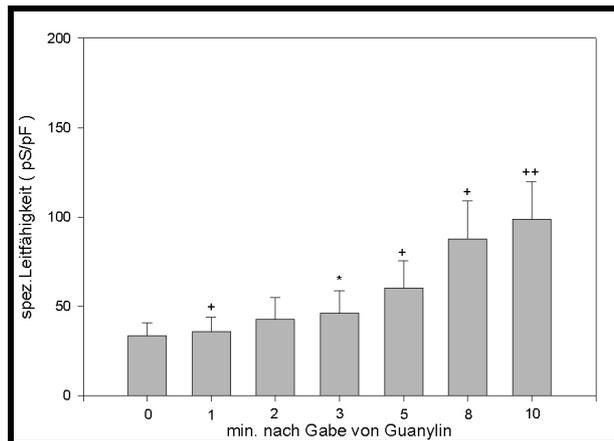


Abbildung 50: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von Guanylin (1 mM).

5.2.4 Dibutyryl-cGMP

Nachdem ich zeigen konnte, dass sowohl das Bakterientoxin STa als auch Guanylin eine Erhöhung des über die Zellmembran fließenden Stromes bewirken, wollte ich weiterhin darstellen, dass dies durch eine cGMP-abhängige Aktivierung des CFTR-Ionenkanals bewirkt wird und nicht der bereits bekannte Signalweg über cAMP benutzt wird.

Dazu gab ich der Badlösung db-cGMP, ein membrangängiges Analogon des zelleigenen cGMPs, bei. Wie bereits zuvor bei den Pankreasgangzellen hatten sich auch hier Versuche mit einer cGMP-reichen Pipettenlösung als zu instabil erwiesen und ich musste daher den Weg über die extrazelluläre Beigabe eines membrangängigen cGMP wählen.

Strom-Zeitverlauf

Anhand des hier abgebildeten Strom-Zeitverlaufs kann man gut sehen, wie der über der Zellmembran gemessene Strom nach kurzer Kontrolle (1) durch Gabe von db-cGMP (1 mM) zunimmt (2). Nach Ausspülen des db-cGMPs nimmt er dann anschließend wieder ab (3).

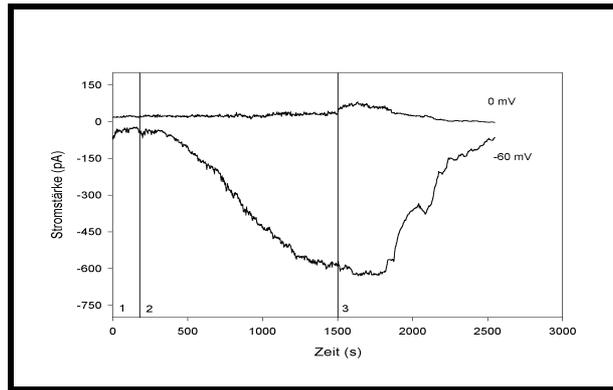


Abbildung 51: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der H441-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von db-cGMP (1 mM) und 3: nach Auswaschen mit db-cGMP-freier Badlösung.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente verdeutlicht den signifikanten Anstieg der Leitfähigkeit nach Gabe von db-cGMP.

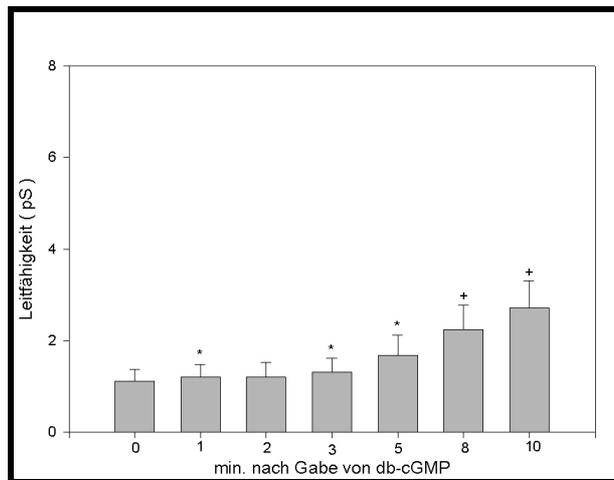


Abbildung 52: Die Veränderung der Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von db-cGMP (1 mM).

Auch die spezifische Leitfähigkeit ändert sich signifikant nach Gabe von db-cGMP (1 mM).

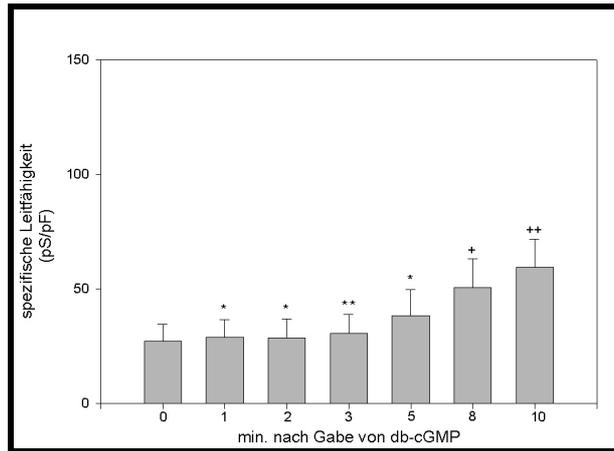


Abbildung 53: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der H441-Zellen nach Gabe von db-cGMP (1 mM).

5.2.5 Glibenclamid

Hier sehen wir, wie sich die Gabe des CFTR-Inhibitors [David N. Sheppard et al.] Glibenclamid auf die Lungenzellen auswirkt. Dazu wurden die Zellen mit Guanylin (1 μM) zunächst aktiviert und anschließend durch Zugabe des Gemisches von Guanylin (1 μM) und Glibenclamid (0,1 mM) inhibiert.

Strom-Zeitverlauf

Der Strom-Zeitverlauf zeigt deutlich eine Zunahme des über die Membran fließenden Stromes nach Gabe von Guanylin (2) und einen erneuten Rückgang nach zusätzlicher Zugabe von Glibenclamid (3). Unter (1) wieder das Verhalten unter Kontrolllösung.

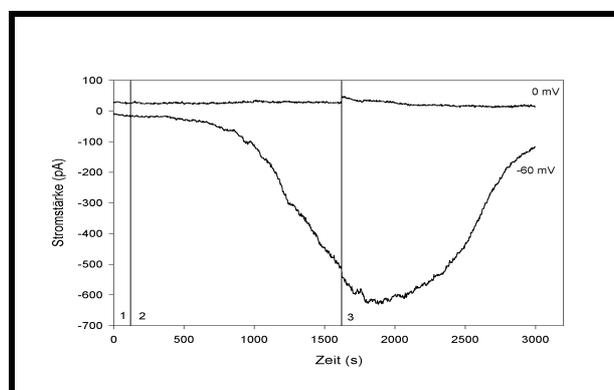


Abbildung 54: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der H441-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und 3: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und Glibenclamid (0,1 mM).

Statistische Auswertung

Auch diese Reihe von Experimenten wurde abschließend statistisch ausgewertet. Hier sehen wir nach der Kontrollmessung (1) zuerst die Zunahme der gemessenen Leitfähigkeit nach Gabe von Guanylin (2), gefolgt von der erneuten Abnahme nach Zugabe von Glibenclamid und Guanylin (3).

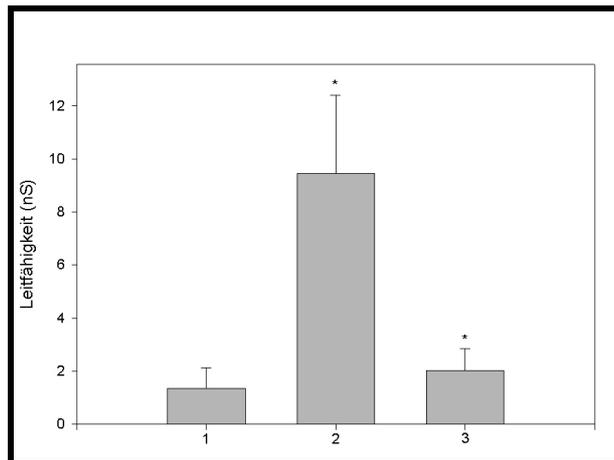


Abbildung 55: Die maximale Membranleitfähigkeit der H441-Zellen 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und 3: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und Glibenclamid 0,1 mM).

