

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

# **Mechanismen der Endo- und Exozytose in Enterochromaffin-like (ECL) Zellen des Rattenmagens**

Robert Zanner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend
3. Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl, Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Die Dissertation wurde am 14.05.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.11.2003 angenommen.

**Publikationen, die aus dieser Dissertation entstanden sind:**

Zanner, R., Gratzl, M., Prinz, C. Expression of the Endocytic Proteins Dynamin and Amphiphysin in Rat Gastric Enterochromaffin-like Cells. *J. Cell Sci.* (in press)

Prinz, C., Zanner, R., Gratzl, M. Physiology of Gastric Enterochromaffin-like Cells. *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 371-382

Zanner, R., Gratzl, M., Prinz, C. Circle of Life of Secretory Vesicles in Gastric Enterochromaffin-like Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 971 (2002) 389-396

Zanner, R., Hapfelmeier, G., Gratzl, M., Prinz, C. Intracellular Signal Transduction during Gastrin-induced Histamine Secretion in Rat Gastric Enterochromaffin-like Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282 (2002) 374-382

Prinz, C., Zanner, R., Gerhard, M., Mahr, S., Neumayer, N., Höhne-Zell, B., Gratzl, M. The Mechanism of Histamine Secretion from Gastric Enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 277 (1999) 845-855

# Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungen</i> .....	<i>1</i>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Exokrine und endokrine Zelltypen der Magenschleimhaut .....	4
1.2 Charakterisierung der ECL-Zellen .....	4
1.3 Physiologische Bedeutung der ECL-Zellen .....	6
1.4 Modell der isolierten ECL-Zellen .....	8
1.5 Gastrininduzierte Histaminfreisetzung aus isolierten ECL-Zellen des Rattenmagens.....	9
1.6 Zielsetzung .....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Isolation und Kultivierung von ECL-Zellen .....	11
2.1.1 Lösungen .....	11
2.1.2 Isolation der ECL-Zellen.....	14
2.1.3 Kultivierung von ECL-Zellen .....	15
2.2 Stimulationsexperimente .....	16
2.3 Radioimmunoassay (RIA).....	16
2.4 Indirekte Messung von $[Ca^{2+}]_i$ (Video Imaging).....	17
2.4.1 Prinzip des Video Imaging.....	17
2.4.2 Materialien .....	17
2.4.3 Durchführung des Video Imaging.....	18
2.5 Proteinisolierung .....	19
2.5.1 Lösungen zur Proteinisolierung .....	19
2.5.2 Proteinisolierung aus frisch isolierten Zellen.....	19
2.5.3 Proteinisolierung aus kultivierten Zellen .....	20
2.5.4 Proteinisolierung aus Geweben.....	20
2.6 Proteinbestimmung .....	20
2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
2.7.1 Prinzip der SDS-PAGE .....	21
2.7.2 Lösungen .....	21
2.7.3 Herstellung der Polyacrylamidgele .....	22
2.7.4 Vorbereitung von Elektrophoresekammer und Proben sowie Elektrophoreselauf .....	22
2.7.5 Coomassie-Färbung der SDS-Gele .....	23
2.8 Western Blot Analyse .....	24
2.8.1 Prinzip der Western Blot Analyse.....	24
2.8.2 Materialien .....	24
2.8.3 Durchführung des Westernblots (Wet blot).....	25
2.9 Indirekte Immunhistochemie .....	26

2.9.1	Prinzip der Immunhistochemie .....	26
2.9.2	Herstellung von Gewebeschnitten.....	26
2.9.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
2.9.4	Immunhistochemie mit biotin-markierten sekundären Antikörpern.....	27
<b>2.10</b>	<b>Indirekte Immunzytochemie.....</b>	<b>29</b>
2.10.1	Prinzip der Immunzytochemie.....	29
2.10.2	Immunzytochemie mit fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern.....	29
<b>2.11</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>30</b>
2.11.1	Prinzip der Elektronenmikroskopie .....	30
2.11.2	Materialien .....	31
2.11.3	Durchführung.....	31
<b>2.12</b>	<b>Immunopräzipitation.....</b>	<b>32</b>
2.12.1	Prinzip der Immunopräzipitation .....	32
2.12.2	Materialien .....	32
2.12.3	Durchführung der Immunopräzipitation.....	32
<b>2.13</b>	<b>Isolation von Ribonukleinsäuren (RNA) .....</b>	<b>33</b>
2.13.1	Materialien .....	33
2.13.2	Durchführung der RNA-Isolation.....	33
2.13.3	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration.....	34
<b>2.14</b>	<b>Reverse Transkription (RT) .....</b>	<b>34</b>
2.14.1	Prinzip der RT.....	34
2.14.2	Reagenzien.....	34
2.14.3	Durchführung der reversen Transkription .....	35
<b>2.15</b>	<b>Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....</b>	<b>36</b>
2.15.1	Prinzip der PCR .....	36
2.15.2	Primerdesign .....	36
2.15.3	Sequenzen und Anlagerungstemperaturen der verwendeten Oligonucleotid-Primer .....	37
2.15.4	Materialien und Durchführung der PCR.....	38
<b>2.16</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese.....</b>	<b>40</b>
2.16.1	Lösungen.....	40
2.16.2	Herstellung von Agarosegelen.....	40
2.16.3	Probenauftrag und Elektrophoreselauf .....	40
2.16.4	Dokumentation .....	41
2.16.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
2.16.6	Klonierung eines Fragments .....	41
2.16.7	Isolation von Plasmiden.....	42
2.16.8	Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolation und Kultivierung von ECL-Zellen des Rattenmagens .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Bedeutung von Calcium für die gastrininduzierte Histaminfreisetzung in isolierten ECL-Zellen .....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Einführung .....	44
3.2.2	Bedeutung von $InsP_3$ und $InsP_3$ -Rezeptoren.....	45
3.2.3	Bedeutung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.....	47
3.2.4	Bedeutung von Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum.....	48
3.2.5	Effekt von Calciumkanal-Inhibitoren .....	49

---

<b>3.3</b>	<b>Expression und Interaktion der Endozytose-Proteine Dynamin und Amphiphysin in ECL-Zellen .....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Einführung .....	51
3.3.2	Expression von Dynamin auf RNA-Ebene in isolierten ECL-Zellen .....	52
3.3.3	Expression von Dynamin auf Protein-Ebene in isolierten ECL-Zellen .....	53
3.3.4	Immunolokalisation von Dynamin in isolierten ECL-Zellen .....	54
3.3.5	Immunolokalisation von Amphiphysin in ECL-Zellen des Magens .....	54
3.3.6	Expression von Amphiphysin auf RNA-Ebene in isolierten ECL-Zellen ..	57
3.3.7	Interaktion von Dynamin und Amphiphysin .....	59
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i> .....</b>	<b>60</b>
4.1	Bedeutung von Calcium für die gastrininduzierte Histaminfreisetzung .....	60
4.2	Expression der Endozytose-Proteine Dynamin und Amphiphysin in ECL-Zellen des Rattenmagens .....	65
4.3	Der Lebenszyklus sekretorischer Vesikel in ECL-Zellen .....	68
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i> .....</b>	<b>71</b>
	<i>Literaturverzeichnis</i> .....	73
	<i>Danksagung</i> .....	92

# Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
Abb.	Abbildung
Amph	Amphiphysin
bp	Base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
CCE	capazitiver Calcium-Einstrom
CCK	Cholecystokinin
CGA	Chromogranin A
DAG	Diacylglycerol
DDSA	2-Dodecyl-Bersteinsäureanhydrid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP-30	2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol
DMSO	Dimethoxysulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxynucleotid Trisphosphat
Dyn	Dynamamin
EC	Enterochromaffin
ECL	Enterochromaffin-like
EDTA	Ethylendiamintrisacetat
EGTA	Ethylenglykol bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fura-2 AM	[1-[2-(5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraaceticacid] penta-kis (acetoxymethyl) ester

---

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HDC	L-Histidindecaboxylase
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethylsulfonic acid
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5- Trisphosphat
InsP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5- Trisphosphat Rezeptor
MMLV	Murine Moloney Leukemia Virus
MNA	Methylnorbonen-2,3-Dicarbonsäureanhydrid
NSF	N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide
PACR	PACAP-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMA	Phorbol 12-Myristat, 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RPM	Revolutions Per Minute
RT	Reverse Transkription
RyR	Ryanodine Rezeptor
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA	sarko-/endoplasmatische Retikulum ATPase
SNAP-25	Synaptosome-associated Protein of 25 kDa
SNAP	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SOCC	Store-operated Calcium Channel
SST	Somatostatin

SSTR	Somatostatin-Rezeptor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
Tg	Thapsigargin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethan
VAMP	Vesicle-associated Membrane Protein
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VPAC	VIP/PACAP-Rezeptor



# 1 Einleitung

## 1.1 Exokrine und endokrine Zelltypen der Magenschleimhaut

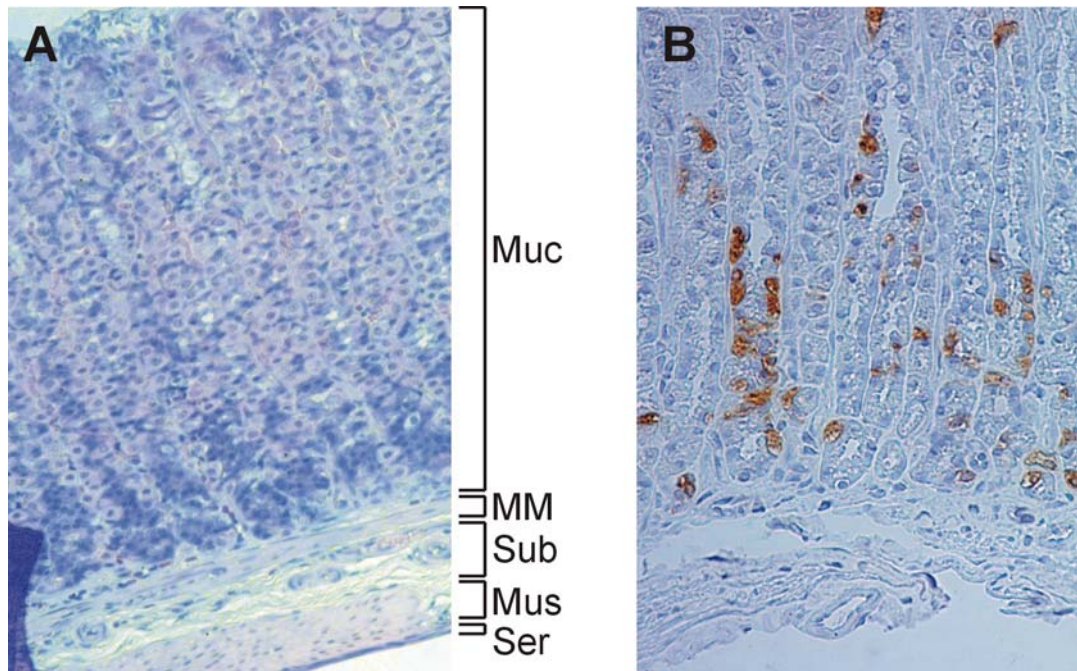
Die Hauptaufgaben des Magens sind die Produktion und Sekretion von Magensäure und Intrinsic Faktor durch die Parietal- oder Belegzellen sowie der Enzymvorstufe Pepsinogen durch die Hauptzellen des Magenfundus. Die Nebenzellen, die einen bikarbonatreichen, alkalischen Schleim sezernieren, beugen einer Selbstverdauung der Magenschleimhaut durch die aggressive Magensäure vor.

Neben diesen exokrinen Zellen finden sich auch eine Reihe endokriner Zelltypen in der Magenmucosa. Endokrine Zellen sezernieren biologisch aktive Peptide sowie niedermolekulare Botenstoffe und machen etwa 1 - 2 % des gesamten Zellvolumens aus (Forssmann et al., 1969, S.692-715; Helander, 1981, S.217-289; Simonsson et al., 1988, S.1089-1099). Hierzu gehören somatostatinproduzierende D-Zellen, D<sub>1</sub>/P-Zellen, serotoninproduzierende enterochromaffine (EC) Zellen, histaminproduzierende enterochromaffin-like (ECL) Zellen, gastrinproduzierende G-Zellen und ghrelinproduzierende X/A-Zellen (Sachs et al., 1997, S.243-256; Solcia et al., 2000, S.31-35). Bei Säugern sind ECL-Zellen die zahlreichsten endokrinen Zellen des Magens. Ihr Anteil liegt beim Menschen bei 25 - 35 % und bei der Ratte zwischen 65 und 75 % (Sundler und Hakanson, 1991, S.9-26; Nissinen und Panula, 1993, S.1405-1412; Hakanson et al., 1994, S.1171-1184).

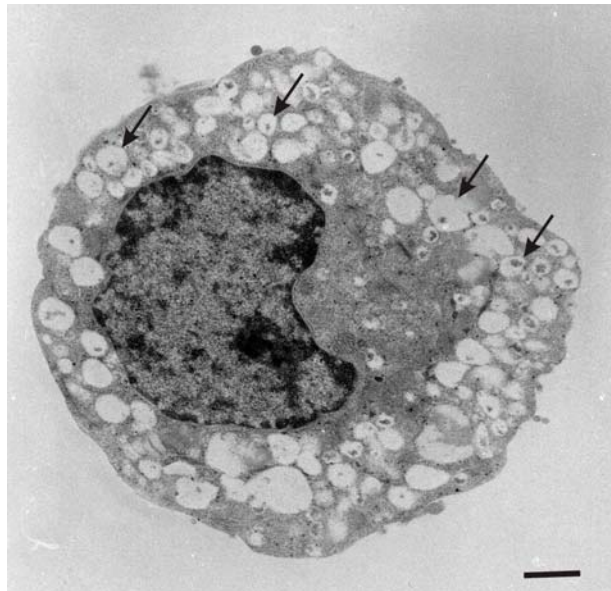
## 1.2 Charakterisierung der ECL-Zellen

ECL-Zellen sind kleine, unregelmäßig geformte Zellen, die ausschließlich in der säureproduzierenden Mucosa des Magenfundus vorkommen. Sie finden sich dort vor allem im basalen Drittel der Magendrüsen, in engem Kontakt mit Haupt- und Parietalzellen (Abb. 1) (Hakanson et al., 1986, S.5-17; Kamoshida et al., 1999, S.315-320). ECL-Zellen wurden erstmals Ende der Sechziger Jahre anhand ihrer Ultrastruktur beschrieben (Hakanson und Owman, 1967, S.759-766). Da sich ECL-Zellen wie alle endokrinen Zellen mit Chrom- und Silberfarbstoffen anfärben lassen und enterochromaffinen Zellen

strukturell sehr ähnlich sind, wurden sie als „Enterochromaffin-like“ Zellen bezeichnet (Hakanson et al., 1971, S.460-466; Capella et al., 1971, S.68-84).



**Abbildung 1:** (A) H.E.-Färbung eines Schnittes durch den säureproduzierenden Anteil des Rattenmagens. Muc = Tunica mucosa, MM = Lamina muscularis mucosae, Sub = Submucosa, Mus = Tunica muscularis, Ser = Serosa. (B) Immunfärbung mit einem Antikörper gegen HDC zur Darstellung der ECL-Zellen



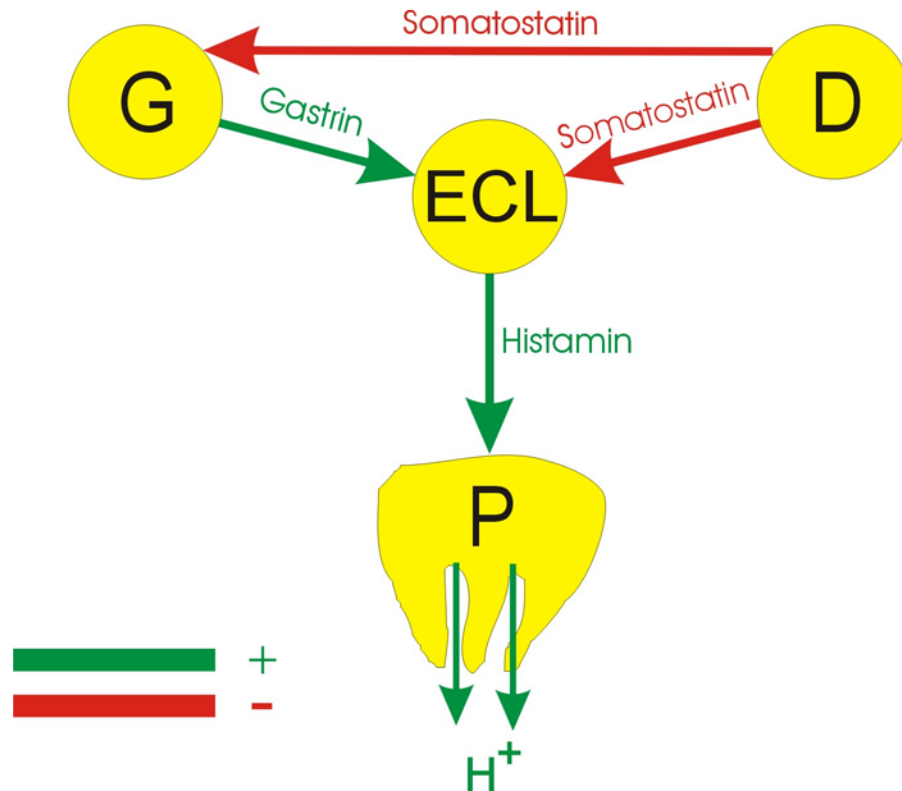
**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Darstellung einer isolierten ECL-Zelle aus dem Rattenmagen. Die Pfeile kennzeichnen zahlreiche sekretorische Vesikel. Balken = 1μm

ECL-Zellen besitzen die typische Ultrastruktur endokriner Zellen (Abb. 2). Sie haben einen Durchmesser von etwa 10  $\mu\text{m}$  und einen exzentrisch gelegenen Zellkern, der mehr als die Hälfte des gesamten Zytoplasmas ausfüllt. Zellorganelle wie endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen sind nur spärlich vorhanden. Dagegen finden sich im Zytoplasma zahlreiche Vesikel: elektronendurchlässige, sekretorische Vesikel (mittlerer  $\varnothing$  180 nm), häufig mit einem kleinen, elektronendichten Kern, elektronendichte Granula (mittlerer  $\varnothing$  120 nm), Mikrovesikel (mittlerer  $\varnothing$  70 nm) und Vakuolen ( $\varnothing \geq 500$  nm) (Hakanson et al., 1986, S.5-17; Chen et al., 1996, S.469-478; Chen et al., 1998, S.217-231; Zhao et al., 1999, S.457-470).

ECL-Zellen sind die Hauptquelle von zellulärem Histamin im Magen (2,8 - 3,3 pg/Zelle) (Andersson et al., 1992, S.7-13; Prinz et al., 1993, S.449-461). Sie synthetisieren dieses biogene Amin mit Hilfe der L-Histidindecaboxylase (HDC) im Zytoplasma und speichern es in sekretorischen Vesikeln mittels des vesikulären Monoamintransporters vom Subtyp 2 (VMAT<sub>2</sub>) (De Giorgio et al., 1996, S.77-80; Dimaline und Struthers, 1996, S.249-256). Deshalb lassen sich ECL-Zellen mit Antikörpern gegen Histamin (Rubin und Schwartz, 1979, S.458-467; Panula et al., 1985, S.933-941; Hakanson et al., 1986, S.5-17; Nissinen und Panula, 1993, S.1405-1412; Fujiwara et al., 1999, S.1031-1038) oder HDC (Kubota et al., 1984, S.496-502) identifizieren. Des Weiteren exprimieren ECL-Zellen den neuroendokrinen Marker Chromogranin A (CGA) (Rindi et al., 1986, S.19-28) sowie dessen Abkömmling Pankreastatin (Curry et al., 1990, S.207-219; Hakanson et al., 1995, S.1445-1452). CGA und Pankreastatin werden zusammen mit Histamin in sekretorischen Vesikeln gespeichert (Zhao et al., 1999, S.457-470). Weitere Sekretionsprodukte umfassen Calbindin (Furness et al., 1989, S.449-451), Regenerating-Gen-Protein (Asahara et al., 1996, S.45-55) und Uroguanylin (Date et al., 1999, S.2398-2404). Das eigentliche Peptid-Hormon der ECL-Zellen ist bis heute unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ECL-Zellen ein Peptid sezernieren, das die Aufnahme von Calcium in den Knochen fördert (Persson et al., 1989, S.2834-2838; Larsson et al., 2002, S.13-18).

### 1.3 Physiologische Bedeutung der ECL-Zellen

Bei der Regulation der Magensäureproduktion unterscheidet man 3 Ebenen: die zentrale Regulation durch das zentrale Nervensystem, die periphere Regulation durch Nervensystem und endokrine Zellen des Magens, sowie die zelluläre Regulation an der säureproduzierenden Parietalzelle selbst (Hersey und Sachs, 1995, S.155-189).



**Abbildung 3:** Vereinfachtes Schema der Regulation der Magensäureproduktion durch endokrine Zellen

ECL-Zellen nehmen eine zentrale Stellung bei der peripheren Regulation der Magensäureproduktion ein (Abb. 3) (Sachs et al., 1994, S.81-95; Modlin und Tang, 1996, S.783-810; Sachs und Prinz, 1996, S.57-62). Nach Nahrungsaufnahme bewirkt eine Magendehnung (Schiller et al., 1980, S.912-917) sowie die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren (Lichtenberger et al., 1982, S.698-700) die Ausschüttung von Gastrin durch die G-Zellen des Antrums. Dieses Hormon erreicht die ECL-Zellen des Magenfundus auf dem Blutweg, bindet dort an spezifische Rezeptoren vom Cholecystokin (CCK)-B Typ und bewirkt die Freisetzung von Histamin (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675). Histamin gelangt auf parakrinem Wege zu den Parietalzellen und bindet dort an Histamin H<sub>2</sub>-Rezeptoren (Black et al., 1972, S.385-390), was dann zu Freisetzung und Produktion von Magensäure durch die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase führt (Hirschowitz, 1989, S.127-157). Die negative Regulation wird von den D-Zellen übernommen, die sich in Antrum und Corpus finden (Lloyd et al., 1995; G102-G106). Diese Zellen sezernieren Somatostatin, das der Freisetzung von Gastrin durch G-Zellen (Bloom et al., 1975; 396; Larsson et al., 1979, S.1393-1395) und Histamin durch ECL-Zellen (Prinz et al., 1994, S.1067-1074) entgegenwirkt.

## 1.4 Modell der isolierten ECL-Zellen

Die ersten funktionellen Untersuchungen über ECL-Zellen wurden an *in vivo* Modellen wie dem isolierten und perfundierten Magen, isolierten Magendrüsen aus dem Kaninchen oder Mucosa-Streifen durchgeführt (Chan und Soll, 1988, S.17-21). ECL-Zellen unterliegen *in vivo* einer Vielzahl endo-, para- und neurokriner Einflüsse. Um den Effekt von Testsubstanzen ohne den Einfluss dieser Faktoren auf ECL-Zellen zu untersuchen, war es nötig, ein Modell von isolierten Zellen zu entwickeln. Hierzu eignet sich besonders der Rattenmagen, da hier der Anteil der ECL-Zellen hoch ist und andere histaminspeichernde Zellen, v.a. Mastzellen, in den Magendrüsen praktisch nicht vorkommen (Sundler und Hakanson, 1991, S.9-26; Hakanson et al., 1994, S.1171-1184). Die ersten Versuche, ECL-Zellen aus dem Rattenmagen zu isolieren erzielten eine Anreicherung von 8 - 12 % (Soll et al., 1981, S.717-727) bzw. 16 % (Brenna und Waldum, 1991, S.1295-1306). Der Durchbruch gelang 1993 mit einer Kombination aus enzymatischem Verdau, Gegenflusselutriation und Dichtegradient-Zentrifugation. Mit dieser Methode konnten ECL-Zellen auf über 65 % angereichert werden (Prinz et al., 1993, S.449-461). Durch anschließende Kurzzeitkultur konnte der Reinheitsgrad sogar auf über 90 % gesteigert werden. (Prinz et al., 1994; G663-G675).

Anhand dieses *in vitro* Modells wurden die Effekte zahlreicher Mediatoren auf die sekretorische Funktion der ECL-Zellen untersucht (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675; Prinz et al., 1994, S.1067-1074; Sandor et al., 1996, S.1084-1092; Prinz et al., 1997, S.364-375; Lindström et al., 1997, S.73-86; Zeng et al., 1997, S.127-135; Zeng et al., 1998, S.330-339; Zeng et al., 1999, S.1383-1391; Lindström und Hakanson, 2001, S.169-180). Es konnten Effekte aus *in vivo* Experimenten bestätigt (z.B. die stimulierende Wirkung von Gastrin) und neue Einflussfaktoren identifiziert werden. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Studien gibt Tabelle 1.

Des weiteren war es mit Hilfe dieses Modells möglich, intrazelluläre Vorgänge wie Signaltransduktionswege, Transkriptions-/Translationsvorgänge oder Enzymaktivitäten zu untersuchen. So konnten Studien zeigen, dass Gastrin mehrere Effekte auf ECL-Zellen ausübt, je nach Dauer der Stimulation (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675; Chen et al., 1994, S.18-27). Die gastrininduzierte Histaminfreisetzung wird als akuter Effekt bezeichnet. Sie setzt innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung des Gastrin/CCK-B-Rezeptors ein und bleibt über etwa 60 Minuten konstant. Bei einer Stimulationsdauer von 30 - 120 Minuten kommt es zu einer verstärkten Histaminsynthese. Dieser intermediäre Effekt erfolgt über eine Aktivierung der HDC auf mRNA- und Proteinebene. Von einer chronische Gastrinwirkung spricht man nach etwa 2 - 4 Tagen. Hierbei kommt zu einer Proliferation der ECL-Zellen.

Effektor	Wirkort/Rezeptor	Wirkung
Gastrin	Gastrin/CCK-B-Rezeptor	Stimulation
PACAP	PAC <sub>1</sub> -Rezeptor	Stimulation
PACAP/VIP	VPAC <sub>2</sub> -Rezeptor	Stimulation
Adrenalin	β <sub>2</sub> -Adreno-Rezeptor	Stimulation
Somatostatin	SST <sub>2</sub> -Rezeptor	Inhibition
Prostaglandin E <sub>2</sub>	EP <sub>3</sub> -Rezeptor	Inhibition
Peptide YY	Y <sub>1</sub> -Rezeptor	Inhibition
Galanin	?	Inhibition

*Tabelle 1: Übersicht über die Wirkungen verschiedener Mediatoren auf die sekretorische Funktion isolierter ECL-Zellen (modifiziert nach Lindström et al. 2001)*

## 1.5 Gastrininduzierte Histaminfreisetzung aus isolierten ECL-Zellen des Rattenmagens

Die gastrininduzierte Histaminfreisetzung aus ECL-Zellen kann in 3 Phasen unterteilt werden: 1) Bindung von Gastrin an den Gastrin/CCK-B-Rezeptor sowie Rezeptoraktivierung, 2) Signaltransduktion und 3) Exozytose (Prinz et al., 1997, S.221-229).

