

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Regulation des Kaliumtransportes
durch das Zellvolumen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Renato Piemonte Ribeiro

Gießen 2001

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

Regulation des Kaliumtransportes durch das Zellvolumen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Renato Piemonte Ribeiro

Tierarzt aus
Assis - S.P. (Brasilien)

Gießen 2001

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener**
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Clauß**

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2001

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG.....	4
I.1	DER KALIUMHAUSHALT.....	4
I.2	DAS KOLON.....	6
I.2.1	Anatomie und Histologie.....	6
I.2.2	Allgemeine Funktionen des Kolons.....	10
I.2.3	Ionentransport im proximalen und distalen Kolon der Ratte..	11
I.3	ZELLVOLUMEN UND IONENTRANSPORT	15
I.4	FRAGESTELLUNGEN	17
II	MATERIAL UND METHODEN.....	18
II.1	VERSUCHSTIERE	18
II.2	GEWEBEPRÄPARATION.....	18
II.3	ELEKTROLYTLÖSUNGEN.....	19
II.4	USSING-KAMMER	20
II.5	ELEKTRISCHE MESSUNGEN	21
II.6	RADIOISOTOPEN-VERSUCHE	25
II.7	MESSUNGEN UNIDIREKTIONALER KALIUM-FLÜSSE.....	26
II.8	KALIUM-UPTAKE-VERSUCHE.....	28
II.9	KALIUM-EFFLUX-VERSUCHE	29
II.10	CHEMIKALIEN	30
II.11	STATISTIK.....	31
III	RESULTATE	32
III.1	UNIDIREKTIONALE $^{86}\text{Rb}^+$ FLÜSSE UNTER NICHT ISOOSMOLAREN BEDINGUNGEN.....	32
III.2	$^{86}\text{Rb}^+$ UPTAKE-VERSUCHE	34
III.3	APIKALER UND BASOLATERALER $^{86}\text{Rb}^+$ -EFFLUX.....	37

Inhaltsverzeichnis

III.3.1	Wirkung von Kalium-Kanalblockern auf den schwellungsinduzierten K^+ -Efflux.....	40
III.3.2	Intrazelluläre Vermittlung des schwellungsinduzierten K^+ - Effluxes	43
IV	DISKUSSION.....	52
IV.1	GRUNDLEGENDE EIGENSCHAFTEN DER ZELLVOLUMENREGULATION	52
IV.2	DER KALIUMTRANSPORT AM KOLON WIRD BEI DER VOLUMENREGULATION VERÄNDERT.....	56
IV.3	INTRAZELLULÄRE VERMITTLUNG DER ZELLVOLUMENREGULATION AM KOLONEPITHEL DER RATTE	59
IV.4	SCHLUSSFOLGERUNG	62
V	ZUSAMMENFASSUNG	66
VI	SUMMARY	68
VII	LITERATURVERZEICHNIS	70
VIII	DANKSAGUNG	83

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CPM	<i>Counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol bis-(β -aminoethylether) N, N, N',N'-tetraessigsäure
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Gt	Gewebeleitfähigkeit
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethanolsulfonsäure)
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Isc	Kurzschlussstrom
J _{Na/Cl/Rb}	Ionenfluss von Na ⁺ , Cl ⁻ bzw. Rb ⁺
J _{ms}	unidirektionaler Ionenfluss von mucosal nach serosal
J _{net}	Netto-Ionenfluss
J _{sm}	unidirektionaler Ionenfluss von serosal nach mucosal
μ Eq	Mikro-Equivalent ($1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NHE-2	Natrium-Protonen-Austauscher, Subtyp 2
NHE-3	Natrium-Protonen-Austauscher, Subtyp 3

Einleitung

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pd	Potentialdifferenz
r	Korrelationskoeffizient
RVD	<i>Regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>Regulatory volume increase</i>
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
TEA	Tetraethylammonium
TMB-8	3,4,5-Trimethoxybenzoesäure-8-(diethylamino)octylester

I Einleitung

I.1 Der Kaliumhaushalt

Kalium ist eines der wichtigsten Ionen im Elektrolythaushalt von Haus- und Nutztieren. Die Kaliumhomöostase beeinflusst die Funktionen praktisch jeder Zelle, wobei insbesondere das Nervensystem, das Herz, die Skelettmuskulatur und die glatte Muskulatur empfindlich auf Störungen im Kaliumhaushalt reagieren (Fenner et al., 1991; Hartmann, 1994).

Kaliumionen werden aktiv durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe in Zellen transportiert. Dafür wenden die Zellen einen großen Anteil ihres basalen Metabolismus auf. Der Kaliumtransport über die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe ist einer der größten Energieverbraucher des Organismus; je nach Zelle benötigt sie 30 – 70 % des gesamten Zellenergieumsatzes (Ganong, 1995). Ungefähr 98 % des Kaliums im gesamten Organismus befinden sich im Intrazellulärraum, wo es das quantitativ wichtigste Kation darstellt. Das Verhältnis zwischen der intra- und der extrazellulären K^+ -Konzentration bestimmt an vielen Zellen entscheidend die Höhe des Membranpotentials (Schröder & Diener, 2000). Eine Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit führt zu einer Hyperpolarisation der Membran, stimuliert den passiven Chloridausstrom, fördert indirekt die Tätigkeit der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe durch ein K^+ -Recycling und hilft bei der Verminderung eines erhöhten Zellvolumens (Greger, 1996b).

Änderungen in der K^+ -Homöostase sind z.B. bei Störungen im Säure-Basen-Haushalt zu beobachten. Die Kalium-Abhängigkeit des Membranpotentials beeinflusst die intrazelluläre Konzentration von HCO_3^- und damit auch den intrazellulären pH-Wert von vielen

verschiedenen Zelltypen. Eine Verminderung z.B. der extrazellulären K^+ -Konzentration führt zur Hyperpolarisation, die einen Efflux von HCO_3^- aus der Zelle antreibt und damit eine intrazelluläre Azidose auslösen kann. Das Umgekehrte passiert bei einer Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration: die Zelle depolarisiert mit der Folge einer intrazellulären Alkalose (Greger, 1996b; Lang, 1996). Auf der anderen Seite ist eine extrazelluläre Azidose häufig mit einer Hyperkaliämie (Plasma- K^+ -Konzentration $> 6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) verbunden, während bei einer extrazellulären Alkalose häufig eine Hypokaliämie (Plasma- K^+ -Konzentration $< 3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) zu beobachten ist (Hartmann, 1994). Bei extrazellulärer Azidose ist die Elimination von H^+ -Ionen aus der Zelle über den Na^+ - H^+ -Austauschmechanismus behindert. Der verminderte Na^+ -Einstrom über den Austauscher führt durch Verminderung des Substratangebotes zu einer Reduktion der Aktivität der Na^+ - K^+ -Pumpe und dadurch zu einem intrazellulären Kaliumverlust (Hartmann, 1994; Turnheim, 1992). Bei ausgeprägter Hypokaliämie wird das Membranpotential durch die Verschiebung des K^+ -Gleichgewichtspotentials zunehmend negativ, sodass die Erregbarkeit von z.B. neuromuskulären Geweben abnimmt. Im Extremfall kommt keine Erregung mehr zustande (schlaffe Lähmung).

Der Pathomechanismus einer Hypokaliämie besteht normalerweise in einer Erhöhung des K^+ -Verlustes über die Nieren oder in einer Verschiebung von Kalium in den Intrazellulärraum durch z.B. Insulin oder erhöhte β -adrenerge Aktivität (Turnheim, 1992). Bei einer Hyperkaliämie hingegen besteht häufig eine Verringerung der renalen K^+ -Ausscheidung oder eine Verschiebung von K^+ vom Intra- in den Extrazellulärraum.

Für die Kaliumhomöostase sind die Nieren besonders wichtig. Ungefähr 90 % der K^+ -Ausscheidung erfolgt renal, der Rest wird über die Fäzes abgegeben. Kalium scheint im Dünndarm praktisch nur parazellulär transportiert zu werden, spezifische transzelluläre K^+ -Transportmechanismen sind nur für den Dickdarm nachgewiesen (Haschke & Diener, 1999a). Im Gastrointestinaltrakt spielt das Kolon eine entscheidende Rolle für den K^+ -Transport, da es die Fähigkeit hat, je nach Lage des Kaliumhaushaltes dieses Kation zu sezernieren oder zu resorbieren. In besonderen Fällen kann das Kolon sogar teilweise Veränderungen im renalen K^+ -Transport kompensieren, z.B. bei chronischer Niereninsuffizienz (Fenner et al., 1991; Binder & Sandle, 1994). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem K^+ -Transport im Kolon und dessen Regulation.

I.2 Das Kolon

I.2.1 Anatomie und Histologie

Der Dickdarm unterteilt sich in das *Caecum*, das *Colon* mit seinen drei Abschnitten und das *Rectum*. Das *Caecum* oder Blinddarm ist der blind endende Abschnitt des Dickdarms. Die Grenze zwischen Kolon und Blinddarm ist (außer beim Pferd) durch die Einmündung des *Ostium ileale* gegeben. Der Wurmformsatz (*Appendix vermiformis*) des Blinddarms des Menschen fehlt bei den meisten Haussäugetieren; nur bei Hasen, Kaninchen und Ratten findet man einen *Processus vermiformis* (Greene, 1959). Das Kolon (Grimmdarm) ist bei den Haussäugetieren in *Colon ascendens*, *Colon transversum* und *Colon descendens* unterteilt. Das *Rectum* (Mastdarm) schließt sich an das *Colon descendens* an und stellt ein

geradlinig afterwärts verlaufendes Darmrohrstück dar. Die *Ampulla recti* ist bei den meisten Haussäugetieren der Übergang des Mastdarms in den kurzen Afterkanal, *Canalis analis* (Vollmerhaus & Roos, 1999).

Das Kolon der Ratte, an dem die vorliegenden Versuche durchgeführt wurden, ist, wie bei Haussäugetieren, makroskopisch in 3 Abschnitte gegliedert. Das *Colon ascendens* oder proximale Kolon ist durch eine charakteristische schräge Schleimhautfaltung gekennzeichnet, die Palmblätter-Streifen (Lindström et al., 1979). Das *Colon transversum* wird von der großen Kolonflexur gebildet. Die große Flexur und das *Colon descendens* (distales Kolon) besitzen eine längs gefaltete Mucosa. Der Kolon-Mastdarm-Übergang wird durch einen großen Lymphknoten in der Darmwand markiert, der ungefähr 3 - 3,5 cm vor dem Anus liegt. Außerdem sind lymphoide Plaques gleichmäßig im Kolon verteilt (Lindström et al., 1979; Olds & Olds, 1984).

Die Darmwand setzt sich von außen nach innen aus folgenden Schichten zusammen: *Tunica serosa*, *Tunica muscularis*, *Tela submucosa* und *Tunica mucosa* (Liebich, 1999). Die *Tunica muscularis* hat eine externe longitudinale und eine interne zirkuläre Lage glatter Muskulatur, zwischen beiden sind die Ganglienzellen des Plexus myentericus (Auerbachscher Plexus) lokalisiert. In der *Tela submucosa* befinden sich lockeres Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäße sowie der Plexus submucosus (Meissnerscher Plexus). Darauf folgt zum Schluss die *Tunica mucosa*, die eigentliche Darmschleimhaut. Sie besteht aus *Lamina muscularis*, *Lamina propria* und *Lamina epithelialis*. Die *Lamina propria* enthält Bindegewebszellen, Blutgefäße, Lymphfollikel (*Folliculi lymphatici*

solitaria) und viele Immunzellen (Abb. I.1). Im Gegensatz zur Dünndarmschleimhaut ist die Dickdarmschleimhaut bei Säugern zottenfrei. Das Schleimhautepithel enthält Enterozyten, die ihre Funktion in der Resorption, d.h. der Aufnahme von Substanzen aus dem Darmlumen, bzw. in der Sekretion, d.h. der Abgabe ins Darmlumen, haben. Dazu kommen Schleim produzierende Becherzellen. Diese sind zwar ebenfalls mit Mikrovilli ausgestattet, allerdings ist deren Anzahl im Vergleich zu den Saumzellen geringer und ihre Gestalt unregelmäßig (Smollich & Günther, 1992).

Epithelien besitzen einheitliche Struktur- und Funktionsprinzipien; sie bilden Barrieren zwischen den Flüssigkeitsräumen des Körpers und transportieren gelöste Stoffe und Wasser durch diese Barrieren hindurch. Epithelzellen haben eine typische polare Struktur und sind miteinander durch Schlussleisten verbunden. Die funktionelle Außenseite stellt die apikale Zellmembran dar. Sie bildet, z.B. im Kolon, fingerartige Ausstülpungen, die *Mikrovilli* oder Bürstensaummembran. Die basolaterale Zellmembran besteht aus der basalen Zellmembran, die einen direkten Kontakt mit der Blutseite hat, und der lateralen Zellmembran, die dem interstitiellen Raum zwischen den einzelnen Enterozyten zugewandt ist.

Die lateralen Membranen sind durch drei Arten von Zellverbindungen miteinander verknüpft. Die Schlussleisten (*Zonulae occludentes, tight junctions*) grenzen die apikalen und basolateralen Zellmembranen voneinander ab; sie sind wegen ihrer negativen Fixladungen besser für Kationen als für Anionen durchlässig (Kationen-Selektivität). Die Desmosomen kommen als gürtelförmige (*Zonula adhaerens, intermediate junction*) und als

Einleitung

punktförmige (*Haftplatte, Macula adhaerens, spot desmosome*) Desmosomen vor; sie dienen dem mechanischen Zusammenhalt der Epithelzellen. Als dritte Sorte von Zellverbindungen gibt es Connexonen (Nexus, gap junctions); sie ermöglichen einen Transport von Zelle zu Zelle und stellen somit eine Art *elektrische Synapse* dar.

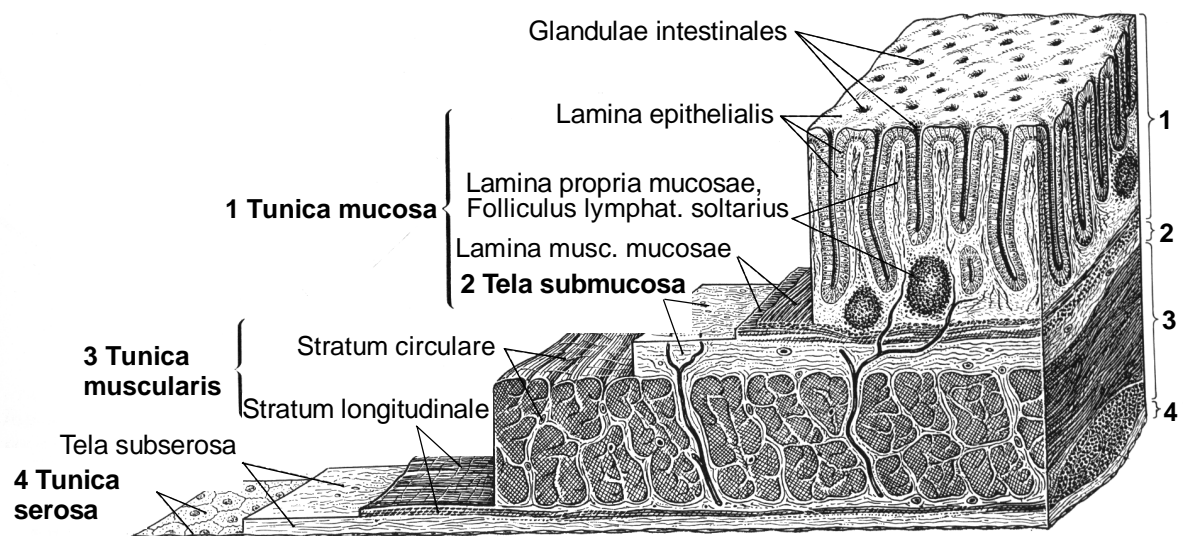


Abb. I.1: Schematische Darstellung der Kolon-Wand, Lupenvergrößerung (nach Sobotta & Becher, 1972).

Das Kolonepithel gehört zu den mitteldichten Epithelien. Die Schlussleisten sind bei mitteldichten Epithelien weniger permeabel als die apikale Zellmembran, deswegen ist der transepitheliale Transport vorwiegend transzellulär, d.h. durch die Zellen hindurch, und nur ein kleiner Teil erfolgt parazellulär über den Zwischenzellraum. Solche Epithelien können mengenmäßig weniger Substanzen als lecke Epithelien (z.B. Dünndarm, proximale Nierentubuli) transportieren, aber sie können dafür

Konzentrationsgradienten aufbauen und erhalten (Fromm & Hierholzer, 1995a; Greger, 1996a).

I.2.2 Allgemeine Funktionen des Kolons

Während der Magen für Verflüssigung, Zerkleinerung und rasche Entleerung des Nahrungsbreis sorgt, laufen im Darm intensive Resorptions- und Sekretionsprozesse ab (Ehrlein, 2000). In diesem Kontext spielt das Kolon eine wichtige Rolle. Neben der mikrobiellen Nachverdauung der Nahrung, die hier lokalisiert ist, dient das Kolon der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Gesamtorganismus, es bestimmt das Volumen der Faeces und die Transitzeit des Chymus durch den Gastrointestinaltrakt (Medelin, 1998). Im Kolon werden ca. 90 % der aus dem Ileum mit dem Chymus gelieferten Flüssigkeit resorbiert, wodurch sich halb feste Faeces bilden (Ganong, 1995). Eine Diarrhö bei Dünndarmerkrankungen kann sich nur dann klinisch manifestieren, wenn die anfallende Flüssigkeitsmenge die Resorptionsfähigkeit des Kolons übersteigt (Binder & Sandle, 1994).

Die meistens anaeroben Bakterien, die das Kolon besiedeln, können unverdauliche Futterreste wie z.B. Zellulose oder auch Proteine teilweise spalten und dadurch kurzkettige Fettsäuren, Vitamin K und Ammoniak produzieren, die ebenfalls durch das Kolonepithel resorbiert werden. Außerdem sezerniert die Kolonschleimhaut, insbesondere im Bereich der Krypten, eine plasmaitone alkalische Flüssigkeit, die u.a. Muzine, Kalium und HCO_3^- enthält (Vaupel & Ewe, 1995).

I.2.3 Ionen transport im proximalen und distalen Kolon der Ratte

Die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ist fast impermeabel für geladene Moleküle. Um diese Barriere zwischen Extra- und Intrazellulärraum zu überwinden sind Transport- und Kanalproteine in die Membran integriert. Die Ionenkanäle sind meist relativ selektiv hinsichtlich der durchfließenden Ionenspezies. Um diese Selektivität zu erreichen, besitzen Kanäle spezifische Bindungsstellen oder Festladungen, die den Durchgang für die spezifischen Stoffe erleichtern und die Permeabilität für andere Moleküle ausschließen (Dudel, 1995).

Um Ionen entgegen elektrochemischen Gradienten zu bewegen, benutzt die Zelle Transportproteine, die als Pumpen oder ATPasen bezeichnet werden. Diese Proteine sind für den primär aktiven Transport der Zelle zuständig, sie können Konzentrationsgradienten gelöster Teilchen zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellulärraum aufbauen. Die „Energie“ dieses elektrochemischen Gradienten kann als treibende Kraft für weitere Austausch- und Transportprozesse benutzt werden. So können z. B. Austauscher oder Cotransporter im Sinne eines sekundär aktiven Transports den Na^+ -Gradienten entlang der Membran ausnutzen, um andere Substanzen „bergauf“ zu transportieren (Haschke & Diener, 1999a).

Die Epithelien funktionieren wie eine Barriere zwischen Körperinnerem (Blutseite) und Außenwelt, d.h. im Falle des Gastrointestinaltraktes dem Darmlumen. Epithelzellen sind grundsätzlich polar organisiert mit einem apikalen und einem basolateralen Zellpol, deren Membranen mit unterschiedlichen Transportmolekülen ausgestattet sind. Diese Polarität erlaubt es,

dass der Transport durch die Zelle immer in mindestens zwei Schritten kontrolliert wird (Greger, 1996a). Umgekehrt muss im Falle des „*Steady States*“ gewährleistet sein, dass der Eintritt einer Substanz über einen Zellpol immer genauso groß ist wie der Austritt am gegenüberliegenden Zellpol. Diese Beziehung zwischen basolateraler und apikaler Zellmembran wird als „*Cross-Talk*“ bezeichnet. Ob es ein „*Cross-Talk*“ zwischen den Membranen des Kolonepithels gibt, ist auch eine Fragestellung dieser Arbeit.

Es gibt deutliche Unterschiede zwischen dem Elektrolyttransport im Dün- und Dickdarm. Außer in der Neugeborenenphase, in der das Kolon noch Glukose und Aminosäuren aktiv resorbieren kann, haben die Transportfähigkeiten beider Darmabschnitte individuelle Besonderheiten. Außerdem zeigt der Elektrolyttransport im Kolon deutliche Spezies-, Segment- und tageszeitliche Abhängigkeiten (Binder & Sandle, 1994).

An allen Epithelzellen ist die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran lokalisiert. Sie bewegt unter Spaltung von ATP jeweils 3 Na^+ aus der Zelle und 2 K^+ in die Zelle hinein, wodurch die intrazelluläre Natriumkonzentration niedrig und die intrazelluläre Kaliumkonzentration hoch gehalten wird (Ab. I.2). Dieser elektrochemische Gradient wird dann von anderen sekundär aktiven Transportern ausgenutzt, wie z.B. dem $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter in der Basolateralmembran und dem $\text{Na}^+\text{-H}^+$ - bzw. $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ -Austauscher in der Apikalmembran (Alberts et al., 1995; Fromm & Hierholzer, 1995a).

