

Molekulare Mechanismen der Säuresekretion des Magens:

Lokalisation, *Trafficking* und die physiologische Rolle der K⁺-Kanäle Kir4.1 und KCNQ1 während der stimulierten Säuresekretion der Parietalzellen der Magenmukosa der Ratte bzw. des Kaninchens.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Marc-André Kaufhold, M.A.
geboren am 03.01.1976 in Lingen (Ems)

2005

Referent:

Prof. Dr. Walter Müller
Abteilung Physiologische Chemie
Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. Winfried Beil
Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule
Hannover

Tag der Promotion:

03. Juni 2005

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ursula Seidler im Zeitraum vom 01.12.2002 bis 24.03.2005 angefertigt.

Zusammenfassung

Die Säuresekretion der gastrischen Parietalzelle (PZ) benötigt K^+ -Ionen in der luminalen Lösung zum Austausch von extrazellulären K^+ -Ionen gegen intrazelluläre H^+ -Ionen. Die K^+ -Sekretion, die notwendig zur Aufrechterhaltung einer hohen extrazellulären K^+ -Ionen-Konzentration an der luminalen Membran der PZ ist, scheint durch K^+ -Kanäle vermittelt zu werden. In der Fachliteratur werden verschiedene K^+ -Kanäle diskutiert, die in den Prozeß der K^+ -Rezyklierung über der apikalen Membran involviert sind. In dieser Arbeit werden zwei dieser K^+ -Kanäle untersucht: Kir4.1 und KCNQ1. Das Ziel der Arbeit war, die Lokalisation, das *Trafficking* und die physiologische Rolle der K^+ -Kanäle Kir4.1 und KCNQ1 während der stimulierten Säuresekretion der PZ der Magenmukosa der Ratte bzw. des Kaninchens zu analysieren.

Dieses Thema wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Zunächst wurden gastrische Membranen der Zellen der Magenmukosa fraktioniert und mittels Westernblotting und leitenzymatischen-Tests analysiert. Zusätzlich wurden Kryoschnitte des Magens sowie isolierte, kultivierte und fixierte PZ mit Konfokaler LASER-Scan-Mikroskopie (Leica TCS SP2 AOBS) untersucht. Darüber hinaus wurden kultivierte PZ mit Kir4.1-DNS-Konstrukten transfiziert und analysiert. Abschließend wurden [^{14}C]Aminopyrin-Aufnahmen und γ -[^{32}P]ATP-Phosphorylierungen mit K^+ -Kanal- und Proteinkinase-Inhibitoren durchgeführt.

Kir4.1 und KCNQ1 wurden auf hochangereicherten H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden Tubulocisternae (TC) und stimulus-assoziierten Membranen (SA) lokalisiert. Immunpräzipitations-Studien zeigten, dass es unterschiedliche H^+/K^+ -ATPase-enthaltende Membran-Kompartimente gibt. Weder Kir4.1 konnte mit Anti-KCNQ1- noch KCNQ1 konnte mit Anti-Kir4.1-Antikörpern kopräzipitiert bzw. angereichert werden. In Kryoschnitten und fixierten PZ zeigten Kir4.1, KCNQ1 und die H^+/K^+ -ATPase eine diffuse Verteilung. Nach Histamin-Stimulierung translozierten Kir4.1 und die H^+/K^+ -ATPase nahezu vollständig in die apikale Membran, wohingegen ein *Trafficking* von KCNQ1 in die apikale Membran nur teilweise beobachtet wurde. Das *Trafficking* von Kir4.1 nach Histamin (100 μ M)- und/oder Carbachol (100 μ M)-Stimulierung der Säuresekretion konnte mit EGFP-Kir4.1 auch in lebenden PZ beobachtet werden.

[^{14}C]Aminopyrin-Aufnahmen zur Abschätzung der Säuresekretion und weitergehende γ -[^{32}P]ATP-Phosphorylierungs-Studien verdeutlichten, dass sowohl Kir4.1 als auch KCNQ1 bei der Säuresekretion eine wesentliche Rolle spielen. Ein 43 kDa-Phosphoprotein (pp43), das vermutlich Kir4.1 ist, wurde durch Proteinkinasen der Signaltransduktionskette der M_3 -Rezeptor-vermittelten-Säuresekretion, CaMKII und PKC- α , phosphoryliert und reguliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass Kir4.1 und KCNQ1 beide eine wesentliche Rolle bei der K^+ -Rezyklierung während der Säuresekretion der PZ spielen. Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte hier eine neue Theorie hinsichtlich der K^+ -Rezyklierung während der Säuresekretion der PZ entwickelt werden: Die Stimulierung der Säuresekretion bewirkt eine Hyperpolarisation der PZ. Während der Hyperpolarisation ist Kir4.1 aktiv. Die Stimulierung der Säuresekretion führt zu einer Aktivierung von apikalen Cl^- -Kanälen. Diese Aktivierung von Cl^- -Kanälen wird durch Hyperpolarisation der PZ noch verstärkt und würde zur Depolarisation der PZ und zur Inaktivierung von Kir4.1 führen. Die Aktivierung des KCNQ1 verhindert die Depolarisation der PZ und bewirkt, dass die K^+ -Rezyklierung während der Säuresekretion der PZ unabhängig des Membranpotentials der PZ aufrechterhalten werden kann.

Schlagwörter: Säuresekretion, Kir4.1, KCNQ1

Abstract

Acid secretion of the gastric parietal cell requires K^+ in the luminal solution for exchange of extracellular K^+ against intracellular H^+ . The K^+ -secretion which is necessary to produce sufficiently high extracellular K^+ concentration at the parietal cell apical membrane during stimulation of acid secretion is believed to occur via K^+ channels expressed by the parietal cell. Members of several different K^+ channel families have been suggested to serve as these K^+ -channels that carry this highly relevant function. Here we focus on Kir4.1 and KCNQ1. Aim of this study was to analyze the “localization, trafficking and functional significance of Kir4.1 and KCNQ1 K^+ channels during stimulation of acid secretion in rat or rabbit gastric parietal cells”.

This was examined by different methods. Highly purified rat and rabbit gastric mucosal cell membrane fractions from either resting or stimulated stomachs were subjected to Western blot analysis and enzyme assays. In addition, cryosections or isolated and cultured gastric parietal cells were studied by confocal microscopy (Leica TCS SP2 AOBS) for the localization of Kir4.1 and KCNQ1 using specific antibodies. Furthermore, cultured parietal cells were transfected with an EGFP-Kir4.1 construct and redistribution of Kir4.1 after stimulation was analyzed by time-lapse confocal imaging in living gastric parietal cells. Also, [^{14}C]aminopyrine-uptakes and γ -[^{32}P]ATP-phosphorylations were performed with different K^+ -channel or protein kinase inhibitors.

In isolated membrane fractions, Kir4.1 and KCNQ1 were highly enriched in rat and rabbit tubulocisternae (TC) as well as in stimulus-associated membranes (SA). Immunoprecipitation studies revealed that there are at least two different H^+/K^+ -ATPase containing membrane compartments exist. Neither Kir4.1 was coprecipitated with anti-KCNQ1- nor KCNQ1 with anti-Kir4.1-antibodies. In rat cryosections and isolated rat parietal cells, Kir4.1, KCNQ1 and H^+/K^+ -ATPase showed a diffuse staining pattern during resting state. After histamine and IBMX-stimulation Kir4.1 translocated along with the H^+/K^+ -ATPase to the secretory membrane of rat gastric parietal cells whereas the distribution of KCNQ1 still remained diffuse. KCNQ1 only partially redistributed to the secretory membrane, whereas Kir4.1 even completely. This trafficking of Kir4.1 was also demonstrated with EGFP-Kir4.1 under different conditions in living gastric parietal cells.

[^{14}C]aminopyrine-uptakes and γ -[^{32}P]ATP-phosphorylations showed that both Kir4.1 and KCNQ1 are involved in gastric acid secretion. A 43 kDa phosphoprotein (pp43) was detected in TC and SA with characteristics of Kir4.1. Kir4.1-(pp43) seems to be phosphorylated and regulated by protein kinases of the muscarinic M_3 -receptor-induced acid secretion, namely CaMKII and PKC- α .

The results presented in this thesis provide strong support for the conclusion that Kir4.1 as well as KCNQ1 are both involved in K^+ -recycling over the luminal membrane of gastric parietal cells. A new model of K^+ -recycling was developed on the basis of this thesis: After stimulation of gastric acid secretion Kir4.1 is active during hyperpolarization of the parietal cell. Stimulation of gastric acid secretion leads to an activation of apical Cl^- -channels. Cl^- -efflux would result in a depolarization of the parietal cell and in an inhibition of Kir4.1. In contrast to this, KCNQ1 is still active and prevents depolarisation. As a consequence the K^+ -recycling over the luminal membrane during stimulation of acid secretion is independent on the membrane potential of the gastric parietal cell.

Schlagwörter: acid secretion, Kir4.1, KCNQ1

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.	1
1.1 Die Rolle der Kalium-Kanäle bei der Säuresekretion der Parietalzellen der Magenmukosa.	1
1.1.1 Der einwärtsgerichtete K^+ -Kanal („ <i>inwardly rectifier K⁺-channel</i> “) Kir4.1.	6
1.1.2 Spannungsabhängige K^+ -Kanäle („ <i>voltage-gated K⁺-channel</i> “) KCNQ1.	8
1.2 Pharmakologie und Signaltransduktion der Säuresekretion der Parietalzellen.	11
1.3 <i>Trafficking</i> der H^+/K^+ -ATPase nach Stimulierung der Säuresekretion in die sekretorische apikale Membran der Parietalzellen.	14
1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.	17
2. Material	20
1.1 Geräte.	20
1.2 Verbrauchsmaterial.	21
1.3 Chemikalien.	21
1.3.1 Radiochemikalien.	21
1.3.2 Flüssigchemikalien.	21
1.3.3 Spezial-Chemikalien.	22
1.4 Antikörper.	23
1.4.1 Primäre Antikörper.	23
1.4.2 Sekundäre Antikörper.	23
1.5 „ <i>Beads</i> “.	23
1.6 Pharmakologisch-wirksame Agenzien.	24
1.7 Versuchstiere.	24
1.8 Zell-Linie.	24
1.9 Expressions-Plasmid.	25
1.10 Software.	25
2. Methoden.	26
2.1 Zellbiochemische Methoden.	26
2.1.1 Gewebe- und Membran-Präparation der Parietalzellen der Magenmukosa.	26
2.1.1.1 Puffer und Lösungen zur Membran-Fraktionierung.	28
2.1.1.2 Präparation von apikalen und basolateralen Membranen sowie der Tubulocisternae der Zellen der Magenmukosa der Ratte.	29
2.1.1.3 Präparation von basolateralen Membranen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens	31
2.1.1.4 Präparation von apikalen Membranen und Tubulocisternae der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens.	32
2.1.2 Leitenzymatische Messungen	32
2.1.2.1 Messung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität nach Lamprecht et al. (1993).	32
2.1.2.2 Messung der g-Strophanthin-insensitiven- K^+ -abhängigen Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (K^+ -pNPPase) modifiziert für Mikrotiterplatten.	34
2.1.2.3 Bestimmung des Anreicherungsfaktors.	35
2.1.3 Immunpräzipitation von angereicherten Membranen.	35
2.1.3.1 Immunpräzipitation von H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden Tubulocisternae nach Crothers et al. (1993), Peng et al. (1997), Calhoun et al. (1998) und Fährmann et al. (2002).	36
2.1.3.2 Immunpräzipitation von H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden stimulus-assoziierten Membranen.	37
2.1.3.3 Immunpräzipitation von Kir4.1-enthaltenden Tubulocisternae und stimulus-assoziierten Membranen.	37

2.1.3.4	Immunpräzipitation von KCNQ1-enhaltenden Tubulocisternae und stimulus-assoziierten Membranen.	38
2.1.3.5	Immunpräzipitation von Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-enhaltenden basolateralen Membranen.	38
2.1.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	38
2.1.4.1	Verwendete Lösungen.....	38
2.1.4.2	Proteinbestimmung.	39
2.1.4.3	Denaturierende Proteinfällung modifiziert nach Wessel und Flügge (1984).	40
2.1.4.4	Durchführung der SDS-PAGE.	40
2.1.4.5	Anfärbung Proteine im SDS-Gel durch Coomassie Brilliant Blau.	40
2.1.5	Proteinnachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper.....	40
2.1.6	Phosphorylierungs-Studien mit γ-[³²P]-ATP.	41
2.2	Molekularbiologische Methoden.	43
2.2.1.1	Verwendete Lösungen.....	43
2.2.1.2	Konstruktion der verschiedenen Plasmide.	43
2.2.1.3	Transformation von kompetenten E.coli.	44
2.2.1.4	Kleine Plasmid-Präparation (Minipräparation).	44
2.2.1.5	Agarose-Gel-Elektrophorese.	45
2.2.1.6	Große Plasmid-Präparation (Maxipräparation).	45
2.3	Immunhistochemie.....	46
2.3.1.1	Verwendete Lösungen.....	46
2.3.1.2	Durchführung.	46
2.4	Zellbiologische Methoden.....	47
2.4.1	Primäre Zellkultur der Parietalzellen der Ratte.....	47
2.4.1.1	Verwendete Lösungen.....	48
2.4.1.2	Isolierung von gastrischen Parietalzellen des Rattenmagens.	49
2.4.1.3	Primäre Zellkultur gastrischer Parietalzellen des Rattenmagens.	50
2.4.1.4	Trypan-Blau Färbung.	50
2.4.1.5	NBT-Test.	50
2.4.1.6	Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels [¹⁴ C]Aminopyrin-Aufnahme.....	51
2.4.1.7	Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels Acridin Orange-Messungen.	51
2.4.1.8	Immunfluoreszenz-Analysen.	52
2.4.1.9	Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.	52
2.4.2	Primäre Zellkultur der Parietalzellen der Maus.	52
2.4.2.1	Isolierung von gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa der Maus.....	52
2.4.2.2	Immunfluoreszenz-Analysen an kultivierten und fixierten Parietalzellen aus der Magenmukosa der Maus.	53
2.4.3	Primäre Zellkultur der Parietalzellen des Kaninchens.	53
2.4.3.1	Isolierung von gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens.....	53
2.4.3.2	Transfektion von Kir4.1-cDNA-Konstrukten in kultivierte Parietalzellen.	53
2.4.3.3	Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels [¹⁴ C]Aminopyrin-Aufnahme.....	54
2.4.3.4	Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.	54
2.4.3.5	Präparation von Gesamt-Zell-Lysaten aus Parietalzellen des Kaninchens.....	54
2.4.4	Gastrisch-mukosomale Adenomakarzinom-Zell-Linie (AGS)	55
2.4.4.1	Verwendete Lösungen.....	55
2.4.4.2	Zellkultur der AGS-Zell-Linie.	55
2.4.4.3	Aussaat von Zellen für Zellkultur-Experimente.....	55
2.4.4.4	Transfektion von AGS-Zellen.....	56
2.4.4.5	Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.	56
2.4.4.6	Protein-Isolierung aus EGFP-Kir4.1-transient transfizierten AGS-Zellen.....	57
2.5	Mikroskopie.....	57
2.5.1	Fluoreszenz Mikroskopie.	57
2.5.2	Konfokale Mikroskopie.....	57
2.6	Auswertung der Daten und Statistik.....	58

3. Ergebnisse.	59
3.1 Unterschiede in der Lokalisation und Umverteilung von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens.	59
3.1.1 Membran-Fraktionierung der Zellen der Magenmukosa des Rattenmagens.	59
3.1.1.1 Differentielle-Pelletierungs- und Ficoll-Gradienten Zentrifugationen.	60
3.1.1.2 Lineare Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen und Immunpräzipitationen.	65
3.1.1.2.1 Anreicherung von Na ⁺ /K ⁺ -ATPase enthaltenden basolateralen Membranen.	65
3.1.1.2.2 Anreicherung der H ⁺ /K ⁺ -ATPase-enthaltenden zytoplasmatischen Tubulocisternae.	67
3.1.2 Membran-Fraktionierung der Zellen der Magenmukosa des Kaninchenmagens	70
3.1.3 Rekonstruktion des Traffickings von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase in hochangereicherten Membranen des Ratten und Kaninchenmagens.	74
3.1.4 Immunhistochemische-Studien zur Lokalisation und zum Trafficking von Kir4.1, KCNQ1 und H⁺/K⁺-ATPase an Kryoschnitten des Rattenmagens.	79
3.1.5 Immunfluoreszenz-Studien zur Lokalisation und zum Trafficking von Kir4.1 und KCNQ1 in isolierten und kultivierten Parietalzellen des Rattenmagens.	83
3.1.5.1 Parietalzellkulturen.	83
3.1.5.2 Trafficking von Kir4.1, KCNQ1 und H ⁺ /K ⁺ -ATPase nach Stimulierung in isolierten Parietalzellen des Rattenmagens.	85
3.1.6 Studien zur Lokalisation und zum Trafficking von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transient transfizierten Zellkulturen.	87
3.1.6.1 Lokalisation von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transfizierten AGS-Zellen.	87
3.1.6.2 Lokalisation und Trafficking von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transient transfizierten Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens.	89
3.1.6.3 Trafficking von EGFP-Kir4.1 durch Life-Zell-Imaging an transient transfizierten Parietalzellen des Kaninchenmagens.	92
3.2 Physiologische Studien zur Funktion von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der Parietalzellen.	95
3.2.1 Indirekte Messung der Säuresekretion mit der [¹⁴ C]Aminopyrin-Aufnahme oder Acridin Orange-Messungen an Parietalzellen der Ratte.....	95
3.2.2 γ-[³² P]ATP-Phosphorylierungs- und [¹⁴ C]AP-Aufnahme-Studien zeigten unspezifische Effekte von 293B im Rahmen der cholinerg-vermittelten Säuresekretion.....	99
3.2.3 Charakterisierung einer Ca ²⁺ -abhängigen γ-[³² P]ATP-Phosphorylierung eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43).	102
4. Diskussion	106
4.1 Lokalisation und Trafficking von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa.	106
4.1.1 Lokalisation und Trafficking von Kir4.1 in Parietalzellen des Magens.	108
4.1.2 Lokalisation und Trafficking von KCNQ1 in Parietalzellen des Magens.	110
4.2 Physiologische Relevanz von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der gastrischen PZ.	113
4.3 Theorie über das Zusammenspiel von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa.	124
5. Literatur.	129
Abbildungsverzeichnis.	138
Abkürzungsverzeichnis	140
Lebenslauf.	142
Verzeichnis der eigenen Publikationen.	143
Danksagung	145
Eidesstattliche Erklärung.	146

1. Einleitung.

1.1 Die Rolle der Kalium-Kanäle bei der Säuresekretion der Parietalzellen der Magenmukosa.

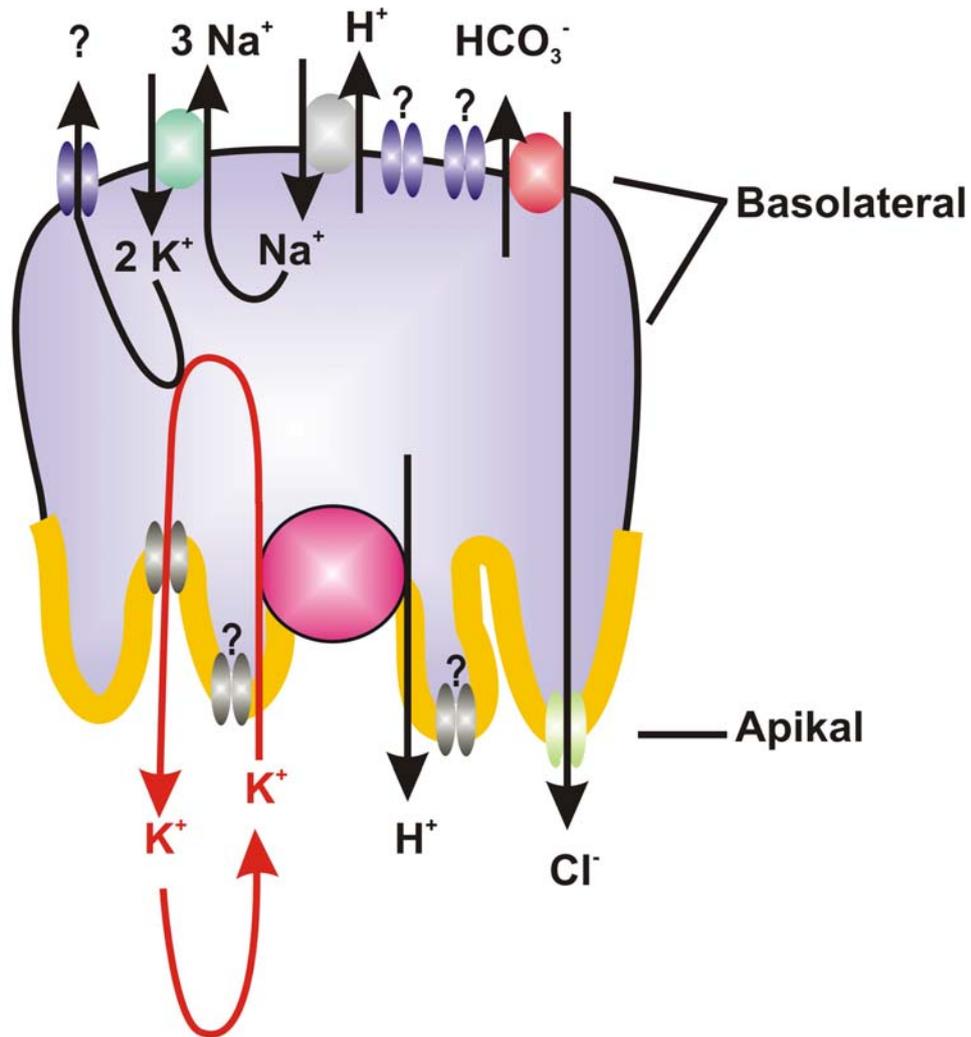
Die Magenschleimhaut des Magens produziert 1,5 bis 2 l des Magensafts täglich (Waldegger, 2003; Lambrecht et al., 2005). Dieser enthält hauptsächlich Wasser, H⁺, K⁺- und Cl⁻-Ionen. Ein vermehrter Anstieg von H⁺-Ionen im Lumen des Magens durch die Salzsäuresekretion der Parietalzellen (PZ; Belegzellen; *Oxyntic cells*) der Magenmukosa, wandelt das Milieu innerhalb des Magensaftes von einem neutralen zu einem sauren um. Diese PZ des Magens machen einen Anteil von 50 bis 60 % der Gesamtzellmasse der Magenschleimhaut aus (Hogben et al., 1974) und fallen besonders durch ihre Größe im Durchmesser von bis zu 25 µm und durch ihre „vorstehende“ Position innerhalb der Magendrüsen auf. Durch die Säuresekretion der PZ kann der pH-Wert im Magensaft auf bis zu pH 0,8 gesenkt (Urushidani und Forte, 1997) und die maximale H⁺-Konzentrierung auf bis zu 150-160 mmol l⁻¹ erhöht werden (Ueda et al., 1987; Forte, 1996). Bezogen auf den pH-Wert in den Magendrüsen (pH 1,0) entspricht dies einer ungefähren Anreicherung der H⁺-Ionen-Konzentration von 1:10⁶ im Vergleich zum normalen pH-Wert des Blutes (Waldegger, 2003). Der niedrige pH-Wert des Magensaftes ist erforderlich für die Desinfektion der Nahrung und für die Aktivierung des für die Verdauung notwendigen Enzyms Pepsin aus Pepsinogen.

Die Regulierung dieses wichtigen physiologischen Prozesses der Säuresekretion der PZ fasziniert seit langem verschiedene Wissenschaftler und gibt eine Vielzahl unerklärter Rätsel auf (Edkins, 1905; Komarov, 1938; Code, 1956; Forte et al., 1977; Brown und Chew, 1986; Marks et al., 1992; Agnew et al., 1999; Fähmann, 2000; Hirst, 2002; Aihara et al., 2003;

Forte, 2004). Gesichert ist, dass neben der H^+/K^+ -ATPase, als essentielle Protonenpumpe, auch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase, der HCO_3^-/Cl^- - und der H^+/Na^+ -Austauscher bei der Säuresekretion wesentliche Funktionen haben (Ueda et al., 1987; Abbildung 1).

Zusätzlich wurde schon früh postuliert, dass auch die Aktivierung bzw. Rekrutierung von apikalen Cl^- - sowie basolateralen und apikalen K^+ -Kanälen notwendig zur Säuresekretion ist (Forte und Lee, 1977; Forte et al., 1983; Wolosin und Forte, 1981, 1985; Forte und Yao, 1996; Agnew et al., 1999; Fährmann, 2000; Cuppoletti et al., 2002; Fujita et al., 2002; Hirst, 2002; Malinowska et al., 2004; Forte, 2004). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Lokalisation, mit dem *Trafficking* nach Stimulierung und mit der physiologischen Rolle von K^+ -Kanälen bei der Säuresekretion der PZ.

Die essentielle Funktion von K^+ -Kanälen bei der Säuresekretion der PZ konnte schon früh erkannt werden (Cooperstein, 1959; Davenport, 1962; Harris und Edelman, 1960; Berglinde, 1978; Forte et al., 1983; Wolosin und Forte, 1985; Reenstra et al., 1986; Sakai et al., 1989), da neben der hohen H^+ -Sekretion auch insbesondere die hohe K^+ -Sekretion mit 10 bis 25 mM der PZ auffiel (Ueda et al., 1987; Waldegger, 2003). Diese erhebliche K^+ -Sekretion der PZ ist notwendig zur Aufrechterhaltung einer hohen luminalen K^+ -Ionenkonzentration zur Unterstützung der Funktion der H^+/K^+ -ATPase (Forte, 2004). So zeigten Davis et al. (1965), dass eine Entfernung von extrazellulären K^+ -Ionen aus der luminalen Lösung eine Inhibierung der Säuresekretion bewirkte. Diese Inhibierung der Säuresekretion war reversibel und konnte durch Zugabe von K^+ -Ionen rückgängig gemacht werden (Davis et al., 1965).



	AE2		basolaterale K^+ -Kanäle
	Na^+/K^+ -ATPase		apikale K^+ -Kanäle
	H^+/Na^+ -Austauscher		Cl^- -Kanal (CIC-2 ?)
	H^+/K^+ -ATPase		K^+ -Rezyklierung
	SA		

Abbildung 1: Die Säuresekretion der Parietalzelle modifiziert nach Ueda et al. (1987) und Parsons und Keeling (2005). Im Mittelpunkt steht in diesem Schaubild die K^+ -Rezyklierung (rot) über die luminalen Membran zur Unterstützung der Funktion der H^+/K^+ -ATPase (pink). Weder basolaterale (blau) noch apikale K^+ -Kanäle (grau) sind bisher eindeutig identifiziert. Der wahrscheinlich apikale CIC-2 (Malinowska et al., 2004; grün) transportiert über die stimulus-assoziierte Membran (SA, gelb), im Zusammenspiel mit dem Anionen-Austauscher 2, AE2 (orange), Cl^- -Ionen in das Lumen des Magens. Ob CIC-2 wirklich der gesuchte Cl^- -Kanal ist, wurde von Hori et al. (2004) in Frage gestellt. Im Lumen des Magens bilden Cl^- -Ionen und H^+ -Ionen die Salzsäure des Magensaftes.

Weiterhin legten Ostrowski et al. (1991) dar, dass durch die Zugabe von extrazellulären K^+ -Ionen die Histamin-stimulierte Säuresekretion der PZ der Ratte über die maximale Histamin-Stimulierung hinaus gesteigert werden konnte. Dies zeigt die wichtige Bedeutung der extrazellulären K^+ -Ionen und K^+ -Kanäle bei der Säuresekretion der PZ (Ostrowski et al., 1991, 1993).

Die essentielle Bedeutung der Funktion der K^+ -Kanäle, die auch als indirektes Maß für die H^+/K^+ -Aktivität herangezogen werden können (Waldegger, 2003), ist äußerst interessant für die Forschung und würde neue Möglichkeiten der medikamentösen Therapie bei verschiedenen Erkrankungen des Magens eröffnen (Aihara et al., 2003; Waldegger, 2003; Parsons und Keeling, 2005). Aus diesem Grund stand schon früh die Identifizierung, Charakterisierung und Lokalisierung von K^+ -Kanäle im Zentrum verschiedener Arbeiten.

Demarest und Machen (1985), Ueda et al. (1987), Sakai et al. (1989) und Supplisson et al. (1991) fanden kinetische Eigenschaften für verschiedene K^+ -Kanäle in der basolateralen Membran. Eine eindeutige Identifizierung der K^+ -Kanäle gelang bisher jedoch noch nicht. Die K^+ -Leitfähigkeit der apikalen Membran stand ebenfalls im Zentrum diverser Untersuchungen von Demarest und Machen (1985), Wolosin und Forte (1984, 1985) und Reenstra und Forte (1990). Auch die apikalen K^+ -Kanäle sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert.

Schon früh wurde vermutet, dass die sowohl durch die H^+/K^+ -ATPase als auch durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgenommenen K^+ -Ionen zur Wiederherstellung der K^+ -Homöostase über K^+ -Kanäle der apikalen und basolateralen Membranen aus der PZ transportiert werden müssen (Cooperstein, 1959; Davenport, 1962; Wolosin und Forte, 1984, 1985; Reenstra et al., 1986; Ueda et al., 1987; Supplisson et al., 1991). In dieser Arbeit steht die wichtige K^+ -Rezyklierung über die apikale Membran im Zentrum des Interesses (Abbildung 1).

Zur Säuresekretion benötigt die PZ K^+ -Ionen in der luminalen Lösung für den Austausch von extrazellulären K^+ -Ionen gegen intrazelluläre H^+ -Ionen (Abbildung 1). *In vivo* besteht eine Möglichkeit zur K^+ -Rezyklierung und somit zur Aufrechterhaltung der hohen luminalen K^+ -Konzentration während der Säuresekretion durch K^+ -Sekretion der aufgenommenen K^+ -Ionen über die apikale Membran. Viele Studien deuten darauf hin, dass dieser Prozess durch spezielle K^+ -Kanäle vermittelt wird (Demarest und Machem, 1985; Wolosin und Forte, 1984, 1985; Im et al., 1985; Reenstra et al., 1986; Ueda et al., 1987; Reenstra und Forte, 1990, Forte, 2004; Abbildung 1). Die K^+ -Ionen, welche durch den Austausch für H^+ -Ionen in die PZ aufgenommen werden, könnten somit direkt wieder über apikale K^+ -Kanäle in das Lumen des Magens zurücktransportiert werden und dadurch die Aktivität und elektroneutrale Funktion der H^+/K^+ -ATPase unterstützen (Hirst, 2002; Forte, 2004; Parsons und Keeling, 2005; Abbildung 1).

In der Fachliteratur werden verschiedene K^+ -Kanäle diskutiert, denen diese H^+/K^+ -ATPase-unterstützende Funktion zugesprochen werden könnte (Hirst, 2002; Aihara et al., 2003; Forte, 2004; Parsons und Keeling, 2005). Hauptsächlich werden Mitglieder zweier verschiedener K^+ -Kanal-Familien kontrovers diskutiert, die hierfür in Frage kommen: Einwärtsgleichrichtende K^+ -Kanäle („*inwardly rectifier K⁺-channels (Kir)*“) und spannungsabhängige K^+ -Kanäle („*voltage-gated K⁺-channels*“) (Horio et al., 1999; Hagen et al., 2001; Grahammer et al., 2001, 2002; Dedek und Waldegger, 2001; Fujita et al., 2002; Hirst, 2002; Cuppoletti et al., 2002; Malinowska et al., 2004; Forte, 2004; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit soll sich exemplarisch mit jeweils einem Vertreter jeder Familie auseinander gesetzt werden, die sowohl in gastrischen PZ der Ratte als auch in PZ des Kaninchens vorkommen: Kir4.1 und KCNQ1.

1.1.1 Der einwärtsgerichtete K^+ -Kanal („*inwardly rectifier K⁺-channel*“) Kir4.1.

Einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle („*inwardly rectifier K⁺-channel*“) wurden erstmals in hoch-depolarisierter Skelettmuskulatur beschrieben und als „anormaler K^+ -Strom“ bezeichnet (Katz, 1949; Jan und Jan, 1997; Isomoto et al., 1997). Die Funktionsweise des einwärtsgerichteten K^+ -Transports ist abhängig von der Polarisation der Zellmembran. Bei Depolarisation liegt eine abgeschwächte Leitfähigkeit vor. So ist z.B. für den kardiären I_{KI} („*inwardly rectifier current*“; Kir2.1) bekannt, dass unter negativem Membranpotential die Leitfähigkeit im Vergleich zu anderen K^+ -Kanälen am höchsten, während in der Depolarisationsphase I_{KI} nahezu geschlossen ist und erst bei -20 mV wieder geöffnet wird. Dieser Effekt ist genau gegensätzlich zu dem der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (Isomoto et al., 1997; Tamargo et al., 2004).

Mittlerweile sind sieben Unterfamilien, Kir1 bis Kir7, mit über 20 zell-spezifischen Kir-Kanälen bekannt (Tanemoto et al., 2000), die in verschiedenen Zelltypen, wie z.B., in Myozyten, in neuronalen Zellen, in Zellen des Blutes, in Osteoklasten, in endothelialen Zellen und in epithelialen Zellen, z.B. des Magens, vorkommen (Isomoto et al., 1997; Hagen et al., 2001; Fujita et al., 2002). Alle Kir-Kanäle sind tetramerische Proteine mit einer K^+ -spezifischen Kernregion und zwei Transmembran-Domänen (Isomoto et al., 1997; Tamargo et al., 2004).

Viele Mitglieder dieser K^+ -Kanal-Familie bilden Homomere z.B. Kir4.1/Kir4.1-Homomer, wobei einige auch Heteromere bilden können z.B. Kir4.1/Kir5.1-Heteromer. Die Bildung von Heteromeren bewirkt im Vergleich zur Bildung von Homomeren deutliche Änderungen hinsichtlich der physiologischen Eigenschaften (Pessia et al., 1996; Isomoto et al., 1997; Tanemoto et al., 2000). So bewirkt nach Casamassima et al. (2003) eine Heteromer-

Bildung von Kir4.1/Kir5.1 eine Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit aber eine Verlangsamung der Aktivierung im Vergleich zu Homomeren der Kir4.1-Kanäle.

Die Regulierung der Kir-Kanäle ist vielfältig und geschieht über zytosolische Faktoren wie z.B. PIP_2 , ATP, CO_2 , den pH-Wert, PDZ-Domänen, intrinsische Mg^{2+} -, Ca^{2+} - oder Na^+ -Ionen und Polyaminen (Xu et al., 2000; Bichet et al., 2003; Tamargo et al., 2004). Zusätzlich scheinen Phosphorylierungen zur Aktivierung oder Inaktivierung für verschiedene Kir-Kanäle wichtig zu sein (Bichet et al., 2003).

So ist z.B. für I_{KI} beschrieben, dass Isoproterenol und Forskolin die Aktivität dieses Kanals inhibieren (Lopatin und Nichols, 2001) und dass dies über Phosphorylierungen der PKA geschieht (Tamargo et al., 2004). Die Regulierung über PKA durch direkte Phosphorylierung ist auch sowohl für den renalen ROMK1 (Kir1.1) (McNicholas et al., 1994; Kubokawa et al., 1995) als auch für Kir5.1/PSD95 beschrieben (Tanemoto et al., 2002). Weiterhin hängt die Aktivität der trunkierten *Splice*-Variante des renalen ROMK, ROMK2 (Kir1.2; Kir1.1b), wesentlich von der Balance zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung ab (MacGregor et al., 1998; Leibziger et al., 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass der aktive Phorbolster TPA I_{KI} hemmt, was durch Mutationen in PKC-Phosphorylierungsstellen und durch H-9 rückgängig gemacht werden kann (Sato et al., 1995). Ferner ist beschrieben, dass Kir2.1 auch durch v-Src und durch negative Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierungen inhibiert wird (Tong et al., 2001). Über die Regulierung des Kir4.1 durch Phosphorylierung ist bisher wenig bekannt.

In den PZ verschiedener Spezies sind bisher nicht alle Mitglieder der Kir-Familie nachgewiesen worden. Es gibt ergänzende, zum Teil aber auch widersprüchliche Daten hinsichtlich der Expression von Kir1.1 (ROMK, Gen KCNJ1), Kir2.1 (IRK1, Gen KCNJ2),

Kir2.3 (IRK3, Gen KCNJ2), Kir3.1 (GIRK1, Gen KCNJ3), Kir3.2 (GIRK2, Bir1, Gen KCNJ6), Kir4.1 (Kir1.2, ROMK2, BIR10, K_{AB-2} , BIRK1, Gen KCNJ10), Kir4.2 (Kir1.3, Gen KCNJ15), Kir5.1 (Bir9, Gen KCNJ16) und Kir7.1 (Gen KCNJ 13) in PZ (Horio et al., 1999; Hagen et al., 2001; Fujita et al., 2002; Aihara et al., 2003; Malinowska et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Die Expression dieser einzelnen Kir-Kanäle scheint durchaus Spezies-abhängig zu sein. So wurde z.B. Kir2.1 in der Magenmukosa des Kaninchens nachgewiesen (Malinowska et al., 2004) nicht jedoch in der der Ratte (Fujita et al., 2002). In der hier dargestellten Untersuchung geschah eine Spezialisierung auf Kir4.1, da aus der Kir-Familie nur die Expression von Kir4.1 sowohl für die gastrische Magenmukosa des Kaninchens als auch für die Ratte beschrieben ist (Horio et al., 1999; Hagen et al., 2001, Fujita et al., 2002, Malinowska et al., 2004).

Die Lokalisation von Kir4.1 in gastrischen PZ ist nicht eindeutig geklärt. So zeigten Fujita et al. (2002) mittels elektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Methoden, dass Kir4.1 in der apikalen Membran (AP) nicht aber in H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC der PZ vorkommt, obwohl die immunhistochemischen Abbildungen nach näherer Betrachtung auch durchaus eine diffuse Verteilung von Kir4.1 andeuten (Fujita et al., 2002). Hagen et al. (2001) demonstrierten ebenfalls mit immunhistochemischen Analysen, dass Kir4.1 zwar apikal vorkommt, dort aber nicht mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert.

1.1.2 Spannungsabhängige K^+ -Kanäle („*voltage-gated K⁺-channel*“) KCNQ1.

Die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle haben eine so genannte *Shaker*-Typ Struktur, die aus sechs Transmembrandomänen und einer K^+ -spezifischen Kernregion besteht (Jentsch, 2000; Tamargo et al., 2004). Die hier vorliegende Arbeit hat sich mit einem Mitglied der

KCNQ-Familie, die die fünf Isoformen KCNQ1 bis 5 umfaßt, beschäftigt. KCNQ1 (KVLQT, Kv7.1) wird vor allem im Herz, in der Lunge, in der Niere, im Innenohr, sowie im Gastrointestinaltrakt und dort insbesondere im Magen exprimiert (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Neyroud et al., 1997; Grahammer et al., 2001; Tamargo et al., 2004).

KCNQ1 bildet *in vivo* keine Heteromere mit anderen KCNQ-Isoformen (Schroeder et al., 2000). Für KCNQ1 sind zwei *Splice*-Varianten, Variante 1 und Variante 2, beschrieben, die sich dahingehend unterscheiden, dass die Variante 2 verkürzt und inaktiv im Vergleich zur Variante 1 vorliegt (Demolombe et al., 1998; Tamargo et al., 2004). Die Kinetik von KCNQ1 wird nach Demolombe et al. (1998) durch eine Anlagerung von Variante 1 an Variante 2 und durch eine zusätzliche Bindung mit β -Untereinheiten der KCNE-Familie deutlich verändert (Sanguinetti et al., 1996; Barhanin et al., 1996; Demolombe et al., 1998; Schroeder et al., 2000; Tamargo et al., 2004; Heitzmann et al., 2004). So bewirkt eine Ko-Expression von KCNQ1 und KCNE1 eine Verlangsamung der Kinetiken zur Aktivierung bzw. Deaktivierung der K^+ -Leitfähigkeit des KCNQ1 (Tamargo et al., 2004). KCNQ1-Kanäle vermitteln *in vivo* einen spannungsabhängigen, schnell aktivierenden und langsam deaktivierenden K^+ -Auswärtsstrom, wohingegen KCNE1 alleine keine funktionellen K^+ -Kanäle bilden kann (Tamargo et al., 2004).

Die Regulierung des KCNQ1 geschieht hauptsächlich über cAMP und PKA (Heitzmann et al., 2004; Tamargo et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Dies ist für I_{KS} („*slow component of delayed rectifier current*“) im Detail beschrieben. Im Herzen wird durch vier KCNQ1 und zwei KCNE1 β -Untereinheiten der kardiäre I_{KS} gebildet (Deutsch, 2002; Tamargo et al., 2004). So bilden KCNQ1 und KCNE1 makromolekulare Signalkomplexe, die durch Bindung an das *Yotiao*-Protein reguliert werden. *Yotiao* bindet PKA sowie

Phosphoprotein-Phosphatase 1 und reguliert den K^+ -Kanal durch Phosphorylierung (Marx et al., 2002; Tamargo et al., 2004). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass neben der PKA auch PKC eine komplex-modulierende Funktion auf I_{KS} hat (Tamargo et al., 2004). Somit scheint, dass KCNQ1 auch über das IP_3/Ca^{2+} -System aktivierbar ist (Grahammer et al., 2002).

In der Fachliteratur wird kontrovers diskutiert welche Mitglieder der KCNE-Familie in der Magenmukosa exprimiert werden und zusätzlich noch mit KCNQ1 kolokalisieren. Erwähnt werden *mink* (IsK, Gen KCNE1), *MirP1* (Gen KCNE2) und *MirP2* (Gen KCNE3) (Grahammer et al., 2001; Dedek und Wadegger 2001; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Es gibt widersprüchliche Daten hinsichtlich der Expression von KCNE1 und KCNE3 (Grahammer et al., 2001; Dedek und Waldegger, 2001; Warth und Barhanin, 2002; Lambrecht et al., 2005) allerdings starke Hinweise für eine Expression von KCNE2 (Grahammer et al., 2001; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Grahammer et al. (2001), Heitzmann et al. (2004) und Lambrecht et al. (2005) postulierten, dass KCNQ1 bei der Säuresekretion eine wesentliche Rolle spielt. Durch Messungen der Säuresekretion unter Einfluss der spezifischen KCNQ1-Inhibitoren 293B und HMR 1556 konnten weitere Hinweise auf eine physiologische Relevanz von KCNQ1 für die Säuresekretion der PZ festgestellt werden (Grahammer et al., 2001, 2002; Lambrecht et al., 2005).

Zusätzlich zeigten KCNQ1-*Knockout*-Mäusen neben Taubheit auch eine Hyperplasie der epithelialen Zellen der Magenmukosa, vor allem in der Fundus- und Korpusregion. Außerdem fand man eine deutliche Reduzierung an PZ (Waldegger, 2003), die jedoch nicht in der Lage waren Säure zu sezernieren, so dass der pH-Wert des Magens der KCNQ1-

Knockout-Mäuse deutlich alkalischer war als bei Wildtyp-Mäusen (Lee et al., 2000; Samuelson und Hinkle, 2003).

Die Lokalisation von KCNQ1 in den PZ der Magenmukosa ist nicht eindeutig geklärt. Mit immunhistochemischen Untersuchungen demonstrierten Grahammer et al. (2001) und Dedek und Wadegger (2001) unabhängig voneinander, dass KCNQ1 mit der H^+/K^+ -ATPase in ruhenden PZ kolokalisiert. Zusätzlich fanden Heitzmann et al. (2004), dass KCNQ1 in ruhenden PZ in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Eine Umverteilung des KCNQ1 vergleichbar mit dem *Trafficking* der H^+/K^+ -ATPase in die sekretorische Membran nach kombinierter Stimulierung mit Histamin, Pentagastrin und Carbachol konnte mittels Immunhistochemie nicht gefunden werden (Heitzmann et al., 2004). Im Gegensatz dazu publizierten Lambrecht et al. (2005), dass KCNQ1 nach Pentagastrin-Stimulierung mit der H^+/K^+ -ATPase in der sekretorischen Membran kolokalisiert. Eine Kolokalisierung von KCNQ1 und H^+/K^+ -ATPase konnte im ruhendem Zustand durch Lambrecht et al. (2004) nicht gefunden werden.

1.2 Pharmakologie und Signaltransduktion der Säuresekretion der Parietalzellen.

In der Fachliteratur werden verschiedene Pharmaka genannt, die in der Lage sind die Säuresekretion der PZ zu inhibieren oder zu stimulieren (Aihara et al., 2003; Parsons und Keeling, 2005). Angriffspunkte dieser Pharmaka sind neben den Rezeptoren der basolateralen Membran auch die H^+/K^+ -ATPase, Proteinkinasen, und bisher nicht genau identifizierte, pharmakologisch-sensitive Regionen der apikalen Membran (Abbildung 2). Eine wesentliche therapeutische Weiterentwicklung in der Pharmakotherapie zur Behandlung von Erkrankungen des Magens wäre die Entwicklung von hochspezifischen K^+ -Kanal-Inhibitoren,

die selektiv K^+ -Kanäle auf der apikalen Membran der PZ ausschalten könnten und dadurch die K^+ -Rezyklierung zur Unterstützung der H^+/K^+ -ATPase-Aktivität unterbinden würden (Aihara et al., 2003; Waldegger, 2003).

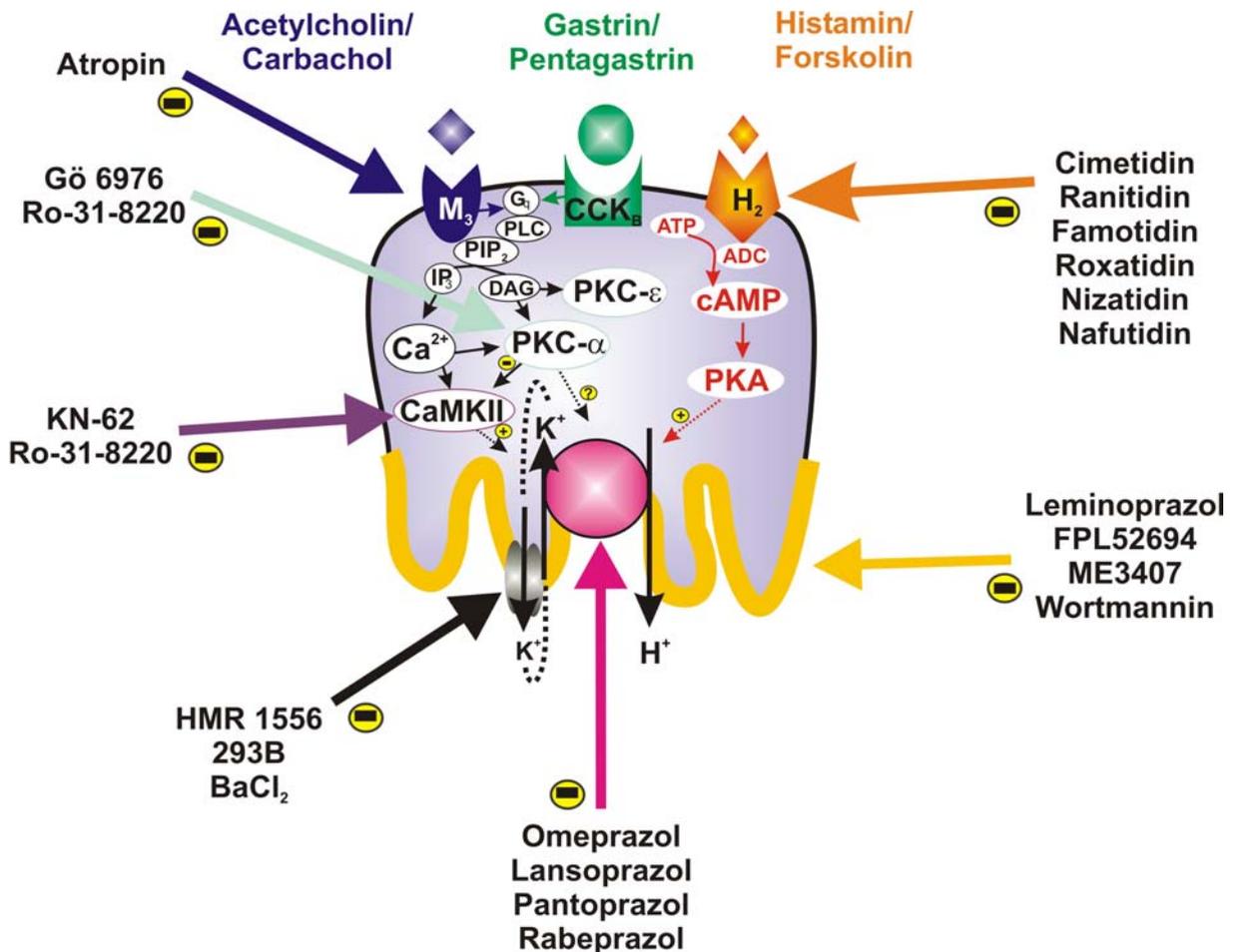


Abbildung 2: Signaltransduktion der Säuresekretion des Magens und die Angriffspunkte diverser anti-sekretorischer Pharmaka. M_3 - und CCK_B -Rezeptor-vermittelte Säuresekretion wird über ein G_q -Protein mediert, das eine Phospholipase C (PLC) aktiviert, die veranlasst, dass sich ein Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) teilt. IP_3 setzt Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei. Dieses Ca^{2+} aktiviert CaMKII und im Zusammenspiel mit DAG PKC- α . PKC- α hat eine abschwächende Wirkung auf die Aktivität der CaMKII (Fährmann et al., 2002, 2003). H_2 -Rezeptor-vermittelte Säuresekretion wird über eine Adenylatzyklase (ADC) mediert, welche ATP zu cAMP spaltet. cAMP aktiviert PKA. Sowohl PKA als auch die CaMKII haben einen positiv steuernden Einfluss auf die Säuresekretion der PZ. Eine Hemmung der Säuresekretion kann durch die hier nach Aihara et al. (2003) dargestellten Pharmaka erreicht werden. Auf die Nennung von CCK_B -, ADC- und PKA-Inhibitoren wurde verzichtet.

