

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

#### 4.1.1 Subzelluläre Lokalisation von $K_{IR6.1}$ und SUR2A in gastrischer Mukosa des Menschen

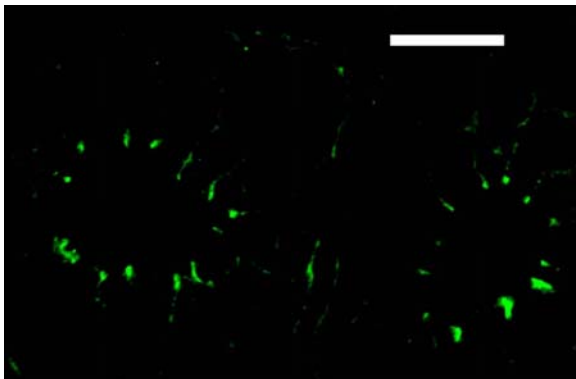
Semi-Dünnschnitte (Schichtdicke: 1  $\mu\text{m}$ ) der Corpusregion des menschlichen Magens wurden mit Antiseren gegen  $K_{IR6.1}$  und SUR2A inkubiert. Hierbei zeigte sich in der indirekten Immunfluoreszenz für beide Antiseren ein identisches Färbemuster. In der Mukosa der Magenbiopsate waren distinkte punkt- und strichförmige Membranareale immunpositiv, die sich in quer angeschnittenen gastrischen Drüsentubuli in einer zirkulären Anordnung darstellten (**Abb. 4.1 bis 4.5**). Die Spezifität der Anfärbung konnte durch Präabsorption der Antiseren mit einem Überschuss des verwendeten Antigens nachgewiesen werden (**Abb. 4.2a und 4.2b**).

Die gefundenen immunpositiven Signale erschienen stets an den apikalen Polen der Drüsenzellen lokalisiert zu sein. Um diese Position genauer zu bestimmen, wurden verschiedene Doppelinkubationen mit weiteren subdomänenspezifischen Antiseren durchgeführt. Eine spezifische Markierung der basolateralen Plasmamembran war durch eine Inkubation mit Antiserum gegen den Anionenausrauscher 2 (AE2) möglich (**Abb. 4.3a und 4.3b**). AE2 kommt in der Mukosa des Magens ausschließlich im basolateralen Membrankompartiment von Parietalzellen vor (JÖNS et al., 1994). Parietalzellen sind in allen Abschnitten der Magendrüsen der Corpus-Fundus-Region zu finden, am häufigsten jedoch im Drüsenhals. Sie sind für die luminal HCl-Sekretion sowie für die Freisetzung des Intrinsic Factor verantwortlich. Das AE2-Molekül dient in den Parietalzellen der Aufnahme von Chloridionen aus dem Blut, die im Austausch gegen intrazellulär erzeugtes Bikarbonat in die Zelle gelangen und anschließend passiv über einen in der luminalen Plasmamembran gelegenen Chloridkanal in den Magensaft übertreten. Zusammen mit der  $\text{H}^+$ -Abgabe durch die luminal gelegene  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase resultiert eine Nettosekretion von Salzsäure (HCl) in das Drüsenlumen.

In den Doppelfärbungen zwischen AE2 und  $K_{IR6.1}$  bzw. SUR2A konnte keinerlei Überlappung der Immunmarkierung festgestellt werden. Die basolaterale Plasmamembran der Parietalzellen erschien vollständig durch die AE2-Antikörper markiert (**grün in Abb. 4.3b**), wohingegen die

gegen  $K_{IR6.1}$  oder SUR2A gerichteten Antikörper einen mehr apikal gelegenen Abschnitt der lateralen Plasmamembran markierten (**rot in Abb. 4.3b**). Ferner zeigte sich, dass nicht nur die Parietalzellen die oben beschriebenen  $K_{IR6.1}$ - und SUR2A-Färbemuster aufwiesen, sondern auch sämtliche anderen, nicht mit AE2-Serum markierten Drüsenzellen der Magenmukosa (**Abb. 4.3c**).

Diese Ergebnisse ließen eine Position von  $K_{IR6.1}$  und SUR2A vermuten, die um den Übergangsbereich zwischen apikalem und basolateralem Membrankompartiment gelegen ist.

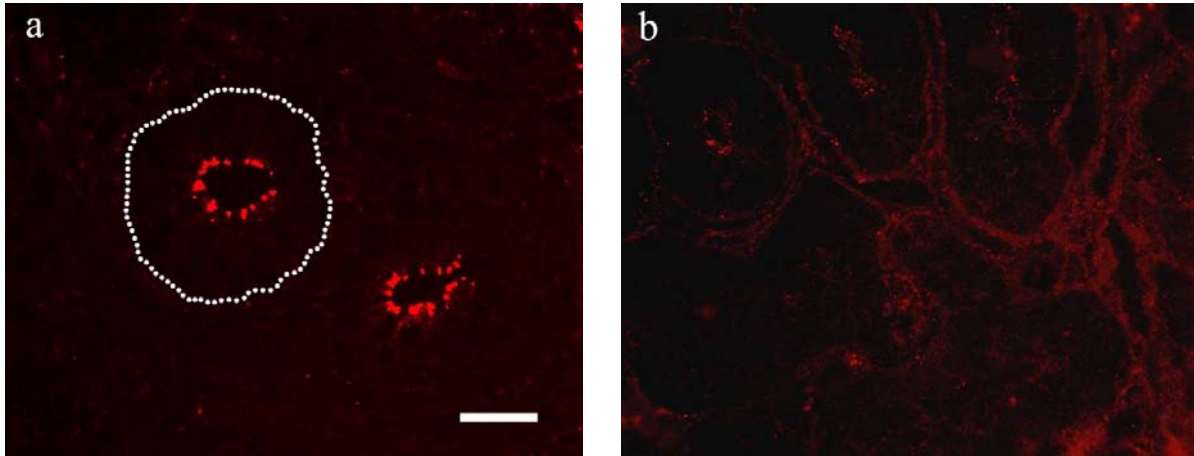


**Abb. 4.1:**

**Lokalisation von  $K_{IR6.1}$  in der Magenmukosa des Menschen**

1  $\mu\text{m}$  dünne Eponschnitte von Biopsaten aus der Corpusregion menschlicher Magenmukosa wurden mit anti- $K_{IR6.1}$ -Serum inkubiert. An den zwei hier quer angeschnittenen Drüsentubuli stellt sich die Markierung mit anti- $K_{IR6.1}$ -Antikörpern als ein ringartiges Muster von distinkten immunpositiven Membranarealen (grün) dar.

