

Extrazelluläre Carboanhydrase im Dickdarm des Meerschweinchens

vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Tanja Kleinke

geboren am 16.09.1968 in Hannover

2001

Referent: PD Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. G. Gros

15. Dezember 2000

Danksagungen

Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr. med. G. Gros** für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Müller** danke ich für die biochemische Betreuung und die organisatorische Unterstützung.

Frau **Dr. S. Sender** gilt ein Dankeschön für die Betreuung und die Einarbeitung während der ersten eineinhalb Jahre dieser Arbeit sowie die vielen Tips und Informationen bezüglich der histologischen Untersuchungen.

Bei Frau **G. Becker** bedanke ich mich für die Betreuung der Meerschweinchen und die Bereitstellung des Organmaterials. Ebenso wie Frau Becker gilt Frau **M. Burmester** und Frau **K. Jansen** ein Dankeschön für ihr stets freundliches Entgegenkommen während der Organentnahme.

Bei **Dr. M. Raida** und **Dr. H. John** aus dem **IPF Pharma Centicals GmbH** möchte ich mich für die massenspektrometrischen Sequenzanalysen bedanken. Auch dem Leiter des IPF **Prof. Dr. Dr. Forssmann** gilt ein Dankeschön für die Kooperation und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Dem Leiter des Zentralen Tierlabors der MHH, Herrn **Prof. Dr. Hedrich**, sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danke ich für die Zusammenarbeit bei der Zucht der CAII-defizienten Mäuse.

Insbesondere möchte ich meinem Kollegen **Werner Zingel** danken, der sich im steten Kontakt mit dem Zentralen Tierlabor um die Aufrechterhaltung der Zucht gekümmert hat. Außerdem gilt ihm ein Dankeschön für seine Unterstützung bei der Organentnahme. Die Tatsache, daß Werner einfach alles weiß und auch in den hintersten Ecken des Labors die unmöglichsten Dinge findet, hat vermutlich nicht nur zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen. **Weiter so, Werner!**

Bei **Sisko Bauer** bedanke ich mich für ihre äußerst geduldige Mitarbeit in der Histologie, insbesondere bei der oft frustrierenden Anfertigung der vielen Gefrier- und Paraffinschnitte. Auch ihre vielen Botengänge in die Fotoabteilung und die Bücherei haben mir in der Endphase des Zusammenschreibens sehr geholfen.

Uwe Krumm danke ich für seine stets sofortige Bereitschaft, meine dummen Fragen rund um die Wunderwelt der Computer zu beantworten.

Bei meinen Kolleginnen **Dr. Petra Wetzel** und **Dr. Cornelia Geers-Knörr** bedanke ich mich für das fachliche Korrekturlesen der ersten Fassung dieser Arbeit.

Bölli, meine langjährige Mitstreiterin im SFB, hat mir mit ihrer offenen und direkten Art sowie ihrer Lebensfreude aus so manchem Tief geholfen.

Ich danke all denjenigen **Kolleginnen und Kollegen** in der Vegetativen Physiologie, die für das gute Arbeitsklima während der gesamten Zeit mit beigetragen haben. Insbesondere die "Teerundengespräche" waren auf eine humorvolle Art und Weise stets sehr aufschlußreich und aufmunternd. Unter dem Motto: "Humor ist der Knopf, der verhindert, daß uns der Kragen platzt." gab es auch an noch so frustrierenden Arbeitstagen stets etwas zum Lachen.

Ich bedanke mich außerdem bei der **Deutschen Forschungsgesellschaft** für die Finanzierung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 280 "Gastrointestinale Barriere".

Bei **Andreas Haude** bedanke ich mich für die supergründliche Rechtschreibkorrektur und die vielen Formulierungsvorschläge für diese Arbeit. Obwohl er den ihm unverständlichen Kauderwelsch hat mehrfach lesen müssen, und die Fehler kein Ende zu nehmen schienen, ist er bis heute nicht daran verzweifelt.

Auch die vielen Stunden mit meinen Tomaten und Mozzarella essenden, Kakao mit Amaretto oder sonstigem Sprit trinkenden Freunden **Sus** und **Andreas** in der Küche, auf dem Balkon oder der Terrasse sowie das gemeinsame Gitarrengeklimper haben mir in den schwierigen Phasen dieser Arbeit stets Auftrieb gegeben und zu meiner Entspannung maßgeblich mit beigetragen. Ich hoffe, ich habe ihnen in dieser Zeit nicht die gesamten Ohren abgekaut.

Den vielen **Haupt- und Ehrenamtlichen im Jugendwerk der AWO** danke ich für die indirekte Unterstützung während der gesamten Zeit. Die Verbandsarbeit hat mir oft den nötigen Abstand zum Laboralltag verschafft und mir so neue Kraft für die Arbeit gegeben. Ihre Geduld mit meinen oft arg strapazierten Nerven läßt sich wohl kaum in Gold aufwiegen.

Meinem **Brüderchen** gilt ein Dankeschön für die stete Aufrüstung und Instandhaltung meines Computers. Insbesondere der 24-Stunden-Service hat mir geholfen, jedes auch noch so komplizierte Computerproblem während meines gesamten Studiums zu meistern.

Meinen **Eltern** danke ich für ihre vielseitige Unterstützung und ihr stets offenes Ohr für alle Anliegen während meines gesamten Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Abstract

Im Dickdarm mehrerer Spezies konnten verschiedene Carboanhydrase (CA) Isoenzyme nachgewiesen werden, für die eine Beteiligung an unterschiedlichen physiologischen Prozessen angenommen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herkunft der extrazellulären CA-Aktivität auf der apikalen Seite des Dickdarms vom Meerschweinchen untersucht, die bei massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnten. Neben dem Nachweis der membrangebundenen CAIV in der apikalen Membran konnte erstmals die Existenz einer CA im gastrointestinalen Mucus von Meerschweinchen, Ratte, Maus und Mensch nachgewiesen werden. Die Mucus-CA erwies sich als originärer Bestandteil des Mucus und ließ sich weder auf die Existenz abgeschilfterter Epithelzellen zurückführen, noch ist sie bakterieller Herkunft oder stammt aus dem Speichel.

Die Mucus-CA wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und stellt ein lösliches Isoenzym mit einem Molekulargewicht von 29kDa dar. Sie zeigt eine hohe Affinität zu Sulfonamiden, eine geringe Sensitivität für Anionen und ist nicht resistent gegenüber SDS.

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften sowie mittels Western-Blot-Analysen, für die im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antiseren gegen Meerschweinchen-CAI und-CAII hergestellt wurden, und Untersuchungen an CAII-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, daß es sich bei der isolierten Mucus-CA um eine bisher unbekannte Isoform der CA handelt.

Der CA im gastrointestinalen Mucus fällt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas an der apikalen Membran im Colon zu.

Schlagworte: Carboanhydrase, gastrointestinaler Mucus, Meerschweinchen

Abstract

In the large intestine of different species the existence of distinct isoforms of carbonic anhydrase (CA) could be shown. These different isozymes seem to be involved in different physiological processes within the large intestine. In this study the source of extracellular CA-activity in the large intestine of the guinea pig which could previously be observed in mass spectrometric experiments is investigated. The presence of CAIV in the apical membrane of the guinea pig colon could be proved. In addition the existence of an extracellular CA within the gastrointestinal mucus of guinea pig, mouse, rat and humans could be demonstrated for the first time. The CA-activity within the gastrointestinal mucus is neither due to the cytosolic isozymes CAI, CAII or CAIII nor to the membrane bound CAIV of the epithelial cells. In addition it is neither of bacterial origin nor caused by the salivary CAVI but is an original component of the gastrointestinal mucus. The enzyme was isolated by affinity chromatography and is a soluble isozyme of about 29kDa which exhibits a high affinity towards sulfonamides. It is only less sensitive for anions but can be fully inhibited by SDS. Because of its biochemical characteristics, the results of experiments with CAII-deficient mice and western-blot-analyses with antibodies against guinea pig CAI and CAII produced for this study we conclude that the mucus CA probably represents an isozyme which is specific for mucus and is not identical with the known CA isozymes. It appears possible that the mucus CA plays an essential role in to maintain pH-microclimate at the apical surface of the gastrointestinal epithelial layer.

Keywords: carbonic anhydrase, gastrointestinal mucus, guinea pig

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
2. AUFGABENSTELLUNG	8
3. MATERIAL	10
3.1. Meerschweinchen	10
3.2. CAII-defiziente Mäuse	10
3.3. Ratten	10
3.4. Humanes Probenmaterial	10
3.5. Antikörper	11
3.6. Chemikalien	11
4. METHODEN	12
4.1. Isolations- und Präparationsmethoden	12
4.1.1. Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln aus Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen	12
4.1.2. Gewinnung des Probenmaterials der CAII-defizienten Mäuse	15
4.1.3. Gewinnung und Verarbeitung von humanem Probenmaterial	16
4.1.4. Isolierung von CAI und CAII aus dem Blut vom Meerschweinchen	17
4.1.5. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen CAI und CAII vom Meerschweinchen	21
4.1.6. Isolierung der CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens	22
4.2. Genotypisierung der Mäuse aus der Zucht der CAII-defizienten Mäuse	23
4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	24
4.4. Triton X-114-Phasenseparation	24
4.5. Enzymmessungen	25
4.5.1. Bestimmung der CA-Aktivität	25
4.5.1.1. Bestimmung des K_i -Wertes verschiedener Hemmstoffe für die CA	25
4.5.2. Bestimmung der LDH-Aktivität	28
4.5.3. Bestimmung der Ouabain-hemmbareren Na^+/K^+ -ATPase	29
4.6. Elektrophoretische Methoden	30
4.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
4.6.2. Immunoblotting	32
4.6.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	34
4.6.4. Silberfärbung	35

4.7. Histologie und Immunhistochemie	36
4.7.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	36
4.7.2. Anfertigung von Paraffinschnitten	37
4.7.3. Mucinfärbung mit PAS und Alcianblau	38
4.7.4. Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrier- und Paraffinschnitten	38
4.7.5. Vorbehandlung mit Phospholipase C	39
4.8. Sequenzanalyse von Proteinen mittels Massenspektrometrie	39
5. ERGEBNISSE	43
5.1. Biochemische Charakterisierung der Mucus-CA verschiedener Spezies	43
5.1.1. CA-Aktivitäten im Mucus des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies	43
5.1.2. Verteilung der Mucus-CA im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114	46
5.1.3. Empfindlichkeit der Mucus-CA für ACZT und SDS	46
5.2. Charakterisierung der Mucus-CA mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII und anderen CA-Antikörpern	48
5.2.1. Charakterisierung der isolierten Enzymfraktionen aus dem Blut vom Meerschweinchen	48
5.2.1.1. Biochemische Charakterisierung	48
5.2.1.2. Elektrophoretische Charakterisierung	51
5.2.2. Spezifität der polyklonalen Antiseren gegen Meerschweinchen-CAI und -CAII	55
5.2.3. Charakterisierung der Mucus-CA aus dem Gastrointestinaltrakt des Meerschweinchens	56
5.2.4. Charakterisierung der Mucus-CA aus dem humanen Gastrointestinaltrakt	59
5.2.5. Charakterisierung der Mucus-CA aus dem Gastrointestinaltrakt der Ratte	62
5.3. Ergebnisse der Untersuchungen des Probenmaterials der CAII-defizienten Mäuse	64
5.4. Identität der isolierten Mucus-CA	69
5.4.1. Bestimmung der CA-Aktivität und der Hemmung mit KJ und SDS	69
5.4.2. Elektrophoretische Charakterisierung	70
5.4.3. Identifizierung der Isoform der Mucus-CA mittels Western-Blot	70
5.4.4. Sequenzierung mittels Massenspektrometrie	72
5.5. Membrangebundene CA im Dickdarm des Meerschweinchens	76
5.5.1. Biochemische Charakterisierung der isolierten apikalen und basolateralen Membranvesikel aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen	76
5.5.1.1. Bestimmung der Enzymaktivitäten der CA, LDH und der Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	76
5.5.1.2. Verteilung der CA-Aktivität im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114	78
5.5.1.3. Hemmbarkeit der CA mit SDS	79
5.5.1.4. Bestimmung des K _i -Wertes für Diamox	80
5.6. Immunhistochemische und histochemische Untersuchungen am Dickdarm vom Meerschweinchen	80
5.6.1. Untersuchungen mit Anti-CAI, -CAII, -CAIII und -CAIV verschiedener Spezies	80
5.6.2. Vorbehandlung der Schnitte mit Phospholipase C	81
5.6.3. Untersuchungen mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII	82
5.6.4. Mucinfärbung der Gewebeschnitte vom Dickdarm des Meerschweinchens	82

6. DISKUSSION	83
6.1. Methodenkritik	83
6.1.1. Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln aus Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen	83
6.1.2. Isolierung von CAI und CAII aus dem Blut vom Meerschweinchen	85
6.1.3. Gewinnung von Mucusproben aus dem Dickdarm verschiedener Spezies	88
6.2. Nachweis einer extrazellulären CA im Mucus des Gastrointestinaltraktes	89
6.2.1. CA in apikalen und basolateralen Membranvesikeln vom Dickdarm des Meerschweinchens	90
6.2.2. CA im Mucus des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies	91
6.3. Herkunft der Mucus-CA	91
6.4. Identität der Mucus-CA	93
6.4.1. Überprüfung der Identität der Mucus-CA mit den bekannten Isoenzymen	93
6.4.1.1. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAI	93
6.4.1.2. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAII	94
6.4.1.3. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAIII	96
6.4.1.4. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAIV	96
6.4.1.5. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAV	98
6.4.1.6. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAVI	98
6.4.1.7. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAVII-XII und CAXIV	99
6.4.2. Identifizierung der isolierten Mucus-CA durch Sequenzierung mittels Massenspektrometrie	101
6.5. Immunhistochemie im Dickdarm vom Meerschweinchen	102
6.5.1. Lokalisation von CAI und CAII im Dickdarm vom Meerschweinchen	102
6.5.2. Lokalisation von CAIV im Dickdarm vom Meerschweinchen	103
6.6. Physiologische Bedeutung der Mucus-CA	104
7. ZUSAMMENFASSUNG	108
8. LITERATURVERZEICHNIS	110
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
10. ANHANG	120

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetazolamid	2-(o-Chlorphenyl)-1,3,4-thiadiazole-5-sulfonamid
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CA	Carboanhydrase (EC 4.2.1.1)
Da	Dalton
DAB	3' 3' Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
h	hora (Stunde(n))
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Isoelektrischer Punkt
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Molar (mol/l)
mM	Millimol
min	Minute
n	Stichprobenumfang
NAD	Nicotinadenosindiphosphat
n. d.	not determined (nicht bestimmt)
n. s.	nicht signifikant
p-AMPS	p-Aminomethylbenzen-Sulfonamid
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphat buffered Saline
P_i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r	Regressionskoeffizient
s	Sekunden
SCFA	short chain fatty acid (kurzkettige Fettsäuren)
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
t	time (Zeit)
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenethylendiamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxylethylensorbitanmonolaureat
U	Einheit (Unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/w	weight/weight (Gewichtsprozent)
w/v	weight/volume (Volumenprozent)

1. Einleitung

Carboanhydrase: In biologischen Systemen wird die normalerweise sehr langsam verlaufende reversible Hydratation von CO_2 durch das Enzym Carboanhydrase (CA) beschleunigt. Sie wurde erstmals von MELDRUM & ROUGHTON (1933) aus den Erythrozyten vom Rind isoliert und mit dieser Reaktion in Verbindung gebracht. Das aktive Zentrum der CA besteht aus einer hydrophoben Tasche, an deren Grund ein Zinkatom liegt, welches an drei Histidinreste gebunden ist. Der 4. Ligand für das Zinkatom ist entweder H_2O oder OH^- (BÖTTCHER, 1991). Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. Zunächst wird OH^- derart an das Zinkatom gebunden, daß es CO_2 angreifen kann und HCO_3^- entsteht, welches über die Hydroxylgruppe mit dem Zinkatom verbunden ist. Im zweiten Schritt wird das gebundene HCO_3^- durch Wasser ersetzt, und HCO_3^- sowie H^+ werden freigesetzt (SLY & HU, 1995).

Carboanhydrase-Isoenzyme: Bei Säugetieren konnten bislang 13 Isoformen der CA gefunden werden (CAI-CAXII, CAXIV), die zur Genfamilie der α -Carboanhydrase gehören und von denen sechs isoliert und charakterisiert wurden (CAI-VI). Die Identifikation der Isoenzyme VII-XII und XIV erfolgte bisher nur anhand ihrer Gene, die dazugehörigen Proteine wurden bislang noch nicht isoliert und charakterisiert (IVANOV ET AL., 1998; FUJIGAWA-ADACHI, 1999). Die verschiedenen Isoenzyme der CA unterscheiden sich in ihren kinetischen Eigenschaften, der Hemmbarkeit durch Sulfonamide, Anionen und SDS, ihren Molekulargewichten sowie ihrer Gewebsverteilung. **CAI, II und III** stellen cytosolische Isoformen mit einem Molekulargewicht von ca. 30kDa dar, die in vielen verschiedenen Geweben gefunden werden konnten. Bei **CAIV** handelt es sich um ein membrangebundenes Isoenzym mit Molekulargewichten zwischen 36kDa und 52kDa, welches für verschiedene Spezies unterschiedlich ist. **CAV** ist auf die Matrix der Mitochondrien beschränkt. **CAVI** stellt eine sekretorische Isoform dar, welche von den Speicheldrüsen in den Speichel sezerniert wird (SLY & HU, 1995).

Carboanhydrase im Dickdarm vom Meerschweinchen und anderen Spezies: Auch im Dickdarm vom Meerschweinchen und anderen Spezies konnten mehrere der CA-Isoenzyme gefunden werden, für die eine Beteiligung an verschiedenen physiologischen Prozessen angenommen wird. **CAI und II** konnten im Cytosol der Epithelzellen des Colons und des

Caecums vom Meerschweinchen sowohl biochemisch (CARTER & PARSSONS, 1971, 1972) als auch histochemisch (LÖNNERHOLM, 1977) nachgewiesen werden. Während CAI gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist, scheint CAII verstärkt als eine Art Saum nahe der apikalen Membran vorzuliegen (LÖNNERHOLM ET AL., 1988). Die histochemische sowie immunhistochemische Anfärbung ist für das distale Colon bei allen untersuchten Spezies stets schwächer als für das proximale Colon und das Caecum (FLEMING ET AL., 1995; LÖNNERHOLM ET AL., 1988; SPICER ET AL., 1990). CAI und II wird in den Epithelzellen des Dickdarms eine Rolle bei der Resorption von Na^+ und Cl^- zugeschrieben, da die Resorption durch Acetazolamid, einem CA-Inhibitor, gehemmt wird. Die CA stellt vermutlich intrazellulär HCO_3^- und H^+ für die gekoppelte elektroneutrale Aufnahme von Na^+ und Cl^- via Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in der apikalen Membran der Epithelzellen bereit (BINDER & RAWLINGS, 1973; CHARNEY ET AL., 1986). Daneben scheint den beiden Isoenzymen eine Bedeutung bei der Resorption von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) zuzukommen. Die intrazelluläre Bereitstellung von H^+ in Verbindung mit H^+ -Transportsystemen in der apikalen Membran des Dickdarms scheint für den undissoziierten Transport von SCFA von Bedeutung zu sein (LÖNNERHOLM ET AL., 1988; BÖLLERT, 1996), da auch dieser durch Acetazolamid gehemmt wird. Aufgrund der vorwiegend apikalen Lokalisation von CAII wird diese auch in Verbindung mit der Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas gebracht, welches unter anderem im Dickdarm vom Meerschweinchen (GENZ ET AL., 1997), der Ratte und dem Menschen (MC NEIL ET AL., 1987) nachgewiesen werden konnte. Neben CAI und CAII konnte im proximalen Colon und im Caecum von Ratte und Mensch (SPICER ET AL., 1990; GRAMLICH ET AL., 1990), nicht aber im distalen Colon **CAIII** nachgewiesen werden. Da CAIII nur im proximalen und nicht im distalen Colon vorkommt und die Resorption von Ammonium hauptsächlich proximal erfolgt, wird eine mögliche Beteiligung der CAIII an diesem Prozeß postuliert (SPICER ET AL., 1990). Zusätzlich zu den cytosolischen Isoenzymen konnte in der apikalen Membran vom Dickdarm der Ratte und des Menschen (PARKKILA ET AL., 1994; FLEMING ET AL., 1995) die membrangebundene **CAIV** nachgewiesen werden. Sie ist auf die apikale Membran beschränkt. Ihr wird eine Rolle bei der Regeneration von CO_2 für die Na^+ - und Cl^- -Resorption sowie der Bereitstellung von Protonen für die Resorption von SCFA und die luminale pH-Regulation zugeschrieben (FLEMING ET AL., 1995).

2. Aufgabenstellung

Obwohl die intrazelluläre Bereitstellung von HCO_3^- und H^+ durch CAI und CAII in den Epithelzellen des Dickdarms für die gekoppelte, elektroneutrale Resorption von Na^+ und Cl^- von vielen Autoren beschrieben wird, findet man nur wenig über einen extrazellulären Mechanismus zur Reaktion der Gegenionen, die bei dem Prozess über die apikale Membran mittels eines Na^+/H^+ -Austauschers und eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers in das Lumen sezerniert werden (BINDER & RAWLING, 1973; SUZUKI & KANEKO, 1987; CHARNEY ET AL., 1986). Eine extrazellulär vorhandene CA könnte das hier anfallende HCO_3^- und H^+ schnell zu CO_2 umsetzen, welches in die Epithelzellen diffundiert und hier wieder für die Bildung von H^+ und HCO_3^- zur Verfügung stehen würde. FLEMING ET AL. (1995) fanden in der apikalen Membran im Dickdarm von Ratte und Mensch die membrangebundene CAIV, für welche sie eine solche Funktion postulierten.

Neben der Regeneration von HCO_3^- und H^+ für die Elektrolytresorption erscheint das Vorhandensein einer extrazellulären CA im Dickdarm auch für die Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas sinnvoll zu sein. Ein konstanter pH auf der Oberfläche des Dickdarmepithels trotz schwankender luminaler pH-Werte über große Bereiche konnte für verschiedene Spezies nachgewiesen werden (GENZ ET AL., 1997; MC NEIL ET AL., 1987; LAVERTY ET AL., 1993; SAID ET AL., 1986). Der Mechanismus der Aufrechterhaltung dieses pH-Mikroklimas ist noch nicht vollständig geklärt. Sowohl von luminaler wie auch epithelialer Seite ist die Mucusschicht und das Epithel jedoch Säuren- wie Basenbelastungen ausgesetzt, die für die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes nahe der Epitheloberfläche abgefangen werden müssen (BÖLLERT, 1996; LAVERTY ET AL., 1993; FELDMANN ET AL., 1988).

Massenspektrometrische Untersuchungen am intakten Colon vom Meerschweinchen von BÖLLERT (1996) haben gezeigt, daß sowohl im distalen wie im proximalen Colon vom Meerschweinchen eine hohe extrazelluläre CA-Aktivität vorhanden ist. Für diese wird eine Rolle bei der Beseitigung des im Zuge der SCFA-Resorption auftretenden Säuren-Basen-Ungleichgewichts postuliert. FLEMING ET AL. (1995) spekulierten, daß die membrangebundene CAIV in der apikalen Membran im Dickdarm von Ratte und Mensch aufgrund ihrer extrazellulären Lage eine Bedeutung für das pH-Mikroklima spielen könnte. Die von BÖLLERT

(1996) gefundene extrazelluläre CA-Aktivität geht jedoch weit über die Aktivität der CAIV hinaus.

Da aufgrund der oben beschriebenen Befunde das Vorhandensein einer extrazellulären CA im Dickdarm physiologisch von Bedeutung sein könnte, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Aufklärung der Herkunft der extrazellulären CA-Aktivität im Dickdarm des Meerschweinchens. Neben dem Vorhandensein einer membrangebundenen Isoform in der apikalen Membran wäre eine sezernierte Form wie beispielsweise die CAVI des Speichels sowie eine Sekretion der in den Epithelzellen vorhandenen Isoenzyme CAI und CAII denkbar. Daher soll in dieser Arbeit zunächst an isolierten apikalen Membranvesikeln aus dem Epithel des Dickdarms die Existenz einer membrangebundenen CA überprüft werden. Des Weiteren wird der Mucus verschiedener Spezies auf das Vorhandensein von CA untersucht. Für die dort gefundene CA soll ein Isolationsverfahren entwickelt und die damit aus dem Mucus isolierte CA biochemisch, elektrophoretisch und mittels massenspektrometrischer Sequenzanalyse charakterisiert werden. Um eine mögliche Identität der im Mucus gefundenen CA mit den cytosolischen Isoenzymen CAI und CAII zu überprüfen, sollen zum einen Untersuchungen an CAII-defizienten Mäusen erfolgen. Zum anderen soll eine Methode entwickelt werden, um diese Isoenzyme erstmals in reiner Form aus dem Blut vom Meerschweinchen zu isolieren, um sie zur Herstellung polyklonaler Antiseren verwenden zu können. Die Antiseren sollen dann im Western-Blot zur Untersuchung der isolierten CA aus dem Mucus eingesetzt werden.

3. Material

3.1. Meerschweinchen

Es wurden männliche Tiere aus der Zucht von E. Pietsch (Holenberg) verwendet. Die Tiere wurden nach ihrer Ankunft in der Tierärztlichen Hochschule in Hannover in Makrolon-Käfigen auf Sägespaneinstreu bei Raumtemperatur gehalten. Über eine Zeitschaltuhr wurde künstlich ein 12h Hell-Dunkel-Zyklus (Lichtzeit von 7.00-19.00 Uhr) erzeugt. In den ersten drei Tagen erfolgte eine Entwurmung der Tiere durch Verabreichen von Fenbendazol (Pancur®, Hoechst, München). Ansonsten stand den Tieren als Alleinfutter Altromin No. 3122, pelletiert (Altromin GmbH, Laage) und mit Ascorbinsäure (0,5g/l) versetztes Trinkwasser ad libitum zur Verfügung.

3.2. CAII-defiziente Mäuse

Die CAII-defizienten Mäuse stammen aus eigener Zucht, die in Kooperation mit Prof. Dr. Hedrich im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule durchgeführt wird. Begonnen wurde die Zucht mit zwei heterozygot defekten Zuchtpaaren vom Stamm C57 BL6x car 2^o/x, die aus dem Jackson Labor (USA) stammen und erstmals von LEWIS ET AL. (1988) charakterisiert wurden. Die Tiere wurden bei einem 12h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Dem Standardfutter wurde zusätzlich ein Trockenfutter für Katzen hinzugefügt, welches zur Stärkung der CAII-defizienten Tiere beitrug.

3.3. Ratten

Verwendet wurden weibliche Wistar-Ratten (ca. 200g) von Charles River (Sulzfeld). Die keimfreien Wistar-Ratten wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule gezüchtet und uns zur Verfügung gestellt.

3.4. Humanes Probenmaterial

Humaner Magen- und Colonmucus wurde von Dr. S. Wagner (Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Hochschule Hannover) während endoskopischer Untersuchungen von Patienten gewonnen und uns zur Verfügung gestellt.

3.5. Antikörper

Die primären Antikörper gegen humane CA-Isoenzyme stammen von N. Carter (CAI, CAIII), London (England); von der Firma "Binding Site Limited" (CAII), Birmingham (England); W. S. Sly (CAIV), St. Louis (USA); P. J. Wistrand (CAIV), Uppsala (Schweden) und S. Parkkila (CAVI), Oulou (Finnland).

Primäre Antikörper gegen CA-Isoenzyme der Ratte stammen von W. S. Sly (CAI, CAII und CAIV); N. Carter (CAII) und von Y. Ogawa (CAVI), Osaka (Japan).

Die primären Antikörper gegen Meerschweinchen-CAI und-CAII wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt.

Bei den Sekundärantikörpern für die immunhistochemischen Untersuchungen handelte es sich um "Anti-rabbit IgG-FITC Conjugate" und "Anti-chicken IgG-FITC Conjugate".

Die Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analysen waren mit Peroxidase gekoppelt. Verwendet wurden "Horseradish Peroxidase Conjugated Donkey Anti-sheep IgG" und "Anti-rabbit IgG Peroxidase Conjugate".

Sämtliche Sekundärantikörper wurden von der Fa. Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.6. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mindestens in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Abweichende Quellen werden jeweils im Text genannt.

4. METHODEN

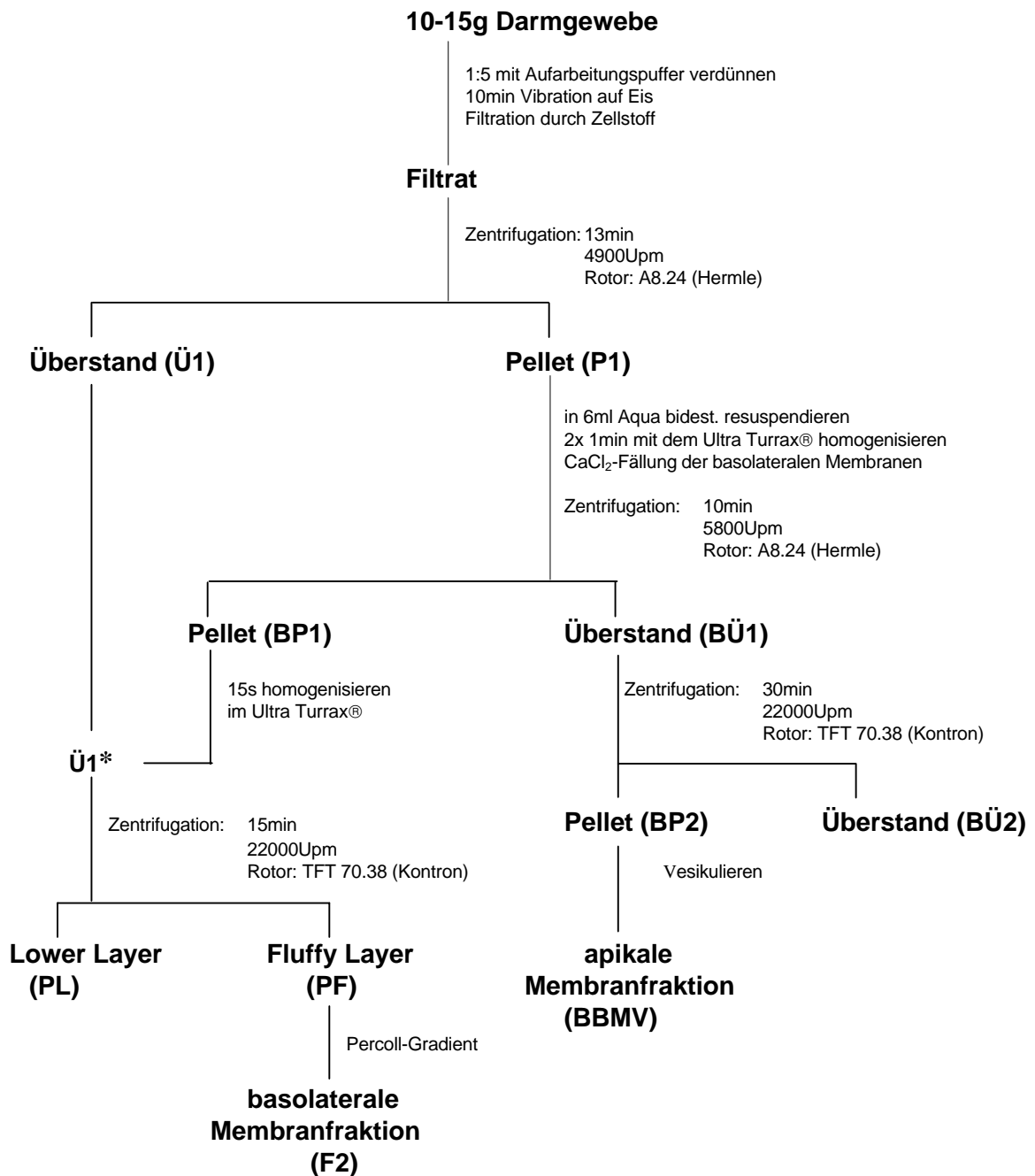
4.1. Isolations- und Präparationsmethoden

4.1.1. Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln aus Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen

Aufarbeitung des Gewebes: Die Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln erfolgte in Anlehnung an die Methode von DEL CASTILLO & ROBINSON (1982). Die Isolierung wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Der Dickdarm wurde nach Enthauptung der Tiere entnommen und in die einzelnen Abschnitte (distales Colon, proximales Colon und Caecum) unterteilt. Anschließend wurde er mit eisgekühltem Aufarbeitungspuffer (20mM Tris-HCl, 250mM Saccharose, 2mM EDTA, 5mM DTT, 0,2mM PMSF, pH 7,4) gespült, um den Faeces zu entfernen. Im Falle des proximalen und distalen Colons wurde der Darm entlang der Taenien aufgeschnitten und in 5-10cm lange Stücke unterteilt. Das Caecum wurde mit Hilfe eines Glasstabes umgestülpt und erneut gespült. Anschließend wurde das Gewebe 15min in Aufarbeitungspuffer inkubiert, bei -20°C eingefroren oder wie folgt weiterverarbeitet.

Trennung apikaler und basolateraler Membranen: Die Aufreinigungsprozedur ist in **Abb. 4.1** zur besseren Übersicht in Form eines Fließschemas dargestellt. 10-15g Gewebe eines Darmabschnittes wurden im Verhältnis 1:5 (w/v) mit frischem Aufarbeitungspuffer verdünnt und in ein Becherglas überführt. Die Darmepithelzellen wurden mit Hilfe eines Vibrierstabes abgelöst. Die Vibration erfolgte 10min lang auf Stufe 8,5-10 eines angeschlossenen Reglers (Typ Voltron 20, Fa. Messner Elektronik, Dettenhausen). Die Suspension mit den Epithelzellen wurde durch Zellstoff filtriert, um die Gewebestücke und das Fett abzutrennen. Von dem Filtrat sowie allen weiteren anfallenden Fraktionen wurde stets ein Aliquot von 500µl zur Charakterisierung genommen, in einem Dounce-Homogenisator (loose fitting) homogenisiert, tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Abb. 4.1: Fließschema zur Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen



Das Filtrat wurde 13min bei 4°C und 4900Upm in einem A8.24-Rotor einer Hermle Kühlzentrifuge (Typ: ZK400) zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde abgenommen und auf Eis zwischengelagert, das Pellet in 6ml Aqua bidest. resuspendiert und mit dem Ultra Turrax® (Fa. Janke & Kunkel) bei maximaler Geschwindigkeit 2x 1min homogenisiert und ein Aliquot zur Charakterisierung entnommen (P1). Im folgenden Schritt wurden die basolateralen

Membranen mit Calcium gefällt, um sie durch anschließende Zentrifugation von den apikalen Membranen zu trennen. Hierzu wurde das Volumen des homogenisierten Pellets mit Aqua bidest. auf 90ml aufgefüllt. Über einen Tropfzylinder wurden unter ständigem Rühren auf Eis innerhalb von 30min 11,27ml einer Calciumlösung (1,27ml 1M CaCl_2 auf 10ml Aufarbeitungspuffer) hinzugefügt. Nach einer weiteren Rührzeit von 30min erfolgte die Trennung der Membranen durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 5800Upm in einem A8.24-Rotor (Hermle). Das Pellet (BP1) enthielt die basolateralen, der Überstand (BÜ1) die apikalen Membranen.

Herstellung der apikalen Membranfraktion: Die apikalen Membranen im Überstand BÜ1 wurden durch 30minütige Zentrifugation bei 4°C und 22000Upm in einem TFT 70.38-Rotor einer Kontron-Ultrazentrifuge (TGA-50 Ultracentrifuge) sedimentiert. Der Überstand (BÜ2) wurde verworfen und das Pellet mit den apikalen Membranen (BBMV = brush-border-membrane) in 1,5ml Trispuffer (25mM Tris-HCl, pH 7,4) resuspendiert. Durch mehrfaches Aufziehen mit einer Injektionsspritze (Nadel: 23Gx11/4, 0,6x30) wurden die Membranen vesikuliert. Die Vesikel wurden tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Herstellung der basolateralen Membranfraktion: Das Pellet BP1 mit den gefällten basolateralen Membranen wurde in wenig Aufarbeitungspuffer resuspendiert, mit dem Ultra Turrax® 15s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert und anschließend mit dem Überstand Ü1 aus der ersten Zentrifugation zu Ü1* vereinigt. Um eventuell in Vesikeln eingeschlossene Cytosolreste zu entfernen, wurde an dieser Stelle ein hypotoner Schritt eingefügt. Die Fraktion Ü1* wurde 1:4 mit Aqua bidest. verdünnt, bevor die Membranen durch 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 22000Upm in einem TFT 70.38-Rotor (Kontron) sedimentiert wurden. Man erhielt nach der Zentrifugation ein "Doppelpellet", bestehend aus einem festen unteren Pellet (PL = lower layer) und einem oberen Pellet, welches sich sehr leicht resuspendieren ließ (PF = fluffy layer). PF enthielt den größten Anteil der basolateralen Membranen und wurde zu deren weiteren Aufreinigung auf einen Percoll-Gradienten aufgetragen. Hierzu wurde das Pellet zunächst in 30ml Aufarbeitungspuffer aufgenommen und in einem Dounce-Homogenisator (loose fitting) resuspendiert. Das Volumen des resuspendierten Pellets wurde mit Aufarbeitungspuffer auf 104,4ml aufgefüllt. Es wurden 15,6ml einer Percoll-Lösung (1ml Aufarbeitungspuffer 10fach und 9 Teile Percoll)

hinzugefügt. Das Gemisch wurde 45min bei 4°C und 26 000Upm in einem TFT 70.38-Rotor (Kontron) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erhielt man in dem gebildeten Percoll-Gradienten vier Banden (**Abb. 4.2**), die von oben nach unten mit F1-F4 bezeichnet wurden. Die einzelnen Banden wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Entfernung des Percolls wurden die Banden 1:2 mit Trispuffer (25mM Tris-SO₄, pH 7,4) verdünnt und 30min bei 4°C und 33000Upm in einem TFT 70.38-Rotor (Kontron) zentrifugiert. Das Percoll klebte nach der Zentrifugation fest am Boden des Zentrifugenröhrchens, während sich die sedimentierten Membranfraktionen leicht resuspendieren ließen. Sie wurden tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

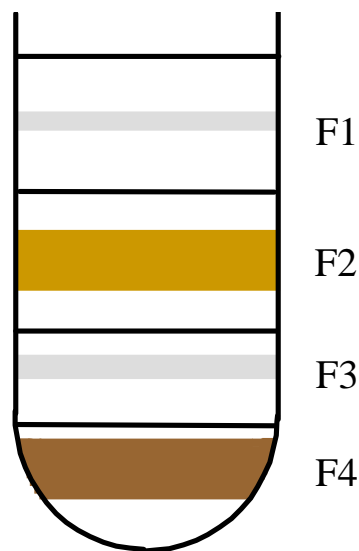


Abb. 4.2: Percoll-Gradient

4.1.2. Gewinnung des Probenmaterials der CAII-defizienten Mäuse

Gewinnung von Mucusproben und Speichel: Die Tiere wurden durch eine Überdosis Ether getötet. Anschließend wurde der Darm entnommen und in die einzelnen Abschnitte Caecum, proximales Colon und distales Colon unterteilt. Die Temperatur während der folgenden Aufarbeitung des Gewebes betrug stets 4°C. Zunächst wurden alle Darmabschnitte grob mit Pufferlösung (5mM Imidazol, pH 7,4) gespült, um den Faeces zu entfernen. In einem zweiten gründlichen Spülschritt wurde dann der Mucus gewonnen.

Der Speichel wurde durch Absaugen von sichtbarem Speichel mit einer Pasteurpipette und anschließendem Spülen des Mundes mit Pufferlösung gewonnen.

Gewinnung der Cytosolfraktion: Nach der Mucuserntfernung wurden die Darmabschnitte von Fett befreit und mit einer Schere grob zerkleinert. Das Gewebe wurde in Pufferlösung (3ml Pufferlösung pro Gramm Gewebe) überführt und mit einem Ultra Turrax® mit maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte 3x für 30s auf Eis. Zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wurden die Proben 5min auf Eis gekühlt. Die Homogenate wurden anschließend 1h bei 4°C mit 33000Upm in einem TFT 70.38-Rotor (Kontron) zentrifugiert. Der Überstand mit der Cytosolfraktion des Gewebes wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wurde verworfen.

4.1.3. Gewinnung und Verarbeitung von humanem Probenmaterial

Humaner Colonmucus: Der Mucus wurde von Dr. S. Wagner (Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Hochschule Hannover) während mehrerer Coloskopien gesammelt. Der Darm wurde mit Oralav® Darmspüllösung (Fa. Braun, Melsungen) so lange gespült, bis makroskopisch kein Stuhl mehr in der Spüllösung erkennbar war. Anschließend wurde mit einem Liter derselben Lösung nachgespült, und die herausgespülte Lösung wurde gesammelt. 500ml des so erhaltenen Materials wurden zunächst durch Zentrifugation bei 12000Upm in einem A8.24-Rotor (Hermle) bei 4°C 30min lang zentrifugiert, um grobe Partikel abzutrennen. Der Überstand wurde durch Ultrafiltration in einer Rührzelle vom Typ 8400 (Fa. Amicon, Witten) unter Verwendung einer Membran mit einer Porengröße von 0,45µm (Millipore, Eschborn) weiter aufgereinigt. Das Eluat dieses ersten Ultrafiltrationsschrittes (Eluat I) wurde im zweiten Schritt mit einer Membran vom Typ PM10 (Fa. Amicon/Millipore, Eschborn) 40fach konzentriert. Es schloß sich eine Dialyse des Retentats aus dem zweiten Ultrafiltrationsschritt (Retentat II) in Dialyseschläuchen (D-9692, Lot 92H0894, Sigma, Deisenhofen) mit einer Ausschlußgrenze von 12kDa gegen 1l Pufferlösung (5mM Imidazol, pH 7,4) an. Die Dauer der Dialyse betrug 36h, wobei der Puffer 6x gewechselt wurde. Die Temperatur betrug während der gesamten Aufarbeitung 4°C. Von allen anfallenden Fraktionen

wurden Aliquots zur Charakterisierung entnommen, tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

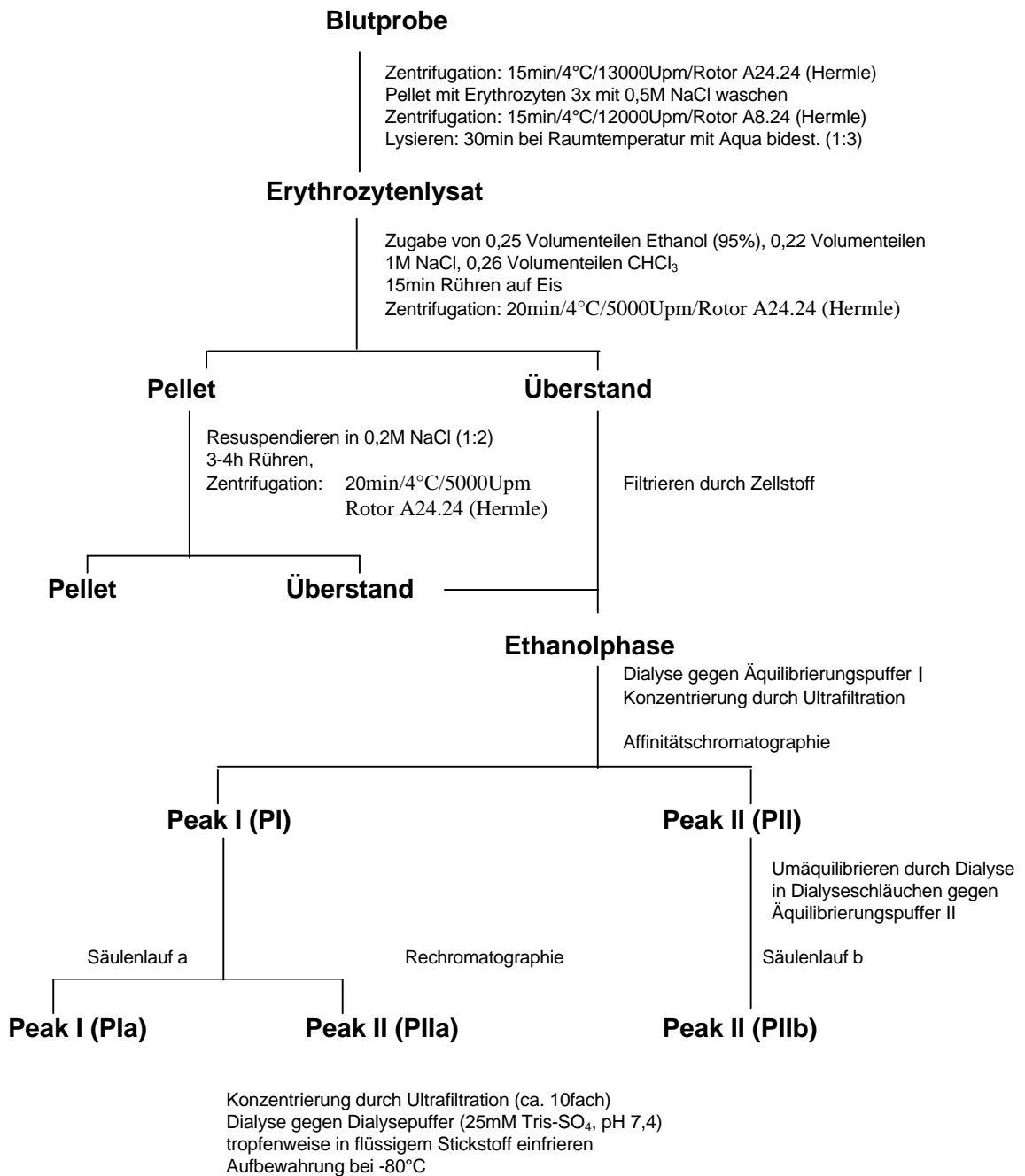
Humaner Magenmucus: Die Ausgangsprobe wurde während mehrerer Gastroskopien bei verschiedenen Patienten von Dr. S. Wagner gewonnen. Dabei wurde mittels einer Pipette, die durch das Endoskop eingeführt wurde, die Flüssigkeit von der Magenschleimhautoberfläche abgesaugt. Das gesammelte Material von mehreren Patienten wurde analog zur Aufarbeitung des Colonmucus weiter verarbeitet. Im Unterschied zum humanen Colonmucus erfolgte jedoch nur eine siebenfache Konzentrierung der Ausgangsprobe.

4.1.4. Isolierung von CAI und CAII aus dem Blut vom Meerschweinchen

Von den anfallenden Fraktionen der Isolierung wurden Aliquots zur Bilanzierung der Aufreinigungsprozedur entnommen, die tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur biochemischen Charakterisierung aufbewahrt wurden. Während der gesamten Aufreinigung betrug die Temperatur 4°C. **Abb. 4.3** gibt die Aufreinigungsprozedur von CAI und CAII aus dem Blut vom Meerschweinchen zur besseren Übersicht in Form eines Fließschemas wieder.

Herstellung von Erythrozytenlysat aus Meerschweinchenblut: Die Meerschweinchen wurden durch Dekapitation getötet. Das Blut wurde in EDTA-Monovetten (9ml S-Monovette® KE, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt und anschließend 15min bei 4°C und 13000Upm in einem A24.24-Rotor (Hermle) zentrifugiert. Der Überstand mit dem Plasma wurde verworfen und das Pellet mit den Erythrozyten 3x mit 0,15M NaCl gewaschen. Hierzu wurde das Pellet 1:6 mit 0,15M NaCl verdünnt und 15min bei 4°C und 12000Upm in einem A8.24-Rotor (Hermle) zentrifugiert. Die gewaschenen Erythrozyten wurden lysiert, indem sie 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend 30min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Erythrozytenlysat wurde entweder sofort für die Chloroform-Ethanol-Extraktion verwendet oder tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Abb. 4.3: Fließschema zur Isolierung von CAI und CAII aus dem Meerschweinchenblut



Chloroform-Ethanol-Extraktion: Da sich das Hämoglobin im Erythrozytenlysat vom Meerschweinchenblut bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung der CA als störend erwiesen hat, wurde zunächst eine Chloroform-Ethanol-Extraktion durchgeführt. Hämoglobin läßt sich durch Chloroform zu 99% denaturieren und anschließend mit der Chloroformphase von den übrigen löslichen Proteinen in der Ethanolphase abtrennen (BERNSTEIN & SCHRAER,

1972). Die Carboanhydrase bleibt bei dieser Prozedur zum überwiegenden Teil unbeschädigt und sammelt sich in der Ethanolphase an.

Das Erythrozytensat von 2-3 Meerschweinchen (ca. 60-70ml) wurde gepoolt und in ein Becherglas auf Eis überführt, welches sich auf einem Magnetprüher befand. Nacheinander wurden unter Rühren 0,25 Volumenteile Ethanol (95%), 0,22 Volumenteile 1M NaCl und schließlich 0,26 Volumenteile Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde weitere 15min auf Eis gerührt und anschließend 20min bei 4°C und 5000Upm in einem A24.24-Rotor (Hermle) zentrifugiert. Man erhielt nach der Zentrifugation die Ethanolphase in Form des Überstandes, der mit einer Pasteurpipette abgenommen, durch zweilagigen Zellstoff filtriert und auf Eis aufbewahrt wurde. Das Chloroform befand sich nach der Zentrifugation in flüssiger Form unter dem Pellet aus den denaturierten Proteinen. Das Pellet wurde durchstoßen, so daß das Chloroform abgegossen werden konnte.