Diese Inhibierung der Aktivität der K^+ -Kanäle könnte auch auf indirektem Wege durch Inhibierung der zur Aktivierung der K^+ -Kanäle notwendigen Signaltransduktion geschehen. Der detaillierte Regulationsmechanismus der Säuresekretion konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt werden, da verschiedene regulative Mechanismen in diesen Prozess involviert sind. Allgemein anerkannt ist die Tatsache, dass die Salzsäuresekretion der PZ hauptsächlich über drei physiologische Stimulanzen initiiert werden kann: Histamin, Gastrin und Azetylcholin (Brown und Chew, 1986, 1987, 1989; Urushidani und Forte, 1997).

Durch Bindung dieser Stimulanzen an die jeweiligen spezifischen Rezeptoren werden im Wesentlichen zwei verschiedene Signaltransduktionswege initialisiert, die wahrscheinlich auch Einfluss auf die Aktivierung der hier untersuchten K^+ -Kanäle haben. Der H_2 -Histamin-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionsweg nach Stimulierung via Histamin wirkt über einen Anstieg des zyklischen AMP (cAMP) und über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und ist damit z.B. an der Regulierung des KCNQ1 beteiligt (Heitzmann et al., 2004; Tamargo et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Die CCK_B -Gastrin- bzw. M_3 -Azetylcholin-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionswege wirken nach Stimulierung via Gastrin bzw. Azetylcholin über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - und Diacylglycerol-Konzentration (Chiba et al., 1989; Pfeiffer et al., 1989; Pfeiffer et al., 1990) und können ebenfalls Einfluss auf die hier beschriebenen K^+ -Kanäle haben. So sind als intrazelluläre Ziele der Ca^{2+} - und/oder der Diacylglycerol-aktivierten Signaltransduktionskette verschiedene Proteinkinasen, wie z.B. die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) oder die Ca^{2+} /Phospholipid abhängige Proteinkinase (PKC) bekannt.

Die Aktivierung über beide, Ca^{2+} und Diacylglycerol, ist nur den cPKC-Isoformen vorbehalten (Nishizuka, 1977; Beil et al., 1987), welche sowohl für die Regulierung von KCNQ1 (Lopatin und Nichols, 2001; Tamargo et al., 2004) als auch für die Regulierung von Kir-Kanälen (Sato et al., 1995; Lopatin und Nichols, 2001) in Frage kommen. In gastrischen Parietalzellen der Ratte bzw. des Kaninchens werden lediglich die PKC-Isoformen α und ϵ exprimiert (Nandi et al., 1996; Fähmann et al., 1998; Fähmann et al., 2000).

1.3 Trafficking der H^+/K^+ -ATPase nach Stimulierung der Säuresekretion in die sekretorische apikale Membran der Parietalzellen.

Die Stimulierung der Säuresekretion über die o.g. Signaltransduktionsketten bewirken wesentliche morphologische Veränderungen innerhalb der PZ (Forte, 1977; Agnew et al., 1999). Die ersten Hinweise für diesen Prozess lieferte schon vor über 100 Jahren Golgi (1893), der bemerkte, dass das canaliculäre Membrannetzwerk der PZ nach Stimulierung der Säuresekretion eine starke Vergrößerung erfuhr (Golgi, 1893).

Kasbekar et al. (1968), Ito und Schofield (1974) sowie Helander und Hirschowitz (1974) konnten zeigen, dass zytoplasmatische Tubulovesikel, die auch neuerdings Tubulocisternae (TC) genannt werden (Duman et al., 2003), nach Stimulierung der Säuresekretion mit der AP verschmelzen (Abbildung 3). Nach der Fusion der TC mit der AP der Canaliculi kommt es zur Ausbildung einer stimulus-assoziierten apikalen Membran (SA) (Abbildung 3 B, C), deren Oberfläche um das 5 bis 10 fache vergrößert gegenüber der AP im unstimulierten Zustand vorliegt (Helander und Hirschowitz, 1972; Forte et al., 1983; Fujita et al., 2002; Waldegger, 2003). Im Vergleich zu den K^+ -impermeablen TC sind SA hochpermeabel gegenüber K^+ -Ionen, was die Theorie von apikalen K^+ -Kanälen unterstützt (Forte et al., 1983; Hirst, 2002).

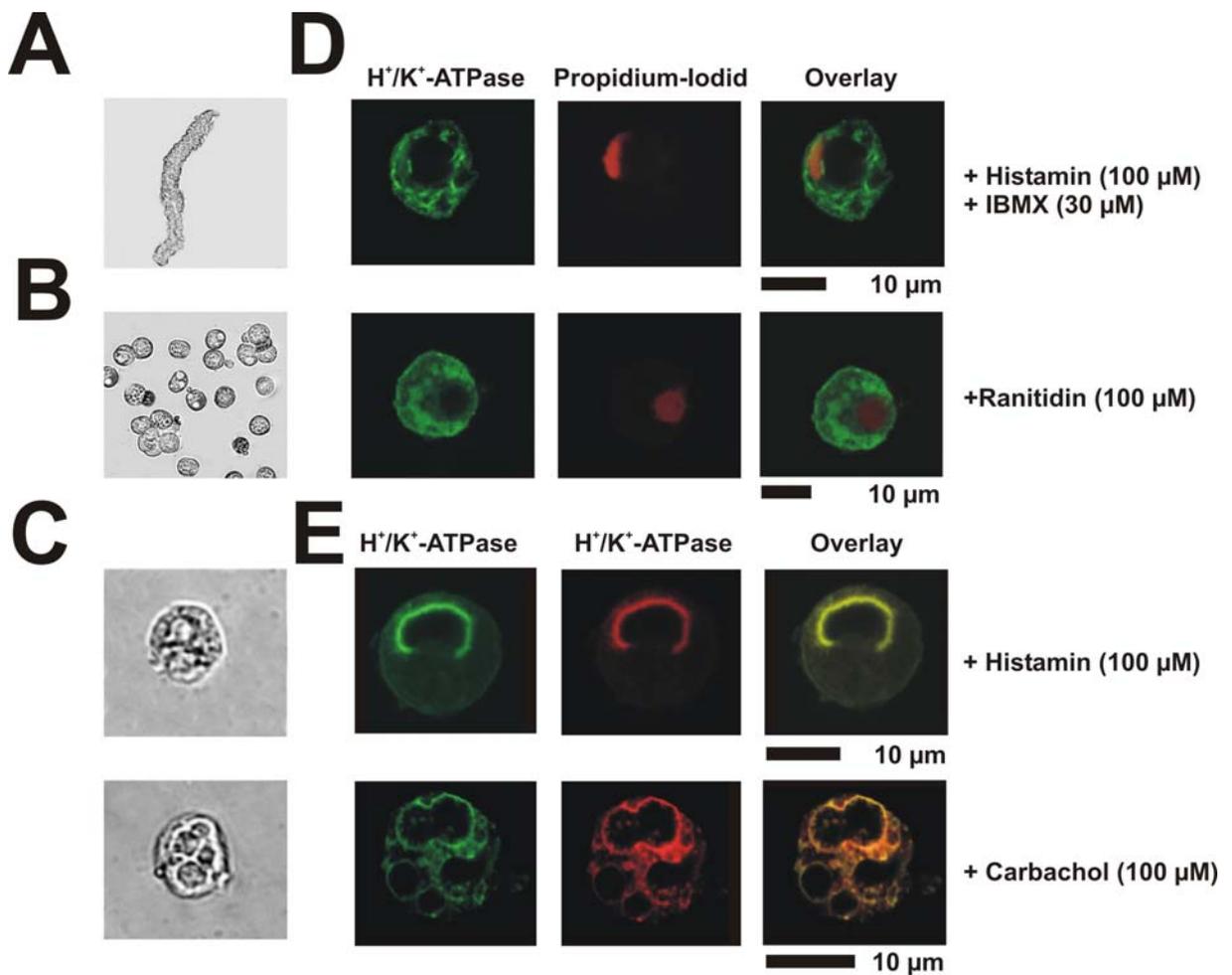


Abbildung 3: Morphologische Veränderungen der PZ nach Isolierung bzw. Stimulierung. **A:** Lichtmikroskopische Aufnahmen einer isolierten Magendrüse. **B:** Parietalzellen in Kultur unterscheiden sich von Parietalzellen in intakten Magendrüsen durch den Verlust epithelialer Polarität und erscheinen deshalb im Lichtmikroskop rund. Die apikale Membran ist in isolierten und kultivierten PZ als VAC („*vacuolar apical compartment*“) internalisiert, wobei die basolaterale Membran der PZ zur äußeren Zellbegrenzung wird (Chew et al., 1989; Mangeat et al., 1990). **C:** Die morphologischen Veränderungen nach Stimulierung sind lichtmikroskopisch zu erkennen (20 fache Vergrößerung). Die internalisierte apikale Membran (VAC) wird durch Fusion mit den TC erheblich vergrößert. **D:** Immunfluoreszenz-Aufnahme isolierter PZ des Magens einer Ratte im ruhenden und im stimulierten Zustand. Nach Histamin (100 μM)-Stimulierung wird eine deutliche Umverteilung der H⁺/K⁺-ATPase (α-Untereinheit, grün) in die VAC's sichtbar. Die H⁺/K⁺-ATPase ist nicht im Zellkern lokalisiert. **E:** Vergleich des Traffickings der α-Untereinheit (grün) der H⁺/K⁺-ATPase mit der β-Untereinheit (rot) der H⁺/K⁺-ATPase, nach Stimulierung mit Histamin (100 μM) oder Carbachol (100 μM) in isolierten PZ der Maus. Beide Untereinheiten sind kolokalisiert.

Nach Identifizierung der H^+/K^+ -ATPase als die verantwortliche Protonenpumpe bei der Säuresekretion (Ganser und Forte, 1973; Forte et al., 1975), wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung der H^+ -Sekretion der PZ zum einen von der Aktivität apikaler K^+ -Kanäle und zum anderen vom Einbau der H^+/K^+ -ATPase-reichen TC in die AP abhängt (Forte et al., 1981; Okamoto und Forte, 2001; Hirst, 2002; Forte, 2004). Die PZ war somit das erste System, in dem die Rekrutierung und Rezyklierung eines Transportproteins, in diesem Fall der H^+/K^+ -ATPase, als Kontrolle eines physiologischen Prozesses identifiziert wurde.

Das *Trafficking* der H^+/K^+ -ATPase ist in der Literatur gut beschrieben (Agnew et al., 1999; Zhou et al., 2003; Forte, 2004) (Abbildung 3). Im ruhenden Zustand zeigt die Anfärbung der H^+/K^+ -ATPase eine diffuse Verteilung über die gesamte Zelle, wohingegen nach Stimulierung eine apikale Lokalisierung der H^+/K^+ -ATPase zu erkennen ist (Wolosin et al., 1983; Chew et al., 1989; Hanzel et al., 1989; Mangeat et al., 1990; Agnew et al., 1999; Zhou et al., 2003; Abbildung 3 B).

In der apikalen Membran vermittelt die H^+/K^+ -ATPase im Zusammenspiel mit K^+ -Kanälen den elektroneutralen Austausch von H^+ -Ionen gegen K^+ -Ionen (Wolosin und Forte, 1984, 1985). Nach Ende der Stimulierung erfolgt eine Rückkehr in den ruhenden Zustand durch Endozytose der zytoplasmatischen Komponenten inklusive der H^+/K^+ -ATPase aus den SA (Agnew et al., 1999; Hirst, 2002).

Diese morphologischen Veränderungen nach Stimulierung der Säuresekretion sind konsistent mit der „Membran Rezyklierung Hypothese der Säuresekretion“, die ein reguliertes *Trafficking* und Verschmelzen der zytoplasmatischen, H^+/K^+ -ATPase-reichen TC mit der AP als Grundvoraussetzung für die Aktivierung der Säuresekretion ansieht (Forte et al., 1977, 1981). Diese Hypothese wurde später dahingehend modifiziert, dass neben der H^+/K^+ -ATPase

auch die Aktivierung oder Rekrutierung von K^+ - und Cl^- -Kanälen zur Säuresekretion notwendig sind (Forte und Lee, 1977; Forte et al., 1983; Forte und Yao, 1996; Agnew et al., 1999; Fähmann, 2000).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht eine besondere Form der exokrinen Sekretion von epithelialen Drüsenzellen: Die Säuresekretion der PZ der Magenmukosa. Speziell soll sich in dieser Arbeit mit den K^+ -Kanälen, Kir4.1 und KCNQ1, die in diesen physiologischen Prozess involviert zu sein scheinen, befasst werden.

Aufgrund der physiologischen und therapeutischen Relevanz der K^+ -Kanäle bei der Säuresekretion der PZ, ist es notwendig, diese exakt in der PZ zu lokalisieren, um effektive K^+ -Kanal-Hemmstoffe entwickeln zu können (Aihara et al., 2003; Waldegger, 2003). Die Lokalisierung von Kir4.1 und KCNQ1 in PZ ist in der Literatur hauptsächlich mit immunhistochemischen Methoden analysiert worden (Hirst, 2002; Forte, 2004). Die Ergebnisse sind z.T. sehr widersprüchlich und nicht ausreichend (Siehe Kapitel 1.1.1 und 1.1.2).

In dieser Arbeit soll mittels zellbiochemischer und zellbiologischer Methoden, die zu diesem Themenkomplex noch nicht angewandt wurden, und zusätzlich auch mit weitergehenden immunhistochemischen Untersuchungen, die Lokalisierung von Kir4.1 und KCNQ1 im Detail aufgeklärt werden.

Aus den bisherigen Ergebnissen, die in der Literatur veröffentlicht wurden, ergeben sich für die Zielsetzung dieser Arbeit drei verschiedene Möglichkeiten der apikalen Lokalisation

von Kir4.1 und KCNQ1 in PZ, die auch zum besseren Verständnis in Abbildung 4 graphisch dargestellt sind:

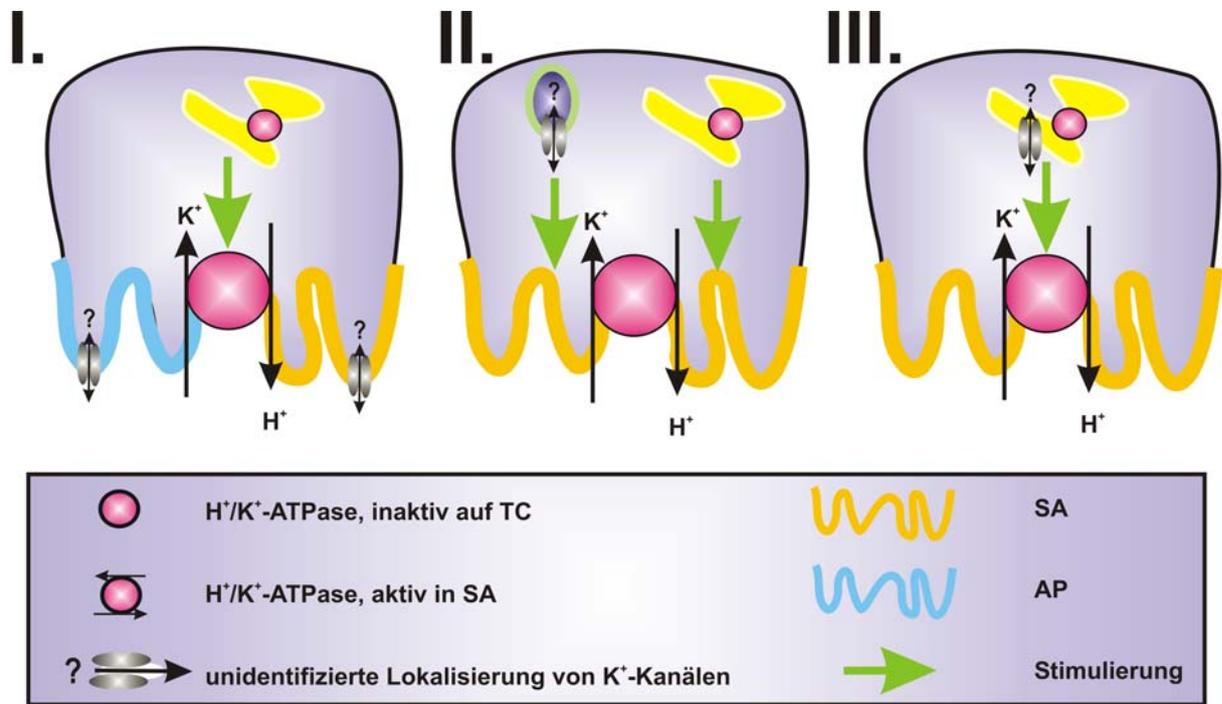


Abbildung 4: Theorien zur apikalen Lokalisation von K⁺-Kanälen in den PZ.

Kir4.1 und/oder KCNQ1 sind...

1. ...sowohl im ruhenden als auch im stimulierten Zustand, in die apikale Membran der PZ eingebaut (Abbildung 4, I).
2. ...im ruhenden Zustand auf intrazelluläre Vesikel verteilt, die sich von H⁺/K⁺-ATPase enthaltenden TC unterscheiden und erst nach Stimulierung der Säuresekretion in die apikale Membran gelangen (Abbildung 4, II).
3. ...im ruhenden Zustand und nach Stimulierung der Säuresekretion eng mit der H⁺/K⁺-ATPase kolokalisiert (Abbildung 4, III).

Daraus resultieren folgende konkrete Fragestellungen:

1. Gibt es Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von Kir4.1 und KCNQ1 in PZ?
2. Sind Kir4.1 und/oder KCNQ1 kolokalisiert mit der H^+/K^+ -ATPase im ruhenden und/oder stimulierten Zustand?
3. Gibt es ein *Trafficking* nach Stimulierung der Säuresekretion von Kir4.1 und KCNQ1, welches mit dem der H^+/K^+ -ATPase vergleichbar ist?
4. Sind Kir4.1 und KCNQ1 in PZ kolokalisiert?

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll darüber hinaus mit Hilfe physiologischer Studien die Relevanz von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der PZ analysiert werden. Dabei stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Welche physiologische Relevanz ergibt sich aus der Lokalisierung von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der PZ?
2. Welche Unterschiede in der Säuresekretion gibt es nach Inhibierung von Kir4.1 oder KCNQ1?
3. KCNQ1 wird über das cAMP/PKA-System und wahrscheinlich auch über das IP_3/Ca^{2+} -System reguliert. Gibt es ähnliche Regulationsmechanismen für Kir4.1?
4. Wie lässt sich die Wirkungsweise zweier verschiedener K^+ -Kanäle in der apikalen Membran der PZ erklären?

2. Material

Die folgenden Tabellen enthalten die verwendeten Chemikalien und Geräte. Alle Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

1.1 Geräte.

Dynatech MR 5000 (Platreader 96 well)	Dynatech, Hamburg
Electrophoresis Power Supply, EPS 600	Amersham Bioscience, Braunschweig
Elektrophorese-Apparatur Mighty Small SE 250/SE 260	Amersham Bioscience
Gelsystem Mighty Small SE 245	Amersham Bioscience
Heat Sealer 1298-012 („Kopf-über Kopf Schüttler“)	Wallac
Inkubator: Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Inkubator: Nuair IR Autoflow, Druckluftbegasung	Zapf Instruments, Sarstedt
Microflow, Biological Safety Cabinet	Nunc
Mikroskop: Konfokales Mikroskop (Leica TCS SP2 AOBS)	Leica, Mannheim
Mikroskop: Zeiss HAL100, + KAPPA ACC1	Zeiss, Jena
Mikrotom: Micro HM 500 OM	Micom
Photometer: Ultrospec 3000	Amersham Bioscience
Photometer: UVIKON Spectrophotometer 930	Kontron, München
Pipetten (0,5 bis 10 µl; 50 bis 200 µl; 200 bis 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten: Biohit-Proline (0,5 bis 10 µl; 50 bis 200 µl)	Roth, Karlsruhe
Platzhalter 0,75 mM für SE 250	Amersham Bioscience
Potter-S	Brauna-Biotech International
Reax DR 54117	Heidolph
Rotor Tft 65.13	Kontron
Rotoren: SW 28; SW 41; TLA 100.2; TLA 100.3; TLA 55; TL 50.2; Ti 60; Ti 70	Beckman, München
Spannungsgeräte: Power supply, ECPS3000/15	Amersham Bioscience
Thermomixer comfort (2 ml)	Eppendorf
Trocken-Blotter (Art. Nr. 24200)	Hölzel GmbH,
Ultrazentrifuge TL 100 ZU, TL 100 ZU, L8 70, L8-70 M	Beckman
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Beckmann J2-21	Beckmann
Zentrifuge: Biofuge („fresco“)	Heraeus, Hannover
Zentrifuge: Biofuge („pico“),	Heraeus
Zentrifuge: Optima TL UZ	Beckman
Zentrifuge: Sepatech	Heraeus
Zentrifuge: Sorvall Kühlzentrifuge Superspeed RC 2-B	du Pont, Bad Homburg

1.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier 700g/qm, 1,3 mM dick (105 mal 130 mm)	Biometra, Göttingen
Dickwand-Röhrchen für TLA 100.3 (Art. Nr.: 349622)	Beckman
Falcontubes, steril, 15 ml, 50 ml	Greiner
Hyperfilm ECL	Amersham Bioscience
Hyperfilm MP (high performance autoradiography film)	Amersham Bioscience
Küvetten No. 67 742 (10 mal 4 mal 145 mm)	Sarstedt
Liquid Scintillation Analyser, Tri- Lab, Packard 200 CA	Canberra-Packard
Mikrotiterplatten, steril	Greiner
pH-Indikator-Stäbchen	Merck, Darmstadt
Plastikpipetten, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Plastikröhrchen, steril, 12 ml	Greiner
Polycarbonate-Bottle-Assembly für Ti 70	Beckman
PVDF (Polyvinylidene difluorid)	Roth, Karlsruhe
Skalpell, steril	Braun, Melsungen
Spritzen, steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml	Braun
Superfrost plus Objektträger	Menzel-Gläser
Tubes (1,5 ml) (02109076); 12,5 ml (010030048.028)	Eppendorf
Tubes No. 55 468 (95 mal 16,8 mm)	Sarstedt
Ultra Clear Röhrchen für SW 28 (Art. Nr.: 344058)	Beckman
Ultra Clear Röhrchen für SW 41 (Art. Nr.: 344059)	Beckman
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten, steril	Nunc
Zell-Strainer 40 (μ M)	BD, Heidelberg

1.3 Chemikalien.

1.3.1 Radiochemikalien.

[¹⁴ C]-Dimethyl-Aminopyrin	Amersham Bioscience
γ -[³² P]-ATP	Amersham Bioscience

1.3.2 Flüssigchemikalien.

Acrylamid 4X Lösung 40 %ig	Serva, Heidelberg
Bio-Rad-Protein Assay	Sigma-Aldrich, München
ECL Detektionsreagenzien	Amersham Bioscience
Heparin	Braun, Melsungen
Ketamin S	Parke-Davis, Freiburg
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
OPTI-MEM	Gibco, Stuttgart
Quickszint 501	Zinsser,
Rompun	Bayer, Leverkusen
Roti-Mark STANDARD	Roth

Rotiphorese Gel 30	Roth
RPMI 1540	PAA Lab, Pasching, Österreich
Transfektion: Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Transfektion: Lipofectamine™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin 1:250	Biochrom,
Tween-20	Sigma-Aldrich
ULTIMA Gold™ LCT	Perkin Elmer

1.3.3 Spezial-Chemikalien.

4-Nitrophenyl Phosphat Di-Natrium Salz (pNPP)	Fluka, Seelze
Adenosin-5'- Triphosphorsäure	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Amidoschwarz	Serva
Amphotericin B	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Atropin	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Serva
BSA, Fraktion V	Paesel&Lorei
BSA, Protein-Kalibrierung (Sigma P7656)	Sigma-Aldrich
Chymostatin	Sigma-Aldrich
DTT	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM F-12)	Sigma-Aldrich
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich
Ficoll TM 400	Amersham Bioscience
Geneticinsulfat	Sigma-Aldrich
Gentamicin 10mg/ml	Gibco
Gluconsäurelacton	Merck
Hydrocortison	Sigma-Aldrich
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure	Merck
Insulin-Transferrin-Selenit	Sigma-Aldrich
Kollagenase Worthington Typ CLS II	Biochrom
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Minimum Essential Medium	Sigma-Aldrich
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
N,N'-Methylenbisacrylamid 2X reinst.	Serva
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich
Nitroblau Tetrazolin (NBT)	Sigma-Aldrich
Normal Donkey Serum (NDS)	Chemikon
Normal Goat Serum (NGS)	Vektor
Nykodenz®	Nykomed, Oslo, Norwegen
Pefabloc Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich

PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid)	Sigma-Aldrich
Pronase E	Merck
Propidium-Iodid	Sigma-Aldrich
Proteinkinase A, PKA	Sigma Aldrich
Skim Milk Powder	Fluka
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich
TEMED	Fluka
Valinomycin	Sigma-Aldrich

1.4 Antikörper.

1.4.1 Primäre Antikörper

Kaninchen-Anti-Kir4.1 (polyklonal) (Immunfluoreszenz)	Stockklausner et al. (2001)
Kaninchen-Anti-Kir4.1 (Rattenhirn, polyklonal)	Poopalasundaram et al. (2000)
Maus-Anti-nPKC- ϵ (monoklonal) und entsprechendes Blockpeptid (nPKC- ϵ (E-5))	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen-Anti-aktivierte-CaMKII (polyklonal)	Promega, Mannheim
Maus-Anti-cPKC- α (monoklonal) und entsprechendes Blockpeptid (cPKC- α (H-7))	Santa Cruz
Maus-Anti-GFP (JL-8) (monoklonal)	BD
Kaninchen-Anti-H ⁺ /K ⁺ -ATPase α -Untereinheit (polyklonal)	Smolka und Swiger (1992)
Maus-Anti-H ⁺ /K ⁺ -ATPase β -Untereinheit (monoklonal)	Chow und Forte (1993)
Ziege-Anti-KCNQ1 (C-20) (polyklonal, sc-106646) und entsprechendes Blockpeptid	Santa Cruz
Maus-Anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPase alpha-1 clone C464.6 (monoclonal)	UPSTATE, Biomol, Hamburg
Kaninchen-Anti-CaMKII- α , γ , δ	Stress Gene Biotech, Kanada

1.4.2 Sekundäre Antikörper.

Esel-Anti-Ziege IgG Alexa Fluor 633 (Absorption Maximum 632 nm, Emmission Maximum 647 nm)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Esel-Anti-Ziege IgG	Santa Cruz
Ziege-Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 (Absorption Maximum 495 nm, Emmission Maximum 519 nm)	Molecular Probes
Ziege-Anti-Kaninchen IgG	BD
Ziege-Anti-Maus IgG Alexa Fluor 546 (Absorption Maximum 556 nm, Emmission Maximum 573 nm)	Molecular Probes
Ziege-Anti-Maus IgG	BD

1.5 „Beads“.

Dynabeads, Anti-Maus, M 280, 6-7 x 10 ⁸ beads/ ml	Dynal, Hamburg
Dynabeads, Anti-Kaninchen, M 280, 6-7 x 10 ⁸ beads/ ml	Dynal
Protein A/G-Plus Agarose Beads	Santa Cruz
μ Macs TM Epitope TAG Protein Isolation Kit, Anti-GFP-Micro Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

1.6 Pharmakologisch-wirksame Agenzien.

1-[N,O-Bis(5-isoquinolinsufonyl)N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazin (KN-62)	Calbiochem, Schwalbach
Bisindolylmaleimid I (GF109203X)	Calbiochem
Bisindolylmaleimid IX (Ro-31-8220)	Calbiochem
Calyculin A	Calbiochem
Forskolin	Sigma-Aldrich
g-Strophanthin (Ouabain)	Sigma-Aldrich
Histamin	Sigma-Aldrich
HMR 1556	Aventis, Frankfurt
Ranitidin	Sigma
Indolylcarbazol (Gö 6976)	Calbiochem
12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Calbiochem
trans-6-Cyano-4-(N-Ethylsulfonyl-N-Methylamino)-3-Hydroxy-2,2-Dimethyl-Chroman (293B)	Aventis

1.7 Versuchstiere.

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten (*Rattus norvegicus* L.) der Zuchtlinie „White Whistar“ (250-300 g) und männliche Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus* L.) der Zuchtlinie „New Zealand White“ (2,5-3 kg) herangezogen. Diese Tiere wurden vorschriftsmäßig getötet und anschließend der Magen zur Fraktionierung der Magenmukosa oder zur Isolierung von PZ entnommen (Karvar et al., 2002; Peng et al., 1997; Lamprecht et al., 1993; Crothers et al., 1993; Reenstra und Forte 1990).

1.8 Zell-Linie.

Die verwendete gastrisch-mukosale Adenomakarzinom-Zell-Linie (AGS) (ATCC 1739-CRL), eine Adenomakarzinom-Zell-Linie des Magens, wurde von der American Type Cultures Collection bezogen. Sie entstammte ursprünglich aus einem 1979 isolierten humanen Adenomakarzinom des Magens einer 54 Jahre alten Frau.

2. Methoden.

2.1 Zellbiochemische Methoden.

2.1.1 Gewebe- und Membran-Präparation der Parietalzellen der Magenmukosa.

Gastrische Membranen der Zellen der Magenmukosa wurden aus dem Magen von männlichen Ratten und Kaninchen hergestellt (Reenstra und Forte 1990; Lamprecht et al., 1993; Crothers et al., 1993; Peng et al., 1997; Karvar et al., 2002). Die Mägen wurden geöffnet und der pH-Wert des Lumens mit einem pH-Indikator-Stäbchen kontrolliert. Bei der Präparation von unstimulierten Membranen lag der pH im Bereich pH 7,4 bei der Präparation stimulierter Membranen bei pH ~ 1. Die Mägen wurden nach Öffnung sofort mit eiskaltem TBS gewaschen ((Kaufhold, 2001, Examensarbeit). Anschließend wurde die gastrische Mukosa mit einem Skalpell von der *Muscularis mucosae* abgeschabt und mit einem „lose-fit“ Glas-Teflon-Potter homogenisiert.

Alle Schritte der Membran-Präparation wurden mit eiskalten Puffern, Geräten und im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Membran-Fraktionierung bestand aus einer Kombination von differentieller-Pelletierungs-, Ficoll-Gradienten- und Saccharose-Gradienten-Zentrifugation. Zur Veranschaulichung der allgemeinen Vorgehensweise dient die Abbildung 6. Weitere detaillierte Angaben sind im Text zu finden.

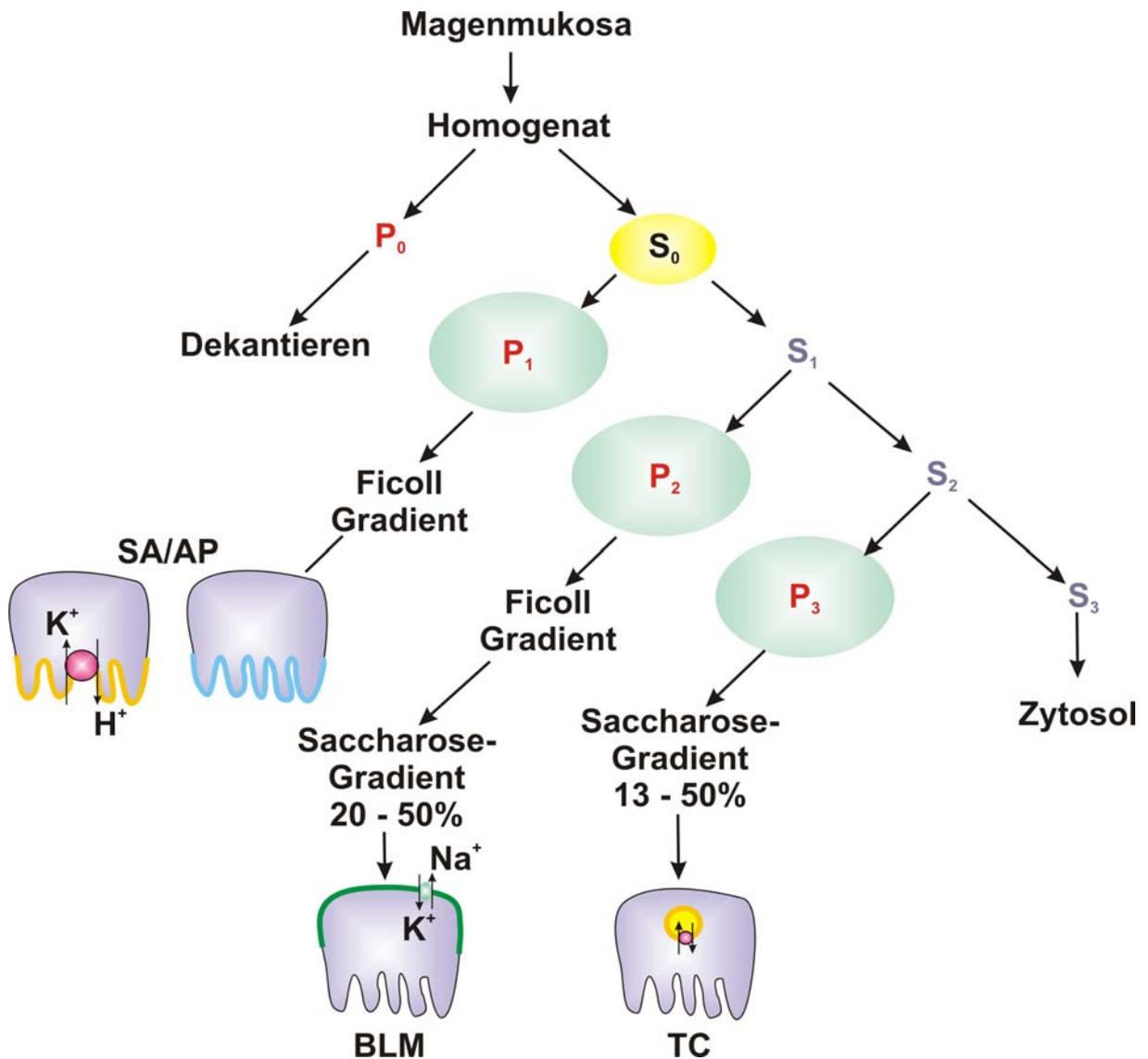


Abbildung 6: Allgemeine Übersicht der Präparation von stimulierten und unstimulierten Membranen der Zellen der Magenmukosa in Anlehnung an Reenstra und Forte (1990), Lamprecht et al. (1993), Crothers et al. (1993); Peng et al. (1997) und Karvar et al. (2002). Diese Vorgehensweise ist sowohl für die Präparation von AP/SA, BLM und TC der Zellen der Magenmukosa der Ratte als auch für die AP/SA und TC Präparationen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens gültig. Bei der Präparation der BLM des Kaninchens entfällt die Zentrifugation für P₁. Als Leitenzyme dienen die H⁺/K⁺-ATPase für SA und TC (Ganser und Forte, 1973; Lee et al., 1974; Sachs et al., 1980, 1980a) sowie die Na⁺/K⁺-ATPase für BLM (Culp und Forte, 1981). Die Anreicherungsberechnung der enzymatischen Leitenzym-Messungen wurde auf S₀ (gelb) bezogen.

2.1.1.1 Puffer und Lösungen zur Membran-Fraktionierung.**Hypotonischer Homogenisationspuffer (MSEP-Puffer):**

5 mM PIPES/TRIS pH 6,7 mit 113 mM Mannitol, 37 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20 mM Benzamidin, 5 mM PMSF, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ α -Chymostatin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Pepstatin A

Isotonischer Homogenisationspuffer (SM-Puffer):

5 mM Imidazol/HCl pH 7,4 mit 300 mM Saccharose, 0,4 mM EDTA, 0,2 EGTA, 0,5 mM DTT, 5 mM Benzamidin, 5 mM PMSF, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ α -Chymostatin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Pepstatin A

Stammlösungen:

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7,4 mit 150 mM NaCl, 1 mM KCl

0,9 % (w/v) NaCl (steril)

35 % (w/v) Ficoll in SM-Puffer, pH 7,4

20 % (w/v) Ficoll in SM-Puffer, pH 7,4

18 % (w/v) Ficoll in SM-Puffer, pH 7,4

0,5 M PMSF in Ethanol

100 mg ml^{-1} Ketanest

2 % (w/v) Xylazinhydrochlorid (Rompun)

25 mg ml^{-1} Trapanal

10000 U Heparin

0,5 M Atropin

1 M Ranitidin, pH 7,4

1 M Histamin, pH 7,4

0,5 mM Carbachol, pH 7,4

2.1.1.2 Präparation von apikalen und basolateralen Membranen sowie der Tubulocisternae der Zellen der Magenmukosa der Ratte.

Die Präparation wurde in Anlehnung an Reenstra und Forte (1990), Crothers et al. (1993), Peng et al. (1997), Calhoun et al. (1998), Fährmann et al. (2002) und Karvar et al. (2002) durchgeführt. Acht männliche Ratten bekamen 24 *h* vor Versuchsbeginn keine Nahrung angeboten hatten aber freien Zugang zu Trinkwasser. Zur Präparation von Membranen unstimulierter Zellen wurde die Vorgehensweise von Fährmann et al. (2002) gewählt. Zur Membranen-Präparation stimulierter Zellen wurde die Vorgehensweise, beschrieben von Reenstra und Forte (1990) für Histamin-stimulierte Membranen und von Fährmann et al. (2002) für Carbachol-stimulierte Membranen angewandt. Die Ratten wurden mit Ketanest/Rompun perichondral narkotisiert und per zervikaler Dislokation getötet.

Die abgeschabte Magenmukosa wurde in eiskalten MSEP-Puffer gegeben und für 5 min auf Eis sedimentieren lassen. Der Überstand wurde abgossen und die Mukosa in 25 Vol./g Mukosa (~ 1 g/Ratte) MSEP-Puffer aufgenommen. Die Mukosa wurde mit Hilfe einer sterilen Schere zerkleinert und anschließend 20× bei 200 U min⁻¹ mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert und bei 50×g für 5 min zentrifugiert (Heraeus Sepatech). Dieses Vorgehen wurde noch zweimal wiederholt. Die Überstände wurden zusammengegeben, als S₀ („postnuklearer Überstand“) deklariert und dann differentiell bei 1.000×g für 10 min (P₁, AP/SA), 30.000×g für 40 min (P₂, BLM) und 100.000×g für 60 min (P₃, TC) zentrifugiert. Die daraus resultierenden Pellets wurden gesichert und für die Anreicherungen der jeweiligen Membran-Fraktion weiterverwendet.

P₁, in dem große zelluläre Strukturen inklusive der Zellkerne und der Plasmamembran enthalten waren (Karvar et al., 2002), diente zur Gewinnung von SA und AP (Peng et al., 1997). Dazu wurde das Pellet in SM-Puffer plus 12 % Ficoll (Endkonzentration)

homogenisiert (Glas-Teflon-Potter: $15 \times 500 \text{ U min}^{-1}$) und auf zwei 18 %ige-Ficoll-Kissen in Ultra-Clear-Röhrchen (Beckmann) verteilt. Überschichtet wurde mit SM-Puffer. Anschließend wurde dieser Zweiphasen-Gradient bei $126.000 \times g$ für 2 h in einem SW 41-Rotor (UZ: L8 70) zentrifugiert. Nach ungebremstem Auslaufen des Rotors ($\sim 45 \text{ min}$) wurden von allen Phasen Aliquots mit Hilfe einer gekühltem Pasteurpipette abgenommen Die Interphasen wurden gesammelt und in einem TLA.100.3 bei $200.000 \times g$ für 60 min pelletiert.

P₂, in dem sich neben Mitochondrien (Karvar et al., 2002) auch hauptsächlich BLM befinden, wurde anschließend in SM-Puffer resuspendiert (Glas-Teflon-Potter: $15 \times 1000 \text{ U min}^{-1}$) und auf zwei 2,5 ml umfassende 20 %ige Ficoll-Kissen, die in Ultra-Clear-Röhrchen gegeben wurden, pipettiert. Dieser Stufen-Gradient wurde bei $126.000 \times g$ für 2 h zentrifugiert. Nach ungebremstem Auslaufen des Rotors ($\sim 45 \text{ min}$) wurden von allen Phasen Aliquots mit Hilfe einer gekühlten Pasteurpipette abgenommen. Die Interphase (2 ml) enthielt die angereicherten basolateralen Membranen, die mit Resuspensionspuffer 1:4 verdünnt, auf Dickwand-Polycarbonat-Röhrchen verteilt und anschließend bei $200.000 \times g$ für 60 min in einem TLA.100.3 zentrifugiert wurden. Das daraus resultierende Pellet wurde in 1 ml SM-Puffer aufgenommen und auf einen kontinuierlichen 20-50 %igen (w/v) Saccharose-Gradienten, der mit einer Peristaltikpumpe und einem Gradientenmischer vorher von unten nach oben geschichtet wurde, bei $126.000 \times g$, für 16 h in einem SW41-Rotor zentrifugiert. Am nächsten Morgen wurde der Gradient nach ungebremstem Auslaufen des Rotors mit Hilfe einer Spinalnadel von unten nach oben in 24 Fraktionen á 300 μl abgesaugt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Dickwand-Polycarbonat-Röhrchen gegeben, 1:8 verdünnt Verdünnung und bei $200.000 \times g$ für 60 min pelletiert.

P₃, in dem sich vorwiegend endoplasmatische Anteile und die TC befanden (Karvar et al., 2002), wurde in 1 ml SM-Puffer aufgenommen. 10 bis 20 mg Protein wurden auf einem

kontinuierlichen 13-50 %igen (w/v) Saccharose-Gradienten aufgelegt. Nach Zentrifugation bei $126.000\times g$ für 16 h in einem SW-41 Rotor (UZ: L8-70M) wurde der Gradient in 24 Fraktionen á 300 μ l abgenommen. Alle Fraktionen wurden hinsichtlich der H^+/K^+ - und Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität untersucht.

2.1.1.3 Präparation von basolateralen Membranen der Zellen der Magenumukosa des Kaninchens

BLM des Kaninchenmagens wurden entsprechend dem Protokoll von Lamprecht et al. (1993) hergestellt. Die Narkose wurde mit 0,5 mg Atropin, 100 mg Ketamin und 8 mg Rompun eingeleitet. Das Tier wurde anschließend durch eine Überdosis Trapanal getötet. Der Magen wurde entnommen, geöffnet und gewaschen. Die abgeschabte Magenumukosa wurde dazu in isotonischem SM-Puffer homogenisiert. Um Zellbruchstücke und Zellkerne zu entfernen wurde das Homogenat dreimal bei $120\times g$ für 10 min zentrifugiert. Die daraus resultierenden Überstände wurden vereinigt und als S_0 deklariert. Dieser Überstand wurde bei $30.000\times g$ für 40 min zentrifugiert. Das Pellet (P_2) wurde anschließend in SM-Puffer resuspendiert und auf einen 20 %igen Ficoll-Stufengradienten gelegt und bei $126.000\times g$ für 90 min zentrifugiert. Die Interphase wurde abgesaugt, verdünnt und bei $100.000\times g$ für 60 min pelletiert. Dieses Pellet wurde in SM-Puffer resuspendiert und auf einem kontinuierlichen Saccharose-Gradienten von 20 -50 % aufgelegt. Dieser Gradient wurde bei $126.000\times g$ für 16 h in einem SW28-Rotor zentrifugiert und in 16 Fraktionen á 1,5 ml abgesaugt. Die Anreicherung der BLM wurde mit Immunoblots gegen Leitenzyme und Messungen der Aktivität bestimmter Referenz-Enzyme bestimmt.

2.1.1.4 Präparation von apikalen Membranen und Tubulocisternae der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens.

AP, SA und TC der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens wurden entsprechend dem Protokoll von Reenstra und Forte (1990) und Crothers et al. (1993) mit leichten Modifikationen beschrieben von Fähmann et al. (2002) und Karvar et al. (2002) hergestellt. Die Vorgehensweise ähnelte derer, welche für die Herstellung der Zellmembranen der Magenmukosa der Ratte schon beschrieben wurde. S_0 wurde differenziert mit $4.300\times g$ für 10 min (P_1 , AP/SA), $14.600\times g$ für 40 min (P_2) und $100.000\times g$ für 60 min (P_3 , TC) zentrifugiert. Die daraus resultierenden Pellets wurden gesichert und für die Anreicherungen der jeweiligen Membran-Fraktion weiterverwendet. Der $100.000\times g$ Überstand wurde als S_3 (Zytosol) gesichert. SA und AP wurden wie im Detail bei Reenstra und Forte (1990) beschrieben aus P_1 gewonnen. TC stark angereichert in H^+/K^+ -ATPase-Aktivität, wurde aus P_3 nach kontinuierlicher Saccharose-Gradienten Zentrifugation (13 – 50 %) gewonnen. Der Gradient wurde bei $126.000 \times g$ für 16 h in an SW28-Rotor zentrifugiert. In diesem Fall wurden 16 Fraktionen gesammelt. Die Qualität der SA oder TC wurde mit Immunoblots und Messungen der Aktivität bestimmter Leitenzyme bestimmt und mittels Immunpräzipitationen weiter angereichert.

2.1.2 Leitenzymatische Messungen

2.1.2.1 Messung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität nach Lamprecht et al. (1993).

Als Leitenzym für BLM diente die Na^+/K^+ -ATPase (Culp und Forte, 1981), deren Enzymaktivität durch das unten beschriebene Verfahren standardmäßig in unserem Labor bestimmt wurde. Die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität ist nach Esman (1988) definiert als Ouabain-sensitive Hydrolyse von ATP in Gegenwart von Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} -Ionen.

Reaktionspuffer nach Esmann (1988):

30 mM Imidazol/HCl pH 7,2 mit \pm 25 mM KCl, 5,6 mM MgCl₂, \pm 130 mM NaCl, 0,4 mM EGTA

Stammlösungen:

14 mM g-Strophanthin in Ethanol

42 mM Na-ATP in 2 M Imidazol/Milli-Q-Wasser, pH 7,4

10 % (w/v) Ammoniummolybdat in Milli-Q-Wasser

20 % (w/v) SDS in Milli-Q-Wasser

Stopp-Lösung (Lösung 1):

3,0 g Ascorbinsäure, 3,0 g Ascorbinsäure plus 50,0 ml 1 N HCl plus 35,0 ml Milli-Q-Wasser plus 5 ml Ammoniummolybdat-Stammlösung plus 15 ml SDS-Stammlösung

Phosphat-Bestimmung nach Forbush III (1982):

Lösung 2: 2 % (w/v) Na-Arsenit; 2 % (w/v) Na-Citrat; 2 % (w/v) Essigsäure

Die ATP- bzw. g-Strophanthin-Stammlösungen wurden am Versuchstag frisch angesetzt. Ebenso die Lösung 2, die durch Mischen der verschiedenen Stammlösungen einen gelben Farbumschlag erfuh. Nach dem Protokoll von Lamprecht et al. (1993) wurden je Ansatz (Dreifachbestimmung) 6,25 μ g Protein für den Enzymtest verwendet. Diese Proteinmenge wurde 100 μ l aufgefüllt und zu 500 μ l auf 37°C vorgewärmten Reaktionspuffer gegeben. Pro Ansatz wurden je drei Probenröhrchen mit 50 μ l g-Strophanthin-Lösung versetzt, zu den verbleibenden Ansätzen gab man 50 μ l Ethanol. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 50 μ l ATP-Lösung gestartet, sorgfältig gevortext und für 7 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml eiskalter Lösung 1 gestoppt und anschließend für 6 min bei 4°C kaltgestellt. Die Phosphat-Determinierung geschah nach dem Protokoll von Forbush III (1983). Dazu wurden 1500 μ l der Lösung 2 mit dem gesamten Ansatz (1700 μ l) gemischt und nach 10 min bei 705 nm photometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Na⁺/K⁺-

ATPase-Aktivität wurden die Extinktionen der g-Strophanthin-haltigen Ansätze von denen der g-Strophanthin-freien Ansätze subtrahiert (Lamprecht et al., 1993). Zur Kontrolle wurden Leerwerte ohne Protein mitgeführt.

