

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Schwerpunkt: Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Malek

DRA wird PDZK1-abhängig dynamisch inhibiert

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sebastian Manncke
aus
Tübingen

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Lamprecht
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Glatzle

1	Einleitung	6
1.1	Die NaCl-Resorption im Intestinaltrakt	6
1.2	Der Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Austauscher DRA (SLC26A3)	7
1.3	Kongenitale Chloriddiarrhoe	8
1.4	PDZ-Adapterproteine.....	9
1.5	Regulation der elektroneutralen NaCl Resorption.....	12
1.6	Die Regulation von DRA.....	13
1.7	Zielsetzung.....	13
1.8	Der Fluoreszenzfarbstoff BCECF.....	14
1.9	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.....	15
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material und Lösungen.....	18
2.2	Zellkultur	22
2.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	23
2.4	Kalibrationsmessungen mit HEK Zellen	30
2.5	Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen mittels 4Br-A23187 31	
2.6	Aktivität von DRA in HEK Zellen mit festgelegtem intrazellulärem Calcium 32	
2.7	Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration mittels BAPTA/AM.33	
2.8	Bestimmung der Oberflächenexpression von DRA.....	33
2.9	Statistik	35
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Parallele Messung von intrazellulärem pH und Calcium.....	37
3.2	Kalibration des Fura-2 Signals.....	38

3.3	Kalibration von Fura-2 in HEK Zellen.....	40
3.4	Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels 4Br-A23187 in HEK Zellen.....	44
3.5	Aktivität von DRA in HEK Zellen mit festgelegtem intrazellulärem Calcium	47
3.6	Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration mittels BAPTA/AM.	50
3.7	Calciuminhibition von DRA in Caco-2 BBE Zellen	52
3.8	Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Oberflächenexpression von DRA.....	57
3.9	Einfluss einer zehnmütigen Erhöhungen der Calciumkonzentration auf die Aktivität von DRA.....	59
4	Diskussion.....	63
4.1	Simultane Messung von intrazellulärem pH und Calciumkonzentrationen	63
4.2	Einschränkungen der Calciumbestimmung mit Fura-2.....	64
4.3	Die Calciumabhängige Inhibition von DRA	66
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literatur	75
7	Erklärung zum Eigenanteil	80
8	Danksagung	81

1 Einleitung

Unter physiologischen Bedingungen beträgt die tägliche Flüssigkeitspassage im Intestinaltrakt je nach Nahrungszufuhr etwa 8,5 l. Alle aufgenommenen Nährstoffe müssen vor ihrer Aufnahme in Lösung gebracht und zumeist zuvor noch mit ebenfalls in Lösung befindlichen Enzymen in Kontakt gebracht werden. Daher ist eine genaue Regulation der intestinalen Flüssigkeitsmenge von besonderer Wichtigkeit.

Diese Flüssigkeit besteht aus etwa 1,5-2,5l Nahrung pro Tag. Dieser Menge werden im Laufe des Verdauungsvorganges 1,5l Speichel, 2l Magensaft, 0,5l Galle, 1,5l Pankreassekret, 1l Dünndarmsekret hinzugeführt. Im Dünndarm wird also nicht nur absorbiert, sondern auch sezerniert. Nur etwa 1-2l der Gesamtmenge erreichen das Zökum [1]. Im Colon werden etwa weitere 90% dieser Flüssigkeit resorbiert, um den noch flüssigen Darminhalt zu Stuhl einzudicken.

Im oberen Dünndarm folgt das Wasser überwiegend dem meist Natriumgekoppelten Nährstofftransport, wobei paradigmatisch der Na^+ /Glukose Cotransporter SGLT1 zu nennen ist [2]. Im distalen Dünndarm und im proximalen Colon folgt das Wasser in erster Linie der elektroneutralen Absorption von NaCl durch parallelen Na/H und Cl/HCO_3 -Austausch. .

Diarrhöen können folglich auf Grund einer gesteigerten Wasser- und Elektrolytsekretion oder auf Grund einer gestörten Resorption entstehen. Beide Vorgänge präsentieren sich als sogenannte sekretorische Diarrhoe und können Hormon- oder Toxin vermittelt entstehen, wie beispielsweise bei der Cholera [3] oder der durch enterotoxische E.coli verursachten Diarrhöe [4].

1.1 Die NaCl-Resorption im Intestinaltrakt

Bereits lange bevor die beteiligten Transportproteine entdeckt wurden, konnte durch funktionelle Experimente eine Kopplung der Chlorid- und die

Natriumresorption im Darm nachgewiesen werden [5]. Später konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen elektroneutralen Transport durch Na^+/H^+ [6] und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch [7] handelt. Die Kopplung dieser Transporter erfolgt durch den pH Wert im unmittelbar subapikalen Bereich.

Für den Na^+/H^+ Austausch konnten die aus der SCL9-Genfamilie stammenden NHE („ Na^+/H^+ “) Isoformen identifiziert werden. Von diesen kommen nur die Isoformen NHE1-3 im Intestinaltrakt vor, wobei nur NHE2 und NHE3 im Bürstensaum zu finden sind [8] [9]. Experimente mit NHE2- und NHE3-knock-out Mäusen zeigten, dass nur diese, bei denen NHE3 fehlte an Diarrhöe erkrankten [10]. NHE3 wird seither die Hauptrolle bei der Natriumresorption im Intestinaltrakt zugesprochen.

1.2 Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher DRA (SLC26A3)

Für den apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher kamen Vertreter aus zwei Genfamilien in Betracht, SCL4 und SLC26. Der einzige, im Intestinaltrakt exprimierte Vertreter der SLC4 Familie, AE2 („Anion Exchanger 2“) konnte jedoch nur in basolateraler Lokalisation nachgewiesen werden [11].

1993 wurde erstmals von Schweinfest et al. die cDNA eines in der gesunden Kolonmukosa exprimierten Proteins isoliert [12]; die mRNA Expression zeigte sich signifikant reduziert in Polypen und Adenokarzinomen. Das Gen wurde daraufhin DRA „down regulated in adenoma“ genannt. Zunächst ging man davon aus, dass DRA ein auf Chromosom 7 lokalisierter Transkriptionsfaktor sei, oder zumindest mit Transkriptionsfaktoren interagiere. Drei Jahre später konnte die gleiche Arbeitsgruppe dies jedoch selbst widerlegen und zeigen, dass es sich bei DRA um ein in Kolon und Ileum exprimiertes Membran-Glykoprotein handelt. Dieses zeigt sich im Western-Blot als eine diffuse Bande bei etwa 95 kDa und eine Doppelbande bei 75 kDa. Durch Behandlung mit Glycosidasen verschwindet die diffuse Bande und die Doppelbande „shiftet“ nach unten [13].

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass DRA nicht nur im Kolon und Ileum exprimiert wird, sondern auch im Duodenum [14], in den Samenblasen und ekrinen Schweißdrüsen [15], den Kiemenbögen von Zebrafischen [16], sowie in

Zusammenhang mit CFTR im Pankreasgang [17], im Hoden [18] und in der Trachea [19].

1.3 Kongenitale Chloriddiarrhoe

1945 wurde erstmals von Darrow [20] und Gamble et al. [21] ein angeborenes Krankheitsbild beschrieben, welches sich vornehmlich durch chloridreiche wässrige Diarrhöe sowie eine metabolische Alkalose auszeichnete. Diese Erkrankung zeigte sich in Polen, Finnland und der Region um den Persischen Golf endemisch [22] mit autosomal rezessiver Vererbung.

Im weiteren Verlauf konnten nähere Einzelheiten zur Pathophysiologie der bis dahin nur als „Metabolische Alkalose mit Diarrhoe“ bezeichneten Krankheit geklärt werden. Die Erkrankung wird durch den gestörten oder fehlenden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch im Ileum und Kolon verursacht [23]. Da dieser Austausch eng mit dem Na^+/H^+ Austausch verknüpft ist, wird ebenfalls die Natriumresorption gestört. Wasser folgt im Darm den osmotischen Gradienten, für den das Natrium im Darm eine große Rolle spielt. Hierdurch entstehen die typischen voluminösen wässrigen Stuhlgänge.

Die weiteren Symptome der Krankheit ergeben sich auf Grund des immensen Flüssigkeitsverlusts. Es kann zu Hyponatriämie, Hypochloridämie, Hyperbilirubinämie, Hypokaliämie und einem sekundären Hyperaldosteronismus kommen. Mildere Verlaufsformen fallen durch eine Wachstumsretardierung und Niereninsuffizienz auf [24].

2006 gelang es der Arbeitsgruppe um Schweinfest erstmals ein DRA defizientes Mausmodell zu etablieren und so genauere Studien der intestinalen Mukosa zu ermöglichen. Dies führte zunächst zu einer wesentlich erhöhten Sterblichkeit der Mäuse, jedoch konnten anhand der überlebenden Mäuse neue Erkenntnisse zur Pathogenese der kongenitalen Chloriddiarrhoe gewonnen werden. So scheint der Ausfall von DRA nicht nur zur chloridreichen Diarrhoe mit all ihren Folgen zu führen. DRA scheint zusätzlich noch ein wichtiger Regulator bei der Ausbildung der Krypten im Kolon zu sein [25].

1.4 PDZ-Adapterproteine

Die Klasse der PDZ Adapterproteine beinhaltet eine große Anzahl intrazellulärer Proteine. Namensgebend waren die ersten drei entdeckten Vertreter PSD95, DLG und ZO-1. Sie alle enthalten PDZ-Domänen, welche eine Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen. Üblicherweise besitzen die PDZ Proteine mehrere PDZ-Domänen und häufig weitere Bindungsdomänen, wodurch eine Bindung zu mehreren Interaktionspartnern zur gleichen Zeit erfolgen kann.

PDZ-Domänen sind etwa 90-100 Aminosäuren lange, kugelförmige Strukturen mit sechs β -Faltblättern (βA - βF) und zwei α -Helices (αA , αB) [26]. Durch Konformationsänderungen, beispielsweise durch Phosphorylierung der PDZ-Domänen oder deren Liganden kann deren Bindeaffinität variiert werden [27-29].

Mögliche Liganden tragen in der Regel C-terminal vier Aminosäure lange Bindemotive. Im Falle von DRA handelt es sich um Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin, kurz ETKF [30]. Harris et al. teilten die möglichen Bindemotive anhand der durch sie erkannten C-terminalen Sequenz in drei Gruppen ein [31].

- Klasse I erkennen das Motiv S/T-X- Φ -COOH
- Klasse II: Φ -X- Φ -COOH
- Klasse III: X-X-C -COOH

Φ steht dabei für eine hydrophobe, X für eine beliebige Aminosäure.

Das Bindemotiv von DRA entspricht somit am ehesten einem Klasse I Motiv.

Kristallographische Studien konnten belegen, dass noch weitere Aminosäuren an der Bindung beteiligt sein können und in manchen Fällen, wie beispielsweise bei der Bindung zwischen NHE3 und NHERF, Motive im Inneren der Proteine als Liganden wirken können [32, 33].

Im Zusammenhang mit der NaCl-Resorption wurde 1995 NHERF-1 als erstes PDZ-Adapterprotein, sowie seine Rolle bei der cAMP vermittelten Inhibition von NHE3

von Weinman et al. beschrieben [34]. Seitdem sind drei weitere NHERF-Isoformen bzw. verwandte PDZ-Adapterproteine in einer Vielzahl von Organen mit unterschiedlichsten Funktionen beschrieben worden: E3KARP (NHERF2), PDZK1 (NHERF3) und IKEPP (NHERF4). Neben den Funktionen bei der Regulation der Ionen Transporte im Intestinaltrakt spielen PDZ-Proteine unter anderem entscheidende Rollen bei der Regulation zellulärer Funktionen in der Leber [35], den Nieren [36] und dem Knochenstoffwechsel. Auch bei der Entstehung von Tumoren scheint die vielseitige Proteinfamilie eine Rolle zu spielen [37, 38].

Auch die zum Teil drastischen Auswirkungen des Knock-outs einzelner PDZ Adapterproteine im Mausmodell unterstreichen deren zentrale Bedeutung in der Regulation zellulärer Abläufe [39].

Über welche Mechanismen die zellulären Effekte der verschiedenen PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie zustande kommen, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Bislang ist bekannt, dass PDZ-Proteine mit einer Vielzahl von Membrantransportern, Rezeptoren und weiteren Regulationsproteinen sowie dem Zytoskelett Bindungen eingehen können. Hierdurch können große und wahrscheinlich dynamisch-variable Multiproteinkomplexe entstehen, welche die Lokalisation, die Expression, das Trafficking und die Aktivität seiner Mitglieder regulieren [40].

Für die Regulation der intestinalen Ionen Transporter sind nach aktuellem Kenntnisstand vor allem die PDZ Proteine NHERF, E3KARP, PDZK1 und IKEPP von Bedeutung. Hinzu kommen noch CAL und Shank2, die ebenfalls eine höhergradige Homologie zur NHERF-Familie zeigen. Diese Adapterproteine interagieren alle mit den wichtigen Ionen Transportern CFTR, NHE3, sowie den Transportern der SLC26 Familie DRA (SLC26A3) und PAT1 (SLC26A6) [39].

Von NHERF¹ ist mittlerweile bekannt, dass es sowohl zwei PDZ Domänen, also auch eine ERM Domäne, die zur Verknüpfung zum Zytoskelett über Ezrin dienen kann verfügt. Regulatorisch kann es durch die PKA und PKC phosphoryliert

¹ Synonyme: NHERF1, EBP50

werden. Weitere Wege der Phosphorylierung sind jedoch möglich. E3KARP² weist größtenteils die gleichen Eigenschaften auf, kann jedoch nicht phosphoryliert werden und befindet sich eher etwas unterhalb der apikalen Membran [41]. Beide Proteine können durch die Bindung an weitere Proteine beim Aufbau größerer Netzwerke beteiligt sein. Da E3KARP und NHERF sehr ähnliche Eigenschaften besitzen, ist für eine Reihe physiologischer Prozesse nicht endgültig geklärt, welches der beiden Proteine für einen bestimmten Effekt verantwortlich ist [39]; eine physiologische Redundanz erscheint zumindest teilweise möglich. Beide Proteine scheinen an der Regulation und dem Trafficking von CFTR und NHE3 beteiligt zu sein [42].

Das dritte PDZ-Adapterprotein der NHERF-Familie, PDZK1, ist für die Regulation von DRA von besonderer Bedeutung und wird im folgenden Abschnitt besprochen.

IKEPP³ besitzt vier PDZ Domänen und kann an die Guanylatcyclase C binden. Es findet sich wie E3KARP weniger im direkten Bereich der apikalen Membran, sondern weiter intrazellulär [41].

1.4.1 PDZK1

„PDZK1“ steht für PDZ Domain Protein Kidney 1. Es gehört zur Gruppe der NHE3 Regulationsfaktoren (NHERF) und wird daher auch NHERF3 genannt. Es existieren weitere Synonyme wie CAP-70 oder NaPi-Cap1. Erstmals beschrieben und charakterisiert wurde es von Kocher et al. 1998 [43].

PDZK1 besitzt vier PDZ Domänen und kann über diese mit den PDZ-Bindemotiven von DRA, NHE3 und des CFTR-Kanals interagieren [44]. Die PDZ Domänen sind die einzigen funktionellen Domänen von PDZK1. Mit NHERF und E3KARP kann PDZK1 Heterooligomere bilden und so subapikale PDZ-Netzwerke bilden [39]. PDZK1 ist teilweise in Lipid rafts, also sphingolipid- und cholesterinreichen Membranbereichen lokalisiert [45]. Über die Proteinkinase A (PKA) kann PDZK1 an der Aminosäure 509 (Serin) phosphoryliert werden [46].

² Synonyme: NHERF2, SIP-1, TKA-1

³ Synonyme: NHERF4, NaPi-CaP2

Mausmodelle mit PDZK1 Knockout fallen durch erhöhte Serumcholesterinwerte und deutlich verminderte Na⁺ Resorption im Darm bei gleichzeitig deutlich erhöhter Genexpression von NHE3 auf [40].

2009 konnte von Lamprecht et al. [47] für DRA und von Zachos et al. [48] für NHE3 eine Beteiligung an der Calciumvermittelten Inhibition dieser Transporter gezeigt werden. Letzterer konnte mittels konfokaler Mikroskopie zeigen, dass hierbei die Dissoziation von PDZK1 und NHE3 eine entscheidende Rolle spielt. Cinar et al. konnten im PDZK1 defizienten Mausmodell zeigen, dass das Fehlen von PDZK1 zum Ausbleiben der cAMP und calciumabhängigen Regulation von NHE3 führt [49].

Von anderen Arbeitsgruppen konnte später die Beteiligung von PDZK1 an der Regulation des subzellulären Trafficking von verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden [50, 51].

1.5 Regulation der elektroneutralen NaCl Resorption

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, waren schon vor der Identifikation der daran beteiligten Transporter einige Details zur Regulation der intestinalen Kochsalzaufnahme bekannt. Bereits 1976 berichtete Field [52], dass erhöhte cAMP Konzentrationen, wie sie etwa durch das Choleratoxin verursacht werden, zu einer Hemmung der aktiven Aufnahme von NaCl im Intestinaltrakt führen. Auch erhöhte cGMP Konzentrationen durch α -adrenerge Rezeptoren oder erhöhte Calcium-Konzentrationen durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren hemmen die apikale NaCl Aufnahme [53]. Im Kolon der Ratte konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen ohne Änderungen der cAMP und cGMP Konzentrationen zu einer Hemmung der NaCl Aufnahme führen [54, 55]. Für eine Reihe von Hormonen konnte im Kaninchendarm ein Einfluss auf Ca²⁺ nachgewiesen werden. So erhöhen Serotonin, Carbachol, Substanz P und Neurotensin den Calciumeintritt über die basolaterale Membran, während dieser von Dopamin gehemmt wird. Bei *Giardia lamblia* infizierten Mäusen kommt es zu einer erhöhten Calciumkonzentration im Bürstensaum mit konsekutiv erniedrigter NaCl Resorption durch die erhöhte Aktivität von Calmodulin [56].

Auf Grund der relativ späten Identifikation von DRA als verantwortlichen Anionenaustauscher (vgl. Abschnitt 1.2) konnte die Regulation von NHE3 wesentlich früher erforscht werden. 2007 wurde von Donowitz und Li hierzu eine Übersicht veröffentlicht [57]. Demnach wird NHE3 durch cAMP und cGMP über Phosphorylierung gehemmt. Außerdem wirkt Calcium über PDZ Adapterproteine regulierend. Das Trafficking von NHE3 wird unter anderem durch EGF (Netto-Stimulation), Carbachol und TNF α (beide führen zu Netto-Inhibition) beeinflusst [58].

1.6 Die Regulation von DRA

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, konnte DRA bereits in einer ganzen Reihe von Geweben nachgewiesen werden. Seine Regulation scheint abhängig von zusätzlich zu DRA exprimierten Proteinen zu erfolgen. So ist bekannt, dass in Anwesenheit von CFTR und PDZK1 cAMP aktivierend auf DRA wirkt, während die Aktivitäten der Partner DRA und NHE3 von cAMP gehemmt werden. Durch die PKA kann zwar nicht DRA selbst, aber seine parallel arbeitenden Transporter, CFTR und NHE3 phosphoryliert und damit stimuliert bzw. gehemmt werden. Auf Grund der Kopplung kommt es dann auch zu einer Stimulation bzw. Hemmung von DRA [59].

Eine Hemmung von DRA durch erhöhte Calciumkonzentrationen kann einerseits konsekutiv über die E3KARP abhängige Hemmung von NHE3 auf dem PKC Signalweg [59], oder andererseits als auch über einen PKC unabhängigen, jedoch PDZK1 abhängigen Signalweg direkt erfolgen [47]. Die direkte Hemmung von DRA durch Calcium ist bislang der einzige bekannte Regulationsmechanismus für DRA in Abwesenheit von NHE3 und CFTR [47].

1.7 Zielsetzung

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben ist die Calcium-abhängige Hemmung von DRA der bislang einzige bekannte Regulationsmechanismus des Anionenaustauschers, welcher unabhängig von den parallel arbeitenden

Transportern, CFTR und NHE3, wirkt. Hierbei spielt das PDZ Adapterprotein PDZK1 eine entscheidende Rolle, wobei die biochemischen bzw. zellbiologischen Mechanismen bisher noch nicht geklärt werden konnten [47].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese offenbar direkte Einwirkung von Calcium auf das DRA/PDZ Netzwerk sowie die Rolle von PDZK1 in diesem Mechanismus näher zu untersuchen.

Konkret lässt sich folgende Zielsetzung formulieren:

- Etablierung einer Methode zur parallelen Bestimmung intrazellulärer pH Werte und intrazellulärer Calciumkonzentrationen.
- Charakterisierung des Dosis-Wirkungs-Zusammenhanges zwischen Calcium und der DRA Aktivität
- Untersuchung, ob PDZK1 hierbei als Calciumsensitizer wirkt
- Untersuchung der Auswirkungen einer längerfristigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Oberflächenexpression von DRA.

Die Messung intrazellulärer pH Werte und Calciumkonzentrationen erfolgte fluoreszenzspektroskopisch. Zum Verständnis der Methodik und der dabei möglichen Probleme bedarf es der Betrachtung der bekannten Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe BCECF und Fura-2.

1.8 Der Fluoreszenzfarbstoff BCECF

BCECF (2',7' Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) wurde erstmals 1982 synthetisiert [60]. Auf Grund seiner günstigen Eigenschaften, wie des pK_a von 7,0 und der pH abhängigen Fluoreszenzeigenschaften ist es heute der meistverwendete Farbstoff zur fluorometrischen pH_i Bestimmung.

Als Acetoxymethylester (AM) ist BCECF nicht fluoreszierend und kann die Zellmembran passieren. Bei pH Werten um 7-8 besitzt BCECF 4-5 negative Ladungen und verbleibt somit nach Abspaltung des Esters in der Zelle. Diese Abspaltung geschieht durch intrazelluläre Esterasen.

Zur Messung regt man den Farbstoff zunächst an seinem isobestischen Punkt (Punkt, in dem sich die pH-abhängigen Anregungswellen schneiden) an und erhält so pH_i -unabhängige Informationen zur vorhandenen Farbstoffkonzentration (s. Abbildung 1.1). Verwendet man die Emission der pH-abhängigen Anregung bei 482nm, und teilt diese durch die Emission am isobestischen Punkt (440 nm), erhält man einen Quotienten (im weiteren „Ratio“), der unabhängig von der Farbstoffkonzentration ist und einen eindeutigen Zusammenhang zum pH_i hat.

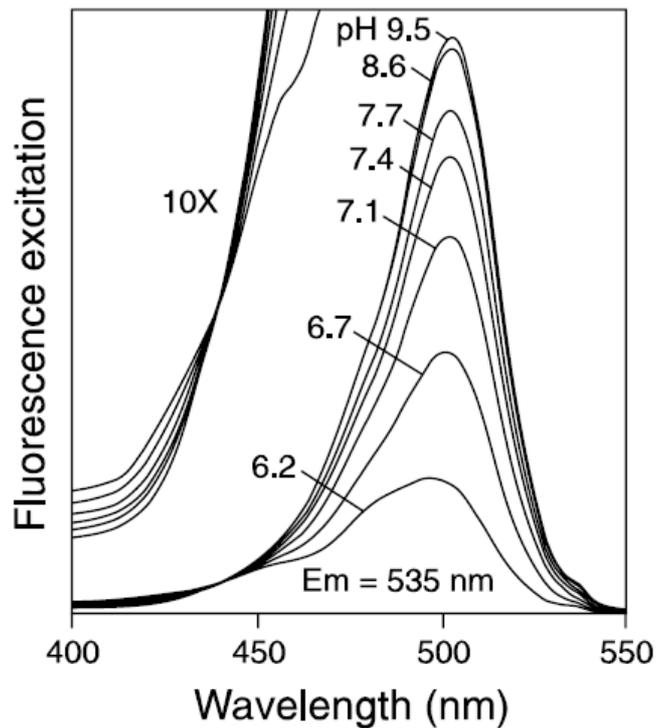


Abbildung 1.1 Die pH-abhängige Fluoreszenz von BCECF. 10 fache Vergrößerung des Bereichs unter 470nm zur Darstellung des isobestischen Punktes.