Die Aufnahme von K^+ aus dem Dickdarmlumen erfolgt durch eine $\text{H}^+\text{-K}^+$ -Pumpe in der apikalen Membran, die nach dem Prinzip des aktiven Transportes arbeitet, d.h. ihren Energiebedarf aus der

Spaltung von ATP gewinnt (Binder & Sandle, 1994; Kone & Higham, 1998). Das so aufgenommene Kalium verlässt die Epithelzellen auf der basolateralen Seite wahrscheinlich durch K^+ -Kanäle (Diener et al., 1996; Schultheiss & Diener 1997). Aktiver K^+ -Transport findet sich lediglich im distalen Kolon. Obwohl im proximalen Kolon - wenn auch auf niedrigem Niveau - sowohl die mRNA als auch das Protein der H^+ - K^+ -ATPase nachgewiesen ist, wurde in diesem Segment keine aktive K^+ -Resorption beobachtet (Del Castillo et al., 1991; Binder & Sandle, 1994).

Zum Zweck der Sekretion kann K^+ durch den basolateralen Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporter und die Na^+ - K^+ -ATPase aus dem Blut aufgenommen und innerhalb der Enterozyten akkumuliert werden. Die Ionen gelangen dann durch apikale Kalium-Kanäle in das Dickdarmlumen (Schultheiß & Diener, 1998).

Quantitativ wichtiger als der Transport von K^+ , dem Thema dieser Arbeit, sind die Resorption bzw. Sekretion von Na^+ und Cl^- über die Dickdarmschleimhaut. Schon im Jahr 1960 haben Curran & Schwarz gezeigt, dass die Natrium- und Chloridflüsse über die Mucosa direkt von den luminalen Konzentrationen der beiden Ionen abhängen. Es gibt auch eine enge Beziehung zwischen Wasser- und Natriumflüssen im Kolon (Devroede & Phillips, 1969). Na^+ - und Cl^- -Resorption im Kolon benötigen aktive Transportprozesse, die im Regelfall am Kolon der Ratte elektroneutral verlaufen, d.h. ohne Netto-Ladungsbewegung (Schultz, 1984; Binder & Sandle, 1994).

In der apikalen Membran ist der elektroneutrale Na^+ - H^+ -Austauscher (NHE, Subtyp NHE-2 und NHE-3) der wichtigste Natriumtransporter (Binder et al., 1986; Foster et al., 1986b; Rajendran et al., 1989). Über die basolaterale Membran des

Rattenkolons wird Natrium über die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter, einen anderen Subtyp des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers (NHE-1) und einen $\text{Na}^+\text{-Anionen}$ -Cotransport, der eine höhere Affinität für HCO_3^- als für OH^- hat, bewegt (Abb.I.2). Im proximalen Kolon sorgt ebenfalls ein $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher für die Natriumresorption; die Cl^- -Resorption erfolgt wahrscheinlich hier parazellulär (Foster et al., 1986a).

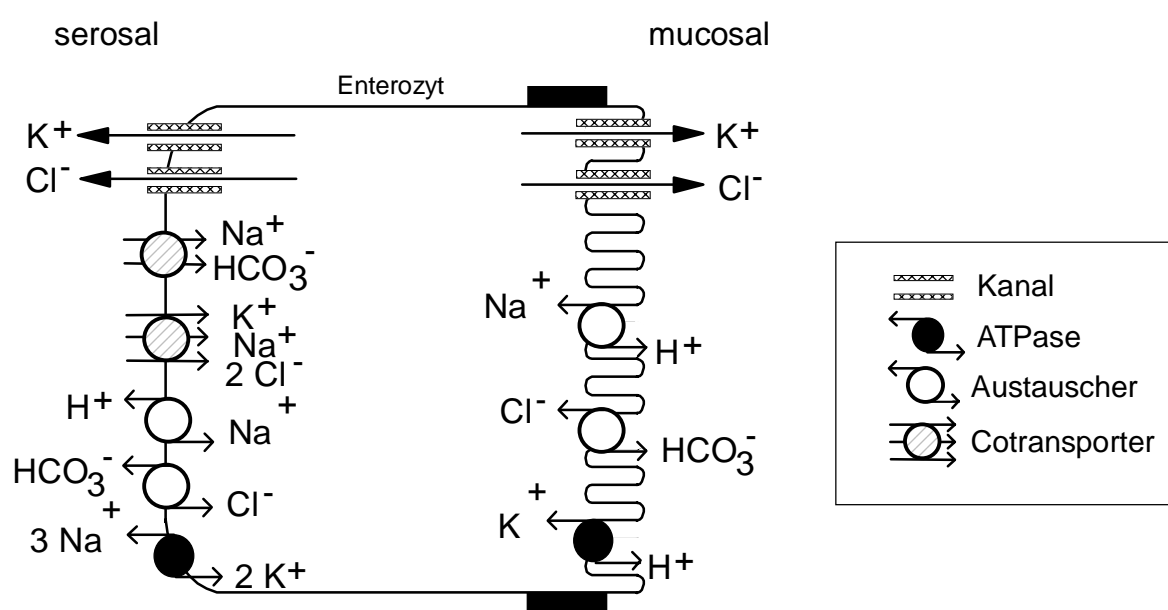


Abb. I.2: Ionentransport am Kolon der Ratte. Die $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ist in geringer Aktivität auch im proximalen Kolon nachgewiesen, obwohl es aktiven K^+ -Transport nur im distalen Kolon gibt. Der apikale $\text{Cl}^- \text{-HCO}_3^-$ -Austauscher wird nur im distalen Abschnitt gefunden.

Ein deutlicher Segmentunterschied zwischen proximalem und distalem Kolon besteht in der Regulation des Ionentransportes durch Mineralocorticoide. Im Falle eines Hyperaldosteronismus werden ausschließlich im distalen Kolon die apikalen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher durch Natrium-Kanäle ersetzt, wodurch die elektroneutrale Na^+ -

Resorption in eine elektrogene übergeht (Rajendran et al., 1989; Binder & Sandle, 1994).

Chlorid wird aktiv im distalen Kolon resorbiert, während im proximalen Dickdarmabschnitt die Cl⁻-Resorption passiv verläuft (Schultheiss & Diener, 1998). Im distalen Kolon ist die Cl⁻-Resorption das Resultat der Kopplung von apikalen Na⁺-H⁺- und Cl⁻-HCO₃⁻-Austauschern (Rajendran & Binder, 1999). Das Anion verlässt dann die Zelle wahrscheinlich durch basolaterale Cl⁻-Kanäle. Der Cl⁻-HCO₃⁻-Austauscher fehlt in der apikalen Membran der Enterozyten des proximalen Kolons (Rajendran et al., 1991; Schultheiss et al., 1998; Abb. I.2).

I.3 Zellvolumen und Ionentransport

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Kaliumtransportes während der Zellvolumenregulation. Als Antwort auf einen osmotischen Stress reagiert die Zelle mit einem Efflux oder Influx von Wasser, um das veränderte Zellvolumen zu normalisieren. So wird nach einer Zellschrumpfung eine kompensatorische Volumenzunahme, die als „*Regulatory Volume Increase*“ (RVI) bezeichnet wird, in Gang gesetzt, während nach einer Zellschwellung eine kompensatorische Volumenabnahme (*Regulatory Volume Decrease* = RVD) ausgelöst wird. RVD und RVI sind eigentlich Zellschutzmechanismen gegen eine Zerstörung der Membran. Die Zelle aktiviert Transporter in der Zellmembran, über deren Tätigkeit das Zellvolumen auf den ursprünglichen Wert zurückgeführt wird (Fromm & Hierholzer, 1995b; Okada, 1997). Dabei sind Natrium-,

Kalium- und Chloridtransporter die wichtigsten Wege, durch die das Zellvolumen kontrolliert wird.

RVD oder RVI werden sofort nach dem osmotischen Stress in Gang gesetzt; je nach Zelltyp braucht die Antwort mehrere Sekunden bis ungefähr 10 Minuten, um das Volumen wieder zu normalisieren (Hazama & Okada, 1990; Diener et al., 1992; Levinson, 1992; Levitan et al., 1995).

Eine Erhöhung des Cl^- - und K^+ -Ausstroms aus der Zelle mit konsekutivem Wasserausstrom während des RVD wurde schon an vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen (Abb. I.3). Elektroneutrale Transporter, wie der K^+ - Cl^- -Cotransporter und der Cl^- - HCO_3^- -Austauscher, spielen eine definitive Rolle bei manchen Zelltypen wie z.B. Erythrozyten und Gallenblasenzellen, während in anderen, etwa dem Epithel des Rattenkolons, Kalium- und Chlorid-Kanäle den Efflux von Elektrolyten vermitteln (Diener et al., 1992 und 1994). Außerdem spielen Ca^{2+} als „*Second Messenger*“ und das Zytoskelett eine essenzielle Rolle für den RVD (Larson & Spring, 1987; Hazama & Okada, 1988; Hoffmann & Kolb 1991; Greger, 1996c; Nilius et al., 1997; Schütt et al., 1997).

NaCl -Aufnahme während eines RVI wird durch die Zusammenarbeit des Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporters, des Cl^- - HCO_3^- -Austauschers und des Na^+ - H^+ -Austauschers in vielen Epithelien vermittelt (Larson & Spring, 1987; Levinson, 1992; McLeod & Hamilton, 1990; Hall et al., 1996; Okada, 1997; Hara et al., 1999).

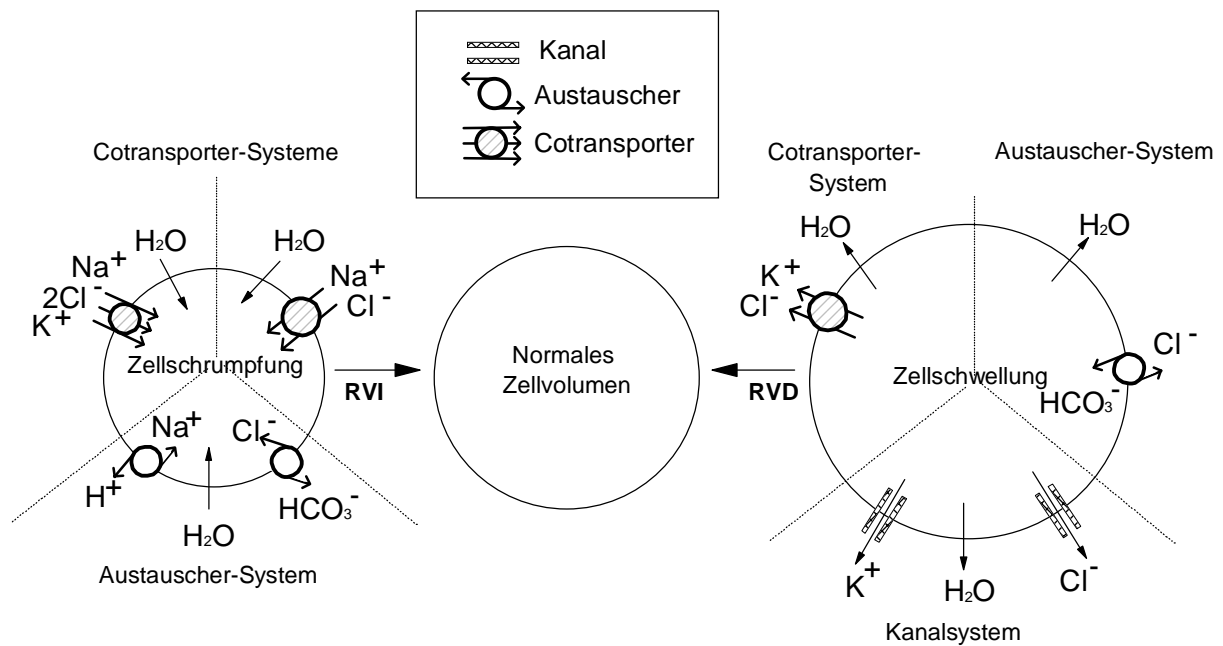


Abb. I.3: Schema von Ionen- und Wassertransportmechanismen, die bei RVD und RVI beteiligt sind. Drei verschiedene Systeme für RVD und RVI, je nach Zelltyp und Versuchslage, sind beschrieben worden.

I.4 Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Versuche ist die Klärung folgender Fragen:

- Welchen Einfluss hat das Zellvolumen auf den K⁺-Transport am Rattenkolon?
- Welche Transporter sind daran beteiligt ?
- Über welche Mechanismen werden diese Transporter aktiviert?
- Gibt es einen „*Cross talk*“ zwischen der basolateralen und der apikalen Membran beim K⁺-Transport?

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

In den Versuchen wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten mit einer Körpermasse zwischen 180 – 380 g aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen eingesetzt. Die Ratten hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter einem 12 Stunden-hell-12 Stunden-dunkel-Regime gehalten.

II.2 Gewebepräparation

Nach der Vorbereitung der Experimentierkammer (s. unten) wurde die Ratte durch einen Schlag auf den Kopf und nachfolgende Ausblutung getötet (Genehmigung der Tötung der Tiere zur Organentnahme durch das Regierungspräsidium Gießen). Entlang der Linea alba wurde dann die Bauchhöhle eröffnet. Das Kolon wurde am Übergang Kolon-Rektum, der durch einen großen Lymphknoten gekennzeichnet ist (Lindström et al., 1979), abgesetzt. Proximales und distales Kolon unterscheiden sich durch die palmbblätterartige Schrägstreifung der Schleimhaut, die nur im proximalen Kolon zu finden ist (Lindström et al., 1979).

Der Inhalt des Kolons wurde mit eisgekühlter (4 °C) Parsons-Lösung (s. unten) ausgespült. Danach wurde der Darmschlauch auf einen Kunststoffstab (Durchmesser 5 mm) aufgezogen. Mit einem stumpfen Skalpell wurde eine zirkuläre Inzision kurz vor dem distalen Darmende gelegt. Dadurch ließen sich die Tunica serosa und die Muscularis in proximaler Richtung vorsichtig abstreifen. Das so erhaltene Mucosa-Submucosa-Präparat wurde in 4 gleich große

Segmente von ungefähr 3 cm Länge unterteilt und in Längsrichtung aufgeschnitten. Die fertigen Präparate wurden anschließend in den Ussing-Kammern eingespannt.

II.3 Elektrolytlösungen

Die Standard-Lösung für die Versuche war eine modifizierte Parsons-Lösung (Parsons und Paterson, 1965). Deren Zusammensetzung lautete ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107, RbCl 4,5, NaHCO₃ 25, Na₂HPO₄ 1,8, NaH₂PO₄ 0,2, CaCl₂ 1,25, MgSO₄ 1 und Glukose 12. Die Lösung wurde während der gesamten Dauer der Versuche mit Carbogen (5 % CO₂ / 95 % O₂) begast und mit HCl / NaHCO₃ auf pH 7,4 eingestellt.

In den Versuchen, in denen eine Zellschwellung ausgelöst werden sollte, wurde statt der 107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons-Lösung eine 57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol Parsons-Lösung (isoosmolar) in der Kontrollphase und eine 57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons-Lösung (hyposmolar) in der Schwellungsphase benutzt. Dadurch wurde verhindert, dass sich die extrazelluläre Na⁺ oder Cl⁻ Konzentration während der Zellschwellung ändert. Zur Induktion einer Zellschrumpfung kam eine 107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 Mannitol Parsons-Lösung (hyperosmolar) zum Einsatz.

In der Versuchsreihe mit Ba²⁺ und La³⁺ wurde während der isoosmolaren Periode (Kontrolle) eine Tyrode-Lösung verwendet mit ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 80, Mannitol 100, RbCl 5,4, CaCl₂ 1,25, MgSO₄ 1, Glukose 12, HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) 10. Um eine Zellschwellung zu induzieren, wurde das Mannitol in der Lösung weggelassen. Beide Tyrode-Lösungen wurden mit O₂ begast und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Die Ca^{2+} -freien Versuche wurden mit zwei verschiedenen Lösungen durchgeführt. Die erste bestand einfach in der Standard-Parsons-Lösung ohne CaCl_2 . In der zweiten Lösung wurde die Mg^{2+} Konzentration auf $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht und $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA (Ethylenglycol bis-(β -aminoethylether) N, N, N',N'-tetraessigsäure) dazugegeben um die im Aqua dest. verbleibenden Reste von Ca^{2+} zu puffern.

II.4 Ussing-Kammer

Alle Versuche wurden mit der Ussing-Kammer-Technik ausgeführt. Verschiedene Typen von Kammern kamen je nach Fragestellung zum Einsatz. Die Messung der unidirektionalen Kalium-Flüsse erfolgte unter Voltage-Clamp-Bedingungen, so dass die dafür verwendeten Kammern Anschlüsse für Potential- und Stromelektroden benötigten (Abb. II.1). Für die Uptake- und Efflux-Versuche wurde das Gewebe nicht kurzgeschlossen, so dass kleinvolumige Kammern zur Reduktion der Tracer-Menge ohne Elektrodenanschlüsse verwendet werden konnten.

Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei Plexiglashälften, die durch Schrauben miteinander verbunden sind. Eine der Hälften besitzt auf der Innenseite 7 Nadelspitzen, an denen das Mucosa-Submucosa-Präparat (s.oben) aufgespannt wurde. Das Gewebestück, das die beiden Kammerhälften voneinander trennt, hat eine freie Oberfläche von 1 cm^2 und ist auf beiden Seiten von einer Pufferlösung umspült. Durch eine Öffnung an der oberen Seite werden die Lösungen eingeführt oder abgesaugt und Wirkstoffe zugegeben. An der unteren Seite der Kammern sind zwei kleine Gasfritten für die kontinuierliche Begasung angebracht. Diese Begasung ist essentiell

um den pH-Wert konstant zu halten und dient gleichzeitig als Sauerstoffquelle für das Gewebe. Neben dem Elektrolytlösungsreservoir besitzen die Kammern ein Durchflusssystem mit Anschluss an ein Wasserbad. Dieses System sorgt für die Konstanthaltung der Nährlösungstemperatur auf 38°C. Unter solchen Bedingungen bleibt das Kolongewebe über 5 Stunden lebens- und funktionsfähig. Es sind nach dieser Versuchsdauer keine morphologischen Veränderungen im Elektronenmikroskop zu sehen (Diener et al., 1989).

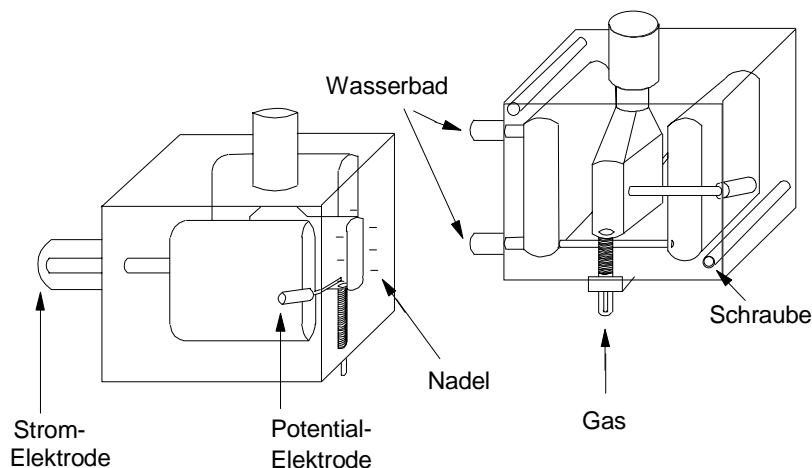


Abb.II.1: Schema einer modifizierten Ussing-Kammer

II.5 Elektrische Messungen

Schon zu Anfang der fünfziger Jahren hat Hans H. Ussing das erste Modell für elektrische Messungen an eingespannten Geweben erstellt (Ussing & Zerahn, 1951). Die Kurzschlussstromtechnik ist eine Methode zur Quantifizierung elektrogener Transportprozesse an Epithelgeweben. Das Prinzip der Bestimmung der elektrogenen Verschiebung einer Ionenspezies lässt sich an einem elektrischen Schaltkreismodell gut erklären (Abb. II.2.). Solche Versuchsansätze, noch mit einer durch einen Potentiometer manuell regelbaren

Batterie, waren die Anfänge der hier benutzten Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen), die es erlaubt, verschiedene Parameter wie Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit oder Gewebepotentialdifferenz kontinuierlich zu bestimmen.

Kurzschlussstrom-Bestimmung nach Ussing und Zehran (1951)

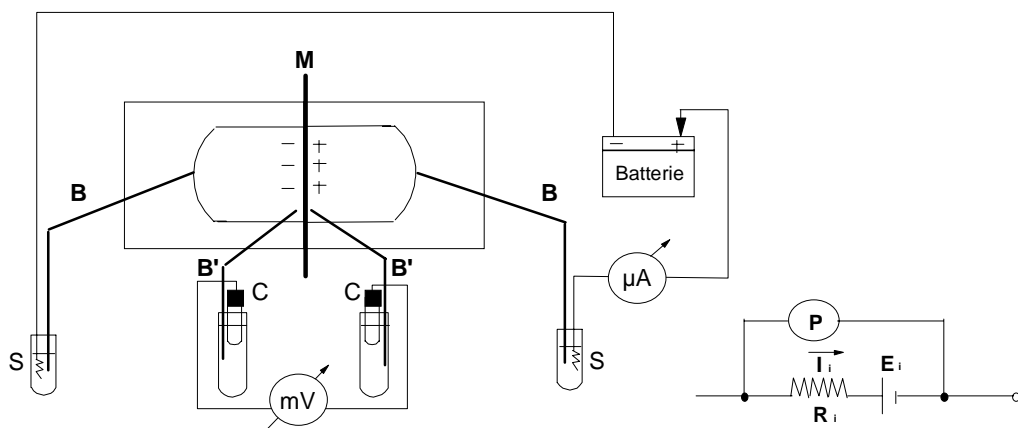


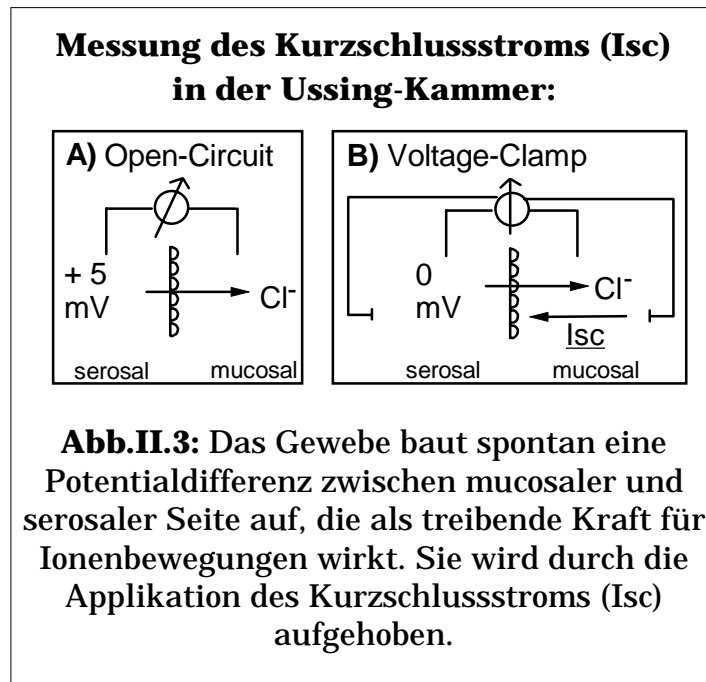
Abb.II.2: C = Kalomelektroden, S = Silber-Silberchlorid Elektroden, B und B' = Agarbrücken und M = Gewebe. Unten rechts: elektrisches Schaltkreismodell für die Ionenbewegung, P = Potentialdifferenz, E_i = elektromotorische Kraft, I_i = Ionenfluss, R_i = Widerstand.