2.1.2.2 Messung der g-Strophanthin-insensitiven-K⁺-abhängigen Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (K⁺-pNPPase) modifiziert für Mikrotiterplatten.

Zur Bestimmung der Anreicherung der H⁺/K⁺-ATPase wurde in unserem Labor die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (K⁺-pNPPase) nach Hirst and Forte (1985), Reenstra und Forte (1990) und Crothers et al. (1993) eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass die K⁺-stimulierte pNPPase-Aktivität eine Teilreaktion der H⁺/K⁺-ATPase ist und dass zwischen der K⁺-stimulierten pNPPase und der ATPase-Aktivität eine exzellente Korrelation besteht (R²=0,92). K⁺-stimulierte pNPPase Aktivität ist direkt proportional zur H⁺/K⁺-ATPase-Aktivität (Hirst and Forte, 1985). Diese Methode bot sich an, da pNPP nicht von F- und V-Typ ATPasen hydrolysiert wird. Zudem konnte die Hydrolyse durch die Na⁺/K⁺-ATPase durch Ouabain gehemmt werden, ohne dabei die H⁺/K⁺-ATPase zu beeinflussen. Weiterhin waren keine Ionophoren notwendig, da die K⁺- und die pNPP-Bindestelle auf der gleichen Membranseite liegen.

Kalium-haltiger Puffer

10 mM PIPES/Tris pH 6,7 mit 5 mM MgSO₄, 1 mM g-Strophanthin, 120 mM KCl

Kalium-freier Puffer

10 mM PIPES/Tris pH 6,7 mit 5 mM MgSO₄, 1 mM g-Strophanthin

pNPP-Stammlösung

100 mM p-Nitrophenylphosphat (pNPP)

Stopp-Lösung

10 N NaOH

Der Enzymtest wurde unter hypo-osmolaren Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 6,25 µg Protein mit MSEP-Puffer auf 75 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde dem Gemisch entweder 20 µl auf 37°C vorgewärmten K⁺-haltiger- oder K⁺-freier Puffer hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 5 µl pNPP-Stammlösung (Endkonzentration: 5 mM) gestartet und für 5 bis 10 min bei 37°C durchgeführt. Gestoppt wurde mit 10 µl 10 N NaOH (Endkonzentration: 1 N). Eine photometrische Auswertung fand bei 405 nm statt.

2.1.2.3 Bestimmung des Anreicherungsfaktors.

Der Anreicherungsfaktor der jeweiligen Membran-Fraktion wurde auf den postnuklearen Überstand (S₀) (Abbildung 6, gelbes Feld) bezogen. Die spezifische Enzymaktivität des jeweiligen Leitenzyms in S₀ wurde dabei als 1 angenommen und die spezifische Enzymaktivität des Leitenzyms in den zu untersuchenden Fraktionen dazu in Bezug gesetzt. Diese Vorgehensweise war bei beiden leitenzymatischen Messungen identisch.

2.1.3 Immunpräzipitation von angereicherten Membranen.

Angereicherte SA, BLM und TC wurden entsprechend dem Protokoll von Peng et al. (1997) immunisoliert. Die eisenhaltigen Beads (Dynabeads M 280, 6-7 x 10⁸ beads ml⁻¹) waren entweder verbunden mit Ziege-Anti-Kaninchen IgG oder Kaninchen-Anti-Maus IgG und wurden je nach primären Antikörper eingesetzt. TC und SA wurden immunisoliert gegen Maus-Anti-H⁺K⁺-ATPase (monoklonal), Kaninchen-Anti-Kir4.1 (polyklonal) oder Ziege-Anti-KCNQ1 (polyklonal).

2.1.3.1 Immunpräzipitation von H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden Tubulocisternae nach Crothers et al. (1993), Peng et al. (1997), Calhoun et al. (1998) und Fährmann et al. (2002).

Mittels Immunoblotting und K^+ -pNppase-Assay konnte aus dem kontinuierlichen Saccharose-Gradienten die Fraktion mit der höchsten Anreicherung der H^+/K^+ -ATPase-Aktivität ermittelt werden. Die reale Menge an H^+/K^+ -ATPase in dieser Fraktion wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Dazu wurden 10 μ g der TC mit fest definierten Mengen BSA (1 - 5 μ g) in einem Gel aufgetrennt, mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und densitometrisch verglichen. Zur Immunpräzipitation wurden mindestens 10 μ g H^+/K^+ -ATPase pro Ansatz eingesetzt (Abbildung 11 B).

Der Ablauf der Immunpräzipitation gestaltete sich wie folgt: Die Dynabeads ($6-7 \times 10^8$ beads ml^{-1}) oder Protein A/G Beads wurden mit dem entsprechenden H^+/K^+ -ATPase-Antikörper zusammengegeben und für mindestens 2 h bei 4°C auf einem „Kopf-über-Kopf-Schüttler“ inkubiert. Um sicherzustellen, dass möglichst alle Bindungsstellen an den Dynabeads mit dem H^+/K^+ -ATPase-Antikörper belegt wurden, wurde der Antikörper im Überschuss dazu gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Dynabeads mit Hilfe eines Magneten pelletiert. Das so erhaltene Pellet bestand aus Dynabeads- H^+/K^+ -ATPase-Antikörper-Komplexen.

Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden zur selben Zeit TC (100 μ g) mit Dynabeads (50 μ l) oder Protein A/G Beads vorinkubiert. Anschließend wurde diese Fraktion über Nacht mit den Beads- H^+/K^+ -ATPase-Antikörper-Komplexen inkubiert. Nach mindestens 12 h Inkubationszeit wurden die Dynabeads mit Hilfe eines Magneten pelletiert oder die Protein A/G Beads abzentrifugiert. An den Beads waren nun neben dem H^+/K^+ -ATPase-Antikörper auch hochspezifisch H^+/K^+ -ATPase-enthaltende TC gebunden, die in

Probenpuffer nach Laemmli et al. (1976) aufgenommen wurden. Die weitere Anreicherung der TC wurde densitometrisch bestimmt (Abbildung 11A, C). Als Kontrolle wurde immer ein Ansatz Membran mit Beads inkubiert, die nicht an einen primären Antikörper gekoppelt waren. Dies zeigte den unspezifischen Hintergrund auf, der vernachlässigbar schwach war (Abbildung 10 C, Spur C).

2.1.3.2 Immunpräzipitation von H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden stimulus-assoziierten Membranen.

Die Vorgehensweise war fast identisch mit der Immunpräzipitation von H^+/K^+ -ATPase enthaltenden TC (Vgl.: 2.1.3.1). Der einzige Unterschied lag darin, dass zur Isolierung die SA-Fraktion verwendet wurde. Eine weitere Anreicherung konnte densitometrisch nachgewiesen werden.

2.1.3.3 Immunpräzipitation von Kir4.1-enthaltenden Tubulocisternae und stimulus-assoziierten Membranen.

Die Vorgehensweise war fast identisch mit den schon beschriebenen Immunpräzipitationen (Vgl.: 2.1.3.1, 2.1.3.2). Der einzige Unterschied lag darin, dass zur Isolierung ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Kir4.1 Antikörper nach dem Protokoll von Poopalasundaram et al. (2000) verwendet wurde. Die Beads-Kir4.1-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit angereicherten TC oder SA zusammengeben.

2.1.3.4 Immunpräzipitation von KCNQ1-enthaltenden Tubulocisternae und stimulus-assoziierten Membranen.

Die Vorgehensweise war fast identisch mit den schon beschriebenen Immunpräzipitationen (Vgl.: 2.1.3.1, 2.1.3.2, 2.1.3.3). Der einzige Unterschied lag darin, dass zur Isolierung ein polyklonaler Anti-KCNQ1 Antikörper mit den entsprechenden Beads vorinkubiert wurde. Die Beads-KCNQ1-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit angereicherten TC oder SA zusammengeben.

2.1.3.5 Immunpräzipitation von Na⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden basolateralen Membranen.

Na⁺/K⁺-ATPase-angereicherte BLM (Ratte) wurden gegen Maus-Anti-Na⁺/K⁺-ATPase exakt entsprechend dem Herstellerprotokoll immunisiert.

2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.1.4.1 Verwendete Lösungen.

5×Probenpuffer nach Laemmli et al. (1976)

312,5 mM Tris/HCl pH 6,8 mit 25 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 25 % (v/v)

Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Acrylamid-Lösungen:

Rotiphorese Gel 30-Lösung (30%ige (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung)

29,2 % (w/v) 4 fach kristallines 40%iges (w/v) Acrylamid (Serva, Art. Nr. 10677, 942 ml)

0,8 % (w/v) 2fach kristallines N,N'-Methylenbisacrylamid 2× reinst. (Serva, Art. Nr. 29195)

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8 mit 0,4 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8 mit 0,4 % (w/v) SDS

APS:

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

TEMED:

N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin

Laufpuffer:

25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 192 mM Glycin,

Transferpuffer:

48 mM Tris, 30 mM Glycin, 0,037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Färbelösung:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau, 50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

7 % (v/v) Essigsäure, 35 % (v/v) Methanol

Strippuffer:

25 mM Glycin/HCl pH 2,0 mit 1 % (w/v) SDS

2.1.4.2 Proteinbestimmung.

Proteinkonzentrationen wurden entsprechend dem Protokoll nach Bradford (1976), modifiziert durch Stoschek (1990), bestimmt. BSA (Sigma P7656) wurde zur Kalibrierung benutzt (Kaufhold, 2001). Zusätzlich wurde zur Kontrolle die reale Proteinmenge im SDS-Gel nach Coomassie Brilliant Blau Färbung densitometrisch mit SigmaGel kontrolliert.

2.1.4.3 Denaturierende Proteinfällung modifiziert nach Wessel und Flügge (1984).

Zur Konzentrierung und zum Entsalzen von Proteinlösungen wurde die Fällungsmethode nach Wessel und Flügge (1984) angewandt (Kaufhold, 2001). Das Pellet wurde in Probenpuffer nach Laemmli et al. (1976) aufgenommen und in der SDS-PAGE getrennt.

2.1.4.4 Durchführung der SDS-PAGE.

SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde entsprechend dem Protokoll nach Laemmli et al. (1976) modifiziert durch Fährmann et al. (1998, 1999, 2002, 2003) durchgeführt. Die Membranen wurden in Probenpuffer solubilisiert und auf einem 12,5% (w/v) Acrylamid/ 2,67% (w/v) Bisacrylamid SDS-PAGE getrennt (25 mA Gel⁻¹, 60 min). Anschließend wurde das Gel auf eine mit Methanol voraktivierte und in Transferpuffer inkubierte PVDF-Membran nach Towbin et al. (1979) transferriert (150 mA Gel⁻¹, 60 min) oder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

2.1.4.5 Anfärbung Proteine im SDS-Gel durch Coomassie Brilliant Blau.

Das SDS-Gel wurde für 30 min in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung inkubiert und anschließend in spezieller Entfärber-Lösung entfärbt. Damit man eine gleichmäßige Färbung oder Entfärbung bekam, wurde das Gel während der Inkubationszeiten auf einen Taumeltisch (Frequenz: 10 min⁻¹) gestellt.

2.1.5 Proteinnachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Für einen Nachweis der im SDS-Gel getrennten Proteine mit Antikörpern wurden die PVDF-Membranen zweimal in TBS plus 0,1 % Tween 20 (TTBS) gewaschen und anschließend in TTBS plus 2 % (w/v) Skim Milk (Fluka) für 1 h inkubiert. Nach

wiederholtem Waschen wurden die Membranen mit der primären Antikörper Verdünnung inkubiert (1 *h*, Raumtemperatur oder über Nacht 4°C). Daraufhin wurden die Blots wieder gewaschen und mit der sekundären Antikörper Verdünnung für 1 *h* bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperreaktion wurde über die ECL-Detektion visualisiert (Kaufhold, 2001, Examensarbeit).

Nachdem die Detektion abgeschlossen war, konnte man die Membran zur wiederholten Antikörperreaktion oder zur Anfärbung vorbereiten. Dazu wurden die an die Membran gebundenen primären und sekundären Antikörper durch Inkubation für 30 *min* in Strippuffer abgelöst. Anschließend wurde die Membran für zweimal 10 *min* mit Aqua dest. gewaschen.

2.1.6 Phosphorylierungs-Studien mit γ -[³²P]-ATP.

Radiochemikale

γ -[³²P]-ATP, 10 μ Ci/ μ l

ATP-Stammlösung

12,5 μ M ATP; 12 mM ATP pH 7,4.

Ca²⁺-haltiger Proteinkinase-Puffer:

20 mM Hepes/ NaOH pH 7,2 mit 12 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,2 mM CaCl₂, 3 mM DTT

Calyculin A haltiger Proteinkinase-Puffer:

20 mM Hepes/ NaOH pH 7,2 mit 12 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,2 mM CaCl₂, 60 nM

Calyculin A, 3 mM DTT

EGTA-haltiger Proteinkinase-Puffer

20 mM Hepes/ NaOH pH 7,2 mit 12 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 3 mM DTT

cAMP-haltiger Proteinkinase-Puffer

20 mM HEPES/ NaOH pH 7,2 mit 12 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 15 μM cAMP, 3 mM DTT

Pharmakologisch wirksame Agenzien:

TPA (0,1 μM), Ro-31-8220 (10 μM), Gö 6976 (10 μM), KN-62 (10 μM)

SA, TC oder PZ_M wurden in oben genannten Proteinkinase-Puffer wie beschrieben in Kaufhold (2001) für 5 min inkubiert. Die Aktivität der unterschiedlichen untersuchten Proteinkinasen (CaMKII, PKC-α und PKA) wurde mit den pharmakologisch wirksamen Agenzien moduliert. Dazu wurden die gastrischen Membranen für 15 min in den Proteinkinase-spezifischen pharmakologisch wirksamen Agenzien inkubiert. Die Phosphorylierungs-Reaktion wurde durch Zugabe von γ-[³²P]-ATP (2 μM, Endkonzentration pH 7,4) oder durch Na₂-ATP (2 mM, Endkonzentration pH 7,4) bei Raumtemperatur gestartet und für 10 min durchgeführt. Gestoppt wurde die Reaktion durch Probenpuffer nach Laemmli (1976). Diese Ansätze wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Danach folgte eine Coomassie Brilliant Blau-Färbung der Gele. Diese gefärbten Gele wurden in 7 %iger Essigsäure gewaschen und mit Hilfe eines Gelrockners bei 75°C für 150 min getrocknet.

Je nach Intensität der Strahlung, wurde ein X-Ray Hyperfilm zwischen 24 bis 72 h aufgelegt. Die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet. Die Zu- bzw. Abnahme der Phosphorylierung wurde in willkürlichen Einheiten (Arbitrary Units) bezogen auf die Kontrolle (100 %) dargestellt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge pro Spur wurde das getrocknete und gefärbte Gel digitalisiert und die prominente Bande der H⁺/K⁺-ATPase (94 kDa) zusätzlich densitometrisch ausgewertet.

2.2 Molekularbiologische Methoden.

2.2.1.1 Verwendete Lösungen.

SOC-Puffer

20 g Bakto-Tryptone, 5 g Bakto-Hefe Extrakt, 0,5 g NaCl, 20 mM Glukose, + 10 ml 250 mM KCl, + 5 ml 2 M MgCl₂ pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen

TAE-Puffer

39,6 mM Tris/ NaOH pH 8 mit 1 mM EDTA, 1,14 % (v/v) Essigsäure

TE-Puffer

10 mM Tris/ NaOH mit 1 mM EDTA

Puffer I:

20 mM Tris, 10 mM EDTA

Puffer II

0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS

Puffer III

60 % K-Azetat (5 M), 11,5 % (v/v) Eisessig

LB-Medium

20 % (w/v) LB Broth base in Aqua dest.

Probenpuffer 10fach für DNS

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % (w/v) Sucrose in H₂O

Kanamycin-Stocklösung

25 mg ml⁻¹ in Aqua dest.

2.2.1.2 Konstruktion der verschiedenen Plasmide.

N-terminale Fusions-Konstrukte der Kir-Kanäle wurden durch Einsetzen der speziellen Kir4.1-cDNS in den Leserahmen des eukaryontischen Expressions-Plasmids

(EGFP-C1, Vgl.: 1.9) erstellt. Dies geschah mit den EcoRI und BamHI Restriktionsstellen beschrieben durch Stockklausner und Kloecker (2003). Die Expression der Fusionsproteine konnte einerseits mit einem spezifischen Maus-Anti-GFP-Antikörper durch Immunoblots (Stockklausner et al., 2001) und durch Konfokale Mikroskopie gezeigt werden.

2.2.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli*.

Die Zellen wurden zuvor durch Behandlung mit Ca^{2+} kompetent gemacht und bei -80°C gelagert. Nur geschlossene Plasmide, nicht aber lineare, können in den Zellen vermehrt werden. Auf dem Plasmid befindet sich ein Kanamycin-Resistenzgen, welches es den transformierten Zellen erlaubt, in Kanamycin-haltigem Medium zu wachsen. Diese Zellen bilden auf einer Agarplatte Kolonien, die alle von einer einzelnen Zelle abstammen. $2\ \mu\text{l}$ der Ligations-Ansätze wurden zu $100\ \mu\text{l}$ kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min unterworfen und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Sodann wurden $250\ \mu\text{l}$ SOC-Puffer dazugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen auf Agarplatten mit $25\ \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C . Am nächsten Morgen konnten die Klone erkannt und gesammelt werden.

2.2.1.4 Kleine Plasmid-Präparation (Minipräparation).

Die Plasmid-Isolierung geschah durch alkalische Lyse der Bakterienzellen und anschließende Fällung der Plasmide mit Ethanol. Am Abend vor der geplanten Präparation wurden Bakterienkulturen angeimpft, in dem einzelne Klone mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in ein Glasröhrchen mit 2 ml LB-Medium plus $25\ \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin überführt wurden. Diese wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden $500\ \mu\text{l}$ für die Maxipräparation (Vgl.: 2.2.1.6) abgenommen und auf Eis

gestellt. 1,5 ml der Kultur wurden bei 6.000 U min^{-1} zentrifugiert, abgesaugt und die Zellen in 100 μl Puffer I aufgenommen. Danach wurden 200 μl Puffer II zugegeben und die Lösungen gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 150 μl Puffer III hinzugefügt und kurz gevortext. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde bei $12.000 \text{ U min}^{-1}$ zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmide befanden, wurde abgenommen und mit 1 ml 100 % Ethanol versetzt. Nach 5 min auf Eis wurden die Plasmide bei $12.000 \text{ U min}^{-1}$ für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und wie o.g abzentrifugiert, getrocknet und in 20 μl TE Puffer plus $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase aufgenommen. Jeweils 5 μl der isolierten Plasmide wurden auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und analysiert.

2.2.1.5 Agarose-Gel-Elektrophorese.

DNS-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch der Grösse nach aufgetrennt. Dazu wurde 1 Gramm Agarose unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten konnte das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und beladen werden.

2.2.1.6 Große Plasmid-Präparation (Maxipräparation).

Um genügende Mengen des gewünschten Plasmids zur Transfektion von Säugerzellen isolieren zu können, wurden 0,5 ml der Kultur des gewünschten Klons verwendet um damit 100 ml LB Medium plus $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin anzuimpfen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Aliquots wurden zur Kontrolle gesammelt und zur Analyse und anschließend mit Hilfe eines 1 %igem (w/v) Agarosegels in TAE-Puffer getrennt.

Zur Bestimmung der DNS-Konzentration wurde die OD bei 280 und 260 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration geschah nach folgender Regel: $OD(260) = 1$, entspricht einer DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Der Quotient $OD(260) / OD(280)$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (1,88 Kir4.1-wt; 1,86 EGFP-Kir4.1). Die so gereinigten Kir4.1-Plasmide wurden zur Transfektion von PZ und AGS-Zellen verwendet.

2.3 Immunhistochemie.

2.3.1.1 Verwendete Lösungen.

OCTTM compound

Fixierungs-Lösungen:

1 % (v/v) Aceton

eiskaltes Methanol

Blockierungs-Lösung:

PBS mit 2 % (v/v) NGS, 2 % (v/v) NDS, 1 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Nonidet P40, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,05 % (v/v) Tween-20, 0,05 % (w/v) Na-Azid

Blockierungs-Lösung 2:

PBS mit 3 % (v/v) NGS, 3 % (v/v) NDS

2.3.1.2 Durchführung.

Stimulierte- und unstimulierte Kryoschnitte des Rattenmagens wurden wie folgt erstellt. Die Ratten wurden über Nacht auf Diät gesetzt, mit Ketamin/Rompun narkotisiert und entsprechend dem Protokoll von Reenstra und Forte (1990) und Fähmann et al. (2002) behandelt (Vgl.: 2.1.1.2). Der Magen wurde in eiskaltem „OCTTM-compound“ auf Trockeneis inkubiert und anschließend bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden $7 \mu\text{m}$ -Schnitte mit einem Mikrotom erstellt. Diese wurden anschließend mit 1 % (v/v) Aceton (1 min), eiskaltem Methanol (5 min) oder nach Dedek and Waldegger (2001) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in für 20 min

Blockierungs-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern. Die Verdünnungen wurden in PBS angesetzt und waren: Maus-Anti- H^+/K^+ -ATPase (β -Untereinheit, monoklonal) 1:5, Kaninchen-Anti- H^+/K^+ -ATPase (α -Untereinheit, polyklonal) 1:20, Kaninchen-Anti-Kir4.1 1:10 - 1:200 (polyklonal, Stockklausner et al., 2001), Ziege-Anti-KCNQ1 (polyklonal) 1:10, Kaninchen-Anti-aktivierte-CaMKII (polyklonal) 1:10 und Maus-Anti-PKC- α (monoklonal) 1:5. Die Inkubation mit den primären Antikörpern geschah für mindestens 1 h. Nach wiederholtem Waschen mit PBS konnten nun auch Mehrfachfärbungen mit weiteren primären Antikörpern vorgenommen werden.

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Kryoschnitte für 15 min mit Blockierungs-Lösung 2 inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Ziege-Anti-Kaninchen IgG-, Ziege Anti-Maus IgG- und Esel-Anti-Ziege IgG Antikörper, welche entweder mit Alexa Fluor 546 (Absorptionsmaximum 556 nm, Emissionsmaximum 573 nm), Alexa Fluor 488 (Absorptionsmaximum: 495 nm, Emissionsmaximum: 519 nm) oder Alexa Fluor 633 (Absorptionsmaximum: 632 nm, Emissionsmaximum: 647 nm) konjugiert waren, verwendet.

2.4 Zellbiologische Methoden.

2.4.1 Primäre Zellkultur der Parietalzellen der Ratte.

PZ aus dem Rattenmagen wurden entsprechend dem Protokoll von Lewin et al. (1976) und Lambrecht et al. (2005) mit leichten Modifikationen publiziert für PZ des Kaninchens von Zhou et al. (2003), Karvar et al. (2002), Agnew et al. (1999) und Chew et al. (1998) hergestellt. Weitere Modifizierungen sind im Detail beschrieben.

2.4.1.1 Verwendete Lösungen.

Medium A: 50 mM HEPES/ NaOH pH 7.8 mit 0,5 mM NaH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaHCO₃, 70 mM NaCl, 5 mM KCl, 11 mM Glukose, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 2 % (w/v) BSA, 0,25 mg ml⁻¹ Sojabohnen Trypsin Inhibitor, 10 U ml⁻¹ Penicillin/Streptomycin

Medium B: 50 mM HEPES/ NaOH pH 7.4 mit 0,5 mM NaH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaHCO₃, 70 mM NaCl, 5 mM KCl, 11 mM Glukose, 1 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 2 % (w/v) BSA, 0,25 mg ml⁻¹ Sojabohnen Trypsin Inhibitor, 10 U ml⁻¹ Penicillin/Streptomycin

Waschmedium:

DMEM-Ham's F-12, 20 mM HEPES pH 7,4 mit 0,2% (w/v) BSA, 10 mM Glukose, 100 U ml⁻¹ Penicillin/Streptomycin, 400 µg ml⁻¹ Gentamycin Sulfat, 20 µg ml⁻¹ Novobicin, 5 µg ml⁻¹ Geneticin, 10 µg ml⁻¹ Phenolrot.

Zellkulturmedium:

DMEM-Ham's F-12, 20 mM HEPES/ NaOH pH 7,4 mit 10 mM Glukose, 0,2 % (w/v) BSA, 100 U ml⁻¹ Penicillin/Streptomycin, 400 µg ml⁻¹ Gentamycin Sulfat, 20 µg ml⁻¹ Novobicin, 5 µg ml⁻¹ Geneticin, 10 µg ml⁻¹ Phenolrot), 800 nM Insulin, 5 µg ml⁻¹ Transferrin, 5 ng ml⁻¹ Natrium-Selenit, 10 nM Hydrocortison, 8 nM EGF

Trypan-Blau-Färbelösung

0,9% (w/v) NaCl, 0,4 % (w/v) Trypan Blau

NBT-Färbelösung

0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,6 mit 0,2 M Natrium-Succinat, 1 mg ml⁻¹ Nitroblau Tetrazolin

NBT-Kontroll-Lösung

0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,6 mit 0,2 M Natrium-Succinat,

AP-Aufnahme-Medium:

14 mM HEPES, 7 mM Tris pH 7,4 mit 3 mM KH₂PO₄, 3 mM K₂HPO₄, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM Ca-Gluconat, 10 mM Glucose, 1 mM Na-Pyruvat, 120 mM NaCl

Homogenisationspuffer:

40 mM HEPES/ NaOH pH 7,4 mit 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 mM Benzamidin, 5 mM PMSF, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, α -Chymostatin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Pepstatin A

Permeabilisierungs-Lösung:

PBS plus 0,25 % (v/v) Triton X-100 und 0,02 % (w/v) Saponin

Lysispuffer

20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM NaPP_i, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (v/v) Triton x-100, 100 μM Na-Orthovanadat, 2 μM Leupeptin, 10 nM Okadasäure, 1 mM DTT

Zellaufschlusspuffer (ZAP)

20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 100 μM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 10 nM Okadasäure, 10 mM β -Glycerolphosphat, 0,5 mM Pefabloc, 2 μM Leupeptin

2.4.1.2 Isolierung von gastrischen Parietalzellen des Rattenmagens.

Drei Rattenmägen wurden evertiert, mit TBS gewaschen und anschließend mit Medium A plus 1,5 mg ml^{-1} Pronase E gefüllt. Diese „evertierten Magensäcke“ wurden dreimal entsprechend dem folgendem Protokoll weiterbehandelt: Inkubation unter langsamen Rühren in Medium A bei 37°C für 30 min – danach starkes Rütteln in Medium B bei 37°C für 10 min. Während der Inkubationszeiten in Medium B wurden die Zellen gesammelt und lichtmikroskopisch inspiziert. Anschließend wurden die Zellen durch ein 40 μm -Filter steril filtriert. Der resultierende Überstand wurde bei 136 $\times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in sterilem Waschmedium gewaschen und anschließend auf einem sterilen Nycodenz-Stufengradienten (2:1 – 1:1 – 1:2) aufgelegt und 10 min bei 300 $\times g$ zentrifugiert. Die Interphasen wurden gesammelt, lichtmikroskopisch kontrolliert, gepoolt und bei 300 $\times g$ pelletiert.

2.4.1.3 Primäre Zellkultur gastrischer Parietalzellen des Rattenmagens.

Die Zellen wurden für 20 min in Zellkulturmedium mit $25 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Amphotericin B gegeben und auf FCS-beschichteten sterilen Mini-Flaschen ausgesät. Nach der Inkubation bei 37°C wurden die Zellen pelletiert und in Zellkulturmedium gegeben, gezählt und auf Matrigel (1:7-Verdünnung) beschichteten Platten ausgesät. Die Zellen wurden in einem luftbegasteten Brutschrank bei leichtem Überdruck inkubiert. An jedem Kulturtag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Es gab bis zum dritten Kulturtag (72 h) keine Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien. Zusätzlich bestand die Zellkultur am dritten Kulturtag fast ausschließlich aus PZ (~80-90 %).

2.4.1.4 Trypan-Blau Färbung.

Zur Überprüfung der Vitalität der PZ wurde ein Aliquot der PZ direkt nach der Präparation mit Trypan-Blau gefärbt. Die Vitalität der PZ lag bei ~95-99 % nach Trypan Blau Ausschluss.

2.4.1.5 NBT-Test.

Zur Identifizierung der PZ wurde der NBT-Test nach Nachlass et al. (1956) und Terano et al. (1982) eingesetzt. Dazu wurde die PZ für 30 min in NBT-Färbelösung inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem kein NBT eingesetzt wurde. Die PZ wurden durch Blaufärbung sichtbar.

2.4.1.6 Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels [¹⁴C]Aminopyrin-Aufnahme.

Die Säuresekretion der PZ wurde nach 72 h mit Hilfe der [¹⁴C]Aminopyrin-Aufnahme ([¹⁴C]AP-Aufnahme) wie für kultivierte PZ von Dunman et al. (1999) beschrieben, quantifiziert. Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen entfernt und durch O₂-begastes AP-Aufnahme-Medium plus 2 mg ml⁻¹ BSA und 100 nCi well⁻¹ [¹⁴C]AP ersetzt. Die Inkorporation von ¹⁴C wurde in einem Liquid Scintillations-Cocktail und in einem β-Scintillation Counter gemessen. Die basale Säuresekretion wurde durch Inhibierung der Zellen mit Ranitidin (100 μM) ermittelt. Die unspezifische [¹⁴C]AP-Aufnahme wurde durch Blockierung der Säuresekretion mit Omeprazol (10 μM) bestimmt. Der unspezifische Hintergrund der Messung wurde von allen Proben abgezogen. Aliquots des Reaktionsmediums und der Zellen wurden für die [¹⁴C]AP-Messung herangezogen. Diese Daten wurden benutzt um das AP-Aufnahme-Verhältnis festzustellen (Karvar et al., 2002).

2.4.1.7 Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels Acridin Orange-Messungen.

Zur Kontrolle der Säuresekretion der PZ wurden neben [¹⁴C]Aminopyrin-Aufnahmen auch Acridin Orange-Messungen mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops modifiziert nach Lambrecht et al. (2005) durchgeführt. 72 h nach der Präparation wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und durch O₂-begastes AP-Aufnahme-Medium plus 0,2 % (w/v) BSA und 1 bis 10 μM Acridin Orange ersetzt. Die Inkorporation von Acridin Orange in die VAC's der PZ nach Stimulierung wurde durch einen Farbumschlag von grün nach rot sichtbar. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung wurde densitometrisch ausgewertet.

2.4.1.8 Immunfluoreszenz-Analysen.

Kultivierte PZ wurden vor der Fixierung (2 % (w/v) Paraformaldehyd oder eiskaltem Methanol) mit verschiedenen Substanzen behandelt. Zur Stimulierung der Säuresekretion wurden die Zellen 30 min lang mit Histamin (100 μM)/IBMX (30 μM) oder mit Carbachol (100 μM) inkubiert. Zur Inhibierung der Säuresekretion kamen Ranitidin (100 μM) oder Omeprazol (10 μM) zum Einsatz. Die Zellen wurden 4 min in Permeabilisierungs-Lösung inkubiert (Vgl.: 2.4.1.1). Anschließend wurden diese mit PBS gewaschen und wie für die Immunhistochemie beschrieben weiterbehandelt.

2.4.1.9 Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.

Isolierte PZ (5×10^6 Zellen ml^{-1}) wurden in Homogenisationspuffer gegeben und aufgeschlossen (3 \times 3 Impulse, 20 Watt). Das Homogenat wurde für 50 $\times g$ bei 4°C und 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand (S_0) bei 100.000 $\times g$ 4°C für 1 h zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde als Zytosol (S_3) definiert. Das Pellet (P_3) wurde resuspendiert und bei 13.000 U min^{-1} , 4°C und 10 min zentrifugiert. Der Überstand diente als Membran-Fraktion (PZ_M).

2.4.2 Primäre Zellkultur der Parietalzellen der Maus.

Für die primäre Zellkultur der PZ der Maus wurden die für die Zellkultur der Ratte beschriebenen Lösungen verwendet (Vgl.: 2.4.1.1).

2.4.2.1 Isolierung von gastrischen Parietalzellen der Magenumukosa der Maus.

Fünf Mäusemägen wurden evertiert, mit TBS gewaschen und anschließend mit Medium A plus 0,75 mg ml^{-1} Pronase E gefüllt (Hinkle et al., 2003; Samuelson und Hinkle,

2003). Diese „eventierten Magensäcke“ wurden entsprechend dem Protokoll der Isolierung der PZ der Ratte weiterbehandelt (Vgl.: 2.4.1.2, 2.4.1.3, 2.4.1.4, 2.4.1.5, 2.4.1.8).

2.4.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen an kultivierten und fixierten Parietalzellen aus der Magenmukosa der Maus.

Kultivierte PZ des Mäusemagens wurden entsprechend dem Protokoll für Ratten PZ stimuliert und weiterbehandelt (Vgl.: 2.4.1.8).

2.4.3 Primäre Zellkultur der Parietalzellen des Kaninchens.

Für die primäre Zellkultur der PZ des Kaninchens wurden die für die Zellkultur der Ratte beschriebenen Lösungen verwendet (Vgl.: 2.4.1.2).

2.4.3.1 Isolierung von gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens.

Die Isolierung von PZ aus der Magenmukosa des Kaninchens wurde entsprechend dem Protokoll beschrieben von Agnew et al. (1999), Karvar et al. (2002) und Fähmann et al. (2002a, 2002b, 2003) durchgeführt. Nach dem Kollagenase-Verdau (14000 U) in Waschmedium für 30 min bei 37°C wurden die Zellen, wie für die Isolierung der PZ der Ratte beschrieben, weiter behandelt (Vgl.: 2.4.1.2, 2.4.1.3, 2.4.1.4, 2.4.1.5, 2.4.1.8).

2.4.3.2 Transfektion von Kir4.1-cDNA-Konstrukten in kultivierte Parietalzellen.

Kultivierte PZ des Kaninchens wurden transient mit N-terminalen Kir4.1 Fusions-Konstrukten nach Chew et al., (1989, 1999) und Chew (1990) transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente das EffecteneTM Transfection Reagent (Qiagen). Dieses wurde wie vom Hersteller getestet in einem Verhältnis von 1:25 (DNS : Effectene) eingesetzt. Die

Transfektionseffizienz wurde im fluoreszenzmikroskopisch inspiziert. 48 Stunden nach der Transfektion waren bis zu ~40 % der PZ transfiziert.

2.4.3.3 Indirekte Messung der Säureakkumulation mittels [¹⁴C]Aminopyrin-Aufnahme.

Die Säuresekretion der PZ des Kaninchens wurde entsprechend dem Protokoll für PZ der Ratte beschrieben nach 72 h Zellkultur durchgeführt (Vgl.: 2.4.1.6)

2.4.3.4 Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.

Die Auftrennung der PZ des Kaninchens in zytosolische und partikuläre Fraktion (PZ_M) erfolgte wie oben beschrieben für PZ der Ratte (Vgl.: 2.4.1.9).

2.4.3.5 Präparation von Gesamt-Zell-Lysaten aus Parietalzellen des Kaninchens.

Dazu wurden die Zellkulturplatten nach der Inkubation auf Eis abgeerntet. Der Überstand wurde dekantiert und die PZ anschließend mit 2 ml eiskaltem PBS überschichtet und abgeschabt. Die einzelnen Zellkulturschälchen wurden daraufhin mit 2 ml PBS nachgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 1600 U min⁻¹ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS gewaschen und bei 4500 U min⁻¹ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde mit 10 Impulsen bei geringer Wattzahl sonifiziert. Das Homogenat wurde bei 13.000 U min⁻¹ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand (PZ_{Lysat}) wurde zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet.

2.4.4 Gastrisch-mukosale Adenomakarzinom-Zell-Linie (AGS)

2.4.4.1 Verwendete Lösungen.

AGS-Zellmedium

RPMI 1540, 10 % FCS, 100 U ml⁻¹ Penicillin G, 100 µg ml⁻¹ Streptomycin

Transfektions Reagenzien

LipofektaminTM2000

OPTI-MEM

Trypsinlösung

Puffer A: 116 mM NaCl (6,8 g l⁻¹), 26,1 mM NaHCO₃ (2,2 g l⁻¹), 5,36 mM KCl (0,4 g l⁻¹)

Puffer B: 941 mM NaCl (55 g l⁻¹), 67 mM KCl (5 g l⁻¹), 340 mM Na-Citrat (100 g l⁻¹)

Gebrauchslösung: 100 ml Puffer A, 10 ml Puffer B, 0,25 g Trypsin, 0,1 g Glucose

2.4.4.2 Zellkultur der AGS-Zell-Linie.

Die Zellen wurden in sterilen 250 ml-Zellkulturflaschen mit 20 ml AGS-Zellmedium bei 37°C, in einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 98 % inkubiert. Die Zellen wurden nach Bedarf jeden 2. bis 3. Tag geteilt und in neue Flaschen umgesetzt. Dafür wurde das Zellkulturmedium jeder Flaschen dekantiert und die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Danach wurden sie in frischem AGS-Zellmedium resuspendiert und in neue sterile Flaschen ausgesät.

2.4.4.3 Aussaat von Zellen für Zellkultur-Experimente.

Das AGS-Zellmedium jeder Flasche wurde dekantiert und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Die Suspension wurde in Zellkulturmedium resuspendiert, bei 1530 U min⁻¹ und 4°C 5 min zentrifugiert. Eine Bestimmung der Zellzahl geschah mit Hilfe der Turk-

Zählkammer. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypan-Blau-Färbung überprüft (Vgl.: 2.4.1.4).

2.4.4.4 Transfektion von AGS-Zellen.

AGS-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät ($300.000 \text{ Zellen well}^{-1}$) und über Nacht in AGS-Medium inkubiert. AGS-Zellen wurden nach Göoz et al. (2000) transfiziert. Dazu wurden $5 \mu\text{l}$ LipofectaminTM2000 mit $100 \mu\text{l}$ OPTI-MEM gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig erfolgte das Mischen von $2 \mu\text{g}$ DNS mit 100 ml OPTI-MEM. Das DNA-Gemisch wurde schließlich langsam zur Lipofektamin-Lösung dazugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Diese Mixtur wurde nun langsam auf die einzelnen Platten verteilt. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht in OPTI-MEM.

2.4.4.5 Präparation von zytosolischen und partikulären Lysaten.

AGS-Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet. Hinterher wurden diese in ZAP aufgenommen (Vgl.: 2.4.1.9) und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde mit 3×3 Impulsen (20 Watt) sonifiziert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für $50 \times g$ für 5 min bei 4°C . Der Überstand (S0) wurde daraufhin bei $100.000 \times g$ für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde im ZAP plus 1 % (v/v) Triton aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert (15 min Inkubation – Sonifizieren – 15 min Inkubation). Dieses Homogenat wurde anschließend für 10 min bei $13.000 \text{ U min}^{-1}$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand ($\text{AGS}_{\text{Lysat}}$) wurde zur Proteinbestimmung herangezogen.

2.4.4.6 Protein-Isolierung aus EGFP-Kir4.1-transient transfizierten AGS-Zellen.

In AGS-Zellen überexprimiertes EGFP-Kir4.1 wurde mit Hilfe des μ MacsTM Epitope TAG Protein Isolierungs-Kits modifiziert nach dem Hersteller Protokoll angereichert. Die Anti-GFP gekoppelten Microbeads wurden zu den EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Microbeads durch Ultrazentrifugation (TL 100 UZ, 10.000 U min⁻¹, 4°C) pelletiert. Die an die Microbeads gekoppelten Proteine wurden entweder direkt in Probenpuffer aufgenommen oder phosphoryliert oder für Interaktionsstudien mit anderen Proteinen inkubiert.

2.5 Mikroskopie.

2.5.1 Fluoreszenz Mikroskopie.

Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe eine Zeiss HAL100 (KAPPA ACC1) Fluoreszenzmikroskops hinsichtlich der Transfektionseffizienz untersucht. Das Durchlichtbild und das dazugehörige Fluoreszenzbild wurden mit Hilfe der Fluoreszenzsoftware (KAPPA Image Base, Version 2.7.1) digitalisiert. Alle Bilder wurden mit einem 20iger Objektiv aufgenommen.

2.5.2 Konfokale Mikroskopie.

Die immunhistochemischen Kryoschnitte und die Immunfluoreszenz-markierten Zellen wurden mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops (Leica TCS SP2 AOBS), welches ein 63 × 0.9 W HCX APO L-U-V-I Objektiv hatte und der entsprechenden Software (Leica Confocal Software, Version 2.05.1347a) aufgenommen und ausgewertet. Zur Anregung der Alexa Fluor-Farbstoffe wurden die entsprechenden Wellenlängen mit Hilfe der zur Verfügung stehenden LASER (Argon-Krypton 488, Helium-Neon 543, 633) erzeugt. Optische

Aufnahmen durch die z-Achse der PZ wurden in den vom System vorgegebenen optimalen Serien aufgezeichnet. Mehrfachfärbungen wurden gleichzeitig mit Hilfe eines AOBS (Akustisch-Optischer-Strahlteiler) aufgezeichnet und vom System als Overlay Bild dargestellt.

2.6 Auswertung der Daten und Statistik

Die Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Alle Mittelwerte setzten sich aus zwischen drei bis elf unabhängigen Experimenten (n= 3-5) zusammen. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde durch eine Analyse der Varianz (ANOVA) mit dem Dunnett Test ermittelt. Die Wahrscheinlichkeiten wurden wie folgt dargestellt: * oder ⁺ = $P < 0.05$; ** oder ⁺⁺ = $P < 0.01$.

3. Ergebnisse.

Im ersten Teil werden die Ergebnisse hinsichtlich der Lokalisation und des *Traffickings* von Kir4.1 und KCNQ1 in der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens dargestellt, um darauf aufbauend die physiologische Relevanz von Kir4.1 und KCNQ1 und die Regulierung von Kir4.1 im zweiten Teil näher zu betrachten.

3.1 Unterschiede in der Lokalisation und Umverteilung von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens.

Die Lokalisation und Umverteilung von Kir4.1 und KCNQ1 nach Stimulierung der Säuresekretion in den PZ der Magenmukosa der Ratten- und des Kaninchens wurde mittels zellbiochemischer, immunhistochemischer und zellbiologischer Methoden analysiert.

3.1.1 Membran-Fraktionierung der Zellen der Magenmukosa des Rattenmagens.

Um die Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 im Detail zu klären, wurden basolaterale-, apikale- und tubulocisternae-Membran-Fractionen der Zellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens mittels einer Kombination aus differentieller Pelletierungs-, Ficoll-Gradienten- und Saccharose-Gradienten-Zentrifugation voneinander getrennt. Die Reinheit und Qualität der hochangereicherten Membranen wurde mit leitenzymatischen Messungen und in Immunoblots analysiert. Zusätzlich wurden hochangereicherte Membranen gegen spezifische Antikörper immunpräzipitiert.

3.1.1.1 Differentielle-Pelletierungs- und Ficoll-Gradienten Zentrifugationen.

Die Abbildung 7 gibt einen Überblick über die Recovery (Wiederauffindungsrate: Gesamtaktivität bezogen auf S_0 in %) und über die aus den spezifischen Enzymaktivitäten ($\text{nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) abgeleiteten Anreicherungsfaktoren der einzelnen Fraktionen der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation für die Na^+/K^+ -ATPase und für die K^+ -Phosphatase (pNPPase). Der wesentliche Unterschied zwischen Histamin-stimulierter und unstimulierter Präparation ist in P_3 zu sehen (Abbildung 7). Im unstimulierten Zustand ist in P_3 eine wesentlich höhere Anreicherung (~ 8 fache) der K^+ -Phosphatase (pNPPase) als nach Histamin-Stimulierung zu erkennen (~ 3 fache). Dies zeigt die schon beschriebenen morphologischen Veränderungen der PZ nach Stimulierung der Säuresekretion auf (Agnew et al., 1999).

Die Wiederauffindungsrate der Enzymaktivität lag bei der stimulierten Membran-Präparation zwischen $71,36 \pm 9,08\%$ der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und $99,8 \pm 9,3\%$ der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität. Bei der unstimulierten Präparation lag die Bilanz zwischen $81,79 \pm 11,11\%$ der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und $100 \pm 1,35\%$ der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität. Im Rahmen der unstimulierten Membran-Präparation konnte eine Wiederauffindungsrate der Proteinmenge von $97,44\%$ und in der stimulierten Membran-Präparation eine Rate von $97,39\%$ ermittelt werden.

		Stimulierte Membranen				
		S ₀	P ₁	P ₂	P ₃	S ₃
Gesamtprotein (%)		100,00±0,00	18,54±4,81	16,13±5,78	3,30±1,80	59,42±3,10
Na ⁺ /K ⁺ - ATPase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	4,38±2,43	62,68±6,35	4,03±0,30	÷
	Anreicherung	1,00±0,00	0,99±0,87	3,76±0,97	2,29±0,29	÷
K ⁺ - pNppase -Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	57,25±2,79	30,83±4,08	9,52±2,25	2,38±0,18
	Anreicherung	1,00±0,00	3,01±0,52	2,77±0,46	3,02±1,48	0,03±0,01
		Unstimulierte Membranen				
		S ₀	P ₁	P ₂	P ₃	S ₃
Gesamtprotein (%)		100,00±0,00	14,79±4,65	12,03±7,34	8,60±5,20	62,02±8,28
Na ⁺ /K ⁺ - ATPase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	10,20±1,80	69,49±15,11	2,10±0,10	÷
	Anreicherung	1,00±0,00	2,39±0,24	7,48±0,39	0,96±0,46	÷
K ⁺ - pNppase -Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	27,91±0,90	15,75±0,50	53,94±2,35	2,40±0,40
	Anreicherung	1,00±0,00	2,66±0,45	1,69±0,20	8,47±0,62	0,25±0,01

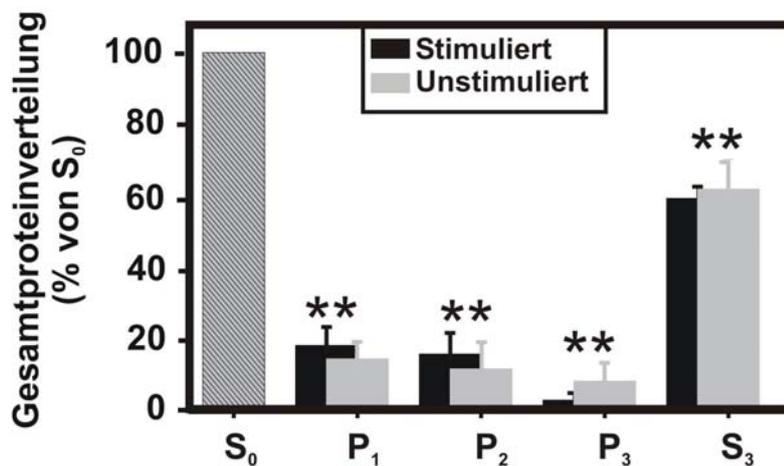


Abbildung 7: Tabelle: Proteinverteilung und Verteilung der Aktivitäten der Na⁺/K⁺-ATPase und der K⁺-Phosphatase (pNPPase) sowie deren Anreicherungsfaktoren in den Fraktionen nach differentieller-Pelletierungs-Zentrifugation. Diagramm: Prozentuale Verteilung des Proteins nach der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation. Die hier dargestellten Ergebnisse liegen im Bereich bereits publizierter Daten (Wolosin und Forte, 1981).

Im Hinblick auf die Präparation basolateraler, apikaler und tubulovesikulärer (tubulocisterner) Membranen aus den Zellen der Magenmukosa der Ratte, erbrachte die differentielle-Pelletierungs-Zentrifugation folgende Ergebnisse:

1. Die Trennung des überwiegenden Teils der AP und SA in die Fraktion P₁.
2. Die Trennung der BLM in die Fraktion P₂.
3. Die Trennung der TC bei der unstimulierten Membran-Präparation in die Fraktion P₃.
Nach Stimulierung translozieren die TC in die AP und bilden die SA. Die H⁺/K⁺-ATPase ist dann als Leitenzym in den SA zu finden.
4. Lösliche Proteine und nicht-sedimentierte Partikel sammelten sich in der Fraktion S₃, die als zytosolische Fraktion zur Kontrolle mitgeführt wurde.