1.9 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Fura-2 wurde als Weiterentwicklung des bis dahin meistgenutzten Calciumindikators Quin-2 synthetisiert. Seine Synthese und Charakteristika

wurden 1985 erstmals von Grynkiewicz et al. publiziert [61]. Hier konnte unter anderem gezeigt werden, dass für eine annähernd gleiche Fluoreszenzintensität 30 Mal weniger Fura-2 als Quin-2 benötigt werden.

Die beschriebenen Calcium Fluoreszenzfarbstoffe besitzen alle Querempfindlichkeiten gegenüber anderen zweifach positiv geladenen Ionen, wie Mg^{2+} , Fe^{2+} oder Mn^{2+} . Die Effekte auf Quin-2 wurden unter anderem von Tsien et al. [62] untersucht. Grynkiewicz et al. konnten für Fura-2 erheblich geringere Querempfindlichkeiten zeigen. Besonders das bei der Messung von physiologischen Vorgängen zuvor problematische Magnesium hat bei Fura-2 erheblich geringeren, jedoch nach wie vor nachweisbaren Einfluss auf das Fluoreszenzsignal. Die Affinitäten gegenüber Calcium und Magnesium sind jedoch pH abhängig [63]. Neben der pH Abhängigkeit von Fura-2 selbst sind auch direkte Interaktionen mit dem eingesetzten Farbstoff für den pH Wert, BCECF möglich. Das Ausmaß dieser Interaktionen ist abhängig vom Quotienten der intrazellulären Farbstoffkonzentrationen [64].

Gegenüber Mn^{2+} besitzt Fura-2 eine 42fach höhere Affinität zu Calcium, sodass dieses zum Quenchen des Signals verwendet werden kann.

Fura-2 ist wie BCECF ein Fluoreszenzfarbstoff, bei dem es möglich ist, von der Farbstoffkonzentration bzw. dessen Ausbleichen unabhängigen Quotienten der Emissionen von gebundenem und nicht gebundenem Fura-2 zu bilden. Die zur Anregung verwendeten Wellenlängen liegen mit 340nm (gebunden) und 380nm (frei) in einem günstigen Bereich (s. Abbildung 1.2), während bei den zuvor verwendeten Farbstoffen Quin-2 und Indo-2 meist nur der gebundene Farbstoff angeregt werden konnte.

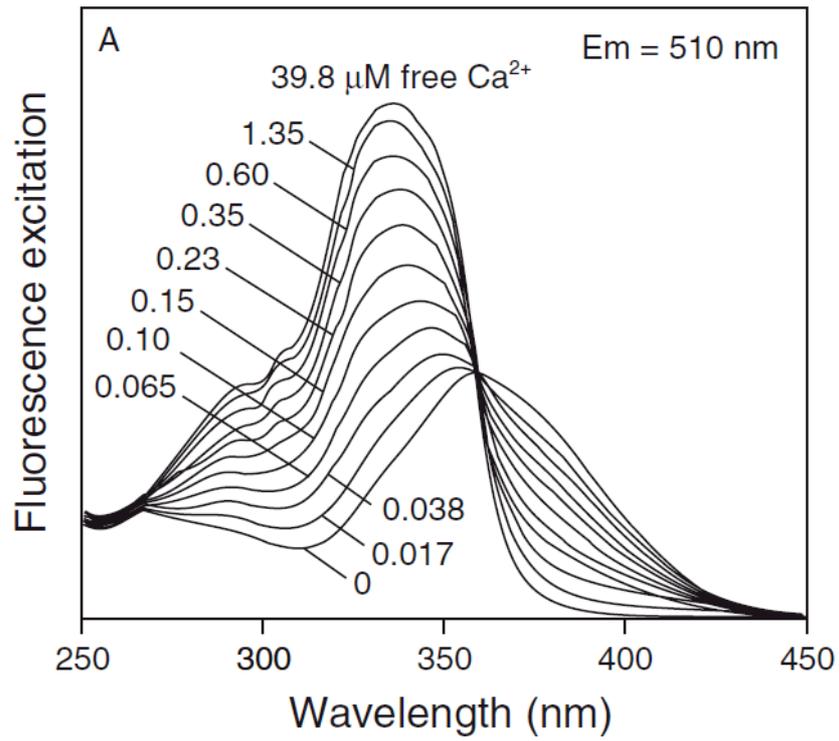


Abbildung 1.2 Die Fluoreszenzanregungsspektren von Fura-2 in Abhängigkeit von der freien Calciumkonzentration. Emission bei 510 nm.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Lösungen

2.1.1 Zellkultur

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Paisley, Schottland) mit Gluta Max I, 4500 mg/l D-Glukose und Natrium Pyruvat.
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Trypsin	(Invitrogen) 0,05 % Trypsin und 0,53 mM EDTA x 4 Na ⁺ in Hanks' Balances Salt Solution
D-PBS	(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Invitrogen) ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (P/S) (Invitrogen) Zeozin (Invitrogen) G418 (Biochrom AG) Hygromycin (Invitrogen)
Zellkulturflaschen	Greiner bio one

2.1.1.1 Verwendete Medien

Native HEK Zellen	DMEM + Pyruvat 10% FCS 0,5% P/S
HEK / EGFP-DRA /dsRedmono-PDZK1	DMEM + Pyruvat 10% FCS 0,5% P/S 400 µg/ml G418 400 µg/ml Zeozin 100 µg/ml Hygromycin
EcR/EGFP-DRA	DMEM + Pyruvat 10% FCS 0,5% P/S 400 µg/ml G418 400 µg/ml Zeozin
Caco2 / EGFP-DRA	DMEM -Pyruvat, +Glutamin 10% hitzeinaktiviertes FCS 0,5% P/S 250 µg/ml G418

	50 µg/ml Zeozin
	200 µg/ml Hygromycin
Caco2 / EGFP-DRA / dsRedmono-PDZK1	DMEM -Pyruvat, +Glutamin
	10% hitzeinaktiviertes FCS
	0,5% P/S
	250 µg/ml G418
	50 µg/ml Zeozin
	200 µg/ml Hygromycin
	10 µg/ml Puromycin

2.1.2 Fluoreszenzspektroskopie

BCECF/AM	2',7' Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymethylester, Invitrogen
Fura-2/AM	Invitrogen
Fura-2	Invitrogen
Nigericin	Nigericin sodium salt, Sigma
4Bromo-A23187	Enzo
Bapta/AM	Invitrogen
UTP	Uridine 5'-triphosphate, Sigma
Fluoreszenzspektroskop LS55	Perkin Elmer
Glasplättchen	Thomas Scientific
Perfusionspumpe	Stepdos 03 S
Osmometer	Roebing
pH Meter PHM 220	Radiometer
IUPAC Standardpuffer	Radiometer Copenhagen
Feinwage PRJ 320-3NM	Kern
D-Mannitol	Sigma
NaCl	Natriumchlorid, Merck
NaGlu	Natriumgluconat, Applichem
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat, Carl Roth
KGlc	Kaliumgluconat, Sigma
KCl	Kaliumchlorid, Carl Roth
CaGlc	Calciumgluconat, Sigma
MgGlc	Magnesiumgluconat, Sigma
HEPES	Carl Roth
Glukose	Carl Roth
TMA-Cl	Tetramethylammoniumchlorid, Merck
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, Sigma
KOH	Kaliumhydroxid, Merck
NaOH	Natronlauge, Merck

2.1.3 Oberflächenbiotinylierung

Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Beads	NeutrAvidin Agarose, Pierce
Boratpuffer pH 9	154 mM NaCl 10 mM Borsäure (Sigma) 7,2 mM KCl 1,8 mM CaCl ₂
Biotinylierungslösung	1mg Biotin/ml Boratpuffer
Quenchingpuffer pH 7,4	25 mM Tris-Base (Sigma) 120 mM NaCl 1,08 mM CaCl ₂
Lysis-Puffer	100 mM NaCl 50 mM NaF (Merck) 20 mM Tris-Base 1% Triton-X100 (Sigma)

2.1.4 SDS-Gelelektrophorese

30% Acrylamidlösung	Rothiphorese Gel 30, Roth
1,5 M Tris-Base	Sigma, pH 8,8
1 M Tris-Base	Sigma, pH 6,9
Glycin	Applichem
Glycerol	Applichem
DTT	DL-Dithiothreitol, Sigma
Bromphenolblau	Sigma
10% SDS-Lösung	Sodiumdodecylsulfat, Fluka
10% APS-Lösung	Ammoniumpersulfat, Sigma
Temed	N, N, N', N' -Tetramethylendiamin, Sigma
20% Jodacetamidlösung	Applichem
Protein Marker	Precision Plus Protein Dual Color (Bio Rad)
Vertikale Gelappertur	Mini-Protean III (Biorad)
Netzgerät	120 V, Biorad

2.1.4.1 Puffer und Gele

4* Lämmli-DTT-Puffer	Für 10 ml Lösung: 2,5 ml 1,5 M Tris base pH 6,8 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 2 g DTT Krümel von Bromphenolblau
Laufpuffer pH 8,3	124 mM Tris-Base 959 mM Glycin 0,5% (w/v) SDS

	Zur Verwendung wird der Puffer 1:5 verdünnt
Trenngel (8,5%)	Für zwei Gele: 4,5 ml ddH ₂ O 2,5 ml 1,5 M Tris-Base 2,8 ml 30% Acrylamidlösung 100 µl 10% SDS-Lösung 80 µl 10% APS-Lösung 10 µl Temed
Sammelgel (5%)	3,4 ml ddH ₂ O 626 µl M Tris-Base 850 µl 30% Acrylamidlösung 50 µl 10% SDS-Lösung 50 µl 10% APS-Lösung 5 µl Temed

2.1.5 Western Blot

Blotpuffer	25 mM Trizma base 0,034% (w/v) SDS 191 mM Glycin 20% (v/v) Methanol In ddH ₂ O
Membran	Nitrocellulose-Transfer-Membran (Protran, Whatman)
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
Mini-Trans-Blot	Biorad
Netzgerät	Biorad

2.1.6 Immundetektion

10*TBST Puffer pH 7,5 Der Puffer wurde 1:5 verdünnt verwendet	150 mM NaCl 20 mM Tris-Base 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck)
Milchpulver	5% in TBST (Bio Milchpulver, Spinnrad)
Anti EGFP AK	Maus, 1:500 verdünnt (Clontech Nr. 632381)
Sekundärer AK	Anti-Maus-800CW, Ziege, 1:10000 verdünnt (LI-COR Nr. 926-32210)
Gerät	LI-COR Odyssey Infrared imaging System (LI-COR)

2.2 Zellkultur

2.2.1 HEK Zellen

Es wurden sowohl native als auch stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Diese wurden in 25 cm² Gewebekulturflaschen in 5ml DMEM-Medium mit unterschiedlichen Zusätzen (s. Abschnitt 2.1.1.1) kultiviert und in einem befeuchteten Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Der Umgang erfolgte ausschließlich unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Geräten, um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden.

Zur Subkultivierung wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und für etwa 5 Sekunden mit 2ml 0,05% Trypsin in Kontakt gebracht. Durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturflasche wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst um anschließend wieder in zumeist 6ml Nährmedium homogenisiert zu werden.

2.2.2 Caco-2 BBE Zellen

Caco-2 Zellen wurden in 50 cm² Gewebekulturflaschen, im 37°C warmen Brutschrank bei 5% CO₂ inkubiert. Der Umgang mit den Zellen erfolgte analog zum oben beschriebenen Umgang mit den HEK Zellen mit dem Unterschied, dass die Zellen zum Ablösen vom Flaschenboden für 2-3 Minuten im Brutschrank mit 3ml 0,25% Trypsin in Kontakt gebracht wurden.

Caco-2 Zellen zeigen im Gegensatz zu HEK293 Zellen bereits eine endogene Expression von DRA und PDZK1. Beide Proteine werden jedoch nur relativ geringfügig exprimiert.

Zur Untersuchung der DRA Aktivität wurden Caco-2 Zellen zusätzlich in einem Tet-off⁴ System stabil mit EGFP-DRA transfiziert. Hierdurch kann die Transgenexpression kontrolliert werden. Während der Kultivierungsphase wird den Zellen an jedem zweiten Tag 20 ng/ml Doxycyclin zugegeben. Dieses bildet einen Komplex mit dem Tetrazyklin abhängigen Transkriptionsaktivator tTA,

⁴ Tetrazyclin-off

wodurch der Promoter des Zielgens inhibiert wird [65]. Zehn Tage vor einem Versuch erhalten die Zellen kein Doxycyclin mehr, wodurch eine Expression von EGFP-DRA stattfinden kann.

2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Mittels der Fluoreszenzspektroskopie können nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen Substanzen quasi in Echtzeit quantifiziert werden. Die verwendeten Farbstoffe verändern dabei nach Bindung an ihr Zielmolekül oder Atom ihre Fluoreszenzeigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit wurden intrazelluläre pH Werte und Calciumkonzentrationen bestimmt. Die Eigenschaften der dazu verwendeten Farbstoffe, BCECF und Fura-2, sind in den Abschnitten 1.8 und 1.9 zusammengefasst. Beide Farbstoffe besitzen von ihrem Bindungszustand abhängige Anregungswellenlängen und emittieren stets Licht einer spezifischen Wellenlänge.

Der Aufbau des Fluorometers ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die gepulsten Lichtwellen der Lichtquelle treffen zunächst auf den Exzitationsmonochromator. Dieser ist so eingestellt nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge \pm der Schlitzweite herauszufiltern. Das gefilterte Licht trifft nun auf die Zellen, welche sich auf Glascoverslips in der Messküvette befinden. Der Farbstoff wird angeregt und emittiert seinerseits Licht einer anderen Wellenlänge. Die spezifische Emissionswellenlänge des Farbstoffes wird vom Emissionsmonochromator \pm der Schlitzweite herausgefiltert. Somit trifft möglichst nur das wirklich vom Farbstoff abgegebene Licht auf den Detektor. Dieser verstärkt das Signal in Abhängigkeit von der eingestellten Photomultiplervoltage.

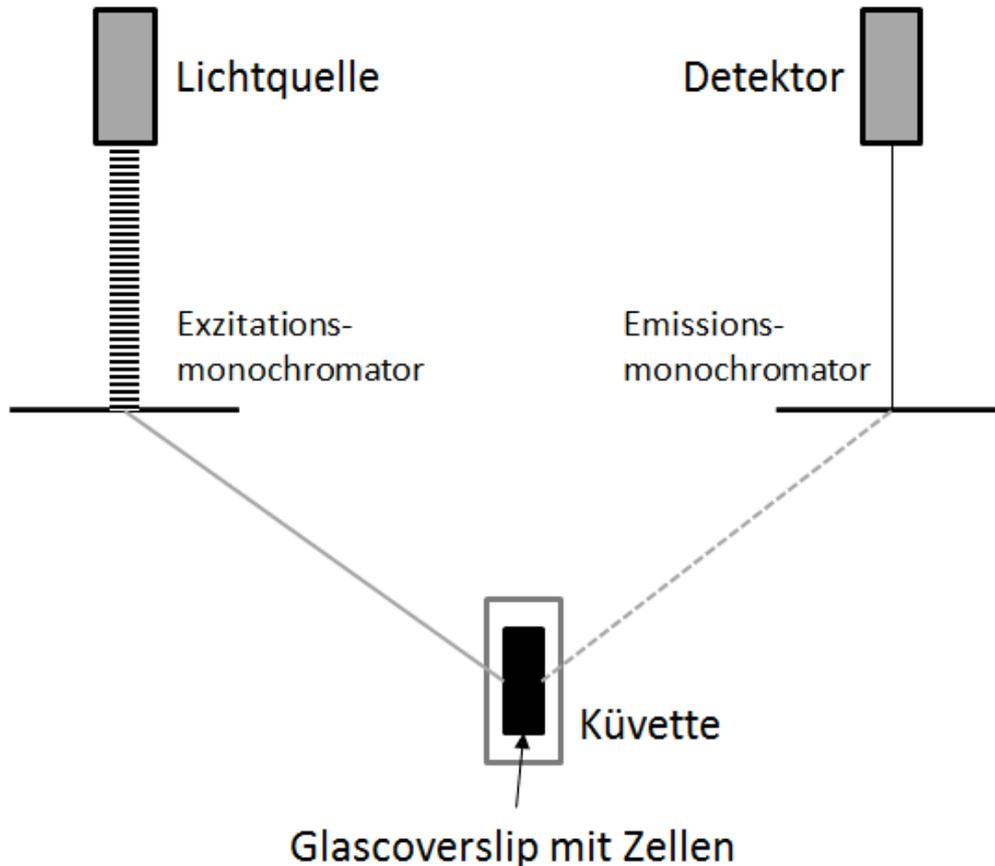


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau des Fluorimeters

Die Lichtquelle gibt gepulstes polychromatisches Licht ab. Am Exzitationsmonochromator wird das Licht einer Wellenlänge \pm der Schlitzweite herausgefiltert. Das beinahe monochromatische Licht trifft nun auf die gefärbten Zellen auf dem Glascoverslip in der Küvette. Hier wird nun der jeweilige Farbstoff angeregt und emittiert Licht seiner spezifischen Wellenlänge. Die Emission wird vom Emissionsmonochromator gefiltert. Dieser lässt wie der Exzitationsmonochromator nur Licht einer bestimmten Wellenlänge \pm der Schlitzweite hindurch. Das vom Detektor aufgezeichnete Signal wird je nach angelegter Photomultiplervoltage weiter verstärkt.

2.3.1 Häufig verwendete Pufferlösungen

Stammlösung	5 mM KGlc, 1 mM MgGlc, 1 mM CaGlc, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose
115 Cl	Stammlösung + 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO ₃
0 Cl	Stammlösung + 115 mM NaGlu, 25 mM NaHCO ₃
30 Cl	Stammlösung + 30 mM NaCl, 85 mM NaGlu, 25 mM NaHCO ₃
Kalibration	Stammlösung + 100 mM KCl, 40 mM TMA-Cl

2.3.2 Bestimmung der DRA Aktivität

Zur fluoreszenzspektroskopischen Messung wurden die Zellen auf Glas-Coverslips ausgesät und mit 2ml des für sie üblichen Mediums paarweise in 6-Well-Platten im Brutschrank inkubiert. HEK Zellen wurden gemessen, wenn sie 100% konfluent waren, Caco-2 Zellen, wenn sie 10 Tage 100% konfluent waren. Hierzu wurde bei Bedarf vorsichtig das Medium gewechselt.

Zur fluorometrischen Bestimmung des intrazellulären pHs wurden die Zellen für 30 Minuten mit 5 μ M BCECF/AM angefärbt. Hierzu wurden die auf den Glasplättchen befindlichen Zellen mit 115 Cl Puffer gewaschen um sämtliches Nährmedium sicher zu entfernen, da BSA 4Bromo-A23187 binden kann [46]. Die Coverslips wurden dann mit der Zellseite nach oben in 1ml 115 Cl Puffer gelegt, in welchen dann BCECF/AM gegeben wurde.

Das in dieser Arbeit verwendete BCECF/AM wurde als Feststoff bezogen und zur weiteren Verwendung in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Glas-Coverslips mit den angefärbten Zellen wurden dann luftblasenfrei in die Durchflussküvette (Kammervolumen 250 μ l) eingesetzt und die Küvette vor dem Einsatz in das Fluorometer entlüftet. Während der Messung flossen die jeweiligen Puffer mit konstant 3 ml/min an den Zellen vorbei.

Zur Messung des intrazellulären pHs wurden die BCECF beladenen Zellen abwechselnd mit 440 nm und 482 nm angeregt und die Emissionsintensität bei 540 nm detektiert.

Zur Bestimmung der Aktivität von DRA wurden die Zellen zunächst mit dem Puffer 115 Cl umspült. Nach üblicherweise 300 Sekunden wurde auf den Puffer 0 Cl umgestellt. Der Entzug des extrazellulären Chlorids führt zur Alkalisierung der Zellen auf Grund des Cl⁻/HCO₃⁻ Austausches durch DRA: es wird nun Chlorid aus den Zellen heraus- und Bikarbonat in die Zellen hineinbefördert. Das Ausmaß der Alkalisierung, Δ pH_i, sowie die Geschwindigkeit, mit der diese verläuft, stellen die Aktivität von DRA dar. Anschließend wurden die Zellen mit dem Puffer 30 Cl umspült, woraufhin es zu einem erneuten abfallen des intrazellulären pHs kommt. Auch dieser kann Rückschlüsse auf die Aktivität von DRA geben.

Die Puffer wurden am Tag einer Messung frisch hergestellt, im Wasserbad auf 37 ° C erwärmt und mit 5% CO₂ in O₂ bzw. 100% O₂ begast. Nachdem sie die gewünschte Temperatur erreicht hatten, wurden die pH Werte der Messpuffer auf 7,45 - 7,5 mittels NaOH und HEPES Zugabe eingestellt. Die pH Kalibrationspuffer wurden auf pH 7,0 bzw. 7,5 durch pipettieren von KOH eingestellt. Das verwendete pH-Meter wurde vor Beginn jedes Messtages unter Verwendung von IUPAC Standardpuffern mit pH 4 und pH 7 kalibriert.

Die Kalibration der pH Messung erfolgte nach der von Thomas et al. beschriebenen Technik [47] mit dem K⁺ /H⁺ Antiporter Nigericin. Bei HEK Zellen erfolgte eine Zweipunkt-Kalibration bei den pH Werten 7,0 und 7,5. Die pH Messungen der Caco-2 Zellen wurden mittels Einpunkt-Kalibration bei pH 7,0 kalibriert.

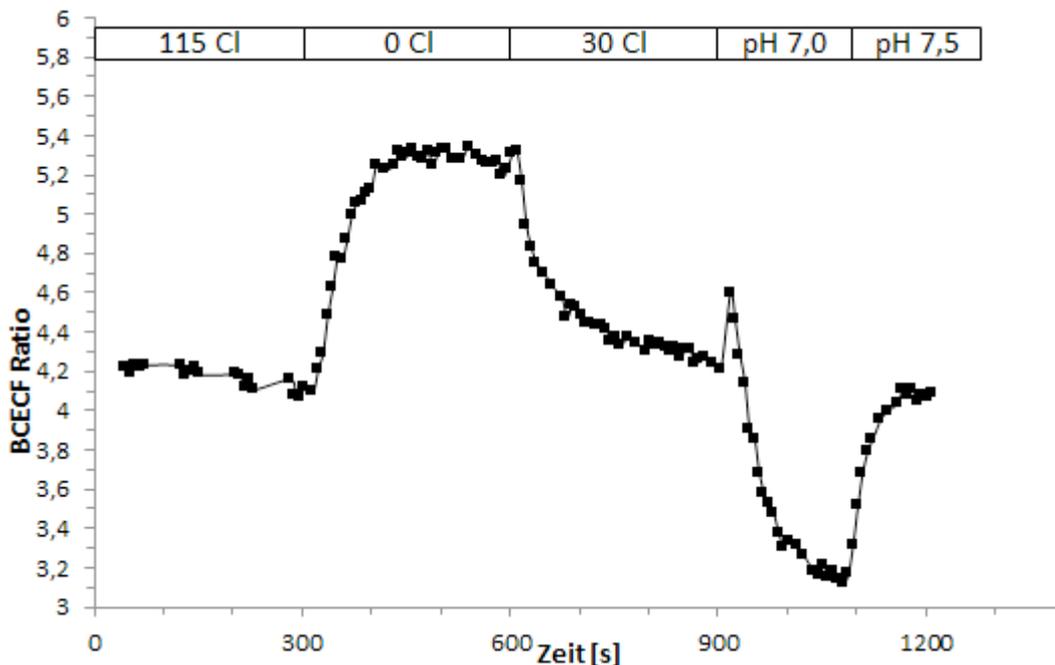


Abbildung 2.2 Ablauf einer Messung mit BCECF/AM und Zweipunkte Kalibration

Dargestellt sind die Rohdaten einer übliche Messung zur Bestimmung der DRA Aktivität. Von 0-300 Sekunden werden die Zellen vom Puffer 115 Cl umspült. Nach 300 Sekunden wird auf den Puffer mit Glukonat, also ohne Chlorid umgestellt (0 Cl). Nun erfolgt eine Alkalisierung der Zellen, da DRA nun entlang des Konzentrationsgradienten Chlorid aus den Zellen heraustransportiert und Bikarbonat in die Zellen hinein. Die Geschwindigkeit und die Höhe dieses Anstieges der BCECF Ratio, welche später anhand der Kalibration in die entsprechenden pH Werte übersetzt wird, stellen die Aktivität von DRA dar. Nach 600 Sekunden wird den Zellen extrazellulär 30mM Chlorid zur Verfügung gestellt und Bikarbonat wird durch DRA aus den Zellen transportiert. Auch die Geschwindigkeit dieses Prozesses gibt Auskunft über die Aktivität des Transporters. Nach 900 Sekunden erfolgt die Kalibration der pH Messung. Bei HEK Zellen erfolgt wie dargestellt eine Zweipunkte-Kalibration mit pH 7,0 und pH 7,5. In diesen Puffern ist Nigericin gelöst, welches als K⁺ /H⁺ Antiporter den intra- und extrazellulären pH gleichschaltet. Bei Caco-2 Zellen erfolgt nur eine Einpunkte Kalibration bei pH 7,0.