Die Voltage-Clamp-Anlage ist über ein Windowsprogramm gesteuert. Die dazu verwendeten Ussing-Kammern besitzen zwei verschiedene Elektroden-Anschlüsse. Ein Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) ist ganz in der Nähe des eingespannten Gewebes (Abstand ca. 1 mm) angebracht. Hierüber wurde die Potentialdifferenz (Pd) zwischen der mucosalen und serosalen Seite des Gewebes gemessen. Die Ag/AgCl-Elektroden, die die Potentialdifferenz erfassen, standen über eine 3 mol·l⁻¹KCl-Lösung, die durch Agarbrücken von den Kammern getrennt war, mit dem Gewebe in Verbindung. Der möglichst geringe Abstand zum Gewebe ist notwendig, um die durch das Gewebe erzeugte Pd möglichst wenig vom Lösungswiderstand zwischen den

Agarbrücken und dem Gewebe abschwächen zu lassen. Außerdem erfolgte durch den Computer eine automatische Korrektur des Lösungswiderstandes und der Eigenpotentialdifferenz (Offset) des Elektrodenpaars, die in einer Vorlaufphase vor Einspannen des Gewebes gemessen wurden.

Das zweite Elektrodenpaar, das ebenfalls aus Ag/AgCl-Elektroden bestand, ist möglichst entfernt von dem Gewebe angebracht und dient der Stromapplikation. Der weite Abstand zum Gewebe ist notwendig, um eine möglichst gleichmäßige Stromdichte am Epithel zu erreichen. Auch diese Elektroden standen über eine Agarbrücke mit der Lösung in der Kammer in Verbindung.

Das Kolonepithel, das in solch eine Ussing-Kammer eingespannt ist, sezerniert spontan Anionen, insbesondere Cl^- und HCO_3^- (Strabel & Diener, 1995), wodurch sich eine transepitheliale Potentialdifferenz aufbaut, da die Serosaseite positiv geladen wird („Open-Circuit“-Modus, Abb. II.3.A). Diese Pd wird durch die Stromelektroden (Ag/AgCl) des Voltage-Clamp-Gerätes auf Null gestellt. Der dazu notwendige kompensatorische Strom wird als Kurzschlussstrom (I_{sc} mit sc für short-circuit) bezeichnet („Voltage-Clamp“-Modus, Abb. II.3.B). Wenn die Pd auf Null gestellt worden ist, so ist der elektrische Gradient für passive Ionenbewegungen ausgeschaltet. Da bei identischen Lösungen auf beiden Seiten des Gewebes gleichzeitig kein Konzentrationsgradient besteht, bedeutet dies, dass der gemessene I_{sc} auf aktive Ionenbewegungen zurückgehen muss. Ein positiver I_{sc} zeigt einen aktiven Netto-Kationentransport durch das Gewebe von der mucosalen nach der serosalen Seite bzw. einen Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung an.



Zur vollständigen Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften eines Epithelgewebes bedarf es neben der Angabe von Kurzschlussstrom und Gewebepotentialdifferenz noch der des Widerstandes (R_t; mit t = tissue) bzw. der Leitfähigkeit (G_t; mit t = tissue). Die Leitfähigkeit eines Epithels ergibt sich aus der Summe aller Einzelleitfähigkeiten in dem eingespannten Gewebestück (Scheffler, 1984). Zur Ermittlung der Gewebeleitfähigkeit wurde alle 60 s ein bipolarer Strompuls von 50 µA Amplitude über eine Dauer von 200 ms dem Gewebe appliziert. Aus der resultierenden Potentialänderung wurde anschließend nach der folgende Gleichung die G_t berechnet: $R_t = 1/G_t = Pd/I_{sc}$ (G_t ist der Kehrwert des Widerstands R_t).

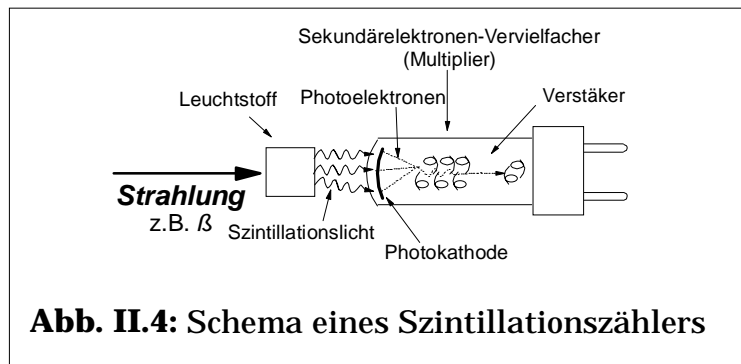
I_{sc}, Pd und G_t wurden kontinuierlich aufgezeichnet und jede Minute ausgedruckt. Um einen direkten Vergleich mit den Ionenflüssen zu ermöglichen, wurde der I_{sc} als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ mit $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) angegeben.

Um differenzieren zu können, in wie weit der Kaliumtransport zu dem gemessenen Strom beiträgt, wurden Radioisotopen-Versuche durchgeführt.

II.6 Radioisotopen-Versuche

Der Nachweis ionisierender Strahlen erfolgte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler. Diese Methode hat den Vorteil, dass nur eine geringe Menge der strahlenden Substanz benötigt wird. Die ionisierende Strahlung, die auf gewisse feste oder flüssige Stoffe auftrifft, erzeugt Lichtblitze, die man registrieren kann. Ein Szintillationszähler besteht in der Hauptsache aus einem Leuchtstoff und einem Photo-Multiplier (Schwiegk und Turba, 1961). Die auf den Leuchtstoff auftreffende Strahlung wird in diesem mehr oder weniger vollständig absorbiert und in Lumineszenzlicht umgewandelt. Das Lumineszenzlicht trifft auf die Photokathode des Multipliers und erzeugt dort Photoelektronen, die sich nach einer entsprechenden Verstärkung registrieren lassen (Abb. II.4)(Bröcker, 1976).

Es gibt eine große Zahl von Leuchtstoffen, zum Beispiel in fester Form, als Kristall oder Pulver und auch in Lösung (Szintillationsmittel). Bei den Messungen mit $^{86}\text{Rb}^+$ wurde eine flüssige Leuchtsubstanz (rotiszint® eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) der Probe zugegeben. Von der gemessenen Aktivität wurde die Hintergrundaktivität (Leerwert) subtrahiert.



II.7 Messungen unidirektionaler Kalium-Flüsse

In allen Versuchen wurde das Isotop $^{86}\text{Rb}^+$ als Marker für K^+ eingesetzt. Rubidiumionen benutzen die gleichen Transportmechanismen wie K^+ in der Darmwand (Foster et al., 1984), haben aber gegenüber von z.B. $^{42}\text{K}^+$, das sehr rasch zerfällt, eine deutlich längere Halbwertszeit (17 Tage), was das Arbeiten mit diesem Marker sehr erleichtert.

Nachdem das Gewebe in die Kammer eingespannt wurde und auf beiden Seiten die Kammer mit 3,5 ml Pufferlösung aufgefüllt wurde, folgte eine 60-minütige Stabilisierungsphase. Zur Messung der resorptiven, d.h. Mucosa-nach-Serosa Flüsse (J_{MS}) wurde $^{86}\text{Rb}^+$ (74 kBq) auf der mucosalen und zur Messung der sekretorischen, Serosa-nach-Mucosa Flüsse (J_{SM}) auf der serosalen Seite zugesetzt. Nach einer weiteren 10 Minutenperiode, während der die unidirektionalen Flüsse einen steady-state erreichen, wurden Proben ($2 \times 100\mu\text{l}$) von der radioaktiv markierten Seite entnommen. Diese Proben dienen als Standard, um aus der gemessenen Radioaktivität die Menge an Rb^+ errechnen zu können. Sofort danach wurden die unidirektionalen Flüsse während einer 10 Minuten dauernden isoosmolaren Kontrollperiode gemessen. Dazu wurden Proben ($2 \times$

250 μl) nach 0 und nach 10 min von der unmarkierten Seite entnommen. Der Anstieg der Radioaktivität zwischen der ersten und der zweiten Probennahme lässt durch Vergleich mit dem Standard berechnen, wieviel Rb^+ während der Messperiode von der markierten auf die unmarkierte Gewebeseite transportiert wurde.

Zur Untersuchung der Wirkung einer Zellschwellung wurde nach der isoosmolaren Kontrollperiode die Lösung auf beiden Seiten des Gewebes gegen eine hypoosmolare Lösung ausgetauscht. Frisches $^{86}\text{Rb}^+$ wurde zugesetzt und nach einer weiteren 10 min-Periode wurde wieder ein Standard (2 x 100 μl) auf der markierten Seite entnommen. Daran schloss sich eine Messung der unidirektionalen Flüsse über eine 10 minütige Versuchsphase in hypoosmolarem Medium an.

Alle Probenvolumina, die auf der unmarkierten Seite entnommen wurden, wurden durch 500 μl frische, nichtradioaktive Elektrolytlösung ersetzt. Eine Korrektur um dieses Volumen wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

Wenn die Untersuchung der Wirkung einer Zellschrumpfung gemessen werden sollte, wurde nach der isoosmolaren Kontrollperiode statt eines Lösungsaustauschs beidseits Mannitol aus einer Stammlösung ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in einer Endkonzentration von $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zugesetzt. 5 Minuten später begann die 10 Minuten-Versuchsperiode zur Messung der unidirektionalen Flüsse unter anisoosmolaren Bedingungen.

Bei allen Versuchen wurden am Ende des Versuchs Proben von der markierten Seite entnommen um sicherzustellen, dass sich die Höhe des Standards während des Versuchs nicht änderte. Die

Kalium-Menge in den entnommenen Proben wurde in einem Beta-Zähler (Flüssigkeitsszintillationszähler) bestimmt.

II.8 Kalium-Uptake-Versuche

Die Aufnahme (Uptake) von Rb^+ in die Schleimhaut wurde in kleinen Kammern (2,5 ml Volumen auf jeder Gewebeseite) ohne elektrische Anschlüsse gemessen. Nach einer 60-minütigen Äquilibrierungsperiode wurde das Medium entweder durch eine iso-, eine hypo- oder eine hyperosmolare Lösung ersetzt. Direkt anschließend wurde zur Messung des mucosalen Uptakes $^{86}\text{Rb}^+$ (22 kBq) auf der mucosalen Seite zugesetzt. Zur Bestimmung des serosalen Uptakes wurde in einer anderen Serie von Versuchen der Marker auf der serosalen Seite appliziert. 5 Minuten nach der Isotop-Zugabe wurden Proben (2 x 1 ml) auf der markierten Seite des Gewebes entnommen. Außerdem wurden Proben auf der unmarkierten Seite entnommen um sicherzustellen, dass es während der Versuchsdauer nicht zu einem nennenswerten Transport des Isotops über die Schleimhaut gekommen ist.

Dann wurde die weitere Aufnahme von Radioaktivität in das Gewebe durch Waschen mit unmarkierter, gekühlter Elektrolytlösung gestoppt. Die Kammern wurden geöffnet und das Gewebe entnommen. Die Schleimhaut wurde mit Filterpapier abgetupft und durch eine 20-stündige Inkubation in einer $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO_3 Lösung bei 70°C (Venglarik et al., 1990) aufgelöst. Nach einer Neutralisierung mit $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler die ins Gewebe aufgenommene Menge an Radioaktivität bestimmt. Die flüssigen Proben wurden

ebenfalls in dem Szintillationszähler gemessen. Die Ergebnisse sind als Uptake pro Gewebeoberfläche ausgedrückt ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$).

II.9 Kalium-Efflux-Versuche

Die gleichen Kammern wie für die Uptake-Versuche wurden in den Efflux-Versuchen benutzt, in denen der Rb^+ -Ausstrom aus dem Epithel gemessen wurde. Nach einer 30-minütigen Äquilibrierungsperiode wurde $^{86}\text{Rb}^+$ (74kBq) auf beiden Seiten des Gewebes zugesetzt. Wenn Hemmstoffe getestet werden sollten, wurden diese 30 min nach der Zugabe von $^{86}\text{Rb}^+$ appliziert. Die Aufladung des Gewebes mit radioaktivem Rubidium dauerte 60 min. Dann wurde die Lösung auf beiden Seiten der Kammer durch frische, unmarkierte Elektrolytlösung ausgetauscht durch zweimaliges Waschen mit 20 ml Puffer in 5 min Abständen.

Anschließend wurde der Ausstrom von $^{86}\text{Rb}^+$ aus dem aufgeladenen Gewebe durch Probenentnahmen auf der serosalen und der mucosalen Seite bestimmt. Dazu wurden alle 6 min 2 x 500 μl Proben entnommen. Nach den Probenentnahmen wurden die Kammern durch Zusatz frischer Pufferlösung wieder aufgefüllt; eine entsprechende Korrektur um dieses Volumen wurde bei der Berechnung durchgeführt. Bei der Untersuchung des Einflusses möglicher Inhibitoren enthielt die Ersatzlösung die entsprechende Wirkstoffkonzentration.

Nach 12 min Versuchszeit wurde das isoosmolare Medium entweder durch eine hypo- oder eine hyperosmolare Lösung ersetzt. Es folgten Probennahmen nach 18, 24 und 30 min. Dann wurde das Gewebe - wie bei den Uptake-Versuchen beschrieben - der Kammer

entnommen, aufgelöst und sein Gehalt an Radioaktivität am Ende des Versuchs bestimmt. Außerdem wurde die Radioaktivität der Proben von der mucosalen und der serosalen Seite gemessen.

Der Efflux wurde ausgedrückt in $\% \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, d.h. als ausgeströmte Menge an Rb^+ in % zu der zu Beginn der entsprechenden Periode im Gewebe noch vorhandenen Rb^+ -Menge. Diese Daten werden durch folgende Rechnung ermittelt. Aus den initial genommenen Standards wurde über einen Dreisatz berechnet, welche Strahlenaktivität (in cpm = counts per minute) welcher Menge an Rb^+ entspricht. Die Rb^+ -Menge im Gewebe wurde durch eine „Rückwärtsrechnung“ ermittelt. Dazu wurde zu der am Ende des Versuchs noch im Gewebe zu findenden Strahlenmenge addiert, was in der davorliegenden Periode nach apikal und basolateral aus dem Gewebe ausgeströmt war. Durch Aufaddition der entsprechenden Efflux-Werte konnte berechnet werden, welche Menge an Radioaktivität sich zu Beginn jeder Effluxperiode im Gewebe befand. Durch diese Berechnung (Mandel et al. 1986) wird letztlich eine Linearisierung der Efflux-Daten erreicht.

II.10 Chemikalien

Brefeldin A, Calmidazolium, Cytochalasin D und TMB-8 (3,4,5-Trimethoxybenzoesäure-8-(diethylamino)octylester) wurden in Dimethylsulphoxid (DMSO; maximale Endkonzentration $2,5 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$) gelöst. Quinin Hydrochlorid wurde in Ethanol (Endkonzentration $4 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$) gelöst. BaCl_2 , LaCl_3 und Tetraäthylammonium Chlorid (TEA) wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt. Alle Substanzen waren von Sigma, Deisenhofen, Deutschland. Das Isotop

war von NEN, Dreieich, Deutschland (Anfangsaktivität von $^{86}\text{Rb}^+$ ungefähr $411 \text{ GBq}\cdot\text{g}^{-1}$).

II.11 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistischen Vergleiche wurden mit einem gepaarten oder einem ungepaarten Student's t-Test durchgeführt. Wenn ein zuvor durchgeführter F-Test signifikante Abweichungen zwischen den Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte ergab, kam stattdessen der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

III Resultate

III.1 Unidirektionale $^{86}\text{Rb}^+$ Flüsse unter nicht isoosmolaren Bedingungen

Im distalen Kolon waren unter isoosmolaren Bedingungen (57 mmol·l⁻¹ NaCl / 100 mmol·l⁻¹ Mannitol Parsons) die resorptiven, mucosa-nach-serosa Flüsse (J_{ms}) von Kalium ($0,37 \pm 0,07 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 10) größer als die sekretorischen, serosa-nach-mucosa (J_{sm}) Flüsse ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 9). Daraus resultierte eine Netto-K⁺-Resorption in dem entsprechenden Kolon-Abschnitt. Austausch der Lösung gegen ein hypoosmolares Medium (57 mmol·l⁻¹ NaCl Parsons) auf beiden Seiten des Gewebes liess J_{sm} auf $0,30 \pm 0,03 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (n = 9, P<0,05 versus Fluss unter isoosmolaren Bedingungen, gepaarter t-Test) ansteigen. J_{ms} blieb unverändert (Abb. III.1A).

Im proximalen Kolon wurden unter isoosmolaren Bedingungen ähnliche basale Werte von J_{ms} und J_{sm} wie im distalen Kolon gemessen. Auch hier stieg nach Exposition gegenüber der hypoosmolaren Lösung tendenziell J_{sm} an, allerdings erreichte dieser Effekt keine statistische Signifikanz (Abb. III.1A).

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Wirkung einer Zellschrumpfung auf den transepithelialen K⁺-Transport untersucht. Dazu wurden zuerst die unidirektionalen K⁺-Flüsse unter isoosmolaren Bedingungen (107 mmol·l⁻¹NaCl) gemessen und danach das Medium auf beiden Seiten des Gewebes durch Zugabe von 100 mmol·l⁻¹ Mannitol hyperosmolar gemacht. In der isoosmolaren Phase betrug J_{ms} im distalen Kolon $0,91 \pm 0,19 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (n = 11), während J_{sm} bei $0,59 \pm 0,07 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (n = 12) lag.

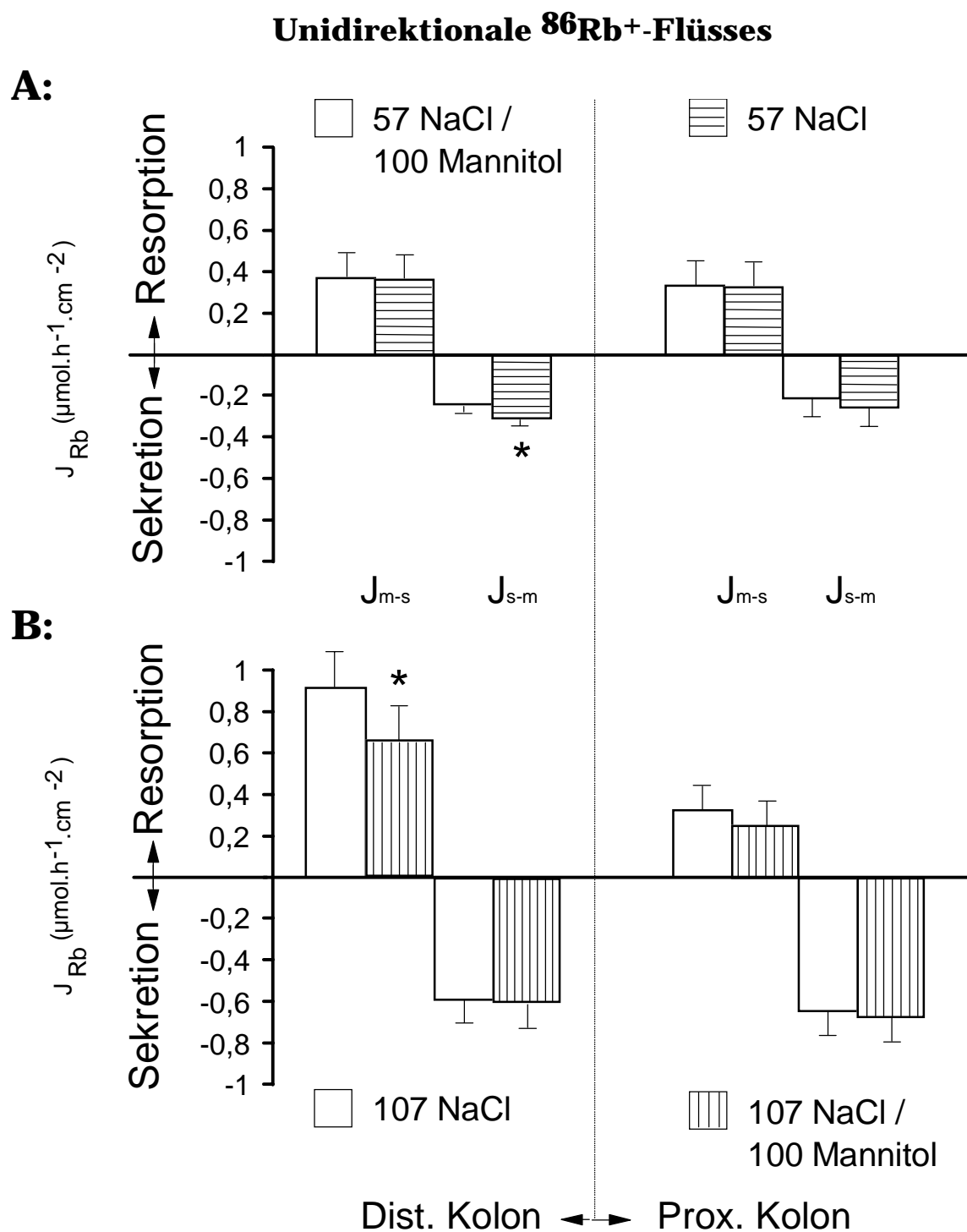


Abb. III.1: Unidirektionale $^{86}\text{Rb}^+$ -Flüsse durch das proximale und distale Kolon während osmotischer Änderungen. A: Flüsse unter isoosmolaren ($57\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol) und hypoosmolaren ($57\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) Bedingungen. B: Flüsse unter isoosmolaren ($107\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) und hyperosmolaren ($107\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol) Bedingungen. Die Werte sind Mittelwerte (Säulen) \pm SEM (vertikale Linien). $n = 8 - 11$. * $P < 0,05$ gegen isoosmolare Bedingungen.