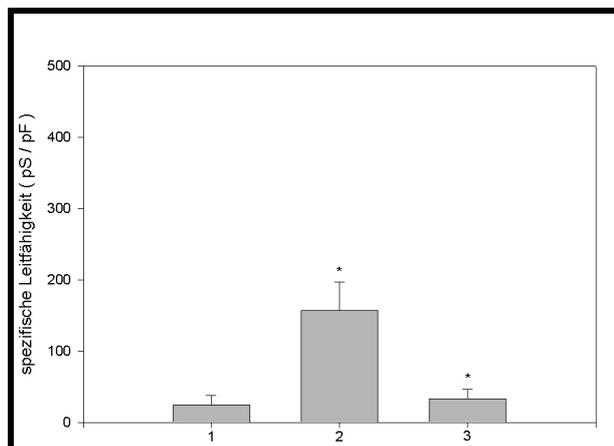


Abbildung 56: Die maximale spezifische Membranleitfähigkeit der H441-Zellen 1: unter Kontrollbedingungen, 2: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und 3: nach Gabe von Guanylin (1 μM) und Glibenclamid (0,1 mM).

5.2.6 KT-5720

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen vor den Versuchen mit KT-5720, einem spezifischen Inhibitor der Proteinkinase A, behandelt. Auf diese Weise

wurde eine cAMP-abhängige Aktivierung des CFTR über die PKA ausgeschlossen.

Strom-Zeitverlauf

Die Zellen wurden mit KT-5720 (1 μM) vorinkubiert. Hier sehen wir die bekannte Zunahme des über die Zelle fließenden Stromes nach der Gabe von Guanylin (1 μM) (2) trotz einer Inhibition der PKA.

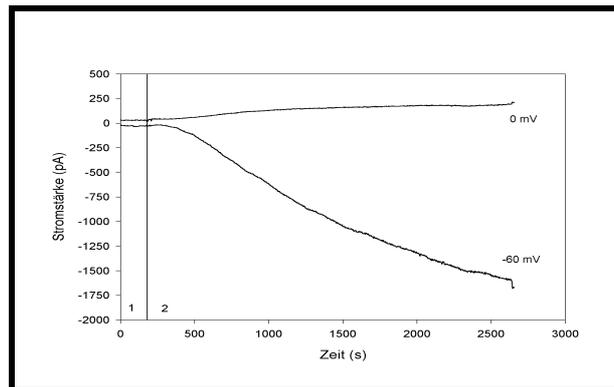


Abbildung 57: Der gemessene Stromfluss über der Zellmembran der mit KT-5720 (1 μM) vorinkubierten H441-Zelle. 1: unter Kontrollbedingungen und 2: nach Gabe von Guanylin (1 μM).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung zeigt dass es auch bei der Vorinkubation mit KT-5720 (1 μM) zu einem Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Gabe von Guanylin (1 μM) kommt.

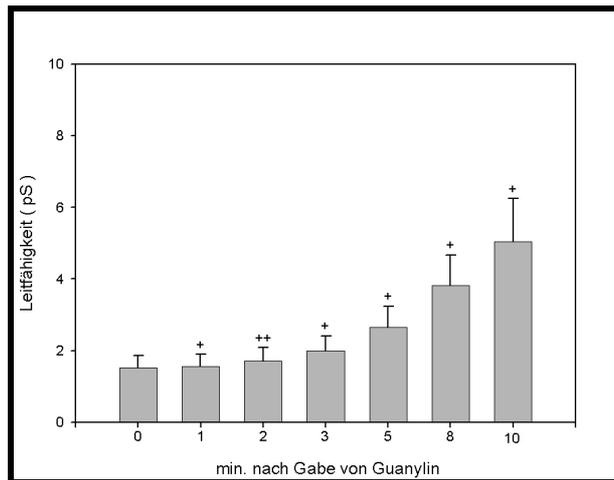


Abbildung 58: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der mit KT-5720 (1 μ M) vorinkubierten H441-Zellen nach Gabe von Guanylin (1 μ M).

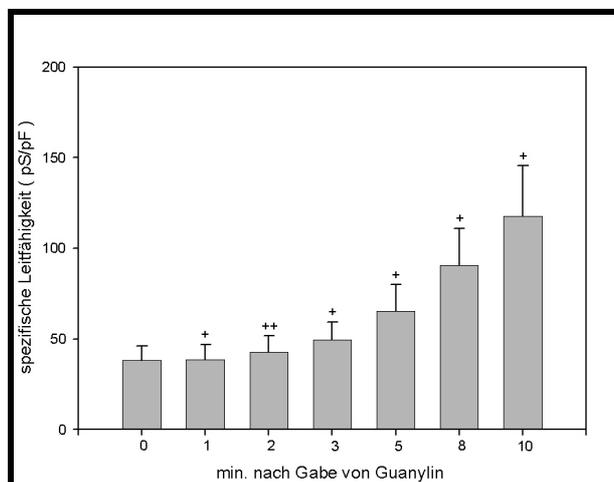


Abbildung 59: Die Veränderung der spezifischen Membranleitfähigkeit der mit KT-5720 (1 μ M) vorinkubierten H441-Zellen nach Gabe von Guanylin (1 μ M).

5.2.7 Methansulfonat

Bei diesen Versuchen konnte man analog zu den Ergebnissen bei den Pankreasgangzellen sehen, dass der Austausch von Chloridionen in den Lösungen mit Methansulfonationen zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials führt. Lag dieses bei den oben stehenden Versuchen noch nahe dem Nullpunkt, so verschob es sich nach dem Austausch der Ionen durchschnittlich auf $35,3 \pm 3,4$ mV. Damit zeigte sich hier eine gewisse Selektivität für Chloridionen.

6.Diskussion

6.1 Chlorid- und Bikarbonatsekretion im Pankreas

6.1.1 Bestandteile der Regulation

Dass der CFTR maßgeblich an der Sekretion der exokrinen Pankreaszellen beteiligt ist, ist hinreichend bekannt und zeigt sich deutlich bei Patienten, die an zystischer Fibrose erkrankt sind [Gaskin KJ et al.(1982),Nr.28 und Case RM und Argent BE (1993),Nr.11]. Auf der Suche nach regulierenden Hormonen gelang der Arbeitsgruppe um Prof. Cetin (Marburg) erstmals der Nachweis von Guanylin im Pankreassekret. Dabei ließ sich eine Konzentration ähnlich derer im Intestinum nachweisen. Der Nachweis von Uroguanylin gelang dagegen nur in vernachlässigbar geringer Konzentration, was nicht weiter verwundert, da Uroguanylin sein pH-Optimum im sauren Bereich hat und somit im alkalischen Pankreassekret kaum wirksam wäre. [Hamra FK et al.(1997),Nr.33]. Neben Guanylin ließen sich auch die anderen Bestandteile der aus dem Darm bekannten, durch Guanylin ausgelösten, cGMP-vermittelten Aktivierung des CFTR nachweisen. Dies gelang sowohl in einzelnen Pankreasgewebeschnitten als auch in den Zelllinien Capan-1 und CF-PAK. Im einzelnen ließen sich nachweisen: GC-C, cGK-II, CFTR und AE2. Eine funktionstüchtige Carboanhydrase II liess sich in Pankreasgangzellen schon verschiedentlich nachweisen und ihr Vorkommen gilt daher als gesichert [Case RM und Argent BE (1993),Nr.11]. Obwohl es bislang unklar ist, über welche Isoform des Anionenaustauschers der Anionentausch stattfindet, macht die hohe Menge des im Pankreas gefundenen AE2 es sehr wahrscheinlich, dass der Austausch von Chlorid und Bikarbonat über den AE2 vollzogen wird, welcher funktionell an den CFTR-Ionenkanal gekoppelt ist [Case RM und Argent BE (1993),Nr.11; Ishiguro H et al.(1996),Nr.36]. In weiteren Untersuchungen wurde mit den Granula der zentroazinären Zellen die vorwiegende Quelle der Guanylinsekretion ausgemacht. Aber auch weiter distal bis zu den proximalen

