

**Aus dem Institut für Physiologie der Universitätsklinik Tübingen**

**Abteilung Physiologie I**

**Direktor: Professor Dr. F. Lang**

**Die Rolle des zweiwertigen Kationenrezeptors (SCAR)**

**bei der Magensäuresekretion**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Eberhard-Karls-Universität**

**zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Philipp Kirchhoff**

**aus Wermelskirchen**

**2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Gutachter: Professor Dr. F. Lang

2. Gutachter: Professor Dr. U. Quast

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1. Physiologie der Magensäuresekretion	1
1.1.1. Regulation der Säuresekretion	1
1.1.2. Die Parietalzelle	4
1.1.3. Aufbau und Funktion der H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	7
1.2. Störungen der Magensäuresekretion	9
1.2.1. Ätiologie	9
1.2.2. Pharmakologische Behandlung	9
1.3. Charakterisierung des zweiwertigen Kationenrezeptors (CAR) und seine Funktion	10
1.4. Vorkommen und Funktion von CAR im Magen	16
1.5. Fragestellung der Arbeit	18
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	<b><u>19</u></b>
2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen	19
2.1.1. HEPES-Ringer-Lösung	19
2.1.2. HEPES-Ringer-Lösung ohne Natriumchlorid	19
2.1.3. HEPES-Ringer-Lösung ohne Magnesium und reduziertem Kalzium	21
2.1.4. Andere verwendete Substanzen	22
2.2. Intrazelluläre pH-Messung mit BCECF	23
2.3. Intrazelluläre Kalzium-Messung	25
2.4. Isolierung der Magendrüsen	26
2.5. Durchführung der Experimente	27
2.6. Auswertung und Statistik	28

<b>3. Versuche und Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1. Kontrollversuch	29
3.2. Stimulation mit Histamin	31
3.2.1. Gabe eines Protonenpumpenhemmers und Histamin	31
3.2.2. Stimulation mit Histamin unter verschiedenen extrazellulären Magnesium- und Kalziumkonzentrationen	33
3.3. Stimulation mit Gadolinium	36
3.3.1. Gabe von Gadolinium unter Histaminstimulation und Kationenreduktion	36
3.3.2. Gabe von Cimetidin (H <sub>2</sub> -Rezeptorblocker) und Gadolinium	36
3.3.3. Gabe von Omeprazol (Protonenpumpeninhibitor) und Gadolinium	37
3.4. Messung des intrazellulären Kalziums	40
<b>4. Interpretation und Diskussion</b>	<b>42</b>
4.1. Fehlerdiskussion	42
4.1.2. Lösungen	42
4.1.3. Geräte	42
4.1.4. Tiere, Drüsen	42
4.2. Die Rolle von SCAR im Magen	43
4.2.1. Einfluß von SCAR auf die gastrale Säuresekretion	43
4.2.2. Einfluß von SCAR auf die Kalziumhomöostase	46
4.2.3. Andere mögliche Funktionen von SCAR	47
4.3. Offene Fragen und medikamentöse Therapieansätze	48
<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
Danksagung	60
Lebenslauf	61

## 1. Einleitung

### 1.1. Physiologie der Magensäuresekretion

#### 1.1.1. Regulation der Säuresekretion

Der Magen besitzt die Fähigkeit, eine große Menge an Salzsäure (HCL) zu sezernieren. Bei durchschnittlich 1 Mrd. Belegzellen liegt die basale Sekretion einer sauren Flüssigkeit (pH 1-2) bei einem mittleren Volumen von 60-80 ml/h und nach maximaler Stimulierung beträgt sie bis zu 200 ml/h. Dieses Phänomen ist schon seit über 150 Jahren bekannt und seitdem häufig Thema wissenschaftlicher Forschung. Dabei haben sich schon früh zwei Schwerpunkte herauskristallisiert, welche heute noch aktuell sind, jedoch aufgrund ihrer Komplexität nicht mehr getrennt voneinander betrachtet werden sollten. Zum einen beschäftigt man sich mit der genauen Regulation der Säuresekretion, zum anderen mit den eigentlichen Mechanismen des Sekretionsablaufes.

Der gesamte Magen ist von einer Schleimhaut aus Zylinderepithel bedeckt, dessen Zellen Schleim und Pepsinogen II sowie Bikarbonat und Natrium sezernieren. Die Magendrüsen, die in die Foveolae gastricae münden, weisen topographische Unterschiede auf.

Die Kardiaregion ist ein schmaler Saum von 1-4cm Ausdehnung unterhalb der Ösophaguseinmündung mit tubulären, stark verzweigten, geschlängelten Drüsen.

Die Fundus-Korpusregion macht 1/4 des gesamten Magens aus. Ihre Drüsen sind mit den schleimbildenden Nebenzellen, mit enterochromaffinen Zellen, mit den säurebildenden Belegzellen und den Pepsinogen-I- und II-Zellen ausgekleidet.

Die Pylorusregion macht 15-20 % des Magens aus und enthält einfach verzweigte tubuläre Drüsen, die im wesentlichen Schleim absondern. Die Besonderheit dieser Region besteht in den G-Zellen, welche Gastrin produzieren (1).

Die Freisetzung von Magensäure unterliegt einem Regelkreis sich gegenseitig rückkoppelnder mechanischer, chemischer, nervaler und hormoneller Faktoren. Das klassische Modell unterscheidet zwischen einer neuronalen Aktivierung durch **Acetylcholin** als Transmitter und einem endokrinen Einfluss durch **Gastrin** und **Histamin**. Das gemeinsame Ziel der peripheren Regulationsmechanismen ist die

Feinabstimmung von diesen drei Botenstoffen, welche direkt auf die Parietalzelle einwirken.

Acetylcholin stammt aus den postganglionären Fasern des enteralen Nervensystems (ENS), die in der Mukosa und der Muskularis enden. Der parasymphatische Transmitter wird schließlich durch zentrale Reize, hauptsächlich vom Vagus Kern ausgehend, in den Extrazellulärraum freigesetzt, um spezifische cholinerge Rezeptoren vom muskarinischen Typ zu stimulieren. Die Parietalzelle wird direkt über den muskarinischen Rezeptor vom Typ 3 aktiviert (2). Weiterhin führt ACh zur Freisetzung von Histamin aus den ECL-Zellen (enterochromaffin-like-cells) im Magenfundus und von Gastrin aus den G-Zellen des Magenanspruchs. Auf die Somatostatinausschüttung der D-Zellen wirkt ACh inhibitorisch (3). Quantitativ spielt die direkte und indirekte Stimulierung der Histaminfreisetzung aus den ECL-Zellen eine weitaus größere Rolle als die direkte Wirkung von ACh auf die Parietalzelle.

Histamin wird parakrin aus den ECL-Zellen des Magenfundus sezerniert. Diese Zellen sind sehr klein (8-10 µm Durchmesser), subepithelial gelegen und im unteren Drittel der Magendrüse in direkter Nähe zu den Haupt- und Parietalzellen lokalisiert. Sie sind in der Lage Histamin mittels dem Enzym Histidindecaboxylase zu synthetisieren und in Vesikeln zu speichern, wobei Gastrin die Expression der Histidindecaboxylase reguliert (4, 5). Die Kontrolle der Histaminausschüttung erfolgt über Gastrin aus den G-Zellen, welches den Cholecystokin-B-Rezeptor (CCK-B) in der ECL-Zellmembran aktiviert. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, deren Signaltransduktion über eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP und/oder Kalzium abläuft. Das erhöhte intrazelluläre Kalzium ( $Ca^{2+}_i$ ) führt schließlich zur Aktivierung von vesikelassoziierten Membranproteinen (Synaptobrevin, Synaptophysin), welche die Exozytose von den histaminspeichernden Vesikeln in den Extrazellulärraum bewirken (6). Neben Gastrin können auch Acetylcholin und  $\beta$ -Sympathikomimetika die Histaminfreisetzung stimulieren (3,7,8). Zudem kann durch Gastrin eine Hyperplasie und Hypertrophie der ECL-Zellen ausgelöst werden. Dieses Phänomen konnte bei langer antisekretorischer Therapie mit Protonenpumpenhemmstoffen beobachtet werden, weil diese mit einem erhöhten Plasmagastrinspiegel einhergeht und zu ECL-Zellkarzinoiden führen kann (9,10). Die maximale Menge an sezerniertem Histamin ist sehr klein und erreicht im

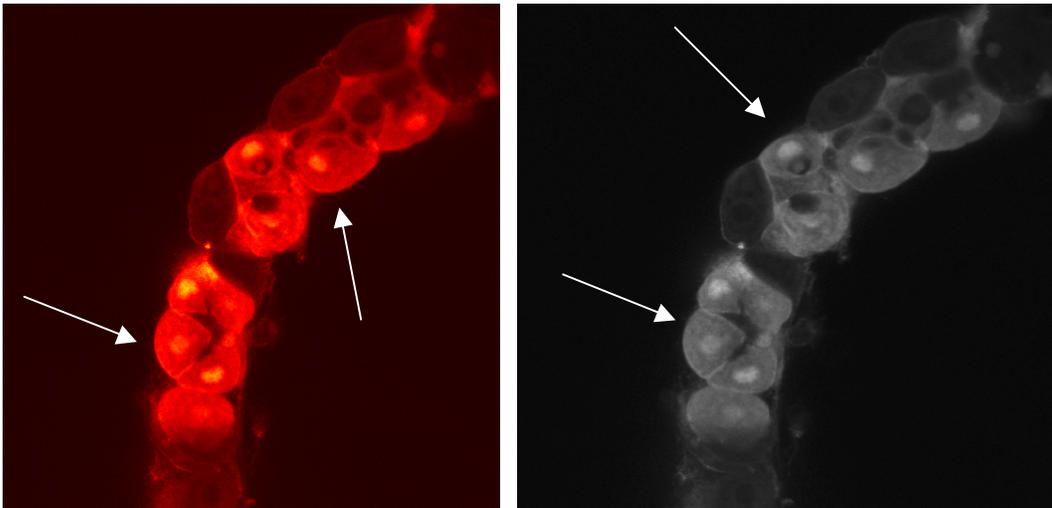
Extrazellulärraum eine maximale Konzentration von  $1\mu\text{mol/L}$ . Im Blutkreislauf ist diese nicht messbar und somit können systemische Effekte nahezu ausgeschlossen werden. Gehemmt wird die ECL-Zelle durch Somatostatin (SS), indem der gastrininduzierte Kalziumeintritt in die Zelle verhindert wird, und durch Histamin infolge negativer Rückkopplung über den  $H_2$ -Rezeptor (11).

Gastrin ist ein Hektadekapeptid (G-17) und gelangt von den G-Zellen im Antrum und im Duodenum durch Exozytose in den Extrazellulärraum, von wo es in den Blutkreislauf diffundiert und an Zielorganen hormonelle Wirkungen auslöst. Die G-Zellen grenzen mit ihrer apikalen Membran direkt an das Drüsenlumen und können so von luminalen Stoffen beeinflusst werden (12). Die Gastrinfreisetzung wird durch ACh, GRP (gastrin-releasing-peptide), Protonen und Aminosäuren stimuliert. Die quantitative größte Bedeutung hierbei besitzt der pH-Wert. Beträgt dieser  $> \text{pH } 3$  so kommt es zur Steigerung der Gastrinkonzentration im Magen, bei Werten  $< \text{pH } 3$  zu dessen Verminderung (13). Auch Aminosäuren, insbesondere aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und Phenylalanin, fördern die Gastrinausschüttung (14). Ob diese direkt mit der apikalen Membran der G-Zelle interagieren oder internalisiert werden, um die Zelle zu aktivieren, ist nicht bekannt. GRP ist ein weitverbreitetes Peptid, welches in Nervenfasern von Magenantrum und Fundus lokalisiert ist und nach vagaler Reizung freigesetzt wird und stimulierend auf die G-Zelle wirkt. Auch die intrazelluläre Signaltransduktion der G-Zelle erfolgt vornehmlich über cAMP und einen  $\text{Ca}^{2+}_i$  Anstieg. Neben einem niedrigen pH-Wert wird die Gastrinsekretion noch durch Somatostatin (SS) gehemmt (12,14,15,16).

Die oben beschriebenen endokrinen Zellen des Magens, ECL-Zellen, D-Zellen und G-Zellen regulieren die Histaminausschüttung. Histamin wiederum aktiviert zusammen mit ACh und Gastrin die Säuresekretion der Parietalzelle. Oberstes Ziel ist die Herstellung eines der Nahrungssituation angepassten pH-Wertes im Magen. Ein direkter Zusammenhang besteht jedoch nur zwischen Gastrinfreisetzung und pH-Wert. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß neben diesem Regelkreis noch andere Mechanismen existieren, weil manche Stoffe (ACh, Histamin) auch direkten Einfluss auf die Parietalzelle haben und damit getrennt voneinander reguliert werden müssen. Das folgende Kapitel befasst sich nun näher mit der Parietalzelle, dem eigentlichen Ort der Säuresekretion, sowie deren Rezeptoren und intrazellulären Signaltransduktionen.

### 1.1.2. Die Parietalzelle

Die Parietalzelle kommt vorwiegend im Fundus der antralen Magendrüsen vor. Es ist eine große, konisch geformte Zelle, die reichlich Mitochondrien enthält und mit der apikalen Membran direkten Kontakt zum Drüsenlumen hat (siehe Abbildung 1). Ferner besitzt diese Zelle ein dichtes intrazelluläres System von kanalikulären Tubulovesikeln, auf deren Funktion im Rahmen der Protonenpumpe später noch eingegangen wird.



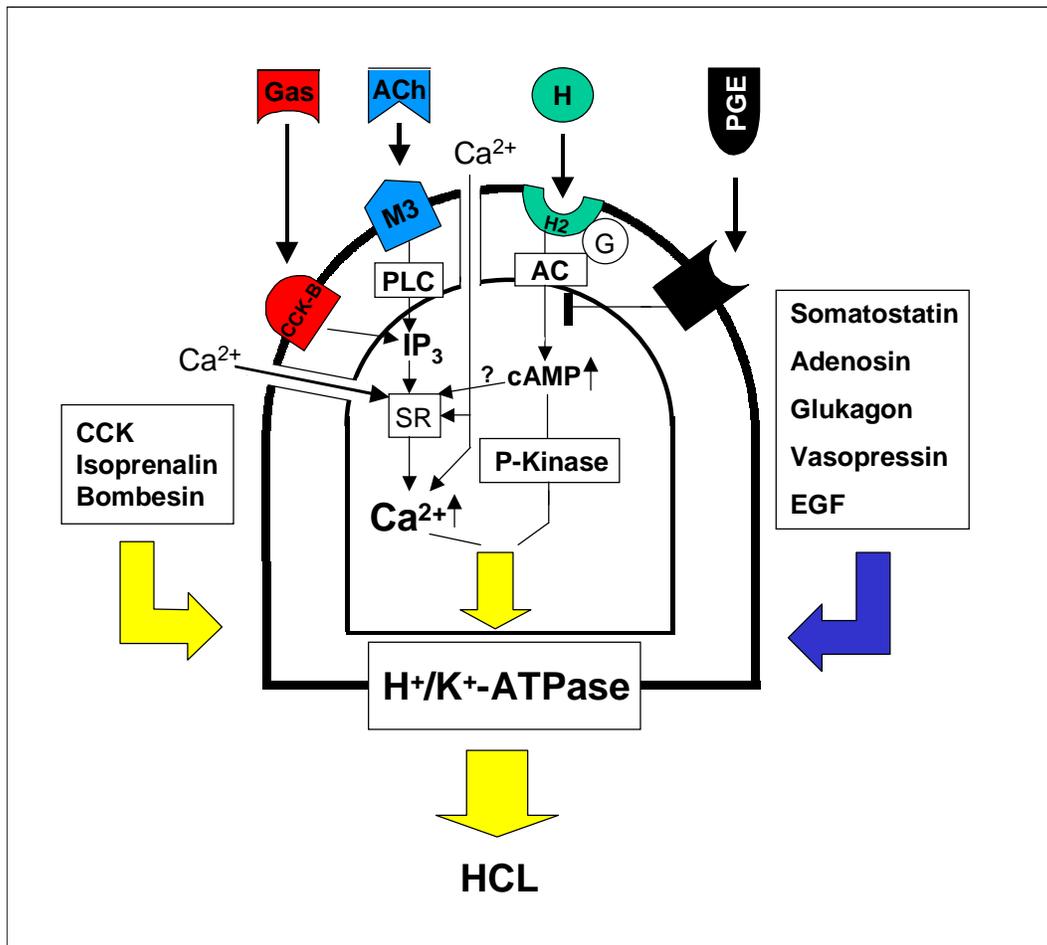
**Abbildung 1:** Aufnahmen einer isolierten Rattenmagendrüse mittels konfokaler Mikroskopie. Linke Darstellung mit Rotfilter, rechts das Nativbild unter normaler Durchleuchtung. Vergrößerung 300X. Es sind zahlreiche Parietalzellen (siehe Pfeile) mit typischer Lage und Form zu erkennen. (Fotos:P.Kirchhoff)

Die Zelle weist Rezeptoren an der basolateralen Membran auf, die sowohl stimulierende als auch inhibitorische Funktionen haben. Solche Rezeptoren konnten durch in situ Hybridisierung, Immunhistochemie, spezifische Agonisten und Antagonisten nachgewiesen bzw. näher charakterisiert werden (67). Die quantitativ bedeutendste Stimulierung der Säuresekretion erfolgt über Histamin-, Gastrin- und Acetylcholinrezeptoren in der basolateralen Membran der Parietalzellen (siehe Abbildung 2). Weil Acetylcholin und Gastrin aber hauptsächlich indirekt über die Freisetzung von endogenem Histamin aus den ECL-Zellen Einfluss nehmen, ist Histamin der wichtigste direkte Ligand bei der Säuresekretion. Histamin bindet an den H<sub>2</sub>-Rezeptor, der geklont und exprimiert werden konnte und eine für G-Protein

gekoppelte Rezeptoren typische Aminosäuresequenz mit 7 transmembranösen Segmenten aufweist (9,18,19). Intrazellulär aktiviert der Rezeptor die Adenylatzyklase und führt zu einem Anstieg des cAMPs. Dies bewirkt eine geringgradige Erhöhung des intrazellulären Kalziums und eine cAMP-abhängige Aktivierung einer Proteinkinase (20,21). Wie diese Kaskade die  $H^+/K^+$ -ATPase (Protonenpumpe) stimuliert ist nicht genau bekannt. Der  $H_2$ -Rezeptor kann durch selektive Antagonisten kompetitiv gehemmt werden, während eine Hemmung dieses Rezeptors durch andere sekretionsstimulierenden Agonisten wie Acetylcholin und Gastrin nicht nachgewiesen werden konnte. Dies spricht für die direkte Interaktion von Histamin auf den  $H_2$ -Rezeptor der Parietalzelle. Umgekehrt drosseln  $H_2$ -Antagonisten, die durch Gastrin und Acetylcholin ausgelöste Säuresezernierung, was für eine Histaminabhängigkeit dieser Aktivierungsvorgänge spricht (22).

Die ausgelöste Säuresekretion durch Acetylcholin unterliegt neben oben erwähnten indirekten Einflüssen, einer direkten Vermittlung durch den muskarinischen Rezeptor vom Typ M-3 in der basolateralen Parietalzellmembran mit anschließender Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und dem  $IP_3$  vermitteltem  $Ca^{2+}_i$  Anstieg (23).