Beide Werte waren signifikant höher als in der Versuchsserie, in der die Wirkung einer Zellschwellung getestet wurde ($P < 0,05$ gegen die Flüsse mit $57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl in beide Richtungen, ungepaarter t-Test), was sich durch die höhere NaCl-Konzentration und die bekannte Na^+ -Abhängigkeit vieler K^+ -Transporter erklären lässt.

Austausch des Mediums gegen ein hyperosmolares Medium führte zu einem Abfall von J_{ms} , der allerdings nur im distalen Kolon statistische Signifikanz erreichte ($P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test; Abb. III.1B).

III.2 $^{86}\text{Rb}^+$ Uptake-Versuche

Im distalen Kolon betrug die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme von der mucosalen Seite des Gewebes unter isoosmolaren Bedingungen ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol) $27,3 \pm 4,9 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$), während der Uptake von der serosalen Seite bei $89,5 \pm 23,6 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) lag. Ähnlich war das Verhältnis zwischen K^+ -Aufnahme über die apikale und die basolaterale Membran im proximalen Kolon (Tabelle III.1), was darauf hinweist, dass die Transportleistung der Na^+ - K^+ -Pumpe und des Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporters, die für den serosalen Uptake verantwortlich sind, ungefähr zwei bis vier mal größer als die der K^+ - H^+ -Pumpe, die große Teile des mucosalen Uptakes vermittelt. Exposition des Gewebes gegenüber einem hypoosmolaren Medium ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) liess den $^{86}\text{Rb}^+$ -Uptake in beiden Kolonsegmenten unverändert (Tabelle III.1).

In den Untersuchungen, in denen die Wirkung einer Zellschrumpfung getestet wurde, wurde der Kontroll-Uptake mit einer $107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons gemessen. In diesem Medium

betrug im distalen Kolon der mucosale $^{86}\text{Rb}^+$ -Uptake $20,9 \pm 4,6$ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$). Zugabe von Mannitol ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) und die daraus resultierende Erhöhung der Osmolarität hatte nur einen marginalen, statistisch nicht signifikanten Effekt auf die mucosale Rb^+ -Aufnahme, die auf $28,1 \pm 4,0$ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) anstieg. Der serosale $^{86}\text{Rb}^+$ -Uptake fiel von $183,0 \pm 29,3$ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) unter isoosmolaren Bedingungen auf $143,3 \pm 9,6$ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) unter hyperosmolaren Bedingungen ab; der Unterschied war ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Auch im proximalen Kolon hatte die Zellschrumpfung keinen Einfluss auf die Aufnahme von Rb^+ über die apikale oder die basolaterale Membran (Tabelle III.1)

Resultate

Tabelle III.1: Effekte von anisoosmolaren Lösungen auf den $^{86}\text{Rb}^+$ -Uptake.

Distales Kolon				
	Mucosaler Uptake ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n	Serosaler Uptake ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n
57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol Parsons	$27,3 \pm 4,9$	6	$89,5 \pm 23,6$	6
57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons	$31,6 \pm 7,8$	6	$98,8 \pm 31,2$	6
107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons	$20,9 \pm 4,6$	8	$183,0 \pm 23,9$	6
107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol Parsons	$28,1 \pm 4,0$	8	$143,3 \pm 9,6$	6
Proximales Kolon				
	Mucosaler Uptake ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n	Serosaler Uptake ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n
57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol Parsons	$27,0 \pm 4,2$	6	$54,1 \pm 12,7$	6
57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons	$25,4 \pm 2,9$	6	$67,0 \pm 18,0$	6
107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Parsons	$22,4 \pm 2,5$	8	$180,1 \pm 24,6$	6
107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol Parsons	$30,9 \pm 6,5$	8	$131,3 \pm 34,8$	6

Serosaler und mucosaler Uptake wurden unter isoosmolaren (Kontrolle; 57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol oder 107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl), hypoosmolaren (57 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) oder hyperosmolaren (107 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl / 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol) Bedingungen gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Der statistische Vergleich zeigte keine signifikante Änderung unter anisoosmolaren Bedingungen in beiden Kolonsegmenten.

III.3 Apikaler und basolateraler $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux

Da der Einfluss des Zellvolumens auf den transepithelialen K^+ -Transport (Abb. III.1) nicht auf eine Veränderung in der K^+ -Aufnahme über einen der beiden Zellpole (Tabelle III.1) zu erklären ist, wurde die Wirkung von anisoosmolaren Lösungen auf den K^+ -Ausstrom, der in der Hauptsache durch K^+ -Kanäle in der apikalen und der basolateralen Membran vermittelt wird, gemessen.

Unter Kontrollbedingungen, d.h. in einem isoosmolaren Medium ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mannitol Parsons}$), war der serosale Efflux, also der K^+ -Ausstrom über die basolaterale Membran, etwa zwei bis drei mal größer als der mucosale Efflux, d.h. der K^+ -Ausstrom über die apikale Membran. Diese Beobachtung wurde in beiden Kolonsegmenten gemacht (Abb. III.2 und Tabelle III.2) und spiegelt die unterschiedliche Dichte von K^+ -Kanälen in beiden Membranen wider.

Wenn bei den Geweben nach 12 Minuten das Medium gegen ein frisches, ebenfalls isoosmolares Medium ausgetauscht wurde, resultierte keine Änderung des K^+ -Ausstroms (Abb. III.2.A). Wurde hingegen das Kontrollmedium gegen eine hypoosmolare Lösung ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$) ausgetauscht und dadurch eine Zellschwellung induziert, nahm der K^+ -Efflux in beiden Kolonabschnitten zu. Dies betraf sowohl den mucosalen als auch den serosalen Efflux (Abb. III.2.B und t_{18} , t_{24} und t_{30} in den Tabellen III.2 bis .5). Der mucosale Efflux stieg dabei um maximal $0,67 \pm 0,09 \text{ \%}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ im distalen Kolon ($n = 10$, $P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test; Tabelle III.2) und um maximal $0,59 \pm 0,11 \text{ \%}\cdot\text{min}^{-1}$

$1 \cdot \text{cm}^{-2}$ im proximalen Kolon ($n = 9$, $P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test; Tabelle III.4) an. Größer war die Stimulation des basolateralen K^+ -Ausstroms, der um maximal $1,03 \pm 0,12 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ im distalen Kolon ($n = 10$, $P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test; Tabelle III.3) und um maximal $1,07 \pm 0,22 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ im proximalen Kolon ($n = 10$, $P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test; Tabelle III.5) anstieg.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der K^+ -Efflux nach der Applikation einer hyperosmolaren Lösung ($107 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Mannitol}$ Parsons) untersucht. Die dadurch induzierte Zellschrumpfung hatte im distalen Kolon eine transiente Stimulation des mucosalen Efflux in den ersten 6 Minuten zur Folge. Danach fiel der mucosale Efflux aber signifikant ($P < 0,05$ versus isoosmolare Kontrollperiode, gepaarter t-Test) unter das Kontrollniveau. Im proximalen Kolon stieg der mucosale Efflux ebenfalls kurz an und fiel dann auf das alte Kontrollniveau zurück (Abb. III.2.C). Auch der serosale Efflux fiel in beiden Kolonabschnitten initial signifikant ab (Abb. III.2.C).

$^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux unter verschiedenen osmotischen Bedingungen

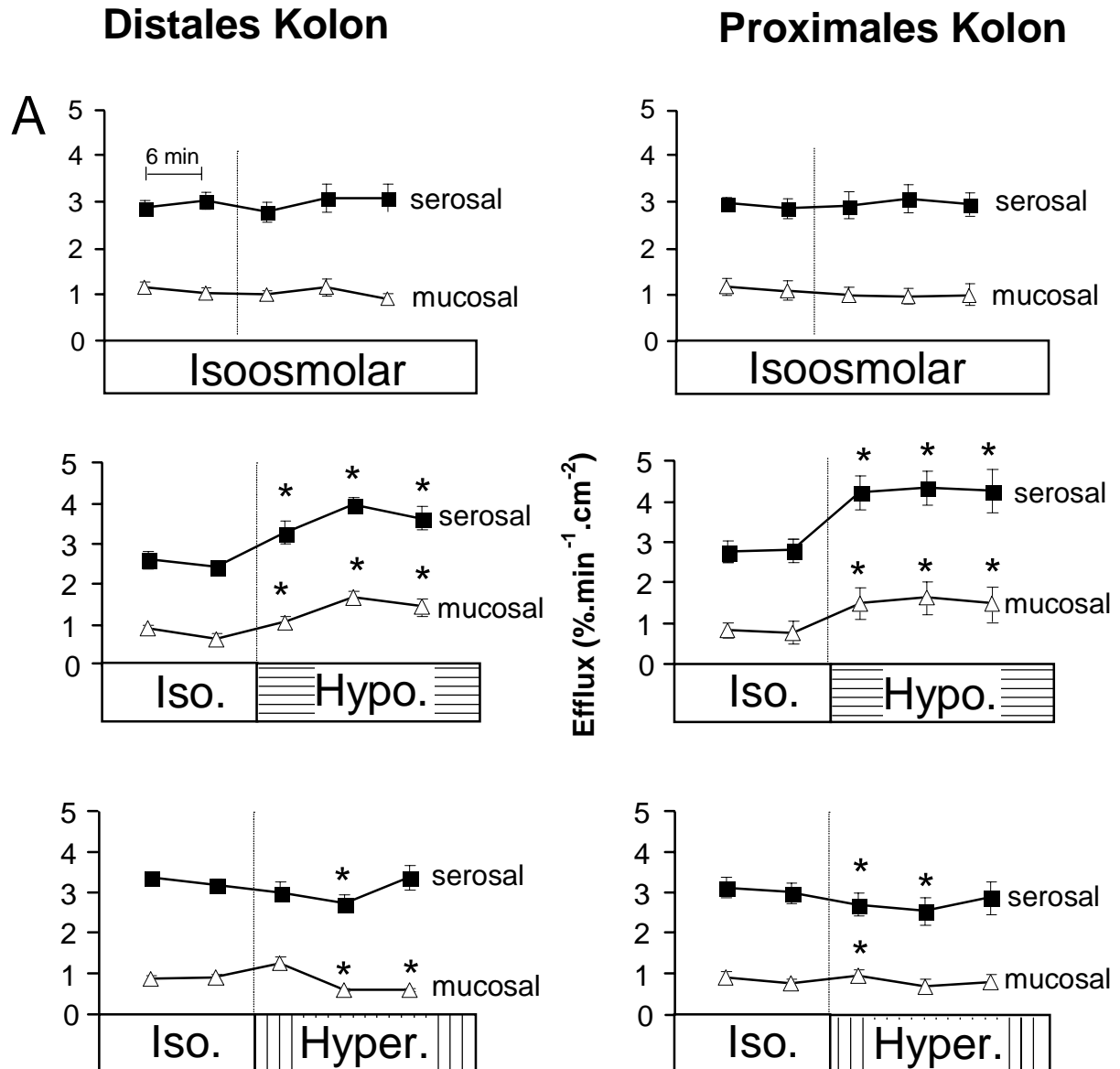


Abb. III.2: $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux nach serosal (geschlossene Vierecke) und mucosal (offene Dreiecke) am distalen (links) und proximalen (rechts) Kolon. A: Zeitabhängige Kontrollversuche, bei denen die isoosmolare Lösung ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mannitol}$) an dem durch die gestrichelte Linie markierten Zeitpunkt gegen die gleiche Lösung ausgetauscht wurde. B: Stimulation des $^{86}\text{Rb}^+$ -Effluxes nach Austausch der isoosmolaren Lösung gegen eine hypoosmolare Lösung ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$). C: Veränderung des $^{86}\text{Rb}^+$ -Effluxes nach Austausch der isoosmolaren Lösung gegen eine hyperosmolare Lösung ($107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mannitol}$ Parsons). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 6 - 10$. * $P < 0,05$ gegen die letzten Datenpunkt der Kontrollperiode.

III.3.1 Wirkung von Kalium-Kanalblockern auf den schwellungsinduzierten K^+ -Efflux

Verschiedene Kalium-Kanalblocker wurden eingesetzt, um die Eigenschaften der volumenregulierten K^+ -Kanäle zu charakterisieren. Quinin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) verminderte die Stimulation des basolateralen Effluxes (Abb. III.3) durch Zellschwellung. Die Zugabe von Quinin auf der mucosalen Seite des Gewebes verminderte, paradoxerweise, die Stimulation des serosalen Effluxes in beiden Kolonabschnitten (Tabelle III.4), während die serosale Zugabe eine Hemmwirkung nur im proximalen Kolon hatte (Abb. III.3 und Tabelle III.2). Dieses Ergebnis ist durch die lipophilen Eigenschaften dieses Kanalblockers zu erklären, der bei mucosaler Gabe anscheinend in der Lage ist, durch die Epithelzellen zu diffundieren und K^+ -Kanäle in der basolateralen Membran zu blockieren, während er anscheinend bei serosaler Gabe durch die subepithelial gelegenen Schichten, z.B. die Submucosa, nur schlecht penetrieren kann, möglicherweise weil er dort gebunden wird. Eine Folge der Blockade der basolateralen K^+ -Kanäle war eine „kompensatorische“ Erhöhung des apikalen K^+ -Ausstroms, der auch statistische Signifikanz erreichte (Abb. III.3, Tabellen 2 und 4).

Ein anderer K^+ -Kanal-Blocker, Tetraethylammonium (TEA, $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hatte keinen Effekt auf den durch Schwellung induzierten K^+ -Efflux, weder bei mucosaler noch bei serosaler Applikation (Tabellen III.2 bis .5).

Als dritter Kalium-Kanalblocker wurde Ba^{2+} ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) getestet. Für diese Versuchsreihe wurde eine HCO_3^- -freie, HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung verwendet, um das Ausfällen von Ba^{2+} in Form von $BaCO_3$ in der „normalen“ Parsons-Lösung zu verhindern.

Unter isoosmolaren Bedingungen war der basale Efflux, d.h. der Efflux in Abwesenheit von Ba^{2+} , genauso groß wie in der HCO_3^- -gepufferten Parsons-Lösung (Tabellen III.2 bis .5). Die Stimulation des K^+ -Effluxes durch Zellschwellung fiel hingegen deutlich stärker aus, besonders im distalen Kolon (Abb. III.4.A).

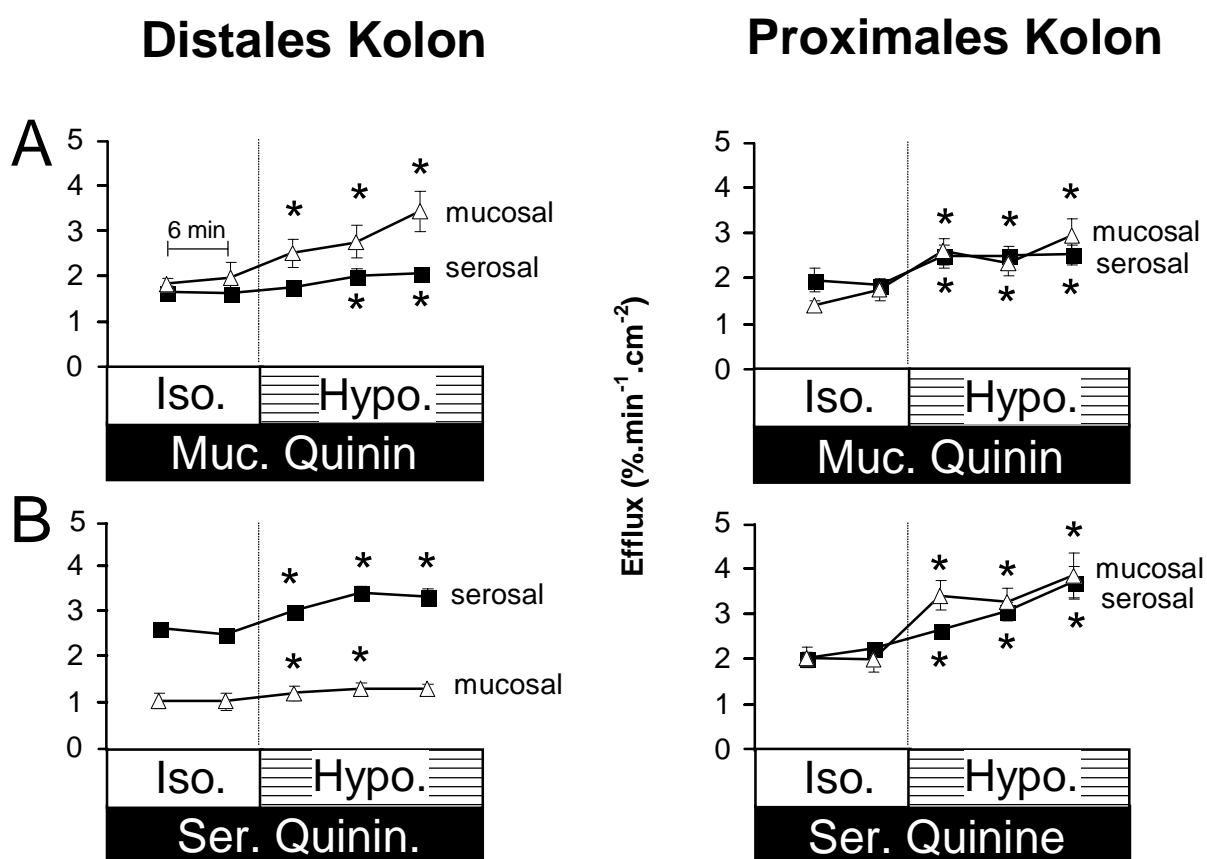


Abb. III.3: Effekte von Quinin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bei serosaler und mucosaler Zugabe am proximalen (rechts) und distalen (links) Kolon auf den $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux. Iso. = isoosmolare Lösung ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mannitol}$) auf beiden Gewebeseiten; Hypo. = hypoosmolare Lösung ($57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$) auf beiden Gewebeseiten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 8$. * $P < 0,05$ gegen die letzte Kontrollperiode.

Wenn die Lösung entweder auf der mucosalen oder serosalen Seite Ba^{2+} enthielt, war die Stimulation des apikalen Effluxes in beiden Kolonabschnitten gehemmt (Abb. III.4.B, Tabellen III.2 bis .5).

Resultate

Auch von Ba^{2+} ist bekannt, dass es in das Kolonepithel aufgenommen werden kann (Hardcastle et al. 1985), was erklärt, warum auch bei serosaler Applikation des Blockers der apikale K^+ -Ausstrom vermindert wurde. Beim basolateralen Efflux war keine signifikante Änderung nach Ba^{2+} -Gabe zu beobachten.