2.3.3 Simultane Messung von intrazellulärem Calcium und pH

In dieser Arbeit sollte unter anderem der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der intrazellulären Calciumerhöhung und der daraufhin eintretenden Hemmung der DRA Aktivität untersucht werden. Hierzu war es nötig, zu jeder pH Messung ebenfalls die intrazelluläre Calciumkonzentration zu bestimmen.

Daher wurden die Zellen zusätzlich zur Anfärbung mit BCECF/AM für 60 Minuten mit 4 μ M Fura-2/AM gefärbt. Fura-2/AM wurden ebenfalls als Feststoff bezogen und in DMSO aufgelöst bei -20°C gelagert.

Da eine Messung von mehreren Farbstoffen mit dem von Perkin Elmer mitgelieferten FLWinlab mit der zur Verfügung stehenden Messanordnung nicht möglich war, wurde hierzu eine neue Software entwickelt. Das Programm ist mit Delphi 6 geschrieben und verwendet die freie Bibliothek TPAPro 4.06 [48] zur Kommunikation mit der seriellen Schnittstelle.

Mit diesem Programm ist es möglich, für verschiedene Zeitintervalle der Messung zwei Farbstoffe in unterschiedlichem Verhältnis abwechselnd anzuregen und die Emission zu messen. Bei jedem Wechsel der Wellenlängentripplets ändert das Programm auch die Photomultiplervoltage, so dass Fura-2 mit 900 V und BCECF mit 775 V gemessen wurde. Als Schlitzweite für die Monochromatoren wurde 4 nm gewählt, wobei abhängig von der Farbstoffbeladung um $\pm 0,5$ nm variiert wurde.

Diese Werte sowie die nötigen Farbstoffkonzentrationen und -zeiten wurden experimentell ermittelt (s. Abschnitt 3.1), um optimale Signal/Rausch Verhältnisse zu erhalten.

Hierzu wurden die Signalstärken bei 440/530 nm für BCECF und 340/510 nm bei Fura-2 mit denen ungefärbter Zellen verglichen. Während der Messungen wurden die Zellen mit dem Puffer 115 Cl umspült. Es wurden jeweils sowohl die Schlitzweite des Exzitationsmonochromators als die des Emissionsmonochromators variiert.

Die Abbildung 2.3 zeigt schematisch den Programmablauf zur Messung mit zwei Farbstoffen.

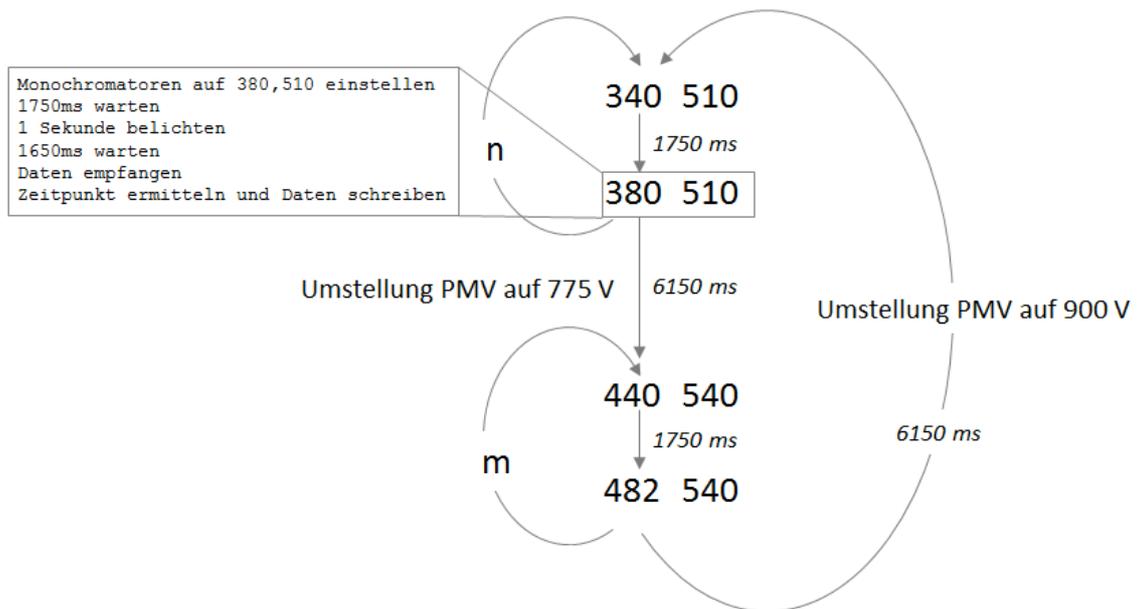


Abbildung 2.3 Schematischer Programmablauf bei der Messung mit zwei Farbstoffen

Dargestellt ist sowohl der Gesamtprozess mit zwei Farbstoffen, sowie im Kasten die nötigen Befehle zur Gewinnung eines Datenpunktes. Für n Durchgänge wird die Probe abwechselnd mit 340nm oder 380nm die Probe angeregt. Die jeweilige Emission wird bei 510nm empfangen. Für den Wechsel der Monochromatorenposition zur Anregung benötigt das Fluorometer etwa 1750ms. 1650ms nachdem der Befehl übermittelt wurde für eine Sekunde zu messen kann die Emissionsintensität abgefragt werden. Versetzt mit einer genauen Zeitangabe wird dieser Wert nun gespeichert. Erfolgt nach n Messungen der Wechsel zur Messung des zweiten Farbstoffes benötigen die Monochromatoren für diese größere Umstellung etwa 6150ms. Gleichzeitig kann die Photomultiplervoltage verändert werden. Eine gleichzeitige Einstellung der Schlitzweiten ist hier nicht möglich. Nun erfolgt die m -malige Messung des zweiten Farbstoffes bevor erneut die zeitintensivere Umstellung auf die Wellenlängen des ersten erfolgt.

2.3.4 Kalibration des Fura-2 Signals

Um die ermittelten Fura-2 Ratios in Calciumkonzentrationen zu übertragen wird in der Literatur üblicherweise die Kalibrationsmethode nach Grynkiewicz et al. [61] verwendet. Hierzu ist zunächst die Bestimmung des K_d Wertes von Fura-2, sowie der maximalen und minimalen Ratio F_{min} und F_{max} nötig. Anschließend kann mittels Gleichung 2.1 die Calciumkonzentration für eine bestimmte Ratio R bestimmt werden.

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

Gleichung 2.1

Die Gleichung beschreibt einen hyperbolischen Verlauf der Konzentration. Die Kurve verläuft jedoch abhängig von F_{\max} zunächst linear, so dass nährungsweise von einem linearen Verlauf für niedrige (physiologische) Calciumkonzentrationen ausgegangen werden kann.

Fura-2 besitzt jedoch zwei Bindestellen für Calcium mit unterschiedlichen K_d Werten. Dies führt dazu, dass mit der oben genannten Methode eine Überschätzung der Calciumkonzentration möglich ist. Als mögliche Lösung hierzu wurde von Henke et al. [66] eine Formel vorgestellt, welche beide K_d Werte berücksichtigt.

Ein weiterer Ansatz von Ameloot et al. [67] berücksichtigt die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von Fura-2 im angeregten Zustand.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich ausschließlich auf die einfachere und nach wie vor weit verbreitete Formel von Grynkiewicz et al. beschränkt.

Die Dissoziationskonstante K_d für Fura-2 ist abhängig von einer Vielzahl an Faktoren, wie dem pH Wert [68], der Viskosität [69], dem Vorhandensein von Magnesium in der Lösung [70], der Temperatur und dem Messgerät.

Daher wurden zunächst mögliche Einflüsse der meistverwendeten Puffer mit 115 mM Chlorid und 0 mM Chlorid überprüft. Die K_d Werte dieser Puffer wurden mit aufsteigenden CaEGTA Konzentrationen bei konstantem pH 7,5 und unterschiedlichen Temperaturen mit und ohne Magnesium bestimmt.

Alle Puffer wurden aus einer Stammlösung mit 5mM KGlc, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 25 mM NaHCO_3 und 10 mM NaEGTA hergestellt.

Puffer	NaCl	NaGlu	CaGlu	MgGlu
115 Cl ohne Mg, 0 Ca	115	0	0	0
115 Cl ohne Mg, 10 Ca	115	0	10	0
115 Cl mit Mg, 0 Ca	115	0	0	2
115 Cl mit Mg, 10 Ca	115	0	10	2
0 Cl, 0 Ca	0	115	0	2
0 Cl, 10 Ca	0	115	10	2
CaEGTA, 0 Ca	0	0	0	0
CaEGTA, 10 Ca	0	0	10	0

Die Puffer mit 0mM Ca und 10mM Ca wurden jeweils gemischt, um aufsteigende Konzentrationen herzustellen. Anschließend wurden die pH-Werte der gewonnenen Puffer mittels KOH, HCl und HEPES Lösungen auf 7,5 eingestellt. Ein Teil der Puffer wurde auf 37°C erwärmt, der andere bei 23°C (Raumtemperatur) belassen.

Die bereits vorgefertigt beziehbaren Kalibrationskits mit 0-10 mM CaEGTA sind mit sehr hohen Fura-2 Konzentrationen gemischt. Das Kit von Invitrogen beispielsweise mit 50 µM. Vorversuche haben gezeigt, dass mit den hier verwendeten Messbedingungen solch hohe Fura-2 Konzentrationen bereits bei sehr niedrigen CaEGTA Konzentrationen zu einem Überschreiten der maximal messbaren Signalstärke führen. Es wurde schließlich mit 5 µM Fura-2 gemessen.

2.4 Kalibrationsmessungen mit HEK Zellen

Zur Bestimmung der für Gleichung 2.1 benötigten Werte wurden konfluente HEK Zellen mit CaEGTA Lösungen aufsteigender Konzentration umspült. 10 µM 4Br-A23187 wurden verwendet, um intra- und extrazelluläre Calciumkonzentrationen gleichzuschalten.

Verwendete Puffer

Stammlösung	5 mM KGlc, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 25 mM NaHCO ₃
115 Cl	Stammlösung + 115 mM NaCl, 1 mM CaGlu
0 Ca	Stammlösung + 10 mM NaEGTA, 70 mM NaCl
5 Ca	0 Ca + 5 mM CaGlu
7 Ca	0 Ca + 7 mM CaGlu
Weitere Konzentrationen dementsprechend	

Der Ausgleich geringerer Osmolaritäten bei den Puffern mit niedrigen Calciumkonzentrationen erfolgte mit Mannit, so dass der Zielbereich zwischen 290 und 300 mOsm erreicht wurde.

	-300s	300-550s	-700s	-850s	-1000s	1000s+
Messreihe 1	115 Cl	0 Ca + 5 μ M 4Br-A23187	4 Ca	5 Ca	6 Ca	10 Ca
Messreihe 2	115 Cl	0 Ca + 5 μ M 4Br-A23187	5 Ca	7 Ca	8 Ca	10 Ca

2.5 Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen mittels 4Br-A23187

Ziel der Experimente war es den Einfluss erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentrationen auf die Aktivität von DRA zu charakterisieren. Zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden 5 μ M des Calcium Ionophors 4Bromo-A23187 bei extrazellulär 1 mM Calcium Konzentration verwendet. 4Bromo-A23187 ist ein calciumspezifischer, nicht-fluoreszierender Abkömmling des Ionophors für divalente Kationen A23187 [71].

Die genauen Transporteigenschaften von 4Bromo-A23187 wurden 1994 von Erdahl beschrieben [72]. Die Geschwindigkeit des Calciumtransports ist abhängig von der Konzentration des Ionophors, dem pH Wert, der Calciumkonzentration sowie der Richtung des Transports.

2.6 Aktivität von DRA in HEK Zellen mit festgelegtem intrazellulärem Calcium

Die im Vergleich zu den von Lamprecht et al. [47] publizierten Daten zeigte sich bei den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Messungen eine geringe Inhibition von DRA durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen bereits zum Beginn der Messungen sehr stark mit Calcium beladen waren, da bei den Messungen an unterschiedlichen Tagen teilweise größere Unterschiede in der Ausgangs-Fura-2 Ratio gemessen wurden. Dies sollte nun überprüft werden. Hierzu wurden mittels 4-Bromo A23187 intra- und extrazelluläre Calciumkonzentrationen gleichgeschaltet und dann über Calcium-EGTA Puffer unterschiedliche Konzentrationen eingestellt. Die freien Calciumkonzentrationen wurden mit dem EGTA-Calculator [73] von brneurosci.org berechnet. Er basiert auf der von Portzehl et al. [74] beschriebenen Methode zur nährungsweisen Berechnung der freien Calciumkonzentration in Calcium-EGTA Puffern unter Berücksichtigung von Temperatur, pH und Anwesenheit von Magnesium.

So wurden Puffer mit 18nM und 255nM freiem Calcium hergestellt. Um die Osmolaritäten der Lösungen weiterhin im Bereich von 300 mOsm zu halten, wurden 5 mM NaEGTA und statt der üblichen 115 mM nur 100 mM NaCl/NaGlu verwendet. Niedrigere Osmolaritäten wurden wie üblich durch Mannitol ausgeglichen.

Neben dem in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Kalibrationspuffer wurden folgende Puffer aus einer Stammlösung aus 5mM NaEGTA, 5mM KGlc, 10mM HEPES, 10mM Glucose, 25mM NaHCO₃ und 1mM MgGlu hergestellt.

	NaCl	NaGlu	CaGlc	NaEGTA
115 Cl	115		1	
100 Cl, 56nM	100		2	5
100 Cl, 752nM	100		4,5	5
0 Cl, 18nM		100	2	5
0 Cl, 255nM		100	4,5	5
30 Cl, 18nM	30	70	2	5
30 Cl, 255nM	30	70	4,5	5

2.7 Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration mittels BAPTA/AM

Ziel der Experimente war es, zu überprüfen, ob eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Erhöhung der DRA Aktivität führt und ob durch Inkubation mit dem Chelator BAPTA/AM die 4Br-A23187 bedingte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration signifikant reduziert werden kann.

Es wurden native HEK Zellen, sowie stabil mit EGFP-DRA/DsRed-monomer-PDZK1 transfizierte HEK Zellen verwendet.

BAPTA/AM wirkt nach Durchtritt durch die Zellmembran und Esterase-abhängige Abspaltung von Acetomycin als Chelator mit einer hohen Calciumaffinität [75]. Hierzu wurde den Zellen 25µM BAPTA/AM für 30 Minuten während des Färbevorganges hinzugeführt. Es wurden die in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Puffer verwendet.

2.8 Bestimmung der Oberflächenexpression von DRA

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von DRA erfolgte mittels Oberflächenbiotinylierung. Hierzu wurden Caco-2 Zellen auf Petrischalen mit 5cm Durchmesser ausgesät. Nachdem die Zellen 10 Tage konfluent waren, wurde das Nährmedium entfernt und mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten im

Kühlraum bei 4°C. Die Zellen wurden hier abermals mit PBS und anschließend dem Borat-Puffer gewaschen. Darauf folgte die zweimalige Inkubation mit der Biotinylierungslösung (1mg NHS-SS-Biotin in 1ml Borat-Puffer) für je 30 Minuten. Nicht gebundenes Biotin wurde durch waschen mit dem Quenchingpuffer und anschließender Inkubation für 5 Minuten entfernt. Nach 2maligem waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe des Lysis-Puffers lysiert.

Die folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die Lysate für 10 Minuten mit 10000g zentrifugiert, um Zellreste und Zellkerne abzutrennen.

Die verwendeten NeutrAvidin-Agarose Beads wurden zunächst durch dreimalige Zentrifugation bei 1min/1000g mit PBS gewaschen.

50 µl des Lysats wurde zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren, das übrige Lysat über Nacht bei 4°C mit den Beads vermischt. Nach Zentrifugation bei 1000g für 1 Minute wurde der gewonnene Überstand der Beads (Beads1) für zwei Stunden mit neuen Beads (Beads2) bei 4°C gemischt. Der bei erneuter Zentrifugation gewonnene Überstand wurde ebenfalls zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zu den Beads wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur 2*Lämmli und DTT gegeben und schließlich für 5min bei 1000g zentrifugiert, um die gebundenen Proteine zu lösen.

Auch zum Lysat und zum Überstand wurde 2*Lämmli gegeben und schließlich wurden Lysat, Überstand, Beads1 und Beads2 auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.8.1 SDS-Page

Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die nach der Oberflächenbiotinylierung in Lösung befindlichen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Vorteil der Vorbehandlung mit SDS ist dabei, dass die Auftrennung unabhängig von der Proteinladung erfolgt. SDS bindet an die Proteine und durch seine stark negative Ladung rückt die Eigenladung der Proteine in den Hintergrund.

Konkret wurde den aufzutrennenden Proben 4xLämmli-DDT Puffer zugegeben, um 1xLämmli-DDT Puffer zu erhalten. Nach Denaturierung bei 95°C können die Proben auf das zuvor gegossene Gel (Trenngel und Sammelgel) aufgetragen werden. Zusätzlich wurde in einer Geltasche ein Gemisch aus Rainbowmarker und Lämmli-puffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei 120V für etwa 1,5h.

2.8.2 Western Blot

Der Transfer der geelektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels wet Western Blot. Die Membran wurde zunächst kurz in Methanol getränkt und anschließend wurde die Blot-Kammer bestehend aus Plastikhülle, zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, dem Gel und der Membran im Transferpuffer schwimmend zusammengesetzt.

Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 30V Spannung.

2.8.3 Immundetektion

Die mittels Western Blot auf die Nitocellulose Membran übertragenen Proteine wurden für eine Stunde in 5% Milchpulver geblockt. Über Nacht wurden sie bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Durch dreimaliges waschen mit 1*TBST wurden überschüssige Antikörper entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgte für eine Stunde. Nach erneutem dreimaligen waschen wurden die Proben mit dem „infrared imaging system“ LI-COR detektiert.

2.9 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± 1 Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Wirkungen von Hemmstoffen und ähnliche Vergleiche wurden durch gepaarte Student t-Tests auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde dabei ein p-Wert von $\leq 0,05$ gewählt.

Wenn so angegeben, wurden die gewonnenen pH Werte der Messungen mit SAS JMP 9 weiterverarbeitet. Hier erfolgte eine nichtlineare Kurvenanpassung nach folgendem Model:

$$\begin{array}{l}
 \text{if } \boxed{\text{time} == 201} \Rightarrow \boxed{c_0} \\
 \boxed{310 < \text{time} \leq T_2} \Rightarrow \boxed{c_1 * [1 - \text{Exp}[-\boxed{al} * (\text{time} - 310)]]} + \boxed{c_0} \\
 \boxed{T_2 < \text{time}} \Rightarrow \boxed{-c_2} \\
 \quad * \text{Exp}[-\boxed{be} * (\text{time} - T_2)] \\
 \quad + \boxed{c_2}
 \end{array}$$

Aus dieser Anpassung erhält man folgende Werte: c_0 entspricht dem Start-pH, c_1 dem Anstieg des pH Wertes nach dem Chloridentzug, al der zugehörigen Zeitkonstante des Anstieges, c_2 den pH Wert nach der Reazidifizierung und be wiederum der zugehörigen Zeitkonstante. Zur Evaluation der DRA-Aktivität wurde in der Regel c_1 als Maßstab verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Parallele Messung von intrazellulärem pH und Calcium

Zunächst wurde ermittelt, welche Geräteeinstellungen, Färbekonzentrationen und -zeiten für die geplanten Messungen die besten Signal/Rausch Verhältnisse liefern. Hierzu wurden die Signalstärken bei 440/530 nm für BCECF und 340/510 nm bei Fura-2 mit denen ungefärbter Zellen verglichen, indem Quotienten aus den Signalstärken gefärbter und ungefärbter Zellen gebildet wurden.

Während der Messungen wurden die Zellen mit dem Puffer 115 Cl umspült. Es wurden jeweils sowohl die Schlitzweite des Exzitationsmonochromators als die des Emissionsmonochromators variiert.

Tabelle 3.1 BCECF Signal/Rauschverhältnisse bei unterschiedlichen BCECF/AM Konzentrationen, Färbezeiten, Photomultiplervoltagen und Schlitzweiten

	1 µl 10 min	1 µl 20 min	0,5 µl 10 min
900 V / 5 nm	4,09	3,17	3,51
775 V / 10 nm	4,15	1,43	0,78
775 V / 7,5 nm	4,31	1,32	0,75
775 V / 5 nm	4,03	3,88	3,61

Messungen bei 900 V Photomultiplervoltage und breiteren Schlitzweiten wurden entfernt, da das Signal von 482/540 nm die maximal messbare Stärke erreichte. Somit wäre keine korrekte Ratio Ermittlung mehr möglich gewesen. Es zeigte sich, dass auch bei höheren Schlitzweiten und Spannungen noch ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis für BCECF gemessen werden kann. Bereits nach zehnmütiger Inkubation mit BCECF/AM alleine scheinen die intrazellulären Esterasen genügend Farbstoff freigesetzt zu haben. Im weiteren Verlauf scheint die BCECF Konzentration wieder abzunehmen. Bei paralleler Färbung mit Fura-2 treten diese Effekte später ein, da größere Mengen von Acetoxymethylestern von den Esterasen zu spalten sind.

Tabelle 3.2 Fura-2 Signal/Rauschverhältnisse bei unterschiedlichen Fura-2/AM Konzentrationen, Färbezeiten, Photomultiplervoltagen und Schlitzweiten

	2 μ l, 30 min	2 μ l, 60 min	4 μ l, 30 min	4 μ l, 60 min
900 V / 5 nm	1,277	1,575	1,921	1,961
900 V / 7,5 nm	1,31	1,623	1,916	2,06
900 V / 10 nm	1,338	1,660	1,901	2,171
775 V / 10 nm	1,323	1,651	1,853	2,116
775 V / 7,5 nm	1,263	1,634	1,781	
775 V / 5 nm	1,220	1,628	1,758	

Das Signal von Fura-2 muss weit mehr verstärkt werden als das von BCECF. Obwohl das LS-55 mit Wellenlängen von 200-800 nm exzitieren kann [76], haben bereits frühere Versuche von uns gezeigt, dass die Intensität der Exzitation in niedrigen Wellenlängenbereichen geringer wird. Eine Erhöhung der Schlitzweite von 5 nm auf 7,5 nm ergab eine Signalerhöhung in alle Färbungen sowie beim Hintergrund um den Faktor 2,62 ($\pm 0,06$). Von 7,5 nm auf 10 nm um 1,77 ($\pm 0,04$). Auf Grund dieser Versuche wurde die eigens programmierte Messsoftware insoweit abgeändert, dass BCECF mit 775 V und Fura-2 mit 900 V Photomultiplervoltage gemessen wird. Eine Veränderung der Schlitzweiten je nach Farbstoff wurde ebenfalls versucht, jedoch benötigt das Fluoreszenzspektroskop zu lange, um diese ebenfalls durchzuführen.

3.2 Kalibration des Fura-2 Signals

Zur Evaluierung, ob die im weiteren Verlauf verwendeten Pufferlösungen bzw. deren Bestandteile einen signifikanten Einfluss auf die Messeigenschaften von Fura-2 haben, wurde für diese unter unterschiedlichen Bedingungen der K_d Wert von Fura-2 bestimmt. Hierzu wurde den Puffen aufsteigende Konzentrationen von CaEGTA hinzugefügt.