Der Gastrin/CCK-B-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) (Wank, 1995; G628-G646; Wank, 1998; G607-G613). Seine Aktivierung führt zu einer charakteristischen, biphasischen Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) die solange anhält, bis kein Gastrin mehr an den Rezeptor bindet (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675). In der Folge kommt es zur Exozytose histaminspeichernder sekretorischer Vesikel. Hierbei sind die SNARE- (= soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Proteine SNAP-25 (= synaptosome-associated protein of 25 kDa) und Synaptobrevin/VAMP (= vesicle-associated membrane protein) von herausragender Bedeutung (Höhne-Zell et al., 1997, S.5518-5526).

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit sollte es zum einen sein, die Bedeutung von Calcium für die gastrin-induzierte Histaminfreisetzung genauer zu untersuchen. Hierzu sollte geklärt werden, welche(r) Second Messenger, welche Kanäle und welche Calcium-Pools an diesem Vorgang beteiligt sind. Zum anderen sollten auch erste Versuche zur Untersuchung von Endozytose-Vorgängen in ECL-Zellen durchgeführt werden. Nach der Verschmelzung von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran muss es zu einer Wiederaufnahme der Vesikel kommen, um die Zellgröße konstant zu halten. An Neuronen wurden zahlreiche Untersuchungen über das Recycling von synaptischen Vesikeln durchgeführt, die zeigten, dass u.a. die Proteine Dynamin und Amphiphysin an diesem Vorgang maßgeblich beteiligt sind (Bauerfeind et al., 1998, S.253-257; Takei et al., 1999, S.33-39; Slepnev und De Camilli, 2000, S.161-172). Deshalb sollte in dieser Arbeit die Expression und Interaktion von Dynamin- und Amphiphysin-Isoformen in ECL-Zellen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Isolation und Kultivierung von ECL-Zellen

#### 2.1.1 Lösungen

##### 2.1.1.1 Stammlösungen

Alle Chemikalien waren falls nicht anders angegeben von Merck, Darmstadt bzw. Sigma, Deisenhofen und wurden stets in Analysenqualität eingesetzt.

<i>Stocklösung I (10x)</i>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	200 mM
NaCl	700 mM
KCl	50 mM
D(+)-Glucose	110 mM

<i>HEPES (10x)</i>	
HEPES (Serva, Heidelberg)	500 mM

<i>EDTA (100x)</i>	
Titriplex III	200 mM

<i>Lösung IV (10x)</i>	
CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	100 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	150 mM



**2.1.1.2 Inkubationslösungen**

<i>Lösung A</i>	
Stock I (10x)	100 ml
HEPES (10x)	100 ml
EDTA (100x)	3,5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml
pH 7,8 mit 2N KOH	
BSA (Serva)	10 g

<i>Lösung B</i>	
Stock I (10x)	100 ml
HEPES (10x)	100 ml
Lösung IV (10x)	10 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml
pH 7,8 mit 2N KOH	
BSA	5 g

<i>Elutriationspuffer</i>	
NaCl	140 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 mit 2N KOH	
D(+)-Glucose	11,1 mM
BSA	0,1 %
Dithiothreitol	0,01 %

<i>Pronase E</i>	
Pronase (Roche, Mannheim) gelöst in Lösung A	1,3 g/l

### 2.1.1.3 Lösungen für den Dichtegradienten

<i>Solution A: Nycodenz Stock</i>	
Nycodenz (Accurate Chemicals, NY, USA)	250 ml
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,0609 g
Albumin (reinst)	2,50 g
HEPES (reinst)	0,595 g
pH 7,4 mit 2N KOH	

<i>Solution B: Elutriationspuffer mit hohem Albumingehalt</i>	
Elutriationspuffer	400 ml
Albumin (reinst)	3,6 g

<i>1:1 Solution (Dichte 1,078)</i>	
Solution A	150 ml
Solution B	150 ml

mischen, steril filtrieren, densitometrische Dichtekontrolle

<i>1:2 Solution (Dichte 1,052)</i>	
Solution A	100 ml
Solution B	200 ml

mischen, steril filtrieren, densitometrische Dichtekontrolle

$$\text{Dichte} = \text{optischer Index} \times 3,287 - 3,383$$

### 2.1.1.4 Kulturmedium

DME/F12	1,56 g
H <sub>2</sub> O dest. (steril und pyrogenfrei)	94 ml
Gentamicin Sulfat (50 mg/ml)	0,1 ml
Hydrocortison (10 <sup>-4</sup> M)	0,01 ml
Gastrin (10 <sup>-8</sup> M)	0,01 ml
Insulin-Transferrin-Sodiumselenit (1 mg/ml; 1 mg/ml; 1 µg/ml)	0,5 ml
Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Karlsruhe)	5 ml
Albumin	0,2 g
pH 7,38 mit 2N KOH	

steril filtrieren mit 0,2 µm Cellulose Acetat Filter

### 2.1.2 Isolation der ECL-Zellen

Pro Präparation wurden 5 weibliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzberg) mit einem Gewicht von 180 - 200 g verwendet. Die Tiere wurden bis zur Verwendung im Tierstall des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung (Direktor: Prof. Dr. med Bernd Gänsbacher) untergebracht und von Fachpersonal versorgt. Nach Betäubung mit Kohlendioxid und Tötung durch Genickbruch wurde das Abdomen der Ratten eröffnet, die Mägen wurden an Ösophagus und Pylorus mit Bindfaden verschlossen und entnommen. Anschließend wurden die Mägen am Fundus eröffnet und entleert, und mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette invertiert. Nach Verschluss des Fundus wurden die Mägen mit Pronase-Lösung gefüllt.

Anschließend wurden die so präparierten Mägen bei 37° C für 35 Minuten in Lösung A, für 10 Minuten in Lösung B und für weitere 30 Minuten in Lösung A inkubiert und gleichzeitig oxygeniert. Durch mechanisches Rühren in Lösung B für 8 Minuten wurden die unfraktionierten Schleimhautzellen gewonnen. Die Mägen wurden nochmals für 20 Minuten in Lösung A inkubiert, diesmal ohne Begasung mit Sauerstoff. Es folgten zwei weitere Rührschritte von 8- und 10-minütiger Dauer.

Die unfraktionierten Zellen wurden nun mit Elutriationsmedium bei 800 RPM für 3 Minuten gewaschen und anschließend durch Gegenstrom-Elutriation (McEwen et al., 1968, S.369-377) in einem JE-6B Rotor (Beckman Instruments, München) in einer J2-21M/E Zentrifuge (Beckman Instruments) der Größe nach in verschiedene Zellfraktionen aufgeteilt. Die Fraktion der ECL-Zellen wurde bei 2000 RPM und einer Pumpleistung von ca. 20 ml/min gewonnen.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die Zellen auf einen Nycodenz-Dichtegradienten aus 1:1 und 1:2 Solution aufgetragen und in einer Rotanta/AP Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) 6 Minuten bei 1100 RPM zentrifugiert. Die resultierenden Zellen wurden in Kulturmedium gewaschen und mit Hilfe einer Neubauerkammer (Brand, Wertheim) gezählt. Die Anreicherung der ECL-Zellen wurde durch Aufnahme von Acridin-Orange und Antikörperfärbung gegen die Histidindecaboxylase ermittelt und betrug 85 - 95 %.

### 2.1.3 Kultivierung von ECL-Zellen

Die Kultivierung erfolgte stets unter sterilen Bedingungen mit sterilen Lösungen, Pipettenspitzen und Kulturplatten.

Für Stimulationsexperimente, bei denen der Einfluss von zugegebenen Substanzen auf die Histaminfreisetzung bestimmt wurde, wurden isolierte ECL-Zellen auf 6-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Die Kulturplatten wurden zuvor auf Eis mit Matrigel (Becton Dickinson) beschichtet (35 µl einer 1:5 Verdünnung mit sterilem Aqua dest. pro Loch) und bei geöffnetem Deckel unter der Laminar-Flow-Bank getrocknet. Auf jedes Loch wurden 2 - 3 x 10<sup>4</sup> Zellen in 1 ml Kulturmedium gegeben. Die Kulturplatten wurden dann bei 37° C in einer feuchten Kammer für 48 Stunden aufbewahrt.

Für immunzytochemische Experimente bzw. Video-Imaging-Studien wurden die isolierten ECL Zellen auf runden Glasobjektträgern mit 24 bzw. 42 mm Durchmesser angezüchtet. Diese wurden zuvor zweimal in 96 % Ethanol getaucht und abgeflammt und jeweils in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte bzw. eine Petrischale (Nunc, Wiesbaden) gelegt. Anschließend wurden die Objektträger mit jeweils 10 µl Cell Tak (Becton Dickinson) in einer 1:1 Verdünnung mit 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> beschichtet und bei geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Die so vorbereiteten Objektträger wurden mit 5 - 7 x 10<sup>4</sup> Zellen in 1 ml Kulturmedium beschickt und bei 37° C in einer feuchten Kammer für 48 Stunden aufbewahrt.

Für elektronenmikroskopische Experimente wurden die isolierten ECL-Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 24 mm (Nunc), die zuvor wie oben beschrieben mit Cell-Tak beschickt worden waren, kultiviert.

## 2.2 Stimulationsexperimente

Um den direkten Einfluss bestimmter Substanzen auf die Histaminfreisetzung *in vitro* bestimmen zu können, wurden ECL-Zellen wie unter 2.1.2 beschrieben isoliert und auf 6-Loch-Platten kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen 3 Stunden lang in DMEM/F12 + 0,2 % BSA präinkubiert, um den Einfluss im Serum enthaltener Wachstumsfaktoren zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen über einen gewissen Zeitraum mit Elutriationspuffer, der die zu untersuchende Substanz in verschiedenen Konzentrationen enthielt, inkubiert (1 ml/Loch). Um einen hemmenden Effekt der Testsubstanz nachzuweisen, wurden die Zellen im Anschluss noch 1 Stunde lang mit 1 nM Gastrin inkubiert. Bei stimulierendem Effekt entfiel der letzte Schritt. Als Kontrollen dienten jeweils unstimulierte bzw. nur mit 1 nM Gastrin stimulierte Zellen. Der Überstand eines jeden Lochs wurde gesammelt und abzentrifugiert, um feste Bestandteile zu entfernen. Nun wurde jeweils ein Aliquot von 700 µl in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -20° C bis zur Bestimmung des Histamingehalts durch einen Radioimmunoassay aufbewahrt. Ein Enzyme-linked Immunoabsorbent Essay (ELISA) der Firma IBL, Hamburg wurde ebenfalls getestet, aber wegen unbefriedigender Ergebnisse nicht weiter verwendet.

## 2.3 Radioimmunoassay (RIA)

Beim Radioimmunoassay konkurrieren Moleküle der zu bestimmenden chemischen Verbindung mit radioaktiv markierten Molekülen derselben Verbindung um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen in einem Reagenzglas. Diese Bindungsstellen sind monoklonale Antikörper mit hoher Affinität gegen die gesuchte chemische Verbindung. Je höher die Konzentration der Verbindung in einer Probe ist, desto weniger Bindungsstellen bleiben für die radioaktiv markierten Moleküle übrig. Durch Messung der Zerfälle pro Zeiteinheit und Vergleich mit einer Standardreihe kann man daher die Konzentration der gesuchten chemischen Verbindung in einer Probe ermitteln.

In dieser Arbeit wurde mittels RIA der Gehalt an Histamin in Zellkulturüberständen bestimmt.

Die Durchführung des RIA erfolgte genau nach Anweisung des Herstellers (Beckman Coulter Diagnostic, Krefeld) mit den mitgelieferten Reagenzien. Für die Messungen wurde ein Gamma-Counter 1470 Wizard (Wallac, Turku, Finnland) verwendet.

## 2.4 Indirekte Messung von $[Ca^{2+}]_i$ (Video Imaging)

### 2.4.1 Prinzip des Video Imaging

Beim Video Imaging werden Zellen mit dem Farbstoff [1-[2-(5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat] (Fura-2) beladen, der intrazelluläre Calciumionen bindet (Grynkiewicz et al., 1985, S.3440-3450). Hierzu verwendet man den membrangängigen Azetoxymethyl-(AM) Ester des Farbstoffs. In der Zelle wird dieser durch Esterasen vom Farbstoff abgespalten und somit ein erneutes Austreten des Farbstoffs aus der Zelle verhindert. Fura-2 wird dann mit Licht der Wellenlängen  $\lambda_1 = 340$  und  $\lambda_2 = 380$  nm angeregt, die jeweilige Emission (F) bei 510 nm gemessen und daraus ein Verhältnis (R) gebildet:

$$R = F_{\lambda_1} / F_{\lambda_2}$$

Durch die Verwendung dieses Verhältnisses wird der Einfluss von Faktoren wie ungleichmäßige Farbstoffverteilung und Ausbleichen des Farbstoffs minimiert, da diese die Messungen bei beiden Wellenlängen gleichermaßen beeinflussen sollten und sich somit eliminieren.

### 2.4.2 Materialien

Versuchspuffer mit Calcium	Elutriationspuffer ohne DTT und BSA
Versuchspuffer ohne Calcium	Elutriationspuffer ohne DTT, BSA und $CaCl_2$ , substituiert mit 0,5 mM EGTA
Fura-2 AM	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Ionomycin	Sigma

### 2.4.3 Durchführung des Video Imaging

Isolierte ECL-Zellen wurden wie unter 2.1.3 beschrieben 48 Stunden kultiviert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit Fura-2 AM (Endkonzentration 1 µg/ml) bei 37° C. Anschließend wurden die Zellen zwei mal mit vorgewärmtem Versuchspuffer gewaschen und in eine beheizbare Perfusionskammer (POC-System; Zeiss, Oberkochen) eingespannt. Die Perfusionskammer (Volumen 2 ml) wurde nun auf einem inversen Axiovert 135 TV Mikroskop (Zeiss), ausgestattet mit einer Quecksilberdampfampe, den benötigten Exzitations- und Emissionsfiltern und einer Attofluor<sup>®</sup> ICCD-Camera (Atto Bioscience, Rockville, MD, USA), befestigt und kontinuierlich perfundiert. Steuerung der Filter und der ICCD-Camera sowie die Durchführung und Aufzeichnung der Messungen erfolgte mit der Attofluor<sup>®</sup> Ratiovision<sup>®</sup> Software (Atto Bioscience). Die Testsubstanzen wurden über das Perfusionssystem zugeführt. Die Calcium-Konzentrationen wurden aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten mittels folgender Formel ermittelt, die ursprünglich für den Farbstoff Quin2 beschrieben (James-Kracke, 1986; C512-C523) und für die Verwendung bei der Dual-Wellenlängen-Excitations-Fluorometrie angepasst worden war (Gryniewicz et al., 1985, S.3440-3450; Kao, 1994, S.155-181):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d Q (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

$K_d$  (Dissoziationskonstante für Fura-2) = 224

$R$  = ermitteltes Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm (s.o.)

$R_{min}$  ist der Minimalwert der Ratio, wenn alle Farbstoffmoleküle frei von Calcium sind. Dieser Wert wird in Anwesenheit des Chelators EGTA (2 mM) bestimmt.

$R_{max}$  ist der Maximalwert der Ratio, wenn alle Farbstoffmoleküle mit Calcium besetzt sind. Dieser Wert wird mittels des Ionophors Ionomycin (10 µM) bestimmt.

$Q$  ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit von EGTA ( $F_{min}$ ) und Ionomycin ( $F_{max}$ ) bei  $\lambda_2$

## 2.5 Proteinisolierung

### 2.5.1 Lösungen zur Proteinisolierung

<i>0,15 M Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)</i>	
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml
pH 7,4	

<i>Lysispuffer</i>	
Hepes, pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	1 mM
Triton X-100 (BioRad Laboratories, München)	1 %
Proteasen-Inhibitor-Cocktail III (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)	2% (Vol/Vol)

### 2.5.2 Proteinisolierung aus frisch isolierten Zellen

Isolierte ECL-Zellen wurden nach der Dichtegradient-Zentrifugation in 4° C kaltem PBS gewaschen, auf 1 ml abgesaugt, resuspendiert, gezählt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis überführt. Anschließend wurden die Zellen in der Kühlzentrifuge (4° C) 5 Minuten lang bei 1000 RPM abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das entstandene Pellet in 40 µl eiskaltem Lysispuffer resuspendiert. Nach einer halben Stunde Inkubation auf Eis wurden die Zellen noch 3 - 4 Ultraschallstößen ausgesetzt, 5 Minuten



bei 15000 RPM abzentrifugiert, der zytosolische Überstand gewonnen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **2.5.3 Proteinisolierung aus kultivierten Zellen**

Auf 6-Loch-Platten kultivierte ECL-Zellen wurden für 5 Minuten mit 0,1 % EDTA auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis überführt. Nach 5 Minuten Zentrifugation in der Kühlzentrifuge ( $4^{\circ}\text{C}$ ) bei 1000 RPM wurde der EDTA-Überstand entfernt, die Zellen in  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem PBS resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Anschließend wurde wie unter 2.5.2 verfahren.

### **2.5.4 Proteinisolierung aus Geweben**

Proteinisolate wurden aus verschiedenen Organen der Ratte gewonnen und dienten als Positivkontrollen für Western Blots. Dazu wurden kleine Gewebstückchen aus kurz zuvor getöteten Tieren entnommen und in Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Gewebstückchen wurden nun mit einem Kunststoffmörser zerkleinert, wobei der untere Teil des Reaktionsgefäßes stets in flüssigem Stickstoff gehalten wurde. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebe in 150  $\mu\text{l}$  Lysispuffer aufgenommen und es wurde weiter wie unter 2.5.2 verfahren.

## **2.6 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen in den Isolaten wurden mit einem kommerziellen Proteinasay (BioRad Laboratories) mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976, S.248-254) bestimmt. Diese Methode beruht auf einem Shift der Wellenlänge von 465 nm zu 595 nm, den der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau nach einer Proteinbindung durchmacht. Für Proteinisolate aus ECL-Zellen wurde der Microassay verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung mit den mitgelieferten Reagentien. Als Eichkurve dienten verschiedene Konzentrationen eines mitgelieferten Standards, die in 1:100 verdünntem Lysispuffer hergestellt wurden. Die Proben wurden jeweils 1:100 verdünnt eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden in einer Microtiterplatte im Microplate Reader (BioRad Laboratories) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

## 2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 2.7.1 Prinzip der SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient dazu, geladene Makromoleküle, wie z.B. Proteine, ihrem Molekulargewicht nach zu trennen. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich mit seiner aliphatischen Kette an hydrophobe Regionen des Proteins an. Kocht man Proteine in SDS, so werden diese aufgefaltet, denaturiert und dissoziieren in ihre Untereinheiten. Um eventuell vorhandene Disulfidbrücken reduktiv zu spalten, wird  $\beta$ -Mercaptoethanol dazugegeben. Die polare Sulfatgruppe macht den SDS-Proteinkomplex wasserlöslich und die stark negative Ladung dieser Gruppe überdeckt die am Protein vorhandene Ladung. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht. Folglich besitzen nun alle so behandelten Proteine die gleiche Ladungsdichte und werden nur ihrer Größe nach getrennt. Diese Auftrennung beruht auf der Reibung der denaturierten Proteine in einer Polyacrylamidgelmatrix (sog. Molekularsieb-Effekt). Die gewünschte Porengröße des Gels wird durch die Wahl eines geeigneten prozentualen Gesamtanteils von Acrylamid (% T)<sup>2</sup> sowie den Grad der Quervernetzung (% C) eingestellt.

### 2.7.2 Lösungen

Acrylamid (BioRad Laboratories)	30% T, 2,6% C; als fertig eingewogene Mischung gelöst in MilliQ
SDS	10 %ige Lösung in H <sub>2</sub> O dest.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 in H <sub>2</sub> O dest.
Sammelpuffer	1,0 M Tris/HCl pH 6,6 in H <sub>2</sub> O dest.
Ammonium Peroxydisulfat	10 %ige Lösung in H <sub>2</sub> O dest.
TEMED (BioRad Laboratories)	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
4x Probenauftragspuffer	1,5 M Dithiothreitol, 6 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, pH Einstellung mit Tris pH 6,8 10x
Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris, 1,0 % SDS, 1,92 M Glycin

### 2.7.3 Herstellung der Polyacrylamidgele

<i>Trenngel-Lösung (7,5 %)</i>	
H <sub>2</sub> O dest.	4,85 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
Acrylamid	2,5 ml
SDS	100 µl
Ammonium Peroxydisulfat	50 µl
TEMED	5 µl

<i>Sammelgel-Lösung (3 %)</i>	
H <sub>2</sub> O dest.	2,8 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	500 µl
Acrylamid	660 µl
SDS	40 µl
Ammonium Peroxydisulfat	40 µl
TEMED	4 µl

Die Herstellung der Polyacrylamidgele für die verwendete Mini-Protean II Elektrophorese-Einheit (BioRad Laboratories) erfolgte im mitgelieferten Gießstand. Nach vorschriftsmäßigem Zusammenbau, wurde der freie Raum zwischen den Glasplatten bis etwa 2 cm unter den Oberrand mit Trenngel-Lösung gefüllt und mit 70 % Ethanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde der Alkohol vorsichtig abgossen, die Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Kamm für die Probenaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisierung wurden die Gele bis zur Verwendung gut befeuchtet bei 4° C aufbewahrt.

### 2.7.4 Vorbereitung von Elektrophoresekammer und Proben sowie Elektrophoreselauf

Das Polyacrylamidgel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt, die Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Entstandene

Luftblasen wurden mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Die Probenauftragstaschen wurden kurz mit 1x Elektrophoresepuffer gespült, um Acrylamidreste zu entfernen.

Die Proteinproben wurden nun mit Probenauftragspuffer versetzt, kurz abzentrifugiert und im Heizblock 3 Minuten lang gekocht. Anschließend wurden die Proben noch einmal kurz abzentrifugiert und danach zusammen mit einem vorgefärbten Molekulargewichtsstandard warm aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 150 - 200 V. Die Dauer hing vom Vernetzungsgrad des Gels ab. Prinzipiell wurde die Elektrophorese beendet, sobald der Lauffrontmarker Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen war.

### 2.7.5 Coomassie-Färbung der SDS-Gele

<i>Coomassie-Färbelösung</i>	
Coomassie Brillant Blau	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml

<i>Entfärbelösung</i>	
Methanol	250 ml
Eisessig	350 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 5000 ml

Um die Auftrennung der Proteine bzw. den erfolgreichen Transfer von Gel auf Membran (siehe 2.8) zu überprüfen, wurde das verwendete Gel nach der Elektrophorese bzw. nach dem Blot-Vorgang in ein Färbebecken gegeben, mit Färbelösung bedeckt und ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und durch Entfärber ersetzt, wobei zur Farbstoffabsorption Wischtücher zugegeben wurden. Das Gel wurde dann solange geschüttelt, bis die Proteinbanden sichtbar waren bzw. der Hintergrund beinahe vollständig entfernt war.

## 2.8 Western Blot Analyse

### 2.8.1 Prinzip der Western Blot Analyse

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Bei dieser Methode werden Proteine, die vorher mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch elektrische Spannung auf eine Membran aus Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) übertragen. Danach wird diese Membran mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Antikörper-Bindungen kann man durch anschließende Zugabe eines radioaktiv markierten oder enzymgekoppelten sekundären Antikörpers und anschließender Detektion sichtbar machen.

### 2.8.2 Materialien

<i>Transferpuffer (für Proteine mit MW &gt; 80kDa)</i>	
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037 %
Methanol	20 %

<i>Tris gepufferte Kochsalzlösung + Tween = (TBST) Puffer</i>	
Tris (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	1 %

<i>Blockierlösung</i>
TBST + 5 % Magermilch Pulver

- PVDF Immunoblot Membran (BioRad Laboratories)
- Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Reagent (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg)

- ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH)
- Mini-Trans-Blot-Elektrophorese-Kammer (BioRad Laboratories)

<i>Verwendete Primärantikörper</i>	
Dynamin-1 monoklonal (1:1000)	Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
Dynamin-1 monoklonal (1 :1000)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
Dynamin-2 polyklonal (1:5000)	Dr. Mark A. McNiven, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
Dynamin-3 polyklonal (1:5000)	Dr. Mark A. McNiven
Amphiphysin-1 monoklonal (1:5000)	Transduction Laboratories
Amphiphysin-1/2 polyklonal (1:1000)	Dr. Peter S. McPherson, McGill University, Montreal, Canada

<i>Verwendete Sekundärantikörper</i>	
Sheep-anti-mouse-HRP (1:1000)	Amersham Pharmacia Biotech Europe
Donkey-anti-rabbit-HRP (1:1500)	Amersham Pharmacia Biotech Europe

### 2.8.3 Durchführung des Westernblots (Wet blot)

Nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.7) wurden die zu untersuchenden Proteingemische auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol geschwenkt und anschließend zusammen mit dem Gel sowie den benötigten Filterpapieren und Fiberpads 15 Minuten lang in Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurde eine Gelhalterung folgendermaßen von der Anodenseite her beladen: Fiberpad, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Fiberpad. Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden vorsichtig mit einer Pipette ausgestrichen. Nun wurde die Gelhalterung geschlossen und so in das Elektrodenmodul eingesetzt, dass die Anodenseite der Gelhalterung zur Anodenseite des Elektrodenmoduls schaute. Das beladene Elektrodenmodul wurde zusammen mit einer Kühleinheit in den Elektrophoresetank gestellt, der noch mit Transferpuffer aufgefüllt wurde. Dauer und Stromstärke des Blots richteten sich nach der Größe des jeweils gesuchten Proteins. Nach dem Blot-Vorgang wurde

die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur in TBST + 5 % Magermilchpulver geblockt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (in TBST + 5 % Magermilchpulver) inkubiert. Am nächsten morgen wurde die Membran 4 x 15 Minuten in TBST gewaschen und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper in (TBST + 5% BSA) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit Hilfe des ECL-Reagenz nach Anleitung des Herstellers entwickelt. Anschließend wurde jeweils ein Film für 15 Sekunden, 1, 3 und 5 Minuten aufgelegt und in der Abteilung für Röntgendiagnostik entwickelt.

## **2.9 Indirekte Immunhistochemie**

### **2.9.1 Prinzip der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie dient dazu, Antigene in Gewebeschnitten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu erkennen und mit einer Farbreaktion sichtbar zu machen. Während bei der direkten Immunhistochemie der gegen das gesuchte Antigen gerichtete Antikörper an einen Farbstoff gebunden ist, verwendet man bei der indirekten Immunhistochemie zwei Antikörper: einen primären, der gegen das Antigen gerichtet ist, und einen sekundären, an einen Farbstoff gekoppelten Antikörper, der den primären erkennt. Da der primäre Antikörper selbst von vielen Molekülen des sekundären Antikörpers erkannt werden kann, ist die indirekte Immunhistochemie sehr spezifisch.