Distales Kolon

Proximales Kolon

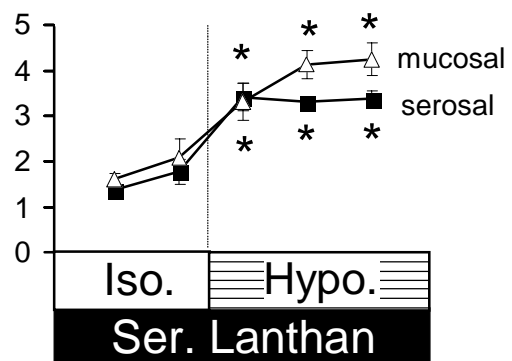
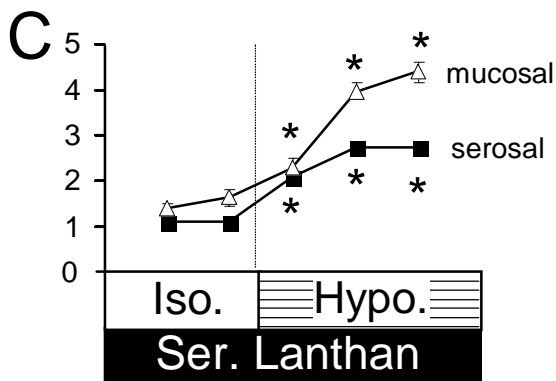
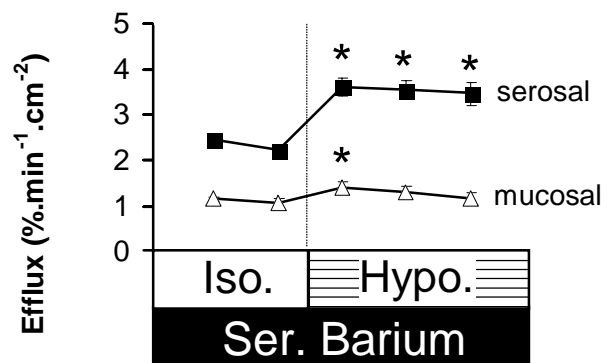
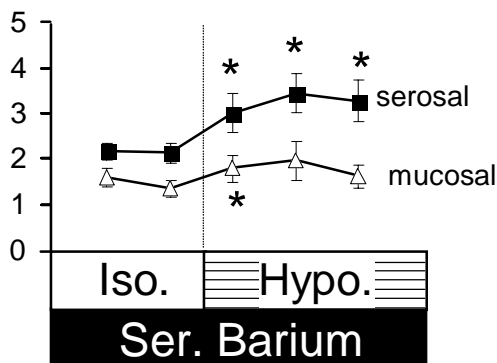
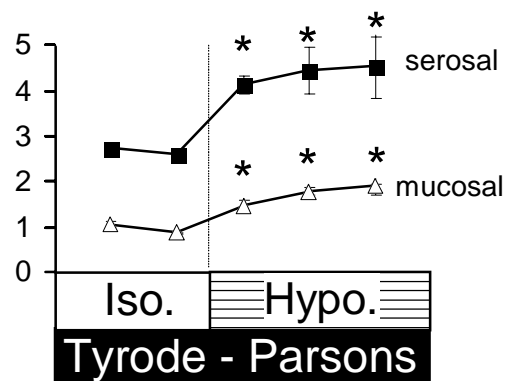
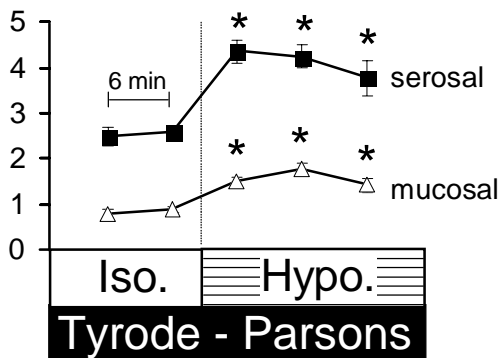


Abb. III.4: A: Kontrollversuche mit HCO_3^- -freier HEPES-gepufferter Tyrode. B: $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux mit Ba^{2+} ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf der serosalen Seite. C: $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux mit La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf der serosalen Seite. Die Versuche mit La^{3+} werden im Abschnitt III.3.2 besprochen. Serosaler Efflux = geschlossene Vierecke; mucosaler Efflux = offene Dreiecke. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 8$.
* $P < 0,05$ gegen die letzte Kontrollperiode.

III.3.2 Intrazelluläre Vermittlung des schwellungsinduzierten K^+ -Effluxes

Das Ziel der nachfolgend beschriebenen Versuche war es, die Mechanismen des schwellungsinduzierten Effluxes zu untersuchen. In vielen Zellen induziert die Zellschwellung eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration (McCarty & O'Neil, 1992), die zu einer Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen führt. Solch eine Ca^{2+} -abhängige K^+ -Leitfähigkeit ist auch im Kolon der Ratte vorhanden (Böhme et al., 1991). Aus diesem Grund wurde die Rolle des Ca^{2+} Signalweges beim schwellungsinduzierten K^+ -Ausstrom untersucht.

In einem ersten Versuchsansatz wurde das Gewebe in einer Ca^{2+} -freien Lösung (Parsons ohne CaCl_2) auf der serosalen Seite inkubiert. Die mucosale Lösung enthielt CaCl_2 um die Dichtigkeit der Tight Junctions zu erhalten (Tidball, 1964). Unter solchen Bedingungen blieb die Stimulation des K^+ -Effluxes durch Zellschwellung unverändert (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurde in einer weiteren Versuchsreihe auf der serosalen Seite eine Ca^{2+} -freie Lösung appliziert, die zusätzlich den Ca^{2+} -Chelator EGTA ($0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) enthielt, um die im Aqua dest. vorhandenen Spuren von Ca^{2+} zu puffern, sowie $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ um die Integrität der Tight Junctions zu schützen (Tidball 1964). Folge war eine Umverteilung des Effluxes unter isoosmolaren

Bedingungen, d.h. der basolaterale Ausstrom war vermindert und der apikale stieg an (Abb. III.5.A), so dass beide das gleiche Niveau erreichten. Dies zeigt, dass ein großer Teil der spontan offenen basolateralen K^+ -Kanäle Ca^{2+} -abhängig ist und sich schließt, wenn durch Verminderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel absinkt. Schwellung stimulierte in diesem Versuchsansatz immer noch den K^+ -Ausstrom, wenn auch die Antwort deutlich anders ausfiel. Die Stimulation des mucosalen Effluxes war weniger anhaltend, d.h. sie fiel im Unterschied zu den Versuchen, bei denen extrazelluläres Ca^{2+} vorhanden war, rasch wieder ab und der Anstieg des basolateralen Effluxes erfolgte im proximalen Kolon deutlich langsamer (Tabellen III.2 bis .5). Dementsprechend scheint ein Teil der volumensensitiven K^+ -Kanäle durch Ca^{2+} beeinflusst zu werden.

Der Ca^{2+} -Einstrom in das Kolonepithel erfolgt über nichtselektive Kationenkanäle in der basolateralen Membran, die sich durch La^{3+} hemmen lassen (De Smet et al., 1998; Frings et al., 1999). Daher wurde die Wirkung einer Zellschwellung in Gegenwart von La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) getestet. Auch diese Versuchsserie musste genau wie diejenige mit Ba^{2+} in einer HCO_3^- -freien, HEPES-gepufferten Tyrode durchgeführt werden, um ein Ausfallen von La^{3+} in der Parsons-Lösung zu vermeiden. Die Folge der Zugabe von La^{3+} war eine Verminderung des basolateralen Effluxes mit einer „kompensatorischen“ Stimulierung des apikales Effluxes in beiden Kolonabschnitten (Abb. III.4.C) (Tabellen III.2 bis .5). Dies weist auf eine – direkte oder indirekte – Hemmung basal, d.h. unter isoosmolaren Bedingungen geöffneter K^+ -Kanäle in der basolateralen Membran durch La^{3+} hin. Die durch die

Zellschwellung induzierte Steigerung des K^+ -Ausstroms über beide Zellpole blieb jedoch unverändert.

Calmidazolium (10^{-7} mol·l⁻¹ auf der serosalen Seite), ein Calmodulin Antagonist (Worrell & Frizzell, 1991), war ohne Wirkung auf den schwellungsinduzierten K^+ -Efflux (Tabellen III.2 bis .5). Das Ca^{2+} -abhängige Regulatorprotein Calmodulin ist also offenkundig an dieser Regulation nicht beteiligt. Auch TMB-8 (3,4,5-Trimethoxybenzoesäure-8-(diethylamino)octylester, 10^{-5} mol·l⁻¹ auf der serosalen Seite), ein Ca^{2+} -Antagonist, der gleichzeitig als Proteinkinase C Blocker fungiert (Malagodi, 1974), war ohne Wirkung (Daten nicht gezeigt).

Neben intrazellulärem Ca^{2+} wird bei vielen Zelltypen eine Beteiligung des Zytoskeletts an der Regulation des Zellvolumens vermutet (Mills, 1987; Dubinsky et al., 1999). Um zu sehen, ob die schwellungsinduzierten K^+ -Kanäle durch das Zytoskelett beeinflusst werden können, wurden drei verschiedene Zytoskelett -Inhibitoren eingesetzt. Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ auf der serosalen Seite), ein Mikrotubuli-Depolimerisator (Achler et al., 1989; Schroer & Sheetz, 1991), hatte keinen Effekt auf den schwellungsinduzierten serosalen K^+ -Efflux (Tabellen III.3 und .5). Was sich allerdings veränderte war der Zeitverlauf der Stimulation des mucosalen Effluxes während der Zellschwellung. In Gegenwart von Colchicin löste das hypoosmolare Medium nur noch einen transienten Anstieg des apikalen Effluxes aus, der sogar beim Zeitpunkt t_{18} signifikant größer war als in Abwesenheit von Colchicin. Der Efflux fiel dann nach und nach ab, so dass zumindest im proximalen Kolon der apikale Ausstrom bei t_{24} und t_{30} nicht mehr signifikant über demjenigen der isoosmolaren Kontrollperiode lag (Abb. III.5.C).

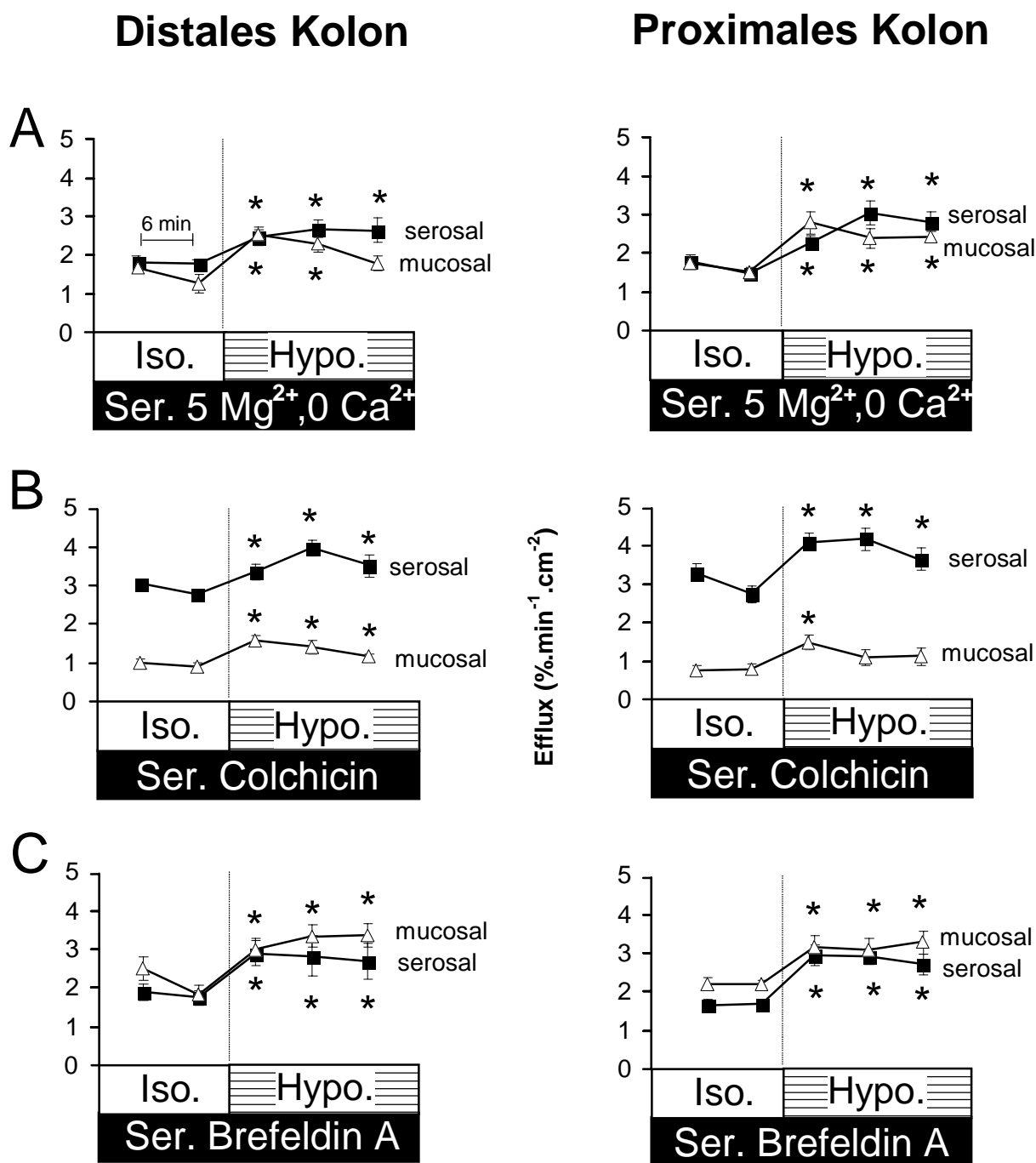


Abb. III.5: A: Effekt von Ca^{2+} -freien Lösungen ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ und $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ EGTA}$ auf der serosalen Seite) auf den $^{86}\text{Rb}^{+}$ - Efflux. B: Effekt von Colchicin ($2,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) auf den $^{86}\text{Rb}^{+}$ - Efflux. C: Effekt von Brefeldin A ($2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) auf den $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Efflux. $n = 7-8$. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ gegen die letzte Kontrollperiode.

Brefeldin A ($2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite), eine Substanz, die von bestimmten Pilzen produziert wird, wurde als

zweiter Zytoskelettinhibitor eingesetzt. Diese Substanz hemmt den vesikulären Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (Lippincott-Schwarz et al., 1990; Bajnath et al., 1995). Brefeldin A hatte einen massiven Effekt auf den basalen K^+ -Efflux. Unter Kontrollbedingungen verminderte dieser Blocker den serosalen Efflux, während der mucosale Efflux zunahm (Abb. III.5.D). Trotzdem ließ die Zellschwellung immer noch den K^+ -Efflux ansteigen, die Stimulation des mucosalen Effluxes war in Gegenwart von Brefeldin A sogar signifikant verstärkt in beiden Kolonabschnitten (Tabellen III.2 bis .5).

Als letzte Substanz wurde Cytochalasin D ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) getestet, ein Hemmstoff der Actinpolymerisation (Lin et al., 1980). Cytochalasin D hatte keine signifikante Wirkung auf den schwellungsinduzierten K^+ - Efflux (Tabellen III.2 und .4).

Resultate

Tabelle III.2: Mucosaler $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux im distalen Kolon

	Isoosmolare Periode (% $\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)		Hypoosmolare Periode Δ (% $\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)			n
	t ₆	t ₁₂	t ₁₈	t ₂₄	t ₃₀	
Kontrolle Parsons	0.88 ± 0.06	0.72 ± 0.09	0.27 ± 0.08*	0.67 ± 0.09*	0.52 ± 0.13*	10
Mucosal Quinin	1.66 ± 0.13	1.81 ± 0.30	0.50 ± 0.09*	0.74 ± 0.18*	1.36 ± 0.23*#	8
Serosal Quinin	0.98 ± 0.16	0.98 ± 0.18	0.17 ± 0.05*	0.28 ± 0.06*#	0.26 ± 0.10	8
Mucosal TEA	0.69 ± 0.09	0.55 ± 0.04	0.14 ± 0.06	0.32 ± 0.07*#	0.25 ± 0.08*	8
Serosal TEA	0.74 ± 0.08	0.62 ± 0.06	0.33 ± 0.09*	0.51 ± 0.17*	0.45 ± 0.04*	8
Ca²⁺-frei	1.48 ± 0.10	1.13 ± 0.19	1.05 ± 0.25*#	0.86 ± 0.23*	0.44 ± 0.24*	8
Calmidazolium	0.93 ± 0.07	0.82 ± 0.08	0.76 ± 0.22*	0.44 ± 0.14*	0.47 ± 0.10*	10
Colchicin	0.99 ± 0.09	0.88 ± 0.11	0.69 ± 0.11*#	0.53 ± 0.14*	0.26 ± 0.09*	7
Brefeldin A	2.40 ± 0.29	1.76 ± 0.24	1.09 ± 0.28*#	1.42 ± 0.25*#	1.45 ± 0.25*#	8
Cytochalasin D	0.67 ± 0.12	0.82 ± 0.12	0.40 ± 0.06*	0.57 ± 0.13*	0.72 ± 0.18*	8
Kontrolle Tyrode	0.87 ± 0.06	0.70 ± 0.02	0.57 ± 0.10*	0.87 ± 0.07*	0.98 ± 0.19*	8
Mucosal Ba²⁺	1.03 ± 0.17	0.78 ± 0.15	0.46 ± 0.15*	0.46 ± 0.08*#	0.33 ± 0.09*#	8
Serosal Ba²⁺	1.59 ± 0.21	1.35 ± 0.17	0.44 ± 0.12*	0.60 ± 0.24	0.28 ± 0.11#	8
La³⁺	1.49 ± 0.08	1.69 ± 0.19	0.64 ± 0.07*	2.30 ± 0.21*#	2.72 ± 0.25*#	8

Der Efflux wurde in 2 Messperioden (t₆, t₁₂) unter isoosmolaren Bedingungen erfasst und als Absolutwert (% $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$) angegeben, während der Efflux in den 3 nachfolgenden hypoosmolaren Perioden (t₁₈, t₂₄, t₃₀) als die Differenz zur letzten isoosmolaren Messperiode (Δ % $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$) angegeben ist, um die Änderungen durch die Zellschwellung deutlicher zu machen. Der Efflux wurde in normaler Parsons Lösung, d.h. ohne Blockerzusatz (Kontrolle), in Gegenwart von Quinin ($10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der mucosalen oder der serosalen Seite), Tetraethylammonium (TEA; $10^{-2} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der mucosalen oder der serosalen Seite), in Ca^{2+} -freier Lösung (0 Ca, $0,1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA, $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mg^{2+} auf der serosalen Seite), Calmidazolium ($10^{-7} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite), Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite), Brefeldin A ($2 \cdot 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) oder Cytochalasin D ($10^{-5} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) gemessen. In den letzten vier Zeilen wird der Efflux in einer Tyrode Lösung ohne Blockerzusatz (Kontrolle), mit Ba^{2+} ($10^{-2} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der mucosalen oder der serosalen Seite) oder La^{3+} ($10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ gegen den Efflux in der letzten

Resultate

isoosmolaren Periode (gepaarter t-Test), # P<0.05 gegen die Stimulation des Effluxes ohne Blockerzusatz (Kontrolle) in der gleichen Elektrolytlösung (ungepaarter t-Test).

Tabelle III.3: Serosaler $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux im distalen Kolon

	Isoosmolare Periode (% min ⁻¹ · cm ⁻²)		Hypoosmolare Periode Δ (% min ⁻¹ · cm ⁻²)			n
	t ₆	t ₁₂	t ₁₈	t ₂₄	t ₃₀	
Kontrolle Parsons	2.52 ± 0.13	2.40 ± 0.07	0.57 ± 0.16*	1.03 ± 0.12*	0.80 ± 0.16*	10
Mucosal Quinin	1.49 ± 0.13	1.46 ± 0.08	0.15 ± 0.07	0.38 ± 0.09*#	0.44 ± 0.08*	8
Serosal Quinin	2.50 ± 0.11	2.36 ± 0.13	0.48 ± 0.05*	0.86 ± 0.07*	0.78 ± 0.09*	8
Mucosal TEA	2.90 ± 0.14	2.72 ± 0.11	0.82 ± 0.14*	1.52 ± 0.12*#	1.46 ± 0.51*	8
Serosal TEA	2.67 ± 0.11	2.48 ± 0.10	0.72 ± 0.39*	1.52 ± 0.48*	1.05 ± 0.40*	8
Ca²⁺-frei	1.59 ± 0.14	1.56 ± 0.08	0.57 ± 0.12*	0.75 ± 0.13*	0.72 ± 0.20*	8
Calmidazolium	3.53 ± 0.13	3.29 ± 0.16	1.21 ± 0.17*#	1.44 ± 0.19*	1.19 ± 0.16*	10
Colchicin	3.01 ± 0.10	2.76 ± 0.09	0.57 ± 0.13*	1.19 ± 0.17*	0.73 ± 0.24*	7
Brefeldin A	1.83 ± 0.20	1.70 ± 0.17	1.06 ± 0.16*	1.00 ± 0.33*	0.86 ± 0.27*	8
Cytochalasin D	2.61 ± 0.30	3.06 ± 0.27	0.43 ± 0.33	1.88 ± 0.41*	2.20 ± 0.69*	8
Kontrolle Tyrode	2.60 ± 0.10	2.46 ± 0.11	1.47 ± 0.14*	1.77 ± 0.42*	1.85 ± 0.59*	8
Mucosal Ba²⁺	2.39 ± 0.19	2.27 ± 0.19	1.97 ± 0.23*	2.18 ± 0.30*	1.73 ± 0.33*	8
Serosal Ba²⁺	2.15 ± 0.19	2.13 ± 0.22	0.85 ± 0.28*	1.28 ± 0.23*	1.12 ± 0.22*	8
La³⁺	1.17 ± 0.03	1.19 ± 0.08	0.95 ± 0.07*#	1.61 ± 0.13*	1.59 ± 0.13*	8

Der Efflux wurde in 2 Messperioden (t₆, t₁₂) unter isoosmolaren Bedingungen erfasst und als Absolutwert (% min⁻¹ cm⁻²) angegeben, während der Efflux in den 3 nachfolgenden hypoosmolaren Perioden (t₁₈, t₂₄, t₃₀) als die Differenz zur letzten isoosmolaren Messperiode (Δ % min⁻¹ cm⁻²) angegeben ist, um die Änderungen durch die Zellschwellung deutlicher zu machen. Die Konzentration der verwendeten Blocker ist in der Legende von Tabelle III.2 angegeben. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. * P<0.05 gegen den Efflux in der letzten isoosmolaren Periode (gepaarter t-Test), # P<0.05 gegen die Stimulation des Effluxes ohne Blockerzusatz (Kontrolle) in der gleichen Elektrolytlösung (ungepaarter t-Test).