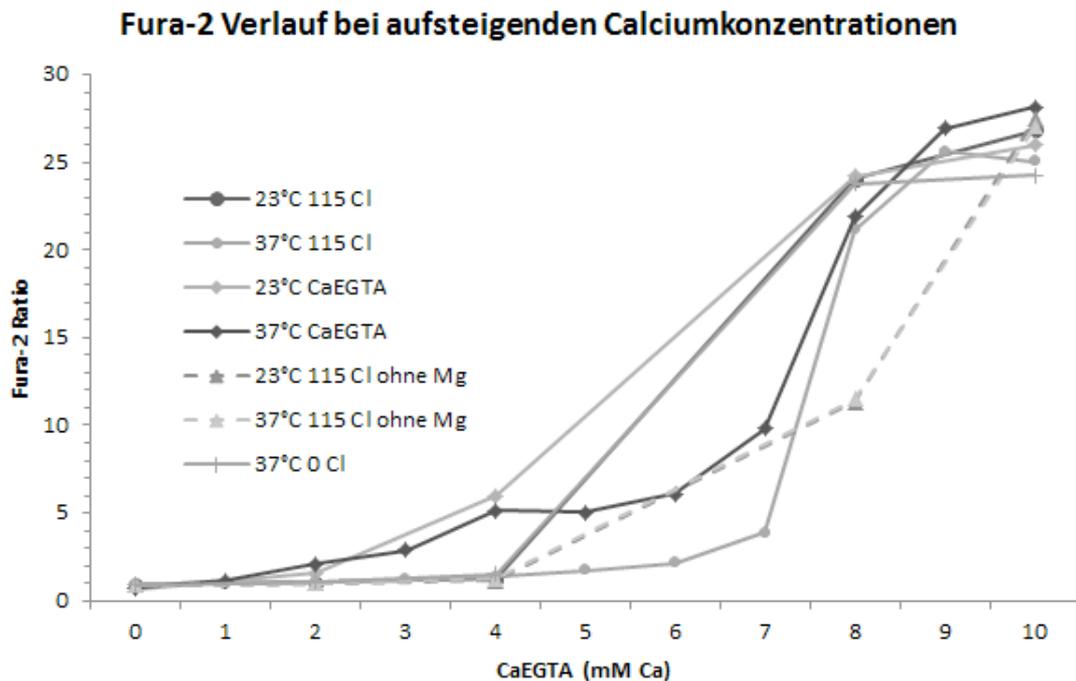


Abbildung 3.1: Abhängigkeit der Fura-2 Ratio von der Pufferzusammensetzung unter zellfreien Messbedingungen.

Mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Bestandteile der verwendeten Pufferlösungen auf Fura-2 wurden in zellfreier Lösung unter Verwendung von Fura-2 (ohne AM) untersucht. Hierbei konnten keine für die vorliegende Fragestellung relevanten Störfaktoren identifiziert werden. Der unterschiedliche Kurvenverlauf bei der Verwendung von 0 oder 1mM Magnesium ist durch die unterschiedlichen freien Calciumkonzentrationen in CaEGTA Puffern in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration zu erklären. Die Puffertemperatur hat im gewählten Temperaturbereich keinen Einfluss auf die gemessene Fura-2 Ratio..

Die Abbildung 3.1 zeigt den Anstieg der Fura-2 Ratio bei ansteigender Calciumkonzentration. Es zeigt sich für alle gemessenen Bedingungen ein ähnlicher Verlauf der Kurve. Dieser verbleibt zunächst einige Zeit nahezu linear bis es schließlich zu einem sprunghaften Anstieg der Ratio kommt. Dieses Bild deckt sich mit dem Verlauf des freien Calciums in den gegebenen CaEGTA Lösungen.

Die unterschiedlichen Temperaturen führen zu keinem relevanten Unterschied in den Fura-2 Ratio Verlaufskurven. Ohne Magnesium beginnt der steile Anstieg der Ratio etwas flacher bei gleichem Endpunkt. Einzig die Kurven der reinen CaEGTA Lösungen zeigen einen Unterschied im Verlauf bereits bei niedrigen Calciumkonzentrationen.

Um aus den gewonnenen Fura-2 Ratios F den K_d Wert von Fura-2 zu erhalten, werden diese in die Gleichung von Grynkiewicz et al. eingetragen:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

Bei graphischer Darstellung in einem doppellogarithmischen Koordinatensystem erhält man $\log(K_d)$ am Schnittpunkt mit $y=0$ [77].

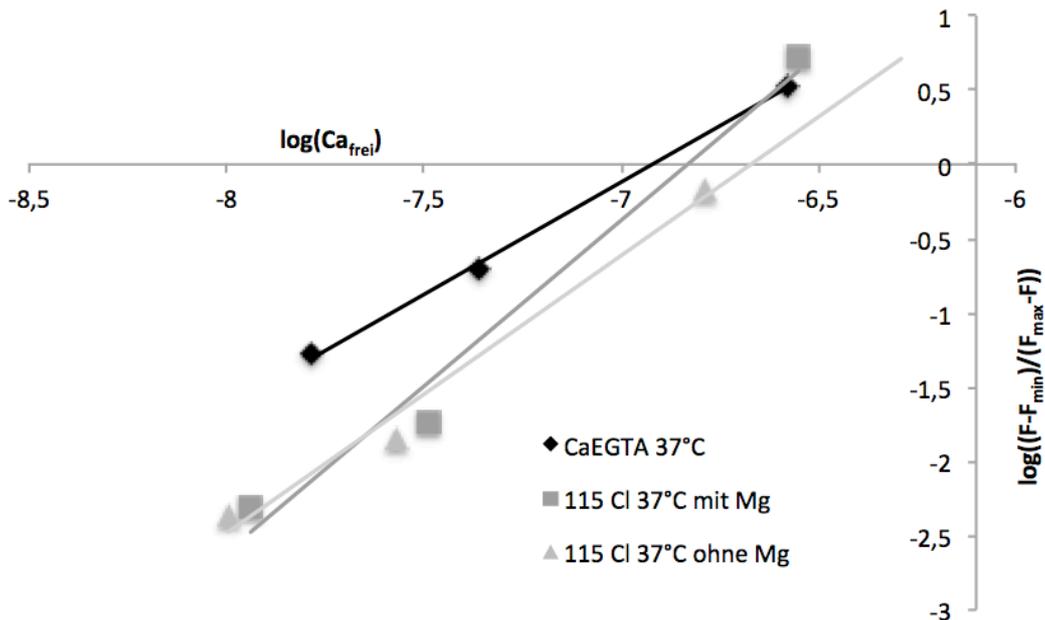


Abbildung 3.2 K_d Werte der Fura-2 Kalibration ohne Zellen

Mit Hilfe des doppellogarithmischen Koordinatensystem kann der K_d Werte von Fura-2 bestimmt werden. Aus den Punkten für 2mM, 4mM und 8mM CaEGTA wurden mittels linearer Regression Geraden errechnet. Der Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse entspricht $\log(K_d)$. Für die reine CaEGTA Lösung ergibt sich so ein K_d Wert von 120nM, für 115 Cl mit Magnesium 147nM und ohne Magnesium 213nM. Von Molecular Probes ist der K_d Wert 145nM angegeben [77]. Der verwendete Puffer 115 Cl mit 1mM Magnesium bewirkt somit keine wesentlichen Veränderungen im Signalverhalten von Fura-2.

3.3 Kalibration von Fura-2 in HEK Zellen

Nachdem der Einfluss verschiedener Pufferlösungen und Messbedingungen auf Fura-2 unter zellfreien Messbedingungen in vorherigen Abschnitt geklärt wurde, sollte als nächstes in HEK Zellen mittels aufsteigender Calciumkonzentrationen in EGTA-Lösung nach Zugabe des Calcium Ionophors 4Bromo-A23187 der K_d Wert von Fura-2 ermittelt werden. Da für diese Versuche nur mit einem Farbstoff gemessen werden musste, wurde die Messsoftware FLWinLab von Perkin Elmer

verwendet, welche einen etwas geringeren Abstand zwischen zwei Messpunkten erreicht.

Es wurden zwei Versuchsreihen mit fünf unterschiedlichen Calciumkonzentrationen durchgeführt. Die genaue Pufferzusammensetzung ist in Abschnitt 2.4 beschrieben.

Abbildung 3.3 zeigt die dazugehörigen Fura-2 Verläufe. Zu beachten ist, dass ausschließlich im Puffer 0 Ca 5 μ M 4Bromo-A23187 enthalten waren. Die Fura-2 Ratio steigt bei jedem Pufferwechsel entsprechend an, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Wirkung des Calcium Ionophors für mehrere Minuten anhält.

Der schnelle Anstieg bei 300 Sekunden wird am ehesten durch Store operated Calcium Kanäle ausgelöst, die im endoplasmatischen Retikulum gespeichertes Calcium freigegeben [78].

Die Mittelwerte dieser Messreihen wurden in Abbildung 3.4 gegen die errechnete Konzentration an freiem Calcium aufgetragen. Hierbei fällt auf, dass die Erhöhung der freien Calciumkonzentration zwar zu einem Anstieg der Fura-2 Ratio führt, die absolute Höhe der Ratio jedoch noch von weiteren Faktoren abhängen muss.

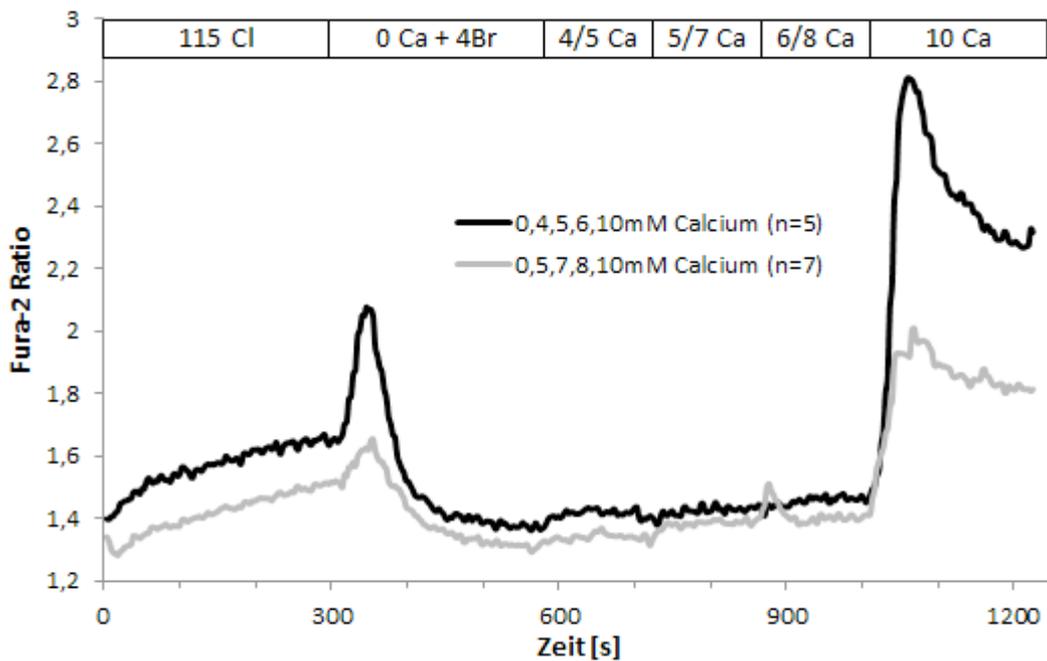


Abbildung 3.3 Verlauf der Fura-2 Ratio bei aufsteigenden Calciumkonzentrationen.

Nach 300 Sekunden im üblichen Standardpuffer mit 115Cl wurde die Kalibrationsreihe mit EGTA Puffern gestartet. Im Verlauf der schwarzen Kurve ist der Anstieg von 0mM Calcium + 5 μ M 4Bromo-A23187 über bis hin zu 29 μ M freiem Calcium zu sehen. Die Zwischenschritte entsprechen hier 56nM, 84nM und 125nM freiem Calcium. Bei der grauen Kurve entsprechen die Zwischenschritte 84nM, 191nM und 335nM freiem Calcium. Auf Fehlerbalken wurde zur Übersichtlichkeit verzichtet. Die Standardabweichungen betragen im Mittel 0,1.

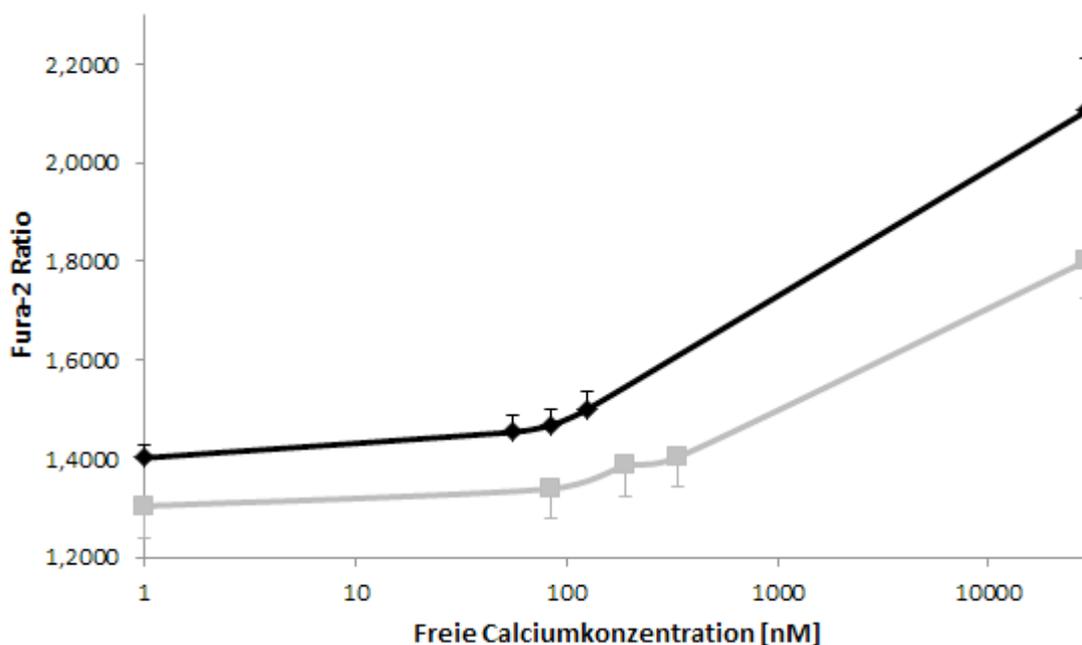


Abbildung 3.4 Mittlere Fura-2 Ratio in HEK Zellen bei EGTA Puffern mit aufsteigenden Calciumkonzentrationen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Fura-2 Ratio aus Abbildung 3.3 entlang der dazugehörigen Konzentrationen an freiem Calcium auf einer logarithmischen X-Achse.

Zur weiteren Untersuchung des Problems wurde im Rahmen der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Messungen nach der pH Kalibration eine Zweipunkt Kalibration mit CaEGTA Puffern mit 0 und 335nM freiem Calcium durchgeführt. Der Puffer mit 0 Calcium enthielt zusätzlich 5 μ M 4Bromo-A23187, um extra- und intrazelluläre Calciumkonzentrationen gleichzuschalten.

Beim Wechsel von 0 Calcium auf 335nM Calcium kam es im Mittel zu einem Anstieg der Fura-2 Ratio um $0,431 \pm 0,198$. Die mittleren Fura-2 Ratios für diese beiden Calciumkonzentrationen sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

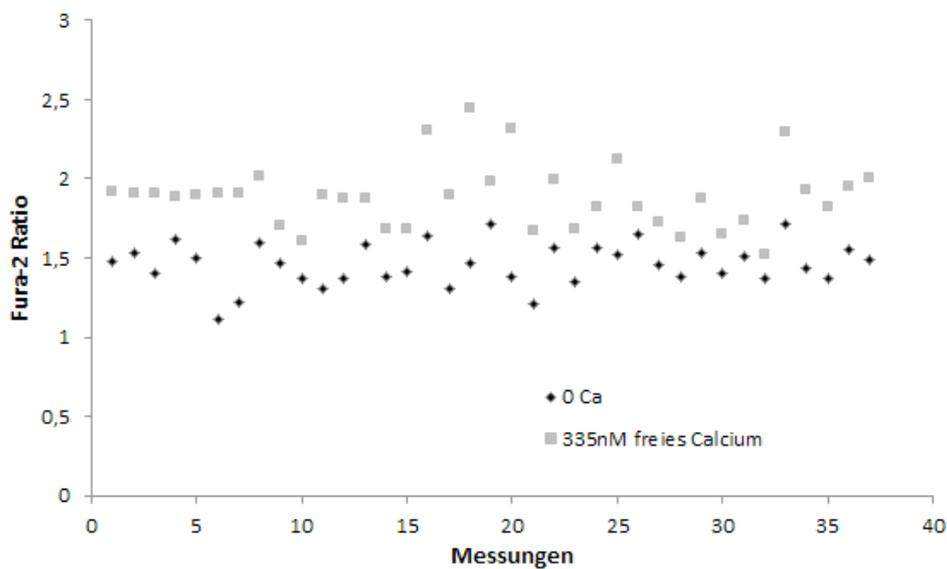


Abbildung 3.5 Fura-2 Ratio in HEK Zellen bei 0 und 335nM freiem Calcium in EGTA Lösung

Die Abbildung zeigt die Fura-2 Ratios für 0 Calcium und 335nM Calcium aus 38 Messungen. Die mittlere Ratio bei 0 Calcium lag bei $1,419 \pm 0,268$, bei 335nM Calcium bei $1,839 \pm 0,364$. Der mittlere Anstieg von 0 auf 335nM betrug $0,431 \pm 0,198$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass gleiche Calciumkonzentrationen zu unterschiedlichen Fura-2 Ratios führen können. Somit wäre zur Übertragung der gemessenen Fura-2 Ratios in Calciumkonzentrationen nach jeder Messung eine Kalibration nötig, wie es auch bei der pH Bestimmung geschieht. Allerdings zeigt Abbildung 3.4, dass eine Zweipunkte Kalibration nicht ausreichend wäre, um eine ausreichend detaillierte Umrechnung der Fura-2 Ratio in absolute Konzentrationen des intrazellulären Calcium zu ermöglichen. Die Fura-2 Ratio steigt allerdings, wie bereits bei den Kalibrationsmessungen ohne Zellen gesehen, besonders im physiologisch wichtigen Bereich unter 200nM nicht sehr stark an.

Daher ist eine verlässliche Angabe der absoluten intrazellulären Calciumkonzentration auch nach erfolgter Kalibration nicht möglich. Ursächlich hierfür könnten eine unterschiedliche Verteilung von Fura-2 in den Zellkompartimenten, eine nicht vollständige Gleichschaltung von intra- und extrazellulären Calciumwerten durch 4-Bromo A23187 oder weitere, nicht kontrollierbare Faktoren sein.

3.4 Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels 4Br-A23187 in HEK Zellen

Ziel des Versuchs war es bei simultaner Messung des intrazellulären pH und der Calciumkonzentration den durch 5 μ M 4Bromo-A23187 vermittelten Anstieg der Calciumkonzentration zu zeigen und dessen Einfluss auf die DRA Aktivität zu bestimmen. Es wurden stabil transfizierte HEK/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen verwendet.

Nach 220 Sekunden wurden 5 μ M 4Bromo-A23187 zugegeben. Nach weiteren 80 Sekunden erfolgte der Entzug des extrazellulären Chlorids, woraufhin die Zellen alkalisieren. In Abbildung 3.6 sind der Verlauf von pH und Fura-2 Ratio dargestellt.

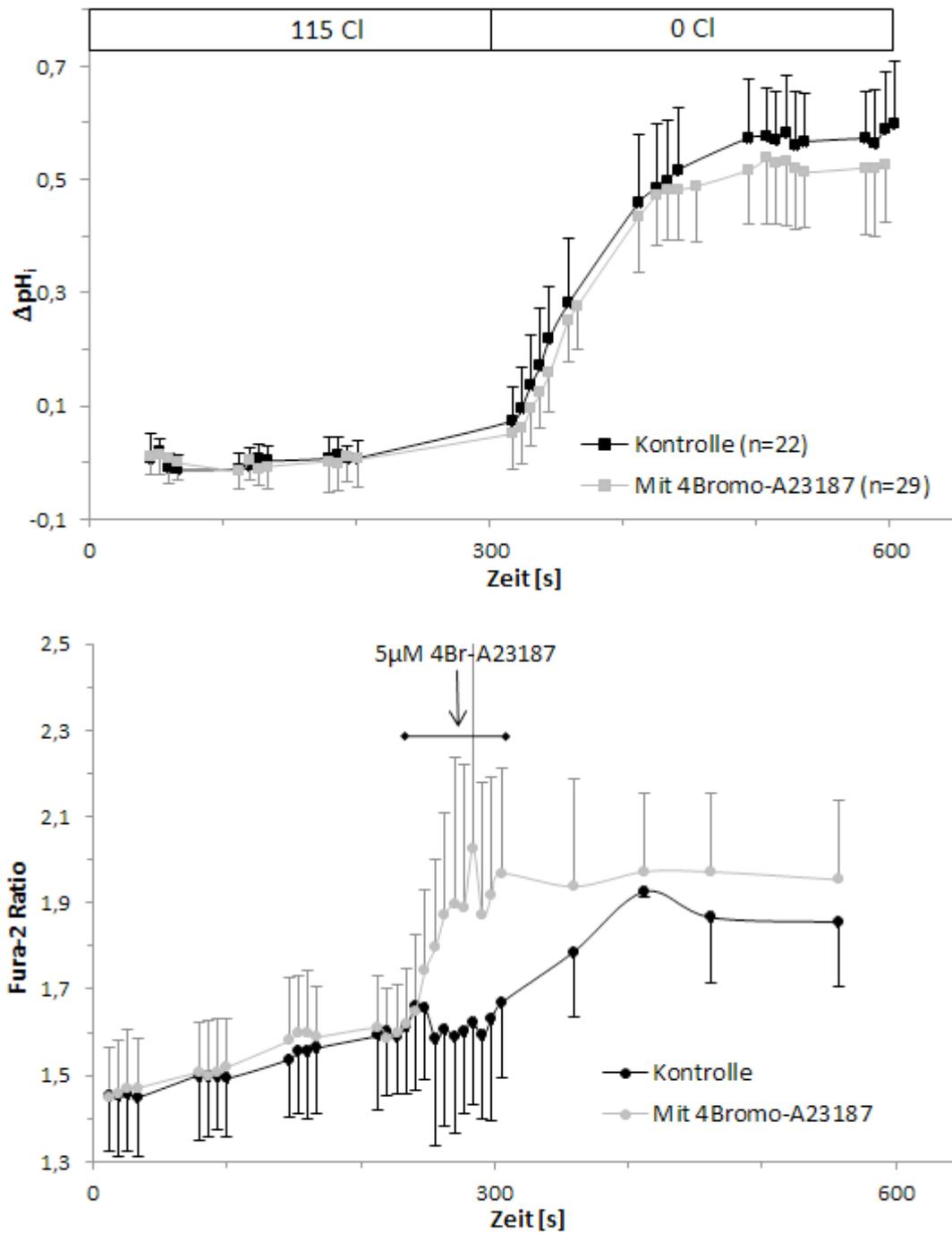


Abbildung 3.6 Simultane Messung von intrazellulärem pH und intrazellulärem Calcium in HEK/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen.

Die oberen Kurven zeigen den Verlauf des intrazellulären pH Wertes, relativ zum Ausgangs-pH. Die unteren Kurven zeigen die Fura-2 Ratio. Nach 220 Sekunden wurde den Zellen 5µM 4Bromo-A23187 zugeführt, dies führt zum Ansteigen der Fura-2 Ratio, also der intrazellulären Calciumkonzentration, um $0,469 \pm 0,445$. Nach 300 Sekunden wurde auf den Glukonatpuffer ohne Chlorid umgeschaltet. Dies bewirkt je nach DRA Aktivität eine Alkalisierung der Zellen um $0,510 \pm 0,074$ (mit A23187) bzw. $0,554 \pm 0,068$ (Kontrolle), $p < 0,05$.