Um möglicherweise absorbierte intakte Proteine aus dem Pellet herauszulösen und so größere Verluste bei der Aufreinigung zu vermeiden, wurde das Pellet 1:2 mit 0,2M NaCl verdünnt und 3-4h unter Rühren resuspendiert. Es folgte eine erneute 20minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000Upm. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit der Ethanolphase der ersten Zentrifugation vereinigt. Das Pellet mit den denaturierten Proteinen wurde anschließend verworfen.

Vorbereitung der Probe für die Affinitätschromatographie: Für die Isolierung der CA mittels Affinitätschromatographie wurden die vereinigten Überstände der Chloroform-Ethanol-Extraktion zunächst konzentriert und den Startbedingungen der Säule angepaßt. Die Äquibrierung der Proben erfolgte durch Dialyse in Dialyseschläuchen. Dialysiert wurde für 48h gegen 1l Äquibrierungspuffer I (25mM Tris-SO₄, 0,1M Na₂SO₂, pH 8,7), der in dieser Zeit 4-6x gewechselt wurde.

Die anschließende Konzentrierung der Probe wurde durch Ultrafiltration in einer Rührzelle vom Typ 8400 durchgeführt. Die verwendete Membran vom Typ PM10 hatte eine Ausschlußgrenze von 10kDa. Die konzentrierte Probe wurde entweder sofort auf die Affinitätsäule aufgetragen oder tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Affinitätschromatographie: Die Affinitätschromatographie erfolgte nach der Methode von WHITNEY (1974), die leicht modifiziert wurde. Da die eluierten Fraktionen des ersten Säulenlaufes stets ein Gemisch beider Isoenzyme enthielten, wurden sie für einen zweiten Säulenlauf erneut auf die Säule aufgetragen, wobei die Startbedingungen geändert wurden.

Für die Affinitätschromatographie wurde eine Glassäule mit einem Innendurchmesser von 2,6cm verwendet, die an ein GradiFrac-System von Pharmacia (Uppsala, Schweden) angeschlossen war. Gefüllt wurde die Säule mit 50ml p-AMPS (Fa. Sigma, Deisenhofen), welches zuvor mit Äquilibriumspuffer I äquilibriert wurde. Die Fließgeschwindigkeit während des Packvorgangs betrug 60ml/h, die Länge der gepackten Säule belief sich auf 4,5cm. Beim Auftragen der Probe sowie während der gesamten Aufreinigung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 51ml/h gearbeitet. Um ein Verstopfen oder eine Verunreinigung der Säule zu vermeiden, wurden die Proben und alle verwendeten Pufferlösungen zuvor durch Filtration durch Cellulose-Acetat-Filter (Fa. Satorius, Göttingen) mit einer Porengröße von 0,45µm gereinigt.

Es wurden 10-15ml der konzentrierten Ethanolphase aus der Chloroform-Ethanol-Extraktion auf die Säule aufgetragen. Die darin enthaltene CA-Menge betrug 60000-100000 U*ml. Anschließend wurden die ungebundenen Komponenten mit ca. 250ml Äquilibriumspuffer I von der Säule gewaschen, bis das Eluat bei 280nm eine Absorption von Null aufwies. Die Elution der unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine erfolgte mit ca. 120ml Elutionspuffer I (25mM Tris-SO₄, 0,3M NaClO₄, pH 8,7). Sowohl während des Probenauftrags als auch während des Waschvorganges und der Elution der unspezifisch gebundenen Proteine wurden Fraktionen mit einem Volumen von 8,5ml gesammelt. Während der folgenden beiden Elutionsschritte von CAI und CAII dagegen betrug das Volumen der gesammelten Fraktionen nur 4,25ml. Zunächst erfolgte die Elution der CAI mit ca. 300ml Elutionspuffer II (50mM Na-Phosphat, 1M NaCl, pH 6,3). Danach wurde die CAII mit ca. 150ml Elutionspuffer III (0,1M Natriumacetat, 0,5M NaClO₄, pH 5,6) von der Säule eluiert. Die Elution der Proteine konnte durch die Messung der Absorption bei 280nm kontrolliert werden. Im Anschluß an den ersten Säulenlauf wurde die Säule mit ca. 500ml Äquilibriumspuffer II (10mM Na-Phosphat, 20mM Na₂SO₄, pH 6,5) für die Rechromatographie der CA-Peaks umäquilibriert. Die Fraktionen der eluierten CA-Peaks wurden nach Peaks getrennt gepoolt, in Dialyseschläuche (s. o.) gefüllt und 36h gegen 1l Äquilibriumspuffer II dialysiert. Der Puffer wurde in diesem Zeitraum 8x gewechselt. In einem zweiten Säulenlauf wurden die beiden Peaks für eine Rechromatographie erneut auf die

Säule aufgetragen. Der Waschvorgang und der Schritt zur Elution der unspezifisch gebundenen Proteine entfiel. Nach dem Probenauftrag erfolgte die Elution der beiden CA-Isoenzyme analog der Beschreibung für den ersten Säulenlauf.

Aufarbeitung der Säulenfraktionen: Die Fraktionen sämtlicher CA-Peaks wurden nach Peaks getrennt gepoolt und in einem Mikro-Ultrafiltrations-System, Modell 8MC (Fa. Amicon, Witten), zunächst auf ca. 3-5ml eingengt. Verwendet wurde eine Membran vom Typ PM10. Anschließend wurde mit Dialysepuffer (25mM Tris-SO₄, pH 7,4) dialysiert. Hierzu wurde das 10fache Volumen der eingengten Probe an Puffer aus der Vorratskammer des Mikro-Ultrafiltrations-Systems durch die Kammer mit der eingengten Probe gepreßt. Das Probenvolumen bleibt hierbei konstant, es findet lediglich ein Austausch der Puffersubstanzen statt. Die Charakterisierung der Peaks erfolgte über die Bestimmung der spezifischen CA-Aktivität, die Hemmbarkeit mit KJ sowie mittels SDS-Gelelektrophorese und isoelektrischer Fokussierung (IEF).

4.1.5. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen CAI und CAII vom Meerschweinchen

Für die Herstellung der Antikörper wurden Chinchilla-Bastarde (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Vor der Immunisierung wurde den Tieren ca. 5ml Blut zur Gewinnung des Präimmunsersums entnommen. Für die Erstimmunisierung wurden im Fall der CAI 52µg Protein, im Fall der CAII 50µg Protein in 0,5ml kompletten Freud'schen Adjuvans gelöst und im Nackenbereich unter die Haut injiziert. Die Boosterinjektion erfolgte vier Wochen später in gleicher Weise, jedoch unter Verwendung von inkomplettem Freud'schen Adjuvans. Zur Gewinnung der Antiseren wurde den Tieren zwei Wochen nach der Boosterinjektion ca. 10ml Blut entnommen.

Sowohl das Blut für die Gewinnung der Präimmunsereen als auch der Antiseren wurde 1-2h in Serummonovetten (Sarstedt, Nümbrecht) bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 3200Upm in einer Hettich-Zentrifuge (EBA 8S, Fa. Roth, Karlsruhe). Der Überstand mit dem Serum wurde mit einer Pasteurpipette entnommen. Zur Abtrennung von möglicherweise vorhandenen Erythrozyten wurde er erneut in einer Eppendorffzentrifuge 10min mit 14000Upm zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde anschließend aliquotiert, bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

4.1.6. Isolierung der CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens

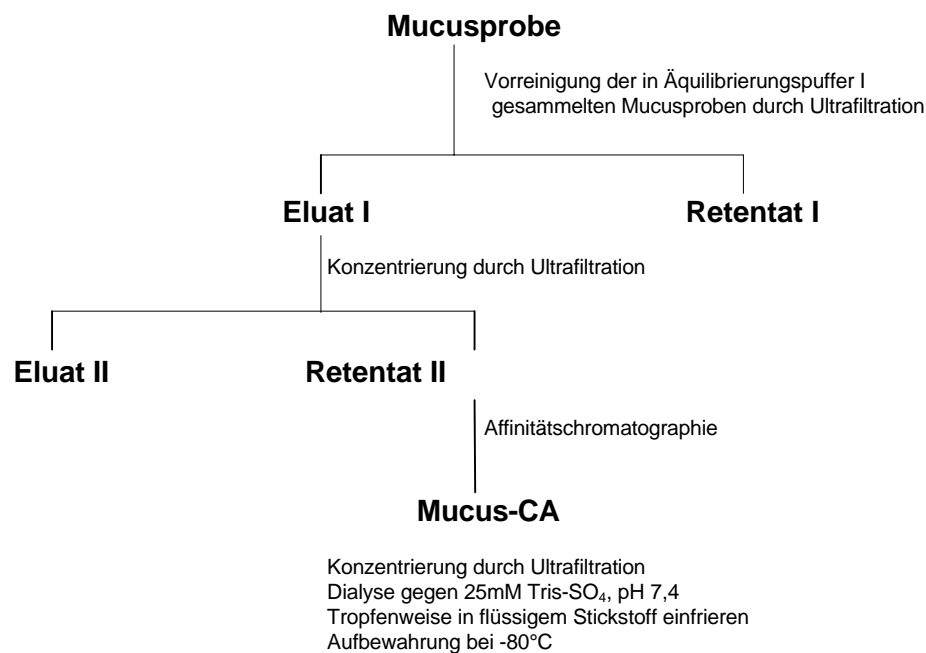
Auch für die Isolierung der CA aus dem Mucus wurden Aliquots der anfallenden Fraktionen wie unter 4.1.4. beschrieben zur Bilanzierung der Prozedur entnommen. Die Isolierung erfolgte bei einer Temperatur von 4°C.

Vorbereitung der Proben für die Affinitätschromatographie: Nach der Dekapitation der Meerschweinchen wurde der Dickdarm entnommen und in die einzelnen Segmente (Caecum, proximales und distales Colon) unterteilt. Der Darm wurde mit Äquilibriumspuffer I mit 2mM PMSF grob gespült, um den Faeces zu entfernen. Im anschließenden zweiten Waschschrift wurde durch gründliches Spülen mit Äquilibriumspuffer I der Mucus gewonnen. Für die weitere Aufreinigung wurden die so gewonnenen Mucusproben mehrerer Tiere gepoolt und bei -80°C aufbewahrt, bis ein Volumen von ca. 800ml vorhanden war. Das Fließschema in **Abb. 4.4** zeigt die im Folgenden beschriebene Isolierung der CA aus der Mucusprobe. Um die Probe von groben Partikeln zu befreien, erfolgte eine Filtration in einer Rührzelle vom Typ 8400 durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,45µm (Fa. Millipore; Eschborn). Das erhaltene klare Eluat wurde durch Ultrafiltration mit einer Membran vom Typ PM10 50fach konzentriert.

Affinitätschromatographie: Die Retentate des zweiten Ultrafiltrationsschrittes (**siehe Abb. 4.4**) mehrerer Vorreinigungsprozeduren wurden gepoolt und auf die Affinitätssäule aufgetragen. Es wurde dieselbe Säule wie für die Aufreinigung von CAI und CAII verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug ebenfalls 51ml/h. Sämtliche Puffer wurden vor der Verwendung wie oben beschrieben filtriert. Vom Probenauftrag, dem Waschschrift und der Elution der unspezifisch gebundenen Proteine wurden Fraktionen mit einem Volumen von 8,5ml gesammelt. Während der Elution der Mucus-CA betrug das Volumen der gesammelten Fraktionen dagegen 4,25ml. Die Äquilibriumierung der Säule sowie der Waschschrift nach dem Probenauftrag erfolgte mit Äquilibriumspuffer I. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer I eluiert. Um die Mucus-CA zu eluieren, wurden 220ml Elutionspuffer IV (7,5mM Na-Azid, pH 5,7) verwendet.

Aufarbeitung der Säulenfraktionen: Die Aufarbeitung der Säulenfraktionen erfolgte wie für die Fraktionen unter 4.1.4. beschrieben.

Abb. 4.4: Fließschema zur Isolierung der Carboanhydrase aus dem Mucus vom Dickdarm des Meerschweinchens



4.2. Genotypisierung der Mäuse aus der Zucht der CAII-defizienten Mäuse

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte im Alter von sechs Wochen durch Messung der CA-Aktivität im Erythrozytenlysat. Die Tiere wurden zunächst mit Ether betäubt. Anschließend wurde ihnen eine geringe Menge Blut retrobulbär mit einer Mikrokapillare abgenommen und in ein Eppendorfhütchen mit Heparin überführt. Durch Zentrifugation mit 14000Upm für 10min in einer Eppendorfzentrifuge (Typ 5414) wurde zunächst das Plasma abgetrennt. Die gepackten Erythrozyten wurden 3x gewaschen, indem sie mit 0,15M NaCl resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert wurden. Das Lysieren erfolgte durch Verdünnung 1:5 (w/v) mit Aqua bidest. und anschließender 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Das Lysat wurde tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Es schloß sich die Bestimmung der CA-Aktivität an.

Für die Zucht von CAII-defizienten Mäuse wurden lediglich defiziente Tiere verwendet. Wildtypmäuse wurden eliminiert, sofern sie nicht für Kontrollexperimente benötigt wurden. Verpaart wurden stets zwei heterozygot defekte Tiere oder ein homozygot defektes mit einem heterozygot defekten Tier. Die Verpaarung zweier homozygot defekter Tiere erwies sich als nicht effektiv und wurde daher eingestellt.

4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von PETERSON (1977) modifizierten Methode von LOWRY ET AL. (1951). Dabei wurden Reagenzien der Firma Sigma (Protein Assay Kit; No. P 5656) verwendet. Da die Farbreaktion dieses Tests durch viele Substanzen gestört wird (PETERSON, 1979), wurden die Proteine zunächst mit TCA gefällt. Für die Eichgerade wurden zehn Standardwerte (2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg, 20µg, 30µg, 40µg, 50µg und 60µg BSA) jeweils als Doppelbestimmung gemessen. Die Standards und die Proben unbekannter Proteinkonzentration wurden mit Aqua bidest. auf 1ml aufgefüllt. Anschließend wurde den Ansätzen 100µl DOC (1,5mg/ml) hinzugefügt und diese gut gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proteine durch Zugabe von 100µl TCA (72%) gefällt. Nach gutem Mischen erfolgte eine 10minütige Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge bei 140000 Upm. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation dekantiert und die gefällten Proteine in 500µl Lowry-Reagenz auf einem Vortex® resuspendiert. Nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde den Ansätzen 250µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugefügt. Nach gutem Mischen und einer weiteren Inkubation von 30min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze in einem Hitachi Photometer (Typ 150-20 Spectrophotometer) bei 750nm gemessen. Anhand der Standardansätze wurde eine Eichgerade erstellt, aus der die Proteinkonzentrationen für die unbekanntenen Proben ermittelt werden konnten.

4.4. Triton-X-114-Phasenseparation

Die Extraktion membrangebundener Proteine erfolgte mittels Triton X-114 leicht modifiziert nach der Methode von BORDIER (1981). Dieses Experiment erlaubt die Abtrennung membrangebundener Proteine von löslichen Proteinen. Während sich membrangebundenen Proteine in der Tritonphase ansammeln, findet man die löslichen Proteine in der Wasserphase. Die eisgekühlte Probe wurde zu gleichen Teilen mit der ebenfalls eisgekühlten Tritonlösung I (2,2% Triton X-114, 300mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7,4) in einem Reaktionsgefäß gemischt. Das Gemisch wurde 4min bei 31°C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung in Triton- und Wasserphase durch dreiminütige Zentrifugation in einer

Eppendorfcentrifuge mit 5000Upm. Die Wasserphase, die nach der Zentrifugation auf der Tritonphase auflag, wurde mit einer Eppendorfpipette abgenommen. Zur vollständigen Entfernung der Membranproteine wurde sie erneut mit Tritonlösung II (4,5% Triton X-114, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,4) versetzt, so daß die Endkonzentration von Triton 0,85% betrug. Die Inkubation bei 31°C und die Zentrifugation erfolgten wie oben beschrieben. Die Volumina der einzelnen Phasen wurden mit Hilfe einer Eppendorfpipette bestimmt. Für die Bestimmung der CA-Aktivität wurden die Tritonphasen beider Durchgänge vereinigt und 1:2 mit Aqua bidest. verdünnt.

Im Fall der für die Phasenseparation verwendeten apikalen Membranvesikel aus dem Dickdarm des Meerschweinchens wurde in der Tritonlösung I auf die 20mM Tris-HCl verzichtet, da diese bereits durch den Vesikelpuffer im Ansatz enthalten waren.

Zur Bestimmung der Verteilung der CA auf die beiden Phasen wurden die gemessenen Aktivitäten [Units] mit dem Volumen der jeweiligen Phase multipliziert. Die so erhaltenen CA-Mengen [U*ml] der einzelnen Phasen wurden in Prozent der für das Phasenseparationsexperiment eingesetzten gesamten CA-Menge [U*ml] angegeben.

4.5. Enzymmessungen

4.5.1. Bestimmung der CA-Aktivität

Prinzip der Messung: Die Carboanhydrase katalysiert folgende Reaktion:



Die Messung der Carboanhydrase-Aktivität nach MAREN (1960) beruht auf einer Veränderung des pH-Wertes, die anhand des Farbumschlages des pH-Indikators Phenolrot erfaßt wird. Die Probe wird zusammen mit dem pH-Indikator in eine Glaskammer pipettiert und 2,5min mit CO₂ begast, so daß die Lösung in der Kammer mit CO₂ gesättigt ist und einen sauren pH-Wert aufweist (Farbindikator gelb). Die CO₂-Hydratationsreaktion befindet sich im chemischen Gleichgewicht. Durch die anschließende schnelle Zugabe eines alkalischen Barbitalpuffers wird die Reaktion aus dem Gleichgewicht gebracht (Farbindikator rot), das sich danach wieder

einstellen muß. Die Zeit, die zum Wiedereinstellen des chemischen Gleichgewichtes benötigt wird, wird mit einer Stoppuhr gemessen und ist am Farbumschlag des pH-Indikators von rot nach gelb zu erkennen. Je mehr Carboanhydrase die Probe enthält, desto schneller erfolgt dieser Farbumschlag. Eine Probe hat die Aktivität 1, wenn die unkatalysierte Reaktionszeit auf die Hälfte beschleunigt wird.

Durchführung: Die Meßkammer wurde in ein Becherglas mit Eiswasser gehängt (siehe Abb. 4.5), so daß die Messung bei 0°C erfolgen konnte. 200µl Phenolrotlösung (12,5mg/l Phenolrot) und die Probe wurden in die Kammer pipettiert und diese mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 350µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 2,5min mit CO₂ (Flow 13ml/min) äquilibriert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Barbitalpuffer (0,064M Diethylbarbitursäure, pH 9,0) gestartet und die Zeit bis zum Farbumschlag von rot nach gelb gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde während der gesamten Meßdauer mit einem Magnetrührer bei 1800 Upm durchmischt.

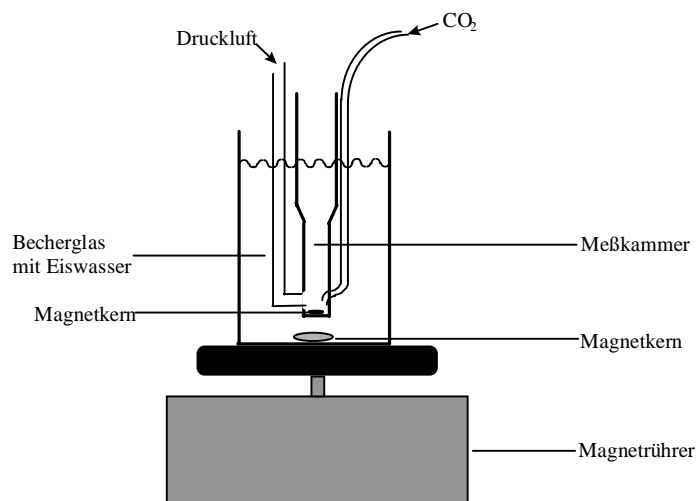


Abb. 4.5 Meßapparat zur Bestimmung der CA-Aktivität

Die Messungen mit den verschiedenen Hemmstoffen erfolgten (mit Ausnahme für SDS) durch direkten Zusatz des Hemmstoffes im Assayansatz. Für die Bestimmung der SDS-Resistenz wurde die Probe zunächst 30min bei Raumtemperatur mit einer Endkonzentration von 0,2%

SDS vorinkubiert. Hierzu wurden neun Teile Probe mit einem Teil SDS (2%) vermischt. Anschließend wurde die CA-Aktivität in dem Gemisch wie oben beschrieben gemessen. Im Falle der apikalen und basolateralen Membranvesikel wurden dem Ansatz stets 15µl Triton X-100 (1%) hinzugefügt, um die Vesikel aufzubrechen.

Berechnung der Carboanhydrase-Aktivität: Eine Probe hat die Aktivität 1, wenn die unkatalysierte Reaktionszeit auf die Hälfte verkürzt wird:

$$\text{Aktivität (A)} = \frac{t \text{ (unkatalysiert)}}{t \text{ (katalysiert)}} - 1$$

Daraus berechnet sich die spezifische Aktivität der eingesetzten Probe in der Einheit [U*ml/mg] wie folgt:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{A \cdot \text{Volumen des Meßansatzes}}{\text{Pr obenvolumen} \cdot \text{Pr oteinkonzentration der Pr obe}}$$

4.5.1.1. Bestimmung des K_i-Wertes verschiedener Hemmstoffe für die CA

Der K_i-Wert gibt die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplexes an. Er wurde in dieser Arbeit für die CA über einen Plot von EASSON & STEDMAN (1936) bestimmt. Hierzu wurde im CA-Assay ein Probenvolumen eingesetzt, welches eine Ausgangsaktivität von 2 hatte. Anschließend wurden Messungen mit aufsteigender Hemmstoffkonzentration im Assay durchgeführt. Aus den gemessenen Aktivitäten wurde dann für die jeweilige Hemmstoffkonzentration die fraktionelle Hemmung (*i*) wie folgt bestimmt:

$$i = 1 - \frac{\text{Aktivität mit Hemmstoff}}{\text{Ausgangsaktivität ohne Hemmstoff}}$$

Anschließend wurde ein Plot angefertigt, bei dem auf der x-Achse 1/(1-fraktionelle Hemmung), auf der y-Achse der Quotient aus der Hemmstoffkonzentration und der fraktionellen Hemmung aufgetragen wurde. Für diesen Plot gilt die Geradengleichung

$$\frac{\text{Hemmstoffkonzentration}}{i} = K_i * \frac{1}{1-i} + E_{tot}$$

Der K_i -Wert konnte somit aus der Steigung der Geraden im Plot bestimmt werden.

4.5.2. Bestimmung der LDH-Aktivität

Die Aktivität der LDH wurde nach der Methode von BERNSTEIN & EVERSE (1979) bestimmt. Dieser Methode liegt der sogenannte optische Test zugrunde, bei dem die Umwandlung von NAD zu NADH oder umgekehrt bei 340nm photometrisch verfolgt wird. Die LDH setzt Pyruvat zu Lactat um, wobei aus NADH NAD entsteht.

Es wurden zunächst 1ml Substratlösung (34mM K_2HPO_4 , 4,89mM KH_2PO_4 , 0,71mM Na-Pyruvat, pH 7,6) und 16,7 μ l NADH-Lösung (10mg NADH in 1,5ml 1%iger $NaHCO_3$) in eine Küvette pipettiert und im Wasserbad bei 30°C vorgewärmt. Die Küvette wurde anschließend ins ebenfalls auf 30°C temperierte Photometer überführt, und die Extinktion bei 340nm wurde solange verfolgt, bis sich ein konstanter Wert eingestellt hatte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 33,3 μ l Probe gestartet, die so vorverdünnt war, daß die Steigung der anschließend beobachteten Extinktionsabnahme linear und gut zu ermitteln war. Die Extinktionsabnahme wurde über 5min in einem Hitachi Photometer gemessen und mit einem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet. Anschließend wurde die Extinktionsänderung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) per Computer ermittelt und die Aktivität der LDH mit den Werten für $\Delta E/\text{min}$ aus dem linearen Teil der Kurve berechnet werden. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungen mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes, wobei der molare Extinktionskoeffizient für NADH mit 6,3 $\text{ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ angenommen wurde. Die spezifische Aktivität [U/g] erhielt man, indem man die berechnete Aktivität durch die Proteinkonzentration der Probe [g/ml] dividierte.

4.5.3. Bestimmung der Ouabain-hemmbareren Na⁺-/K⁺-ATPase

Die Aktivität der Ouabain-hemmbareren Na⁺-/K⁺-ATPase wurde nach der Methode von DEL CASTILLO & ROBINSON (1982) bestimmt. Die Ouabain-hemmbarere Na⁺-/K⁺-ATPase hydrolysiert ATP in Gegenwart von Na⁺-, K⁺-, und Mg⁺⁺-Ionen zu ADP und anorganischem Phosphat (P_i) und läßt sich durch Ouabain (g-Strophanthin) hemmen. Die spezifische Enzymaktivität wurde daher aus der Differenz von Parallelansätzen mit und ohne Ouabain ermittelt. Die Reaktionen in den einzelnen Ansätzen wurden durch die Zugabe von ATP gestartet und nach einer Reaktionszeit von 15min durch Zugabe von TCA gestoppt. Nach siebenminütiger Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge erfolgte die Phosphatbestimmung nach OTTOLENGHI (1975) in den Überständen der Reaktionsansätze. Aus der Menge des gebildeten Phosphates konnte dann die ATPase-Aktivität berechnet werden.

Präinkubationsansatz: Vor der eigentlichen Bestimmung der ATPase Aktivität wurde die Probe mit DOC präinkubiert, um die Membranvesikel für Ionen, ATP und Ouabain zugänglich zu machen. Es wurden 650µl Präinkubationsmedium (0,092% DOC, 1,54mM EDTA) und 350µl Probe bzw. Aqua bidest. in ein Eppendorffgefäß pipettiert. Das Probenvolumen wurde so gewählt, daß der Reaktionsansatz etwa 600µg Protein enthielt. Der Kontrollansatz zur Ermittlung der Eigenextinktion der Reagenzien enthielt neben dem Präinkubationsmedium lediglich 350µl Aqua bidest. Die Präinkubation erfolgte für 30min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln.

Meßansatz: Die Enzymaktivität der präinkubierten Probe wurde in Doppelansätzen einmal mit und einmal ohne Ouabain in einem Endvolumen von 1ml bestimmt. Für den Testansatz ohne Ouabain wurden 750µl Assaymedium (66,66mM Tris/HCl, 6,66mM MgCl₂, 133,33mM NaCl, 26,66mM KCl, pH 7,0) sowie 50µl des Präinkubationsansatzes und 50µl Aqua bidest. vorgelegt. Der Parallelansatz mit Ouabain enthielt statt Aqua bidest. 50µl Ouabain (20mM). Der Ansatz wurde 5min auf dem Heizblock bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl Na₂-ATP (20mM) gestartet und die Reaktion nach 15min durch Zugabe von 100µl TCA (50% w/w) gestoppt. Es erfolgte eine siebenminütige Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge bei 14000Upm.

Phosphatbestimmung: Es wurden in Doppelansätzen je 250µl Überstand des Meßansatzes zu 250µl Aqua bidest. in ein Reagenzglas auf Eis pipettiert. Anschließend wurde 1ml einer eisgekühlten Lösung aus 20 Teilen 3%iger (w/v) Ascorbinsäure in 0,5N HCl und einem Teil einer 10%igen (w/v) Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde mindestens 6min auf Eis inkubiert, bevor ihm 1,5ml einer Lösung mit 2% (w/v) Natriumarsenit, 2% (w/v) tri-Natriumcitrat-dihydrat und 2%(v/v) Eisessig hinzugefügt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10min bei 37°C wurde die Extinktion des Ansatzes bei 850nm in einem Pye Unicam Photometer (Typ Sp 8-100) gemessen.

Die Aktivität der ATPase wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungen mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet, wobei der molare Extinktionskoeffizient für P_i mit 22500 l/mol*cm angenommen wurde. Die spezifische Aktivität [mmol P_i/mg*min] erhielt man, indem man die Aktivität durch die Proteinkonzentration der Probe dividierte.

4.6. Elektrophoretische Methoden

4.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden in zwei verschiedenen Vertikalelektrophoresekammern unterschiedlicher Größe durchgeführt. Verwendet wurde ein Minigel zur vertikalen SDS-Gelelektrophorese (Fa. Biometra, Göttingen) mit einer Gelgröße von 8,5cm x 9,5cm und einer Gelstärke von 0,6mm sowie eine Vertikalelektrophoresekammer (Fa. Life Science, Karlsruhe) mit einer Gelgröße von 14cm x 15cm und einer Gelstärke von 0,5mm.

Verwendete Lösungen:

Acrylamid/Bisacrylamid: (29,2% / 0,8%) und (29,6% / 0,4%)

Gelpuffer A: 0,5M Tris, 0,4% SDS, 1,5mM NaN₃, pH 6,8

Gelpuffer B: 1,5M Tris, 0,4% SDS, 1,5mM NaN₃, pH 8,8

Laufpuffer: 0,25M Tris, 0,2M Glycin, 1% SDS, 0,15mM NaN₃, pH 8,5

Probenpuffer: 0,125M Tris, 50% Glycerin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau, pH 6,8

Gießen des Gels: Trenn- und Sammelgel wurden nach dem abgebildetem Schema zusammenpipettiert, wobei die Mengenangaben für die große Gelkammer mit 2,5 zu multiplizieren sind. Die Zugabe von TEMED und APS erfolgte erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels, welches mit Hilfe einer Pasteurpipette erfolgte. Nach dem Gießen wurde das Gel 30-45min zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen.

	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bisacrylamid (29,6% / 0,4%)	5ml	-
Acrylamid/Bisacrylamid (29,2% / 0,8%)	-	833µl
Gelpuffer A	-	1,25ml
Gelpuffer B	3,75ml	-
Glycerin	1375µl	-
Orange G (0,3%)	-	100µl
Aqua bidest.	-	2,81ml
TEMED (10%)	6,7µl	5µl
APS (10%)	40µl	30µl

Aufarbeitung und Auftrag der Proben: Die Proben wurden zunächst vorverdünnt, so daß sie eine Proteinkonzentration von 1,4-1,6mg/ml hatten. Bei Proben mit geringeren Ausgangskonzentrationen an Protein wurde auf eine Vorverdünnung verzichtet. Anschließend wurden die Proben zu gleichen Teilen mit Probenpuffer gemischt und 3min bei 95°C in einem Thermostat (Typ 3401, Fa. Eppendorf) denaturiert. Die denaturierten Proben wurden mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt.

Die aufgetragenen Mengen variierten je nach Experiment. Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen einer Probe wurden 10µl der vorverdünnten Probe für das kleine und 30µl der vorverdünnten Probe für das große Gel verwendet. Wurde das Gel für eine Western-Blot-Analyse weiterverwendet, so richteten sich die Vorverdünnung und das aufgetragene Probenvolumen nach den CA-Mengen der Proben. Diese wurden so gewählt, daß die aufgetragene CA-Menge der zu analysierenden Probe und der entsprechenden Positivkontrolle gleich groß waren.

Bei allen Experimenten wurde mindestens eine Geltasche mit Proteinmarkern (10kDa Protein Ladder, Fa. Life Technologies, Eggenstein) gefüllt, um die Molekulargewichte der einzelnen Banden bestimmen zu können. Bei den Proteinmarkern handelte es sich um ein Gemisch aus Proteinen, die Molekulargewichte von 10kDa - 120kDa im Abstand von 10kDa sowie ein

Protein mit einem Molekulargewicht von 200kDa haben. Es wurden 10µl der 1:10 mit Probenpuffer verdünnten und denaturierten Marker auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur im 1:8 verdünnten Laufpuffer bei 10mA (2197 Power Supply, Fa. LKB, Stockholm-Bromma, Schweden). Gestoppt wurde der Lauf, wenn die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel herausgelaufen war. Die Dauer lag für die kleine Kammer bei 1,5-2h und für die große Kammer bei 3-4h.

Es schloß sich entweder eine Silberfärbung der Proteinbanden im Gel oder die Prozedur des Immunoblottings an.

4.6.2. Immunoblotting

Nach der Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel wurden diese zunächst elektrophoretisch mit einem sogenannten "Semi-Dry-Blotting"-Verfahren vom Gel auf Nitrocellulosefolien übertragen und anschließend mit verschiedenen Antikörpern detektiert.

Proteintransfer: Als Elektroden dienten zwei Graphitplatten für eine horizontale Elektrophoresekammer (LKB Multiphor II, Pharmacia, Schweden). Diese wurden vor dem Proteintransfer mit Aqua bidest. gründlich gespült und getränkt. Auf die untere Graphitplatte (Anode) wurden zunächst drei Lagen Filterpapier (Fa. Biometra, Göttingen) in Gelgröße gelegt, die in Anodenlösung I (0,3M Tris) getränkt waren. Es folgten zwei Lagen Filterpapier sowie zwei Nitrocellulosefolien (porablot NCL, Fa. Macherey-Nagel, Düren), die in Anodenlösung II (25mM Tris) getränkt waren. Das Gel wurde 5min in Anodenlösung II inkubiert, bevor es luftblasenfrei auf den Blot gelegt wurde. Abschließend folgten fünf Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung (40mM 6-Amino-n-Caprinsäure). Die zweite Graphitplatte (Kathode) wurde vorsichtig auf den Blot aufgelegt. Der Transfer erfolgte mit ca. 0,8mA/cm² für 1,5h.

Nach dem Transfer wurden zunächst die Filterpapierlagen über dem Gel sowie das Gel selbst entfernt. Die Richtung der beiden Nitrocellulosemembranen wurde durch Einkerbungen markiert und die obere Folie bei -80°C für die Antikörpermarkierung aufbewahrt. Die zweite Folie wurde für die Anfärbung der Proteine zur späteren Identifizierung der Molekulargewichte der mit Antikörpern markierten Banden verwendet.

Proteinfärbung mit Indian Ink: Die Proteinfärbung erfolgte nach der leicht modifizierten Methode von HANCOCK & TSANG (1983). Zur besseren Anhaftung der Proteine wurde die Folie zunächst 5min unter Schütteln in 0,2M NaOH inkubiert. Anschließend wurde sie 3x 15min unter Schütteln in PBS-Tween (0,15M NaCl, 18,55mM NaH₂PO₄, 83,89mM Na₂HPO₄, 0,025% Tween, pH 7,2) gewaschen. Die Inkubation mit der Indian-Ink-Färbelösung (PBS-Tween mit 1% Essigsäure und 0,1% Pelikan-Indian-Ink-Kalligraphietinte) erfolgte für 1-5h je nach Proteinmenge und daraus resultierender Färbeintensität. Anschließend wurde sie kurz mit Aqua bidest. gespült und zwischen zwei Papiertüchern getrocknet.

Antikörpermarkierung : Alle Schritte der Markierung erfolgten bei Raumtemperatur. Die Nitrocellulosefolie wurde aufgetaut und zunächst eine Stunde unter Schütteln mit PBS-Tween gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren, erfolgte eine einstündige Inkubation mit 25ml Blockpuffer (15g BSA/500ml PBS-Tween). Die Folie wurde 3x 10min unter Schütteln mit PBS-Tween gewaschen, bevor sie eine Stunde mit dem Primärantikörper bzw. dem entsprechenden Nullserum als Kontrolle inkubiert wurde. Nach einem erneuten Waschschrift (3x 10min in PBS-Tween unter Schütteln) wurde die Folie eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper waren mit Peroxidase gekoppelt und wurden entsprechend der Primärantikörper wie diese in Inkubationspuffer (15g BSA/500ml PBS) 1:500 oder 1:1000 verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Folie gewaschen (s. o) und anschließend mit 10-20ml Peroxidase-Substrat-Lösung (30ml 50mM Tris HCl, pH 7,4, 10ml DAB (100mg auf 60ml 50mM Tris-HCl pH 7,4), 13µl H₂O₂) entwickelt. Die Entwicklungszeit betrug je nach Reaktivität der Antikörper zehn Minuten bis fünf Stunden.

Für die Markierung mit Anti-human-CAIV von W. S. Sly (St. Louis) erfolgte die Detektion mittels ECL-Reagenz. Die Nitrocellulosefolie wurde 3x10min unter Schütteln in PBS-Tween gewaschen und anschließend unter leichtem Schwenken 2h in 50ml PBS-Tween mit 10% Non-Fat-Dry-Milk (Fa. Bio-Rad, München) blockiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (1:500 in PBS-Tween mit 3% Non-Fat-Dry-Milk). Vor und nach der Inkubation (1h) mit dem Sekundärantikörper (Anti-rabbit IgG-Peroxidase 1:1000 in PBS-Tween mit 3% Non-Fat-Dry-Milk) wurde 2x 5min und 3x 10min unter Schütteln mit PBS-Tween gewaschen. Die Folien wurden 1min in einem frisch angesetzten Gemisch aus gleichen Teilen ECL Reagenz 1 und 2 (RPN 2106 Detection

Reagent, Amersham, Braunschweig) inkubiert. Das Reagenz wurde gründlich abgetropft und die Folien luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingewickelt. Anschließend wurde sie in eine Filmkassette (Hypercassette™, Amersham Life Science, Braunschweig) überführt. Die Belichtungszeit variierte je nach Intensität der Reaktion. Es wurde ein Kodak Scientific Imaging Film (XAR 5) verwendet. Die Filmentwicklung erfolgte automatisch in einem Optimax (Fa. Protec).

4.6.3. Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung handelt es sich um eine Elektrophorese im pH-Gradienten, bei der Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (IP) getrennt werden. Die Methode eignet sich daher zur Trennung von Proteinen mit identischem Molekulargewicht aber unterschiedlichem IP. Dabei verwendet man unter anderem Polyacrylamidgele als Matrix, die eine spezielle Mischung an Ampholyten enthalten. Durch Anlegen einer Spannung an derartige Gele wandern die Ampholyte in der Matrix, entmischen sich und bilden einen pH-Gradienten aus. Man spricht von einer Vorfokussierung. Die anschließend aufgetragenen Proteine wandern in dem Gradienten bis zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht.

Verwendete Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid: (29,2% / 0,8%)

Anodenpuffer: 25mM Aspartat, 25mM Glutamat

Kathodenpuffer: 2m EDTA, 25mM Arginin, 25mM Lysin

Herstellung des Gels: Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte mit dem Multiphor II-Electrophoresis-System von Pharmacia (Uppsala, Schweden) und dem entsprechenden Zubehör. Für das Gel wurden zunächst folgende Substanzen in ein vakuumfestes Glasgefäß zusammenpipettiert: 3ml Acrylamid/Bisacrylamid, 0,2ml Ampholine® pH 3,5-9,5, 0,9ml Ampholine® pH 5-8, 13,9ml Aqua bidest. und 18µl TEMED (10%). Anschließend wurde das Gel mit einer Wasserstrahlpumpe mehrere Minuten entlüftet, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und da vorhandenes CO₂ ansonsten im Gel zu pH-Veränderungen im Gradienten

führt. Nach rascher Zugabe von 100µl APS (10%) wurde das Gel zügig mit einer Spritze zwischen zwei Glasplatten gegossen. Auf einer Glasplatte war zuvor eine Trägerfolie (Gel Bond® PAGfilm) aufgebracht worden, auf der das Gel dann aufpolymerisierte. Die Dicke des Gels betrug 2mm. Das Polymerisieren erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Das Gel wurde nach dem Auspolymerisieren mit der Trägerfolie zuunterst luftblasenfrei auf die mit 2ml Petroleum benetzte temperierte Kühlplatte (12°C) aufgelegt. Je zwei Papierstreifen (IEF electrode strips) wurden übereinander gelegt und mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Die Pufferstreifen wurden den Elektroden entsprechend ca. 0,5cm vom Gelrand entfernt dem Gel aufgelegt. Die Vorfokussierung des Gels erfolgte 30min lang bei einer angelegten Spannung von 500V.

Auftragen und Fokussierung der Proben: Nach der Vorfokussierung des Gels wurden kleine Filterpapierstücke (IEF Sample Appl. Pieces) mit einem Abstand von 0,5cm voneinander ca. 1cm von der Kathode entfernt auf das Gel aufgelegt. Diese Probenaufgabestücke wurden mit 20µl der entsprechend vorverdünnten nativen Proben getränkt. Die Vorverdünnungen variierten je nach Probe und wurden so gewählt, daß die einzelnen Banden bei der Silberfärbung gut sichtbar erschienen. Bei einer der aufgetragenen Proben handelte es sich stets um Erythrozytenlysat (2,5mg/ml). Die Fokussierung der Hämoglobinbanden an charakteristischer Stelle zeigte das Ende der Fokussierung an.

Auch die Fokussierung erfolgte bei einer Temperatur von 12°C. Es wurde zunächst eine Spannung von 500V angelegt. Die Probenaufgabestücke wurden entfernt, sobald anhand des Erythrozytenlysates erkennbar war, daß die Proben aus diesen herausgewandert waren (ca. 30min). Nach einer Stunde wurde die Spannung stufenweise in Schritten von 300V auf maximal 1800V erhöht. Die Fokussierung dauerte ca. 3h. Die Proteinbanden im Gel wurden anschließend mit der im Folgenden beschriebenen Silberfärbung angefärbt.

4.6.4. Silberfärbung

Die Silberfärbung der Proteinbanden nach der SDS-PAGE und der IEF erfolgte nach der Methode von HEUKESHOVEN & DERNICK (1985). Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXA, Fa. Jürgens). Das Gel wurde zunächst eine Stunde in

Fixierlösung (20% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die anschließende Inkubation in der Inkubationslösung (30% (v/v) Ethanol, 0,23M Natriumacetat, 8mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 25% (w/v) Glutardialdehyd) erfolgte über Nacht oder mindestens für 1h. Vor der Inkubation des Gels in der Färbelösung wurde es 4x 20min mit Aqua bidest. gewaschen. Die Färbung erfolgte eine Stunde mit einer Silbernitratlösung (0,1% (w/v) AgNO_3 , 0,5% (v/v) Formaldehyd). Die Entwicklung der gefärbten Proteinbanden mit Entwicklungslösung (0,24M Na_2CO_3 , 0,25% (v/v) Formaldehyd) dauerte je nach Intensität der Banden 5-15min. Das Abstoppen der Entwicklungsreaktion erfolgte mit 0,05M Glycin für eine Stunde. Anschließend wurde das Gel für eine Stunde in 10%iger Glycerinlösung aufbewahrt. Im Falle der SDS-PAGES erfolgte dieser Schritt zusammen mit zwei Folien (Gel Drying Film, Fa. Promega, Mannheim), im Falle der IEF mit einer Folie (Cellophane Sheet, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Gele der SDS-PAGES wurden zum Trocknen zwischen den beiden Folien luftblasenfrei aufgespannt und 12h aufgestellt. Im Falle der IEF wurde die Folie luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und dieses in der Horizontalen ebenfalls 12h luftgetrocknet.

4.7. Histologie und Immunhistochemie

4.7.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Der Darm wurde nach der Entnahme gründlich gespült. Anschließend wurde er im Falle des proximalen und distalen Colons entweder als geschlossenes Rohr in 1-2cm lange Stücke unterteilt oder aber zuvor entlang der Taenien der Länge nach aufgeschnitten. Im Falle des Caecums erfolgte stets eine Zerteilung in 1-2cm² große Stücke. Die Gewebestücke wurden in flüssigem Propan eingefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Das gefrorene Gewebe wurde im -25°C kalten Schneiderraum eines Gefriermikrotoms (Frigocut 2700, Fa. Reichert-Jung, Nußloch) mit Hilfe eines Auffriermittels (Fa. Reichert-Jung, Nußloch) auf dem Schneideblock befestigt. Im Falle der zylindrischen Form des Darms wurde das Lumen ebenfalls mit dem Auffriermittel ausgefüllt. Es wurden 7-10µm dicke Schnitte quer zur Längsrichtung des Darms angefertigt, die auf mit Gelatine oder Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen wurden. Die Qualität der Präparate wurde lichtmikroskopisch überprüft (Orthoplan Universelles Großfeldmikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar). Anschließend

wurden die Schnitte 2h bei Raumtemperatur luftgetrocknet, bevor sie 1min in Aceton (-20°C) fixiert wurden. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung für immunhistochemische Untersuchungen in Alufolie gewickelt und bei -20°C aufbewahrt.

Vor der weiteren Verwendung für immunhistochemische Untersuchungen oder zur Anfärbung wurden die Schnitte zunächst 2h bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 10min in Aceton (-20°C) nachfixiert und luftgetrocknet.

4.7.2. Anfertigung von Paraffinschnitten

Der Darm wurde - wie schon für die Anfertigung der Gefrierschnitte beschrieben - gespült und in Stücke unterteilt. Um ein ausreichendes Eindringen der Fixierlösung zu gewährleisten, wurde auf die Verwendung des Darms als geschlossenes Rohr verzichtet. Das Gewebe wurde zunächst für 6h in Bouinscher Fixierlösung (15 Teile gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile Formalin, 1 Teil Eisessig) fixiert. Die Entwässerung des Gewebes über eine aufsteigende Alkoholreihe wurde wie folgt durchgeführt: 35% Ethanol (12h), 50% Ethanol (6h), 70% Ethanol (6h), 80% Ethanol (12h), 90% Ethanol (6h), 96% Ethanol (6h), 100% Ethanol (12h). Zur Entfernung des Alkohols und zur Durchtränkung der Präparate mit Paraffin wurde das Gewebe wie folgt in verschiedenen Intermedien inkubiert: 8h in einem Gemisch aus 8 Teilen Dekalin (Decahydronaphthalin, cis-trans-Isomergemisch) und 2 Teilen Methylbenzoat, 8h in Dekalin, 8h bei 60°C in einem Gemisch bestehend aus gleichen Teilen Dekalin und Paraffin und schließlich 8h bei 60°C in Paraffin. Anschließend wurden die Präparate in Paraffinblöcken von ca. 3x3cm ausgegossen.

Nach dem Erstarren der Paraffinblöcke wurden 7-10µm dicke Schnitte quer zur Längsrichtung des Darms mit dem Gefriermikrotom angefertigt. Hierzu wurden die Blöcke auf Träger aufgeschmolzen (Histoblock-Trägereile, Fa. Kutzler), die anschließend mit dem Auffriermittel auf den Schneideblock aufgefroren wurden. Die Schneidetemperatur betrug 4°C. Die Schnitte wurden auf die Oberfläche eines Wasserbades (35°C) überführt, so daß sie sich ausstrecken konnten. Anschließend wurden sie auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen und für 30min bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Qualitätskontrolle erfolgte wie für die Gefrierschnitte mit einem Lichtmikroskop.

Unmittelbar vor der weiteren Verwendung für immunhistochemische Untersuchungen oder zur Anfärbung mußten die Schnitte entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie wie folgt inkubiert: 4min in Xylol, 4min in 100% Ethanol, 1,5min in 96% Ethanol, 1,5min in 80% Ethanol, 1,5min in 60% Ethanol und 1,5min in PBS (136mM NaCl, 2,68mM KCl, 7,61mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄).

4.7.3. Mucinfärbung mit PAS und Alcianblau

Zur Darstellung der Mucusschicht auf den Gefrier- und Paraffinschnitten wurde eine Doppelfärbung mit PAS und Alcianblau pH 2,5 nach SZENTKUTI ET AL. (1990) durchgeführt. Bei dieser Doppelfärbung erscheinen saure Mucine blau, neutrale Mucine rosa und ein Gemisch aus beiden violett. Die Objektträger mit den Schnitten wurden zunächst 3x mit Aqua bidest. gespült und anschließend 30min mit Alcianblau (1% Alcianblau in 3% Essigsäure, pH 2,5) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua bidest. wurden die Schnitte 15min in 1%iger Perjodsäure inkubiert, erneut 1x mit Aqua bidest. gespült, 15min mit Schiffs Reagenz für Histologie (Merck, Darmsadt) inkubiert und abschließend 2x mit Aqua bidest. gespült. Vor dem Eindeckeln mit DePex® wurden die Schnitte je 2min wie folgt inkubiert: 50% Ethanol, 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, Ethanol/Xylol (1:1) und abschließend 4min in Xylol.

4.7.4. Indirekte Immunfluoreszenz an Gefrier- und Paraffinschnitten

Die Objektträger mit den Gefrier- oder Paraffinschnitten wurden zunächst 30min in PBS mit BSA (0,5g/l) inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte für 30min mit dem Primärantikörper. Der Primärantikörper wurde durch 30minütiges Spülen mit PBS/BSA entfernt. Danach wurden die Schnitte 30min mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der mit FITC gekoppelt war. Der Sekundärantikörper wurde durch 30minütiges Spülen in PBS/BSA entfernt und die Schnitte in PBS eingedeckelt. Die Verdünnung der Primärantikörper variierte je nach verwendetem Antikörper (1:5; 1:500; 1:750; 1:1000). Für die Negativkontrolle wurden

als Primärantikörper Kontrollseren der jeweiligen Spezies in der entsprechenden Verdünnung verwendet. Die Verdünnung der Sekundärantikörper betrug 1:30 für Anti-chick IgG-FITC und 1:80 für Anti-rabbit IgG-FITC.