Resultate

Tabelle III.4: Mucosaler $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux im proximalen Kolon

	Isoosmolare Periode (% min ⁻¹ · cm ⁻²)		Hypoosmolare Periode Δ (% min ⁻¹ · cm ⁻²)			n
	t ₆	t ₁₂	t ₁₈	t ₂₄	t ₃₀	
Kontrolle Parsons	0.97 ± 0.13	0.93 ± 0.20	0.53 ± 0.12*	0.59 ± 0.11*	0.49 ± 0.13*	9
Mucosal Quinin	1.54 ± 0.10	1.87 ± 0.23	0.81 ± 0.16*	0.58 ± 0.17*	1.17 ± 0.24*#	8
Serosal Quinin	2.00 ± 0.20	1.96 ± 0.23	1.29 ± 0.23*#	1.16 ± 0.22*#	1.70 ± 0.29*#	8
Mucosal TEA	0.80 ± 0.09	0.75 ± 0.11	0.21 ± 0.07*	0.33 ± 0.04*	0.33 ± 0.07*	8
Serosal TEA	0.78 ± 0.11	0.73 ± 0.10	0.44 ± 0.13*	0.38 ± 0.07*	0.35 ± 0.11*	8
Ca²⁺-frei	1.71 ± 0.15	1.50 ± 0.10	1.10 ± 0.23*#	0.75 ± 0.19*	0.79 ± 0.14*	8
Calmidazolium	1.45 ± 0.33	1.24 ± 0.26	0.76 ± 0.22*	0.44 ± 0.14*	0.47 ± 0.10*	9
Colchicin	0.84 ± 0.13	0.87 ± 0.13	0.68 ± 0.13*	0.30 ± 0.16*	0.32 ± 0.16	8
Brefeldin A	2.33 ± 0.15	2.32 ± 0.12	0.97 ± 0.17*	0.90 ± 0.17*	1.08 ± 0.19*#	8
Cytochalasin D	0.98 ± 0.14	0.94 ± 0.10	0.46 ± 0.09*	0.62 ± 0.11*	0.65 ± 0.15*	7
Kontrolle Tyrode	0.81 ± 0.09	0.91 ± 0.07	0.58 ± 0.08*	0.84 ± 0.11*	0.51 ± 0.09*	8
Mucosal Ba²⁺	1.04 ± 0.16	0.91 ± 0.12	0.41 ± 0.04*	0.53 ± 0.06*	0.52 ± 0.13*	8
Serosal Ba²⁺	1.17 ± 0.05	1.09 ± 0.09	0.34 ± 0.07	0.24 ± 0.12*#	0.10 ± 0.10*	8
La³⁺	1.61 ± 0.11	2.04 ± 0.40	1.16 ± 0.25	1.92 ± 0.28*#	2.04 ± 0.25*#	8

Der Efflux wurde in 2 Messperioden (t₆, t₁₂) unter isoosmolaren Bedingungen erfasst und als Absolutwert (% min⁻¹ cm⁻²) angegeben, während der Efflux in den 3 nachfolgenden hypoosmolaren Perioden (t₁₈, t₂₄, t₃₀) als die Differenz zur letzten isoosmolaren Messperiode (Δ % min⁻¹ cm⁻²) angegeben ist, um die Änderungen durch die Zellschwellung deutlicher zu machen. Die Konzentration der verwendeten Blocker ist in der Legende von Tabelle III.2 angegeben. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. * P<0.05 gegen den Efflux in der letzten isoosmolaren Periode (gepaarter t-Test), # P<0.05 gegen die Stimulation des Effluxes ohne Blockerzusatz (Kontrolle) in der gleichen Elektrolytlösung (ungepaarter t-Test).

Resultate

Tabelle 5: Serosaler $^{86}\text{Rb}^+$ - Efflux im proximalen Kolon

	Isoosmolare Periode (% $\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)		Hypoosmolare Periode Δ (% $\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)			n
	t ₆	t ₁₂	t ₁₈	t ₂₄	t ₃₀	
Kontrolle Parsons	2.73 ± 0.19	2.75 ± 0.19	0.98 ± 0.18*	1.07 ± 0.22*	1.02 ± 0.32*	9
Mucosal Quinin	2.08 ± 0.25	1.98 ± 0.12	0.61 ± 0.19*	0.61 ± 0.12*	0.64 ± 0.17*	8
Serosal Quinin	2.00 ± 0.12	2.17 ± 0.12	0.38 ± 0.10*#	0.75 ± 0.16*	1.35 ± 0.28*	8
Mucosal TEA	2.86 ± 0.13	2.76 ± 0.12	1.21 ± 0.16*	1.05 ± 0.15*	0.85 ± 0.26*	8
Serosal TEA	2.67 ± 0.21	2.48 ± 0.11	0.93 ± 0.12*	0.99 ± 0.08*	0.55 ± 0.12*	8
Ca²⁺-frei	1.74 ± 0.15	1.48 ± 0.14	0.68 ± 0.12*	1.34 ± 0.17*	1.15 ± 0.11*	8
Calmidazolium	3.02 ± 0.16	2.80 ± 0.17	1.15 ± 0.34*	1.25 ± 0.48*	1.36 ± 0.93*	9
Colchicin	3.33 ± 0.21	2.77 ± 0.22	1.34 ± 0.30*	1.41 ± 0.31*	0.90 ± 0.35*	8
Brefeldin A	1.80 ± 0.15	1.83 ± 0.12	1.24 ± 0.30*	1.20 ± 0.17*	1.00 ± 0.19*	8
Cytochalasin D	2.65 ± 0.17	2.54 ± 0.16	1.19 ± 0.29*	1.83 ± 0.33*	2.11 ± 0.62*	7
Kontrolle Tyrode	2.44 ± 0.19	2.54 ± 0.10	1.68 ± 0.16*	1.57 ± 0.16*	1.12 ± 0.29*	8
Mucosal Ba²⁺	2.40 ± 0.12	2.31 ± 0.08	2.00 ± 0.17*	1.60 ± 0.16*	0.92 ± 0.18*	8
Serosal Ba²⁺	2.42 ± 0.06	2.22 ± 0.10	1.34 ± 0.21*	1.28 ± 0.21*	1.20 ± 0.18*	8
La³⁺	1.39 ± 0.09	1.76 ± 0.26	1.54 ± 0.20*	1.44 ± 0.22*	1.50 ± 0.17*	8

Der Efflux wurde in 2 Messperioden (t₆, t₁₂) unter isoosmolaren Bedingungen erfasst und als Absolutwert (% $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$) angegeben, während der Efflux in den 3 nachfolgenden hypoosmolaren Perioden (t₁₈, t₂₄, t₃₀) als die Differenz zur letzten isoosmolaren Messperiode (Δ % $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$) angegeben ist, um die Änderungen durch die Zellschwellung deutlicher zu machen. Die Konzentration der verwendeten Blocker ist in der Legende von Tabelle III.2 angegeben. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. * P<0.05 gegen den Efflux in der letzten isoosmolaren Periode (gepaarter t-Test), # P<0.05 gegen die Stimulation des Effluxes ohne Blockerzusatz (Kontrolle) in der gleichen Elektrolytlösung (ungepaarter t-Test).

IV Diskussion

IV.1 Grundlegende Eigenschaften der Zellvolumenregulation

Die Fähigkeit von Zellen, ihr Volumen bei osmotischer Belastung zu regulieren, ist ein Phänomen, das bei sehr vielen Körperzellen nachgewiesen ist (Larson & Spring, 1987; Mills, 1987; Hoffmann & Kolb, 1991; Sarkadi & Parker 1991; McCarty & O'Neil, 1992; Nilius et al 1997; Okada, 1997). Unter anisoosmolaren Bedingungen aktivieren Zellen Transporter, um ihr angestiegenes Volumen durch Efflux von Osmolyten zu reduzieren (*regulatorische Volumenabnahme*) bzw. durch Aufnahme von Osmolyten ihr vermindertes Volumen wieder anzuheben (*regulatorische Volumenzunahme*).

Die Mechanismen, die von der Zelle benutzt werden um diese Transporter zu aktivieren, sind noch nicht vollständig geklärt und unterscheiden sich wahrscheinlich von Zelltyp zu Zelltyp. Theoretisch können diese Mechanismen in drei Komponenten unterteilt werden: 1.) ein Reiz, der einen Volumensensor stimuliert, 2.) ein Signal, das von dem Sensor ausgelöst wird und eine Signalkaskade anstößt, und 3.) ein Effektor-System, z.B. Ionen-Kanäle, die das Zellvolumen wieder normalisieren (Sachs, 1996).

1.) Über den Sensormechanismus zur Registrierung von Zellvolumenänderungen gibt es in der Hauptsache zwei Theorien. Die eine Theorie geht davon aus, dass der eigentliche physikalische Reiz, der die Volumenregulation auslöst, eine Änderung der intrazellulären *Ionenstärke*, d.h. der Gesamtkonzentration an geladenen Teilchen, ist (Cannon et al., 1998; Guizouarn & Motais, 1999; Wittels et al., 2000). Änderungen in der Ionenstärke können z.B. die Aktivität

volumensensitiver Anionenkanäle verändern (Minton et al., 1992). In einigen Epithelien ist die Steuerung von K^+ - und Cl^- -Kanälen sowie des Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporters durch die intrazelluläre K^+ - und Cl^- -Konzentration nachgewiesen, obwohl die Aktivierung des Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporters durch die intrazelluläre Cl^- -Konzentration auch unabhängig von dem Zellvolumen verlaufen kann (Putney et al., 1999).

Darüber hinaus gibt es Evidenz für eine direkte mechanische Stimulation von volumensensitiven Kanälen z.B. bei Zellschwellung. Volumensensitive Anionenkanäle können, z.B. ohne dass eine osmotisch-induzierte Schwellung vorliegt, durch Druck während einer Patch-Clamp-Ableitung aktiviert werden. Druck (oder Sog) führt zu einer *Verformung der Zellmembran*. Das bedeutet, dass auch eine Membrandehnung als Reiz für die Volumenregulation dienen kann (Cannon et al., 1998; Vanoye & Reuss, 1999; Mallouk et al., 2000). Diese Mechanosensibilität spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation mancher volumensensitiver Kanäle (Okada, 1997; Heitzmann et al., 2000; Lange, 2000).

Als Vermittler zwischen der Volumenänderung und der Membrandehnung dient wahrscheinlich das Zytoskelett, das bei einer Veränderung des Zellvolumens gedehnt bzw. gestaucht wird (Lange, 1999). Daran beteiligt sind Aktinfilamente, Mikrotubuli und andere Zytoskelettanteile (Sachs, 1997; Lange, 2000). Die Öffnung von volumensensitiven Anionenkanälen scheint nicht unbedingt vom Zytoskelett abhängig zu sein, ein intaktes Zytoskelett kann aber ihre Aktivierung optimieren (Levitan et al., 1995). Eine Beteiligung des Zellskeletts an der Volumenregulation ist für verschiedene

Epithelien nachgewiesen (Nilius et al., 1997; Zhang et al., 1997; Dubinsky et al., 1999).

2.) Ebenso wie im Fall des eigentlich auslösenden Reizes existieren eine Reihe von Theorien über die Signalkaskade, über die bei Volumenveränderung Transporter und Kanäle in der Membran aktiviert werden. Eine zentrale Rolle nimmt dabei das intrazelluläre Ca^{2+} ein. Dass es Ca^{2+} -abhängige K^{+} - und Cl^{-} -Kanäle gibt, wurde bei einer Reihe wichtiger Epithelien etwa aus den Atemwegen, der Niere oder dem Kolon nachgewiesen (Bajnath et al., 1997; Klaerke, 1995), wobei im letzteren Fall Ca^{2+} -abhängige Cl^{-} -Kanäle lediglich von undifferenzierten Tumorzellen exprimiert werden. Gut nachgewiesen ist die Aktivierung von K^{+} -Kanälen während der regulatorischen Volumenabnahme durch intrazelluläres Ca^{2+} an humanen Dünndarmzellen (Hazama & Okada 1988), an Hühner-Erythrozyten (Monteiro & Ilundáin, 1988), an humanen nicht pigmentierten epithelialen Augenzellen (Mito et al., 1993) und an kultivierten Nierenzellen der A6-Linie (Ehrenfeld et al., 1994). Umgekehrt kommt es nach einer Zellschrumpfung zu einem Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zu einer Hemmung von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen an Kolonkrypten der Ratte (Weyand et al., 1998).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Kopplung von intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration an Zellvolumenänderungen durch das Zytoskelett vermittelt wird (Bajnath et al., 1995), eine direkte Beziehung zwischen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Zytoskelettstrukturen ist bekannt (Zhang et al., 1997; Janmey, 1998). Andere Faktoren, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen, sind G-Proteine, Phospholipase C, Inositol-1,4,5-

triphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und Proteinkinase C (Cohen et al., 1991; Worrell & Frizzel, 1991; Heinke et al., 1999). Eine Verbindung und eventuelle Abhängigkeiten zwischen diesen Strukturen und bestimmten Teilen des Zytoskeletts ist ebenfalls gezeigt worden (Janmey, 1998). Zum Beispiel ist ein Teil der durch IP₃-induzierten Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern von einem intakten Aktin- und Microtubulus-System abhängig (Bourguignon et al., 1993). Das Zytoskelett kann nicht nur die Ca²⁺-Freisetzung vermitteln, sondern kann auch Teil der intrazellulären Ca²⁺-Speicher sein (Lange & Brandt, 1996). Außerdem kann das Zytoskelett auch Na⁺-, K⁺- und Cl⁻-Kanäle direkt in ihrem Öffnungsverhalten beeinflussen (Janmey, 1998).

3.) Die Effektoren, die bei Zellvolumenänderung eine Normalisation des Zellvolumens erlauben, sind Ionenkanäle und Transporter in der Zellmembran. Die regulatorische Volumenabnahme nach einer Zellschwellung wird durch einen Ausstrom von osmotischen Teilchen verursacht. K⁺- und Cl⁻-Ionen, die durch *Kanäle* oder den *KCl-Cotransport* aus der Zelle geschleust werden, sind die in der Hauptsache beteiligten Ionen (Abb. I.3) (Haddad & Graf, 1989; Sarkadi & Parker, 1991; Perry & O'neill, 1993; Taouil & Hannaert, 1999). Dazu kommt noch ein Ausstrom kleiner organischer Osmolyte, wie z.B. von Taurin (King & Goldstein, 1983; Breton et al., 1995; Ruhfus & Kinne, 1996; Benyajati & Renfro, 2000). Die Taurin-permeablen Kanäle sind möglicherweise identisch mit den volumensensitiven Anionen-Kanälen (Strange et al., 1995; Nilius et al., 1997; Okada, 1997; Cannon et al., 1998; Wittels et al., 2000).

Umgekehrt wird die regulatorische Volumenzunahme nach Zellschrumpfung durch Aufnahme von Ionen getragen, wobei in der Hauptsache Na^+ und Cl^- Ionen als die im Extrazellulärraum quantitativ wichtigsten Kationen bzw. Anionen aufgenommen werden. Die regulatorische Volumenabnahme, die zum großen Teil durch Kanäle stattfindet, ist normalerweise schneller als die regulatorische Volumenzunahme, die durch ATPasen, Cotransporter oder Austauscher vermittelt ist (Hara et al., 1999).

Zusammengefasst regulieren Zellen ihr Volumen durch: einen Reiz-Sensor, bei dem wahrscheinlich Membrandehnung und Änderungen der Ionenstärke im Vordergrund stehen; eine Signalkaskade, an der das Zytoskelett und intrazelluläres Ca^{2+} beteiligt sind; und Effektor-Systeme, die Ionenkanäle und Transporter in der Zellmembran umfassen.

IV.2 Der Kaliumtransport am Kolon wird bei der Volumenregulation verändert

Der K^+ -Transport wird durch verschiedene intrazelluläre *second messenger* Systeme reguliert, u.a. cAMP und Ca^{2+} (Übersicht bei Binder und Sandle, 1994). Eine Erhöhung der Konzentration dieser *second messenger* induziert eine K^+ -Sekretion und hemmt die K^+ -Resorption durch das Kolonepithel (Foster et al., 1983; Diener et al., 1996; Heinke et al., 1998). Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass auch das Zellvolumen den K^+ -Transport am Dickdarm der Ratte beeinflusst. Zellschwellung, ausgelöst durch ein hypoosmolares Medium, stimuliert den sekretorischen K^+ -Fluss (J_{SM}) im distalen Kolon der Ratte (Abb. III.1.A). Eine ähnliche Beobachtung wurde

auch tendentiell im proximalen Kolon gemacht, wenn auch hier der Effekt keine statistische Signifikanz erreichte. Umgekehrt hemmt eine Zellschrumpfung, ausgelöst durch ein hyperosmolares Medium, die resorptiven K^+ -Flüsse (J_{ms}) (Abb. III.B).

Die Veränderungen im K^+ -Transport bei Zellschwellung verhalten sich genau entgegengesetzt zu den Änderungen im Transport von Na^+ und Cl^- , die beide ansteigen, was im Fall des Cl^- Transportes zu mindestens teilweise durch die Aktivierung volumensensitiver basolateraler Cl^- -Kanäle vermittelt ist (Diener et al., 1994).

Für die Änderungen in der transepithelialen K^+ -Bewegung während anisoosmolarer Bedingungen ist offenkundig nicht eine Änderung der Aktivität der H^+ - K^+ -ATPase verantwortlich. Dieses Enzym ist für einen großen Teil der Aufnahme von K^+ aus dem Darmlumen über die apikale Membran verantwortlich (Sweiry & Binder, 1990). Die apikale Aufnahme von K^+ blieb sowohl bei Inkubation in hypo- als auch in hyperosmolarer Lösung unverändert (Tab. III.1). Auch die basolateralen Aufnahmewege für K^+ sind nicht an der Veränderung des transepithelialen K^+ -Transportes bei Zellschwellung bzw. -schrumpfung beteiligt. Die Aufnahme von K^+ aus dem serosalen Medium blieb unter anisoosmolaren Bedingungen völlig unverändert (Tab. III.1). Basolateral wird K^+ durch die Na^+ - K^+ -ATPase und den Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporter aufgenommen (s. Schultheiss & Diener, 1997), wobei unter basalen Bedingungen, d.h. wenn die Enterozyten nicht durch cAMP stimuliert werden, die K^+ -Aufnahme hauptsächlich durch die Na^+ - K^+ -ATPase vermittelt wird (Diener et al., 1996). Die einzige interessante Beobachtung in diesen beiden Versuchsreihen bestand in der Abhängigkeit des basolateralen

$^{86}\text{Rb}^+$ -Uptakes von der extrazellulären Na^+ -Konzentration. Die basolaterale K^+ -Aufnahme war 2 bis 3 mal größer in beiden Kolonabschnitten, wenn die Na^+ -Konzentration von $57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht war. Dieser Befund lässt sich mit der bekannten Na^+ -Abhängigkeit der basolateralen K^+ -Aufnahmewege, d.h. der Na^+ - K^+ -ATPase und des Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporters, gut in Einklang bringen.

Die K^+ -Kanäle in der apikalen und basolateralen Membran scheinen hingegen unter der Kontrolle des Zellvolumens zu stehen, wie die entsprechenden Efflux-Versuche zeigen (Abb. III.2). Zellschwellung induziert eine Stimulation des apikalen und basolateralen K^+ -Ausstroms in beiden Kolonabschnitten; ein Effekt, der wahrscheinlich durch die Öffnung von K^+ -Kanälen vermittelt wird. Andererseits verminderte Zellschrumpfung den K^+ -Ausstrom, wenn auch dieser Effekt relativ klein war. Eine Hemmung des K^+ -Effluxes nach Zellschrumpfung wurde bereits an Hühner-Erythrozyten (Monteiro & Ilundáin, 1988), Rattenieren (Haddad & Graf, 1989) und dem Luftröhrenepithel des Hundes (Butt et al., 1990) beobachtet. Auch am Kolon der Ratte sind in Patch-Clamp Versuchen volumensensitive K^+ -Kanäle nachgewiesen worden. Zellschwellung in einem hypoosmolaren Medium lässt die K^+ - Leitfähigkeit der Kryptenzellen ansteigen (Diener & Scharrer, 1995), während Zellschrumpfung sie absinken lässt (Weyand et al., 1998).

Die Verminderung des basolateralen Effluxes zusammen mit der Hemmung des mucosa-nach-serosa Flusses (J_{ms}) während der Zellschrumpfung lässt vermuten, dass die volumenabhängigen basolateralen K^+ -Kanäle unter isoosmolaren Bedingungen schon zum Teil geöffnet sind. Damit sind sie für die Extrusion der resorbierten

K⁺-Ionen aus dem Kolonepithel auf die Blutseite zuständig. Es wird vermutet, dass außer K⁺-Kanälen auch andere Transporter wie der KCl-Cotransporter an diesem Ausschleusungsprozess teilnehmen. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass Blockade basolateraler K⁺-Kanäle die K⁺-Resorption nur mäßig zu hemmen vermag (Binder & Sandle, 1994; Diener et al., 1996; Diecke & Beyer-Mears, 1997; Hernández & Cristina, 1998).

Die volumensensitiven basolateralen K⁺-Kanäle erwiesen sich als empfindlich gegen Quinin (Tab. III. 3 und 5). Paradoxerweise war Quinin im distalen Kolon auch dann wirksam, wenn es von der apikalen Seite, d.h. über die mucosale Badlösung, appliziert wurde (Tab. III.3). Dies hängt wahrscheinlich mit der starken Lipophilie dieser Substanz zusammen (Wangemann et al., 1992), so dass der Blocker auch bei Gabe in das mucosale Kompartiment nach Diffusion durch die apikale Membran die basolateralen Kanäle erreichen kann. Die volumensensitiven K⁺-Kanäle ließen sich dagegen insbesondere im distalen Kolon durch den K⁺-Kanalblocker Ba²⁺ hemmen (Tab. III.2 und 4).