Gastrin scheint die Parietalzelle durch den nachgewiesenen Cholecystokin-B-Rezeptor (CCK-B) zu stimulieren. Dies bewirkt über Inositoltriphosphat und Kalziumeinstrom einen Anstieg des intrazellulären Kalziums. Unter  $H_2$ -Antagonisten ist die gastrininduzierte Säuresekretion jedoch nicht zu beobachten. Histaminstimulierung ist also eine Bedingung für den direkten Einfluss von Gastrin. Dafür spricht auch die nachgewiesene Abhängigkeit des  $Ca^{2+}_i$  Anstieges von der intrazellulären cAMP Konzentration, welche durch Histamin bedingt ist (24, 25). Einige Autoren gehen sogar davon aus, dass die Gastrinwirkung vollständig durch die ECL-Zelle vermittelt wird (25). Es gibt eine Vielzahl von weiteren Stoffen, welche die Säuresekretion über die Parietalzelle hemmen oder stimulieren. Die genauen Mechanismen sind jedoch wenig bekannt. Bei Prostaglandin E (PGE) scheint eine direkte rezeptorvermittelte Hemmung der Säuresekretion erwiesen (26). Die gemachten Ausführungen sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Darstellung der parietalen Zellrezeptoren mit intrazellulärer Signaltransduktion. Die Aktivierung durch Gastrin und Acetylcholin führt zu einem intrazellulären Kalziumanstieg durch Öffnen von Kalziumkanälen in der Zellmembran und Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Phospholipase C. Der Histaminrezeptor ist G-Proteingekoppelt und bewirkt über eine Aktivierung der Adenylatcyclase einen Anstieg des cAMP. Prostaglandin E inhibiert die Adenylatcyclase.

Abkürzungen: Gas = Gastrin, Ach = Acetylcholin, H = Histamin, PG = Prostaglandin E, CCK = Cholecystokinin, EGF = rowth factor, PLC = Phospholipase C, A = Adenylatcyclase, IP3 = Inositol-triphosphat, G = G-Protein, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, CCK-B = Cholecystokinin-B-Rezeptor, M3=Muskarinischer Rezeptor vom Subtyp 3.

Gelbe Pfeile stellen stimulierende und blaue hemmende Effekte dar.

### 1.1.3. Aufbau und Funktion der $H^+/K^+$ -ATPase

Alle regulativen Elemente der Säuresekretion, sowohl endokriner als auch neuronaler Art, finden in der gastralen Protonenpumpe ihre gemeinsame Endstrecke. Das Protein, welches nur in der apikalen Membran der Parietalzelle und eventuell in Zwischenzellen vom  $\alpha$ -Typ im Sammelrohr in der Niere vorkommt, ist als  $H^+/K^+$ -ATPase identifiziert worden und gehört zur Gruppe der ionentransportierenden P-ATPasen (27). Es ist ein heterodimeres Protein, und besteht aus einer großen  $\alpha$ -Einheit mit 1035 Aminosäuren und einer kleinen  $\beta$ -Einheit mit 290 Aminosäuren (28).

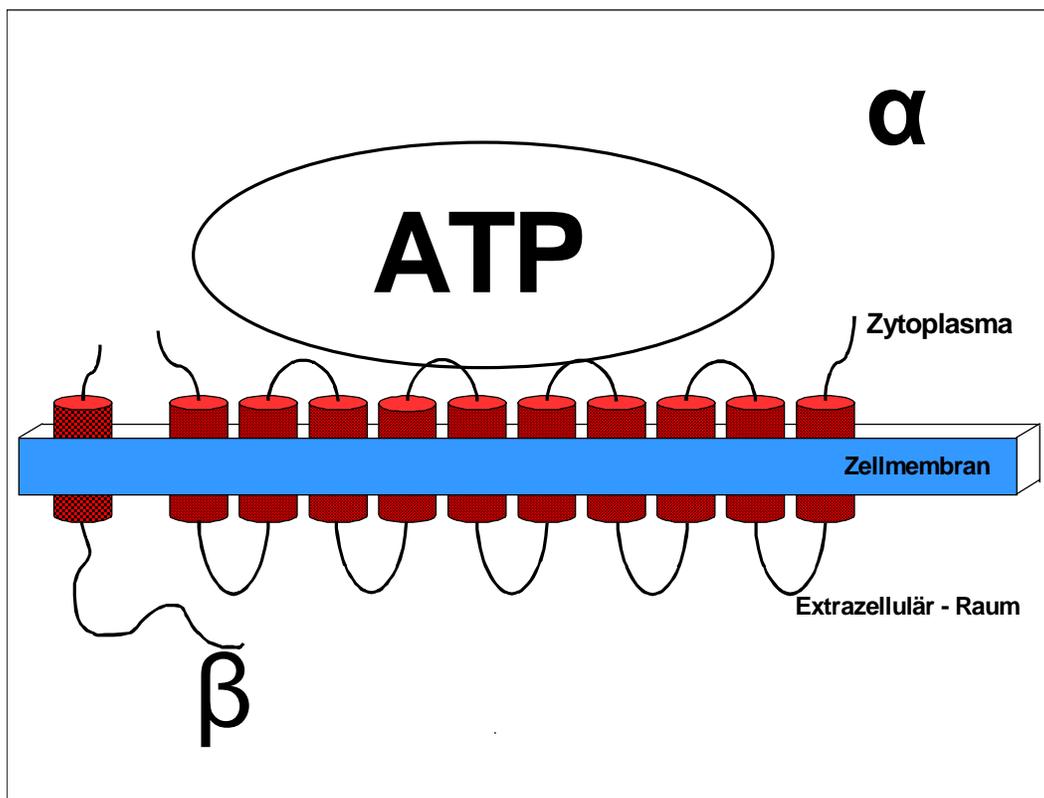
Die Energie für den primär aktiven Ionentransport stammt aus der Hydrolyse von ATP. Dies ist eine chemische Reaktion, welche eine Konformationsänderung des Proteins induziert und somit den Transport von Ionen ermöglicht. Die Transportreaktion ist elektroneutral und bewirkt den Austausch eines zytoplasmatischen Protons gegen ein extrazelluläres Kaliumion, wobei die Funktion der Pumpe vom extrazellulärem Kalium abhängig ist (29). Mit Aktivierung der Sekretion strömen Protonen aus der Parietalzelle in die sekretorischen Kanalikuli, wobei das Kaliumion über einen bislang unbekanntes Mechanismus wieder reabsorbiert wird. Hieraus resultiert die hohe HCl-Konzentration (pH 0.8) im Kanalikulilumen. Zeitgleich zur Aktivierung der Protonenpumpe kommt es zu einem Ausstrom von intrazellulären Chloridionen in das Drüsenlumen. Diese bilden mit den Protonen dann intraluminal das HCL. Der beteiligte Chloridkanal ist als ClC-2 Kanal identifiziert worden und scheint bei Inaktivität, ähnlich wie die Protonenpumpe, internalisiert zu werden (29a).

Die Säuresekretion ist die Folge der Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase. Diese Aktivierung geht mit einer morphologischen Transformation der Zelle einher, weil das Enzym von den zytoplasmatischen Tubulovesikeln zu der kanalikulären Membran transportiert wird (30,31,32). Nur in dieser apikalen Membran sezerniert die Pumpe Protonen, nicht aber in den intrazellulären Vesikeln, in die das Protein bei einer Abnahme der Sekretion wieder internalisiert wird (33). Dieser morphologische Umbau, vermittelt durch das Zytoskelett, ist essentiell für die Regulation der HCl-Produktion.

Beim eigentlichen Ionentransport unterliegt die ATPase einem Kreislauf von Phosphorylierung und Dephosphorylierung, wobei sich die Affinitäten der Ionenbindungsstellen verändern. Sind im Zytoplasma Magnesium, Protonen und ATP vorhanden so befindet sich das Enzym in phosphoryliertem Zustand und bindet ein

Proton. Dann wechselt die Ionenbindungsstelle auf die extrazelluläre Seite, wo das Proton jetzt in hydratisierter Form gebunden ist. Das Hydroniumion löst sich von dem Enzym und die Stelle kann von einem Kaliumion besetzt werden. Die hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration bewirkt die Dephosphorylierung der Pumpe, was zu einem Transport des Kaliumions in das Zytoplasma führt (34,35,36).

Als zweidimensionale Struktur des Proteins wird ein Modell propagiert, in dem die große Einheit aus 10 transmembranären Segmenten und die kleine Einheit aus einem solchen Segment besteht (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Die 2-dimensionale Struktur der gastralen  $H^+/K^+$ -ATPase mit 10 Segmenten der  $\alpha$ -Einheit und einer  $\beta$ -Einheit, welche transmembranär angeordnet sind. Die ATP-Bindungsstelle liegt zytoplasmatisch im Bereich der großen Einheit, während der Anteil der  $\beta$ -Einheit auf der extrazellulären Seite überwiegt (Modell nach Caplan MJ. in Current Opinion of Cell Biology 1998:10(4):468-73).

Die genaue Funktion der Segmente ist noch größtenteils unbekannt, doch ist die  $\alpha$ -Einheit Ort der Phosphorylierung durch ATP und damit der katalytische Teil der

Pumpe. Das transmembranäre Segment der  $\alpha$ -Einheit ist primär extrazellulär gelagert und hat 6-7 glykolysierte Domänen sowie 3 Disulfidbindungen. Diese Einheit ist für den korrekten Zusammenbau, die Stabilität und den Einbau der Pumpe in die apikale Membran zuständig. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei einer Abnahme der Säuresekretion die Protonenpumpe wieder internalisiert wird. Dieser Prozess wird von der  $\beta$ -Untereinheit gesteuert, welche eine Aminosäuresequenz hat, die tyrosin-gekoppelten Endozytosesignalen homolog ist (36).

Einige Elemente der Struktur und Funktion dieses heterodimeren Proteins konnten mit Hilfe bestimmter Inhibitoren näher charakterisiert werden. Deren Wirkungsweise und klinische Bedeutung wird im folgenden Abschnitt erläutert.

## **1.2. Störungen der Magensäuresekretion**

### **1.2.1. Ätiologie**

Gastritis, Refluxösophagitis und das Duodenalulkus können im Allgemeinen als Folge eines Ungleichgewichtes zwischen Magensäuresekretion und zellulären Schutzmechanismen verstanden werden, wenngleich auch deren Ursachen sehr vielfältig sind. Normalerweise besitzt der Magen die Eigenschaft der Säureresistenz. Diese resultiert zum einen aus der speziellen Morphologie der verschiedenen Magenzellen und deren Verbund durch tight junctions und zum anderen aus der Muzinschicht und der Bicarbonatsekretion. Verliert der Magen eine Komponente dieser schützende Eigenschaft, kann es durch die anwesende Magensäure zu den oben genannten Krankheitsbildern kommen.

Für die Entstehung von Duodenal- und Magengeschwüren ist neben der erhöhten Magensäure auch der Reflux von Duodenalflüssigkeit oder eine bakterielle Infektion mit *Helicobacter pylori* verantwortlich (37).

### **1.2.2. Behandlungsmethoden**

Ziel der Behandlung ist die Reduktion der Magensäuresekretion. Dies kann chirurgisch durch eine Vagotomie erfolgen, wodurch die zentrale Stimulation durch den Transmitter Acetylcholin unterbrochen wird. Wegen der hohen Problemrate der chirurgischen Therapie werden heute pharmakotherapeutische Methoden bevorzugt.

Selektive Histaminrezeptorenblocker (Cimetidin, Ranitidin, etc.) vermindern die Stimulation der Sekretion durch kompetitive Hemmung des gastralen H<sub>2</sub>-Rezeptors. Da die Magensäuresekretion aber auch durch andere Mediatoren stimuliert wird, ist die Unterdrückung nicht vollständig.

Am effektivsten sind die Protonenpumpenblocker (Omeprazol, Lanzoprazol, Pantoprazol etc.), welche die gastrale H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase irreversibel hemmen. Diese Medikamente sind schwache Basen, welche sich bevorzugt in einem sauren Milieu mit einem pH-Wert unter 4 anreichern. Diese Voraussetzung wird an der kanalikulären Membran der Parietalzelle erfüllt, wo die Protonenpumpe in ihrem aktiven Zustand eingebaut ist. Dort unterliegen die Stoffe einer säureabhängigen Umsetzung in ein Sulfonamid, welches mit Zysteinresten der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase eine kovalente Bindung eingeht (38). Erst eine Neusynthese des Transportproteins lässt die Säuresekretion nach ca. 72-96 Stunden wieder auf den Ausgangswert ansteigen. So genügt eine Tagesdosis, um innerhalb von drei Tagen einen konstanten Medikamentenspiegel und eine vollständige Hemmung zu erreichen. Diese Eigenschaften machen die Stoffe hochspezifisch für die gastrale Protonenpumpe.

Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* ist eine Kombination von Protonenpumpenhemmern und Antibiotika (Amoxicillin, Clarithromycin) zu empfehlen. Durch Anheben des pH-Wertes, insbesondere im Magenfundus, kommt es zu einem schnelleren Wachstum des Bakteriums und die Antibiotika können so effektiver die Protein- und Zellwandsynthese hemmen, was in 80-85% der behandelten Patienten zur Eradikation des Bakteriums führt (39).

Da die Kontrolle der Magensäuresekretion durch Protonenpumpenhemmer vielleicht schon an die Grenzen des Möglichen gestoßen ist, wird in Zukunft das Interesse eventuell auf der Unterstützung des Heilungsprozesses, sowie der Vermeidung und Bekämpfung der *Helicobacter pylori* Infektion liegen.

### **1.3. Charakterisierung des zweiwertigen Kationenrezeptors (CAR) und seine Funktionen**

Bei nahezu allen physiologischen Prozessen spielen intra- und extrazelluläre Kalziumionen (Ca<sup>2+</sup>) eine Rolle (40). Das intrazelluläre Kalzium (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) fungiert als second messenger und als Kofaktor bei enzymatischen Vorgängen, es kontrolliert und

koordiniert zelluläre Funktionen wie Muskelkontraktionen, Hormonsekretion, Glykogenmetabolismus, Zelldifferenzierung, Zellteilung und -beweglichkeit (41). Die basale Konzentration des zytosolisch freien Kalziums beträgt annähernd 100 nanomol/L, kann aber bei Zellaktivierung auf 1  $\mu\text{mol/L}$  und mehr ansteigen. Dabei stammt das Kalzium entweder aus intrazellulären Speichern und/oder aus extrazellulärer Aufnahme.

Im Gegensatz dazu ist die Konzentration der freien extrazellulären Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}_0$ ) mit 1 mM ungefähr 10.000 mal höher und weicht unter normalen Umständen nur um wenige Prozent vom Mittelwert ab (40). Freies und gebundenes Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}_0$ ) ist die Quelle für alle intrazellulären Kalziumionen und ein essentielles Kation für die Blutgerinnung, die elektromechanische Kopplung in Skelett-, Herz- und glatten Muskeln, die Sekretionsaktivität exokriner und endokriner Drüsen und die Zelladhäsion (42). Dies macht die enorme Wichtigkeit eines stabilen Kalziumhaushaltes deutlich.

An diesem Kontrollprozeß sind die Nebenschilddrüsen, die thyroidalen C-Zellen, die Nieren, die Skelettknochen und der Gastrointestinaltrakt beteiligt. Man unterscheidet zwei Steuerungswege, die zur Stabilität des Kalziumlevels führen:

- a) Kalziumströme zwischen Extrazellulärraum und Umwelt durch Änderung von renaler Ausscheidung und/oder gastrointestinaler Absorption von Kalzium und
- b) der gegenseitige Austausch von Kalziumionen zwischen Extrazellulärraum und Knochen (40).

Die drei wichtigsten Hormone, welche auf diese Homöostase Einfluss nehmen sind das Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse, das Kalzitinin aus den C-Zellen der Schilddrüse und das Vitamin-D-Hormon aus der Niere (siehe Abbildung 4).

Bei erniedrigter Kalziumkonzentration im Blut kommt es zur Ausschüttung von Parathormon, welches am Knochen die Osteoklasten aktiviert. Dadurch werden Kalzium- und Phosphationen freigesetzt. Eine Akkumulation von Phosphationen wird dadurch verhindert, daß das Parathormon an der Niere deren Ausscheidung fördert, wohingegen die Kalziumausscheidung über die Niere vermindert wird. Zudem bewirkt das Parathormon im proximalen Tubulus der Niere die C1-Hydroxylierung des 25-(OH)-Vitamin-D in das biologisch wirksame 1,25 (OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D-Hormon. Dieses Hormon erhöht am Darmepithel die Kalziumrückresorption und wirkt negativ rückkoppelnd auf die Parathormonsekretion der Epithelkörperchen (43) .



Um diese Homöostase zu gewährleisten bedarf es einer genauen Registrierung der extrazellulären Kalziumkonzentration. Durch die Charakterisierung und Klonierung eines Kalziumrezeptors (CaR) aus der Nebenschilddrüse des Rindes wurde erstmals bewiesen, daß Kalzium eine hormonähnliche Rolle als extrazellulärer first messenger einnimmt, und dieser den Zellen ermöglicht physiologische Änderungen des  $\text{Ca}^{2+}_0$  zu erkennen und entsprechend entgegenzuwirken (44).

Bis heute ist mit Hilfe von Klonierung und DNA-Hybridisierungstechnik der CaR in folgenden Geweben kloniert worden: Gehirn, Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Plazenta, C-Zellen der Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Linsenepithelzellen, Keratinozyten und Knochen. Diese werden nicht nur durch zweiwertige Kationen ( $\text{Ca}^{2+}_0$ ,  $\text{Mg}^{2+}_0$ ,  $\text{Ba}^{2+}_0$ ,  $\text{Sr}^{2+}_0$ ) sondern auch von dreiwertigen Kationen ( $\text{Gd}^{3+}_0$ ,  $\text{Al}^{3+}_0$ ,  $\text{La}^{3+}_0$ ) und organischen Polykationen (Neomycin, Spermin, Putrescin) aktiviert (40,45,46,47). Physiologisch kommen jedoch nur  $\text{Ca}^{2+}_0$ ,  $\text{Mg}^{2+}_0$  und Spermin als Agonisten in relevanten Konzentrationen vor. Alle zweiwertigen Kationenrezeptoren sind dem primär klonierten CaR sehr ähnlich und weisen eine 90% Homologie ihrer Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturen auf (48).

Bezüglich der Topologie des menschlichen CaRs werden 3 Hauptdomänen unterschieden:

- 1) Ein großer extrazellulärer, hydrophiler Teil mit Aminoterminus, welcher aus 612 Aminosäuren besteht und als Bindungsstelle der Agonisten fungiert.
- 2) Die hydrophobe Domäne mit 250 Aminosäuren, welche sich aus 7 transmembranösen Segmenten zusammensetzt und damit typisch für die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist.
- 3) Einem zytosolisch lokalisierten Carboxyterminus mit 217 Aminosäuren.

Vergleicht man diese Struktur mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren so finden sich Ähnlichkeiten mit dem Glutamatrezeptor (mGluR), dem  $\text{GABA}_B$ -Rezeptor und dem Pheromonrezeptor des veromonasalen Organes (49,50). Während die Aminosäuresequenz des CaRs nur mit 18-24% der des GluR Homologie aufweist, besitzen beide eine große extrazelluläre Domäne sowie 20 Cysteinreste. Diese Reste könnten sogenannte Bindungstaschen für ihre Liganden bilden. Ferner sind einige GluRs in der Lage durch einen Aminosäurenrest (Ser 166) in Nähe der Glutamatbindungsstelle  $\text{Ca}^{2+}_0$

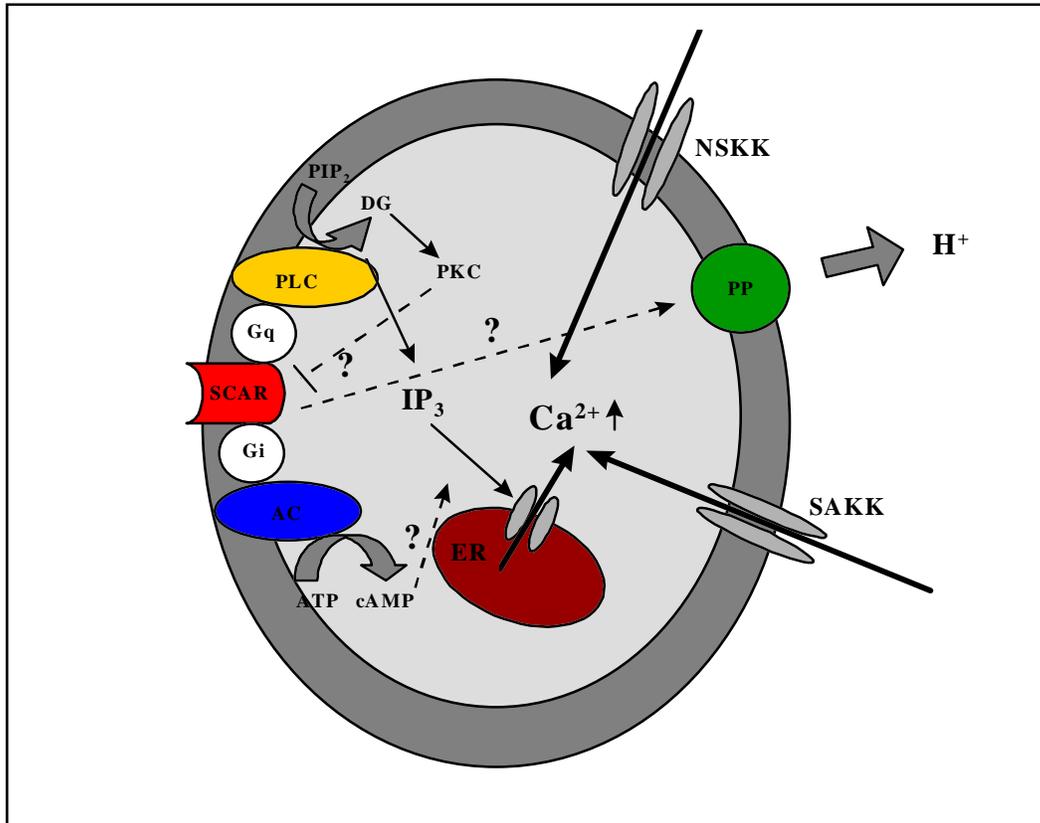
zu registrieren (51). Ob bei CaR ähnliche Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}_0$  vorliegen, konnte noch nicht geklärt werden. Bei allen drei genannten Rezeptoren ist es jedoch wahrscheinlich, dass die jeweils kleinen Liganden mit der großen extrazellulären Domäne des Rezeptorproteins interagieren und diese das aktivierende Signal über transmembranäre Segmente an das C-Terminus ins Zellinnere weiterleiten.