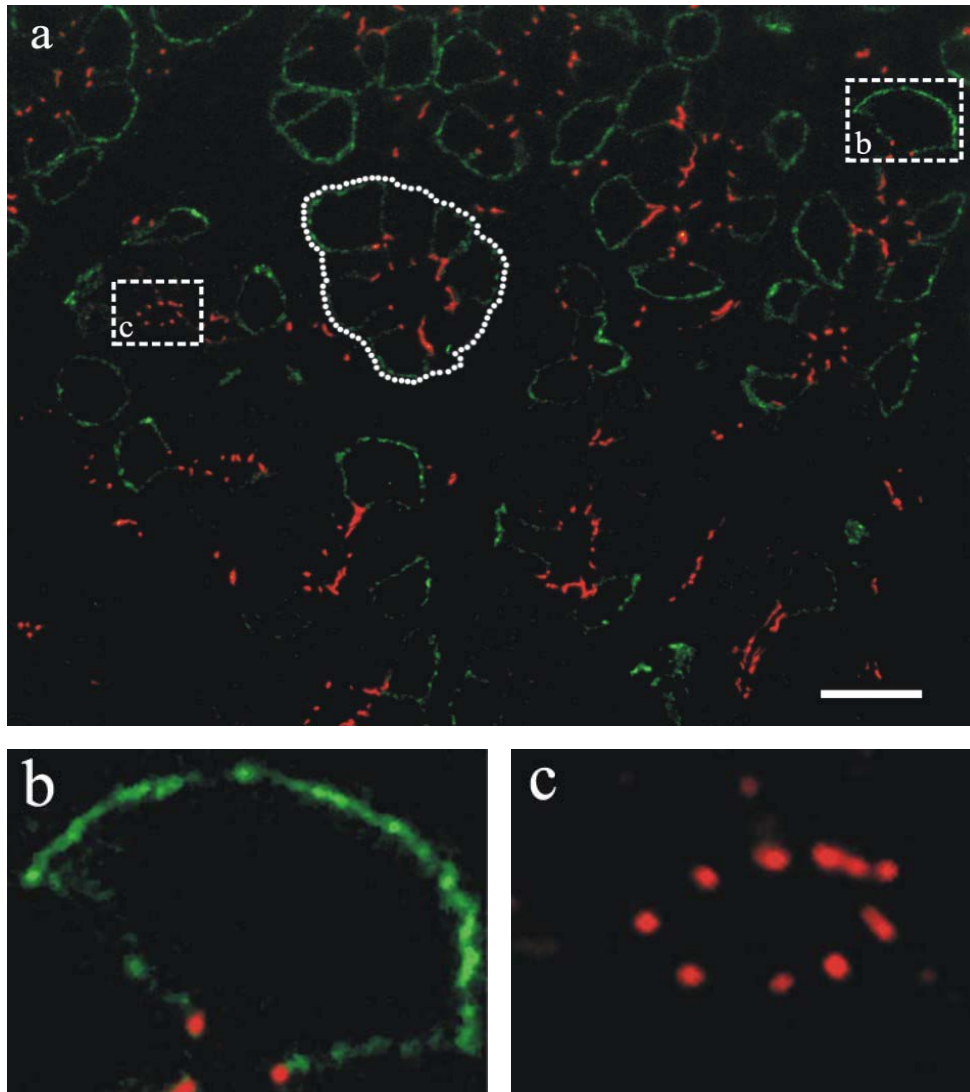
Bar: 25  $\mu\text{m}$



**Abb. 4.2: Lokalisation von SUR2A in der Magenmukosa des Menschen**

- (a) Semidünne Eponschnitte ( $1\ \mu\text{m}$ ) menschlicher Magenmukosa wurden mit anti-SUR2A-Serum inkubiert. Auch an diesen hier wieder quer angeschnittenen Drüsentubuli zeigt sich bei der Färbung mit anti-SUR2A-Antikörpern das gleiche ringartige Muster distinkter immunpositiver Membranareale (rot) wie bei den  $K_{IR}6.1$ -Inkubationen (**siehe Abb. 4.1**). Diese Signale sind am apikalen Pol der Drüsenzellen lokalisiert. Die gepunktete Linie markiert die Grenze des Drüsentubulus zur extrazellulären Matrix.
- (b) Die Präabsorption des anti-SUR2A-Serums mit einem Überschuss an SUR2A-Antigen führte bei der Inkubation eines Folgeschnitts zu einem Ausbleiben des unter (a) zu sehenden Färbemusters, wodurch die Spezifität der Anfärbung bei (a) nachgewiesen werden konnte. Hier ist durch elektronische Verstärkung der schwachen Autofluoreszenz lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung zu erkennen wie sie sich auch an den Drüsentubuli bei (a) darstellt.

Bar:  $30\ \mu\text{m}$



**Abb. 4.3: Doppelfärbung menschlicher Magenmukosa mit Seren gegen SUR2A (rot) und AE2 (grün)**

- (a) Übersichtsaufnahme transversal angeschnittener Magendrüsen eines 1 µm dünnen Eponschnittes. Die Lumina der Drüsentubuli lassen sich durch die lumenwärtige Ausrichtung der basolateral grünmarkierten Parietalzellen und durch das ringähnliche rote Punktmuster von SUR2A-Markierungen (linker gestrichelter Kasten, Abb. 4.3c) abgrenzen. Die gepunktete Linie in der Bildmitte markiert die Grenze eines Drüsentubulus zur extrazellulären Matrix.
- (b) Vergrößerung einer einzelnen AE2-markierten Parietalzelle eines Drüsentubulus. Der Anionenaustauscher 2 (AE2) ist innerhalb des Magengewebes ein spezifischer Marker für die basolaterale Plasmamembran von Parietalzellen. Man erkennt keine Überlappung von AE2 (grün) mit SUR2A (rot). Das apikale Membrankompartiment ist nicht angefärbt.
- (c) Vergrößerung eines SUR2A-markierten Drüsenlumens. Das Vorkommen von SUR2A (und  $K_{IR6.1}$ ) ist nicht auf die Parietalzellen beschränkt, sondern imponiert an den apikalen Polen aller Zellen des Drüsentubulus mit dem gleichen ringartigen Färbemuster distinkter immunpositiver Signale.

Bar: 60 µm

#### 4.1.2 Zur Position von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A an Interzellularkontakten

Zu den charakteristischen Oberflächendifferenzierungen von Epithelzellen gehören die verschiedenen Formen von Interzellularkontakten. Eine besonders enge Staffelung verschiedener Interzellularkontakte findet sich in den meisten einschichtigen Epithelien, wie z.B. in den Epithelien des Gastrointestinaltraktes, im Übergangsbereich vom apikalen zum basolateralen Membrankompartiment. In diesem so genannten Schlussleistenkomplex sind von apikal nach basal dicht aneinandergereiht:

1. Zonula occludens (syn.: Tight Junction)
2. Zonula adherens (syn.: Intermediate Junction, Gürteldesmosom)
3. Macula adherens (syn.: Desmosom, Fleckdesmosom)

(siehe Einleitung Abb. 1.1)

Da auch die Position von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A möglicherweise in genau diesem Übergangsbereich von apikaler zu basolateraler Plasmamembran, also dem Bereich des Schlussleistenkomplexes, befand, sollte als nächstes der Frage nach einer Colokalisation von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A mit einem der Interzellularkontakte des Schlussleistenkomplexes nachgegangen werden. Hierfür wurden Doppelinkubationen mit Antikörpern gegen K<sub>IR</sub>6.1 oder SUR2A sowie gegen Proteine der verschiedenen Interzellularkontakte durchgeführt.

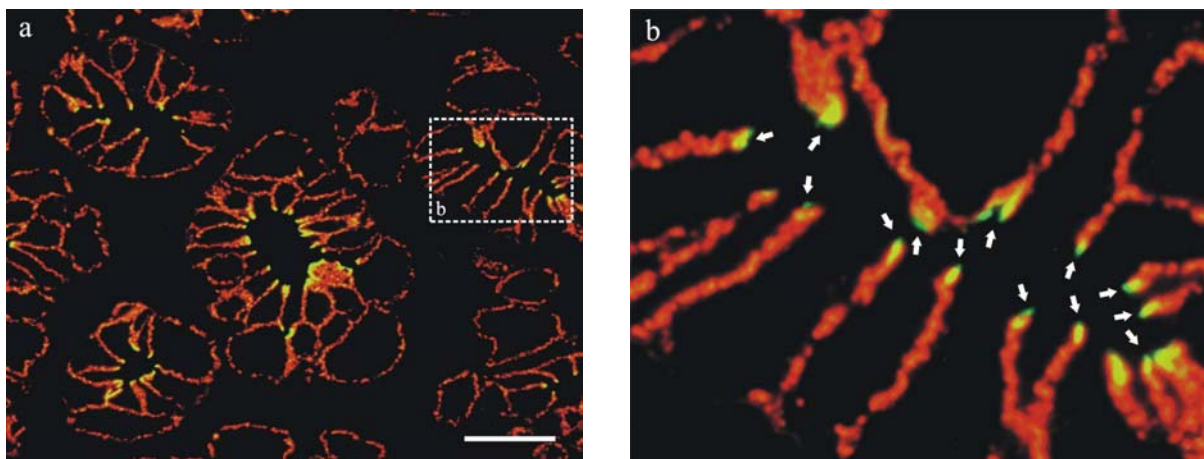
#### 4.1.3 E-Cadherin ist in gastrischer Mukosa des Menschen mit K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A partiell colokalisiert

E-Cadherin (epitheliales Cadherin) ist als Transmembranprotein für den Zell-Zell-Kontakt ausschließlich in Adhäsionskontakten verantwortlich und konnte daher als spezifischer Marker der Zonula adherens des Schlussleistenkomplexes verwendet werden.

In den Doppelmarkierungen von Semidünnschnitten (1 µm) der menschlichen Magenmukosa wurde mit den gegen E-Cadherin gerichteten Antikörpern das typische Färbemuster der Drüsenepithelien erhalten (**rot in Abb. 4.4a und 4.4b**). Neben einer intensiven Markierung der Zonula adherens im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran imponierten in den basalwärts gelegenen zwei Dritteln vor allem die Puncta adherentia als E-Cadherin-immunpositive Strukturen. Die gegen K<sub>IR</sub>6.1 oder SUR2A gerichteten Antikörper markierten

sowohl isoliert den am weitesten apikal gelegenen Anteil der lateralen Plasmamembran (**grün in Abb. 4.4b**), als auch überlappend mit der E-Cadherin-Markierung den Bereich der Zonula adherens (**gelb in Abb. 4.4a und 4.4b**).

Die sich ohne Überlappung darstellenden  $K_{IR6.1}$ - und SUR2A-Signale, apikal der Zonula adherens, zeigten, dass  $K_{IR6.1}$  und SUR2A in dieser Position nicht mit Adhäsionskontakten colokalisiert sein konnten. Dieser am weitesten apikal gelegene Bereich der lateralen Plasmamembran repräsentiert jedoch das Areal der Tight Junctions.



**Abb. 4.4: Doppelfärbung menschlicher Magenmukosa mit Seren gegen E-Cadherin (rot) und  $K_{IR6.1}$  (grün)**

- (a) Übersicht eines doppelt inkubierten Semidünnschnitts (1  $\mu\text{m}$ ) mit quer getroffenen Drüsentubuli der Magenmukosa des Menschen. Die laterale Membran aller Zellen eines Drüsentubulus ist immunpositiv für E-Cadherin (rot). Im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran sind ferner die Überlappungszonen von E-Cadherin und  $K_{IR6.1}$  zu erkennen (gelb). Die für E-Cadherin untypische Markierung auch der basalen Plasmamembran einiger Zellen ist zum Teil auf einen kappenartigen Abschnitt der betreffenden Zelle zurückzuführen. Vermutlich wird E-Cadherin allerdings auch über einen „default pathway“ in die Plasmamembran eingebaut. Diese „falsch“ eingebauten Moleküle gelangen so erst nach einem zweiten gerichteten Transport zum eigentlichen Zielbereich der lateralen Plasmamembran.
- (b) Ausschnittsvergrößerung eines Drüsentubulus. Die laterale Plasmamembran der Drüsenzellen stellt sich durch eine Markierung von E-Cadherin (rot) dar. Im Bereich der Zonula adherens zeigt sich eine Überlappung des E-Cadherin- und  $K_{IR6.1}$ -Signals (gelb). In dem am weitesten apikal gelegenen Abschnitt der lateralen Plasmamembran, dem Areal der Tight Junctions, finden sich außerdem isolierte Signale für  $K_{IR6.1}$  (grün, Pfeile), die keinerlei Überlappung mit der E-Cadherin-Markierung aufweisen.