### **2.9.2 Herstellung von Gewebeschnitten**

Der Magen einer Ratte wurde wie unter 2.1.2 beschrieben entnommen, am Ösophagus verschlossen und über eine Pipette gestülpt. Anschließend wurde der Magen entlang der kleinen Krümmung eröffnet und mit Stecknadeln auf einem Styroporblock aufgespannt. So wurde der Magen über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 fixiert. Nach der Fixierung wurde der Magen in kleine Streifen geschnitten, jeder Streifen in eine Einbett-Kassette (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) gegeben und 30 Minuten lang leicht fließend gewässert. Es folgte ein 10-minütiger Waschschrift in Aqua bidest. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert: 2 Stunden in 50% Ethanol, über Nacht in 70 % Ethanol im Kühlschrank, danach 1 Stunde in 70% Ethanol bei Raumtemperatur 3 mal 2 Stunden in 96 % Ethanol, 30 Minuten in absolutem Ethanol, über Nacht in absolutem Ethanol im Kühlschrank und nochmals 1 Stunde in absolutem Ethanol bei Raumtemperatur. Nach 2 mal 1,5 Stunden in Xylol

wurden die Schnitte 2 mal 2 und anschließend noch mal 1 Stunde in vorgewärmtes Paraplast (Sherwood Medical, Athy, Irland) geben, und in sauberen Formen auf einem Eisblock ausgehärtet. Die fertigen Blöcke wurden bis zu ihrer Verwendung in Alufolie bei 4° C aufbewahrt. Für die Immunhistochemie wurden die Paraffinblöcke auf einem Mikrotom geschnitten und auf Super Frost Plus Objektträger (Carl Roth GmbH & Co.) aufgebracht.

### **2.9.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten in Hämatoxylin gefärbt und anschließend 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Es folgte eine 10-minütige Färbung mit 0,2% Eosin. Nach Waschen, Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und 2 mal 10 Minuten Xylol wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

### **2.9.4 Immunhistochemie mit biotin-markierten sekundären Antikörpern**

#### **2.9.4.1 Materialien**

- Xylol
- Ethanol unterschiedlicher Konzentrationen
- Methanol
- Wasserstoffperoxid
- 0,15 M PBS
- Fetales Kälberserum (Gibco BRL)
- Normal goat serum (DAKO, Hamburg)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Vectastain™ Elite ABC Kit Standard (Vector Laboratories)
- DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories)



<i>Citratpuffer</i>	
0,1 M Citrat	3,6 ml
0,1 M Trinatriumcitratdihydrat	16,4 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad 200 ml

<i>Primärantikörper</i>	
Amphiphysin-1 monoklonal (1:200)	Transduction Laboratories
Amphiphysin-2 polyklonal (1:100)	Dr. Peter S. McPherson
Histidindecaboxylase polyklonal (1:3000)	Eurodiagnostica, Arnhem, Niederlande

<i>Sekundärantikörper</i>	
Goat anti-rabbit IgG (1:1000)	DAKO
Goat anti-mouse IgG (1:800)	Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA)

### 2.9.4.2 Durchführung

Schnitte des Rattenmagens wurden 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe bestehend aus absolutem, 96 %, 80 % und 50 % Ethanol für jeweils 2 Minuten rehydriert, 2 Minuten in H<sub>2</sub>O dest. gegeben und anschließend in PBS gewaschen. Um eine bessere Antigenizität des Gewebes zu erreichen, wurden die Schnitte nun 3 x 5 Minuten bei 400 W in einem Mikrowellenherd in Citratpuffer gekocht. Dabei wurde der verdunstete Puffer stets zwischen den einzelnen Schritten nachgefüllt. Nach einer 30 - 45-minütigen Inkubation in 5 % fetalem Kälber Serum wurden die Schnitte 3 x 3 Minuten in PBS gewaschen. Um ein unspezifisches Signal durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, folgte ein 10-minütiger Blockierschritt in 10 % Methanol, 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte 5 Minuten in 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 % Normalserum der Spezies des sekundären Antikörpers blockiert. Diese sowie jede weitere Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Es folgten zwei weitere 30-minütige Blockierschritte in Avidin und Biotin (Avidin Blocking Kit). Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte in primärem Antikörper, verdünnt in 2 % Normalserum

der Spezies des sekundären Antikörpers, über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Primärantikörper abgewaschen und die Schnitte bei Raumtemperatur 30 - 45 Minuten in sekundärem Antikörper, verdünnt in 2 % Normalserum der Spezies des sekundären Antikörpers inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurde nach Abwaschen von überschüssigem Sekundärantikörper 30 Minuten ABC-Komplex (Vectastain™ Elite Kit) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach einem Waschschrift wurde die Peroxidase entwickelt. Als Substrat diente 3,3-di-amino-benzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit). Die Entwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und bei genügender Braunfärbung durch Waschen in PBS gestoppt. Zum Schluss wurden die Schnitte noch mit Mayers saurem Hämalaun gegengefärbt und in Kaisers Gelatine eingebettet.

## 2.10 Indirekte Immunzytochemie

### 2.10.1 Prinzip der Immunzytochemie

Die Immunzytochemie folgt dem selbem Prinzip wie die Immunhistochemie, allerdings werden nicht Gewebeschnitte, sondern isolierte Zellen verwendet.

### 2.10.2 Immunzytochemie mit fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern

#### 2.10.2.1 Materialien

<i>Primärantikörper</i>	
Dynamamin-1 monoklonal (1:100)	Transduction Laboratories
Dynamamin-1 monoklonal (1:100)	Upstate Biotechnology
Dynamamin-2 polyklonal (1:750)	Dr. Mark A. McNiven
Dynamamin-3 polyklonal (1:750)	Dr. Mark A. McNiven
Amphiphysin-1 monoklonal (1:200)	Transduction Laboratories
Amphiphysin-1/2 polyklonal (1:100)	Dr. Peter S. McPherson
InsP <sub>3</sub> R3 (1:50)	Transduction Laboratories

<i>Sekundärantikörper</i>	
ALEXA 488 goat anti-rabbit IgG (1:100)	Molecular Probes
ALEXA 488 goat anti-mouse IgG (1:100)	Molecular Probes

### 2.10.2.2 Durchführung

ECL Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und auf sterilisierten Glasobjektträgern 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend 3 mal 3 Minuten in PBS gewaschen. Nach einer einstündigen Blockierung in 10 % Normalserum der Spezies der Sekundärantikörper wurden die Objektträger über Nacht bei 4° C mit Primärantikörper verdünnt in 2% Normalserum der Spezies der Sekundärantikörper inkubiert. Am nächsten morgen wurden die Schnitte 3 mal 3 Minuten in PBS gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper verdünnt in 2% Normalserum beschickt. Es folgten wiederum drei Waschgänge in PBS und einer in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in Mounting Medium (Sigma) eingedeckt.

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte entweder auf FujiChrome 64 T Filmen (Fuji Photo Film, Düsseldorf) mittels einer Canon D30 digitalen Spiegelreflexkamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld).

## 2.11 Elektronenmikroskopie

### 2.11.1 Prinzip der Elektronenmikroskopie

Im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie werden zu untersuchende Objekte nicht von einem Licht- sondern von einem Elektronenstrahl durchstrahlt. Dieser wird – ähnlich wie der Lichtstrahl bei der Lichtmikroskopie durch eine Linse – durch elektromagnetische Felder abgelenkt. Die Elektronen werden in einem Vakuum erzeugt und durch eine Potentialdifferenz zwischen Kathode und Anode beschleunigt. So treffen sie auf das zu untersuchende Objekt, wo sie mit Gewebekomponenten und Schwermetallen interagieren. Durch eine Objektlinse entsteht vom durchstrahlten Objekt ein Bild, das durch Projektionslinsen weiter vergrößert werden kann und schließlich auf einen Fluoreszenzschirm projiziert wird. Somit entstehen Bilder mit einer sehr hohen Auflösung,

die ultrastrukturelle Untersuchungen bei einem Vergrößerungsgrad von bis zu über 100.000fach zulassen.

### 2.11.2 Materialien

- 2,5 % Glutaraldehyd (Serva)
- OsO<sub>4</sub>
- Ethanol unterschiedlicher Konzentrationen
- Uranylacetat (Fluka, Neu-Ulm)
- Bleinitrat

<i>Epon</i>	
Glycidether	27,575 ml
DDSA	6,1 g
MNA	8,1 g
DMP-30	0,375 ml

### 2.11.3 Durchführung

Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Frau Gabriele Terfloht, Anatomisches Institut, Ludwig-Maximilian-Universität, München, durchgeführt.

Isolierte ECL-Zellen wurden wie unter 2.1.3 beschrieben kultiviert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen über Nacht bei 4° C in 2,5 % Glutaraldehyd in Natriumcacodylat-Puffer, pH 7,4 fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS folgte die Postfixierung in 1 % OsO<sub>4</sub> für 1 Stunde. Nun wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 10 Minuten in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und absolutem Ethanol) dehydriert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Epon/Ethanol-Gemisch bedeckt, jeweils 20 Minuten in einem 1:1 und einem 2:1 Gemisch, danach zweimal 20 Minuten mit reinem Epon und schließlich noch einmal über Nacht mit reinem Epon. Am nächsten Tag folgte die Polymerisation bei 60° C über 16 - 24 Stunden. Mit einem Diamantmesser wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von etwa 80 nm hergestellt. Die Schnitte wurden auf Kupfer-Grids mit 2 % Uranylacetat und 2,66 % Bleinitrat nachkontrastiert. Die Elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten auf einem EM-10 Elektronenmikroskop (Zeiss) bei einer konstanten Strahlenspannung von 60 kV.

## 2.12 Immunopräzipitation

### 2.12.1 Prinzip der Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation wird mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein gesuchtes Protein aus einem Proteingemisch extrahiert. Der Antikörper-Protein-Komplex wird durch Bindung an z.B. Protein-A-Agarose und anschließendes Verwerfen des Überstands von den übrigen Proteinen getrennt. Durch Kochen in Probenpuffer wird der Komplex wieder aufgelöst und das präzipitierte Protein kann durch Gelelektrophorese und Western Blot analysiert werden.

### 2.12.2 Materialien

- Protein A-Agarose (Roche, Mannheim)
- Lysispuffer
- anti-Amphiphysin-2 Antikörper

### 2.12.3 Durchführung der Immunopräzipitation

Die benötigte Menge Protein A-Agarose wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 3 Minuten bei 1000 RPM in einer Mikro 22R Tischzentrifuge (Hettich) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protein A-Agarose drei mal mit eiskaltem Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und die Protein A-Agarose 1:1 mit Lysispuffer verdünnt (= Protein A-Agarose Slurry). Proteinextrakte aus ECL-Zellen und Rattenhirn wurden wie unter 2.1.5 beschrieben hergestellt. Zu einem Proteinextrakt in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 30 µl Protein A-Agarose Slurry gegeben und das Gemisch 1 Stunde auf einem Drehrad bei 4° C inkubiert um unspezifische Bindungen zu eliminieren. Das Gemisch wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, das 30 µl Protein A-Agarose Slurry und 2 µl anti-Amphiphysin-2 Antikörper enthielt. Der Reaktionsansatz wurde 3 Stunden bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend 3 mal 3 Minuten bei 1000 g und 4° C in Lysispuffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und der Agarose-Anikörper-Protein-Komplex in 25 µl 3x Probenpuffer 3 Minuten gekocht. Nach einminütiger Zentrifugation bei 14000 g wurde der Überstand abgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion erfolgte analog zum Western Blot.

## 2.13 Isolation von Ribonukleinsäuren (RNA)

### 2.13.1 Materialien

- peqGOLDTriFast Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Chloroform
- Isopropanol
- 70 % Ethanol
- H<sub>2</sub>O dest.

### 2.13.2 Durchführung der RNA-Isolation

RNA wurde aus verschiedenen Rattengeweben und kultivierten Zellen gewonnen. Kleine Stückchen frisch isolierten Gewebes wurden in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Plastikmörser zerkleinert. Anschließend wurde 1 ml peqGOLDTriFast hinzugegeben.

In einer 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche gezüchtete PC12-Zellen wurden mit EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml peqGOLDTriFast aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Isolierte ECL-Zellen wurden bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und das resultierende Pellet in 1 ml peqGOLDTriFast resuspendiert und ebenfalls in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Ab diesem Schritt wurden alle Proben gleich behandelt. Nach Hinzufügung von 200 µl eisgekühltem Chloroform wurden die Reaktionsgefäße ca. 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und 15 - 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Bildung von zwei Phasen wurden die Proben 30 Minuten bei 15000 RPM und 4° C abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropylalkohol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15000 RPM, 4° C, 45 - 60 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (15000 RPM, 4° C, 30 Minuten). Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

### 2.13.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Mit Hilfe eines Photometers (DU 640 Spectrometer, Beckman Instruments) wurde die optische Dichte (OD) der gewonnenen RNA bestimmt und daraus mit folgender Formel die Konzentration errechnet:

$$OD_{260\text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 = \text{Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

Für die quantitative Bestimmung von RNA muss der Faktor 40 eingesetzt werden, da 1 OD einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  entspricht.

## 2.14 Reverse Transkription (RT)

### 2.14.1 Prinzip der RT

Bei der RT wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dieser resultierende cDNA Strang kann dann in eine Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt werden, um das Vorhandensein von Genen auf der RNA-Ebene nachzuweisen.

Die reverse Transkriptase stammt aus Viren, z.B. dem Affen-Myeloblastosis-Virus (AMV) oder dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). Sie synthetisiert einen neuen cDNA Strang, der festgelegt ist durch den benutzten Primer. Verwendet man ein Gemisch aus kurzen Oligonucleotiden mit zufälliger Sequenz (= Random Primer), findet die Transkription an verschiedenen, unspezifischen Stellen der RNA statt. Will man nur ein bestimmtes Stück der RNA umschreiben, verwendet man einen genspezifischen Primer.

### 2.14.2 Reagenzien

Die RT wurde mit den TaqMan Reverse Transcription Reagents der Firma Perkin Elmer durchgeführt:

<i>10x TaqMan RT Buffer</i>	
TRIS	100 mM
KCl	500 mM
pH 8,3	

<i>Reverse Transkriptase</i>	
MultiScribe Reverse Transkriptase	100 units/ $\mu$ l MMLV

<i>RNase Inhibitor</i>	
RNase Inhibitor	20 mM

<i>Deoxynucleotid triphosphate (dNTP) Mixture</i>	
dATP	2,5 mM
dTTP	2,5 mM
dCTP	2,5 mM
dGTP	2,5 mM

<i>Random Primer</i>	
Random Hexamer	50 mM [d(N) <sub>6</sub> ]

<i>MgCl<sub>2</sub> solution</i>	
MgCl <sub>2</sub>	25mM

### 2.14.3 Durchführung der reversen Transkription

Folgender Ansatz wurde auf Eis in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

Ansatz für 50  $\mu$ l cDNA:

	5 $\mu$ l RNA
	15 $\mu$ l H <sub>2</sub> O dest.
	11 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub>
	10 $\mu$ l dNTP-Mix
	5 $\mu$ l RT-Puffer
	2,5 $\mu$ l Random Primer
	0,5 $\mu$ l RNase Inhibitor
	<u>1 <math>\mu</math>l</u> Reverse Transkriptase
Total:	50 $\mu$ l

Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig vermischt, kurz abzentrifugiert und dann im Thermocycler folgenden Temperaturen ausgesetzt:



- 25° C (10 min)
- 48° C (30 min)
- 95° C (5 min)

Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20° C aufbewahrt.

## 2.15 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

### 2.15.1 Prinzip der PCR

Mit Hilfe der PCR lassen sich *in vitro* gezielt genomische Sequenzen vervielfältigen. Hierbei dienen zwei genspezifische einzelsträngige Oligonukleotide (sog. Primer) als Rahmen für eine Polymerase. Die Primer hybridisieren an eine Matrize und somit kann die Polymerase die Sequenz zwischen diesen Primern vervielfältigen.

Als Matrize kann sowohl DNA als auch RNA verwendet werden. Kommt RNA zum Einsatz, so muss diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden (siehe oben).

Prinzipiell besteht ein Reaktionszyklus in der PCR aus drei Teilen: Zuerst wird die DNA bei 94° C denaturiert, damit Einzelstränge entstehen. Dies ist notwendig, damit sich die Primer an die Matrize anlagern können. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach GC-Gehalt und Länge der verwendeten Primer. Nach Anlagerung der Primer folgt die Extension bei 65 - 72° C. Die Dauer richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Etwa 25 - 35 solcher Zyklen werden in einem PCR-Programm hintereinander geschaltet. Manche Firmen (z.B. Clontech) empfehlen auch Programme, die nur aus 2 Schritten bestehen. Hierbei werden Anlagerung und Extension in einem Schritt zusammengefasst.

### 2.15.2 Primerdesign

Anhand der in Genbank™ publizierten Sequenzen der nachzuweisenden Gene wurde jeweils ein spezifisches Oligonukleotid-Primerpaar erstellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Primersequenzen zwischen 19 und 24 Basen lang waren, einen GC-Gehalt von 50 - 60 % aufwiesen und in etwa die gleiche  $T_m$  hatten. Die Primer wurden dann bei der Firma MWG Biotech synthetisiert. Nach Erhalt wurden die lyophilisierten Primer in H<sub>2</sub>O dest. zu 20 µM aufgelöst, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

### 2.15.3 Sequenzen und Anlagerungstemperaturen der verwendeten Oligonucleotid-Primer

Gen	Sense Primer	Antisense Primer	Anlagerungstemperatur	Produktlänge
Amph1	5'-CTG GAG GTG AAG AAG GAG G-3'	5'-TCA GTT CCC ACA GTC TCA CC-3'	58° C	398 bp
Amph2	5'-GGA TGG CAG AGA TGG GGA GCA AGG G- 3'	5'-ATG GAA GTT TTC CTC CAG ACC CGC GAT GC-3'	66° C	¶)
Amph2 (gesamt)	5'-GGA TGG CAG AGA TGG GGA GCA AGG G- 3'	5'-TCA CAC ACC GGA AGG CTG CAG AGG C-3'	66° C	¶)
Dyn1	5'-GAC CAG ATC GAC ACT TAT GAA-3'	5'-GCC ACC CCT TTC GAA TG-3'	55° C	533 bp
Dyn2	5'-ATC AAG TCG ACA CCC TGG AG-3'	5'-ACC AGC CCC TGC GGA TC-3'	60° C	531 bp
Dyn3	5'-CCA CCA CCC AAA GAA GGC T-3'	5'-CTG GAT GGA ACC TGT GGA G-3'	58° C	190 bp
InsP <sub>3</sub> R1	5'-TGA CAG CAG TGG AGC ATC G-3'	5'-GCA GCA GCC ATA GGA GTC A-3'	58° C	392 bp
InsP <sub>3</sub> R2	5'-CAA GTG CCA AGG TGC TGA G-3'	5'-TCA GCA CAT AGG CAC CAG G-3'	58° C	586 bp
InsP <sub>3</sub> R3	5'-CGC TCC ATC CTG CTA ACT G-3'	5'-TTC CTC AGT CCG TGG TTC A-3'	56° C	316 bp

¶) Diese Primer produzierten mehrere Banden aufgrund von alternativem Splicing

## 2.15.4 Materialien und Durchführung der PCR

### 2.15.4.1 PCR mit dem *Taq* PCR Master Mix Kit

Die meisten PCRs wurden mit dem *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser enthält außer den Primern alle notwendigen Materialien: steriles H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einen Master Mix bestehend aus Reaktionspuffer, *Taq* Polymerase und dNTPs. Pro PCR Ansatz wurden folgende Substanzen auf Eis in ein Reaktionsgefäß (200 µl) pipetiert:

	2,5 µl cDNA
	12,5 µl Master Mix
	0,5 µl Sense Primer
	0,5 µl Antisense Primer
	<u>9,0 µl H<sub>2</sub>O dest.</u>
Total:	25,0 µl

Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde vorsichtig vermischt, kurz abzentrifugiert und anschließend nach folgendem Temperatur-Profil erhitzt:

1 Zyklus	Denaturierung:	94° C	5 min
	Anlagerung:	X° C	1 min
	Extension:	72° C	1 min
30 - 35 Zyklen	Denaturierung:	94° C	45 s
	Anlagerung:	X° C	55 s
	Extension:	72° C	1 min
	Extension:	72° C	10 min

X° C = Anlagerungstemperatur des jeweiligen Primerpaares.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

### 2.15.4.2 PCR mit dem Advantage<sup>®</sup>-GC cDNA Polymerase Mix

Der Advantage<sup>®</sup>-GC cDNA Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg) besteht aus der KlenTaq-1 Polymerase und einem kleinen Anteil einer Proof-reading Polymerase. Mit diesem Polymerasegemisch erhält man eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität und kann sehr schwach exprimierte aber auch sehr große Fragmente amplifizieren. Mit Hilfe des DMSO-haltigen Reaktionspuffers und dem mitgelieferten GC-Melt<sup>®</sup> Reagenz ist es möglich, auch Sequenzen mit einem sehr hohen GC-Anteil zu amplifizieren.

In vorliegender Arbeit wurde der Advantage<sup>®</sup>-GC cDNA Mix für die Amplifikation von Amphiphysin-2 verwendet. Folgender Ansatz wurde jeweils in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert:

	5,0 µl cDNA
	10,0 µl 5x Reaktionspuffer
	1,0 µl 50x dNTP Mix
	1,0 µl PolymeraseMix
	15,0 µl GC-Melt
	1,0 µl Sense Primer
	1,0 µl Antisense Primer
	<u>16,0 µl H<sub>2</sub>O dest.</u>
Total:	50,0 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

1 Zyklus	Denaturierung:	94° C	1 min
35 Zyklen	Denaturierung:	94° C	30 s
	Anlagerung/Extension:	66° C	3 min
	Extension:	72° C	10 min

## 2.16 Agarose-Gelelektrophorese

### 2.16.1 Lösungen

<i>50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer</i>	
Tris (pH 8,5)	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 ml

<i>6x Probenauftragspuffer</i>	
Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech Europe)	25 %
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %

### 2.16.2 Herstellung von Agarosegelen

Für PCR-Produkte > 1000 Basenpaaren (bp) wurden 1 %ige Gele, für kleinere 2%ige Gele verwendet. Pro Gel wurden 1 bzw. 2 g Ultrapure Agarose (Gibco BRL) in 100 ml 1x TAE-Puffer gegeben und durch kurzes aufkochen in einem konventionellen Mikrowellenofen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 40° C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Merck) hinzugefügt und das Gel in einer Gelwanne im Gelgießstand gegossen. Die Probenaschen wurden durch Einsetzen eines Kammes erzeugt.

### 2.16.3 Probenauftrag und Elektrophoreselauf

Für die Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (BioRad Laboratories) verwendet. Jeweils 15 µl eines PCR-Produkts wurden mit 2,5 µl 6x Probenauftragspuffer in einer Vertiefung einer 96-Lochplatte vermischt. Anschließend

wurde die Gelkammer mit dem festen Agarosegel in die Elektrophoresekammer gestellt, mit 1x TAE-Puffer bedeckt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Proben in die vorgesehenen Taschen des Gels pipettiert. Eine Tasche pro Gel wurde mit einem Standard (Bioladder 100, Hybaid-AGS, Heidelberg) gefüllt, um die Größe des PCR-Produkts überprüfen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 70 V für etwa 1 Stunde. Die Dauer richtete sich nach der Lauffront, die durch die im Auftragspuffer enthaltenen Farbstoffe sichtbar gemacht wurde.

## 2.16.4 Dokumentation

Durch Bindung des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid an DNA-Moleküle können diese im Agarosegel sichtbar gemacht werden. DNA-Banden im Gel wurden mit UV-Licht bei  $\lambda = 354 \text{ nm}$  sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems (MWG Biotech) ein digitales Abbild erzeugt.

## 2.16.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein PCR-Produkt zu sequenzieren, wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang erfolgte möglichst schnell, um den schädigenden Einfluss von UV-Licht auf die DNA weitgehendst zu unterbinden. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit Hilfe des Nucleo Spin Kits (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aus der Agarose extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

## 2.16.6 Klonierung eines Fragments

### 2.16.6.1 Materialien

<i>LB Medium</i>	
LB Broth (USB, Cleveland, OH, USA)	20 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Autoklavieren und bei 4° C im Dunkeln lagern

<b><i>LB Agar Platten + Ampicillin</i></b>	
LB Agar (USB)	32 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Autoklavieren, bei  $< 60^{\circ}$  C 50 mg/ml Ampicillin dazu, in Petrischalen gießen, bei  $4^{\circ}$  C im Dunkeln lagern

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

### **2.16.6.2 Durchführung**

Nach der Isolierung aus dem Gel wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits in den TOPO pCR2.1 Vektor ligiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Bakterien durch Hitze/Kälteschock mit dem Vektor transformiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB Agar Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}$  C inkubiert. Die Durchführung erfolgte genau nach Anleitung des Herstellers.

### **2.16.7 Isolation von Plasmiden**

Einzelne Kolonien wurden gepickt und über Nacht in 2 ml LB Medium + 50  $\mu$ g/ml Ampicillin in einem Bakterienschüttler bei  $37^{\circ}$  C hochgezogen. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Plasmide mit Hilfe des Nucleo Spin plus Kits (Machery Nagel) extrahiert. Die Durchführung des Kits erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.16.8 Restriktionsverdau mit *EcoRI***

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurden die gewonnenen Plasmide mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Der pCR 2.1-TOPO Vektor enthält jeweils kurz vor und nach der Insertionsstelle des klonierten Fragments eine Schnittstelle für *EcoRI*. Somit kann das klonierte Fragment aus dem Vektor ausgeschnitten und aufgrund seines Molekulargewichts in einer Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden.

Folgender Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 1 Stunde bei  $37^{\circ}$  C inkubiert:

	5 µl Plasmid
	3 µl H <sub>2</sub> O dest.
	1 µl Puffer H
	<u>1 µl Eco RI</u>
Total:	10,0 µl

Anschließend wurde der Reaktionsansatz wie unter 2.16.3 beschrieben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Hierbei erzeugte der TOPO Vektor eine Bande von 3,9 kbp und das klonierte Fragment in Höhe des PCR Produkts.



## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Isolation und Kultivierung von ECL-Zellen des Rattenmagens**

Je Präparation wurden die Mägen von 5 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Dabei erhielt man zwischen  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen. Der Reinheitsgrad der ECL-Zellen lag unmittelbar nach der Präparation bei ca. 80 %. Kontaminierende Zellen waren hauptsächlich schleimproduzierende Nebenzellen und einige wenige Fibroblasten. Durch Kurzzeitkultur und den Einsatz von Hydrocortison im Kulturmedium konnte die Zahl der kontaminierenden Zellen deutlich reduziert werden und der Reinheitsgrad der ECL-Zellen stieg nach 48 Stunden bis auf über 90 % an.

### **3.2 Die Bedeutung von Calcium für die gastrininduzierte Histaminfreisetzung in isolierten ECL-Zellen**

#### **3.2.1 Einführung**

Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Vorgänge. Diese Anhebung kann durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum oder eine Kombination dieser beiden Vorgänge entstehen (Berridge und Irvine, 1989, S.197-205; Berridge, 1993, S.315-325; Berridge et al., 2000, S.11-21).