Der extrazellulären Aktivierung von CaR folgt eine Stimulierung von verschiedenen intrazellulären G-Proteinen, welche als Transducer weitere intrazelluläre Signalmoleküle beeinflussen. Agonisten von CaR erwirken eine Erhöhung der Aktivität der Phospholipasen C, A2 und D. Dies wurde bei CaR exprimierenden HEK293-Zellen (Human embryonic kidney cells) beobachtet (52). Bei der Vermittlung des CaRs zur Aktivierung der PLC ist von einer Beteiligung des  $G_q$ , vielleicht  $G_{11}$ , auszugehen, weil sie nicht durch das Pertussistoxin hemmbar ist (52). Die Stimulierung der PLD und  $\text{PLA}_2$  geschieht indirekt über eine Proteinkinase C, welche wiederum PLC abhängig angetrieben wird.

Im weiteren kommt es über PLC zu einem  $\text{IP}_3$  (Inositol-1,4,5-triphosphat) vermittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg. Das Kalzium stammt entweder aus intrazellulären Speichern oder dem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Letzteres geschieht unter anderem durch einen nichtselektiven Kationenkanal, der bei hohem  $\text{Ca}^{2+}_0$  geöffnet wird, oder aber auch direkt von CaR beeinflusst werden könnte (53).

Hohes  $\text{Ca}^{2+}_0$  führt jedoch auch zu einer Verminderung von cAMP, welche durch Pertussistoxin gehemmt werden kann. Somit kann auf eine CaR vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase geschlossen werden, die unter Beteiligung von inhibitorischem G-Protein ( $G_i$ ) abläuft (54,55).

Wie die Erhöhung von  $\text{Ca}^{2+}_i$  und die Hemmung der Adenylatcyclase durch CaR die zellulären Effekte (z.B. Verminderung der PTH-Ausschüttung) auslöst und ob gegebenenfalls noch andere Signaltransduktionsmechanismen bestehen, ist bis jetzt nicht bekannt (siehe Abbildung 5)



**Abbildung 5:** Schema der intrazellulären Signalkaskade von SCAR in der Parietalzelle. Die Aktivierung von SCAR bewirkt eine  $G_q$ -vermittelte Stimulation von PLC. Über einen Anstieg von  $IP_3$  kommt es zu Mobilisation von Kalzium aus den Intrazellulären Speichern (ER) sowie Einstrom von Kalzium über nichtselektive Kalziumkanäle und spannungsabhängige Kalziumkanäle aus dem Extrazellulärraum. Das Entstehen der Proteinkinase C über Diacylglycerol wirkt wahrscheinlich als negativer Rückkopplungsmechanismus an den Phosphorylierungsstellen von SCAR.  $G_i$ -vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase verhindert die cAMP Entstehung. Abhängig vom Gewebetyp kann die Aktivierung von SCAR hemmend oder Stimulierend wirken. Die gestrichelten Pfeile mit Fragezeichen markieren die bisher ungeklärten Wege der Signalkaskade

Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, PKC = Protein Kinase C, AC = Adenylatzyclase,  $IP_3$  = Inositoltriphosphat, PLC = Phospholipase C,  $G_i$  = inhibitorisches G-Protein,  $G_q$  = förderndes G-Protein, NSKK = Nichtselektive Kalziumkanäle, SAKK = Spannungs-abhängige Kalziumkanäle, PP = Protonenpumpe

Neben seiner Funktion bei der Kalziumhomöostase werden dem Kalziumrezeptor eine Beteiligung bei der Zellproliferation und Differenzierung in Keratinozyten, Fibroblasten und Nebenschilddrüsenzellen zugeschrieben (56,57), sowie eine  $\text{Ca}^{2+}_0$  induzierte Chemotaxis bei Mausosteoblasten und menschlichen Monozyten im peripheren Blut (58,59). Weiterhin beeinflusst CaR die Genexpression durch Regulierung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK), welche extrazelluläre Signale zum Zellkern übermittelt und somit längerfristige Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration aufgrund von Hoch- oder Herunterregulierung involvierter Zellrezeptoren kompensiert (60,61).

Die vorangegangenen Ausführungen machen die Vielfalt der physiologischen Prozesse, an denen Kalzium und gegebenenfalls der zweiwertige Kationenrezeptor (CaR) beteiligt sind deutlich und lassen dadurch zugleich eine Beteiligung an zahlreichen unbekanntenen Mechanismen vermuten. Dem Thema vorliegender Arbeit entsprechend, wird der Rolle des CaR im Magen, insbesondere bei der Magensäuresekretion, im folgenden Kapitel nun besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

#### **1.4. Vorkommen und Funktion von CaR im Magen**

Die extrazelluläre Kalziumkonzentration scheint auf eine Vielfalt von epithelialen Transportmechanismen und Schleimhauteigenschaften der Magenmukosa Einfluss zu nehmen. Es ist schon früh bekannt geworden, dass ein Anstieg der extrazellulären Kalziumkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}_0$ ) die Säuresekretion der Magendrüsen, sowie die Bikarbonatsekretion durch die Magenschleimhautepithelzellen stimuliert (62,63). Aufgrund dieser Beobachtung schließt man auf die Fähigkeit dieser Zellen, Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}_0$  registrieren zu können. Durch RT-PCR, Immunhistochemie, Northern- und Western-Blot konnte der divalente Kationenrezeptor in folgenden Zellen des Magens nachgewiesen werden: Parietalzellen, muzinproduzierende Epithelzellen, gastrin-sezernierende Zellen des Magenantrums, und den Nervenzellen des Auerbach- und Meissnerplexus (64,65,66).

Die amplifizierte RNA Produkte aus dem Rattenmagen weisen in 99 % ihrer Sequenz eine Homologie zu CaR-Transkripten der Rattenniere auf (65). In Epithel- und Parietal-

zellen ist der CaR weitaus häufiger in der basolateralen Zellmembran als an der apikalen Seite lokalisiert (67). Bei diesen beiden Zelltypen konnte *in vitro* nach Stimulierung von CaR eine Proliferation nachgewiesen werden, was wiederum auf eine Beteiligung bei der Zellregeneration der Magenmukosa *in vivo* hinweisen könnte.

Weiterhin lösen CaR-Agonisten einen Anstieg des  $Ca^{2+}_i$  in Parietalzellen von isolierten Magendrüsen aus und potenzieren die von Histamin induzierten intrazellulären Kalziumanstiege (65). Dies zeigt die mögliche Rolle von CaR als Vermittler bei bekannter Steigerung der Magensäuresekretion durch erhöhtes extrazelluläres Kalzium. Eine hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration führt außerdem zu einer vermehrten Gastrinsekretion aus den antralen G-Zellen *in vivo* und *in vitro* (66). Wie bereits erwähnt, wurde auch in diesen Zellen der CaR identifiziert und könnte somit als regulierendes Element bei der Gastrinsekretion beteiligt sein und so indirekt auf die Säuresekretion Einfluss nehmen.

Trotz der Identifizierung von CaR in Zellen des Magens fehlt der Nachweis, ob  $Ca^{2+}_o$  assoziierte Prozesse, insbesondere die Säuresekretion der Parietalzellen, durch diesen zweiwertigen Kationenrezeptor vermittelt werden und, wenn dies der Fall ist, über welchen Signaltransduktionsmechanismus dies geschieht.

### 1.5. Fragestellung der Arbeit

Die ausgeführten Versuche basieren auf der Grundlage folgender Fragestellungen:

1. Besteht eine direkte, quantitative Korrelation zwischen verschiedenen Konzentrationen von extrazellulären zweiwertigen Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) und der HCl-Sekretion der Parietalzelle?
2. Inwiefern ist die durch Histamin stimulierte Säuresekretion von der Existenz extrazellulärer CaR-Agonisten ( $Gd^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) abhängig?
3. Erfolgt eine Säuresekretion durch den spezifischen CaR-Agonisten Gadolinium? Wenn ja, ist diese auch bei Abwesenheit von divalenten Kationen ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) und Hemmung der H<sub>2</sub>-Rezeptoren durch einen selektiven H<sub>2</sub>-Rezeptorenblocker (Cimetidin) nachweisbar?
4. Resultiert die durch CaR-Agonisten hervorgerufene Säuresekretion aus dem Einbau der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in die apikale Zellmembran der Parietalzelle und deren Aktivierung?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen**

HEPES-Ringer war die Grundlösung für die Perfusion bei den Experimenten, sowie bei der Präparation der Magendrüsen. Für bestimmte Versuchsreihen wurde sie variiert.

#### **2.1.1. HEPES-Ringer-Lösung ( Standard )**

Tabelle 1: Zusammensetzung der HEPES-Ringer-Lösung bei pH 7.4

<b>Substanz</b>	<b>MG (g/ Mol)</b>	<b>mM</b>	<b>g/ l</b>
NaCl	58.44	125	7.305
KCl	74.55	5	0.373
CaCl <sub>2</sub>	147.02	1	0.147
MgSO <sub>4</sub>	246.48	1.2	0.296
HEPES*	238.31	32.2	7.67
Glucose	180.16	5	0.9

\*HEPES ist Hydroxymethyl-aminomethan-N-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonat (pKs 7.4) und diente als Puffer.

#### **2.1.2. HEPES-Ringer-Lösung ohne Natriumchlorid**

Tabelle 2: Zusammensetzung der natriumfreien HEPES-Ringer-Lösung bei pH 7.4

<b>Substanz</b>	<b>MG (g/ Mol)</b>	<b>mM</b>	<b>g/ l</b>
NMDG*	195.2	125	24.1
KCl	74.55	5	0.373
CaCl <sub>2</sub>	147.02	1	0.147
MgSO <sub>4</sub>	246.48	1.2	0.296
HEPES	238.31	32.2	7.67
Glucose	180.16	5	0.9

\*NMDG ist N-Methyl-D-Glucamin.

Der pH in der Parietalzelle ist von der Säuresekretion unabhängig und liegt unter physiologischen Bedingungen nahezu konstant bei pH 7.4 (14). Da der pH-sensitive Indikator BCECF bei den Versuchen nur den intrazellulären pH-Wert mißt, bleibt die

Fluoreszenz daher während der Säuresekretion konstant und Veränderungen sind auf diese Weise nicht erkennbar.

Deswegen wurden die Versuche mit einer initialen Ansäuerungsphase der Parietalzellen begonnen, um die spätere Säuresekretion dieser Zellen besser messen zu können. Zudem fallen durch intrazelluläre Stoffwechselprozesse Protonen an, die nicht aus der Zelle befördert werden können, was zu einem Abfall des  $\text{pH}_i$  führt. Eine Aktivierung der Säuresekretion hat dann eine intrazelluläre Alkalisierung zur Folge, welche durch eine proportionale Fluoreszenzänderung direkt messbar ist.

An der Regulierung des intrazellulären pH-Wertes der Parietalzelle sind neben den Puffersystemen der Zelle weitere Membranproteine beteiligt. Der Bikarbonat/Chlorid-Austauscher transportiert Chlorid im Austausch mit Bikarbonat in die Zelle. Um den Einfluss dieses Proteins auf die Versuche zu hemmen, wurden nur bikarbonatfreie Lösungen verwendet. Weiterhin weist die Parietalzelle verschiedene Isoformen des Natrium/Protonen-Austauschers auf, welche sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert sind. Diese tauschen extrazelluläre Protonen mit intrazellulären Natriumionen aus. Um den Protonentransfer über diesen Austauscher zu hemmen wurde eine natriumfreie HEPES-Lösung verwendet. Zum einen war es so möglich die Zelle anzusäuern, um Veränderungen des pH-Wertes besser registrieren zu können, zum anderen war unter diesen Bedingungen mit hoher Wahrscheinlichkeit nur die aktivierte Protonenpumpe in der Lage eine Alkalisierung der Zelle herbeizuführen. Dazu wurde nach der Standard-HEPES-Lösung eine natriumfreie HEPES-Lösung benutzt. Dafür wurde die HEPES-Ringer-Lösung verändert, wobei Natriumchlorid durch äquimolare Mengen NMDG (N-Methyl-D-Glucamin) ersetzt wurde. NMDG muss mit Salzsäure titriert werden.

### 2.1.3. HEPES-Ringer-Lösung ohne Magnesium und reduziertem Kalzium

Bei einigen Experimenten wurde eine magnesiumfreie HEPES-Ringer-Lösung mit reduziertem Kalzium [100  $\mu\text{mol/l}$ ] verwendet, um die Abhängigkeit der Säuresekretion von divalenten Kationen zu untersuchen. Diese Lösung wurde sowohl mit NaCl für die Grundperfusion und ohne NaCl für die Ansäuerungsphase hergestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der magnesiumfreien HEPES-Ringer-Lösung mit reduziertem Kalzium [100  $\mu\text{mol/l}$ ] bei pH 7.4

Substanz	MG (g/ Mol)	mM	g/l
NaCl	58.44	125	7.305
CaCl <sub>2</sub>	147.02	0.1	0.0147
KCl	74.55	5	0.373
HEPES	238.31	32.2	7.67
Glucose	180.16	5	0.9

Tabelle 4: Zusammensetzung der magnesium- und natriumfreien HEPES-Ringer-Lösung mit reduziertem Kalzium [100  $\mu\text{mol/l}$ ] bei pH 7.4

Substanz	MG (g/ Mol)	mM	g/l
NMDG	195.2	125	24.1
KCl	74.55	3	0.373
CaCl <sub>2</sub>	147.02	0.1	0.0147
HEPES	238.31	32.2	7.67
Glucose	180.16	5	0.9

### 2.1.4. Andere verwendete Substanzen

Tabelle 5: Substanzen und Pharmaka

Substanz	Nomenklatur
Histamin	(2-[4-Imidazolyl]ethylamine)
Gadolinium	Gadolinium(III)Chlorid
Omeprazol	(R,S)-5-Methoxy-2-[[[4-methoxy-3,5-dimethylpyridine-2-yl]methyl]sulfinyl]1H-benzimidazole, Protonenpumpenhemmer
Fluo-3	Kalzium-sensitiver Farbstoff
BCECF	2',7'-bis-(carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluorescein
Nigericin	Protonen-Ionophor für die Kalibrierung
Cimetidin	H <sub>2</sub> -Rezeptorblocker
Celltak	Zur Fixierung der Drüsen auf dem Objektglas

Alle Substanzen wurden von der Firma SIGMA (St.Louis, USA) bezogen. Omeprazol war eine Gabe von der Firma Astra (Schweden). Die verwendeten Substanzen sind als frische Stammlösungen angesetzt und zu den Experimentierlösungen pipetiert worden, um die erwünschte Endkonzentration zu erhalten. Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle HEPES-Ringer-Lösungen wurden jeweils frisch hergestellt und bei Nichtgebrauch unter 4 °C gelagert und nach 2 Tagen verworfen. Die Lösungen wurden mit NaOH oder HCl titriert. Bei den natriumfreien Lösungen wurde KOH und HCl zum Titrieren benutzt. Die Osmolarität der Versuchslösungen betrug jeweils etwa 280-300 mosmol/ L.

Nigericin und BCECF wurden in DMSO gelöst, dabei lag die Endkonzentration von DMSO bei 0.1 %. Omeprazol ist nur biologisch aktiv nach Säureaktivierung. In der Parietalzelle entsteht über ein Spiroderivat und Omeprazolsulfensäure schließlich der aktive Metabolit Omeprazolsulfonamid, der mit SH-Gruppen der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase unter Bildung einer Disulfidbrücke reagiert und das Enzym irreversibel blockiert. Dabei bindet ein Molekül ATPase 2 Moleküle Omeprazol. Die hohe Selektivität und Spezifität für das gastrale Enzym ergibt sich durch die Erfordernis eines niedrigen pH-Wertes für

die Aktivierung. Daher wurde die Omeprazolstammlösung vor Gebrauch auf pH 4.0 angesäuert und dann wieder auf pH 7.4 zurücktitriert.

## **2.2. Intrazelluläre pH-Messung mit BCECF**

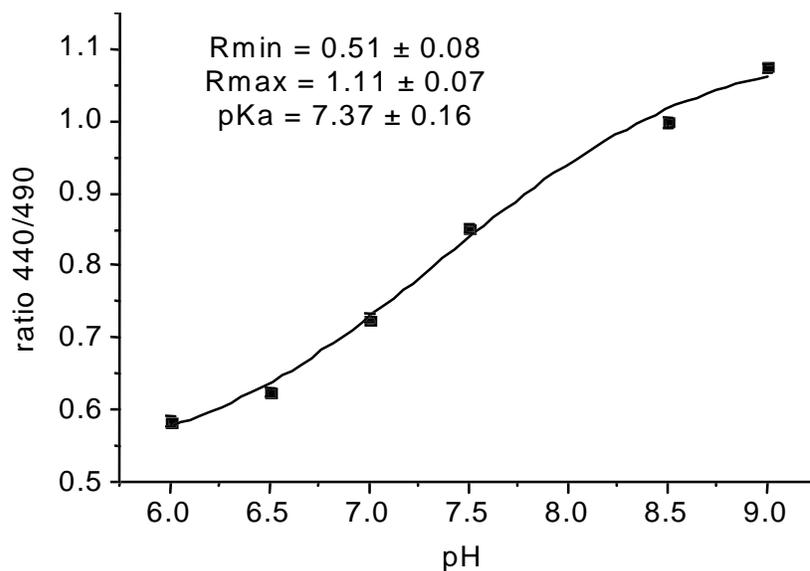
BCECF (2',7'-bis-(carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein) ist ein häufig verwendeter Fluoreszenzindikator für den intrazellulären pH-Wert. Der  $pK_a$  dieses Stoffes beträgt 7.0 und liegt damit in der Schwankungsbreite des zytoplasmatischen pH (~6.8-7.4) während der durchgeführten Versuche. Das Absorptionsmaximum liegt nah an der Wellenlänge des Argonlasers (488 nm) und eignet sich daher besonders gut für die Durchflußzytometrie sowie die konfokale Mikroskopie. Durch die Membranpermeabilität des Acetylmetyler BCECF (AM) Derivates wird eine nichtinvasive Beladung der Zellen ermöglicht. Das nicht-fluoreszierende Derivat wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolysiert, wodurch der fluoreszierende Indikator entsteht, welcher für die Zellwand nicht mehr permeabel ist. Bei einem pH von 7-8 hat BCECF 4-5 negative Ladungen, wodurch die intrazelluläre Retention bewirkt wird. Zur Applikation in Geweben wird eine Konzentration von 1-5  $\mu\text{mol/L}$  des BCECF AM empfohlen, welches zusammen mit dem späteren Perifusat zwischen 5-60 min Inkubationszeit verlangt. Die optimale Temperatur dafür liegt bei  $4^\circ\text{C}$ - $37^\circ\text{C}$ .