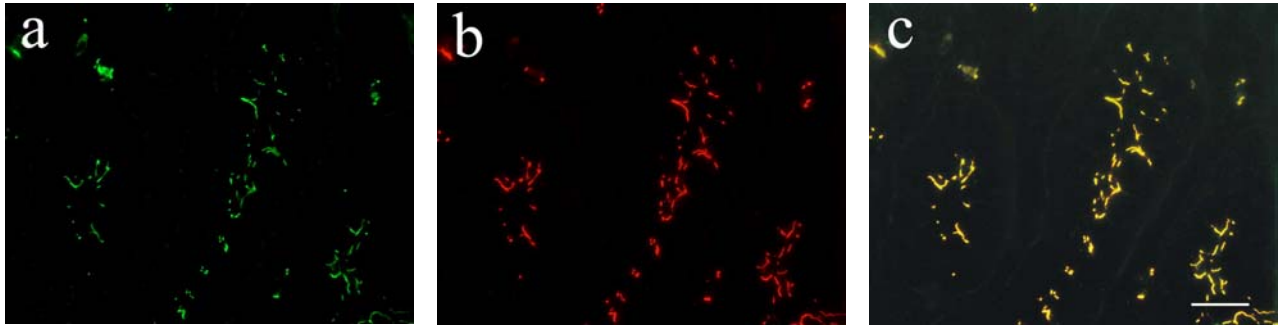
Bar: 30  $\mu\text{m}$

#### 4.1.4 Perfekte Colokalisation von $K_{IR6.1}$ und SUR2A mit dem Tight-Junction-Protein ZO-1

Nachdem sich in den Doppelinkubationen mit E-Cadherin die Tight-Junction-Areale der gastrischen Drüsenzellen isoliert mit  $K_{IR6.1}$ - und SUR2A-Antikörpern gefärbt zeigten (**Abb. 4.4**), stellte sich die Frage nach einer Colokalisation mit den Tight Junctions. Ein charakteristisches Plaqueprotein der Tight Junctions, welches dort ubiquitär vorkommt, ist das Zonula-occludens-Protein 1 (ZO-1). ZO-1 erschien daher für die immunologische Detektierung von Tight Junctions als besonders geeignet.

Es wurden 1  $\mu\text{m}$  dünne Eponschnitte aus der Corpusregion menschlicher Magenmukosa gleichzeitig mit Seren gegen ZO-1 (**rot in Abb. 4.5b**) und gegen SUR2A (**grün in Abb. 4.5a**) bzw.  $K_{IR6.1}$  inkubiert. Es zeigte sich für  $K_{IR6.1}$  und SUR2A das aus den Abbildungen 4.1 bis 4.4. bekannte Färbemuster punkt- und strichförmiger immunpositiver Signale in den apikalen Bereichen der lateralen Zellmembran der Drüsenzellen. Die Markierungen mit den gegen ZO-1 gerichteten Antikörpern wiesen ein identisches Färbemuster auf. Die gleichzeitige Anregung beider Fluorochrome der verschiedenen Sekundärantikörper für ZO-1 und  $K_{IR6.1}$  bzw. SUR2A bestätigte eine perfekte Colokalisation des Tight-Junction-Proteins ZO-1 mit den beiden  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten  $K_{IR6.1}$  und SUR2A (**Abb. 4.5c**).

Da die Bereiche von Tight Junction und Zonula adherens innerhalb der Plasmamembran wahrscheinlich nicht scharf gegeneinander abgegrenzt sind, sondern eher verwoben und wellenartig ineinander übergehen, ist bei der hier gezeigten vollständigen Colokalisation von  $K_{IR6.1}$  und SUR2A mit den Tight Junctions die partielle Überlappung mit der E-Cadherin-haltigen Zonula adherens (**gelb in Abb. 4.4**) erklärbar.



**Abb. 4.5: Doppelfärbung menschlicher Magenmukosa mit SUR2A (a) und ZO-1 (b)**

Ein 1- $\mu$ m-Semidünnschnitt eines in Epon eingebetteten Biopsats aus der Corpusregion menschlicher Magenmukosa wurde simultan mit Serum gegen SUR2A (a) und gegen ZO-1 (b) inkubiert. Während im linken unteren Bildbereich ein quer getroffener Drüsentubulus zu erkennen ist, lässt sich rechts davon ein eher längs angeschnittener Tubulus identifizieren. In beiden Färbungen stellt sich ein identisches Muster punkt- und strichförmiger Signale apikaler Membranareale dar. Die gleichzeitige Anregung beider Fluorochrome (c) verdeutlicht eine perfekte Colokalisation des Tight-Junction-Markers ZO-1 mit SUR2A.

Bar: 30  $\mu$ m



#### 4.1.5 K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A sind auch in Dünndarm und Leber im Bereich der Tight Junction lokalisiert

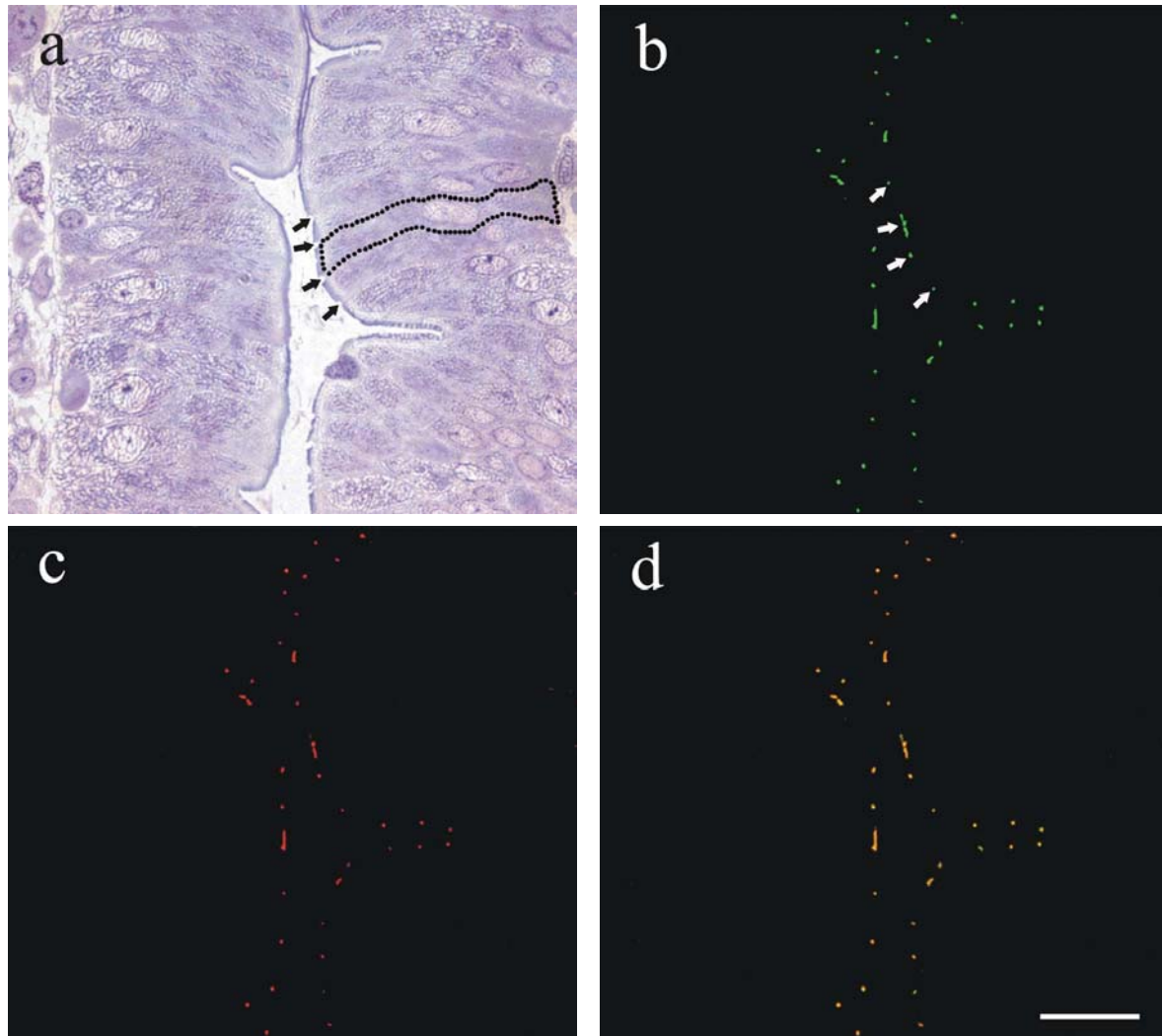
Die in der menschlichen Magenmukosa gefundene Colokalisation von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A mit dem Tight-Junction-Protein ZO-1 warf nun drei weitere Fragen auf:

1. Ist diese Colokalisation ausschließlich auf den Magen beschränkt?
2. Handelt es sich um ein artspezifisches Phänomen?
3. Lässt sich die Colokalisation von ZO-1 mit K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A auch durch eine Colokalisation mit anderen Tight-Junction-Proteinen bestätigen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden von in Epon eingebetteter Rattenleber sowie von eingebettetem Jejunum der Ratte Semidünnschnitte der Schichtdicke 1 µm angefertigt. Es schloss sich eine gleichzeitige Inkubation der Präparate mit Antiseren gegen K<sub>IR</sub>6.1 bzw. SUR2A und gegen ZO-1 bzw. Occludin an. Occludin ist ein weiterer geeigneter Tight-Junction-Marker für die genannten Gewebe, da dieses Transmembranprotein in den meisten Tight Junctions zu finden ist und nur in einigen extrazerebralen Endothelien nicht vorkommt (DRENCKHAHN, 2003).