In erregbaren Zellen strömt Calcium nach Depolarisation der Plasmamembran über spannungsgesteuerte Calciumkanäle in die Zelle ein und führt z.B. zur Freisetzung von Neurotransmittern (Meir et al., 1999, S.1019-1088). In nicht-erregbaren Zellen hingegen ist eine Depolarisation nicht notwendig. Hormone aktivieren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C, die Inositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $InsP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) umwandelt (Berridge und Irvine, 1989, S.197-205; Meldolesi et al., 1991, S.289-292; Berridge, 1993, S.315-325). Die Bindung von  $InsP_3$  an den  $InsP_3$ -Rezeptor ( $InsP_3R$ ) führt zur

Freisetzung von Calcium aus internen Speichern, was wiederum einen Calciumeinstrom über die Plasmamembran induziert. Dieser Calcium-Einstrom erfolgt über sog. „store-operated“ Calciumkanäle (SOCCs) und wird als kapazitiver Calcium-Einstrom bezeichnet (Putney Jr., 1986, S.1-12; Parekh und Penner, 1997, S.901-930). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die verschiedene Transduktionswege reguliert, u.a. Gen-Transkription, Proliferation und Freisetzung von Hormonen (Berridge und Irvine, 1989, S.197-205).

In ECL-Zellen führt die Stimulation mit dem antralen Hormon Gastrin zur Freisetzung von Histamin über einen calciumabhängigen Mechanismus (Sachs und Prinz, 1996, S.57-62). Die Aktivierung des Gastrin-Rezeptors führt zu einem biphasischen Calcium-Signal, das aus einem anfänglichen Peak und einer nachfolgenden Plateau-Phase besteht. Bei Entfernung des Stimulus kehrt die  $[Ca^{2+}]_i$  auf ihren Ausgangswert zurück (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675; Sachs und Prinz, 1996, S.57-62). Dieses Signal findet sich in vielen Zelltypen und man vermutet, dass der Peak durch intrazelluläre Freisetzung und das Plateau durch Calcium-Einstrom von außen zustande kommt, da bei Vorinkubation mit dem unspezifischen Kanalblocker Lanthanum das Plateau völlig verschwindet, der Peak jedoch unverändert bleibt (Prinz et al., 1997, S.221-229).

Inkubation von permeabilisierten ECL-Zellen mit freiem Calcium führt ebenfalls zur Freisetzung von Histamin (Höhne-Zell et al., 1997, S.5518-5526). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Gastrin die Bildung von Inositolphosphaten in ECL-Zellen von *Mastomys natalensis* anregt (Kinoshita et al., 1998, S.93-100). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl Inositolphosphate als auch Calcium-Einstrom von außen für die Histamin-Freisetzung in ECL-Zellen von großer Bedeutung sind.

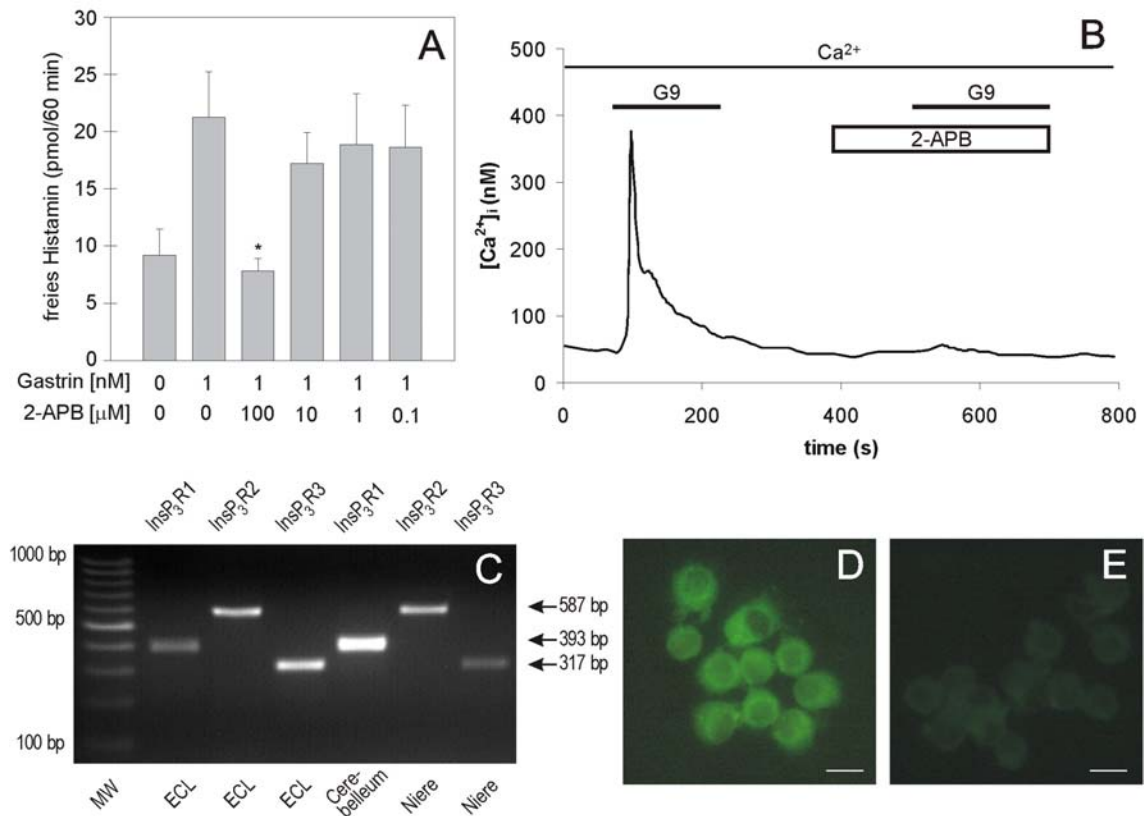
ECL-Zellen exprimieren spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom L- und N-Typ (Bufler et al., 1998; C424-C429; Zeng et al., 1999; G1268-G1280). Diese Kanäle könnten den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum vermitteln. Sie finden sich auch in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Gandia et al., 1995, S.55-63) sowie in enterochromaffinen Zellen des Darms (Racke und Schwörer, 1993, S.1-8; Lomax et al., 1999, S.1363-1369), wo sie für die Exozytose essentiell sind.

### 3.2.2 Bedeutung von $InsP_3$ und $InsP_3$ -Rezeptoren

Um die Rolle von  $InsP_3$  und  $InsP_3$ Rs bei der gastrininduzierten Histamin-Freisetzung zu bestimmen, wurden isolierte ECL-Zellen 10 Minuten mit dem  $InsP_3$ R-Antagonisten 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB; Tocris, Bristol, UK) inkubiert und anschließend

stimuliert. Dieser Inhibitor hat keinen Effekt auf die Produktion von  $\text{InsP}_3$  durch Phospholipase C und läßt die Funktion von VOCCs und Ryanodin-Rezeptoren unverändert (Maruyama et al., 1997, S.498-505).

Wie in Abb. 4A dargestellt, hemmte 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) die gastrininduzierte Histaminsekretion vollständig. Abb. 4B zeigt den Effekt von 2-APB auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Gastrin alleine erzeugte eine typische biphasische Calcium-Antwort, welche nach Zufuhr von 2-APB nicht mehr ausgelöst werden konnte. 2-APB alleine hatte keinen Effekt auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



**Abbildung 4:** Bedeutung von  $\text{InsP}_3$  und  $\text{InsP}_3\text{Rs}$ . **(A)** Effekt des  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Antagonisten 2-APB auf die gastrininduzierte Histaminfreisetzung. 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) hemmte die gastrininduzierte Histaminsekretion vollständig ( $n = 7$ ;  $*P < 0,007$  vs. Stimulation mit Gastrin). **(B)** Effekt von 2-APB auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Gastrin löste ein biphasisches Calcium-Signal aus, das durch 2-APB vollständig unterdrückt wurde. G9, Gastrin (1 nM). **(C)** Eine RT-PCR mit subtyp-spezifischen Primern ergab Banden für alle 3  $\text{InsP}_3\text{Rs}$ . Cerebellum und Niere dienen als Positivkontrollen. MW, Molekulargewichtsstandard. **(D)** Antikörperfärbung des  $\text{InsP}_3\text{R}_3$ . **(E)** Negativkontrolle. Balken, 10  $\mu\text{m}$ .

Des weiteren wurden die  $\text{InsP}_3\text{R}$  Subtypen in ECL-Zellen ermittelt. Eine RT-PCR mit spezifischen Primern amplifizierte Banden von 392, 586 und 316 bp, welche  $\text{InsP}_3\text{R}_1$ ,  $\text{InsP}_3\text{R}_2$  und  $\text{InsP}_3\text{R}_3$  repräsentieren (Abb. 4C, Spuren 2 - 4). Als Positiv-Kontrolle dienten cDNAs von Kleinhirn und Niere (Spuren 5 - 7). Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass die amplifizierten Fragmente identisch mit den Originalsequenzen aus GenBank™ sind. Negativ-Kontrollen produzierten keine Banden (nicht gezeigt).

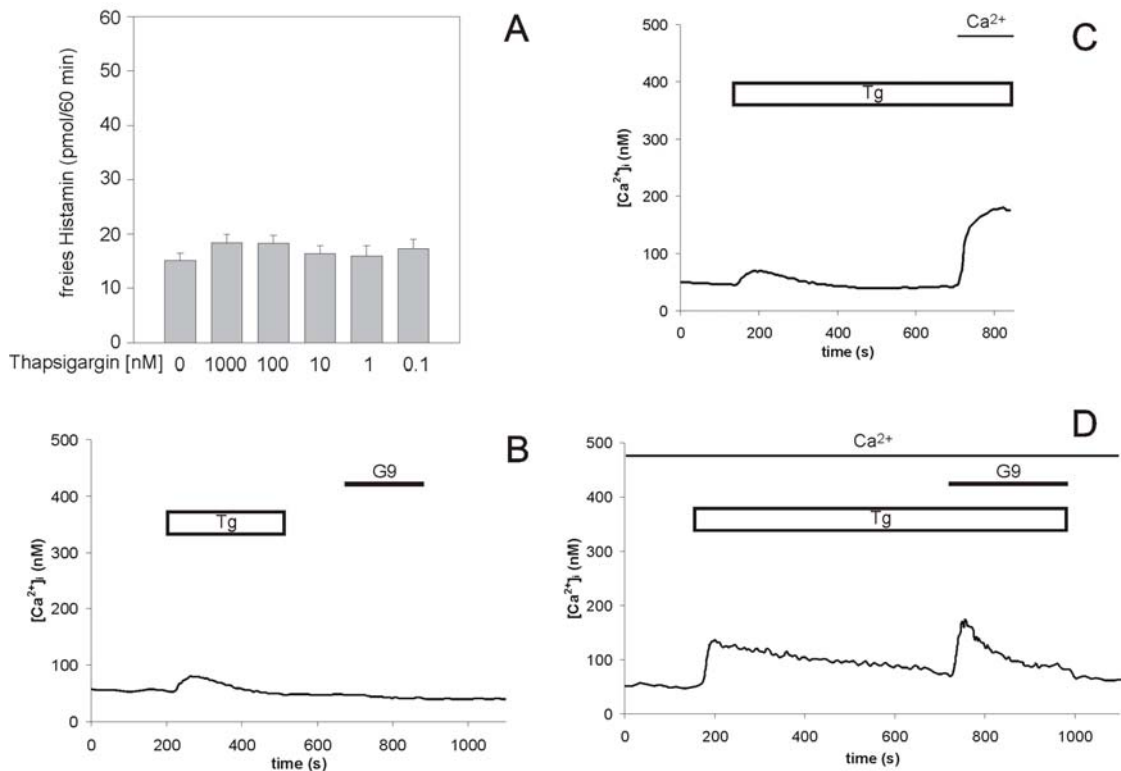
Zusätzlich wurde eine Immunfärbung an isolierten und kultivierten ECL-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden ein monoklonaler Antikörper gegen  $InsP_3R_3$  und ein sekundärer an Alexa Fluor™ 488 gekoppelter Antikörper verwendet. Abb. 4D zeigt das positive confokale Bild und bestätigt die Ergebnisse der RT-PCR. Die Negativkontrolle ist in Abb. 4E abgebildet.

### 3.2.3 Bedeutung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern

Thapsigargin (Tg) wurde eingesetzt um den Einfluss der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern auf die gastrininduzierte Histaminsekretion zu bestimmen. Tg ist ein häufig verwendeter Inhibitor der sarco-/endoplasmatischen Reticulum ATPase (SERCA), der intrazelluläre Speicher passiv entleert (Thastrup et al., 1990, S.2466-2470).

Eine einstündige Inkubation von ECL-Zellen mit Tg ( $10^{-6}$  -  $10^{-10}$  M) in calciumhaltigem Medium führte zu keiner messbaren Freisetzung von Histamin (Abb. 5A). Um die Wirkung von Tg weiter zu charakterisieren, wurde  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen, isolierten ECL-Zellen bestimmt. Dabei wurden Tg-Konzentrationen von  $\leq 0,5 \mu\text{M}$  verwendet um unspezifische Effekte auszuschließen (Geiszt et al., 1995, S.525-528). In calciumfreiem Medium führte Tg zu einer vorübergehenden Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Anschließend kehrte  $[Ca^{2+}]_i$  wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 5B). Zugabe von Gastrin (1 nM) hatte keinen weiteren Effekt in calciumfreiem Medium. Infusion von Calcium (1 mM) nach Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher mit Tg resultierte in einem bemerkenswerten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch kapazitiven Calciumeinstrom über SOCCs (Abb. 5C) (Barritt, 1999, S.153-169).

Des weiteren wurde der Effekt von Tg in calciumhaltigem Medium auf  $[Ca^{2+}]_i$  bestimmt. Abb. 5D zeigt, daß Tg unter diesen Bedingungen  $[Ca^{2+}]_i$  stärker und länger erhöhte als in calciumfreiem Medium. Anschließende Zugabe von Gastrin (1 nM) erzeugte ein biphasisches Calcium-Signal. Verglichen mit dem reinen Gastrin-Signal war der initiale Peak vermindert, während die Plateau-Phase auf einer vergleichbaren Stufe blieb (s. Abb. 4B, 5D und 6B).

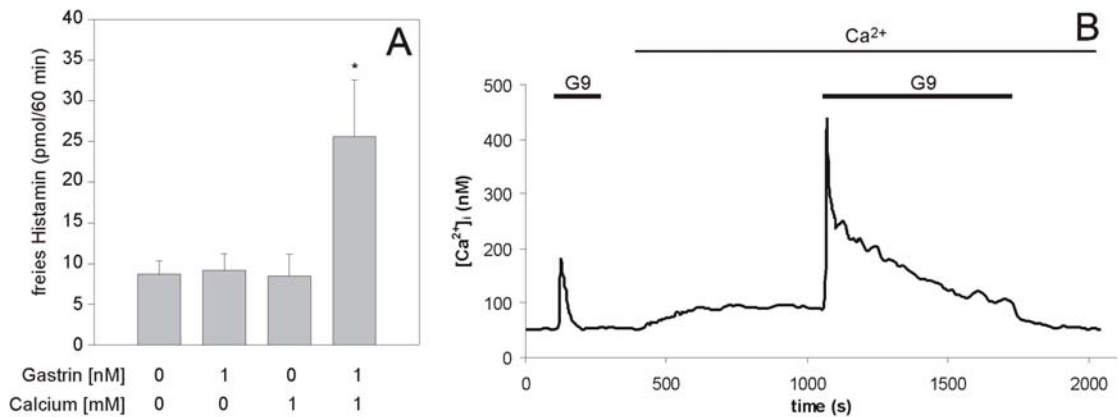


**Abbildung 5:** Bedeutung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. **(A)** Effekt von Thapsigargin auf die Histaminfreisetzung in der Gegenwart von Calcium. Nach einstündiger Inkubation konnte keine Sekretion nachgewiesen werden. **(B)** Effekt von Thapsigargin (Tg; 0,5  $\mu$ M) auf  $[Ca^{2+}]_i$  in der Abwesenheit von Calcium. Gastrin (1 nM) löste kein weiteres Calciumsignal aus. **(C)**  $Ca^{2+}$  add-back Protokoll. Nach Speicherentleerung mit Thapsigargin (0,5  $\mu$ M) und nachfolgender Zufuhr von Calcium kam es zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Calciumeinfluss über SOCCs. **(D)** Effekt von Thapsigargin auf  $[Ca^{2+}]_i$  in der Gegenwart von Calcium. Die Zufuhr von Gastrin in der Gegenwart von Thapsigargin induzierte einen biphasischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.2.4 Bedeutung von Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum

Um die Bedeutung von Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum zu ermitteln, wurde die Wirkung von Gastrin auf die Histaminfreisetzung in calciumfreiem Medium untersucht. Wie in Abb. 6A dargestellt, kam es unter diesen Bedingungen zu keiner messbaren Histaminsekretion. Auch der Gastrin-Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  wurde an Fura-2 beladenen ECL-Zellen untersucht. In calciumfreiem Medium produzierte Gastrin einen kleinen Peak aber keine Plateau-Phase (Abb. 6B), wie auch schon früher berichtet wurde (Zeng et al., 1996, S.1835-1846). Dieses Ergebnis ist auch mit der Beobachtung vereinbar, dass der unspezifische Kanalblocker Lanthanum (10  $\mu$ M) die Plateau-Phase vollkommen unterdrückt (Prinz et al., 1997, S.221-229). Nach Entfernung von Gastrin aus dem Perfusionsmedium und Zufuhr von Calcium kam es zu einer kleinen Zunahme der basalen  $[Ca^{2+}]_i$ . Eine erneute Stimulation mit Gastrin induzierte ein starkes biphasisches

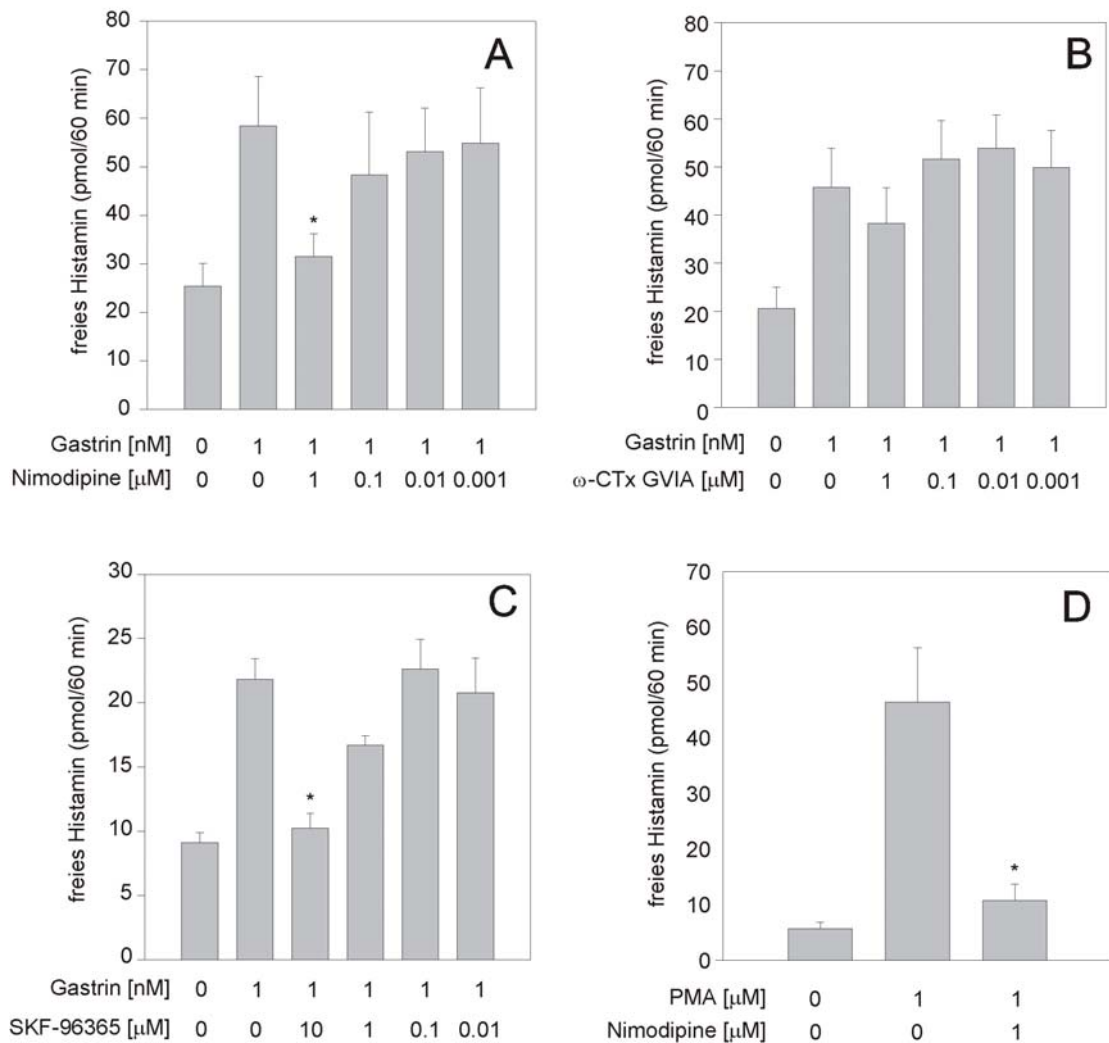
Signal (Abb. 6B). Nach Elimination von Gastrin kehrte  $[Ca^{2+}]_i$  auf den Ausgangswert zurück.



**Abbildung 6:** Bedeutung von Calciumeinstrom über die Plasmamembran. **(A)** Gastrininduzierte Histaminfreisetzung in calciumfreiem bzw. -haltigem Medium ( $n = 6$ ;  $*P > 0,05$  vs. basal). Eine Histaminfreisetzung konnte nur in der Gegenwart von Calcium beobachtet werden. **(B)** Effekt von Gastrin auf  $[Ca^{2+}]_i$  in calciumfreiem bzw. -haltigem Medium. Nur in der Gegenwart von Calcium induzierte Gastrin ein biphasisches Calciumsignal

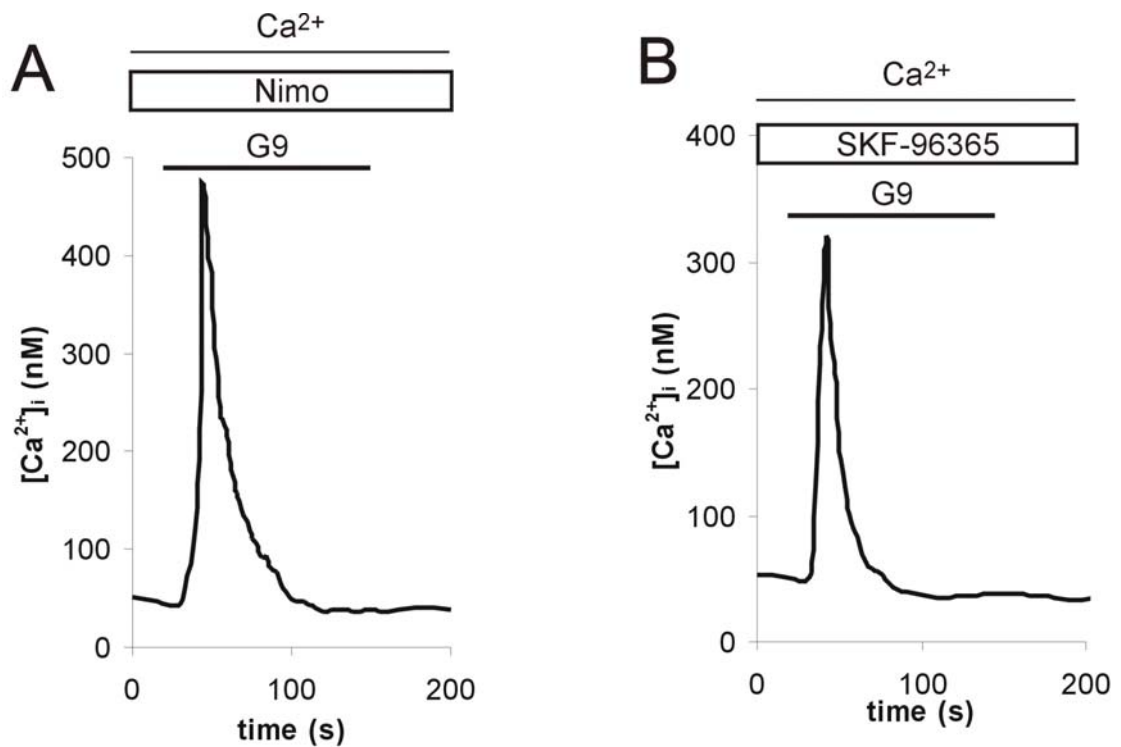
### 3.2.5 Effekt von Calciumkanal-Inhibitoren

Die Effekte verschiedener Calciumkanal-Blocker wurden untersucht um die Calciumkanäle zu identifizieren, die am Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum beteiligt sind. Gastrin stimulierte die Histaminsekretion um das 3 - 5-fache nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Diese Stimulation wurde nach zwanzigminütiger Präinkubation der Zellen mit dem selektiven L-Typ Calciumkanal-Blocker Nimodipin ( $10^{-6}$  M; RBI, Natick, MA, USA) um ~70 % gehemmt (Abb. 7A). Der spezifische N-Typ Calciumkanal-Blocker  $\omega$ -Conotoxin GVIA ( $10^{-6}$  M) hatte nach einstündiger Präinkubation nur eine minimale inhibitorische Wirkung, die nicht statistisch signifikant war (Abb. 7B). SKF-96365 ( $10^{-5}$  M; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), das sowohl spannungs- als auch rezeptorgesteuerte Calciumkanäle beeinflusst, blockierte die gastrininduzierte Histaminfreisetzung nach zwanzigminütiger Präinkubation fast vollständig (Abb. 7C). Der PKC-Aktivat Phorbol 12-Myristat, 13-Acetat (PMA ;  $10^{-6}$  M; Sigma, Deisenhofen) stimulierte über 60 Minuten die Histaminsekretion ähnlich suffizient wie Gastrin. Dieser Effekt wurde durch Nimodipin ( $10^{-6}$  M) um ~80 % gehemmt (Abb. 7D).



**Abbildung 7:** Effekt von Calciumkanalblockern auf die Histaminfreisetzung. **(A)** Effekt des L-Typ Calciumkanalblockers Nimodipin auf die gastrininduzierte Histaminsekretion ( $10^{-6}$  M;  $n = 8$ ;  $*P < 0,01$  vs. Gastrin Stimulation). **(B)** Effekt des N-Typ Calciumkanalblockers  $\omega$ -Conotoxin (CTx) GVIA ( $10^{-6}$  M,  $n = 6$ ) auf die gastrininduzierte Histaminfreisetzung. **(C)** Effekt von SKF-96365 ( $10^{-5}$  M,  $n = 7$ ,  $*P < 0,0003$  vs. Gastrin Stimulation). **(D)** Effekt von Nimodipin auf die Phorbol 12-Myristat, 13-Acetat (PMA) induzierte Histaminsekretion. PMA ( $10^{-6}$  M) stimulierte die Histaminfreisetzung um das 3 - 5fache gegenüber dem Basalwert und diese Stimulation wurde zu ~ 80 % durch Nimodipin gehemmt ( $10^{-6}$  M,  $n = 5$ ;  $*P < 0,05$  vs. PMA Stimulation).