Nach Zugabe des Calcium Ionophors bei 220 Sekunden kommt es zu einem Anstieg der Fura-2 Ratio, also der intrazellulären Calciumkonzentration. Der Entzug des extrazellulären Chlorids nach 300 Sekunden führt zur Alkalisierung der Zellen auf Grund des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausches durch DRA. Auch bei den Messungen ohne 4Br-A23187 Zugabe kommt es nach 300 Sekunden zu einem Anstieg der Fura-2 Ratio. Dieser Effekt wird ausführlich in Abschnitt 4.2 diskutiert.

Die Zugabe von 5 μM 4Bromo-A23187 nach 220 Sekunden führt zu unterschiedlich starken Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen. Vergleicht man die Fura-2 Ratios in den Bereichen von 0-100 Sekunden und 280-300 Sekunden so führt die Zugabe des Calcium Ionophors zu einer Zunahme der Ratio um $0,469 \pm 0,445$. Die hohe Standardabweichung zeigt die Inhomogenität, mit der die Zellen bzw. Fura-2 auf 4Bromo-A23187 reagieren. Es führt also nicht jede Zugabe des Calcium Ionophors automatisch zu einer drastischen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Geringere Reaktion oder gar ein Ausbleiben des Anstiegs kommen vor.

Zur weiteren Analyse wurde die Höhe des pH Anstieges ΔpH_i daher in Abbildung 3.7 in Bezug auf die mittlere Fura-2 Ratio im Bereich von 250-300 Sekunden dargestellt.

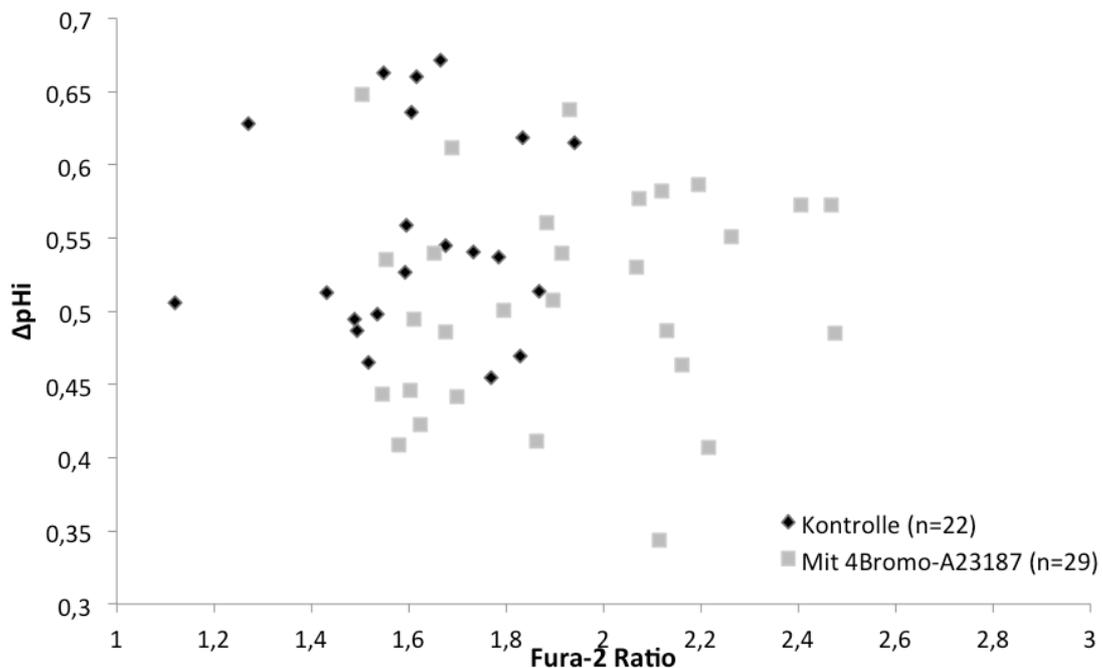


Abbildung 3.7 Die Calciumabhängigkeit der DRA Aktivität in HEK/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen

Der Anstieg des intrazellulären pH Wertes nach dem Chloridentzug in Abhängigkeit von der, durch 4Bromo-A23187 beeinflussten Fura-2 Ratio. In der Kontrollgruppe kommt es zu einem Anstieg des pH um $0,554 \pm 0,068$, in der Gruppe mit A23187 um $0,510 \pm 0,074$.

In Abbildung 3.7 sieht man, dass die Behandlung der HEK Zellen mit dem Calcium Ionophor nicht zwangsläufig zu einer starken Erhöhung der Fura-2 Ratio, also der Calciumkonzentration, geführt hat. Auch in den Kontrollmessungen gab es eine Abweichung der Fura-2 Ratio um $\pm 0,194$.

Die statistische Analyse der Daten zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen. Der Anstieg der intrazellulären pH Werte ist bei den mit 4Bromo-A23187 behandelten Zellen signifikant geringer ($0,510 \pm 0,074$ vs $0,554 \pm 0,068$, $p < 0,05$).

3.5 Aktivität von DRA in HEK Zellen mit festgelegtem intrazellulärem Calcium

Zur Überprüfung, ob die Zellen evtl. schon von Beginn an hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen aufweisen, sollten bei den Zellen die Calciumkonzentrationen fest eingestellt werden. Nach 300 Sekunden wurden die

intrazellulären Calciumkonzentrationen auf 56nM bzw. 752nM eingestellt. Die Verläufe des intrazellulären Calciums sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

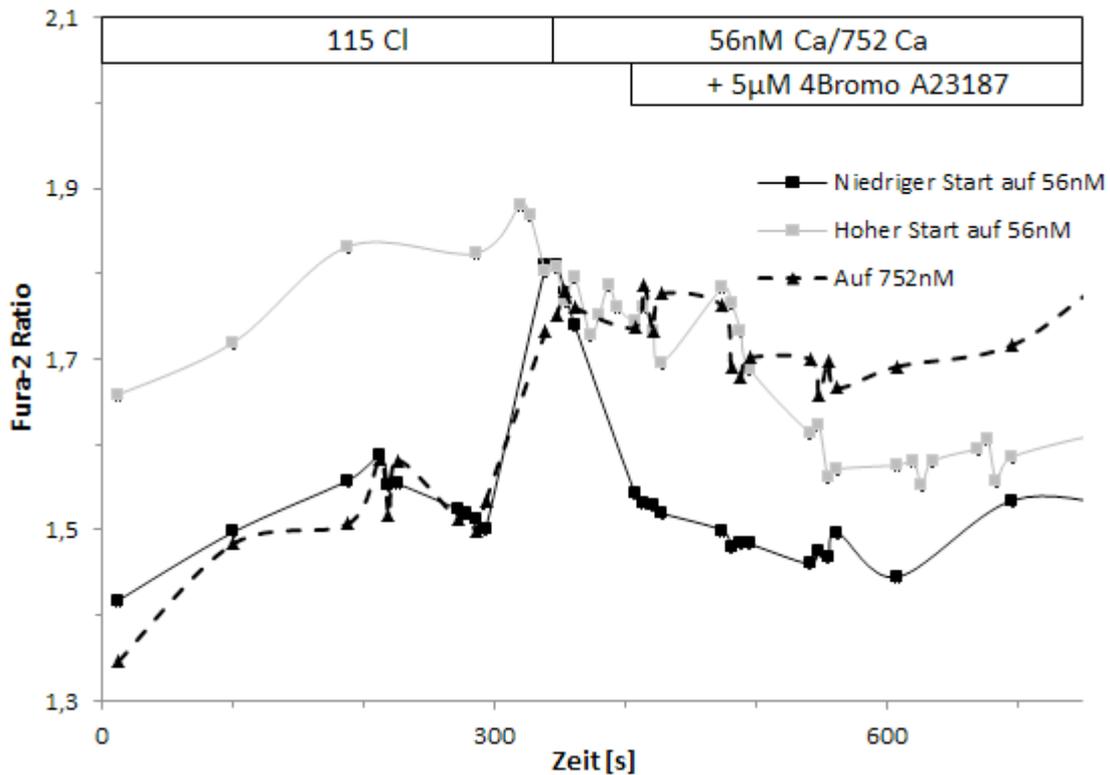


Abbildung 3.8 Calciumverläufe bei Festlegung des intrazellulären Calciums mittels 4Br-A23187 und CaEGTA Puffern.

Nach 300 Sekunden wurde auf CaEGTA Puffer mit 56nM bzw. 752nM freiem Calcium umgestellt. Zusätzlich waren 5µM 4Bromo-A23187 in den CaEGTA Puffern gelöst, um intra- und extrazelluläre Calciumkonzentrationen gleichzuschalten. Bei den Messungen mit 56 nM Calcium betrug die Fura-2 Ratio nach Gleichschaltung im Mittel $1,505 \pm 0,111$, bei denen mit 752 nM Calcium $1,736 \pm 0,133$.

Bei der Einstellung auf 56nM sind zwei unterschiedliche Verläufe zu beobachten. Starten die Zellen bereits mit niedrigen Calciumkonzentrationen, so kommt es nach Exposition mit sehr niedrigen extrazellulären Calciumkonzentrationen zum kurzzeitigen Anstieg der Fura-2-Ratio. Dieser entspricht wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben am ehesten der Aktivität von Store operated Calcium Kanälen. Bei den Zellen, die mit hohen Calciumkonzentrationen starten ist dieser Effekt nicht zu sehen. Es erfolgt lediglich ein allmählicher Abfall der Fura-2-Ratio. Die Gleichschaltung mit den Puffern mit 752 nM freiem Calcium führt zum raschen Anstieg der Fura-2 Ratio.

Die Höhe der pH Differenz im Zuge der Alkalisierung nach dem Entzug des extrazellulären Chlorids bezogen auf die Fura-2 Ratio direkt vor diesem ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

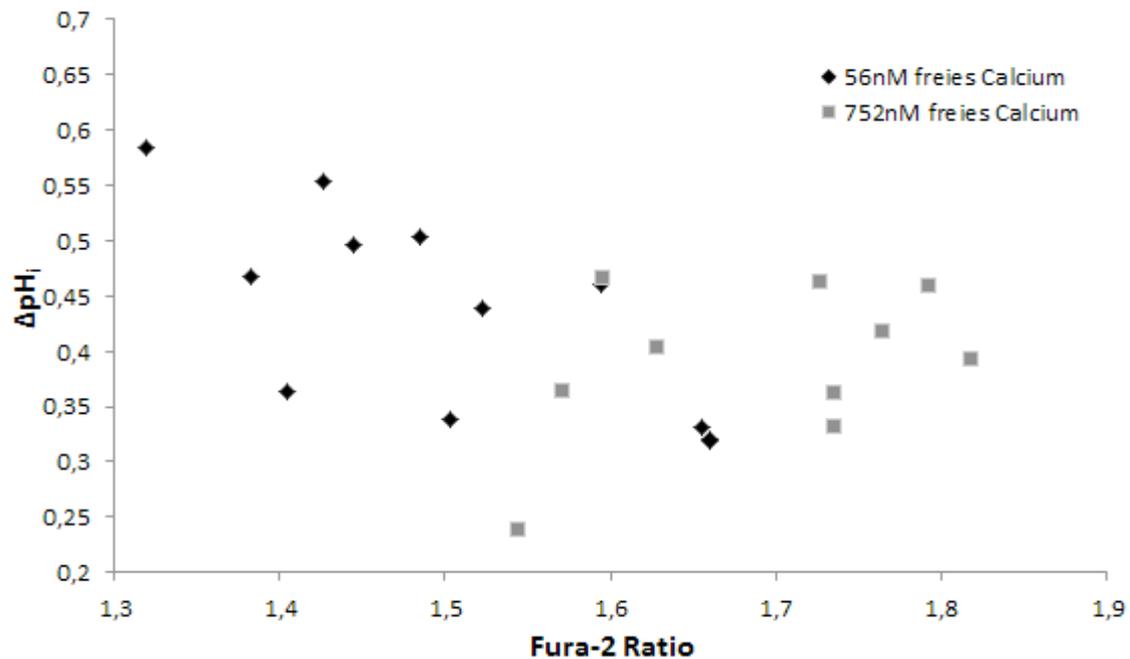


Abbildung 3.9 Die Höhe der pH Differenz im Zuge der Alkalisierung nach dem Entzug des extrazellulären Chlorids bezogen auf die Fura-2 Ratio direkt vor diesem.

Hier ist zunächst zu erkennen, dass trotz 300 Sekunden Gleichschaltung von intra- und extrazellulärem Calcium die Fura-2 Ratios der einzelnen Messungen erheblich variieren. Bei den Messungen mit 56 nM Calcium betrug die Fura-2 Ratio im Mittel $1,505 \pm 0,111$, bei denen mit 752 nM Calcium $1,736 \pm 0,133$. Die Zellen mit theoretischen 56 nM intrazellulärem Calcium wurden nach dem Entzug des extrazellulären Chlorids im Mittel um $0,4311 \pm 0,090$ alkalischer, die Serie mit höherem Calcium um $0,395 \pm 0,063$. Es ist also ein Unterschied zwischen hohem und niedrigem Calcium zu sehen, dieser ist jedoch nicht signifikant.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Zellen, deren Fura-2 Ratio zu Beginn der Messungen bereits erhöht war, unabhängig von der weiteren Einstellung der Calciumkonzentration eine geringere DRA Aktivität aufgewiesen haben. Der ΔpH_i dieser Subgruppe lag nur bei $0,397 \pm 0,095$ (n=5).

3.6 Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration mittels BAPTA/AM

Es sollte untersucht werden, ob analog zur Hemmung der DRA Aktivität durch erhöhte Calciumkonzentrationen die Verminderung der Calciumkonzentration ebenso einen Einfluss auf die DRA Aktivität hat.

Hierzu wurden ebenfalls stabil transfizierte HEK/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen verwendet. Durch Inkubation für 30 Minuten mit 25 μM des calciumspezifischen Chelators BAPTA/AM wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration gesenkt. Die DRA Aktivität wurde wie bereits in Abschnitt 3.4 nur durch Verwendung der Puffer 115 Cl und 0 Cl bestimmt.

Abbildung 3.10 zeigt, dass die Inkubation mit 25 μM BAPTA/AM zu einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentrationen führt. Die mittlere Fura-2 Ratio zu Beginn der Messungen betrug in der Kontrolle $1,524 \pm 0,117$, nach Inkubation mit BAPTA/AM $1,363 \pm 0,127$, $p \ll 0,05$.

Der Einfluss dieser Unterschiede der Calciumkonzentration auf die Aktivität von DRA ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Bei den Kontrollmessungen wurde unterschieden, ob die Messungen am Tag an dem die Zellen konfluent waren durchgeführt wurden, oder einen Tag später. Hierbei fällt auf, dass die DRA Aktivität der Zellen, die länger konfluent waren geringer ist. Der mittlere pH Anstieg alle Kontrollmessungen lag bei $0,518 \pm 0,117$, der 0 Tage konfluenten Zellen bei $0,562 \pm 0,073$ ($n=8$), der 1 Tag konfluenten Zellen bei $0,467 \pm 0,072$ ($n=7$). Im Vergleich dazu lag der mittlere pH Anstieg in den BAPTA/AM inkubierten Zellen bei $0,535 \pm 0,046$ ($n=19$).

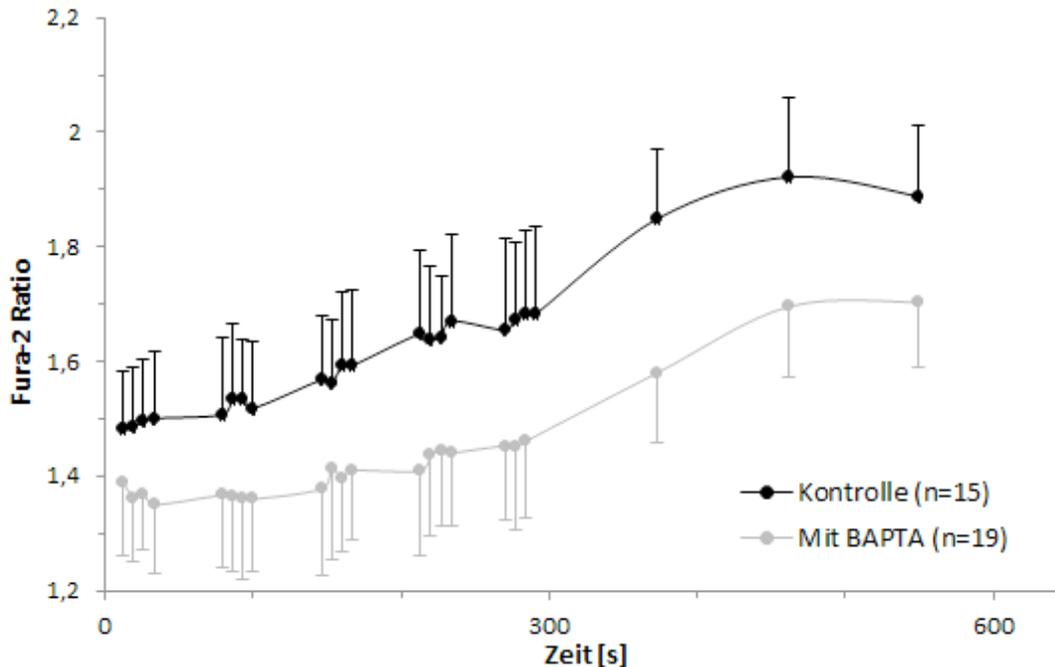


Abbildung 3.10 Der Einfluss der Inkubation mit BAPTA/AM auf die Fura-2 Ratio

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Fura-2 Ratio nach 30 Minütiger Inkubation mit 25 μ M BAPTA/AM. Die mittlere Fura-2 Ratio zu Beginn der Messungen betrug in der Kontrolle $1,524 \pm 0,117$, nach Inkubation mit BAPTA/AM $1,363 \pm 0,127$. Nach 300 Sekunden wurde zur Bestimmung der DRA Aktivität das extrazelluläre Chlorid entzogen, woraufhin die Zellen alkalisieren. Der Anstieg der Fura-2 Ratio ab 300 Sekunden spiegelt keinen realen Anstieg der Calciumkonzentration wieder (Vgl. Abschnitt 4.2).

Somit lässt sich sagen, dass die Inkubation mit BAPTA/AM die DRA Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht steigert. Allerdings kann durch die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration eine bereits vorhandene Hemmung, wie sie offenbar durch zu langes Wachstum der Zellen auf den Glasplättchen entsteht wieder ausgeglichen werden.

Der Versuch eine durch 4Bromo-A23187 erzeugte calciumabhängige Hemmung von DRA durch die Inkubation mit BAPTA auszugleichen gelang nicht, da dennoch bei der Zugabe des Calcium Ionophors ein massiver Anstieg der Fura-2 Ratio, und somit der intrazellulären Calciumkonzentration festzustellen war. Dies ist auf die erschöpfte Kapazität des in limitierter Menge vorliegenden intrazellulären BAPTA für letztlich unlimitiert von extrazellulär einströmendes Calcium zurückzuführen.

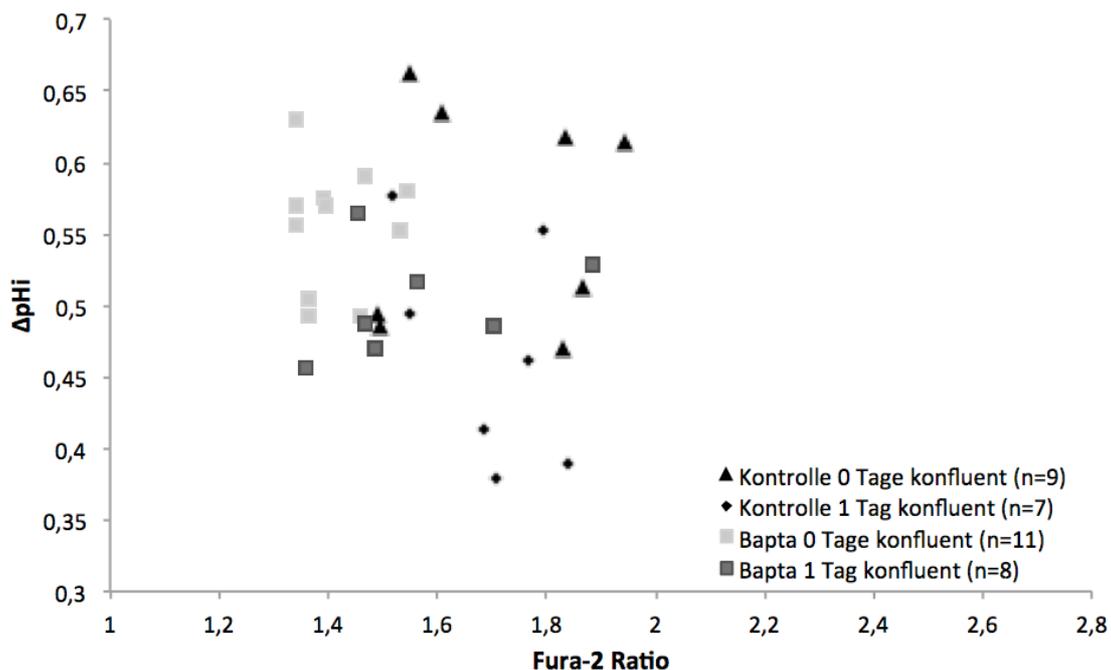


Abbildung 3.11 Auswirkungen der Inkubation mit BAPTA/AM auf die DRA Aktivität.

Dargestellt ist DRA-Aktivität, ausgedrückt durch den pH-Unterschied vor und nach der Alkalisierung der Zellen in Abhängigkeit von der Fura-2 Ratio vor dem Umschalten auf den Puffer 0 Cl. Als Referenz wurden zwei unterschiedliche Kontrollen gewählt. Der mittlere pH Anstieg alle Kontrollmessungen lag bei $0,518 \pm 0,117$, der 0 Tage konfluenten Zellen bei $0,562 \pm 0,073$ ($n=8$), der 1 Tag konfluenten Zellen bei $0,467 \pm 0,072$ ($n=7$). Im Vergleich dazu lag der mittlere pH Anstieg in den BAPTA/AM inkubierten Zellen bei $0,535 \pm 0,046$ ($n=19$).

3.7 Calciuminhibition von DRA in Caco-2 BBE Zellen

Um zu untersuchen, ob PDZK1 als Calciumsensitizer bei der Inhibition von DRA wirkt, wurde die calciumabhängige DRA Inhibition von EGFP-DRA transfizierten Caco-2 Zellen mit endogener PDZK1 Expression mit derer in PDZK1 überexprimierenden Zellen untersucht. Hierzu wurden Caco-2/EGFP-DRA Zellen zusätzlich mit DsRedmono-PDZK1 stabil transfiziert.

Es wurde die calciumabhängige DRA Inhibition in stabil mit EGFP-DRA transfizierten Caco-2 BBE Zellen untersucht. Hierzu wurden, wie bei den Messungen mit transfizierten HEK Zellen die Puffer 115 Cl, 0 Cl und 30 Cl verwendet. Zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen wurden $5 \mu\text{M}$ 4Br-A23187 verwendet, welche 80 Sekunden vor dem Chloridentzug hinzugegeben wurden.

Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 zeigen die pH- und Calciumverläufe während der Messungen. Jeweils im unteren Teil der der Abbildungen ist der zeitliche Verlauf der Fura-2 Ratio dargestellt. Diese steigt nach Zugabe des Calcium Ionophors deutlich an. Bei den nur mit EGFP-DRA transfizierten Zellen im Mittel um 0,241 auf $1,875 \pm 0,251$, bei den PDZK1 überexprimierenden um 0,300 auf $1,902 \pm 0,317$. Nach 300 Sekunden ist auch bei den Messungen ohne 4Bromo-A23187 ein Anstieg der Fura-2 Ratio zu sehen. Dieser Effekt wird ausführlich in Abschnitt 4.2 diskutiert.. Die Ratio fällt nach 600 Sekunden unter beiden Messbedingungen wieder ab.