P₁ und P₂ wurden durch einen Ficoll-Stufengradienten weiter angereichert, wobei lediglich die Interphasen eine Anreicherung der Leitenzyme aufzeigten. Weder in der proteinarmen Ficoll-Phase, in der sich nur schwebende Teilchen mit einer Dichte von 20 % (BLM) respektive 18 bzw. 12 % (AP/SA) befinden können, noch im klaren SM-Überstand ließen sich leitenzymatische Aktivitäten nachweisen. Demgegenüber waren die pelletierten Interphasen (BLM, AP oder SA) hinsichtlich der Leitenzyme hochangereichert (Abbildung 8 A, B).

spezifische Aktivität mit $497,55 \pm 63,46 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (stimuliert) bzw. $600,57 \pm 87,00 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (unstimuliert). Ebenso spricht die Recovery für eine gute Qualität der basolateralen Membranen. Die Recovery betrug in dieser Fraktion zwischen $15,56 \pm 4,18 \%$ (stimuliert) und $19,33 \pm 3,37 \%$ (unstimuliert) Membranen. Die Anreicherung der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität in BLM bezogen auf S_0 (unstimuliert: $121,27$ bzw. unstimuliert: $161,62 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) betrug zwischen $2,78 \pm 1,44$ (unstimuliert) und $4,57 \pm 0,66$ (stimuliert) mit einer spezifischen K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität von $449,3 \pm 27,67 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (unstimuliert) und $552,99 \pm 80,20 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (stimuliert). Die Fraktion BLM wurde mittels linearem Saccharose-Gradienten für die weitere Anreicherung basolateraler Membranen verwendet.

Die Anreicherung der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität in den Fraktionen AP und SA bezogen auf S_0 betrug im Mittel zwischen $4,19 \pm 1,44$ (unstimuliert) und $12,86 \pm 2,43$ (stimuliert) mit einer spezifischen Phosphataseaktivität von $678,00 \pm 158,17 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (unstimuliert) und $1559,86 \pm 295,37 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (stimuliert). Die spezifische Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase lag in den angereicherten Apikal-Membranen zwischen $100,62 \pm 4,24 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (unstimuliert) und $90,73 \pm 43,32 \text{ nmol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (stimuliert). Dies entsprach einer Anreicherung von $1,15 \pm 0,12$ (unstimuliert) bzw. $1,4 \pm 0,24$ (stimuliert), die über Na^+/K^+ -ATPase-Antikörper im Immunoblot nicht nachweisbar war.

Um die Lokalisation von Kir4.1 in diesen angereicherten Membranen zu bestimmen wurden in einem Vorversuch Immunoblots mit Anti-Kir4.1 Antikörper inkubiert. Zur eindeutigen Klärung der Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 war eine weitere Anreicherung der Membranen der Zellen der Magenmukosa notwendig. Kir4.1 wird in SA und P_3 (unstimuliert) angereichert, aber auch andere Signale sind noch zu erkennen (Abbildung 8 C).

3.1.1.2 Lineare Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen und Immunpräzipitationen.

3.1.1.2.1 Anreicherung von Na⁺/K⁺-ATPase enthaltenden basolateralen Membranen.

Die Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der weiteren Anreicherung der BLM durch einen linearen Saccharose-Dichtegradienten von 20 bis 50 % (w/v) Saccharose auf. Dargestellt sind die spezifische Enzymaktivität der Na⁺/K⁺-ATPase sowie die spezifische Phosphataseaktivität der K⁺-Phosphatase (pNPPase), die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen und der Anreicherungsfaktor der Na⁺/K⁺-ATPase (Abbildung 9 A).

Durch den linearen Saccharose-Gradienten konnte eine weitere Anreicherung der BLM um den Faktor ~1,8 bezogen auf die eingesetzten BLM nach dem Ficoll-Gradienten erzielt werden. Dies entsprach einer tatsächlichen Anreicherung um das 23,68±2,48 fache gegenüber S₀ (unstimuliert: 43,43±7,53 nmol P_i mg⁻¹ min⁻¹, Abbildung 8). Diese Fraktion zeigte sowohl die höchste spezifische Enzymaktivität (1028,42±148,320 nmol P_i mg⁻¹ min⁻¹) als auch die höchste Proteinkonzentration mit 0,68±0,084 µg/µl (Abbildung 9 A).

Die Anreicherung der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität in der Fraktion mit der höchsten spezifischen Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität betrug den Faktor 4,5±0,32 fach bezogen auf S₀ mit einer spezifischen Phosphataseaktivität von 555,57±16,7 nmol P_i mg⁻¹ min⁻¹. Zusammenfassend werden die einzelnen Fraktionen, die zur Anreicherung der Na⁺/K⁺-ATPase enthaltenden BLM notwendig waren in Abbildung 9 B zusammengefasst.

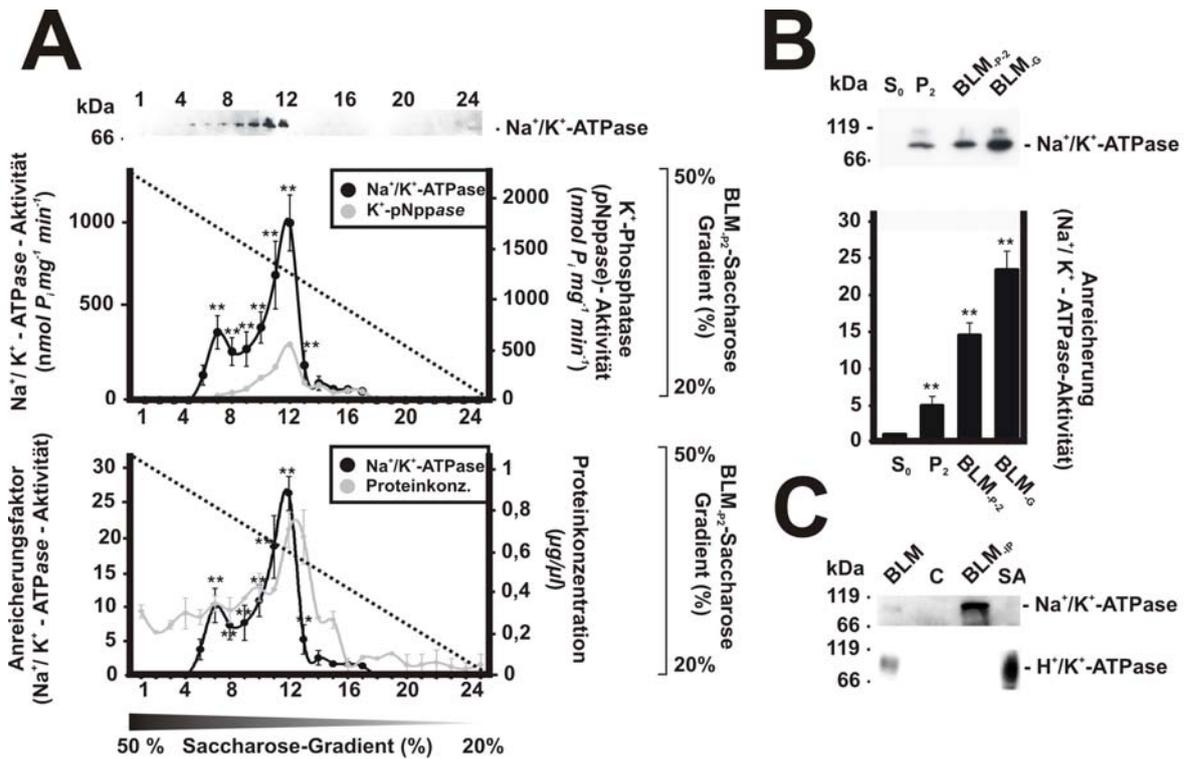


Abbildung 9: Auftrennung der Fraktion BLM nach Ficoll-Gradienten mittels linearem Saccharose-Gradienten. Dargestellt ist exemplarisch die Auswertung einer unstimulierten BLM-Präparationen. A: Immunoblots inkubiert mit einem Maus-Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (1:13000). Aufgetragen wurden 5 µg Protein pro Spur. Weiterhin sind die spezifische Enzymaktivität und die daraus errechneten Anreicherungen der Na⁺/K⁺-ATPase sowie die spezifische K⁺-Phosphatase-Aktivität (pNPPase) in den einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten abgebildet. B: Zusammenfassung der einzelnen Schritte zur Anreicherung der BLM. C: IP der hochangereicherten BLM nach Saccharose-Gradienten mit einem Maus-Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper. Als Kontrolle der Abreicherung der H⁺/K⁺-ATPase wurde der Immunoblot auch mit einem Kaninchen-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (α-Untereinheit) (1:10000) inkubiert. Als Kontrolle der Abreicherung dienten SA Membranen. BLM_{P-2} = BLM nach Ficoll-Gradienten; BLM_G = BLM-Gradienten-Fraktion mit der höchsten Anreicherung der Na⁺/K⁺-ATPase; C = BLM inkubiert mit Protein A/G-Beads ohne primären Antikörper (Vgl.: 2.1.3.1, 2.1.3.5); BLM_{IP} = BLM-Immunprecipitat, inkubiert mit Protein A/G - Beads und mit einem primären Antikörper.

Da die hochangereicherten BLM nach Saccharose-Gradienten auch eine 4,5 fache Anreicherung der H⁺/K⁺-ATPase aufzeigten, wurden diese Fraktionen gegen einen Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper immunisoliert. Das Ergebnis der Immunpräzipitation ist in Abbildung 9 C zu sehen. Es konnte eine deutliche Anreicherung der Na⁺/K⁺-ATPase bei gleichzeitiger Abreicherung der H⁺/K⁺-ATPase erreicht werden (Abbildung 9 C).

3.1.1.2.2 Anreicherung der H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden zytoplasmatischen Tubulocisternae.

Zur spezifischen Anreicherung von H^+/K^+ -ATPase enthaltenden TC wurde die Fraktion P_3 der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation der Präparation unstimulierter Membranen herangezogen. Wie aus der Abbildung 7 und Abbildung 8 sichtbar wird, lag die K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität in P_3 bei $1368,95 \pm 100,33 \text{ nmol } P_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und war damit um das $8,46 \pm 0,71$ fache im Vergleich zu S_0 angereichert. Dem gegenüber zeigte die Fraktion P_3 eine spezifische Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase- von $41,64 \pm 24,40 \text{ nmol } P_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mit einem Abreicherungsfaktor von $0,95 \pm 0,45$. Die Na^+/K^+ -ATPase konnte in der Fraktion P_3 im Westernblot nicht detektiert werden (Abbildung 8). Die Abbildung 10 stellt die Auftrennung der Fraktion P_3 nach linearem Saccharose-Gradienten (13-50 %) dar. Dargestellt ist zum einen die spezifische Phosphataseaktivität der K^+ -Phosphatase (pNPPase) der einzelnen Fraktionen sowie die spezifische Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase. Zum anderen wird die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen und der Anreicherungsfaktor der K^+ -Phosphatase (pNPPase) veranschaulicht (Abbildung 10 A).

Durch den linearen Saccharose-Gradienten konnte eine weitere Anreicherung der TC um den Faktor $\sim 2,1$ im Vergleich zu P_3 erreicht werden (Abbildung 10 B). Hinsichtlich der spezifischen K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität entsprach dies einer tatsächlichen Anreicherung der TC um das $17,68 \pm 1,05$ fache gegenüber S_0 . Diese Fraktion zeigte die höchste spezifische Enzymaktivität ($2857,50 \pm 161,79 \text{ nmol } P_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und die höchste Proteinkonzentration mit $0,68 \pm 0,084 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Eine Detektion der Na^+/K^+ -ATPase war im Immunoblot nicht möglich (Abbildung 10 A).

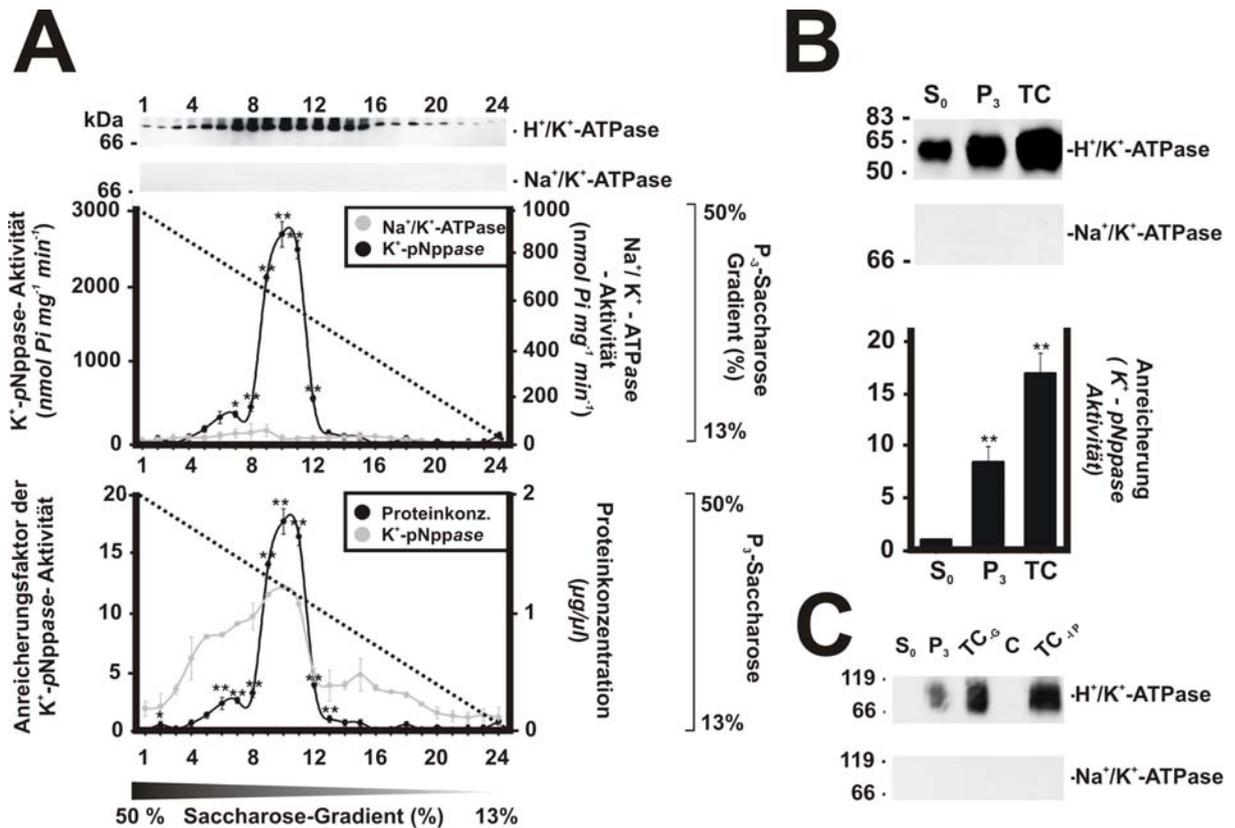


Abbildung 10: Auftrennung der Fraktion P₃ mittels linearem Saccharose-Gradienten (13-50 %). A: Die Immunoblots wurden mit einem Kaninchen-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (α -Untereinheit) (1:10.000) oder mit einem Maus-Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (1:13.000) inkubiert. Aufgetragen wurden 5 μ g Protein pro Spur. Die Na⁺/K⁺-ATPase konnte mittels Antikörper nicht detektiert werden (A, B und C). Zusätzlich ist die spezifische K⁺-Phosphatase (*pNPPase*)-Aktivität und der daraus errechnete Anreicherungsfaktors der K⁺-Phosphatase (*pNPPase*) Aktivität sowie die spezifische Enzymaktivität der Na⁺/K⁺-ATPase in den einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten dargestellt (A). B: Zusammenfassung der einzelnen Schritte zur Anreicherung der TC. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots (n=4) inkubiert mit einem Maus-H⁺/K⁺-ATPase -Antikörper (β -Untereinheit) (1:1.500) und einem Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (s.o.). Aufgetragen wurden 5 μ g pro Spur. C: Immunpräzipitation der hochangereicherten TC nach Saccharose-Gradienten mit einem monoklonalen Maus-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (β -Untereinheit). Zur Kontrolle der Anreicherung der H⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden TC wurde der Immunoblot mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (α -Untereinheit) (1:10.000) und einem Maus-Anti-Na⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (s.o.) inkubiert. TC_G= P₃-Gradienten-Fraktion mit der höchsten Anreicherung der H⁺/K⁺-ATPase; C= TC_G inkubiert mit Dynabeads ohne primären Antikörper (Vgl.: 2.1.3.1); TC_{IP} = TC-Immunpräzipitat, inkubiert mit Dynabeads und mit primärem Antikörper.

Die so angereicherten TC beinhaltenen noch immer mikrosomale Membranen von anderen Organellen (ER, Golgi Apparat) (Karvar et al., 2002). Aus diesem Grund wurden die TC durch Immunpräzipitation gegen einen monoklonalen H^+/K^+ -ATPase-Antikörper (Maus, β -Untereinheit) entsprechend dem Protokoll von Peng et al., (1997) weiter angereichert (Abbildung 10 C und Abbildung 11).

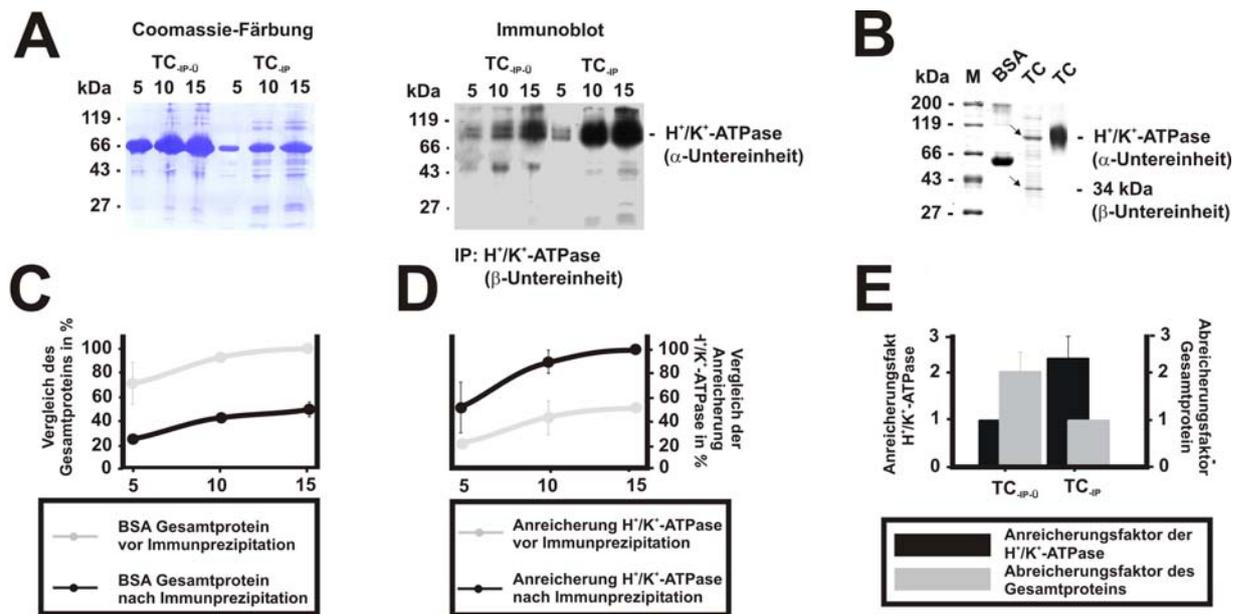


Abbildung 11: Immunpräzipitation von TC. A: Coomassie Brilliant Blau gefärbter Westernblot und ein repräsentativer Immunoblot. TC wurden immunpräzipitiert gegen einen monoklonalen H^+/K^+ -ATPase -Antikörper (Maus, β -Untereinheit). Die Detektion der Anreicherung geschah mit einem polyklonalen H^+/K^+ -ATPase -Antikörper (α -Untereinheit Kaninchen) (1:10000). B: Veranschaulichung der Berechnung der H^+/K^+ -ATPase-Menge in TC (Vgl.: 2.1.3.1). C: Densitometrische Bestimmung der Gesamtproteinverteilung nach Immunpräzipitation im Überstand und im Immunpräzipitat. D: Densitometrische Bestimmung der An- bzw. Abreicherung des spezifischen H^+/K^+ -ATPase Signals nach Immunpräzipitation im Überstand und im Immunpräzipitat. Bei abnehmender Gesamtproteinmenge nimmt die Spezifität des H^+/K^+ -Signals deutlich zu. E: Zusammenfassung der An- und Abreicherungsfaktoren des Gesamtproteins und des spezifischen H^+/K^+ -ATPase Signals. TC_{IP-U} = Überstand der IP; TC_{IP} = TC-Immunpräzipitat.

Da eine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Zugabe des primären Antikörpers nicht mehr möglich war, unter anderem wegen des hohen Gehalts an BSA in der Antikörper-Lösung, wurden densitometrische Bestimmungen hinsichtlich der Anreicherung

durchgeführt. Dazu wurden die Überstände mit den Immunpräzipitaten verglichen – zunächst im Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-PAGE (Abbildung 11) und anschließend nach Immunoblotting mit einem polyklonalen H^+/K^+ -ATPase-Antikörper (Kaninchen, α -Untereinheit). Bei abnehmender Gesamtproteinmenge nahm die Spezifität des H^+/K^+ -Signals zu (Abbildung 11 A, C und D). Dies führte zu einer densitometrisch bestimmbaren Anreicherung des H^+/K^+ -ATPase Signals im Immunpräzipitat von $2,31 \pm 0,46$ verglichen mit dem Überstand bei gleichzeitiger Abreicherung der Gesamtproteinmenge im Immunpräzipitat von ca. 50 % (Abbildung 11 E).

3.1.2 Membran-Fraktionierung der Zellen der Magenmukosa des Kaninchenmagens

Die Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Recovery (Gesamtaktivität bezogen auf S_0 in %) und über die aus den spezifischen Enzymaktivitäten ($\text{nmol } P_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) abgeleiteten Anreicherungsfaktoren der einzelnen Fraktionen der differentiellen Pelletierungs-Zentrifugation für die Na^+/K^+ -ATPase und für die K^+ -Phosphatase (pNPPase) der H^+/K^+ -ATPase Aktivität.

Im Unterschied zur Präparation der Zellen der Magenmukosa der Ratte, wurden beim Kaninchen zwei unterschiedliche Trennverfahren eingesetzt (Vgl.: 2.1.1.3 und 2.1.1.4). Die wesentlichen Unterschiede zwischen der Membran-Präparation stimulierter- und unstimulierter Zellen der Magenmukosa lassen sich an der Umverteilung der H^+/K^+ -ATPase zwischen P_3 , SA und AP feststellen (Abbildung 13).

SA-Präparation		Stimulierte Membranen					
		S ₀	P ₁	P ₂	P ₃	S ₃	SA
Gesamtprotein (%)		100,00±0,00	22,87±0,81	9,33±0,78	9,99±0,63	56,48±17,73	0,2±0,05
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 4,38±2,43	** 62,68±6,35	** 4,03±0,30	** 0,14±0,00	÷
	Anreicherung	1,00±0,00	0,99±0,87	** 3,76±0,97	2,29±0,29	÷	0,75±0,00
K ⁺ -pNppase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 69,25±2,88	** 1,59±1,08	** 4,52±2,25	** 2,38±0,18	** 15,36±4,8
	Anreicherung	1,00±0,00	** 3,77±0,52	0,77±0,46	1,02±0,48	0,03±0,01	** 14,16±1,5

AP-Präparation		Unstimulierte Membranen					
		S ₀	P ₁	P ₂	P ₃	S ₃	AP
Gesamtprotein (%)		100,00±0,3	20,877±1,51	6,626±0,61	11,31±1,73	65,72±4,369	0,499±0,17
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 10,20±1,80	** 69,49±15,11	** 2,10±0,10	÷	÷
	Anreicherung	1,00±0,00	2,39±0,24	** 7,48±0,39	0,96±0,46	÷	0,8±0,2
K ⁺ -pNppase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 26,29±0,90	** 10,2±0,40	** 46,7±2,35	÷	** 2,81±0,14
	Anreicherung	1,00±0,00	** 2,22±0,3	0,69±0,20	** 7,28±0,22	÷	** 2,67±0,25

BLM-Präparation		Unstimulierte Membranen				
		S ₀	P ₂	P ₃	S ₃	BLM
Gesamtprotein (%)		99,99±4,66	37,41±4,99	8,51±0,5	55,1±4,1	0,15±0,02
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 66,33±0,90	** 15,75±0,50	÷	** 5,13±0,00
	Anreicherung	1,00±0,00	** 4,7±0,45	1,51±0,70	0,05±0,01	** 21,47±1,26
K ⁺ -pNppase-Aktivität	Recovery (%)	100,00±0,00	** 21,29±1,80	** 69,5±15,1	** 1,9±0,00	÷
	Anreicherung	1,00±0,00	0,57±0,14	** 4,88±0,5	0,04±0,00	0,93±0,2

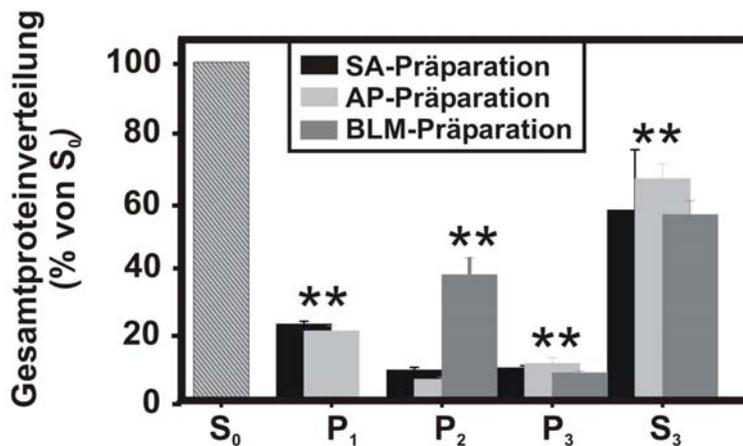


Abbildung 12: Tabelle: Proteinverteilung und Verteilung der Aktivitäten der Na⁺/K⁺-ATPase und der K⁺-Phosphatase (pNPPase) sowie deren Anreicherungsfaktoren in den Fraktionen nach differentieller-Pelletierungs-Zentrifugation. Diagramm: Prozentuale Verteilung des Proteins nach der differentieller-Pelletierungs-Zentrifugation. Die hier dargestellten Ergebnisse liegen im Bereich bereits publizierter Daten (Wolosin und Forte, 1981; Lambrecht et al., 1993).

So zeigen die Fraktionen P₃ (7,48±0,39 fache) der Membran-Präparation ruhender Zellen der Magenmukosa und die Fraktion SA (14,16±1,5 fache) aus der Membran-Präparation stimulierten Zellen deutlich höhere Anreicherungen hinsichtlich der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität als P₃ (1,0±0,48 fache) aus der Membran-Präparation stimulierter Zellen und AP (2,67±0,25 fache) aus der Membran-Präparation ruhender Zellen der Magenmukosa. Dies zeigt die schon beschriebenen morphologischen Veränderungen der PZ nach Stimulierung der Säuresekretion auf (Vgl.: 1.3).

Im Rahmen der stimulierten Membran-Präparation konnte eine Wiederauffindungsrate der Proteinmenge von 98,67±19,95 %, für die unstimulierte Membran-Präparation eine Rate von 104,53±8,2 % und für die Membran-Präparation zur Gewinnung basolateraler Membranen 91,02±9,59 % ermittelt werden. Die Wiederauffindungsrate der Enzymaktivität lag bei der stimulierten Membran-Präparation zwischen 71,23±9,08 % der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und 80,62±6,39 % der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität. Bei der Membran-Präparation apikaler Membranen unstimulierter Zellen lag die Bilanz zwischen 81,79±17,01 % der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und 83,13±3,65 % der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität.

Bei der Präparation unstimulierter basolateraler Membranen konnte eine Wiederauffindungsrate der Enzymaktivität zwischen 82,02±1,46 % der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und 90,78±16,91 % der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität ermittelt werden.

Die Fraktion BLM war nach der Ficoll-Gradienten-Zentrifugation 14,9±1,9 fach hinsichtlich der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und 1,61±0,4 fach hinsichtlich der K⁺-Phosphatase (pNPPase)-Aktivität angereichert. Die Recovery hatte in dieser Fraktion ca. 20 % betragen. Durch Ultrazentrifugation mit einem linearen Saccharose-Gradienten konnte eine weitere Anreicherung auf das 21,47±1,26 fache erzielt werden. Die K⁺-Phosphatase (pNPPase)-

Aktivität wurde durch diesen Zentrifugationsschritt angereichert ($0,93 \pm 0,2$ fach). Die Abbildung 13 fasst die Präparation basolateraler und apikaler Membranen zusammen.

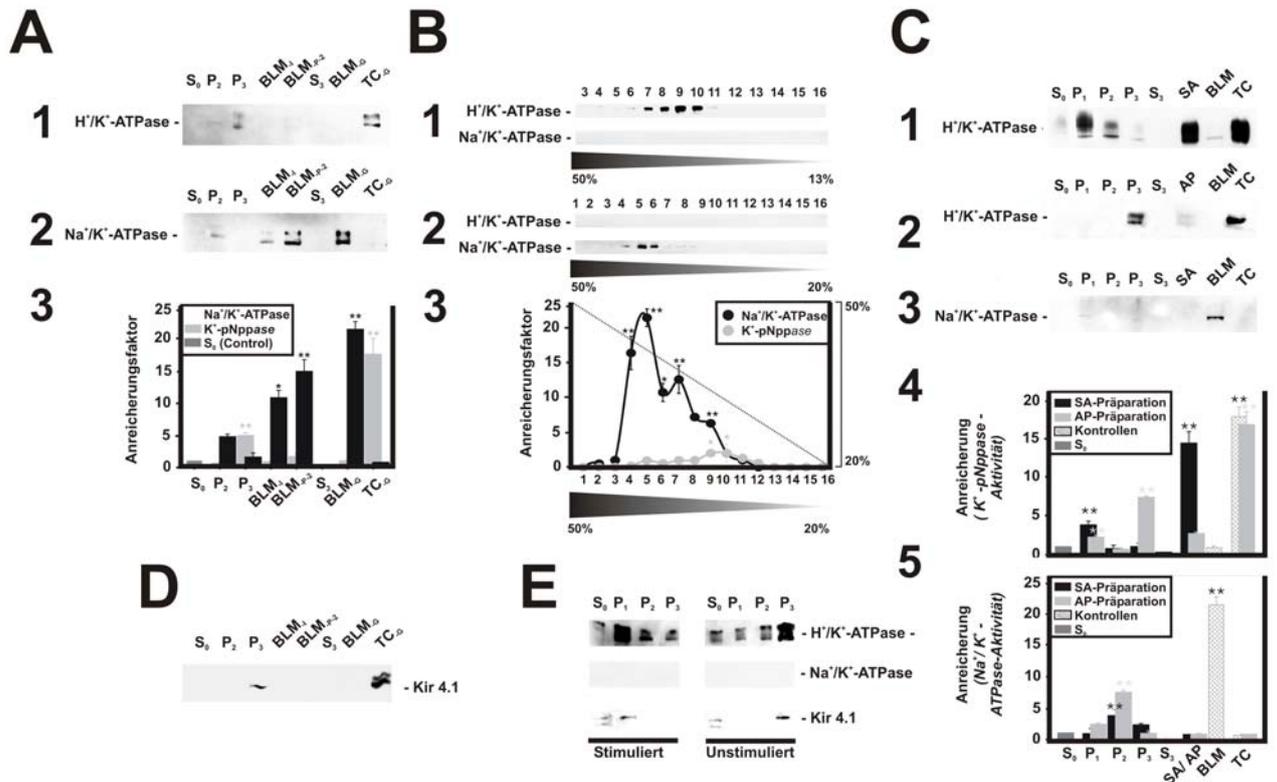


Abbildung 13: Überblick über die Membran-Präparationen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens. A₁ und A₂: Repräsentative Immunoblots (n=3) zur Analyse der Gütequalität der BLM Präparation. A₃: Diagramm: Übersicht über die Anreicherungsfaktoren der einzelnen Fraktionen der BLM-Präparation. B: Saccharose-Gradienten. B₁: P₃-Gradienten dienten zur Gewinnung von TC. B₂: BLM_{p.2} wurde zur weiteren Anreicherung der BLM auf einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. B₃: Diagramm: Übersicht über die Anreicherungsfaktoren der einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten der BLM Präparation. C₁-C₃: Repräsentative Immunoblots zur Analyse der Gütequalität der AP und SA Präparation. C₄-C₅: Diagramm: Übersicht über die Anreicherungsfaktoren der Leitenzyme, K⁺-Phosphatase (pNPPase) (C₄) und Na⁺/K⁺-ATPase (C₅) der einzelnen Fraktionen. D+E: Kir4.1 ist nicht auf BLM lokalisiert, sondern auf P₁, P₃ oder TC. BLM₁ = BLM-Interphase nach Ficoll-Gradient; BLM_{p.2} = Pelletierte Interphase; BLM_G = BLM-Gradienten-Fraktion höchster Anreicherung der Na⁺/K⁺-ATPase; TC_G = P₃-Gradienten-Fraktion höchster Anreicherung des Leitenzyms.

TC wurden wie beschrieben im Rahmen einer unstimulierten Membran-Präparation aus P₃ angereichert. Diese waren $17,58 \pm 2,50$ fach bei der Präparation basolateraler

Membranen bzw. $16,52 \pm 1,7$ fach bei der Präparation unstimulierter apikaler Membranen hinsichtlich der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität bezogen auf S_0 angereichert und zeigten nur schwache Na^+/K^+ -ATPase-Aktivitäten ($0,73 \pm 0,1$ fach). Die Fraktion mit der höchsten Anreicherung der K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität des stimulierten P_3 -Gradienten wies nur eine ungefähr zweifache Anreicherung auf und zeigte keine Anreicherung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität.

3.1.3 Rekonstruktion des *Traffickings* von Kir4.1, KCNQ1 und der H^+/K^+ -ATPase in hochangereicherten Membranen des Ratten und Kaninchenmagens.

Zur Aufklärung der Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte wurden die einzelnen Membranen wie beschrieben (Vgl.: 2.1.4.2, 2.1.4.3, 2.1.4.4) auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als Kontrollen dienten die H^+/K^+ -ATPase, die als Leitenzym für TC und SA anzusehen ist (Ganser and Forte, 1973; Sachs et al., 1976) und die Na^+/K^+ -ATPase, die als Leitenzym für die BLM verwendet wurde (Culp und Forte, 1981).

In Abbildung 14 wird die Umverteilung von Kir4.1 und KCNQ1 nach Histamin-Stimulierung der Säuresekretion gezeigt. Dieses *Trafficking* von Kir4.1 und der H^+/K^+ -ATPase war schon in Fraktionen der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation zu erkennen (Abbildung 14 A). Nach Histamin-Stimulierung der Säuresekretion translozierten Kir4.1, KCNQ1 und die H^+/K^+ -ATPase aus zytoplasmatischen TC zur SA (Abbildung 14 D). Nach Immunpräzipitation der hochangereicherten TC und SA mit Maus-Anti- H^+/K^+ -ATPase wurden auch Kir4.1 und KCNQ1 sowohl in TC als auch in SA kopräzipitiert (Abbildung 14 C und D). Darüber hinaus war nach Immunpräzipitation gegen Kaninchen-Anti-Kir4.1 oder gegen Ziege-Anti-KCNQ1 die H^+/K^+ -ATPase in TC und SA kopräzipitiert (Abbildung 14 D und E).

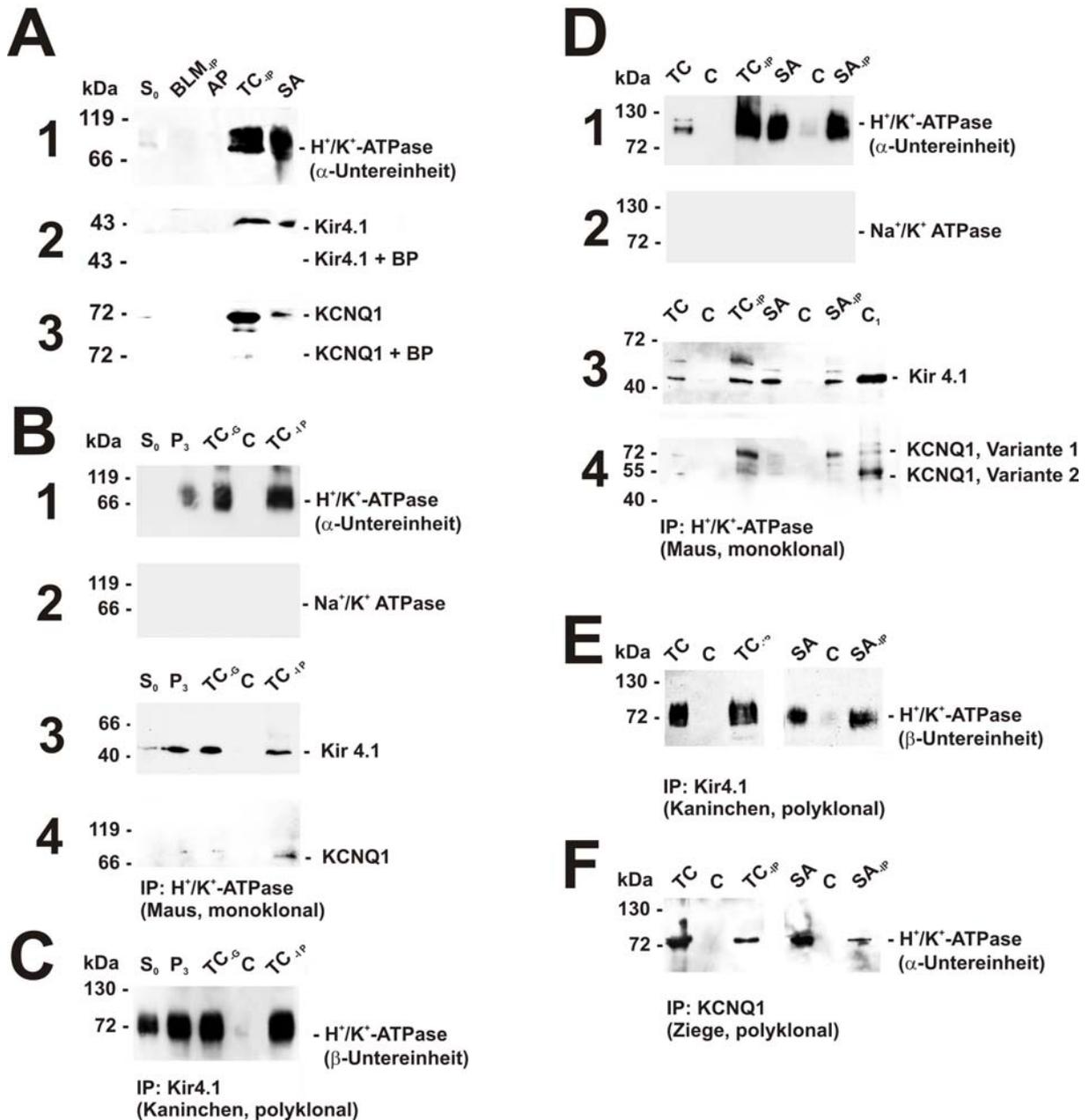


Abbildung 14: *Trafficking* von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase aus TC nach SA. A: Hochangereicherte Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte. Die H⁺/K⁺-ATPase (A₁), Kir4.1 (A₂) und KCNQ1 (A₃) sind nicht auf unstimulierten BLM_{IP} oder AP, sondern in TC_{IP} und SA. B: Immunpräzipitation von TC mit einem Maus-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (β-Untereinheit). Kir4.1 (B₃) und KCNQ1 (B₄) werden kopräzipitiert. C: Kontroll-Immunpräzipitation von TC mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Kir4.1-Antikörper. D: Immunpräzipitation von TC und SA gegen einen Maus-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (β-Untereinheit). Kir4.1 (D₃) und KCNQ1 (D₄) wurden sowohl in TC als auch in SA kopräzipitiert. Immunpräzipitation von TC und SA gegen Kaninchen-Anti-Kir4.1 (E) und Ziege-Anti-KCNQ1 (F). In beiden Fällen wurde die H⁺/K⁺-ATPase kopräzipitiert. BP: Blockpeptid; C = Kontrolle, TC oder SA inkubiert mit Dynabeads ohne primären Antikörper; BLM_{IP}/TC_{IP}/SA_{IP} = Immunpräzipitat, inkubiert mit Beads und mit primärem Antikörper. C₁ = Kontrolle: Herzmembranen.

Auch in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens ließ sich ein *Trafficking* von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase nach Histamin-Stimulierung der Säuresekretion nachvollziehen. Der Vergleich eines P₃-Gradienten einer Membran-Präparation unstimulierter Zellen der Magenmukosa (Abbildung 15 A) mit einem P₃-Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa (Abbildung 15 A), zeigte deutlich, dass die Signale für Kir4.1 und für die H⁺/K⁺-ATPase nach Histamin-Stimulierung im P₃-Gradienten der stimulierten Membran-Präparation weitestgehend verschwinden (Abbildung 15 A). Die H⁺/K⁺-ATPase und Kir4.1 translozieren nach Histamin-Stimulierung von intrazellulären TC in die sekretorische Membran und sind somit in der SA nachweisbar (Abbildung 15 D₁ und D₃).

Auch KCNQ1 translozierte nach Histamin-Stimulierung in die SA (Abbildung 15 D₄ und D₅). Auffällig war jedoch, dass zwei spezifische Signale, die beide mit dem entsprechenden Blockpeptid blockierbar waren, mit dem hier verwendeten KCNQ1-Antikörper in Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte (Abbildung 14 D₄) und des Kaninchens (Abbildung 15 A) detektiert wurden. Die Größen beider Signale 74 kDa und 58 kDa entsprachen den Proteingrößen der humanen KCNQ1-Variante 1 (74 kDa) und Variante 2 (~58 kDa). Beide KCNQ1-Signale waren bei einer Membran-Präparation unstimulierter Zellen der Magenmukosa intrazellulär kolokalisiert (Abbildung 15 A), wobei die KCNQ1-Variante 2 auch in der AP vorkam (Abbildung 15 D₅). Nach Histamin-Stimulierung waren beide Varianten in den SA zu finden (Abbildung 15 D₄ und D₅).

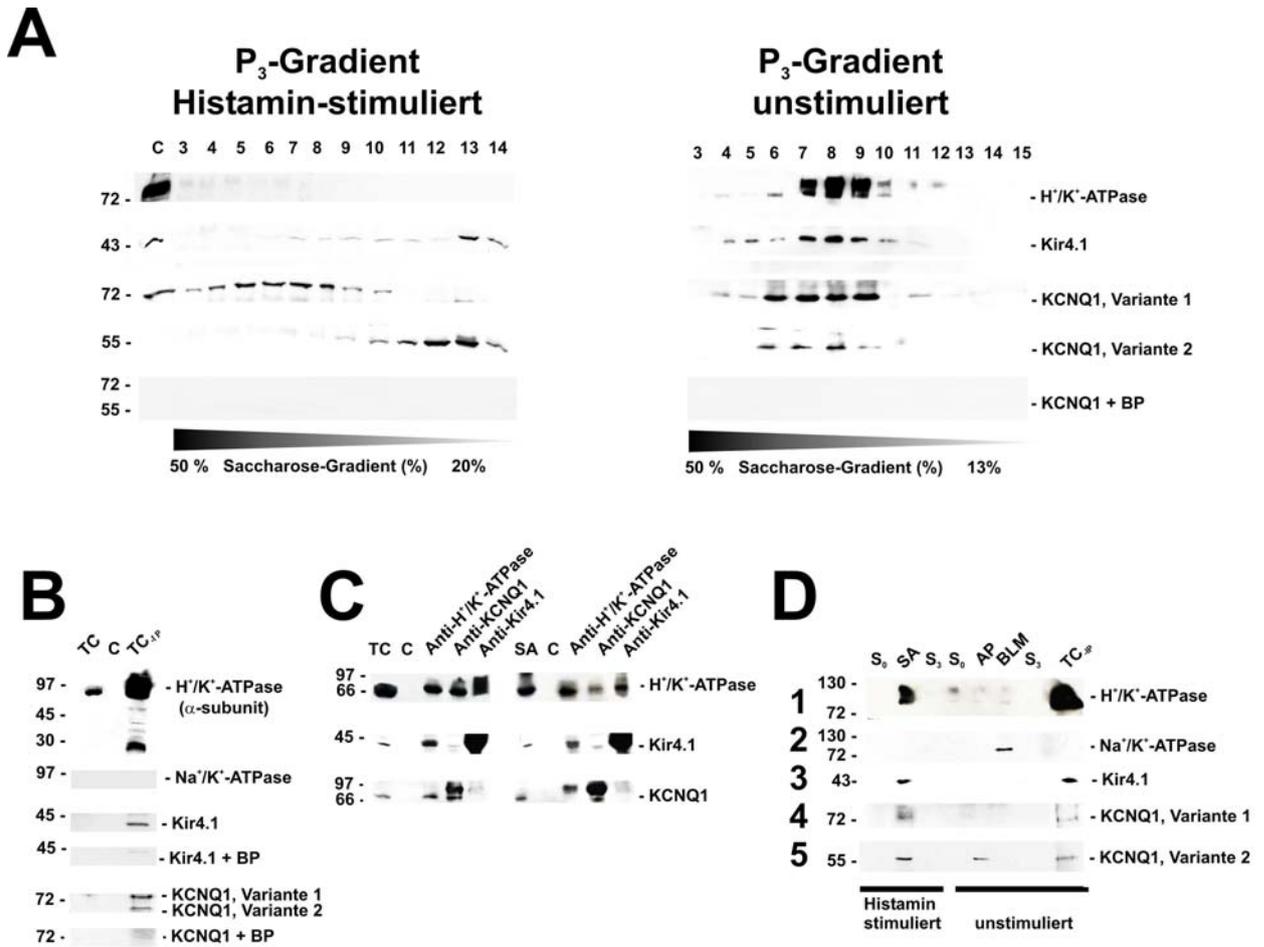


Abbildung 15: Lokalisation von Kir4.1, KCNQ1 und H⁺/K⁺-ATPase in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens A: Vergleich eines P₃-Gradienten einer Membran-Präparation unstimulierter Zellen der Magenmukosa mit einem P₃-Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa. Nach Histamin-Stimulierung kam es zu einer Umverteilung von Kir4.1, der H⁺/K⁺-ATPase und KCNQ1. Aus diesem Grund waren nur schwache Signale für Kir4.1 und die H⁺/K⁺-ATPase im P₃-Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa im Vergleich zur unstimulierten zusehen (C = TC). KCNQ1 wies nach Histamin-Stimulierung weiterhin eine deutliche intrazelluläre Verteilung auf. Die Kolo-kalisation von KCNQ1-Variante 1 und 2 im ruhenden Zustand änderte sich nach Stimulierung wesentlich. B: Kontrollexperiment der Immunpräzipitation mit TC. C: Immunpräzipitations-Experimente zeigten, dass weder Kir4.1 mit Anti-KCNQ1 noch dass KCNQ1 mit Anti-Kir4.1 kopräzipitiert wurde. D: Lokalisation von Kir4.1, KCNQ1 und H⁺/K⁺-ATPase in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens. Nach Histamin-Stimulierung translozierten Kir4.1, KCNQ1 und die H⁺/K⁺-ATPase von TC in die apikale Membran. Kir4.1 und KCNQ1 waren nicht in unstimulierten BLM nachweisbar.

Neben einer apikalen Lokalisation von KCNQ1 nach Histamin-Stimulierung ließ sich auch weiterhin eine starke intrazelluläre Verteilung feststellen, denn auch nach Histamin-Stimulierung waren deutliche Signale der KCNQ1-Varianten in verschiedenen Fraktionen eines P_3 -Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa sichtbar (Abbildung 15 A). Interessanterweise lagen beide Varianten nach Histamin-Stimulierung getrennt auf verschiedenen intrazellulären Membran-Kompartimenten vor. So befand sich die KCNQ1-Variante 1 weitestgehend in dichteren wohingegen die KCNQ1-Variante 2 in weniger dichten Membran-Fraktionen zu finden war (Abbildung 15 A).

Diese intrazelluläre Verteilung von KCNQ1 nach Histamin-Stimulierung lässt die Vermutung zu, dass Kir4.1 und KCNQ1 zumindest nach Histamin-Stimulierung nicht vollständig in PZ des Kaninchens kolokalisieren. Weitergehende Immunpräzipitations-Studien mit hochangereicherten TC und SA des Kaninchens zeigten, dass weder Kir4.1 mit einem Anti-KCNQ1 noch KCNQ1 mit einem Anti-Kir4.1 in TC oder SA kopräzipitiert wurde (Abbildung 15 C₂ und C₃). Nach Inkubation mit Anti-KCNQ1 kam es zu einer deutlichen Anreicherung von Kir4.1. Ähnlich konnte nach Inkubation mit Anti-Kir4.1 KCNQ1 deutlich angereichert werden (Abbildung 15 C₂ und C₃).