Es zeigte sich in diesen Doppelfärbungen die gleiche präzise Colokalisation von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A mit den Tight-Junction-Proteinen ZO-1 und Occludin wie bei den Untersuchungen an der menschlichen Magenmukosa. Das punkt- und strichförmige Muster sich kettenartig aneinander reihender Signale für K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A konnte im Dünndarm an sämtlichen apikalen Membranarealen der Enterozyten beobachtet werden (**Abb. 4.6b**). Die Färbungen der Leberschnitte führten zu einem vergleichbaren Ergebnis. Das durch Occludin-Antiserum dargestellte Färbemuster der Tight Junctions intrahepatischer, interzellulärer Gallenkanälchen (**Abb. 4.7a**) konnte in nahezu identischer Form durch eine Färbung mit Antiseren gegen K<sub>IR</sub>6.1 (**Abb. 4.7b**) beobachtet werden.

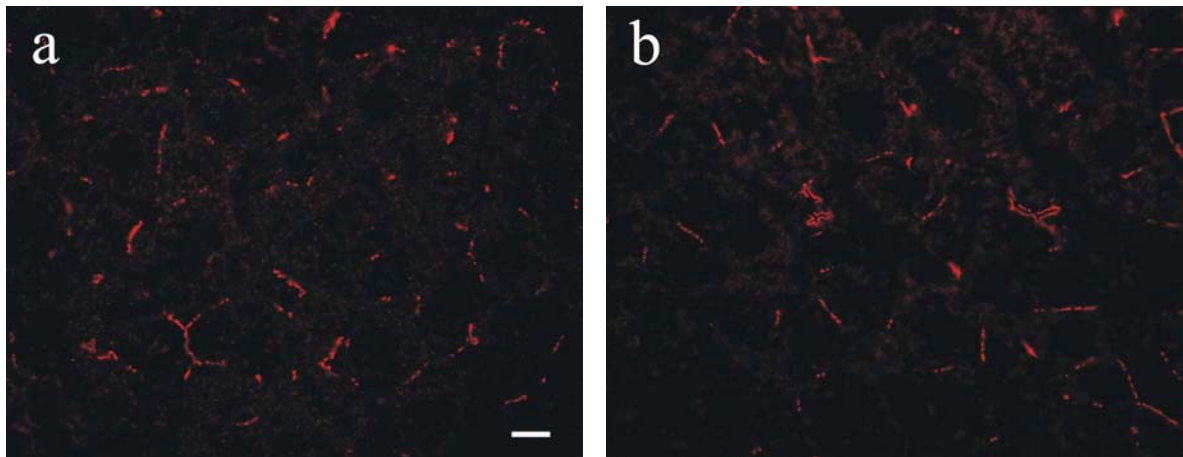
Somit gab es erste Hinweise darauf, dass die in der gastrischen Mukosa des Menschen erstmals beobachtete Colokalisation von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A mit Proteinen von Tight Junctions auch in anderen Organen vorkommt und offenbar nicht allein auf den Menschen beschränkt ist. Zusätzliche Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von T. Jöns bestätigten im weiteren Verlauf diese Hypothesen. Es konnte die gleiche Art der Colokalisation auch im Magen von Schwein und Ratte, im Dünndarm des Menschen und im Dickdarm der Ratte nachgewiesen werden (JÖNS AND WITTSCHIEBER et al., 2006).



**Abb. 4.6: Subzelluläre Verteilung von  $K_{IR6.1}$  (b) und ZO-1 (c) im Dünndarmepithel der Ratte**

- (a) Ein  $1\ \mu\text{m}$  dünner Schnitt von in Epon eingebettetem Jejunum der Ratte wurde zur histologischen Übersicht mit Toluidin-Blau gefärbt. Es stellen sich zwei vertikal stehende, benachbarte Darmzotten dar, die in der Bildmitte durch Darmlumen voneinander getrennt sind. Die Darmzotten sind von einem für den Dünndarm charakteristischen einschichtig-hochprismatischen Epithel bedeckt, welches sich im Wesentlichen aus Bürstensaum tragenden Enterozyten und Becherzellen zusammensetzt. Die schwarze gepunktete Linie markiert einen typischen Enterozyten. Der lumenwärtige Bürstensaum weist zwischen den apikalen Zell-Zell-Grenzen einige artefizielle Unterbrechungen auf (schwarze Pfeile) und markiert dadurch zusätzlich an benachbarten Enterozyten die Position der Schlussleistenkomplexe, welche stets im apikalsten Bereich der lateralen Plasmamembran lokalisiert sind.
- (b-d) Die Doppelfärbung eines zu (a) konsekutiven Schnittes mit Antiserum gegen  $K_{IR6.1}$  (b) und ZO-1 (c) zeigt die gleiche präzise Colokalisation beider Proteine (d) wie sie in der Magenmukosa des Menschen zu finden war. Die weißen Pfeile in (b) verdeutlichen die exakte Übereinstimmung der histologisch zu vermutenden Position der Tight Junctions (a) mit der immunologisch detektierbaren Position der  $K_{IR6.1}$ -Proteine.

Bar:  $20\ \mu\text{m}$



**Abb. 4.7: Subzelluläre Verteilung von Occludin (a) und K<sub>IR</sub>6.1 (b) in der Leber der Ratte**

- (a) Übersicht eines Semidünnschnitts des Leberparenchyms der Ratte (Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ ), welcher mit Antiserum gegen das Tight-Junction-Markerprotein Occludin gefärbt wurde. Zu erkennen ist ein für Tight Junctions der Leber charakteristisches punkt- und strichförmiges Färbemuster, das durch Darstellung der interzellulären Gallenkanälchen entsteht. Die Lumina der Gallenkanälchen werden durch kleine Plasmamembranareale benachbarter Hepatozyten begrenzt, welche durch Tight Junctions verschlossen werden.
- (b) Konsekutivschnitt, der mit Antiserum gegen K<sub>IR</sub>6.1 inkubiert wurde. Es zeigt sich ein gleichartiges Färbemuster wie bei (a), welches auf eine Position von K<sub>IR</sub>6.1 an den Tight Junctions der intrahepatischen Gallengänge hinweist.

Bar: 30  $\mu\text{m}$

#### 4.1.6 Die Tight Junctions der Sammelrohre der Niere enthalten kein $K_{IR6.1}$ und SUR2A

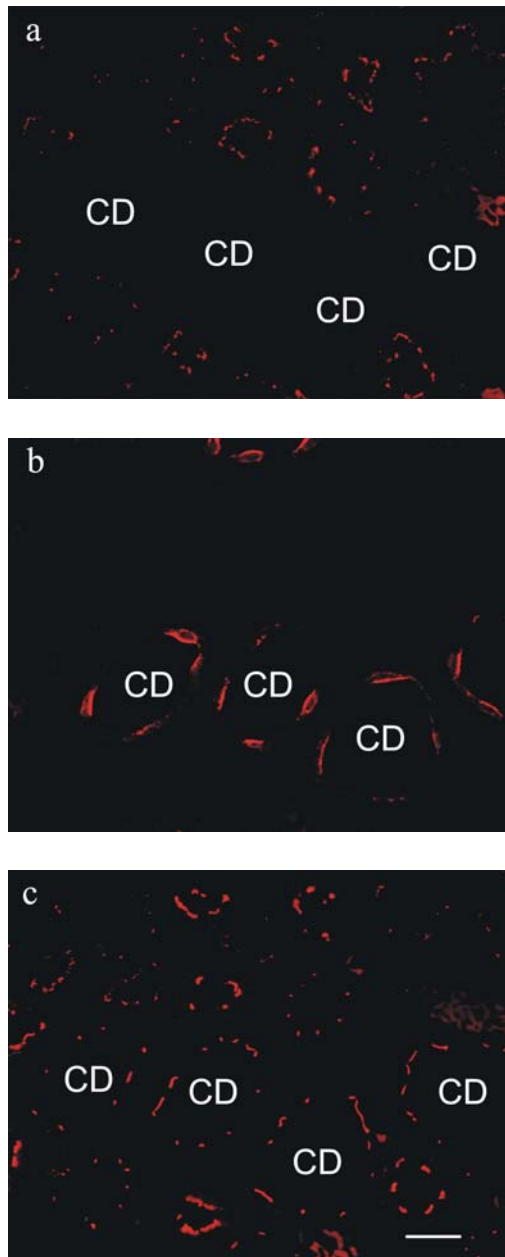
Nachdem in Organen des Gastrointestinaltraktes auch verschiedener Spezies eine Colokalisation der  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten  $K_{IR6.1}$  und SUR2A mit verschiedenen Markerproteinen von Tight Junctions nachgewiesen werden konnte, sollten als nächstes die verschiedenen Epithelien der Niere untersucht werden.

Die einschichtigen Epithelien der proximalen und distalen Nierentubuli zeigen eine ganz ähnliche Morphologie und Physiologie wie die bereits untersuchten gastrointestinalen Epithelien. Die dortigen Schlussleistenkomplexe weisen wie in Magen und Darm ebenfalls so genannte undichte („leaky“) Tight Junctions auf, die einer stetigen Regulation unterliegen, welche den parazellulären Resorptionsfluss steuert. Im Unterschied dazu besitzen die Verbindungstubuli und Sammelrohre der Niere hochgradig impermeable und unregulierte Tight Junctions, so genannte dichte („tight“) Tight Junctions. Sie bestehen aus einer deutlich höheren Anzahl von Occludensleisten und unterbinden nahezu jeglichen parazellulären Transport. Die Niere stellt also ein Organ dar, in welchem das gleichzeitige Vorkommen regulierter und unregulierter Tight Junctions eine parallele Untersuchung verschiedener Tight-Junction-Formen auf eine Colokalisation mit  $K_{IR6.1}$  und SUR2A hin ermöglicht.