Die oberen Kurven zeigen jeweils den Verlauf der intrazellulären pH Werte. Nach 300 Sekunden alkalisieren die Zellen rasch infolge der Umkehr des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausches durch DRA. Bei den Zellen, deren intrazelluläre Calciumkonzentration zuvor erhöht wurde, erfolgt der pH Anstieg weniger schnell und weniger hoch als bei den unbehandelten Zellen. Bei den EGFP-DRA transifzierten Zellen erfolgt ein pH Anstieg um $0,531 \pm 0,068$ (Kontrolle: $0,568 \pm 0,118$, $p > 0,05$). Bei zusätzlicher Überexpression von PDZK1 um $0,480 \pm 0,111$ (Kontrolle: $0,545 \pm 0,068$, $p < 0,05$). Nach 600 Sekunden kommt es zur Reazidifizierung der Zellen nach Umstellung auf den Puffer mit 30mM Chlorid.

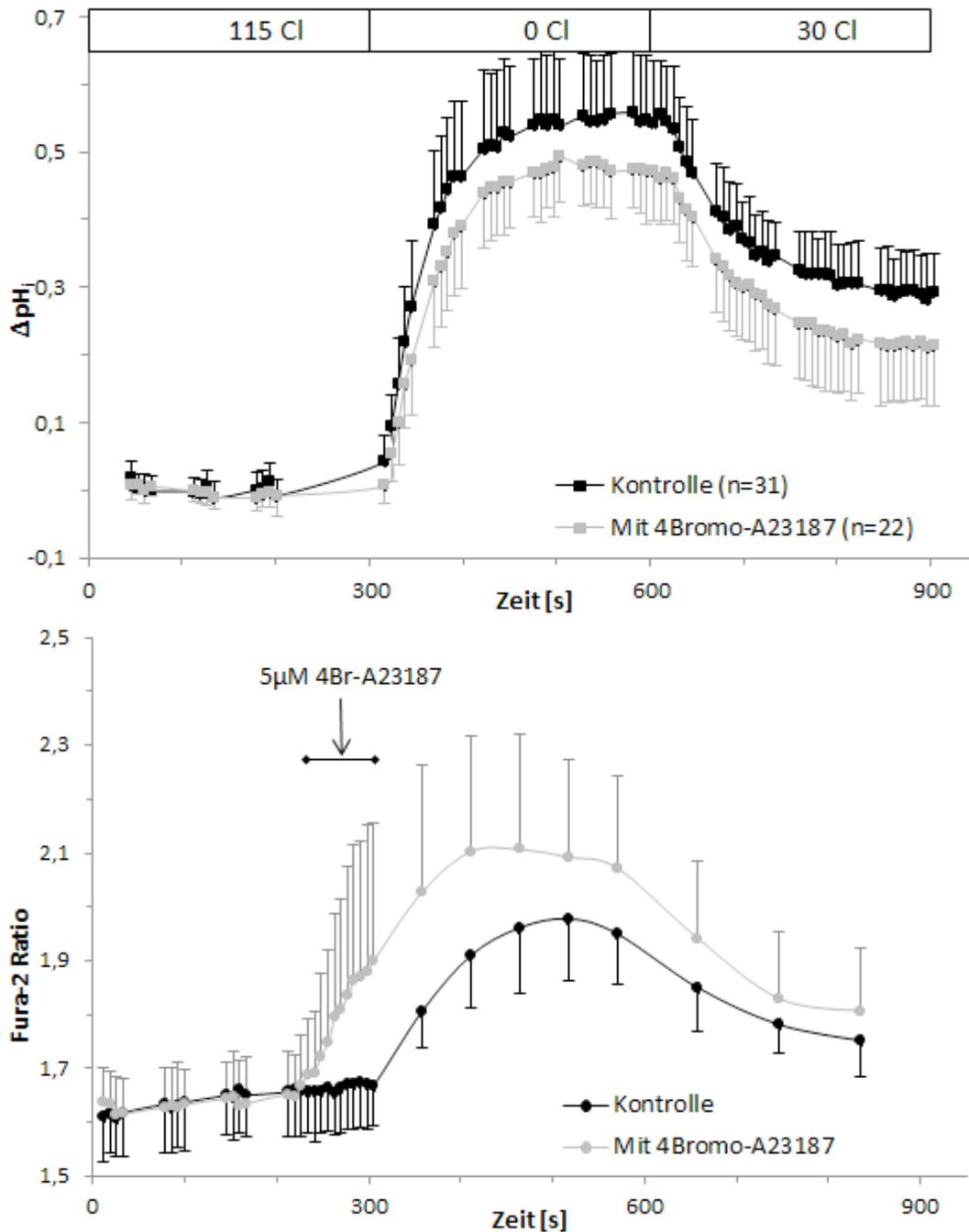


Abbildung 3.12 Calciuminhibition von DRA in Caco-2/EGFP-DRA Zellen

Stabil mit EGFP-DRA transfizierte Caco-2 Zellen wurde nach 220 Sekunden 5 μ M 4Bromo-A23187 zugeführt. Die untere Abbildung zeigt den daraufhin stattfindenden Anstieg der Fura-2 Ratio. Diese steigt im Mittel um 0,241 auf $1,875 \pm 0,251$. 80 Sekunden später wurde auf den Glukonatpuffer mit 0 mM Chlorid umgestellt. In der oberen Abbildung ist der Anstieg der intrazellulären pH Werte im Vergleich zum Ausgangs-pH dargestellt. Dieser steigt bei den 4Br-A23187 behandelten Zellen im Mittel um $0,531 \pm 0,068$ (Kontrolle: $0,568 \pm 0,118$, $p > 0,05$). Nach 600 Sekunden wurde auf den Puffer 30 Cl mit Chlorid und Glukonat umgeschaltet.

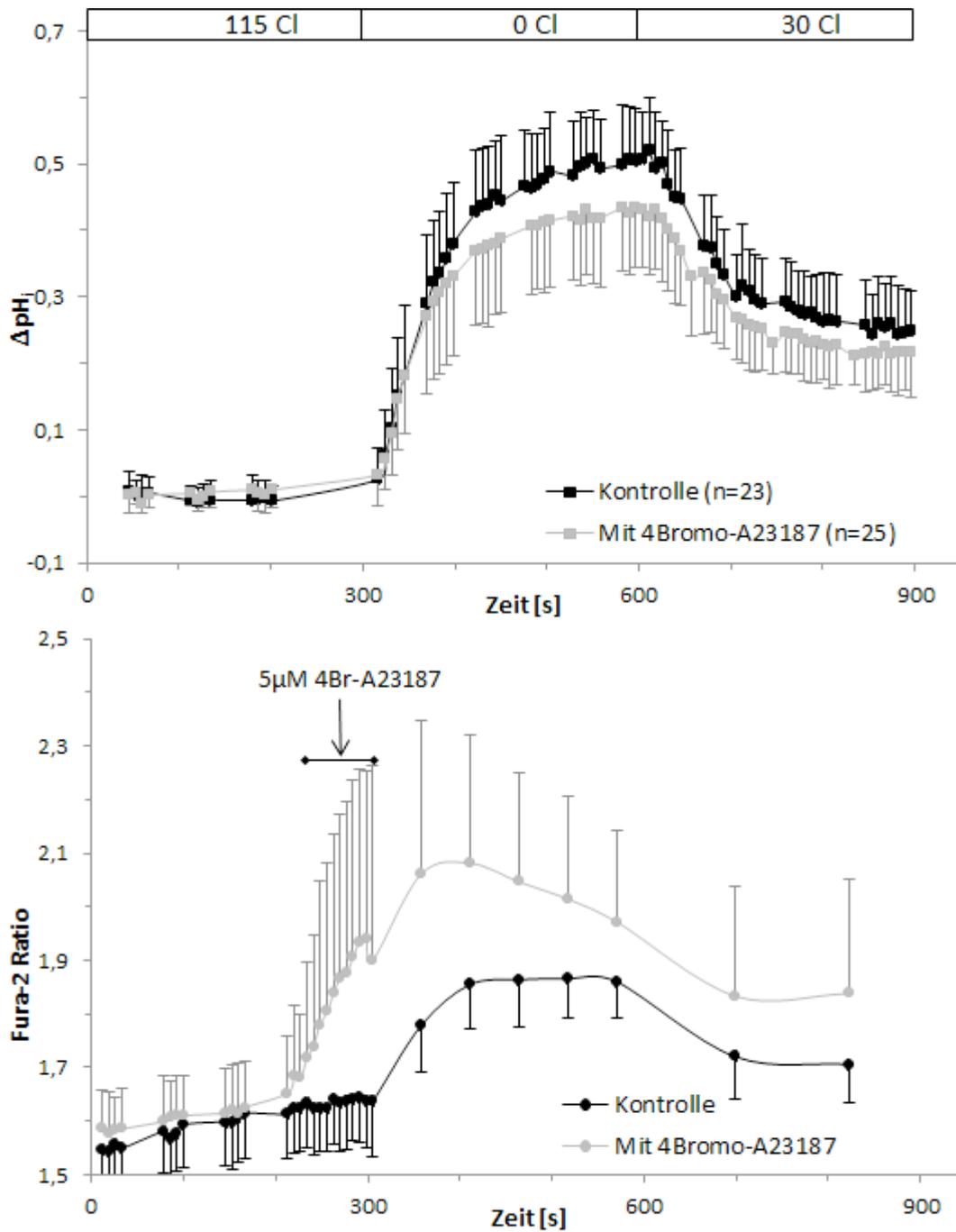


Abbildung 3.13 Calciuminhibition von DRA in Caco-2/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen

Die Auswirkungen der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels 4Bromo-A23187 wurde in PDZK1 überexprimierenden Caco-2 Zellen in gleicher Weise wie in Abbildung 3.12 beschrieben untersucht. Die obere Abbildung zeigt den intrazellulären pH Anstieg, die untere den Anstieg der Fura-2 Ratio nach Zugabe des Calciumionophors. Die Fura-2 Ratio steigt nach Behandlung mit 4Br-A23187 um 0,300 auf $1,902 \pm 0,317$. Der pH Wert der behandelten Zellen im Mittel um $0,480 \pm 0,111$ (Kontrolle: $0,545 \pm 0,068$, $p < 0,05$).

Da die Zellen mit sehr heterogenen Calciumveränderungen auf die Zugabe von 4Bromo-A23187 reagierten, sollte nicht nur die Tatsache, dass das Calciumionophor hinzugegeben wurde, sondern auch die Höhe des erreichten Fura-2-Ratio Anstieges beachtet werden. Außerdem wurden in einigen Zellen bereits zu Beginn der Messungen sehr hohe Fura-2 Ratios registriert. Daher wurden die Zellen in zwei Gruppen anhand der Fura-2 Ratio unmittelbar vor dem Chloridentzug eingeteilt.

Ohne PDZK1 Überexpression kam es in der Gruppe mit einer Fura-2 Ratio $< 1,8$ (im Mittel 1,665) zu einem pH Anstieg um $0,566 \pm 0,104$, mit Fura-2 Ratio $> 1,8$ (im Mittel 2,064) um $0,497 \pm 0,050$, $p < 0,05$. Mit Überexpression in der niedrigeren Gruppe (Mittel 1,615) um $0,546 \pm 0,082$ und in der höheren (Mittel 2,122) um $0,423 \pm 0,086$, $p \ll 0,05$. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3.14 die pH Anstiege im Verhältnis zu den dazugehörigen Fura-2 Ratios im Bereich vor dem Chloridentzug dargestellt.

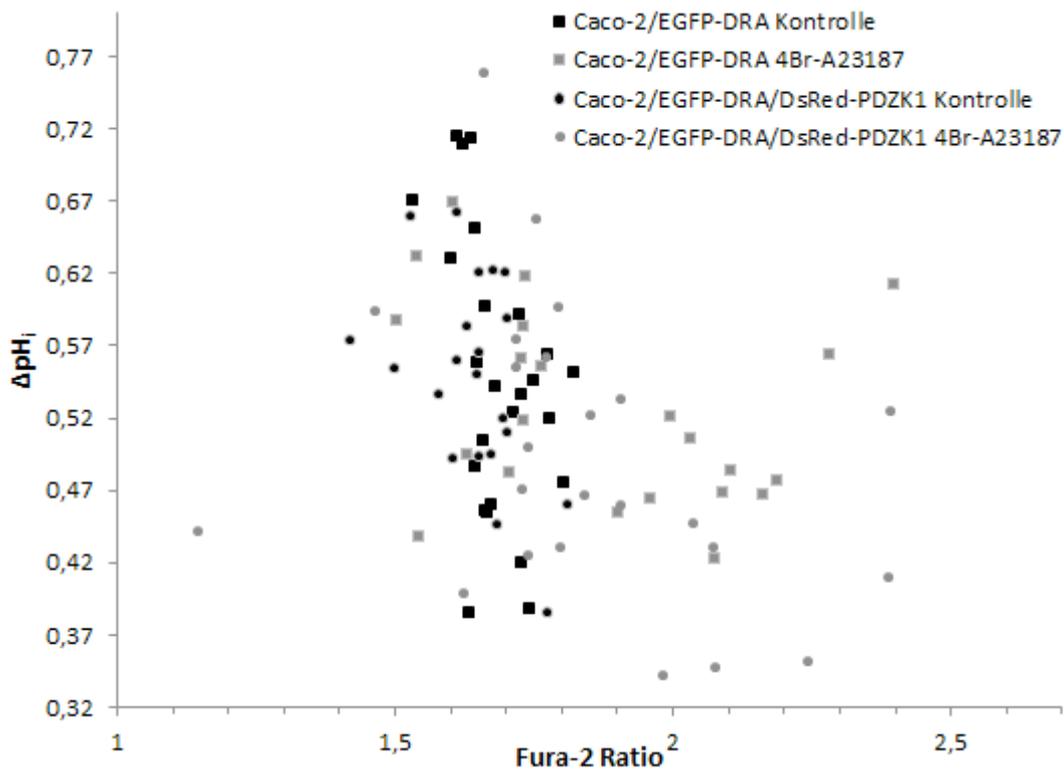


Abbildung 3.14 Die Abhängigkeit der DRA Aktivität vom Ausmaß der intrazellulären Calciumerhöhung
 Dargestellt ist das Ausmaß der Alkalisierung der Zellen in Relation zur mittleren Fura-2 Ratio zwischen 290 und 300 Sekunden.

3.8 Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Oberflächenexpression von DRA

Zur Überprüfung, welchen Einfluss eine Calciumerhöhung mit 4Bromo-A23187 auf die Oberflächenexpression von DRA hat, wurde diese nach 100 Sekunden, 10 Minuten und 30 Minuten ermittelt. Hierzu wurde den Zellen für die genannten Zeiträume 10 μ M 4Bromo-A23187 zugegeben, und sie wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Bestimmt wurde die Oberflächenexpression von DRA in Caco-2/EGFP-DRA und Caco-2/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1, also PDZK1 überexprimierenden Zellen.

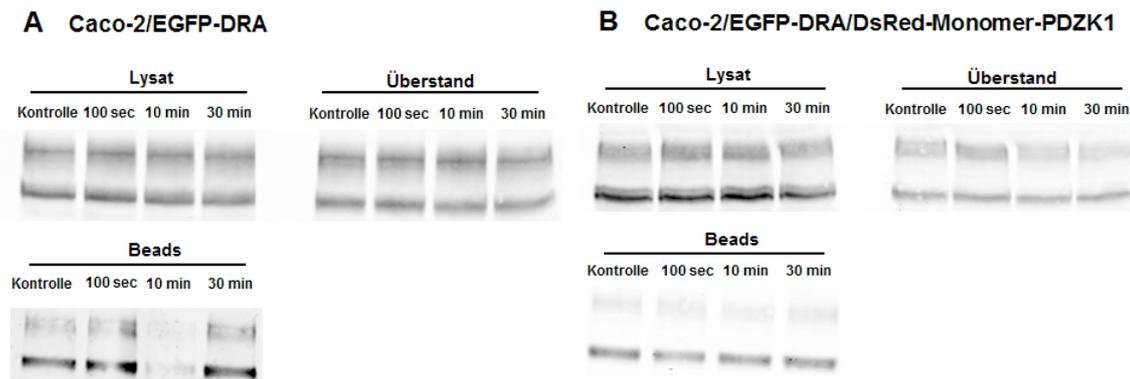


Abbildung 3.15 Einfluss der 4Bromo-A23187 vermittelten Calciuserhöhung auf die Oberflächenexpression von DRA

Um die Oberflächenexpression von EGFP-DRA und EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 transfizierten Caco-2 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 0, 100 Sekunden, 10 Minuten und 30 Minuten mit $10\mu\text{M}$ 4Bromo-A23187 inkubiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von DRA mittels Oberflächenbiotinylierung, SDS-Page, Western Blot und Detektion mit einem spezifischen anti-EGFP Antikörper, sowie fluoreszierendem Sekundärantikörper quantitativ untersucht.

Der Anteil von DRA an der gesamten Oberflächenproteinmenge betrug bei den Zellen mit ausschließlich endogener PDZK1 Expression im Mittel $20,1\% \pm 4,05$, bei den PDZK1 überexprimierenden Zellen $24,2\% \pm 2,11$.

Die Veränderungen der Oberflächenexpression von DRA im Vergleich zu den Ausgangswerten sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Nach 100 Sekunden ist keine signifikante Änderung festzustellen. Nach 10 und 30 Minuten sieht man bei Caco-2/EGFP-DRA Zellen eine signifikante Reduktion von DRA auf der Oberfläche. Die Reduktion beträgt nach 10 Minuten bis zu $44\% \pm 10\%$.

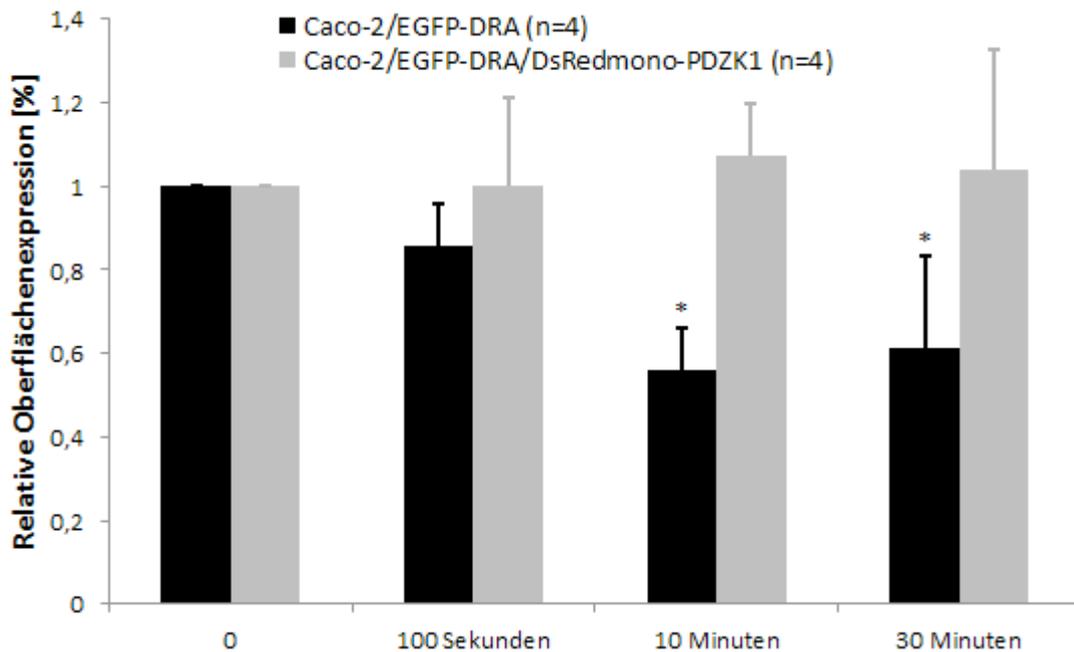


Abbildung 3.16 Der Einfluß der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration auf die Oberflächenexpression von DRA

In Zellen mit endogener PDZK1 Expression und mit Überexpression von PDZK1 wurde für 100 Sekunden, 10 Minuten und 30 Minuten die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels $10\mu\text{M}$ 4Bromo-A23187 erhöht. Die Abbildung zeigt die Veränderungen der Oberflächenkonzentration von DRA im Vergleich zum Kontrollwert. Nach 100 Sekunden ist keine signifikante Veränderung der DRA Oberflächenexpression festzustellen. Nach 10 und 30 Minuten ist eine signifikante Reduktion bei den Zellen, welche nur endogen exprimiertes PDZK1 exprimieren, nicht jedoch bei den PDZK1 überexprimierenden Zellen festzustellen.

3.9 Einfluss einer zehnmütigen Erhöhungen der Calciumkonzentration auf die Aktivität von DRA

Es sollte nun überprüft werden, ob die im vorherigen Abschnitt gezeigte Verminderung von DRA auf der Zelloberfläche Auswirkungen auf die Gesamtaktivität von DRA hat. Hierzu wurden Caco-2/EGFP-DRA Zellen verwendet. Es wurde die DRA Aktivität ohne 4Bromo A23187, 100 Sekunden und 10 Minuten nach der Calciumerhöhung bestimmt.

In Abbildung 3.17 ist der Verlauf der Fura-2 Ratio dargestellt. Nach 200 bzw. 700 Sekunden wurde den Zellen $10\mu\text{M}$ 4Bromo-A23187 zugegeben. Dies führt jeweils zum Ansteigen der Fura-2 Ratio. Diese erreicht bei den Messungen mit insgesamt 10 Minuten Calciumerhöhung nach 150 Sekunden ein Maximum (durchschnittlich Anstieg um $0,132 \pm 0,103$) und fällt dann wieder ab. Bei den Messungen mit

Calciumerhöhung für 100 Sekunden kommt es nach 700 Sekunden zum, bereits in den vorherigen Experimenten gesehenen „artificialen“, auf die pH_i -Änderung zurückzuführenden starken Anstieg der Fura-2 Ratio.

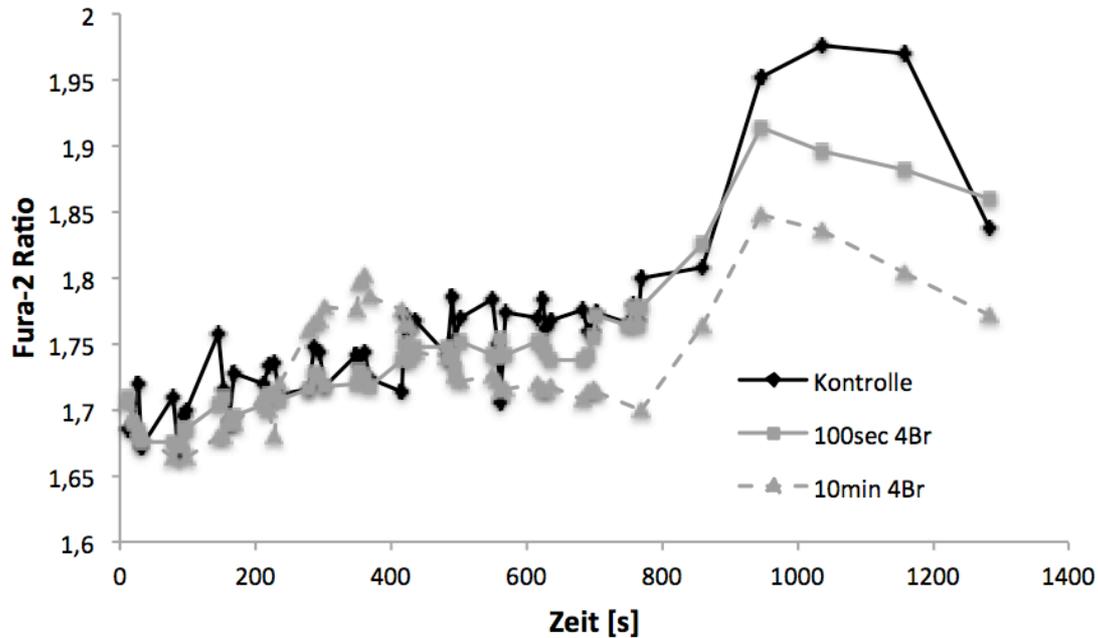


Abbildung 3.17 Verlauf der Fura-2 Ratio

Bei den Messungen mit 10 minütiger Calciumerhöhung wurde nach 200 Sekunden $10\mu\text{M}$ 4Bromo-A23187 hinzugegeben. Bei den Messungen mit 100 Sekunden 4Bromo-A23187 bei 700s. Bei 800 Sekunden erfolgt der Entzug des extrazellulären Chlorids mit dem, bereits in den vorangegangenen Experimenten gesehenen artifiziellen Anstieg der Fura-2 Ratio.