Pankreasgangzellen finden sich sekretorische Granula mit Guanylin. Dass diese Granula auch in das Pankreaslumen entleert werden, wurde durch den positiven Nachweis von Guanylin im Pankreassaft gesichert. Die membranständige Guanylatzyklase C konnte an der luminalen Membran der zentroazinären Zellen und der proximalen Pankreasgangzellen (das sind: Schaltstücke, intra- und interlobuläre Ausführungsgänge) nachgewiesen werden. Die bisherigen Untersuchungen bestätigten damit eine vorwiegend para- und autokrine Aktivität des Guanylins. Das Guanylinsystem könnte also im Pankreas dazu genutzt werden die Sekretionsleistung des Pankreasgangsystems individuell an die Sekretionsleistung der jeweils distal davon gelegenen Azini anzupassen. In der apikalen Membran von proximalen Pankreasgangzellen konnte neben der GC-C dann auch der CFTR-Ionenkanal und die ihn aktivierende cGK-II [Lohmann SM et al.(1997),Nr.53; Vaandrager AB et al.(1998),Nr.91] nachgewiesen werden. Ebenfalls an der luminalen Membran zeigte sich der AE2. Der AE2 ist dabei in seiner Funktion von der Nachbarschaft zu einem funktionsfähigen CFTR abhängig. [Lee MG et al.(1999),Nr.45/46]. Durch den Anionentauscher AE2 gelangt Chlorid im Austausch gegen Bikarbonat in die Zellen. Das Bikarbonat wird intrazellulär über die CA-II aus Wasser und Kohlendioxid synthetisiert und ins Lumen sezerniert.

6.1.2 Funktionelle Verifizierung der Signalkaskade

Der Nachweis der funktionellen Interaktion gelang mittels Patch-Clamp-Technik an Capan-1-Zellen. Zunächst zeigte sich, dass die Pankreasgangzellen durch eine Mischung aus Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, und IBMX, einem Inhibitor der Phosphodiesterase, aktiviert werden. Diese Aktivierung geschieht über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP und führt zu einer Zunahme der Ganzzelleitfähigkeit [Becq F et al.(1993),Nr.3/4]. Gleiche Ergebnisse gelangen auch mit STa und Guanylin. In den weiteren Versuchen konnte mit 0,0125 U/ml die geringste Guanylinkonzentration ermittelt werden, die noch zu einer deutlich messbaren Erhöhung der

Gesamtzelleitfähigkeit führt. Zum Nachweis der Aktivierung über cGMP gab ich der Badlösung das membrangängige cGMP-Analogon dibutyryl-cGMP bei, welche eine dem Guanylin vergleichbare Gesamtzelleitfähigkeitserhöhung bewirkt. Die hier jeweils gemessenen Ströme zeigen eine leichte Auswärtsrektifizierung und die Strom-Spannungskurven verlaufen nahe dem Nullpunkt durch die x-Achse, das heißt ohne anliegende Spannung fließt auch fast kein Strom. Um eine Chloridselektivität nachzuweisen, wurde das Chlorid der Badlösung gegen Methansulfonat ausgetauscht, was dann erwartungsgemäß zu einer Verschiebung der Stromspannungskurve und zu einer Abnahme der Gesamtzelleitfähigkeit führte. Durch Versuche mit Glibenclamid ließ sich die Abhängigkeit der Zunahme der Leitfähigkeit vom CFTR untermauern. Spült man mit dem CFTR-Blocker Glibenclamid [Sheppard DN und Welsh MJ (1992),Nr.78], lässt sich der aktivierte Membranstrom wiederholt reversibel inhibieren. Ebenso kommt es bei den CF-PAK-Zellen, denen ein funktionsfähiger CFTR-Ionenkanal fehlt, weder zu einer cGMP-vermittelten (via STa / Guanylin / db - cGMP) noch zu einer cAMP-vermittelten (via IBMX/Forskolin) Erhöhung der Gesamtzelleitfähigkeit. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Guanylin und das Bakterientoxin STa in Capan-1 Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration führen, ohne dass sich die intrazelluläre cAMP-Konzentration ändert. Umgekehrt führte dagegen eine Inkubation mit Forskolin zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration ohne dass sich die cGMP Menge ändert.

Zusammenfassend belegen die Experimente Folgendes: Das in den Azinuszellen und proximalen Pankreasgangzellen sezernierte Guanylin führt über eine Bindung an die GC-C zu einer intrazellulären cGMP Erhöhung, die dann über eine cGKII-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung des CFTR eine Chloridsekretion auslöst. Nach Austausch des Chlorids gegen Bikarbonat an der apikalen Membran über den Anionentauscher AE resultiert netto eine Bikarbonatsekretion.

6.2 Guanylinabhängige Chlorid- und Bikarbonatsekretion in der Lunge

6.2.1 Bestandteile der Regulation

Auf der Suche nach weiteren Organsystemen, die über eine guanylinabhängige Signalkaskade reguliert werden, widmete man sich nun der Lunge. Auch hier sollte gezeigt werden, welche Rolle Guanylin bei der Elektrolytsekretion spielt. Die Bedeutung einer intakten und korrekt gesteuerten Elektrolytsekretion in den Atemwegen zeigt auch hier die zystische Fibrose. Da der CFTR in der Lunge vorwiegend in den kleinen Atemwegen exprimiert wird [Plopper CG (1983),Nr.63; Lee MG et al.(1999), Nr.46/47] untersuchte man die dort vorherrschenden Zellsorte, die Clarazellen. Diese machen bis zu 80% des Epithels der terminalen Atemwege aus und sind bislang trotz ihrer zentralen Funktion für die Homöostase der luftleitenden Atemwege noch wenig untersucht. Bekannt ist, dass sie Peptidgranula beinhalten, deren Inhalt sie ins Lumen sezernieren. In einem ersten Arbeitsschritt konnte man in operativ gewonnen Lungenschnitten von Mensch und Ratte mittels RT-PCR-Analysen Guanylin, GC-C, cGKII und einen funktionstüchtigen CFTR (inklusive der wichtigen Gerüstproteine EBP50/NHERF und E3KARP/NHERF-2) in den Clarazellen nachweisen [Kulaksiz et al.(2002),Nr.43]. Zudem gelang auch hier der Nachweis des AE2, der wichtigsten Isoform der epithelialen Chlorid-Bikarbonataustauscher. Alle oben genannte Ergebnisse wurden anschließend mittels Westernblot verifiziert. In weiteren Experimenten konnte man dann Guanylin immunhistochemisch in den zilienlosen Zellen des Epithels der terminalen Atemwege, den sogenannten Clarazellen, in Gewebsschnitten von Mensch und Ratte nachweisen. Das Guanylin befindet sich in den Granula an der apikalen, lumenwärtigen Membran der Zellen. Betrachtet man die bisherigen Untersuchungen an Clarazellen, so sprechen diese für eine Sezernierung der guanylinhaltigen Granula ins Lumen [Stinson SF und Loosli CG (1978),Nr.85]. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die GC-C ausschließlich an der

apikalen, zum Lumen hin gerichteten Seite der Clarazellen zu finden ist. Eine geeignete Möglichkeit ein Protein im Lumen nachzuweisen ist die bronchoalveoläre Lavage. Hierzu wird während einer Bronchoskopie mit einer Flüssigkeit gespült, welche dann im gleichen Arbeitsgang abgesaugt und anschließend untersucht wird. Hier konnte man in allen untersuchten Flüssigkeiten Guanylin in einer so hohen Konzentration nachweisen, die die des im Blut zirkulierenden Guanylins weit übertrifft [Khun M et al. (1995), Nr.42]. Dies spricht deutlich für eine zusätzliche, aktive Sezernierung des Guanylins aus den Clarazellen ins Alveolar- und Bronchiallumen. Passend dazu wurde die membranständige Guanylatzyklase-C, der CFTR-Ionenkanal und die cGK-II ausschließlich an der apikalen Zellmembran nachgewiesen. Die Funktionstüchtigkeit des CFTR konnte mehrfach experimentell gesichert werden. So ließen sich die für die Funktion so wichtigen [Kleizen B et al. (2000),Nr.39] Baugerüstproteine EBP50/NHERF und E3KARP/NHERF-2 ebenfalls an der apikalen Zellmembran nachweisen. Durch sie wird der CFTR im Zytoskelett der Zelle verankert und so an Ezrin (einem Bestandteil des Zytoskeletts) und die Proteinkinasen gekoppelt. Zusätzlich zu seiner Funktion als Chloridkanal fungiert der CFTR als Regulator des Anionentauschers AE2, der ebenfalls an der apikalen Membran lokalisiert ist und so die Bikarbonatsekretion steuert [Lee MG et al. (1999),Nr.46/47]. Neben der Chloridsekretion wird so auch die Bikarbonatausscheidung reguliert und so die physiologisch erforderliche Zusammensetzung des Bronchialsekrets gewährleistet [Trout L und King M (1998),Nr.89].