Abb. 8 zeigt den Einfluss von Nimodipin ( $10^{-6}$  M; Abb. 8A) und SKF-96465 ( $10^{-5}$  M; Abb. 8B) auf  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten ECL-Zellen. Beide Substanzen hemmten die Plateau-Phase komplett, ließen den Peak aber unverändert.



**Abbildung 8:** Effekte von Calciumkanalblockern auf das Calciumsignal. (A) Effekt von Nimodipin ( $10^{-6}$  M) und (B) SKF-96365 ( $10^{-6}$  M) auf das gastrininduzierte Calciumsignal. Beide Calciumkanalblocker unterdrückten die Plateau-Phase komplett.

### 3.3 Expression und Interaktion der Endozytose-Proteine Dynamin und Amphiphysin in ECL-Zellen

#### 3.3.1 Einführung

Dynamin und Amphiphysin sind multimodulare Proteine, die für viele Endozytose-Vorgänge von großer Bedeutung sind (Marsh und McMahon, 1999, S.215-220; McPherson, 1999, S.229-238; Slepnev und De Camilli, 2000, S.161-172). Dynamine sind Guanosintriphosphatasen (GTPasen) mit einem Molekulargewicht von ~100 kDa. Sie vermitteln die Abschnürung von sich einstülpenden Membrananteilen und somit die Bildung von endozytotischen Vesikeln (Schmid et al., 1998, S.504-512; Henley et al., 1999; S243-S247)(McNiven et al., 2000, S.115-120; Hinshaw, 2000, S.438-519; Sever, 2002; 463). Wie dies genau geschieht, ist noch nicht geklärt. Den Ergebnissen bisheriger Studien nach könnte Dynamin als Mechanoenzym funktionieren oder aber - im Sinne einer klassischen GTPase - als Steuerzentrale für andere Proteine (Yang und Cerione, 1999; R511-R514; van der Bliek, 1999, S.253-254; Sever et al., 2000, S.385-392; Thompson und McNiven, 2001; R850; Eccleston et al., 2002, S.275-282). Bei Säugetie-



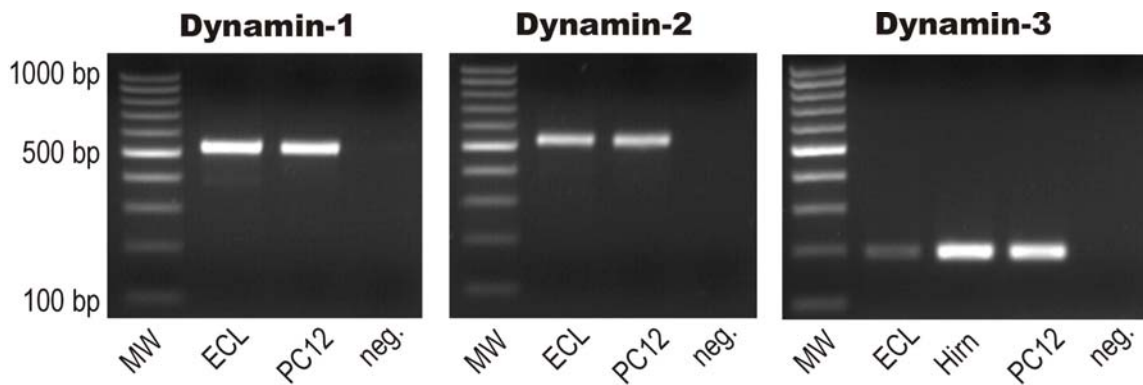
ren wurden bisher drei Dynamin-Isoformen entdeckt. Diese haben viele Splice-Varianten und werden gewebespezifisch exprimiert. Dynamin-1 findet sich in Zellen neuronalen Ursprungs (Obar et al., 1990, S.256-261), Dynamin-2 kommt ubiquitär vor (Sontag et al., 1994, S.4547-4554; Cook et al., 1994, S.644-648) und die Expression von Dynamin-3 ist auf Testes, Gehirn, Lunge und Herz beschränkt (Nakata et al., 1993, S.1-5; Cook et al., 1996, S.927-931; Cao et al., 1998, S.2595-2609).

Amphiphysin dient als Transporter für Dynamin. Es interagiert sowohl mit Dynamin als auch mit Clathrin und Clathrin-Adapter Proteinen und bringt Dynamin somit an Stellen, an denen Endozytose abläuft (Wigge und McMahon, 1998, S.339-344). Des weiteren unterstützt Amphiphysin Dynamin bei der Abschnürung endozytotischer Vesikel (Takei et al., 1999, S.33-39). Bei Säugern sind zwei Amphiphysin-Isoformen bekannt. Amphiphysin-1 findet sich in Gehirn und chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Lichte et al., 1992, S.2521-2530), sowie in geringerer Menge in Sertoli-Zellen des Hodens (Ramjaun et al., 1997, S.16700-16706; Watanabe et al., 2001, S.739-745) und in der Retina (Terada et al., 2002, S.185-190). Amphiphysin-2, von dem eine Vielzahl von Splice-Varianten bekannt sind, findet sich ubiquitär. Manche Splice-Varianten werden gewebespezifisch exprimiert (Sparks et al., 1996, S.741-744; Sakamuro et al., 1996, S.69-77; Ramjaun et al., 1997, S.16700-16706; Leprince et al., 1997, S.15101-15105; Wigge et al., 1997, S.2003-2015; Tsutsui et al., 1997, S.178-183; Butler et al., 1997, S.1355-1367; Gold et al., 2000, S.285-292).

Die meisten Erkenntnisse über die Funktion von Dynamin und Amphiphysin stammen aus Experimenten mit neuronalen Zell-Modellen. Über die Expression dieser Proteine im Magen ist jedoch kaum etwas bekannt. Lediglich über die Expression von Dynamin an der apikalen Zellmembran von Parietalzellen ist bisher berichtet worden (Calhoun et al., 1998; C163-C170; Okamoto et al., 2000; C833-C851).

### **3.3.2 Expression von Dynamin auf RNA-Ebene in isolierten ECL-Zellen**

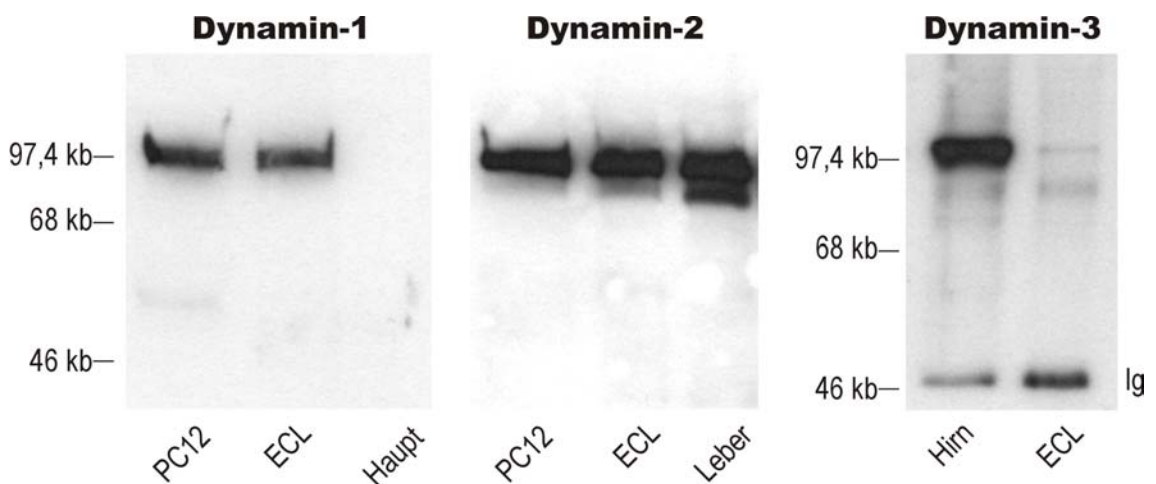
Mit Hilfe der RT-PCR wurden mRNAs der drei bekannten Dynamin-Isoformen aus hochangereicherten isolierten ECL-Zellen amplifiziert. Hierzu wurden isoform-spezifische Oligonukleotidprimer verwendet. Wie Abb. 9 zeigt, konnten RNAs für Dynamin-1, -2 und -3 gefunden werden. Bei Verwendung gleicher Mengen an cDNA war die Bande für Dynamin-3 am schwächsten, was auf eine geringere Expression im Vergleich zu Dynamin-1 und -2 hindeutet. Hirn und PC-12 Zellen dienten als Positivkontrollen.



**Abbildung 9:** RT-PCR für Dynamin-Isoformen. Alle drei bekannten Isoformen konnten auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Positiv- (Hirn, PC-12 Zellen) und Negativkontrollen sind ebenso gezeigt. MW, Molekulargewichtsstandard.

### 3.3.3 Expression von Dynamin auf Protein-Ebene in isolierten ECL-Zellen

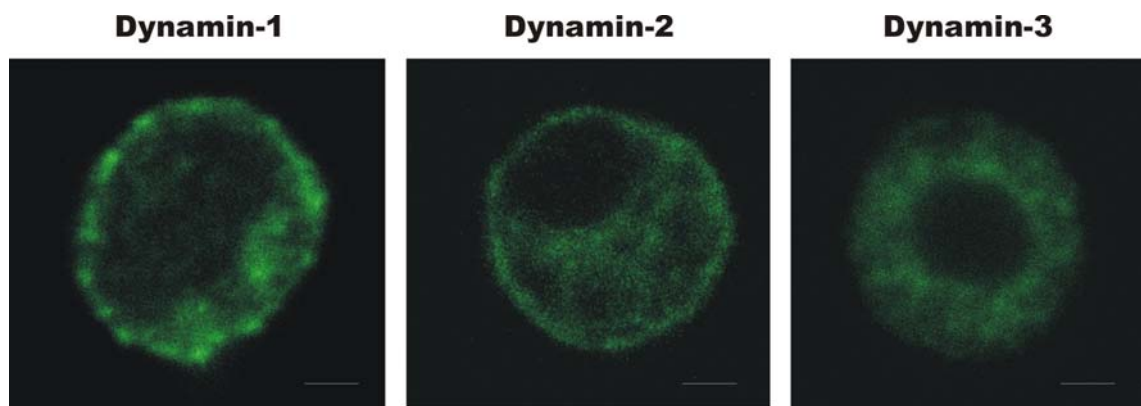
Die Expression von Dynamin-Isoformen in ECL-Zellen auf Protein-Ebene wurde mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 10). Wiederum konnten alle drei Dynamin-Isoformen nachgewiesen werden. Während Dynamin-1 und -2 schon nach kurzer Expositionszeit ein starkes Signal erzeugten, war Dynamin-3 nur durch Immunopräzipitation aus einer größeren Menge ECL-Zell-Proteingemisch nachweisbar.



**Abbildung 10:** Western Blot Analyse der Dynamin-Proteinexpression in ECL-Zellen. Dynamin-1 und -2 erzeugten deutliche Banden nach kurzer Exposition, während Dynamin-3 kaum nachweisbar war. Exokrine Hauptzellen dienten als Negativkontrolle für den Dynamin-1 Antikörper. Ig, Immunoglobuline.

### 3.3.4 Immunolokalisation von Dynamin in isolierten ECL-Zellen

Um die intrazelluläre Verteilung der Dynamin-Isoformen zu bestimmen, wurden immunzytochemische Versuche mit isoform-spezifischen Antikörpern an isolierten und kultivierten ECL-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte Dynamin-1 ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster mit hellen Punkten an der Plasmamembran (Abb. 11A). Dynamin-2 fand sich ebenfalls im Zytoplasma mit Betonung der perinucleären Region und der Plasmamembran (Abb. 11B). Dynamin-3 war hauptsächlich um den Zellkern lokalisiert (Abb. 11C).

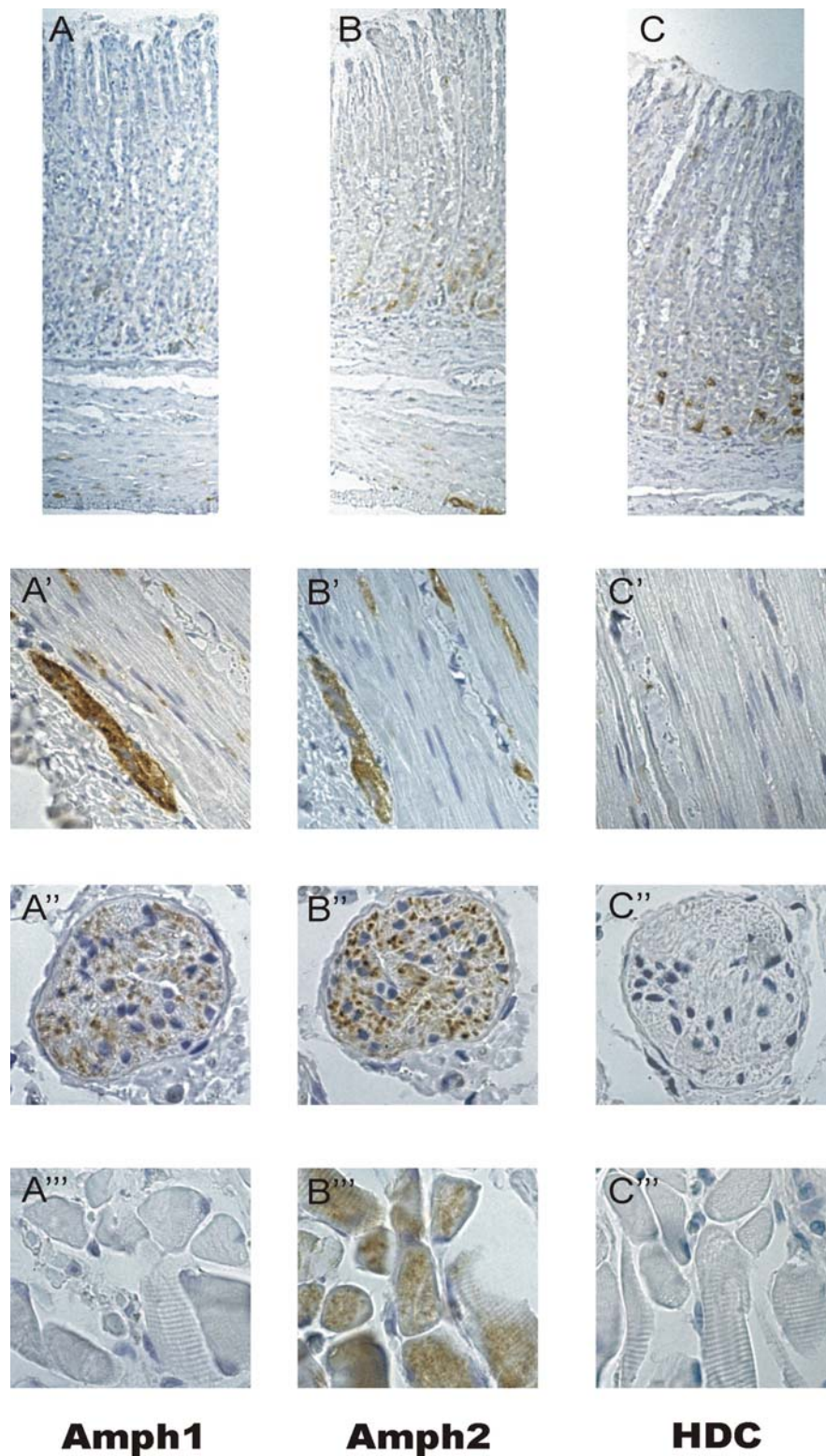


*Abbildung 11: Immunolokalisation der Dynamin-Isoformen in isolierten ECL-Zellen mit spezifischen Antikörpern. Dynamin-1 stellte sich im Zytoplasma und an der Plasmamembran dar. Dynamin-2 fand sich an der Plasmamembran, im Zytoplasma und perinucleär. Dynamin-3 war um den Zellkern lokalisiert. Balken = 2 µm.*

### 3.3.5 Immunolokalisation von Amphiphysin in ECL-Zellen des Magens

Mit Hilfe der Immunhistochemie an in Paraffin eingebetteten Schnitten der säureproduzierenden Magenschleimhaut wurden amphiphysinexprimierende Zellen identifiziert. Abb. 12 zeigt Schnitte, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen Amphiphysin-1 (Abb. 12A), einem polyklonalen Antikörper gegen Amphiphysin-2 (Abb. 12B) und einem polyklonalen Antikörper gegen HDC, dem Markerenzym für ECL-Zellen (Abb. 12C), gefärbt wurden. Der Antikörper gegen Amphiphysin-1 erzeugte eine schwache Färbung einiger weniger Schleimhautzellen im basalen Anteil der Magendrüsen sowie eine stärkere Färbung von Zellen innerhalb der Lamina muscularis und Zellen zwischen Lamina muscularis und Serosa. Abb. 12A' zeigt eine stärkere Vergrößerung des Übergangs zwischen Lamina muscularis und Serosa. Die positiv gefärbten Zellen konnten auch mit Antikörpern gegen die neuronalen Marker AP180 und Syntaxin angefärbt werden (nicht gezeigt) und stellen somit Neurone, die die Muskelschicht innervieren, sowie Zellen des Plexus myentericus dar. In Abb. 12A'' ist ein Schnitt durch den N.

vagus dargestellt. Abb. 12A''' zeigt einen Schnitt durch Muskelzellen des Magens, wie man an der Querstreifung erkennen kann. Wie erwartet, wurden diese Zellen nicht mit dem Amphiphysin-1 Antikörper angefärbt.

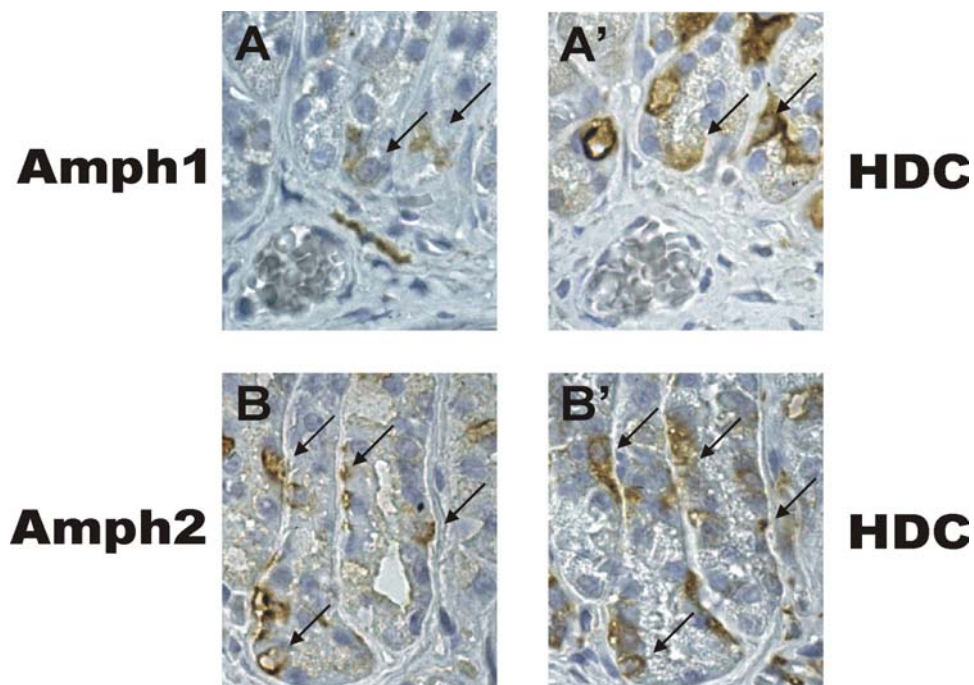


**Abbildung 12:** Immunohistochemischer Nachweis von Amphiphysin-1 und -2 sowie Histidindecaboxylase (HDC), dem Marker-Enzym für ECL-Zellen, an Schnitten des Rattenmagens. Alle drei Antigene wurden in basalen Zellen der Mucosa gefunden (A-C). Amphiphysin-1 und -2 fanden sich auch in Nervenzellen (A'-C'). Nur Amphiphysin-2 wurde in Muskelzellen entdeckt (A''' - C''').

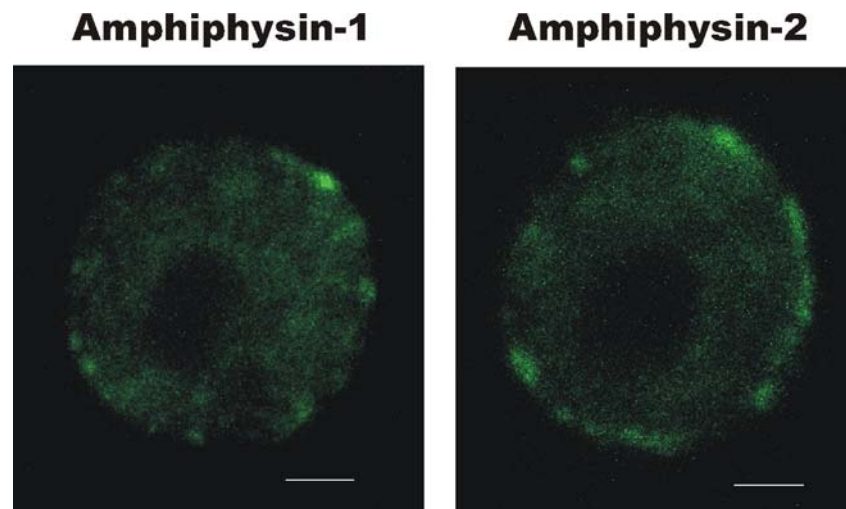
Mit dem Antikörper gegen Amphiphysin-2 wurde ein ähnliches Färbungsmuster erzielt wie mit dem Amphiphysin-1 Antikörper. Allerdings waren die positiven Zellen der Mucosa stärker gefärbt (Abb. 12B - B'') und auch die Muskelzellen zeigten ein positives Signal (Abb. 12B''').

Mit dem Antikörper gegen die HDC konnten ECL-Zellen im basalen Anteil der Magendrüsen deutlich und spezifisch identifiziert werden (Abb. 12C). Es konnten mit diesem Antikörper keine weiteren immunreaktiven Zellen identifiziert werden (Abb. 12C' - C''').

Um die amphiphysin-1- und -2-positiven Zellen der Magenmucosa genauer zu charakterisieren wurde an Serienschnitten eine Doppelfärbung mit diesen Antikörpern und dem Antikörper gegen HDC durchgeführt. Wie Abb. 13A - A' bzw. 12B - B' zeigen, konnten Zellen, die positiv für Amphiphysin waren, auch mit dem HDC-Antikörper angefärbt werden. Somit konnten die ECL-Zellen des Rattenmagens als ein neuer Expressionsort für Amphiphysin-1 und -2 identifiziert werden. Abb. 14 stellt die intrazelluläre Lokalisation der Amphiphysin-Isoformen in isolierten ECL-Zellen dar, ermittelt mittels Immuncytochemie. Beide Isoformen zeigen ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster mit Betonung der Plasmamembran.



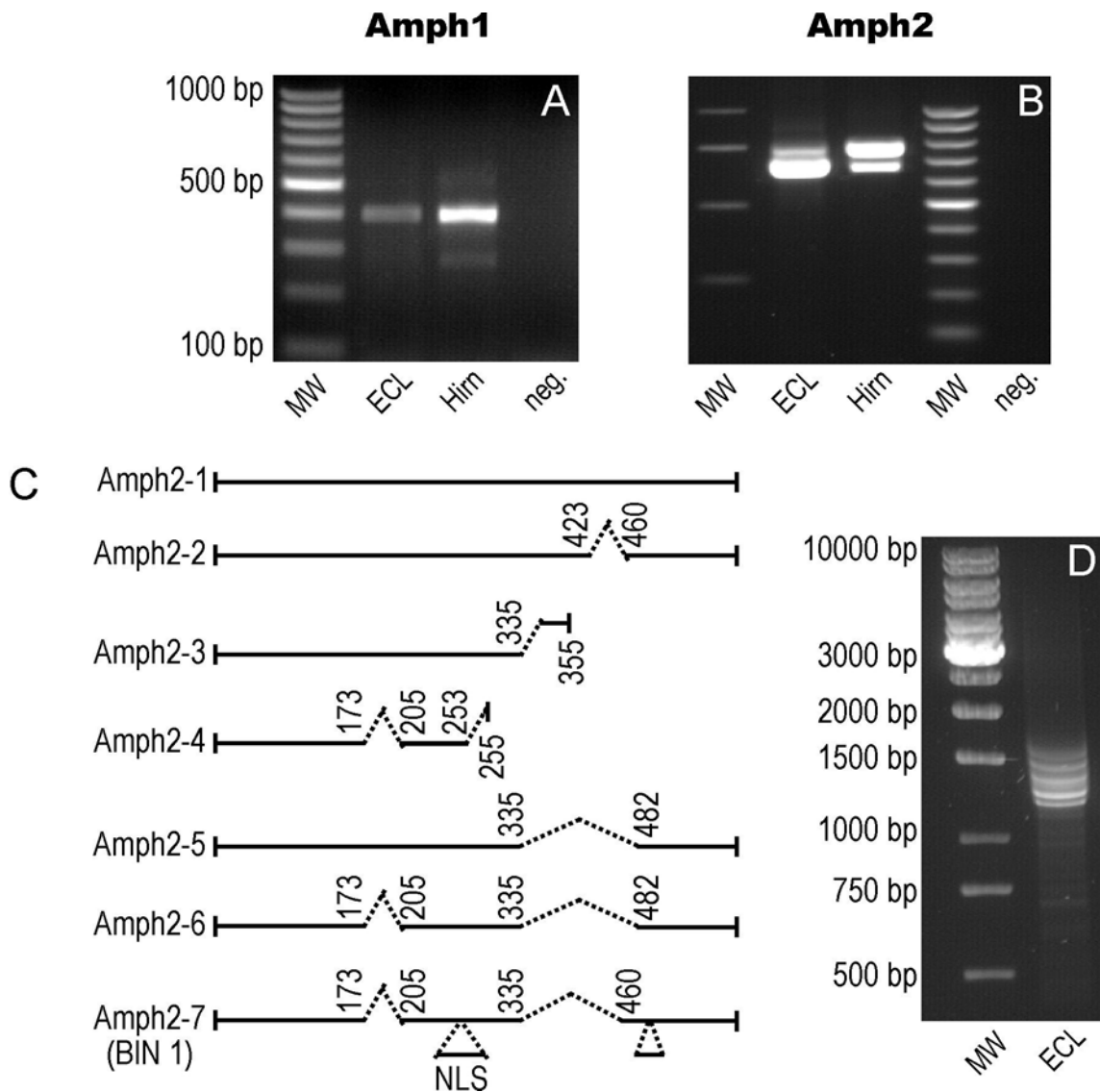
**Abbildung 13:** Identifizierung der amphiphysin-1 (A, A') und -2-positiven (B, B') Zellen als ECL-Zellen anhand von Antikörperfärbungen an Folgeschnitten.