Die Analyse der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops (s. o.), welches für die Erfassung der Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Auflichtilluminator (Ploemopak® 2.1.; Fa. Leitz) mit einer Quecksilber-Hochdrucklampe sowie entsprechenden Filtern versehen war.

Für die Fotografien wurde ein Photoautomat (Wild MPS 55/51, Fa. Wild; Heerbrugg, Schweiz) eingesetzt. Bei den verwendeten Filmen handelte es sich entweder um einen Ilford HP5 oder einen Kodak Ektachrom 400. Die Belichtungszeit der markierten Schnitte erfolgte automatisch. Für die Negativkontrollen wurde die entsprechende Belichtungszeit manuell entsprechend der Belichtungszeit der markierten Schnitte gewählt.

4.7.5. Vorbehandlung mit Phospholipase C

Um spezifisch die CAIV aus den Membranen des Gewebes in den Gefrierschnitten zu entfernen, wurden die Gefrierschnitte vor der Immunfluoreszenzmarkierung mit Phospholipase C (Fa. Sigma, Deisenhofen) behandelt. Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden aufgetaut und fixiert wie unter 4.7.1. beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte 2h entweder bei Raumtemperatur oder bei 37°C mit Phospholipase C inkubiert. Verwendet wurden 100mUnits pro Einzelschnitt in 20µl 10mM Tris/HCl, pH 7,4. Es schloß sich eine Immunfluoreszenzmarkierung (wie unter 4.7.4 beschrieben) an, wobei die Schnitte vor der Inkubation mit PBS/BSA zunächst 30min mit PBS gespült wurden.

4.8. Sequenzanalyse von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die mittels Affinitätschromatographie isolierte CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschnechens wurde von Dr. M. Raida und Dr. H. John (IPF Pharma Centicals GmbH) mit Hilfe eines speziellen massenspektrometrischen Verfahrens in Teilen sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit bekannten Daten in verschiedenen Datenbanken verglichen.

Gewinnung der Bruchstücke für die Massenspektrometrie: Die CA-Fraktion der Affinitätschromatographie wurde zunächst mit Trypsin behandelt, um das Protein kontrolliert in kleinere Fragmente zu spalten. Hierzu wurden 150µl der Fraktion mit 40µl Trypsinlösung (25µg Trypsin (Fa. Serva, EC 3.4.21.4) auf 500µl 100mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,2) versetzt und 24h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei -20°C zwischengelagert, bevor sie mittels HPLC in die Einzelfragmente aufgeteilt wurde, die dann im Massenspektrometer analysiert wurden.

HPLC und massenspektrometrische Sequenzanalyse: Die Auftrennung der Trypsinfragmente mittels HPLC und die anschließende Analyse im Massenspektrometer erfolgte wie von SCHRADER (1998) beschrieben. Bei der HPLC handelt es sich um ein Verfahren, das im IPF als Standardmethode angewendet wird und aus diesem Grunde hier nicht näher erläutert wird. Die massenspektrometrische Sequenzanalyse stellt ein spezielles, technisches Verfahren dar, welches an dieser Stelle kurz in seinen Grundzügen erläutert werden soll.

Das angewendete Meßverfahren wird als "Tandem-Massenspektrometrie" (MS/MS) bezeichnet, bei dem die zu analysierende Probe mittels ESI (=Elektrospray-Ionisation) ionisiert wird und die anschließende Analyse unter Verwendung zweier aufeinanderfolgender Oktapole zur Fokussierung und einer Ionenfalle zur Massenanalyse erfolgt.

Bei der ESI erfolgt die Bildung freier Ionen aus einer in Lösung befindlichen Probe mittels Versprühen dieser Probe im elektrischen Feld. Die Probe wird hierzu durch eine "Fused Silica-Kapillare" versprüht, die in einer Metallkapillare verläuft. Zwischen der Metallkapillare und einer etwa 1-3cm entfernten Gegenelektrode wird eine Spannung angelegt. Es wird im "Positiv-Ionen-Modus" gemessen, d. h. die Metallkapillare stellt die Anode und die "Interface-Plate" die Kathode dar. Das so entstehende elektrische Feld führt zu einer Anhäufung positiver Ladungsträger an der Oberfläche der austretenden Analytlösung an der Kapillarspitze. Ist die angelegte Spannung hoch genug, können durch die ansteigende Ladungsdichte die Coulombkräfte größer als die Oberflächenspannung werden, so daß es zu einer Zerstäubung der Analytlösung kommt. Unterstützt wird der Prozeß dieser Spraybildung zum einen durch die anziehende Wirkung der "Interface-Plate" und zum anderen durch einen Stickstoffstrom durch die Metallkapillare. Aus den geladenen Tröpfchen des Sprays verdampfen ständig

neutrale Lösungsmittelmoleküle, so daß die Ladungsdichte innerhalb der Tröpfchen stetig steigt. Übersteigen die Coulombkräfte die Oberflächenspannung, zerfallen die Tröpfchen in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion). Dieser Vorgang wiederholt sich, bis in den Tröpfchen jeweils nur noch einzelne desolvatisierte Analytionen vorliegen. Die vollständige Desolvatisierung der Ionen vor dem Eintreten in das Hochvakuum wird durch den temperierten Inertgasstrom (reines N₂-Gas) unterstützt.

Der so entstehende Ionenstrom gelangt bei dem verwendeten Gerät vom Typ LCQ Duo über die sogenannte "ion optics" zum Massenanalysator. Die "ion optics" bestehen aus zwei Oktapolen, die durch eine Linse (interoctapole lens) voneinander getrennt werden. Durch das Anlegen einer definierten Spannung an die Oktapole können sich nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) auf einer stabilen Flugbahn bewegen und so den Oktapol passieren. Alle übrigen Ionen treffen aufgrund ihrer instabilen Flugbahn auf die Oberfläche der Stabelektroden und werden neutralisiert. Die "ion optics" fungieren so als eine Art Filter, die nur bestimmte Vorläuferionen passieren lassen. Zusätzlich wird der Ionenstrom durch die Anordnung der Oktapole und die Linse fokussiert, bevor er in den Massenanalysator eintritt.

Für die Analyse der Ionen wurde eine Ionenfalle (ion trap) verwendet. In dieser Art von Analysator können Ionen mit bestimmtem m/z -Wert zunächst über einen gewissen Zeitraum im Inneren der Falle gehalten und anschließend nach ihren m/z -Werten getrennt emittiert und detektiert werden. Die Ionenfalle besteht aus einer ringförmigen Elektrode, die an beiden Seiten von perforierten Endkappenelektroden begrenzt wird. An der Ringelektrode ist ein Hochfrequenzfeld mit konstanter Frequenz und variabler Amplitude angelegt. Dieses Hochfrequenzfeld erzeugt im Zentrum der Falle ein elektrisches Feld, in dem sich Ionen mit einem passendem m/z -Wert auf stabilen Bahnen bewegen können. Sie führen im Zentrumsbereich der Falle axiale und radiale Schwingungen aus, ohne den Bereich zu verlassen. Die optimale Form des elektrischen Feldes zum Fangen der Ionen wird mit guter Näherung nur im Zentrum der Falle erreicht, in den Randbereichen weicht das Feld durch die endliche Größe der Elektroden immer stärker von der Idealform ab, so daß die Ionen in den Randbereichen nicht gefangen werden können, sondern aus der Falle entweichen. Durch die Amplitude des Ringelektroden-Feldes wird festgelegt, ab welchem m/z -Wert die Ionen im Zentrum der Falle gefangen werden. Ionen mit kleineren m/z -Werten führen zu große Schwingungen aus und fliegen dadurch aus der Falle. Zusätzlich können an den

Endkappenelektroden Hochfrequenzfelder angelegt werden. Sind die Frequenz und die Phase dieser Felder so gewählt, daß sie mit den axialen Schwingungen der Ionen in Resonanz sind, kann dadurch den Ionen kinetische Energie zugeführt werden. Die axialen Schwingungsamplituden der Ionen werden größer, und die Ionen verlassen die Falle. Durch Anlegen eines bestimmten Frequenzgemisches an diese Elektroden, in welchem alle Resonanzfrequenzen der zu eliminierenden Ionen enthalten sind, erfolgt eine zusätzliche Selektion der gefangenen Ionen. Zusätzlich wird das Einfangen der Ionen durch eine Heliumatmosphäre unterstützt. Diese sorgt dafür, daß die Ionen beim Eintreten durch Kollision verlangsamt und im Zentrum der Falle fokussiert werden. Bei größeren kinetischen Energien der Ionen führt sie des weiteren dazu, daß diese in kleinere Bruchstücke zerfallen. Verändert man die Amplitude des Ringelektrodenfeldes sowie die Frequenz der Endkappenelektroden, können gezielt Ionen mit bestimmten m/z -Werten aus der Falle entfernt und nacheinander detektiert werden.

Auswertung der Massenspektren: Das Prinzip der Sequenzierung eines Vorläuferions (parent-ion) anhand eines so entstehenden Spektrums der Tochterionen beruht darauf, daß bei der Spaltung durch niederenergetische Stoßaktivierung nur entlang der Peptidkette - und hier vorwiegend an der Peptidbindung selbst - gespalten wird. Die Seitenketten der Aminosäuren bleiben bestehen. Im Idealfall enthält das entstehende Spektrum eine kontinuierliche Serie von Fragmenten, bei der jedes Fragment um genau eine Aminosäure verkürzt ist, so daß aus dieser Serie die Sequenz anhand der Differenzen der m/z -Werte im Idealfall direkt abgelesen werden kann. Die so erhaltene Aminosäuresequenz kann anschließend für eine vergleichende Suche in verschiedenen Protein- und DNA-Datenbanken eingesetzt werden.

Die vergleichende Suche mit den abgelesenen kurzen Aminosäuresequenzen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mittels FASTA 3 in den Datenbanken „swall“ und „SwissProt“, die im Internet verfügbar sind.

Daneben wurden für die Auswertung der Spektren Computerprogramme herangezogen, die direkt mit den Daten der Spektren arbeiten: Das Programm SEQUEST (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland) ermöglicht eine Suche unter direkter Verwendung der Rohspektren in den Datenbanken „SwissProt“ und „OWL“. Mit Hilfe der „Protein- und Peptid-Suchmaschine“ MS-Tag wurde eine vergleichende Suche anhand der Fragmentmassenmuster nach dem Ausgangsprotein in der Datenbank „SwissProt“ durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. Biochemische Charakterisierung der Mucus-CA verschiedener Spezies

5.1.1. CA-Aktivitäten im Mucus des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies

Spezifische CA-Aktivität im Mucus: Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die spezifischen CA-Aktivitäten im Speichel und im Mucus des Magens und des Dickdarms von Maus, Ratte, Meerschweinchen und Mensch. Wie die Tabelle zeigt, kann in all diesen Flüssigkeiten des Gastrointestinaltraktes dieser Spezies eine nennenswerte CA-Aktivität gemessen werden.

Tabelle 1: Spezifische CA-Aktivitäten [U*ml/mg] im Mucus des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies

	Maus	Ratte	Meerschweinchen	Mensch
Speichel	63 ± 25 (n=5)	112 (n=1)	-	1,2 (n=1)
Mucus Magenmucosa	-	-	-	2,3 ± 1,6 (n=6)
Mucus Caecum	30 ± 12 (n=7)	67 ± 7 (n=3)	47 ± 31 (n=18)	-
Mucus proximales Colon	20 ± 9 (n=6)	52 ± 5 (n=3)	185 ± 123 (n=18)	6,7 (n=2)
Mucus distales Colon	10 ± 9 (n=7)	42 ± 21 (n=3)	77 ± 68 (n=17)	

Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

Die Proben von den Mäusen wurden wie unter 4.1.2., das humane Probenmaterial wie unter 4.1.3. beschrieben gewonnen. Die Gewinnung der Proben von Meerschweinchen und Ratten erfolgte analog zu denen der Mäuse.

Korrelation von LDH- und CA-Aktivität im Mucus: Um eine mögliche Kontamination der Mucusproben mit den im Cytosol der Dickdarmepithelzellen vorhandenen Isoenzyme CAI und CAII auszuschließen, wurde in einzelnen Proben neben der CA-Aktivität die LDH-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse der Messungen in Mucusproben aus dem Darm vom Meerschweinchen sind in **Tabelle 2** dargestellt. Sie zeigen, daß keine Korrelation zwischen den Aktivitäten der beiden Enzyme im Mucus besteht. Es ist weder ein gleichzeitiger Anstieg oder Abfall der Aktivitäten, noch eine entgegengesetzte Ab- und Zunahme zu beobachten. Im Mucus vom distalen Colon beispielsweise sind die LDH-Aktivitäten der beiden untersuchten Tiere mit 2979 U/g und 2636 U/g in etwa gleich groß, während die CA-Aktivität von Tier 2 mit 180 U*ml/mg gut doppelt so groß ist wie bei Tier 1 mit 85 U*ml/mg.

Tabelle 2: Korrelation von CA- und LDH-Aktivitäten im Mucus aus dem Meerschweinchendarm

Darmabschnitt	Tier	spezifische LDH-Aktivität [U/g]	spezifische CA-Aktivität [U*ml/mg]
Mucus Caecum	1	477	50,5
	2	421	89,9
Mucus proximales Colon	1	725	87,2
	2	1146	575,9
Mucus distales Colon	1	2979	85,5
	2	2636	180,5

CA im Mucus von keimfreien und normalen Ratten: Um auszuschließen, daß die gemessenen CA-Aktivitäten in den Mucusproben auf die Herkunft bakterieller CA von Bakterien im Darm zurückzuführen ist, wurden vergleichende Untersuchungen an normalen und keimfreien Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb 5.1** dargestellt. Im gepaarten t-Test zeigt sich, daß es keinen signifikanten Unterschied in den spezifischen CA-Aktivitäten im Mucus von Caecum und proximalem Colon der Tiere gibt. Im Caecum sind die Aktivitäten

Abb. 5.1: CA-Aktivität im Mucus normaler und keimfreier Ratten

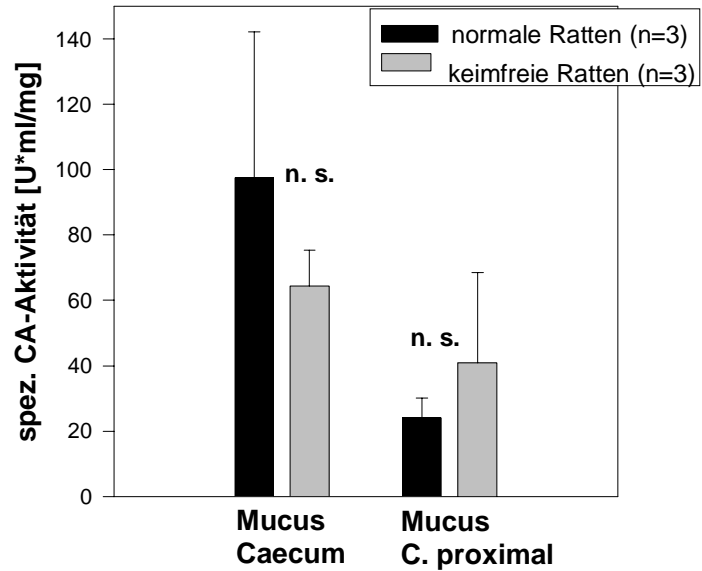
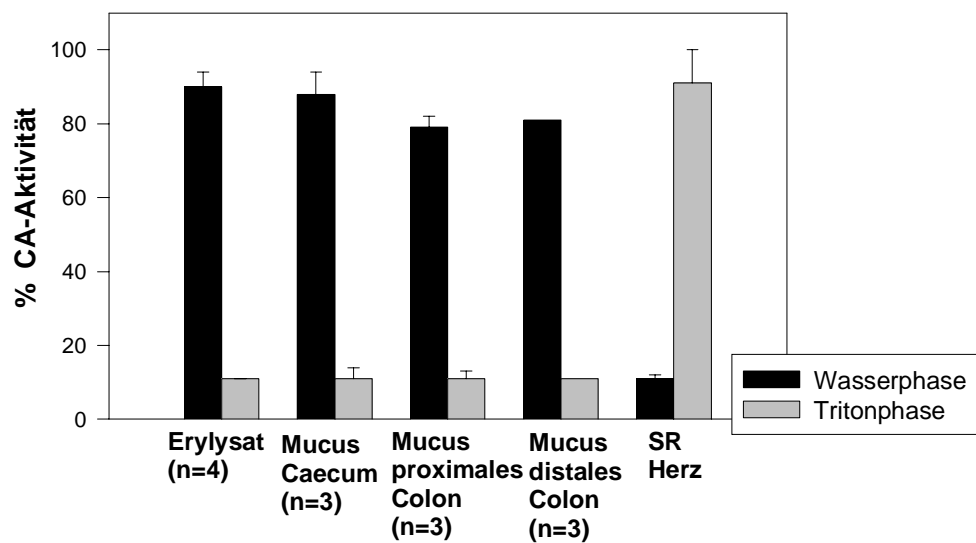


Abb. 5.2: Verteilung der Aktivität der Mucus-CA vom Meerschweinchen bei Phasenseparation mit Triton X-114



der keimfreien Tiere mit 67 U*ml/mg um den Faktor 1,4 kleiner als bei den normalen Tieren mit 97 U*ml/mg. Im proximalen Colon findet man den umgekehrten Fall. Hier sind die Aktivitäten der keimfreien Tiere um den Faktor 2,2 höher als bei den normalen Tieren. Im gepaarten t-Test ergibt sich jedoch in beiden Fällen keine Signifikanz.

5.1.2. Verteilung der Mucus-CA im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114

Es wurden Phasenseparationsexperimente mit Triton X-114 durchgeführt, um festzustellen, ob es sich bei der Mucus-CA um ein lösliches Isoenzym handelt, welches man in diesem Experiment in der Wasserphase finden würde, oder ob die Mucus-CA ein membrangebundenes Protein ist, welches sich in der Tritonphase ansammeln würde. **Abb. 5.2** zeigt die Ergebnisse dieser Experimente im Mucus vom Dickdarm des Meerschweinchens. Die CA-Aktivität im Mucus aller drei Darmabschnitte (Caecum, proximales Colon, distales Colon) geht zu über 80% in die Wasserphase. Nur ein kleiner Teil von etwa 10% der Aktivität verbleibt in der Tritonphase. Damit verhält sich die Mucus-CA ähnlich wie die lösliche CA im Rattenergolyt, die zu 90% in der Wasserphase verbleibt. Dagegen läßt sich für die membrangebundene CA in Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) vom Rinderherzen ein umgekehrtes Verhältnis zeigen. Hier verbleiben nur etwa 10% in der Wasserphase, während der überwiegende Teil der Aktivität in der Tritonphase wiederzufinden ist (Ergebnisse von BRUNS ET AL. 1992).

5.1.3. Empfindlichkeit der Mucus-CA für Acetazolamid und SDS

Hemmung der Mucus-CA mit Acetazolamid: Der Einfluß des spezifischen CA-Hemmstoffes Acetazolamid auf die Mucus-CA wurde untersucht, indem eine K_i -Wert-Bestimmung durchgeführt wurde. Die K_i -Werte für Acetazolamid im Mucus vom Meerschweinchen der drei Darmabschnitte liegen im Mittel bei $7,6 \cdot 10^{-9} \text{M}$. Für das distale Colon erhält man bei der Bestimmung in drei verschiedenen Proben einen Mittelwert \pm SD von $5,5 \cdot 10^{-9} \text{M} \pm 3,8 \cdot 10^{-9} \text{M}$. Die Dreifachbestimmung im Mucus vom Caecum ergibt einen Wert von $7,7 \cdot 10^{-9} \text{M} \pm 1,3 \cdot 10^{-9} \text{M}$. Die Korrelationskoeffizienten waren stets größer als 0,95. Im

Mucus vom proximalen Colon war die Streuung in den Plots größer und die Korrelationskoeffizienten dementsprechend niedriger ($r \cong 0,5$). Der ermittelte K_i -Wert für den Mucus vom proximalen Colon, der mit diesen Plots bestimmt wurde, liegt bei $9 \cdot 10^{-9} \text{M} \pm 5 \cdot 10^{-9} \text{M}$ (n=3).

Hemmung der Mucus-CA mit SDS: Unter den CA-Isoenzymen gibt es Formen, die sich durch eine Resistenz gegenüber SDS auszeichnen, während sich die Aktivität anderer durch SDS vollständig hemmen läßt. Um eine Identifizierung der Mucus-CA vornehmen zu können, wurde daher die Hemmung mit SDS untersucht. **Tabelle 3** zeigt die Ergebnisse der CA-Messungen nach Vorinkubation der Mucusproben von Meerschweinchen und Maus mit 0,2% SDS dargestellt. Für den Mucus aller drei Darmabschnitte ergibt sich eine nahezu 100%ige Hemmung der CA-Aktivität.

Tabelle 3: Prozentuale Hemmung der Mucus-CA von Meerschweinchen und Maus mit 0,2% SDS

	Meerschweinchen	Maus
Mucus Caecum	99 ± 2% (n=3)	85 ± 15% (n=3)
Mucus proximales Colon	95 ± 5% (n=3)	100 ± 0% (n=3)
Mucus distales Colon	98 ± 3% (n=3)	100 ± 0% (n=3)

Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

5.2. Charakterisierung der Mucus-CA mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII und anderen CA-Antikörpern

5.2.1. Charakterisierung der isolierten Enzymfraktionen aus Blut vom Meerschweinchen

5.2.1.1. Biochemische Charakterisierung

Für die Isolierung von CAI und CAII aus dem Erythrozytenlysat vom Meerschweinchen wurden insgesamt vier Aufreinigungsprozeduren durchgeführt. Von diesen wurden ausgewählte Fraktionen (s. u.) gepoolt und für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antiseren verwendet. Die biochemische Charakterisierung der isolierten Enzymfraktionen erfolgte durch die Bestimmung der CA-Aktivität und ihre Hemmbarkeit mit 7mM KJ, da sich die beiden Isoenzyme anhand dieser Kriterien gut unterscheiden lassen. CAI hat eine wesentlich niedrigere spezifische Aktivität als CAII. Sie läßt sich mit 7mM KJ vollständig hemmen, während CAII noch aktiv ist.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die biochemischen Eigenschaften der Enzymfraktionen und die Ausbeuten der Isolierung. Dabei stellen PIa und PIIa die Fraktionen dar, die man nach der Rechromatographie von PI aus dem ersten Säulenlauf erhält. PI Ib stellt den rechromatographierten PeakII des ersten Säulenlaufs dar (siehe auch **Abb. 4.3**).

Die *spezifischen CA-Aktivitäten* im Ausgangsmaterial der Ethanolphase der vier Chloroform-Ethanol-Extraktionen vom Meerschweinchen-Erythrozytenlysat liegen mit Werten von 69U*ml/mg bis 92U*ml/mg alle in derselben Größenordnung. Auch die Ausbeute der Extraktionen von etwa 23% ist bei allen vier Extraktionen annähernd gleich groß. Die spezifischen CA-Aktivitäten in den Ethanolphasen schwanken mit Werten von 1210U*ml/mg bis 2485U*ml/mg dagegen etwas stärker. Die prozentuale CA-Ausbeute der vier Säulenläufe differiert von 7,5% - 84%. Dabei ist festzustellen, daß die Ausbeute nicht mit der für den Säulenlauf eingesetzten CA-Menge korreliert.

Tabelle 4: Übersicht über die biochemischen Eigenschaften der isolierten Fraktionen aus dem Meerschweinchen-Erythrozytenlysat

Fraktion: Eigenschaft	Säulenlauf Nr. 1	Säulenlauf Nr. 2	Säulenlauf Nr. 3	Säulenlauf Nr. 4
Erythrozytenlysat: Volumen spezifische CA-Aktivität CA-Menge	54ml 79,19 U*ml/mg 354 078 U*ml	60ml 92,55 U*ml/mg 291 324 U*ml	67ml 69,18 U*ml/mg 448 875 U*ml	60ml 73,13 U*ml/mg 460 740 U*ml
Ethanolphase: Volumen spezifische CA-Aktivität CA-Menge Ausbeute	13ml 2017 U*ml/mg 83 070 U*ml 23%	11ml 1210 U*ml/mg 48 532 U*ml 17%	20ml 1365 U*ml/mg 115 840 U*ml 26%	21ml 2485 U*ml/mg 117 432 U*ml 25%
Säulenauftrag: Volumen spezifische CA-Aktivität CA-Menge	10ml 2017 U*ml/mg 63 898 U*ml	10ml 1210 U*ml/mg 44 105 U*ml	17ml 1365 U*ml/mg 98 461 U*ml	18ml 2485 U*ml/mg 100 638 U*ml
Säulenfraktionen: PIa: Volumen CA-Aktivität CA-Menge Hemmung mit KJ Ausbeute	5ml 471 Units 2355 U*ml 89% 3,6%	5ml 751 Units 3755 U*ml 65% 8,5%	5ml 1297 Units 6485 U*ml 90% 6,6%	5,5ml 751 Units 4131 U*ml 86% 4,1%
PIIa: Volumen CA-Aktivität CA-Menge Hemmung mit KJ Ausbeute	3ml 592 Units 1776 U*ml 46% 2,7%	3ml 11038 Units 33114 U*ml 28% 75%	3ml 10617 Units 31851 U*ml 32% 32%	4ml 359 Units 1436 U*ml 60% 1,4%
PIIb: Volumen CA-Aktivität CA-Menge Hemmung mit KJ Ausbeute	3ml 18,5 Units 55,5 U*ml 0,0% 0,09%	3ml 4,54 Units 13,6 U*ml 0,0% 0,03%	2ml 732 Units 1464 U*ml 51% 1,5%	3,5ml 8,58 Units 30 U*ml 61% 0,03%

Für die Charakterisierung der Säulenfraktionen wurden die eingegengten und dialysierten Fraktionen der Säulenläufe verwendet (siehe 4.1.4.)

Auf die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in den Säulenfraktionen verzichtet, um kein Material für die Immunisierung zu verlieren, so daß keine spezifischen Aktivitäten angegeben werden konnten.

Die **Hemmung mit 7mM KJ** liegt für PIa mit Ausnahme der Fraktion von Säulenlauf 2 bei ca. 90%, wie man es für CAI erwarten würde. PIa von Säulenlauf 2 zeigt eine etwas geringere Hemmbarkeit von nur 65%. Die Hemmung der CA-Aktivität von PIIa schwankt zwischen 28% und 60%, liegt aber deutlich unter der Hemmbarkeit von PIa, wie es für CAII zu erwarten wäre. Ähnliches gilt für PIIb, wobei die Schwankungen von ca. 55%iger Hemmung bis hin zu einer völlig fehlenden Hemmung reichen.

Tabelle 5: Biochemische Charakterisierung der gepoolten Fraktionen aus dem Meerschweinchenerylysat

Eigenschaft	PIa (Säulenläufe 1, 2, 3)	PIIa (Säulenläufe 1, 3, 4)	PIIb (Säulenläufe 1-4)
Volumen	11ml	10,5ml	7ml
Proteinkonzentration	0,145mg/ml	0,105mg/ml	0,0175mg/ml
spezifische CA-Aktivität	799 U*ml/mg	10029 U*ml/mg	897 U*ml/mg
CA-Menge	1275 U*ml	11057 U*ml	99 U*ml
Hemmung mit KJ	100%	13%	19%

Tabelle 5 zeigt die biochemischen Eigenschaften der gepoolten Enzymfraktionen aus dem Meerschweinchenerylysat. Um die einzusetzende Menge für die Immunisierung der Kaninchen und die spezifischen CA-Aktivitäten bestimmen zu können, wurde in den gepoolten Fraktionen auch die Proteinkonzentration bestimmt. Die spezifischen CA-Aktivitäten von PIa und PIIb liegen zwischen 800U*ml/mg und 900U*ml/mg. Die Aktivität von PIIa ist mit 10029 U*ml/mg um mehr als den Faktor 10 größer. Der extreme Aktivitätsunterschied von PIa und PIIa deutet darauf hin, daß diese Fraktionen wie erwartet CAI und CAII enthalten. Auch die 100%ige Hemmung mit 7mM KJ der Aktivität in PIa spricht dafür, daß dieser Peak CAI enthält, während PIIa, dessen Aktivität sich nur zu 13% hemmen läßt, vermutlich CAII enthält. Die Hemmung der Aktivität von PIIa um 16% spricht ebenfalls dafür, daß der Peak wie erwartet CAII enthält. Im Widerspruch hierzu steht allerdings die geringe spezifische Aktivität dieser Fraktion.

5.2.1.2. Elektrophoretische Charakterisierung

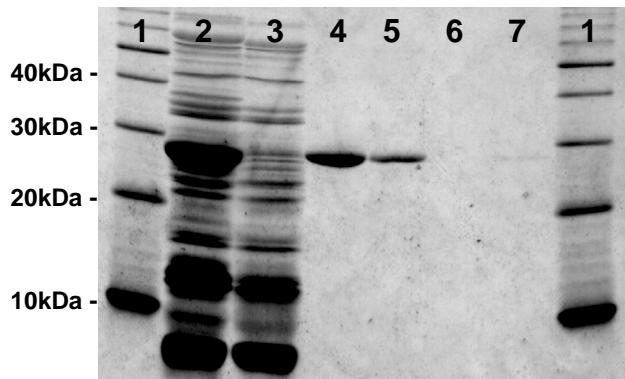
Die elektrophoretische Charakterisierung der aufgereinigten Enzymfraktionen aus dem Meerschweinchenerylysat erfolgte mittels SDS-PAGE sowie IEF anhand derer sich das Molekulargewicht sowie die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von CAI und CAII bestimmen lassen.

Die Ergebnisse der *SDS-PAGES* (siehe **Abb. 5.3 - 5.6**) zeigen, daß die isolierten Enzymfraktionen der vier Säulenläufe jeweils nur eine einzelne Bande bei ca. 29kDa aufweisen. PIIb der Säulenläufe 1 und 2 zeigen keine Bande. Vermutlich ist die Proteinkonzentration in diesen Fraktionen zu gering, so daß in der Silberfärbung keine Banden erkennbar sind. Für die Säulenläufe 1 und 2 findet man in der SDS-PAGE zusätzlich eine Fraktion, die mit PIb bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um die Fraktionen einer Unebenheit auf der Nulllinie der Chromatogramme der Säulenläufe b (Rechromatographie von PII der ersten Affinitätschromatographie, siehe auch unter 4.1.4.), die zu Kontrollzwecken bei den ersten beiden Säulenläufen biochemisch und elektrophoretisch untersucht wurden. Da weder in der SDS-PAGE und der IEF eine Bande sichtbar ist noch eine CA-Aktivität nachgewiesen werden kann, wurde bei den weiteren Säulenläufen auf die Analyse dieser Fraktionen verzichtet.

Die Ergebnisse der Gelelektrophoresen weisen weiter in den Ethanolphasen eine sehr starke Bande im Bereich von 29kDa auf, die identisch mit den isolierten CA-Fraktionen zu sein scheint. In den Fraktionen des Waschvorgangs der ersten Affinitätschromatographie findet man ebenfalls eine Bande an dieser Stelle, die aber sehr viel schwächer ist. Dies paßt zu dem Befund, daß in diesen Fraktionen geringe CA-Aktivitäten von 0,7 - 4,2 Units gemessen werden können.

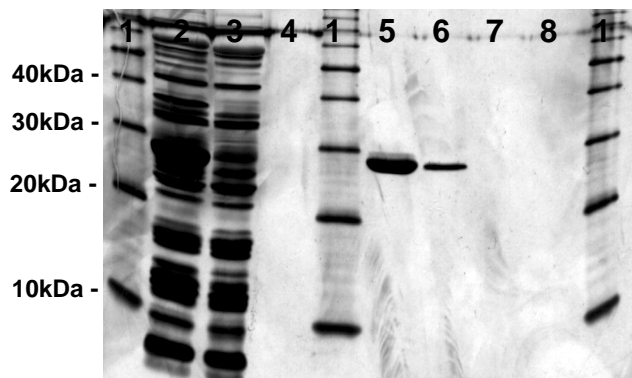
In den Fraktionen der unspezifisch gebundenen Proteine kann bei keinem der Säulenläufe eine CA-Aktivität gemessen werden, was zu dem Ergebnis der Gelelektrophoresen paßt, in denen die oben genannte Bande in dieser Fraktion nicht zu sehen ist.

In **Abb. 5.7** wurden zur Kontrolle neben den isolierten Enzymfraktionen der einzelnen Säulenläufe noch die gepoolten Fraktionen aufgetragen. Das Ergebnis zeigt, wie aus den SDS-PAGES der einzelnen Säulenläufe zu erwarten, auch für die gepoolten Fraktionen jeweils nur eine einzige Bande bei ca. 29kDa.



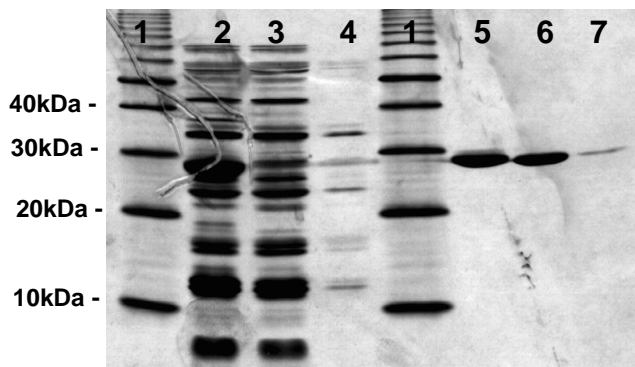
**Abb. 5.3: SDS-PAGE:
Fraktionen Säulenlauf Nr. 1**

- 1: Molekulargewichtsmarker
- 2: Ethanolphase
- 3: Waschfraktionen
- 4: PIa
- 5: PIa
- 6: PIb
- 7: PIb



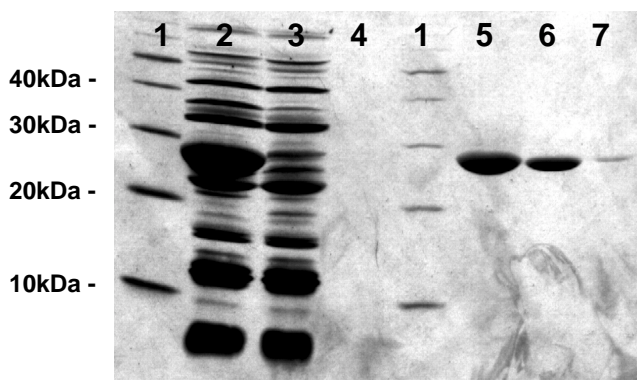
**Abb. 5.4: SDS-PAGE:
Fraktionen Säulenlauf Nr. 2**

- 1: Molekulargewichtsmarker
- 2: Ethanolphase
- 3: Waschfraktionen
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa
- 6: PIa
- 7: PIb
- 8: PIb
- 9: PIIB



**Abb. 5.5: SDS-PAGE:
Fraktionen Säulenlauf Nr. 3**

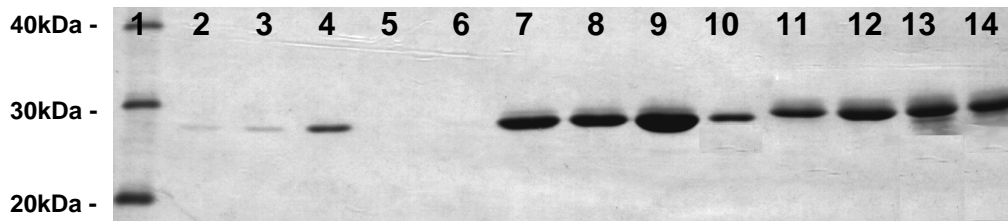
- 1: Molekulargewichtsmarker
- 2: Ethanolphase
- 3: Waschfraktionen
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa
- 6: PIa
- 7: PIIB



**Abb. 5.6: SDS-PAGE:
Fraktionen Säulenlauf Nr. 4**

- 1: Molekulargewichtsmarker
- 2: Ethanolphase
- 3: Waschfraktionen
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa
- 6: PIa
- 7: PIIB

Abb. 5.7. SDS-PAGE: Einzel- und gepoolte Enzymfraktionen der vier Säulenläufe aus dem Meerschweinchenblut



1: Molekulargewichtsmarker
 2: PIIb gepoolt (Säulenläufe 1-4)
 3: PIIb Säulenlauf 4
 4: PIIb Säulenlauf 3
 5: PIIb Säulenlauf 2
 6: PIIb Säulenlauf 1
 7: PIIa gepoolt (Säulenläufe 1,3,4)

8: PIIa Säulenlauf 4
 9: PIIa Säulenlauf 3
 10: PIIa Säulenlauf 1
 11: PIIa gepoolt (Säulenläufe 1,2,3)
 12: PIIa Säulenlauf 4
 13: PIIa Säulenlauf 2
 14: PIIa Säulenlauf 1

Abb. 5.8 - 5.11 zeigen die Ergebnisse der *isoelektrischen Fokussierungen* von den isolierten Enzymfraktionen aus dem Meerschweinchenblut. Während die Erythrozytenlysate, die Ethanolphasen und die Fraktionen des Waschvorgangs mehrere Banden über den gesamten pH-Bereich verteilt aufweisen, findet man für die isolierten Enzymfraktionen - mit einer Ausnahme - lediglich entweder 2 Banden im Bereich der Kathode oder eine Bande nahe der Anode. Für PIIa läßt sich im Bereich der Kathode, dem basischen Bereich des Gradienten, stets eine Doppelbande anfärben. Für PIIa dagegen findet man eine Einzelbande im sauren Bereich der Anode. Die Banden für PIIb befinden sich im selben Bereich wie die für PIIa, sind aber nur sehr schwach, so daß sie beim Einscannen und der weiteren Bildverarbeitung verloren gehen. Die einzige Ausnahme stellt PIIa von Säulenlauf Nr. 2 dar. Hier zeigt die Silberfärbung sowohl die Doppelbande in Kathodennähe als auch die Einzelbande in der Nähe der Anode. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Fraktion nicht in den Pool für die Immunisierung aufgenommen.

In **Abb. 5.12** wurden wie in Abb. 5.8 bei der SDS-PAGE zur Kontrolle neben den isolierten Enzymfraktionen der einzelnen Säulenläufe noch die gepoolten Fraktionen aufgetragen. Das Ergebnis zeigt - wie aus den IEF's der einzelnen Säulenläufe zu erwarten - auch für die gepoolten Fraktionen von PIIa eine Einzelbande im sauren, bzw. eine Doppelbande für PIIa im basischen Bereich des Gradienten.

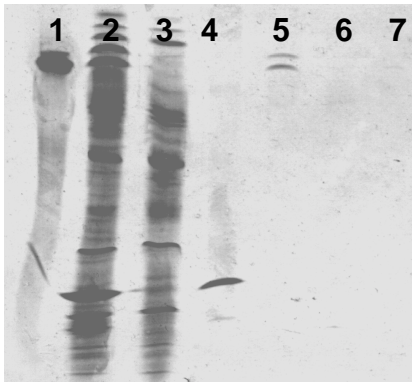


Abb. 5.8: IEF: Säulenlauf Nr. 1

- 1: Erythrozytenlysat (1:80)
- 2: Ethanolphase (1:5)
- 3: Waschfraktionen (1:3)
- 4: PIa (1:2)
- 5: PIa
- 6: PIb
- 7: PIib

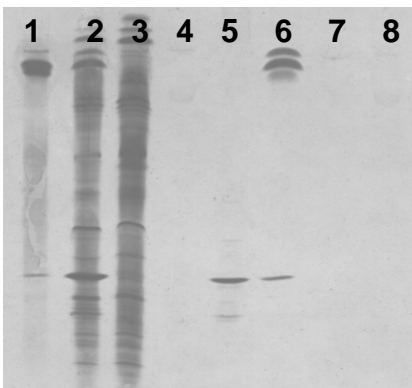


Abb. 5.9: IEF: Säulenlauf Nr. 2

- 1: Erythrozytenlysat (1:80)
- 2: Ethanolphase (1:5)
- 3: Waschfraktionen (1:3)
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa (1:2)
- 6: PIa (1:2)
- 7: PIb
- 8: PIib

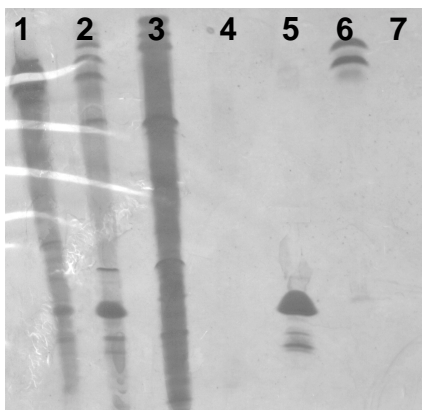


Abb. 5.10: IEF: Säulenlauf Nr. 3

- 1: Erythrozytenlysat (1:60)
- 2: Ethanolphase (1:5)
- 3: Waschfraktionen (1:3)
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa (1:2)
- 6: PIa (1:2)
- 7: PIib

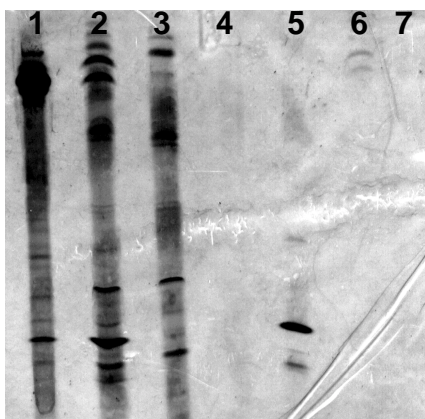
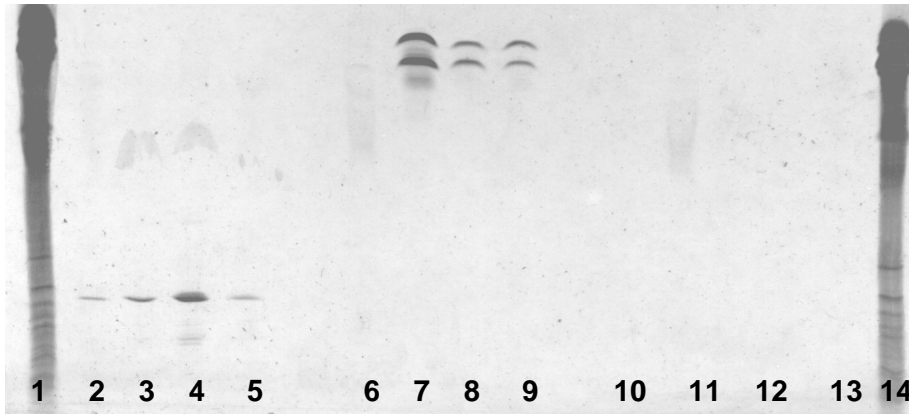


Abb. 5.11 IEF: Säulenlauf Nr. 4

- 1: Erythrozytenlysat (1:60)
- 2: Ethanolphase (1:5)
- 3: Waschfraktionen (1:3)
- 4: unspezifisch gebundene Proteine
- 5: PIa (1:2)
- 6: PIa (1:2)
- 7: PIib

Abb. 5.12 IEF: Einzel- und gepoolte Enzymfraktionen der vier Säulenläufe aus dem Meerschweinchenblut



- 1: Erythrozytenlysat
- 2: PIa Säulenlauf 1
- 3: PIa Säulenlauf 2
- 4: PIa Säulenlauf 4
- 5: PIa gepoolte (Säulenläufe 1, 2, 3)
- 6: PIIa Säulenlauf 1
- 7: PIIa Säulenlauf 3

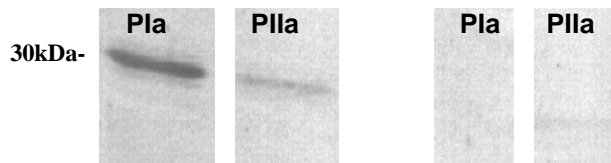
- 8: PIIa Säulenlauf 4
- 9: PIIa gepoolt (Säulenläufe 1,3,4)
- 10: PIIb Säulenlauf 1
- 11: PIIb Säulenlauf 2
- 12: PIIb Säulenlauf 3
- 13: PIIb Säulenlauf 4
- 14: PIIb gepoolt (Säulenläufe 1-4)

5.2.2. Spezifität der polyklonalen Antiseren gegen Meerschweinchen-CAI und -CAII

Die Spezifität der polyklonalen Antiseren wurde im Western-Blot getestet. Wie die **Abb. 5.13 und 5.14** zeigen, wurden ähnliche Proteinmengen der beiden zur Immunisierung verwendeten Antigene CAI und CAII aufgetragen und diese sowohl mit Anti-Meerschweinchen-CAI als auch -CAII sowie den entsprechenden Präimmunsereen inkubiert.

Man erhält jeweils eine einzige deutliche Bande bei 29kDa für das entsprechende Antigen. Daneben zeigt sich für das Antigen des jeweils anderen Isoenzym ebenfalls eine einzige Bande im selben Molekulargewichtsbereich, die allerdings viel schwächer ist. Dies zeigt, daß die gewonnenen Antiseren zwar spezifisch mit dem eingesetzten Antigen reagieren, aber dennoch eine geringe Kreuzreaktivität mit dem Antigen des jeweils anderen Isoenzym aufweisen.

**Abb. 5.13: Western-Blot: Meerschweinchen-CAI und -CAII
(Anti-Meerschweinchen-CAI)**



linke Seite: Anti-Meerschweinchen-CAI (1:500)

rechte Seite: Präimmunserum (1:500)

aufgetragene Proteinmengen: PIa: 1,09 μ g = 5,99U*ml; PIIa: 0,79 μ g = 75,21U*ml

**Abb. 5.14: Western-Blot: Meerschweinchen-CAI und -CAII
(Anti-Meerschweinchen-CAII)**



linke Seite: Anti-Meerschweinchen-CAII (1:500)

rechte Seite: Präimmunserum (1:500)

aufgetragene Proteinmengen: PIa: 1,09 μ g = 5,99U*ml; PIIa: 0,79 μ g = 75,21U*ml

5.2.3. Charakterisierung der Mucus-CA aus dem Gastrointestinaltrakt des Meerschweinchens

Für die Identifizierung der Mucus-CA in Proben aus dem Colon und Caecum des Meerschweinchens wurden neben Antikörpern gegen verschiedene Isoenzyme anderer Spezies die gewonnenen Antiseren gegen Meerschweinchen-CAI und -CAII ausgetestet. Die Ergebnisse der Western-Blots sind in **Abb. 5.15 - 5.18** dargestellt.

Western-Blots mit Antikörpern gegen CAIV ergeben unterschiedliche Ergebnisse. Während mit *Anti-rat-lung-CAIV* von W. S. Sly keine Banden im Western-Blot zu sehen sind (Daten hier nicht gezeigt), erhält man mit *Anti-human-CAIV* von P. J. Wistrand deutlich sichtbare Banden. Diese liegen, wie in **Abb. 5.15** zu sehen ist, im Bereich von etwa 66kDa und scheinen

hier eine Doppelbande darzustellen. Die Abbildung zeigt weiter, daß auch die Molekulargewichtsmarker an derselben Stelle eine Doppelbande aufweisen. Die als Kontrolle verwendeten Präimmunseren dieser zwei Antikörper ergeben ein negatives Ergebnis. Es ist anzunehmen, daß es sich bei der Reaktion im Mucus um eine Reaktion mit einer anderen Substanz als CA handelt, da zum einen das Molekulargewicht von 66kDa nicht mit dem der Mucus-CA übereinstimmt und zum anderen auch die Molekulargewichtsmarker mit dem Antikörper reagieren.

Abb. 5.16 zeigt das Ergebnis des Western-Blots mit *Anti-human-CAVI*. Lediglich im Humanspeichel, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, erhält man eine Bande bei ca. 42kDa, obwohl die aufgetragene CA-Menge im Humanspeichel ca. 3x geringer ist als in den Mucusproben aus dem Meerschweinchendarm. Es ist fraglich, ob im Mucus vom Meerschweinchen tatsächlich keine CAVI vorhanden ist, oder ob es die negative Reaktion mit dem Mucus vom Meerschweinchen in einer fehlenden Kreuzreaktion de Antikörpers gegen humane CAVI mit Meerschweinchen-CAVI begründet ist.