6.2.2 Funktionelle Verifizierung der Signalkaskade

Durch die folgenden elektrophysiologischen Messungen mittels Patch-Clamp-Technik konnte sichergestellt werden, dass die oben genannten Bestandteile der bereits bekannten Signalkaskade einer guanylinvermittelten und cGMP-abhängigen Aktivierung des CFTRs auch in der bereits bekannten Art und Weise interagieren. Für diese Versuche eigneten sich besonders die H441-

Zellen. Diese Zellen einer Zellkultur menschlichen Ursprungs entsprechen voll funktionstüchtigen Clarazellen [Suske G et al.(1992),Nr.86]. Auch die an der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse entsprachen denen der Gewebeschnitte. Gibt man den H441 Zellen ein Gemisch aus IBMX und Forskolin in die Badlösung, welches über eine Blockade der Phosphodiesterase durch IBMX und einer Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt, kommt es anschließend zu einem messbaren Anstieg der Gesamtzelleitfähigkeit. Die gleiche reversible Zunahme der Gesamtzelleitfähigkeit konnte dann sowohl nach Gabe von Guanylin als auch nach Gabe des E.coli Toxins STa gezeigt werden. Dabei ist das Umkehrpotential bei einer Badlösung mit 140 mM NaCl nahe dem Nullpunkt und bei positiven Membranströmen zeigt sich der Strom leicht auswärtsgerichtet. Die Ionenselektivität konnte im Folgenden durch einen Austausch der Badlösung gezeigt werden: ersetzt man in der Badlösung Natriumchlorid durch Natrium-Methansulfonat, so zeigt sich eine Verschiebung des Umkehrpotentials von 0 mV auf $35,3 \pm 3,4$ mV. Diese Chloridionenselektivität ist ein weiteres Indiz für eine Beteiligung des CFTR-Ionenkanals. Wie bereits in der vorhergehenden Versuchsreihe ließ sich auch hier die Zunahme des Gesamtzellstromes mittels Glibenclamid reversibel blockieren. Da Glibenclamid den CFTR blockiert, muss der gemessene Ionenfluß mit hoher Wahrscheinlichkeit über den CFTR zustande gekommen sein [Sheppard DN und Welsh MJ (1992),Nr.78]. Um zu verdeutlichen, dass die CFTR-Aktivierung via cGMP und nicht über den cAMP-abhängigen Weg geschieht, wurde in der nächsten Versuchsreihe dibutyryl-cGMP, die membrangängige Form des cGMP, der Badlösung zugefügt. Die hierdurch ausgelöste Zunahme der Gesamtzelleitfähigkeit gleicht der durch Guanylin ausgelösten vollkommen, was nahe legt, dass es sich bei dem intrazellulären Aktivator des CFTR-Ionenkanals um cGMP handelt. Zusätzlich für cGMP als second messenger spricht, dass es trotz einer Blockade der Proteinkinase A mit

KT5720 - und damit des cAMP-abhängigen Signalweges - zu einer Aktivierung über Guanylin kommt. Dafür, dass diese über cGK-II und nicht über die cGK-I erreicht wird, spricht zum einen die hohe Konzentration an cGK-II in den Clarazellen, zum anderen ist in vielen untersuchten Zellsystemen die cGK-II schon als Aktivatorprotein des CFTR-Ionenkanals bekannt [Lohmann SM et al.(1997),Nr.53; Vaandrager AB et al.(1998),Nr.91]. Zusammenfassend konnte also der bereits oben besprochene und aus mehreren anderen Organsystemen bekannte Signalweg einer guanylinabhängigen Chlorid- und Bikarbonatsekretion über eine Aktivierung des CFTR-Ionenkanals via intrazellulärer cGMP-Erhöhung auch für die Clarazellen in der Lunge gezeigt werden. Dieser auto- und parakrine Weg von luminaler Seite her ist klar abzugrenzen von einer möglichen basolateralen Aktivierung des CFTR-Ionenkanals über den Blutweg via cAMP und Proteinkinase A. Den Stellenwert des guanylinabhängigen Regulationsweges der Ionensekretion ist hoch anzusetzen, denn das Krankheitsbild der zystischen Fibrose zeigt nur allzu deutlich, was passiert wenn dieser Regulationsmechanismus versagt. Durch die unphysiologische Zusammensetzung des Sekrets der Atemwege kommt es zum Ausbleiben des Sekretflusses mit einer mangelhaften Abwehr von Krankheitserregern mit daraus resultierenden rezidivierenden Entzündungen, die dann zum vorzeitigen Versterben der Patienten führen können. Es ist zu wünschen, dass weiterführende Erkenntnisse hier neue Behandlungswege dieser häufigen Genkrankung möglich machen.

6.3 Besonderheiten der Zellkultur

Nachdem die Arbeitsgruppe von Professor Cetin ihre Untersuchungen an Gewebestücken durchgeführt hatte, stellte sich die Frage welche Zellen beziehungsweise Zellverbände für die experimentelle Beantwortung der Fragestellung am geeignetsten sind. Die Capan-1 Zellen sind ursprünglich aus der Lebermetastase eines Pankreaskarzinom isoliert worden. In mehreren Untersuchungen konnte bis heute gezeigt werden, dass diese Zellen funktionell

Pankreasgangzellen entsprechen [Becq F et al.(1992),Nr.2] und somit für die Versuche geeignet sind. Ebenso war durch Voruntersuchungen sichergestellt, dass diese Zellen alle wichtigen Merkmale der zu untersuchenden Signalkaskade inklusive dem funktionsfähigen CFTR [Becq F et al.(1993),Nr.3/4] und dem AE II [Mahieu I et al.(1994),Nr.55] enthalten. Da diese Zellen nach einigen Tagen Wachstum kleinere Zellhaufen, sogenannte Cluster bilden, konnte so die Funktionalität einer Zellkultur mit den Gegebenheiten elektrophysiologisch gekoppelter Zellen verbunden werden. Um nachzuweisen, dass die gemessenen Zellströme über einen aktivierten CFTR ausgelöst werden, folgten Versuche mit CF-PAK-Zellen, in denen der CFTR-Ionenkanal aufgrund der $\Delta 508$ -Mutation funktionsunfähig ist. Diese Zellen besitzen also zwar alle Bestandteile normaler Pankreasgangzellen, eine Chloridsekretion über den CFTR-Ionenkanal ist aber nicht möglich [Schoumacher RA et al.(1990),Nr.73 und Drumm ML et al.(1990),Nr.18]. Die mit den Zellkulturzellen erzielten Ergebnisse sollen so das physiologische Verhalten von gesunden Pankreasgangzellen beziehungsweise Pankreasgangzellen bei zystischer Fibrose widerspiegeln. Da eine Patch-Clamp-Untersuchung von humanen Gewebeschnitten praktisch unmöglich ist, waren die Untersuchungen der Zellreihen die Methode der Wahl, da sie den physiologischen Bedingungen am nächsten kommen. Weil sich die Zellen der Zellkulturen aber dennoch von denen im physiologischen Gewebeverband unterscheiden, sollten die hier erzielten Ergebnisse durch weitere Experimente verifiziert werden. Mögliche Störfaktoren könnten insbesondere Unterschiede im Zellzyklus, sowie in der elektrophysiologischen Kopplung der einzelnen Zellen sein. So kommt es durch Substanzen wie Guanylin, STa, Forskolin und IBMX zu einer Zunahme der Gesamtleitfähigkeit deren Ausmaß aber vor, während und nach Aktivierung starken Schwankungen unterliegt. Diese Varianz ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Dichte der Ionenkanäle in der Zellmembran der Zellkulturzellen zurückzuführen.

6.4 Klinische Relevanz und Ausblicke in der Guanylinforschung

Hier zeigt sich eine starke Fokussierung der Forschung auf Erkrankungen des Darmes, was zum einen daran liegt, dass hier zum ersten Mal das Modell der guanylinabhängigen Signalkaskade nachgewiesen werden konnte, zum anderen scheint aber auch die guanylinabhängige Regulation hier den größten Einfluss zu haben. Die Vielzahl der sich ergebenden klinischen Möglichkeiten in nahezu jedem Organsystem macht aber auch deutlich, um was für einen zentralen und entwicklungsgeschichtlich alten (die Signalkaskade der Guanylin vermittelten CFTR-Aktivierung findet sich auch in entwicklungsgeschichtlich deutlich älteren Spezies als den Menschen) Regulationsmechanismus es sich bei der guanylinabhängigen CFTR-Aktivierung handelt.