IV.3 Intrazelluläre Vermittlung der Zellvolumenregulation am Kolonepithel der Ratte

Die erhobenen Daten erlauben keine definitive Abklärung der intrazellulären Mechanismen, über die bei Volumenänderung die Kanäle in der Zellmembran des Kolonepithels reguliert werden. Mit einigen wenigen Ausnahmen (Hall et al., 1996) geht eine Zellschwellung mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einher, welche für die Aktivierung von Ca²⁺-

abhängigen K^+ -Kanälen verantwortlich ist (Hazama & Okada 1988; McCarty & O'Neil, 1992; Schwab et al., 1999). In meinen Versuchen hingegen erwies sich die Aktivierung des schwellungsinduzierten Effluxes in einem Ca^{2+} -freien Medium (mit dem Ca^{2+} -Chelator EGTA und einer erhöhten Mg^{2+} -Konzentration) als im wesentlichen unverändert (Abb. III.5A). Allerdings war die Stimulation des apikalen Effluxes im distalen Kolon unter Ca^{2+} -freien Bedingungen weniger lang anhaltend und die des basolateralen Effluxes im proximalen Kolon deutlich verlangsamt (Abb. III.5A). Auch Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms in das Epithel mit La^{3+} , einem Hemmstoff nichtselektiver Kationenkanäle, die für die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum verantwortlich sind (Frings et al., 1999), hatte keine Wirkung auf die Stimulation des apikalen oder basolateralen Effluxes nach Zellschwellung (Abb. III.4.C). Dementsprechend erscheint es unwahrscheinlich, dass ein Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum oder eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, welche durch Speicherentleerung zur Aktivierung des La^{3+} -sensitiven nichtselektiven Kationenkanals führt (Frings et al., 1999), für die Stimulation des schwellungsinduzierten apikalen oder basolateralen K^+ -Effluxes verantwortlich ist.

Die von anderen Zelltypen her bekannte Beziehung zwischen Zytoskelett und der Zellvolumenregulation wurde durch die Anwendung verschiedener Inhibitoren von Zytoskelettbestandteilen geprüft. Die Vorbehandlung des Epithels mit Brefeldin A, einem Blocker des vesikulären Transports zwischen dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (Lippincott-Schwarz et al., 1990; Bajnath et al., 1995), oder mit Cytochalasin D, einem Hemmstoff der

Actinpolymerisation (Lin et al., 1980), hatte keine hemmende Wirkung auf die Stimulation des Kalium-Effluxes während einer Zellschwellung (Abb. III.5.C, Tab. III.2-5). Im Gegenteil fiel die schwellungsinduzierte Stimulation des mucosalen K^+ -Effluxes sogar signifikant höher aus in Gegenwart von Brefeldin A (Tab. III.2 und 4). Nur bei der Vorbehandlung mit Colchicin, einem Mikrotubuli-Depolimerisator (Achler et al., 1989; Schroer & Sheetz, 1991), war die Stimulation des mucosalen Effluxes im proximalen Kolon leicht vermindert, hier war bereits nach 6 Minuten der initial durch Schwellung erhöhte apikale K^+ -Efflux auf das alte Kontrollniveau abgesunken (Abb. III.5.B). Somit ist es möglich, dass die Mikrotubuli an der Regulation der volumensensitiven K^+ -Kanäle während längerer Zellschwellung beteiligt sind.

Neben der bei vielen Zellen vermuteten Rolle des Ca^{2+} -Signalweges bzw. des Zytoskeletts darf man nicht außerachtlassen, dass es direkt mechanosensitive Kanäle gibt (Sachs, 1997; Dubinsky et al., 1999), also Kanäle, deren Öffnungswahrscheinlichkeit durch Dehnung der Membran verändert wird. Falls die volumensensitiven K^+ -Kanäle am Kolonepithel diese Eigenschaften besäßen, könnte dies die Erklärung für die Beobachtung sein, dass Blockade des Zytoskeletts, das normalerweise die osmotisch induzierte Membrandehnung limitiert, die K^+ -Freisetzung über die apikale Membran nach Zellschwellung erhöht (Abb. III.5.C, Tab. III.2 und 4).

Unter basalen, d.h. isoosmolaren Bedingungen ist der serosale K^+ -Efflux ungefähr 2 bis 3 mal größer als der mucosale Efflux (Abb. III.2), ein Verhältnis, das die verschiedenen K^+ -Permeabilitäten von beiden Zellpolen widerspiegelt. Diese basale K^+ -Permeabilität zeigt einige interessante Abhängigkeiten. Wenn der Einstrom von Ca^{2+} in

das Epithel gehemmt wird, sei es durch Einsatz Ca^{2+} -freier Puffer auf der serosalen Seite (Abb. III.5.A) oder durch Blockierung der für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlichen Kationenkanäle mit La^{3+} (Abb. III.4.C), vermindert sich der basale K^+ -Efflux durch die basolaterale Membran und der Efflux über die apikale Membran steigt kompensatorisch an. Der Effekt ist so stark, dass die ansonsten um den Faktor 2 bis 3 differierenden Ausstromraten über beide Zellpole auf das gleiche Niveau kommen. Dies bedeutet, dass ein großer Teil der basalen basolateralen K^+ -Leitfähigkeit unter der Kontrolle der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steht.

Eine ähnliche Umverteilung zwischen apikalen und basolateralen K^+ -Leitfähigkeiten wurde bei der Anwendung von Brefeldin A beobachtet (Abb. III.5.C). Hemmung des intrazellulären vesikulären Transports durch Brefeldin A stört anscheinend die Verteilung von K^+ -Kanälen zwischen apikalem und basolateralem Zellpol. Da die Vorbehandlungszeit mit Brefeldin A nur 60 min vor Beginn der Effluxmessungen betrug, bedeutet dies, dass die K^+ -Kanäle, zumindest in der basolateralen Membran, einem sehr schnellen Turnover unterliegen müssen.

IV.4 Schlussfolgerung

Meine Ergebnisse weisen auf eine Rolle von volumensensitiven K^+ -Kanälen bei der Regulation des transepithelialen K^+ -Transportes am Kolon der Ratte hin (Abb. IV.1 und IV.2). Zellschwellung, die physiologischerweise bei einer Stimulation der NaCl -Resorption auftritt (Diener et al., 1994), verursacht die Öffnung von apikalen und basolateralen K^+ -Kanälen. Folge ist eine Hyperpolarisation der Zelle, die einen Ausstrom von Cl^- über volumensensitive basolaterale

Cl⁻-Kanäle antreibt (Diener et al., 1992), und parallel dazu durch Öffnung der apikalen K⁺-Kanäle eine K⁺-Sekretion verursacht. Auf der anderen Seite führt Zellschrumpfung zu einer partiellen Verminderung der K⁺-Resorption, wahrscheinlich durch die Hemmung von basolateralen K⁺-Kanäle. Intrazelluläres Ca²⁺ und das Zytoskelett spielen eine Rolle bei der Regulation der basalen K⁺-Leitfähigkeit der apikalen und der basolateralen Membran, sind aber nicht direkt ursächlich für das Öffnen der volumensensitiven Kanäle verantwortlich. Im Gegenteil scheint das Zytoskelett die Aktivierung der apikalen volumensensitiven K⁺-Kanäle eher zu limitieren. Die Änderungen im transepithelialen K⁺-Transport bei Zellvolumenänderungen sind ein Beispiel für den sogenannten „*Cross Talk*“ (s. Lau et al., 1984) zwischen den Membranen an beiden Zellpolen von Epithelzellen. Das bedeutet, dass Ungleichgewichte in den Transportraten von Ionen über die apikale bzw. basolaterale Membran über Volumenveränderungen zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts führen.

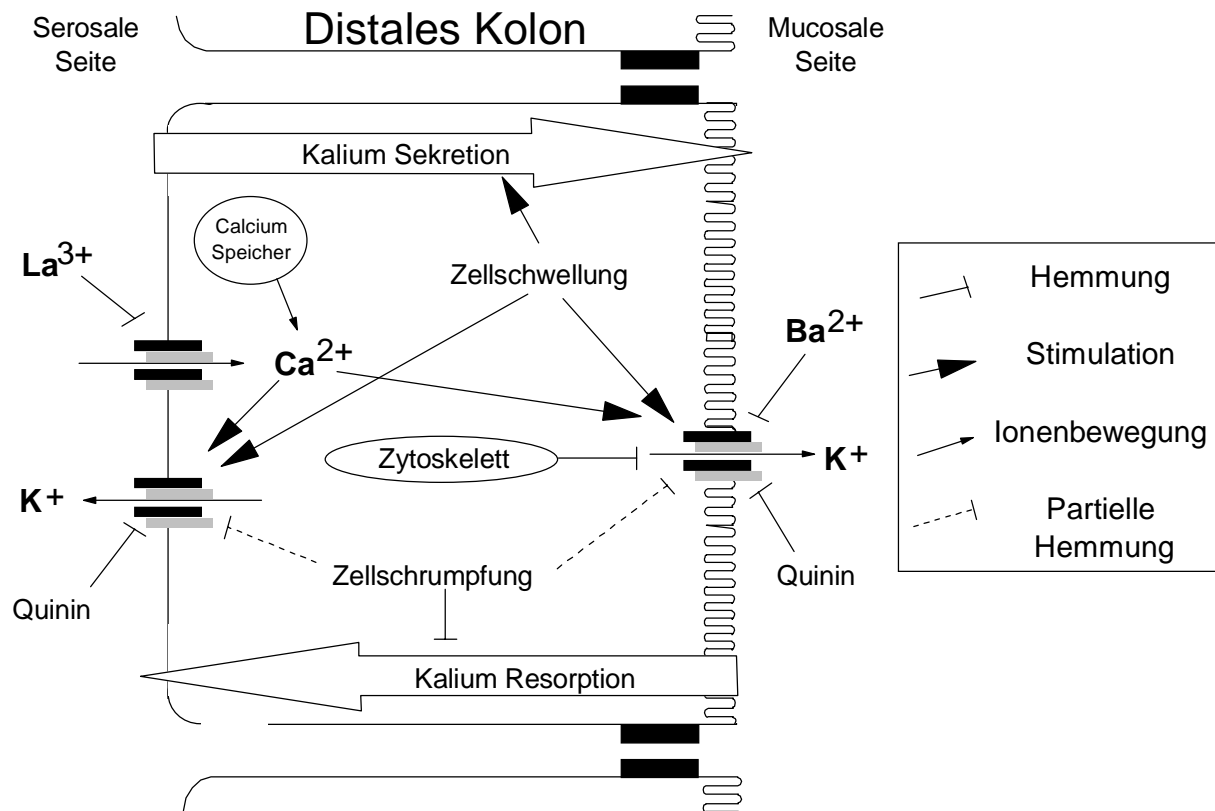


Abb. IV.1: Regulation des K^+ -Transportes durch das Zellvolumen im distalen Kolon.

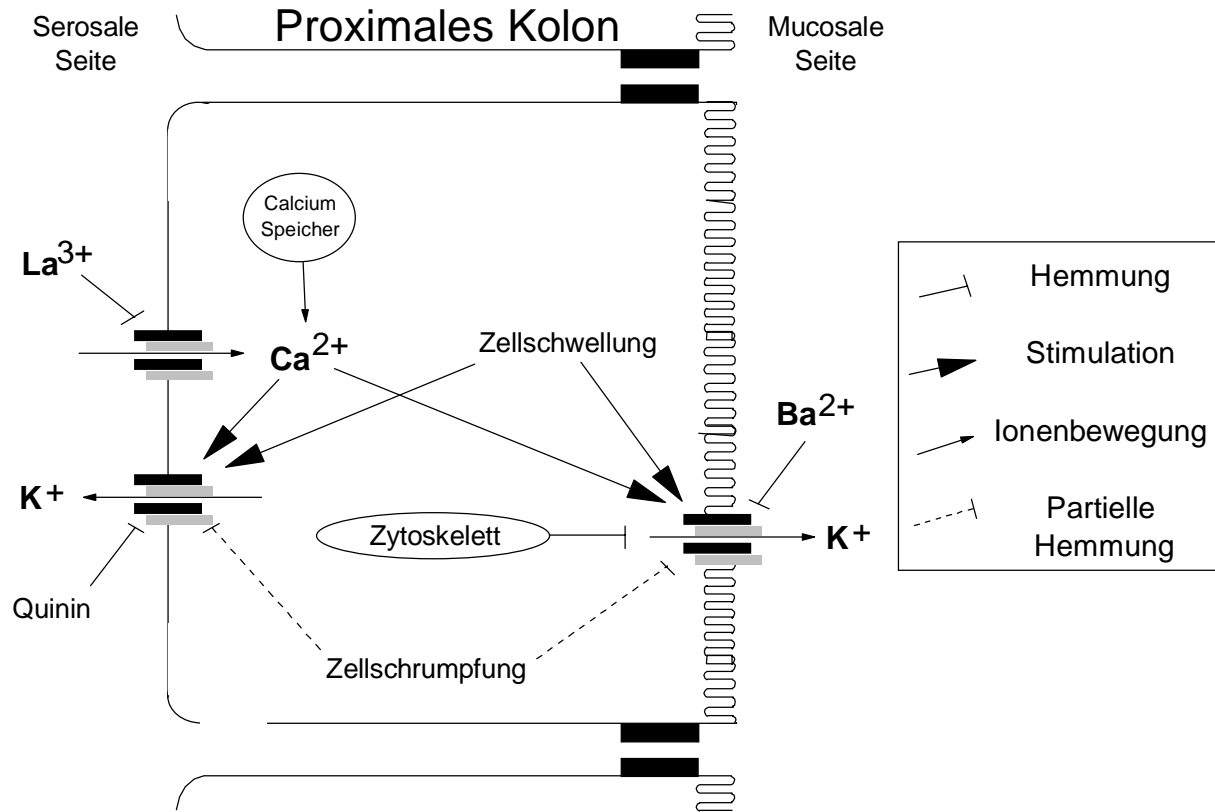


Abb. IV.2: Regulation des K^+ -Transportes durch das Zellvolumen im proximalen Kolon.

V Zusammenfassung

Der intestinale Kaliumtransport wird durch verschiedene Second Messenger Systeme (v.a. cAMP und Ca^{2+}) reguliert. Ein anderer Signalweg, der Einfluss auf z.B. den Na^+ - und Cl^- -Transport nimmt, ist das Zellvolumen. Volumensensitive K^+ -Kanäle kommen in der basolateralen Membran von Kolonkryptenzellen vor. Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluss Veränderungen im Zellvolumen auf den transepithelialen K^+ -Transport haben.

Eine Zellschwellung wurde durch ein hypoosmolares Medium induziert. Veränderungen im Ionentransport am distalen und proximalen Kolon der Ratte wurden mit Hilfe von unidirektionalen Flüssen, Efflux- und Uptake-Versuchen erfasst; als Marker für K^+ wurde $^{86}\text{Rb}^+$ eingesetzt.

Am distalen Kolon induzierte eine Zellschwellung, ausgelöst durch ein hypoosmolares Medium, eine Netto- K^+ -Sekretion. Im Unterschied dazu führte die Inkubation des Gewebes in einem hyperosmolaren Medium - vermittelt über eine Zellschrumpfung - zu einer Hemmung des resorptiven Flusses (J_{ms}) von K^+ , insbesondere am distalen Kolon.

Die Regulation des K^+ -Transportes durch das Zellvolumen ist nicht auf eine Änderung in den Aktivitäten von K^+ -Aufnahmemechanismen zurückzuführen, da weder ein hypo- noch ein hyperosmolares Medium einen Effekt auf den K^+ -Uptake zeigte. Stattdessen wurde der K^+ -Ausstrom verändert. Zellschwellung stimulierte den K^+ -Efflux in beiden Dickdarmabschnitten, während Zellschrumpfung ihn verminderte. Der apikale schwellungsinduzierte Efflux erwies sich als sensitiv gegenüber dem K^+ -Kanalblocker Ba^{2+}

und der basolaterale gegenüber dem K⁺-Kanallocker Quinin am distalen Kolon.

Inkubation in einer Ca²⁺-freien Lösung mit 5 mmol·l⁻¹ Mg²⁺ und Zugabe von La³⁺, einem unspezifischen Kationen-Kanallocker, verminderten den basalen Efflux durch die basolaterale Membran im distalen Kolon. Den gleichen Effekt zeigte eine Versuchsserie mit Brefeldin A, welches den Transport von neu synthetisierten Proteinen aus dem Golgi-Apparat hemmt. Die Stimulation des Effluxes durch Zellschwellung blieb jedoch unverändert. Im Gegenteil war die Stimulation des apikalen K⁺-Effluxes in Gegenwart von Inhibitoren des Zytoskeletts wie Colchicin, welches eine Depolymerisation von Mikrotubuli auslöst, und von Brefeldin A sogar verstärkt.

Die Versuche belegen, dass volumensensitive K⁺-Kanäle, die unter anderem durch Ca²⁺ und das Zytoskelett beeinflusst werden können, an der Regulation des transepithelialen K⁺-Transportes im Kolon beteiligt sind.

VI Summary

The intestinal potassium transport is under the control of many second messenger systems (for example cAMP and Ca^{2+}). Another pathway that influences Na^{+} - and Cl^{-} -transport is the cell volume. Volume-activated K^{+} -channels are present in the basolateral membrane of colonic crypts. Therefore the aim of this work was to investigate if there is a volume influence at the transepithelial K^{+} transport.

The effect of cell swelling and cell shrinkage on K^{+} transport across the rat colonic epithelium was studied by measuring unidirectional fluxes, uptake and efflux of $^{86}\text{Rb}^{+}$, a marker for K^{+} .

Exposure to a hypotonic medium stimulated the secretory, serosa-to-mucosa flux of K^{+} , whereas exposure to a hypertonic medium inhibited the absorptive, mucosa-to-serosa flux of K^{+} in the distal, but not in the proximal colon. Neither manoeuvre had any effect on the uptake of K^{+} across the apical or the basolateral membrane.

Cell swelling stimulated apical and basolateral K^{+} efflux in both colonic segments, whereas cell shrinkage reduced it. The stimulation of the swelling-induced K^{+} efflux in the distal colon is Ba^{2+} sensitive at the apical side and quinine sensitive at the basolateral side. Incubation of the tissue in Ca^{2+} -free buffer and La^{3+} , which blocks Ca^{2+} -influx into the epithelium side, strongly reduced the basal K^{+} efflux across the basolateral membrane. The same was observed with brefeldin A, a blocker of the transport of newly synthesized proteins out of the endoplasmatic reticulum. Swelling-induced K^{+} efflux, however, was not reduced. Hypotonically-stimulated apical K^{+} efflux

Summary

was enhanced by drugs disturbing the cytoskeleton such as colchicine, an inhibitor of the polymerisation of microtubules, and by brefeldin A.

These results demonstrate that the cell volume is involved in the regulation of transepithelial K^+ transport across the rat colonic epithelium and suggest a role of Ca^{2+} and the cytoskeleton in the control of a part of the volume-sensitive K^+ channels.

VII Literaturverzeichnis

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1995).

Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit.

In: Molekularbiologie der Zelle. Hrsg.: Jaenicke, L., 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 599-650.

ACHLER, C., FILMER, D., MERTE, C., DRENCKHAHN, D. (1989).

Role of Microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to brush border of intestinal epithelium.

J. Cell Biol. **109**: 179-189.

BAJNATH, R.B., DEKKER, K., DE JONGE, H.R. & GROOT, J.A. (1995).

Chloride secretion induced by phorbol dibutyrate and forskolin in the human colonic carcinoma cell line HT 29Cl.19A is regulated by different mechanisms.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **430**: 705-712.

BAJNATH, R.B., DE JONGE, H.R., BORGDORFF, A.J., ZUIDERWIJK, M., GROOT, J.A. (1997).

Characterization of swelling-induced ion transport in HT-29Cl.19A cells. Role of inorganic and organic osmolytes during regulatory volume decrease.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **433**: 276-286.

BENYAJATI, S., RENFRO, J.L. (2000).

Taurine secretion in primary monolayer cultures of flounder renal epithelium: stimulation by low osmolality.

Am. J. Physiol. **279**: R704-R712.

BINDER, H.J. & SANDLE, G.I. (1994).

Electrolyte Transport in the Mammalian Colon.

In.: Physiology of the Gastrointestinal Tract – Volume 2, Third Edition, Hrsg: Johnson, L.R.. Raven Press, New York. **64**: 2133-2171.

BINDER, H.J., STANGE, G., MURER, H., STEIGER, B., HAURI, H-P. (1986).

Sodium-proton exchange in colon brush border membranes.

Am. J. Physiol. **251**: G382-390.

BÖHME, M., DIENER, M. & RUMMEL, W. (1991).

Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **419**: 114-151.

- BOURGUIGNON, L.Y., IIDA, N., JIN, H. (1993).**
The involvement of the cytoskeleton in the regulating IP₃ receptor-mediated internal Ca²⁺ release in human blood platelets.
Cell. Biol. Int. **17**: 751-758.
- BRETON, S., MARSOLAIS, M., LAPRADE, R. (1995).**
Hypotonicity increases basolateral taurine permeability in rabbit proximal convoluted tubule.
Am. J. Physiol. **268**: F595-F603.
- BRÖCKER, B. (1976).**
Detektoren. dtv – Atlas zur Atomphysik Tafel und Texte. Original Ausgabe, Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG., München, 146-149.
- BUTT, A.G., CLAPP, W.L., FRIZZELL, R.A. (1990).**
Potassium conductances in tracheal epithelium activated by secretion and cell swelling.
Am. J. Physiol. **258**: C630-C638.
- CANNON, C.L., BASAVAPPA, S., STRANGE, K. (1998).**
Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel.
Am. J. Physiol. **275**: C416-C422.
- COHEN, M.E., WESOLEK, J., McCULLEN, J., RYS-SIKORA, K., PANDOL, S., ROOD, R.P., SHARP, G.W.G., DONOWITZ, M. (1991).**
Carbachol-induced and elevated Ca²⁺-induced translocation of functionally active protein kinase C to the brush border of rabbit ileal Na⁺ absorbing cells.
J. Clin. Invest. **88**: 855-863.
- CURRAN, P.F., SCHWARZ, G.F. (1960).**
Na, Cl and Water transport by the rat colon.
J. Gen. Physiol. **45**: 555-571.
- DE SMET, P., LI, J., VAN DRIESSCHE, W. (1998).**
Hypotonicity activates a lanthanide-sensitive pathway for K⁺ release in A6 epithelia.
Am. J. Physiol. **275**: C189-C199.
- DEL CASTILLO, J.R., RAJENDRAN, V.M., BINDER, H.J. (1991).**
Apical membrane localization of ouabain-sensitive K-activated ATPase activities in rat distal colon.
Am. J. Physiol. **261**: G1005-G1011.
- DEVROEDE, G.J., PHILLIPS, S.F. (1969).**

Conservation of sodium chloride and water by the human colon.
Gastroenterology **56**: 421-426.