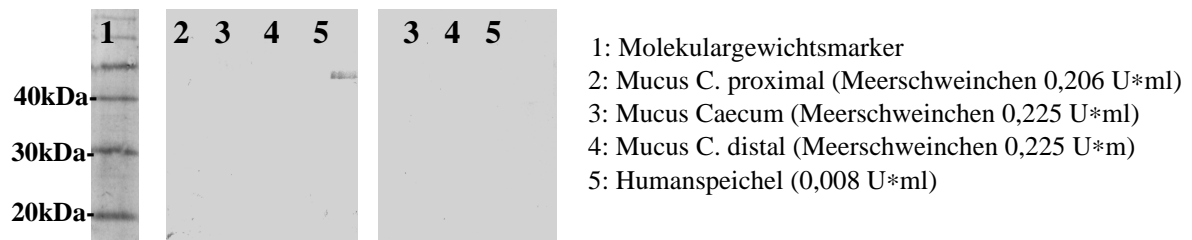
Abb. 5.17 und 5.18 zeigen die Ergebnisse der Western-Blots mit den Antiseren gegen *Meerschweinchen-CAI und -CAII*. Man erhält für beide Antikörper im Mucus aller drei Darmabschnitte wie auch für die Antigene PIa und PIIa eine positive Reaktion in Form einer einzigen Bande bei 29kDa. Obwohl die aufgetragenen CA-Mengen für alle vier Proben im Bereich von 0,2 U*ml liegen, sind die Banden für die Antigene in beiden Western-Blots wesentlich stärker als für die Mucusproben.

**Abb. 5.15: Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm
(Anti-human-CAIV, P. J. Wistrand)**



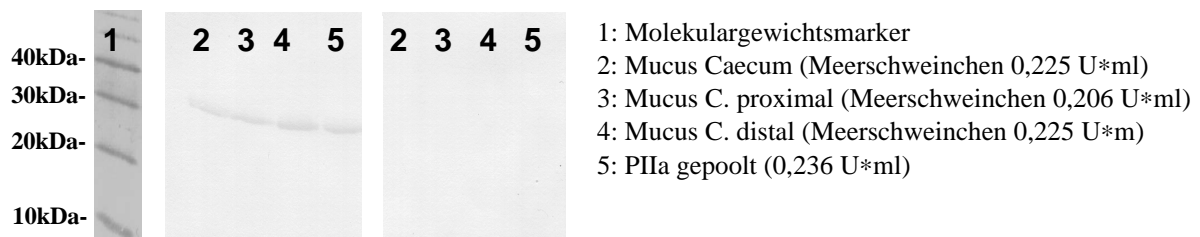
links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-human-CAIV 1:500
rechts außen: Kaninchen-Präimmunserum (1:500)

**Abb. 5.16: Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm
(Anti-human-CAVI, S. Parkkila)**



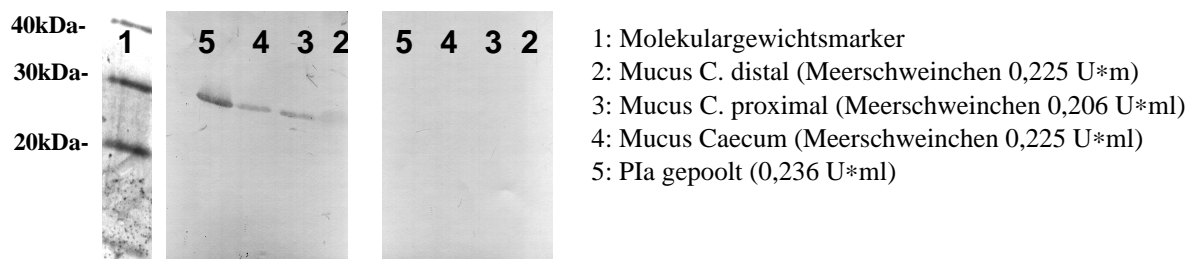
links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-human-CAVI (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

**Abb. 5.17: Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm
(Anti-Meerschweinchen-CAII)**



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-Meerschweinchen CAII (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

**Abb. 5.18: Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm
(Anti-Meerschweinchen-CAI)**



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-Meerschweinchen CAI (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

5.2.4. Charakterisierung der Mucus-CA des humanen Gastrointestinaltraktes

Für die Identifizierung der Mucus-CA im Gastrointestinaltrakt des Menschen wurden Western-Blots mit Antikörpern gegen verschiedene humane Isoenzyme durchgeführt. Dabei wurden sowohl humaner Magen- wie auch Colonmucus untersucht. Die Ergebnisse sind in den **Abb. 5.19 - 5.25** dargestellt.

Abb. 5.19: Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAI, N.Carter)

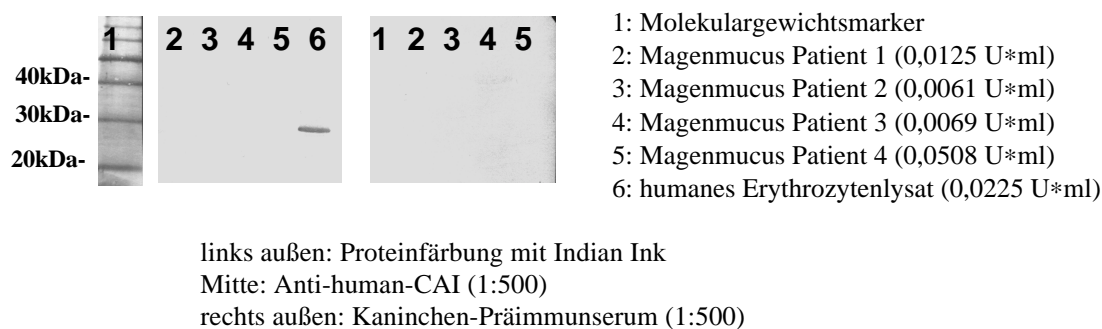


Abb. 5.20: Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAII, Binding Site)

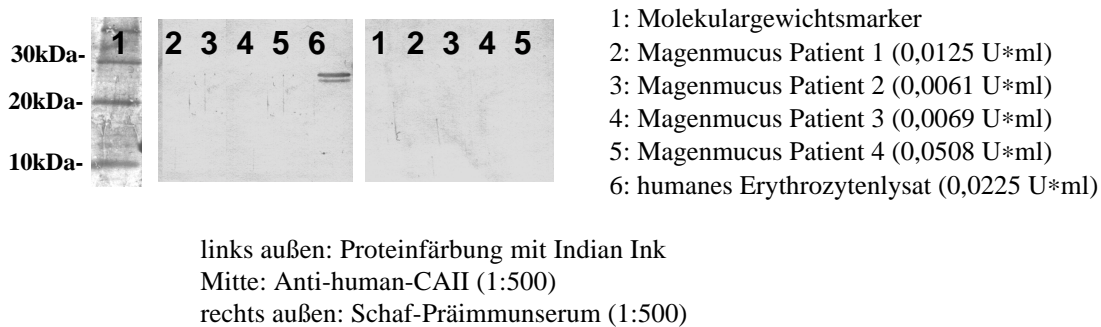


Abb. 5.21: Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAVI, S. Parkilla)

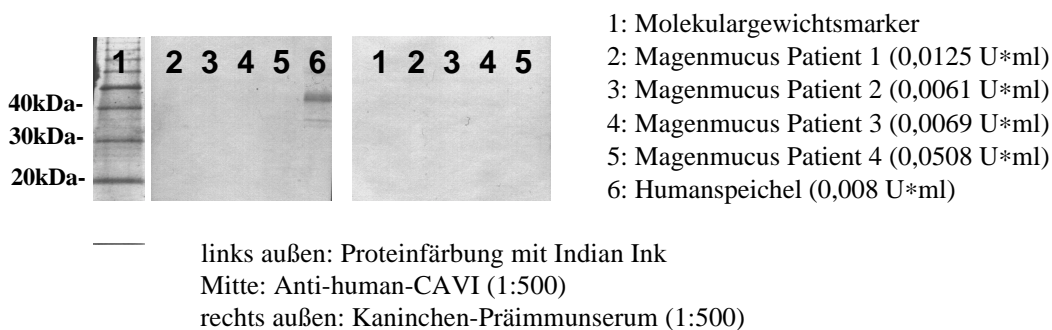
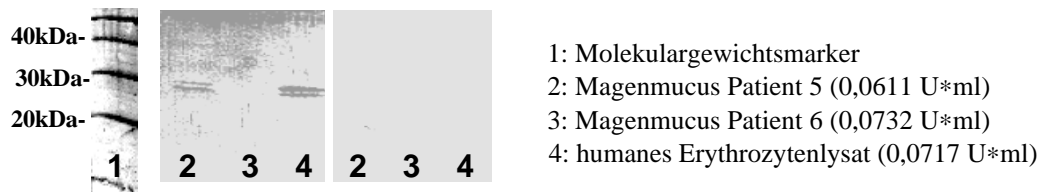
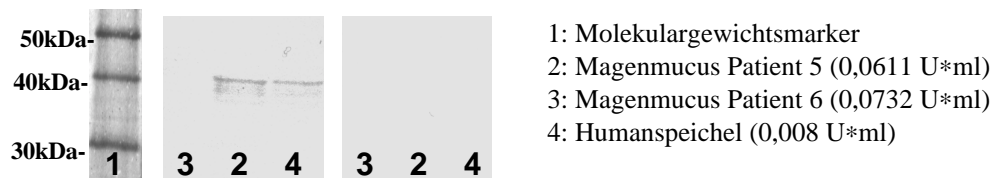


Abb. 5.22: Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAII, Binding Site)

links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-human-CAII (1:500)
rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

Abb. 5.23: Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAVI, S. Parkilla)

links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-human-CAVI (1:500)
rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

Die **Abbildungen 5.19 -5.23** zeigen Western-Blots mit *humanen Magensaftproben* von sechs verschiedenen Patienten. Es wurden etwa gleiche CA-Mengen für die zu analysierenden Proben von den Patienten und der Positivkontrolle für die Western-Blots aufgetragen. Im Fall von Anti-human-CAVI ist die Menge im Humanspeichel um den Faktor 7 bis 9 geringer als in den Patientenproben.

Man findet nur für die Magensaftprobe von Patient 5 ein positives Ergebnis. Nach Inkubation mit Anti-human-CAII erhält man wie für das humane Erythrozytenlysat eine Doppelbande bei ca. 29kDa (siehe **Abb. 5.22**). Daneben kann in der Probe desselben Patienten mit Anti-human-CAVI wie für den Humanspeichel eine Bande bei ca. 42kDa nachgewiesen werden (siehe **Abb. 5.23**). Alle anderen Proben zeigen für Anti-human-CAII sowie Anti-human-CAVI ein negatives Ergebnis. Die Positivkontrollen ergeben jeweils eine Bande. Sie liegt für CAI und CAII im humanen Erythrozytenlysat bei ca. 29kDa und für CAVI im Humanspeichel bei etwa 42kDa. Die Inkubation der Blots mit den jeweiligen Präimmunsereen der Antikörper ergibt in keinem der Western-Blots ein positives Ergebnis.

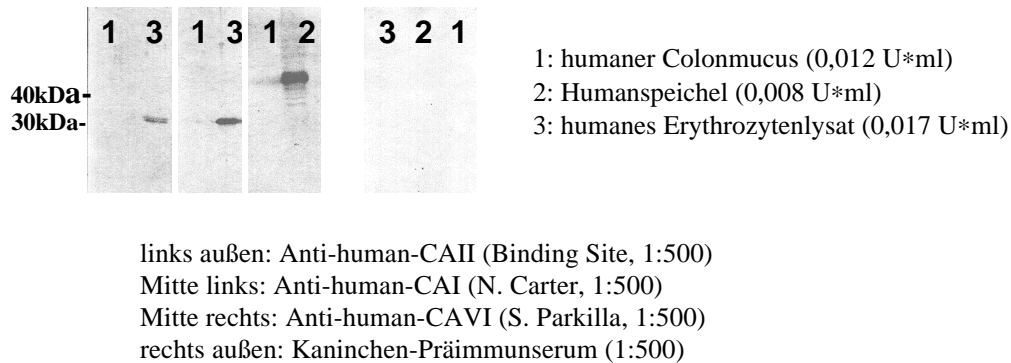
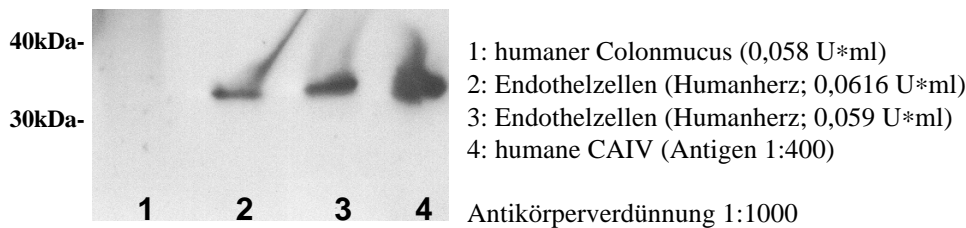
Abb. 5.24: Western-Blot: Humaner Colonmucus (Anti-human-CAI, -CAII, -CAVI)**Abb. 5.25: Western-Blot: Humaner Colonmucus (Anti-human-CAIV, W. Sly)**

Abb. 5.24 und 5.25 zeigen die Ergebnisse von Western-Blots im *humanen Colonmucus* mit Antikörpern gegen die humanen Isoenzyme CAI, CAII, CAIV und CAVI. In **Abb. 5.24** enthält die rechte Spur jeweils die Positivkontrolle für den verwendeten Antikörper, die linke humanen Colonmucus. Die aufgetragenen CA-Mengen wurden so gewählt, daß sie für den humanen Colonmucus und die jeweilige Positivkontrolle in der gleichen Größenordnung lagen. Für die Berechnung der einzusetzenden Menge der CAIV in den Endothelzellen wurde der SDS-resistente Anteil der CA-Aktivität zugrunde gelegt. In **Abb. 5.25** befindet sich in der linken Spur ebenfalls der humane Colonmucus, die rechten Spuren enthalten verschiedene Positivkontrollen. Die Detektion der Reaktion erfolgte wie unter 4.6.2. beschrieben für Anti-human-CAIV mittels ECL, für die restlichen Antikörper über DAB.

Für die Positivkontrollen erhält man jeweils eine einzige Bande im Western-Blot. Sie liegt für CAI und CAII im humanen Erythrozytenlysat bei ca. 29kDa, für CAIV aus humanen Endothelzellen des Herzens (KNÜPPEL ET AL., 1999) bei 35kDa und für CAVI im Humanspeichel bei ca. 42kDa. Im humanen Colonmucus dagegen ist das Ergebnis für die vier getesteten Antikörper negativ. Ein ebenfalls negatives Ergebnis ergibt die Inkubation mit den

Präimmunseren der jeweiligen Antikörper (Daten hier nur zum Teil gezeigt). Die Mucus-CA im humanen Colonmucus kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht identisch mit CAI, CAII, CAIV und CAVI sein.

5.2.5. Charakterisierung der Mucus-CA aus dem Gastrointestinaltrakt der Ratte

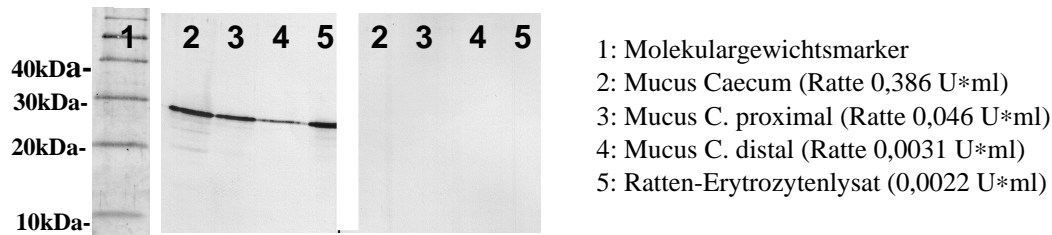
Wie für den Mucus aus dem humanen Gastrointestinaltrakt wurden auch für den Mucus aus dem Dickdarm der Ratte Western-Blots mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen verschiedene Isoenzyme der Ratte durchgeführt. Auch hier wurden die CA-Mengen in den Mucusproben aus dem Dickdarm und der jeweiligen Positivkontrolle so gewählt, daß sie etwa gleich groß sind. Wie in den Western-Blots der Humanproben wurde auch hier für die Berechnung der einzusetzenden CA-Menge in den Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums der Ratte als Positivkontrolle der SDS-resistente Anteil der CA zugrunde gelegt. Die SR-Vesikel stammen aus den Präparationen der Diplomarbeit der Autorin (1994). **Abb. 5.26 - 5.29** zeigen die Ergebnisse der Western-Blots.

Abb. 5.26 und 5.27 zeigen die Ergebnisse mit *Anti-rat-CAI und CAII*. Man erhält mit beiden Antikörpern im Western-Bot sowohl für die Mucusproben aus dem Dickdarm der Ratte wie auch für das Erythrozytenlysat eine Bande bei ca. 29kDa. Die Banden weisen im Mucus vom Caecum, dem proximalen Colon und dem Erythrozytenlysat die gleiche Intensität auf. Die Bande im distalen Colon ist schwächer, obwohl hier etwa die gleiche CA-Menge wie für die übrigen Proben aufgetragen wurde. Eine Inkubation mit den Präimmunseren ergibt auch in diesen Western-Blots ein negatives Ergebnis.

Das Ergebnis des Western-Blots mit *Anti-rat-CAIV* ist in **Abb. 5.28** dargestellt. Man erhält in den als Positivkontrolle aufgetragenen SR-Vesikeln mehrere Banden, die jedoch auch bei der Inkubation mit dem Präimmunserum auftreten und somit unspezifisch sind.

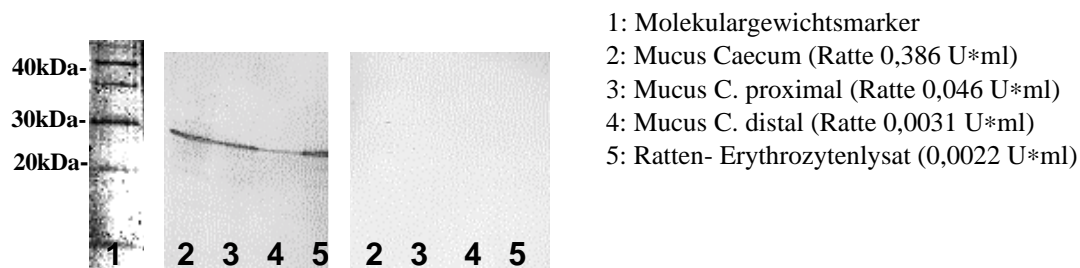
Für *Anti-rat-CAVI* erhält man sowohl nach Inkubation mit dem Antikörper wie auch dem Präimmunserum ein negatives Ergebnis. Weder die Positivkontrolle noch die Mucusproben aus dem Dickdarm der Ratte reagieren im Western-Blot mit dem Antikörper (siehe **Abb. 5.29**).

Abb. 5.26: Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-rat-CAI, W. S. Sly)



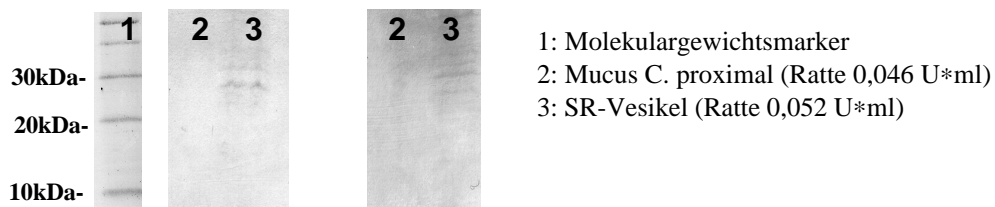
links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-rat-CAI (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

Abb. 5.27: Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-rat-CAII, W. S. Sly)



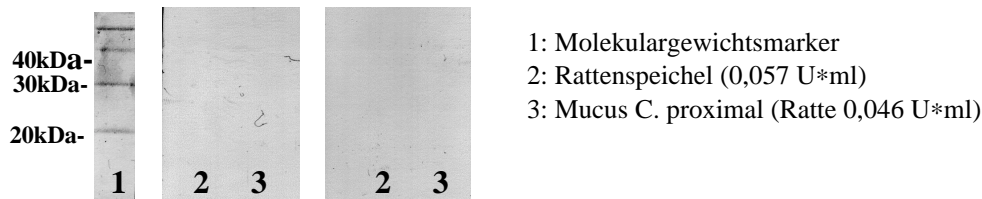
links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-rat-CAII (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

Abb. 5.28: Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-rat-CAIV, W. S. Sly)



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
 Mitte: Anti-rat-CAIV (1:500)
 rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:500)

Abb. 5.29: Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-rat-CAVI, Y. Ogawa)



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-rat-CAVI (1:10)
rechts außen: Kaninchen-Präimmunsereum (1:10)

5.3. Ergebnisse der Untersuchungen des Probenmaterials der CAII-defizienten Mäuse

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Messungen der **CA-Aktivitäten** im Erythrozytenlysat sowie dem Cytosol der Epithelzellen und dem Mucus von drei Dickdarmabschnitten (Caecum, proximales und distales Colon) der CAII-defizienten Mäuse.

Die spezifischen CA-Aktivitäten im *Erythrozytenlysat* weisen bei den drei verschiedenen Genotypen hoch signifikante Unterschiede auf. Bei den Wildtyp-Mäusen ist die spezifische CA-Aktivität mit 220 U*ml/mg um den Faktor 1,6 höher als bei den heterozygot defizienten Tieren mit 140 U*ml/mg. Die Aktivität der homozygot defizienten Tiere ist mit nur 3,4 U*ml/mg sogar um den Faktor 65 geringer als bei den Wildtyp-Mäusen und um den Faktor 41 verglichen mit den heterozygot defizienten Tiere. Diese großen Unterschiede der spezifischen CA-Aktivitäten im Erythrozytenlysat der drei Genotypen sind auf das Fehlen der hoch aktiven CAII zurückzuführen und wurden daher wie unter 4.2. beschrieben auch zur Genotypisierung der Tiere verwendet.

Im *Cytosol* der drei untersuchten Darmabschnitte erhält man ein ähnliches Ergebnis wie im Erythrozytenlysat. Die spezifischen CA-Aktivitäten sind bei den Wildtyp-Mäusen am größten und bei den homozygot defizienten Tieren am geringsten. Auch dies ist vermutlich auf das Fehlen der hoch aktiven CAII in den Dickdarmepithelzellen zurückzuführen. Während man für die Proben aus dem Caecum und dem proximalen Colon Faktoren zwischen den Aktivitäten der einzelnen Genotypen von nur 3,0 bis 1,4 findet, ist der Unterschied zum distalen Colon

ähnlich stark ausgeprägt wie im Erythrozytenlysat. Im Cytosol vom distalen Colon der Wildtypen findet man eine 40fach höhere Aktivität als bei den homozygot defizienten Tieren. Bei den heterozygot defizienten Tieren und den homozygot defizienten Tieren liegt dieser Faktor bei 17. Der gepaarte t-Test für die Cytosolproben zeigt, daß es sich auch hier um signifikante Unterschiede handelt. Einzige Ausnahme stellt der Vergleich zwischen dem Cytosol aus dem Caecum der heterozygot und der homozygot defizienten Tiere mit $p = 0,07$ dar.

Tabelle 6: Spezifische CA-Aktivität [Units*ml/mg] in den Proben der CAII-defizienten Mäuse

Fraktion	Wildtyp	CAII-defizient (heterozygot)	CAII-defizient (homozygot)
Erythrozytenlysat ^{b)}	220 ± 41 (n=7)	140 ± 12 (n=10)	3,4 ± 0,9 (n=6)
Cytosol Caecum ^{b) c)}	289 ± 45 (n=7)	155 ± 32 (n=10)	96 ± 34 (n=6)
Cytosol proximales Colon ^{b)}	186 ± 35 (n=7)	136 ± 41 (n=10)	58 ± 19 (n=6)
Cytosol distales Colon ^{b)}	195 ± 36 (n=7)	86 ± 27 (n=10)	5 ± 2 (n=6)
Mucus Caecum ^{a) d)}	30 ± 12 (n=7)	27 ± 10 (n=10)	42 ± 9 (n=6)
Mucus proximales Colon ^{a)}	20 ± 9 (n=7)	20 ± 15 (n=10)	40 ± 18 (n=6)
Mucus distales Colon ^{a)}	10 ± 9 (n=7) ¹	18 ± 10 (n=10)	21 ± 16 (n=6)
Speichel ^{a)}	63 ± 25 (n=5)	223 ± 126 (n=4)	83 ± 39 (n=5)

Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

Die Signifikanzen wurden mit dem gepaarten t-Test berechnet. Überprüft wurden jeweils die Werte zweier Genotypen, wobei jede Gruppe mit jeder verglichen wurde.

a) nicht signifikant: $p > 0,06$

b) signifikant: $p < 0,006$

c) Ausnahme homozygot/heterozygot nicht signifikant $p = 0,07$

d) Ausnahme homozygot/Wildtyp signifikant $p = 0,031$

Im *Mucus der drei Darmabschnitte* und im *Speichel* dagegen liegen die Aktivitäten der Tiere aller drei Genotypen in derselben Größenordnung und zeigen keine signifikanten Unterschiede. Einzige Ausnahme ist die Aktivität im Mucus vom Caecum der Wildtyp-Mäuse und der

homozygot defizienten Tiere. Allerdings ist in diesem Falle die Aktivität der homozygot defizienten Tiere mit 42 U*ml/mg höher als die der Wildtyp-Mäuse mit 30 U*ml/mg. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß es sich bei der CA im Mucus und im Speichel nicht um CAII handelt.

Tabelle 7: Hemmung der CA-Aktivitäten in den Proben der CAII-defizienten Mäuse mit KJ und SDS

Fraktion	Genotyp	Hemmung mit 7mM KJ [%]	Hemmung mit 0,2% SDS [%] ^{a)}
Erythrozytenlysat	Wildtyp	43 ± 4 (n=5) ^{b)}	-
	homozygot defizient	100 ± 0 (n=6)	-
Cytosol Caecum	Wildtyp	65 ± 4 (n=7) ^{b)}	100 ± 0 (n=3)
	homozygot defizient	100 ± 0 (n=6)	100 ± 0 (n=3)
Cytosol proximales Colon	Wildtyp	61 ± 6 (n=7) ^{b)}	100 ± 0 (n=3)
	homozygot defizient	100 ± 0 (n=6)	100 ± 0 (n=3)
Cytosol distales Colon	Wildtyp	54 ± 6 (n=7) ^{b)}	100 ± 0 (n=3)
	homozygot defizient	100 ± 0 (n=6)	90 ± 18 (n=3)
Mucus Caecum	Wildtyp	50 ± 7 (n=7) ^{a)}	85 ± 15 (n=3)
	homozygot defizient	55 ± 11 (n=6)	68 ± 8 (n=3)
Mucus proximales Colon	Wildtyp	35 ± 10 (n=7) ^{c)}	100 ± 0 (n=3)
	homozygot defizient	56 ± 9 (n=5)	81 ± 17 (n=3)
Mucus distales Colon	Wildtyp	-	100 ± 0 (n=3)
	homozygot defizient	33 ± 9 (n=6)	89 ± 18 (n=3)
Speichel	Wildtyp	46 ± 13 (n=5) ^{a)}	-
	homozygot defizient	41 ± 10 (n=5)	-

Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

Die Signifikanzen wurden mit dem gepaarten t-Test berechnet. Verglichen wurden die Werte zwischen Wildtyp und homozygot CAII-defizienten Tieren.

a) nicht signifikant: $p > 0,1$

b) hoch signifikant: $p < 0,00003$

c) signifikant: $p = 0,002$

Um herauszufinden, ob es sich bei der CA im Mucus vom Dickdarm möglicherweise um CAI handelt, wurden **Hemmversuche mit 7mM KJ** durchgeführt. CAI läßt sich durch 7mM KJ vollständig hemmen, während CAII noch aktiv ist. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in **Tabelle 7** zusammengefaßt.

Die verbleibende Aktivität im *Erythrozytenlysat*, der homozygot defizienten Tiere, die auf CAI zurückzuführen ist, läßt sich wie erwartet mit 7mM KJ vollständig hemmen, während die Hemmung im Erythrozytenlysat der Wildtypen nur 43% beträgt.

Im *Cytosol* erhält man ein ähnliches Ergebnis. Bei den homozygot defizienten Tieren ist die Hemmung vollständig, bei den Wildtyp-Mäusen hingegen liegt sie zwischen 54% und 65%.

Im *Mucus und im Speichel* aller drei Darmabschnitte dagegen läßt sich die CA-Aktivität mit 7mM KJ sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den homozygot defizienten Tieren nur um ca. 45-50% hemmen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß es sich bei der CA im Mucus und im Speichel nicht um CAI handelt.

Die Messungen mit **0,2% SDS** ergeben sowohl für das *Cytosol* wie auch für den *Mucus* eine nahezu 100%ige Hemmung, die keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-Mäusen und den homozygot defizienten Tieren aufweist. Bei der Mucus-CA handelt es sich demnach um ein SDS-empfindliches Isoenzym.

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse von CA- und **LDH-Aktivität** in mehreren Mucus-Einzelproben. Es zeigt sich bei den untersuchten Proben der Mäuse, daß keine Korrelation zwischen den Aktivitäten der beiden Enzyme im Mucus besteht. Ähnliche Ergebnisse findet man auch bei den Messungen im Mucus aus dem Meerschweinchendarm (siehe Tabelle 2, Kapitel 5.1.1.). Auch für die Mucusproben der Mäuse ist aufgrund dieser Ergebnisse anzunehmen, daß die gemessene CA-Aktivität im Mucus nicht auf eine Kontamination mit den cytosolischen Isoenzymen CAI und CAII aus den Epithelzellen zurückzuführen ist.

Tabelle 8. Korrelation der CA- und LDH-Aktivitäten im Mucus der CAII-defizienten Mäuse

Darmabschnitt	Tier	Genotyp	spezifische LDH-Aktivität [U/mg]	spezifische CA-Aktivität [U*ml/mg]
Mucus Caecum	1	Wildtyp	1197	29,7
	2	Wildtyp	892	29,6
	3	Wildtyp	914	23,8
	4	homozygot defizient	865	47,6
	5	homozygot defizient	1413	31,8
	6	homozygot defizient	0	52,7
Mucus proximales Colon	1	Wildtyp	981	35,5
	2	Wildtyp	1173	20,5
	3	Wildtyp	442	20,2
	4	homozygot defizient	0	57,2
	5	homozygot defizient	870	22,8
	6	homozygot defizient	1128	26,2
Mucus distales Colon	1	Wildtyp	0	12,1
	2	Wildtyp	0	48,3
	3	Wildtyp	0	18,9
	4	homozygot defizient	0	12,8
	5	homozygot defizient	0	00,0
	6	homozygot defizient	0	00,0

5.4. Identität der isolierten Mucus-CA

Wie unter 4.1.6. beschrieben wurde aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens mittels Affinitätschromatographie eine Fraktion isoliert, die Carboanhydrase enthält. Die Identifizierung erfolgte mittels biochemischer und elektrophoretischer Charakterisierung sowie massenspektrometrischer Sequenzanalyse.

5.4.1. Bestimmung der CA-Aktivität und der Hemmung mit KJ und SDS

Für die Aufreinigung der CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens wurden 60ml Retentat 2 (gepooltes Material mehrerer Vorreinigungsprozeduren, siehe 4.1.6.) für die Affinitätschromatographie auf eine Säule aufgetragen. **Tabelle 9** zeigt die biochemischen Eigenschaften der Ausgangsprobe sowie der isolierten CA-Fraktion.

Tabelle 9: Biochemische Eigenschaften der isolierten Mucus-CA aus dem Caecum vom Meerschweinchen und der Ausgangsprobe für die Aufreinigung

Eigenschaft	Ausgangsprobe (Retentat 2)	isolierte Mucus-CA
Volumen	60ml	5ml
CA-Aktivität	116,59 Units	0,675 Units
CA-Menge	6995 U*ml	3,375 U*ml
Hemmung mit 7mM KJ	49%	36%
Hemmung mit 0,2% SDS	100%	100%

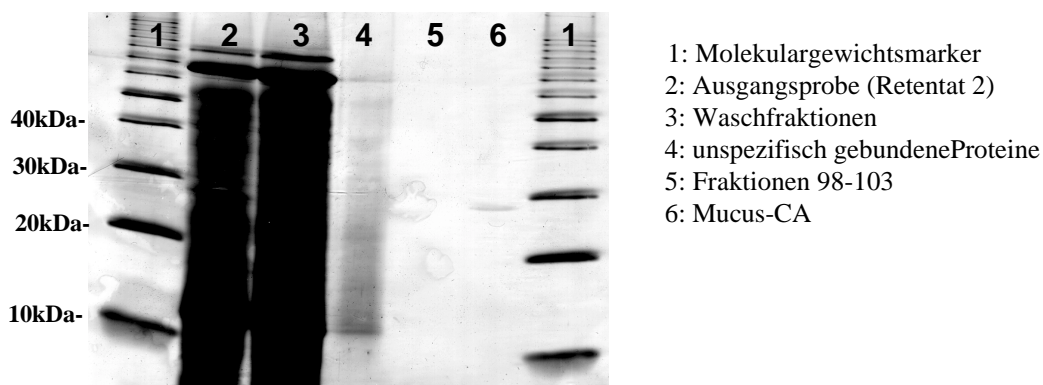
Die Proteinkonzentration in der isolierten Mucus-CA und damit auch die spezifische CA-Aktivität wurden nicht bestimmt, um kein Material für die weitere Charakterisierung zu verlieren.

Wie **Tabelle 9** zeigt, hat die isolierte CA-Fraktion nur eine sehr geringe Aktivität von 0,675 Units. Die daraus berechnete isolierte CA-Menge beträgt 3,375 U*ml und ergibt eine Ausbeute von nur 0,05%. Die Hemmung mit 7mM KJ der isolierten Mucus-CA und der Ausgangsprobe beträgt 49% bzw. 36%. In beiden Proben läßt sich die CA nach Inkubation mit 0,2% SDS vollständig hemmen.

5.4.2. Elektrophoretische Charakterisierung

Die elektrophoretische Charakterisierung der isolierten Mucus-CA erfolgte mittels SDS-PAGE. Das Ergebnis ist in **Abb. 5.30** dargestellt. Sowohl die Ausgangsprobe als auch die Fraktionen des Waschvorgangs enthalten große Mengen verschiedenster Proteine. Die Fraktionen mit den unspezifisch gebundenen Proteinen weisen eine sehr viel geringere Proteinkonzentration auf, enthalten aber ebenfalls ein Gemisch aus mehreren Proteinen. Die Fraktion mit der isolierten dagegen zeigt nur eine einzige Bande bei ca. 29kDa, die allerdings sehr schwach ist. Bei den Fraktionen 98 bis 103 war im Chromatogramm ein leichtes Rauschen auf der Nulllinie zu erkennen. Sie zeigen weder in der SDS-PAGE eine Bande, noch kann in ihnen eine CA-Aktivität gemessen werden.

Abb. 5.30: SDS-PAGE: Aufreinigung Mucus-CA

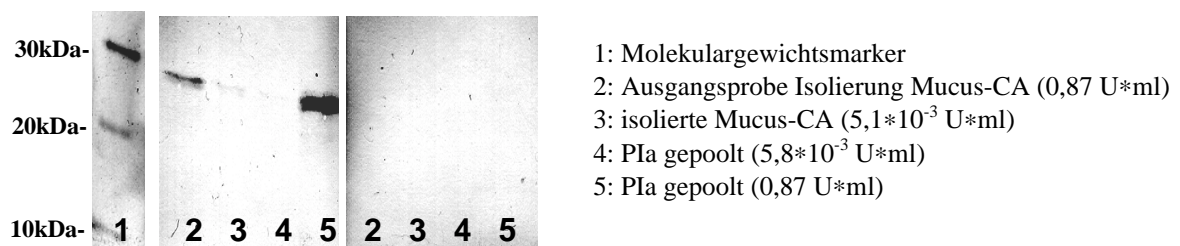


5.4.3. Identifizierung der Isoform der Mucus-CA mittels Western-Blot

Ein Versuch der Identifizierung der isolierten Mucus-CA mittels Western-Blot erfolgte mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII. Es wurde für die Western-Blots jeweils die isolierte Mucus-CA sowie die Ausgangsprobe der Isolierungsprozedur und das dem Antikörper entsprechende Antigen aufgetragen. Dabei wurden die CA-Mengen so gewählt, daß sie für das als Positivkontrolle verwendete Antigen ebenso groß waren wie für die restlichen Proben. Für die isolierte Mucus-CA wurden $5,1 \cdot 10^{-3}$ U*ml, für die Ausgangsprobe der Isolierung 0,87 U*ml aufgetragen.

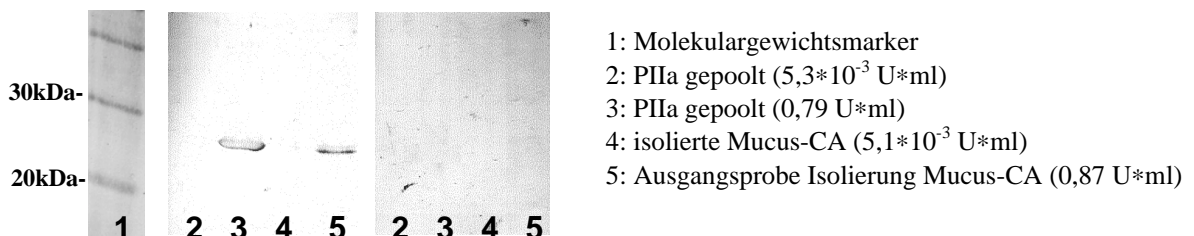
Die Ergebnisse sind in **Abb. 5.31 und 5.32** zu sehen. Sie sind für die Antikörper beider Isoenzyme identisch. Man erhält für die Positivkontrolle und die Ausgangsprobe, deren aufgetragene CA-Mengen bei ca. 0,8 U*ml liegen, eine einzige Bande bei ca. 29kDa. Dabei ist anzunehmen, daß es sich bei der Reaktion im Mucus um eine Kreuzreaktion handelt und nicht um die Reaktion mit CAI oder CAII im Mucus, da die Banden sehr viel schwächer als für das als Positivkontrolle verwendete Antigen sind. Die isolierte Mucus-CA und die Positivkontrolle mit der geringeren CA-Menge dagegen zeigen keine Banden im Western-Blot, da die Proteinkonzentration vermutlich zu gering ist.

Abb. 5.31: Western Blot: Fraktionen Aufreinigung Mucus-CA (Anti-Meerschweinchen-CAI)



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-Meerschweinchen-CAI (Kaninchen 440; 1:500)
rechts außen: Präimmunserum Kaninchen 440 (1:500)

Abb 5.32: Western Blot: Fraktionen Aufreinigung Mucus-CA (Anti-Meerschweinchen-CAII)



links außen: Proteinfärbung mit Indian Ink
Mitte: Anti-Meerschweinchen-CAII (Kaninchen 442; 1:500)
rechts außen: Präimmunserum Kaninchen 442 (1:500)

5.4.4 . Sequenzierung mittels Massenspektrometrie

Aufgrund der zu geringen Proteinmenge für die Sequenzierung der Mucus-CA mittels Edman-Abbau wurde ein spezielles massenspektrometrisches Verfahren wie unter 4.5. beschrieben durchgeführt. Die Massenspektren der HPLC-Fraktionen nach tryptischem Verdau des Proteins wurden mittels verschiedener Computerprogramme ausgewertet. Dabei erfolgte ein Vergleich der Massenspektren bzw. AS-Sequenzen mit entsprechenden Daten bekannter Proteine auf Protein- und DNA-Ebene in verschiedenen Datenbanken.

Die Auswertung der Rohspektren mit Hilfe des Programms „*SEQUEST*“ ergibt kein Ergebnis, d. h. es können keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden.

Die Verwendung von „*MS-Tag*“ ergibt lediglich das Vorhandensein zweier Trypsin-Fragmente in den Proben.

Darüberhinaus können aus den Massenspektren mehrere kurze Aminosäuresequenzen, sogenannte „Sequence-tags“, von Hand abgelesen werden, die zwischen vier und sechs Aminosäuren lang sind. Aufgrund der identischen Massen von Leucin und Isoleucin beinhalten diese „Sequence-tags“ eine Unsicherheit, die bei der anschließenden Auswertung mittels *FASTA 3* berücksichtigt wurde. Die Suche erfolgte in zwei verschiedenen Datenbanken: „Swall“ und „Swiss Prot“. Für drei „Sequence-tags“ ergibt die Auswertung mit diesem Programm Homologien zu bekannten Proteinen, deren Molekulargewichte jedoch nicht mit dem in der SDS-PAGE für die Mucus-CA ermittelten von 29kDa übereinstimmen. Für sechs weitere abgelesene Sequenzen ergeben sich keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen.

Lediglich für die Sequenzen QSPIDI und QSPIDL beinhalten die Listen der Proteine mit homologen Sequenzen neben wenigen Ausnahmen verschiedene CA-Isoenzyme unterschiedlicher Spezies. **Tabelle 10 und 11** zeigen die Listen, die man bei der Suche mit *FASTA 3* in der Datenbank „Swall“ erhält. Die Molekulargewichte und die Position der homologen Sequenz im Protein stammen aus den Detailinformationen, die das Programm liefert, und wurden in die Liste eingefügt. Wie die Abbildungen zeigen, liegen die Molekulargewichte der meisten CA-Isoenzyme im Bereich von 28kDa-29kDa. Für die Isoenzyme dieses Molekulargewichtsbereiches befindet sich die homologe Sequenz mit einer Ausnahme im Bereich der 26.-33. Aminosäureposition (ausgehend vom N-terminalen Ende) im Protein, wobei in den überwiegenden Fällen die genaue Lokalisation die 28.-33. Aminosäure ist. Es gibt darüber hinaus eine Reihe von CA-Isoenzymen mit einem Molekulargewicht

zwischen 32kDa und 39kDa, bei denen die Position der homologen Sequenz im Protein stärker differiert (31.-63. Aminosäure) sowie einige Ausnahmen, deren Molekulargewichte in völlig anderen Bereichen liegen.

Tabelle 10: Liste der Proteine mit Homologien zum Sequenz-Tag „QSPIDI“ der isolierten Mucus-CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens erstellt von „FASTA 3“ (Datenbank: Swall)

The best scores are:	AS-Anzahl	Molekulargewicht [Da]	AS-Position im Protein
SWALL:O60420 O60420 PROTEIN TYROSINE PHO	(142)	15 933	20-25
SWALL:Q21614 Q21614 R01E6.3 PROTEIN. 11/	(259)	29 190	31-36
SWALL:CAH2 RABIT P00919 CARBONIC ANHYDRA	(259)	29 369	27-32
SWALL:O93587 O93587 CARBONIC ANHYDRASE.	(259)	27 762	26-31
SWALL:CAH1 SHEEP P48282 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 677	28-33
SWALL:CAH2 BRARE Q92051 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 677	28-33
SWALL:CAH1 HORSE P00917 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 895	28-33
SWALL:CAH1 MOUSE P13634 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 189	28-33
SWALL:Q9XZG6 Q9xzg6 CARBONIC ANHYDRASE ((261)	28 612	29-34
SWALL:O04846 O04846 CARBONIC ANHYDRASE ((284)	32 698	58-63
SWALL:Q63839 Q63839 RECEPTOR PROTEIN TYR	(306)	34 438	108-113
SWALL:O85685 O85685 RNA POLYMERASE SIGMA	(162)	18 763	100-106
SWALL:O02637 O02637 CARBONIC ANHYDRASE ((319)	35 512	78-83
SWALL:CAHX CAEEL Q10462 PUTATIVE CARBONI	(334)	37 695	72-77
SWALL:BAA85002 Baa85002 CARBONIC ANHYDRA	(337)	27 303	45-50
SWALL:Q20781 Q20781 SIMILAR TO CARBONIC	(365)	42 442	59-64
SWALL:CAH1 RABIT P07452 CARBONIC ANHYDRA	(235)	25 696	4-9
SWALL:Q9XDX8 Q9xdx8 A-TYPE CARBONIC ANHY	(255)	27 303	59-64
SWALL:CAH2 RAT P27139 CARBONIC ANHYDRASE	(259)	28 982	28-33
SWALL:CAH2 HUMAN P00918 CARBONIC ANHYDRA	(259)	29 115	27-32
SWALL:CAH2 SHEEP P00922 CARBONIC ANHYDRA	(259)	29 080	27-32
SWALL:CAH2 MOUSE P00920 CARBONIC ANHYDRA	(259)	28 960	27-32
SWALL:CAH1 MACNE P35217 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 807	28-33
SWALL:CAH1 MACMU P00916 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 805	28-33
SWALL:CAH1 HUMAN P00915 CARBONIC ANHYDRA	(260)	28 739	28-33
SWALL:CAH DUNSA P54212 CARBONIC ANHYDRAS	(589)	64 257	345-350
SWALL:AAD33111 Aad33111 TRIGGER FACTOR ((305)	34 125	297-302
SWALL:AAD51634 Aad51634 PUTATIVE CARBONI	(315)	34 674	31-36
SWALL:AAD51635 Aad51635 PUTATIVE CARBONI	(315)	34 690	39-44
SWALL:CAH6 MOUSE P18761 CARBONIC ANHYDRA	(317)	36 348	46-51
SWALL:AAD51633 Aad51633 PUTATIVE CARBONI	(325)	35 964	44-49
SWALL:KNIR DROME P10734 ZYGOTIC GAP PROT	(429)	45 611	251-256
SWALL:CAH9 HUMAN Q16790 CARBONIC ANHYDRA	(459)	49 729	161-166
SWALL:RPSD PSEFL P52326 RNA POLYMERASE S	(615)	69 436	351-356
SWALL:O87812 O87812 RNA POLYMERASE SIGMA	(616)	69 252	532-537
SWALL:O54540 O54540 RNA POLYMERASE SIGMA	(616)	69 396	532-537
SWALL:PTPG CHICK Q98936 PROTEIN-TYROSINE	(1422)	159 766	83-88
SWALL:PTPG MOUSE Q05909 PROTEIN-TYROSINE	(1442)	161 242	83-88
SWALL:PTPG HUMAN P23470 PROTEIN-TYROSINE	(1445)	162 058	83-85

Die Molekulargewichte und die Position der homologen Sequenz im Protein entstammen den Detailinformationen, die man in FASTA 3 abrufen kann und wurden nachträglich in die Tabelle eingefügt.

Tabelle 11: Liste der Proteine mit Homologien zum Sequenz-Tag „QSPIDL“ der isolierten Mucus-CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens erstellt von „FASTA 3“ (Datenbank: Swall)

	AS-Anzahl	Molekular im gewicht [Da]	AS-Position Protein
SWALL:AAD29832 Aad29832 PUTATIVE CARBONI	(248)	28 642	40-45
SWALL:Q41953 Q41953 CYTOCHROME P450 (FRA	(135)	15 475	42-47
SWALL:CAB45895 Cab45895 CARBONIC ANHYDRA	(260)	29 948	76-71
SWALL:CAH6 SHEEP P08060 CARBONIC ANHYDRA	(307)	35 555	30-35
SWALL:CAH6 BOVIN P18915 CARBONIC ANHYDRA	(319)	37 006	42-47
SWALL:CAHC HUMAN O43570 CARBONIC ANHYDRA	(354)	39 451	55-60
SWALL:Q12953 Q12953 OXIDOREDUCTASE. 8/98	(370)	41 521	104-109
SWALL:DNAB HAEIN P45256 REPLICATIVE DNA	(504)	56 811	108-111
SWALL:VPS1 YEAST P21576 VACUOLAR SORTING	(704)	78 736	24-29
SWALL:AAC68921 Aac68921 T24C4.2 PROTEIN.	(423)	47 284	229-234
SWALL:C7B2 ARATH O65788 CYTOCHROME P450	(502)	57 038	165-170
SWALL:AAD31061 Aad31061 F3F19.10 PROTEIN	(502)	57 140	165-170
SWALL:O60420 O60420 PROTEIN TYROSINE PHO	(142)	15 933	20-25
SWALL:C7B4 ARATH O65786 CYTOCHROME P450	(504)	57 745	166-171
SWALL:G299612 G299612 CARBONIC ANHYDRASE	(27)	3086	10-15

Die Molekulargewichte und die Position der homologen Sequenz im Protein entstammen den Detailinformationen, die man in FASTA 3 abrufen kann und wurden nachträglich in die Tabelle eingefügt.

