

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Heterogenität der Darmabschnitte

Diese Versuchsreihe zeigte einen Vergleich der Wirkung von Aldosteron an verschiedenen Abschnitten des distalen Kolons der Ratte (EDC, LDC-1, LDC-2).

Abb. 7 zeigt den Verlauf der gemittelten Stromwerte von jeweils mindestens 4 Epithelien in den drei verschiedenen Abschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten. Der nach achtstündiger Inkubation mit Aldosteron und anschließender Amiloridgabe bestimmte Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ ) betrug für EDC  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für LDC-1  $9,3 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für LDC-2  $15,3 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

	$J_{Na}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) Kontrolle	$J_{Na}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) nach 1 h	$J_{Na}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) nach 2 h	$J_{Na}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) nach 3 h	$J_{Na}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) nach 8 h	n
<b>EDC</b>	$-0,1 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,0$	$2,5 \pm 0,8$	4 – 7
<b>LDC 1</b>	$0,0 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,7$	4 – 7
<b>LDC 2</b>	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	$15,3 \pm 1,9$	6



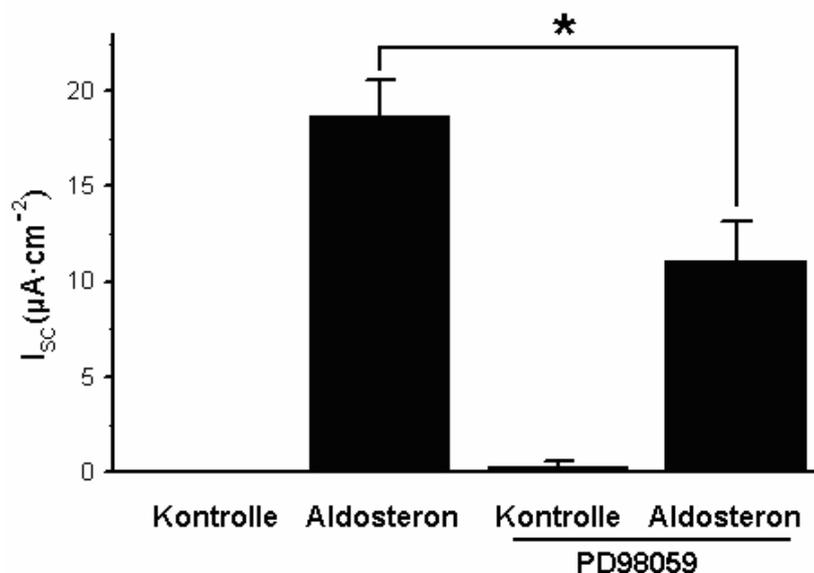
**Abbildung 7: Gemittelte Kurzschlussströme ( $I_{SC}$ ) am total gestrippten Epithel des Rattenkolons (EDC, LDC-2, LDC-1) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron.**

Die vorgenommenen Messungen zeigten, dass der Ort der stärksten Wirkung das LDC-2 war. Für sämtliche nachfolgenden Versuche wurde daher das Gewebe dieses Darmabschnittes genauer untersucht.

### 3.2 Wirkung des ERK/MAPK-Inhibitors PD98059

Abb. 8 zeigt die gemittelten Kurzschlussstromwerte von jeweils 7 Epithelien nach achtstündiger Inkubation und anschließender mukosaler Amiloridgabe. Die Wirkung von PD98059 auf LDC-2 wurde sowohl mit als auch ohne Aldosteronzugabe untersucht. Säule I zeigt dabei einen Kontrollansatz ohne Zusätze.

	$I_{sc}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	N
<b>Kontrolle</b>	$0,0 \pm 0,0$	8
<b>Aldosteron</b>	$18,7 \pm 1,9$	7
<b>PD98059</b>	$0,3 \pm 0,2$	7
<b>Aldosteron + PD98059</b>	$11,2 \pm 2,0$	7



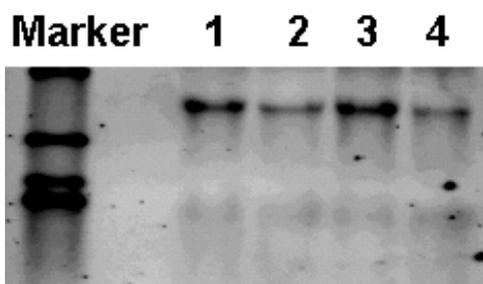
**Abbildung 8: Gemittelte Kurzschlussströme ( $I_{sc}$ ) am total gestrippten Epithel des Rattenkolons (LDC-2) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron und Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  PD98059.**