6.4.1 Kolonkarzinom

Die vielen Untersuchungen an humanen Kolonkarzinomzellen (vor allem an den Zellreihen T84 und CaCo²) zeigen, dass sowohl Primarius als auch Metastasen des Kolonkarzinoms ähnlich wie die gesunde Darmschleimhaut GC-C in hoher Konzentration exprimieren [Carrithers SL et al.(1994),Nr.6; Carrithers SL et al.(1996),Nr.7/8; Waldman SA et al.(1998),Nr. 93; Cagir B et al.(1999),Nr.5]. Nun kann man per Autoradiographie mit ¹²⁵I-STa die GC-C sowohl in normalem Kolonepithel als auch in den Karzinomzellen von Primarius und Metastase sowie in Adenomen nachweisen [Forte LR et al.(1989),Nr.24; Krause WJ et al.(1990),Nr.40 und Krause WJ et al.(1994),Nr.41]. Diese Ergebnisse konnten in vielen Versuchen mit anderen Methoden (unter anderem RT-PCR, Northernblot) [Carrithers SL et al.(1994),Nr.6; Carrithers SL et al.(1996),Nr.7/8; Waldman SA et al.(1998),Nr. 93; Shailubhai K et al.(2000),Nr.77] bestätigt werden. Somit ist es möglich ortsfremde Kolonepithelzellen zu identifizieren und mögliche Mikrometastasen frühzeitig zu entdecken. Hierzu hat man STa mit eine Chelatgruppe gekoppelt, welche Metallionen aufnimmt [Hariprasad G et al.(2001),Nr.36/37]. Diese kann man mit Hilfe der single-photon-emitting-computer-tomographie (SPECT) nachweisen und so die Tumorzellen aufspüren.

Da die Tumorzellen im Gegensatz zu den gesunden Kolonepithelzellen die GC-C nicht nur an der zum Darmlumen hin gerichteten Seite besitzen, sondern die GC-C hier über die gesamte Zelloberfläche verteilt ist, kann man sie von dem gesunden Epithel unterscheiden. Dies gelingt gut nach der intravenösen Gabe eines STa-Derivats, weil sich dann das gesunde Darmepithel mit seinen luminal gelegenen Rezeptoren im Vergleich zu den entarteten Zellen kaum darstellt [Urbanski R et al.(1995),Nr.91]. Setzt man nun ein radioaktives Metallion (^{64}Cu oder ^{68}Ga) ein, so ist auch eine PET-gesteuerte Detektion der Tumorzellen möglich. Betrachtet man den Krankheitsverlauf des Kolonkarzinoms, so wäre gerade die Unterscheidung von physiologischem Kolonepithel und lokaler Dysplasie beziehungsweise Karzinom von großem Interesse. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal konnte man 1998 [Cohen MB et al.(1998),Nr.16] herausarbeiten: Während normale Kolonepithelzellen große Mengen von Guanylin-mRNA produzieren, exprimierten die Karzinomzellen keine Guanylin-mRNA. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass dies auch für Adenome und für Uroguanylin gilt. Das heißt, in den Zellen des Kolonkarzinoms und des Kolonadenoms findet sich nicht annähernd soviel Uroguanylin- und Guanylin-mRNA wie in gesundem Kolonepithel [Shailubhai K et al.(2000),Nr.77; Steinbrecher KA et al.(2000),Nr.82]. Die Ursache dieser Guanylin-Downregulation in den entarteten Zellen ist bislang unklar und Gegenstand weiterer Forschung. Aber nicht nur der Nachweis von Karzinomvorstufen ist so möglich, auch therapeutisch scheinen Guanylin und Uroguanylin einsetzbar. Geht man davon aus, dass die Zellen des Intestinums Guanylin und Uroguanylin sezernieren [Kita T et al.(1999),Nr.38; Martin S et al.(1999),Nr.56; Moro F et al.(2000),Nr.57 und Rudolph JA et al.(2002),Nr.68], so werden auch die entarteten Zellen über ihre Nachbarzellen über Guanylin via ihrer funktionstüchtigen GC-C reguliert. Ab einer gewissen Tumorgroße reicht dann aber die Versorgung über die Nachbarzellen nicht mehr aus und die entarteten Zellen wachsen unabhängig von der Guanylin-Regulation. Untersucht

man nun wie die Tumorzellen reagieren, wenn man ihnen wieder Guanylin zukommen lässt, zeigt sich eine deutliche Wirkung. Bei Mäusen die an multipler intestinaler Neoplasie (MIN) erkrankt sind, führt ein Defekt des APC-Gens zu einer Vielzahl kolorektaler Tumore. Gibt man diesen Mäusen oral Uroguanylin, entwickeln sie an Größe und Zahl weniger Tumore als die Kontrollgruppe [Shailubhai K et al.(2000),Nr.77]. Die orale Applikation bietet sich besonders an, da die GC-C im Darm vorwiegend an der luminalen Seite lokalisiert ist. Zum Kontrollzeitpunkt zeigten sich im Versuch in der mit Uroguanylin behandelten Gruppe nur 10 Prozent der Tumore der Kontrollgruppe. Zudem waren die behandelten Mäuse in der Nahrungsaufnahme und dem Wachstum weitaus weniger beeinträchtigt. Andere Versuche zeigten, dass Uroguanylin in den Tumorzellreihen T84 und CaCo² die weitere Proliferation verlangsamt [Pitari GM et al.(2001),Nr.61; Pitari GM et al.(2003),Nr.61] beziehungsweise Apoptose [Liu L et al.(2001),Nr.52] auslöst. Der Gegenversuch mit Guanylin-knock-out Mäusen zeigte, dass das Fehlen von Guanylin im Kolon zu einer Steigerung der Proliferationsrate führt [Steinbrecher KA et al.(2002),Nr.84]. So könnte in Zukunft die Behandlung mit einer guanylinähnlichen Substanz, wie zum Beispiel mit dem hochpotenten STa bei Patienten mit Kolontumoren eine therapeutische Option sein. Guanylin selbst scheidet als orale Therapieoption aus, da es von Chymotrypsin inaktiviert wird und so einer oralen Gabe nicht zugänglich ist. Zusätzlich wäre eine unterstützende therapeutische Wirkung durch Phosphodiesteraseinhibitoren denkbar, da alle gezeigten und von guanylinähnlichen Peptiden ausgelösten Wirkungen cGMP-abhängig vermittelt werden. In weiteren Versuchen konnte mittels STa eine Suppression von Tumorzellen (T84-Zelllinie) erreicht werden, die von einer funktionsfähigen GC-C abhängt und cGMP-vermittelt ist. Hierin mag unter anderem auch der antiproportionale regionale Zusammenhang der Morbidität von ETEC und Kolonkarzinom liegen [Pitari JM et al.(2003),Nr.61]. Eine weitere Vertiefung der vorgestellten Ergebnisse kann unser Wissen über Entstehung, Diagnostik

und Therapie von Kolontumoren verbessern. Die bislang erreichten Erkenntnisse machen aber schon jetzt die Tumordetektion mit neuen Techniken möglich und könnten so in Zukunft wesentlich an der Bekämpfung dieser so häufigen Neoplasie beteiligt sein.