Die pH-Messung mit BCECF beruht auf Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes, je nach extrazellulärem Medium. Dazu muss die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes proportional zur relativen pH-Änderung in der Zelle sein, die Pufferkapazität über den gesamten Versuch konstant bleiben und innerhalb wie außerhalb Zelle ein gleicher  $pK$ -Wert bestehen.

Die Fluoreszenzintensität muss dann in absolute pH-Werte konvertiert werden. Dazu wurde die Nigericin kalibrierung verwendet (Thomas et al.). Nigericin ist ein Protonen-Ionophor, welches zusammen mit einer speziellen Kalibrierungslösung (siehe Tab.: 6) ein pH-Gleichgewicht zwischen extra- und intrazellulärem Kompartiment herstellt. Bei einem Ausgleich der transmembranären Kaliumkonzentration durch die Perifusion mit der unten genannten HEPES-Ringer-Lösung (Kaliumkonzentration: 105 mmol/l) kommt es zur einer vollständigen Depolarisation des Membranpotentials, welches zusammen mit Nigericin die Einstellung des Protonengleichgewichtes erlaubt. Da BCECF einen sogenannten gewebespezifischen  $pK_a$  Wert hat, der nach Zelltypus und

Untersuchungsbedingungen schwanken kann, muss eine Eichkurve für jedes Gewebe und jede Untersuchungsbedingung durchgeführt werden.

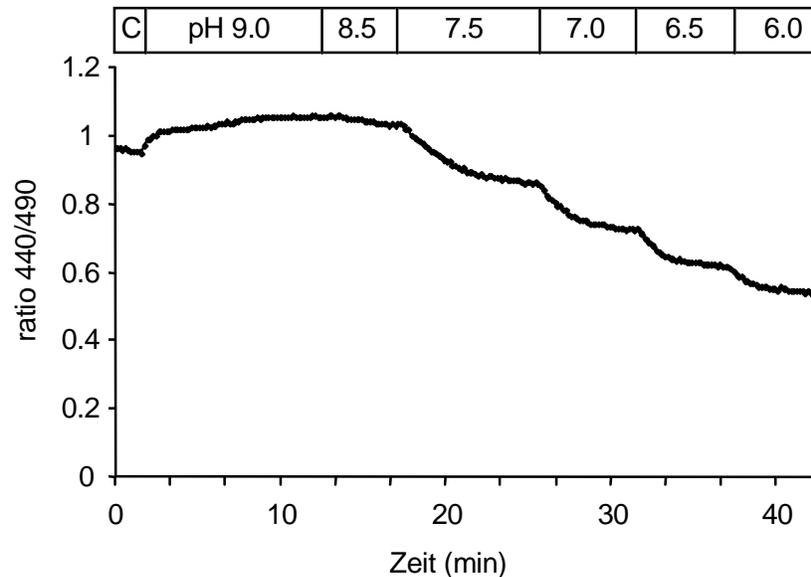
Für die vorliegende Arbeit wurde daher eine Kalibrierungskurve in den Parietalzellen des Rattenmagens für den pH Bereich 6.0-9.0 erstellt und der dabei gewonnen pKa Wert für die folgenden Kalibrierungen aller Experimente verwendet. Dabei war das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den Wellenlängen 430 nm und 490 nm sowie dem extrazelluläre pH-Wert eine sigmoidale Funktion mit annähernd linearem Abschnitt zwischen pH 6.4 und 7.8 in den Parietalzellen des Rattenmagens (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Fluoreszenzintensität (Anregungsquotient der Wellenlängen (nm) 440/490) von BCECF in Abhängigkeit vom pH<sub>i</sub>. Die sigmoidale Funktion zeigt im Arbeitsbereich von pH 6.75 - 7.75 einen nahezu linearen Abschnitt. Der gewebespezifische pKa-Wert von BCECF liegt bei  $7.37 \pm 0.16$ . (n = 6 Drüsen, n = 30 Zellen)

Zunächst wurde eine Magendrüse isoliert und für 10 min mit BCECF bei 37 °C inkubiert (HEPES-Ringer-Lösung mit 10 µmol/L BCECF) und dann in der Perfusionskammer mit HEPES-Ringer gespült, um nicht aufgenommenes BCECF zu entfernen, sowie gewartet, bis eine konstante Fluoreszenz gemessen werden konnte. Dann wurden jeweils 5 ml der Nigericinkalibrierungslösung mit definierten pH-Werten von 6 - 9 in die

Kammer pipetiert, wobei jeweils nach konstanten Messwerten über mindestens eine Minute mit der nächsten pH-Lösung kalibriert wurde (siehe Abbildung 7)



**Abbildung 7:** Originalaufzeichnung: Verlauf der der Fluoreszenzintensität (Anregungsquotient 440 / 490) während der Perfusion mit Nigericinkalibrierungslösungen verschiedener pH-Werte. (n = 6 Drüsen)

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kalibrierungslösung (hohe Kaliumkonzentration) bei pH 7.4

Substanz	MG (g/ mol)	mM	g/ l
KCL	74.55	105	7.83
CaCl <sub>2</sub>	147.02	1	0.147
MgSO <sub>4</sub>	246.48	1.2	0.296
NMDG	195.2	32.8	6.4
HEPES	238.31	32.2	7.674

Diese Lösung muss mit HCl und KOH titriert werden. Zur eigentlichen Kalibrierung wurden jeweils 5 ml dieser Lösung mit 10 µmol/L Nigericin verwendet.

### 2.3 Intrazelluläre Kalzium-Messung

Für die intrazelluläre Kalzium-Messung wurden die Drüsen für 10 min bei Raumtemperatur mit dem Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Farbstoff Fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) inkubiert. Anschließend wurden die Drüsen mit Standard-HEPES-Lösung gespült, um

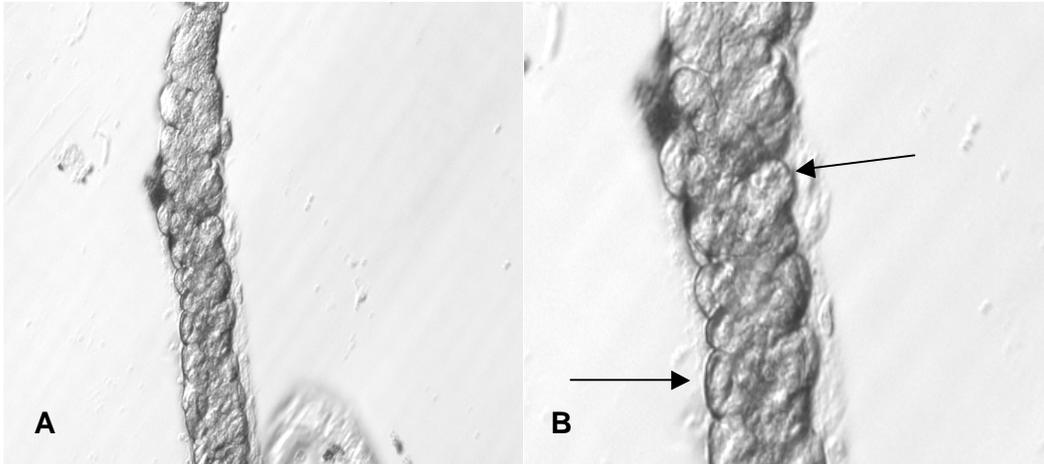
nicht aufgenommene Reste des Farbstoffes zu entfernen. Die Fluoreszenz ist mit einem Argonlaser bei einer Exzitation von 488 nm und einer Emission von 535 nm aufgezeichnet worden. Die Fluoreszenzintensität ist sowohl vor und nach der Perifusion mit 100  $\mu\text{M}$  Histamin oder 1 mM  $\text{Gd}^{3+}$  durch Messung von Pixelwerten über festgelegten Zellen bestimmt worden. Diese Messungen wurden alle 2 Sekunden vorgenommen, wobei jedes Bild aus durchschnittlich 8 festgelegten Bezirken bestand. So wurden in jedem Experiment 5 Parietalzellen analysiert und die Daten später in Fluoreszenzeinheiten ausgedrückt.

#### **2.4. Isolierung der Magendrüsen**

Die Magendrüsen wurden aus Sprague-Dawley Ratten (CharlesRiver Laboratories, Wilmington, MA) mit einem Gewicht zwischen 250-500g entnommen. Die Tiere wurden unter normalem Tag- und Nachtrhythmus, sowie gleichbleibenden Klimabedingungen gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser, bekamen jedoch 24h vor dem Experiment kein Futter mehr um die Ausgangsbedingungen zu standardisieren

Obwohl eine große Anzahl von Drüsenfragmenten durch enzymatische Auftrennung isoliert werden können (Paradiso et al.1987) wurde die kompliziertere, manuelle Auftrennung verwendet (Schettino et al.1985), weil die Stabilität und Unversehrtheit der gesamten Drüsen besser erhalten bleibt.

Da die Magendrüsen überwiegend im Magenfundus vorkommen, reicht dessen Entnahme aus. Hierzu wurde die Ratte mit Pentobarbital betäubt und durch eine Laparotomie der Magen entfernt, das Magenantrum isoliert und ca.  $0.3\text{cm}^2$  Stücke zurechtgeschnitten. Diese Präparation erfolgte in einer auf Eis gekühlten HEPES-Ringer-Lösung, die dreimal ausgetauscht wurde, um den Mageninhalt gründlich zu entfernen. Unter Beibehaltung der Kühlkette wurden die Magenstücke unter einem Stereomikroskop (Zeiss LSM-410) von der Muscularis Mucosa und Geweberesten befreit und die Drüsen unter 5-facher Vergrößerung mit Pinzetten unter Sicht präpariert. Die Isolierungszeit einer Einzeldrüse (ca. 1 mm lang) aus einem Magenabschnitt beträgt 1-3 min (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 3.** Einzelne Magendrüsen nach Isolierung und Fixierung auf dem Objektträger. **(A)** Einzeldrüse mit peripher angelagerten Geweberesten (100 X) **(B)** Ausschnitt derselben Drüse mit markierten Parietalzellen (200 X)

Anschließend wurden 6-8 einzelne Drüsen mittels einer feinen Pasteur Glaspipette auf einen Objektträger transferiert. Dieser wurde vorher mit 1  $\mu$ l Cell-Tak bedeckt, um die Fixierung der Einzeldrüsen, erneut unter mikroskopischer Sicht, zu gewährleisten. Danach wurde die Perfusionskammer mit Hilfe eines abdichtenden Gels (Cell Tak) auf den gläsernen Objektträger geklebt.

### 2.5. Durchführung des Experiments

Nachdem die Drüsen isoliert und 20 min mit HEPES-Ringer-Lösung und 10  $\mu$ mol/l BCECF-AM bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, wurde die Perfusionskammer auf einem inversen Zeissmikroskop (Olympus IMT2, Olympus, USA) fixiert. Während der Experimente fand eine kontinuierliche Perfusion mit 5 ml/min statt, das Kammervolumen betrug ca. 180  $\mu$ l, wobei die Temperatur durch ein elektronisch rückgekoppeltes Heizsystem der Kammer als auch der zuführenden Leitungen bei 37 °C konstant gehalten wurde.

Das Mikroskop war mit einem 100 Watt Argonlaser und einem 40-fachen Vergrößerungsobjektiv ausgestattet. Der intrazelluläre pH wurde fluorimetrisch mit BCECF gemessen, wobei die Wellenlängen 490 (hierbei ist die Fluoreszenz des Farbstoffes sehr pH sensitiv) und 440 nm (bei dieser Wellenlänge ist die Fluoreszenz relativ unsensitiv) verwendet. Um den intrazellulären pH-Wert zu bestimmen, wurde

der Farbindikator abwechselnd mit diesen Wellenlängen bestrahlt und die Fluoreszenzemission bei 530 nm gemessen worden. Der Filterwechsel fand automatisch alle 10 Sekunden für jede Wellenlänge statt. Um eine Ausbleichung des Farbstoffes durch den Argonlaser zu verhindern, kam ein Graufilter direkt vor der Lichtquelle zur Verwendung.

Die emittierte Fluoreszenz wurde über markierten Flächen quantifiziert, welche jeweils aus einer oder mehreren Parietalzellen bestanden. Dazu wurde die vorher mit einer Kamera aufgenommenen Einzeldrüsen auf dem Bildschirm abgebildet. Die Parietalzellen haben eine charakteristische Form, sind relativ groß, konisch und in der Drüse peripher gelagert. Im Durchschnitt wurden 8 Flächen mit jeweils 1-4 Zellen definiert.

Nach Messung der Emmission und Digitalisierung der Daten wurden die Daten bis zur weiteren Analyse im Computer gespeichert. Die Hintergrundemission wurde während jeder Messung registriert, war jedoch nie größer als 2 %. Die Autofluoreszenz der Zellen war immer kleiner als 1 % und wurde daher nicht korrigiert.

Alle Experimente wurden an verschiedenen Magendrüssen von verschiedenen Tieren und an unterschiedlichen Tagen wiederholt. Aus einem Magen wurden jeweils zwei Versuche durchgeführt.

## **2.6. Auswertung und Statistik**

Bei allen Experimenten kam das Softwareprogramm OPTIMAS (Universität Yale, Physiologisches Institut) zum Einsatz. Die Daten wurden bis zur Auswertung mit EXCEL auf dem Computer zwischengespeichert. Die Fluoreszenzintensität wurde aus dem Quotient von I 440/I490 automatisch errechnet und mit Hilfe der Kalibrierungswerte in absolute pH-Werte übertragen. Alle Werte sind als arithmetisches Mittel (Mean)  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM: Standard error of the mean) angegeben. "n" gibt die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen an. Die Werte wurden mit dem ungepaarten Student t-Test auf Signifikanz geprüft, und nur Werte mit  $p < 0.05$  wurden als signifikant angesehen. Dabei wurde die Gleichheit der Varianzen und die Normalität der Stichproben vorausgesetzt.

### **3. Versuche und Ergebnisse**

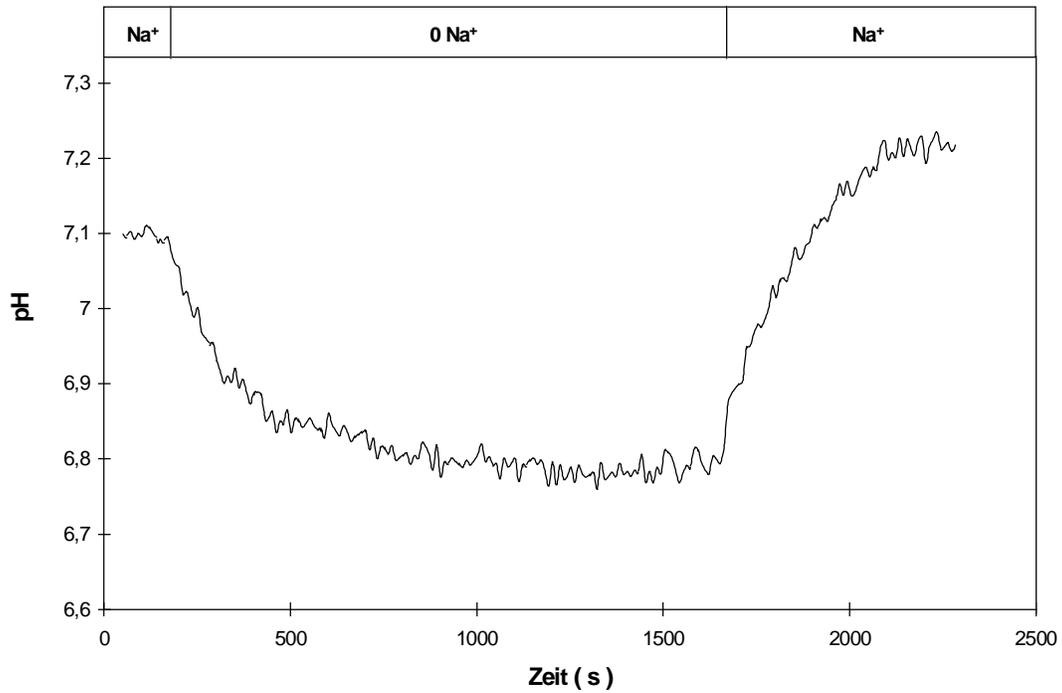
Die Messung der Säuresekretion wurde mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF durchgeführt. Mit Hilfe der hochauflösenden Videomikroskopie war es möglich, Änderungen der Fluoreszenz und damit den intrazellulären pH-Wert während der Säuresekretion in den Belegzellen der frisch isolierten Magendrüsen kontinuierlich zu messen. Aufgrund der intrazellulären pH-Wert Änderungen in Abwesenheit von Natrium und Bikarbonat konnte auf die Aktivierung oder Hemmung der  $H^+/K^+$ -ATPase geschlossen werden. Um den Einfluß des basolateralen  $Na^+/H^+$ -Austauschers auszuschließen, wurde in jedem Versuch durch Perifusion mit einer natriumfreien Standardlösung eine Ansäuerung der Belegzellen induziert. Somit war die  $H^+$ -Sekretion deutlich messbar und alleine auf die Aktivität der apikalen  $H^+/K^+$ -ATPase zurückzuführen. Dies wurde durch die Hemmung mit spezifischen Inhibitoren (Omeprazol, Cimetidin, siehe auch Seite 22,9) bestätigt.

Folgende Abschnitte stellen die Ergebnisse der Experimente dar, mit welchen die genaue Rolle des SCAR (stomach calcium receptor) bei der gastralen Säuresekretion untersucht wurde.

#### **3.1. Kontrollversuch**

Im Kontrollversuch wurden die isolierten Drüsen mit der Standard-HEPES-Lösung perifundiert und nach Einstellung auf einen stabilen pH-Wert mit der natriumfreien HEPES-Lösung angesäuert. In dieser Phase zeigte sich keine Alkalisierung der Belegzellen. Erst nach erneuter Zugabe von Natrium erfolgte eine Protonensekretion, in diesem Falle über den  $Na^+/H^+$ -Austauscher, bis zum Ausgangs pH-Wert. Hieraus ist zu schließen, daß die Protonenpumpe ohne Stimulation entweder inaktiv ist, bzw. eine sehr geringe basale Aktivität hat, welche mit dieser Methode nicht nachweisbar ist. Ferner könnte eine basale Säuresekretion auch durch die Puffersysteme der Zelle kompensiert werden.

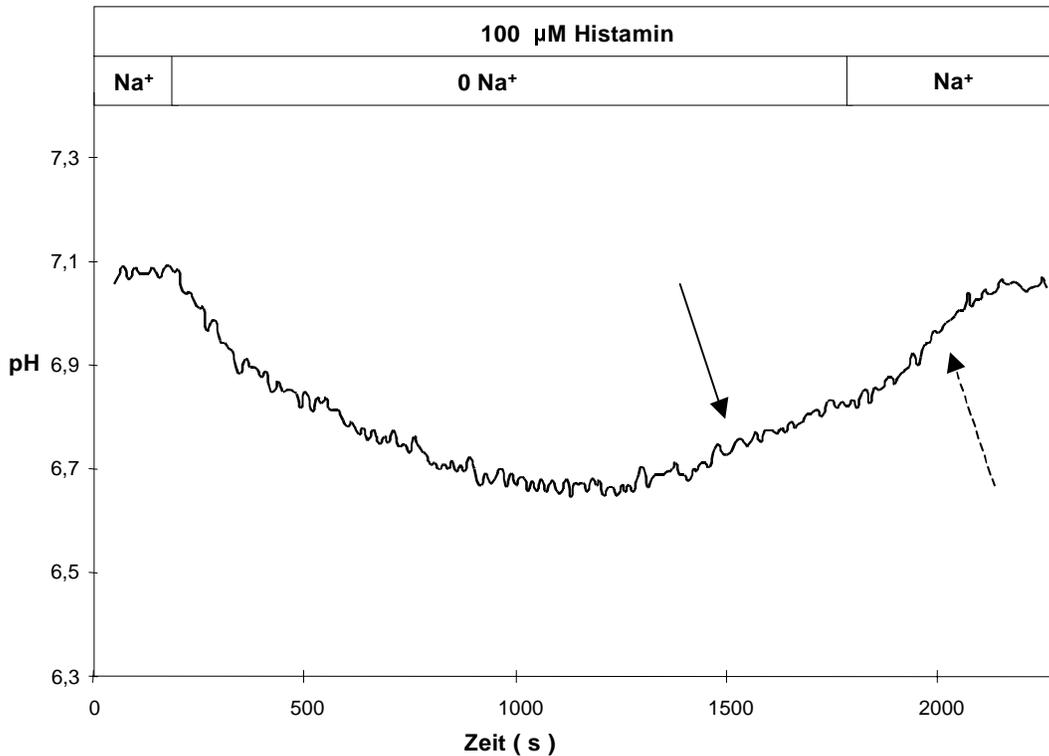
In den folgenden Abbildungen fällt eine starke Variabilität der Ansäuerungsgeschwindigkeit auf. Diese war nicht von zugesetzten Stoffen abhängig. Vielmehr ist diese Variabilität bei allen Versuchsprotokollen in gleicher Form aufgetreten und hat somit keinen Einfluß auf die Ergebnisse.