In Abbildung 3.18 ist der Verlauf der intrazellulären pH Werte dargestellt. Bei den Messungen mit 10 Minütiger 4-Bromo A23187 Zugabe sieht man zunächst ein Absinken des intrazellulären pHs um durchschnittlich $0,191 \pm 0,081$ auf $7,299 \pm 0,038$. Sollte die Veränderung des intrazellulären pH Wertes durch A23187 auf Grund von dessen Funktion als H^+/Ca^{2+} Antiporter verursacht werden, wäre bei gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Alkalisierung statt mit einer Azidifizierung zu rechnen [72]. Zum Beginn der Azidifizierung bei etwa 190 Sekunden zeigt die Fura-2 Ratio jedoch noch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration an. Erst nach etwa 380 Sekunden sinkt die Fura-2 Ratio wieder ab und das weitere Absinken des intrazellulären pHs könnte durch 4Bromo-A23187 verursacht werden.

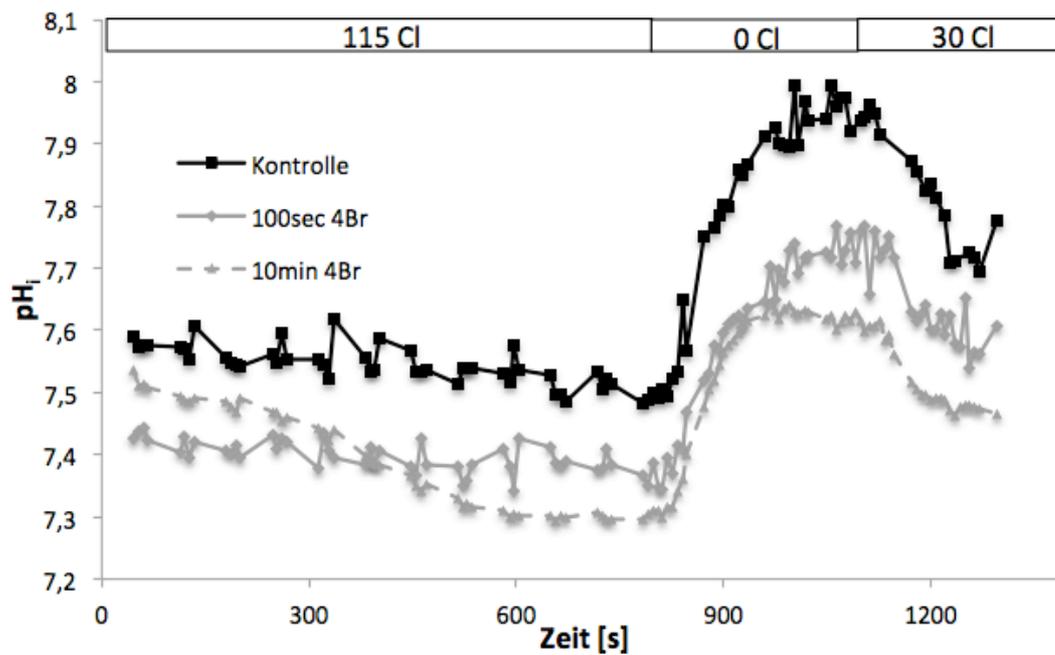


Abbildung 3.18 Mittlerer Verlauf der intrazellulären pH Werte bei 100 sekundiger und 10 minütiger Calciumerhöhung

Nach 800 Sekunden erfolgte der Entzug des extrazellulären Chlorids und somit die Alkalisierung der Zellen durch die Aktivität von DRA. Hierbei kam es in der Kontrollgruppe (n=5) zu einem pH-Anstieg um $0,421 \pm 0,066$, in der Gruppe mit 100 Sekunden 4-Bromo (n=5) um $0,348 \pm 0,106$ und 10 Minuten 4-Bromo (n=6) um $0,315 \pm 0,093$.

Die Arbeiten von Nader et al und Lamprecht et al [79, 80] deuten darauf hin, dass DRA zwar durch alkalischen intrazellulären pH stimuliert und durch sauren intrazellulären pH inhibiert wird, insgesamt ist diese Abhängigkeit jedoch relativ „flach“, so dass die Unterschiede der DRA-Aktivität in Abbildung 3.18 nicht allein durch den saureren basalen intrazellulären pH erklärt werden können, sondern zumindest teilweise auf die längerfristige Erhöhung des intrazellulären pH zurückzuführen sind.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem pH-Anstieg um $0,421 \pm 0,066$ kam es in den Gruppen mit Calcium Ionophor nur zu einem Anstieg von $0,348 \pm 0,106$ (100 sec) bzw. $0,315 \pm 0,093$ (10 Minuten). Die Differenzen sind jedoch nicht signifikant. Die Ursache der fehlenden Signifikanz könnte die geringe Probenanzahl sein.

Betrachtet man in Abbildung 3.19 die pH-Anstiege in Relation zur mittleren Fura-2 Ratio im Bereich von 750-770 Sekunden ist ein klarer Trend erkennbar. ΔpH_i erscheint abhängig von der Fura-2 Ratio und wird in allen drei Gruppen geringer bei höheren intrazellulären Calciumkonzentrationen.

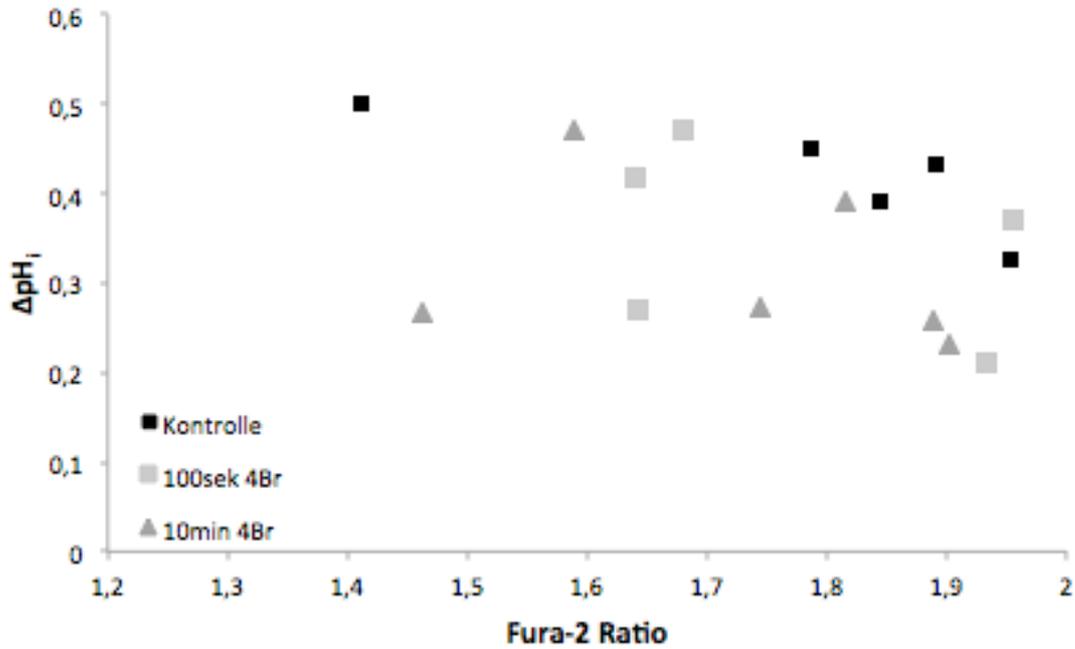


Abbildung 3.19 Die Abhängigkeit der DRA-Aktivität von der intrazellulären Calciumkonzentration

In der Abbildung sind die pH-Anstiege (zeigt DRA Aktivität an) in Relation zur mittleren Fura-2 Ratio im Bereich von 750-770 Sekunden dargestellt. Innerhalb der drei Gruppen ist eine Verminderung der DRA Aktivität mit Zunahme der Fura-2 Ratio festzustellen. Die mittleren pH-Anstiege liegen bei den Messungen mit 4Bromo-A23187 mit $0,348 \pm 0,106$ (100 sek) und $0,315 \pm 0,094$ deutlich unter denen der Kontrollgruppe mit $0,421 \pm 0,066$. Statistisch ist dies jedoch noch nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Simultane Messung von intrazellulärem pH und Calciumkonzentrationen

Die simultane Messung von intrazellulären pH Werten und Calciumkonzentrationen ist mit dem verwendeten Versuchsaufbau zwar gut möglich, unterliegt jedoch einer Reihe von Einschränkungen.

Im Gegensatz zur Messung mit nur einem Farbstoff müssen Kompromisse im Hinblick auf die optimalen Signal/Rausch Verhältnisse in Kauf genommen werden. So ist es zwar möglich die Photomultiplervoltage jederzeit zu ändern und die für BCECF ausreichenden 775V bzw. für Fura-2 benötigten 900V einzustellen, die ebenfalls wünschenswerten unterschiedlichen Einstellungen der Monochromatoren-Schlitzweiten wären aber nur mit erheblichen Zeitverlusten in der Taktung der Messpunkte zu realisieren gewesen. Dies ist allein auf die technischen Gegebenheiten des LS55 Spektralfluorometers zurückzuführen.

Bereits ohne die Umstellung der Schlitzweiten benötigen die Monochromatoren zum Wechsel auf die Wellenlängenpaare des jeweils anderen Farbstoffes über sechs Sekunden. Die Einstellung der Photomultiplervoltage kann parallel erfolgen, die Schlitzweiteneinstellung jedoch erst im Nachhinein, was zu großen Lücken zwischen den einzelnen Messpunkten führen würde. Somit wurden die Schlitzweiten der Monochromatoren in der Regel bei 5nm belassen, welches für beide Farbstoffe akzeptable Signal/Rausch Verhältnisse liefert.

Weiterhin ist bei der Messung mit zwei Farbstoffen zu beachten, dass die Menge an Acetomycinestern, die abgespalten werden müssen, deutlich höher liegt also bei nur einem Farbstoff. So reicht bei der alleinigen Messung des intrazellulären pHs mit BCECF/AM die Inkubation für 10 Minuten um ein starkes Signal zu erhalten. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Fura-2/AM ist eine längere Zeit erforderlich, bis ausreichend freies BCECF in den Zellen vorliegt. Für die verwendeten Farbstoffkonzentrationen von 5 μM BCECF/AM und 4 μM Fura-2/AM haben sich 60 Minuten für Fura-2/AM und 30 Minuten für BCECF/AM als praktikabel

herausgestellt. Bei einem Teil der Messungen waren jedoch diese Zeiten nicht ausreichend, was vor allem Auswirkungen auf die pH Messung hatte. Bei diesen Messungen konnte ein steter Anstieg des BCECF Signals während der Messung gesehen werden. Dieser Anstieg konnte im Verlauf der Messung bis an das Maximum des vom LS55 zu detektierenden Bereichs reichen, wodurch keine Ratio mehr gebildet werden konnte. Bei weniger extremer Ausprägung des Signalanstiegs war in einigen Fällen die auf jede Messung folgende pH Kalibration nicht möglich.

4.2 Einschränkungen der Calciumbestimmung mit Fura-2

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde mittels Fura-2 bestimmt. Trotz zahlreicher Angaben in der Literatur, wie aus der gemessenen Fura-2 Ratio die absolute Calciumkonzentration bestimmt werden kann, gelang dies in den verwendeten HEK und Caco-2BBE Zellen nicht.

Die absolute Calciumbestimmung anhand der Fura-2 Ratio gestaltet sich in Zellen als deutlich komplizierter als unter zellfreien Messbedingungen, da hier eine Vielzahl nicht kontrollierbarer Einflüsse zusammen kommen. Wie in der Mehrzahl der Experimente dieser Arbeit zu sehen war, führt die Zugabe von 4Bromo-A23187 zu den Zellen zu sehr variablen Änderungen der Fura-2 Ratio, bei sonst identischen Bedingungen. Es ist dabei nicht möglich, festzustellen, ob die Unterschiede der Ratio auch tatsächliche Unterschiede der Calciumkonzentration widerspiegeln. Entweder führt 4Bromo-A23187 nicht zur erwarteten Calciumveränderung oder Fura-2 kann diesen nicht darstellen.

Mögliche Fehlerquellen bei der Verwendung von Fura-2 sind dessen Abhängigkeit vom pH Wert, der Viskosität, der Magnesiumkonzentration, die Verteilung in intrazellulären Kompartimenten und mögliche Interaktionen mit BCECF. Bis auf den pH Wert, welcher mittels BCECF gemessen wurde, sind diese Faktoren nicht zu kontrollieren.

Als Lösungsversuch wurde im Anschluss an die Messungen mit HEK Zellen eine Zweipunkte Kalibration mit CaEGTA Puffern mit 0 mM und 8 mM Calcium

(entspricht 335 nM freiem Calcium) durchgeführt. Wie erwartet, lagen die Fura-2 Ratios für diese, stets gleichen Calciumkonzentrationen mit Standardabweichungen von $\pm 0,268$ für 0 mM Calcium und $\pm 0,364$ relativ weit auseinander.

Damit eine vergleichbare Zweipunkte Kalibration wie bei BCECF bei pH 7,0 und 7,5 möglich ist, sollte der Quotient der beiden Ratios gleich bleiben. Bei BCECF liegt dieser zwischen 1,25 und 1,3. Abweichungen von diesen Werten sprechen für Störungen bei der Färbung oder Messung. Bei den Fura-2 Messungen lag der mittlere Quotient der Ratios bei 335nM und 0nM Calcium ebenfalls bei 1,3. Die einzelnen Werte lagen jedoch zwischen 1,107 und 1,710, so dass hier anders als bei der pH Kalibration keine Richtlinien zur Beurteilung der Qualität der Messung gefunden werden konnten.

Neben den bereits beschriebenen allgemeinen Schwierigkeiten bei der Verwendung von Fura-2 mit 4-Bromo und EGTA Puffern zur Kalibration gab es bei dem gerade genannten Kalibrationsversuch jedoch zwei weitere mögliche Probleme. Zum einen wurde die Zweipunktkalibration des intrazellulären Calciums nach Abschluss des üblichen Versuchsablaufs mit Alkalisierung der Zellen und pH-Kalibration mit Nigericin durchgeführt. Durch den damit verbundenen Stress für die Zellen sowie durch Nigericin selbst können Veränderungen in der Verteilung von Calcium in den intrazellulären Kompartimenten hervorgerufen werden [81-83]. Außerdem erscheint eine Kalibration mit 0nM Calcium physiologisch schwer durchführbar, da eine vollständige Entleerung aller intrazellulärer Speicher durch alleinige Zugabe von 4-Bromo-A23187 in calciumfreier Lösung nicht zu erreichen sein wird.

Bei den Versuchen mit festgelegter intrazellulärer Calciumkonzentration (Abschnitt 3.5) erfolgte die Zugabe von 4-Bromo-A23187 in definiertem CaEGTA Puffer vor dem weiteren Versuchsablauf. Bei den Messungen mit 56 nM freiem Calcium betrug die Fura-2 Ratio im Mittel $1,505 \pm 0,111$, bei denen mit 752 nM Calcium $1,736 \pm 0,133$ (s. Abbildung 3.9). Die Unterschiede der Fura-2 Ratio bei gleicher Calciumkonzentration sind zwar geringer als bei den Versuchen mit 0 und

8 mM CaEGTA, jedoch nachwievor zu groß als dass sich eine Kalibrationskurve ableiten ließe.

Daher wurden in den Ergebnissen die Fura-2 Ratios und keine absoluten Calciumkonzentrationen angegeben. Dies entspricht dem Vorgehen in der Mehrzahl anderer Untersuchungen in der Literatur.

Ein weiteres Problem bei der simultanen Messung von pH und Calcium mittels BCECF und Fura-2 ist die mögliche Interaktion der beiden Farbstoffe. Bei der Bestimmung der DRA Aktivität kam es gleichzeitig mit der Alkalisierung der Zellen, also dem Anstieg der BCECF Ratio bzw. dem intrazellulären pH auch immer zum Ansteigen der Fura-2 Ratio. Dieser Anstieg ist ohne BCECF Färbung nicht zu sehen und spricht somit für eine Interaktion der beiden Farbstoffe. Da der Einfluss der Interaktion auf die Fura-2 Ratio nicht quantifiziert werden kann, wurden ausschließlich die Fura-2 Ratios unmittelbar vor der Alkalisierung berücksichtigt.

4.3 Die Calciumabhängige Inhibition von DRA

Die Beteiligung von Calcium an einer Vielzahl von Signalwegen ist bereits seit sehr langer Zeit bekannt. Veränderungen der freien Calciumkonzentration wirken dabei vornehmlich über die Proteinkinase-C und Calcium-bindenden Proteinen, allen voran hierbei Calmodulin, welches häufig als allosterischer Regulator wirkt. In manchen Fällen wirken auch Calciumionen selbst als Signaltransduktor [84].

Wie bereits in Abschnitt 1.6 erläutert, ist die calciumvermittelte Regulation derzeit der einzige bekannt Regulationsweg, über den DRA individuell reguliert wird. Die weiteren bekannten Regulationswege sind abhängig von den jeweils exprimierten Cotransportern, wie CFTR oder NHE3.

Von Lamprecht et al. konnte bereits gezeigt werden, dass diese Regulation unabhängig von der Proteinkinase-C und abhängig von der Bindung an PDZK1 ist [47].

Sowohl in EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 transfizierten HEK, als auch in transfizierten Caco2BBE Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung der DRA Aktivität durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Messungen mit dem Calcium Ionophor 4Bromo-A23187 ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Das Ausmaß der Hemmung ist in Caco-2 Zellen abhängig von der Höhe der Calciumkonzentration, wie Abbildung 4.2 zeigt. Das Calciumsignal wirkt hierbei nicht als on-off Mechanismus, sondern inhibiert DRA dynamisch.

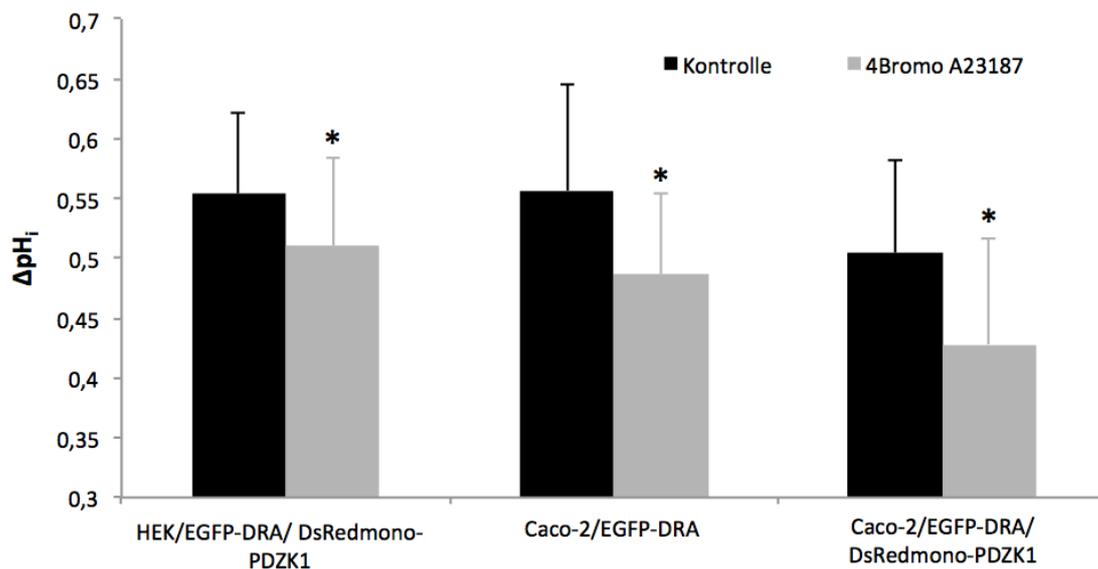


Abbildung 4.1 Die Zugabe von 4Bromo-A23187 führt zur Hemmung der DRA Aktivität

Bei HEK/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1, Caco-2/EGFP-DRA und Caco-2/EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 Zellen wurde die DRA Aktivität mit und ohne die Zugabe von 5 μ M des Calcium Ionophors 4Bromo-A23187 für 80 Sekunden bestimmt. Dabei konnte in allen drei untersuchten Zelllinien eine signifikante Verminderung der DRA Aktivität festgestellt werden.

Obwohl die Aktivität von DRA in HEK Zellen nach Behandlung mit 4Br-A23187 signifikant geringer war, konnte der Zusammenhang zwischen Calciumkonzentration und DRA Aktivität nicht gezeigt werden (Vergleiche Abbildung 4.2). Gründe hierfür könnten einerseits die im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Probleme im Zusammenhang mit Fura-2, oder das Fehlen weiterer Adapterproteine in den HEK Zellen sein. Letzteres würde bedeuten, dass PDZK1

zwar für die Calciumregulation von DRA zwingend benötigt wird, aber weitere Regulationspartner beteiligt sind. Diese werden möglicherweise in Caco-2 BBE Zellen, nicht jedoch in HEK Zellen endogen exprimiert. Ein möglicher Kandidat für das gesuchte Protein wäre E3KARP, für welches bereits eine Beteiligung an der Calcium Inhibition von NHE3 gezeigt werden konnte [48, 85].

PDZK1 selbst könnte als Calciumsensitizer agieren. Die Überexpression führt, wie in Abbildung 4.2 gezeigt, zu einem signifikanten Unterschied in der calciumvermittelten Inhibition nach Analyse mittels Wilcoxon-Test. Gleichwohl fällt auf, dass durch die Überexpression von PDZK1 die DRA Aktivität insgesamt vermindert erscheint. Ob dies durch eine Wirkung von PDZK1 oder durch klonale Einflüsse hervorgerufen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht aufgegriffen.

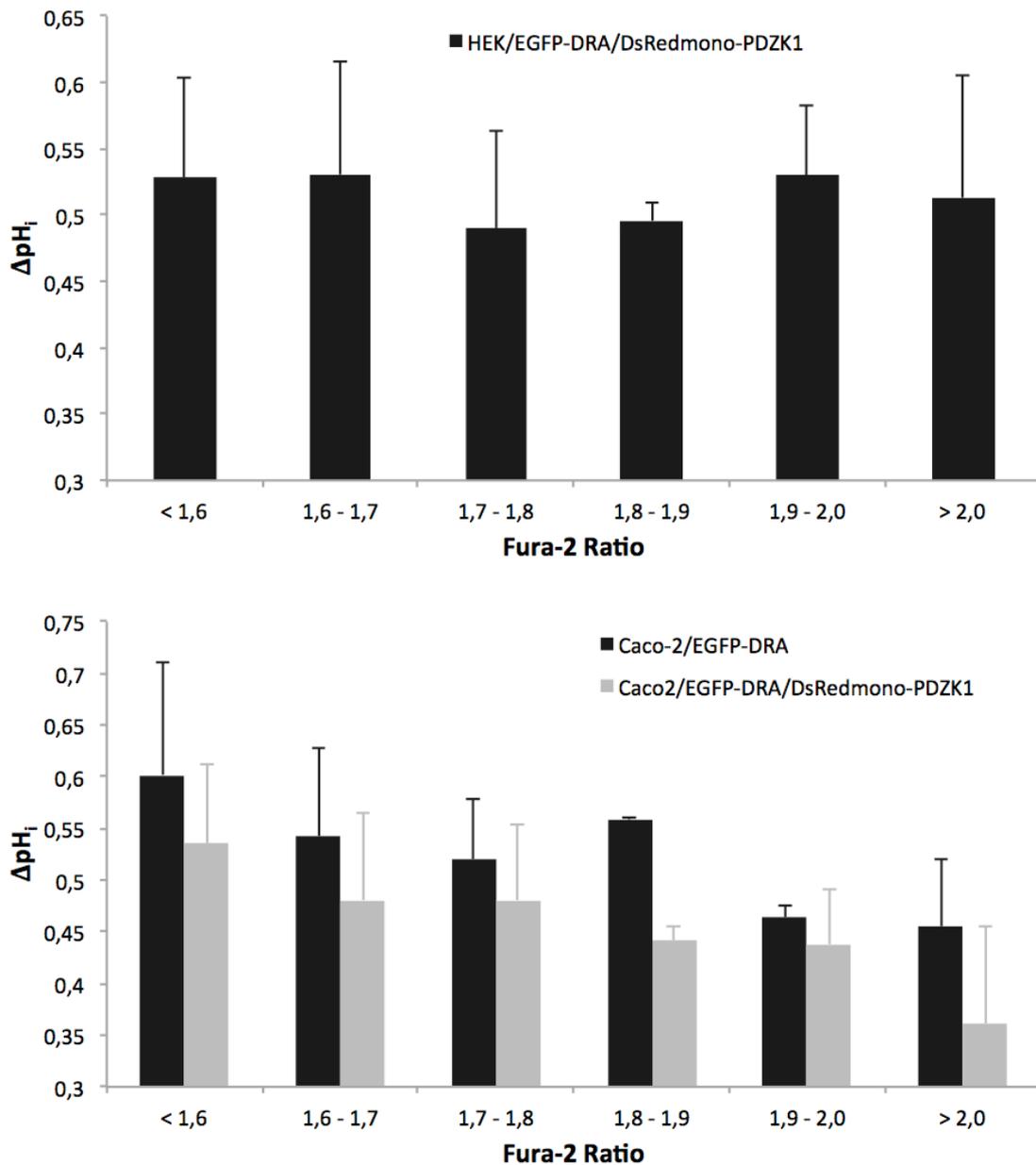


Abbildung 4.2 Die Hemmung von DRA ist abhängig von der Höhe der intrazellulären Calciumkonzentration

Dargestellt sind die Höhe der Alkalisierung der Zellen nach Entzug des extrazellulären Chlorids bezogen auf die unterschiedlichen Fura-2 Ratios kurz vor der Alkalisierung. Das obere Diagramm zeigt den Zusammenhang zwischen Calciumkonzentration und DRA Aktivität bei HEK Zellen, das untere Diagramm bei Caco-2 Zellen. Die Aktivität der Caco-2 Zellen wurde mittels Wilcoxon-Test verglichen. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den endogen PDZK1 exprimierenden und überexprimierenden Zellen.