*Abbildung 14: Immunolokalisation von Amphiphysin-Isoformen in isolierten ECL-Zellen. Beide Isoformen zeigen ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster mit Betonung der Plasmamembran. Balken = 2 µm.*

### 3.3.6 Expression von Amphiphysin auf RNA-Ebene in isolierten ECL-Zellen

Mittels RT-PCR und isoform-spezifischer Primer wurden vorhandene Amphiphysin-mRNAs in ECL-Zellen bestimmt. Wie in Abb. 15A dargestellt, konnte mit spezifischen Primern für Amphiphysin-1 eine 398 bp große Bande aus ECL cDNA amplifiziert werden (Spur 2). Im Vergleich zur Positivkontrolle (Rattenhirn cDNA, Spur 3) war das Signal deutlich schwächer, bei Verwendung gleicher Mengen an cDNA. In der Negativkontrolle konnte keine Bande entdeckt werden (Spur 4). Abb. 15B zeigt das Ergebnis mit spezifischen Primern für Amphiphysin-2. Dieser Primer beinhalten die Region, die für die Aminosäuren 174 - 204 kodieren und einem alternativen Splicing unterliegt. Mit diesen Primern wurden aus ECL cDNA zwei Banden amplifiziert: eine schwächere Bande von 761 bp und eine stärkere Band von 668 bp (Spur 2). In der Positivkontrolle (Rattenhirn cDNA, Spur 3) waren dieselben Banden vorhanden, allerdings mit vertauschten Intensitäten. Folglich werden in ECL-Zellen die Splice-Varianten, denen die Aminosäuren 174 - 204 fehlen stärker exprimiert als diejenigen, die diesen Abschnitt enthalten.



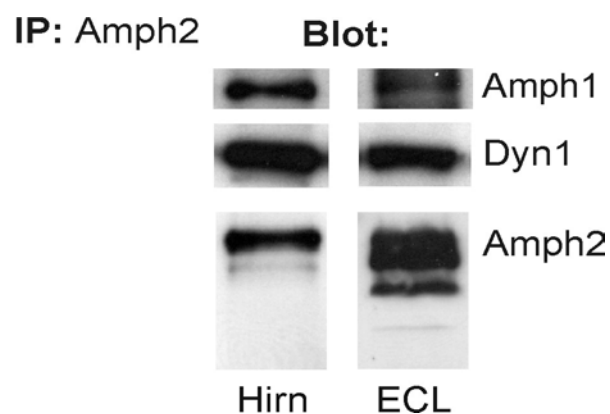
**Abbildung 15:** RNA-Nachweis von (A) Amphiphysin-1 und (B) -2 mittels RT-PCR. Positiv- (Hirn) und Negativkontrollen sind ebenfalls dargestellt. Aufgrund von alternativem Splicing wurden für Amphiphysin-2 zwei Banden detektiert. (C) Übersicht über die bekannten Amphiphysin-2 Splice-Varianten. NLS, Nuclear location sequence. (D) Amplifikation der gesamten Länge von Amphiphysin-2 aus ECL cDNA. Aufgrund von alternativem Splicing wurden mehrere Banden detektiert.

Da eine Reihe von Amphiphysin-2 Splice-Varianten in verschiedenen Geweben beschrieben worden sind (Wigge et al., 1997, S.2003-2015) (Abb. 15C), wurde die komplette Amphiphysin-2-Sequenz aus ECL cDNA amplifiziert um alle Amphiphysin-2 Splice-Varianten, die in ECL-Zellen vorkommen, zu ermitteln. Wie Abb. 15D zeigt wurden mehrere Banden amplifiziert (Spur 2). Durch nachfolgende Klonierung und Sequenzierung konnten die bereits bekannten mRNAs für Amphiphysin 2-1, Amphiphysin 2-5, Amphiphysin 2-6 und Amphiphysin 2-7/BIN1 sowie eine bisher unbekannte Splice-Variante identifiziert werden. Diese neue Splice-Variante unterscheidet sich von Amphiphysin 2-1 nur darin, dass die Region, die für die Aminosäuren 174 -

204 kodiert, fehlt. Zur Übereinstimmung mit der Nomenklatur von Wigge et al. soll diese Splice-Variante Amphiphysin 2-1b genannt werden.

### 3.3.7 Interaktion von Dynamin und Amphiphysin

Um die Interaktionen zwischen Dynamin und Amphiphysin *in vitro* zu untersuchen, wurde eine Co-Immunopräzipitation mit dem polyklonalen anti-Amphiphysin-2 Antikörper 1874 (Ramjaun et al., 1997, S.16700-16706) an Proteinextrakten von isolierten, hochangereicherten ECL-Zellen durchgeführt. Proteinextrakte aus dem Rattenhirn dienten als Positivkontrolle. Die Immunopräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen Dynamin-1, Amphiphysin-1 und Amphiphysin-2 inkubiert. Wie Abb. 16 zeigt, konnten alle drei Antigene im Immunoblot nachgewiesen werden, was die Interaktion zwischen Dynamin und Amphiphysin bestätigte. Im Vergleich zum Hirn erkannte der Amphiphysin-2 Antikörper mehrere kleinere Banden in ECL-Zellen, was für das Vorhandensein mehrerer Splice-Varianten spricht und die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt.



**Abbildung 16:** Co-Immunopräzipitation von Amphiphysin und Dynamin aus Proteinextrakten von isolierten, hochangereicherten ECL-Zellen. Die Immunopräzipitation wurde mit dem Amphiphysin-2 Antikörper durchgeführt.



## 4 Diskussion

Die Enterochromaffin-like Zellen des Magens sind von herausragender Bedeutung für die periphere Regulation der Magensäureproduktion. Sie produzieren und sezernieren Histamin, das Parietalzellen zur Produktion und Freisetzung von Magensäure anregt (Hakanson et al., 1994, S.1171-1184; Modlin und Tang, 1996, S.783-810; Sachs und Prinz, 1996, S.57-62). Gastrin ist für die Histaminsekretion der wichtigste physiologische Stimulus. Nach der Bindung an seinen Rezeptor löst es ein biphasisches Calcium-Signal aus und führt schließlich zur Ausschüttung von Histamin (Prinz et al., 1993, S.449-461; Prinz et al., 1994; G663-G675; Chen et al., 1994, S.18-27). Calcium scheint für die Exozytose der histaminspeichernden Vesikel, die über die SNARE-Proteine Synaptobrevin und SNAP-25 vermittelt wird (Höhne-Zell et al., 1997, S.5518-5526), von entscheidender Bedeutung zu sein. Zum einen kann freies Calcium die Sekretion von Histamin in permeabilisierten ECL-Zellen stimulieren (Höhne-Zell et al., 1997, S.5518-5526). Zum anderen inhibiert die Blockierung von Ionenkanälen der Plasmamembran mit dem unspezifischen Kanalblocker Lanthanum auch die Histaminfreisetzung (Prinz et al., 1997, S.221-229). Über das Zustandekommen des Calciumsignals in ECL-Zellen ist bisher nichts genaues bekannt. Deshalb wurden im ersten Teil dieser Arbeit mögliche Mechanismen hierfür untersucht.

### 4.1 Bedeutung von Calcium für die gastrininduzierte Histaminfreisetzung

Gastrin bindet an  $G_q$ -gekoppelte Gastrin/CCK-B-Rezeptoren (Kopin et al., 1992, S.3605-3609; Nakata et al., 1992, S.1151-1157; Pisegna et al., 1992, S.296-303; Kopin et al., 1994, S.67-78; Wank, 1998; G607-G613), was zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und zu Exozytose führt (Ito et al., 1993, S.18300-18305; Prinz et al., 1994; G663-G675; Wank, 1995; G628-G646; Nagata et al., 1996, S.11825-11830; Todisco et al., 1997; G891-G898; Kinoshita et al., 1998, S.93-100).  $G_q$  induziert die Spaltung von Inositol-4,5-bisphosphat zu  $InsP_3$  und DAG durch die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C. Dieser Vorgang kann nicht durch Pertussis-Toxin gehemmt werden (Morris und Malbon, 1999, S.1373-1430). Während  $InsP_3$  zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt, aktiviert DAG die Proteinkinase C.

Studien an isolierten ECL-Zellen von *Mastomys natalensis* (Kinoshita et al., 1998, S.93-100) und isolierten Hauptzellen aus dem Meerschweinchen (Qian et al., 1993; G718-G727) ergaben, dass die Bindung von Gastrin an den Gastrin/CCK-B-Rezeptor in diesen Zellen die Produktion von Inositolphosphaten auslöst. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gastrininduzierte Histaminfreisetzung vollständig durch den  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Antagonisten 2-APB gehemmt wird, was gut mit den Ergebnissen dieser früheren Studien vereinbar ist. Des Weiteren wurde die Gegenwart von  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  in isolierten ECL-Zellen des Rattenmagens mittels RT-PCR und Immunocytochemie bestätigt. Drei verschiedene  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Subtypen sind bisher in der Ratte beschrieben worden.  $\text{InsP}_3\text{R1}$  wurde ursprünglich aus dem Cerebellum (Mignery et al., 1990, S.12679-12685),  $\text{InsP}_3\text{R2}$  aus dem Großhirn (Südhof et al., 1991, S.3199-3206) und  $\text{InsP}_3\text{R3}$  aus Pankreasinseln kloniert (Blondel et al., 1993, S.11356-11363).  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  zeigen eine weite Verbreitung. Mindestens zwei Rezeptorsubtypen können in unterschiedlichen Geweben co-exprimiert werden (Newton et al., 1994, S.28613-28619). Im Verdauungstrakt scheint  $\text{InsP}_3\text{R3}$  der prädominante Subtyp zu sein (Newton et al., 1994, S.28613-28619). In ECL-Zellen wurden in vorliegender Arbeit mittels RT-PCR alle drei Subtypen nachgewiesen. Neben der Freisetzung von Histamin konnte durch die Blockierung der  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  mittels 2-APB auch das biphasische Calciumsignal komplett unterdrückt werden, was die Bedeutung von  $\text{InsP}_3$  und  $\text{InsP}_3\text{R}$  für die Signaltransduktion, die durch die Aktivierung des Gastrin-Rezeptors getriggert wird, hervorhebt.

$\text{InsP}_3$  bindet normalerweise an  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und setzt Calcium aus diesem intrazellulären Speicher frei. Dies hat in elektrisch nicht erregbaren Zellen wiederum einen kapazitiven Calciumeinstrom über die Plasmamembran zur Folge (Putney Jr., 1986, S.1-12). Um die Beteiligung des endoplasmatischen Calcium-Pools am gastrininduzierten Calciumeinstrom und der gastrininduzierten Histaminfreisetzung zu bestimmen, wurden die Calciumspeicher des ER mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin entleert. Die Inkubation von isolierten ECL-Zellen mit Thapsigargin führte zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , was die Mobilisierung von Calcium aus dem ER widerspiegelt. Diese Erhöhung induzierte jedoch keine Freisetzung von Histamin. Folglich ist die Freisetzung von Calcium aus dem ER alleine für die Exozytose nicht ausreichend. Des Weiteren induzierte Gastrin auch nach der Entleerung intrazellulärer Speicher mit Thapsigargin eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Demzufolge erscheint ein anderer Signaltransduktionsweg notwendig, um den Einstrom von Calcium über die Plasmamembran auszulösen.

Es muss erwähnt werden, dass intrazelluläre Calcium-Speicher durch die Verwendung des Chelators EGTA langsam entleert werden könnten. Somit könnte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vermindert werden, was sich negativ auf einen möglichen Effekt von Thapsigargin in calciumfreiem Medium auswirken könnte. Allerdings induzierte Thapsigargin in calciumhaltigem

Medium eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ohne dabei eine Histaminsekretion zu bewirken, was zeigt, dass die gastrininduzierte Histaminfreisetzung unabhängig von kapazitivem Calciumeinstrom ist und somit andere Calciumkanäle involviert sind.

Wenn in ECL-Zellen die Bindung von  $InsP_3$  an  $InsP_3Rs$ , nicht aber ein kapazitiver Calciumeinstrom über die Plasmamembran für die Sekretion von Histamin notwendig ist, wäre es möglich, dass verschiedene Calcium-Signalwege durch verschiedene  $InsP_3R$ -Subtypen bzw. unterschiedliche Lokalisation dieser Rezeptoren aktiviert werden. Somit könnte  $InsP_3$  in ECL-Zellen seinen Effekt nicht nur am ER ausüben sondern auch z.B. an der Plasmamembran und eine  $InsP_3$ - $InsP_3R$ -Interaktion könnte dort einen Einstrom von extrazellulärem Calcium auslösen. Eine Expression von  $InsP_3Rs$  an der Plasmamembran wurde schon in Lymphozyten (Kuno und Gardner, 1987, S.301-304; Berridge, 1993, S.315-325), Endothelzellen (Vaca und Kunze, 1995; C733-C738) und einigen anderen Zelltypen (Fujimoto et al., 1992, S.1507-1513; Khan et al., 1992, S.815-818; Mayrleitner et al., 1995, S.141-153) beobachtet. Es wurde auch schon angenommen, dass eine direkte Interaktion von intrazellulären  $InsP_3Rs$  mit Calciumkanälen in der Plasmamembran zu einem Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum führt (eine Übersicht gibt (Putney Jr., 1999, S.5-8)).

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit stützen auch die Hypothese, dass neben der Aktivierung von  $InsP_3Rs$  und nachfolgender Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern eine gleichzeitige Aktivierung der Proteinkinase C über DAG notwendig ist, um einen Calciumeinstrom über die Plasmamembran auszulösen. PMA, ein direkter Aktivator der PKC induzierte eine Sekretion von Histamin und dieser Effekt konnte mit Nimodipin gehemmt werden. Dies zeigt, dass PKC in der Histaminfreisetzung über eine Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen involviert ist.

„Long lasting“ L-Typ Calciumkanäle gehören zur Gruppe der spannungsgesteuerten Calciumkanäle und lassen sich durch Dihydropyridine hemmen. Da ihre Aktivierungsschwelle deutlich über dem Ruhemembranpotential liegt, gehören sie der Untergruppe der hochspannungsgesteuerten Calciumkanäle an, zusammen mit den „neuronalen“ N-Typ Calciumkanälen, deren spezifischer Inhibitor das Schneckengift  $\omega$ -Conotoxin GVIA ist, den „Purkinje-Zell“ P-Typ und den Q-Typ Calciumkanälen. Bei den niederspannungsgesteuerten Calciumkanäle liegt die Aktivierungsschwelle nur unwesentlich über dem Ruhemembranpotential. Ihnen werden die „transienten“ T-Typ Calciumkanäle zugerechnet. Hemmt man alle zuvor genannten Calciumkanäle in Neuronen, so kann man noch einen kleinen „residualen“ Calciumstrom messen. Dieser wird über R-Typ Calciumkanäle vermittelt, deren Aktivierungsschwelle zwischen der von hoch- und niederspannungsgesteuerten Calciumkanälen liegt (Meir et al., 1999, S.1019-1088).

Passend zu der Beobachtung, dass die PMA-induzierte Gastrinfreisetzung durch Nimodipin gehemmt werden kann, wurden in Lymphozyten (Savignac et al., 2001, S.1577-1579) und in Zellen des Glomus caroticus, die als Sauerstoffsensoren fungieren (Summers et al., 2000, S.1636-1644), dihydropyridinsensitive Calciumströme gemessen. In Synaptosomen aus dem Hippocampus konnte PMA Calciumströme durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle induzieren, welche mit Inhibitoren der PKC wie Calphostin C oder Dihydrosphingosin gehemmt werden konnten (Bartschat und Rhodes, 1995, S.2064-2072). Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation von chromaffinen Zellen mit PMA zu einer Hemmung von Calciumströmen durch L-Typ Calciumkanäle (Sena et al., 1999, S.281-292). Eine unterschiedliche Expression von spannungsgesteuerten Calciumkanälen in dem jeweiligen Zelltyp könnte auch die Aktivierung dieser Kanäle durch PKC regulieren. Dennoch ist PKC in ECL-Zellen offensichtlich entscheidend für die Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen, was zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt. Die Erzeugung von DAG erscheint notwendig für die Aktivierung der PKC in ECL-Zellen zu sein.

Gastrin induzierte keine Histaminfreisetzung in calciumfreiem Medium, was zeigt, dass der Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum während der Plateau-Phase des Calciumsignals unabdingbar für die Exozytose ist. Da ECL-Zellen spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom L- und N-Typ exprimieren, welche für die Sekretion in neuronalen (Artalejo et al., 1994, S.72-76) und chromaffinen Zellen (Gandia et al., 1995, S.55-63; Lomax et al., 1999, S.1363-1369) sowie in  $\beta$ -Zellen der Pankreasinseln (Ligon et al., 1998, S.13905-13911) bedeutsam sind, wurde der Effekt von selektiven Calciumkanal-Inhibitoren auf diese Kanäle untersucht. Nimodipin verminderte die gastrininduzierte Histaminfreisetzung um etwa 70%. Dies steht im Widerspruch zu einer früheren Arbeit die zeigte, dass Nifedipin diese nur ein wenig minderte (Zeng et al., 1999; G1268-G1280). Der Grund hierfür bleibt unklar, da in unseren Versuchen sowohl Nimodipin als auch Nifedipin die gastrininduzierte Histaminfreisetzung gleichermaßen beeinflussen (A. Pohlinger, unveröffentlichte Ergebnisse). L-Typ-Calciumkanal-Antagonisten vom Dihydropyridin-Typ, wie Nimodipin und Nifedipin, sind spezifische Inhibitoren, die an das transmembranäre Segment 6 von Motif III und VI der  $\alpha_{1c}$  Untereinheit binden (Abernethy und Schwartz, 1999, S.1447-1457). Die verwendeten Konzentration entsprachen den  $IC_{50}$  Werten, die in anderen Zellen für die Unterbindung von Calciumströmen ermittelt wurden (Tsien et al., 1991, S.349-354; Striessnig et al., 1998, S.108-115; van Zwieten, 1998, S.5-9).

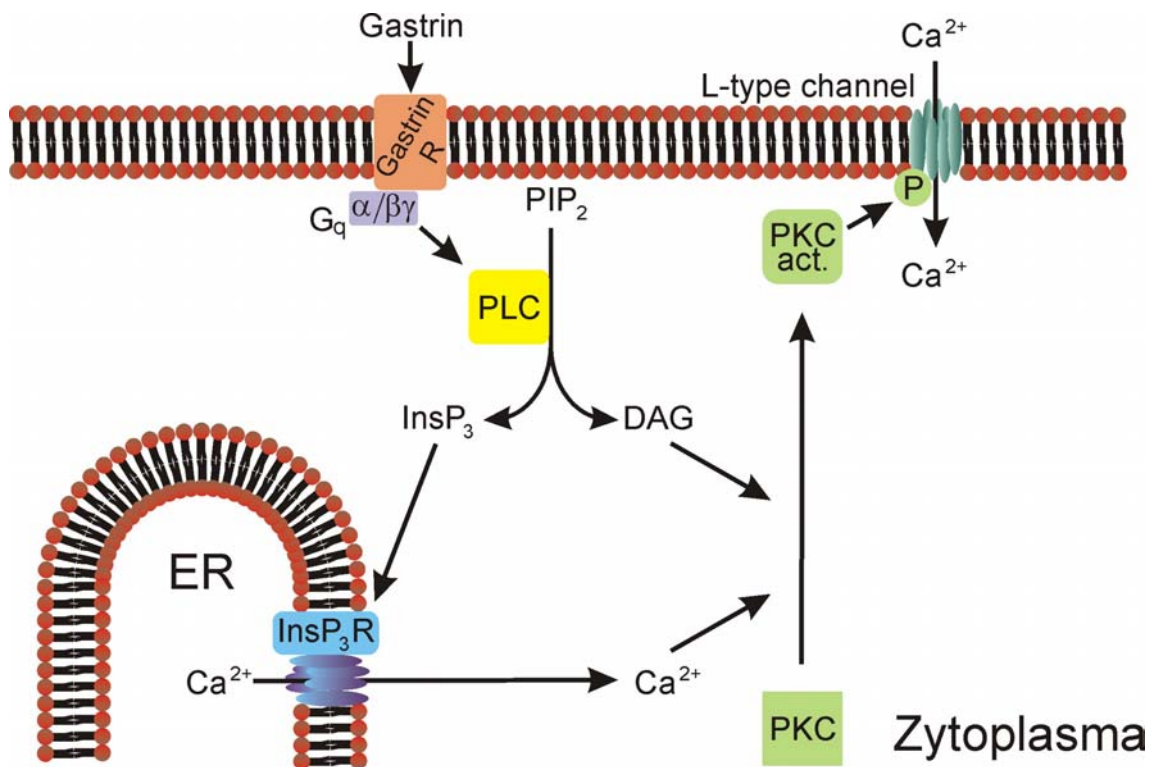
Frühere Arbeiten ergaben, dass ECL-Zellen elektrisch nicht erregbar sind (Loo et al., 1996; G739-G745). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die Funktion von spannungsgesteuerten L-Typ-Calciumkanälen in diesem Zelltyp von Bedeutung ist. Eine Erklärung hierfür wäre, dass L-Typ-Calciumkanal-Antagonisten unspezifisch auch an

dere Calciumkanäle beeinflussen. Kandidaten hierfür wären z.B. die sog. „transient receptor potential channels“ (TRPCs), die strukturell den spannungsgesteuerten Calciumkanälen sehr ähnlich sind (Birnbaumer et al., 1996, S.15195-15202). Auch ECL-Zellen exprimieren diese Kanäle (R. Zanner, unveröffentlichte Ergebnisse). Es gibt jedoch bisher keine Studie, die zeigen würde, dass die Funktion von TRPCs durch Dihydropyridine beeinflusst würde. Außerdem findet die Bindung von Dihydropyridinen an den L-Typ-Kanal in der verwendeten Konzentration an spezifische Stellen statt, und die Wirkung in diesem Konzentrationsbereich ist sehr spezifisch (s.o.). In höheren Konzentrationen ( $10^{-4}$  M) wurde jedoch schon ein unspezifischer Effekt dieser Calciumkanalblocker nachgewiesen (Yusufi et al., 2001, S.531-536).

Es wäre aber auch möglich, dass Calciumkanäle vom L-Typ in ECL-Zellen ohne Membrandepolarisierung beim Ruhepotential aktiviert werden. In einer früheren Arbeit wurden die Effekte von Nimodipin und PKC-Aktivatoren auf die Veränderungen der Acetylcholinfreisetzung im Bereich der neuromuskulären Endplatte des Frosches untersucht (Arenson und Evans, 2001, S.1157-1164). Hierbei stellte sich heraus, dass PMA Frequenz und Größe von Miniaturpotentialen und -strömen an der Endplatte erhöht. Dieser Effekt konnte durch den Zusatz von Nimodipin ( $10^{-6}$  M) gehemmt werden. Diesen Ergebnissen nach scheint die Aktivierung der PKC die Acetylcholinfreisetzung durch Öffnung von ruhenden L-Typ-Calciumkanälen beim Ruhemembranpotential und offensichtlich nicht durch Depolarisation zu bewirken. Ein solcher Mechanismus wäre auch in ECL-Zellen denkbar.

Der spezifische N-Typ-Calciumkanalblocker  $\omega$ -Conotoxin GVIA hemmte die gastrininduzierte Histaminfreisetzung nur wenig und dieser Effekt war nicht statistisch signifikant, was die Beteiligung dieser Kanäle am gastrininduzierten Calciumeinstrom unwahrscheinlich macht. Eine andere Arbeit fand jedoch eine 40%ige Hemmung der gastrininduzierten Pancreastatin-Sekretion durch  $\omega$ -Conotoxin GVIA (Lindström et al., 2001, S.663-677). Der Grund hierfür bleibt unklar.

Abb. 17 gibt einen Überblick über die mögliche Regulation der gastrininduzierten Histaminsekretion, wie sie den vorliegenden Ergebnissen nach denkbar wäre.



**Abbildung 17:** Hypothetisches Modell der intrazellulären Signal-Kaskade nach der Aktivierung des Gastrin-Rezeptors. Die Bindung von Gastrin an seinen Rezeptor aktiviert über  $G_q$  die Phospholipase C (PLC), was die Generierung von  $InsP_3$  und Diacylglycerol (DAG) auslöst. Während Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC), was zu Phosphorylierung und Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen führt.  $PIP_2$ , Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; ER, Endoplasmatisches Retikulum.

## 4.2 Expression der Endozytose-Proteine Dynamin und Amphiphysin in ECL-Zellen des Rattenmagens

Nach der Freisetzung transmitterhaltiger Speichervesikel muss es zu einer Wiederaufnahme derselben kommen, damit die Größe der Zellmembran in etwa konstant bleibt. In Neuronen erfolgt dieses Recycling synaptischer Vesikel mit Hilfe von Dynamin und Amphiphysin. Deshalb wurde in vorliegender Arbeit die Expression dieser Endozytose-Proteine in ECL-Zellen des Rattenmagens untersucht. Hierbei ergab sich, dass ECL-Zellen alle Isoformen von Dynamin und Amphiphysin exprimieren und diese Proteine *in vitro* interagieren. Diese Ergebnisse beschreiben zum ersten Mal die Expression aller Dynamin Isoformen in einer Nicht-Tumorzelle und unterstützen somit die Hypothese, dass unterschiedliche Dynamin Isoformen unterschiedliche Funktionen haben (Urrutia et al., 1997, S.377-384).

Die neuronale Isoform Dynamin-1 ist bisher am genauesten untersucht worden. Dynamin-1 ist in das clathrinabhängige (Hinshaw und Schmid, 1995, S.190-192; Takei et al., 1995, S.186-190; Takei et al., 1996, S.1237-1250; Shupliakov et al., 1997, S.259-263) und -unabhängige (Artalejo et al., 1995, S.8328-8332; Daly et al., 2000, S.6120-6125) Recycling von synaptischen Vesikeln involviert sowie in die Internalisierung und/oder Signaltransduktion einer Vielfalt von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Zhang et al., 1996, S.18302-18305; Chu et al., 1997, S.27124-27130; Daaka et al., 1998, S.685-688; Ahn et al., 1999, S.1185-1188; Vögler et al., 1999, S.12333-12338; Schramm und Limbird, 1999, S.24935-24940; Whistler und von Zastrow, 1999, S.24575-24578; Werbonat et al., 2000, S.21969-21974; Gaborik et al., 2001, S.239-247) und Wachstumshormonrezeptoren (Scaife et al., 1994, S.2574-2582). Des weiteren ist Dynamin-1 am Wachstum von Neuronen beteiligt (Torre et al., 1994, S.32411-32417).

Wie Dynamin-1 nimmt auch das ubiquitäre Dynamin-2 an rezeptorvermittelter Endozytose (Cao et al., 1998, S.2595-2609) und der Aufnahme von GPCRs (Szaszak et al., 2002, S.21650-21656) teil. Weiterhin vermittelt es die Internalisierung von Caveolae (Henley et al., 1998, S.85-99; Oh et al., 1998, S.101-114), die Freisetzung von Vesikeln am Trans-Golgi-Netzwerk (Maier et al., 1996, S.229-233; Jones et al., 1998, S.573-577; Kreitzer et al., 2000, S.125-127; Cao et al., 2000, S.1993-2002; Allan et al., 2002; E236-E242), reguliert die Polymerisierung von Actin (Ochoa et al., 2000, S.377-389; McNiven et al., 2000, S.187-198; Orth et al., 2002, S.167-172; Lee und De Camilli, 2002, S.161-166) und die Phagozytose in Macrophagen (Gold et al., 1999, S.1849-1856).