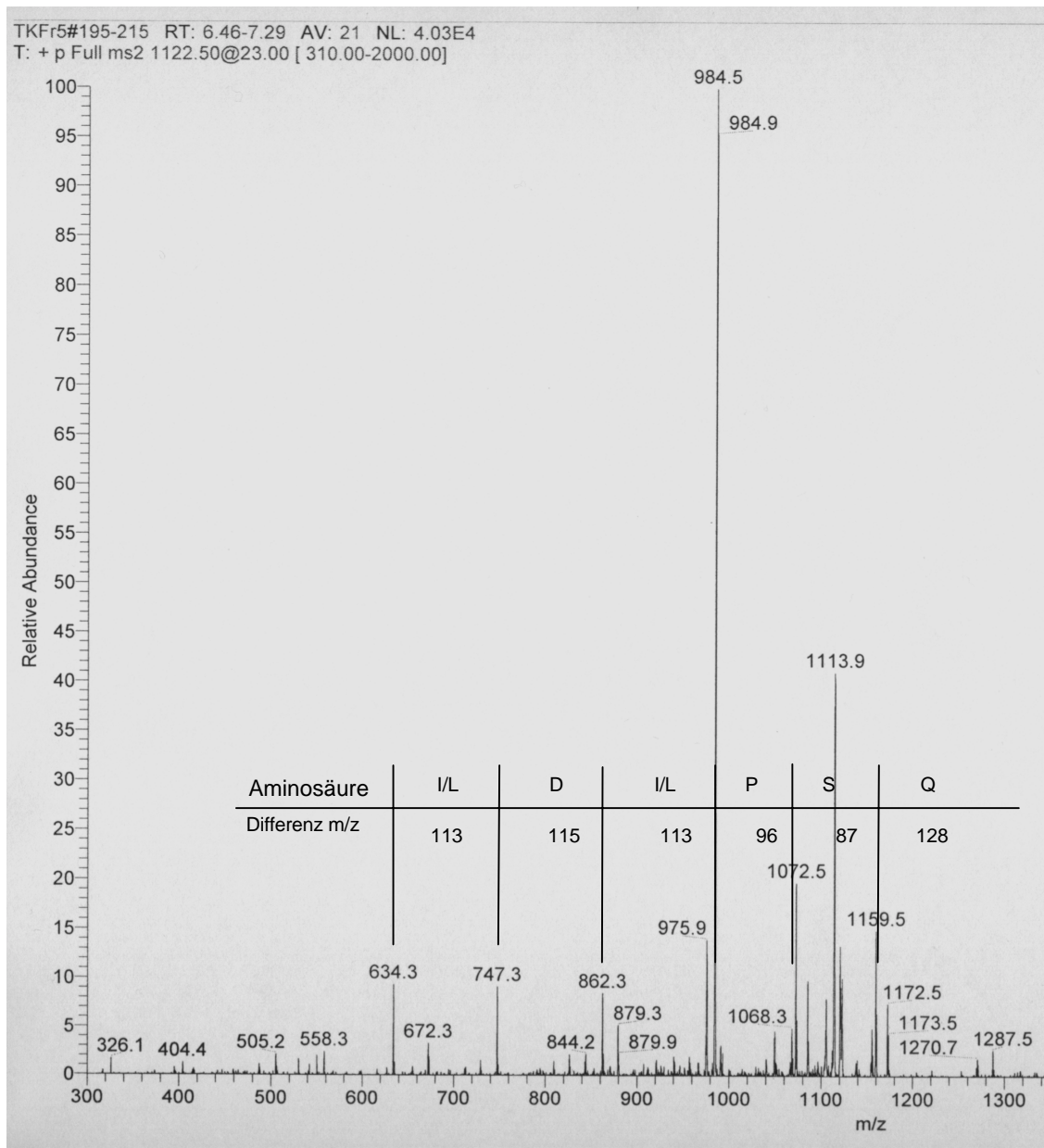
Tabelle 12: CA-Isoenzyme mit homologen Sequenzen zur isolierten Mucus-CA, ermittelt mit FASTA 3 in der Datenbank „Swiss Prot“, die in „Swall“ nicht erscheinen

Ergebnis FASTA 3	Sequenz	AS-Anzahl	Molekulargewicht [Da]	AS-Position im Protein
CAH ANASP P94170	QSPIDL	264	29 639	65-70
CAH6 MOUSE P18761	QSPIDL	317	36 348	45-50
CAH3 HORSE P07450	QSPIDL	259	29 380	27-32
CAH3 MOUSE P16015	QSPIDL	259	29 397	27-32
CAH3 RAT P14141	QSPIDL	259	29 300	27-32
CAH3 HUMAN P07451	QSPIDL	259	29 440	27-32
CAH ERWCA 052538	QSPIDI	244	26 773	52-57
CAH KLEBN 052535	QSPIDI	246	27 145	52-57
CAH/ HUMAN P43166	QSPIDI	264	29 658	30-35

Die Molekulargewichte und die Position der homologen Sequenz im Protein entstammen den Detailinformationen, die man in FASTA 3 abrufen kann und wurden nachträglich in die Tabelle eingefügt.

Die Suche in der Datenbank „Swiss Prot“ ergibt zusätzliche Proteine mit homologen Sequenzen, deren Molekulargewichte von dem der Mucus-CA abweichen. Neben den CA-Isoenzymen, die man aus der Datenbank „Swall“ erhält, findet man in dieser Datenbank weitere CA-Isoenzyme, die in **Tabelle 12** zusammengestellt sind.

Abb. 5.33: MS-Spektrum einer HPLC-Fraktion der tryptisch verdauten Mucus-CA



Die in das Spektrum eingefügte Tabelle enthält die Differenzen der m/z-Werte und die dazugehörigen Aminosäuren. I = Isoleucin; L = Leucin; D = Aspartat; P = Prolin; S = Serin; Q = Glutamin.

Abb. 5.33 zeigt zur vollständigen Dokumentation das Massenspektrum, aus dem die entsprechenden beiden Aminosäure-Sequenzen abgelesen wurden.

5.5. Membrangebundene CA im Dickdarm des Meerschweinchens

5.5.1. Biochemische Charakterisierung der isolierten apikalen und basolateralen

Membranvesikel aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen

5.5.1.1. Bestimmung der Enzymaktivitäten der CA, LDH und der Na⁺-/K⁺-ATPase

Für die enzymatische Charakterisierung der isolierten Membranvesikel wurden die Aktivitäten der CA, der LDH und der Na⁺-/K⁺-ATPase bestimmt. Die LDH diente als Marker für eine mögliche Kontamination der Vesikel mit cytosolischen Bestandteilen. Als Markerenzym für die basolateralen Membranen wurde die Na⁺-/K⁺-ATPase verwendet. Die Gewinnung von apikalen und basolateralen Vesikeln aus dem Dickdarm des Meerschweinchens erfolgte wie unter 4.1.1. beschrieben. Dabei wurden pro Darmabschnitt mehrere Präparationen durchgeführt. Lediglich bei den ersten beiden Präparationen erfolgte eine weitere Aufreinigung der basolateralen Membranen über einen Percoll-Gradienten und die Bestimmung der Na⁺-/K⁺-ATPase. Die Ergebnisse der Enzymmessungen sind in **Tabelle 13** dargestellt.

Die *spezifischen CA-Aktivitäten* in apikalen wie in basolateralen Vesikeln des Caecums und des proximalen Colons sind wesentlich größer als die in den Vesikeln des distalen Colons. Für die apikalen Vesikel sind die Aktivitäten im Caecum mit einem Mittelwert von 44 U*ml/mg 15,5fach höher als im distalen Colon mit einem Mittelwert von 2,85 U*ml/mg. Der Faktor zum proximalen Colon beträgt 4,6. Für die basolateralen Fraktionen erhält man ein ähnliches Ergebnis. Die spezifische CA-Aktivität im Caecum und im proximalen Colon liegt bei ca. 4,4 U*ml/mg, während sie für das distale Colon mit 0,76 U*ml/mg weniger als 1/5 hiervon beträgt. Die gemessenen *LDH-Aktivitäten* aller Membranfraktionen liegen zwischen 97 U/g und 353 U/g. Sie sind damit wesentlich geringer als in den bei der Präparation anfallenden Überständen. In diesen sind cytosolische Bestandteile enthalten, und die LDH-Aktivitäten liegen hier in der Größenordnung von 1000-2000 U/g (Einzeldaten hier nicht aufgeführt). Eine eindeutige Korrelation zwischen den CA- und den LDH-Aktivitäten ist wie in den Mucusproben von Meerschweinchen und Mäusen (siehe **Tabelle 2 und 8**) auch in den isolierten Membranvesikeln nicht erkennbar. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die gemessenen CA-Aktivitäten in den Membranvesikeln nicht auf die cytosolischen Isoenzyme CAI und CAII aus den Epithelzellen zurückzuführen ist.

Tabelle 13: Enzymatische Charakterisierung der apikalen und basolateralen Membranvesikel aus dem Dickdarm des Meerschweinchens

Fraktion	Präparation Nr.	spezifische CA-Aktivität [U*ml/mg]	spezifische LDH-Aktivität [U/g]	spezifische Na ⁺ -/K ⁺ -Aktivität [nmol P _i /mg*min]
BBMV (apikale Membranvesikel)				
<i>Caecum</i>	1	15,93	250	47,60
	2	11,17	139	7,45
	3	21,37	182	n. d.
	4	77,64	211	n. d.
	5	104,69	324	n. d.
<i>proximales Colon</i>	1	15,46	97	64,97
	2	11,04	95	41,59
<i>distales Colon</i>	1	2,78	250	299,62
	2	1,57	161	36,72
	3	4,84	353	n. d.
	4	3,71	140	n. d.
	5	1,37	245	n. d.
F2 basolaterale Membranvesikel				
<i>Caecum</i>	1	4,91	214	162,03
	2	4,01	125	187,68
<i>proximales Colon</i>	1	5,03	94	227,14
	2	3,73	112	62,08
<i>distales Colon</i>	1	0,81	159	257,36
	2	0,71	283	34,58

Es wurden insgesamt je fünf Präparationen für das Caecum und das distale Colon sowie zwei Präparationen für das proximale Colon wie unter 4.1.1. beschrieben durchgeführt. Lediglich bei den ersten beiden Präparationen erfolgte eine weitere Aufreinigung der basolateralen Membranen über einen Percoll-Gradienten und die Bestimmung der Na⁺-/K⁺-ATPase.

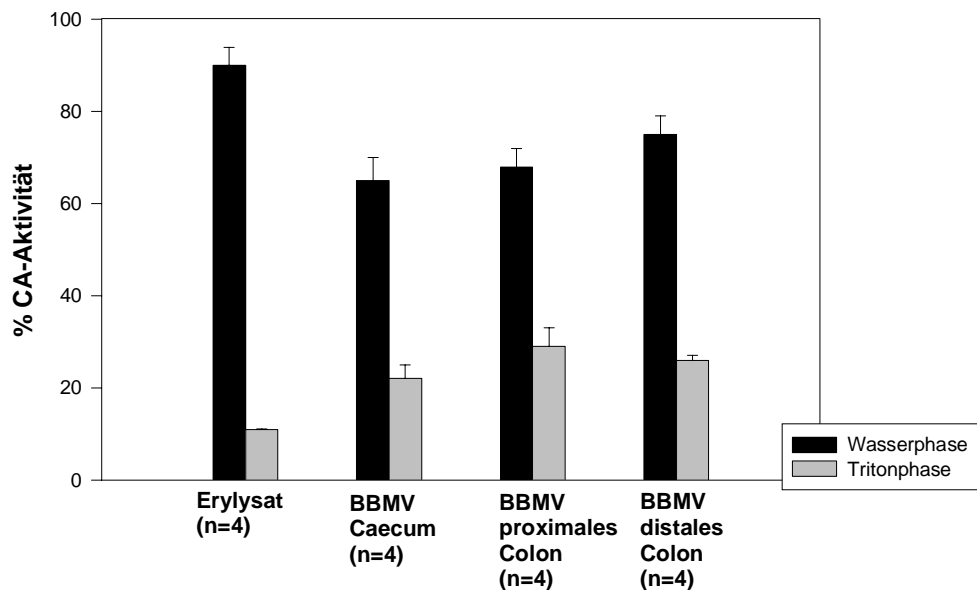
Die Aktivität der Na⁺-/K⁺-ATPase in den einzelnen Fraktionen schwankt stark und ergibt kein eindeutiges Bild. Lediglich für das Caecum läßt sich sagen, daß die Aktivitäten in den apikalen Vesikeln etwa sechsmal geringer sind als in den basolateralen Vesikeln. Ein ebenso undeutliches Bild ergibt der Vergleich der Messungen der Aktivität der Na⁺-/K⁺-ATPase in den

Fraktionen des Percoll-Gradienten (Einzeldaten hier nicht gezeigt). Die Aktivitäten in den Fraktionen F2 sind zwar für das Caecum und das proximale Colon bei allen Präparationen am höchsten, jedoch sind die Aktivitätsunterschiede zu den restlichen drei Fraktionen des Percoll-Gradienten nicht markant.

5.5.1.2. Verteilung der CA-Aktivität im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114

Abb. 5.34 zeigt die Ergebnisse der Phasenseparationsexperimente mit Triton X-114 für die apikalen Membranvesikel aus dem Dickdarm des Meerschweinchens. Man findet für die Vesikel aller drei Darmabschnitte ca. 25% der Aktivität in der Tritonphase, während ca. 70% der Aktivität in der Wasserphase verbleiben. Anders als für die Mucusproben aus dem Dickdarm des Meerschweinchens und für das Rattenerythrozytenlysats läßt sich damit keine so eindeutige Aussage über eine cytosolische oder membrangebundene Herkunft machen.

Abb. 5.34: Verteilung der Aktivität der apikalen Membranvesikel vom Meerschweinchen im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114



Für die basolateralen Vesikel konnten aufgrund des wenigen vorhandenen Materials nur einzelne Experimente gemacht werden, die statistisch nicht auswertbar waren. Das Ergebnis ähnelt jedoch dem in den apikalen Vesikeln. Für das proximale Colon findet man einen Anteil der CA-Aktivität von 40% in der Tritonphase und 63% in der Wasserphase. Im Caecum liegen die Anteile bei 39% und 71%.

5.5.1.3. Hemmbarkeit der CA mit SDS

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der CA-Messungen in den apikalen Membranvesikeln nach Vorinkubation mit 0,2% SDS. Man erhält für alle drei Darmabschnitte eine Hemmung der CA-Aktivität in der Größenordnung von etwa 35%. Die Aktivität in den Membranvesikeln ist somit auf einen SDS-resistenten und einen SDS-empfindlichen Anteil zurückzuführen.

Für die basolateralen Membranvesikel konnten wie im Falle der Phasenseparationsexperimente mit Triton X-114 nur wenige Experimente durchgeführt werden. Man erhält für das Caecum eine 100%ige, für das proximale Colon eine 61%ige Hemmung.

Tabelle 14: Hemmung der CA-Aktivität in apikalen Membranvesikeln aus dem Dickdarm des Meerschweinchens mit 0,2% SDS

Darmabschnitt	Caecum	proximales Colon	distales Colon
Hemmung [%]	40 ± 23 (n=5)	37 ± 4 (n=3)	32 ± 17 (n=5)

Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

Als apikale Membranfraktion wurde die Fraktion BBMV der Vesikelpräparation gewählt.

5.5.1.4. Bestimmung des K_i -Wertes für Acetazolamid

Die Bestimmung des K_i -Wertes für die apikalen Membranvesikel ergibt im Caecum einen Wert von $2,2 \cdot 10^{-7}$ M, im proximalen Colon von $3,9 \cdot 10^{-5}$ M. Die Korrelationskoeffizienten liegen bei 0,92 und 0,98.

5.6. Immunhistochemische und histochemische Untersuchungen am Dickdarm vom Meerschweinchen

5.6.1. Untersuchungen mit Anti-CAI, -CAII, -CAIII und -CAIV verschiedener Spezies

Um eine Lokalisation der verschiedenen CA-Isoenzyme im Dickdarm des Meerschweinchens vorzunehmen, wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz an Gefrier- und Paraffinschnitten eine Reihe von Antikörpern gegen die verschiedenen Isoenzyme unterschiedlicher Spezies in mehreren Verdünnungen ausgetestet.

Die ausgetesteten Antikörper gegen die Isoenzyme der Ratte (CAII und CAIII von N. Carter und CAIV von W. S. Sly) zeigen in keiner der eingesetzten Verdünnungen (1:250, 1:750, 1:1000) eine Reaktion mit den Gewebeschnitten. Auch die Antikörper gegen humane CAI von N. Carter und CAIV von W. S. Sly reagieren in den oben genannten Verdünnungen weder mit den Gefrier- noch mit den Paraffinschnitten vom Dickdarm des Meerschweinchens. Lediglich mit Anti-human-CAIV von P. J. Wistrand erhält man eine positive Reaktion. In der fotografischen Dokumentation dieser Ergebnisse mit Anti-human CAIV von P. J. Wistrand sind die Kontrollschnitte, die mit den entsprechenden Präimmunsereen inkubiert wurden, mit dem Kleinbuchstaben „a“ hinter der Abbildungsnummer versehen.

Abb. 5.34-5.37 zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an *Gefrierschnitten*. Man erhält für die Gewebeschnitte aller drei Darmabschnitte (Caecum, proximales Colon, distales Colon) mit Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand) eine Anfärbung im Bereich der apikalen Membran, nicht aber des Cytoplasma der Epithelzellen. Auch die Becherzellen, die den Mucus enthalten, fluoreszieren nicht. Es handelt sich bei der Anfärbung

um eine Markierung einer scheinbar dem Epithel aufgelagerten Substanz, die auch in den Krypten vorhanden ist. Man kann keine kontinuierliche Anfärbung der Epitheloberfläche erkennen. Es gibt neben Bereichen, die eine sehr dicke Auflage aufweisen, Abschnitte, in denen eine Fluoreszenz komplett fehlt. Weiter kann man erkennen, daß sogar breite Kryptenzwischenräume z. T. vollständig mit einer fluoreszierenden Substanz ausgefüllt sind.

Die Ergebnisse für die immunhistochemischen Untersuchungen an *Paraffinschnitten* mit demselben Antikörper führen zu einem etwas anderen Ergebnis. Wie die **Abb. 5.38 und 5.39** zeigen, findet man auch hier im Caecum und im proximalen Colon keine Anfärbung der Epithel- und Becherzellen. Die Anfärbung im apikalen Bereich des Epithels stellt sich als schmaler Saum auf dem Epithel dar, der ein höheres Maß an Kontinuität als bei den Gefrierschnitten aufweist. Aber auch auf den Paraffinschnitten gibt es Bereiche, die keine Fluoreszenz in diesem Bereich zeigen (auf den hier gezeigten Fotos nicht sichtbar). Man findet ebenfalls die schmalen Kryptenzwischenräume vollständig mit einer fluoreszierenden Substanz ausgefüllt vor. Der auffälligste Unterschied zwischen Gefrier- und Paraffinschnitten besteht jedoch in der Stärke der aufgelagerten Schicht. Sie ist auf den Paraffinschnitten sehr viel schmaler als auf den Gefrierschnitten. Für das distale Colon ist das Ergebnis der Markierung an Paraffinschnitten vollständig negativ (**Abb. 5.40**).

5.6.2. Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit Phospholipase C

Um eine möglicherweise vorhandene membrangebundene CAIV aus den Membranen des Gewebes der Gefrierschnitte zu entfernen, wurden diese vor der Markierung mit Phospholipase C behandelt. Die Positivkontrolle für das Experiment erfolgte mit Gefrierschnitten vom Musculus soleus der Ratte, deren Kapillaren bekannterweise CAIV enthalten (SENDER ET AL. 1994). Als Negativkontrolle wurden Gefrierschnitte beider Gewebe verwendet, die anstatt mit Phospholipase C vor der Markierung mit 10mM Tris/HCl pH 7,4 inkubiert wurden. Diese sind mit dem Kleinbuchstaben „a“ hinter der entsprechenden Abbildungsnummer versehen.

Wie **Abb. 5.42** zeigt, verschwindet die Fluoreszenz der Kapillaren auf den Gefrierschnitten des Musculus soleus der Ratte nach Vorinkubation mit Phospholipase C vollständig. Dagegen läßt sie sich beim Caecum des Meerschweinchens lediglich reduzieren (siehe **Abb. 5.41**), aber nicht vollständig entfernen.

5.6.3. Untersuchungen mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Antikörper gegen CAI und CAII vom Meerschweinchen zeigten erst bei einer Verdünnung von 1:5 eine Reaktion mit den Paraffinschnitten vom Dickdarm des Meerschweinchens. Die Ergebnisse sind in den **Abb. 5.43-5.57** dargestellt, und der Kleinbuchstabe "a" hinter der Abbildungsnummer kennzeichnet auch hier die jeweilige Kontrolle mit dem Präimmunserum. Im Gegensatz zu Anti-human-CAIV (siehe 5.6.1.) färben beide Antikörper keine aufgelagerte Schicht auf dem Epithel, sondern die Epithelzellen selbst an. Die Becherzellen, die den Mucus enthalten, fluoreszieren auch nach Inkubation mit diesen beiden Antikörpern nicht. Ebenfalls findet man die Kryptenzwischenräume frei von einer fluoreszierenden Substanz. Eine unterschiedliche Lokalisation von CAI und CAII ergibt sich aus diesen Ergebnissen nicht.

5.6.4. Mucinfärbung und Übersichtsfärbung mit Eosin-Hämalaun der Gewebeschnitte vom Dickdarm des Meerschweinchens

Um eine Veränderung in der Struktur der Mucusschicht zu ermitteln, wurden Mucinfärbungen vorgenommen. Es wurde Gewebe nach ein- bzw. zweimaligem Spülen des Darms gefärbt. Wie in den **Abb. 5.58 -5.61** zu sehen, ist nach dem ersten Spülschritt noch Mucus auf dem Gewebe aufgelagert, welcher im zweiten Spülschritt entfernt werden kann.

6. Diskussion

6.1. Methodenkritik

6.1.1. Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln aus Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen

Die Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln erfolgte in Anlehnung an die Methode von DEL CASTILLO & ROBINSON (1982). Das Verfahren hat gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Methoden den Vorteil, daß beide Membranfraktionen relativ schnell und unkompliziert aus demselben Ausgangsmaterial gewonnen werden können.

Als *Markerenzym* für die Fraktion der *basolateralen Membranen* wurde die Aktivität der $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ bestimmt, die in basolateralen Membranen auch des Colons (VENGESA & HOPFER, 1979) lokalisiert ist. Für dieses Enzym konnte bei der Präparation von basolateralen Membranvesikeln aus dem Dünndarm des Meerschweinchens von DEL CASTILLO & ROBINSON (1982) eine 12,5fache Anreicherung erzielt werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch BIBER ET AL. (1983) mit einer 8-12fachen Anreicherung für Membranen aus dem Dickdarm des Meerschweinchens sowie SCALERA ET AL. (1980), die sogar eine 20fache Anreicherung in Dünndarmvesikeln der Ratte zeigen konnten. Die in dieser Arbeit erzielten Anreicherungsfaktoren der $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivitäten in den basolateralen Membranfraktionen sind geringer als die in der Literatur angegebenen Werte. Sie betragen in den beiden Präparationen vom Caecum 11,1 und 6,5. Für das proximale Colon sind sie mit 7,3 und 3,6 ebenso wie für das distale Colon mit 2,6 und 1,5 noch geringer als die in der Literatur beschriebenen Werte.

Auch die Absolutwerte der spezifischen Aktivitäten der $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ in den basolateralen Membranen dieser Arbeit sind geringer als die in der Literatur beschriebenen Werte. Sie liegen in den vier Fraktionen nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation dieser Arbeit alle in der Größenordnung von ca. 150 nmol $\text{P}_i/\text{mg}\cdot\text{min}$. Die spezifischen Aktivitäten in den Membranfraktionen aus dem Dickdarm des Meerschweinchens von BIBER ET AL. (1983) liegen mit 1010 nmol $\text{P}_i/\text{mg}\cdot\text{min}$ um den Faktor 7 höher als in dieser Arbeit. DEL CASTILLO & ROBINSON (1982) erzielten in ihrer basolateralen Membranfraktion aus dem Dünndarm des

Meerschweinchens zwar nur eine etwa dreifach so hohe Aktivität von 538 nmol P_i /mg*min, diese war damit aber deutlich größer als in den restlichen Fraktionen des Gradienten. Die Aktivitäten innerhalb der einzelnen Präparationen dieser Arbeit sind zwar jeweils in der Fraktion mit den basolateralen Vesikeln (F2) am höchsten, jedoch sind die Unterschiede zu den restlichen drei Fraktionen des Gradienten sehr viel geringer als bei DEL CASTILLO & ROBINSON (1982).

Die Identifizierung der *apikalen Membranfraktion* erweist sich als schwierig, da ein geeignetes *Markerenzym fehlt*. Während die alkalische Phosphatase als Markerenzym für die apikale Membran im Dünndarm verwendet wird (DEL CASTILLO & ROBINSON, 1982; BINDER ET AL., 1986; EICHHOLZ & CRANE, 1965; SCALERA ET AL. 1980), ist ihre Anwesenheit als solches im Dickdarm umstritten. VENGESA & HOPFER (1979) konnten das Enzym histochemisch in Colonocyten der Ratte nachweisen, und GUSTIN & GOODMAN (1981) haben eine Anreicherung der alkalischen Phosphatase bei der Isolierung von apikalen Membranvesikeln aus Colonocyten von Kaninchen und Ratte zeigen können. BINDER ET AL. (1986) konnten bei der parallelen Isolierung von apikalen Membranvesikeln aus Dünndarm und Dickdarm von Ratte und Kaninchen zwar für die Membranfraktion des Dünndarms eine deutliche Anreicherung finden, nicht aber für Membranen aus dem Dickdarm. BINDER ET AL. (1983) wiesen histochemisch und biochemisch nach, daß die alkalische Phosphatase in der apikalen Membran im Colon vom Meerschweinchen nicht vorhanden ist. Aufgrund des fehlenden Markers wurde daher in den apikalen Membranfraktionen dieser Arbeit lediglich die $Na^+/-K^+$ -ATPase bestimmt, um Verunreinigungen mit basolateralen Membranen auszuschließen. Die Ergebnisse in **Tabelle 13** zeigen, daß bei allen Präparationen eine gewisse Verunreinigung mit basolateralen Membranen vorhanden ist.

In den apikalen Membranfraktionen vom distalen Colon kann nicht nur eine $Na^+/-K^+$ -ATPase nachgewiesen werden, sie ist in diesem Darmabschnitt sogar ebenso groß wie in den basolateralen Membranfraktionen. Die Durchführung des ATPase-Assays in Abwesenheit von Na^+ ergibt dieselben Aktivitäten (Daten hier nicht gezeigt), so daß davon auszugehen ist, daß es sich bei der gemessenen Aktivität um die der $K^+/-H^+$ -ATPase handelt, die von GUSTIN & GOODMAN (1981) in der apikalen Membran des distalen Colons vom Meerschweinchen nachgewiesen werden konnte, während die $Na^+/-K^+$ -ATPase hier fehlt.

Sowohl in den apikalen wie auch den basolateralen Membranvesikeln liegen die LDH-Aktivitäten zwischen 97 und 353 U/g, was im Vergleich zu Aktivitäten von bis zu 2000U/g in

den cytosolischen Überständen der Präparation vergleichsweise niedrig ist und auf eine nur unwesentliche cytosolische Verunreinigung schließen läßt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Anreicherung von basolateralen Membranen in der Fraktion F2 im Caecum annähernd der anderer Arbeiten entspricht, während sie für das proximale Colon und das distale Colon etwas geringer ausfällt. Die Verunreinigung durch cytosolische Bestandteile ist nur minimal.

Die Anreicherung der apikalen Membranen konnte aufgrund des fehlenden Markers nicht überprüft werden. Wie für die basolateralen Vesikel ist auch in dieser Fraktion nur eine minimale cytosolische Verunreinigung festzustellen. Daneben konnte anhand der Aktivitäten der Na^+/K^+ -ATPase eine gewisse Kontamination mit basolateralen Membranen nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Aktivität der K^+/H^+ -ATPase in den apikalen Membranvesikeln aus dem distalen Colon ist jedoch davon auszugehen, daß die Fraktion überwiegend apikale Membranstrukturen enthält.

6.1.2. Isolierung von CAI und CAII aus dem Blut vom Meerschweinchen

CAI und CAII konnten mit verschiedenen Methoden aus dem Erythrozytenlysat vieler Spezies isoliert werden. Der erste Schritt der Isolierungsprozedur besteht stets in der Entfernung des Hämoglobins aus dem Erythrozytenlysat durch Chloroform-Ethanol-Extraktion oder Ionenaustauschchromatographie. Die CA stellt quantitativ betrachtet im Erythrozyten das zweithäufigste Protein nach dem Hämoglobin dar, welches 98% des Gesamtproteingehaltes ausmacht (ARMSTRONG ET AL., 1966). Da sich das Hämoglobin bei der Aufreinigung der CA-Isoenzyme als störend erweist, wird es zunächst entfernt. Für die anschließende Auftrennung der beiden CA-Isoenzyme werden ebenfalls unterschiedliche Methoden in der Literatur beschrieben: präparative Elektrophorese, Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie (ARMSTRONG ET AL., 1966).

Nach Dialyse der Ethanolphase konnten in dieser Arbeit im Mittel etwa 23% der CA des Erythrozytenlysats isoliert werden. Diese Ausbeute ist damit zwar um den Faktor 2 geringer als die in der Literatur beschriebenen Ausbeuten von ca. 50% (RICKLEY ET AL. 1963, CARLSSON ET AL., 1980), sie war aufgrund der großen zur Verfügung stehenden

Erythrozytenlysatzmengen jedoch für die weitere Aufreinigung ausreichend.

Die anschließende Trennung der CA-Isoenzyme mittels Affinitätschromatographie erfolgte nach WHITNEY (1974). Die beiden CA-Isoenzyme wurden mittels unterschiedlicher Puffer nacheinander von der Säule eluiert. Whitney erhielt bei der Rechromatographie für CAII einen einzelnen Peak an derselben Stelle wie im ersten Säulenlauf. Für CAI konnte er bei der Rechromatographie außer dem CAI-Peak einen kleinen Peak an der für die CAII spezifischen Stelle eluieren. Dieser wurde aufgrund seiner geringen spezifischen Aktivität jedoch nicht als CAII identifiziert. Die Ausbeute ist mit 90% angegeben (WHITNEY 1974).

Die Chromatogramme in dieser Arbeit ähneln denen von WHITNEY (1974). Das lange ausgezogene Ende des ersten CA-Peaks erforderte einen ausgiebigen Waschschriff, bevor mit der Elution der zweiten CA begonnen werden konnte. Die Rechromatographie des zweiten CA-Peaks ergibt ebenfalls einen einzelnen Peak an derselben Stelle wie im ersten Säulenlauf. Bei der Rechromatographie des ersten CA-Peaks erhält man auch in dieser Arbeit zwei Peaks, wobei der zweite Peak erheblich größer ist als bei Whitney. Die Ausbeute der vier Präparationen ist sehr unterschiedlich und liegt zwischen 7,5% und 84%.

Die biochemische Charakterisierung der eluierten Enzymfraktionen erfolgte durch Bestimmung der spezifischen CA-Aktivität und ihrer Hemmung mit 7mM KJ sowie elektrophoretisch über SDS-PAGE und über isoelektrische Fokussierung.

Die spezifischen Aktivitäten von CAI und CAII unterscheiden sich sehr stark voneinander, wobei CAII sehr viel höhere Aktivitäten aufweist als CAI. Für die CAII des Meerschweinchens konnte eine 18-20fach (CARTER & PARSONS, 1970A UND 1972) bzw. 40fach (CARTER & PARSONS, 1971) höhere Aktivität als für CAI nachgewiesen werden. Für die bovinen Isoenzyme beträgt der Faktor nur 10 (ABOU-REBYEH ET AL., 1991) und für die humanen Isoenzyme nur 5 (RICKLEY ET AL., 1963; SLY & HU, 1995). Die *spezifischen CA-Aktivitäten* der hier isolierten Enzymfraktionen für PIa und PIIb liegen mit 799 U/mg*ml und 897 U/mg*ml in derselben Größenordnung. Die Aktivität von PIIa ist mit 10029 U/mg*ml um das 11-12fache höher als in den beiden anderen isolierten Enzymfraktionen. Anhand dieser spezifischen Aktivitäten könnte man PIa in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WHITNEY (1974) als CAI identifizieren. Die hohe Aktivität von PIIa und die geringe Aktivität

von PIIb entsprechen nicht den Ergebnissen von WHITNEY (1974), der ein umgekehrtes Verhältnis der Aktivitäten dieser beiden Peaks erhielt.

Ein weiterer Unterschied zwischen den erythrozytären Isoenzymen ist ihre *Empfindlichkeit gegenüber Anionen*. CAI ist wesentlich sensitiver für Anionen als CAII. Die K_i -Werte für Chlorid unterscheiden sich beim Meerschweinchen mit 40mM für CAI und 400mM für CAII ebenso wie die humanen mit 28mM (CAI) und 200mM (CAII) um den Faktor 10 bzw. 7 (MAREN ET AL., 1976). Für KJ unterscheidet sich der K_i -Wert mit 0,5mM für CAI und 20mM für CAII (MAREN, 1977; MAREN ET AL., 1980) der beiden Isoenzyme sogar um den Faktor 40. Die Identifizierung der isolierten Enzymfraktionen erfolgte daher mit Hilfe der Hemmbarkeit der CA-Aktivität durch KJ. PIa läßt sich mit 7mM KJ zu 100% hemmen, wie man es für CAI mit einem K_i -Wert von 0,5mM erwarten würde. Dieses Ergebnis stimmt mit der niedrigen spezifischen Aktivität des Peaks und seiner vermuteten Identität als CAI überein. PIIa und PIIb dagegen zeigen nur eine 13- bzw. 19%ige Hemmung in Anwesenheit von 7mM KJ, wie man es für CAII erwarten würde. Anhand dieses Ergebnisses könnte man PIIa in Übereinstimmung mit der hohen spezifischen Aktivität als CAII identifizieren. Die Identität von PIIb dagegen ist aufgrund dieser nicht übereinstimmenden Befunde unklar.

Die elektrophoretische Charakterisierung mittels *SDS-PAGE* zeigt, daß alle drei Fraktionen nur eine einzelne Bande bei ca. 29kDa zeigen (siehe **Abb. 5.7**). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den ermittelten Molekulargewichten für die humanen Isoenzyme (RICKLEY ET AL., 1963) wie auch für die Isoenzyme der Ratte (CARTER ET AL., 1981) und das Meerschweinchen (CARTER & PARSONS, 1970A) überein, die mit 28kDa-30kDa angegeben werden.

Eine zusätzliche Identifizierung der beiden CA-Isoenzyme bietet die *isoelektrische Fokussierung*, da die isoelektrischen Punkte beider Enzyme weit auseinander liegen. Während der isoelektrische Punkt für CAI im sauren Bereich liegt, liegt er für CAII im alkalischen Bereich (siehe **Tabelle 15**).

Abb. 5.12 zeigt die isoelektrische Fokussierung der Einzel- sowie der gepoolten Enzymfraktionen aus dem Erythrozytenlysat vom Meerschweinchen. PIa ergibt für alle Fraktionen eine einzelne Bande im sauren Bereich in der Nähe der Anode, während man für PIIa eine Doppelbande im alkalischen Bereich nahe der Kathode erhält. Die

Proteinkonzentration von PIIb ist zu gering, um die Banden mit Silber anzufärben.

Tabelle 15: Isoelektrische Punkte für CAI und CAII verschiedener Spezies

Spezies	CAI	CAII	Literaturangabe
Mensch	5,7	7,4	RICKLEY ET AL, 1963
Mensch	6,6	7,4	ABOU-REHBYEH ET AL, 1991
Meerschweinchen	5,2	7,3	CARTER & PARSONS ET AL., 1970A,B

In Übereinstimmung mit der niedrigen spezifischen Aktivität sowie der 100%igen Hemmung mit KJ läßt sich PIa mit einem isoelektrischen Punkt im sauren Bereich als CAI identifizieren. PIIa ist mit einer 12fach höheren spezifischen Aktivität und einer 13%igen Hemmung mit 7mMKJ sowie einem isoelektrischen Punkt im alkalischen Bereich identisch mit CAII. Die Identität von PIIb bleibt unklar, da der isoelektrische Punkt aufgrund der geringen Proteinkonzentration nicht bestimmt werden konnte und die niedrige spezifische Aktivität zusammen mit der nur 19%igen Hemmung durch KJ kein eindeutiges Bild ergibt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mittels Affinitätschromatographie und Rechromatographie CAI und CAII in reiner Form aus Meerschweinchenblut isoliert werden konnten.

6.1.3. Gewinnung von Mucusproben aus dem Dickdarm verschiedener Spezies

Die Mucusproben aus dem Dickdarm von Meerschweinchen, Ratten und Mäusen wurden durch Spülen des Darmes mit Pufferlösung gewonnen. Dabei wurde in einem ersten vorsichtigen Spülschritt zunächst der Faeces entfernt. Mit dem zweiten, kräftigeren Spülen wurde der Mucus gewonnen, der mit der Lösung zusammen gesammelt wurde.

Um sicherzugehen, daß die im Mucus gemessene CA-Aktivität nicht aus abgeschilferten Epithelzellen stammt, wurde neben der CA-Aktivität auch die LDH-Aktivität als cytosolisches Markerenzym in den Mucusproben bestimmt. Die Ergebnisse sind in den **Tabellen 1 und 6** (Kapitel 5.3.) dargestellt. Sie zeigen, daß keine Korrelation zwischen den Aktivitäten der

beiden Enzyme in den Mucusproben besteht, so daß es sich bei der im Mucus gemessenen CA-Aktivität wahrscheinlich nicht um cytosolische CA handelt.

Ein weiterer Beleg hierfür sind die Ergebnisse im Probenmaterial der CAII-defizienten Mäuse (siehe Kapitel 5.3.), die deutliche Unterschiede zwischen Cytosol und Mucus aus ein und demselben Darmstück aufweisen. Während die CA-Aktivitäten im Cytosol bei den Wildtyp-Mäusen wesentlich höher sind als in den CAII-defizienten Tieren, ist im Mucus kein Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Genotypen zu beobachten. Wäre die Aktivität im Mucus auf eine cytosolische Kontamination zurückzuführen, so müßte auch in den Aktivitäten im Mucus zwischen den verschiedenen Genotypen ein Aktivitätsunterschied festzustellen sein.

Mit den histochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nach dem Entfernen des Faeces noch Mucusreste auf dem Epithel aufgelagert sind, die mit dem zweiten Spülschritt entfernt werden können (**Abb. 5.57 - 5.61**). Diese Ergebnisse belegen, daß die Spüllösung tatsächlich Mucus aus dem Dickdarm enthält.

6.2. Nachweis einer extrazellulären CA im Mucus des

Gastrointestinaltraktes

Massenspektrometrische Untersuchungen am intakten Colon vom Meerschweinchen von BÖLLERT (1996) haben gezeigt, daß sowohl im distalen wie im proximalen Colon neben einer intrazellulären auch eine hohe extrazelluläre CA-Aktivität vorhanden ist. Die intrazelluläre CA-Aktivität läßt sich auf die Isoenzyme CAI und CAII zurückführen, die bei verschiedenen Spezies in den Epithelzellen vom Colon nachgewiesen wurden. LÖNNERHOLM (1977) konnte CAI und CAII mittels der histochemischen Methode von HANSSON (1967) sowie anhand von Aktivitätsmessungen in den Epithelzellen des Meerschweinchen-Colons zeigen. Daneben gibt es immunhistochemische Untersuchungen, die die Existenz der CAI und CAII in den Epithelzellen des Colons vom Menschen (PARKKILA ET AL., 1994), der Ratte (FLEMING ET AL., 1995) und dem Rind (SASAKI ET AL., 1993) belegen. Für die von BÖLLERT (1996) gezeigte extrazelluläre CA ist möglicherweise teilweise auch die membrangebundene Isoform der CA (CAIV) verantwortlich, die für Mensch und Ratte (FLEMING ET AL., 1995)

immunhistochemisch in der apikalen Membran des Colons nachgewiesen wurde. Um zu klären, ob an der extrazellulären CA im Colon des Meerschweinchens CAIV beteiligt ist, wurden in dieser Arbeit apikale Membranvesikel aus dem Dickdarm des Meerschweinchens isoliert und auf CA untersucht.

6.2.1. CA in apikalen und basolateralen Membranvesikeln vom Dickdarm des Meerschweinchens

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Enzymmessungen in den apikalen und basolateralen Vesikeln aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen. Sowohl in den apikalen wie auch den basolateralen Vesikeln der drei untersuchten Darmabschnitte (Caecum, proximales und distales Colon) konnte eine CA-Aktivität nachgewiesen werden. Um zu zeigen, ob diese Aktivität auf CAIV zurückzuführen ist, wurde die Hemmung mit SDS, sowie die Verteilung der Aktivität im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114 untersucht.

CAIV ist aufgrund einer intramolekularen Disulfidbrücke bei Behandlung mit 0,2% SDS stabil und zeigt keinen Aktivitätsverlust (WAHEED ET AL., 1992; WHITNEY & BRIGGLE, 1982; WISTRAND & KNUUTTILA, 1989), während für die cytosolischen Isoenzyme CAI und CAII ein nahezu vollständiger Aktivitätsverlust zu beobachten ist. Wie die Ergebnisse in **Tabelle 13** zeigen, erhält man für die CA-Aktivität in den apikalen Membranvesikeln aller drei Darmabschnitte eine Hemmung mit 0,2% SDS, die in der Größenordnung von 35% liegt. Dies deutet darauf hin, daß in den Fraktionen mit den apikalen Membranvesikeln neben einer membrangebundenen CA, die ca. 65% der Gesamtaktivität ausmacht, noch ein Anteil einer CA-Aktivität vorhanden ist, die einen anderen Ursprung hat.

Ein ähnliches Bild ergeben die Phasenseparationsexperimente mit Triton X-114. BORDIER (1981) konnte zeigen, daß sich Membranproteine bei diesem Experiment mit der Tritonphase abtrennen lassen, während cytosolische Bestandteile in der Wasserphase verbleiben. Für die apikalen Membranvesikel können ca. 25% der Aktivität in der Tritonphase nachgewiesen werden, während die restliche Aktivität in der Wasserphase zu finden ist (**Abb. 5.34**). Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, daß in den apikalen Vesikeln neben einer membrangebundenen CA eine lösliche Komponente des Enzyms vorliegt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit SDS sowie mit Triton X-114 an den apikalen Membranvesikeln zeigen, daß im Caecum und im Colon des Meerschweinchens in der apikalen Membran eine membrangebundene CA existiert. Neben dieser CA enthalten die Vesikelfractionen noch eine CA-Aktivität, die auf eine lösliche Komponente zurückzuführen ist. Diese ist aufgrund der nur geringen Kontamination der Vesikel mit cytosolischen Proteinen (siehe Kapitel 6.1.1.) wohl nicht auf das Vorhandensein der cytosolischen CAI und CAII aus den Epithelzellen zurückzuführen. Als mögliche Quelle für die CA-Aktivität kommt der Mucus auf der apikalen Membran der Epithelzellen in Frage, der bei der Vesikelpräparation möglicherweise an der Membran haften bleibt. Diese Möglichkeit wurde durch die Entnahme von Mucusproben von verschiedenen Spezies und deren Untersuchung auf CA geprüft.

6.2.2. CA im Mucus des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die CA-Aktivitäten in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes der untersuchten Spezies. In allen getesteten Mucusproben konnten trotz der starken Verdünnung des Mucus mit der Spüllösung nennenswerte spezifische CA-Aktivitäten nachgewiesen werden. Nimmt man anhand der Proteinkonzentration des Mucus eine Abschätzung vor, so dürfte die absolute CA-Aktivität im nativen Mucus des Meerschweinchens für das Caecum bei 500U, für das proximale Colon bei 2000U und für das distale Colon bei 600U liegen. Diese Aktivitäten haben eine Größe, wie sie auch in vielen Zellen, z. B. Epithelien (BÖLLERT ET AL, 1996), gefunden werden. Sie sind damit als recht hoch einzuordnen, obwohl sie 10fach geringer sind, als die Aktivitäten in den Erythrozyten.

6.3. Herkunft der Mucus-CA

CA aus den Epithelzellen des Dickdarms: Beim gastrointestinalen Mucus handelt es sich um ein viskoelastisches Gel, das sich aus hochmolekularen Glykoproteinen, Wasser, Elektrolyten, Proteinen, Nahrungsresten, Bakterien und abgeschilferten Zellen zusammensetzt (GUTH, 1988). Um sicherzugehen, daß die CA im Mucus vom Dickdarm tatsächlich ein Mucusprotein darstellt und die Aktivität nicht möglicherweise auf CAI und CAII aus den abgeschilferten

Zellen zurückzuführen ist, wurde neben der CA-Aktivität die LDH-Aktivität im Mucus bestimmt.

Wie unter 6.1.3. dargestellt konnte weder in den Mucusproben aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen noch im Mucus der CAII-defizienten Mäuse eine Korrelation zwischen der Aktivität der CA und der LDH nachgewiesen werden, so daß eine cytosolische Herkunft der CA-Aktivität des Mucus auszuschließen ist. Außerdem sprechen die identischen CA-Aktivitäten im Mucus von Wildtypmäusen und CAII-defizienten Tieren sowie die ebenfalls identische Hemmung mit 7mM KJ im Mucus beider Genotypen (im Gegensatz zu den Unterschieden im Cytosol) gegen eine cytosolische Herkunft der CA-Aktivität im Mucus.

Bakterielle CA: Um eine bakterielle Herkunft der CA auszuschließen, wurden CA-Aktivitäten im Mucus des Dickdarms von keimfreien und normalen Ratten bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 5.1** dargestellt. Die Aktivität ist zwar im Mucus vom Caecum normaler Ratten höher, jedoch konnte im gepaarten t-Test keine Signifikanz ermittelt werden. Im proximalen Colon liegt die Aktivität der keimfreien Tiere sogar über der der normalen Tiere, wobei auch dieser Befund nicht signifikant ist. Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die CA im Mucus eine bakterielle Herkunft ausgeschlossen werden.

Sekretorische CA aus dem Speichel: PARKKILA ET AL. (1997) konnten in der Magenmucosa und dem Magensaft CAVI nachweisen, obwohl diese im Magen nicht exprimiert wird. Die Autoren vermuten, daß CAVI über den Schluckvorgang mit dem Speichel in den Magen gelangt und dort eine Schutzfunktion für das Epithel ausübt. In Western-Blot-Analysen mit Magensaftproben von vier Patienten konnte dieser Befund teilweise bestätigt werden. Wie **Abb. 5.23** zeigt, konnte in einer der Proben CAVI nachgewiesen werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß es sich bei der CA im Mucus des Dickdarms um verschluckte CAVI handelt, wurden Western-Blots mit humanem Colonmucus und Anti-human-CAVI von Parkkila durchgeführt. Wie **Abb. 5.22** zeigt, erhält man bei gleichen CA-Mengen in den aufgetragenen Proben nur für den Humanspeichel, der als Positivkontrolle dient, ein Signal bei 42kDa. Bei der Mucus-CA im Dickdarm handelt es sich demnach nicht um CAVI aus dem Speichel.

Da nachgewiesen wurde, daß die CA im Mucus vom Dickdarm nicht auf eine Kontamination mit abgeschilferten Epithelzellen zurückzuführen ist und sie weder aus dem Speichel stammt,

noch bakterieller Herkunft ist, ist davon auszugehen, daß es sich um ein originäres Mucusprotein handelt. Um die Herkunft und die Identität der Mucus-CA zu klären, wurde das Enzym aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens isoliert und anschließend charakterisiert.

6.4. Identität der Mucus-CA

6.4.1. Überprüfung der Identität der Mucus-CA mit bekannten Isoenzymen

Bisher konnten 13 Gene einer Genfamilie identifiziert werden, die eine Isoform der α -Carboanhydrase (CAI - CAXII, CAIV) codieren. Die Isoenzyme CAI - CAVI wurden in den letzten 30 Jahren aus vielen Geweben verschiedener Spezies isoliert. Ihre kinetischen und biochemischen Eigenschaften sowie ihre Lokalisation sind gut untersucht worden. Die Identifikation der in jüngster Zeit entdeckten Isoenzyme CAVII-CAXII und CAXIV erfolgte nur mit molekularbiologischen Methoden. Es konnten bisher nur die Gene identifiziert, nicht aber die dazugehörigen Proteine isoliert werden.

6.4.1.1. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAI

CAI zählt zu den cytosolischen Isoenzymen und konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Hierzu gehören u. a. das Dickdarmepithel, die Cornea, Schweißdrüsen, myoepitheliale Zellen und die Erythrozyten (SLY & HU, 1995). Ihre physiologische Bedeutung ist nicht eindeutig geklärt. CAI wird im Gegensatz zur CAII als „low-activity“-Form bezeichnet, da sie eine geringere spezifische Aktivität hat als CAII. Sie ist beispielsweise beim Meerschweinchen 18-20fach weniger aktiv als CAII (CARTER & PARSONS, 1970A UND 1972). Das Molekulargewicht der CAI verschiedener Spezies liegt zwischen 28kDa und 30kDa. Sie ist sensitiv für Sulfonamide und Anionen. Der K_i -Wert der humanen CAI liegt für Acetazolamid bei $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$ und für KJ bei 0,5mM (MAREN, 1980).

Für eine Identität der Mucus-CA mit CAI könnte sprechen, daß es sich bei der Mucus-CA

ebenso wie bei CAI um ein lösliches Isoenzym handelt, welches im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114 in der Wasserphase wiederzufinden ist. Das Molekulargewicht der aus dem Caecum vom Meerschweinchen isolierten Mucus-CA von 29kDa ähnelt ebenfalls dem der CAI. Auch die Western-Blot-Analysen mit dem Mucus aus dem Dickdarm der Ratte mit Anti-Ratten-CAI (**Abb. 5.26**) scheinen auf eine mögliche Identität der Mucus-CA mit CAI hinzuweisen.