Eine längerfristige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen mit 4Bromo-A23187 führt, wie in Abschnitt 3.9 gezeigt, zur Verminderung der DRA Oberflächenexpression in Caco-2 Zellen mit endogener PDZK1 Expression nach zehn Minuten. Nach 100 Sekunden ist dagegen keine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression feststellbar. Die Überexpression von PDZK1 bewirkt hingegen, dass DRA in der Oberfläche verbleibt. Somit kann man davon ausgehen, dass PDZK1 DRA in der Oberfläche hält. Ein Überschuss von PDZK1 bewirkt, dass es auch bei erhöhten Calciumkonzentrationen dort verbleibt.

Die Klärung, ob die verminderte Oberflächenexpression durch verminderten Einbau von DRA oder eine vermehrte Endozytose geschieht gelang leider nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Bei funktionellen Experimenten kam es, wie in Abschnitt 3.9 gezeigt zu nur geringfügig unterschiedlich ausgeprägten Hemmungen der DRA-Aktivität nach 100 Sekunden bzw. 10 Minuten Calciumerhöhung. Da für diese Zeitpunkte eine Reduktion von DRA in der Oberfläche um 44% gezeigt wurde, wären weit deutlichere Unterschiede in der Aktivität von DRA zu erwarten gewesen.

Dies könnte als indirekter Nachweis dienen, dass die Verminderung der Oberflächenkonzentration von DRA mittels Endozytose geschieht. In diesem Fall würden die bereits durch die kurzzeitige Calciumerhöhung gehemmten Transporter aus der Oberfläche entfernt. Die Menge an nicht gehemmtem DRA und damit die Aktivität von DRA blieben somit konstant.

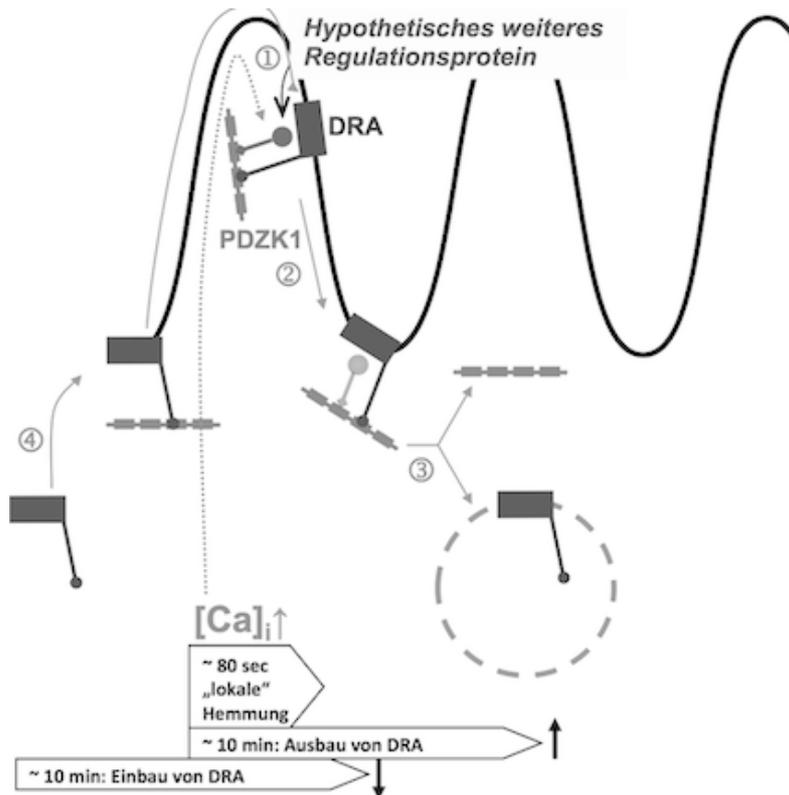


Abbildung 4.3 Hypothetisches Modell der Calciumvermittelten Regulation von DRA

Obwohl 100 Sekunden nach der Calcium Erhöhung noch keine DRA-Internalisierung stattfindet, findet bereits eine PDZK1 abhängige Inhibition von DRA statt. Das Calcium-Signal wird daher wahrscheinlich durch ein oder mehrere andere Proteine in einem Multiproteinkomplex, der auch PDZK1 enthält, in der Plasmamembran an DRA übertragen. Dabei könnte es sich um ein bisher unbekanntes Protein handeln, das an eine der PDZ-Domänen von PDZK1 bindet, oder um E3KARP, für das eine direkte Calcium-Inhibition von NHE3 gezeigt ist

Zusammenfassend ergibt sich aus der Betrachtung der Ergebnisse der kurzfristigen und längerfristigen Erhöhung der Calciumkonzentration das in Abbildung 4.3 dargestellte Modell. Hiernach handelt es sich bei der calciumvermittelten Inhibition von DRA um einen Zweischritt-Prozess. Bereits nach 80 sekundiger Calciumerhöhung erfolgt die „lokale“ funktionelle Hemmung, welche durch PDZK1 und vermutlich ein weiteres PDZ Adapterprotein vermittelt wird. DRA verbleibt hierbei in der Oberfläche. Bei andauernder Erhöhung der Calciumkonzentration folgt die Verminderung der Oberflächenexpression von DRA. Dies könnte entweder durch verminderten Einbau von DRA in die Oberfläche oder durch vermehrte Endozytose geschehen. An beiden möglichen Mechanismen scheint in jedem Fall PDZK1 jeweils beteiligt (s. Abbildung 3.16).

Eine Hemmung über zwei Schritte war bislang für DRA noch nicht diskutiert worden. Für NHE3 konnte ein solcher Mechanismus bereits nachgewiesen werden Hu et al. [33].

5 Zusammenfassung

Die Resorption von NaCl im Darm erfolgt elektroneutral durch die die beiden Antiporter NHE3 (Na^+/H^+) und DRA ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). Eine Mutation von DRA führt zur autosomal-rezessiv vererbten kongenitalen Chloriddiarrhoe. DRA wird nicht nur im Darm, sondern auch in zahlreichen weiteren Organen exprimiert. Teilweise fungiert es hier als Partner von CFTR. Bislang ist neben der indirekten Regulation von DRA durch Regulation seiner Partnertransporter ausschließlich die Calciumvermittelte Regulation als direkter Regulationsmechanismus von DRA bekannt. Ziel dieser Arbeit war es diesen Regulationsmechanismus näher zu charakterisieren und die Rolle des hierbei beteiligten PDZ-Adapterproteins PDZK1 zu klären.

In bereits vorhandenen, stabil transfizierten HEK und Caco-2 Zelllinien wurde fluoreszenzspektroskopisch die intrazelluläre Calciumkonzentration und der pH Wert gemessen. Die HEK Zellen, welche keine endogene Expression der beteiligten Proteine besitzen waren mit EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 transfiziert. Die Caco-2 Zellen, welche bereits eine endogene Expression besitzen waren entweder nur mit EGFP-DRA oder mit EGFP-DRA/DsRedmono-PDZK1 transfiziert. Letztere besaßen somit eine Überexpression von PDZK1. Fura-2/AM und BECF/AM wurden als Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Zur Steuerung des Messgerätes wurde hierzu eine eigens programmierte Software verwendet. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde mittels BAPTA/AM und 4-Bromo A23187 moduliert. Mittels Oberflächenbiotinylierung wurde die Oberflächenexpression von DRA bestimmt.

Es zeigte sich, dass die parallele Messung mit den oben genannten Farbstoffen einige Einschränkungen mit sich bringt. Die sichere Bestimmung der Calciumkonzentration aus den gewonnenen Fura-2 Ratios gelang nicht, weshalb, wie in der Literatur ebenfalls üblich, nur die Fura-2 Ratio angegeben wurde. Die Calciumabhängigkeit der DRA-Aktivität konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden. In den Caco-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von DRA

durch Calcium dynamisch ist. PDZK1 könnte hierbei als Sensitizer wirken. Klonale Einflüsse sind jedoch nicht sicher auszuschließen. Eine anhaltende Erhöhung der Calciumkonzentration bewirkt in den Caco-2 Zellen mit endogener PDZK1 Expression eine verminderte Oberflächenexpression. Dies spricht für einen Zweischnitt-Mechanismus mit zunächst lokaler Hemmung und später Verminderung der Oberflächenexpression. Bei Überexpression von PDZK1 verbleibt die Oberflächenkonzentration von DRA konstant. PDZK1 könnte somit DRA in der Membran halten. Die Verminderung der Oberflächenexpression von DRA bei endogener PDZK1-Expression würde folglich durch vermehrten Ausbau aus der Plasmamembran erfolgen.

6 Literatur

1. Klinke, P., Kurtz, Silbernagl, *Physiologie*. Vol. 6. Auflage. 2010.
2. Loo, D.D.F., E.M. Wright, and T. Zeuthen, *Water pumps*. The Journal of physiology, 2002. **542**(Pt 1): p. 53-60.
3. Vanden Broeck, D., C. Horvath, and M.J.S. De Wolf, *Vibrio cholerae: cholera toxin*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(10): p. 1771-5.
4. Cutting, W.A., *Mechanisms of diarrhoea and why they matter*. Dialogue Diarrhoea, 1988(35): p. 4-5.
5. Nellans, H.N., R.A. Frizzell, and S.G. Schultz, *Coupled sodium-chloride influx across the brush border of rabbit ileum*. The American journal of physiology, 1973. **225**(2): p. 467-75.
6. Knickelbein, R., et al., *Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange*. The American journal of physiology, 1983. **245**(4): p. G504-10.
7. Knickelbein, R., et al., *Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling*. The American journal of physiology, 1985. **249**(2 Pt 1): p. G236-45.
8. Bookstein, C., et al., *Tissue distribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney*. The American journal of physiology, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1496-505.
9. Hoogerwerf, W.A., et al., *NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins*. The American journal of physiology, 1996. **270**(1 Pt 1): p. G29-41.
10. Schultheis, P.J., et al., *Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 282-5.
11. Alper, S.L., et al., *Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine*. The American journal of physiology, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G321-32.
12. Schweinfest, C.W., et al., *Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(9): p. 4166-70.
13. Byeon, M.K., et al., *The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein*. Oncogene, 1996. **12**(2): p. 387-96.
14. Jacob, P., et al., *Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 709-24.
15. Haila, S., et al., *The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(4): p. 279-86.
16. Perry, S.F., et al., *Evidence that SLC26 anion transporters mediate branchial chloride uptake in adult zebrafish (Danio rerio)*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **297**(4): p. R988-97.
17. Greeley, T., et al., *Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2001. **281**(5): p. G1301-8.
18. Hihnala, S., et al., *Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(2): p. 107-11.

19. Wheat, V.J., et al., *CFTR induces the expression of DRA along with Cl(-)/HCO₃(-)
exchange activity in tracheal epithelial cells*. American journal of physiology. Cell
physiology, 2000. **279**(1): p. C62-71.
20. Darrow, D., *Congenital alkalosis with diarrhoea*. The Journal of pediatrics, 1945. **26**:
p. 519-532.
21. Gamble, J., et al., *Congenital alkalosis with diarrhoea* The Journal of pediatrics,
1945. **26**: p. 509-518.
22. Höglund, P., et al., *Genetic background of congenital chloride diarrhea in high-
incidence populations: Finland, Poland, and Saudi Arabia and Kuwait*. Am J Hum
Genet, 1998. **63**(3): p. 760-8.
23. Holmberg, C., J. Perheentupa, and K. Launiala, *Colonic electrolyte transport in health
and in congenital chloride diarrhea*. The Journal of clinical investigation, 1975.
56(2): p. 302-10.
24. Holmberg, C., J. Perheentupa, and A. Pasternack, *The renal lesion in congenital
chloride diarrhea*. The Journal of pediatrics, 1977. **91**(5): p. 738-43.
25. Schweinfest, C.W., et al., *slc26a3 (dra)-deficient mice display chloride-losing
diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion
transporters in the colon*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(49): p.
37962-71.
26. Doyle, D.A., et al., *Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane
protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ*. Cell, 1996.
85(7): p. 1067-76.
27. Lau, A.G. and R.A. Hall, *Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains:
differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by
phosphorylation*. Biochemistry, 2001. **40**(29): p. 8572-80.
28. Li, J., et al., *Ezrin controls the macromolecular complexes formed between an adapter
protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor and the cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(45): p.
37634-43.
29. Peterson, F.C., et al., *Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric
CRIB-PDZ transition*. Molecular cell, 2004. **13**(5): p. 665-76.
30. Lamprecht, G., et al., *The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to
the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP),
potentially linking intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange to Na⁺/H⁺ exchange*.
Biochemistry, 2002. **41**(41): p. 12336-42.
31. Harris, B.Z. and W.A. Lim, *Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex
assembly*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 18): p. 3219-31.
32. Hillier, B.J., et al., *Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure
of nNOS-syntrophin complex*. Science, 1999. **284**(5415): p. 812-5.
33. Yun, C.H., et al., *NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush
border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin*. The Journal of
biological chemistry, 1998. **273**(40): p. 25856-63.
34. Weinman, E.J., et al., *Characterization of a protein cofactor that mediates protein
kinase A regulation of the renal brush border membrane Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger*. The
Journal of clinical investigation, 1995. **95**(5): p. 2143-9.
35. Claperon, A., M. Mergey, and L. Fouassier, *Roles of the scaffolding proteins NHERF in
liver biology*. Clinics and research in hepatology and gastroenterology, 2011. **35**(3):
p. 176-81.
36. Cunningham, R., et al., *Role of NHERF and scaffolding proteins in proximal tubule
transport*. Urological research, 2010. **38**(4): p. 257-62.

37. Bellizzi, A., et al., *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 expression levels in blood and tissue predict breast tumour clinical behaviour*. *Histopathology*, 2011. **58**(7): p. 1086-95.
38. Georgescu, M.M., et al., *Roles of NHERF1/EBP50 in cancer*. *Current molecular medicine*, 2008. **8**(6): p. 459-68.
39. Lamprecht, G. and U. Seidler, *The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2006. **291**(5): p. G766-77.
40. Seidler, U., et al., *The role of the NHERF family of PDZ scaffolding proteins in the regulation of salt and water transport*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1165**: p. 249-60.
41. Donowitz, M., et al., *NHERF family and NHE3 regulation*. *The Journal of physiology*, 2005. **567**(Pt 1): p. 3-11.
42. Seidler, U., et al., *Knockout mouse models for intestinal electrolyte transporters and regulatory PDZ adaptors: new insights into cystic fibrosis, secretory diarrhoea and fructose-induced hypertension*. *Experimental physiology*, 2009. **94**(2): p. 175-9.
43. Kocher, O., et al., *Identification and partial characterization of PDZK1: a novel protein containing PDZ interaction domains*. *Lab Invest*, 1998. **78**(1): p. 117-25.
44. Wang, S., et al., *Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity*. *Cell*, 2000. **103**(1): p. 169-79.
45. Lissner, S., et al., *Activity and PI3-kinase dependent trafficking of the intestinal anion exchanger downregulated in adenoma depend on its PDZ interaction and on lipid rafts*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2010. **299**(4): p. G907-20.
46. Nakamura, T., et al., *Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(38): p. 13404-9.
47. Lamprecht, G., et al., *Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium*. *The Journal of biological chemistry*, 2009. **284**(29): p. 19744-53.
48. Zachos, N.C., et al., *NHERF3 (PDZK1) contributes to basal and calcium inhibition of NHE3 activity in Caco-2BBE cells*. *The Journal of biological chemistry*, 2009. **284**(35): p. 23708-18.
49. Cinar, A., et al., *NHE3 inhibition by cAMP and Ca²⁺ is abolished in PDZ-domain protein PDZK1-deficient murine enterocytes*. *The Journal of physiology*, 2007. **581**(Pt 3): p. 1235-46.
50. Choi, J.H., J.W. Murray, and A.W. Wolkoff, *PDZK1 binding and serine phosphorylation regulate subcellular trafficking of organic anion transport protein 1a1*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2011. **300**(3): p. G384-93.
51. Emi, Y., et al., *ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein*. *J Biochem*, 2011. **149**(2): p. 177-89.
52. Field, M., *Regulation of active ion transport in the small intestine*. *Ciba Foundation symposium*, 1976(42): p. 109-27.
53. Brasitus, T.A., M. Field, and D.V. Kimberg, *Intestinal mucosal cyclic GMP: regulation and relation to ion transport*. *The American journal of physiology*, 1976. **231**(1): p. 275-82.
54. Donowitz, M., *Ca²⁺ in the control of active intestinal Na and Cl transport: involvement in neurohumoral action*. *The American journal of physiology*, 1983. **245**(2): p. G165-77.

55. Zimmerman, T.W., J.W. Dobbins, and H.J. Binder, *Role of calcium in the regulation of colonic secretion in the rat*. The American journal of physiology, 1983. **244**(5): p. G552-60.
56. Ganguly, N.K., et al., *Intestinal brush border calmodulin: key role in the regulation of NaCl transport in Giardia lamblia infected mice*. Biochemistry international, 1987. **14**(2): p. 249-56.
57. Donowitz, M. and X. Li, *Regulatory binding partners and complexes of NHE3*. Physiological reviews, 2007. **87**(3): p. 825-72.
58. Clayburgh, D.R., et al., *Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo*. The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(10): p. 2682-94.
59. Lamprecht, G., et al., *Regulation of the intestinal anion exchanger DRA (downregulated in adenoma)*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1165**: p. 261-6.
60. Rink, T.J., R.Y. Tsien, and T. Pozzan, *Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes*. The Journal of cell biology, 1982. **95**(1): p. 189-96.
61. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. The Journal of biological chemistry, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
62. Tsien, R.Y., T. Pozzan, and T.J. Rink, *Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator*. The Journal of cell biology, 1982. **94**(2): p. 325-34.
63. Lattanzio, F.A., Jr. and D.K. Bartschat, *The effect of pH on rate constants, ion selectivity and thermodynamic properties of fluorescent calcium and magnesium indicators*. Biochemical and biophysical research communications, 1991. **177**(1): p. 184-91.
64. Zavoico, G.B., E.J. Cragoe, Jr., and M.B. Feinstein, *Regulation of intracellular pH in human platelets. Effects of thrombin, A23187, and ionomycin and evidence for activation of Na⁺/H⁺ exchange and its inhibition by amiloride analogs*. The Journal of biological chemistry, 1986. **261**(28): p. 13160-7.
65. Lamprecht, G., et al., *Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(29): p. 19744-53.
66. Henke, W., et al., *Non-hyperbolic calcium calibration curve of Fura-2: implications for the reliability of quantitative Ca²⁺ measurements*. Cell Calcium, 1996. **20**(3): p. 287-92.
67. *A new calibration equation for ratiometric fluorescent ion indicators: Application to fura-2*. 1993(3): p. 169-171.
68. Lattanzio, F., Jr., *The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with Chelex-100 and EDTA buffer systems*. Biochemical and biophysical research communications, 1990. **171**(1): p. 102-8.
69. Roe, M.W., J.J. Lemasters, and B. Herman, *Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium*. Cell Calcium, 1990. **11**(2-3): p. 63-73.
70. Uto, A., H. Arai, and Y. Ogawa, *Reassessment of Fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca²⁺ concentrations*. Cell Calcium, 1991. **12**(1): p. 29-37.
71. Deber, C.M., et al., *Bromo-A23187: a nonfluorescent calcium ionophore for use with fluorescent probes*. Analytical biochemistry, 1985. **146**(2): p. 349-52.
72. Erdahl, W.L., et al., *Ca²⁺ transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system*. Biophys J, 1994. **66**(5): p. 1678-93.
73. BrNeuroSci. Available from: <http://brneurosci.org/cgi-bin/egta>.

74. Portzehl, H., P.C. Caldwell, and J.C. Rueegg, *The Dependence of Contraction and Relaxation of Muscle Fibres from the Crab Maia Squinado on the Internal Concentration of Free Calcium Ions*. *Biochimica et biophysica acta*, 1964. **79**: p. 581-91.
75. Tsien, R.Y., *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures*. *Biochemistry*, 1980. **19**(11): p. 2396-404.
76. Elmer, P.
http://las.perkinelmer.de/content/RelatedMaterials/brochures/BRO_LS-55andLS-45FluorescenceSpectrophotometer.pdf. LS 55 Fluorescence Spectrometer Brochure.
77. Probes, M., *Calcium Calibration Buffer Kits*. Product Information, 2001.
78. Parekh, A.B. and R. Penner, *Store depletion and calcium influx*. *Physiological reviews*, 1997. **77**(4): p. 901-30.
79. Lamprecht, G., et al., *Chloride and bicarbonate have similar affinities to the intestinal anion exchanger DRA (down regulated in adenoma)*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2006. **452**(3): p. 307-15.
80. Prunoiu, C., et al., *Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C - the benefit of the antiviral treatment*. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 2008. **49**(4): p. 557-62.
81. Geavlete, B., et al., *Hexvix blue light fluorescence cystoscopy--a promising approach in diagnosis of superficial bladder tumors*. *Journal of medicine and life*, 2008. **1**(3): p. 355-62.
82. Burnei, G., et al., *Osteoarticular reconstructive surgery in malignant bone tumors: the importance of external fixators*. *Journal of medicine and life*, 2008. **1**(3): p. 295-306.
83. Georgescu, E.F., et al., *Peutz-Jeghers syndrome: case report and literature review*. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 2008. **49**(2): p. 241-5.
84. Horn, *Biochemie des Menschen*. Vol. 4. 2009: Thieme.
85. Lee-Kwon, W., et al., *Ca²⁺-dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexes*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2003. **285**(6): p. C1527-36.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Frau Lilia Nold (MTA) hat einen Großteil der routinemäßig durchgeführten Zellkulturarbeiten durchgeführt. Die verwendeten Clone wurden bereits im Vorfeld der Arbeit von weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe transfiziert. Frau Dr. Simone Lissner hat die Oberflächenexpression von DRA in Caco-2/EGFP-DRA Zellen untersucht. Herr Professor Lamprecht war an der Konzeption der Arbeit maßgeblich beteiligt, er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

8 Danksagung

Ich möchte als erstes Herrn Professor Lamprecht sowie seiner leider nicht mehr bestehenden Arbeitsgruppe für die tolle Betreuung und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten danken. Ich wünsche ihm weiterhin viel Erfolg und Freude in Rostock.

Besonderer Dank gebührt meiner Frau Victoria, die mich immer wieder aufs neue motiviert und unterstützt hat. Außerdem bedanke ich mich bei meiner weiteren Familie und Freunden für den Rückhalt und die Geduld.