6.4.2 Natriumhaushalt und Bluthochdruck

Schon früh entdeckte man GC-C und Uroguanylin in der Niere [Forte LR et al.(1988),Nr.23 und Hamra FK et al.(1993),Nr.32] und spätere Versuche zeigten, dass Nierenzellen sowohl Uro- als auch Guanylin-mRNA und die GC-C exprimieren. In der Untersuchung der weiteren Wirkung zeigten die anschließend durchgeführten Experimente, dass guanylinähnliche Substanzen die renale Ausscheidung von Natrium, Kalium, Chlorid und Wasser förderten [Lima AAM et al.(1992),Nr.50; Fonteles MC et al.(1996),Nr.21; Greenberg RN et al.(1997),Nr.30; Carrithers SL et al.(1999),Nr.9; Santos-Neto MS et al.(1999),Nr.69; Fonteles MC et al.(2001),Nr.22; Santos-Neto MS et al.(2003),Nr.70]. In mehreren Experimenten setzte man daraufhin Versuchstiere einer oral gegebenen Salzmenge aus und konnte eine Steigerung der intestinalen und renalen Guanylin- und Uroguanylin-mRNA-Menge beobachten [Potthast R et al.(2001),Nr.64; Carrithers SL et al.(2002), Nr.10; Fukae H et al.(2002),Nr.25]. Außerdem ließ sich durch diese salzreiche Kost die im Urin ausgeschiedene Menge an Guanylin und Uroguanylin [Fukae H et al.(2002),Nr.25] sowie die Menge an Natriumchlorid [Lennane RJ et al.(1975), Nr.48] steigern. Diese Beobachtungen ließen sich auch an isolierten und perfundierten Darmstücken sowie Zellkulturen bestätigen [Kita T et al.(1999),Nr.38; Potthast R et al.(2001),Nr.64; Steinbrecher KA et al.(2002),Nr.83]. Es scheint also so, dass über das im Blut zirkulierende Guanylin und Uroguanylin eine Verbindung zwischen Niere und Intestinum gebildet wird und somit der Haushalt der Blutsalze und damit indirekt der Blutdruck reguliert wird. In diesem Zusammenhang wurde Uroguanylin auch schon - in Analogie zu den myokardialen Hormonen, die ebenfalls an

Guanylatzyklen binden, - als „intestinal natriuretic peptid“ bezeichnet. Versuche mit den phänotypisch unauffälligen Uroguanylin-knock-out Mäusen konnten zeigen, dass die Mäuse die kein funktionfähiges Uroguanylin besaßen, nach einer Salzbelastung nicht annähernd soviel Salz ausscheiden konnten wie gesunde Mäuse mit funktionfähigem Uroguanylin [Lorenz JN et al.(2003),Nr.54], woraus dann auch ein höherer Blutdruck der Guanylin-knock-out Mäuse resultierte. Überraschenderweise zeigten Guanylin-knock-out Mäuse eine unveränderte Salzexkretion [Steinbrecher KA et al.(2002),Nr.83; Lorenz JN et al.(2003),Nr.54] und da auch Tiere, denen die GC-C fehlt, über eine normale Natriurese, Kaliurese und Diurese verfügen, liegt die Vermutung nahe, dass die Uroguanylinwirkung hier nicht über die GC-C vermittelt wird, sondern hier ein weitere Signalkaskade existiert. Zusammenfassend bestehen zum jetzigen Zeitpunkt lediglich erst Hinweise inwieweit guanylinähnliche Peptide in den Haushalt der Blutsalze und in die Regulation des Blutdrucks verwickelt sind, aber in Zukunft können sie eventuell sogar therapeutische Möglichkeiten bieten. So wäre zum Beispiel eine Behandlung des Bluthochdrucks mit uroguanylin-ähnlichen Peptiden denkbar.

6.4.3 Colon irritable und Obstipation

Nach Untersuchungen an Patienten, die an einer durch E.coli ausgelösten Diarrhö leiden, zeigte sich, dass über STa auch eine Aktivierung der glatten Muskulatur des Darms ausgelöst wird und dadurch eine Verkürzung der Transitzeit resultiert. Der genaue Weg dieser Aktivierung ist bislang noch unklar, ein therapeutischer Nutzen für Patienten die an einem Kolon irritable mit obstipativer Komponente leiden, scheint aber durchaus denkbar. In ersten präklinischen Studien wird dies bereits an Tieren getestet. So können oral verabreichte STa-Derivate eine neue Substanz zur Bekämpfung von Kolon irritable und Obstipation sein.

6.4.4 Leberregeneration

In autoradiographischen Untersuchungen konnte man zeigen, dass eine sich regenerierende Leber hohe Mengen an GC-C exprimiert. Dies ist sowohl bei einem toxischen Leberschaden als auch nach Hepatektomie und Trauma der Fall [Laney DW et al.(1994),Nr.45; Scheving LA und Russel WE (1996),Nr.72]. In weiteren Versuchen sah man, dass die Regenerationsfähigkeit der Leber bei GC-C-knock-out-Mäusen deutlich beeinträchtigt ist [Gianella RA und Mann EA (2003),Nr.29]. So scheint Guanylin ein wichtiger Bestandteil der Regeneration von neuem Lebergewebe zu sein. Inwieweit sich die Regeneration im Bedarfsfalle günstig durch guanylinähnliche Substanzen beeinflussen lässt, muss aber noch weiter geklärt werden.

6.4.5 Pankreas

Auch wenn bislang kaum Studien zur weiteren Erforschung therapeutischer Möglichkeiten durch guanylinähnliche Peptide bei Pankreaserkrankungen durchgeführt beziehungsweise veröffentlicht worden sind, so können den Ergebnissen dieser Arbeit nachfolgend vielleicht ähnliche Forschungserfolge in Detektion und Behandlung des Pankreaskarzinoms erzielt werden, wie bereits oben für das Kolonkarzinom geschildert. Immerhin ist das Pankreaskarzinom, das von den von uns untersuchten Pankreasgangzellen ausgeht, zur Zeit die sechsthäufigste Todesursache unter den Tumorerkrankungen und hat unter den 60 häufigsten Malignomen mit der niedrigsten 5-Jahres-Überlebensrate die schlechteste Prognose.

6.4.6 Zystische Fibrose und Asthma bronchiale

Nachdem durch diese Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch im Epithel der Luftwege die Ionensekretion durch Guanylin reguliert wird, ergaben weitere Versuche, dass auch bei Individuen, die kein funktionstüchtigen CFTR besitzen, Guanylin einen CFTR-unabhängigen Anionenstrom auslöst [Kulaksiz H et al.(2002),Nr.43; Krause WJ et al.(1990),Nr.40]. Daher könnte die Gabe von

guanylinähnlichen Peptiden eine Behandlungsoption bei der medikamentösen Therapie der zystischen Fibrose sein. Diese Medikamente könnten von luminal als Aerosol verabreicht werden, aber auch eine ähnliche Wirkung durch intravenös verabreichte Substanzen konnte schon gezeigt werden. Zusätzlich konnte man [Ohbayashi K et al.(1998),Nr.59; Ohbayashi K und Yamaki K (2000),Nr.60] zeigen, dass die Applikation von einem uroguanylinhaltigen Aerosol neben einer Bronchodilatation eine Verringerung der mikrovaskulären Durchlässigkeit des Bronchialepithels bewirkt. Sowohl bei der Behandlung der zystischen Fibrose als auch bei der Asthmatherapie sind dies gute Ansätze, die zurzeit durch weitere Studien verifiziert und weiterentwickelt werden. Da die Clarazellen als pulmonale Stammzellreihe auch maßgeblich an der Entstehung von Adenokarzinomen beteiligt sind [Linnoila RI (2000),Nr.51] und in ersten Versuchen die Arbeitsgruppe um Prof. Cetin bereits Guanylin in allen Adenokarzinomschnitten immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, bietet der Nachweis von Guanylin als potentiellem Tumormarker vielleicht in Zukunft zusätzliche Möglichkeiten in der histologischen Typisierung und Detektion von Tumoren der Lunge.