Gegen eine Identität der Mucus-CA mit CAI sprechen jedoch die Untersuchungen an den CAII-defizienten Mäusen, der niedrigere K_i -Wert für Acetazolamid sowie die Western-Blot-Analysen mit humanem Probenmaterial. Aufgrund des niedrigen K_i -Wertes der CAI für KJ von 0,5mM im Vergleich zu 20mM für CAII (MAREN ET AL., 1976) konnte die Restaktivität im Erythrozytenlysat wie auch im Cytosol vom Dickdarm der CAII-defizienten Mäuse mit 7mM KJ vollständig gehemmt werden. In den Wildtyp-Mäusen, die neben CAI noch CAII enthalten, welche weniger sensitiv für KJ ist, betrug die Hemmung mit 7mM KJ dagegen nur ca. 50%. Würde es sich bei der Mucus-CA um CAI handeln, so würde man für den Mucus der beiden Genotypen dasselbe Ergebnis erwarten. Die Hemmung mit 7mM KJ beträgt jedoch für den Mucus der Wildtyp- wie für die CAII-defizienten-Mäuse 45-50%, was ebenfalls gegen eine Identität der Mucus-CA mit der CAI spricht. Die aus dem Caecum vom Meerschweinchen isolierten Mucus-CA läßt sich mit 7mM KJ ebenfalls nicht vollständig, wie für CAI zu erwarten, sondern nur zu 36% hemmen. Auch der K_i -Wert für Acatazolamid im Mucus vom Dickdarm des Meerschweinchens ist mit $7,6 \cdot 10^{-9} \text{M}$ zu hoch, um eine Identität der Mucus-CA mit CAI möglich erscheinen zu lassen. Western-Blots mit Mucus aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen und Anti-Meerschweinchen-CAI (**Abb. 5.18**) ergaben eine sehr viel schwächere Reaktion als für das Antigen mit gleicher CA-Menge. Dies zeigt, daß die Mucus-CA mit Anti-Meerschweinchen-CAI kreuzreagiert, nicht aber identisch ist mit CAI. Schließlich konnte im Western-Blot mit humanem Colonmucus mit Anti-human-CAI bei gleichen aufgetragenen CA-Mengen nur eine Reaktion im Erythrozytenlysat, nicht aber im Colonmucus gefunden werden.

6.4.1.2. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAII

CAII stellt das am weitesten verbreitete Isoenzym der Carboanhydrase dar. Man findet sie im Cytosol verschiedenster Zelltypen in nahezu allen Organen und Geweben (SLY & HU, 1995).

Die physiologische Funktion ist entsprechend ihrer weiten Verbreitung sehr vielseitig. So unterstützt sie beispielsweise in den Erythrozyten, in der Lunge und im proximalen Nierentubulus den CO₂-Austausch. Im Magen ist sie an der Säuresekretion beteiligt, in anderen Zellen wiederum spielt sie eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichtes (SLY & HU, 1995). Mit einer Wechselzahl von 10⁶ sek⁻¹ ist CAII eines der aktivsten Enzyme in biologischen Systemen überhaupt, sie wird deshalb auch als „high-activity“-Form bezeichnet. Sie hat ebenfalls ein Molekulargewicht von 30kDa und ist sensitiver als CAI gegenüber Sulfonamiden, dafür aber unempfindlicher für verschiedene Anionen (CARTER & PARSONS, 1972; SLY & HU, 1995; MAREN, 1976). Der K_i-Wert humaner CAII liegt für Acetazolamid bei 1*10⁻⁸M, für KJ bei 20mM (MAREN, 1980).

Wie für die CAI käme eine Identität der Mucus-CA mit der CAII aufgrund des übereinstimmenden Molekulargewichtes und des Verhaltens im Phasenseparationsexperiment sowie den Western-Blot-Analysen mit Mucus aus dem Dickdarm der Ratte mit Anti-Ratten-CAII (**Abb. 5.27**) in Frage. Daneben zeigt die Mucus-CA eine ähnliche Empfindlichkeit für Acetazolamid und KJ wie CAII.

Ebenso wie im Fall der CAI sprechen die Ergebnisse im Probenmaterial der CAII-defizienten Mäuse, wie auch der Western-Blot mit humanem Colonmucus jedoch gegen das Vorhandensein von CAII im Mucus vom Dickdarm. **Tabelle 6** zeigt, daß die spezifische CA-Aktivität im Erythrozytenlysat wie im Cytosol der Dickdarmzellen bei den CAII-defizienten Mäusen stark reduziert ist, was auf das Fehlen von CAII zurückzuführen ist. Im Mucus dagegen kann kein signifikanter Unterschied der spezifischen Aktivitäten zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden, so daß es sich hier nicht um CAII handeln kann. Western-Blots mit Mucus vom Meerschweinchen und Anti-Meerschweinchen-CAII ergeben wie im Fall der CAI zwar eine Kreuzreaktion, es handelt sich aufgrund der geringeren Intensität des Signals verglichen mit dem Signal für das Antigen mit gleicher CA-Menge aber nicht um CAII. Der in **Abb. 5.24** dargestellte Western-Blot mit humanem Colonmucus und Anti-human-CAII zeigt lediglich für das Erythrozytenlysat, nicht aber für den Colonmucus eine Reaktion bei 30kDa, obwohl die aufgetragenen CA-Mengen beider Proben identisch sind. Auch dieses Ergebnis schließt die Identität der Mucus-CA mit CAII aus.

6.4.1.3. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAIII

CAIII zählt ebenfalls zu den cytosolischen Isoenzymen und kommt wie CAI nur in bestimmten Geweben vor. Große Mengen findet man im Cytosol vom roten Skelettmuskel. Sie ist hier für eine Beschleunigung des Transportes von CO₂ verantwortlich (GROS & DODGSON, 1988). Weiter findet man CAIII in Adipozyten und in geringen Mengen in der Lunge, im Herzen, in der Niere und den Erythrozyten (GROS & DODGSON, 1988; CARTER, 1982) sowie den Epithelzellen im Dickdarm (SPICER ET AL., 1990). Ihre spezifische Aktivität beträgt nur 1% der Aktivität der CAII und ist damit noch niedriger als die der CAI (CARTER ET AL., 1981; CARTER ET AL., 1982). Im Gegensatz zur CAI und CAII zeichnet sich CAIII durch ihre Resistenz gegenüber Sulfonamiden aus. Ihr K_i-Wert für Acetazolamid ist 10000fach größer als für CAII (CARTER ET AL., 1981) und wurde für das Isoenzym der Ratte mit 1*10⁻⁴M ermittelt (SANYAL ET AL., 1982).

Sowohl das übereinstimmende Molekulargewicht wie auch die Tatsache, daß es sich bei der Mucus-CA und der CAIII um lösliche Enzyme handelt, könnten eine mögliche Identität der Mucus-CA mit CAIII bedeuten. Die hohe Affinität der Mucus-CA für Sulfonamide mit einem K_i-Wert von 7,6*10⁻⁹M schließt dies jedoch eindeutig aus, da sich die CAIII von den übrigen Isoenzymen durch ihre sehr niedrige Affinität zu Sulfonamiden mit einem K_i-Wert von 10⁻⁴ M unterscheidet.

6.4.1.4. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAIV

CAIV stellt ein membrangebundenes Glykoprotein dar, welches über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker in der Membran befestigt ist und zwei N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten hat (SLY & HU, 1995; WAHEED ET AL., 1992). Das Isoenzym wurde erstmals aus der Rinderlunge isoliert, konnte aber auch in verschiedenen Abschnitten des Nierentubulus, im Gehirn, im Skelettmuskel, in der Leber, im Kapillarendothel sowie im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (SLY & HU, 1995). Die Funktion ist je nach Lokalisation unterschiedlich. In der Niere erleichtert CAIV die Absorption von Bicarbonat und trägt zur Aufrechterhaltung des CO₂- oder HCO₃⁻-Equilibriums bei (BROWN ET AL., 1990). In der Lunge unterstützt sie den CO₂-Austausch (ZHU & SLY, 1990; SLY & HU, 1995). Des

weiteren vermittelt sie an verschiedenen Membranen die Translokation von H^+ und HCO_3^- (FERNLEY, 1988C; MAREN, 1980). CAIV zählt wie CAII zu den „high-activity“ Enzymen und ähnelt kinetisch der CAII (ZHU & SLY, 1990). Die Angaben über das Molekulargewicht liegen je nach Spezies zwischen 36kDa und 68kDa, was in den unterschiedlich großen Oligosaccharidketten begründet ist (SLY & HU, 1995). Mit Ausnahme des humanen Isoenzym, welches ein Molekulargewicht von 36kDa und keine Oligosaccharidkette hat, läßt sich das Molekulargewicht der CAIV aller Spezies durch Inkubation mit Endoglykosidase F auf 36kDa reduzieren (WAHEED ET AL., 1992). Mit einem K_i -Wert von $7 \cdot 10^{-8} M$ für Acetazolamid sowie einer relativen Resistenz gegenüber Anionen ähnelt sie ebenfalls der CAII (MAREN, 1980). Im Gegensatz zu den restlichen Isoenzymen ist die membrangebundene CA aufgrund einer intramolekularen Disulfidbrücke stabil gegen SDS (SLY & HU, 1995; MAREN, 1980; ZHU & SLY, 1990; WHITNEY & BRIGGLE, 1982).

Eine Identität der Mucus-CA mit CAIV kann aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften sowie der Western-Blot-Analysen ausgeschlossen werden. Ihr Molekulargewicht ist mit ca. 29kDa identisch mit dem der cytosolischen Isoenzyme, liegt aber deutlich unter dem für die CAIV ermittelten Werte, der für das Meerschweinchen beispielsweise mit 42kDa angegeben wird (WAHEED ET AL., 1992). Wie **Abb. 5.2** zeigt, stellt die Mucus CA ein lösliches Isoenzym dar, welches im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114 in die Wasserphase und nicht wie CAIV in die Tritonphase wandert (BRUNS & GROS, 1992). Auch die für CAIV charakteristische Resistenz gegen SDS konnte für die Mucus-CA nicht gefunden werden. **Tabelle 3** zeigt, daß die CA im Mucus vom Meerschweinchen und der Maus mit 0,2% SDS vollständig gehemmt wird. Weiter zeigen die Western-Blot-Analysen mit humanem Colonmucus sowie mit Mucus-Proben aus dem Meerschweinchendarm, daß eine Identität der Mucus-CA mit CAIV ausgeschlossen werden kann. In **Abb. 5.23** zeigen nur die Endothelzellen aus dem Humanherzen mit Anti-human-CAIV eine Reaktion bei 35kDa, was dem Molekulargewicht der humanen CAIV entspricht (WAHEED ET AL., 1992). Der humane Colonmucus reagiert bei gleicher aufgetragener CA-Menge dagegen nicht mit dem Antikörper. Der Western-Blot mit dem Mucus aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen mit Anti-human-CAIV von Wistrand (**Abb. 5.15**) ist dagegen natürlich weniger aussagekräftig. Man erhält im letzteren Fall für den Mucus aller drei Darmabschnitte eine Doppelbande bei ca. 66kDa. Zum einen stimmen diese nicht mit dem der Meerschweinchen-CAIV überein, zum anderen erhält man dieselbe Bande auch für das verwendete Gemisch an Molekulargewichtsmarkern. Anhand

der Western-Blot-Analysen mit Mucusproben aus dem Dickdarm der Ratte (**Abb. 5.28**) lassen sich keine Schlüsse über die Identität mit CAIV ziehen, da hier die CA-Mengen nicht ausreichend waren, so daß auch für die Positivkontrollen kein Signal zu erkennen ist.

6.4.1.5. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAV

CAV findet man ausschließlich in den Mitochondrien verschiedener Gewebe, wo sie in der Matrix lokalisiert ist (GROS & DODGSON, 1988; DODGSON ET AL., 1980). Sie stellt hier HCO_3^- für die Gluconeogenese und den Harnstoffzyklus zur Verfügung. CAV ähnelt in ihren kinetischen Eigenschaften der CAI, bezüglich ihrer Hemmung durch Sulfonamide der CAII (PARKKILA ET AL., 1999). Anders als die cytosolischen Isoenzyme CAI, II und III ist sie bei physiologischen Salzkonzentrationen nicht löslich. Ihr Molekulargewicht liegt ebenfalls bei 30kDa (GROS & DODGSON, 1988).

Wie für CAI, II und III schiene eine Identität mit CAV aufgrund des identischen Molekulargewichtes mit der Mucus-CA möglich. Da sie sich im Gegensatz zur CAV bei physiologischen Ionenstärken in Lösung bringen läßt, kann eine Identität wohl ausgeschlossen werden.

6.4.1.5. Mögliche Identität der Mucus-CA mit CAVI

CAVI ist ein sekretorisches Isoenzym, welches in den Speicheldrüsen produziert und in den Speichel sezerniert wird. Sie konnte aus den Speicheldrüsen vom Menschen (MURAKAMI & SLY, 1987; OGAWA ET AL., 1992; PARKKILA ET AL., 1996), dem Schaf (FERNLEY ET AL., 1988A; FERNLEY ET AL., 1979) und der Ratte (FELDSTEIN & SILVERMANN, 1984) isoliert werden. Ihr wird eine Bedeutung bei der Säureelimination im Mund zugeschrieben, während die CAII - die ebenfalls in den Speicheldrüsen vorkommt, nicht aber in den Speichel sezerniert wird - den Speichel mit HCO_3^- anreichert (PARKKILA ET AL., 1996). Zur Kinetik gibt es nur wenige Untersuchungen, die auf eine eher niedrige spezifische Aktivität hinweisen (OGAWA ET AL., 1992). Die Angaben der Molekulargewichte schwanken je nach Spezies. Für die humane CAVI wurde ein Molekulargewicht von 42kDa (MURAKAMI & SLY, 1987; OGAWA ET AL.,

1992) ermittelt. Für das Schaf wurde aus dem Speichel eine CAVI mit 45kDa (FERNLEY ET AL., 1988A), aus den Speicheldrüsen eine CA mit 238kDa (FERNLEY ET AL., 1979) bzw. 540kDa (FERNLEY ET AL., 1988B) isoliert. Die Empfindlichkeit der CAVI für Sulfonamide ist gering und für Anionen sehr hoch. Für das humane Isoenzym wurden K_i -Werte von $1,1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ für Acetazolamid und von $5,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ für KJ bestimmt (MURAKAMI & SLY, 1987).

Eine Identität der Mucus-CA mit CAVI kommt aufgrund der Messungen im Probenmaterial der CAII-defizienten Mäuse in Frage. Während für das Cytosol und den Mucus aus dem Dickdarm ein unterschiedliches Hemmverhalten gegenüber KJ sowie Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten gefunden werden konnten, decken sich die Ergebnisse im Mucus und im Speichel der Tiere. **Tabelle 6** zeigt, daß die spezifischen Aktivitäten im Speichel und im Mucus vom Dickdarm bei den Wildtyp- wie den CAII-defizienten Mäusen identisch sind, während sie im Erythrozytenlysat und im Cytosol der defizienten Tiere niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen liegen. 7mM KJ führt weder im Speichel noch im Darmmucus der defizienten Tiere zu einer vollständigen Hemmung, wie das im Erythrozytenlysat und dem Cytosol der Fall ist (**Tabelle 7**).

Wie unter 6.3. beschrieben konnte mit humanem Probenmaterial eine Identität der Mucus-CA mit CAVI im Western-Blot ausgeschlossen werden. Auch der in **Abb. 5.24** dargestellte Western-Blot mit Mucus aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen und Anti-human-CAVI steht im Einklang damit, daß es sich bei der Mucus-CA nicht um CAVI handelt. Auch hier konnte nur für die Positivkontrolle eine Reaktion gezeigt werden, was entweder die Identität mit CAVI ausschließt oder auf eine fehlende Kreuzreaktivität der Meerschweinchen-CAVI mit der humanen CAVI zurückzuführen ist. Daneben schließt das geringe Molekulargewicht der Mucus-CA im Vergleich zu den für CAVI bekannten Molekulargewichten das Vorkommen von CAVI im Mucus aus.

6.4.1.6. Mögliche Identität der Mucus CA mit CAVII-XII und XIV

Die Identifikation der Isoenzyme CAVII-CAXII und CAXIV erfolgte bisher nur mit molekularbiologischen Methoden anhand der Gene. Die dazugehörigen Proteine konnten noch nicht isoliert und identifiziert werden. Angaben zur Funktion haben spekulativen Charakter und

wurden aufgrund der Lokalisation der mRNA sowie der cDNA bei in-situ-Hybridisierungen sowie Northern-Blot-Analysen von Gewebshomogenaten vorgenommen. Die Eigenschaften von **CAVII** wurden an rekombinanten Enzymen der Maus (LAKKIS ET AL.;1996B; EARNHARDT ET AL., 1998) untersucht. Es handelt sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30kDa. CAVII zählt mit 4% der Aktivität von CAII zu den „low-activity“-Formen und zeigt eine hohe Affinität zu Acetazolamid (EARNHARDT ET AL., 1998; LAKKIS ET AL., 1996A). Wie CAVIII stellt CAVII eine hoch konservierte Isoform dar, die bei verschiedenen Spezies Homologien von über 90% aufweist (EARNHARDT ET AL., 1998; LAKKIS ET AL., 1996A; LAKKIS ET AL, 1996B). **CAVIII** ist wie **CAX** und **CAXI** ein akatalytisches Isoenzym, da aufgrund des fehlenden Histidins im Bereich des aktiven Zentrums kein Zinkatom gebunden werden kann. Anhand der Strukturanalyse des Gens wird für **CAXI** ein Protein mit 328 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 36kDa angenommen. Eine Signalsequenz deutet darauf hin, daß es sich um ein sekretorisches Isoenzym handelt (TÜRECI ET AL., 1998). **CAIX**, **XII** und **XIV** stellen Transmembranproteine dar, die aus vier Domänen bestehen: einer Domäne, die eine Signalsequenz enthält; einer, die große Homologie zu den CA-Isoenzymen aufweist; einem transmembranalen Teil; einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Die Molekulargewichte der Proteine wurden anhand der Genstruktur mit 51,5kDa für CAIX (PASTOREK ET AL., 1994), 39kDa für CAXII (IVANOV ET AL., 1998) und 37,6kDa für CAXIV (FUJIKAWA-ADCHI ET AL., 1999) kalkuliert. Aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums wurde für alle drei Isoformen eine katalytische Aktivität angenommen (IVANOV ET AL., 1998; PASTOREK ET AL., 1994). Daneben konnte für CAIX die Fähigkeit der Bindung von Zink nachgewiesen werden (PASTOREK ET AL., 1994).

Eine Identität der Mucus-CA mit CAVII, CAX und CAXI kann aufgrund ihrer fehlenden katalytischen Aktivität ausgeschlossen werden. Da es sich bei CAIX, CAXII und CAXIV um Transmembranproteine handelt, die zudem alle ein größeres Molekulargewicht als die isolierte Mucus-CA haben, kann das Vorhandensein dieser Isoenzyme im Mucus vom Dickdarm ebenfalls ausgeschlossen werden. Eine Identität mit CAVII kann anhand der bekannten Daten nicht eindeutig geklärt werden. Das rekombinante Protein hat ebenfalls ein Molekulargewicht von 30kDa. Auch die hohe Affinität zu Acetazolamid läßt eine Identität der beiden Enzyme möglich erscheinen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Mucus-CA den bekannten cytosolischen

Isoenzymen CAI, II, III, und VII sowie der mitochondrialen CAV stark ähnelt. Sie stellt ein lösliches Isoenzym mit einem Molekulargewicht von 29kDa dar. Ihre Affinität zu Sulfonamiden ist ähnlich hoch wie die der CAII, sie ist wie diese weniger sensitiv für KJ als CAI und nicht resistent gegen SDS. Ihre immunologischen Eigenschaften ähneln denen der CAI und CAII, so daß es zum Teil zu Kreuzreaktionen in Western-Blot-Analysen kommt. Eine Identität der Mucus-CA mit den cytosolischen Isoenzymen kann aufgrund der Western-Blot-Analysen mit humanem Colonmucus sowie den Untersuchungen an den CAII-defizienten Mäusen und seiner Löslichkeit bei physiologischen Ionenstärken jedoch ausgeschlossen werden. Eine Identität der Mucus-CA mit dem membrangebundenen Isoenzym CAIV ist aufgrund der fehlenden SDS-Resistenz sowie der Western-Blot-Analysen und den Ergebnissen der Phasenseparation mit Triton X-114 ausgeschlossen. Auch handelt es sich aufgrund des geringeren Molekulargewichtes und der Western-Blot-Analysen bei der Mucus-CA nicht um die sekretorische CAVI. Eine Identität mit den in jüngster Zeit entdeckten Isoenzymen VII-XII und XIV konnte aufgrund der fehlenden katalytischen Aktivität einiger Formen sowie der abweichenden Molekulargewichte ebenfalls ausgeschlossen werden. Daher liegt es nahe, daß es sich bei der CA im Mucus des Dickdarms um ein bisher noch nicht bekanntes Isoenzym handelt.

6.4.2. Identifizierung der isolierten Mucus-CA durch Sequenzierung mittels

Massenspektrometrie

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Sequenzanalysen der isolierten Mucus-CA deuten wie die biochemischen und immunologischen Untersuchungen darauf hin, daß es sich bei dieser um eine bislang unbekannte Isoform handelt. Die Mucus-CA weist die stark konservierten Sequenzen QSPIDI und QSPIDL auf, die bei nahezu allen CA-Isoenzymen an ähnlicher Stelle auftreten. Zusammen mit einer messbaren Aktivität in der isolierten Enzymfraktion identifiziert es diese als CA. Neben den konservierten Sequenzen konnten Bruchstücke gefunden werden, die zu keinem der bisher bekannten CA-Isoenzyme homolog sind, was darauf hinweist, daß die Mucus-CA eine unbekannte Isoform darstellt.

6.5. Immunhistochemie im Dickdarm vom Meerschweinchen

Die Lokalisation von CA im Dickdarm des Meerschweinchens erfolgte bisher nur mittels biochemischer Methoden sowie mit der histochemischen Methode von HANSSON (1967). Eine Unterscheidung der verschiedenen Isoenzyme ist mit diesen Techniken nur bedingt möglich. Die Differenzierung von CAI und CAII erfolgte durch den Einsatz von Acetazolamid, für das CAII eine höhere Empfindlichkeit aufweist als CAI. Daher wurden die in dieser Arbeit zur Identifizierung der Mucus-CA hergestellten Antikörper gegen CAI und CAII vom Meerschweinchen für die immunhistochemische Lokalisierung dieser Isoenzyme im Meerschweinchendarm verwendet. Daneben wurden die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen humane CAIV an Gefrier- und Paraffinschnitten vom Meerschweinchendarm auf eine Kreuzreaktivität mit dieser Spezies ausgetestet, um die Ergebnisse in den apikalen Membranvesikeln evtl. immunhistochemisch bestätigen zu können.

6.5.1. Lokalisation von CAI und CAII im Dickdarm vom Meerschweinchen

Die **Abb. 5.43-5.57** zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit Anti-Meerschweinchen-CAI und -CAII an Paraffinschnitten vom Dickdarm des Meerschweinchens. Mit beiden Antikörpern erhält man eine cytoplasmatische Anfärbung des Epithels in allen drei Darmabschnitten (Caecum, proximales Colon, distales Colon). Die Becherzellen sind im Gegensatz zu den Epithelzellen stets ungefärbt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit früheren Befunden überein. Biochemische Untersuchungen von CARTER & PARSSONS (1971, 1972) belegen die Existenz von CAI und CAII in den Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen. LÖNNERHOLM (1977) konnte histochemisch CAI und konnten Durch Vorinkubation mit Acetazolamid konnten CAII in den Epithelzellen des Dickdarms vom Meerschweinchen nachweisen LÖNNERHOLM ET AL. (1985) beim Menschen und (1988) bei der Ratte zeigen, daß CAII als apikaler Saum vorliegt, während CAI verteilt im Cytoplasma vorkommt. Auch beim Pferd (SASAKI ET AL., 1993) konnte die CAII überwiegend in der Nähe der apikalen Membran der Epithelzellen nachgewiesen werden. Eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Isoenzyme konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig festgestellt werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergeben sowohl mit Anti-Meerschweinchen-CAI wie auch -CAII eine gleichmäßige Anfärbung der Epithelzellen (**Abb. 5.43-5.57**). Hierzu

könnte evtl. die Kreuzreaktivität der beiden Antikörper mit dem jeweils anderen Isoenzym beitragen, welche im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (siehe 5.2.2.).

6.5.2. Lokalisation von CAIV im Dickdarm vom Meerschweinchen

Die Existenz der membrangebundenen CAIV in der apikalen Membran des Dickdarmepithels konnte bereits bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. FLEMING ET AL. (1995) zeigten beispielsweise immunhistochemisch und biochemisch die Existenz dieses Isoenzym in der apikalen Membran des Colons vom Menschen und von der Ratte.

Die Inkubation von Gefrier- und Paraffinschnitten vom Dickdarm des Meerschweinchens mit Anti-human-CAIV von Wistrand ergab eine Anfärbung im apikalen Bereich der Zellen. Diese stellt bei den Paraffinschnitten einen schmalen Saum im Bereich der apikalen Membran dar (**Abb. 5.38-5.42**), während sie auf den Gefrierschnitten eher wie eine dicke aufgelagerte Schicht erscheint (**Abb. 5.34-5.37**). Eine Vorinkubation der Gefrierschnitte mit Phospholipase C führt zu einer starken Abschwächung der Fluoreszenz, nicht aber zu ihrem vollständigen Verschwinden, wie für die Kapillaren des *M. soleus* der Ratte gezeigt werden konnte (**Abb. 5.41 und 5.42**). Diese Ergebnisse könnten dann mit den Befunden in den apikalen Membranvesikeln aus dem Dickdarm des Meerschweinchens übereinstimmen. Neben einer membrangebundenen CA konnte in Colonvesikeln eine lösliche CA nachgewiesen werden, die nicht aus dem Cytosol der Epithelzellen stammt, sondern vermutlich auf Mucusreste zurückzuführen ist. Wenn man eine Kreuzreaktivität des Antikörpers sowohl mit CAIV als auch mit der Mucus-CA vom Meerschweinchen annehmen könnte, dann wäre zu verstehen, daß durch Vorinkubation mit Phospholipase C der Teil der Fluoreszenz verschwindet, der auf das Vorhandensein von CAIV zurückzuführen ist. Die sehr viel geringere Stärke der apikalen Anfärbung auf den Paraffinschnitten könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Mucusschicht durch die Behandlung mit den verschiedenen Lösungsmitteln bei der Paraffineinbettung zum größten Teil abgelöst wird. Diese Deutung der immunhistochemischen Befunde mit Anti-human-CAIV ist allerdings hoch spekulativ.

6.6. Physiologische Bedeutung der Mucus-CA

Über die apikale Membran der Epithelzellen des Dickdarms von Säugetieren finden eine ganze Reihe von Transportprozessen statt, die in Verbindung mit der Hauptfunktion des Dickdarms, der Rückresorption von Elektrolyten und Wasser, stehen (PHILLIPS & DEVROEDE, 1979). Diese Transportprozesse beinhalten eine Reihe von HCO_3^- - und H^+ -sezernierenden Schritten (HOLTUG ET AL., 1992; GOLDFARB ET AL., 1988; LAVERTY ET AL., 1993). Eine intrazelluläre Bereitstellung dieser beiden Ionen sowie ihre Elimination auf luminaler Seite ist für die Transportprozesse ebenso von Bedeutung, wie die Beseitigung eines möglicherweise entstehenden Säure-Basen-Ungleichgewichts auf der apikalen Membran zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes sowie des extrazellulären pH-Mikroklimas.

Für die Resorption von Na^+ und Cl^- konnte von verschiedenen Autoren bei unterschiedlichen Spezies ein gekoppelter elektroneutraler Mechanismus nachgewiesen werden (BINDER & RAWLINS, 1973; SUZUKI & KANEKO, 1987; CARNEY ET AL., 1986), der in **Abb.6.1** dargestellt ist. Die Resorption erfolgt über einen Na^+/H^+ -Austauscher sowie über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in der apikalen Membran des Colons. Mittels der Hemmung des Resorptionsprozesses durch Acetazolamid konnte die Beteiligung der in den Epithelzellen vorhandenen CA belegt werden. Ihre Aufgabe soll in der Bereitstellung von HCO_3^- und H^+ für diesen Prozeß liegen. Über einen Mechanismus zur extrazellulären Eliminierung und der intrazellulären Regenerierung von HCO_3^- und H^+ finden sich kaum Angaben in der Literatur. Lediglich FLEMING ET AL (1995) postulierten eine Beteiligung der CAIV in der apikalen Membran des Dickdarms von Ratte und Mensch an diesem Prozeß. Die in dieser Arbeit gefundene Mucus-CA könnte extrazellulär eine ähnliche Funktion übernehmen wie CAI und CAII in den Epithelzellen. Sie würde HCO_3^- und H^+ extrazellulär zu CO_2 umsetzen, welches dann in die Epithelzellen diffundieren und dort von der intrazellulären CA wieder für den Resorptionsprozess zu HCO_3^- und H^+ umgewandelt werden könnte. Die Hemmung der Resorption von Na^+ und Cl^- durch Acetazolamid und die ähnlich hohe Affinität der Mucus-CA wie die der cytosolischen Isoenzyme für Acetazolamid lassen eine Beteiligung der Mucus-CA an diesem Prozeß möglich erscheinen.

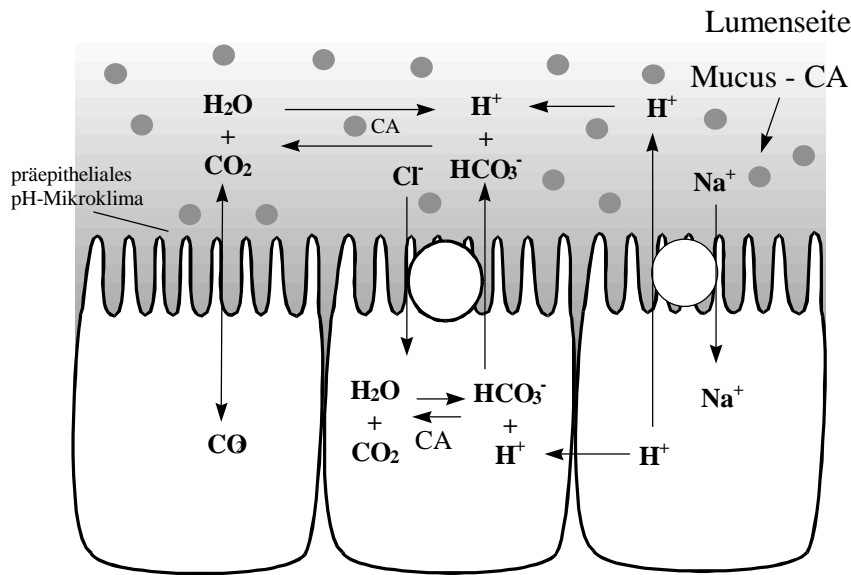


Abb. 6.1. Resorption von Na^+ und Cl^- im Dickdarm

Neben der Resorption von Elektrolyten und Wasser werden vom Dickdarmepithel auch kurzkettige Fettsäuren (SCFA) resorbiert. Diese entstehen durch den anaeroben Abbau von unverdauten Kohlehydraten durch Mikroorganismen, werden von den Epithelzellen resorbiert und zwecks Energiegewinn bereits hier zu einem großen Teil verstoffwechselt (CHU & MONTROSE, 1996; BÖLLERT, 1996). Der Energieanteil des SCFA-Stoffwechsels am Grundumsatz beträgt beim Meerschweinchen 31% (BÖLLERT, 1996). Obwohl über 90% der SCFA aufgrund ihrer pK-Werte von ca. 4,8 im Darmlumen als Anionen vorliegen, konnte ein Anteil für die nichtionische Diffusion im Colon vom Meerschweinchen von mehr als 50% nachgewiesen werden (VON ENGELHARDT ET AL., 1993). Die Autoren konnten zeigen, daß diese Aufnahme von undissoziierten SCFA an die luminalen Präsenz von H^+ , apikale H^+ -Transportprozesse und die intrazelluläre CA gebunden ist. Der Mechanismus ist in **Abb. 6.2.** dargestellt. Die intrazellulär aus der Hydratation von CO_2 bereitgestellten H^+ werden proximal über den in der apikalen Membran lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher, distal von der K^+/H^+ -ATPase in das Lumen sezerniert, wo sie sich an SCFA-Anionen binden, die dann über die Membran diffundieren können. BÖLLERT (1996) konnte für den undissoziierten Transport in der apikalen Membran des Meerschweinchens einen SCFA-/ HCO_3^- -Antiporter nachweisen. Auch für diesen Transportmechanismus spielt die intrazellulär vorhandene CA bei der Bereitstellung von HCO_3^- eine Rolle.

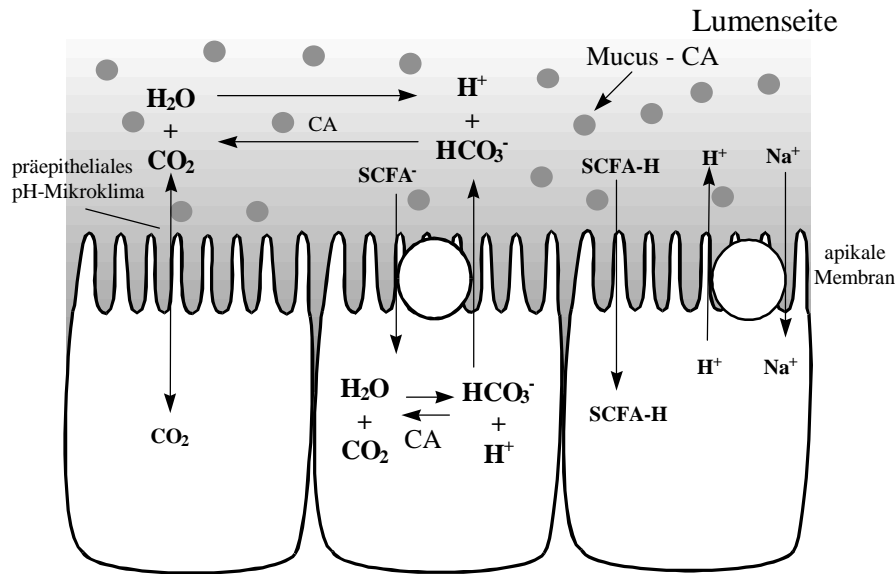


Abb. 6.2. Resorption von SCFA im Colon vom Meerschweinchen

Da die Fluxe von H⁺, HCO₃⁻ und SCFA keine feste Stöchiometrie aufweisen, wurde einer extrazellulären CA eine Bedeutung als Puffersystem zugeschrieben, die zur Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas wichtig sein könnte. FLEMING ET AL. (1995) postulierten bereits für die CAIV in der apikalen Membran von Ratte und Mensch eine Beteiligung an der Resorption von SCFA. Neben einer membrangebundenen CAIV erscheint auch das Vorhandensein einer CA im Mucus zum Ausgleich von entstehenden Säure-Basen-Ungleichgewichten nützlich. Daneben stellt sie möglicherweise zusätzlich zur intrazellulären CA Protonen für die Diffusion undissoziierter SCFA zur Verfügung. VON ENGELHARDT ET AL. (1994) fanden widersprüchliche Ergebnisse. Sie konnten zeigen, daß Acetazolamid - ein CA-Hemmstoff, der gut membrangängig ist - die Resorption von SCFA hemmt. Der extrazelluläre CA-Hemmstoff Prontosil-Dextran dagegen hat keinen Einfluß. Demnach wäre die Beteiligung der Mucus CA an diesem Prozeß ausgeschlossen. Es ist jedoch möglich, daß Mucus-CA durch Prontosil-Dextran nicht vollständig genug gehemmt wird.

Eine besondere Bedeutung könnte der Mucus-CA bei der Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas zukommen. Beim pH-Mikroklima handelt es sich um das Phänomen, daß trotz schwankender luminaler pH-Werte über einen Bereich von 5 bis 9 nahe der Epitheloberfläche ein konstanter pH-Wert gemessen werden kann, der im Colon je nach Spezies neutral bis leicht sauer ist (GENZ ET AL., 1997; MC NEIL ET AL, 1987, LAVERTY ET AL., 1993, SAID ET AL, 1986). Für das Meerschweinchen wurde für das proximale Colon ein Wert von 7,01 und für das distale Colon von 6,91 ermittelt (RECHKEMMER ET AL, 1986). Der Mechanismus, der zur

Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes nahe der Epitheloberfläche trotz der dort anfallenden Säuren und Basen führt, ist ungeklärt. Die Anwesenheit einer CA im Mucus im Zusammenhang mit den anfallenden H^+ und HCO_3^- im Zuge der zuvor beschriebenen Transportprozesse könnte hierbei jedoch eine wichtige Rolle spielen.

HOLTUNG ET AL. (1992) und SAID ET AL. (1986) postulierten eine Abhängigkeit des pH-Mikroklimas vom normalen Stoffwechsel der Epithelzellen, da eine Entkoppelung mit KCN bzw. Jodacetat eine Zerstörung des pH-Mikroklimas bewirkt. Bei der Annahme einer Beteiligung der Mucus-CA an der Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas könnte auch ihre Hemmung durch CN^- oder J für die Zerstörung des Mikroklimas eine mögliche Erklärung darstellen.

Ergebnisse von RECHKEMMER ET AL. (1986) dagegen konnten keine solche Abhängigkeit finden. Sie fanden, daß Acetazolamid keinen Einfluß auf das pH-Mikroklima hat, was eine Rolle der Mucus-CA bei der Aufrechterhaltung desselben ausschließt.

LIVINGSTONE ET AL. (1995) postulierten, daß aufgrund des geringen Diffusionskoeffizienten für HCO_3^- im Mucus vom Duodenum der Ratte bei großer luminaler Säurebelastung die Neutralisation der Protonen durch das sezernierte HCO_3^- erst in unmittelbarer Nähe der Epitheloberfläche erfolgen würde. Eine extrazelluläre CA im Mucus vom Dünndarm wurde zwar nicht untersucht, sie könnte aber dazu beitragen, daß bereits weiter luminal HCO_3^- zur Abpufferung von Protonen zur Verfügung gestellt werden.

Zusammenfassend erscheint die Carboanhydrase im Mucus vom Dickdarm für verschiedene physiologische Prozesse von Bedeutung zu sein. Sie eliminiert das bei der Na^+ und Cl^- extrazellulär anfallende HCO_3^- und H^+ , indem sie es zu CO_2 umsetzt, welches in den Zellen für den Resorptionsvorgang rehydratisiert wird. Daneben stellt sie im Zusammenhang mit H^+ und HCO_3^- ein effektives extrazelluläres Puffersystem dar, welches Säure-Basen-Ungleichgewichte ausgleicht, die u. a. im Zuge der SCFA-Resorption entstehen und trägt so mit zur Aufrechterhaltung des pH-Mikroklimas bei.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herkunft der **extrazellulären CA-Aktivität auf der mucosalen Seite des Dickdarms des Meerschweinchens** untersucht, die von BÖLLERT (1996) bei massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Hierzu wurden die apikalen Membranen der Epithelzellen des Dickdarms sowie der Mucus auf das Vorhandensein von CA untersucht.

Es wurden zunächst **apikale und basolaterale Membranvesikel** aus dem Dickdarm vom Meerschweinchen isoliert. Die Anreicherung der basolateralen Membranen wurde mittels der Na^+/K^+ -ATPase als Markerenzym überprüft. Als Markerenzym für die apikale Membranfraktion ist lediglich die K^+/H^+ -ATPase im distalen Colon des Meerschweinchens bekannt. Es konnte für beide Membrantypen eine Anreicherung gefunden werden, die allerdings geringer war als in der Literatur beschrieben. Die Verunreinigung mit cytosolischen Bestandteilen erwies sich als sehr gering. In den **apikalen Membranvesikeln** konnte die **Existenz einer membrangebundenen CAIV** für die drei untersuchten Darmabschnitte (Caecum, proximales und distales Colon) belegt werden.

Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit die **Existenz einer CA im gastrointestinalen Mucus von Meerschweinchen, Ratte, Maus und Mensch** nachgewiesen. Im Mucus der drei Abschnitte vom Dickdarm dieser Spezies als auch im humanen Magenmucus konnten erhebliche CA-Aktivitäten gemessen werden. Nach Abschätzungen dürften die absoluten Aktivitäten im nativen Mucus beim Meerschweinchen im Caecum bei 500 Units, im proximalen Colon bei 2000 Units und im distalen Colon bei 600 Units liegen. Die CA-Aktivität erwies sich als originärer Bestandteil des Mucus und ließ sich weder auf die Existenz abgeschilfterter Epithelzellen zurückführen noch ist sie bakterieller Herkunft oder stammt aus dem Speichel.

Mittels Affinitätschromatographie konnte die CA aus dem Mucus vom Caecum des Meerschweinchens isoliert werden. Bei der **Mucus-CA** handelt es sich um ein lösliches Isoenzym mit einem Molekulargewicht von 29kDa. Sie hat eine hohe Affinität zu Sulfonamiden und eine geringere Sensitivität für Anionen. Ihre immunologischen Eigenschaften ähneln stark denen der Isoenzyme CAI und CAII.

Die Überprüfung der **Identität der Mucus-CA** mit einem der bekannten Isoenzyme CAI-XII und CAXIV erfolgte anhand biochemischer Eigenschaften (Molekulargewicht, Hemmbarkeit mit Diamox, SDS und KJ, Verhalten im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114), Western-Blot-Analysen mit den hergestellten Antikörpern gegen Meerschweinchen-CAI und -

II und anderen Antikörpern sowie Untersuchungen an Probenmaterial von CAII-defizienten Mäusen. Im Zuge dessen wurde eine Methode entwickelt, um **CAI und CAII** aus den **Erythrozyten** vom **Meerschweinchen** erstmals in reiner Form zu **isolieren**. Diese wurden für die **Herstellung polyklonaler Antiseren** verwendet wurden, die zur Identitätsklärung der Mucus-CA vom Meerschweinchen eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse ergaben **keine Identität der Mucus-CA mit einem bekannten CA-Isoenzym**. Ein identisches Ergebnis erhielt man auch mittels **massenspektrometrischer Sequenzanalyse**. Neben zwei Sequenzabschnitten, für die in nahezu allen CA-Isoformen bei verschiedenen Spezies eine Homologie gefunden werden konnte, gab es Sequenzabschnitte, die in den Datenbanken keine Homologien zu bekannten Proteinen aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde damit gezeigt, daß im **Mucus** des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies eine **CA existiert**. Es wurde belegt, daß es sich bei dieser **Mucus-CA** um eine **bisher unbekannte Isoform der CA** handelt.

Der Mucus-CA könnte eine mögliche Rolle bei der Resorption von Na^+ und Cl^- zukommen. Diese erfolgt über einen gekoppelten elektroneutralen Prozeß via Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in der apikalen Membran der Epithelzellen im Dickdarm vom Meerschweinchen. Hier fallen demzufolge luminal H^+ und HCO_3^- an (SUZUKI & KANEKO, 1987), die von der Mucus-CA eliminiert werden können.

Bei der Resorption von SCFA in undissoziierter Form werden luminal Protonen benötigt, da die SCFA aufgrund von pK-Werten um 4,8 im Lumen dissoziiert vorliegen (VON ENGELHARDT, 1993). Die Resorption von SCFA in dissoziierter Form erfolgt über einen $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, so daß luminal HCO_3^- anfällt (BÖLLERT, 1996). Da diese Fluxes keine feste Stöchiometrie aufweisen, kann es zu einem Säure-Basen-Ungleichgewicht im Mucus nahe der apikalen Membran kommen. Für die Aufrechterhaltung des hier vorliegenden pH-Mikroklimas (GENZ ET AL, 1997) könnte eine extrazellulär vorhandene CA durch die Pufferung der anfallenden Säuren und Basen von Bedeutung sein.