Es zeigte sich ein  $I_{sc}$  von gemittelt  $0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Durch Zugabe von  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron wurde ein elektrogener Natriumtransport induziert, der  $I_{sc}$  betrug  $18,7 \pm 1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  PD98059 alleine hatte keinen induzierenden Effekt auf den Kurzschlussstrom, dieser betrug im Mittel  $0,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die kombinierte Gabe von Aldosteron ( $3\cdot 10^{-9}$  M) und PD98059 (20  $\mu\text{M}$ ) über 8 h in der Ussing-Kammer zeigt dagegen einen amiloridhemmbaren Kurzschlussstrom von  $11,2 \pm$

2,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dieser Wert war weitaus geringer als ohne Zusatz von PD98059 (jew. n=7-8, p<0,05).

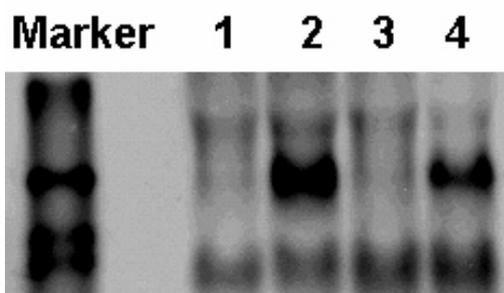
Die angefertigten Northern Blots zeigen für die drei Untereinheiten des ENaC folgende mRNA-Mengen:

Die  $\alpha$ -Untereinheit (Abb. 9) erfährt unter Aldosteron (Spur II) eine leichte Herabregulation im Vergleich zum Kontrollansatz (Spur I). Bei Zugabe von PD98059 zeigte sich kein Hinweis auf eine Änderung der RNA-Menge, weder ohne Aldosteronzugabe (Spur III) noch mit Aldosteronzugabe (Spur IV) (repräsentatives Ergebnis von n=7-8, gepoolte Proben).

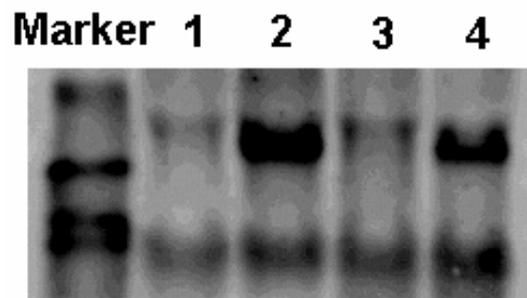


**Abbildung 9: Northern Blot der  $\alpha$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.**

Bei der Detektion der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten (Abb. 10 u. 11) zeigte sich eine starke Hochregulation der RNA bei Aldosteronzugabe. Bei alleiniger Zugabe von PD98059 (Gruppe III) ließ sich keine Änderung der mRNA detektieren. Gab man jedoch Aldosteron und PD98059 in Kombination (Gruppe IV), so war die mRNA der beiden Untereinheiten deutlich weniger hochreguliert als bei Aldosteron alleine (repräsentative Ergebnisse von je n=7-8, gepoolte Proben).



**Abbildung 10: Northern Blot der  $\beta$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.**



**Abbildung 11: Northern Blot der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.**

### 3.3 Wirkung des ERK-Inhibitors U0126

Zur Ergänzung und Kontrolle der Wirkung von PD98059 wurde U0126 als ein weiterer spezifischer Hemmstoff von ERK eingesetzt. Auch hier kam es zu einer Abnahme des Aldosteron-induzierten, Amilorid-sensitiven Kurzschlussstromes unter Zugabe des Hemmstoffes U0126. Während der gemittelte  $I_{SC}$  bei Aldosteronzugabe  $13,4 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  betrug, wurde er durch gleichzeitige Gabe von U0126 auf  $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  reduziert (Abb. 12) (jeweils  $n=3$ ,  $p<0,05$ ).

	$J_{Na} (\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$	n
Kontrolle	$0,0 \pm 0,1$	3
Aldosteron	$13,4 \pm 1,1$	3
U0126	$0,2 \pm 0,2$	3
Aldosteron + U0126	$3,3 \pm 0,2$	3