**Abbildung 9:** Kontrollversuch. Ohne die Stimulierung durch Histamin ist keine Säuresekretion nachweisbar, bzw. eine basale Aktivität der Protonenpumpe könnte durch Puffersysteme der Zelle kompensiert werden. Der Intrazelluläre pH-Wert bleibt nach der Ansäuerungsphase konstant und erhöht sich erst wieder nach dem Zusatz von Na<sup>+</sup>. (n = 65 Zellen/10 Drüsen)

### 3.2. Stimulation mit Histamin

Bei Stimulation der Säuresekretion mit Histamin (100 $\mu$ M) konnte nach der Ansäuerungsphase eine Alkalisierung von  $0.025 \pm 0.008$  Einheiten pH/ min beobachtet werden (Abbildung 10). Dazu wurde sowohl der Inkubationslösung mit BCECF als auch den anderen verwendeten Lösungen jeweils frisch 100  $\mu$ M Histamin zugesetzt.

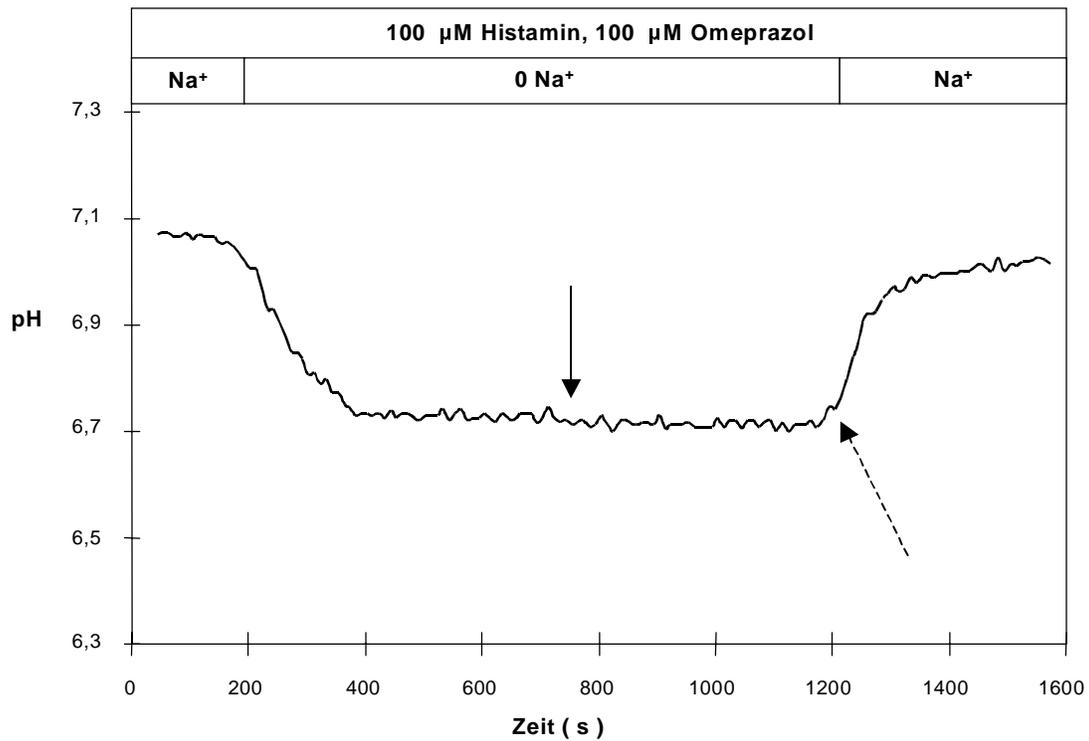


**Abbildung 10:** Stimulation der Belegzellen mit Histamin. Nach Ansäuerung der Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup> ist eine langsame Alkalisierung von  $0.025 \pm 0.007$  Einheiten pH/min zu beobachten (durchgezogener Pfeil). Nach erneuter Zugabe von extrazellulärem Na<sup>+</sup> sieht man eine schnellere Alkalisierung nahezu bis zum Ausgangs-pH-Wert des Versuches (unterbrochener Pfeil). (n = 65 Zellen/9 Drüsen)

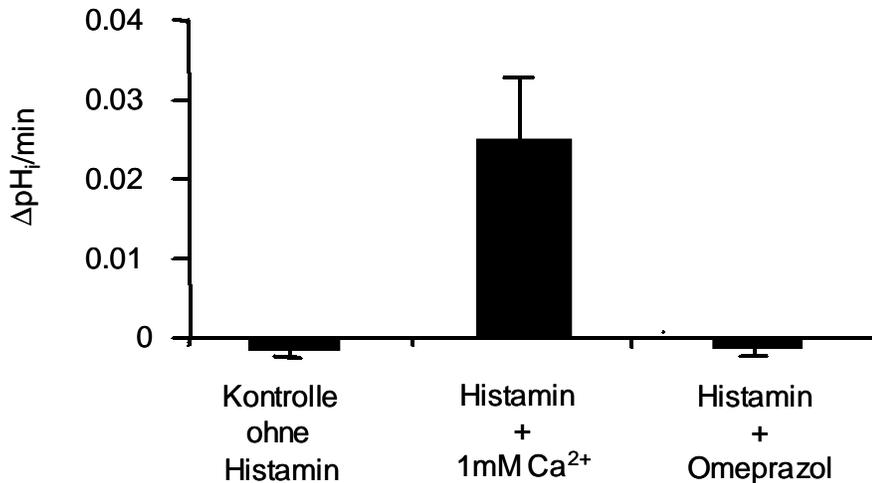
#### 3.2.1. Gabe eines Protonenpumpenhemmers und Histamin

Die durch Histamin ausgelöste Alkalisierung konnte durch den spezifischen gastrischen H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Inhibitor Omeprazol (100 $\mu$ M) ( $-0.002 \pm 0.001$  Einheiten pH/min) gehemmt werden (Abbildung 11). Die Histamin stimulierte Säuresekretion, hier indirekt über die intrazelluläre Alkalisierung gemessen, resultiert somit aus der Protonen-

sekretion über die  $H^+/K^+$  ATPase der apikalen Zellmembran. In Abbildung 12 sind die verschiedenen Ergebnisse der Versuchsdurchführungen mit Histamin noch einmal als Balkendiagramm übersichtlich zusammengefasst.



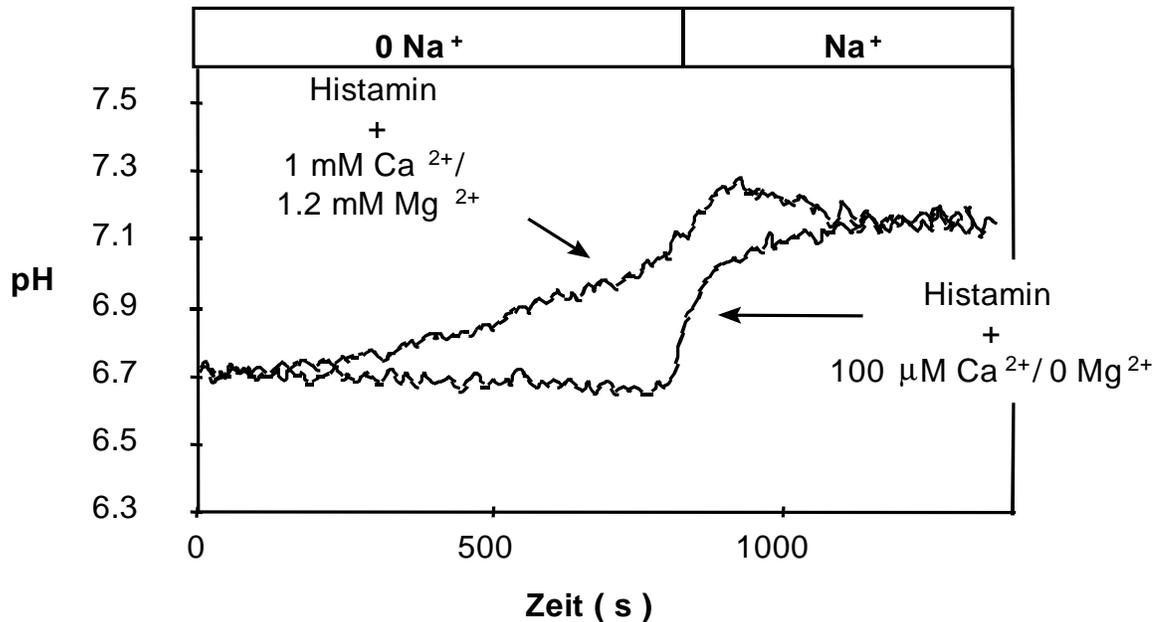
**Abbildung 11:** Hemmung der Histamin-induzierten Alkalisierung durch den spezifischen Protonenpumpeninhibitor Omeprazol (100  $\mu$ M über den gesamten Versuchsablauf). Nach der Ansäuerung der Zelle lässt sich keine Alkalisierung erkennen (durchgezogener Pfeil), diese setzt erst nach der Zugabe von extrazellulärem  $Na^+$  ein (unterbrochener Pfeil). (n = 24 Zellen/4 Drüsen)



**Abbildung 12:** Zusammenfassung der Histaminversuche. Unter Kontrollbedingungen ist keine pH-Veränderung in der Zelle messbar. Nach Stimulation mit Histamin war eine Alkalisierung der Belegzellen zu beobachten ( $0,025 \pm 0,007$  Einheiten pH/ min). Bei Zugabe des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol ( $100 \mu\text{M}$ ) ist keine Alkalisierung registriert worden ( $-0.002 \pm 0,001$ ). (n = 40-50 Zellen/8-9 Drüsen)

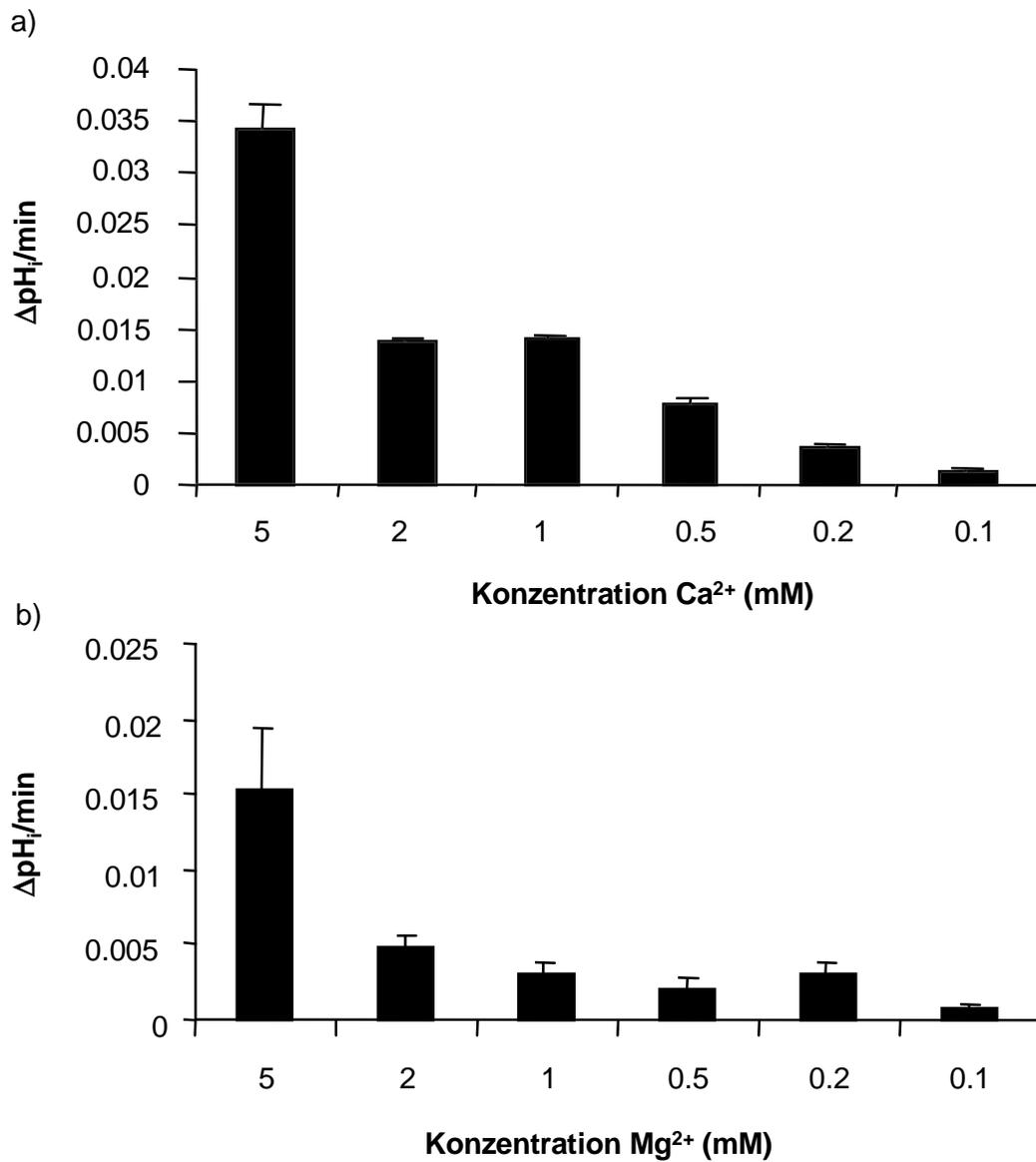
### 3.2.2. Stimulation mit Histamin unter verschiedenen extrazellulären Magnesium- und Kalziumkonzentrationen

In diesem Experiment wurde die Abhängigkeit der Histamin-induzierten Säuresekretion von verschiedenen extrazellulären Magnesium und Kalziumkonzentrationen und die Beteiligung von SCAR untersucht. Im Kontrollversuch betrug die extrazelluläre Kalziumkonzentration  $1 \text{ mM}$  und die Magnesiumkonzentration  $1.2 \text{ mM}$ . Unter diesen nahezu physiologischen Bedingungen zeigte sich eine deutliche Alkalisierung (Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) unter Stimulation mit Histamin (s.o.). Danach wurde die Konzentration der zweiwertigen Kationen auf  $100 \mu\text{M}$  Kalzium und  $0 \text{ M}$  Magnesium herabgesetzt. Unter diesen Umständen war keine Alkalisierung durch Histamin mehr zu beobachten ( $-0.002 \pm 0.001$  Einheiten pH/min). Dies spricht für eine Abhängigkeit der Säuresekretion durch Histamin von extrazellulären zweiwertigen Kationen (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Dargestellt ist die Rolle von zweiwertigen Kationen auf die Aktivierung oder Hemmung der  $H^+/K^+$ -ATPase durch SCAR in Abhängigkeit von Histamin. Reduktion der extrazellulären Kationen von 1 mM  $Ca^{2+}$  und 1.2 mM  $Mg^{2+}$  auf 100  $\mu M$   $Ca^{2+}$  und 0 M  $Mg^{2+}$  hebt den stimulatorischen Effekt von Histamin auf die intrazelluläre Alkalisierung ( $H^+/K^+$ -ATPase-Aktivierung) auf (n = 47 Zellen/5 Drüsen).

Anschließend wurden sowohl die extrazelluläre Kalziumkonzentration und die Magnesiumkonzentration von 0.1 mM bis 5 mM variiert. Hierzu wurde immer nur die Konzentration eines Kations, entweder Kalzium oder Magnesium, verändert. Dabei zeigte sich ein proportionaler Anstieg der Säuresekretion mit steigender Konzentration der jeweiligen zweiwertigen Kationen. Aus dieser Steigerung der extrazellulären Kationenkonzentrationen resultierte eine Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase in den Belegzellen nach vorheriger Histaminstimulation (Abbildung 14). Erwähnt werden sollten allerdings die unphysiologischen Konzentrationen, welche bei diesem Ansatz verwendet wurden. Die verwendete Methode ließ eine nähere Untersuchung im physiologischen Konzentrationsbereich nicht zu, weil die Versuche per se schon eine hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse boten und kleinste Unterschiede nicht nachweisbar waren. Dies spricht jedoch nicht gegen eine Feinmodulation der Säuresekretion durch extrazelluläre Kationen unter Histaminstimulation, wobei eine sensitivere Methode zu einem Nachweis verwendet werden müsste.

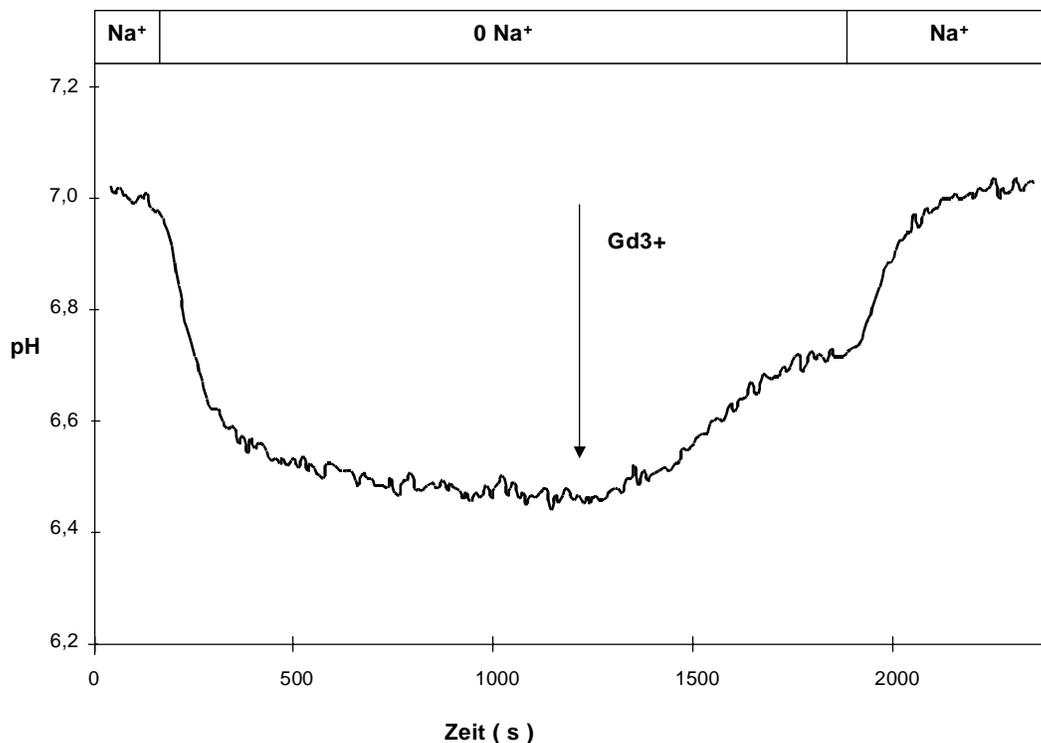


**Abbildung 14:** SCAR-Aktivierung bei verschiedenen Kalzium- und Magnesiumkonzentrationen unter Histaminstimulation. a) Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Abhängigkeit der extrazellulären Kalziumkonzentration bei Stimulierung durch Histamin und Abwesenheit von Magnesium ( $n = 20\text{-}30$  Zellen/ $4\text{-}5$  Drüsen für jede  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration). b) Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Abhängigkeit der extrazellulären Magnesiumkonzentration bei Stimulierung durch Histamin und  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $n = 20\text{-}30$  Zellen/ $4\text{-}5$  Drüsen für jede  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration).