Die Inkubation mit einem Anti- H^+/K^+ -ATPase-Antikörper bewirkte jedoch, dass beide Kalium-Kanäle kopräzipitiert wurden. Dies wurde durch Immunpräzipitations-Studien mit einem Anti-KCNQ1- und einem Anti-Kir4.1-Antikörper bestätigt (Abbildung 14 E und F; Abbildung 15 C). In beiden Fällen wurde auch die H^+/K^+ -ATPase kopräzipitiert (Abbildung 15 D). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Kir4.1 und KCNQ1 auf unterschiedlichen H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC und auf unterschiedlichen H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden SA-Kompartimenten lokalisiert sind.

3.1.4 Immunhistochemische-Studien zur Lokalisation und zum *Trafficking* von Kir4.1, KCNQ1 und H⁺/K⁺-ATPase an Kryoschnitten des Rattenmagens.

Zur weiteren Klärung der Lokalisierung von Kir4.1 und KCNQ1 und zur Untermauerung der zellbiochemischen Methoden wurden zwei verschiedene Immunfluoreszenz Methoden angewandt: Immunhistochemie mit Kryoschnitten und Immunfluoreszenz mit isolierten PZ.

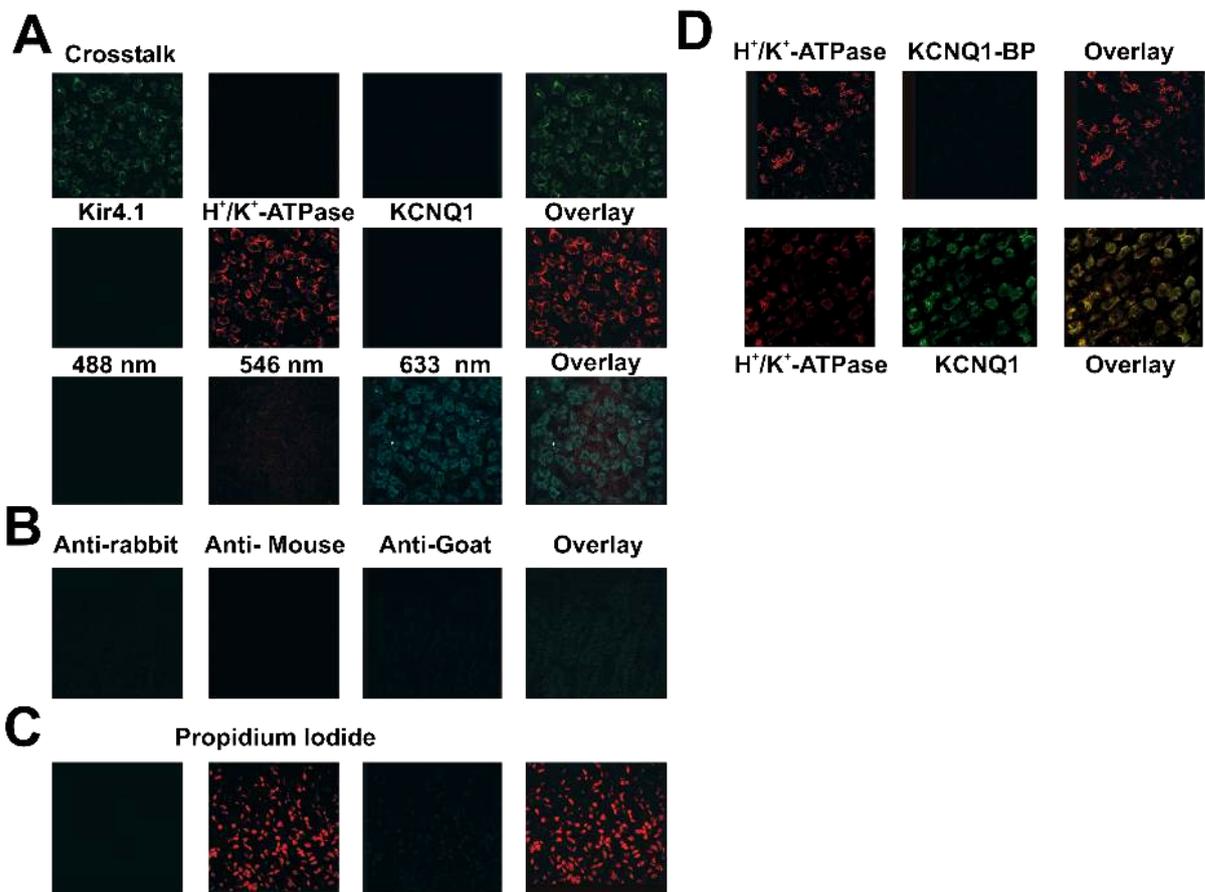


Abbildung 16: Kalibrierung der Detektionskanäle im Konfokalen LASER-Scanmikroskop. A: Darstellung des „Crosstalks“ (Übersprechen) der einzelnen Photomultiplier (PMT) bei Dreifachfärbungen mit Alexa Fluor 488 (grün), -546 (rot) und -633 (cyan/blau). Ein Übersprechen der einzelnen Kanäle konnte weitestgehend unterbunden werden. B: Unspezifischer Hintergrund der sekundären Antikörper, der an Alexa Fluor 488, -546 oder -633 gekoppelt waren. C: Unspezifischer Hintergrund der sekundären Antikörper im Vergleich zur Propidium-Iodid Färbung. Die Färbungen ohne primären Antikörper waren zu vernachlässigen. D: Darstellung der spezifischen Bindung des KCNQ1. Das spezifische KCNQ1-Signal (Alexa Fluor 633, grün) im unstimulierten Magen konnte durch das entsprechende Blockpeptid inhibiert werden. Als Kontrolle diente die H⁺/K⁺-ATPase (Alexa Fluor-546, rot)

Exemplarisch für diese beiden Methoden sind in Abbildung 16 die Kontrollen dargestellt. In Abbildung 16 wird veranschaulicht, dass es nach gründlichem Justieren der Detektionskanäle des Konfokalen LASER-Scanmikroskops keine Probleme mit dem Phänomen des Übersprechens der Detektionskanäle gab (Abbildung 16 A). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Wahl der sekundären Antikörper entscheidend ist. Der Hintergrund der verwendeten sekundären Antikörper (Vgl.: 1.4.2) war vernachlässigbar schwach und hatte keinen Einfluss auf die Aussagekraft der Ergebnisse nach Inkubation mit einem primären Antikörper (Abbildung 16 B).

Das spezifische Signal des Anti-KCNQ1-Antikörpers verschwand nach Vorinkubation mit dem entsprechendem Blockpeptid (Abbildung 16 D).

Histamin-stimulierte und unstimulierte Kryoschnitte des Magens der Ratte wurden nacheinander mit einem Kaninchen-Anti-Kir4.1-Antikörper (grün), einem Maus-Anti- H^+K^+ -ATPase-Antikörper (β -Untereinheit) (rot) und einem Ziege- Anti-KCNQ1-Antikörper (cyan/blau) gefärbt.

Nach dem virtuellen Übereinanderlegen („Overlay“) der unterschiedlichen Färbungen (Abbildung 17 A₈), war eine diffuse Verteilung sowohl von Kir4.1, als auch von KCNQ1 sowie der H^+K^+ -ATPase im unstimulierten Zustand zu erkennen (Abbildung 17 A₈). Dies spiegelte die Verteilung der H^+K^+ -ATPase-enthaltenden TC vor Stimulierung der Säuresekretion wieder, wie sie auch in den zellbiochemischen Studien hier gezeigt werden konnte (Abbildung 14; Abbildung 15).

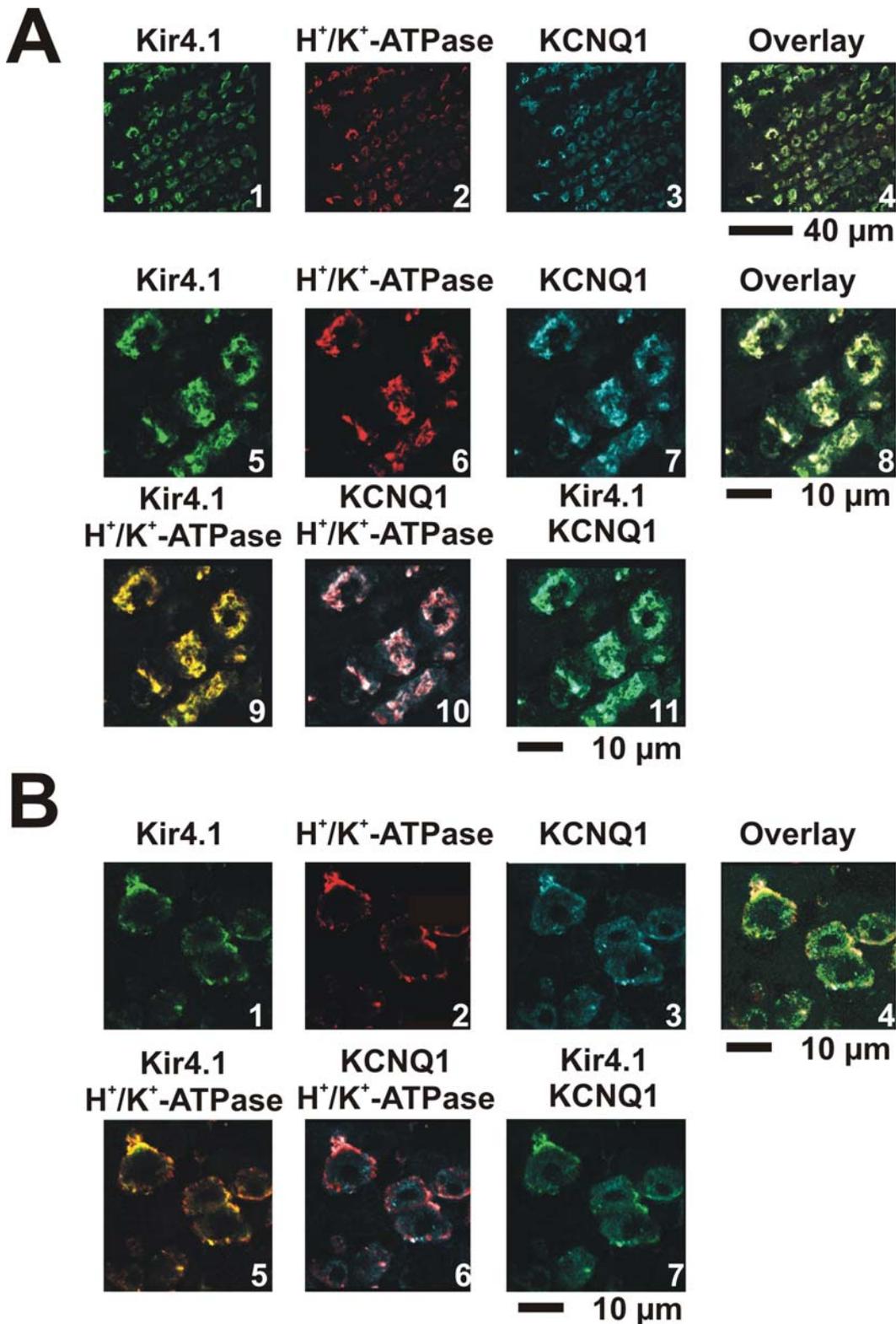


Abbildung 17: Dreifachfärbungen von Ranitidin-behandelten (A) und Histamin-stimulierten (B) Kryoschnitten des Rattenmagens. Die Kryoschnitte wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Kir4.1-Antikörper (Alexa Fluor 488, grün), einem Maus-Anti-H⁺K⁺-ATPase-Antikörper (β-Untereinheit) (Alexa Fluor 546, rot) und einem Ziege-Anti-KCNQ1-Antikörper (Alexa Fluor 633, cyan/blau) gefärbt. Kir4.1 und die H⁺/K⁺-ATPase translozierten nach Histamin-Stimulierung in die apikale Membran während KCNQ1 neben einer apikalen auch weiterhin eine starke intrazelluläre Lokalisation aufwies.

Die Histamin-stimulierten Schnitte des Magens der Ratte unterschieden sich wesentlich von den Ranitidin-vorbehandelten. Es fehlte die diffuse Verteilung von Kir4.1 und der H^+/K^+ -ATPase (Abbildung 17 B₁ bis B₇). Nach dem Übereinanderlegen der unterschiedlichen Färbungen, war zu erkennen, dass eine Umverteilung von Kir4.1 und der H^+/K^+ -ATPase in apikale Bereiche der PZ vorlag (Abbildung 17 B₄), während die Verteilung von KCNQ1 neben einer apikalen- auch eine diffuse Lokalisation aufwies (Abbildung 17 B₃ und B₄). Die diffuse Verteilung von KCNQ1 ging besonders durch die bläuliche Färbung der Abbildung 17 B₆ und Abbildung 17 B₇ hervor und war im Einklang mit den zellbiochemischen Daten (Abbildung 15 A).

Kir4.1 und die H^+/K^+ -ATPase schienen sowohl in ruhenden als auch in Histamin-stimulierten PZ eng kolokalisiert zu sein (Abbildung 17 A₉ und B₅), wohingegen eine Kolokalisation für KCNQ1 und die H^+/K^+ -ATPase im stimulierten Zustand nicht eindeutig mit Hilfe der Kryoschnitte nachzuweisen war (Abbildung 17 B₄, B₆ und B₇).

Auffällig war bei den Kryoschnitten des Magens der Ratte, dass es keine Unterschiede in der Verteilung und Expression von Kir4.1, KCNQ1 und der H^+/K^+ -ATPase entlang der Längsachse der Magendrüsen gab. So waren Kir4.1, KCNQ1 und die H^+/K^+ -ATPase in apikalen als auch in basalen Regionen der Magendrüsen nachweisbar (Abbildung 17 A₁ bis A₄).

Um eine exakte Aussage bezüglich der Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 mit Hilfe der Immunfluoreszenz in PZ fällen zu können, reichte die Methode der Kryoschnitte nicht aus. Aus diesem Grund wurden PZ der Ratte und des Kaninchens isoliert und mit Konfokaler Mikroskopie analysiert, um einen detaillierteren Blick in das Innere der PZ, sowohl im ruhenden als auch im stimulierten Zustand, zu bekommen

3.1.5 Immunfluoreszenz-Studien zur Lokalisation und zum *Trafficking* von Kir4.1 und KCNQ1 in isolierten und kultivierten Parietalzellen des Rattenmagens.

Immunfluoreszenz-Studien zur Lokalisation von K^+ -Kanälen im Magen waren in der Literatur bisher hauptsächlich für Kryo- und Paraffin-eingebettete Schnitte (Scraff et al., 1999; Grahammer et al., 2001; Dedek und Waldegger, 2001; Fujita et al., 2002; Heitzmann et al., 2004; Warth et al., 2004; Lambrecht et al., 2005) oder für isolierte Magendrüsen (Malinowska et al., 2004) beschrieben.

Die Grenzen dieser Methoden waren anhand der Aufnahmen deutlich zuerkennen (Dedek und Waldegger, 2001; Grahammer et al., 2001; Fujita et al., 2002; Malinowska et al., 2004; Heitzmann et al., 2004; Warth et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Die exakte Lokalisation bzw. Kolo-kalisation mit Leitenzymen war mit diesen Methoden nur schwer festzulegen.

Aus diesem Grund bot sich an, PZ aus dem Gewebeverband der Magendrüsen der Magenmukosa zu isolieren, um somit einen detaillierten Blick in das Innere der einzelnen PZ zu bekommen. Ein weiterer methodischer Vorteil der isolierten PZ war, dass man anhand der VAC's („*vacular apical compartment*“) schon lichtmikroskopisch identifizieren konnte, ob die PZ stimuliert zur Säuresekretion war oder nicht (Vgl.: 1.3, Abbildung 3). Die geschickte Verwendung von isolierten PZ in der Immunfluoreszenz könnte somit eine hervorragende methodische Weiterentwicklung zur Klärung der Lokalisation von K^+ -Kanälen in PZ sein.

3.1.5.1 Parietalzellkulturen.

Zur weiteren Analyse der Lokalisation, Umverteilung und der physiologischen Relevanz von Kir4.1 und KCNQ1 wurden PZ der Ratte oder des Kaninchens isoliert und

kultiviert. In Abbildung 18 wird exemplarisch eine PZ-Präparation aus der Magenmukosa eines Rattenmagens vorgestellt.

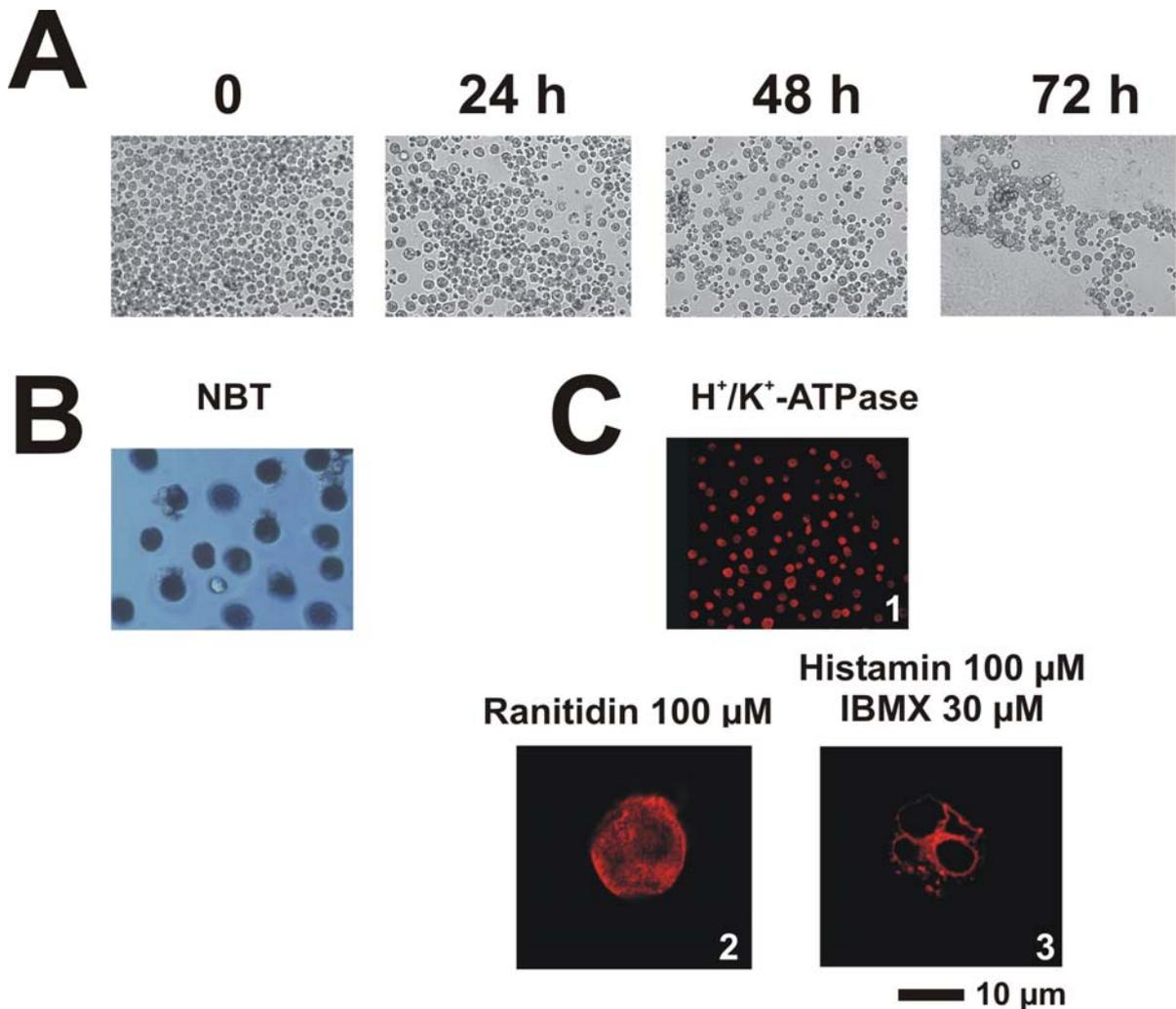


Abbildung 18: Primäre Parietalzellkultur (0-72 h). Die Identifizierung der Parietalzellen geschah lichtmikroskopisch (A), mit Hilfe des NBT-Test (B) und über Immunfluoreszenz-Studien (C₁ bis C₃) mit einem Maus-Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (β-Untereinheit). Nach Histamin (100 µM) und IBMX (30 µM) ist eine deutliche Umverteilung der H⁺/K⁺-ATPase in die VAC's der PZ der Ratte zu erkennen.

Die Identifizierung der PZ geschah zunächst lichtmikroskopisch. PZ sind die größten Zellen der Magenmukosa, weisen eine starke Körnung auf und kommen am häufigsten in der Magenmukosa (Hogben et al., 1974) Sie verlieren durch den Isolationsprozess ihre Polarität und erscheinen deshalb im Lichtmikroskop rund. Die apikale Membran ist als so genannte

VAC's internalisiert (Chew et al., 1989). Mit dem NBT-Test und über Immunfluoreszenz-Studien konnten diese Zellen zusätzlich weiter identifiziert werden (Abbildung 18).

3.1.5.2 Trafficking von Kir4.1, KCNQ1 und H⁺/K⁺-ATPase nach Stimulierung in isolierten Parietalzellen des Rattenmagens.

Ähnlich wie in den hochangereicherten Membranen oder den Kryoschnitten konnte auch in isolierten und fixierten PZ nach Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM)-Stimulierung eine Umverteilung von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase in die sekretorische Membran der PZ der Ratte beobachtet werden (Abbildung 19 B₁ bis B₄). Im ruhenden Zustand der PZ der Magenmukosa des Rattenmagens waren sowohl Kir4.1, KCNQ1 als auch die H⁺/K⁺-ATPase diffus in der Zelle verteilt (Abbildung 19 A₁ bis A₄). Dies spiegelte die Verteilung der H⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden TC vor Stimulierung der Säuresekretion wieder (Vgl.: 1.3).

Nach Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM)-Stimulierung waren Kir4.1 und die H⁺/K⁺-ATPase besonders eng kolokalisiert und translozierten fast vollständig in die apikale Membran (Abbildung 19 B₁, B₂ und B₄). Auch KCNQ1 translozierte in die apikale Membran doch im Gegensatz zu Kir4.1 und der H⁺/K⁺-ATPase, verblieben deutliche Anteile in zytoplasmatischen Kompartimenten (Abbildung 19 B₃ und B₄). Dies wurde durch die bläulichen Bereiche im Overlay deutlich (Abbildung 19 B₄). Diese Ergebnisse der Immunfluoreszenz gingen einher mit den zellbiochemischen Daten, die durch den Vergleich eines P₃-Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa mit einem P₃-Gradienten einer Membran-Präparation unstimulierter Zellen der Magenmukosa, Unterschiede in der Umverteilung von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase ermittelten (Abbildung 15 A).

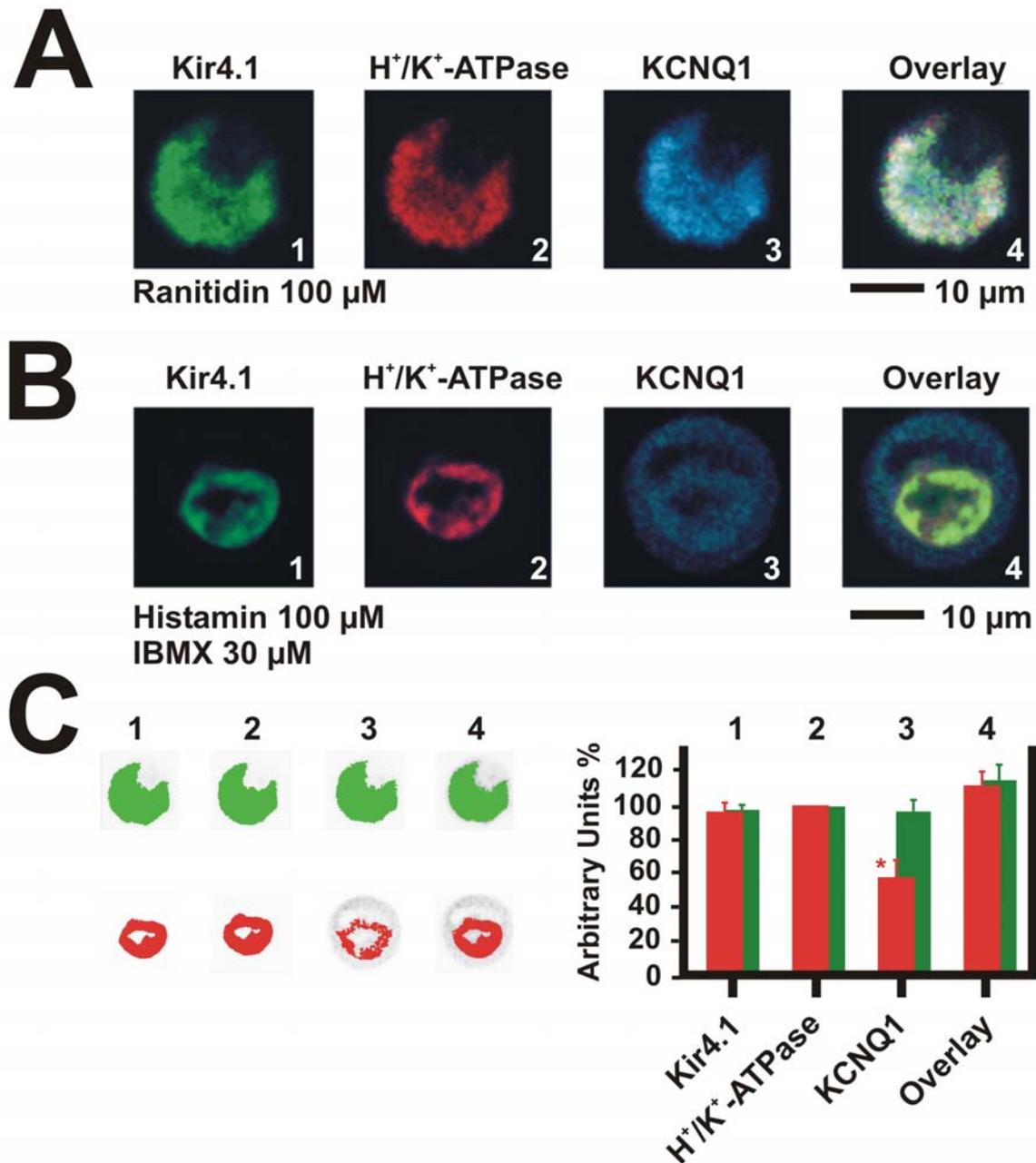


Abbildung 19: Umverteilung von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase nach Stimulierung der Säuresekretion in isolierten und kultivierten PZ der Magenmukosa des Rattenmagens. Die PZ wurden vor der Fixierung entweder für 60 min mit Ranitidin (100 μM) oder für 25 min mit Histamin (100 μM) plus IBMX (30 μM) inkubiert. Kir4.1 (Alexa Fluor 488, grün), die H⁺/K⁺-ATPase (Alexa Fluor 543, rot) und KCNQ1 (Alexa Fluor 633, blau) waren im ruhenden Zustand diffus über die PZ verteilt. Nach Histamin (100μM)/IBMX (30 μM)-Stimulierung translozierten Kir4.1, KCNQ1 und die H⁺/K⁺-ATPase von intrazellulären Kompartimenten in die sekretorische Membran der PZ. Während Kir4.1 und die H⁺/K⁺-ATPase im stimulierten Zustand eng kolokalisierten, wie KCNQ1 neben einer apikalen auch weiterhin eine diffuse Lokalisation auf. Dies wurde durch die blauen Signale in dem Overlay deutlich und ließ sich auch densitometrisch veranschaulichen (C).

Densitometrische Analysen der PZ nach Inkubation mit Ranitidin (100 μM) (grün) oder Histamin (100 μM)/IBMX (30 μM) (rot) veranschaulichten, dass KCNQ1 bezogen auf die H^+/K^+ -ATPase (100 % Kontrolle) nur zu $56,95 \pm 10,7$ % in der internalisierten sekretorischen-apikalen Membran zu finden war (Abbildung 19 C₃). Demgegenüber zeigte Kir4.1 im Vergleich zur H^+/K^+ -ATPase sowohl im ruhenden als auch im stimulierten Zustand eine nahezu identische Verteilung wie die H^+/K^+ -ATPase ($96,28 \pm 6,12$ %) (Abbildung 19 C₁, C₂ und C₄).

3.1.6 Studien zur Lokalisation und zum *Trafficking* von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transient transfizierten Zellkulturen.

Die bisher gezeigten Ergebnisse der Immunfluoreszenz unterstützen die Ergebnisse der Membran-Präparationen. Kir4.1, KCNQ1 und H^+/K^+ -ATPase waren auf intrazellulären, zytoplasmatischen H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC lokalisiert und translozierten nach Histamin-Stimulierung in die apikalen Membran. Allerdings wies KCNQ1 nach Histamin-Stimulierung neben einer apikalen Lokalisation auch weiterhin eine starke diffuse zytoplasmatische Verteilung auf. Kir4.1 dagegen schien auch nach Histamin-Stimulierung sehr eng mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert zu sein. Aufgrund dieser engen Kolokalisierung von Kir4.1 und der H^+/K^+ -ATPase wurde mit Kir4.1-DNS-Konstrukten untersucht in wie weit ein *Trafficking* von Kir4.1 mit dem *Trafficking* von KCNQ1 und/oder der H^+/K^+ -ATPase verglichen werden kann.

3.1.6.1 Lokalisation von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transfizierten AGS-Zellen.

Da die Präparation, Kultivierung und Transfektion von PZ sehr aufwendig und zeitintensiv war, wurden die Kir4.1-DNS-Konstrukte vorab in AGS-Zellen transfiziert und getestet. Ziel war es, einerseits die Transfektion zu optimieren und andererseits für

Phosphorylierungs-Experimente ein geeignetes Model zur Überexpression von Kir4.1 zu erhalten.

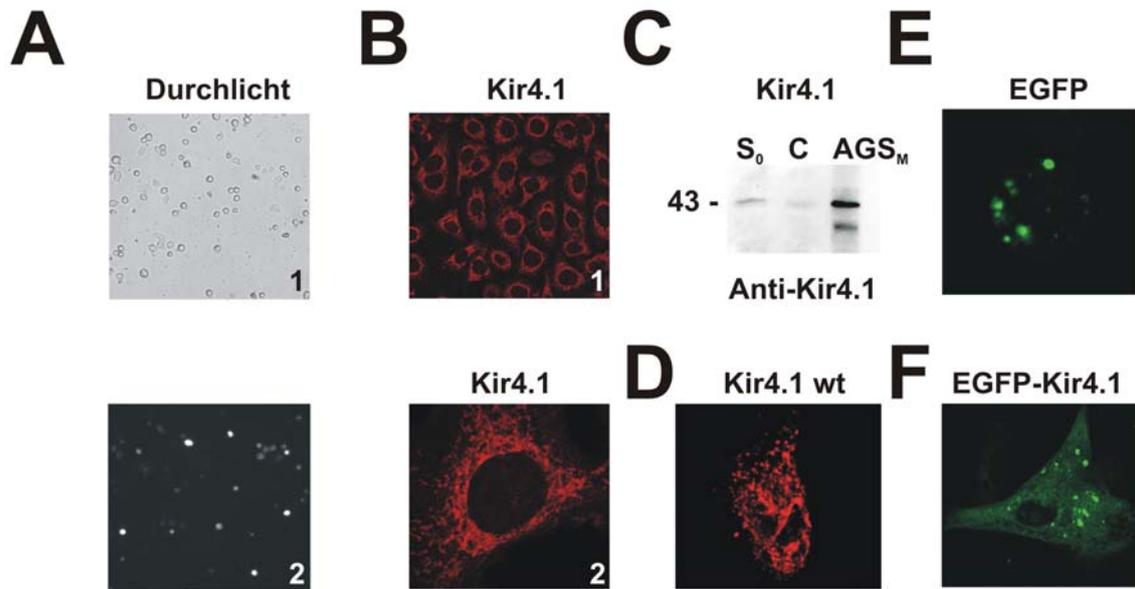


Abbildung 20: Kontrollelexperimente zur Transfektion von Kir4.1 in Zellkulturen. A: Durchlicht (A₁) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (A₂) der Transfektionseffizienz nach 24 h in AGS Zellen. In AGS Zellen wiesen sowohl Kir4.1 (Alexa Fluor 546) (B₁ und B₂), die transient transfizierten Kir4.1-Konstrukte Kir4.1 wt (D) (Alexa Fluor 546) und EGFP-Kir4.1 (F) im Gegensatz zu EGFP-transfizierten (E) AGS-Zellen eine ähnlich diffuse Verteilung innerhalb der Zelle auf. Nach Fraktionierung von AGS-Zellen war Kir4.1 deutlich in der Membran-Fraktion (100.000×g Pellet, AGS_M) an- und sichtbar in der Zytosol-Fraktion (100.000×g Überstand) abgereichert (C).

Kir4.1 wt und EGFP-Kir4.1 ließen sich sowohl mit LipofektaminTM 2000 (Göoz et al., 2000) als auch mit dem Effektene Transfektions Reagenz gut in AGS-Zellen transfizieren, so dass $77,6 \pm 5,5$ % der AGS-Zellen nach Transfektion das entsprechende Kir4.1-Konstrukt exprimierten.

3.1.6.2 Lokalisation und *Trafficking* von Kir4.1-DNS-Konstrukten in transient transfizierten Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens.

Im Gegensatz zur Transfektion von AGS-Zellen stellte sich die Transfektion von PZ schwieriger dar.

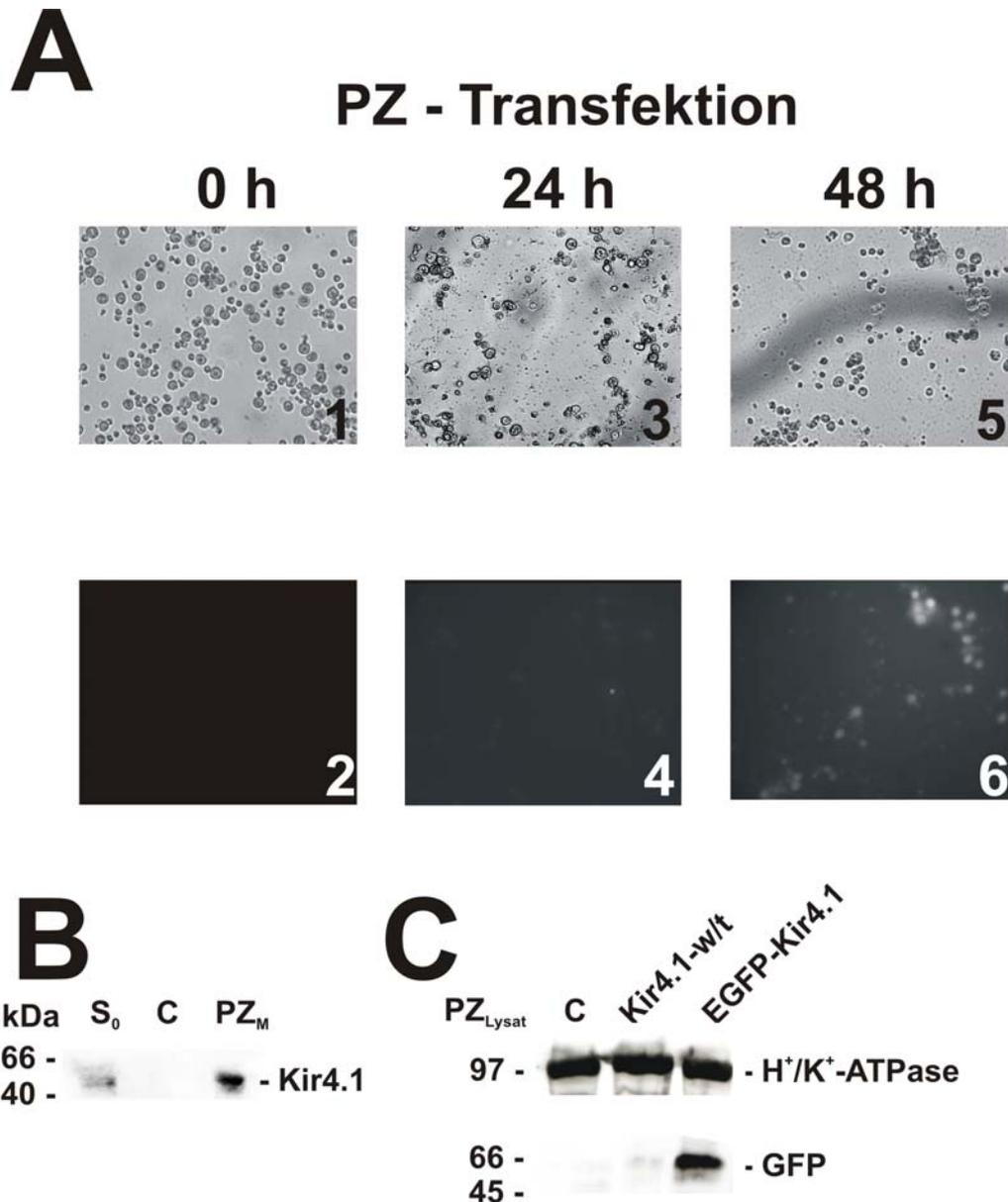


Abbildung 21: Transfektion von Kir4.1 in Parietalzellen des Kaninchens. A: Durchlicht (A₁, A₃, A₅)- und Fluoreszenzmikroskopische (A₂, A₄, A₆)- Aufnahmen. Abschätzung der Transfektionseffizienz zwischen 0 bis 72 h nach der Transfektion der PZ aus dem Vergleich der im Lichtmikroskop dargestellten PZ mit ihrer Fluoreszenz. B: Fraktionierung von PZ des Kaninchens. Kir4.1 war deutlich angereichert in der Membran-Fraktion (100.000×g Pellet) und sichtbar abgereichert in der Zytosol-Fraktion (100.000×g Überstand). C: Expression der Fusionsproteine detektiert mit einem Anti-GFP-Antikörper. Das Signal für EGFP-Kir4.1 war in der erwarteten Größe ~65kDa wie beschrieben bei Stockklausner et al. (2001).

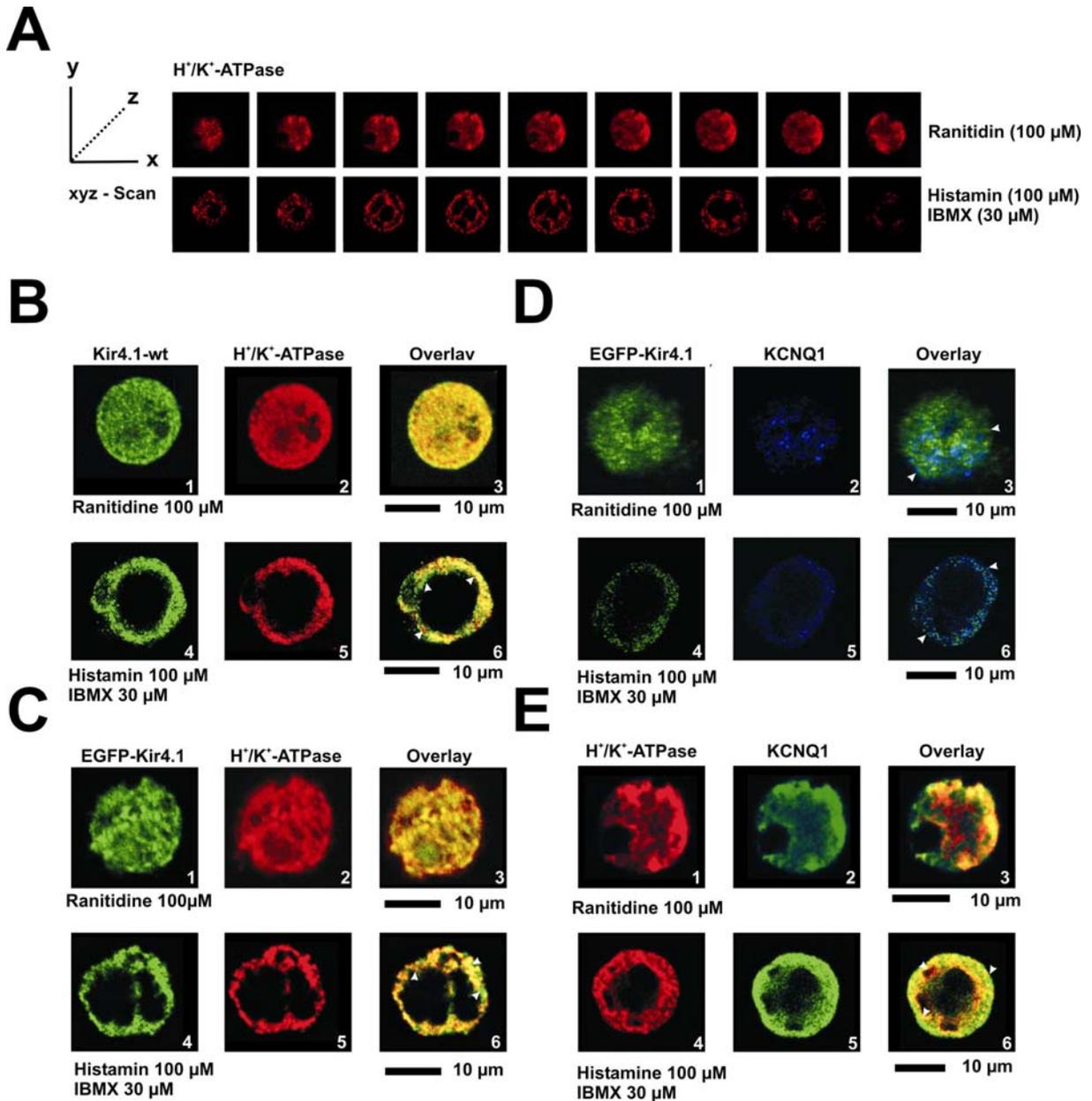


Abbildung 22: Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens. A: Vergleich unstimulierter und stimulierter PZ des Kaninchens. Die xyz-Reihe wurde in vom System vorgegebenen optimalen Serien aufgezeichnet. Die PZ wurden vor der Fixierung entweder für 60 min mit Ranitidin (100 μ M) oder für 25 min mit Histamin (100 μ M) plus IBMX (30 μ M) inkubiert. B-D: Mit Kir4.1-wt- oder EGFP-Kir4.1-cDNS transfizierte und fixierte PZ des Kaninchens. Kir4.1-wt und EGFP-Kir4.1 zeigten eine ähnliche Verteilung wie die H^+/K^+ -ATPase auf (A, B). C: EGFP-Kir4.1 und KCNQ1 (Alexa Fluor 633, blau) waren sowohl im ruhenden als auch nach Histamin (100 μ M)/IBMX (30 μ M)-Stimulierung nicht kolokalisiert. Dies wurde durch den Overlay deutlich, in dem die Signale für EGFP-Kir4.1 und KCNQ1 deutlich getrennt vorlagen (D₃ und D₆). E: Nicht-transfizierte PZ. KCNQ1 (Alexa Fluor 633, grün) wies nach Histamin (100 μ M) und IBMX (30 μ M)-Stimulierung die schon beschriebene apikale als auch diffuse Verteilung in PZ auf (E₆). Die weißen Pfeile heben die hier gemachten Aussagen hervor.

Obwohl publiziert ist, dass man PZ mit LipofektaminTM transfizieren kann (Muraoka et al., 1996), konnten damit nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Stattdessen exprimierten bis zu 40 % der PZ das entsprechende Kir4.1-Konstrukt nach Transfektion mit dem Effectene Transfection ReagentTM (Chew et al., 1989, 1998; Parente et al., 1999).

Weiterführende Immunfluoreszenz-Studien mit Kir4.1-wt und EGFP-Kir4.1 transfizierten PZ der Magenmukosa des Kaninchens bestätigten die Immunpräzipitations-Studien dahingehend, dass Kir4.1 und KCNQ1 auf unterschiedlichen H⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden TC und SA-Kompartimenten vorzukommen scheinen (Abbildung 22 C₃ und C₆). In EGFP-Kir4.1 transfizierten PZ der Magenmukosa des Kaninchenmagens waren die Fluoreszenzsignale für EGFP-Kir4.1 (Abbildung 22 C₁ und C₄, grün) und KCNQ1 (Abbildung 22 C₂ und C₅, blau) sowohl im ruhenden als auch nach Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM)-Stimulierung deutlich getrennt (Abbildung 22 C₃ und C₆).

Nach Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM)-Stimulierung waren Kir4.1-wt und EGFP-Kir4.1 kolokalisiert mit der H⁺/K⁺-ATPase und translozierten in die apikale Membran (Abbildung 22 A und B). Auch KCNQ1 translozierte in die apikale Membran (Abbildung 22 C und D) doch im Gegensatz zu Kir4.1 und der H⁺/K⁺-ATPase, verblieben deutliche Anteile in zytoplasmatischen Kompartimenten (Abbildung 22 D). Dies wird durch die weißen Pfeile im Overlay hervorgehoben (Abbildung 22 C₆ und D₆).

Diese Ergebnisse der Immunfluoreszenz gingen einher mit den zellbiochemischen Daten, die durch den Vergleich eines P₃-Gradienten einer Membran-Präparation Histamin-stimulierter Zellen der Magenmukosa mit einem P₃-Gradienten einer Membran-Präparation

unstimulierter Zellen der Magenmukosa, Unterschiede in der Umverteilung von Kir4.1, KCNQ1 und der H⁺/K⁺-ATPase ermittelten (Abbildung 15).

3.1.6.3 Trafficking von EGFP-Kir4.1 durch Life-Zell-Imaging an transient transfizierten Parietalzellen des Kaninchenmagens.

Aufgrund der engen Kollokalisierung von Kir4.1 und der H⁺/K⁺-ATPase nach Histamin (Abbildung 14, Abbildung 15) und Histamin (100 μM)/IBMX (30 μM)-Stimulierung (Abbildung 19 B₁, B₂ und B₄, Abbildung 22 A und B) soll im Weiteren speziell das *Trafficking* von Kir4.1 im Zentrum des Interesses stehen.

Dieses *Trafficking* konnte durch Life-Zell-Imaging mit EGFP-Kir4.1 transfizierten PZ nachvollzogen werden. Gewählt wurde dazu das Zeitfenster (0-30 min), das auch für die Immunfluoreszenz- und Säuresekretions-Studien benutzt wurde (Vgl.: Abbildung 19, Abbildung 22, Abbildung 25, Abbildung 26).

Nach Histamin (100 μM)- und Carbachol (100 μM)-Stimulierung der PZ translozierte EGFP-Kir4.1 von intrazellulären Kompartimenten in die sekretorische Membran. Dies war sichtbar geworden durch eine Vergrößerung der VAC's, die einherging mit einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität des EGFP-Kir4.1 in den VAC's (Abbildung 23, Abbildung 24 A₃).

Die Fluoreszenzintensität war um das 7,9±0,7 fache nach 30 min nach Histamin (100 μM)- und Carbachol (100 μM)-Stimulierung im Vergleich zum Nullwert (0 min) erhöht (Abbildung 24 B). Eine Umverteilung von EGFP-Kir4.1 konnte unter Zugabe von Ranitidin (100 μM) nicht beobachtet werden (Abbildung 23). Stattdessen wurde eine leichte Zunahme der Gesamt-PZ-Fluoreszenz (gPZ) sowohl in Ranitidin (100 μM) vorbehandelten als auch

nach Histamin (100 μ M)- und Carbachol (100 μ M)-Stimulierung über die Zeit (0-30 min) sichtbar (Abbildung 23).