8. Literaturverzeichnis

- Abou-Rebyeh, H., Josic, D. J., Gottschall, K., Schuhbert-Rehberg, K., Körber, F. (1991).** Purification of carbonic anhydrase isoenzymes by high-performance affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography. *J. of Chromatography* 566: 351-359
- Armstrong, J. McD., Myers, D. V., Veerporte, J. A., Edstall, J. T. (1966).** Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 21 (10): 5137-5149
- Biber, J., Rechkemmer, G., Bodmer, M., Schröder, P., Haase, W. (1983).** Isolation of basolateral membranes from columnar cells of the proximal colon of the guinea pig. *Biochim. & Biophys. Acta* 735: 1-11
- Bernstein, L. H. & Everse, J. (1979).** Determination of the isoenzyme levels of the lactate dehydrogenase. *Methods in enzymology* 41: 47-52
- Bernstein, R. S. & Schraer, R. (1972).** Purification and properties of an avian carbonic anhydrase from erythrocytes of gallus domesticus. *J. Biol. Chem.* 247 (4): 1306-1322
- Binder, H. J. & Rawlins, C. L. (1973).** Electrolyt transport across isolated large intestine. *Am J. Physiol.* 225 (5): 1232-1239
- Binder, H. J., Stange, G., Murer, H., Stieger, B., Hauri, H. P. (1986).** Sodium-proton exchange in colon brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* 250: G382-G390
- Böllert, P., Peters, T., Engelhardt, W., v., Gros, G. (1997).** Mass spectrometric determination of HCO_3^- permeability and carbonic anhydrase activity in intact guinea-pig colon epithelium. *J. Physiol.* 502 (3): 679-691
- Böllert, P. (1996).** Intrazelluläre Carboanhydrase-Aktivität und Bicarbonat-Permeabilität und deren Rolle bei der Resorption kurzkettiger Fettsäuren an den Epithelzellen des Meerschweinchendickdarms. Dissertation, Universität Hannover
- Böttcher, K. (1991).** Die Rolle der Carboanhydrase in den Kiemen der Strandkrabbe *Carcinus maenas*. Dissertation, Universität Hamburg
- Bordier, C. (1981).** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 (4): 1604-1607
- Brown, D., Zhu, X. L., Sly, W. S. (1990).** Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. Am.* 87 (19): 7457-7461
- Bruns, W., Dermitzel, R., Gros, G. (1986).** Carbonic anhydrase in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J. Physiol.* 371: 351-364
- Bruns, W. & Gros, G. (1992).** Membrane-bound carbonic anhydrase in the heart. *Am. J. Physiol.* 262, H577-H584

Carlsson, U., Kjellström, B., Antonsson, B. (1980). Purification and properties of cyclostome carbonic anhydrase from erythrocytes of hagfish. *Biochim. & Biophys. Acta* 612: 160-170

Carter, M. J. & Parsons, D. S. (1970A). The CA in some guinea pig tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 206: 190-192

Carter, M. J. & Parsons, D. S. (1970B). The purification and properties of carbonic anhydrase from guinea pig erythrocytes and mucosa of the gastrointestinal tract. *Biochem. J.* 120: 797-808

Carter, M. J. & Parsons, D. S. (1971). The isoenzymes of CA: Tissue, subcellular distribution and functional significance with particular references to the intestinal tract. *J. Physiol.* 215: 71-94

Carter, M. D. & Parsons, D. S. (1972). The isoenzymes of CA: Kinetic properties with particular reference to the function in the intestinal tract. *J. Physiol.* 220: 465-478

Carter, N. D., Hewlett-Emmlett, D., Jeffrey, S., Tashian, R. E. (1981). Testosterone-induced, sulfonamide-resistant carbonic anhydrase isoenzyme of rat liver is indistinguishable from skeletal muscle CAIII. *FEBS LETTERS* 128 (1): 114-118

Carter, N., Jeffery, S., Shiels, A. (1982). Immunoassay of carbonic anhydrase III in rat tissue. *FEBS LETTERS* 139(2): 265-266

Charney, A. N., Wagner, J. D., Birnbaum, G. J., Johnstone, J. N. (1986). Functional role of CA in intestinal electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 251 (14): G682-G687

Chu, S., & Montrose, M. H. (1996). Non-ionic diffusion and carrier-mediated transport drive extracellular pH regulation of mouse colonic crypts. *J. Physiol.* 494 (3): 783-793

Del Castillo, J. R. & Robinson, J. W. J. (1982). The simultaneous preparation of basolateral and brush-border membrane vesicles from guinea-pig intestinal epithelium and the determination of the orientation of the basolateral vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*: 688: 45-56

Dodgson, S. J., Forster II, R. E., Story, B. T., Mela, A. L. (1980). Mitochondrial carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (9): 5562-5566

Earnhardt, J. N., Qian, M., Tu, C., Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H., Laipis, P. J., Tashian, R. E., Silverman, D. N. (1998). The catalytic properties of murine CAVII. *Biochem.* 37: 10837-10845

Easson, L. H. & Stedman, E. (1936). The absolute activity of cholin-esterase. *Proc. of Rry. Soc. B* 121: 142-164

Eichholz, A. & Crane, R. K. (1965). Studies on the organization of the brush-border in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 26: 687-691

Engelhardt, W. v.; Burmester, M., Hansen, K., Becker, G. Rechkemmer, G. (1993). Effects of amilorid and glibenclamide on short-chain fatty acid transport in guinea pig large intestine. *J. Physiol. (London)* 460: 455-466

- Engelhardt, W. v., Gros, G., Burmester, M., Hansen, K., Becker, G. Rechkemmer, G. (1994).** Functional role of bicarbonate in propionate transport across guinea-pig isolated caecum and proximal colon. *J. Physiol.* 477 (2): 365-371
- Feldmann, G. M., Bermann, S. F., Stephenson, R. L. (1988).** Bicarbonate secretion in rat distal colon in vitro: a measurement technique. *Am. J. Physiol.* 254 23: C383-C390
- Feldstein J. B. & Silvermann N. D. (1984).** Purification and characterization of carbonic anhydrase from saliva of rat. *J. Biol. Chem.* 259 (9):5447-5453
- Fernley, R. T., Wrigth, R. D., Coghlan, J. P. (1979).** A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. *FEBS Letters* 105 (2): 299-302;
- Fernley, R. T., Wrigth, R. D., Coghlan, J. P. (1988A).** Complete amino acid sequence of ovine salivary carbonic anhydrase. *Biochem.* 27: 2815-1820
- Fernley, R. T., Wrigth, R. D., Coghlan, J. P. (1988B).** Purification and characterization of a high-Mr carbonic anhydrase from sheep parotid gland. *Biochem. J.* 249: 201-207
- Fernley, T. R. (1988C).** Non-plasmic carbonic anhydrases. *TIBS* 13: 356-358
- Fleming, R. E., Parkkila A. K., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Sly, W. S. (1995).** CAIV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J. Clin. Invest.* 96: 2907-2913
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Onishi, S. (1999).** Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosom 1. *Genomics* 61 (1): 74-81
- Genz, A. K., Bische, R., V. Engelhardt, W. (1997).** Surface pH of the distal colonic epithelium of guinea-pigs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (2): 407-408
- Goldfarb, D. S., Egnor, R. W., Charney, A. N. (1988).** Effects of acid-base variables on ion transport in rat colon. *J. Clin. Invest. Inc.* 81: 1903-1910
- Gramlich, T. L., Randolph, Henniger, A., Spicer, S., Schulte, B. A. (1990).** Immunohistochemical localization of Na⁺/K⁺-ATPase and CA in human colon. *Arch. Pathol.* 114: 415-419
- Gros, G. & Dodgson, S. (1988).** Velocity of CO₂ exchange in muscle and liver. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 669-694
- Guth, D. (1988).** Die Bedeutung der gastrointestinalen Mucusschicht als Diffusionsbarriere. Dissertation, Universität Hohenheim
- Gustin, M. & Goodman, D. B. P. (1981).** Isolation of brush-border membrane from the rabbit descending colon epithelium. *J. Biol. Chem.* 256 (20): 10651-10656
- Hancock, K. & Tsang, V. C. W. (1983).** Indian Ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133: 157-162

- Hansson, H. P. J. (1967):** Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Histochem.* 11: 112-128
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985).** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 102-112
- Holtug, K., McEwan, G. T. A., Skadhauge, E. (1992).** Effects of propionate on the acid microclimate of hen (*Gallus domesticus*) colonic mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A (4): 649-652
- Ivanov, S. V. Kuzmin, I., Wie, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., Lerman, M. I. (1998).** Down-regulation of transmembrane CA in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von hippel-lindau transgenes. *Proc. Natl. Accad. Sci.* 95: 12596-12601
- Kleinke, T. (1994).** Carboanhydrase-Hemmstoffeffekte und Carboanhydrase Lokalisation an isolierten Skelettmuskelfibrillen. Diplomarbeit Universität Hannover
- Knüppel, A. S., Harringer, W., Gros, G., Kubis, H. P. (1999).** Carbonic anhydrase in the heart: Immunochemical evidence for a new isoenzyme in human cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* im Druck
- Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H., Tashian, R. E. (1996A).** Expression of mouse CAVII in *E. coli* and demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochim & Biophys. Res. Com.* 226: 268-272
- Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H., O`Shea, K. S., Tashian, R. E. (1996B).** Expression of catalytic CAVIII gene, CAR8, during mouse embryonic development. *Histochem. J* 29: 135-141
- Lavery, G., Holtug, K., Elbrond, V. S., Ridderstrale, Y., Skadhauge, E. (1993).** Mucosal acidification and an acid microclimate in the hen colon in vitro. *J. Comp. Physiol. B* 163: 633-641
- Lewis, S. E., Erickson, R. P., Barnett, L. B., Tashian, R. E. (1988).** N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation of the mouse CAR-2 locus: an animal for human CAII deficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 1962-1966
- Livingstone, E. W., Miller, J., Engel, E. (1995).** Bicarbonate diffusion through mucus. *Am. J. Physiol.* 269 (32): G453-G457
- Lönnerholm, G. (1977).** CA in the intestinal tract of the guinea pig. *Acta physiol. Scand.* 99: 53-61
- Lönnerholm G., Selking, Ö., Wistrand, P. J. (1985).** Amount and distribution of CAI and CAII in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 88: 1151-1161
- Lönnerholm, G., Midtvedt, T., Schenholm, M., Wistrand, P. J. (1988).** CA isoenzymes in the caecum of normal and germ-free rats. *Acta Physiol. Scand.* 132: 159-166
- Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

- Maren, T. H. (1960).** A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 130: 26-29
- Maren, T. H., Rayburn, C. S., Liddell, N. E. (1976).** Inhibition by anions of human red cell CAB: Physiological and biochemical implications. *Science*
- Maren, T. H. (1977).** Use of inhibitors in physiological studies of carbonic anhydrase. *Am. J. Physiol.* 323 (4): F291-F297
- Maren, T. H. (1980)** Current status of membrane-bound carbonic anhydrase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 341: 246-258
- McNeil, N. I., Ling, K. L. E., Wager, J. (1987).** Mucosal surface pH of the large intestine of the rat and of normal and inflamed large intestine in man. *Gut* 28: 707-713
- Meldrum, N. U. & Roughton, F. J. W (1933).** Carbonic anhydrase: Its preparation and properties. *J. Physiol.* 80: 113-142
- Murakami H. & Sly W. (1987).** Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 262 (3): 1382-1388
- Ogawa, Y., Chang, C. K., Kuwahara, H., Hong, S. S., Toyosawa, S., Yagi, T. (1992).** Immunoelectron microscopy of carbonic anhydrase isoenzyme VI in rat submandibular gland: comparison with isoenzyme I and II. *J. Histochem. & Cytochem.* 40 (6): 807-817
- Ottolenghi, P. (1975).** The reversible deplipidation of a solubilized sodium-plus-potassium ion-dependent adenosin triphosphatase from the salt gland of the spiny dogfish. *Biochem. J.* 151: 61-66
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Rajaniemi, T. J. (1994).** Distribution of CA-isoenzymes I, II and VI in the human alimentary tract. *Gut* 35: 646-650
- Parkkila, S. (1996).** Carbonic anhydrase in the alimentary tract. *Scand. J. Gastroenterol* 31: 305-317
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Lehtola, J., Reinilä, A., Södervik, H. J., Rannisto, M., Rajaniemi, H. (1997).** Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Digestive Diseases and Sciences* 42 (5): 1013-1019
- Parkkila, S., S., Parkkila, A. K., Waheed, A., Karttunen, T., Sly, W., S. (1999).** Cell-specific expression of mitochondrial carbonic anhydrase in the human and rat gastrointestinal tract. *J. Histochem. & Cytochem.* 47 (4): 517-524
- Pastorek, J. Pastorekova, S., Callebaut, I., Moron, J. P., Zelnik, V., Zadovicova, M., Liao, S., Portetelle, D., Standbridge, E., J., Zavada, J., Burny, A., Kettmann, R. (1994).** Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with domain homologous to CA and a putative helix-loop-helix DANN binding segment. *Oncogene* 9: 2877-2888
- Peterson, G. L. (1977).** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83 (2): 246-355

Peterson, G. L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrought, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100: 201-220

Phillips, S. F., & Devenroede, G. J. (1979). Function of the large intestine. *Int. Rev. Physiol.* 19: 263-290

Rechkemmer, G., Wahl, M., Kuschinsky, W., v. Engelhardt, W. (1986). pH-microclimate at the luminal surface of the intestinal mucosa of guinea pig and rat. *Pflügers Arch.* 407: 33-40

Rickley, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibson, B. H., Edstall, J. T. (1963). Carbonic anhydrase from human erythrocytes: Preparation and properties of two isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 239 (4): 1065-1078

Said, H. M., Blair, J. A., Lucas, M. L., Hilburn, M. E. (1986). Intestinal surface acid microclimate in vitro and in vivo in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 107: 420-424

Sanyal, G., Swenson, E., R., Pessah, N. I., Maren, T., H. (1982). The carbon dioxide hydration activity of skeletal muscle carbonic anhydrase. Inhibition by sulfonamides and anions. *Mol. Pharmac.* 22 (1): 211-220

Sasaki, K., Igarashi, S. I., Amaski, T., Amaski, H., Nishita, T., Kano, Y., Asari, M. (1993). Comparative immunohistolocalization of carbonic anhydrase isoenzyme I, II and II in the equine and bovine digestive tract. *Hist. J.* 25: 304-311

Scalera V., Storelli, C., Storelli-Joss, C., Haase, W. (1980). A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from small-intestinal epithelial cells. *Biochem. J.* 186: 177-181

Schrader, R. (1998). Massenspektrometrische Analyse des murinen kardialen Myosins. Diplomarbeit Universität Hannover

Sender, S., Gros, G., Waheed, A., Hageman, G. S., Sly, W. (1994). Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle. *J. Histochem. and Cytochem.* 42 (9): 1229-1236

Sly, W. S. & Hu, P. Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 375-401

Spicer, S. S., Ge, Z. H., Tashian, R. E., Hazen-Martin, D. J., Schulte, B. A. (1990). Comparative distribution of CA-Isoenzymes III and II in rodent tissue. *Am. J. Anatomy* 187: 55-64

Stieger, B., Marxer, A., Hauri, H. P. (1986). Isolation of brush-border membranes from rat and rabbit colonocytes: is alkaline phosphatase a marker enzyme? *J. Membrane Biol.* 91: 19-31

Suzuki, Y. & Kaneko, K. (1987). Acid secretion in isolated guinea pig colon. *Am J. Physiol.* 253: G155-G164

Szentkuti, L., Ridesel, H., Enss, ML., Gaertner, K., v. Engelhardt, W. (1990). Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ free rats. *Histochem. J.* 22 (9): 291-297

Türeci, Ö., Sahin, U., Vollmer, E., Siemer, S., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shan, G. N., Grubb, J. H., Pfreundschuh, M., Sly, W. S. (1998). Human CAXII: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of CA gene that is overexpressed in some renal cell cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 7608-7613

Vengesa, P. B. & Hopfer, U. (1979). Cytochemical lokalization of alkaline phosphatase and Na⁺-pump sites in adult rat colon. *Histochem. Cytochem.* 27: 1231-1235

Waheed, A., Zhu, X. L., Sly, W. S. (1992). Membrane-associated CA from rat lung. Purification, characterization, tissue distribution and comparison with CAIV of other mammals *J. Biol. Chem.* 267 (5): 3308-3311

Whitney P. L. (1974). Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal. Chem.* 57: 467-476

Whitney P. L. & Briggle T. V. (1982). Membrane-associated CA purified from bovine lung. *J. Biol Chem.* 257 (20): 12056-12059

Wistrand P. J. & Knuuttila, K. G. (1989). Renal membrane-bound CA. Purification and properties. *Kidney International* 35: 851-859

Zhu, X. L. & Sly, W. S. (1990) Carbonic anhydrase IV from human lung: Purification, characterization and comparison with membrane CA from human kidney. *J. Biol. Chem.* 265 (15): 8795-8801

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1.	Fließschema zur Präparation von apikalen und basolateralen Membranvesikeln.....	13
	aus dem Dickdarm des Meerschweinchens.....	
Abb. 4.2	Percoll-Gradient.....	15
Abb. 4.3	Fließschema zur Isolierung von CAI und CAII aus dem Meerschweinchenblut.....	18
Abb. 4.4	Fließschema zur Isolierung der CA aus dem Mucus vom Dickdarm des Meerschweinchens.....	23
Abb. 4.5.	Meßapparat zur Bestimmung der CA-Aktivität.....	26
Abb. 5.1	CA-Aktivität im Mucus normaler und keimfreier Ratten.....	45
Abb. 5.2	Verteilung der Aktivität der Mucus-CA vom Meerschweinchen im Phasenseparationsexperiment mit Triton X-114.....	45
Abb. 5.3	SDS-PAGE: Fraktionen Säulenlauf 1.....	52
Abb. 5.4	SDS-PAGE: Fraktionen Säulenlauf 2.....	52
Abb. 5.5	SDS-PAGE: Fraktionen Säulenlauf 3.....	52
Abb. 5.6	SDS-PAGE: Fraktionen Säulenlauf 4.....	52
Abb. 5.7	SDS-PAGE: Einzel und gepoolte Enzymfraktionen der vier Säulenläufe aus dem Meerschweinchenerlysat.....	53
Abb. 5.8	IEF: Säulenlauf 1.....	54
Abb. 5.9	IEF: Säulenlauf 2.....	54
Abb. 5.10	IEF: Säulenlauf 3.....	54
Abb. 5.11	IEF: Säulenlauf 4.....	54
Abb. 5.12	IEF: Einzel- und gepoolte Enzymfraktionen der vier Säulenläufe aus dem Meerschweinchenerlysat.....	55
Abb. 5.13	Western-Blot: Meerschweinchen-CAI und -CAII (Anti-Meerschweinchen-CAI).....	56
Abb. 5.14	Western-Blot: Meerschweinchen-CAI und -CAII (Anti-Meerschweinchen-CAII).....	56
Abb. 5.15	Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm (Anti-human-CAIV, P. J. Wistrand)	57
Abb. 5.16	Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm (Anti-human-CAVI, S. Parkkila).....	58
Abb. 5.17	Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm (Anti-Meerschweinchen-CAII	58
Abb. 5.18	Western-Blot: Mucus Meerschweinchendarm (Anti-Meerschweinchen-CAI).....	58
Abb. 5.19	Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAI, N. Carter).....	59
Abb. 5.20	Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAII, Binding Site).....	59
Abb. 5.21	Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAVI, S. Parkkila).....	59
Abb. 5.22	Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAII, Binding Site).....	60
Abb. 5.23	Western-Blot: Humaner Magenmucus (Anti-human-CAVI, S. Parkkila).....	60
Abb. 5.24	Western-Blot: Humaner Colonmucus (Anti-human-CAI, -CAII, -CAVI).....	61
Abb. 5.25	Western-Blot: Humaner Colonmucus (Anti-human-CAIV, W. S. Sly).....	61
Abb. 5.26	Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-Ratten-CAI, W. S. Sly).....	63
Abb. 5.27	Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-Ratten-CAII, W. S. Sly).....	63
Abb. 5.28	Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-Ratten-CAIV, W. S. Sly).....	63
Abb. 5.29	Western-Blot: Mucus Rattendarm (Anti-Ratten-CAVI, Y. Ogawa).....	64
Abb. 5.30	SDS-PAGE: Aufreinigung Mucus-CA.....	70
Abb. 5.31	Western-Blot: Fraktionen Aufreinigung Mucus-CA (Anti-Meerschweinchen-CAI).....	71
Abb. 5.32	Western- Blot: Fraktionen Aufreinigung Mucus-CA (Anti-Meerschweinchen-CAII).....	71
Abb. 5.33	MS-Spektrum einer HPLC-Fraktion der tryptisch verdauten Mucus-CA.....	75
Abb. 5.34	Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500)....	120
Abb. 5.34a	Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen: Hühner-Präimmunserum (1:500).....	120
Abb. 5.35	Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500)	121
Abb. 5.35a	Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Hühner-Präimmunserum (1:500)....	121

Abb. 5.36	Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500)	122
Abb. 5.36a	Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Hühner Präimmunserum (1:500)....	122
Abb. 5.37	Gefrierschnitt distales Colon Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500).....	123
Abb. 5.37a	Gefrierschnitt distales Colon Meerschweinchen: Hühner-Präimmunserum (1:500).....	123
Abb. 5.38	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750).....	124
Abb. 5.38a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Hühner-Präimmunserum (1:750).....	124
Abb. 5.39	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750)	125
Abb. 5.39a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: HühnerPräimmunserum (1:750)....	125
Abb. 5.40	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750)	126
Abb. 5.40a	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Hühner-Präimmunserum (1:750).....	126
Abb. 5.41	Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-human-CAI (P. J. Wistrand, 1:750) nach Vorinkubation mit Phospholipase C.....	127
Abb. 5.41a	Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750).....	127
Abb. 5.42	Gefrierschnitt Musculus soleus der Ratte: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500) nach Vorinkubation mit Phospholipase C.....	128
Abb. 5.42a	Gefrierschnitt Musculus soleus der Ratte Colon: Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500).....	128
Abb. 5.43	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5).....	129
Abb. 5.43a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	129
Abb. 5.44	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5).....	130
Abb. 5.44a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5)....	130
Abb. 5.45	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5).....	131
Abb. 5.45a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	131
Abb. 5.46	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5).....	132
Abb. 5.46a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	132
Abb. 5.47	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5).....	133
Abb. 5.47a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen Präimmunserum (1:5).....	133
Abb. 5.48	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5).....	134
Abb. 5.48a	Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5)....	134
Abb. 5.49	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti- Meerschweinchen-CAI (1:5).....	135
Abb. 5.49a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	135
Abb. 5.50	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer- schweinchen-CAI (1:5).....	136
Abb. 5.50a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	136
Abb. 5.51	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer- schweinchen-CAI (1:5).....	137
Abb. 5.51a	Paraffinschnittproximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen- Präimmunserum (1:5).....	137
Abb. 5.52	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer- schweinchen-CAII (1:5).....	138

Abb. 5.52a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	138
Abb. 5.53	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer-schweinchen-CAII (1:5).....	139
Abb. 5.53a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	139
Abb. 5.54	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer-schweinchen-CAII (1:5).....	140
Abb. 5.54a	Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	140
Abb. 5.55	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer-schweinchen-CAI (1:5).....	141
Abb. 5.55a	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	141
Abb. 5.56	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer-schweinchen-CAI (1:5).....	142
Abb. 5.56a	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	142
Abb. 5.57	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Anti-Meer-schweinchen-CAI (1:5).....	143
Abb. 5.57a	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen: Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5).....	143
Abb. 5.58	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 1x gespült: Mucinfärbung,.....	144
Abb. 5.59	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 1x gespült: Mucinfärbung,.....	144
Abb. 5.60	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 2x gespült: Mucinfärbung,.....	145
Abb. 5.61	Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 2x gespült: Mucinfärbung,.....	145
Abb. 6.1	Resorption von Na ⁺ und Cl ⁻ im Dickdarm	105
Abb. 6.2	Resorption von SCFA im Colon vom Meerschweinchen.....	106

10. Anhang

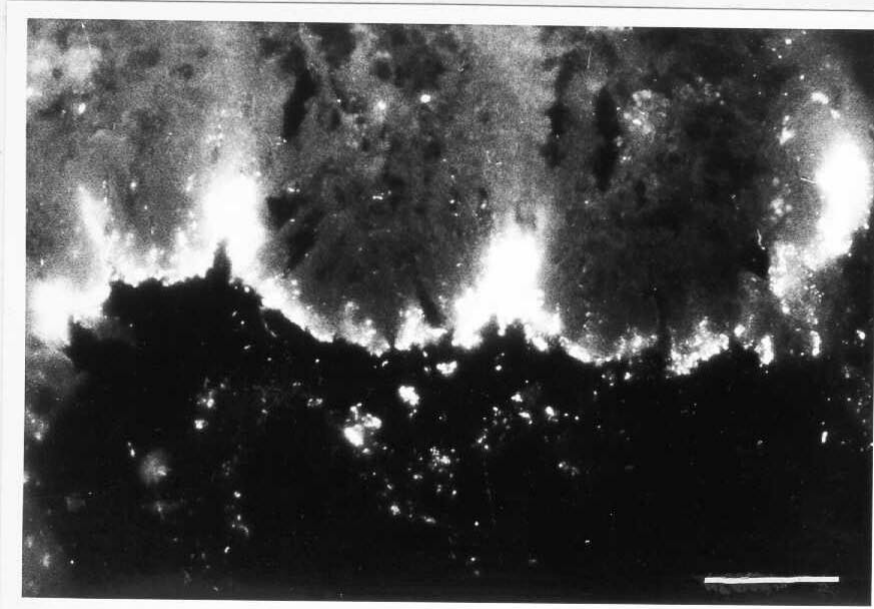


Abb. 5.34 Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500); Balken: 50 μ m

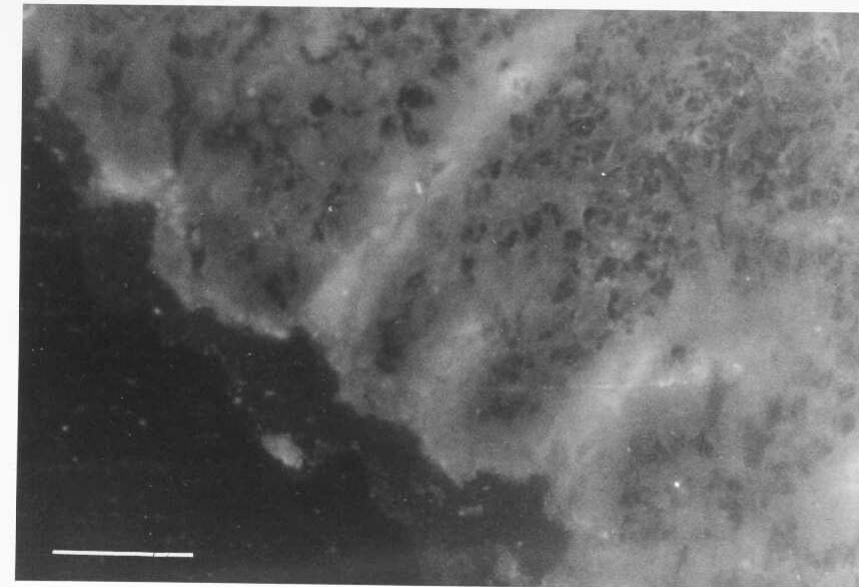


Abb. 5.34a: Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen:
Hühner-Präimmunserum (1:500); Balken: 50 μ m

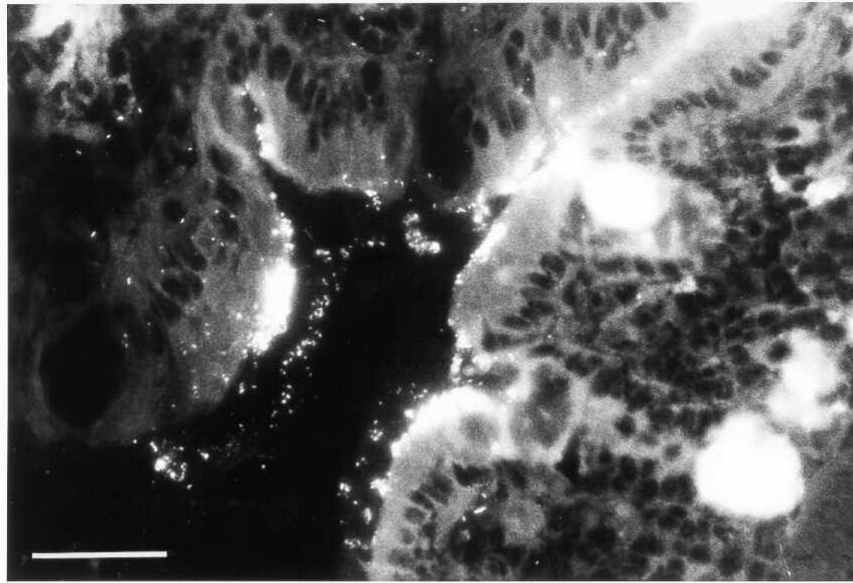


Abb. 5.35: Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500); Balken: 50 μ m

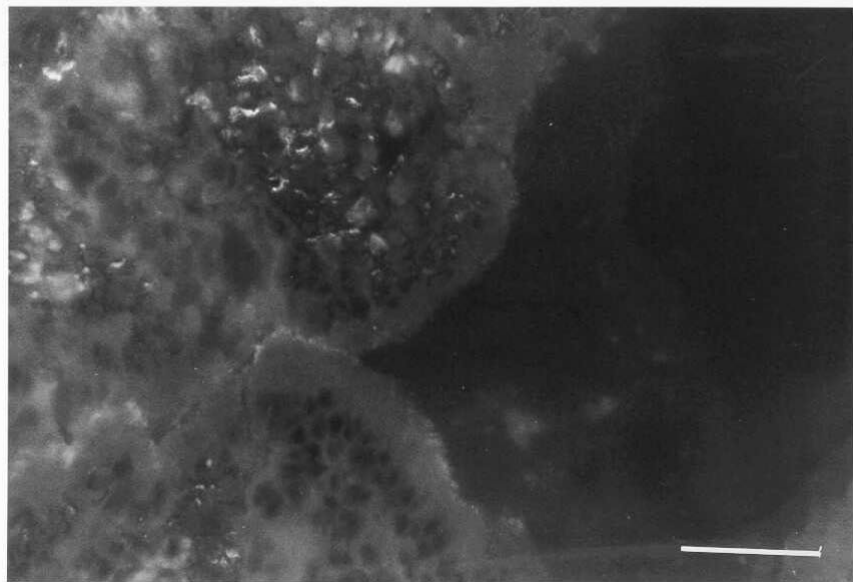


Abb. 5.35a: Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Hühner-Präimmenserum (1:500); Balken: 50 μ m

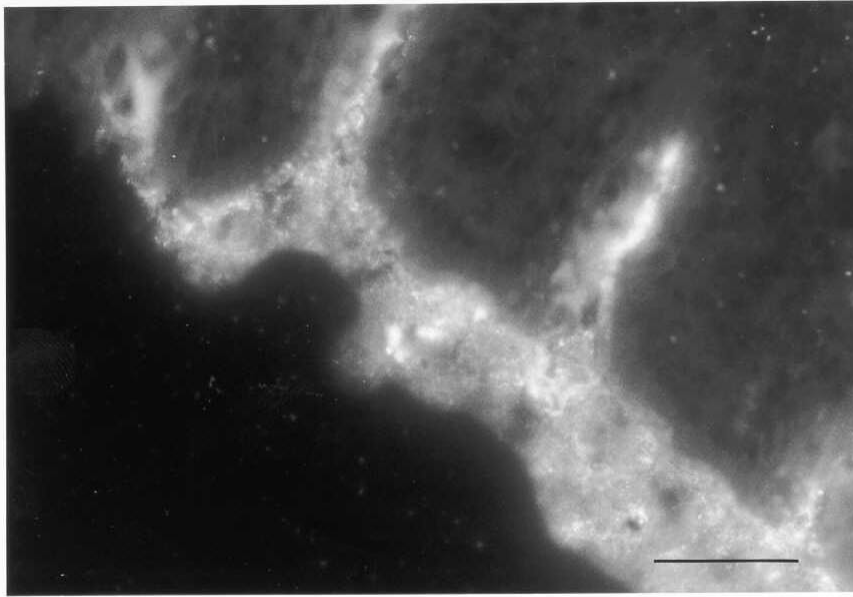


Abb. 5.36: Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500); Balken: 50 μ m

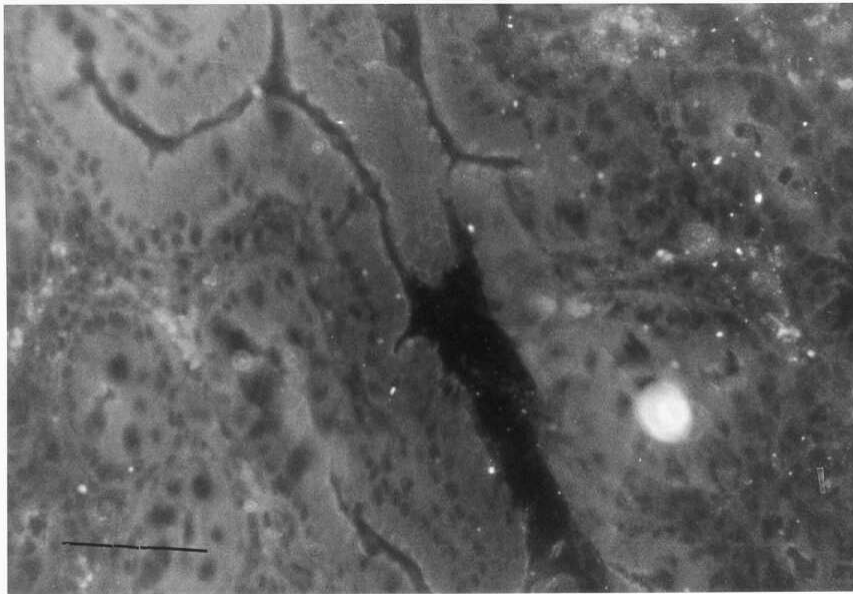


Abb. 5.36a: Gefrierschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Hühner-Präimmenserum (1:500); Balken: 50 μ m

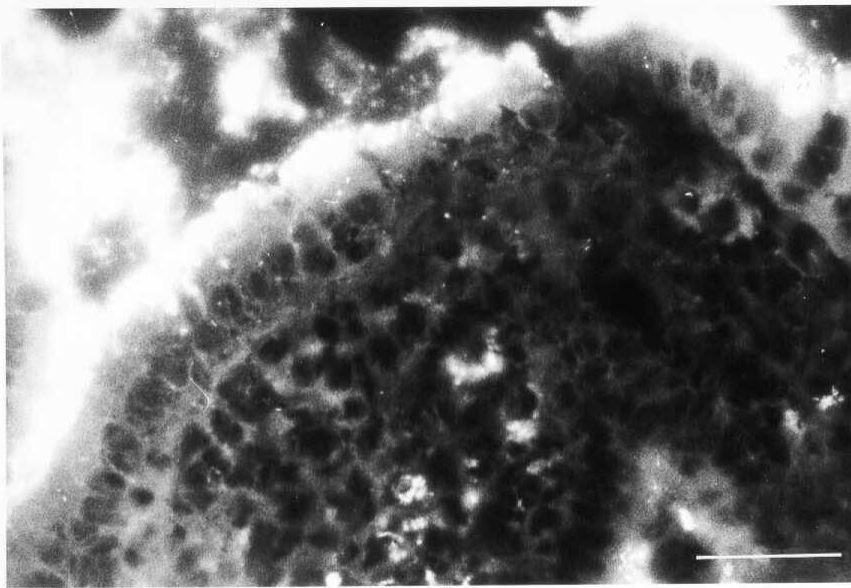


Abb. 5.37 Gefrierschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:500); Balken: 50µm

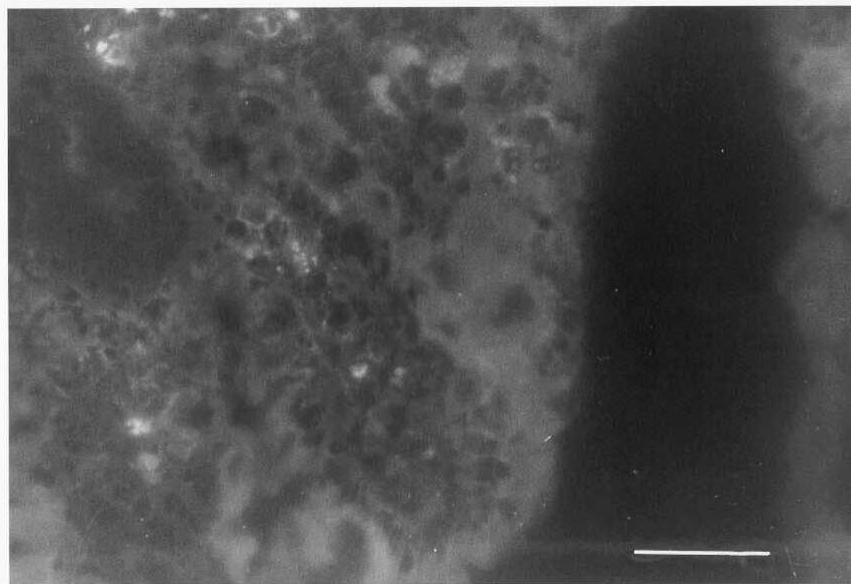


Abb. 5.37a: Gefrierschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Hühner-Präimmunserum (1:500); Balken: 50µm

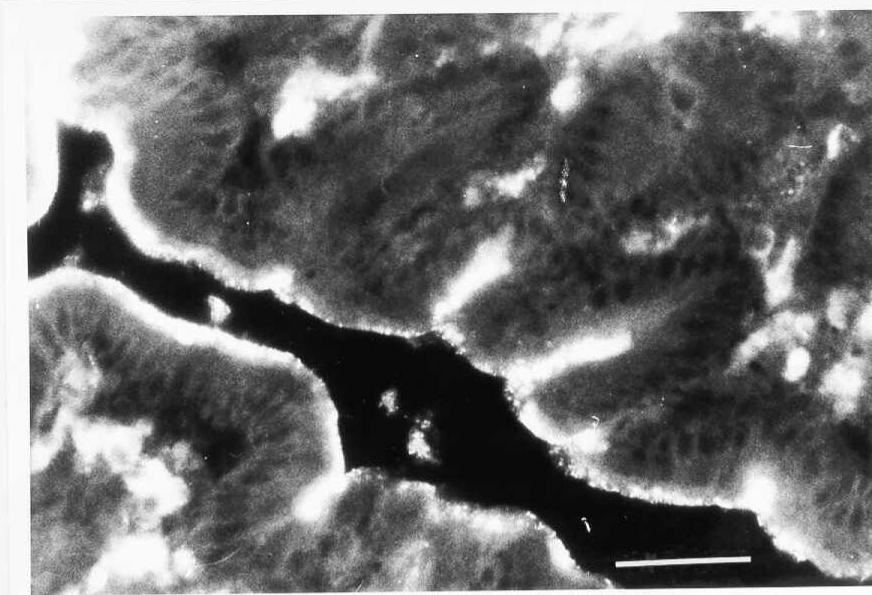


Abb. 5.38: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750); Balken: 50 μ m

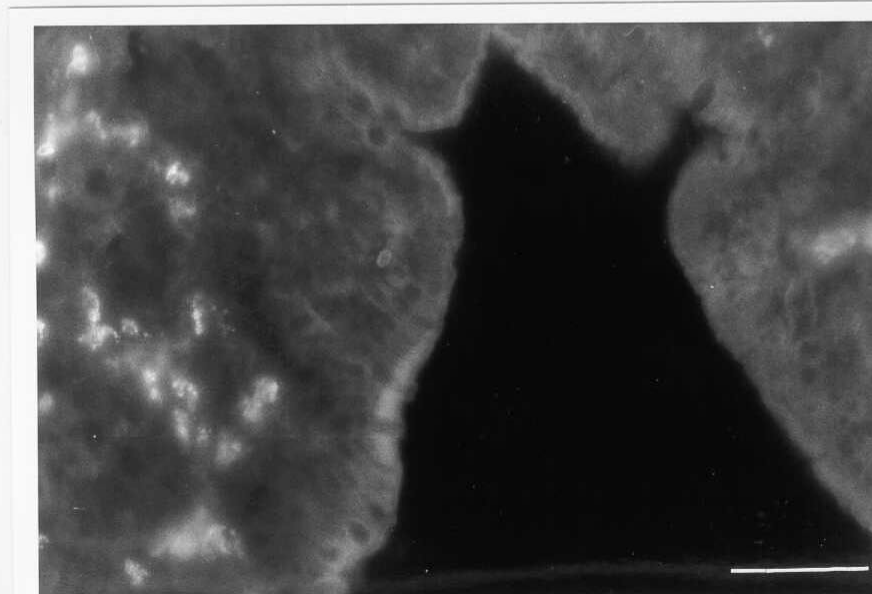


Abb. 5.38a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Hühner-Präimmunserum (1:750); Balken: 50 μ m

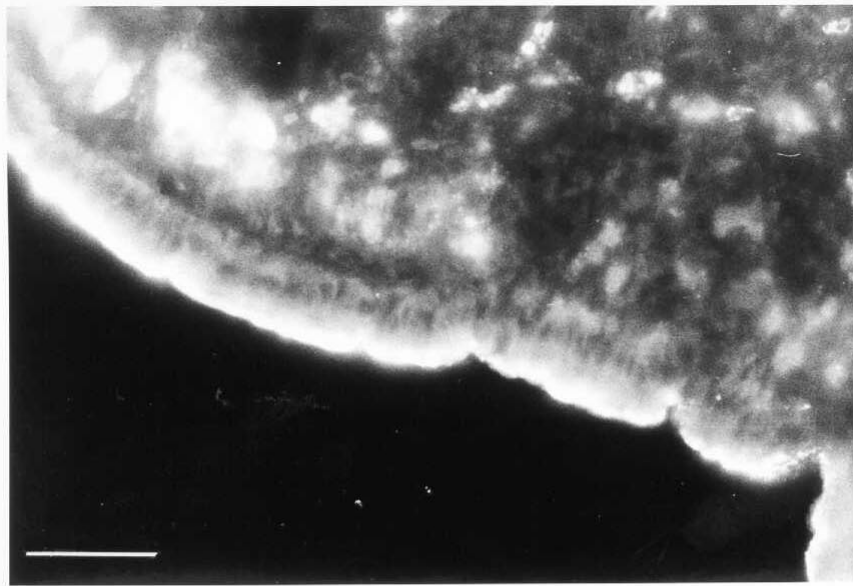


Abb. 5.39: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750); Balken: 50 μ m

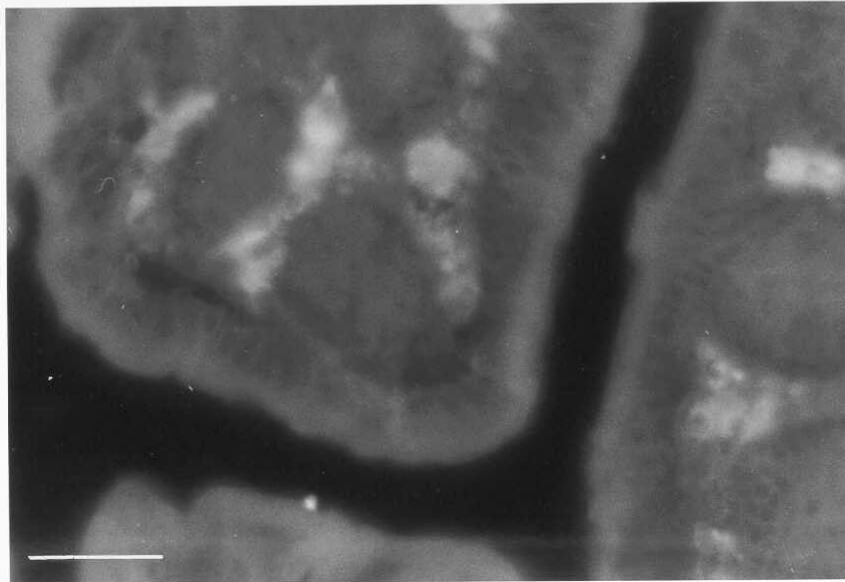


Abb. 5.39a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Hühner-Präimmunserum (1:750); Balken: 50 μ m

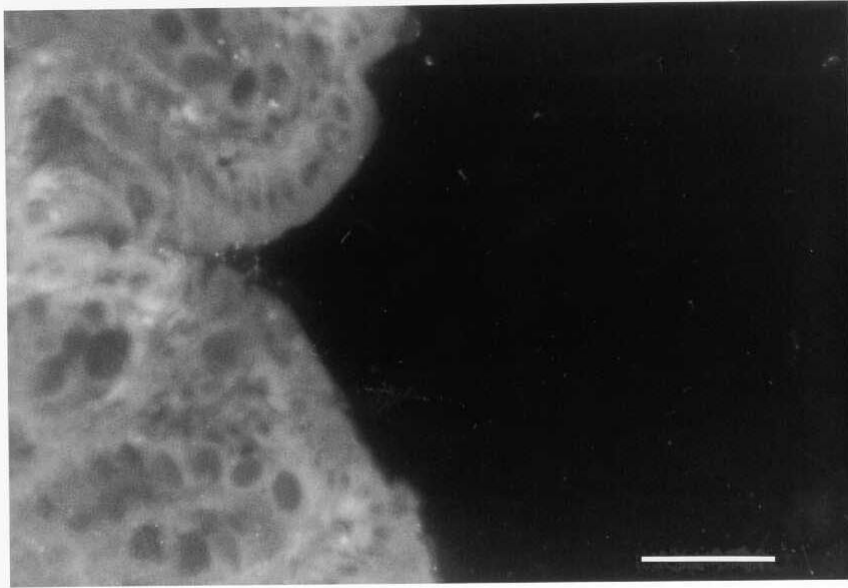


Abb. 5.40: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750); Balken: 50 μ m

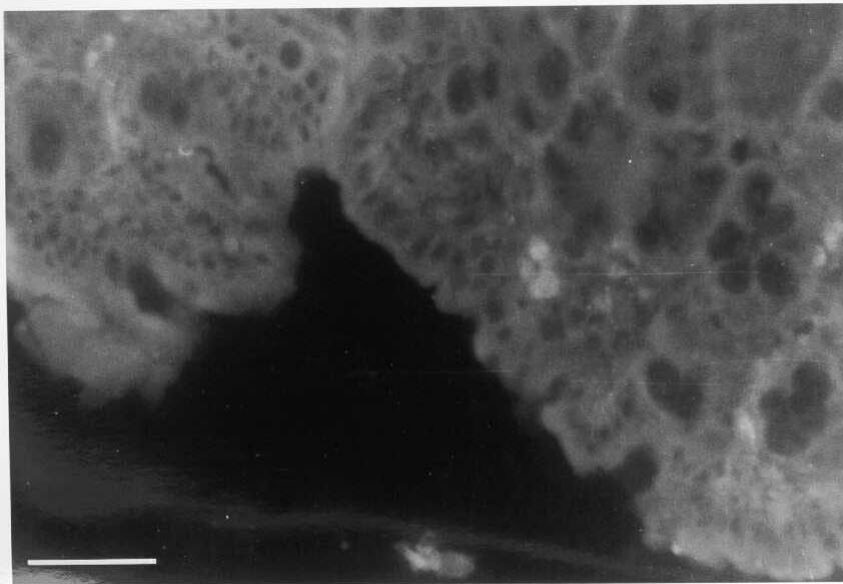


Abb. 5.40a: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Hühner-Präimmenserum (1:750); Balken: 50 μ m

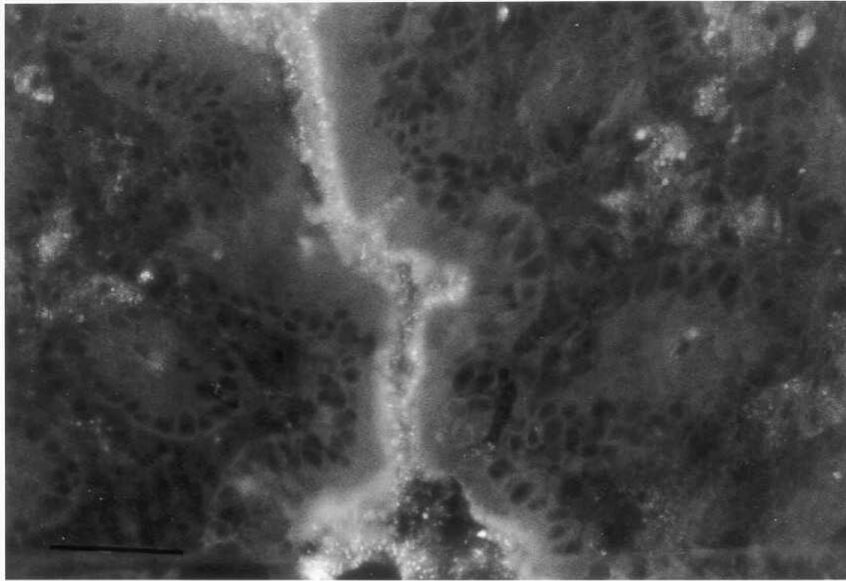


Abb. 5.41: Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen: Anti-human-CAI (P. J. Wistrand, 1:750) nach Vorinkubation mit Phospholipase C
Balken: 50 μ m

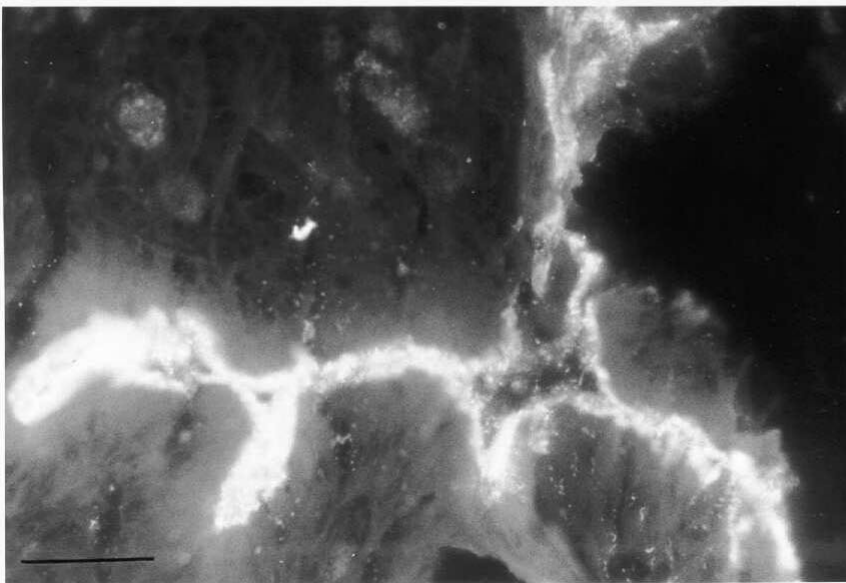


Abb. 5.41a: Gefrierschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-human-CAIV (P. J. Wistrand, 1:750); Balken: 50 μ m

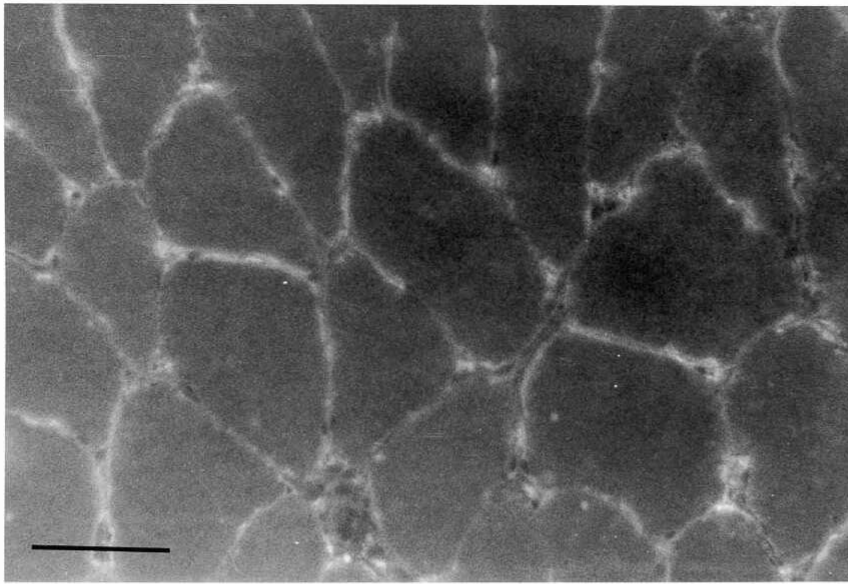


Abb. 5.42: Gefrierschnitt Musculus soleus der Ratte: Anti-human-CAIV
(P. J. Wistrand, 1:500) nach Vorinkubation mit Phospholipase C
Balken: 50 μ m

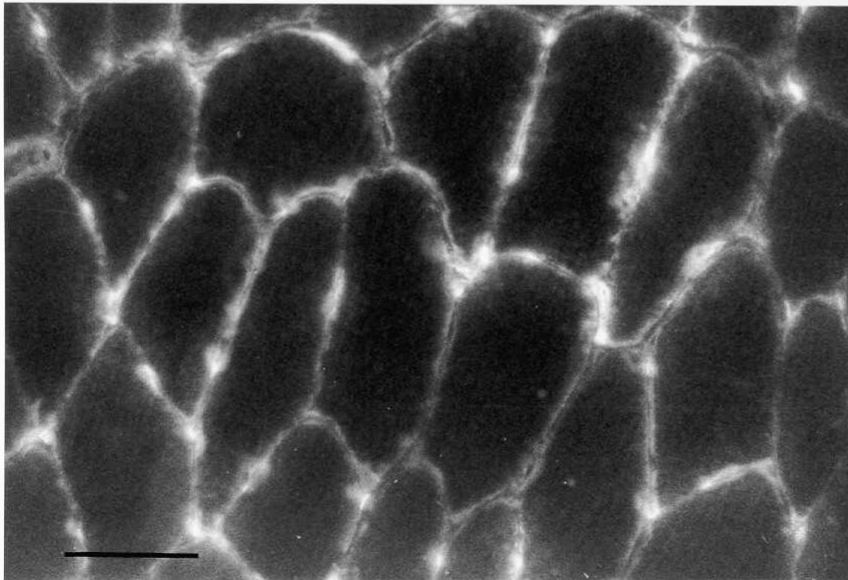


Abb. 5.42a: Gefrierschnitt Musculus soleus der Ratte Colon: Anti-human-CAIV
(P. J. Wistrand, 1:500); Balken: 50 μ m