### 3.3. Stimulation mit Gadolinium

#### 3.3.1. Gabe von Gadolinium

Nach Zugabe eines  $\text{Ca}^{2+}$  Rezeptoraktivators, des dreiwertigen Kations Gadolinium (1 mM), direkt zum natriumfreien Perifusat konnte eine Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase beobachtet werden. Die intrazelluläre Alkalisierung betrug  $0.035 \pm 0.004$  Einheiten pH/min (Abbildung 15). Dieser Effekt konnte auch bei gleichzeitiger Reduktion der extrazellulären Kationen ( $100\mu\text{M Ca}^{2+}$ ,  $0\text{mM Mg}^{2+}$ ) beobachtet werden (siehe Abbildung 18).

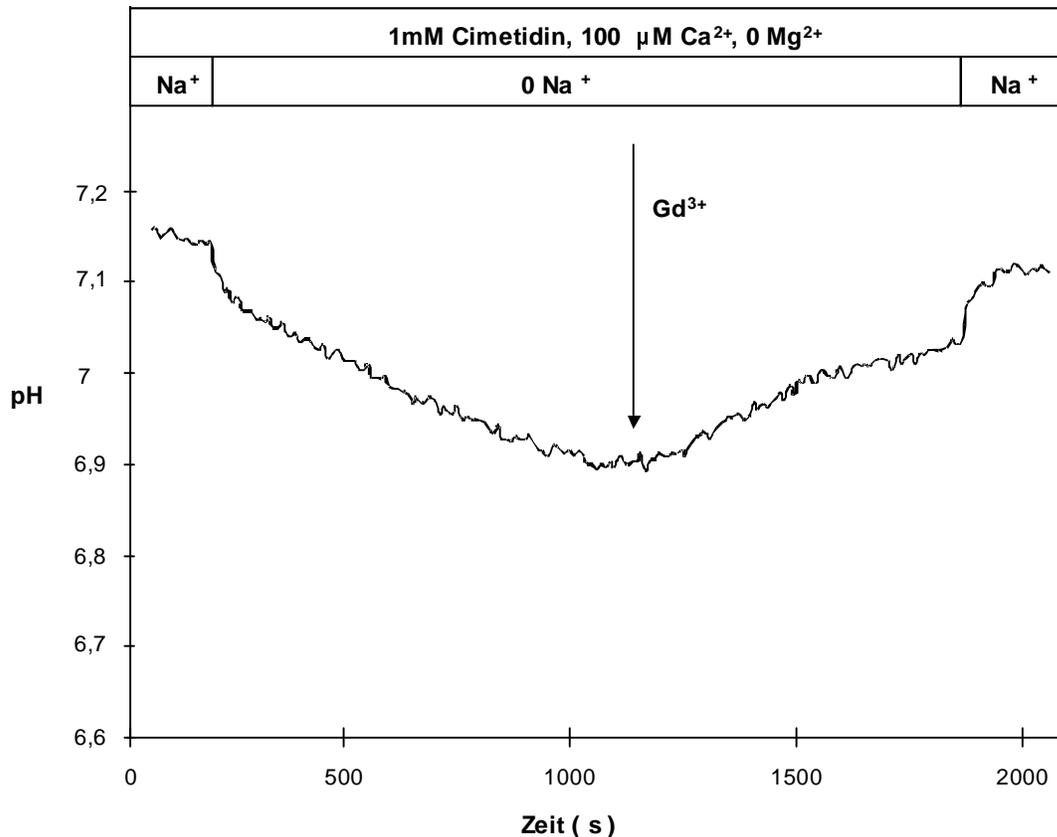


**Abbildung 15:** SCAR Aktivierung durch  $\text{Gd}^{3+}$ . Nach Zugabe von 1 mM  $\text{Gd}^{3+}$  erfolgt eine intrazelluläre Alkalisierung durch Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $n = 41$  Zellen/5 Drüsen)

#### 3.3.2. Gabe von Cimetidin ( $\text{H}_2$ -Rezeptorblocker) und Gadolinium

Um zu testen, ob der Effekt von  $\text{Gd}^{3+}$  durch eine Beeinflussung der Histaminausschüttung aus den ECL Zellen vermittelt wurde, ist  $\text{Gd}^{3+}$  in Anwesenheit des spezifischen  $\text{H}_2$ -Histaminrezeptorblockers Cimetidin (1 mM) gegeben worden.

Selbst nach selektiver Hemmung des H<sub>2</sub>-Rezeptors durch Cimetidin konnte eine intrazelluläre Alkalisierung durch Gd<sup>3+</sup> induziert ( $-0.038 \pm 0.012$  Einheiten pH/min) und somit die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aktiviert werden. Desweiteren wurden auch die extrazellulären Kationen Magnesium (0 mM) und Kalzium (100  $\mu$ M) reduziert, so dass der Effekt allein auf Gd<sup>3+</sup> zurückgeführt werden konnte (Abbildung 16).

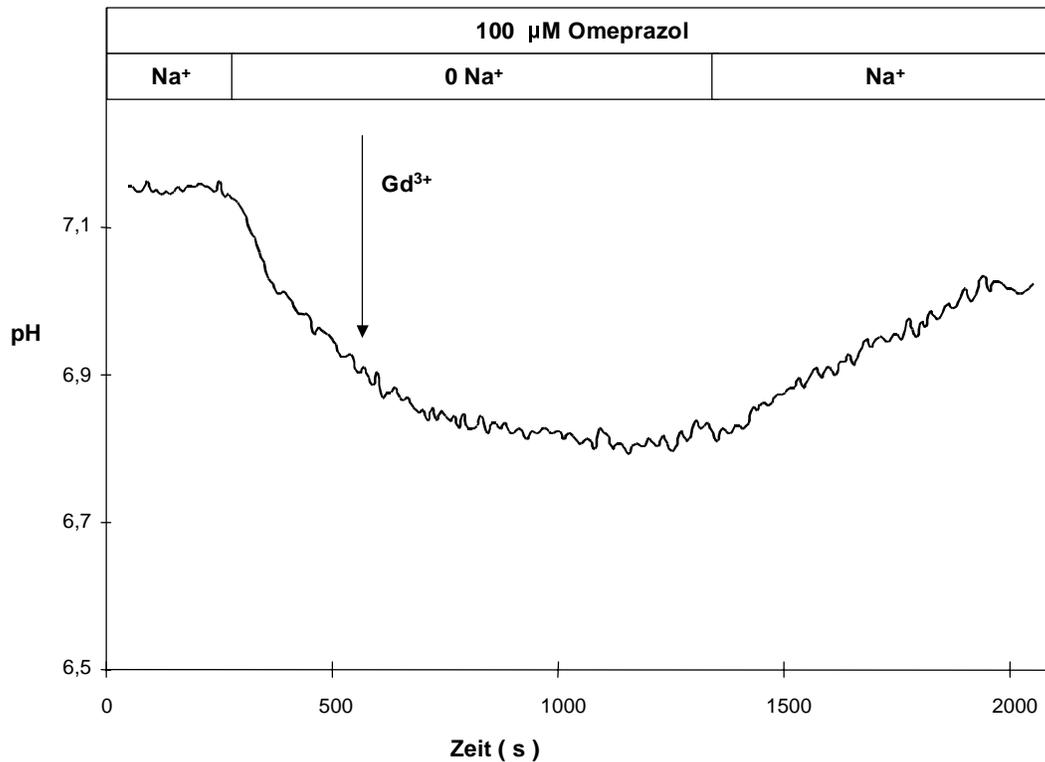


**Abbildung 16:** Einfluss von Gd<sup>3+</sup> (1mM) auf SCAR bei Reduktion der extrazellulären Kationen (0 mM Mg<sup>2+</sup>, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>) und Hemmung des H<sub>2</sub>-Rezeptors durch Cimetidin (1mM). Nach Zugabe von Gd<sup>3+</sup> ist eine deutliche Alkalisierung zu beobachten (n = 43 Zellen/5 Drüsen).

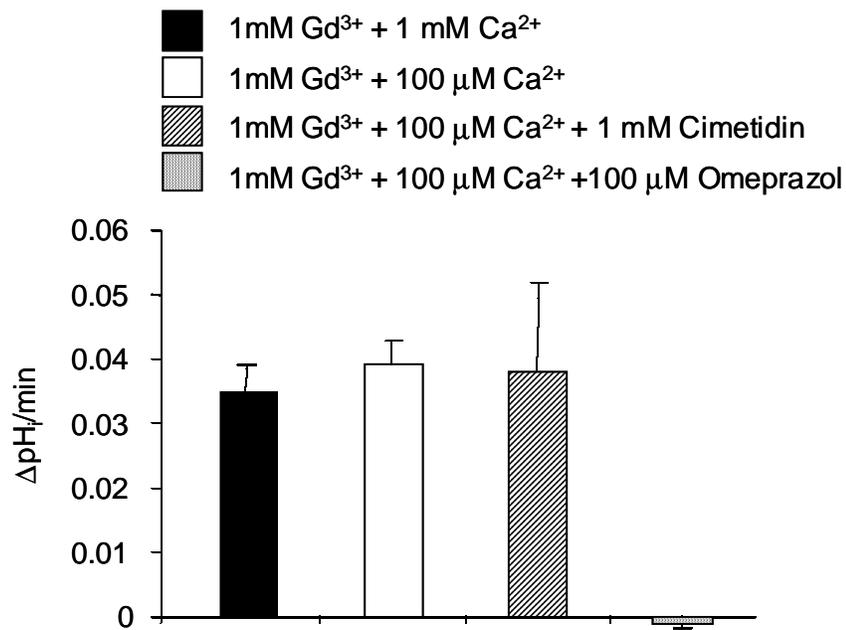
### 3.3.3. Gabe von Omeprazol (Protonenpumpeninhibitor) und Gadolinium

Um auszuschließen, daß Gd<sup>3+</sup> durch andere Mechanismen als die Aktivierung der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zu einer intrazellulären Alkalisierung führte, wurde die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Zusetzung des spezifischen Protonenpumpeninhibitors Omeprazol (100  $\mu$ M) während der gesamten Perfusion gehemmt. Dies verhinderte die Gd<sup>3+</sup> induzierte

Alkalisierung ( $-0.001 \pm 0.002$  Einheiten pH/ min) vollständig. Dies zeigt, daß  $Gd^{3+}$  durch Aktivierung von SCAR die Säuresekretion über die  $H^+/K^+$ -ATPase induziert (Abbildung 17). Um die verschiedenen Versuche miteinander vergleichen zu können, sind die Ergebnisse in Abbildung 18 mit Hilfe eines Balkendiagramms zusammengefaßt.



**Abbildung 17:** Gabe von Omeprazol (100 µM) und Gadolinium. Nach Zugabe von 1 mM  $Gd^{3+}$  zeigt sich keine Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase. Omeprazol wurde während des gesamten Versuches dem Perfusat zugesetzt. (n = 22 Zellen/ 2 Drüsen)

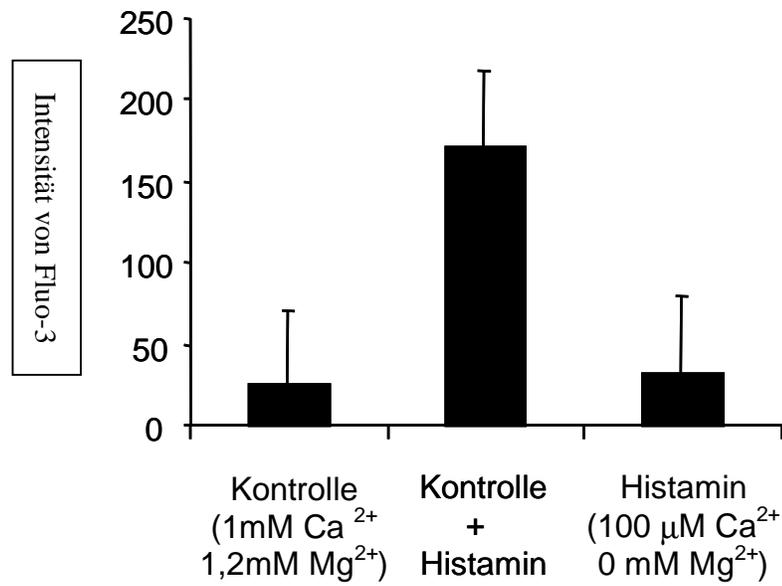


**Abbildung 18:** Mechanismen der SCAR vermittelten Säuresekretion. Dargestellt ist die Aktivierung der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch den Agonisten  $\text{Gd}^{3+}$  (1mM) sowohl in der Anwesenheit normaler (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1,2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) als auch erniedrigter Kationenkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). Der Effekt von  $\text{Gd}^{3+}$  wird nicht durch den H2-Rezeptorantagonist Cimetidin (1mM) vermindert, aber durch den Protonenpumpenhemmer Omeprazol vollständig inhibiert. Dies zeigt, daß nicht die Histaminfreisetzung für die  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivierung verantwortlich ist.

### 3.4. Messung des intrazellulären Kalziums

In diesem Versuch wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Belegzellen bei verschiedenen Bedingungen gemessen. Ziel war es, herauszufinden, inwiefern Histamin und Gadolinium die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflussen. Im Kontrollversuch ohne Histaminstimulation war nur eine geringe Intensität von Fluo-3 nachzuweisen (Die Fluoreszenzintensität ist über das Massenwirkungsgesetz mit der freien  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration verknüpft, eine Umrechnung in absolute Konzentrationswerte wurde nicht durchgeführt und so ist hier nur ein relativer Vergleich der Intensitätswerte möglich). Wie in der Einleitung auf Seite 2 ausgeführt, erhöht die Histaminstimulation, wie schon früher nachgewiesen werden konnte, die intrazelluläre Kalziumkonzentration in der Parietalzelle. Auch in unserem Versuch wurde unter der Stimulation mit Histamin (100  $\mu\text{M}$ ) ein intrazellulärer Anstieg des Kalziums beobachtet. Anschließend wurden die extrazellulären Kationen reduziert (100 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) und es konnte kein Kalziumanstieg unter Histaminstimulation in der Zelle registriert werden (Abbildung 19).

Die Versuche unter Gadoliniumeinfluß sind erst später durchgeführt worden, weswegen sie hier nicht näher abgebildet sind. Sie bestätigen jedoch die Hypothese, daß auch allein Gadolinium unter Standardbedingungen einen Anstieg des intrazellulären Kalziums auslöst. Im Gegensatz zu Histaminstimulation vermag Gadolinium auch unter reduzierten extrazellulären Kationen einen Anstieg des intrazellulären Kalziums auszulösen (64a). Die Kontrollversuche mit erniedrigten extrazellulären Kationen *ohne* Stimulation mit Histamin sind hier nicht mit eingefügt, weil sie später erfolgten. Sie zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der Intensität von Fluo-3 im Vergleich zu Versuchen *mit* Histaminstimulation bei erniedrigten extrazellulären Kationen.



**Abbildung 19:** Effekt von Histamin (100μM) bei Anwesenheit physiologischer Kationenkonzentrationen (1 mM Ca<sup>2+</sup>, 1,2 mM Mg<sup>2+</sup>) und reduzierten extrazellulären Kationen (100 μM Ca<sup>2+</sup>, 0 mM Mg<sup>2+</sup>) auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Belegzelle. Diese Reduktion verhindert den Histamin-induzierten Kalziumanstieg in der Zelle, welcher nahezu gleich hoch ist, wie bei der Kontrolle ohne Histaminstimulation, aber bei physiologischen Kationenkonzentrationen (n = 15-20 Zellen/ 4-5 Drüsen).

## **4. Interpretation und Diskussion**

### **4.1. Fehlerdiskussion**

#### **4.1.2. Lösungen**

Alle benutzten Lösungen hatten einen pH-Wert von 7,4. Um dies zu gewährleisten wurde eine tägliche pH-Kontrolle durchgeführt und das verwendete pH-Meter regelmäßig mit Standardlösungen geeicht.

Um die Zersetzung der Lösungen zu vermeiden, wurden diese bei 4 °C aufbewahrt und in kurzen, regelmäßigen Abständen neu angesetzt. Lichtempfindliche Substanzen wurden mit einem Lichtschutz versehen. Die verwendeten Substrate sind luftdicht bei Raumtemperatur oder 4°C aufbewahrt worden.

#### **4.1.3. Geräte**

Die Fluoreszenzmessungen sind sehr vibrations- und lichtempfindlich. Um ein Verschieben der markierten Zellen und der festgelegten Messareale durch externe Einflüsse zu verhindern ist ein schwingungsarmer Tisch verwendet worden. Störungen durch sekundäre Lichtquellen wurden durch einen Lichtkäfig sowie das Abdunkeln des Raumes während des Versuches verhindert. Die Perfusionsanlage wurde regelmäßig gereinigt, kontrolliert und gegebenenfalls erneuert.

#### **4.1.4. Tiere, Drüsen**

Um mögliche Einflussfaktoren der Tiere auf die Versuchsergebnisse zu minimieren wurden nur männliche Tiere zwischen 8 - und 18 Wochen verwendet. Um einen einheitlichen kalorischen Ausgangszustand zu gewährleisten sind die Tiere in der Nacht vor den Versuchen nur mit Wasser versorgt worden. Aus jedem Tiermagen wurden Drüsen für zwei Versuche isoliert, die nicht älter als 4 h waren. Außerdem sind nur diejenigen Versuche gewertet worden, bei welchen die Drüsen am Ende wieder ihren Ausgangs pH-Wert erreicht haben.

## **4.2. Die Rolle von SCAR im Magen**

Die vorliegende Arbeit zeigt, welche wichtige Funktion dem extrazellulären Kalziumrezeptor SCAR (stomach calcium receptor) bei der Regulierung der Magensäuresekretion zukommt. Nach der Identifizierung des Rezeptors in zahlreichen Geweben, und unter anderem in den Parietalzellen des Magens, ist es nun gelungen, diesem Rezeptor im Magen eine Funktion zuzuordnen. So können weitere Aspekte der genauen Regulationsmechanismen der gastralen Säuresekretion und deren Feinabstimmung untersucht werden. Der Rezeptor scheint darüber hinaus in der Lage zu sein, die klassischen neuronalen und humoralen Regelungsmechanismen zu modifizieren, indem er die Sekretion nach Aktivierung fördert oder inhibiert. Zu diskutieren sind jedoch die teilweise verwendeten unphysiologischen Konzentrationen. Um in einem engeren physiologischen Bereich Veränderungen zu registrieren, wäre eine sensitivere Methode erforderlich. Andererseits gibt es pathologische Fälle (z.B. Hyperkalziämie), bei denen durchaus andere Kationenkonzentrationen erreicht werden. Die genauen Werte konnte ich in der Literatur nicht entnehmen. Ferner zeigen diese Experimente mögliche Mechanismen bei der genauen Regulation des intrazellulären pH-Wertes der Parietalzelle, sowie den komplexen Vorgängen bei der Stabilisierung der gesamten Kalziumhomöostase.

### **4.2.1. Einfluss von SCAR auf die gastrale Säuresekretion**

Die durchgeführten Experimente beruhen auf einer neuen Methode, welche indirekt den Protonenausstrom aus der Zelle misst. Dazu wurde der intrazelluläre pH-Wert gemessen. Um die Aktivität der  $H^+/K^+$ -ATPase zu messen, wurde zum einen in der nominellen Abwesenheit von Bikarbonat gearbeitet. Darüberhinaus wurde, um kleinere pH-Veränderungen in der Zelle zu registrieren, zunächst immer ein Protonengradient von der Zelle zum Lumen geschaffen. Dazu wurde das Natrium aus dem basolateralen Perifusat entfernt, welches eine Ansäuerung der Parietalzelle zur Folge hatte. Anschließend konnte man den Protonenausstrom (Alkalisierungsrate) über die natriumunabhängige und omeprazolsensitive  $H^+/K^+$ -ATPase aufzeichnen. Dabei ist auch zu erwähnen, daß das Entfernen von Natrium im Perifusat auch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums bewirken kann, was wiederum indirekt zu einer Aktivierung der Protonenpumpe und damit zur Säuresekretion führen kann (65).