DIECKE, F.P.J., BEYER-MEARS, A. (1997).

A mechanism for regulatory volume decrease in cultured lens epithelial cells.
Curr. Eye Res. **16**: 279-288.

DIENER, M., HUG, F., STRABEL, D., SCHARRER, E. (1996).

Cyclic AMP-dependent regulation of K⁺ transport in the rat distal colon.
Brit. J. Pharmacol. **118**: 1477-1487.

DIENER M., MESTRES P., BRIDGES R.J., RUMMEL W. (1989).

Functional and morphological changes during electric field stimulation of rat colon descendens.

In.: Nerves and the Gastrointestinal Tract. Hrsg.: Singer M.v., Goebell H., MTP Press, Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht, pp. 705-712.

DIENER, M., NOBLES, M., RUMMEL, W. (1992).

Activation of basolateral Cl⁻ channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **421**: 530-538.

DIENER, M., PETER, A., SCHARRER, E. (1994).

The role of volume-sensitive Cl⁻ channels in the stimulation of chloride absorption by short-chain fatty acids in the rat colon.
Acta Physiol. Scand. **151**: 385-394.

DIENER, M., SCHARRER, E. (1994).

The effect of short-chain fatty acids on Cl⁻ and K⁺ conductance in rat colonic crypts.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **426**: 472-480.

DIENER, M., SCHARRER, E. (1995).

Swelling-activated conductances for chloride, potassium and amino acids in the rat colon: A whole-cell study.
Exp. Physiol. **80**: 411-428.

DUDEL, J. (1995).

Grundlagen der Zellphysiologie.
In: Physiologie des Menschens. 26. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **1**: 3-19.

DUBINSKY, W.P., MAYORGA-WARK, O., SCHULTZ, S.G. (1999).

Volume regulatory response of basolateral membrane vesicles from Necturus enterocytes: Role of the cytoskeleton.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 9421-9426.

EHRENFELD, J., RASCHI, C., BROCHIERO, E. (1994).

Basolateral potassium membrane permeability of A6 cells and volume regulation.

J. Membrane Biol. **138**: 181-195.

EHRLEIN, H.J. (2000).

Physiologie der Magen-Darm-Kanals – Motorik des Dickdarmes.

In: Physiologie der Haustiere. Hrsg.: W.v. Engelhardt und G. Breves, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart. **15**: 323-327.

FENNER, W.R.(1991).

Störungen des Elektrolytgleichgewichtes.

In: Kleintierkrankheiten. 2nd. Ed.. Columbus, Ohio.

FOSTER, E.S., BUDINGER, M.E., HAYSLETT, J.P., BINDER, H.J. (1986a).

Ion exchange in the rat proximal colon. Sodium depletion stimulates neutral sodium chloride absorption.

J. Clin. Invest. **77**: 228-235.

FOSTER, E.S., DUDEJA, P.K., BRASITUS, T.A. (1986b).

Na⁺/H⁺ exchange in rat colonic brush-border membrane vesicles.

Am. J. Physiol. **250**: G781-787.

FOSTER, E.S., HAYSLETT J.P., BINDER H.J. (1984).

Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon.

Am. J. Physiol. **245**: G611-617.

FOSTER, E.S., SANDLE, G.I., HAYSLETT, J.P., BINDER, H.J. (1983).

Cyclic adenosine monophosphate stimulates active potassium secretion in the rat colon.

Gastroenterology **84**: 324-330.

FRINGS, M., SCHULTHEISS, G., DIENER, M. (1999).

Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **439**: 39-48

FROMM, M., HIERHOLZER, K. (1995).

a) *Epithelien*, **34**: 719-736.

b) *Wasser- und Elektrolythaushalt*, **36**: 778-791.

In: Physiologie des Menschen. 26. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

GANONG, W.F. (1995).

Digestion & Absorption and Regulation of Gastrointestinal Funktion.

In: Review of Medical Physiology. 17th edition. Prentice-Hall International (UK) Limited, London. **25-26**:431-71.

GREENE, E.C. (1959).

The Anatomy of the Rat. Volume XXVII.
Hafner Publishing Co., New York.

GREGER, R. (1996).

a) *Membrane voltage and Preservation of the Ionic Distribution Across the Cell Membrane*, pp **11**:245-265.

b) *Epithelial Transport*, pp **59**: 1217-1232.

c) *Principles of Renal Transport; Concentration and Dilution of Urine*, pp **74**: 1489-1516.

In: Comprehensive Human Physiology. Volume 1 and 2. Hrsg.: R. Greger, U. Windhorst. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

GUIZOUARN, H., MOTAIS, R. (1999).

Swelling activation of transport pathways in erythrocytes : effects of Cl⁻, ionic strength, and volume changes.

Am. J. Physiol. **276**: C210-C220.

HADDAD, P., GRAF, J. (1989).

Volume-regulatory K⁺ fluxes in the isolated perfused rat liver: characterization by ion transport inhibitors.

Am. J. Physiol. **257**: G357-G363.

HALL, A.C., STARKS, I., SHOULTS, C.L., RASHIDBIGI, S. (1996).

Pathways for K⁺ transport across the bovine articular chondrocyte membrane and their sensitivity to cell volume.

Am. J. Physiol. **270**: C1300-C1310.

HARA, E., REINACH, P.S., WEN, Q., ISEROVICH, P., FISCHBARG, J. (1999).

Fluoxetine inhibits K⁺ transport pathways (K⁺ efflux, Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport and Na⁺ pump) underlying volume regulation in corneal endothelial cells.

J. Membrane Biol. **171**: 75-85.

HARDCASTLE, J., HARDCASTLE, P.T., NOBLE, J.M. (1985).

The secretory action of barium chlorid in rat colon.

J. Physiol. **361**: 39-48.

HARTMANN, H. (1994).

Funktionelle Störungen des Elektrolythaushaltes.

In: Klinische Pathologie der Haustiere. Hrsg.: H. Hartmann und H. Meyer, Gustav Fischer Verlag Jena. **8**: 216-217.

HASCHKE, G., DIENER, M. (1999)

a) *Zellphysiologie: Die Zellmembran.*

b) *Magen-Darm-Trakt: Dünn und Dickdarm.*

In: Multimedia für Physiologie. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

HAZAMA, A., OKADA, Y. (1988).

Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells.

J. Physiol. **402**: 687-702.

HAZAMA, A., OKADA, Y. (1990).

Involvement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in the volume regulation of human epithelial cells exposed to a hypotonic medium.

Biochem. Biophys. Res. Comm. **167**: 287-293.

HEINKE, B., HÖRGER, S., DIENER, M. (1998).

Mechanisms of carbachol-induced alterations in K⁺ transport across the rat colon.

Eur. J. Pharmacol. **362**: 199-206.

HEINKE, B., RIBEIRO, R., DIENER, M. (1999).

Involvement of calmodulin and protein kinase C in the regulation of K⁺ transport by carbachol across the rat distal colon.

Eur. J. Pharmacol. **377**: 75-80.

HERNÁNDEZ, J.A., CRISTINA, E. (1998).

Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells : the roles of the Na⁺ pump and cotransport systems.

Am. J. Physiol. **275**: C1067-C1080.

HEITZMANN, D., WARTH, R., BLEICH, M., HENGER, A., NITSCHKE, R., GREGER, R. (2000).

Regulation of the Na⁺2Cl⁻K⁺ cotransporter in isolated rat colon crypts.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **439**: 378-384.

HOFFMANN, E.K., KOLB, H.-A. (1991).

Mechanisms of Activation of Regulatory Volume Responses after Cell Swelling.

Adv. Environ. Physiol. **9**: 140-185.

JANMEY, P.A. (1998).

The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling.

Physiol. Rev. **78**: (3) 763-781.

KING, P.A., GOLDSTEIN, L. (1983).

Organic osmolytes and cell volume regulation in fish.

Mol. Physiol. **4**: 53-66.

KLAERKE, D.A. (1995).

Purification and characterization of epithelial Ca^{2+} -activated K^+ channels.
Kidney International. **48**: 1047-1056.

KONE, B.C., HIGHAM, S.C. (1998).

A novel N-terminal splice variant of the rat H^+ - K^+ -ATPase $\alpha 2$ Subunit.
J. Biol. Chemistry. **273**: (5) 2543-2552.

LANGE, F. (1996).

K^+ Metabolism.

In: Comprehensive Human Physiology. Volume 1 and 2. Hrsg.: R. Greger, U. Windhorst. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp **79**: 1585-1593.

LANGE, K., BRANDT, U. (1996).

Calcium storage and release properties of F-actin: evidence for the involvement of F-actin in cellular calcium signalling.

FEBS Lett. **395**: 137-142.

LANGE, K. (1999).

Microvillar Ca^{2+} signalling : a new view of an old problem.

J. Cell. Physiol. **180**: 19-34.

LANGE, K. (2000).

Regulation of cell volume via microvillar ion channels.

J. Cell. Physiol. **185**: 21-35.

LARSON, M., SPRING, K.R. (1987).

Volume Regulation in Epithelia.

In: Current Topics in Membranes and Transport. Vol. 30. Acad. Press. Inc. 105-123.

LAU, K.R., HUDSON, R., SCHULTZ, S.G. (1984).

*Cell swelling increases a barium inhibitable potassium conductance in the basolateral membrane of *Necturus* small intestine.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 3591-3594.

LEVINSON, C. (1992).

Regulatory volume increase in ehrlich ascites tumor cells is mediated by the Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -cotransport system.

J. Membrane Biol. **176**: 277-284.

LEVITAN, I., ALMONTE, C., MOLLARD, P., GARBER, S.S. (1995).

Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin.

J. Membrane Biol. **147**: 283-294.

LIEBICH, H. -G. (1999).

Verdauungsapparat (Apparatus digestorius).

In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 3. Auflage. Schattauer Verlag Stuttgart-New York. **10**: 215-230.

LIN, D.C., TOBIN, K.D., GRUMET, M., LIN, S. (1980).

Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerisation by blocking filament elongation.

J. Cell Biol. **84**: 455-460.

LINDSTRÖM, C.G., ROSENGREN, J.-E. , FORK, F.-T. (1979).

Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation.

Acta Radiol. Diagn. **20**: 523-536.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., DONALSON, J.G., SCHWEIZER, A., BERGER, E.G., HAURI, H.P., YUAN, L.C., KLAUSNER, R.D. (1990).

Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway.

Cell. **60**: 821-836.

MALAGODI, M.H. (1974).

Pharmacological evaluation of a new Ca²⁺ antagonist, 8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5 trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8): Studies in smooth muscle.

Eur. J. Pharmacol. **27**: 25-33.

MALLOUK, N., ALLARD, B. (2000).

Stretch-induced activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse skeletal muscle fibers.

Am. J. Physiol. **278**: C473-C479.

MANDEL, K.G., McROBERTS, J.A., BEUERLEIN, G., FOSTER, E.S. & DHARMSATHAPHORN, K. (1986).

Ba²⁺ inhibition of VIP- and A23187-stimulated Cl⁻ secretion by T84 cell monolayers.

Am. J. Physiol. **250**: C486-94.

McCARTY, N.A., O'NEIL, R.G. (1992).

Calcium signalling in cell volume regulation.

Physiol. Rev. **72**: 1037-1061.

McLEOD, R.J., HAMILTON, J.R. (1990).

Regulatory volume increase in mammalian jejunal villus cells is due to bumetanide-sensitive NaKCl₂ cotransport.

Am. J. Physiol. **258**: G665-G674.

MENDELIN, K. (1998).

In-vitro-Untersuchung zur Wirkung von Ampicillin und Cephalexin auf den mikrobiellen Dickdarmstoffwechsel.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. **2:** 2-10.

MILLS, J.W. (1987).

The cel cytoskeleton: Possible role in volume control.

In: Current Topics in Membran Transport. Cell Volume Control: Fundamental and Corporative Aspects in Animal Cells. Hrsg.: R. Gilles, A. Kleinzeller, L. Bolis, Academic Press San Diego. 75-101.

MINTON, A.P., COLCLASURE, G.C., PARKER, J.C. (1992).

Model for a role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89:** 10504-10506.

MITO, T., DELAMERE, N.A., COCA-PRADOS, M. (1993).

Calcium-dependent regulation of cation transport in cultured human nonpigmented ciliary epithelial cells.

Am. J. Physiol. **264:** C519-C526.

MONTEIRO, M.C., ILUNDÁIN, A. (1988).

Effects of anisotonic buffers on K⁺ transport in isolated chicken enterocytes.

Biochim. Biophys. Acta **979:** (198) 269-271.

NILIUS, B., EGGERMONT, J., VOETS, T., BUYSE, G., MANOLOPOULOS, V., DROOGMANS, G. (1997).

Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells.

Prog. Biophys. Molec. Biol. **68:** (1) 69-119.

OKADA, Y. (1997).

Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor.

Am. J. Physiol. **273:** C755-C789.

OLDS, R.J., OLDS, J.R. (1984).

Farbatlas der Anatomie der Ratte.

Schober Verlags-GmbH, Hengersberg.

PARSONS D. S., PATERSON C.R. (1965).

Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.

Quarterly Journal of Experimental Physiology **50:** 220-231.

PERRY, P.B., O'NEILL, W.C. (1993).

Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels.

Am. J. Physiol. **265:** C763-C769.

PUTNEY, L.K., VIBAT, C.R.T., O'DONNELL, M.E. (1999).

Intracellular Cl regulates Na-K-Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells.

Am. J. Physiol. **277**: C373-C383.

RAJENDRAN, V.M., BINDER, H.J. (1999).

Distribution and regulation of apical Cl/anion exchanges in surface and crypt cells of rat distal colon.

Am. J. Physiol. **276**: G132-G137.

RAJENDRAN, V.M., KASCHGARIAN, M., BINDER, H.J. (1989).

Aldosterone induction of electrogenic sodium transport in the apikal membrane vesicles of rat distal colon.

J. Biol. Chem. **264**: 18638-18644.

RAJENDRAN, V.M., OESTERLIN, M., BINDER, H.J. (1991).

Sodium uptake across the basolateral membrane of rat distal colon: evidence of Na-H exchange and Na-anion cotransport.

J. Clin. Invest. **88**: 1379-1385.

RUHFUS, B., KINNE, R.K.H. (1996).

Hypotonicity-activated efflux of taurine and myo-inositol in rat inner medullary collecting duct cells: evidence for a major common pathway.

Kidney Blood Press Res. **19**: 317-324.

SACHS, J.R. (1996).

Cell volume regulation.

In: Molecular Biology of Membrane Transport Disorders. Hrsg.: Schultz, S.G. et al.. New York: Plenum Press. p. 401.

SACHS, F. (1997).

Mechanical transduction by ion channels: how forces reach the channel?

In: Cytoskeletal Regulation of Membrane Function. Hrsg.: Froehner, S.C. & Bennett, V.. The Rockefeller University Press, New York. **5**: 209-220.

SARKADI, B., PARKER, J.C. (1991).

Activation of ion transport pathways by changes in cell volume.

Biochim. Biophys. Acta **1021**: 407-427.

SCHEFFLER A. (1984).

Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer Mikrocomputer-Gesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. 24-40.

SCHRÖDER, B., DIENER, M. (2000).

Grundlagen der Zellphysiologie.

In: Physiologie der Haustiere. Hrsg.: W.v. Engelhardt und G. Breves, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart. **2**: 5-21.

SCHROER, T.A., SHEETZ, M.P. (1991).

Functions of microtubule-based motors.

Annu. Rev. Physiol. **53**: 629-652.

SCHULTHEISS, G., DIENER, M. (1997).

Regulation of apical and basolateral K^+ conductances in rat colon.

Acta Physiol. Scand. **164**: 219-228.

SCHULTHEISS, G., DIENER, M. (1998).

K^+ and Cl^- conductances in the distal colon of rat.

Gen. Pharmac. **31**: (3) 337-342.

SCHULTHEISS, G., HÖRGER, S., DIENER, M. (1998).

The bumetanide-resistant part of forskolin-induced anion secretion in rat colon.

Acta Physiol. Scand. **164**: 219-228.

SCHULTZ, S.G. (1984).

A cellular model for active sodium absorption by mammalian colon.

Annu. Rev. Physiol. **46**: 435-451.

SCHÜTT, H., SACKIN, H. (1997).

A new technique for evaluating volume sensitivity of ions channels.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **433**: 368-375.

SCHWAB, A., SCHURICHT, B., SEEGER, P., REINHARDT, J., DARTSCH, P. (1999).

Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K^+ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume.

Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol. **438**: 330-337.

SCHWIEGK, H., TURBA, F. (1961).

Grundsätzliches über Messgeräte zum Nachweis radioaktiver Strahlung – Der Szintillationszähler.

In: Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie Diagnostik und Therapie, 2. Auflage, Erste Band, Springer-Verlag, Berlin.Göttingen.Heidelberg. **5**: 31-36.

SMOLLICH, A., GÜNTHER, M. (1992).

Verdauungssystem.

In: Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2., überarb. Aufl.. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. **5**: 166-170.

SOBOTTA, J., BECHER, H. (1972).

Verdauungsapparat.

In: Atlas der Anatomie des Menschen. Hrsg.: H. Ferner, J. Staubesand. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien. Band 2 – 61-143.

STRABEL D., DIENER M. (1995).

The effect of neuropeptide Y on sodium, chloride and potassium transport across the rat distal colon.

Brit. J. Pharmacol. **115**: 1071-1079.

STRANGE, K., JACKSON, P.S. (1995).

Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels.

Kidney Int. **48**: 994-1003.

SWEIRY, J.H., BINDER, H.J. (1990).

Active potassium absorption in rat distal colon.

J. Physiol. **423**: 155-170.

TAOUIL, K., HANNAERT, P. (1999).

Evidence for the involvement of K^+ channels and K^+ - Cl^- cotransport in the regulatory volume decrease of newborn rat cardiomyocytes.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **439**: 56-66.

TIDBALL, C.S. (1964).

Magnesium and calcium as regulators of intestinal permeability.

Am. J. Physiol. **206**: 243-246.

TURNHEIM, K. (1992).

Wasser und Elektrolyte.

In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Hrsg.: Forth, W. et al. 6. Auflage. Wissenschaftsverlag Manheim, Leipzig, Wien und Zurich. Pp 410-423.

USSING, H.H. und ZEHRAN, K. (1951).

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. **23**: 110-127.

VANOYE, C.G., REUSS, L. (1999).

Stretch-activated single K^+ channels account for whole-cell currents elicited by swelling.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 6511-6516.

VAUPEL, P., EWE, K. (1995).

Funktionen des Magens-Darm-Kanals.

In: Physiologie des Menschen. 26. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **38**: 806-846.

VENGLARINK, C.J., BRIDGES, R.J. & FRIZZELL, R.A. (1990).

A simple assay for agonistregulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells.

Am. J. Physiol. **259**: C358-C364.

VOLLMERHAUS, B., ROOS, H. (1999).

Verdauungsapparat.

In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Hrsg.: J. Frewein, H. Gasse, R. Leiser, H. Roos, H. Thomé, B. Vollmerhaus, H. Waibl. 8., vollständig neubearbeitete Auflage. Parey Buchverlag, Berlin. Band II, **6**: 126-129.

WANGEMANN, P., SHIGA, N., WELCH, C., MARCUS, D.C. (1992).

Evidence for the involvement of a K⁺ channel in isosmotic cell shrinking in vestibular dark cells.

Am. J. Physiol. **263**: C616-C622.

WEYAND, B., WARTH, R., BLEICH, M., KERSTAN, D., NITSCHKE, R., GREGER, R. (1998).

Hypertonic cell shrinkage reduces the K⁺ conductance of rat colonic crypts.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **436** : 227-232.

WITTELS, K.A., HUBERT, E.M., MUSCH, M.W., GOLDSTEIN, L. (2000).

Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC.

Am. J. Physiol. **279**: R69-R76.

WORRELL, R.T. & FRIZZELL, R.A. (1991).

CaMKII mediates stimulation of chloride conductance by calcium in T84 cells.

Am. J. Physiol. **260**: C877-882.

ZHANG, J., LARSEN, T.H., LIEBERMAN, M. (1997).

F-actin modulates swelling-activated chloride current in cultured chick cardiac myocytes.

Am. J. Physiol. **273**: C1215-C1224.

VIII Danksagung

Allen sei herzlich gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. M. Diener für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Beantwortung aller Fachfragen, die intensive und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Erstellung dieser Dissertation und die intensive und mutige Hilfe bei der Ausarbeitung von Problemen, die meinen Aufenthalt und das Leben während der Doktorarbeit in Deutschland ermöglicht und angenehmer gemacht hat.

An Dr. Bernhard Heinke, Dr. Gerhard Schultheiß, Dr. Guido Haschke, Dr. Monika Frings und TÄ Gisela Seip für die Freundlichkeit und die ständige Unterstützung und Diskussionsbeiträge.

Danke an Anna-Maria von Gyimes, Alice Metternich, Bärbel Reuter, Bärbel Schmidt, Brigitta Brück, Doreen Marks, Eva-Maria Haas und Jolanta Murgott für die freundliche und angenehme Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

An Michael Haas und Silke Handstein für die gute Pflege und Versorgung der Versuchstiere, an Karl-Hermann Maurer für die Hilfsbereitschaft und Reparatur aller Versuchsmaterialien und Karin Pfeiff für die Hilfe bei Problemen, die mit Bürokratie zu tun hatten.

An alle Mitarbeiter des Institutes für Veterinär-Physiologie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

An Prof. Dr. Bernd Hoffman für die Empfehlung von Prof. Dr. M. Diener als Betreuer.

Danksagung

An meine Schwiegereltern für die Unterstützung und Freundlichkeit.

An meine Eltern, die immer alles dafür eingesetzt haben, um mir die besten Studien- und Lebensbedingungen zu ermöglichen.

An meine Frau Paula für alles und meine Tochter, die nicht ohne Grund Victoria heißt.