Die Stimulation von ECL-Zellen mit Gastrin und die nachfolgende Freisetzung von Histamin führt zu einer Reduktion der Anzahl sekretorischer Vesikel sowie zu einer Zunahme der Anzahl elektronendurchlässiger Mikrovesikel (Zhao et al., 1999, S.457-470). Dies ist damit zu erklären, dass eine Vergrößerung der Zelloberfläche, die durch die Verschmelzung von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran entstehen würde, durch eine kompensatorische Wiederaufnahme von Membranbestandteilen in Form von Mikrovesikeln verhindert wird, wie man es auch in anderen neuroendokrinen Zellen findet (Schmid und Damke, 1995, S.1445-1453). Immunfluoreszenzmikroskopische Versuche in vorliegender Arbeit zeigen, dass Dynamin-1 und -2 in ECL-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran zu finden sind, was eine Beteiligung dieser Isoformen am Recycling sekretorischer Vesikel nach der Freisetzung von Histamin wahrscheinlich macht. In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, die den ECL-Zellen sehr ähnlich sind, gibt es zwei verschiedene Formen des Vesikelrecyclings. Je nachdem, wie die Zellen stimuliert werden, unterscheidet man eine schnelle Form der Endozytose, die von Dynamin-1 vermittelt wird und kein Clathrin benötigt, und eine langsame Form, die von Dynamin-2 und Clathrin vermittelt wird (Artalejo et

al., 2002, S.6358-6363). Diese beiden Formen könnten auch in ECL-Zellen existieren. Weiterhin ist zu vermuten, dass Dynamin-1 in ECL-Zellen bei der Internalisierung und Signaltransduktion von  $G_q$ -gekoppelten Gastrin/CCK-B-Rezeptoren von Bedeutung ist. Die Bindung von Gastrin an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (Taniguchi et al., 1994, S.861-867; Kinoshita et al., 1998, S.93-100). Dieser Vorgang wird bei einer Reihe von GPCRs von Dynamin vermittelt (Daaka et al., 1998, S.685-688; Ahn et al., 1999, S.1185-1188; Whistler und von Zastrow, 1999, S.24575-24578).

Dynamin-2 könnte auch an der Exozytose histaminspeichernder Vesikel beteiligt sein. In chromaffinen Zellen fand man Dynamin-2 an der Membran aufgereinigter sekretorischer Granula, wo es mit freiem Syntaxin-1 interagiert und somit den Transport dieser Granula an der Plasmamembran regeln könnte (Galas et al., 2000, S.1511-1519). Außerdem spielt Dynamin-2 bei der Kontrolle der Hormonsekretion aus hypophysären Zellen der Maus eine wesentliche Rolle (Yang et al., 2001, S.4251-4260)

Die Funktion von Dynamin-3, das in Testes, Gehirn, Lunge und Herz exprimiert wird (Nakata et al., 1993, S.1-5; Cook et al., 1996, S.927-931; Cao et al., 1998, S.2595-2609), ist größtenteils unbekannt. Im Gehirn findet sich Dynamin postsynaptisch, wo es mit Homer und metabotropen Glutamat-Rezeptoren interagiert (Gray et al., 2003, S.510-515). Im Hoden ist Dynamin-3 vermutlich an der Spermatogenese beteiligt (Kamitani et al., 2002, S.261-267). In ECL-Zellen zeigte Dynamin-3 eine perinukleäre Verteilung und war im Vergleich zu Dynamin-1 und -2 viel schwächer exprimiert. Die Bedeutung von Dynamin-3 in ECL-Zellen bleibt vorerst unbekannt.

Amphiphysin-1 ist von großer Bedeutung für das Recycling synaptischer Vesikel (David et al., 1996, S.331-335) und das Wachstum von Neuronen (Mundigl et al., 1998, S.93-103). Im Hoden könnte es an der Spermatogenese mitwirken (Watanabe et al., 2001, S.739-745). Die zahlreichen Splice-Varianten von Amphiphysin-2 üben mehrere Funktionen aus. Im Gehirn bilden Amphiphysin-1 und -2 Heterodimere aus und vermitteln clathrinabhängige Endozytose (Wigge et al., 1997, S.2003-2015). Kürzere Formen von Amphiphysin-2 vermitteln die Biogenese von T-Tubuli in Muskelzellen (Lee et al., 2002, S.1193-1196), Phagozytose (Gold et al., 2000, S.285-292) und die Funktion von p73 $\beta$  (Kim et al., 2001, S.6689-6699). Außerdem findet sich eine Produktion von Autoantikörpern bei verschiedenen Krankheiten, wie z.B. dem paraneoplastischen Stiff-Man-Syndrom (Floyd und De Camilli, 1998, S.299-301; Perego et al., 2002, S.196-200; Dorrestijn et al., 2002, S.1307-1308). Die Ergebnisse vorliegender Arbeit ergaben, dass ECL-Zellen beide Amphiphysin-Isoformen exprimieren. In der Immunfluoreszenz zeigten beide Isoformen eine Verteilung im Zytoplasma und an der Zellmembran. Von den zahlreichen Splice-Varianten von Amphiphysin-2 fanden sich in ECL-Zellen auf RNA-



Ebene Amph2-1 sowie die kürzeren Formen Amph2-5, Amph2-6 und Amph2-7/BIN1. Außerdem wurde eine bisher nicht beschriebene Splice-Variante entdeckt, die in Anlehnung an die Nomenklatur von Wigge et al. Amph2-1b genannt werden soll (Wigge et al., 1997, S.2003-2015). Vergleicht man Amph2-1b mit Amph2-1, so fehlt Amph2-1b nur die Region, die für die Aminosäuren 174 - 204 kodiert. Dieser Abschnitt wird auch N-terminale Domäne (NTID) genannt und spielt bei der Dimerisierung und dem Transport zur Zellmembran eine Rolle (Ramjaun et al., 1997, S.19785-19791).

Die src-Homology-Domänen beider Amphiphysin-Isoformen interagieren mit der prolinreichen Domäne von Dynamin (David et al., 1996, S.331-335; Grabs et al., 1997, S.13419-13425; Ramjaun et al., 1997, S.16700-16706; Wigge et al., 1997, S.2003-2015). Diese Interaktion ist äußerst wichtig, damit Dynamin an die Orte in der Zelle gelangt, an denen Endozytose stattfindet (Wigge und McMahon, 1998, S.339-344). Durch Co-Immunoprecipitation an Protein-Extrakten hochangereicherter isolierter ECL-Zellen konnte diese Interaktion *in vitro* bestätigt werden.

### 4.3 Der Lebenszyklus sekretorischer Vesikel in ECL-Zellen

Nimmt man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Daten früherer Studien zusammen, ergibt sich folgendes Modell für den Lebenszyklus sekretorischer Vesikel in ECL-Zellen (Abb. 17):

Sekretorische Vesikel, die vom Golgi-Apparat kommen, wandern in die Peripherie der Zelle, wo sie mit Histamin beladen werden. Histamin wird im Zytosol durch die HDC aus Histidin synthetisiert und mit Hilfe des VMAT-2 sowie einer V-Typ ATPase in die Vesikel eingeschleust. VMATs können durch Reserpin inhibiert werden. Ein- bzw. vierstündige Präinkubation isolierter ECL-Zellen mit Reserpin ( $10^{-6}$  M) hemmt die gastrininduzierte Histaminfreisetzung um 60 - 70 % bzw. komplett (Prinz et al., 1998). Die Expression von VMAT-2 auf mRNA- und Proteinebene wird innerhalb von 3 - 7 Stunden durch Gastrin induziert. Promoteranalysen ergaben, dass diese Induktion auf dem transkriptionellen Level statt findet, hauptsächlich über Sp1 und cAMP responsive Elemente des VMAT-2 Promoters (Gerhard et al., 2001, S.3663-3672).

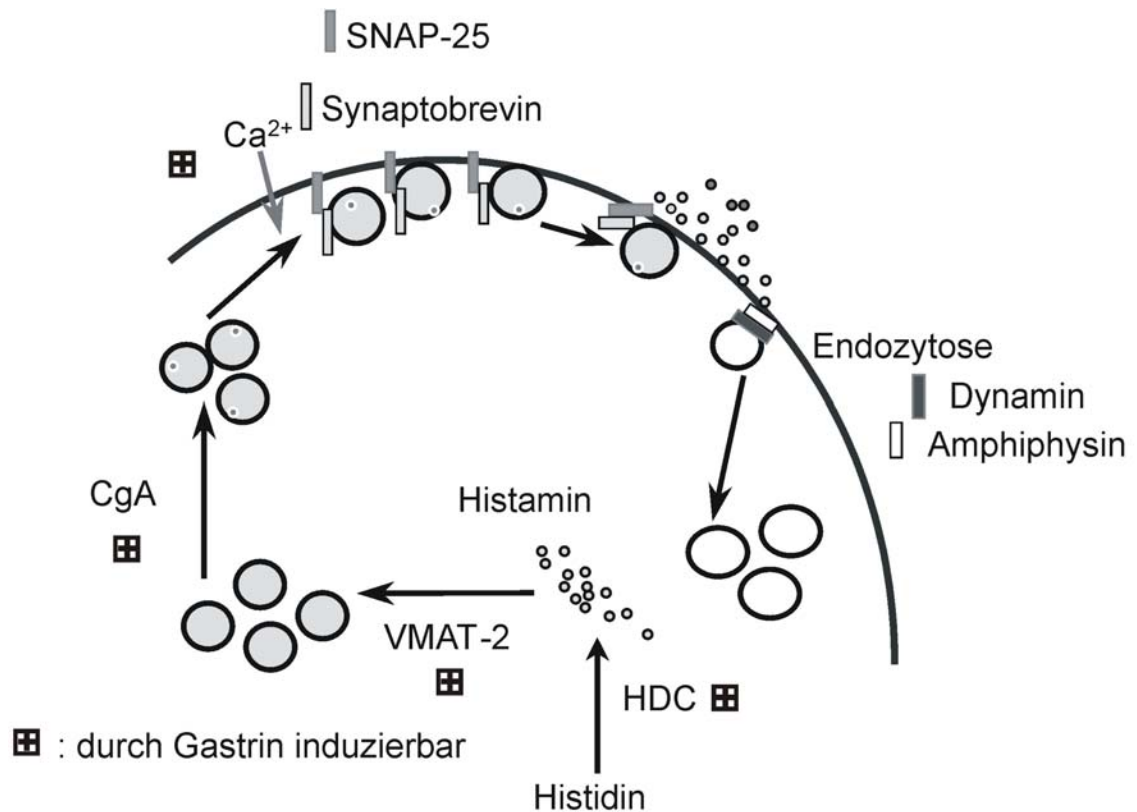


Abbildung 18: Der Lebenszyklus sekretorischer Vesikel in ECL-Zellen.

Wird die Zelle mit Gastrin stimuliert, kommt es, wie oben beschrieben, über einen  $InsP_3$ - und DAG-abhängigen Mechanismus zum Einstrom von Calcium über spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle. Dieser Calciumeinstrom, der bereits wenige Sekunden nach der Aktivierung des Gastrin/CCK-B-Rezeptors nachweisbar wird, führt zu komplexen Interaktionen von Exozytose-Proteinen, die den Transport der Vesikel zur Plasmamembran ermöglichen. Hierbei spielen Proteine auf Vesikel- (Synaptobrevin/VAMP) und Plasmamembran (SNAP-25, Syntaxin) sowie zytoplasmatische Proteine (NSF = N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - SNAP = soluble NSF attachment Protein) eine Rolle. SNAP-25, Synaptobrevin und Syntaxin werden auch als SNARE (= SNAP Rezeptor) Proteine bezeichnet, da NSF und die SNAPs während der Exozytose daran binden. Laut der SNARE-Hypothese stehen die drei SNARE-Proteine als Komplex bereit, um bei Calciumeinstrom in die Zelle mit NSF und den SNAPs einen noch größeren Komplex zu bilden (Söllner et al., 1993, S.409-418; Söllner et al., 1993, S.318-324). Da NSF ATPase-Aktivität besitzt kommt es schließlich zum Zerfall dieses Komplexes unter Verbrauch von ATP und zur Freisetzung des Vesikelinhalts. Neben den oben erwähnten Proteinen spielen auch Synaptotagmin und Synaptophysin eine noch nicht genau charakterisierte Rolle bei der Exozytose. ECL-Zellen exprimieren die SNARE-Proteine SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin sowie Synaptotagmin und Synaptophysin. Vor allem die funktionelle Bedeutung von SNAP-25 und

VAMP/Synaptobrevin ist in ECL-Zellen untersucht worden (Höhne-Zell et al., 1997, S.5518-5526). Diese Exozytose-Proteine können gezielt mit Botulinum Neurotoxin A (Schiavo et al., 1992, S.832-835; Blasi et al., 1993, S.160-163; Binz et al., 1994, S.1617-1620) bzw. der leichten Kette des Tetanus-Toxin (Schiavo et al., 1992, S.832-835; Höhne-Zell et al., 1994, S.131-134) gespalten und somit funktionsuntüchtig gemacht werden, was zu einer Verhinderung der gastrininduzierten Histaminfreisetzung führt.

Nach der Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran wird Histamin sezerniert und diffundiert zu den nahe gelegenen Parietalzellen. Nach der Entleerung ihres Inhalts, werden die sekretorischen Vesikel mittels konzertierter Aktion von Dynamin und Amphiphysin wieder in das Zellinnere aufgenommen, wo sie erneut mit sekretorischen Produkten beladen werden können. Wie genau dieser Vorgang abläuft, ob es sich dabei um eine schnelle oder langsame Form des Vesikel-Recyclings handelt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Für Dynamin und Amphiphysin sind noch keine direkten, spezifischen Inhibitoren beschrieben worden. Alle bisherigen Erkenntnisse über die Funktion dieser Endozytose-Proteine beruht auf Transfektion mit verschiedenen mutanten Formen, was in ECL-Zellen nicht durchführbar war. Versuche mit einer dominant-negativen Form von Dynamin-1 konnten auch zeigen, dass Dynamin eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der vakuolisierenden Wirkung des Zytotoxins VacA aus *Helicobacter pylori* spielt (Suzuki et al., 2001, S.363-370). Während durch Expression von dominant-negativem Dynamin-1 die Aufnahme von VacA in die Zelle unbeeinflusst blieb, war die Vakuolisierung deutlich reduziert. Obwohl nicht bekannt ist, ob ECL-Zellen bei einer Infektion des Magens mit *Helicobacter pylori* betroffen sind, ist dieser Mechanismus der Toxinwirkung in diesen neuroendokrinen Zellen sehr gut vorstellbar.

## 5 Zusammenfassung

Die Enterochromaffin-like Zellen des Magens sind neuroendokrine Schleimhautzellen, die von großer Bedeutung für die periphere Regulation der Magensäuresekretion sind. Nach Stimulation mit dem antralen Hormon Gastrin setzen sie Histamin aus sekretorischen Vesikeln frei, das auf parakrinem Weg die Parietalzellen erreicht und diese via Aktivierung von Histamin  $H_2$ -Rezeptoren zur Produktion und Sekretion von Magensäure anregt. Die Bindung von Gastrin an den Gastrin/CCK-B-Rezeptor führt zu einem biphasischen Calcium-Signal, bestehend aus einem Peak und einer nachfolgenden Plateau-Phase. Dieses Calcium-Signal ist auch in einer Vielzahl anderer elektrisch nicht erregbarer Zellen beschrieben worden. Man geht davon aus, dass der Peak durch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern via  $InsP_3$  entsteht. Die daraus resultierende Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führt zu einem kapazitiven Calcium-Einstrom über Calcium-Kanäle in der Plasmamembran. In vorliegender Arbeit wurden Entstehung und Bedeutung dieses Calcium-Signals in ECL-Zellen genauer untersucht.

Mit Hilfe des  $InsP_3$ R-Antagonisten 2-APB konnten sowohl das gastrininduzierte Calcium-Signal als auch die Histaminfreisetzung komplett unterdrückt werden. Mittels RT-PCR wurden alle drei  $InsP_3$ R Subtypen in ECL-Zellen auf RNA-Ebene nachgewiesen. Die Expression von  $InsP_3$ R3 wurde mit Hilfe der Immunzytochemie bestätigt. Die Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher mit Thapsigargin erhöhte zwar die  $[Ca^{2+}]_i$ , führte aber nicht zu einer Freisetzung von Histamin. Des Weiteren war Gastrin auch nach der Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher in der Lage ein Calcium-Signal zu induzieren. In calciumfreiem Medium bewirkte Gastrin weder die Freisetzung von Histamin noch ein biphasisches Calcium-Signal. Lediglich ein kleiner Peak ohne Plateau-Phase konnte unter diesen Bedingungen beobachtet werden. Der spezifische N-Typ Calcium-Kanal-Blocker  $\omega$ -Conotoxin GVIA hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die gastrininduzierte Sekretion von Histamin. Der selektive L-Typ Calcium-Kanal-Blocker Nimodipin hemmte die gastrininduzierte Histaminfreisetzung um ~ 70 % und SKF-96365, das sowohl spannungs- als auch rezeptorgesteuerte Calcium-Kanäle beeinflusst, fast vollständig. Beide Substanzen unterdrückten die Plateau-Phase des Calcium-Signals, während sie den Peak unbeeinflusst ließen. Nimodipin war weiter in der Lage, die durch den PKC-Aktivator PMA induzierte Histaminfreisetzung zu hemmen. Folglich sind die Aktivierung von  $InsP_3$ R sowie der PKC-aktivierte Einstrom von Calcium über L-Typ Calcium-Kanäle maßgeblich an der Entstehung des biphasischen Calcium-Signals und der Freisetzung von Histamin nach Gastrinstimulierung beteiligt.

Abb. 17 gibt einen Überblick über die mögliche Regulation der gastrininduzierten Histaminsekretion, wie sie den vorliegenden Ergebnissen nach denkbar wäre.

Nach ihrer Entleerung müssen transmitterhaltige Speichervesikel wieder aufgenommen werden, um die Zelloberfläche konstant zu halten. In Neuronen und anderen Zellen sind die Endozytoseproteine Dynamin und Amphiphysin maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt. In ECL-Zellen nimmt nach der Exozytose von Histamin die Zahl der histaminspeichernden sekretorischen Vesikeln ab und die der Mikroversikel zu, was dafür spricht, dass es auch in diesen Zellen zu einer kompensatorischen Wiederaufnahme der Vesikelmembranen kommt. In vorliegender Arbeit wurde deshalb die Präsenz von Dynamin- und Amphiphysin-Isoformen untersucht.

Mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot Analyse und Immunzytochemie konnten alle bekannten Dynamin- und Amphiphysin-Isoformen in ECL-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde mittels RT-PCR eine neue Splice-Variante von Amphiphysin-2 gefunden. Die Interaktion zwischen Dynamin und Amphiphysin wurde *in vitro* mittels Co-Immunopräzipitation an Lysaten von ECL-Zellen demonstriert. Diese Ergebnisse machen eine Beteiligung von Dynamin und Amphiphysin an der Wiederaufnahme von sekretorischen Vesikeln in ECL-Zellen sehr wahrscheinlich. Ein direkter Nachweis konnte in dieser Arbeit allerdings nicht erbracht werden, da es keine pharmakologischen Inhibitoren für Dynamin und Amphiphysin gibt und sämtliche Versuche, ECL-Zellen zu transfizieren, scheiterten.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit liefern wesentliche neue Erkenntnisse zum Verständnis des Sekretionsapparats der ECL-Zellen. Anhand dieser Beobachtungen können zukünftige Studien ermitteln, wie man durch selektive Inhibition der beteiligten Moleküle/Proteine zu einer spezifischen Hemmung der Histaminsekretion kommt. Solche Inhibitoren sind dann möglicherweise auch in verwandten Zellsystemen wie den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks oder serotoninproduzierenden enterochromaffinen Zellen verwendbar.

## Literaturverzeichnis

Abernethy, D.R., Schwartz, J.B. Calcium-antagonist drugs. *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 1447-1457

Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., Daaka, Y. Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for  $\beta$ 2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1185-1188

Allan, V.J., Thompson, H.M., McNiven, M.A. Motoring around the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) E236-E242

Andersson, K., Chen, D., Hakanson, R., Mattsson, H., Sundler, F. Enterochromaffin-like cells in the rat stomach: effect of  $\alpha$ -fluoromethylhistidine-evoked histamine depletion. A chemical, histochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 270 (1992) 7-13

Arenson, M.S., Evans, S.C. Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and apparently not by depolarisation of the terminal. *Neuroscience* 104 (2001) 1157-1164

Artalejo, C.R., Adams, M.E., Fox, A.P. Three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367 (1994) 72-76

Artalejo, C.R., Elhamedani, A., Palfrey, H.C. Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 6358-6363

Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A., Palfrey, H.C. Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves  $\text{Ca}^{2+}$ , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8328-8332

Asahara, M., Mushiake, S., Shimada, S., Fukui, H., Kinoshita, Y., Kawanami, C., Watanabe, T., Tanaka, S., Ichikawa, A., Uchiyama, Y., Narushima, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Tohyama, M., Chiba, T. Reg gene expression is increased in rat gastric enterochromaffin-like cells following water immersion stress. *Gastroenterology* 111 (1996) 45-55

- Barritt, G.J. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements. *Biochem. J.* 337 (1999) 153-169
- Bartschat, D.K., Rhodes, T.E. Protein kinase C modulates calcium channels in isolated presynaptic nerve terminals of rat hippocampus. *J. Neurochem.* 64 (1995) 2064-2072
- Bauerfeind, R., David, C., Grabs, D., McPherson, P.S., Nemoto, Y., Slepnev, V.I., Takei, K., De Camilli, P. Recycling of synaptic vesicles. *Adv. Pharmacol.* 42 (1998) 253-257
- Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (1993) 315-325
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341 (1989) 197-205
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 11-21
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T.C., Jahn, R., Niemann, H. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1617-1620
- Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E., Birnbaumer, M. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 15195-15202
- Black, J.W., Duncan, W.A., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine  $\text{H}_2$ -receptors. *Nature* 236 (1972) 385-390
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H., Jahn, R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365 (1993) 160-163
- Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., Bell, G.I. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11356-11363

- Bloom, S.R., Russell, R.C., Barros-D'sa, A.A., Baron, J.H., Besser, G.M., Hall, R., Coy, H., Kastin, A.J., Schally, A.V. Proceedings: Inhibition of gastrin and gastric acid by growth hormone release inhibiting hormone. *Gut* 16 (1975) 396
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254
- Brenna, E., Waldum, H.L. Studies of isolated parietal and enterochromaffin-like cells from the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 26 (1991) 1295-1306
- Bufler, J., Choi, G.C., Franke, C., Schepp, W., Prinz, C. Voltage-gated  $Ca^{2+}$  currents in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 43 (1998) C424-C429
- Butler, M.H., David, C., Ochoa, G.C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., De Camilli, P. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 137 (1997) 1355-1367
- Calhoun, B.C., Lapierre, L.A., Chew, C.S., Goldenring, J.R. Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275 (1998) C163-C170
- Cao, H., Garcia, F., McNiven, M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 9 (1998) 2595-2609
- Cao, H., Thompson, H.M., Krueger, E.W., McNiven, M.A. Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *J. Cell Sci.* 113 (2000) 1993-2002
- Capella, C., Vassallo, G., Solcia, E. Light and electron microscopic identification of the histamine-storing argyrophil (ECL) cell in murine stomach and of its equivalent in other mammals. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 118 (1971) 68-84
- Chan, C.B., Soll, A.H. Role of the cholinergic nervous system in acid secretion. *Pharmacology* 37 Suppl 1 (1988) 17-21
- Chen, D., Monstein, H.J., Nylander, A.G., Zhao, C.M., Sundler, F., Hakanson, R. Acute responses of rat stomach enterochromaffinlike cells to gastrin: secretory activation and adaptation. *Gastroenterology* 107 (1994) 18-27



- Chen, D., Zhao, C.M., Andersson, K., Meister, B., Panula, P., Hakanson, R. ECL cell morphology. *Yale J. Biol. Med.* 71 (1998) 217-231
- Chen, D., Zhao, C.M., Andersson, K., Sundler, F., Hakanson, R. Ultrastructure of enterochromaffin-like cells in rat stomach: effects of  $\alpha$ -fluoromethylhistidine-evoked histamine depletion and hypergastrinemia. *Cell Tissue Res.* 283 (1996) 469-478
- Chu, P., Murray, S., Lissin, D., von Zastrow, M.  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27124-27130
- Cook, T., Mesa, K., Urrutia, R. Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. *J. Neurochem.* 67 (1996) 927-931
- Cook, T.A., Urrutia, R., McNiven, M.A. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 644-648
- Curry, W.J., Johnston, C.F., Shaw, C., Buchanan, K.D. Distribution and partial characterisation of immunoreactivity to the putative C-terminus of rat pancreastatin. *Regul. Pept.* 30 (1990) 207-219
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ahn, S., Della Rocca, G.J., Ferguson, S.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 685-688
- Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J.E., Ziff, E.B., Llinas, R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 6120-6125
- Date, Y., Nakazato, M., Yamaguchi, H., Kangawa, K., Kinoshita, Y., Chiba, T., Ueta, Y., Yamashita, H., Matsukura, S. Enterochromaffin-like cells, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology* 140 (1999) 2398-2404
- David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O., De Camilli, P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 331-335
- De Giorgio, R., Su, D., Peter, D., Edwards, R.H., Brecha, N.C., Sternini, C. Vesicular monoamine transporter 2 expression in enteric neurons and enterochromaffin-like cells of the rat. *Neurosci. Lett.* 217 (1996) 77-80

- Dimaline, R., Struthers, J. Expression and regulation of a vesicular monoamine transporter in rat stomach: a putative histamine transporter. *J. Physiol. (London)* 490 (1996) 249-256
- Dorresteyn, L.D., Kappelle, A.C., Renier, W.O., Gijtenbeck, J.M. Anti-amphiphysin associated limbic encephalitis: a paraneoplastic presentation of small-cell lung carcinoma. *J. Neurol.* 249 (2002) 1307-1308
- Eccleston, J.F., Binns, D.D., Davis, C.T., Albanesi, J.P., Jameson, D.M. Oligomerization and kinetic mechanism of the dynamin GTPase. *Eur. Biophys. J.* 31 (2002) 275-282
- Floyd, S., De Camilli, P. Endocytosis proteins and cancer: a potential link? *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 299-301
- Forssmann, W.G., Orci, L., Pictet, R., Renold, A.E., Rouiller, C. The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat. An electron microscope study. *J. Cell Biol.* 40 (1969) 692-715
- Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Ogawa, K. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell Biol.* 119 (1992) 1507-1513
- Fujiwara, K., Bai, G., Tamura, C., Tsuru, D. Immunocytochemical localization of histamine in enterochromaffin-like (ECL) cells in rat oxyntic mucosa: a transmission electron microscopy study using monoclonal antibodies and conventional glutaraldehyde-based fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 47 (1999) 1031-1038
- Furness, J.B., Padbury, R.T., Baimbridge, K.G., Skinner, J.M., Lawson, D.E. Calbindin immunoreactivity is a characteristic of enterochromaffin-like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry* 92 (1989) 449-451
- Gaborik, Z., Szaszak, M., Szidonya, L., Balla, B., Paku, S., Catt, K.J., Clark, A.J., Hunyady, L.  $\beta$ -arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor. *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 239-247
- Galas, M.C., Chasserot-Golaz, S., Dirrig-Grosch, S., Bader, M.F. Presence of dynamin--syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 75 (2000) 1511-1519
- Gandia, L., Borges, R., Albillos, A., Garcia, A.G. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 430 (1995) 55-63