Es ist jedoch aus den Ergebnissen klar, dass dieses Phänomen hier keine Rolle spielte:

1. Es ist keine Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase in der Abwesenheit von Histamin oder ohne Stimulation von SCAR registriert worden (Abbildung 12 und 19).
2. Die Kalziummessungen zeigen, daß in Abwesenheit von SCAR-Stimulation kein intrazellulärer Kalziumanstieg nachgewiesen werden konnte (Abbildung 19).
3. Falls es zu einem intrazellulären Kalziumanstieg und der daraus vermittelten  $H^+/K^+$ -ATPase Aktivierung gekommen sein sollte, spielt dies für die Interpretation der Ergebnisse keine Rolle, da diese Aktivierung dann unter allen Bedingungen gleichermaßen aufgetreten wäre.

Hier konnte aber nun gezeigt werden, daß sowohl die Zugabe als auch die Abwesenheit von extrazellulären zweiwertigen Kationen die Säuresekretion massiv beeinflusst. Nach Entfernen von Natrium aus dem basolateralen Perifusat bei nicht stimulierten Zellen konnte weder in der An- noch in der Abwesenheit von extrazellulären zweiwertigen Kationen eine Aktivierung der Säuresekretion beobachtet werden. Bei Aktivierung von SCAR durch den Agonisten  $Gd^{3+}$  ist jedoch ein Anstieg der Säuresekretion auch in der Abwesenheit weiterer extrazellulärer divalenter Kationen und ohne Histaminstimulation zu beobachten.

Im Gegensatz dazu findet unter Histaminstimulation bei Abwesenheit von extrazellulären zweiwertigen Kationen keine Säuresekretion statt (Abbildung 13). Die Abhängigkeit der histamininduzierten  $H^+/K^+$ -ATPase Aktivierung von extrazellulären zweiwertigen Kationen ist durch die positive Korrelation von verschiedenen zweiwertigen Kationenkonzentrationen im Perifusat zum Anstieg der Säuresekretion demonstriert worden (Abbildung 14). Neben den Effekten auf die Magensäuresekretion, welche SCAR in Abhängigkeit von extrazellulären zwei- und dreiwertigen Kationen auslöst, zeigt diese Arbeit die Wichtigkeit dieses Mechanismus im Zusammenspiel mit Histamin (Abbildung 14). Die Signalkaskade zwischen SCAR und der Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase ist noch weitgehend ungeklärt, genauso wie die Frage, wie SCAR die Wirkung von Histamin moduliert. Ein indirekter Einfluss von SCAR auf die  $H^+/K^+$ -ATPase über die Ausschüttung von Histamin aus benachbarten ECL Zellen konnte durch die vorliegenden Versuche allerdings ausgeschlossen werden (Abbildung 16,18). Selbst in Anwesenheit des  $H_2$ -Rezeptorblockers Cimetidin zeigte die Aktivierung von SCAR durch Gadolinium die volle Wirkung. Der SCAR-Agonist Gadolinium ist in der

Lage unter Standardbedingungen, als auch bei niedrigen extrazellulären Kalziumkonzentrationen einen Anstieg des intrazellulären Kalziums auszulösen (64a). Die Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase zeigt die Fähigkeit der Parietalzelle, funktionell auf eine Aktivierung von SCAR reagieren zu können. Zudem unterstreicht es die These, daß diese funktionelle Antwort auf sekretogene Stimulanzien, wie Histamin, von einer basalen Hintergrundaktivität des SCAR-Rezeptors abhängig sein könnte. Die Vermittlung der Säuresekretion bei Anwesenheit von extrazellulären zwei- und dreiwertigen Kationen über die Aktivierung von SCAR, legt die Vermutung nahe, daß die histamininduzierte Säuresekretion von SCAR abhängig ist oder zumindest moduliert wird.

Desweiteren können diese Ergebnisse mögliche Mechanismen der genauen Regulation des intrazellulären pH-Wertes der Parietalzelle offenlegen. Die mögliche Beeinflussung verschiedener Transporter über SCAR könnte zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes während der Säuresekretion beitragen. Diese Sekretion über die apikale Membran führt zu einem starken Abfall des luminalen pH-Wertes. Dabei bleibt der intrazelluläre pH unter dieser Stimulation konstant, was bis heute im Zusammenhang mit der Magensäuresekretion nicht näher erklärt werden konnte (70). Frühere Studien zeigen, daß die apikale Membran der Parietalzelle eine sehr niedrige Permeabilität für Protonen,  $NH_3$  und  $CO_2$  hat (71). Der konstante pH wird vermutlich durch zahlreiche Transporter gewährleistet, welche gleichzeitig aktiviert oder gehemmt werden. Daran sind  $Na^+/H^+$ -Austauscher,  $Cl^-/HCO_3^-$ -Austauscher sowie  $Na^+/HCO_3^-$ -Kotransporter beteiligt (72,73,74,75). Auch die Funktion des  $Na^+/H^+$ -Austauschers scheint durch SCAR beeinflusst zu werden, da bei einigen Versuchsprotokollen eine starke Verminderung der  $Na^+/H^+$ -Aktivität beobachtet werden konnte. Diese Registrierung wurde jeweils am Schluss der Experimente gemacht, als wieder Natrium zu dem Perifusat gegeben wurde, um die Zelle auf den Ausgangs pH-Wert zurückzuführen. Für einen klaren Nachweis sind jedoch noch weitere Versuche nötig, auch im Hinblick auf die verschiedenen lokalisierten Isoformen des  $Na^+/H^+$ -Austauschers (siehe Seite 20). Ferner sind hier Studien nötig, welche den Zusammenhang der  $Na^+/H^+$ -Austauscher mit Histamin-stimulierter Säuresekretion und zweiwertigen Kationen näher untersuchen. Neben der Kontrolle der Säuresekretion scheint SCAR also durch die Regulierung von Transportern in der apikalen-, wie auch der basolateralen Membran Einfluss auf den

konstanten intrazellulären pH der Parietalzelle zu nehmen, um das intrazelluläre Ionenmilieu aufrecht zu halten.

#### **4.2.2. Einfluss von SCAR auf die Kalziumhomöostase**

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, konnte der zweiwertige Kationenrezeptor in zahlreichen Gewebearten nachgewiesen werden. Dazu zählen hauptsächlich solche Organe, die bei der Regulierung der Kalziumhomöostase eine wichtige Rolle spielen (Parathyroidea, C-Zellen der Schilddrüse, Niere und Knochen).

Mutationen des Rezeptors führen zu Störungen im Kalziumhaushalt. Mutationen, welche zur Inaktivierung des Rezeptors führen, können eine benigne familiäre Hyperkalzämie sowie das Syndrom des neonatalen Hyperparathyroidismus verursachen. Beide Krankheitsbilder führen zur Hyperkalzämie (76,77).

In seltenen Fällen kommen auch Mutationen vor, welche den divalenten Kationenrezeptor übermäßig aktivieren und so zum Krankheitsbild der autosomal dominanten oder sporadischen Hypokalzämie mit Nephrolithiasis, Niereninsuffizienz, Nephrokalzinose und Hyperkalziurie führen können (78).

Die metabolische Entgleisung in Form der Hyperkalzämie steht in engem Zusammenhang mit der Magensäuresekretion. Patienten mit Hyperparathyroidismus und Hyperkalzämie haben ein erhöhtes Risiko ein Magenulkus zu entwickeln (79). Dieser Zusammenhang wird durch vorliegende Ergebnisse verständlicher, da die Stimulation der Magensäuresekretion durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration gezeigt werden konnte. Hierbei könnte die verstärkte Aktivierung von SCAR durch extrazelluläres Kalzium (oder andere zweiwertige Kationen) zu einer Steigerung der Säuresekretion der Parietalzellen und somit zu einem erhöhten Risiko an Magen- oder Duodenalulzerationen führen. Wie hoch die Kalziumkonzentration bei dieser Krankheit direkt an den Parietalzellen ist, konnte der Literatur nicht entnommen werden.

Weiterhin unterstreichen diese Versuche die These, daß der pH-Wert im Magen großen Einfluss auf die intestinale Kalziumaufnahme und damit auf den gesamten Kalziumhaushalt hat. Neben einer möglichen direkt vermittelten Kalziumaufnahme durch SCAR kommt es über die Produktion von Magensäure entlang der Magendrüsen indirekt zu einer vermehrten Kalziumaufnahme im Intestinaltrakt (80).

Diese Beteiligung von SCAR bei der Säuresekretion und der Ionenhomöostase in Parietalzellen legt eine Beteiligung bei der Regulierung des gesamten Kalziumhaushaltes durch Interaktion des Rezeptors mit Ionentransportern und Kanälen der Zellmembran nahe. Dieser Mechanismus könnte den Kationenrezeptor befähigen, die Kalziumreabsorption durch Veränderung des Protonenausstromes aus der Parietalzelle zu regulieren, was wiederum den Anteil des ionisierten Kalziums im Körper beeinflusst.

#### **4.2.3. Andere mögliche Funktionen von SCAR im Magen**

Diese Arbeit zeigt den funktionellen Zusammenhang zwischen gastralem zweiwertigen Kationenrezeptors (SCAR) und Magensäuresekretionsmechanismen. Daneben konnte SCAR aber auch in anderen Geweben und Zelltypen des Magens nachgewiesen werden:

a)Gastrinzellen des Magenantrums. Hohes extrazelluläres Kalzium und SCAR-Agonisten lösen einen Anstieg des intrazellulären Kalziums aus. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung von Gastrin, welches wiederum an der Parietalzelle die Säuresekretion aktiviert. Also ist SCAR auch indirekt über die G-Zellen in der Lage, die Magensäuresekretion zu modulieren und eventuell über diesen Mechanismus auch den systemischen Kalziumhaushalt zu beeinflussen (66).

b)Magenmukosaepithelzellen. In diesen Zellen konnte der Rezeptor hauptsächlich in der basolateralen Membran nachgewiesen werden. Hier löst eine Erhöhung des extrazellulären Kalziums einen intrazellulären Kalzium- und Inositoltriphosphatanstieg aus. Ferner ist nach Stimulation von SCAR eine Zellproliferation zu beobachten (81). Dies könnte auf die Beteiligung von SCAR an Reparations- und Regenerationsmechanismen der Magenmukosa hindeuten und gleichzeitig den Schutz der Magenmukosa bei verstärkter Magensäuresekretion bedeuten. An diesen Reparationsmechanismen sind auch Wachstumsfaktoren und Polyamine beteiligt (47,89). Polyamine stellen neben zweiwertigen Kationen ebenfalls Agonisten von SCAR dar (82,89). Intrazellulär bewirken sie eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Mikrotubulopolimerisation, welche auch durch SCAR moduliert werden könnte (83).

c)Enterisches Nervensystem. Der divalente Kationenrezeptor wurde im Auerbach und Meissner Plexus nachgewiesen (65). Dort wird eine Beteiligung an der Magenmotilität sowie an der Säuresekretion vermutet.

Alle Mechanismen deuten auf einen gemeinsamen Endpunkt hin: die Steigerung der Magensäuresekretion und der gleichzeitige Aufrechterhaltung der mukosalen Schutzbarriere. Es werden jedoch weitere Studien benötigt, um diese Funktionen von SCAR in seinen Details zu verstehen.

Wie weiter oben ausgeführt, existieren neben Kalzium auch noch weitere Agonisten, wie  $Mg^{2+}$ , Gadolinium, Spermin und Neomycin, welche mit dem zweiwertigen Kationen-rezeptor interagieren (82,84).

Darüberhinaus ist in anderen Studien auch eine Aktivierung von SCAR durch Aminosäuren gezeigt worden (84). Aminosäuren potenzieren die Aktivierung von SCAR durch andere Agonisten. Dabei haben die L-Aminosäuren eine vielfach höhere Wirkung auf den Rezeptor als die D-Aminosäuren. Besonders aromatische Aminosäuren sind in der Lage bei einem bestimmten Level von extrazellulärem Kalzium den divalenten Kationenrezeptor selbst zu aktivieren und darüber hinaus für andere Agonisten zu sensitivieren. Im Magen induzieren Aminosäuren eine Aktivierung der Säuresekretion über bislang noch nicht identifizierte Mechanismen (84). Eine Beteiligung von SCAR erscheint angesichts dieser neuen Ergebnisse wahrscheinlich.

So ist es möglich, daß SCAR bestimmte Effekte erhöhter oder verminderter Proteinaufnahme auf den Elektrolythaushalt und im Speziellen auf den Kalziumhaushalt vermittelt. Zum Einen kann bei erhöhtem Proteingehalt der Nahrung die Magensäuresekretion über SCAR gesteigert werden und auch eine erhöhte Kalziumausscheidung über die Niere beobachtet werden (85). Bei erniedrigter Proteinzufuhr kommt es zu einer Steigerung des Parathyroidhormons im Blut und damit zu einer Kalziummobilisation (86). Die Fähigkeit von SCAR sowohl mit Kationen als auch mit Aminosäuren zu interagieren stellt einen wichtigen Schritt dar, den Zusammenhang von Ionen- und Proteinhaushalt besser zu verstehen.

#### **4.3. Offene Fragen und medikamentöse Therapieansätze**

Der zweiwertige Kationenrezeptor stellt ein interessantes Ziel für die Entwicklung therapeutischer Mittel zur Behandlung von Störungen, die auf einer Unter- oder Überfunktion des Rezeptors beruhen, dar (87).

Bezüglich der vorliegenden Arbeit könnten die Ergebnisse einen neuen therapeutischen Ansatz für die Magensäureüberproduktion eröffnen. Aufgrund der Interaktion von SCAR mit der Protonenpumpe und der vermuteten Modulation der Histamin-stimulierten Säuresekretion ist es denkbar, durch spezifische Antagonisten des SCAR die Säuresekretion zu hemmen. Um wahrscheinliche Nebenwirkungen zu vermeiden, wäre es wichtig, einen selektiven SCAR-Antagonisten zu entwickeln. Ein nächster möglicher Ansatzpunkt wäre die Hemmung des intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus, der bis heute jedoch weitgehend unerkannt ist.

Bisherige klinische Studien zur medikamentösen Regulation des Kalziumrezeptors beschäftigen sich vor allen Dingen mit der Behandlung von Hyperparathyroidismus. Dazu werden Agonisten des divalenten Kationenrezeptors verwendet. Dies ist eine Klasse von hydrophoben kleinmolekularen Verbindungen, welche den Rezeptor allosterisch aktivieren. Bei der Behandlung des Hyperparathyreodismus mit solchen kalzimimetischen Agonisten konnte ein schneller Abfall des PTH-Levels im Blut beobachtet werden, sowie ein anschließender Abfall des Serumkalziums und eine erhöhte Ausscheidung von Kalzium über die Niere (88). Über Wirkungen dieser Medikamente auf die Magensäuresekretion ist bislang nichts bekannt.

### **Zusammenfassung**

Zweiwertige Kationenrezeptoren konnten in zahlreichen Geweben und Organen nachgewiesen werden. Die Identifizierung offenbart neue potentielle Mechanismen im Hinblick auf die zahlreichen physiologischen Prozesse, bei welchen zweiwertige Kationen, insbesondere Kalzium, beteiligt sind. Die wichtigste Beteiligung dieser Rezeptoren scheint die Modulation des systemischen Kalziumhaushaltes zu sein, wobei auch andere Funktionen nachgewiesen werden konnten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem divalenten Kationenrezeptor im Magen (SCAR = stomach-calcium-sensing-receptor). Dieser Rezeptortyp konnte in der basolateralen Membran der Parietalzelle lokalisiert werden, welche die säuresezernierende Zelle der Magendrüse darstellt. Die Aktivierung der Säuresekretion im Magen wird hauptsächlich neuronal durch den Transmitter Acetylcholin und endokrin durch die Hormone Gastrin und Histamin reguliert. Verliert der Magen seine natürlichen Schutzbarrieren oder treten Defekte bei den Regulationsmechanismen auf, so kann es zu einer Hypersekretion von Säure kommen und in Folge Ulzerationen von Magenmukosa, Ösophagus und Duodenum entstehen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen neuen Mechanismus, welcher die Säuresekretion über den zweiwertigen Kationenrezeptor SCAR beeinflusst. Wird dieser Rezeptor durch zweiwertige Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) aktiviert, so führt dies zu einer Aktivierung der apikalen Protonenpumpe ( $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) und damit zu einem Anstieg der Säuresekretion. Auch der intrinsisch sehr wirksame dreiwertige SCAR-Agonist Gadolinium bewirkt eine Steigerung der Sekretion von Säure über die Omeprazol-sensitive  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Dieser Effekt wird auch bei Abwesenheit von Histamin beobachtet. Nach Reduktion der extrazellulären Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) wird jedoch der stimulatorische Effekt von Histamin auf die Säuresekretion gehemmt. Dies spricht für eine regulatorische Interaktion zwischen SCAR und der apikalen Protonenpumpe, sowie einer Abhängigkeit der Histamin-induzierten Säuresekretion von der SCAR-Aktivierung.

Es ist hier zum erstenmal gelungen eine Wechselwirkung zwischen dem zweiwertigen Kationenrezeptor (SCAR) im Magen und einem Membranprotein ( $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) nachzuweisen und somit mögliche neue Aspekte bei der Regulierung der Magensäuresekretion aufzuzeigen.

### Literaturverzeichnis

- 1) Schmidt, Thews  
 Physiologie des Menschen  
 25.Auflage Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- 2) Wilkes, J.M., Kjimura, M., Scott D. R., Hersey S. J., & Sachs G. (1991)  
 Muscarinic responses of gastric parietal cells. *J. Membr. Biol.* **122**:97-110.
- 3) Prinz, C., Kajimura, M., Scott, D.R., Mercier, F., Helander, H.F., Sachs, G.(1993)  
 Histamine secretion from rat enterochromaffine-like cells in primary culture.  
*Gastroenterology* **105**:449-461.
- 4) Dimaline, R., & Sandvik, A.K. (1991) Histidine decarboxylase gene expression in rat fundus is regulated by gastrin. *FEBS Lett.* **281**:20-22.
- 5) Chen, D., Monstein, H.J., Nylander, A.G., Zhao, C.M., Sundler, F., & Hakanson, R. (1994) Acute responses of rat stomach enterochromaffine-like cells to gastrin: secretory activation and adaption. *Gastroenterology* **107**:18-27.
- 6) Zhao C.M., Jacobsson G., Chen D., Hakanson R., & Meister B.(1997) Exocytic proteins in enterochromaffin.like (ECL) cells of the rat stomach. *Cell. Tissue Res.* **290**:539-551.
- 7) Hakanson, R., & Owman C.(1967) Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromaffin-like cells of gastric mucosa. *Life Sci.* **6**:759-766.
- 8) Hakanson, R., Bottcher, G., Ekblad, E., Panula, P., Simonsson, M., Dohlsten, M., Hallberg, T. & Sundler, F. (1986) Histamine in endocrine cells in the stomach. A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry* **86**:5-17.
- 9) Bottcher, G., Hakanson, R., Nilsson, G., Seensalu, R. & Sundler, F. (1989) Effects of long-term hypergastrinaemia on the ultrastructure of enterochromaffine-like cells in the stomach of the rat, hamster and guinea pig. *Cell. Tissue Res.* **256**:247-257.
- 10) Prinz, C., Scott, D.R. & Sachs, G. (1993) Gastrin effects on isolated rat enterochromaffine-like cells. *Gastroenterology* **105**:449-461.
- 11) Prinz, C., Sachs, G., Walsh, J.& WU, V. (1994) The somatostatin receptor subtype in rat enterochromaffine-like cells. *Gastroenterology* **107**:1067-1074
- 12) Dockray, G.J., & Gregory, R.A.. (1989) Gastrin. In: Handbook of Biology. Bethesda, MD: *Am. Physiol. Soc.*, **6**:311-336.