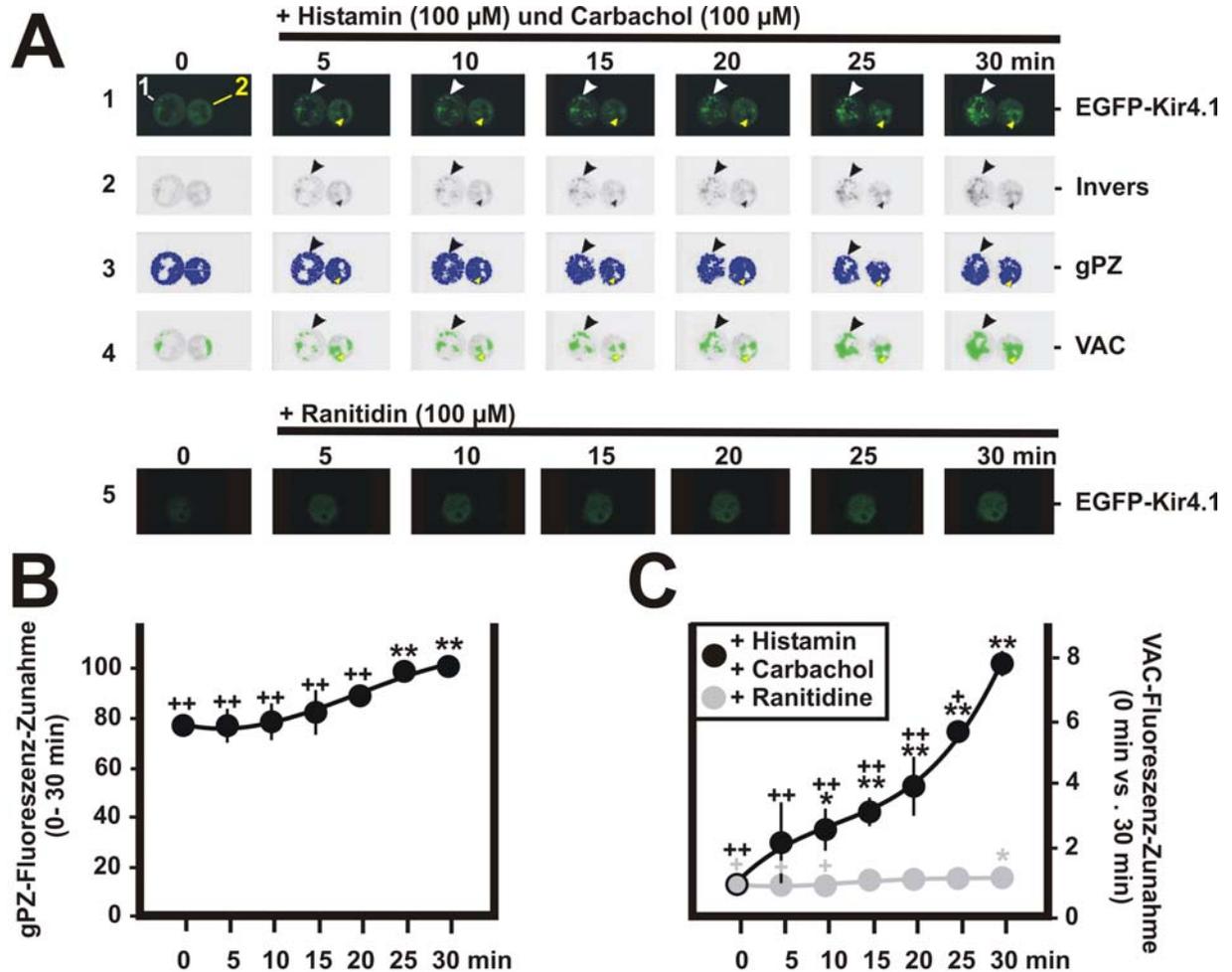


Abbildung 23: Transient transfizierte PZ des Kaninchens zeigen eine deutliche Umverteilung des EGFP-Kir4.1 nach Histamin (100 μ M)- und Carbachol (100 μ M)-Stimulierung an (A). Dies wird durch die weißen und gelben Pfeile hervorgehoben (weiß: PZ 1, gelb: PZ 2). Dargestellt ist exemplarisch die densitometrische Auswertung eines Zeitverlaufs nach Stimulierung mit Histamin (100 μ M)/Carbachol (100 μ M) (A₁ bis A₄) im Vergleich zu PZ, die mit Ranitidin (100 μ M) behandelt wurden (A₅). Ein vergleichbarer Anstieg der Gesamt-Parietalzell-Fluoreszenz (gPZ) konnte sowohl im ruhenden als auch im stimulierten Zustand beobachtet werden (B). Eine Zunahme der Fluoreszenz in den VAC's und ein damit verbundenes *Trafficking* von EGFP-Kir4.1 konnte nach Histamin (100 μ M)/Carbachol (100 μ M)-Stimulierung entdeckt werden (C). Eine Inkubation mit Ranitidin (100 μ M) hatte kein *Trafficking* von EGFP-Kir4.1 zur Folge (C). * = P < 0,05, ** = P < 0,01 vs. Nullwert; + = P < 0,05, ++ = P < 0,01 vs. 100 % Kontrolle.

Weitergehende *Trafficking*-Studien haben gezeigt, dass sowohl Histamin (100 μ M)- als auch Carbachol (100 μ M)-Stimulierung eine Umverteilung von EGFP-Kir4.1 zur Folge hatten (Abbildung 24 A).

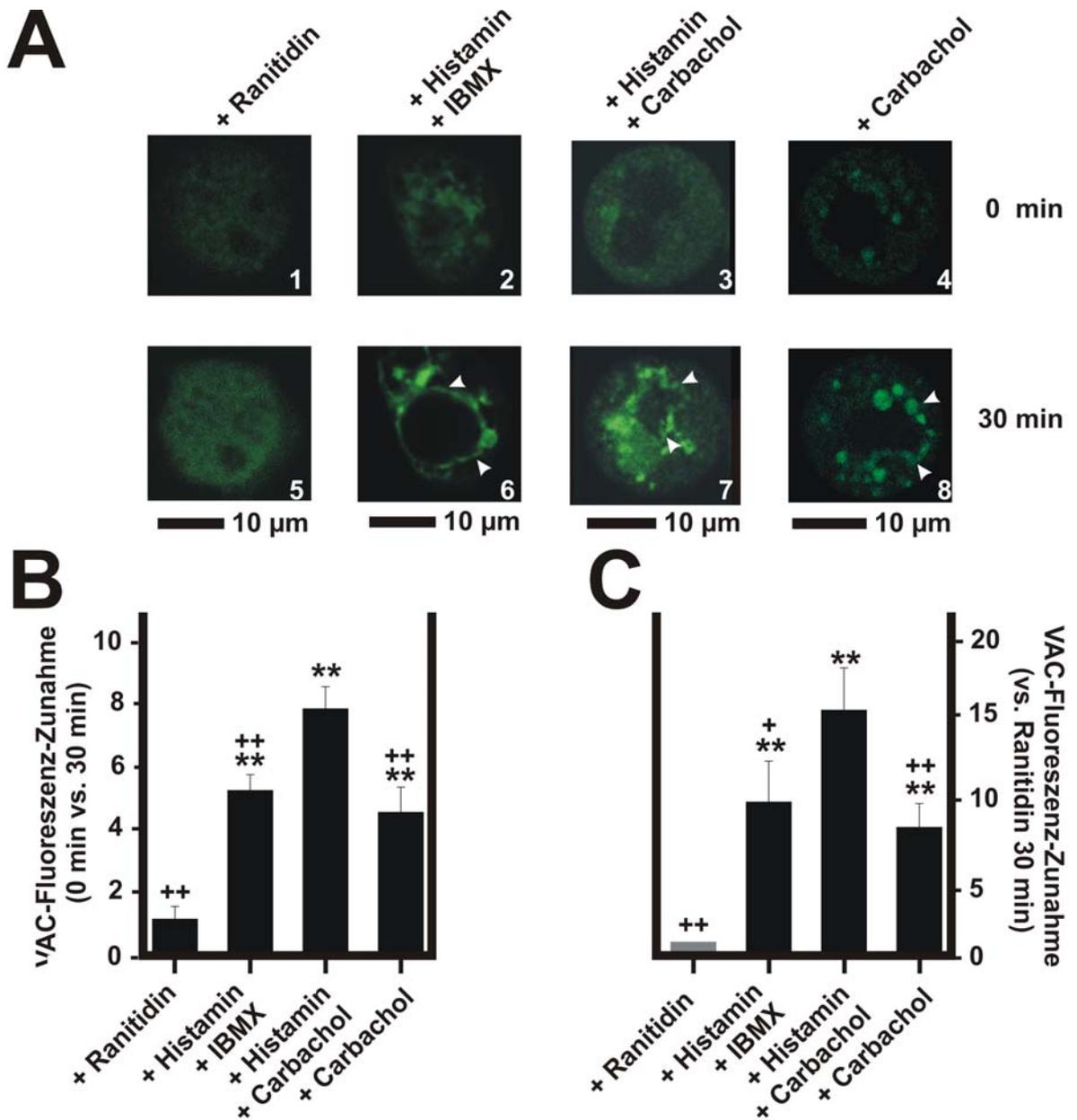


Abbildung 24: *Trafficking* von EGFP-Kir4.1 in transient transfizierten PZ nach Stimulierung mit Histamin (100 μ M)/IBMX (30 μ M), Histamin (100 μ M)/Carbachol (100 μ M) und Carbachol (100 μ M). Ranitidin (100 μ M) hatte keinen Einfluss auf das *Trafficking* von EGFP-Kir4.1. Eine Kombination von Histamin (100 μ M) und Carbachol (100 μ M) hatte den stärksten Effekt auf das *Trafficking* von Kir4.1.

Im Vergleich zu PZ, die mit Ranitidin inkubiert wurden wird sichtbar, dass Histamin (100 μM)/IBMX (30 μM) ($9,92 \pm 2,6$ fache) und Carbachol (100 μM) ($8,3 \pm 1,5$ fache) einen ähnlichen Effekt auf die Translokation von Kir4.1 hatten und dass der Effekt von Histamin (100 μM)/Carbachol (100 μM) durch Kombination beider Substanzen deutlich verstärkt werden konnte ($15,7 \pm 2,7$ fache) (Abbildung 24 A₇, B und C)

3.2 Physiologische Studien zur Funktion von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der Parietalzellen.

3.2.1 Indirekte Messung der Säuresekretion mit der [¹⁴C]Aminopyrin-Aufnahme oder Acridin Orange-Messungen an Parietalzellen der Ratte.

Zur indirekten Messung der Säuresekretion wurden die schwachen Base-Marker [¹⁴C]AP-Aufnahmen und Acridin Orange verwendet. Diese diffundieren in die PZ und können nach Protonierung die PZ nicht mehr verlassen und werden stattdessen in saurem Milieu angereichert.

Die VAC's der PZ (Vgl.: 1.3, Abbildung 3) akkumulieren Säure, was auf die Aktivität der H⁺/K⁺ATPase nach Stimulierung hindeutet (Chew et al., 1989; Mangeat et al., 1990; Soroka et al., 1993; Agnew et al., 1999). Diese Eigenschaft macht man sich methodisch zur indirekten Messung der Säuresekretion der PZ zu nutze. Das Maß der Akkumulierung des [¹⁴C]AP oder des Acridin Orange nach Stimulierung ist somit ein indirektes Maß für die Säuresekretion der PZ (Chew et al., 1989; Mangeat et al., 1990; Agnew et al., 1999; Fähmann et al., 2002; Karvar et al., 2003).

Die basale [¹⁴C]AP-Aufnahme in isolierten, kultivierten und unstimulierten PZ der Magenmukosa der Ratte betrug in der Gegenwart von Ranitidin (100 μM) $5,39 \pm 1,6 \text{ nmol } 10^{-6}$

Zellen⁻¹ 45 min⁻¹. Nach Stimulierung der Säuresekretion durch Histamin (100 µM) war die [¹⁴C]AP-Aufnahme um das 4.18±0.63 fache im Vergleich zur Kontrolle mit Ranitidin (100 µM) auf 22,6±3,4 nmol 10⁻⁶ Zellen⁻¹ 45 min⁻¹ gesteigert. Eine weitere Steigerung auf das 5,28±0,55 fache im Vergleich zur Kontrolle konnte durch gleichzeitige Stimulierung mit Histamin (100 µM)/ IBMX (30 µM) erzielt werden. Dem gegenüber zeigten Carbachol (100 µM)-stimulierte PZ einen schwächeren Anstieg der [¹⁴C]AP-Aufnahme um das 2,79±0,5 fache im Vergleich zur Kontrolle auf 15±3,74 nmol 10⁻⁶ Zellen⁻¹ 45 min⁻¹.

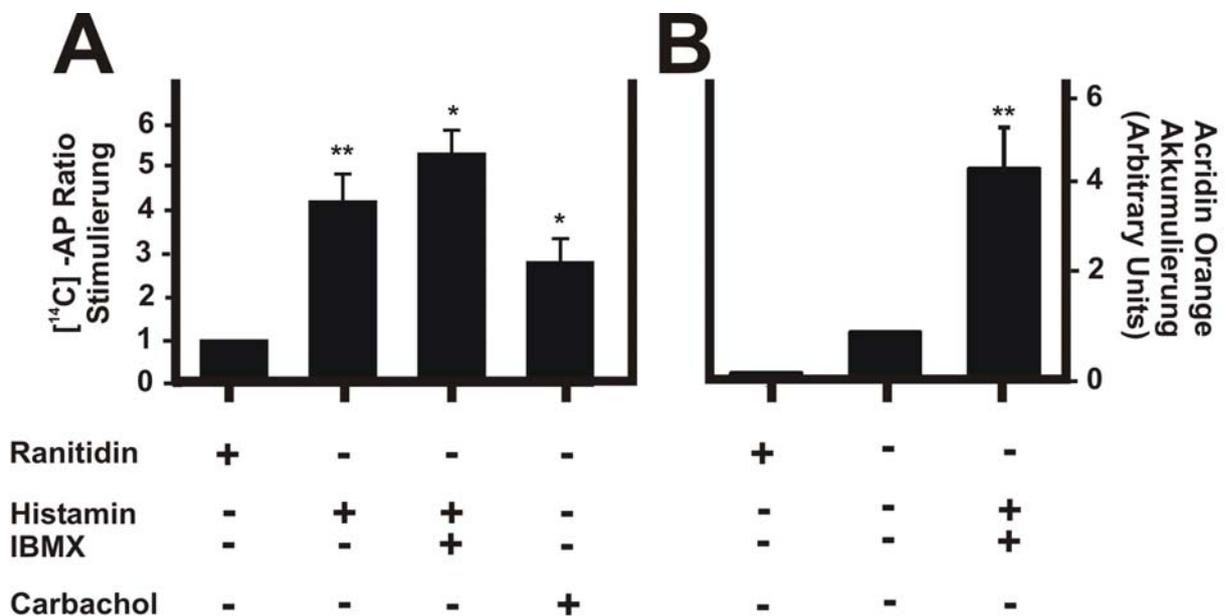


Abbildung 25: Sekretorische Stimulierung von isolierten und kultivierten PZ der Magenmukosa der Ratte. A: [¹⁴C]AP-Aufnahmen nach Stimulierung der Säuresekretion mit Histamin (100 µM), Histamin (100 µM) und IBMX (30 µM) und Carbachol (100 µM). B: Densitometrische Analyse der Acridin Orange-Akkumulierung nach Stimulierung der Säuresekretion der PZ mit Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM).

Einen vergleichbaren Anstieg der Säuresekretion konnte durch die Inkorporation von Acridin Orange nach Histamin (100 µM)/IBMX (30 µM)-Stimulierung festgestellt werden.

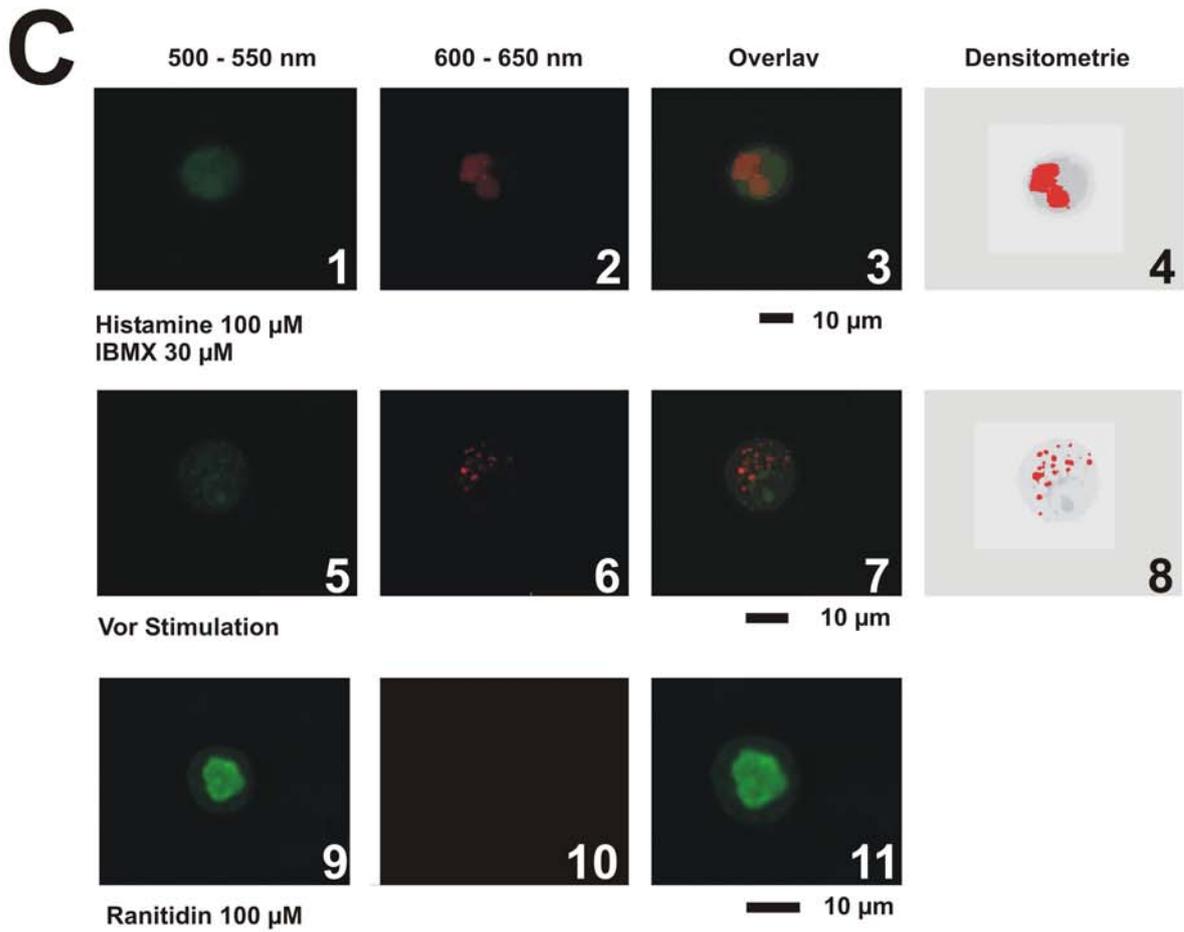
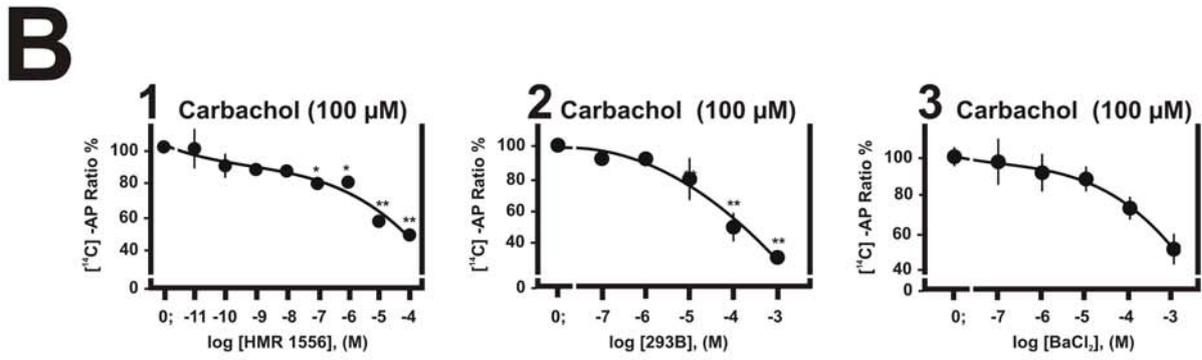
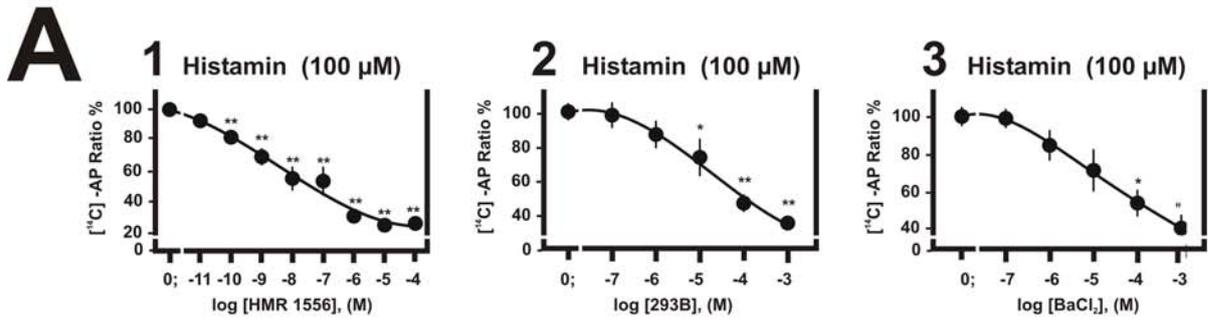


Abbildung 26: Indirekte Messungen der Säuresekretion der PZ. A: Der hochwirksame KCNQ1-Inhibitor HMR 1556 blockierte die Histamin (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP-Aufnahme konzentrationsabhängig um ca. 75% (A₁). Carbachol (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP-Aufnahme wurde durch HMR 1556 (10 bis 100 μ M) um ca. 40 % gehemmt. 293B inhibierte sowohl Histamin (100 μ M)- als auch Carbachol (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP Aufnahme um bis zu 75 % (A₂, B₂). BaCl₂ blockierte sowohl Histamin (100 μ M)- als auch Carbachol (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP Aufnahme um ca. 50% (A₃, B₃). C: Auswertung der Akkumulierung von Acridin Orange nach Histamin (100 μ M)/IBMX (30 μ M) Stimulierung (C₁ bis C₅) im Vergleich zur Kontrolle (C₉-C₁₁). * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$.

Die densitometrische Auswertung des Farbumschlags von PZ, die mit Acridin Orange (10 μ M) inkubiert wurden, ergab eine Erhöhung der Säuresekretion um den Faktor $4,67 \pm 0,9$ nach Stimulierung mit Histamin (100 μ M)/IBMX (30 μ M) im Vergleich zur Kontrolle mit Ranitidin (100 μ M) (Abbildung 25, B, Abbildung 26 C₁ bis C₁₁).

Alle drei eingesetzten K⁺-Kanal-Inhibitoren hemmten die H₂- bzw. M₃-Rezeptor-vermittelte [14 C]AP-Aufnahme. Die KCNQ1-Inhibitoren HMR 1556 bzw. 293B hemmten Histamin-stimulierte [14 C]AP-Aufnahme konzentrationsabhängig um ca. 75 %, womit sich IC₅₀ Werte zwischen 40 nM für HMR 1556 beziehungsweise 2,1 μ M für 293B ergaben. Auf die M₃-Rezeptor-vermittelte [14 C]AP-Aufnahme zeigte 293B einen ähnlichen Effekt. Im Gegensatz dazu hemmte HMR 1556 Carbachol (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP Aufnahme nur um ca. 40 % und war mit einem IC₅₀ von 31 μ M im Vergleich zu dem Effekt bei Histamin-stimulierter [14 C]AP-Aufnahme nicht sehr wirksam auf den M₃-Rezeptor-vermittelten-Signaltransduktionsweg.

Ähnlich wie 293B hemmte auch der unspezifische Kir-Kanal-Blocker BaCl₂ sowohl Histamin (100 μ M)- als auch Carbachol (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP-Aufnahme. H₂- und M₃-Rezeptor-vermittelte [14 C]AP-Aufnahme wurden durch BaCl₂ konzentrationsabhängig um bis zu 50 % inhibiert. Es ergaben sich IC₅₀-Werte zwischen 16,8 μ M für Histamin beziehungsweise 40,3 μ M für Carbachol.

3.2.2 γ -[³²P]ATP-Phosphorylierungs- und [¹⁴C]AP-Aufnahme-Studien zeigten unspezifische Effekte von 293B im Rahmen der cholinerg-vermittelten Säuresekretion.

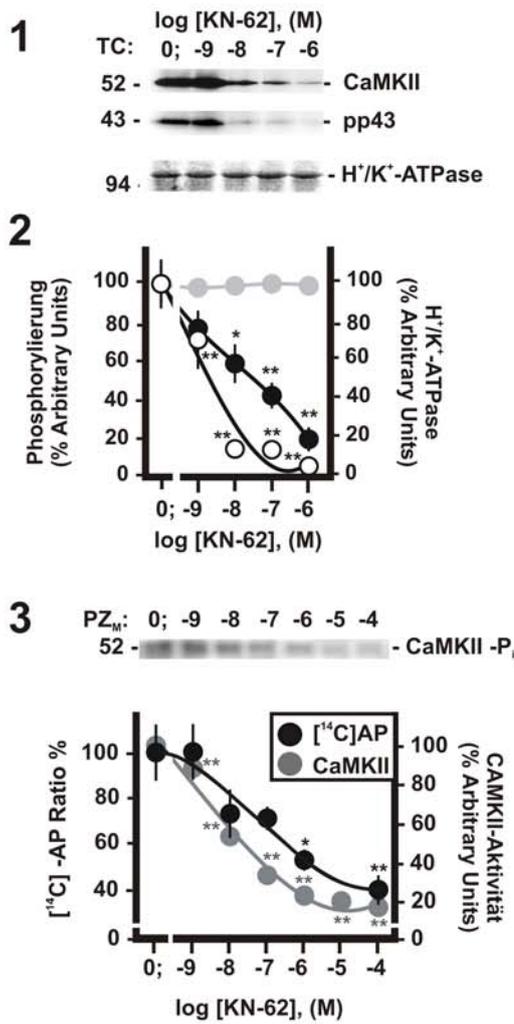
Bereits publizierte Daten legen nahe, dass sowohl die Aktivierung der PKC als auch die Inhibierung der CaMKII zu einem deutlichen Abfall der cholinerg-induzierten Säuresekretion führen (Fährmann et al., 2003). Eine Korrelierung der Inhibierung der CaMKII mit der Inhibierung H⁺ Sekretion konnte auch hier beobachtet werden.

Ein Vergleich der Inhibierung gereinigter CaMKII durch KN-62 (Daten nicht gezeigt, Fährmann et al., 2003) mit der Carbachol-induzierten [¹⁴C]AP-Aufnahme unter Einfluss von KN-62 (Abbildung 27 A₃) zeigten eine „ähnlichen“ sigmoiden Verlauf der Inhibierungskurve mit einem IC₅₀ im Bereich von ~ 39 bis 32 nM.

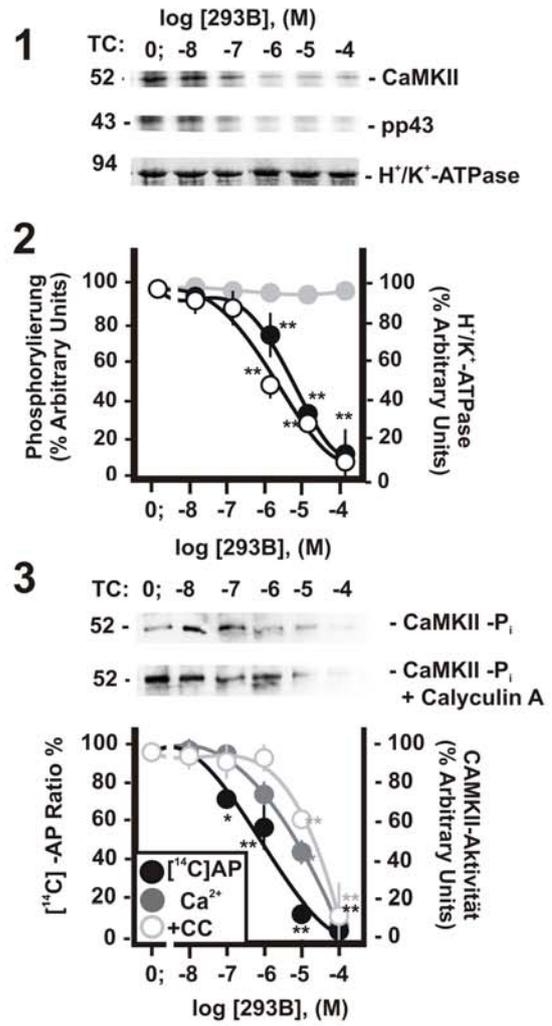
Die eingesetzten K⁺-Kanal-Inhibitoren hemmten die H₂- bzw. M₃- Rezeptor-vermittelte [¹⁴C]AP-Aufnahme in den PZ der Ratte (Abbildung 26 A und B) und des Kaninchens (Abbildung 27 B₃, Abbildung 28 B). Auffällig war jedoch, dass auch hohe Konzentrationen von HMR 1556 (10 bis 100 µM) und BaCl₂ (100 µM bis 1 mM) keine wesentlichen Effekte auf die Phosphorylierung der CaMKII zeigten, wohingegen 293B die Aktivierung und Phosphorylierung der CaMKII konzentrationsabhängig mit einem IC₅₀ zwischen 13 bis 23 µM hemmte (Abbildung 27 B). Diese Hemmung konnte einerseits mit γ -[³²P]ATP-Phosphorylierungen (Abbildung 27 B₁ und B₂) und andererseits im Westernblot mit einem Anti-aktivierte-CaMKII-Antikörper gezeigt werden (Abbildung 27 B₃).

Die hemmende Wirkung von 293B auf Phosphorylierungen schien speziell bei der cholinerg-vermittelten Säuresekretion zu wirken, denn weitere Studien haben gezeigt, dass PKA-induzierte Phosphorylierungen durch 293B nicht beeinflusst wurde (Abbildung 28 A).

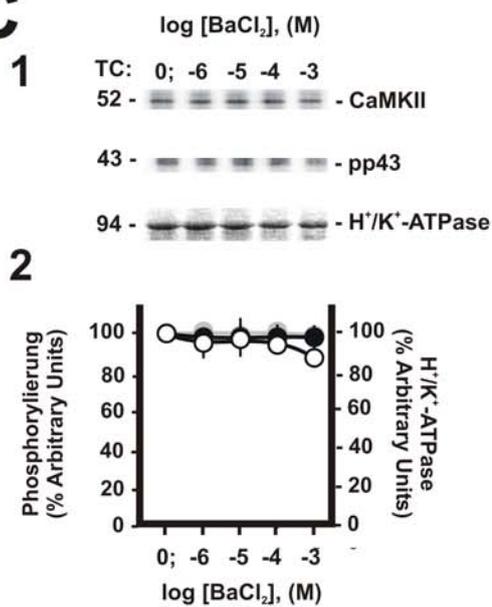
A



B



C



D

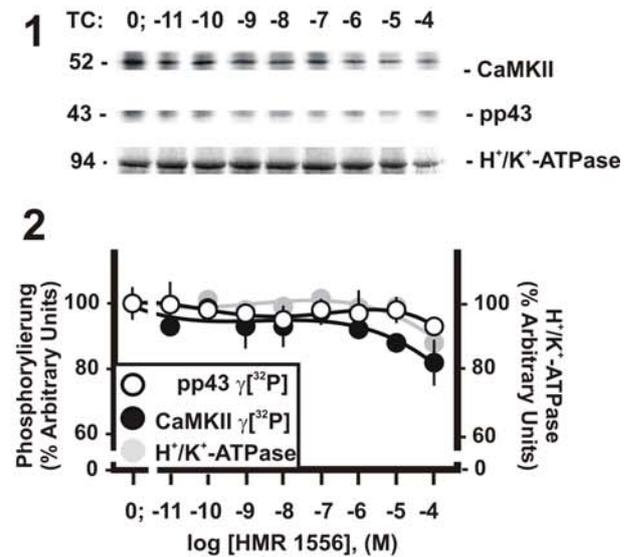


Abbildung 27: Studien zum Einfluss von KN-62, 293B, BaCl₂ und HMR 1556 auf den cholinerg vermittelten Signaltransduktionsweg in PZ der Magenmukosa des Kaninchens. A: KN-62 hemmte in Anwesenheit von Ca²⁺ die γ -[³²P]ATP-Phosphorylierung der CaMKII und von pp43 in hochangereicherten TC (A₁ und A₂), die Aktivierung der CaMKII in PZ_M und die Carbachol-induzierte [¹⁴C]AP-Aufnahme (A₃) in PZ der Magenmukosa des Kaninchens konzentrationsabhängig. B: 293B hemmte ebenfalls in Anwesenheit von Ca²⁺ die γ -[³²P]ATP-Phosphorylierung der CaMKII und von pp43 (B₁ und B₂) und die Aktivierung der CaMKII in hochangereicherten TC (B₃). Die Zugabe von Calyculin A verstärkt die Aktivierung der CaMKII (B₃). Carbachol induzierte-[¹⁴C]AP-Aufnahme in PZ der Magenmukosa des Kaninchens wurde durch 293B konzentrationsabhängig mit einem IC₅₀ 3,7 μ M gehemmt. BaCl₂ und HMR 1556 schienen keinen wesentlichen Einfluss auf die Phosphorylierung der CaMKII und auf pp43 in TC zu haben. [¹⁴C]AP-Aufnahme 100 % nach Carbachol-Stimulierung entspricht einer [¹⁴C]AP-Aufnahme von 9,4 nmol 10⁻⁶ Zellen⁻¹ 45 min⁻¹ und war im Vergleich zum Kontrollwert um dass 3,12 \pm 0,72 fache erhöht.

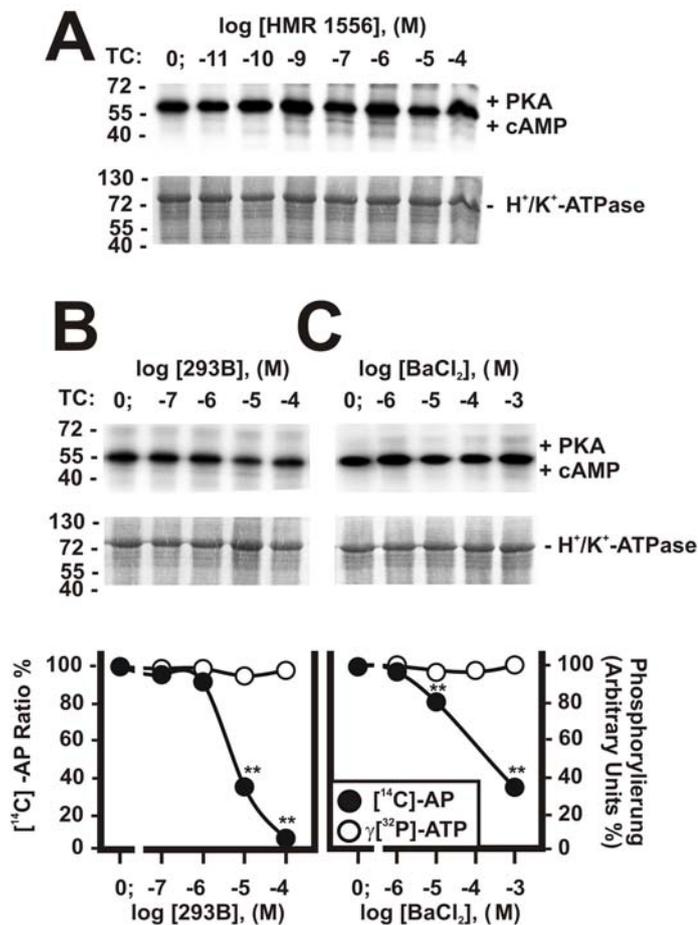


Abbildung 28: Studien zum Einfluss von HMR 1556, 293B und BaCl₂ auf den H₂-Histamin-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg in PZ des Kaninchens. HMR 1556 (A), 293B (B) und BaCl₂ (C) hatten keinen inhibierenden Einfluss auf Ca²⁺-freie-Phosphorylierungen nach PKA (3 Unit, Cornelius und Mahmmoud, 2003) und cAMP (15 μ M)-Zugabe. 293B (B) und BaCl₂ (C) hemmten Histamin (100 μ M)-stimulierte [¹⁴C]AP-Aufnahme in PZ des Kaninchens deutlich. Histamin-stimulierte [¹⁴C]AP-Aufnahme lag bei 16,8 nmol 10⁻⁶ Zellen⁻¹ 45 min⁻¹ (Daten nicht gezeigt).

Neben dem inhibierenden Effekt des Chromanols 293B auf die Phosphorylierung und Aktivierung der CaMKII fiel auf, dass zusätzlich die Phosphorylierung eines 43-kDa Phosphoproteins (pp43) durch 293B gehemmt wurde (Abbildung 27 B₁). Dieses Phosphoprotein schien bei der cholinerg vermittelten Säuresekretion phosphoryliert zu werden, denn auch KN-62 hemmte die Phosphorylierung von pp43 konzentrationsabhängig (Abbildung 27 A₁ und A₂). Weiterhin sprach für eine Regulierung über den M₃-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg, dass auch die Zugabe von reiner PKA keine pp43-Phosphorylierung zeigte (Abbildung 28 A)

3.2.3 Charakterisierung einer Ca²⁺-abhängigen γ -[³²P]ATP-Phosphorylierung eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43).

In ruhenden TC konnte nach *in vitro* Zugabe von γ -[³²P]ATP eine Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43) entdeckt werden (Abbildung 27), die in Abwesenheit von Ca²⁺ verschwand und durch Zugabe von Calmodulin verstärkt wurde (Abbildung 30 D). Neben pp43 sind auf H⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden TC auch CaMKII und PKC- α lokalisiert (Abbildung 29 A). Dies konnte durch Lokalisations-Studien mit hochangereicherten Membranen der Magenmukosa gezeigt werden (Abbildung 29).

PKC- α , Kir4.1 und die H⁺/K⁺-ATPase konnten in TC und SA mit einem Anti-H⁺/K⁺-ATPase- und einem Anti-Kir4.1-Antikörper kopräzipitiert werden (Abbildung 29 C₃, D₂ und D₅). Ebenso war die CaMKII mit der H⁺/K⁺-ATPase kolokalisiert (Abbildung 29 B) und wurde mit einem Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper in SA kopräzipitiert (Abbildung 29 D₆). Diese Kolokalisation ist eine wichtige Voraussetzung für funktionelle Interaktionen dieser Proteine miteinander.

Die CaMKII, die *in vivo* inaktiv und nicht phosphoryliert auf TC vorlag (Abbildung 29 A, C), konnte nach *in vitro* Zugabe von γ -[32 P]ATP und Ca^{2+} phosphoryliert und aktiviert werden (Abbildung 27 C₃, Abbildung 29 B₄ und D₆, Abbildung 30 A, B).

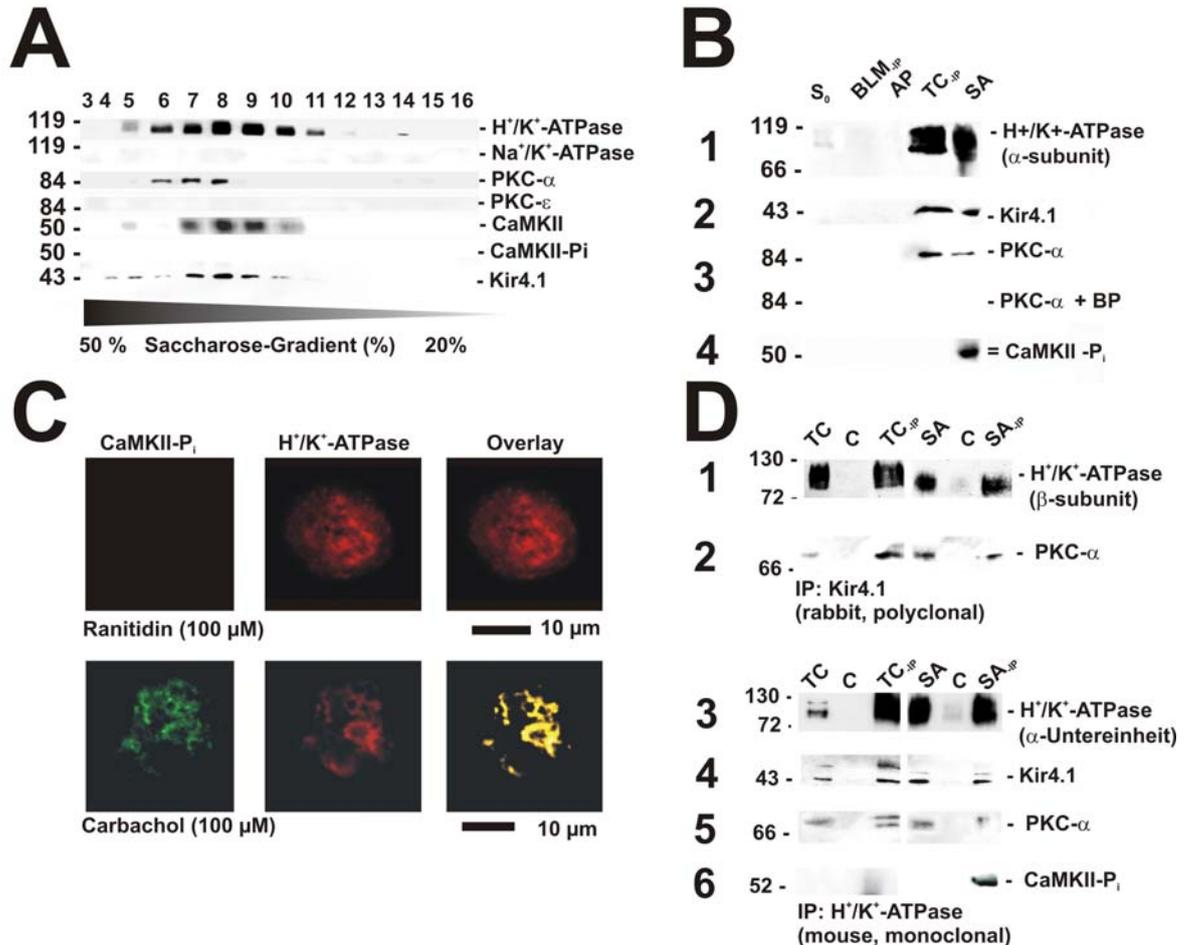


Abbildung 29: Lokalisation von CaMKII, PKC-α, Kir4.1 und H⁺/K⁺-ATPase in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens. A: TC der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens wurden in einem Saccharose (50 bis 20%)-Gradienten getrennt. B: Hochangereicherte Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte. PKC-α war sowohl in TC und SA detektierbar (B₃). Die CaMKII war inaktiv auf TC und wurde sogar nach Histamin-Stimulierung in den SA aktiv (B₄), was auf eine mögliche Verknüpfung der H₂- und M₃-Rezeptor-vermittelten-Signaltransduktionswege hindeutete. C: Konfokale LASER-Scan-Mikroskopie. CaMKII-P_i (grün) und die H⁺/K⁺-ATPase (β-Untereinheit, rot) waren nach Carbachol (100 μM)-Stimulierung kolokalisiert in PZ der Ratte. D: Immunpräzipitations-Studien. PKC-α wurde sowohl mit Anti-Kir4.1-(D₂) als auch mit einem Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (D₅) in TC und SA kopräzipitiert. Die aktivierte CaMKII war nach Immunpräzipitation mit einem Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (D₆) in SA detektierbar.

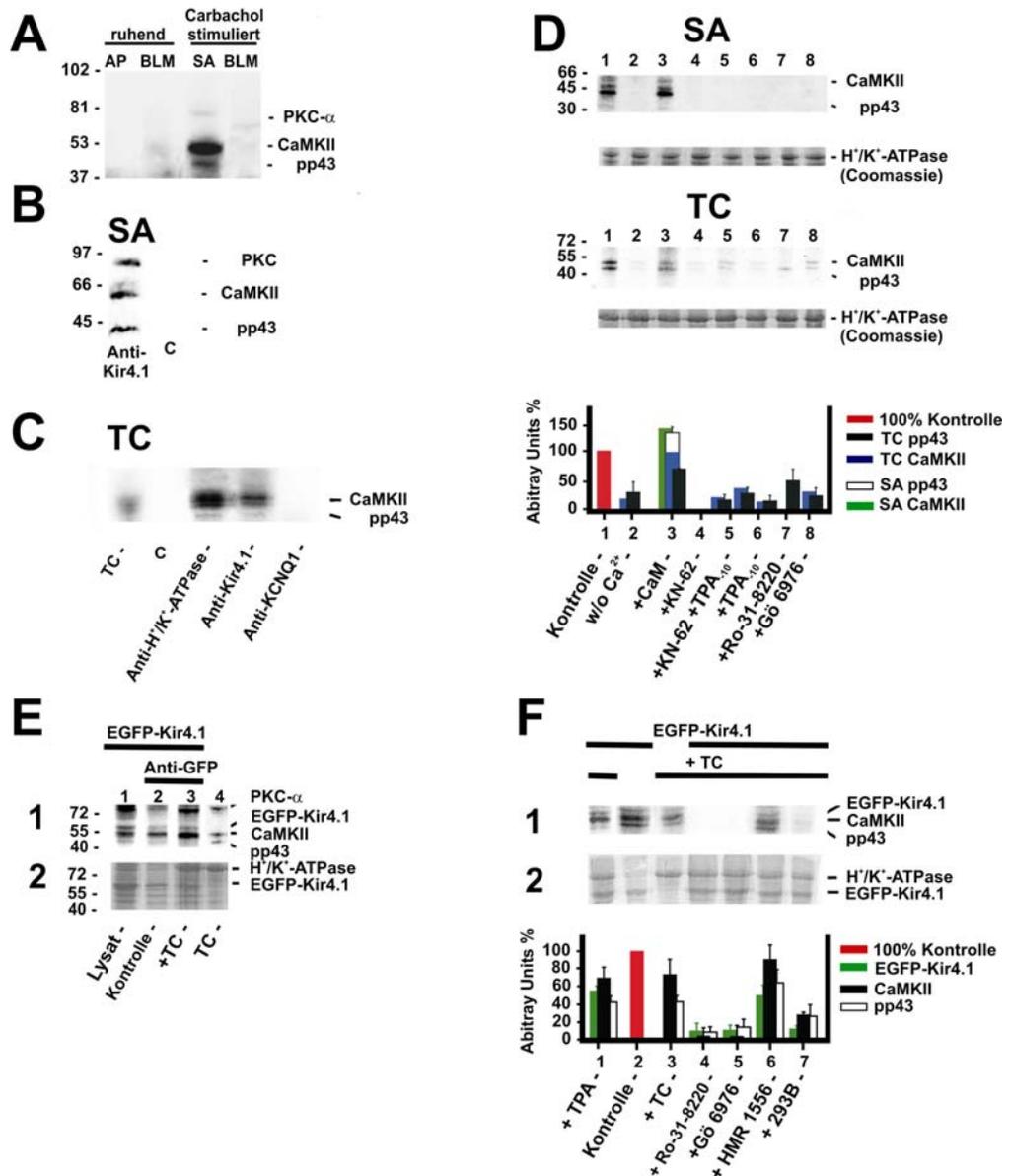


Abbildung 30: Charakterisierung einer Ca²⁺-abhängigen γ-[³²P]ATP-Phosphorylierung eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43). A: Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung von PKC-α (~84 kDa), CaMKII (~52 kDa) und pp43 in Carbachol-stimulierten SA. B: Immunpräzipitationen mit Anti-Kir4.1 zeigte eine Kopräzipitation von PKC-α, CaMKII und pp43. C: Immunpräzipitationen mit Anti-H⁺/K⁺-ATPase (β-Untereinheit)-, Anti-Kir4.1- und Anti-KCNQ1. CaMKII und pp43 wurden durch den Anti-H⁺/K⁺-ATPase- und Anti-Kir4.1-Antikörper präzipitiert. D: Modulierungs-Studien mit dem spezifischen CaMKII Inhibitor KN-62 (10 μM) und diverser pharmakologischer Modulatoren der PKC-Aktivität (0,1 nM TPA, 0,1 μM Ro-81-3220, 10 μM Gö 6976) resultierten in einer deutlichen Inhibierung der Phosphorylierung der CaMKII und von pp43 in SA und TC. E: Proteinisolierung von EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten mittels μMacs Anti-GFP-Beads zeigten eine Koisolierung der CaMKII und PKC-α (Vgl.: Spur 2 mit Spur 4) mit EGFP-Kir4.1 und pp43 auf. C: Modulierungs-Studien mit EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten, die zusätzlich mit TC inkubiert wurden. Die Modulatoren der PKC-Aktivität (s.o.), HMR 1556 (10 μM) und 293B (10 μM) hemmten die Phosphorylierung von pp43 und CaMKII.

In Carbachol-stimulierten SA, die *in vitro* mit γ -[32 P]ATP und Ca^{2+} phosphoryliert wurden, wurden die Phosphorylierungen von PKC- α (84 kDa), CaMKII (52 kDa) und eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43) sichtbar (Abbildung 30 A).

Diese pp43-Phosphorylierung konnte in SA durch einen Anti-Kir4.1 und in TC durch einen Anti-Kir4.1 und zusätzlich durch einen Anti- H^+/K^+ -ATPase-Antikörper präzipitiert werden (Abbildung 30 A, B).

In EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten konnte eine pp43- γ -[32 P]ATP-Phosphorylierung entsprechend der Größe von Kir4.1 in AGS_M (Vgl.: Abbildung 20) und eine pp65- γ -[32 P]ATP-Phosphorylierung entsprechend der Größe von EGFP-Kir4.1 (Stockklausner et al., 2001; Vgl.: Abbildung 21 C), entdeckt werden. Beide Phosphorylierungen wurden mit Anti-GFP-Microbeads immunisoliert (Abbildung 30 A, B).

Die hier dargestellten Ergebnisse der Charakterisierung von pp43 legten den Schluss nahe, dass es sich bei dem unidentifizierten 43 kDa-Phosphoprotein höchstwahrscheinlich um Kir4.1 handelte, dass durch Einfluss der Proteinkinasen CaMKII und PKC- α phosphoryliert wurde.

Dies ging aus weitergehende Modulationsstudien hervor, die zeigten, dass durch Zugabe des hochwirksamen CaMKII-Inhibitors KN-62 (10 μM) und diverser pharmakologischer Modulatoren der PKC-Aktivität (0,1 nM TPA, 0,1 μM Ro-81-3220, 10 μM Gö 6976) eine deutliche Hemmung der Phosphorylierung der CaMKII bzw. von pp43 (Abbildung 30 A, B) sowie von EGFP-Kir4.1 eintrat (Abbildung 30 A, B).

4. Diskussion.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der subzellulären Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen PZ der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens. Diese Analysen wurden mit zellbiochemischen und zellbiologischen Methoden durchgeführt. Diese ermöglichten durch die molekulare Analyse der zu untersuchenden K^+ -Kanäle, ein besseres Verständnis ihrer subzellulären Verteilung und Umverteilung in PZ als bisher durch rein immunhistochemische Untersuchungen gefunden wurde.

Im Weiteren konnte durch die Identifizierung der Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 ein *Trafficking* beider K^+ -Kanäle beobachtet werden. Physiologische Studien veranschaulichten, dass sowohl Kir4.1 als auch KCNQ1 bei der Säuresekretion der PZ eine Rolle spielen. In einem theoretischen Modell wird die Möglichkeit der Wirkungsweise zweier verschiedener K^+ -Kanäle diskutiert.

4.1 Lokalisation und *Trafficking* von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa.

Studien zur Lokalisation von K^+ -Kanälen in PZ der Magenmukosa sind bisher hauptsächlich mit einfachen immunhistochemischen Methoden durchgeführt worden (Scraff et al., 1999; Grahammer et al., 2001; Dedek und Waldegger, 2001; Fujita et al., 2002; Heitzmann et al., 2004; Warth et al., 2004; Malinowska et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Die exakte Lokalisation bzw. Koloalisation von K^+ -Kanälen im Vergleich zu kompartiment-spezifischen Referenz-Enzymen ist mit diesen Methoden schwierig zu finden. Analysen mit zellbiochemischen und zellbiologischen Methoden hinsichtlich der Lokalisation von K^+ -Kanälen in den PZ der Magenmukosa haben bisher gänzlich gefehlt.

Zur Identifizierung der Lokalisation von Kir4.1 und KCNQ1 wurden zwei wichtige, häufig beschriebene Methoden (Chew et al., 1990; Peng et al., 1997; Agnew et al., 1999; Karvar et al., 2002; Crothers et al., 1993) in unserem Labor etabliert:

1. Spezifische-Präparationen subzellulärer Membranen aus gastrischen Zellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens.
2. Isolierung, Kultivierung und transgene Transfizierung von PZ der Magenmukosa.

Diese Methoden wurden in der Vergangenheit zur Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen erfolgreich eingesetzt (Chew et al., 1990; Agnew et al., 1999; Karvar et al., 2002; Zhou et al., 2003). Zur eindeutigen Aufklärung der Lokalisation und des *Traffickings* von K⁺-Kanälen in den PZ wurde eine Membran-Präparation der Zellen der gastrischen Magenmukosa angewandt, die zum Ziel hatte, apikale, basolaterale oder tubulocisternae Membranen voneinander zu trennen.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte von AP/SA, BLM und TC war eine Trennung durch Kombination von differentieller-Pelletierungs-, Ficoll-Gradienten- und Saccharose-Gradienten-Zentrifugation möglich (Reenstra und Forte, 1990; Lamprecht et al., 1993; Crothers et al., 1993; Peng et al., 1997; Calhoun et al., 1998; Karvar et al., 2002; Fähmann et al., 2002). Durch Modifikationen der Immunpräzipitation nach Peng et al. (1997) konnten enge Bindungsverhältnissen von Proteinen und Protein-Protein-Interaktionen in hochangereicherten Membranen aufgedeckt werden.

Die Beurteilung der Membran-Präparation kann mit Leitenzymen durchgeführt werden, die ausschließlich in bestimmten Zellorganellen, Membrandomänen oder im

Zytoplasma vorkommen. Als Leitenzyme dienten in dieser Arbeit für BLM die Na^+/K^+ -ATPase (Culp und Forte, 1981; Lamprecht et al., 1993), für SA und TC die H^+/K^+ -ATPase-Aktivität bzw. ihre K^+ -Phosphatase (pNPPase)-Aktivität (Hirst und Forte, 1985). Eine Kolokalisation der untersuchten K^+ -Kanäle mit dem jeweiligen Referenz-Enzym ermöglichte die Lokalisierung der K^+ -Kanäle in bestimmten zellulären Kompartimenten.

Die bisher in der Fachliteratur beschriebenen Eigenschaften der primären PZ-Kultur konnten auch unter den hier vorgestellten Versuchsbedingungen für die PZ der Maus, Ratte und des Kaninchens bestätigt werden (Chew et al., 1989; Mangeat et al., 1990; Agnew et al., 1999). So konnten die von Chew et al. (1989) und Mangeat et al. (1990) beschriebenen morphologischen Veränderungen der Parietalzelle nach Isolierung und das *Trafficking* der H^+/K^+ -ATPase nach sekretorischer Stimulierung der Säuresekretion beobachtet und beschrieben werden (Vgl.: Abbildung 3, Abbildung 19, Abbildung 23).

4.1.1 Lokalisation und *Trafficking* von Kir4.1 in Parietalzellen des Magens.

In dieser Arbeit konnte mit Immunpräzipitationen und Konfokaler LASER-Scan-Mikroskopie gezeigt werden, dass Kir4.1 sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand eng mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisierte. Kir4.1 war im ruhenden Zustand auf zytoplasmatischen H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC lokalisiert. Nach Stimulierung der Säuresekretion der PZ mit Histamin-, Histamin/IBMX-, Histamin/Carbachol- oder Carbachol translozierte Kir4.1, vergleichbar dem *Trafficking* der H^+/K^+ -ATPase nach sekretorischer Stimulierung, in die stimulierte apikale Membran.

Ein *Trafficking* von Kir4.1 aus intrazellulären Kompartimenten zur Membran wurde schon von Stockklausner et al. (2001) und Stockklausner und Klöcker (2003) für EGFP-Kir4.1 oder Kir4.1-wt in transfizierten *Oppossum Kidney* (OK)-Zellen beschrieben. Bisher

nicht beschrieben war ein *Trafficking* von Kir4.1 nach sekretorischer Stimulierung bei der Säuresekretion der PZ der Magenumukosa. Stattdessen zeigten Fujita et al. (2002) mit immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden, dass Kir4.1 apikal in der PZ vorliegt aber nicht auf H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC, auch wenn die immunhistochemischen Abbildungen eine diffuse Verteilung von Kir4.1 und eine Kolokalisation mit der H^+/K^+ -ATPase im ruhenden Zustand andeuteten (Fujita et al., 2002). Hagen et al. (2001) schrieben weiter, dass Kir4.1 in der apikalen Membran, dort aber nicht mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert, vorliegt.

Die hier durch Immunpräzipitation und durch Konfokale LASER-Scan-Mikroskopie demonstrierte enge Kolokalisation von Kir4.1 und der H^+/K^+ -ATPase, sowohl im ruhenden als auch im stimulierten Zustand, spricht für eine funktionelle Verknüpfung beider Proteine, die auch schon an anderer Stelle vermutet wurde (Hagen et al., 2001; Fujita et al., 2002). Kir4.1 scheint somit einer der apikalen K^+ -Kanäle zu sein, die bei der K^+ -Rezyklierung über die luminalen Membran die Aktivität der H^+-K^+ -ATPase unterstützen.

Diese K^+ -rezyklierende Funktion von Kir-Kanälen wurde schon für verschiedene Ionen-Transporter beschrieben (Ito et al., 1996; Poopalasundaram et al., 2000; Tanemoto et al., 2000). Als erstes wurde diese K^+ -rezyklierende Funktion von Kir4.1 für die Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran in „*renal distal convoluted tubular epithelial cells*“ beschrieben (Ito et al., 1996; Tanemoto et al., 2000; Poopalasundaram et al., 2000; Casamassima et al., 2003). Weiterhin ist bekannt, dass apikale Kir-Kanäle an der K^+ -Abgabe über die apikale Membran beteiligt sein können. Diese Funktion wurde bereits für den renalen ROMK1 publiziert (Casamassima et al., 2003).

Die Möglichkeit die Funktion der H^+/K^+ -ATPase durch K^+ -Rezyklierung zu unterstützen ist bei Kir4.1 gegeben. Einerseits spricht die hier demonstrierte enge Kollokalisierung mit der H^+/K^+ -ATPase nach Immunpräzipitation dafür und andererseits noch die Eigenschaft, dass die Aktivität von Kir4.1 nicht durch Absenkung des extrazellulären pH-Wertes auf bis zu pH 3,0 beeinflusst wurde (Tanemoto et al., 2000; Tucker et al., 2000; Fujita et al., 2002). Kir4.1 bringt dadurch eine Eigenschaft mit, die unter Stimulierung der Säuresekretion essentiell ist. Dieser K^+ -Kanal könnte auch in einem sauren Milieu die K^+ -rezyklierende Funktion aufrechterhalten.

Die hier präsentierten Ergebnisse sprechen dafür, dass Kir4.1 zumindest einer der gesuchten K^+ -Kanäle ist, der für die K^+ -Rezyklierung zur Unterstützung der Funktion der H^+/K^+ -ATPase verantwortlich ist. Dies wurde in physiologischen Studien näher untersucht.

4.1.2 Lokalisation und *Trafficking* von KCNQ1 in Parietalzellen des Magens.

Neben dem Kir4.1, als einem Vertreter der „*inwardly rectifier*“ K^+ -Kanäle stand bei dieser Arbeit auch der spannungsabhängige KCNQ1 im Blickpunkt des Interesses. Verschiedene Autoren berichteten unabhängig voneinander, dass die mRNA von KCNQ1 in den PZ der Maus und Ratte exprimiert wird (Dedek and Waldegger, 2001; Lambrecht et al., 2005; Grahammer et al., 2001).

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen jedoch den Schluss zu, dass beide bekannten *Splice*-Varianten des KCNQ1 in PZ exprimiert werden. Im Westernblotting konnten zwei spezifische Signale, 74 kDa und 58 kDa mit einem entsprechenden Antikörper in H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC und SA nachgewiesen werden (Abbildung 14, Abbildung 15).

Da beide KCNQ1-Varianten in SA und TC kolokalisieren, ist es möglich, dass sie auch funktionell miteinander interagieren. Eine solche Protein-Protein-Interaktion der KCNQ1-Varianten 1 und 2 wurde schon von Demolombe et al. (1998) für humane Herz-Zellen beschrieben und ist demnach auch für PZ möglich. Demolombe et al. (1998) fanden heraus, dass die Variante 1 und die verkürzte, inaktive Variante 2 im Verhältnis 70 % zu 30 % vorliegen (Demolombe et al., 1998). Durch Homomer-Bildung und im Zusammenspiel mit dem K^+ -Kanal-Regulator-Protein KCNE wird die K^+ -Leitfähigkeit des KCNQ1 zusätzlich reguliert (Sanguinetti et al., 1996; Barhanin et al., 1996; Demolombe et al., 1998; Schroeder et al., 2000; Tamargo et al., 2004; Heitzmann et al., 2004).

Die Beeinflussung der K^+ -Leitfähigkeit des KCNQ1 durch KCNE wird auch für die PZ der Magenmukosa diskutiert (Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Kontroverse Meinungen gibt es welche Mitglieder der KCNE-Familie in der Magenmukosa tatsächlich dafür in Frage kommen (Grahammer et al., 2001; Dedek and Wadegger 2001; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Viele Hinweise sprechen für eine Expression des KCNE2 in gastrischen PZ und für eine luminale Lokalisation von KCNQ1/KCNE2 Kanälen in PZ (Grahammer et al., 2001; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Die Lokalisation von KCNQ1 wird in der Fachliteratur gegensätzlich diskutiert. Eine apikale Lokalisation von KCNQ1 nach Pentagastrin-Stimulierung bei gleichzeitiger Kolokalisation mit der H^+/K^+ -ATPase wurde von Lambrecht et al. (2005) beschrieben. Eine Kolokalisation des KCNQ1 mit der H^+/K^+ -ATPase im ruhenden Zustand konnten Lambrecht et al. (2005) mit Immunhistochemie jedoch nicht feststellen.

Im Widerspruch hierzu publizierten Dedek und Waldegger (2001), Grahammer et al. (2001) und Heitzmann et al. (2004) unabhängig voneinander, dass KCNQ1 im ruhenden

Zustand mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert. Da ein *Trafficking* von KCNQ1 nach Pentagastrin ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$), Histamin ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) und Carbachol ($70 \mu\text{g kg}^{-1}$)-Stimulierung in die sekretorische Membran mit immunhistochemischen Methoden nicht festgestellt werden konnte, folgerten Heitzmann et al. (2004), dass KCNQ1 möglicherweise auch auf intrazellulären Vesikeln vorkommen, die keine H^+/K^+ -ATPase tragen.

Diese zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse von Dedek und Waldegger (2001), Grahammer et al. (2001), Heitzmann et al. (2004) und Lamprecht et al. (2004) wurden ausschließlich mit immunhistochemischen Methoden erhoben. Zwischen den Varianten 1 und 2 des KCNQ1 wurde in den Arbeiten von Dedek und Waldegger (2001), Grahammer et al. (2001) Heitzmann et al. (2004) und Lamprecht et al. (2004) nicht differenziert.

Mit Hilfe der hier eingesetzten zellbiochemischen und zellbiologischen Methoden konnte aufgedeckt werden, dass beide KCNQ1-Varianten 1 und 2 im ruhenden Zustand sowohl auf intrazellulären H^+/K^+ -ATase-enthaltenden TC als auch nach Histamin- und Histamin/IBMX-Stimulierung in der sekretorischen Membran der PZ zu finden sind.

Trotz einer Histamin-stimulierten Umverteilung der KCNQ1-Varianten 1 und 2 in die apikale Membran, waren beide Varianten auch weiterhin in intrazellulären Kompartimenten nachweisbar. KCNQ1-Variante 1 war nach Histamin-Stimulierung auf dichten intrazellulären Membran-Kompartimenten zu finden, wohingegen KCNQ1-Variante 2 auf weniger dichten intrazellulären Membran-Kompartimenten nachzuweisen war. Beide KCNQ1-Varianten 1 und 2 waren nach Histamin-Stimulierung nicht mehr kolokalisiert auf intrazellulären Membranen. Diese Umverteilung der KCNQ1-Varianten 1 und 2 unterstützt die Theorie der Membran-Rekrutierung und Membran-Rezyklierung während Stimulierung der Säuresekretion (Forte et al., 1983).

Die hier demonstrierte Lokalisation von KCNQ1 in gastrischen PZ spricht für eine physiologische Rolle dieses Proteins bei der Säuresekretion der gastrischen PZ, die schon an anderer Stelle vermutet wurde (Lee et al., 2000; Grahammer et al., 2001; 2002). Inwieweit ein Zusammenspiel der Protonenpumpe, Kir4.1 und KCNQ1 bei der stimulierten Säuresekretion vorstellbar ist, wird im Weiteren diskutiert.

4.2 Physiologische Relevanz von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der gastrischen PZ.

Beide hier untersuchten K^+ -Kanäle sind aufgrund ihrer Eigenschaften in der Lage die Wirkungsweise der H^+/K^+ -ATPase zu unterstützen (Grahammer et al., 2001; Fujita et al., 2002). Zur Analyse der Funktion von Kir4.1 und KCNQ1 bei der Säuresekretion der PZ wurden in dieser Arbeit [^{14}C]AP-Aufnahmen und γ -[^{32}P]ATP-Phosphorylierungen unter Einfluss verschiedener K^+ -Kanal-Inhibitoren durchgeführt. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass das, in der Literatur als spezifischer KCNQ1-Inhibitor beschriebene, Chromanol 293B die [^{14}C]AP-Aufnahme in kultivierten PZ sowohl nach H_2 - als auch nach M_3 -Rezeptor-vermittelter Säuresekretion um bis zu 75 % hemmte. Diese Inhibierung der Histamin (100 μM)- und Carbachol (100 μM)-stimulierten [^{14}C]AP-Aufnahme durch 293B zeigte IC_{50} -Werte, die gut in den Bereich bereits publizierter IC_{50} -Werte (1-10 μM) für 293B eingeordnet werden konnten. Diese IC_{50} -Werte (1-10 μM) für 293B zur Hemmung von KCNQ1 wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt (Gögelein et al., 2000, Yang et al., 2000; Bachmann et al., 2001; Thomas et al., 2003; Tamargo et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PZ der Ratte und des Kaninchens isoliert, kultiviert und für [^{14}C]AP-Aufnahme herangezogen. Die Hemmung durch 293B der kultivierten PZ der

Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens war sehr ähnlich der Hemmung schon beschriebener [¹⁴C]AP-Aufnahme in isolierten Magendrüsen des Kaninchens (Grahammer et al., 2001, 2002; Waldegger, 2003).

Grahammer et al. (2001) demonstrierten, dass sowohl Histamin-, Carbachol (100 µM)- als auch dbcAMP (300 µM)-stimulierte [¹⁴C]AP-Aufnahme konzentrationsabhängig durch 293B mit einem IC₅₀-Wert von 3 bis 20 µM inhibiert wurde (Grahammer et al., 2001). Weitergehende Studien zur Säuresekretion mit Magenumen-perfundierten-Mäusen- und Ratten sowie Heidenhain-Taschen („*Pouches*“) in Hunden, zeigten außerdem, dass auch eine Stimulierung der Säuresekretion mit Desglugastrin (100 µg kg⁻¹ h⁻¹) oder Pentagastrin (44 µg kg⁻¹ h⁻¹) konzentrationsabhängig durch 293B gehemmt wurde.

Ferner entdeckten Heitzmann et al. (2004), dass nach Stimulierung mit Forskolin (5 µM) und Carbachol (100 µM) 293B (10 µM) die Gesamt-Zell-K⁺-Leitfähigkeit der PZ der Maus inhibierte. Sie schlussfolgerten daraus, dass KCNQ1/KCNE2 während der Säuresekretion aktiv ist. Da die Inhibierung der Gesamt-Zell-K⁺-Leitfähigkeit der PZ der Maus durch 293B im Vergleich zur Inhibierung des KCNQ1/KCNE2 in transfizierten COS-Zellen relativ niedrig war, vermuteten sie, dass neben der Aktivität von KCNQ1 weitere apikale und/oder basolaterale K⁺- bzw. luminale Cl⁻-Kanäle während der Säuresekretion aktiv, aber insensitive für 293B gewesen sind (Heitzmann et al., 2004). Zu diesen K⁺-Kanälen könnte z.B. der Kir2.1 gehören, der möglicherweise der luminalen Membran der PZ des Kaninchens zugeordnet werden kann (Malinowska et al., 2004), aber nicht durch 293B gehemmt wurde (Cuppoletti et al., 2002; Malinowska et al., 2000, 2004).

Neben einer spezifischen Hemmung von KCNQ1 durch 293B werden in der Fachliteratur auch unspezifische Wirkungen dieses Chromanols kontrovers diskutiert (Forte, 2004). So

beschrieben Yang et al. (2000) und Bachmann et al. (2003), dass 293B andere K^+ -Kanäle, wie Kv4.3 (Gen KCND3, IC_{50} 54 μ M) und Kv1.5 (Gen KCNA5) hemmt. Konzentrationen von 293B (30 μ M), die vollständig den kardiären I_{KS} blockieren, inhibieren auch signifikant I_{To} („*rapidly activating and inactivating transient outward current*“) mit einem IC_{50} von 24 μ M (Yang et al., 2000; Bachmann et al., 2001; Thomas et al., 2003; Tamargo et al., 2004). Zusätzlich hemmt 293B schwach den K^+ -Kanal K_{ATP} („*heteromeric inwardly rectifying K^+ -channel subunits with sulphonylurea receptor*“) mit einem IC_{50} zwischen 50 μ M und 100 μ M (Bachmann et al., 2001).

Interessanterweise publizierten Bachmann et al. (2001), dass 293B zusätzlich auch den CFTR konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} von 20 μ M hemmte. Bachmann et al. (2001) folgerten daraus, dass aus diesem Grund, Studien, die durch Einfluss von 293B die Funktion von KCNQ1 aufdecken sollten, neu überdacht werden müssten (Bachmann et al., 2001; Thomas et al., 2003).

Da 293B keinen Effekt auf die H^+ -Akkumulation in gastrischen Mikrosomen hatte, vermuteten Cuppoletti et al. (2002) und Malinowska et al. (2004), dass KCNQ1 nicht bei der K^+ -Rezyklierung über die apikale Membran der PZ wirkt. Neben einer spezifischen Hemmung von KCNQ1 scheint 293B auch unspezifische Ziele in gastrischen PZ zu haben (Cuppoletti et al., 2002; Malinowska et al., 2004). Unspezifische Ziele von 293B könnten nach Bachmann et al. (2001) Phosphatasen oder Proteinkinasen sein.

In dieser Arbeit wurden tatsächlich Hinweise gefunden, dass 293B auf Phosphorylierungen bei der M_3 -Rezeptor-vermittelten Säuresekretion einen hemmenden Einfluss hat. Die Aktivierung und Phosphorylierung der CaMKII wurde durch 293B konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} zwischen 13 bis 23 μ M inhibiert (Abbildung 27).

Dieser Effekt von 293B konnte für die H₂-Rezeptor-vermittelte Säuresekretion und die entsprechenden PKA-Phosphorylierungen nicht festgestellt werden (Abbildung 28). Eine Hemmung der Säuresekretion nach Stimulierung aller drei bekannter Rezeptoren der PZ (Grahammer et al., 2001; 2002) schien folglich nicht ausschließlich ein Resultat der spezifischen Inhibierung des KCNQ1 zu sein.

Aufgrund der zweifelhaften Spezifität von 293B zur spezifischen Hemmung des KCNQ1 in gastrischen PZ wurde bei dieser Arbeit ein weiterer KCNQ1-Inhibitor, HMR 1556, eingesetzt. HMR 1556 wird in der Literatur als hochwirksam zur Inhibierung des kardiären I_{KS} (z.B.: KCNQ1/KCNE1) beschrieben und zeigte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen eine reversible und konzentrationsabhängige Hemmung von I_{KS} mit IC₅₀-Werten zwischen 6,8 bis 120 nM (Gögelein et al., 2000; Gerlach et al., 2001; Bosch et al., 2003; Thomas et al., 2003; Tamargo et al., 2004; Lambrecht et al., 2005).

Weiterhin ist beschrieben, dass HMR 1556 die K⁺-Kanäle I_{to} , I_{KR} („*rapid component of delayed rectifier current*“) (z.B.: Herg) und I_{Kur} („*ultrarapid component of delayed rectifier current*“) (z.B.: Kv1.5) bis zu Konzentrationen (10 µM), die komplett I_{KS} hemmen, nicht beeinflusst (Bosch et al., 2003). Thomas et al. (2003) publizierten, dass HMR 1556 bis zu Konzentrationen von < 50 µM keinen Einfluss auf I_{KI} (z.B.: Kir2.1) hat (Thomas et al., 2003; Tamargo et al., 2004).

Die in dieser Arbeit durchgeführten [¹⁴C]AP-Aufnahme-Studien zeigten, dass HMR 1556 konzentrationsabhängig die Histamin (100 µM)-stimulierte Akkumulierung von [¹⁴C]AP in isolierten PZ der Ratte um bis zu 75 % hemmt. Diese Daten sind gut vereinbar mit den publizierten Werten von Lambrecht et al. (2005), mit der Ausnahme, dass der IC₅₀ von HMR 1556 nach Histamin (100 µM)-Stimulierung der Säuresekretion der PZ der Ratte ungefähr 10

fach niedriger war, als der IC_{50} -Wert für HMR 1556 nach Inhibierung der Histamin (1 μ M)/IBMX (1 μ M)-Stimulierung der Säuresekretion in isolierten Magendrüsen der Ratte (Lambrech et al., 2005).

Neben der Histamin-stimulierten Säuresekretion wurde in dieser Studie auch die Carbachol-stimulierte analysiert. In weiteren [14 C]AP-Aufnahmen wurde gezeigt, dass es Unterschiede zwischen der Carbachol (100 μ M)- und der Histamin (100 μ M)-stimulierten [14 C]AP-Aufnahme unter Einfluss des HMR 1556 gibt. Im Gegensatz zum Chromanol 293B, das sowohl H_2 - als auch M_3 -Rezeptor-vermittelte [14 C]AP-Aufnahme deutlich hemmte, war HMR 1556 wirksamer auf die Histamin (100 μ M)-induzierte [14 C]AP-Aufnahme und zeigte einen IC_{50} von 40 nM. Diese Wirkung von HMR 1556 auf Histamin (100 μ M)-stimulierte [14 C]AP-Aufnahme, erhärten die publizierten Daten hinsichtlich der Regulierung von KCNQ1 über das cAMP/PKA-System (Grahammer et al., 2001, 2002; Heitzmann et al., 2004).

Ein Vergleich der Wirkungsweise von HMR 1556 mit 293B bei der M_3 -Rezeptor-vermittelten [14 C]AP-Aufnahme in isolierten PZ macht deutlich, dass neben einer Aktivierung von KCNQ1 durch das IP_3/Ca^{2+} -System noch andere K^+ -Kanäle bei der Säuresekretion involviert sein müssen. Carbachol (100 μ M)-induzierte [14 C]AP-Aufnahme wurde durch HMR 1556 (10 μ M) mit einem IC_{50} von 31 μ M um bis zu 40 % gehemmt. Im Vergleich zu dem Effekt bei Histamin (100 μ M)-stimulierter [14 C]AP-Aufnahme war HMR 1556 nicht sehr wirksam bei der cholinerg-vermittelten Säuresekretion.

Abgesehen von der Lokalisation und Funktion von KCNQ1 wurde in dieser Studie auch die mögliche Rolle von Kir4.1 bei der Säuresekretion des Magens analysiert. Kir4.1 war nach Immunpräzipitation sowohl mit der H^+/K^+ -ATPase als auch mit der CaMKII und PKC- α kolokalisiert. Diese Kolokalisation von Kir4.1 mit der H^+/K^+ -ATPase und Proteinkinasen die

bei der M_3 -Rezeptor-vermittelten Säuresekretion wirken, spricht für eine funktionelle Verknüpfung dieser Proteine.

Phosphorylierungs-Studien mit hochangereicherten TC, SA oder EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten veranschaulichten, dass nach Inkubation mit pharmakologisch wirksamen Agenzien, die zum einen die CaMKII-Aktivität (10 μ M KN-62) und zum anderen die PKC-Aktivität beeinflussten (0,1 nM TPA, 0,1 μ M Ro-81-3220, 10 μ M Gö 6976), die Phosphorylierung eines 43 kDa-Phosphoproteins (pp43) unterbunden bzw. deutlich abgeschwächt wurde.

Dieses 43 kDa-Phosphoproteins (pp43) wurde näher charakterisiert. Die Phosphorylierung des 43 kDa-Phosphoproteins, war ähnlich wie die Phosphorylierung und Aktivierung der CaMKII und PKC- α , von freien Ca^{2+} -Ionen abhängig. Wurden diese freien Ca^{2+} -Ionen durch z.B. EGTA chelatiert, wurde die Phosphorylierung des 43 kDa-Phosphoproteins deutlich abgeschwächt (Abbildung 30 D). Im Gegensatz dazu bewirkte eine Inkubation mit Ca^{2+} /Calmodulin eine Verstärkung der Phosphorylierung des 43 kDa-Phosphoproteins (Abbildung 30 D).

Es wurden in dieser Arbeit viele Hinweise gefunden, dass es sich bei dem 43 kDa-Phosphoproteins (pp43) möglicherweise um Kir4.1 handeln könnte:

Das 43 kDa-Phosphoprotein (pp43)...

1. ...hatte die Größe von Kir4.1 im SDS-PAGE (Abbildung 30 A bis D).
2. ...war wie Kir4.1 bzw. die H^+/K^+ -ATPase in TC und SA zu finden (Abbildung 30 A bis D).

3. ...war präzipitierbar aus TC und SA mit einem Anti-Kir4.1-Antikörper (Abbildung 30 B).
4. ...war wie Kir4.1 präzipitierbar aus TC mit einem Anti-H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper (Abbildung 30 C).
5. ...wurde wie Kir4.1 nicht präzipitiert aus TC mit einem Anti-KCNQ1-Antikörper (Abbildung 30 C).
6. ...war wie Kir4.1 kolokalisiert mit CaMKII bzw. PKC- α in TC und SA (Abbildung 29; Abbildung 30 A bis D).
7. ...wurde durch die Inkubation mit pharmakologisch-wirksamen Agenzien, die die CaMKII-Aktivität oder die PKC-Aktivität beeinflussten, in seiner Phosphorylierung inhibiert (Abbildung 30 D).
8. ...wurde durch die Inkubation mit 293B in seiner Phosphorylierung inhibiert (Abbildung 27 B).
9. ...wurde durch die Inkubation mit HMR 1556 (10 μ M) vergleichbar der CaMKII auch in hohen Konzentrationen kaum beeinflusst (Abbildung 27 D).

Darüber hinaus konnte das 43 kDa-Phosphoproteins (pp43) auch in EGFP-Kir4.1 transfizierten AGS-Zell-Lysaten nachgewiesen werden und zeigte ähnliche Eigenschaften wie das EGFP-Kir4.1 (65 kDa, Stockklausner et al., 2001) auf.

Das 43 kDa-Phosphoprotein (pp43)...

1. ...hatte die Größe von Kir4.1 in AGS_M im SDS-PAGE (Abbildung 20 C)
2. ...und ein 65 kDa-Phosphoprotein, entsprechend der Größe von EGFP-Kir4.1 (Abbildung 21 C), wurden unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit freier Ca²⁺-Ionen phosphoryliert (Abbildung 30 E und F).

3. ...wurde wie das 65 kDa-Phosphoprotein durch Anti-GFP-Microbeads präzipitiert und war somit eng mit dem 65 kDa-Phosphoprotein kolokalisiert (Abbildung 30 E).
4. ...wurde wie das 65 kDa-Phosphoprotein durch die Inkubation mit pharmakologisch wirksamen Agenzien, die die PKC-Aktivität beeinflussten, hinsichtlich der Phosphorylierung inhibiert (Abbildung 30 F).
5. ...wurde wie das 65 kDa-Phosphoprotein durch die Inkubation mit 293B inhibiert (Abbildung 30 F).
6. ...wurde wie das 65 kDa-Phosphoprotein durch die Inkubation mit HMR 1556 vergleichbar der CaMKII und pp43 in TC auch in hohen Konzentrationen (10 μ M) hinsichtlich der Phosphorylierung kaum beeinflusst (Abbildung 30 F).

Im Gegensatz zu 293B hatten auch hohe Konzentrationen von HMR 1556 kaum einen Einfluss auf Phosphorylierungen und Aktivierungen von Proteinkinasen im Rahmen der H₂- und M₃-Rezeptor-vermittelten Säuresekretion. So wurden z.B. die Aktivierungen und Phosphorylierungen von PKA und CaMKII durch HMR 1556 beeinflusst kaum (Abbildung 27, Abbildung 28).

Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivität von Kir4.1-(pp43) in PZ des Kaninchens vermutlich indirekt durch 293B beeinflusst wurde. Kir4.1-(pp43) wurde wahrscheinlich durch den Einfluss der CaMKII und der PKC- α reguliert und war somit an den M₃-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg der Säuresekretion angeschlossen.

Sowohl die Phosphotransferase-Aktivität von CAMKII (Abbildung 29, A) als auch das Leiten der K⁺-Ionen von Kir4.1 sind auf intrazellulären TC inaktiv. Für die Inaktivität von Kir4.1 spricht einerseits, dass TC- K⁺-impermeabel sind (Forte et al., 1983; Wolosin und Forte, 1985; Hirst, 2002) und andererseits, dass die K⁺-Leitfähigkeit von Kir-Kanälen erst

wesentlich durch die Anlagerung an Membran-assoziierte Adapterproteinen an das Aktin-Zytoskelett und durch Komplexierungen in der Membran verstärkt wird (Horio et al., 1997; Connors et al., 2004).

Durch Stimulierung der Säuresekretion werden die H^+/K^+ -ATPase-enthaltenden TC entlang dem Aktin-Zytoskelett in die apikale Membran eingebaut (Okamoto und Forte, 2001). In SA ist die CaMKII aktiv (Abbildung 29) und moduliert möglicherweise die weitere Regulierung der Kir4.1-(pp43)-Aktivität durch Phosphorylierung. Eine Hemmung der Aktivierung und Phosphorylierung der CaMKII und der PKC- α durch 293B würde somit auch die Aktivität von Kir4.1-(pp43) inhibieren. Ein Resultat dessen wäre möglicherweise, dass die M_3 -Rezeptor-vermittelte-Säuresekretion der PZ durch 293B wesentlich deutlicher gehemmt wurde als durch HMR 1556, das ja kaum einen Einfluss auf Aktivierungen und Phosphorylierungen von CaMKII und PKC- α bei der cholinerg-vermittelten Säuresekretion hatte (Abbildung 27).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *Trafficking* von Kir4.1 auch nach Histamin-Stimulierung induzierbar war (Abbildung 23, Abbildung 24) und dass der unspezifische Kir-Kanal-Blocker $BaCl_2$ sowohl die H_2 - als auch die M_3 -Rezeptor-vermittelte [^{14}C]AP-Aufnahme konzentrationsabhängig um bis zu 50 % hemmte. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Fujita et al. (2002), die ebenfalls eine Inhibierung der Säuresekretion nach Zugabe von $BaCl_2$ beobachten konnten.

Aufgrund dieser Studien kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kir4.1-(pp43) auch direkt über das cAMP/PKA-System oder aber über Interaktionen zwischen dem IP_3/Ca^{2+} - und cAMP/PKA-System reguliert werden kann (Bhalla und Iyengar, 2001; Abbildung 31). Eine solche Interaktion ist sehr wahrscheinlich, denn ältere Studien berichteten, dass auch

Histamin-Stimulierung intrazelluläres Ca^{2+} freisetzen kann (Chew, 1986; Chew und Brown, 1986; Perez et al., 2001).

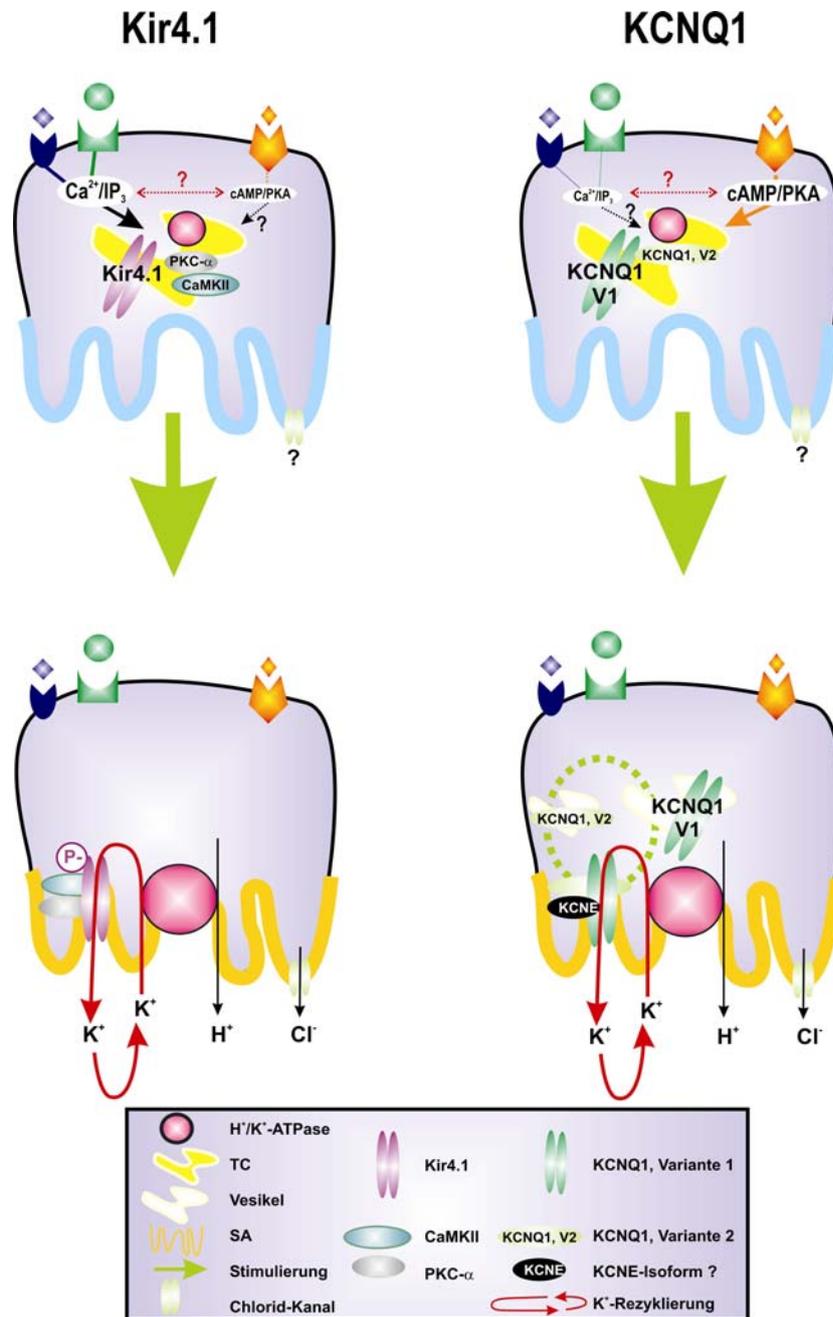


Abbildung 31: Modell zur Lokalisation und zum Trafficking von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen PZ. Nach sekretorischer Stimulierung der Säuresekretion translozierten Kir4.1, KCNQ1 und die H^+/K^+ -ATPase in die apikale Membran. Kir4.1-(pp43) wird u.a. durch zwei identifizierte Proteinkinasen des $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Systems reguliert. KCNQ1 ist stärker an das cAMP/PKA-System angeschlossen und ist auch nach Stimulierung intrazellulär zu finden. Eine Verknüpfung beider Signaltransduktionswege (roter Pfeil) ist sehr wahrscheinlich (Chew, 1986; Chew und Brown, 1986).

Es ist sehr sicher, dass Kir-Kanäle in den Prozess der Säuresekretion involviert sind. Wolosin und Forte (1984, 1985) untersuchten die apikale K^+ - und Cl^- Leitfähigkeit und konnten mit Ionen-Flux-Studien in SA des Kaninchens zeigen, dass der unspezifische Kir-Kanal-Blocker $BaCl_2$ K^+ -Kanäle hemmte.

Ältere Studien zeigten, dass Histamin (100 μM)/IBMX (100 μM)-stimulierte Säuresekretion durch Spermine (5 mM) oder Spermidine inhibiert wurde (Ray et al., 1982; Ostrowski et al., 1991, 1993). Die Inhibierung durch Spermine (5 mM) der Histamin (100 μM)/IBMX (100 μM) stimulierten Säuresekretion in isolierten Magendrüsen der Ratte konnte durch Erhöhung der extrazellulären K^+ -Ionen Konzentration von 5 auf 70 mM abgeschwächt werden (Ostrowski et al., 1993). Spermine bzw. Spermidine sind als potente Kir-Inhibitoren bekannt, die sehr wirksam von der zytosolischen Seite Kir4.1 hemmen können (Stanfield und Sutcliffe, 2003). Eine Inhibierung von Kir4.1 durch Spermine ist mit einem IC_{50} von 40 nM angegeben, gemessen in einem Heterologen-Expressions System unter nahezu depolarisierten Bedingungen (+ 40 mV) (Coetzee et al., 1999).

Das Fehlen hochspezifischer Kir-Inhibitoren und die Identifizierung verschiedener Kir-Kanäle in gastrischen PZ (Horio et al., 1999; Hagen et al., 2001, Fujita et al., 2002, Malinowska et al., 2000, 2004; Lambrecht et al., 2005) führen dazu, dass unter diesen Voraussetzungen eine spezielle Betrachtung der einzelnen Kir-Kanäle bei der Säuresekretion nicht möglich ist (Cuppoletti et al., 2002). Unter der Berücksichtigung, dass insbesondere $BaCl_2$ in millimolaren Konzentrationen zusätzlich zu Kir-Kanälen auch andere K^+ -Kanäle inhibieren kann, kann man einen Einfluss weiterer, bisher vielleicht unbekannter oder unentdeckter K^+ -Kanäle auf die Säuresekretion nicht ausschließen (Diaz et al., 1996, Lesage et al., 1996, Kim et al., 1998, Fujita et al., 2001). Das Modell in Abbildung 31 fasst die hier

vorgestellten Ergebnisse zur Lokalisation und zum *Trafficking* von Kir4.1 und KCNQ1 zusammen.

4.3 Theorie über das Zusammenspiel von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen Parietalzellen der Magenmukosa.

Die Lokalisation, das *Trafficking* in die luminal Membran nach Stimulierung der Säuresekretion und die beschriebenen physiologischen Eigenschaften von Kir4.1 und KCNQ1, unterstützen die These, dass beide K^+ -Kanäle bei der Säuresekretion der PZ die Aktivität der H^+/K^+ -ATPase durch K^+ -rezyklierende Funktionen unterstützen (Grahammer et al., 2001; Fujita et al., 2002; Heitzmann et al., 2004; Lambrecht et al., 2005). Die H^+/K^+ -ATPase benötigt zum elektroneutralen Austausch von H^+ -Ionen für K^+ -Ionen luminal K^+ -Ionen. Diese K^+ -Efflux-Aktivierung und K^+ -Rezyklierung resultiert in einer KCl-Abgabe der PZ, die die HCl-Sekretion begleitet (Ueda et al., 1987). Aber wie ist die Wirkungsweise zweier verschiedener K^+ -Kanäle bei der Säuresekretion zu erklären?

Durch Immunpräzipitations-Studien mit hochangereicherten TC bzw. SA konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation einerseits mit Anti-KCNQ1 Kir4.1 nicht und andererseits nach Inkubation mit Anti-Kir4.1 KCNQ1 nicht kopräzipitiert wurde. Demnach scheint es unterschiedliche H^+/K^+ -ATPase-enthaltende TC in gastrischen PZ zu geben und als Resultat dessen auch unterschiedliche SA-Mikro-Kompartimente. Die physiologische Funktion solcher Mikromilieus in der sekretorischen Membran erscheint wichtig, da Kir4.1 und KCNQ1 unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen aktiviert werden (Grahammer et al., 2001, 2002; Fujita et al., 2002).

Die K^+ -Leitfähigkeit von Kir4.1 wird durch die Anlagerung an Membran-assoziierte Adapterproteinen, wie zB. PSD-95 oder SAP97, und durch Komplexierungen in der Membran verstärkt (Horio et al., 1997; Connors et al., 2004). Weiterhin ist die Funktion von Kir-Kanälen vom Membranpotential der PZ abhängig (Cuppoletti et al., 2002). Dies ist gut für den kardiären I_{KI} beschrieben (Tamargo et al., 2004). Im Bereich des Ruhepotentials der Zelle und unter Hyperpolarisation dominiert die K^+ -Leitfähigkeit des kardiären I_{KI} (Lopatin und Nichols, 2001; Stanfield und Sutcliffe, 2003; Tamargo et al., 2004). Unter Depolarisation der Zellmembran schließt beispielweise I_{KI} und es liegt eine abgeschwächte Leitfähigkeit vor (Lopatin und Nichols, 2001; Tamargo et al., 2004). Dieser Effekt ist genau gegensätzlich zu dem der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (Isomoto et al., 1997).

Die Stimulierung der Säuresekretion bewirkt, dass die Permeabilität der basolateralen- und der apikalen Membran der PZ gesteigert wird (Demarest and Finn, 1984; Demarest und Machen, 1985; Ueda et al., 1985). In der basolateralen Membran wird durch Stimulierung der Säuresekretion sowohl ein H^+/Na^+ - und der HCO_3^-/Cl^- -Austauscher (AE2) aktiviert (Abbildung 32). Das Resultat dessen ist ein verstärkter NaCl-Einfluss in die Zelle, der Cl^- für den KCl-Efflux und Na^+ zur Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase bereitstellt. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase kompensiert den K^+ -Verlust über die basolaterale und apikale Membran und kann eine Hyperpolarisation der PZ bewirken (Ueda et al., 1987; Abbildung 32).

Die Säuresekretion der PZ ist abhängig von einer simultanen Sekretion von H^+ und Cl^- (Shoemaker et al., 1967, 1970) über die H^+/K^+ -ATPase und Cl^- -Kanäle (Wolosin und Forte, 1984, 1985; Ueda et al., 1987). Cl^- wirkt dabei ausgleichend auf die elektroneutrale HCl-Sekretion (Forte, 2004). In Abwesenheit von Cl^- würde die apikale Membran zu einer elektrogenen H^+ -Pumpe werden (Forte, 2004).

Während der Säuresekretion ist die Cl^- -Aufnahme elektroneutral an die HCO_3^- -Abgabe über die basolaterale Membran gebunden (Abbildung 32). Neben der Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase kann auch die Aktivierung der basolateralen K^+ -Kanäle eine Hyperpolarisation der PZ bewirken, die zu einer Verstärkung der Cl^- -Abgabe über die apikale Membran führen kann (Ueda et al., 1987, Abbildung 32).

In der Tat entdeckten Sakai et al. (1989) und Supplisson et al. (1991) mit elektrophysiologischen Methoden Spannungs-unabhängige-, Hyperpolarisations-aktivierte- und Depolarisations-abhängige K^+ -Kanäle in der BLM der PZ. Demarest und Finn (1984) sowie Demarest und Machen (1985) zeigten, dass Histamin ($100 \mu\text{M}$)-Stimulierung der PZ sowohl das basolaterale Membran-Potential (von -50 auf -59 mV; Ueda et al., 1987) als auch das apikale Membran-Potential, welches nicht näher definiert wurde, hyperpolarisierte (Ueda et al., 1987).

Die gesteigerte K^+ -Leitfähigkeit und die Möglichkeit zur Hyperpolarisation der sekretorischen Membran bieten wichtige Aspekte zur Erklärung des Vorkommen zweier verschiedener K^+ -Kanäle in der sekretorischen apikalen Membran der PZ. Eine Theorie zum Zusammenspiel von Kir4.1 und KCNQ1 könnte demzufolge nach sein, das unter Ruhe- bzw. Hyperpolarisation Kir4.1 aktiv an der K^+ -Rezyklierung über die luminale Membran beteiligt ist (Abbildung 32 III).

Durch eine verstärkte Cl^- -Abgabe nach Hyperpolarisation über die luminale Membran würde die PZ depolarisiert werden (Abbildung 32 IV). Eine Depolarisation würde Kir4.1 hemmen (Yang et al., 2000; Abbildung 32 IV) und folglich den K^+ -Efflux, die Säuresekretion zum Erliegen bringen (Abbildung 32 IV).