- Geiszt, M., Kaldi, K., Szeberenyi, J.B., Ligeti, E. Thapsigargin inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  entry into human neutrophil granulocytes. *Biochem. J.* 305 (1995) 525-528
- Gerhard, M., Neumayer, N., Presecan-Siedel, E., Zanner, R., Lengyel, E., Cramer, T., Höcker, M., Prinz, C. Gastrin induces expression and promoter activity of the vesicular monoamine transporter subtype 2. *Endocrinology* 142 (2001) 3663-3672
- Gold, E.S., Morrisette, N.S., Underhill, D.M., Guo, J., Bassetti, M., Aderem, A. Amphiphysin II $\alpha$ , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* 12 (2000) 285-292
- Gold, E.S., Underhill, D.M., Morrisette, N.S., Guo, J., McNiven, M.A., Aderem, A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1849-1856
- Grabs, D., Slepnev, V.I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L.C., De Camilli, P. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13419-13425
- Gray, N.W., Fourgeaud, L., Huang, B., Chen, J., Cao, H., Oswald, B.J., Hemar, A., McNiven, M.A. Dynamin 3 Is a Component of the Postsynapse, Where it Interacts with mGluR5 and Homer. *Curr. Biol.* 13 (2003) 510-515
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440-3450
- Hakanson, R., Böttcher, G., Ekblad, E., Panula, P., Simonsson, M., Dohlsten, M., Hallberg, T., Sundler, F. Histamine in endocrine cells in the stomach. A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry* 86 (1986) 5-17
- Hakanson, R., Chen, D., Sundler, F. The ECL Cells. In: "Physiology of the Gastrointestinal Tract", Johnson, L.R., Alpers, D.H., Christensen, J., Jacobson, E.D., Walsh, J.H. (Eds.), Raven Press, New York, 1994, 1171-1184
- Hakanson, R., Ding, X.Q., Norlen, P., Chen, D. Circulating pancreastatin is a marker for the enterochromaffin-like cells of the rat stomach. *Gastroenterology* 108 (1995) 1445-1452
- Hakanson, R., Owman, C. Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromaffin-like cells of gastric mucosa. *Life Sci.* 6 (1967) 759-766

- Hakanson, R., Owman, C., Sporrang, B., Sundler, F. Electron microscopic identification of the histamine-storing argyrophil (enterochromaffin-like) cells in the rat stomach. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 122 (1971) 460-466
- Helander, H.F. The cells of the gastric mucosa. *Int. Rev. Cytol.* 70 (1981) 217-289
- Henley, J.R., Cao, H., McNiven, M.A. Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB J.* 13 Suppl 2 (1999) S243-S247
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J., McNiven, M.A. Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *J. Cell Biol.* 141 (1998) 85-99
- Hersey, S.J., Sachs, G. Gastric acid secretion. *Physiol. Rev.* 75 (1995) 155-189
- Hinshaw, J.E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 438-519
- Hinshaw, J.E., Schmid, S.L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374 (1995) 190-192
- Hirschowitz, B.I. Neural and hormonal control of gastric secretion. In: "Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Salivary, Gastric, Pancreatic, and Hepatobiliary Secretion", *Am.Physiol.Soc (Ed.)*, Bethesda, MD, 1989, 127-157
- Höhne-Zell, B., Ecker, A., Weller, U., Gratzl, M. Synaptobrevin cleavage by the tetanus toxin light chain is linked to the inhibition of exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 355 (1994) 131-134
- Höhne-Zell, B., Galler, A., Schepp, W., Gratzl, M., Prinz, C. Functional importance of synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffin-like cells. *Endocrinology* 138 (1997) 5518-5526
- Ito, M., Matsui, T., Taniguchi, T., Tsukamoto, T., Murayama, T., Arima, N., Nakata, H., Chiba, T., Chihara, K. Functional characterization of a human brain cholecystokinin-B receptor. A trophic effect of cholecystokinin and gastrin. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 18300-18305
- James-Kracke, M.R. Measurement of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in cultured muscle cells by aequorin and quin 2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 251 (1986) C512-C523

- Jones, S.M., Howell, K.E., Henley, J.R., Cao, H., McNiven, M.A. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* 279 (1998) 573-577
- Kamitani, A., Yamada, H., Kinuta, M., Watanabe, M., Li, S.A., Matsukawa, T., McNiven, M., Kumon, H., Takei, K. Distribution of dynamins in testis and their possible relation to spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 (2002) 261-267
- Kamoshida, S., Saito, E., Fukuda, S., Kato, K., Iwasaki, A., Arakawa, Y. Anatomical location of enterochromaffin-like (ECL) cells, parietal cells, and chief cells in the stomach demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *J. Gastroenterol.* 34 (1999) 315-320
- Kao, J.P. Practical aspects of measuring  $[Ca^{2+}]$  with fluorescent indicators. *Methods Cell Biol.* 40 (1994) 155-181
- Khan, A.A., Steiner, J.P., Klein, M.G., Schneider, M.F., Snyder, S.H.  $IP_3$  receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science* 257 (1992) 815-818
- Kim, K.C., Kim, T.S., Kang, K.H., Choi, K.H. Amphiphysin IIb-1, a novel splicing variant of amphiphysin II, regulates p73 $\beta$  function through protein-protein interactions. *Oncogene* 20 (2001) 6689-6699
- Kinoshita, Y., Nakata, H., Kishi, K., Kawanami, C., Sawada, M., Chiba, T. Comparison of the signal transduction pathways activated by gastrin in enterochromaffin-like and parietal cells. *Gastroenterology* 115 (1998) 93-100
- Kopin, A.S., Beinborn, M., Lee, Y.M., McBride, E.W., Quinn, S.M. The CCK-B/gastrin receptor. Identification of amino acids that determine nonpeptide antagonist affinity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 713 (1994) 67-78
- Kopin, A.S., Lee, Y.M., McBride, E.W., Miller, L.J., Lu, M., Lin, H.Y., Kolakowski Jr, L.F., Beinborn, M. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 3605-3609
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., Rodriguez, B.E. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 125-127
- Kubota, H., Taguchi, Y., Tohyama, M., Matsuura, N., Shiosaka, S., Ishihara, T., Watanabe, T., Shiotani, Y., Wada, H. Electron microscopic identification of histidine decar-

- boxylase-containing endocrine cells of the rat gastric mucosa. An immunohistochemical analysis. *Gastroenterology* 87 (1984) 496-502
- Kuno, M., Gardner, P. Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 326 (1987) 301-304
- Larsson, B., Norlen, P., Lindström, E., Zhao, D., Hakanson, R., Linde, A. Effects of ECL cell extracts and granule/vesicle-enriched fractions from rat oxyntic mucosa on cAMP and IP<sub>3</sub> in rat osteoblast-like cells. *Regul. Pept.* 106 (2002) 13-18
- Larsson, L.I., Goltermann, N., de Magistris, L., Rehfeld, J.F., Schwartz, T.W. Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion. *Science* 205 (1979) 1393-1395
- Lee, E., De Camilli, P. From the Cover: Dynamin at actin tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 161-166
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C., Farsad, K., Wenk, M.R., De Camilli, P. Amphiphysin 2 (bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297 (2002) 1193-1196
- Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A., Camonis, J.H. A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15101-15105
- Lichte, B., Veh, R.W., Meyer, H.E., Kilimann, M.W. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J.* 11 (1992) 2521-2530
- Lichtenberger, L.M., Delansorne, R., Graziani, L.A. Importance of amino acid uptake and decarboxylation in gastrin release from isolated G cells. *Nature* 295 (1982) 698-700
- Ligon, B., Boyd, A.E., Dunlap, K. Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13905-13911
- Lindström, E., Bjorkqvist, M., Boketoft, A., Chen, D., Zhao, C.M., Kimura, K., Hakanson, R. Neurohormonal regulation of histamine and pancreastatin secretion from isolated rat stomach ECL cells. *Regul. Pept.* 71 (1997) 73-86
- Lindström, E., Eliasson, L., Bjorkqvist, M., Hakanson, R. Gastrin and the neuropeptide PACAP evoke secretion from rat stomach histamine-containing (ECL) cells by stimulating influx of Ca<sup>2+</sup> through different Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Physiol. (London)* 535 (2001) 663-677

- Lindström, E., Hakanson, R. Neurohormonal regulation of secretion from isolated rat stomach ECL cells: a critical reappraisal. *Regul. Pept.* 97 (2001) 169-180
- Lloyd, K.C., Wang, J., Aurang, K., Gronhed, P., Coy, D.H., Walsh, J.H. Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits acid secretion in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 268 (1995) G102-G106
- Lomax, R.B., Gallego, S., Novalbos, J., Garcia, A.G., Warhurst, G. L-Type calcium channels in enterochromaffin cells from guinea pig and human duodenal crypts: an in situ study. *Gastroenterology* 117 (1999) 1363-1369
- Loo, D.D., Sachs, G., Prinz, C. Potassium and chloride currents in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 270 (1996) G739-G745
- Maier, O., Knoblich, M., Westermann, P. Dynamin II binds to the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223 (1996) 229-233
- Marsh, M., McMahon, H.T. The structural era of endocytosis. *Science* 285 (1999) 215-220
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., Mikoshiba, K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J. Biochem (Tokyo)* 122 (1997) 498-505
- Mayrleitner, M., Schafer, R., Fleischer, S. IP<sub>3</sub> receptor purified from liver plasma membrane is an (1,4,5)IP<sub>3</sub> activated and (1,3,4,5)IP<sub>4</sub> inhibited calcium permeable ion channel. *Cell Calcium* 17 (1995) 141-153
- McEwen, C.R., Stallard, R.W., Juhos, E.T. Separation of biological particles by centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 23 (1968) 369-377
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R., Yoon, Y. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 115-120
- McNiven, M.A., Kim, L., Krueger, E.W., Orth, J.D., Cao, H., Wong, T.W. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J. Cell Biol.* 151 (2000) 187-198
- McPherson, P.S. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell Signal.* 11 (1999) 229-238

- Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S.G., Kaiserman, I., Ahdut, R., Demirgoren, S., Rahamimoff, R. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1019-1088
- Meldolesi, J., Clementi, E., Fasolato, C., Zacchetti, D., Pozzan, T.  $\text{Ca}^{2+}$  influx following receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 289-292
- Mignery, G.A., Newton, C.L., Archer, B.T., Südhof, T.C. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 12679-12685
- Modlin, I.M., Tang, L.H. The gastric enterochromaffin-like cell: an enigmatic cellular link. *Gastroenterology* 111 (1996) 783-810
- Morris, A.J., Malbon, C.C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1373-1430
- Mundigl, O., Ochoa, G.C., David, C., Slepnev, V.I., Kabanov, A., De Camilli, P. Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18 (1998) 93-103
- Nagata, A., Ito, M., Iwata, N., Kuno, J., Takano, H., Minowa, O., Chihara, K., Matsui, T., Noda, T. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 11825-11830
- Nakata, H., Matsui, T., Ito, M., Taniguchi, T., Naribayashi, Y., Arima, N., Nakamura, A., Kinoshita, Y., Chihara, K., Hosoda, S., Chiba, T. Cloning and characterization of gastrin receptor from ECL carcinoid tumor of *Mastomys natalensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 (1992) 1151-1157
- Nakata, T., Takemura, R., Hirokawa, N. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J. Cell Sci.* 105 (1993) 1-5
- Newton, C.L., Mignery, G.A., Südhof, T.C. Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ) receptors with distinct affinities for  $\text{InsP}_3$ . *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28613-28619
- Nissinen, M.J., Panula, P. Histamine-storing cells in the oxyntic mucosa of the rat stomach: a transmission electron microscopic study employing fixation with carbodiimide. *J. Histochem. Cytochem.* 41 (1993) 1405-1412



- Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S., Vallee, R.B. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* 347 (1990) 256-261
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., De Camilli, P. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol.* 150 (2000) 377-389
- Oh, P., McIntosh, D.P., Schnitzer, J.E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141 (1998) 101-114
- Okamoto, C.T., Duman, J.G., Tyagarajan, K., McDonald, K.L., Jeng, Y.Y., McKinney, J., Forte, T.M., Forte, J.G. Clathrin in gastric acid secretory (parietal) cells: biochemical characterization and subcellular localization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C833-C851
- Orth, J.D., Krueger, E.W., Cao, H., McNiven, M.A. From the Cover: The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 167-172
- Panula, P., Kaartinen, M., Macklin, M., Costa, E. Histamine-containing peripheral neuronal and endocrine systems. *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 933-941
- Parekh, A.B., Penner, R. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77 (1997) 901-930
- Perego, L., Previtali, S.C., Nemni, R., Longhi, R., Carandente, O., Saibene, A., Sciolla, R., Villa, A., Gai, P., Panzeri, C., Dell'Antonio, G., Quattrini, A., Folli, F. Autoantibodies to Amphiphysin I and Amphiphysin II in a Patient with Sensory-Motor Neuropathy. *Eur. Neurol.* 47 (2002) 196-200
- Persson, P., Hakanson, R., Axelson, J., Sundler, F. Gastrin releases a blood calcium-lowering peptide from the acid-producing part of the rat stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2834-2838
- Pisegna, J.R., de Weerth, A., Huppi, K., Wank, S.A. Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor: structure, functional expression and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189 (1992) 296-303
- Prinz, C., Galler, A., Höhne-Zell, B., Gratzl, M. Receptor-activation, signal-transduction and exocytosis in gastric enterochromaffin-like cells. In: "The Adrenal

- Chromaffin Cell - Archetype and Exemplar of Cellular Signalling in Secretory Control", Kanno, T., Nakazato, Y., Kumakura, K. (Eds.), Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, 1997, 221-229
- Prinz, C., Kajimura, M., Scott, D.R., Mercier, F., Helander, H.F., Sachs, G. Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology* 105 (1993) 449-461
- Prinz, C., Neumayer, N., Mahr, S., Classen, M., Schepp, W. Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 $\beta$ . *Gastroenterology* 112 (1997) 364-375
- Prinz, C., Sachs, G., Walsh, J.H., Coy, D.H., Wu, S.V. The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology* 107 (1994) 1067-1074
- Prinz, C., Scott, D.R., Hurwitz, D., Helander, H.F., Sachs, G. Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin-like cells in primary culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 267 (1994) G663-G675
- Prinz, C., Zanner, R., Höhne-Zell, B., Galler, A., Classen, M. and Gratzl, M.: Different Histamine Pools in Rat Gastric Enterochromaffin-like Cells. *Gastroenterology* 114 (1998) (Abstract)
- Putney Jr., J.W. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7 (1986) 1-12
- Putney Jr., J.W. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell* 99 (1999) 5-8
- Qian, J.M., Rowley, W.H., Jensen, R.T. Gastrin and CCK activate phospholipase C and stimulate pepsinogen release by interacting with two distinct receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 264 (1993) G718-G727
- Racke, K., Schwörer, H. Characterization of the role of calcium and sodium channels in the stimulus secretion coupling of 5-hydroxytryptamine release from porcine enterochromaffin cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 347 (1993) 1-8
- Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I., McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16700-16706
- Ramjaun, A.R., Philie, J., de Heuvel, E., McPherson, P.S. The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J. Biol. Chem.* 274 (1997) 19785-19791

- Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O., Solcia, E. Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry* 85 (1986) 19-28
- Rubin, W., Schwartz, B. Electron microscopic radioautographic identification of the ECL cell as the histamine-synthesizing endocrine cell in the rat stomach. *Gastroenterology* 77 (1979) 458-467
- Sachs, G., Prinz, C. Gastric enterochromaffin-like cells and the regulation of acid secretion. *News Physiol. Sci.* 11 (1996) 57-62
- Sachs, G., Prinz, C., Loo, D., Bamberg, K., Besancon, M., Shin, J.M. Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J. Biol. Med.* 67 (1994) 81-95
- Sachs, G., Zeng, N., Prinz, C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997) 243-256
- Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R., Prendergast, G.C. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* 14 (1996) 69-77
- Sandor, A., Kidd, M., Lawton, G.P., Miu, K., Tang, L.H., Modlin, I.M. Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion. *Gastroenterology* 110 (1996) 1084-1092
- Savignac, M., Badou, A., Moreau, M., Leclerc, C., Guery, J.C., Paulet, P., Druet, P., Ragab-Thomas, J., Pelletier, L. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *FASEB J.* 15 (2001) 1577-1579
- Scaife, R., Gout, I., Waterfield, M.D., Margolis, R.L. Growth factor-induced binding of dynamin to signal transduction proteins involves sorting to distinct and separate proline-rich dynamin sequences. *EMBO J.* 13 (1994) 2574-2582
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino, d.L., DasGupta, B.R., Montecucco, C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359 (1992) 832-835
- Schiller, L.R., Walsh, J.H., Feldman, M. Distention-induced gastrin release: effects of luminal acidification and intravenous atropine. *Gastroenterology* 78 (1980) 912-917

- Schmid, S.L., Damke, H. Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J.* 9 (1995) 1445-1453
- Schmid, S.L., McNiven, M.A., De Camilli, P. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 504-512
- Schramm, N.L., Limbird, L.E. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by G protein-coupled  $\alpha_2$ -adrenergic receptors does not require agonist-elicited endocytosis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24935-24940
- Sena, C.M., Santos, R.M., Boarder, M.R., Rosario, L.M. Regulation of  $Ca^{2+}$  influx by a protein kinase C activator in chromaffin cells: differential role of P/Q- and L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Eur. J. Pharmacol.* 366 (1999) 281-292
- Sever, S. Dynamin and endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 463
- Sever, S., Damke, H., Schmid, S.L. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1 (2000) 385-392
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., Brodin, L. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276 (1997) 259-263
- Simonsson, M., Eriksson, S., Hakanson, R., Lind, T., Lonroth, H., Lundell, L., O'Connor, D.T., Sundler, F. Endocrine cells in the human oxyntic mucosa. A histochemical study. *Scand. J. Gastroenterol.* 23 (1988) 1089-1099
- Slepnev, V.I., De Camilli, P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (2000) 161-172
- Solcia, E., Rindi, G., Buffa, R., Fiocca, R., Capella, C. Gastric endocrine cells: types, function and growth. *Regul. Pept.* 93 (2000) 31-35
- Soll, A.H., Lewin, K.J., Beaven, M.A. Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: biochemical and morphologic differences from mast cells. *Gastroenterology* 80 (1981) 717-727
- Sontag, J.M., Fykse, E.M., Ushkaryov, Y., Liu, J.P., Robinson, P.J., Südhof, T.C. Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4547-4554

- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., Rothman, J.E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75 (1993) 409-418
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362 (1993) 318-324
- Sparks, A.B., Hoffman, N.G., McConnell, S.J., Fowlkes, D.M., Kay, B.K. Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 741-744
- Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M.J., Glossmann, H. Structural basis of drug binding to L Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (1998) 108-115
- Summers, B.A., Overholt, J.L., Prabhakar, N.R. Augmentation of L-type calcium current by hypoxia in rabbit carotid body glomus cells: evidence for a PKC-sensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 84 (2000) 1636-1644
- Sundler, F., Hakanson, R. Gastric endocrine cell typing at the light microscopic level. In: "The Stomach as an Endocrine Organ", Hakanson, R., Sundler, F. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1991, 9-26
- Suzuki, J., Ohnsihi, H., Shibata, H., Wada, A., Hirayama, T., Iiri, T., Ueda, N., Kanamaru, C., Tsuchida, T., Mashima, H., Yasuda, H., Fujita, T. Dynamin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 363-370
- Südhof, T.C., Newton, C.L., Archer, B.T., Ushkaryov, Y.A., Mignery, G.A. Structure of a novel InsP<sub>3</sub> receptor. *EMBO J.* 10 (1991) 3199-3206
- Szaszak, M., Gaborik, Z., Turu, G., McPherson, P.S., Clark, A.J., Catt, K.J., Hunyady, L. Role of the Proline-rich Domain of Dynamin-2 and Its Interactions with Src Homology 3 Domains during Endocytosis of the AT1 Angiotensin Receptor. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21650-21656
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L., De Camilli, P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP $\gamma$ S in nerve terminals. *Nature* 374 (1995) 186-190

- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L., De Camilli, P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.* 133 (1996) 1237-1250
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., De Camilli, P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 33-39
- Taniguchi, T., Matsui, T., Ito, M., Murayama, T., Tsukamoto, T., Katakami, Y., Chiba, T., Chihara, K. Cholecystokinin-B/gastrin receptor signaling pathway involves tyrosine phosphorylations of p125FAK and p42MAP. *Oncogene* 9 (1994) 861-867
- Terada, Y., Tsutsui, K., Sano, K., Hosoya, O., Ohtsuki, H., Tokunaga, A., Tsutsui, K. Novel splice variants of amphiphysin I are expressed in retina(1). *FEBS Lett.* 519 (2002) 185-190
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., Dawson, A.P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2466-2470
- Thompson, H.M., McNiven, M.A. Dynamin: switch or pinchase? *Curr. Biol.* 11 (2001) R850
- Todisco, A., Takeuchi, Y., Urumov, A., Yamada, J., Stepan, V.M., Yamada, T. Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273 (1997) G891-G898
- Torre, E., McNiven, M.A., Urrutia, R. Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32411-32417
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T., Horne, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 349-354
- Tsutsui, K., Maeda, Y., Seki, S., Tokunaga, A. cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (1997) 178-183
- Urrutia, R., Henley, J.R., Cook, T., McNiven, M.A. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 377-384

- Vaca, L., Kunze, D.L. IP<sub>3</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> channels in the plasma membrane of cultured vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 269 (1995) C733-C738
- van der Blik, A.M. Is dynamin a regular motor or a master regulator? *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 253-254
- van Zwieten, P.A. The pharmacological properties of lipophilic calcium antagonists. *Blood Press. Suppl.* 2:5-9. (1998) 5-9
- Vögler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K.H., van Koppen, C.J. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12333-12338
- Wank, S.A. Cholecystokinin receptors [editorial]. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 269 (1995) G628-G646
- Wank, S.A. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 274 (1998) G607-G613
- Watanabe, M., Tsutsui, K., Hosoya, O., Tsutsui, K., Kumon, H., Tokunaga, A. Expression of amphiphysin I in Sertoli cells and its implication in spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 739-745
- Werbonat, Y., Kleutges, N., Jakobs, K.H., van Koppen, C.J. Essential role of dynamin in internalization of M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine and angiotensin AT<sub>1A</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 21969-21974
- Whistler, J.L., von Zastrow, M. Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24575-24578
- Wigge, P., Köhler, K., Vallis, Y., Doyle, C.A., Owen, D., Hunt, S.P., McMahon, H.T. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 8 (1997) 2003-2015
- Wigge, P., McMahon, H.T. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* 21 (1998) 339-344
- Yang, W., Cerione, R.A. Endocytosis: Is dynamin a 'blue collar' or 'white collar' worker? *Curr. Biol.* 9 (1999) R511-R514

- Yang, Z., Li, H., Chai, Z., Fullerton, M.J., Cao, Y., Toh, B.H., Funder, J.W., Liu, J.P. Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4251-4260
- Yusufi, A.N., Cheng, J., Thompson, M.A., Chini, E.N., Grande, J.P. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) elicits specific microsomal  $\text{Ca}^{2+}$  release from mammalian cells. *Biochem. J.* 353 (2001) 531-536
- Zeng, N., Athmann, C., Kang, T., Lyu, R.M., Walsh, J.H., Ohning, G.V., Sachs, G., Pisegna, J.R. PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 1383-1391
- Zeng, N., Athmann, C., Kang, T., Walsh, J.H., Sachs, G. Role of neuropeptide-sensitive L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in histamine release in gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277 (1999) G1268-G1280
- Zeng, N., Kang, T., Wen, Y., Wong, H., Walsh, J., Sachs, G. Galanin inhibition of enterochromaffin-like cell function. *Gastroenterology* 115 (1998) 330-339
- Zeng, N., Walsh, J.H., Kang, T., Helander, K.G., Helander, H.F., Sachs, G. Selective ligand-induced intracellular calcium changes in a population of rat isolated gastric endocrine cells. *Gastroenterology* 110 (1996) 1835-1846
- Zeng, N., Walsh, J.H., Kang, T., Wu, S.V., Sachs, G. Peptide YY inhibition of rat gastric enterochromaffin-like cell function. *Gastroenterology* 112 (1997) 127-135
- Zhang, J., Ferguson, S.S.G., Barak, L.S., Menard, L., Caron, M.G. Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18302-18305
- Zhao, C.M., Chen, D., Lintunen, M., Panula, P., Hakanson, R. Secretory organelles in ECL cells of the rat stomach: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 298 (1999) 457-470



# Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Christian Prinz für die durchwegs exzellente Betreuung, die kontinuierliche Unterstützung und den nötigen Freiraum bei der Durchführung meiner Ideen im Rahmen dieser Arbeit;

Herrn Prof. Dr. Manfred Gratzl für die Ermöglichung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs und die stets sehr fruchtbare Zusammenarbeit;

Frau Dr. Martina Haasemann für die hervorragende Koordination und Betreuung des Graduiertenkollegs, nicht nur in fachlicher Hinsicht;

Herrn Dr. Robert Paul für die Ermutigung, diese Arbeit durchzuführen und zahlreiche erkenntnisbringende Diskussionen;

den Mitgliedern des Labors, v.a. Frau Dr. Sabine Mahr für die Einarbeitung in die Isolation und Primärzellkultur der ECL-Zellen und Frau Dr. Petra Voland für die Geduld und Hilfe bei der Beseitigung von Problemen im Labor-Alltag; Frau Dr. Sonja Bülau, Frau Dr. Elena Presecan-Siedel, Herrn Dr. Markus Gerhard, Herrn Dr. Bruno Neu, den MTAs Nina Neumaier, Hedda Hermuth, Christine Herda, Kerstin Dehne sowie meinen Mit-Doktoranden Martin Schöniger, Roland Rad, Christian Huber, Agnes Pohlinger, Pamela Randlkofer, Franziska Ernst und Andreas Puschmann. Sie alle haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen;

den Mitgliedern des Graduiertenkollegs, v.a. Britta Sommersberg für die Hilfe bei der Immunopräzipitation und Lothar Graff für den reichlichen und anregenden Gedankenaustausch;

Herrn Dr. Dieter Saur für viele Tipps auf dem Gebiet der Molekularbiologie;

Frau Gabriele Terfloth für die Unterstützung bei zahlreichen elektronenmikroskopischen Versuchen;

Frau Marlies Rauchfuß und Frau Irmgard Wiest für die Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung von Gewebeschnitten.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihren unermüdlichen und hingebungsvollen Beistand in allen Bereichen des täglichen Lebens. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.