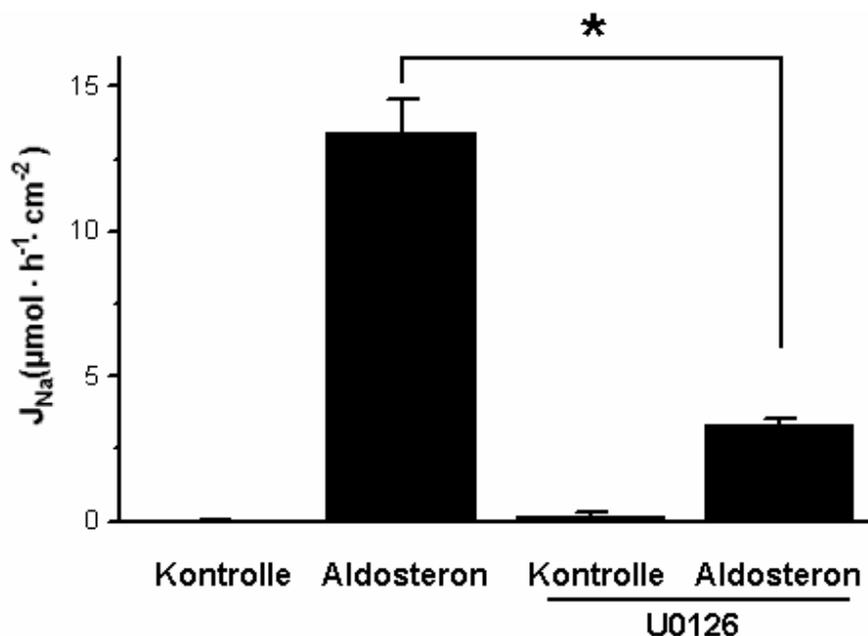


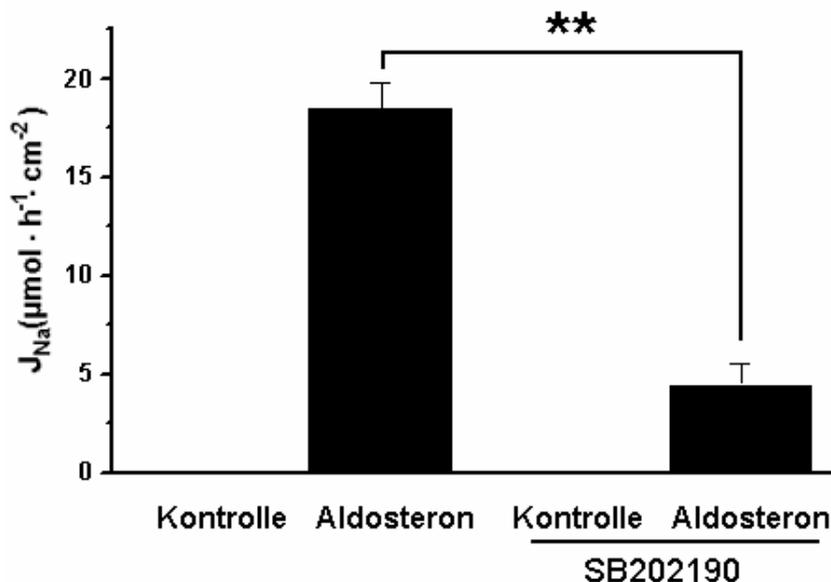
Abbildung 12: Gemittelte Kurzschlussströme ( $I_{SC}$ ) am total gestrippten Epithel des Rattenkolons (LDC-2) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron und Zugabe von U0126.

### 3.4 Wirkung des p38-Inhibitors SB202190

Um den Einfluss einer weiteren MAP-Kinase zu untersuchen, wurde der spezifische Hemmstoff der p38-MAPK SB202190 gegeben. Dabei zeigt sich ebenfalls ein Einfluss auf den aldosteroninduzierten, amiloridsensitiven Kurzschlussstrom, der durch SB202190 stark gehemmt wurde.

Abb. 13 zeigt die Kurzschlussströme dieser Untersuchung. Der gemittelte Wert bei alleiniger Inkubation mit Aldosteron betrug  $18,5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Bei alleiniger Gabe von SB202190 kam es zu keiner signifikanten Induktion des Kurzschlussstroms. Bei Kombination von Aldosteron und SB202190 war der gemittelte  $I_{\text{SC}}$  mit  $4,5 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  deutlich niedriger als für Aldosteron alleine (jew.  $n=3$ ,  $p<0,005$ ).

	$I_{\text{SC}} (\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$	n
<b>Kontrolle</b>	$0,0 \pm 0,0$	3
<b>Aldosteron</b>	$18,5 \pm 1,3$	3
<b>SB202190</b>	$0,0 \pm 0,0$	3
<b>Aldosteron + SB202190</b>	$4,5 \pm 1,1$	3



**Abbildung 13: Gemittelte Kurzschlussströme ( $I_{\text{SC}}$ ) am total gestrippten Epithel des Rattenkolons (LDC-2) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron und Zugabe von SB202190.**

### 3.5 Wirkung des Proteinkinase-C-Aktivators 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)

Der PKC-Aktivator TPA wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben. Es zeigte sich, dass TPA weder alleine einen nennenswerten  $I_{SC}$  hervorrief, noch in Kombination mit Aldosteron dessen Wirkung signifikant änderte (Abb. 14).