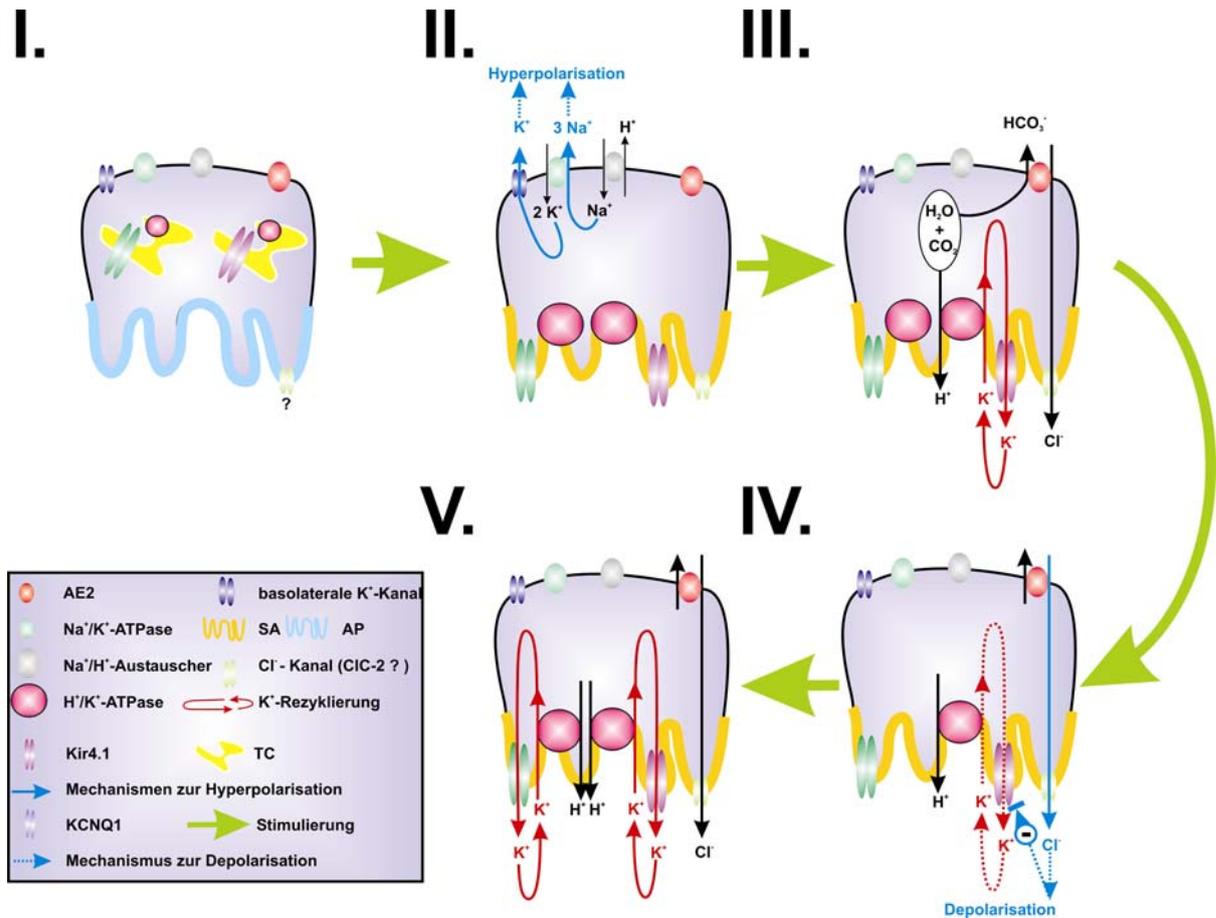


Abbildung 32: Theorie der K⁺-Rezyklierung in gastrischen PZ der Magenmukosa. I.: Im ruhenden Zustand sind Kir4.1 und KCNQ1 auf unterschiedlichen H⁺/K⁺-ATPase-enthaltenden TC lokalisiert. II.: Nach sekretorischer Stimulierung wird die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers und der Na⁺/K⁺-ATPase erhöht. Im Zusammenspiel mit basolateralen K⁺-Kanälen bewirkt die Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase eine Hyperpolarisation sowohl der basolateralen als auch der apikalen Membran. III.: Unter Hyperpolarisation ist Kir4.1 aktiv und kann die Aktivität der H⁺/K⁺-ATPase unterstützen. Die Cl⁻-Abgabe geschieht simultan zur H⁺-Sekretion und wird durch Hyperpolarisation verstärkt. IV.: Dies hätte eine Depolarisation der PZ zur Folge, die Kir4.1 hemmen würde. V.: Durch die Aktivierung des KCNQ1 wird diese Depolarisation unterbunden. Als Resultat dessen kann die K⁺-Rezyklierung unabhängig des Membranpotentials der PZ fortlaufen.

Die Existenz von KCNQ1 in der sekretorischen Membran wirkt der Depolarisation entgegen. KCNQ1 kann auch bei Depolarisation aktiv K⁺-Ionen rezyklieren. Als Resultat dessen würde durch die Aktivität von KCNQ1 eine Depolarisation der PZ verhindert werden und somit eine Inhibierung von Kir4.1 unterbunden werden (Abbildung 32 V).

Diese zwei Möglichkeiten der K^+ -Rezyklierung über Kir4.1 und KCNQ1 bieten die Gewährleistung, dass unabhängig des Membran-Potentials der apikalen Membran ständig K^+ -Ionen zur Unterstützung der Funktion der H^+/K^+ -ATPase in das Lumen des Magens rezykliert werden können. Diese Theorie ist in Abbildung 32 zusammengefasst.

5. Literatur.

1. Agnew B. J., Duman J. G., Watson C. L., Coling D. E., and Forte J. G. (1999): Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J. Cell Science*, **112**, 2639-2646.
2. Aihara T., Nakamura E., Amagase K., Tomita K., Fujishita T., Furutani K., and Okabe S. (2003): Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol. Ther.* **98(1)**, 109-127.
3. Bachmann A., Quast A., and Russ I. (2001): Chromanol 293B, a blocker of the slow delayed rectifier K⁺ current I_{Ks}, inhibits the CFTR Cl⁻-channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, **363**, 590-596.
4. Barhanin J., Lesage F., Guillemare E., Fink M., Lazdunski M., and Romey G. (1996): K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, **384**, 78-80.
5. Beil W., Mannschedel W. und Sewing K.F. (1987): Protein kinase C and parietal cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 720-728.
6. Bhalla U. S. and Iyengar R. (2001): Functional modules in biological signalling networks. *Novartis Found Symp.* **239**, 45-51.
7. Bichet, D., Haass, F. A., and Jan, L. Y. (2003): Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nature Rev. Neurosci.*, **4**, 957-967.
8. Bosch R. F., Gaspo R., Busch A. E., Lang H. J., Li G. R., and Nattel S. (1998): Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovas. Res.* **38**, 441-450.
9. Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
10. Brown M. R. and Chew C. S. (1987): Multiple effects of phorbol ester on secretory activity in rabbit gastric glands and parietal cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 1840-1847.
11. Brown M. R. and Chew C. S. (1989): Carbachol-induced protein phosphorylation in parietal cells: regulation by [Ca²⁺]_i. *Am. J. Physiol.* **257**, G99-110.
12. Calhoun B. C., Lapierre L. A., Chew C. S., and Goldenring J. R. (1998): Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **275**, C163-C170.
13. Casamassima M., D'Adamo M. C., Pessia, M., and Tucker, S. J. (2003): Identification of a heteromeric interaction that influences the rectification, gating, and pH sensitivity of Kir4.1/Kir5.1 potassium channels. *J Biol. Chem.* **278**, 43533-43540.
14. Chew C. S. (1986): Cholecystokinin, carbachol, Gastrin, histamine, and Forskolin increase [Ca²⁺]_i in gastric glands. *Am. J. Physiol.* **250**, G814-G823.
15. Chew C. S. and Brown M. R. (1986): Release of intracellular Ca²⁺ and elevation of inositol triphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochem. Biophys. Acta* **888**, 116-125.
16. Chew C. S., Ljungstrom M., Smolka A., and Brown M. R. (1989): Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **256**, G254-G263.
17. Chew C. S. and Ljungstrom M. (1990): HCl secretion and [Ca²⁺]_i in cultured parietal cells. *J. Intern. Med. Suppl* **732**, 9-15.

18. Chew C. S., Parente J. A., Zhou C. J., Baranco E., and Chen X. (1998): Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell. *Am. J. Physiol.* **275**, C56-C67.
19. Chiba T., Fisher S. K., Agranoff B. W., and Yamada T. (1989): Autoregulation of muscarinic and gastrin receptors on gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **256**, G356-G363.
20. Chow D. C. and Forte J. G. (1993): Characterization of the beta-subunit of the H(+)-K(+)-ATPase using an inhibitory monoclonal antibody. *Am. J. Physiol.* **265**, C1562-C1570.
21. Code C. F. (1957): Histamine and gastric acid secretion. In: Wolstenhole GEW, O'Connor, CM: Histamine. *Boston*, 189-219.
22. Coetzee W. et al. (1999): Molecular Diversity of K⁺ Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**, 233-255.
23. Connors N. C., Adams M. E., Froehner S. C., and Kofuji P. (2004): the potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J. Biol. Chem.* **279**, 28387-92.
24. Cooperstein I. L. (1959): Inhibitory effect of strophanthidin on gastric acid secretion by the isolated gastric mucosa. *J. Gen Physiol* **59**, 135-142.
25. Cornelius F. and Mahmmoud Y. A. (2003): Direct Activation of Gastric H,K-ATPase by N-Terminal Protein Kinase C Phosphorylation. Comparison of the Acute Regulation Mechanisms of H,K-ATPase and Na,K-ATPase. *Biophys. J.* **84**, 1690-1700.
26. Crothers J. M., Chow D. C., and Forte J. G. (1993): Omeprazole decreases H(+)-K(+)-ATPase protein and increases permeability of oxyntic secretory membranes in rabbits. *Am. J. Physiol.* **265**, G231-G241.
27. Culp, D. J. and Forte, J. G. (1981): An enriched preparation of basolateral plasma membranes from gastric glandular cells. *J. Membr. Biol.* **59**, 135-142.
28. Cupoletti J., Kirit P., Tewari A., and Malinowska D. H. (2002): Kir2.1 K⁺ channels of the gastric parietal cell. In: Urushidani, T., Forte, J. and Sachs, G.: Mechanism and consequences of proton transport. 2002, 255-264.
29. Davenport H. W. S. (1962): Effect of ouabain on acid secretion and electrolyte content of frog gastric mucosa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 613-615.
30. Davis T. L., Rutledge D., Keese F., Bajandas F. J., and Rehm W. S. (1965): Acid secretion, potential and resistance of frog stomach in K⁺-free solutions. *Am. J. Physiol.* **209**, 146-156.
31. Davis T. L., Jackson J. W., Day B. E., Shoemaker R. L., and Rehm W. S. (1970): Potentials in frog cornea and microelectrode artefact. *Am. J. Physiol.* **219**, 178-183.
32. Dedek K, Waldegger S. (2001): Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch.* **442**, 896-902.
33. Demarest J. R. and Machen T. E. (1985): Microelectrode measurements from oxyntic cells in intact *Necturus* gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **249**, C535-C540.
34. Demarest J. R. and Finn A. L. (2005): Basolateral potassium channel block and interactions between the cell membranes of *Necturus* urinary bladder. *J. Gen. Physiol.* **84**, 28a.
35. Demolombe S., Baro I., Pereon Y., Bliet J., Mohammad-Panah R., Pollard H., Morid S., Mannens M., Wilde A., Barhanin J., Charpentier F., and Escande D. (1998): A dominant negative isoform of the Long QT Syndrome. *J. Biol. Chem.* **273**, 6837-6843.
36. Deutsch C. (2002): Potassium channel ontogeny. *Annual Review of Physiol.* **64**, 19-46.

37. Diaz F., Wallner M., Stefani E., Toro L., and Latorre R. (1996): Interaction of internal Ba^{2+} with a cloned Ca^{2+} -dependent K^+ channel from smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* **107**, 399-407.
38. Duman J. G., Tyagarajan K., Kolsi M. S., Moore H., and Forte J. G. (1999): Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H^+ - K^+ -ATPase. *Am. J. Physiol.* **277**, C361-C372.
39. Duman J. G., Pathak N. J., Ladinsky M. S., McDonald K. L., and Forte J. G. (2002): Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. *J. Cell Science* **115**, 1251-1258.
40. Edkins J. S. (1905): On the chemical mechanism of gastric acid secretion. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)*, 76-376.
41. Esmann M. and Skou J. C. (1988): Temperature-dependencies of various catalytic activities of membrane-bound Na^+/K^+ -ATPase from brain, kidney and shark rectal gland and of C12E8-solubilized shark Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **944(3)**, 344-350.
42. Fahrman M., Kaufhold M., Rieg T., and Seidler U. (2002): Different actions of protein kinase C isoforms (α) and (ϵ) on gastric acid secretion. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 938-946.
43. Fahrman M., Kaufhold M., Pfeiffer A. F., and Seidler U. (2003): Protein kinase C- (α) attenuates cholinergically stimulated gastric acid secretion of rabbit parietal cells. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 545-554.
44. Fahrman M and Pfeiffer A. (1999): Protein kinase C modulates peripheral calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity by direct phosphorylation. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 49-57.
45. Fahrman M. and Pfeiffer A. (2000): Copurification of two holoenzyme-forming calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms as holoenzyme from porcine stomach. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 151-158.
46. Fahrman M. (2000): The role of protein kinase C in the acid secretion of mammalian gastric parietal cells. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **6**, 139-150.
47. Fahrman M., Schatz H., and Pfeiffer A. (1998): Purification and characterization of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II from hog gastric mucosa using a protein-protein affinity chromatographic technique. *Eur. J. Biochem* **255**, 516-525.
48. Forbush B. III (1982): Characterization of right-side-out membrane vesicles rich in (Na,K) -ATPase and isolated from dog kidney outer medulla. *J. Biol. Chem.* **257**, 12678-12684.
49. Forte J.G. and Lee H.C. (1977): Gastric adenosine triphosphatases: a review of their possible role in HCl secretion. *Gastroenterology* **72**, 921-926.
50. Forte G. M., Limlomwongse L., and Forte J. G. (1969): The development of intracellular membranes concomitant with the appearance of HCl secretion in oxyntic cells of the metamorphosing bullfrog tadpole. *J. Cell Sci.* **4**, 709-727.
51. Forte J. G., Black J. A., Forte T. M., Machen T. E., and Wolosin J. M. (1981): Ultrastructural changes related to functional activity in gastric oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* **241**, G349-G358.
52. Forte J. G., Forte T. M., Black J. A., Okamoto C., and Wolosin J. M. (1983): Correlation of parietal cell structure and function. *J. Clin. Gastroenterol.* **5**, 17-27.
53. Forte J. G. and Yao X. (1996): The membrane recruitment and recycling hypothesis of gastric HCl secretion. *Trends Cell Biol.* **6**, 45-48.
54. Forte J. G. (1996): Comprehensive human physiology. Chapter: Gastric function. HRSG: Greger R.; Windthorst U. Springer Verlag Vol. 2, Berlin-Heidelberg.

55. Forte J. G. (2004): K⁺ channels in the secretory membrane of the parietal cell. Focus on "Gastric parietal cell secretory membrane contains PKA- and acid-activated Kir2.1 K⁺ channels". *Am. J. Physiol.* **286**, C478-C479.
56. Forte T. M., Machen T. E., and Forte J. G. (1977): Ultrastructural changes in oxyntic cells associated with secretory function: a membrane-recycling hypothesis. *Gastroenterology* **73**, 941-955.
57. Fujita A., Horio Y., Higashi K., Mouri T., Hata F., Takeguchi N., and Kurachi Y. (2002): Specific localization of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, at the apical membrane of rat gastric parietal cells; its possible involvement in K⁺ recycling for the H⁺-K⁺-pump. *J. Physiol.* **540**, 85-92.
58. Ganser A. L. and Forte J. G. (1973): K⁺-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 169-180.
59. Golgi C. (1893): Sur la fine organisation des glandes peptiques des mammifères. *Arch. Italiennes de Biologie* **19**, 448-453.
60. Gooz M., Hammond C. E., Larsen K., Mukhin Y. V., and Smolka A. J. (2000): Inhibition of human gastric H⁺-K⁺-ATPase alpha -subunit gene expression by Helicobacter pylori. *Am. J. Physiol.* **278**, G981-G991.
61. Gögelein H., Brüggemann A., Gerlach U., Brendel J., and Busch A. E. (2000): Inhibition of I_{KS} channels by HMR 1556. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**, 480-488.
62. Grahammer F, Herling A.W., Lang H. J., Schmitt-Graff A., Wittekindt O. H., Nitschke R., Bleich M., Barhanin J., and Warth R. (2001): The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* **120**, 1363-1371.
63. Grahammer F, Herling A. W., Von Hahn T., Heitzmann D., Lang H. J., Schmitt-Gräef A., Nitschke R., Wittekindt O., Bleich M., Barhanin J., and Warth R. (2002): Identification of potassium channels associated with the H⁺/K⁺-ATPase in the parietal cell. In: Urushidani, T., Forte, J. and Sachs, G.: Mechanism and consequences of proton transport. 2002, 247-253.
64. Hagen S. J., Ouellette A. J., and Yang D. X. (2001): Identification of inwardly rectifying K⁺-channels at the apical surface of rat parietal cells: Implications for the regulation of gastric acid secretion. *Gastroenterology* **121**, A-155.
65. Hanzel D. K., Urushidani T., Usinger W. R., Smolka A., and Forte J. G. (1989): Immunological localization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **256**, G1082-9.
66. Harris J. B. and Edelman I. S. (1960): Potassium and the transmucosal resistance of the frog gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **198**, 285-288.
67. Heitzmann D., Grahammer F., von Hahn T., Schmitt-Graff A., Romeo E., Nitschke R., Gerlach U., Lang H. J., Verrey F., Barhanin J., and Warth R. (2004): Heteromeric KCNE2/KCNQ1 potassium channels in the luminal membrane of gastric parietal cells. *J. Physiol.* **561**, 547-557.
68. Helander H. F. and Hirschowitz B. L. (1972): Quantitative ultrastructural studies on inhibited and partly stimulated gastric parietal cells. *Gastroenterology* **67**, 447-452.
69. Hinkle K. L., Bane G. C., Jazayeri A., and Samuelson L. C. (2003): Enhanced calcium signaling and acid secretion in parietal cells isolated from gastrin-deficient mice. *Am. J. Physiol.* **284**, G145-G153.
70. Hirst B. H. and Forte J. G. (1985): Redistribution and characterization of H⁺/K⁺-ATPase membranes from resting and stimulated gastric parietal cells. *Biochem J.* **231**, 641-649.
71. Hirst B. H. (2002): K⁺ recycling and gastric acid secretion. *J. Physiol.* **540**, 1.
72. Hogben C. A. M., Kent T. H., Woodward P. A. und Sill A. J. (1974): Quantitative histology of gastric mucosa: man, dog, cat, guinea pig and frog. *Gastroenterology* **67**, 1143-1154.

73. Horio Y., Mouri T., Fujita A., Inanobe A., Tanemoto M., and Kurachi Y. (1999): Inward rectifying K⁺ channel Kir4.1 participates in gastric acid secretion. *Physiologist* **42**, A-18.
74. Horio Y., Hibino H., Inanobe A., Yamada M., Ishii M., Tada Y., Satoh E., Hata Y., Takai Y., and Kurachi Y. (1997): Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J. Biol. Chem.* **272**, 12885-12888.
75. Im W. B., Blakeman D. P., and Davis J. P. (1985): Studies on K⁺ permeability of rat gastric microsomes. *J. Biol. Chem.* **260**, 9452-9460.
76. Isomoto S. and Kurachi Y. (1997): Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**, 1431-1446.
77. Isomoto S., Kondo C., and Kurachi Y. (1997): Inwardly rectifying potassium channels: Their molecular heterogeneity and function. *Jap. J. Physiol* **47**, 11-39.
78. Ito M., Inanobe A., Horio Y., Hibino H., Isomoto S., Ito H., Mori K., Tonosaki A., Tomoike H., and Kurachi Y. (1996): Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS* **388** (1), 11-5.
79. Ito S. and Schofield G. C. (1974): Studies on the depletion and accumulation of microvilli and changes in tubulovesicular compartment of mouse parietal cells in relation to gastric acid secretion. *J. Cell Biol* **63**, 364-382.
80. Jan Y. L. and Jan Y. N. (1997): Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol* **505**, 267-282.
81. Jentsch T.J. (2000): Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 21-30.
82. Karvar S., Yao, X., Crothers, J. M., Liu, Y., and Forte, J. G. (13-12-2002): Localization and function of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-25 and vesicle-associated membrane protein-2 in functioning gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 50030-50035.
83. Kasbekar D. K., Forte G. M., and Forte J. G. (1968): Phospholipid turnover and ultrastructural changes in resting gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 1-13.
84. Katz B. (1949): Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Archives des Science Physiologiques* **2**, 285-299.
85. Kaufhold, M. (2001): Untersuchungen zur Säuresekretion des Magens. Examensarbeit. Münster.
86. Komarov S. A. (1938): Gastrin. *Proc Soc Exp Biol NY*, 38-514.
87. Kubokawa M., McNicholas C. M., Higgins M. A., Wang W., and Giebisch G. (1995): Regulation of ATP-sensitive K⁺ channel by membrane-bound protein phosphatases in rat principal tubule cell. *Am. J. Physiol.* **269**, F355-F362.
88. Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature* **227**, 680-685.
89. Lambrecht N. W. G., Yakubov I., Scott D., and Sachs G. (2005): Identification of the K⁺ efflux channel coupled to the gastric H⁺/K⁺-ATPase during acid secretion. *Physiol. Genomics* **21**, 81-91.
90. Lamprecht G., Seidler U., and Classen M. (1993): Intracellular pH-regulating ion transport mechanisms in parietal cell basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **265**, G903-G910.
91. Lee H. C., Breitbart H., and Forte J. G. (1980): The functional role of K⁺-ATPase in proton transport by gastric microsomal vesicles. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **341**, 297-311.

92. Lee M. P., Ravenel J. D., Hu R. J., Lustig L. R., Tomaselli G., Berger R. D., Brandenburg S. A., Litz T. J., Bunton T. E., Limb C., Francis H., Gorelikow M., Gu H., Washington K., Argani P., Goldenring J. R., Coffey R. J., and Feinberg A. P. (2000): Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J. Clin. Invest.* **106**, 1447-1455.
93. Leipziger J., MacGregor G. G., Cooper G. J., Xu J., Hebert S. C., and Giebisch G. (2000): PKA site mutations of ROMK2 channels shift the pH dependence to more alkaline values. *Am. J. Physiol.* **279**, F919-F926.
94. Lewin M., Cheret A. M., Soumarmon A., and Girodet J. (1975): Method for isolation and separation of cells from rat fundic mucosa. *Biol Gastroenterol (Paris)* **7**, 139-144.
95. Lopatin A. N. and Nichols C.G. (2001): Inward rectifiers in the heart: An update on I_{K1} . *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 625-638.
96. MacGregor G. G., Xu J. Z., McNicholas C. M., Giebisch G., and Hebert S. C. (1998): Partially active channels produced by PKA site mutation of the cloned renal K^+ channel, ROMK2 (*kir1.2*). *Am. J. Physiol.* **275**, F415-F422.
97. Malinowska D. H., Kuppert E. Y., Sherry A. M., and Cupoletti J. (2000): A candidate K^+ -channel involved in gastric HCl secretion. *FASEB J.* **14**, A-338
98. Malinowska D. H., Sherry, A. M., Tewari K. P., and Cuppoletti J. (2004): Gastric parietal cell secretory membrane contains PKA- and acid-activated Kir2.1 K^+ channels. *Am. J. Physiol.* **286**, C495-C506.
99. Marks I. N., Louw J. A., and Young G. O. (1992): Acid Secretion, 1932-92: Advances, Adaptations, and Paradoxes. *Scan J.Gastroenterol.* **27**, 7-13.
100. Marx S.O., Kurokawa J., Reiken S., Motoike H., D'Armiento J., Marks A. R., and Kass R.S. (2002): Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**, 496-499.
101. McNicholas C. M., Wang W., Ho K., Hebert S. C., and Giebisch G. (1994): Regulation of ROMK1 K^+ Channel Activity Involves Phosphorylation Processes. *PNAS* **91**, 8077-8081.
102. Nachlass M. M., Tsou K. C., Souza E. D., Cheng C. S., and Seligman A. M. (1956): Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420-436.
103. Nakajima S., Shoemaker R. L., Hirschowitz B. I., and Sachs G. (1970): Comparison of actions of aminophylline and pentagastrin on *Necturus* gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **219**, 1259-1262.
104. Nakajima S., Shoemaker R. L., Hirschowitz B. I., and Sachs G. (1970): Influence of atropine on resistance, potential, and H^+ secretion in isolated gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **218**, 990-994.
105. Nandi J., Bosche M. C., and Levine R. A. (1996): Effects of a phorbol ester and isoquinoline sulfonamides on rabbit parietal cell function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**, 97-105.
106. Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., and Guicheney, P. (1997): A novel mutation in the potassium channel gene *KVLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 186-189.
107. Nichols C.G. and Lopatin A. N (1997): Inward rectifier potassium channels. *Ann. Rev. Physiol.* **59**, 171-191.
108. Nishizuka Y. (1977): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
109. Okamoto C. T. and Forte J. G. (2001): Vesicular trafficking machinery, the actin cytoskeleton, and H^+ - K^+ -ATPase recycling in the gastric parietal cell. *J. Physiol.* **532**, 287-296.

110. Ostrowski J., Zych W., Dolwy K., and Butruk E. (1991): The relationship between extracellular K^+ and Ca^{2+} on aminopyrine accumulation in rat parietal cells. *J. Physiol. Pharmacol.* **42**, 279-291.
111. Ostrowski J., Wojciechowski K., Konturek S. J., and Butruk E. (1993): Inhibitory effect of EGF on secretory response of rat parietal cells is associated with an induction of ODC. *Am. J. Physiol.* **264**, C1428-C1433.
112. Parente J. A., Chen X., Zhou C., Petropoulos A. C., and Chew C. S. (1999): Isolation, cloning, and characterization of a new Mammalian coronin family member, Coroninse, which is regulated within the PKC signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 3017-3025.
113. Perez F. J., Ruiz M. C. and Michelangeli F. (2001): Simultaneous measurement and imaging of intracellular Ca^{2+} and H^+ transport in isolated rabbit gastric glands. *J. Physiol.* **537**, 735-745.
114. Parsons M.E. and Keeling D.J. (2005): Novel approaches to the pharmacological blockade of gastric acid secretion. *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**, 411-421.
115. Peng X. R., Yao X., Chow D. C., Forte J. G., and Bennett M. K. (1997): Association of syntaxin 3 and vesicle-associated membrane protein (VAMP) with H^+/K^+ -ATPase-containing tubulovesicles in gastric parietal cells. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 399-407.
116. Pepio A. M. and Sossin W. S. (2001): Membrane translocation of novel Protein kinase C's is regulated by phosphorylation of the C2 domain *J. Biol. Chem.* **276**, 3846-3855.
117. Pessia M., Tucker S.J., Lee K., Bond C. T., and Adelman J. P. (1996): Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K^+ channels. *EMBO J.* **15**, 2980-2987.
118. Pfeiffer A., Kopp R., and Rochlitz H. (2001): Stimulation of inoditol phosphate and diacylglycerol production by RHC 80267, a diacylglycerol-lipase inhibitor, in rat gastric parietal cells: effects on hydrogen ion secretion. *Biochem. Biophys. Acta* **1001**, 191-195.
119. Poopalasundaram S., Knott C., Shamotienko O. G., Foran P. G., Dolly J. O., Ghiani C. A., Gallo V., and Wilkin G. P. (2000): Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K^+ channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* **30**, 362-372.
120. Ray T. K., Nandi J., Pidhorodecky J. N., and Meng-Ai Z. (1982): Polyamies are inhibitors of gastric acid secretion. *PNAS* **79**, 1448-1452.
121. Reenstra W. W. and Forte J. G. (1990): Isolation of H^+/K^+ -ATPase-containing membranes from the gastric oxyntic cell. *Methods Enzymol.* **192**, 151-165.
122. Reenstra W. W., Bettencourt J. D., and Forte J. G. (1986): Active K^+ absorption by the gastric mucosa: inhibition by omeprazole. *Am. J. Physiol.* **250**, G455-G460.
123. Reenstra W. W. and Forte J. G. (1990): Characterization of K^+ and Cl^- conductances in apical membrane vesicles from stimulated rabbit oxyntic cells. *Am. J. Physiol.* **259**, G850-8.
124. Sachs G., Berglinth T., Rabon E., Stewart H. B., Barcellona M. L., Wallmark B., and Saccomani G. (1980): Aspects of parietal cell biology: cells and vesicles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **341**, 312-334.
125. Sachs G., Berglinth T., Rabon E., Wallmark B., Barcellona M. L., Stewart H. B., and Saccomani G. (1980): The interaction of K^+ with gastric parietal cells and gastric ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **358**, 118-137.
126. Sakai H., Okada Y., Morii M., and Takeguchi N. (1989): Anion and cation channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells. *Pfluegers Arch* **414**, 185-192.
127. Samuelson L. C. and Hinkle K. L. (2003): Insights into the regulation of gastric acid secretion through analysis of genetically engineered mice. *Ann. Rev. Physiol.* **65**, 383-400.

128. Sanguinetti M. C., Curran M. E., Zou A., Shen J., Spector P. S., Atkinson D. L., and Keating M. T. (1996): Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.
129. Sato R. and Koumi S. (1995): Modulation of the inwardly rectifying K⁺ channel in isolated human atrial myocytes by alpha 1-adrenergic stimulation. *J. Membr. Biol.* **148**, 185-191.
130. Scarff K. L., Judd L. M., Toh B. H., Gleeson P. A., Van Driel I. R. (1999): Gastric H⁺/K⁺-adenosine triphosphatase beta subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. *Gastroenterology* **117**, 605-618.
131. Schroeder B. C., Waldegger S., Fehr S., Bleich M., Warth R., Greger R., and Jentsch T. J. (2000): A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.
132. Shoemaker R. L., Hirschowitz B. I., and Sachs, G. (1967): Hormonal stimulation of *Necturus* gastric mucosa in vitro. *Am. J. Physiol.* **212**, 1013-1016.
133. Shoemaker R. L., Makhoulouf G. M., and Sachs G. (1970): Action of cholinergic drugs on *Necturus* gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* **219**, 1056-1060.
134. Smolka A. and Swiger K. M. (1992): Site-directed antibodies as topographical probes of the gastric H,K-ATPase alpha-subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* **1108**, 75-85.
135. Stanfield, P. R. and Sutcliffe, M. J. (2003): Spermine Is Fit to Block Inward Rectifier (Kir) Channels. *J. Gen. Physiol.* **122**, 481-484.
136. Stockklausner C., Ludwig J., Ruppertsberg J. P. and Klocker N. (2001): A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K⁺ channels. *FEBS lett.* **493**, 129-133.
137. Stockklausner C. and Klocker, N. (2003): Surface Expression of Inward Rectifier Potassium Channels Is Controlled by Selective Golgi Export. *J. Biol. Chem.* **278**, 17000-17005.
138. Stoschek, C. M. (1990): Increased uniformity in the response of coomassie blue G protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* **184**, 111-116.
139. Supplisson S., Loo D. F., and Sachs G. (2005): Diversity of K⁺-channels in the basolateral membrane of resting *Necturus* oxyntic cells. *J. Membr. Biol.* 209-221.
140. Takumi T., Ishii T., Horio Y., Morishige K. I., Takahashi N., Yamada M., Yamashita T., Kiyama H., Sohmiya K., Nakanishi S., and Kurachi Y. (1995): A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in Glial Cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 16339-16346.
141. Tamargo J., Caballero R., Gomez R., Valenzuela C., and Delpon E. (2004): Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **62**, 9-33.
142. Tanemoto M., Kittaka N., Inanobe A., and Kurachi Y. (2000): In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J. Physiol.* **525**, 587-592.
143. Tanemoto M., Abe T., Onogawa T., and Ito S. (2004): PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am. J. Physiol.* **287**, F1148-F1153.
144. Terano A., Ivey K. J., Stachura J., Sekhon S., Hosojima H., McKenzie W. N., Krause W. J., Wyche J. H. (1982): Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology* **83**, 1280-1291.
145. Thomas G. P., Gerlach U., and Antzelevitch C. (2003): HMR 1556, a potent and selective blocker of slowly activating delayed rectifier potassium current. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**, 140-147.
146. Tong Y., Brandt G. S., Li M., Shapovalov G., Slimko E., Karschin A., Dougherty D. A., and Lester H. A. (2001): Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **117**, 103-118.

-
147. Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc. Natl. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
148. Ueda S., Loo D. F., and Sachs, G. (1987): Regulation of K⁺ channels in the basolateral membrane of *Necturus* oxyntic cells. *J. Membr. Biol.* **97**, 31-41.
149. Urushidani T. and Forte J. G. (1999): Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *J. Membr. Biol.* **159**, 99-111.
150. Waldegger S. (2003): Heartburn: cardiac potassium channels involved in parietal cell acid secretion. *Pfluegers Arch* **446**, 143-147.
151. Warth R. (2003): Potassium channels in epithelial transport. *Pfluegers Arch* **446**, 505-513.
152. Warth R. and Barhanin J. (2002): The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am. J. Physiol.* **282**, R639-R648.
153. Wessel D. and Flüggé U. I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Lipids. Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
154. Wolosin J. M. and Forte J. G. (1981): Changes in the membrane environment of the (K⁺/H⁺)-ATPase following stimulation of the gastric oxyntic cell. *J. Biol. Chem.* **256**, 3149-3152.
155. Wolosin J. M. and Forte J. G. (1984): Stimulation of oxyntic cell triggers K⁺ and Cl⁻ conductances in apical H⁺-K⁺-ATPase membrane. *Am. J. Physiol.* **246**, C537-45.
156. Wolosin J. M. and Forte J. G. (1985): K⁺ and Cl⁻ conductances in the apical membrane from secreting oxyntic cells are concurrently inhibited by divalent cations. *J. Membr. Biol.* **83**, 261-272.
157. Xu H., Yang Z., Cui N., Chanchevalap S., Valesky W. W., and Jiang C. (2000): A single residue contributes to the difference between Kir4.1 and Kir1.1 channels in pH sensitivity, rectification and single channel conductance. *J. Physiol.* **528**, 267-277.
158. Xu Z. C., Yang Y., and Hebert S. C. (1996): Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9313-9319.
159. Yang I. C. H., Scherz M. W., Bahinski A., Bennett P. B., and Murray K. T. (2000): Stereoselective interactions of the enantiomers of chromanol 293B with human voltage-gated potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 955-962.
160. Zhou R., Guo Z., Watson C., Chen E., Kong R., Wang W., and Yao X. (2003): Polarized distribution of IQGAP proteins in gastric parietal cells and their roles in regulated epithelial cell secretion. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1097-1108.
161. Zicha S., Moss I., Allen B., Varro A., Papp J., Dumaine R., Antzelevich C., and Nattel S. (2003): Molecular basis of species-specific expression of repolarizing K⁺ currents in the heart. *Am. J. Physiol.* **285**, H1641-H1649.

Abbildungsverzeichnis.

Abbildung 1: Die Säuresekretion der Parietalzelle.	3
Abbildung 2: Signaltransduktion der Säuresekretion des Magens und die Angriffspunkte diverser anti-sekretorischer Pharmaka.....	12
Abbildung 3: Morphologische Veränderungen der PZ nach Isolierung bzw. Stimulierung.....	15
Abbildung 4: Theorien zur apikalen Lokalisation von K^+ -Kanälen in den PZ.....	18
Abbildung 5: Eukaryontische Expression-Plasmide.....	25
Abbildung 6: Allgemeine Übersicht der Präparation von stimulierten und unstimulierten Membranen der Zellen der Magenmukosa.	27
Abbildung 7: Tabelle: Proteinverteilung und Verteilung der Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase und der K^+ -Phosphatase (<i>pNPPase</i>) sowie deren Anreicherungsfaktoren in den Fraktionen nach differentieller-Pelletierungs-Zentrifugation. Diagramm: Prozentuale Verteilung des Proteins nach der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation.....	61
Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen-Pelletierungs- und Ficoll-Stufengradienten-Zentrifugation.....	63
Abbildung 9: Auftrennung der Fraktion BLM nach Ficoll-Gradienten mittels linearem Saccharose-Gradienten.....	66
Abbildung 10: Auftrennung der Fraktion P_3 mittels linearem Saccharose-Gradienten (13-50 %).....	68
Abbildung 11: Immunpräzipitation von TC.....	69
Abbildung 12: Tabelle: Proteinverteilung und Verteilung der Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase und der K^+ -Phosphatase (<i>pNPPase</i>) sowie deren Anreicherungsfaktoren in den Fraktionen nach differentieller-Pelletierungs-Zentrifugation. Diagramm: Prozentuale Verteilung des Proteins nach der differentiellen-Pelletierungs-Zentrifugation.....	71
Abbildung 13: Überblick über die Membran-Präparationen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens.....	73
Abbildung 14: <i>Trafficking</i> von Kir4.1, KCNQ1 und der H^+/K^+ -ATPase aus TC nach SA.....	75
Abbildung 15: Lokalisation von Kir4.1, KCNQ1 und H^+/K^+ -ATPase in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa des Kaninchens.	77
Abbildung 16: Kalibrierung der Detektionskanäle im Konfokalen LASER-Scanmikroskop.	79
Abbildung 17: Dreifachfärbungen von Ranitidin-behandelten (A) und Histamin-stimulierten (B) Kryoschnitten des Rattenmagens..	81
Abbildung 18: Primäre Parietalzellkultur (0-72 h).	84

Abbildung 19: Umverteilung von Kir4.1, KCNQ1 und der H ⁺ /K ⁺ -ATPase nach Stimulierung der Säuresekretion in isolierten und kultivierten PZ der Magenmukosa des Rattenmagens.....	86
Abbildung 20: Kontrollexperimente zur Transfektion von Kir4.1 in Zellkulturen.	88
Abbildung 21: Transfektion von Kir4.1 in Parietalzellen des Kaninchens.....	89
Abbildung 22: Parietalzellen der Magenmukosa des Kaninchens.....	90
Abbildung 23: Transient transfizierte PZ des Kaninchens zeigen eine deutliche Umverteilung des EGFP-Kir4.1 nach Histamin (100 µM)- und Carbachol (100 µM)-Stimulierung an.....	93
Abbildung 24: <i>Trafficking</i> von EGFP-Kir4.1 in transient transfizierten PZ nach Stimulierung.	94
Abbildung 25: Sekretorische Stimulierung von isolierten und kultivierten PZ der Magenmukosa der Ratte.....	96
Abbildung 26: Indirekte Messungen der Säuresekretion der PZ.....	98
Abbildung 27: Studien zum Einfluss von KN-62, 293B, BaCl ₂ und HMR 1556 auf den cholinerg vermittelten Signaltransduktionsweg in PZ der Magenmukosa des Kaninchens.....	101
Abbildung 28: Studien zum Einfluss von HMR 1556, 293B und BaCl ₂ auf den H ₂ -Histamin-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg in PZ des Kaninchens.....	101
Abbildung 29: Lokalisation von CaMKII, PKC-α, Kir4.1 und H ⁺ /K ⁺ -ATPase in hochangereicherten Membranen der Zellen der Magenmukosa der Ratte und des Kaninchens.....	103
Abbildung 30: Charakterisierung einer Ca ²⁺ -abhängigen γ-[³² P]ATP-Phosphorylierung eines 43 kDa Phosphoproteins (pp43).	104
Abbildung 31: Modell zur Lokalisation und zum <i>Trafficking</i> von Kir4.1 und KCNQ1 in gastrischen PZ.....	122
Abbildung 32: Theorie der K ⁺ -Rezyklierung in gastrischen PZ der Magenmukosa..	127

Abkürzungsverzeichnis.

[¹⁴ C]AP	[¹⁴ C]Dimethylamin-Aminopyrin
293 B	trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane
AGS	Adenomakarzinom-Zell-Linie
AGS _{Lysat}	Lysate von Adenomakarzinom Zellen
AGS _M	Mikrosomale Fraktion von Adenomakarzinom Zellen
AP	Ruhende unstimulierte apikale Membran
ATP	Adenosin-5'-Triphosphorsäure
BSA	Bovines Serumalbumin, Fraktion V
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
cAMP	Adenosin 3'5'Zyklisches Monophosphat
Carbachol	(2-[Aminocarbonyl]oxy)-N,N,N-Trimethylethanaminiumchloride (2hydroxyethyl)Trimethylammonium Chloride Carbamate), Carbamoylcholinchlorid
CCK _B	Cholecystokinin, Gastrinrezeptor
dbcAMP	Dibutyryl- Adenosin 3'5'Zyklisches Monophosphat
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N.N.N.'N'-tetraacetat
Gö 6976	Indolylcarbazol
H ₂	H ₂ -Histamin-Rezeptor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HMR 1556	[(3R,4S)-(+)-N-[3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-(4,4,4-trifluorobutoxy)chroman-4-yl]-N-methylmethanesulfonamide]
IBMX	Isobutylmethylxanthine
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorische Konzentration
ITS	Insulin-Transferrin-Selenit
KCNQ1	Spannungsabhängiger K ⁺ -Kanal KvLQT1
Kir4.1	Einwärtsgerichteter K ⁺ Kanal 4.1
KN-62	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinsulfonyl)N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazin
M ₃	muskarinischer M ₃ -Azetylcholin-Rezeptor
NBT	Nitroblau Tetrazolin
NDS	Normal Donkey Serum
NGS	Normal Goat Serum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKA	Proteinkinase A
PKC-α	Proteinkinase C Isoform alpha
PKC-ε	Proteinkinase C Isoform epsilon
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
pNPP	4-Nitrophenyl Phosphat Di-Natrium Salz ()
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PZ	Parietalzellen

PZ _{Lysat}	Lysate isolierter Parietalzellen
PZ _M	Mikrosomale Fraktion isolierter Parietalzellen
Ro-31-8220	Bisindolylmaleimid IX
S ₀	Postnuklearer Überstand
SA	stimulus-assoziierte Membran, sekretorische oder luminale Membran,
SCH28080	Protonenpumpen-Inhibitor, Schering 28080
TC	Tubulocisternae, Tubulovesikel
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat ()
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
wt	Wildtyp Konstrukt

Lebenslauf.

Name: Marc-André Kaufhold, M.A.
Anschrift: Am Berg 2, 49811 Lingen (Ems)
Geburtstag: 03.01.1976
Geburtsort: St. Bonifatius Hospital Lingen (Ems)
Familienstand: verheiratet mit Svenja Kaufhold geb. Büscher

Schulabschluss:

Mai 1996 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1996-12/1996 Hümmling Kaserne in Werlte

12/1996-04/1997 Scharnhorstkaserne in Lingen

Berufliche Ausbildung/Studium

Lehramt-Studiengang Sekundarstufe I und II:

10/1997-11/2002 Biologie (Sek.I/II)

04/1997-11/2002 Sport (Sek.I/II)

08.11.2002 Erstes Staatsexamen (Lehramt Sek. I u. II)

Examensarbeit: Marc-André Kaufhold (2001): Untersuchungen zur Säuresekretion des Magens. Münster (Examensarbeit). (sehr gut)

Magister-Studiengang

Hauptfach: Sportwissenschaften

04/1999-12/2003 1. Nebenfach: Biologie

04/1999-12/2003 2. Nebenfach: Erziehungswissenschaften

04.12.2003 Magister Artium

Magisterarbeit: Marc-André Kaufhold (2003): Doping im Nationalsozialismus. Münster (Magisterarbeit). (sehr gut)

Anstellungen als Studentischer Mitarbeiter

02.01.2001-31.10.2002 Zoophysiologie Münster, Prof. Dr. Beinbrech

04.02.2002-28.06.2002 Med. Biochemie Münster, Prof. Dr. Gehrke

13.03.2002-31.05.2002 Transfusionsmedizin Münster, Prof. Dr. Sibrowski

Anstellungen als Wissenschaftlicher Mitarbeiter

01.12.2002-01.12.2004 Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und
Endokrinologie, Prof. Dr. U. Seidler

Verzeichnis der eigenen Publikationen.

Wissenschaftliche Publikationen

- (1) Fährmann M., **Kaufhold M. A.**, Rieg T., and Seidler U. (2002): "Different actions of protein kinase C isoforms alpha and epsilon on gastric acid secretion. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 6, 938-946.
- (2) Fährmann M., **Kaufhold M. A.**, Rieg T. and Seidler U. (2003): Proteinkinase C- α attenuates cholinergically stimulated gastric acid secretion of rabbit parietal cells. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 3, 545-554.
- (3) **Kaufhold M. A.**, Fährmann M., Klöcker N., Beil W., Hagen S.J., and Seidler, U. (2005): Localization, *Trafficking* and physiological role of Kir4.1 and KCNQ1 in gastric parietal cells. in preparation.

Kongressbeiträge (Vortrag):

- (1) **Kaufhold M. A.**, Fährmann M., Klöcker N., Beil W., Hagen S.J., and Seidler, U. (2005): Localisation, *Trafficking*, and phosphorylation of the K⁺ channel, Kir4.1, in rat and rabbit parietal cells. *Gastroenterology* **128**, A-77, 519. DDW AGA, Chicago.
- (2) **Kaufhold M. A.**, Fährmann M., Klöcker N., Beil W., Hagen S.J., and Seidler, U. (2005): K⁺-channel Kir4.1 redistributes from tubulocisternae to the apical secretory membrane after stimulation of rat and rabbit parietal cells. *Eur. J. Physiol.* **449** (suppl. 1), S50, O 16-8. DPG, Göttingen.

Kongressbeiträge (Poster):

- (1) Fährmann M., **Kaufhold M. A.**, and Seidler U. (2001): Protein kinase C-alpha is activated after cholinergic stimulation of gastric parietal cells and attenuates the mediating pathway for acid secretion. *Biol. Cell* **93**, 191.
- (2) Fährmann M., **Kaufhold M. A.**, und Seidler U.: Role of calcium-dependent protein kinases in the cholinergic stimulation of gastric acid secretion. *Eur. J. Physiol.* **443**, 194.
- (3) Fährmann M., **Kaufhold M.A.** and Seidler U. (2002): Protein kinase C (PKC)- α but not PKC- ϵ attenuates H^+ -secretion of rabbit gastric parietal cells. *Zoology* **105**, 51.
- (4) Fährmann M.; **Kaufhold M. A.** und Seidler U. (2002): Die Funktion der Calcium-abhängigen Proteinkinasen CaMKII und Proteinkinase C- α in der cholinerg-stimulierten Säuresekretion des Magens. *German J Gastroenterol.* **8**, 636.
- (5) Fährmann M.; **Kaufhold M. A.**, Rieg T., and Seidler U. (2003): PKC-epsilon mediates cholinergically-conveyed acid secretion in gastric parietal cells. *Eur. J. Physiol.* **445**, 82.
- (6) **Kaufhold M. A.**, Krabbenhöft A., Fährmann M., Manns M. P., Seidler U. Hagen S. J. (2004): Inwardly Rectifying K^+ Channel (Kir)-4.1 localizes to the tubulovesicles and secretory membranes from resting and stimulated rat stomach. *German J Gastroenterol.* **8**, 825.
- (7) **Kaufhold M. A.**, Fährmann M., Klöcker N., Beil W., Hagen S. J., Seidler, U. (2005): K^+ -channels Kir4.1 and KCNQ1 are localized to different H^+/K^+ -ATPase containing membranes of gastric parietal cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **84**, 120-121.

Danksagung.

Mit den folgenden Zeilen möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben:

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Seidler für die Überlassung des Themas und die finanzielle Bereitstellung von Sachmitteln sowie der Promotionsstelle und für den notwendigen Freiraum zur Bearbeitung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Michael Fähmann für die kreative und professionelle Mitgestaltung des Themas, für Sachmittel und für alle kritischen und kompetenten Anregungen und Hilfestellungen während dieser Zeit.

Herrn Prof. Dr. Müller und Herrn Prof. Dr. Beil danke ich für die Übernahme der Referate. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Beil für die Möglichkeit in seinen Laborräumen forschen zu dürfen. Zusätzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der AG Beil, Ute Staar und Petra Kilian, für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Brigitte Riederer möchte ich danken für die professionelle Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Seidler für die freundschaftliche Atmosphäre und das gute Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich hier insbesondere Anja Krabbenhöft, für die Hilfestellungen bei der Präparation der Membranen und den Enzym-Tests.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Kooperationspartnern bedanken:

Frau Prof. Dr. Susan Hagen (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA) für die zur Verfügungstellung eines Anti-Kir4.1-Antikörpers zur Durchführung der Westernblottings und der Immunpräzipitationen.

Herrn PD. Dr. Nikolay Klöcker (Institut Physiologie II, Universität Freiburg) für die zur Verfügungstellung eines Anti-Kir4.1 Antikörpers, sowie der Kir4.1-DNS-Konstrukte für die Konfokale Mikroskopie.

Herrn Prof. Dr. Adam Smolka und Dr. Serhan Karvar (Dept. of Molecular Cell Biology, University of California at Berkeley, Berkeley CA 94720-3200) für die zur Verfügungstellung der H⁺/K⁺-ATPase-Antikörper.

Der Firma Aventis danke ich für die großzügige Lieferung der KCNQ1-Inhibitoren 293B und HMR 1556.

Abschließend möchte ich auch bei Olli, Sabrina und meinen Eltern sowie ganz besonders und Svenja für die Unterstützung während der Anfertigung der Dissatation danken.

Eidesstattliche Erklärung.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Molekulare Mechanismen der Säuresekretion des Magens: Lokalisation, *Trafficking* und die physiologische Rolle der K^+ -Kanäle Kir4.1 und KCNQ1 während der stimulierten Säuresekretion der Parietalzellen der Magenmukosa der Ratte bzw. des Kaninchens“

selbstständig verfasst, sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, März 2005