Es wurden von in Epon eingebetteter Rattenniere 1  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt und mit Antiseren gegen  $K_{IR6.1}$ , SUR2A, ZO-1 und AQP-2 inkubiert. Der Wasserkanal Aquaporin 2 (AQP-2) stellt in den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere ein über ADH induzierbares System zur Erhöhung der Wasserpermeabilität dar und liegt im Ruhezustand in der Membran intrazellulärer Vesikel vor. Die Stimulation durch ADH, das in der Neurohypophyse freigesetzt wird, führt dann über eine Freisetzung von cAMP zu einer Fusionierung der AQP-2-Vesikel mit der luminalen Plasmamembran (VERKMAN et al., 1988; WADE, 1986). Daher ist AQP-2 meist sowohl im Zytoplasma als auch in der apikalen Plasmamembran nachweisbar und dient damit im Nierenmark als zuverlässiger Marker für Hauptzellen renaler Sammelrohre (**Abb. 4.8b**).

In den Inkubationen mit den Antikörpern gegen  $K_{IR6.1}$  und SUR2A stellten sich die proximalen und distalen Nierentubuli in ähnlicher Weise wie die Drüsentubuli der Mageninkubationen dar. Es zeigte sich das für Tight Junctions charakteristische und durch Doppelinkubationen mit ZO-1 bestätigte Färbemuster punkt- und strichförmiger Membranareale im Bereich der Schlussleistenkomplexe der einschichtigen Tubulusepithelien. Durch AQP-2-Markierung

identifizierbare Sammelrohre wiesen allerdings keinerlei Anfärbung für  $K_{IR6.1}$  oder SUR2A auf (**Abb. 4.8a**). Es konnten dennoch mittels der ZO-1-Markierungen die Tight Junctions nicht nur an den proximalen und distalen Tubuli, sondern auch an den Sammelrohren nachgewiesen werden (**Abb. 4.8c**). In der Niere kommen  $K_{IR6.1}$  und SUR2A demnach an den unregulierten Tight Junctions der Sammelrohre nicht vor.



**Abb. 4.8:**

**Lokalisation von  $K_{IR6.1}$  (a), Aquaporin 2 (b) und ZO-1 (c) in der Niere der Ratte**

- (a) Ein 1  $\mu\text{m}$  dünner Eponschnitt des Nierenmarks der Ratte wurde mit Antiserum gegen  $K_{IR6.1}$  inkubiert. Die hierbei quer angeschnittenen Tubuli weisen ein ringartiges Muster punkt- und strichförmiger Signale für  $K_{IR6.1}$  auf. Hierbei fällt das Fehlen der Färbung bei einer bestimmten Art von Tubuli auf, welche später als Sammelrohre (CD = Collecting Ducts) identifiziert wurden (b).
- (b) 1  $\mu\text{m}$  dünner Konsekutivschnitt zu (a), welcher mit Antiserum gegen Aquaporin 2 inkubiert wurde. Aquaporin 2 ist innerhalb des Nierengewebes ein spezifischer Marker für die Hauptzellen der Sammelrohre (CD) und kommt sowohl in vesikulärer Form im Zytoplasma als auch in der apikalen Plasmamembran vor. Somit konnten die in (a) ungefärbten Tubuli eindeutig als Sammelrohre identifiziert werden.
- (c) 1  $\mu\text{m}$  dünner Konsekutivschnitt zu (a) und (b), der mit Antiserum gegen den Tight-Junction-Marker ZO-1 gefärbt wurde. Hierbei stellen sich sowohl die proximalen und distalen Tubuli als auch das Sammelrohrsystem (CD) durch ein Färbemuster ringförmig angeordneter, distinkter, immunpositiver Signale dar. So zeigt sich im Vergleich mit (a), dass  $K_{IR6.1}$  mit den Tight Junctions der proximalen und distalen Tubuli colokalisiert ist, nicht aber mit denen der Sammelrohre.

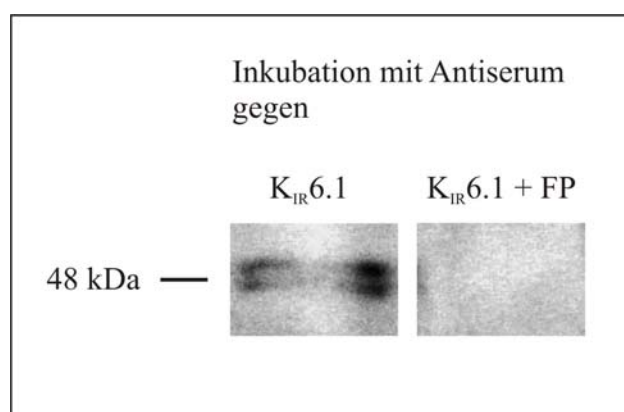
Bar: 20  $\mu\text{m}$

## 4.2 Proteinbiochemie: Western-Blot-Analyse von Gallenkanalpräparationen

Um das Vorhandensein von  $K_{IR}6.1$  und SUR2A innerhalb eines peripheren Gewebes durch eine weitere Methode neben der indirekten Immunfluoreszenz zu bestätigen, wurden Western-Blot-Analysen von Lebergewebe der Ratte durchgeführt.

Hierfür wurde eine modifizierte Präparationsmethode zur Isolation von Gallenkanälchen der Rattenleber nach TSUKITA UND TSUKITA (1989) angewandt. Die Region der intraheptischen, interzellulären Gallenkanälchen umfasst genau die Membrananteile, welche in der Immunfluoreszenz durch Occludin- und  $K_{IR}6.1$ -Färbungen markierte Tight Junctions aufzeigten (**Abb. 4.7**).

Es stellte sich bei den anti- $K_{IR}6.1$ -Inkubationen eine Doppelbande bei 48 kDa dar, was dem theoretischen Molekulargewicht des  $K_{IR}6.1$ -Proteins entspricht (THOMZIG et al., 2001). Die Spezifität der dargestellten Proteinbande konnte durch Präabsorption des Antiserums mit einem Überschuss an  $K_{IR}6.1$ -Fusionsprotein nachgewiesen werden (**Abb. 4.9**). Der Nachweis von SUR2A gelang hierbei jedoch nicht, da die gegen das SUR2A-Fusionsprotein gerichteten Antikörper das SDS-denaturierte Protein möglicherweise nicht erkennen (DRENCKHAHN et al., 1993).



**Abb. 4.9:**  
Western-Blot-Analyse von mit Gallenkanälchen angereicherten Membranfraktionen aus der Leber der Ratte

Durch das anti- $K_{IR}6.1$ -Antiserum wurde in der Gallenkanälchenfraktion eine Doppelbande bei dem für  $K_{IR}6.1$  errechneten Molekulargewicht von 48 kDa detektiert, die bei vorheriger Absorption mit dem verwendeten Antigen (FP = Fusionsprotein  $K_{IR}6.1$ ) nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

### 4.3 Messung der parazellulären Permeabilität des Dünndarmepithels der Ratte

#### 4.3.1 Überlegungen zur Funktion von $K_{IR6.1}$ und SUR2A an Tight Junctions

Die Proteine  $K_{IR6.1}$  und SUR2A konnten in dieser Arbeit an undichten, regulierten Tight Junctions der Magendarmtraktes und der Niere nachgewiesen werden. Im Unterschied hierzu waren diese Proteine an den dichten und nicht regulierten Tight Junctions der renalen Sammelrohre nicht nachweisbar. Somit stellte sich die Frage, ob der  $K_{IR6.1}/SUR2A$ -Proteinkomplex möglicherweise eine Rolle bei der Regulierung der parazellulären Permeabilität spielen könnte.

#### 4.3.2 Entwicklung der Modellvorstellung

1987 wurde in drei zusammenhängenden Arbeiten erstmals ein Phänomen beschrieben, welches eine Steigerung der parazellulären Permeabilität eines Dünndarmepithels beinhaltet, die mit der Aktivierung Natrium-abhängiger Transportproteine einherging (PAPPENHEIMER, 1987 / PAPPENHEIMER AND REISS, 1987 / MADARA AND PAPPENHEIMER, 1987). So führte innerhalb des Darmlumens der postprandiale Anstieg der Konzentration an D-Glucose über die Aktivierung des Natrium-abhängigen Glucose-Cotransporters SGLT-1 zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Tight-Junction-Permeabilität und damit zu einer Erhöhung der Rate der parazellulären Nährstoffresorption. Man spricht hierbei auch von der D-Glucose-induzierten Steigerung der parazellulären Permeabilität.

Unter Berücksichtigung dieses Phänomens der D-Glucose-induzierten Permeabilitätssteigerung und der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten wurde folgende Modellvorstellung entwickelt: Ein Anstieg der intrazellulären D-Glucose-Konzentration führt durch entsprechende Stoffwechselaktivitäten der Epithelzelle zu einer Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration. ATP bindet an die ATP-sensitive SUR2A-Untereinheit, was zu einer Konformationsänderung des  $K_{IR6.1}/SUR2A$ -Komplexes führt und in Folge durch physikalischen Kontakt zu weiteren Tight-Junction-Proteinen die parazelluläre Permeabilität steigert (**siehe Diskussion 5.6**).