	$I_{SC}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	n
<b>Kontrolle</b>	$-0,2 \pm 0,1$	2
<b>Aldosteron</b>	$22,2 \pm 1,4$	3
<b>TPA</b>	$-0,1 \pm 0,0$	3
<b>Aldosteron + TPA</b>	$19,0 \pm 1,7$	3

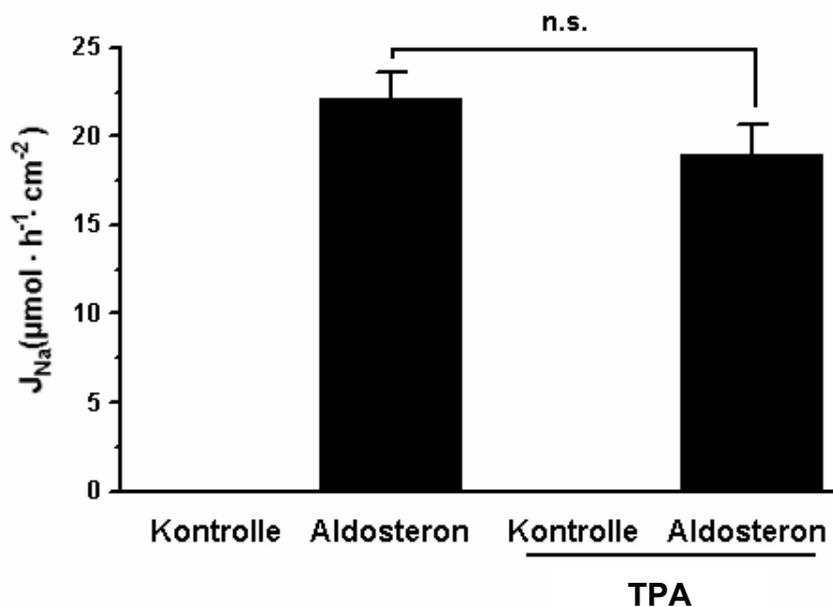
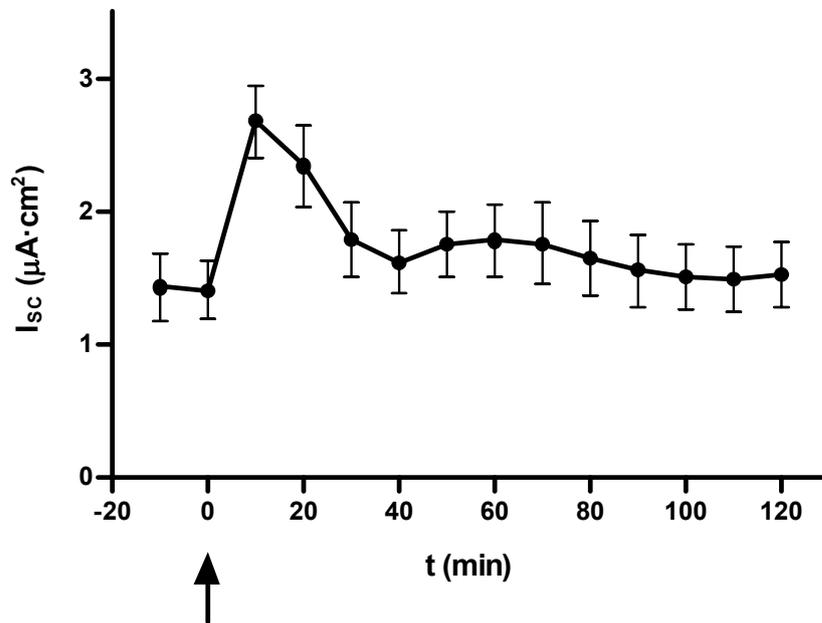


Abbildung 14: Gemittelte Kurzschlussströme ( $I_{SC}$ ) am total gestripten Epithel des Rattenkolons (LDC-2) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron und Zugabe von TPA.

Direkt nach Gabe des TPA ließ sich ein kurzzeitiger Anstieg des Kurzschlussstroms beobachten (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Zeitverlauf der Kurzschlussströme ( $I_{sc}$ ) am total gestripten Epithel des Rattenkolons (LDC-2) bei Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  M Aldosteron und Zugabe von TPA (Pfeil markiert Zeitpunkt der Zugabe).