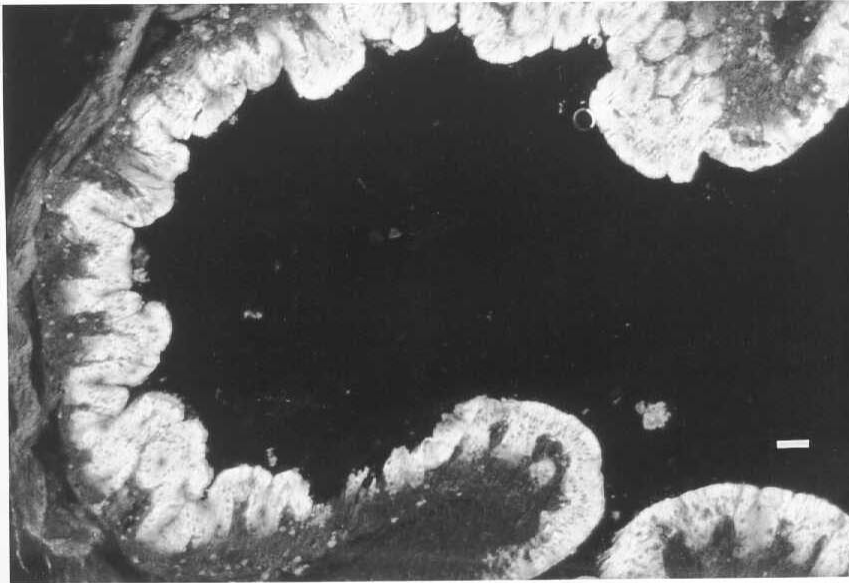


Abb. 5.43: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

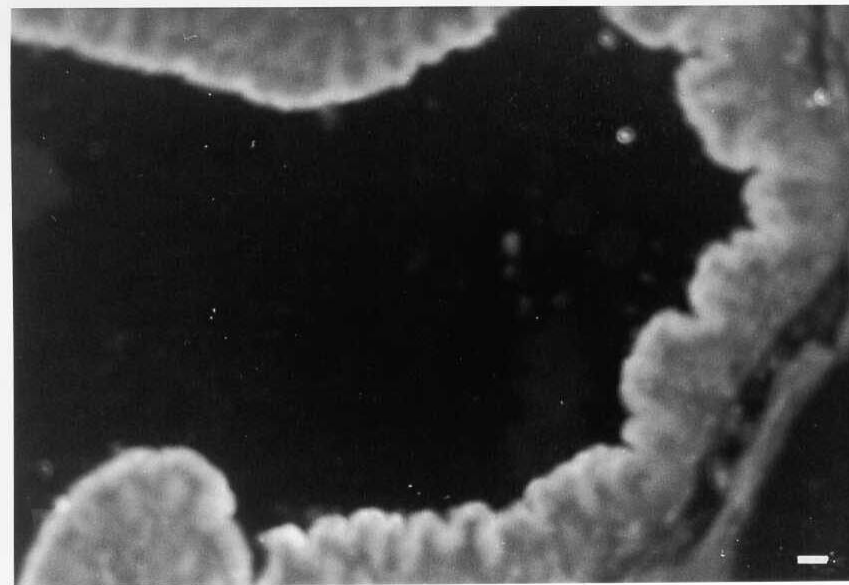


Abb. 5.43a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

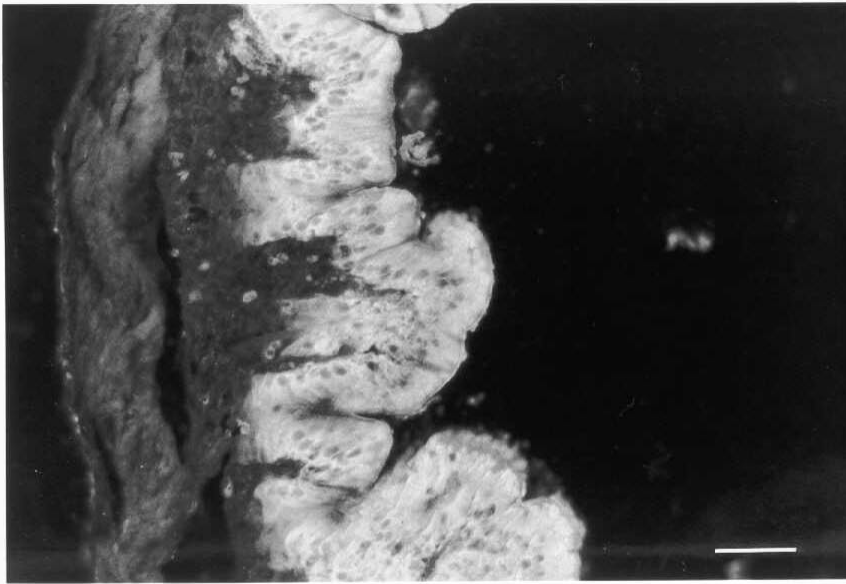


Abb. 5.44: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

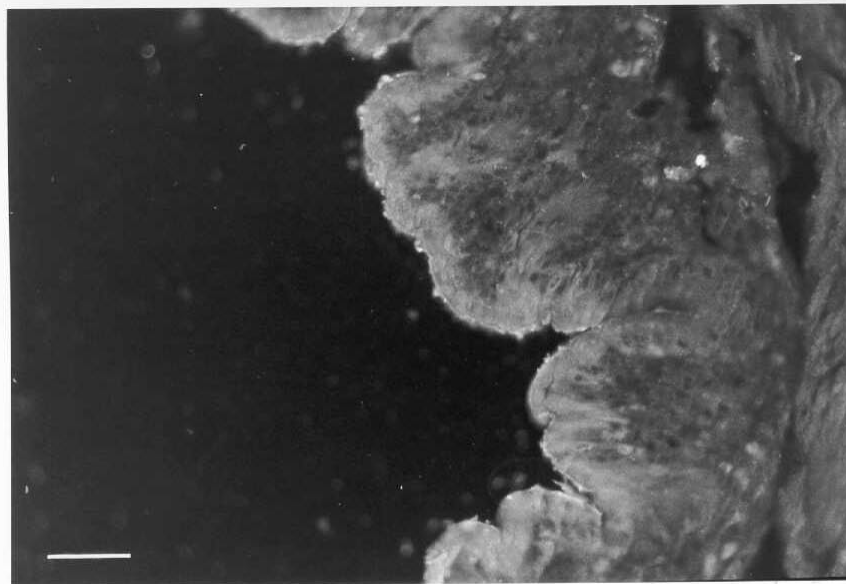


Abb. 5.44a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunsrum (1:5); Balken: 50 μ m

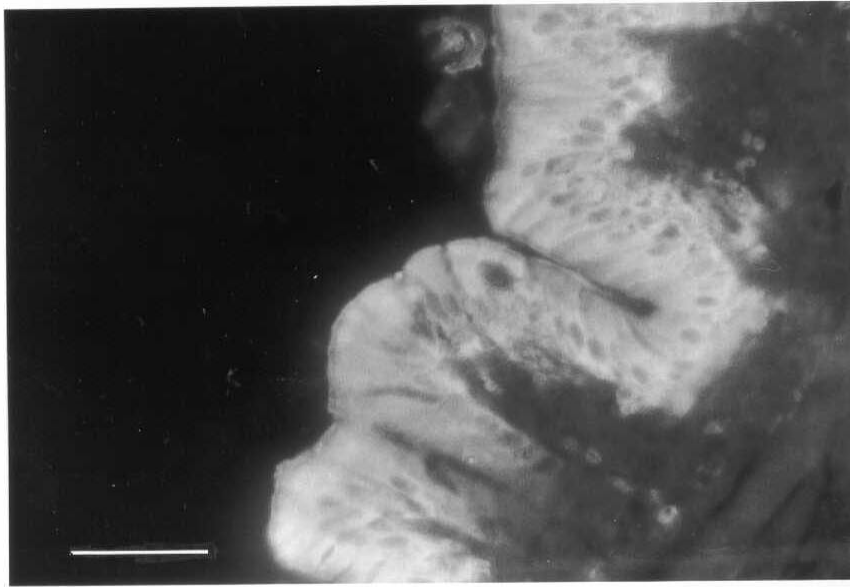


Abb. 5.45: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

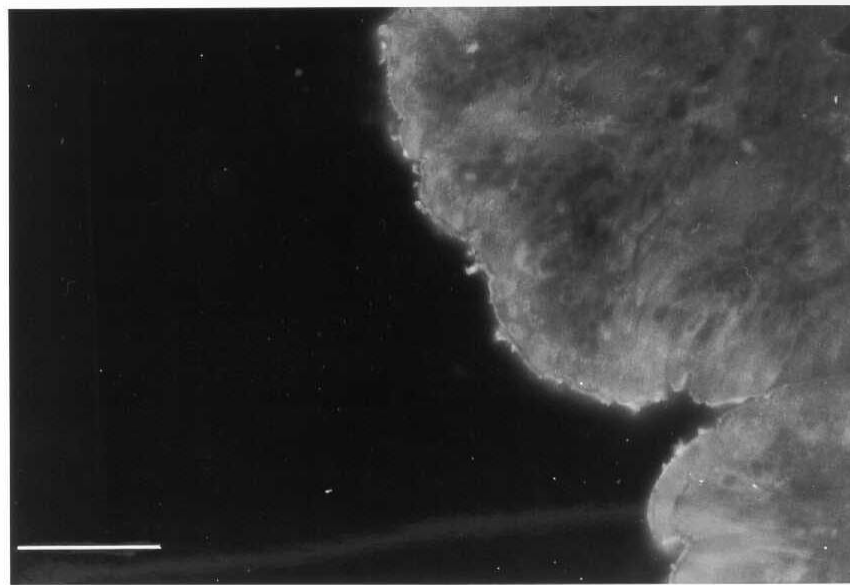


Abb. 5.45a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m



Abb. 5.46: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m

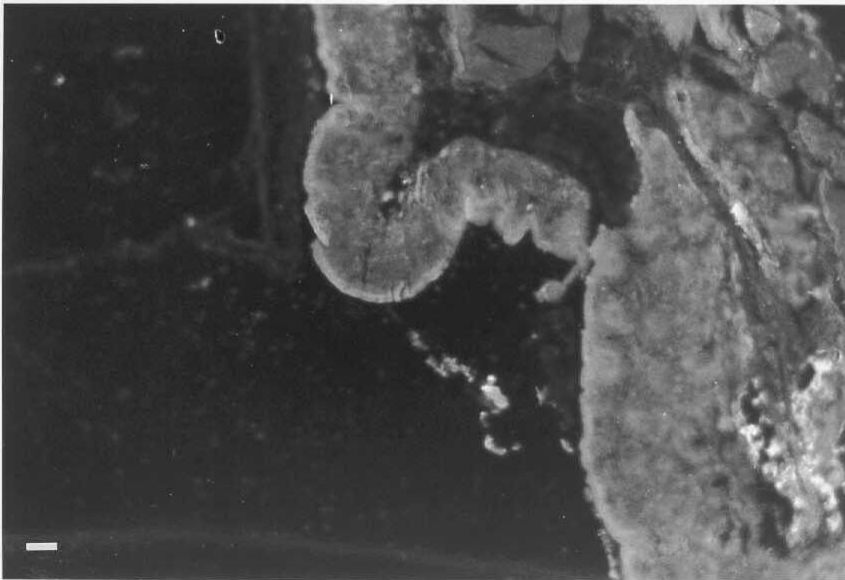


Abb. 5.46a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m



Abb. 5.47: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m

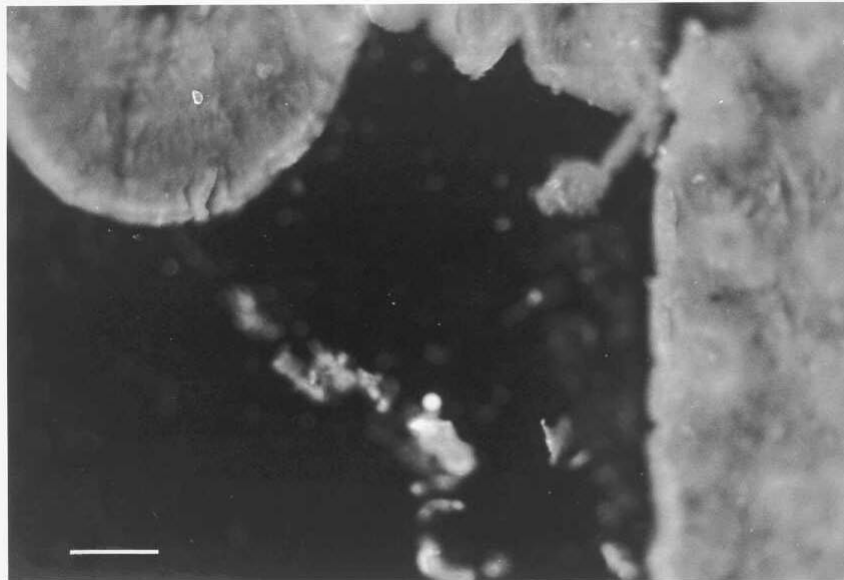


Abb. 5.47a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmenserum (1:5); Balken: 50 μ m

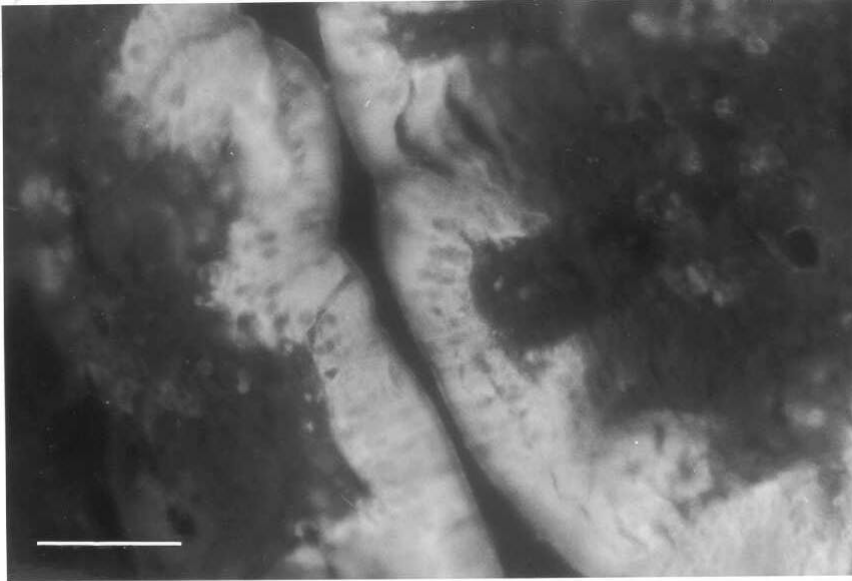


Abb. 5.48: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m

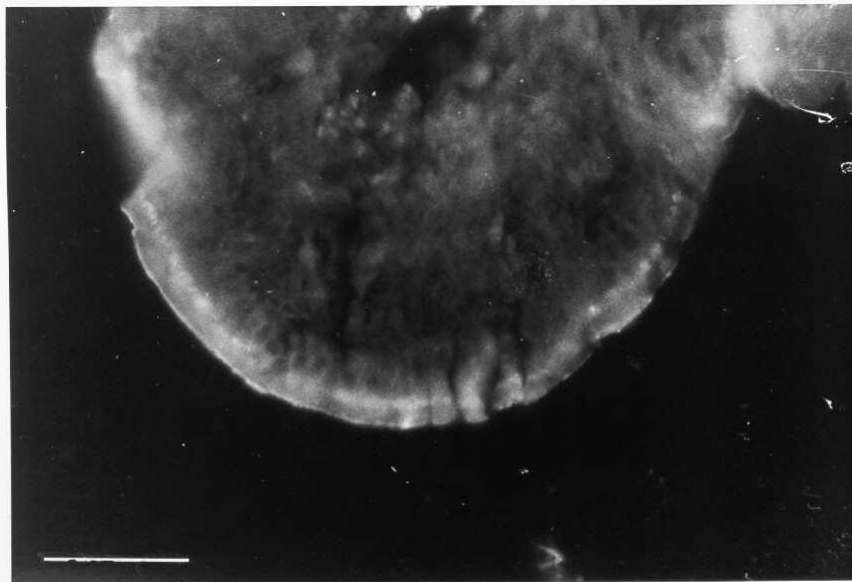


Abb. 5.48a: Paraffinschnitt Caecum Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

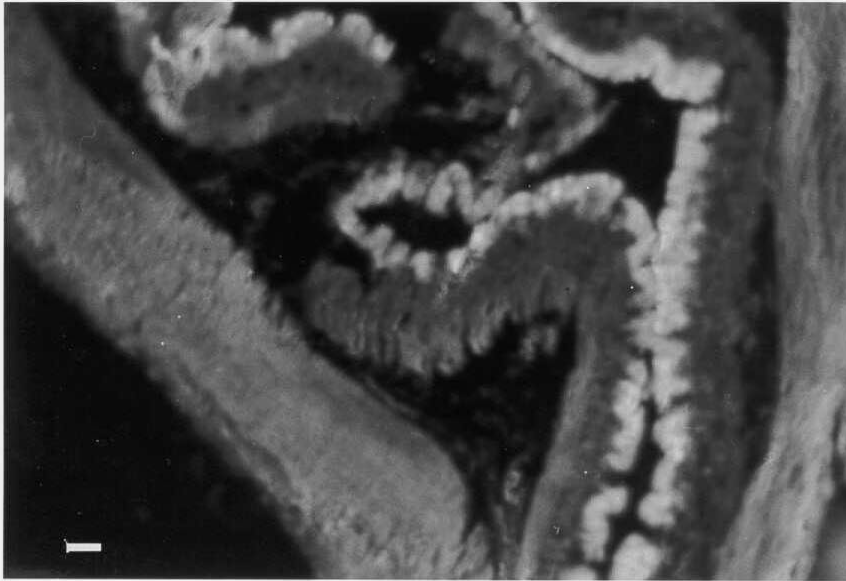


Abb. 5.49: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

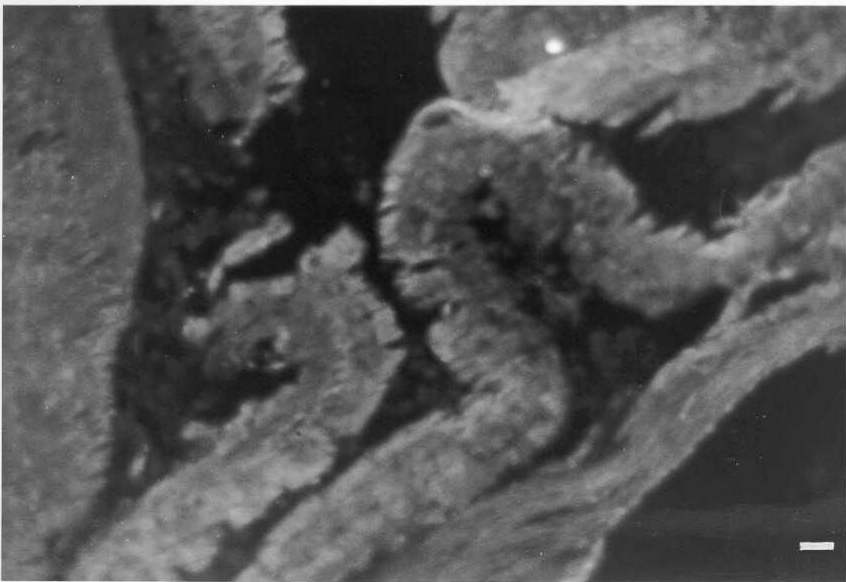


Abb. 5.49a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmuserum (1:5); Balken: 50 μ m

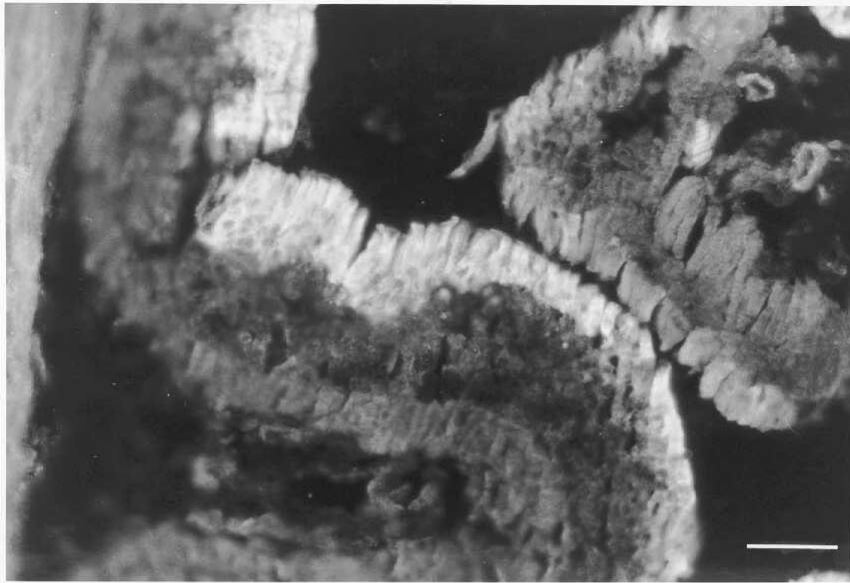


Abb. 5.50: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

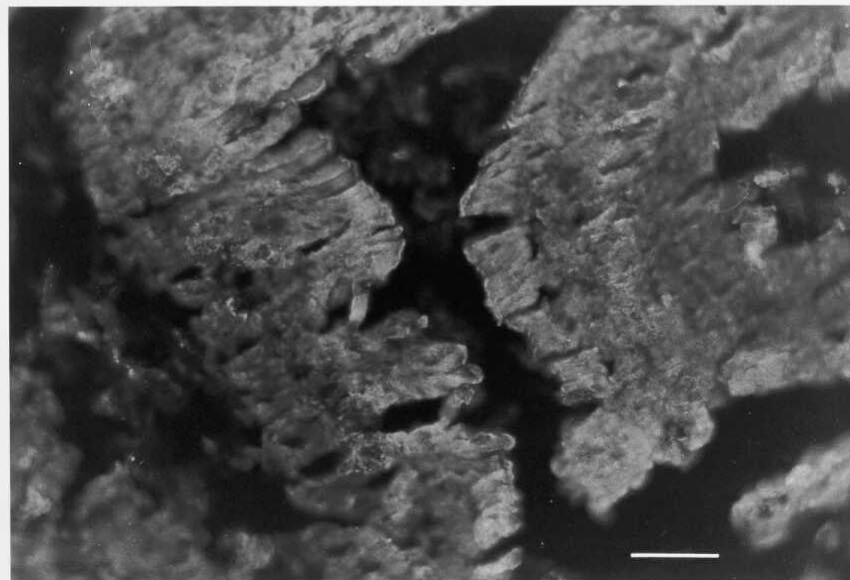


Abb. 5.50a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

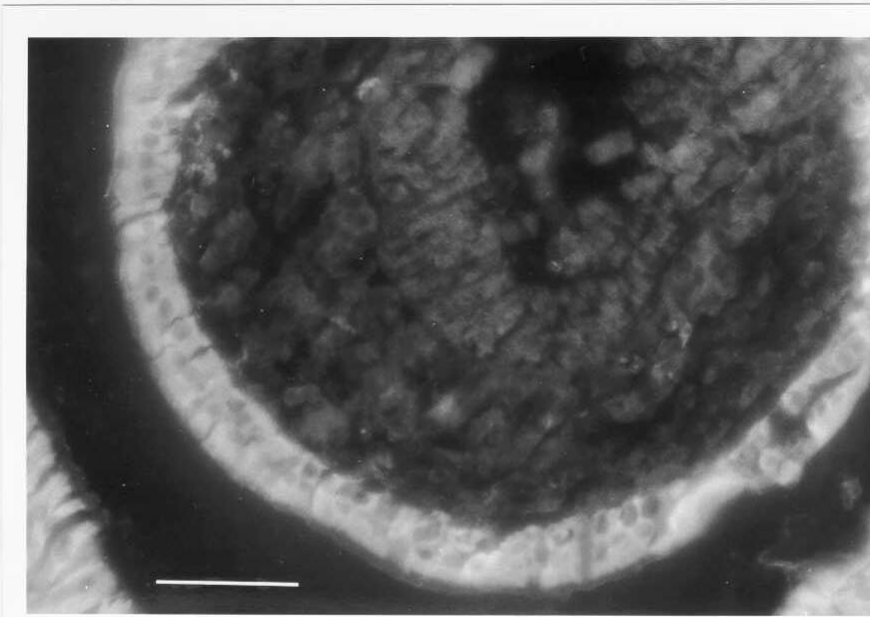


Abb. 5.51: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

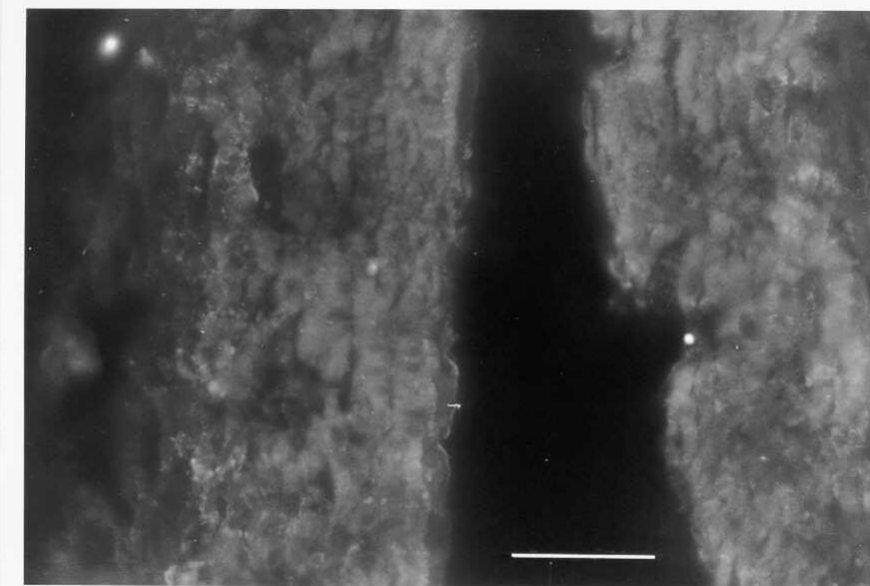


Abb. 5.51a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m



Abb. 5.52: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m



Abb. 5.52a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

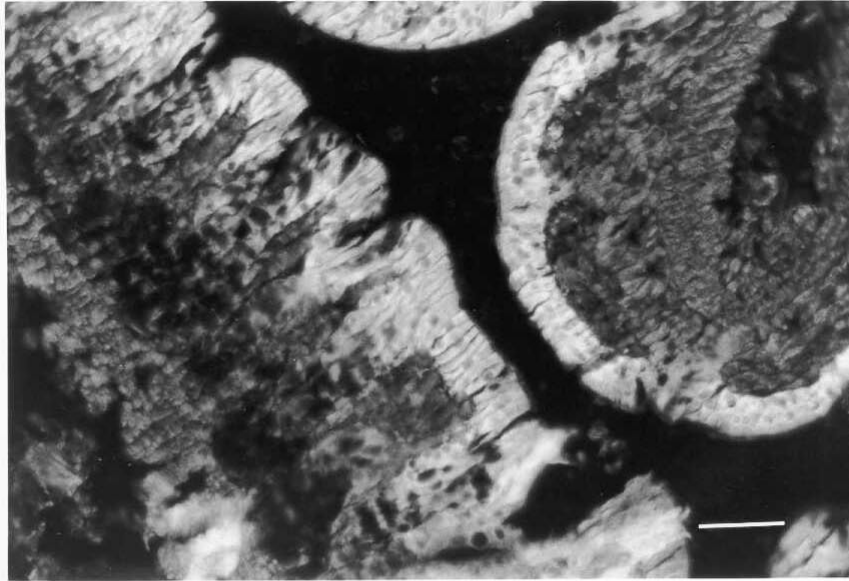


Abb. 5.53: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m



Abb. 5.53a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

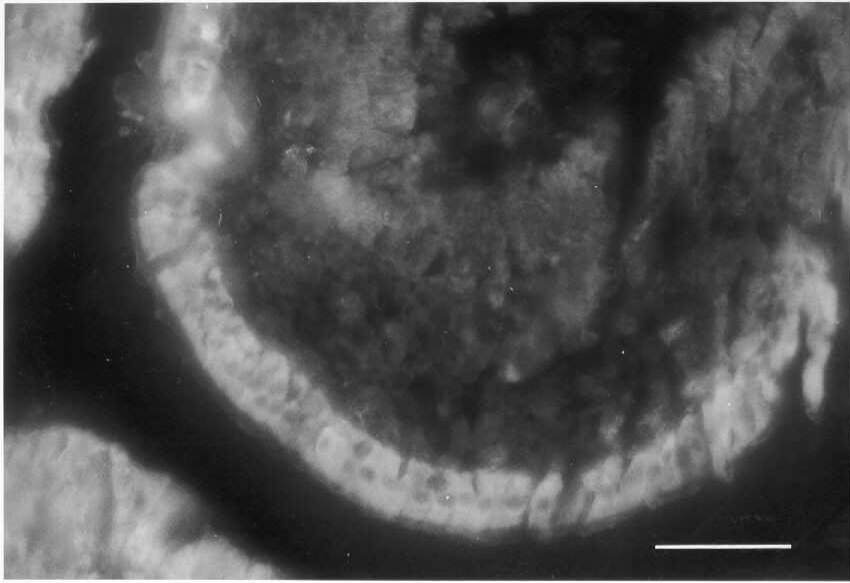


Abb. 5.54: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAII (1:5); Balken: 50 μ m

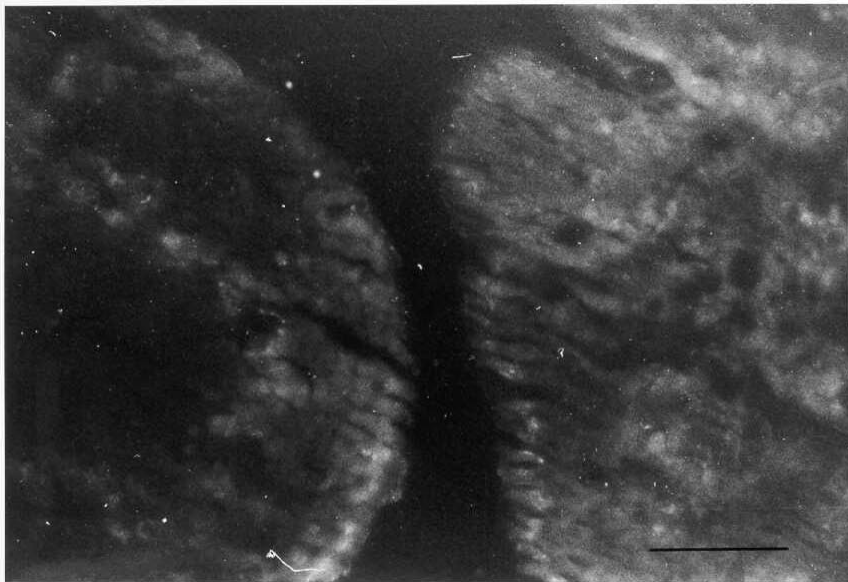


Abb. 5.54a: Paraffinschnitt proximales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

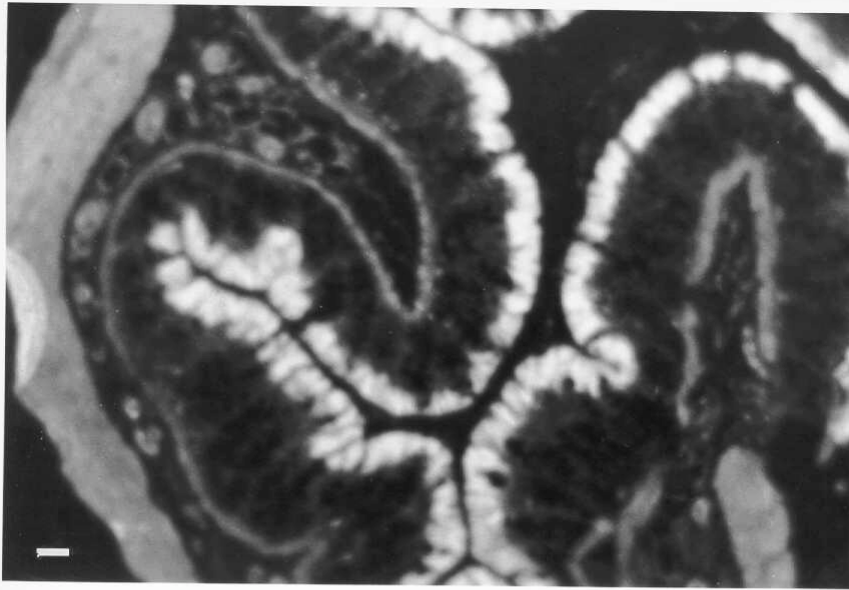


Abb. 5.55: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

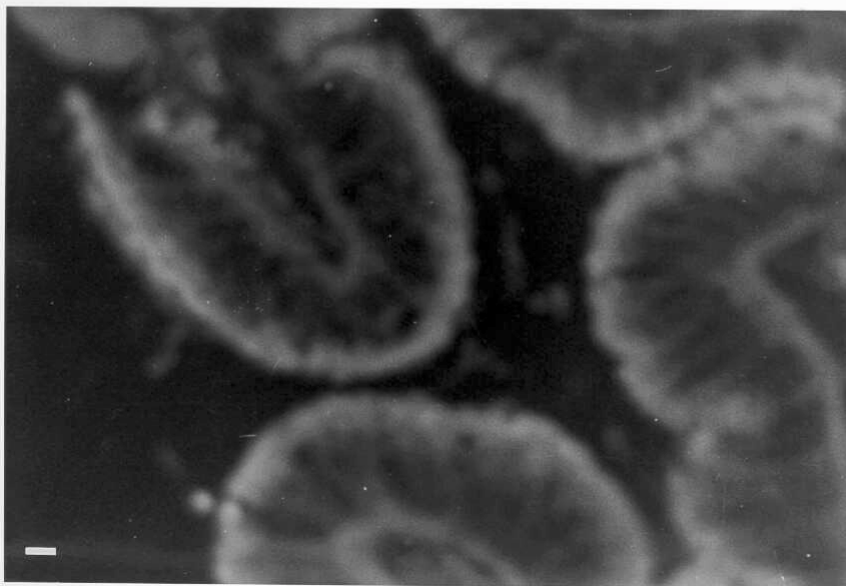


Abb. 5.55a: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

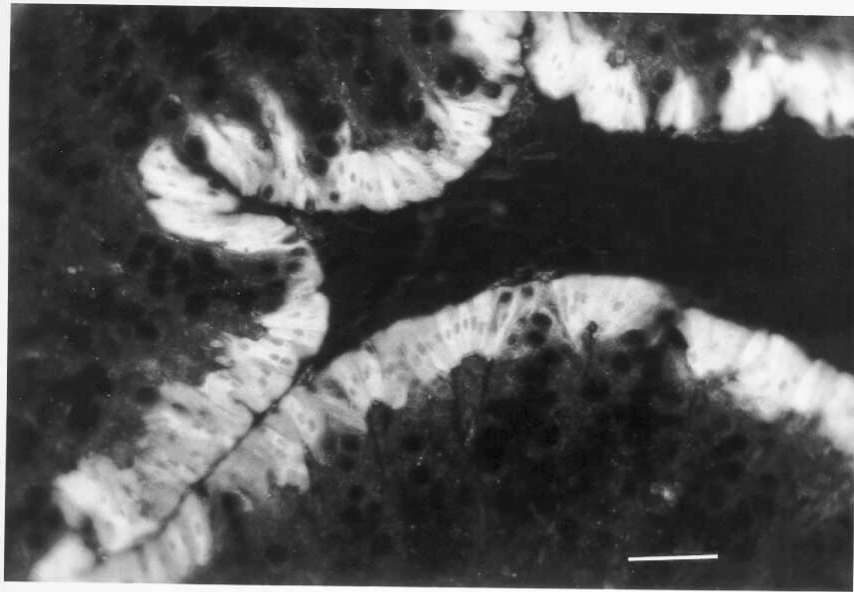


Abb. 5.56: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

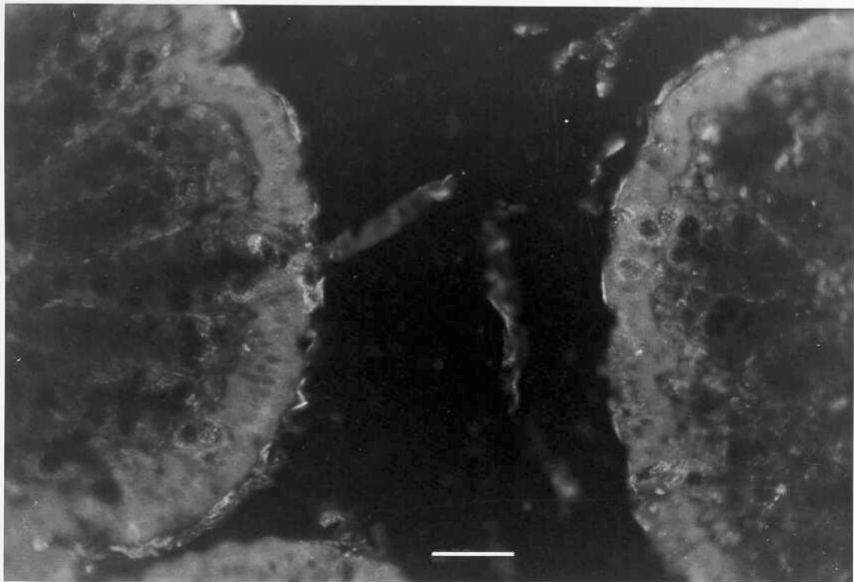


Abb. 5.56a: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmunserum (1:5); Balken: 50 μ m

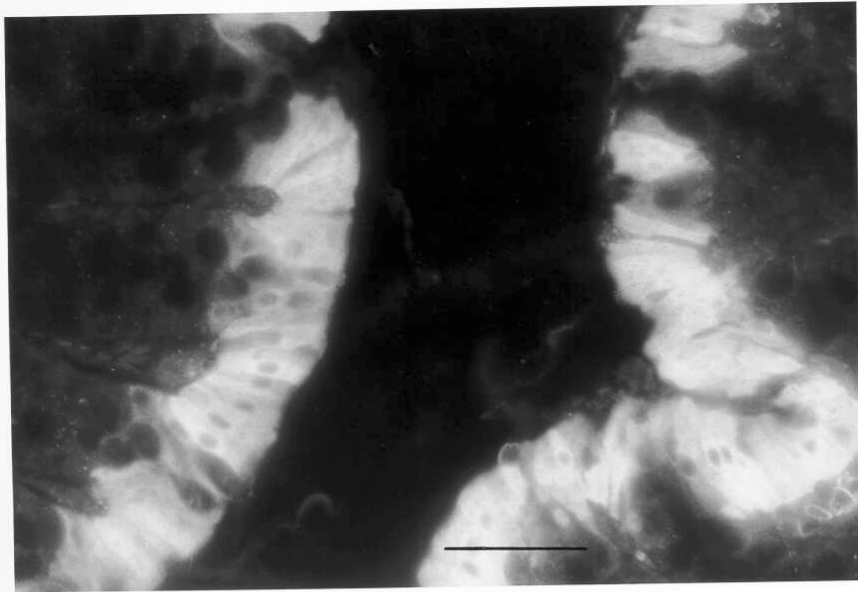


Abb. 5.57: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Anti-Meerschweinchen-CAI (1:5); Balken: 50 μ m

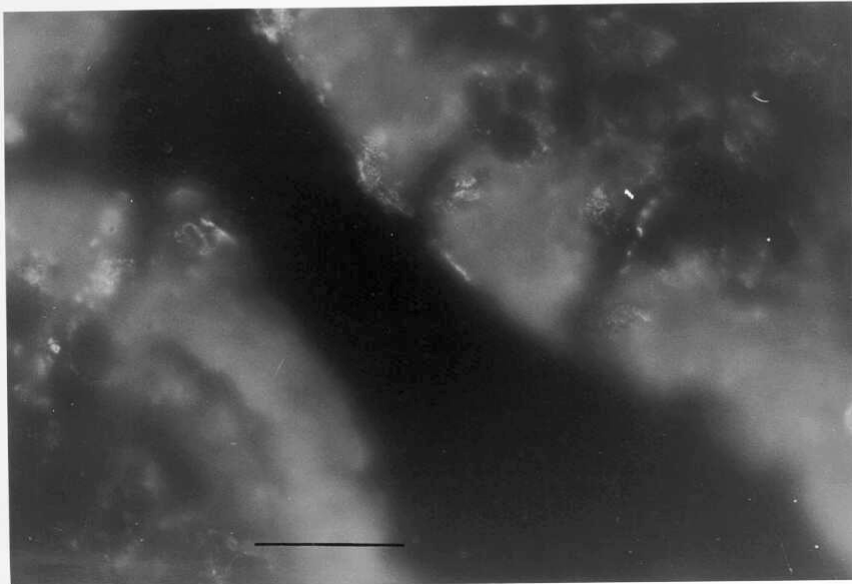


Abb. 5.57a: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen:
Meerschweinchen-Präimmenserum (1:5); Balken: 50 μ m

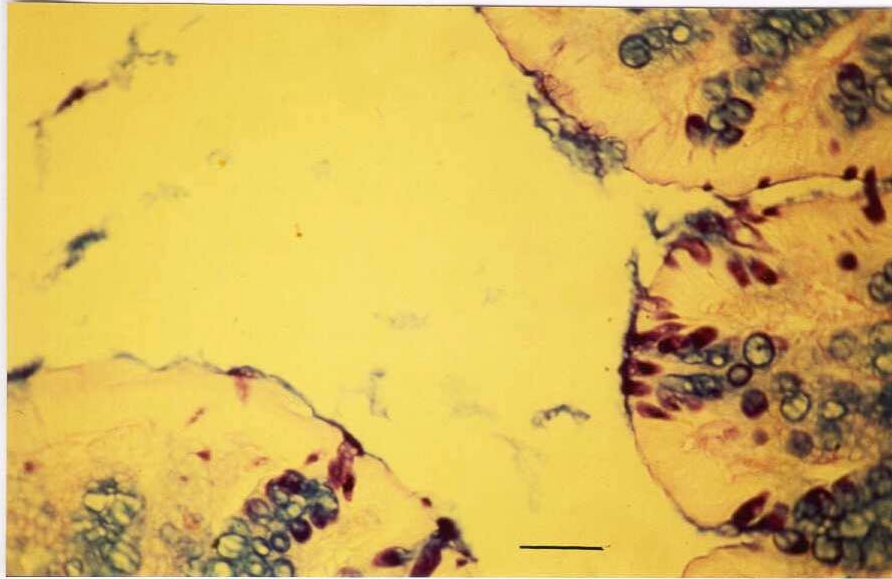


Abb. 5.58: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 1x gespült:
Mucinfärbung; Balken: 50 μ m



Abb. 5.59: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 1x gespült:
Mucinfärbung; Balken: 50 μ m

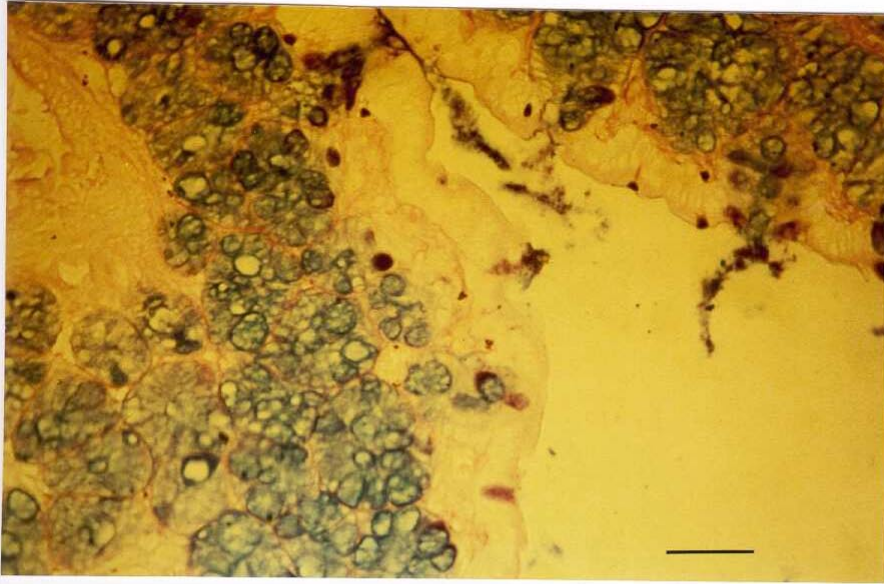


Abb. 5.60: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 2x gespült:
Mucinfärbung; Balken: 50µm

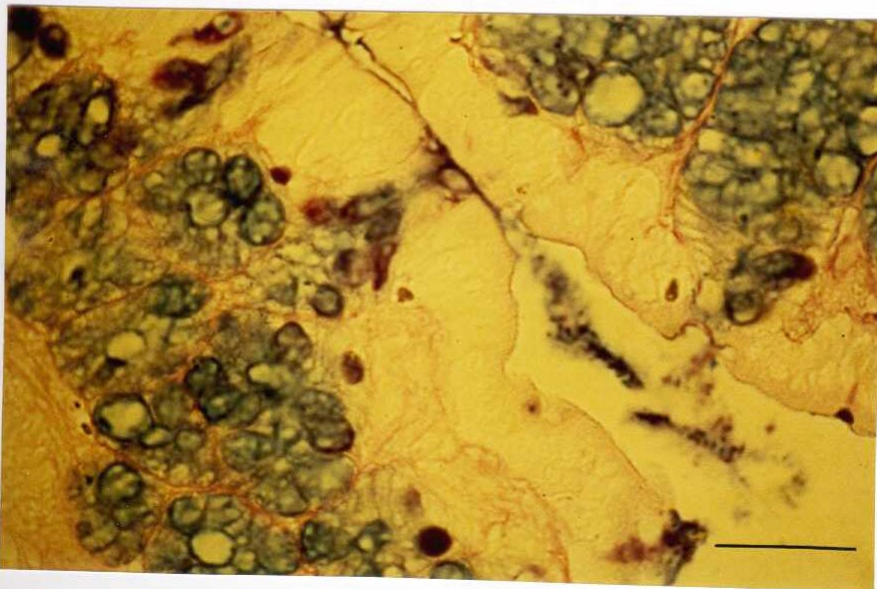


Abb. 5.61: Paraffinschnitt distales Colon Meerschweinchen 2x gespült:
Mucinfärbung; Balken: 50µm

Wissenschaftlicher Werdegang

Name:	Tanja Kleinke
Geboren am:	16.9.1968 in Hannover
Anschrift:	Annenstr. 9 30171 Hannover
Schulbildung:	Vorschule der Grundschule Meterstr. in Hannover August 1974 - Juli 1975 Grundschule in Dedensen August 1975 - Juli 1979 Orientierungsstufe Seelze August 1979 - Juli 1981 Georg-Büchner-Gymnasium in Letter August 1981 - Mai 1988
Schulabschluß	Abitur
Studium der Biologie	Oktober 1988 - März 1994 an der Universität Hannover
Studienabschluß	Diplom 29.4.1994 Titel der Diplomarbeit: „Carboanhydrase-Hemmstoffeffekte und Carboanhydrase- lokalisation an isolierten Skelettmuskelfibrillen“
Promotion:	15.12.2000 im Fachbereich Chemie der Universität Hannover Thema der Dissertation: "Extrazelluläre Carboanhydrase im Dickdarm des Meerschweinchens
Beruflicher Werdegang	seit 1.10.200 Post-doc Mitarbeiterin in der Abteilung "Molekulare Immunologie" der GBF (Gesellschaft für biotechnologische Forschung) in Braunschweig

Abstracts, Vorträge und Publikationen

P. Wetzel, T. Kleinke G. Gros (1995): „Sulfonamide-induced changes in muscle force development and muscle ATPases,,; Vortrag: 4th International Conference on the Carbonic Anhydrases (26.7. - 30.7.95 in Oxford)

T. Kleinke, S. Wagner, S. Parkkila, G. Gros (1998): „Carbonic anhydrase in the mucus of the gastrointestinal tract of guinea pigs, rats humans and CAII-deficient mice,,; Pflügers Archiv 435(6)

P. Wetzel, S. Papadopoulos, T. Kleinke, G. Gros (1999): „Influence of carbonic anhydrase inhibitors on single-twitch, action potential, and Ca⁺⁺- and Myosin-ATP-ase activity in rat skeletal muscle,, XXVIII European Muscle Congress 4.9 - 7.9.1999 in York (J. Muscle Res. Cell Motil.)

G. Gros, P. Wetzel, T. Kleinke, HP. Kubis (2000): „Significance of carbonic anhydrases associated with membrane surfaces for surface pH regulation,,

T. Kleinke & G. Gros (2000): „Carbonic anhydrase in the mucus of the gastrointestinal tract,,; Vortrag 5th International Conference on the Carbonic Anhydrases (20.5. – 25.5.2000 in Port Townsend)

T. Kleinke, S. Wagner, S. Parkkila, G. Gros (2001): „Carbonic anhydrase in the mucus of the colon of guinea pigs, rats, humans and CAII-deficient mice,, zur Publikation vorgelegt

**Ich versichere, die vorliegende Arbeit
selbständig verfaßt und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt
zu haben.**

Hannover, den