### 4.3.3 Entwicklung des Modellsystems Rattendarm

Zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung parazellulärer Permeabilität durch den K<sub>IR</sub>6.1/SUR2A-Proteinkomplex wurden zunächst verschiedene epitheliale Zellkultursysteme hinsichtlich ihrer Expression von K<sub>IR</sub>6.1 und SUR2A überprüft. Colonkarzinomzellen der Linie CaCo-2 wurden durch Western-Blot- und PCR-Analysen getestet, in welchen sich jedoch weder K<sub>IR</sub>6.1 noch SUR2A nachweisen ließen. Ferner wurde im Labor von T. Jöns gezeigt, dass MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney), die von Schaltzellen renaler Sammelrohre des Hundes abstammen, ebenfalls kein K<sub>IR</sub>6.1 oder SUR2A exprimieren, was anhand der Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie der Niere bereits zu vermuten war (**siehe 4.1.6**). Das gleiche negative Ergebnis fand sich in der Arbeitsgruppe auch für Primärkulturen von Endothelien der Vena cava des Schweins und der Vena umbilicalis des Menschen.

Da keines der getesteten Zellkultursysteme eine Expression von K<sub>IR</sub>6.1 oder SUR2A aufwies, wurde ein neues *in-vitro*-Modellsystem entwickelt, um parazelluläre Permeabilität in Gegenwart des K<sub>IR</sub>6.1/SUR2A-Komplexes zu messen und zu beeinflussen (**siehe Methoden 3.3**). Der Dünndarm der Ratte erschien aus zwei Gründen hierfür am besten geeignet. Zum einen ist der Rattendarm immer relativ leicht zugänglich und zum anderen wurde 1987 in diesem System die D-Glucose-induzierte Steigerung parazellulärer Permeabilität erstmalig beschrieben.

Zur Detektion der parazellulären Permeabilität wurde radioaktive L-[<sup>14</sup>C]-Glucose verwendet, da diese nicht aktiv von den Enterozyten aufgenommen werden kann. Dieses liegt in der Enantiomerenspezifität des SGLT-1-Cotransporters der apikalen Plasmamembran der Enterozyten begründet. Der SGLT-1-Carrier transportiert nur das D-Enantiomer der Glucose aus dem Darmlumen in die Zelle und bindet keine L-Glucose (RUMMEL UND STUPP, 1960), die somit das Epithel ausschließlich parazellulär via Solvent Drag passieren kann. Ein durch L-[<sup>14</sup>C]-Glucose verursachter Anstieg der Radioaktivität im subepithelialen Bindegewebe der Darmwand eignete sich deswegen als Messgröße für Permeabilität von Tight Junctions.



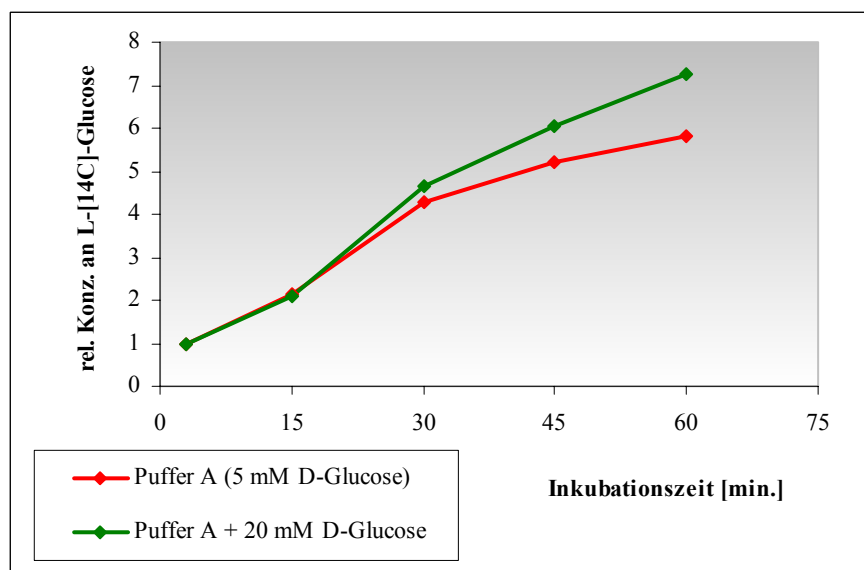
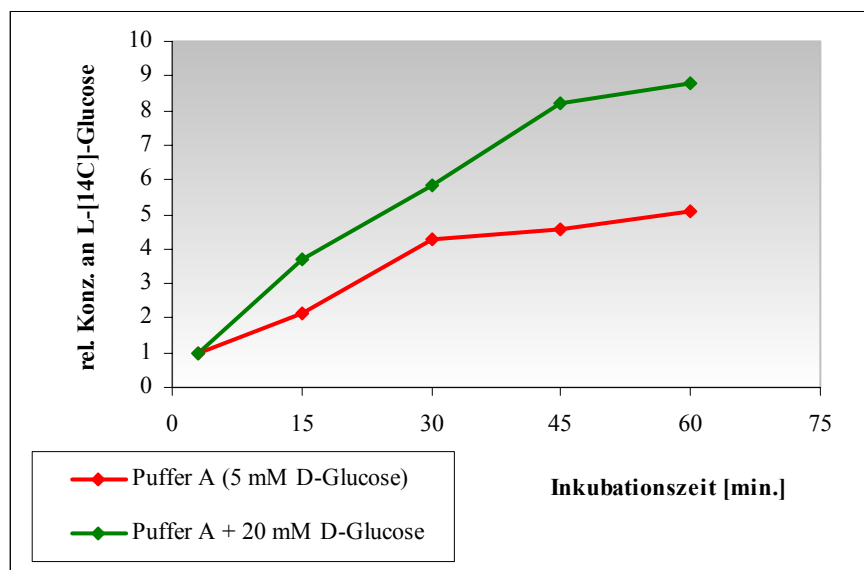
#### 4.3.4 D-Glucose induziert erwartungsgemäß eine Steigerung parazellulärer Permeabilität

Zur Etablierung des neu entwickelten Verfahrens sollte zunächst die D-Glucose-induzierte Steigerung parazellulärer Permeabilität nachgestellt und gemessen werden. Eine der Inkubationslösungen enthielt daher insgesamt 25 mM D-Glucose (Inkubationslösung Nr. 2), was den physiologischen Bedingungen nach einer Mahlzeit innerhalb des Lumens eines Rattendünndarmes entspricht. Dort schwankt die Konzentration von D-Glucose postprandial zwischen 0,2 und 48 mM, abhängig vom Zeitpunkt der Messung und der jeweiligen Region des Dünndarms (FERRARIS et al., 1990).

Es wurden bei den nachfolgenden Experimenten stets die Messwerte des oralen Anteils des Dünndarms verschiedener Ratten bzw. die Messwerte des nachfolgenden Anteils des Dünndarms verschiedener Ratten miteinander verglichen, um die unterschiedlichen Resorptionsgeschwindigkeiten verschiedener Darmabschnitte zu berücksichtigen. Die Messungen erfolgten in 15-Minuten-Abständen über 60 min., so dass auch das Verhalten der L-[<sup>14</sup>C]-Glucose-Resorption über die Zeit beurteilt werden konnte.

In diesen Experimenten (**Abb. 4.10**) zeigte sich, dass durch eine erhöhte Konzentration an D-Glucose innerhalb des Darmlumens die in der Literatur beschriebene Permeabilitätssteigerung bestätigt und damit auch die Validität des neuen Messsystems bewiesen werden konnte. Über die Zeit von 60 min. wurde unter den Kontrollbedingungen mit Puffer A eine annähernd linear ansteigende Konzentration der L-[<sup>14</sup>C]-Glucose in der Darmwand detektiert, welche unter Stimulation mit D-Glucose (Puffer A + 20 mM D-Glucose) ebenso linear, aber steiler ansteigend ausfiel (**Vergleich rot gegen grün in Abb. 4.10**). Somit passierte unter der Bedingung eines luminal vorhandenen D-Glucose-Stimulus pro Zeiteinheit mehr L-[<sup>14</sup>C]-Glucose das Darmepithel als ohne Stimulation. Dieses Ergebnis konnte sowohl in den proximalen als auch in den distalen Dünndarmabschnitten bestätigt werden (**Vergleich von Abb. 4.10a mit 4.10b**).

Der gemittelte Startwert (= Wert der 3. Minute [ $t_3$ ]) für die gemessene Radioaktivität wurde bei jedem Experiment stets „eins“ gesetzt und die folgenden Messwerte in Relation dazu berechnet. Diese Werte innerhalb des Darmsegmentes eines Tieres zeigten eine durchgängige Übereinstimmung mit denen anderer Rattendärme, weshalb fortan diese Form der Darstellung der Resorption von L-[<sup>14</sup>C]-Glucose gewählt wurde.

(a) Resorptionsverhalten der vorderen 25 cm Dünndarm(b) Resorptionsverhalten der nachfolgenden 25 cm Dünndarm**Abb. 4.10: Resorptionsverhalten des Dünndarmepithels der Ratte unter Stimulation mit D-Glucose**

Über eine Inkubationszeit von 60 min. wurde in 15-Minuten-Abständen die relative Konzentration an L-[<sup>14</sup>C]-Glucose im Bindegewebe der Darmwand bestimmt. Der Startwert (= Wert der 3. Minute) wurde stets „eins“ gesetzt. Es zeigt sich bei luminal vorhandenem Puffer A sowohl für proximale (a) als auch für distale (b) Abschnitte des Jejunums ein linear verlaufender Konzentrationsanstieg an L-[<sup>14</sup>C]-Glucose (rot), welcher unter Stimulation mit D-Glucose (Puffer A + 20 mM D-Glucose) deutlich steiler ausfiel (grün). Das neue Messsystem war somit in der Lage die 1987 erstmals beschriebene D-Glucose-induzierte Steigerung parazellulärer Permeabilität zu detektieren.