7. Literaturverzeichnis

1. Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, Hawkins RD (2001) Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci* 21:143-149
2. Becq F, Fanjul M, Mahieu I, Berger Z, Gola M, Hollande E (1992) Anion channels in a human pancreatic cancer cell line (Capan-1) of ductal origin. *Pflugers Arch* 420:46-53
3. Becq F, Fanjul M, Merten M, Figarella C, Hollande E, Gola M (1993) Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Lett* 327:337-342
4. Becq F, Hollande E, Gola M (1993) Phosphorylation-regulated low-conductance Cl⁻ channels in a human pancreatic duct cell line. *Pflugers Arch* 425:1-8
5. Cagir B, Gelmann A, Park J, Fava T, Tankelevitch A, Bittner EW (1999) Guanylyl cyclase C is a biomarker for recurrent stage II colorectal cancer. *Ann Intern Med* 131:805-812
6. Carrithers SL, Parkinson SJ, Goldstein S, Park P, Robertson DC, Waldmann SA (1994) Escherichia coli heat-stable toxin receptors in human colonic tumors. *Gastroenterology* 107:1653-1661
7. Carrithers SL, Barber MT, Biswas S, Parkinson SJ, Park PK, Goldstein SD (1996) Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci* 93:14827-14832
8. Carrithers SL, Parkinson SJ, Goldstein SD, Park PK, Urbansky RW, Waldman SA (1996) Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptors. A novel marker for colorectal tumors. *Dis Colon Rectum* 39:171-181
9. Carrithers SL, Hill ML, Johnson BJ, O'Hara SM, Jackson BA, Ott CE (1999) Renal effects of uroguanylin and guanylin in vivo. *Braz J Med Biol Res* 32:1337-1344

10. Carrithers SL, Jackson BA, Cai WY, Greenberg RN, Ott CE (2002) Site-specific effects of dietary intake of guanylin and uroguanylin mRNA expression in rat intestine. *Regul Pept* 107:87-95
11. Case RM, Argent BE (1993) Pancreatic duct cell secretion. Control and mechanism of the transport. In: Go VLW, DiMagno EP (eds) *The Pancreas*, Raven press, New York, pp301-350
12. Chan SK, Giannella R (1981) Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *J Bio Chem* 256:7744-7746
13. Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV (1989) Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341:68-72.
14. Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P (1994) Activation of intestinal CFTR Cl^- -channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 13:1065-1072
15. Cheng HS, Leung PY, Cheng Chew SB, Leung PS, Lam SY, Wong WS, Wang ZD, Chan HC (1998) Concurrent and independent HCO_3^- - and Cl^- -secretion in a human pancreatic duct cell line (CAPAN-1). *J Membr Biol* 164:155-167
16. Cohen MB, Hawkins JA, White DP (1998) Guanylin mRNA expression in human intestine and colorectal adenocarcinoma. *Lab Invest* 78:101-108
17. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:947-951.
18. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzel RA, Wilson JM (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62:1227-1233

- 19.El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* 17:45-55
- 20.Feil R, Hofmann F, Kleppisch T (2005) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* 16:23-41
- 21.Fonteles MC, Monteiro HSA, Soares AM, Santos-Neto MS, Greenberg RN, Lima AAM (1996) The lysine-I analog of guanylin induces intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. *Braz J Med Biol Res* 29:267-271
- 22.Fonteles MC, Carrithers SL, Monteiro HSA, Carvalho AF, Coelho GR, Greenberg RN (2001) Renal effects of serine α -7 analog of lymphoguanilin in ex vivo rat kidney. *Am J Physiol* 280:207-213
- 23.Forte LR, Krause WJ, Freeman RH (1988) Receptors and cGMP signaling mechanism for e.coli enterotoxin in opossum kidney. *Am J Physiol* 255:F1040-1046
- 24.Forte LR, Krause WJ, Freeman RH (1989) Escherichia coli enterotoxin receptors: localisation in opossum kidney, intestine and testis. *Am J Physiol* 257:F874-F881
- 25.Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Kita T, Nakazato M, Eno T (2002) Changes in urinary levels and renal expression of uroguanylin on low or high salt diets in rats. *Nephron* 92:373-378
- 26.Fuller CM, Benos DJ (1992) CFTR!. *Am J Physiol* 263:267-286
- 27.Gardner P, Chao AC, De Sauvage F (1995) STa receptors: physiological and pathophysiological regulation of intestinal secretion by 5'-cyclic guanosine monophosphate. *Gastroenterology* 109:325-327
- 28.Gaskin KJ, Durie PR, Corey M, Wei P, Forstner GG (1982) Evidence for a primary defect of pancreatic HCO_3^- secretion in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 16:554-557

29. Gianella RA, Mann EA (2003) E.coli heat-stable enterotoxin and guanylin cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 114:67-85
30. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK (1997) Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, Escherichia coli heatstable enterotoxin Sta in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Invest Med* 45:276-282
31. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100
32. Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH (1993) Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10464-10468
33. Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR (1997) Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2705-2710
34. Hariprasad G, Siekmann GL, Hoffman TJ, Kiefer GE, Chin DT, Forte LR (2001) Synthesis and in vitro evaluation of ¹¹¹Inlabeled ST-peptide enterotoxin ST. Analogue for specific targeting of guanylin receptors on human colonic cancers. *Anticancer Res* 21:2785-2792
35. Hariprasad G, Siekmann GL, Hoffman TJ, Owen NK, Chin DT, Forte LR (2001) In vivo evaluation of an ¹¹¹Inlabeled ST-peptide analog for specific targeting of human colon cancers. *Nucl Med Biol* 28:903-909
36. Ishiguro H, Steward MC, Wilson RW, Case RM (1996) Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol.* 495: 179-191
37. Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, Kachur JF, Hamra FK, Pidhorodeckyj NV, Forte LR (1994)

- Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol* 266:342-348
38. Kita T, Kitamura K, Sakata J, Eto T (1999) Marked increase of guanylin secretion in response to salt loading in the rat small intestine. *Am J Physiol* 277:G960-G966
39. Kleizen B, Braakman I, deJonge HR (2000) Regulated trafficking of the CFTR chloride channel. *Eur J Cell Biol* 79:544-556
40. Krause WJ, Freeman RH, Forte LR (1990) Autoradiographic demonstration of specific binding sites for E.coli enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res* 260:387-394
41. Krause WJ, Cullinford GL, Freeman RH, Eber SL, Richardson KC, Fok KF (1994) Distribution of heat-stable enterotoxin guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *J Anat* 184:407-417
42. Kuhn M, Kulaksiz H, Cetin Y, Frank M, Nold R, Arnold R, Boker K, Bischoff SC, Manns MP, Forssmann WG (1995) Circulating and tissue guanylin immunoreactivity in intestinal secretory diarrhoea. *Eur J Clin Invest* 25:899-905
43. Kulaksiz H, Schmid A, Hönscheid M, Ramaswamy A, Cetin Y (2002) Clara cell impact in air-side activation of CFTR in small pulmonary airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6796-6801
44. Kulaksiz H, Schmid A, Hönscheid M, Eissele R, Klempnauer J, Cetin Y (2001) Guanylin in the human Pancreas: a novel luminocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. *Histochem Cell Biol* 115:131-145
45. Laney DW jun., Bezerra JA, Kosiba JL, Degen SJF, Cohen MB (1994) Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am J Physiol* 266:G899-906
46. Lee MG, Choi LY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S (1999) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal

- Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* 274:14670-14677
47. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S (1999) Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem* 274:3414-3421
48. Lennane RJ, Peart WS, Carey RM, Shaw JA (1975) Comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med* 49:433-436
49. Liedtke CM (1989) Regulation of chloride transport in epithelia. *Annu Rev Physiol* 51:143-160
50. Lima AAM, Moneira HSA, Fonteles MC (1992) The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol* 70:163-167
51. Linnoila RI, Szabo E, DeMayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A (2000) The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. *Ann N Y Acad Sci* 923:249-267
52. Liu L, Li H, Underwood T, Lloyd M, David M, Sperl G (2001) Cyclic GMP-dependent protein kinase activation and induction by exisulind and cp461 in colon tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther* 299:583-592
53. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, de Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22:307-312
54. Lorenz JN, Niemann M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N (2003) Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest* 112:1244-1254

55. Mahieu I, Becq F, Wolfensberger T, Gola M, Certer N, Hollande E (1994) The expression of carbonic anhydrase II and IV in the human pancreatic cancer cell line (Capan-1) is associated with bicarbonate ion channels. *Biol Cell* 81:131-141
56. Martin S, Adermann K, Forssmann W-G, Kuhn M (1999) Regulated, side-directed secretion of proguanylin from isolated rat colonic mucosa. *Endocrinology* 140:5022-5029
57. Moro F, Levenez F, Nemoz-Gaillard E, Pellissier S, Plaisancie P, Cuber JC (2000) Release of guanylin immunoreactivity from the isolated vascular perfused rat colon. *Endocrinology* 141:2594-2599
58. Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802
59. Ohbayashi K, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K (1998) Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. *Life Sci* 62:1833-1844
60. Ohbayashi K, Yamaki K (2000) Both inhalant and intravenous uroguanylin inhibit leukotriene C4-induced airway changes. *Peptides* 21:1467-1472
61. Pitari GM, DiGuglielmo MD, Park J, Schulz S, Waldman SA (2001) Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7846-7851
62. Pitari JM, Zingmann LV, Hodgson DM, Alekseev AE, Kazerounian S, Bienengraeber M (2003) Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2695-2699
63. Plopper CG (1983) Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am Rev Respir Dis* 128:37-41

64. Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindie A, Schlatter E, Kuhn M (2001) High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology* 142 :3087-3097
65. Quinton PM (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* 79:3-22
66. Rennard SI, Rickard K, Beckmann JD, Huerta G, Koyama S, Robbins RA, Romberger D, Spurzem J, Thompson AB (1991) Protease injury in airways disease. *Ann N Y Acad Sci* 624:278-285
67. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073
68. Rudolph JA, Harkins JA, Cohen MB (2002) Proguanylin secretion and the role of negative-feedback inhibition in a villous epithelial cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G695-G702
69. Santos-Neto MS, Carvalho AF, Forte LR, Fonteles MC (1999) Relationship between the actions of atrial natriuretic peptide ANP, guanylin and uroguanylin on the isolated kidney. *Braz J Med Biol Res* 32:1015-1019
70. Santos-Neto MS, Carrithers SL, Carvalho AF, Monteiro HAS, Greenberg RN, Forte LR (2003) Guanylin and its lysine-containing analogue in the isolated perfused rat kidney: interaction with chymotrypsin inhibitor. *Pharmacol Toxicol* 92:114-120
71. Sauvage de FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV (1992) Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9089-9093
72. Scheving LA, Russel WE (1996) Guanylyl cyclase C is upregulated by nonparenchymal cells and hepatocytes in regenerating rat liver. *Cancer Res* 56:5186-5191

73. Schoumacher RA, Kelly DR, Schmid SM, Gelder FB, Rado TA, Frizzell RA (1990) A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4012-4016
74. Schulz S, Green CK, Yuen PS, Garbers DL (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63:941-948
75. Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL (1992) Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *J Biol Chem* 267:16019-16021.
76. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79:145-166
77. Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY, Eber SL, Wang Y (2000) Uroguanylin suppresses polyp formation in the APC^{Min1} mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res* 60:5149-5155
78. Sheppard DN, Welsh MJ, (1992) Effect of ATP-sensitive K⁺ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J Gen Physiol* 100:573-591
79. Sheppard DN, Robinson KA (1997) Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J Physiol* 503:333-346
80. Shumaker H, Amlal H, Frizzell R, Ulrich CD 2nd, Soleimani M (1999) CFTR drives Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO₃⁻-secretion in CF. *Am J Physiol* 276:16-25.
81. Staples S, Asher S, Gianella R (1981) Purification and characterisation of heat-stable enterotoxin produced by strain of E.coli pathogenic for man. *J Biol Chem* 255:4716-4721

82. Steinbrecher KA, Tuohy TMF, Goss KH, Scott MC, Witte DP, Groden J (2000) Expression of guanylin is downregulated in mouse and human intestinal adenomas. *Biochem Biophys Res Commun* 273:225-230
83. Steinbrecher KA, Rudolph JA, Luo G, Cohen MB (2002) Coordinated upregulation of guanylin and uroguanylin expression by hypertonicity in HT-29-18-N2 cells. *Am J Physiol* 283:C1729-1737
84. Steinbrecher KA, Wowk SA, Rudolph JA, Witte DP, Cohen MB (2002) Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation. *Am J Pathol* 161: 2169-2178
85. Stinson SF, Loosli CG (1978) Ultrastructural evidence concerning the mode of secretion of electron-dense granules by Clara cells. *Am J Pathol* 127:291-298.
86. Suske G, Lorenz W, Klug J, Gazdar AF, Beato M (1992) Elements of the rabbit uteroglobin promoter mediating its transcription in epithelial cells from the endometrium and lung. *Gene Expr* 2:339-352
87. Thompson M, Gianella R (1985) Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect Immun* 57:649-652
88. Trezise AE, Buchwald M (1991). In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353:434-437
89. Trout L, King M, Feng W, Inglis SK, Ballard ST (1998) Inhibition of airway liquid secretion and its effect on the physical properties of airway mucus. *Am J Physiol* 274:258-263
90. Urbanski R, Carrithers SL, Waldman SA (1995) Internalization of *E. coli* ST mediated by guanylyl cyclase C in T84 human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1245:29-36
91. Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EME, Bot AGM, Edixhoven M, Boomars WEM, Lohmann SM, de Jonge HR (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required

for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. Proc Natl Acad Sci USA 95:1466-1471

92. Waldman SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. Pharmacol Rev 39:163-196

93. Waldman SA, Cagir B, Rakinic J, Fry RD, Goldstein SD, Isenberg G (1998) Use of guanylin cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. Dis Colon Rectum 41:310-315

94. Yuen PS, Potter LR, Garbers DL (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. Biochemistry 29:10872-10878.

8. Publikationen

1. "Activation of CFTR-like Cl⁻ Channels by Guanylin in Capan-1 cells"

Autor: Matthias Hönscheid.

Ein Poster anlässlich des Zwischensymposiums des Graduiertenkollegs „Zelluläre Regulation und Wachstum“ im September 1999 in Homburg/Saar.

2. "The bioactive peptide guanylin is a luminocrine activator of electrolyte secretion in pancreatic ducts."

Autoren: Matthias Hönscheid, Hasan Kulaksiz, Yalcin Cetin und Andreas Schmid.

Ein Poster anlässlich der 79. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft im März 2000 in Bonn.

3. "Clara cell impact in air-side activation of CFTR in small pulmonary airways."

Autoren: Hasan Kulaksiz, Andreas Schmid, Matthias Hönscheid, Annette Ramaswamy und Yalcin Cetin.

Ein Artikel in PNAS (Proceeding of the national academy of science of the united states of america) im Mai 2002 veröffentlicht [Kulaksiz H et al.(2002),Nr.43].

4. "Guanylin in the human Pankreas: a novel luminocrine regulatory pathway of elektrolyt secretion via cGMP and CFTR in the ductal system"

Autoren: : Hasan Kulaksiz, Andreas Schmid, Matthias Hönscheid, Rolf Eissele, Jürgen Klempnauer und Yalcin Cetin.

Ein Artikel in Histochemical Cell Biology im Februar 2001 veröffentlicht [Kulaksiz H et al. (2001),Nr.44].

9. Danksagungen

Diese Dissertation entstand an der Universität des Saarlandes im Institut für Physiologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. Irene Schulz) unter Anleitung von Herrn PD Dr. A. Schmid. An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. A. Schmid für die Überlassung des Themas und für sein großes Interesse an dieser Arbeit herzlich danken. Durch seine Anregungen, engagierte Einarbeitung und Betreuung sowie zahlreiche Diskussionen hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Frau Prof. Irene Schulz für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Universität des Saarlandes und stellvertretend für das gesamte Physiologische Institut.

Außerdem möchte ich ihr für die weitere Förderung im Rahmen des Graduierten-Kollegs der Universität des Saarlandes danken.

Herrn Prof. Cetin und seinen Mitarbeitern schulde ich Dank für die experimentellen Vorarbeiten und die Möglichkeit der Kooperation.

Bei Frau Dr. Ines Anderie und Herrn Dr. Elmar Krause bedanke ich mich für konstruktive Hilfestellungen und Diskussionen im Laboralltag sowie für die freundschaftliche Unterstützung besonders in den experimentell weniger erfolgreichen Phasen. Ebenso gilt mein Dank Frau Sabine Plant für die Betreuung der Zellkultur.

10. Lebenslauf

Zur Person

Geboren: am 15.12. 1974 in Bonn

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: römisch-katholisch

Eltern: Sibylle und Dr. med. Bernhard Hönscheid

Fremdsprachen: Englisch und Spanisch

Schulische Ausbildung

1994 Abitur am Gymnasium am Ölberg in Königswinter

Ersatzdienst

1994-1995: Betreuende Tätigkeit im Haus St. Elisabeth in Bad Honnef, einem Heim für geistig behinderte Menschen.

Studium

Physikum im März 1998 in Homburg/Saar, 1. Staatsexamen im März 2000 in Homburg/Saar, 2. Staatsexamen im März 2002 in Homburg/Saar, 3. Staatsexamen im Juni 2003 in Bonn.

Ärztliche Tätigkeiten

Von August 2003 bis Oktober 2004 Arzt im Praktikum im Klinikum Siegburg.

Seit November 2004 Assistenzarzt der Gastroenterologie & Hepatologie des Klinikum Siegburg.