- 13) Elwin, C.E. (1974) Gastric acid responses to antral application of some amino acids, peptides, and isolated fractions of a protein hydrolysate. *Scan. J. Gastroenterol.* **9**:239-247.
- 14) Delvalle, J., & Yamada, T. (1990) Amino acids and amines stimulate gastrin release from canine antral G-cells via different pathways. *J. Clin. Invest.* **85**:139-143.
- 15) Delvalle, J., Chiba, T., Park, J. & Yamada, T. (1993) Distinct receptors for cholecystokinin and gastrin on canine fundic D-cells. *Am. J. Physiol.* **264**:G811-815.
- 16) Madaus, S., Bender, H., Schusdziarra, V., Kehe, K., Munzert, G., Weber, G., & Classen, M. (1990) Vagally induced release of gastrin, somatostatin and bombesin-like immunoreactivity from perfused rat stomach. *Regul. Pept.* **30**:179-192.
- 17) Hersey, S.J., Sachs, G. Gastric acid secretion. *Physiol. Rev.* **75**:155-89
- 18) Dial, E., Thompson, W.J. & Rosenfeld, R.C. (1981) Isolated parietal cells: histamine response and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **219**:585-590.
- 19) Gantz, I., Schaffer, M., Delvalle, J., Logsdon, C., Campbell, V., Uhler, M., & Yamada, T. (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H<sub>2</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5937.
- 20) Chew, C. S., Nakamura, K., & Ljungstrom, M. (1992) Calcium signaling mechanism in the gastric parietal cell. *Yale J. Biol. Med.* **65**:561-576.
- 21) Francis, S. H., & Corbin, J.D. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **56**:237-272.
- 22) Prinz, C., Zanner, R., Gerhard M., Mahr, S., Neumayer, N., Hohne-Zell, B., Gratzl, M. (1999) The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* **277**:C845-55
- 23) Kajimura, M., Reuben, M.A., & Sachs, G. (1992) The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the m<sub>3</sub> subtype. *Gastroenterology* **103**:870-875.
- 24) Kulaksiz, H., Arnold, R., Goke, B., Maronde, E., Neyer, M., Fahrenhol, F., Forssmann, W.G., Eissele, R. (2000) Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin Receptor in human stomach. *Cell. Tissue Res.* **299**:289-98.
- 25) Geibel, J., Abraham, R., Modlin, I., Sachs, G. (1995 Okt.) Gastrin-stimulated changes in Ca<sup>2+</sup> concentration in parietal cells depends on adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels. *Gastroenterology.* **109**:1060-7.

- 26) Soll, A. H. (1980) Specific inhibition by Prostaglandins E2 und I2 of histamine-stimulated (<sup>14</sup>C) aminopyrine accumulation and cyclic adenosine monophosphate generation by isolated canine parietal cells. *J. Clin. Invest.* **65**:1222-1229.
- 27) Smolka, A, Helander, H.F., Sachs, G. (1993) Monoclonal antibodies against gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Am. J. Physiol.* **245**:G589-96.
- 28) Hall, K., Perez, G., Sachs, G., Rabon, E. (1991)  
Identification of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha,beta-heterodimers.  
*Biochem. Biophys. Acta.* **1077**:173-9.
- 29) Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., Saccomani, G. (1976)  
A nonelectrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach.  
*J. Biol. Chem.* **251**:7690-8.
- 29a) Sherry A., Malinowska D., Morris R., Ciruolo G., Cuppoletti J. (2001) Localization of ClC-2 Cl-channels in rabbit gastric mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1599-606
- 30) Forte, J.G., Black, J.A, Forte, T.M, Machen, T.E, Wolosin, J.M. (1981)  
Ultrastructural changes related to functional activity in gastric oxyntic cells.  
*Am. J. Physiol.* **241**:G349-58.
- 31) Forte, J.G, Hanzel, D.K., Okamoto, C., Chow, D., Urushidani, T. (1990)  
Membrane and protein recycling associated with gastric HCl secretion.  
*J. Intern. Med. Suppl.* **732**:17-26. Review.
- 32) Caplan, M.J. Gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: targeting signals in the regulation of physiological function. (1998) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**:468-73. Review.
- 33) Scott, D.R, Helander, H.F, Hersey, S.J, Sachs, G. (1993)  
The site of acid secretion in the mammalian parietal cell.  
*Biochem. Biophys. Acta.* **1146**:73-80.
- 34) Rabon, E., Sachs, G., Bassilian, S., Leach, C., Keeling, D. (1991)  
A K<sup>(+)</sup>-competitive fluorescent inhibitor of the H,K-ATPase.  
*J. Biol. Chem.* **266**:12395-401.
- 35) Brzezinski, P., Malmstrom, B.G., Lorentzon, P., Wallmark, B. (1988)  
The catalytic mechanism of gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: simulations of pre-steady-state and steady-state kinetic results.  
*Biochem. Biophys. Acta.* **942**:215-9.

- 36) Courtois-Coutry, N., Roush, D., Rajendran, V., McCarthy, J.B., Geibel, J., Kashgarian, M., Caplan, M.J. (1997). A tyrosine-based signal targets H/K-ATPase to a regulated compartment and is required for the cessation of gastric acid secretion. *Cell*. **90**:501-10.
- 37) Tytgat GN. Helicobacter pylori: causal agent in peptic ulcer disease? Conclusion. (1991). *J. Gastroenterol. Hepatol.* **6**:139-40.
- 38) Besancon, M., Shin, J.M., Mercier, F., Munson, K., Miller, M., Hersey, S., Sachs, G. Membrane topology and omeprazole labeling of the gastric H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosinetriphosphatase. (1993) *Biochemistry*. **32**:2345-55.
- 39) Van der Hulst, R.W., Weel, J.F., Van der Ende, A., ten Kate, F.J, Dankert, J., Tytgat, G.N. (1996). Therapeutic options after failed Helicobacter pylori eradication therapy. *Am. J. Gastroenterol.* **91**:2333-7.
- 40) Brown, E.M. Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers. (1991) *Physiol. Rev.* **71**:371- 411.
- 41) Pietrobon, D., Di Virgilio, F., Pozzan, T. (1990) Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **120**:599-622.
- 42) Stewart, A.F., Broadus, A.E. (1987) Mineral metabolism. In: Felig, P., Baxter, J.D., Broadus, A.E., Frohmann, L.A., eds. *Endocrinology and Metabolism 2<sup>nd</sup> ed.* New York: McGraw-Hill:1317-1453.
- 43) Weisinger, J.R., Favus, M.J., Langman, C.B., & Bushinsky, D. (1989). Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid hormone-replete rat. *J. Bone. Mine. Res.* **4**:929-935.
- 44) Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., et al. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. **366**:575-580
- 45) Nemeth, E. (1990). Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent cations in C-cells and parathyroid cells. *Cell Calcium* **11**:323-327.
- 46) Li, L., F. H. Kruszewski, K., Punnonen, R. W., Tucker, S. H., Yuspa, & H. Hennings. (1993) Strontium induces murine keratinocyte differentiation in vitro in the presence of serum and calcium. *J. Cell. Physiol.* **154**:643-653.
- 47) Quinn, S.J, Ye, C.P., Diaz R, et al. (1997). The calcium-sensing receptor: a target for polyamines. *Am. J. Physiol.* **273**:1315-1323.

- 48) Garrett, J.E., Capuano, I.V., Hammerland, L. G., Hung, B.C.P., Brown, E.M., Hebert, S.C., Nemeth, E.F., & Fuller, F.(1995a). Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J. Biol. Chem.* **270**:12919-12925.
- 49) Ryba, N. J. P., & Trindell, R. (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* **19**:371-379.
- 50) Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron* **13**:1031-1037.
- 51) Kubo, Y., Miyashita, T., & Murata, Y. (1998). Structural basis for a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science* **279**:1722-1725
- 52) Kifor, O., Diaz, R., Butters, R., and Brown, e.M.. (1997). The  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Bone Miner. Res.* **12**:715-725.
- 53) Ye, C., Rogers, K., Bai, M., Quinn, S.J., Brown, E.M., & Vassilev, P.M. (1996b). Agonists of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (CaR) activate nonselective cation channels in HEK293 cells stably transfected with human cCaR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**:572-579.
- 54) Chang, W., Pratt, S., Chen, T.-S., Huang, Z., & Shoback, D. (1998). Coupling of calcium receptors to inositol phosphate and cAMP generation in mammalian cells and *Xenopus* oocytes and immunodetection of receptor protein by region-specific antipeptide antisera. *J. Bone Miner. Res.* **13**:570-580.
- 55) Chen, C., Barnett, J., Congo, D., & Brown, E. (1989). Divalent cations suppress 3',5'-adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **124**:233-239.
- 56) Mailland, M., Waelchli, R., Ruat, M., Boddeke, H. G. W. M., & Seuwen, K. (1997). A  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing of cell proliferation by Calcium and calcimimetic compound *Endocrinology* **138**:3601-3605.
- 57) Wada, M., Furuya, Y., Sakiyama, J.-I., Kobayashi, N., Miyata, S., Ishii, H., & Hagano, N. (1997). The calcimimetic compound NPS R-568 suppresses parathyroid cell proliferation in rats with renal insufficiency. *J. Clin. Invest.* **100**:2977-2983.

- 58) Yamaguchi, T., Chattopahyay, N., Kifor, O., Butters, R.R., Sugimoto, T., & Brown, E.M.(1998b). Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}_0$ )-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**:1530-1538.
- 59) Yamaguchi, T., Olozak, I., Chattopadhyay, N., Butters, R. R., Kifor, O., Scadden, D. T., & Brown, E. M. (1998). Expression of extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}_0$ )-sensing receptor in human peripheral blood monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:501-506,
- 60) Kifor, O., MacLeod, R.J., Diaz, R., Bai, M., Yamaguchi, T., Yao, T., Kifor, I., Brown, E.M. (2001) Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**:F291-F30236.
- 61) McMeill, S.E., Hobsen, S.A., Nipper, K.D., Rodland, K.D. (1998). Functional calcium-sensing receptors in rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J. Biol Chem* **273**:1114-1120.
- 62) Flemstrom, G., Garner, A. (1980). Stimulation of gastric acid and bicarbonate secretions by calcium in guinea pig stomach and amphibian isolated mucosa. *Acta physiol. Scand.* **110**:419-426, 1980
- 63) Flemström, G. (1978). Effects of catecholamines,  $\text{Ca}^{2+}$  and gastrin on gastric  $\text{HCO}_3^-$  secretion. *Acta Physiol. Scand.* **88**:81-90.
- 64) Cima, R.R, Cheng, I., Klingensmith, M.E, Chattopadhyay, N., Kifor, O., Hebert, S.C., Brown, E.M, & Soybel, D. I. (1997). Identification and functional assay of an extracellular calcium sensing receptor in Necturus gastric mucosa. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **273**:G1051- G1060.
- 64a) Geibel, J.P., Wagner, C.A., Caroppo, R., Quereshi, I., Gloeckner, J., Manuelidis, L., Kirchhoff, P., Radebold, K. (2001). The stomach divalent ion-sensing receptor SCAR is a modulator of gastric acid secretion. *J. Biol. Chem.* **276**:39549-39552
- 65) Cheng, I., Quereshi, I., Chattopadhyay, N., Quereshi, A., Butters, R., Hall, A.E., Cima, R.R., Rogers, K.V., Hebert, S.C., Geibel, J.P., Brown, E.M., & Soybel, D.I. (1999). Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in rat stomach. *Gastroenterology* **116**:118-126.

- 65) Ray, J.M., Squires, P.E., Curtis, S.B., Meloche, M.R., & Buchan, A.M. (1997)  
Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture.  
*J. Clin. Invest.* **99**:2328-2333.
- 67) Rutten, M.J., Bacon, K.D., Marlink, K.L., Stoney, M., Meichsner, C.L., Lee, F.P.,  
Hobsen, S.A., Rodland, K.D., Shepard, B.C., Trunkey, D.D., Deveney, K.E., , &  
Deveney, CW.(1999). Identification of a functional  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor in normal  
human gastric mucous epithelial cells. *Am J Physiol* . **277**:G662-G670.
- 68) Ray, J.M., Squires, P.E., Curtis, S.B., Meloche, M.R., Buchan, A.M. (1997).  
Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture.  
*J. Clin. Invest.* **99**:2328-33
- 69) Negelescu, P. A. & Machen, T. E. (1995).  $\text{La}^{3+}$  and pH sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  
intracellular store filling in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **269**:G770-778.
- 70) Paradiso, A., Townsley, M., Wenzl, E., Machen, T. (1989). Regulation of intracellular  
pH in resting and stimulated parietal cells. *Am. J. Physiol.* **257**:C554-C561 (1989)
- 71) Walter, F., Boron, S. J., Waisbren, I.M., Modlin, & Geibel, J. P.  
Unique Permeability Barrier of the apical surface of parietal and chief cells in isolated  
perfused gastric gland
- 72) Noel, J. & Pouyssegur, J. (1995). Hormonal regulation, pharmacology, and  
membrane sorting of vertebrate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* **268**:  
C283-296.
- 73) Yun, C. H., Tse, C. M., Nath, S. K., Levine, S. A., Brant, S. R., & Donowitz, M.  
(1995). Mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger gene family: structure and function studies.  
*Am. J. Physiol.* **269**:G1-11.
- 74) Caroppo, R., Schmitt, B.M., Boron, W.F. & Geibel, J.P. (1998). *Gastroenterology*  
**114**:G4635.
- 75) Rossmann, H., Bachmann, O., Vieillard-Baron, D., Gregor, M. & Seidler, U.(1999).  
 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransport and expression of NBC1 and NBC2 in rabbit gastric  
parietal and mucous cells. *Gastroenterology* **116**:1389-98
- 76) Chattopadhyay N., Mithal A., Brown E., (1996). The Calcium receptor: new handle  
on the diagnosis and treatment of parathyroid disorders. *Endocrine Rev.* **17**:289-  
307

- 77) Pearce S., Trump D., Wooding C., et al. (1995). Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcaemia and neonatal hyperparathyroidism. *J. Clin. Invest.* **96**:2683-92
- 78) Baron, J., Winer, K.K., Yanovski, J.A., et al. (1996). Mutations in the  $Ca^{2+}$ -sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Human Mol. Genet.* **5**:601-6
- 79) Wise, S.R., Quigley, M., Saxe, A.W., Zdon, M.J. (1990). Hyperparathyroidism and cellular mechanism of acid secretion. *Surgery* **108**:1058 - 63; discussion 1063-4
- 80) Favus, M.J., Bushinsky, D.A., Coe, F.L. (1986). Effects of medium pH on duodenal and ileal calcium active transport in the rat. *Am. J. Physiol.* **251**:G695-700
- 81) Gama, L., L. M. Baxendale-Cox, & G. E. Breitwieser. (1997).  $Ca^{2+}$ -sensing receptors in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.* **273**:C1168-C1175.
- 82) Chattopadhyay, N., I. Cheng, K. Rogers, D. Riccardi, A., Hall, R. Diaz, S. C. Hebert, D. I. Soybel, & E. m. Brown.(1998). Identification and localisation of extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor in rat intestine. *Am. J. Physiol.* **274**:G122-G130.
- 83) Banan, A., S. A. Mc Cormack, & L.R. Johnson. (1998). Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. *Am. J. Physiol.* **274**:G879-G885.
- 84) Conigrave, D., Quinn, S.T., & Brown, E.M. (2000). L-amino acid sensing by the extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **25**, 4814-4819.
- 85) Burtis, W.J, Gay, L., Insogna, K.L., Ellison, A., & Broadus, A.E.(1994) Dietary hypercalciuria in patients with calcium oxalate kidney stones. *Am. J. clin. Nutr.* **60**:424-429
- 86) Kerstetter, J.E., O'Brien, K.O., & Insogna, K.L. (1998). Dietary protein affects intestinal calcium absorption. *Am. J. Biol. Chem.* **274**:27111-27117.
- 87) Nemeth, E.F. (1996). Calcium receptors as novel drug targets. In: *Principles of Bone Biologie 1<sup>st</sup> ed.*, edited by Bilezikian JP., Raisz LG., & Rodan, G.A. San Diego, CA:Academic.1019-1035.
- 88) Silverberg, S.J., Bone, H.G., Marriott, T.B., Locker, F.G., Thys-Jacobs, S., Dziem G., Kaatz, S., Sanguenetti, E.L., & Bilezikian JP. (1997). Short term inhibition of parathyroid hormone secretion by a calcium-receptor agonist in patients with primary hyperparathyroidism. *New Engl. J. Med.* **337**:1506-1510.

- 89) Brzowski, T., Droszdowicz, D., Majka, J., Polonczyk-Pytka, J., Konturek, S.J. (1991). Role of polyamines in gastroprotection induced by epidermal growth factor. *J. Physiol. Pharmacol.* **42**:181-93.

## **Danksagung**

Mein erster herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Herrn Dr. Wolfgang und Frau Marie-Luise Kirchhoff, die mit ihrem Interesse, ihrer Geduld und ihrer großzügigen Unterstützung die Arbeit in dieser Form überhaupt erst ermöglicht haben.

Sodann danke ich ganz besonders meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Florian Lang, für seine hilfsbereite, stets freundliche Betreuung, sowie Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Carsten Wagner, der mich bei den Experimenten, der Auswertung und dem Verfassen stets beispielhaft betreute, bin ich nicht nur deshalb, sondern auch wegen seiner freundliche Hilfe bei einigen arbeitstechnischen Unsicherheiten und der überaus angenehmen Zeit an der Yale University zu höchstem Dank verpflichtet.

Technische und fachliche Unterstützung und die Bereitstellung jeglicher benötigten Materialien sowie des Laborplatzes gewährte Prof. Dr. John Geibel, auch ihm danke ich herzlich, ebenso meinem Freund Herrn cand. med. Felix Knauf, für einige Wochen entspannter Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft in New Haven.

Meinem Bruder Herrn Dr. Jörg Kirchhoff, dem das zweifelhafte Vergnügen zuteil geworden ist, das Manuskript als aufmerksamer und kritischer Korrekturleser kennenlernen zu dürfen, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Neben den hier namentlich Genannten bin ich besonders all denjenigen sehr dankbar, die mir - manchmal ohne es zu wissen - in den etwas weniger angenehmen Phasen der Arbeit immer wieder Mut gemacht haben, sowie allen anderen, die mir auf vielfältige Art und Weise geholfen haben.

**Lebenslauf****Persönliche Angaben:**

Name: Philipp Kirchhoff  
geboren am: 2. September 1975  
in: Wermelskirchen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

**Schulausbildung:**

1982-1986: Grundschule Attendorn  
1986-1995: Rivius-Gymnasium in Attendorn

**Zivildienst:**

Juli 1995-Juli 1996: Universitätsklinikum Freiburg  
Herzchirurgie (Prof. Beyersdorf)

**Studium:**

1996-1999: Studium der Humanmedizin an der  
Universität Freiburg i. Br.  
August 1999: 1. Staatsexamen  
August 1999 - Juli 2000: Studium der Humanmedizin an der  
Universität Wien  
Juli 2000 - Oktober 2000: Experimenteller Teil der Dissertation  
an der Yale University  
seit Oktober 2000: Studium der Humanmedizin an der  
Freien Universität Berlin  
08.05.2003: 3. Staatsexamen

Famulaturen:

- September 1998: St.-Barbara-Krankenhaus Attendorn  
Allgemeinchirurgie (Dr. Rettler)
- Februar 1999: Universitätsklinik Wien  
Transplantationschirurgie  
(Prof. Dr. Mühlbacher)
- März 1999: Universitätsklinik Freiburg  
Allgemeinchirurgie (Prof. Dr. Farthmann)
- September 1999: Universitätsklinik Wien  
Intensivmedizin (Prof. Dr. Lechner)
- Februar 2000: Universitätsspital Zürich  
Herzchirurgie (Prof. Dr. Turina)
- März 2000: Semmelweis-Frauenklinik in Wien  
(Prof. Dr. Wagenbichler)
- März 2001: Allgemeinmedizin (Dr. Kirchhoff)

Praktische Erfahrung:

- 1996-1999: Regelmäßige Tag- und Nachtdienste auf der  
Überwachungsstation der Herzchirurgie  
Freiburg
- Oktober 1999 - Januar 2000: Unfallchirurgischer Operationskurs am  
Präparat (Universitätsklinik Wien)

Veröffentlichungen:

John P. Geibel, Carsten A. Wagner, Rosa Caroppo, Imtiaz Quereshi, Judith Glöckner, Laura Manuelidis, Philipp Kirchhoff, Klaus Radebold. (2001) The stomach divalent ion-sensing receptor is a modulator of gastric acid-secretion“ in J. Biol. Chem. 276(43):39549-52