#### 4.3.5 Die $K_{ATP}$ -Kanal-Regulatoren Tolbutamid und Diazoxid beeinflussen die parazelluläre Permeabilität

Die beiden Pharmaka Tolbutamid und Diazoxid üben antagonistische Wirkungen auf  $K_{ATP}$ -Kanäle aus (vgl. **Einleitung 1.3.3**). Der Sulfonylharnstoff Tolbutamid ist ein  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitor, welcher über eine Interaktion mit der SUR-Untereinheit das Schließen der durch die  $K_{IR6}$ -Untereinheiten gebildeten Ionenpore bewirkt. Diazoxid hingegen ist ein Aktivator des  $K_{ATP}$ -Kanals und veranlasst ebenfalls über Interaktion mit der SUR-Untereinheit eine Porenöffnung.

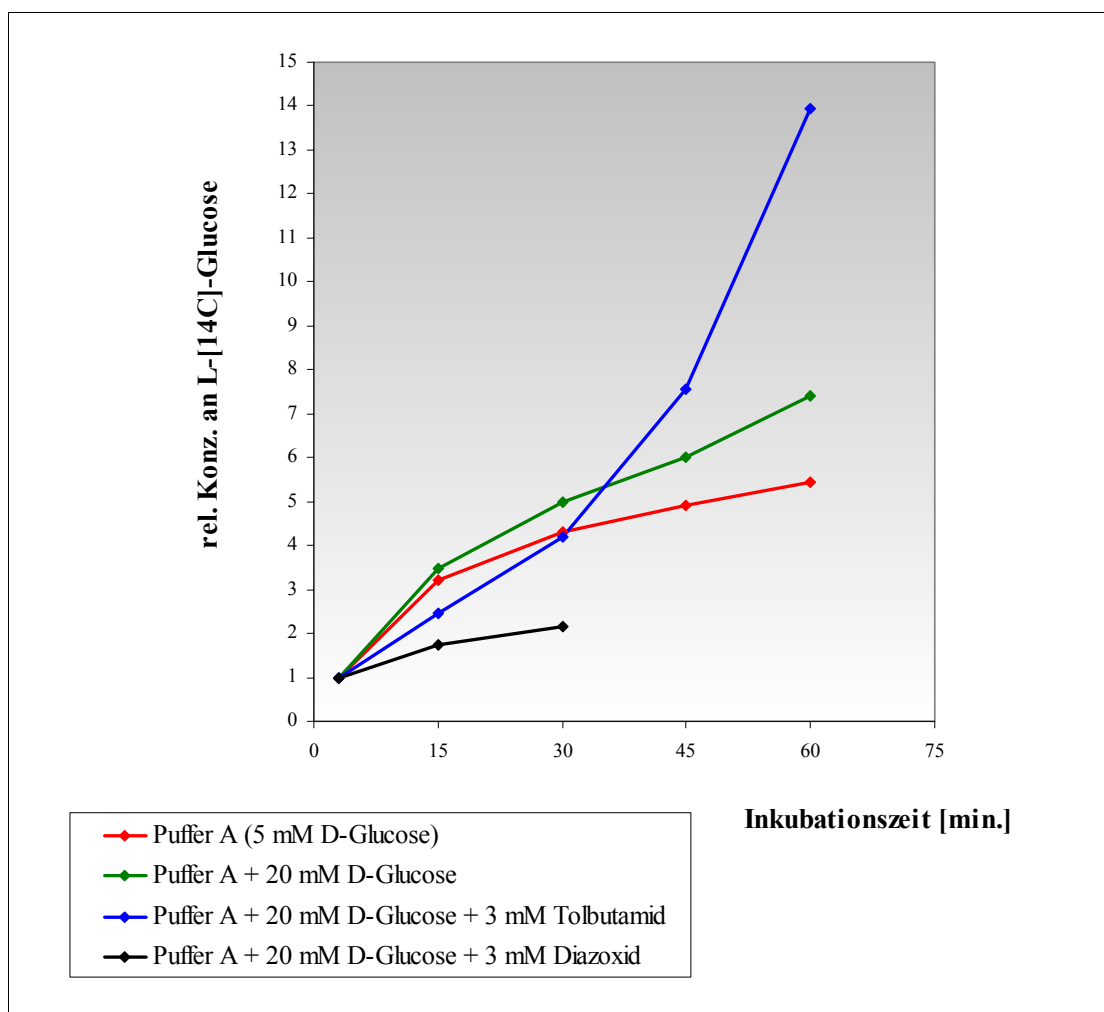
Die Experimente mit Tolbutamid und Diazoxid sollten nun erste Erkenntnisse darüber liefern, ob die genannten Pharmaka über die mit den Tight Junctions colokalisierten Proteine  $K_{IR6.1}$  und SUR2A möglicherweise eine Modulation der D-Glucose-induzierten Steigerung parazellulärer Permeabilität, also der Permeabilität der Tight Junctions, bewirken könnten. Außerdem war wieder das Verhalten der L-[ $^{14}C$ ]-Glucose-Resorption zu beurteilen, und zwar insbesondere dahingehend, ob dieses ebenso linear verlief wie bei den vorherigen Untersuchungen unter **4.3.4**.

Hierfür wurden 25-cm-Abschnitte von proximalem Jejunum verschiedener Ratten für 30 bzw. 60 min. mit Diazoxid- oder Tolbutamid-haltigen Inkubationslösungen (Nr. 5 und 6) gefüllt und in 15-Minuten-Abständen die relative Konzentration an L-[ $^{14}C$ ]-Glucose im Bindegewebe von abgeschnittenen Darm-Teilsegmenten bestimmt. Als Kontrolle erfolgten Inkubationen mit Puffer A und mit Puffer A + 20 mM D-Glucose.

Die Inkubation mit Tolbutamid (Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3mM Tolbutamid) ergab einen steilen aber annähernd proportionalen Anstieg der L-[ $^{14}C$ ]-Glucose-Konzentration (**blau in Abb. 4.11**). Verglichen mit der Inkubation der einfachen D-Glucose-Stimulation (Puffer A + 20 mM D-Glucose, **grün in Abb. 4.11**) war nach 60 min. etwa die doppelte Menge an Radioaktivität im Darmgewebe nachweisbar. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Tolbutamid einen Effekt bewirkte, der synergistisch mit dem der D-Glucose-Stimulation einherging. Die verwendete Inkubationslösung enthielt demnach offenbar einen additiven Stimulus für parazelluläre Permeabilität: die 20 mM D-Glucose und zusätzlich die 3 mM Tolbutamid.

Die Inkubation mit Diazoxid (Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3 mM Diazoxid) zeigte ein dem Tolbutamid genau entgegengesetztes Verhalten (**schwarz in Abb. 4.11**). Trotz der gleichzeitigen D-Glucose-Stimulation verlief der Konzentrationsanstieg an L-[<sup>14</sup>C]-Glucose deutlich flacher als bei allen anderen Inkubationen, aber ebenso annähernd linear. Nach 30 min. war nur etwa knapp die Hälfte der Radioaktivitätsmenge der Kontrollinkubation mit Puffer A (**rot in Abb. 4.11**) im Darmgewebe nachweisbar. Dieses Ergebnis ließ die Vermutung zu, dass der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivator Diazoxid einen hemmenden Einfluss auf parazelluläre Permeabilität ausübt.

Somit erbrachten diese Experimente einen ersten Hinweis darauf, dass eine Modulation von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch das Antagonistenpaar Tolbutamid und Diazoxid eine Beeinflussung parazellulärer Permeabilität bewirkt.



**Abb. 4.11: Resorptionsverhalten des Dünndarms der Ratte unter Anwendung von Tolbutamid und Diazoxid**

25-cm-Segmente proximalen Jejunums wurden über 60 min. mit verschiedenen Inkubationslösungen inkubiert. In 15-Minuten-Abständen wurden die aufgenommenen Mengen an L-[<sup>14</sup>C]-Glucose bestimmt und anhand der als „eins“ gesetzten Startwerte in Relation dazu berechnet. Der K<sub>ATP</sub>-Kanal-Blocker Tolbutamid bewirkte verglichen mit den Kontrollinkubationen (rot und grün) eine deutliche Zunahme parazellulärer Permeabilität, welche über die 60 min. annähernd linear verlief (blau). Der K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivator Diazoxid hingegen zeigte im Vergleich mit allen übrigen Inkubationslösungen über 30 min. einen ebenso annähernd linearen, aber sichtlich schwächeren Anstieg der L-[<sup>14</sup>C]-Glucose-Aufnahme (schwarz), so dass für das Diazoxid eine inhibierende Wirkung auf Tight-Junction-Permeabilität vermutet wurde.

#### 4.3.6 Statistische Datenerhebung zur pharmakologischen Beeinflussung parazellulärer Permeabilität durch D-Glucose, Tolbutamid und Diazoxid

Die Untersuchungen unter 4.3.5 zeigten, dass Tolbutamid möglicherweise eine aktivierende und Diazoxid eine inhibierende Funktion auf Tight-Junction-Permeabilität ausüben könnten. Diese vorläufigen Experimente sollten nun durch die im Folgenden beschriebenen Experimente auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft werden. Die Errechnung der p-Werte erfolgte mithilfe des t-Tests.

Da alle Inkubationslösungen in den unter 4.3.4 und 4.3.5 beschriebenen Vorexperimenten über die 60 min. ein annähernd linear verlaufendes Resorptionsverhalten aufwiesen, wurde für die folgenden Experimente eine Form der Endpunktbestimmung gewählt. Es wurde für jede Inkubationslösung die vom Dünndarm aufgenommene Menge an L-[<sup>14</sup>C]-Glucose nach 45 sek. ( $t_1$ -Startwert) und nach 60 min. ( $t_{60}$ -Endwert) bestimmt. Jede Experimentalserie zu einer Inkubationszeit umfasste stets drei Ratten, von denen jeweils ein proximales Jejunumsegment von 15 cm Länge zur Inkubation verwendet wurde. Zur Berücksichtigung individueller Experimentalbedingungen wurde jeder gemittelte  $t_1$ -Startwert als „eins“ gesetzt und die nachfolgenden  $t_{60}$ -Endwerte in Relation dazu berechnet.

Für die Inkubationen mit Puffer A + 20 mM D-Glucose ergab sich im Vergleich mit den Inkubationen mit Puffer A ein hochsignifikanter Anstieg ( $p = 0,0022$ ) an im Gewebe messbarer L-[<sup>14</sup>C]-Glucose um ca. 60% (**Vergleich der Säulen I und II in Abb. 4.12a**).

Die alleinige Verwendung des  $K_{ATP}$ -Kanal-Blockers Tolbutamid (Puffer A + 3 mM Tolbutamid) (**Säule III in Abb. 4.12a**) erhöhte im Vergleich mit der Puffer-A-Kontrollinkubation die L-[<sup>14</sup>C]-Glucose-Aufnahme unabhängig von einem Anstieg der luminalen D-Glucose-Konzentration um ca. 90% und übertraf damit sogar den Wert einer Stimulation mit 20 mM D-Glucose. Auch in diesem Falle war der gemessene Anstieg als statistisch hochsignifikant ( $p = 0,0013$ ) zu bewerten.

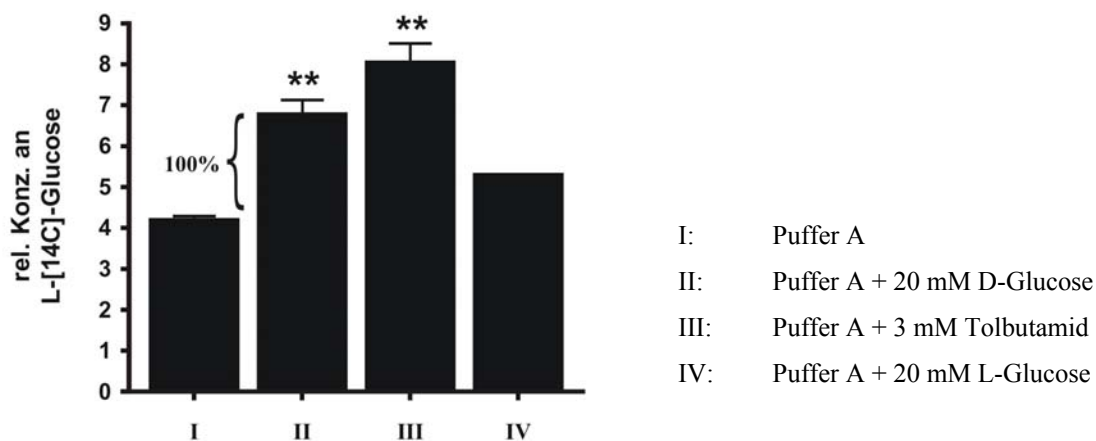
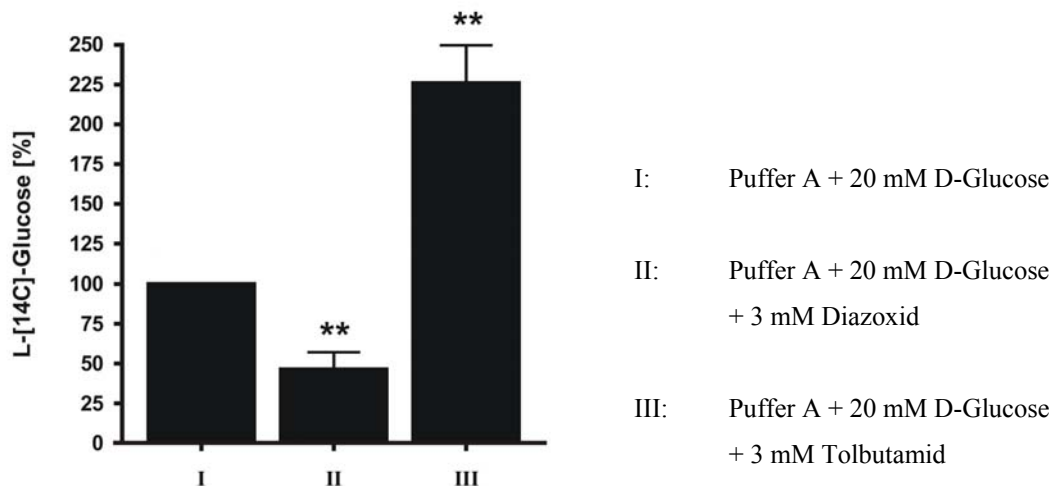
Als weitere Kontrollinkubation wurde in dieser Experimentalserie zusätzlich eine Inkubationslösung verwendet, welche anstelle von D-Glucose nun 20 mM L-Glucose in Puffer A enthielt (**Säule IV in Abb. 4.12a**). Verglichen mit der Puffer-A-Kontrollinkubation wurde hierbei kein signifikanter Effekt auf die Aufnahme von L-[<sup>14</sup>C]-Glucose festgestellt. Dies

bestätigte, dass der Natrium-gekoppelte Glucose-Cotransporter der apikalen Plasmamembran der Enterozyten (SGLT-1) ausschließlich das D-Enantiomer der Glucose transzellulär aus dem Lumen in die Zelle befördern kann (RUMMEL UND STUPP, 1960). L-Glucose wird vom SGLT-1 nicht erkannt und kann somit zu keinem intrazellulären Anstieg der ATP-Konzentration führen, welcher möglicherweise über den  $K_{IR6.1}/SUR2A$ -Proteinkomplex zu einer Erhöhung der Tight-Junction-Permeabilität beiträgt.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen regulatorischen Funktion des  $K_{IR6.1}/SUR2A$ -Komplexes wurde die Wirkung von Tolbutamid und Diazoxid auf den Anstieg parazellulärer Permeabilität nach Stimulation mit D-Glucose getestet. Hierfür wurde die alleinige D-Glucose-Stimulation als „100% Anstieg an parazellulärer Permeabilität“ gesetzt (**geschweifte Klammer in Abb. 4.12a und Säule I in Abb. 4.12b**).

Die 60-Minuten-Inkubationen mit Diazoxid (Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3 mM Diazoxid) zeigten hierbei eine hochsignifikante Reduktion ( $p = 0,0077$ ) des D-Glucose-induzierten Stimulationseffektes um ca. 50% (**Säule II in Abb. 4.12b**), so dass für den  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivator Diazoxid eine inhibierende Wirkung auf die Tight-Junction-Permeabilität bestätigt werden konnte.

In Gegenwart von Tolbutamid (Puffer A + 20 mM D-Glucose + 3 mM Tolbutamid) war hingegen ein deutlicher Anstieg der parazellulären Permeabilität festzustellen (**Säule III in Abb. 4.12b**). Die Aufnahme radioaktiver L-[ $^{14}C$ ]-Glucose überragte den Wert der D-Glucose-induzierten Permeabilitätssteigerung um 125% und war damit ebenfalls wieder als hochsignifikant ( $p = 0,0061$ ) zu bewerten. Dem  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker Tolbutamid konnte somit, unter Berücksichtigung der Ergebnisse in **Abb. 4.12a** und **4.12b**, eindeutig eine hochgradig stimulierende Wirkung auf die Tight-Junction-Permeabilität nachgewiesen werden.

(a) Stimulation parazellulärer Permeabilität(b) Beeinflussung D-Glucose-induzierter Steigerung parazellulärer Permeabilität durch Tolbutamid und Diazoxid**Abb. 4.12: Resorptionsverhalten von Rattendünndarm unter verschiedenen pharmakologischen Bedingungen**

15-cm-Jejunumsegmente wurden für 45 sek. ( $t_1$ -Startwert) oder 60 min. ( $t_{60}$ -Endwert) mit den verschiedenen Inkubationslösungen in gefülltem Zustand belassen. Danach erfolgte die Bestimmung der von der Darmwand resorbierten L-[ $^{14}$ C]-Glucose. Die  $t_1$ -Startwerte aller Inkubationen wurden stets „eins“ gesetzt (in der Abb. nicht gezeigt) und die  $t_{60}$ -Endwerte dazu in Relation berechnet. (\*\*) =  $p < 0,01$

- (a) Dieses Diagramm veranschaulicht den stimulatorischen Effekt von D-Glucose (II) und Tolbutamid (III) auf die Permeabilität intestinaler Tight Junctions. Verglichen mit der Kontrollinkubation (I) konnte nach 60 min. mit einer erhöhten Konzentration an D-Glucose ein ca. 60%-iger und mit Tolbutamid ein ca. 90%-iger Anstieg an Resorption von L-[ $^{14}$ C]-Glucose festgestellt werden. Eine Erhöhung der luminalen L-Glucose-Konzentration verursachte keinen signifikanten Effekt (IV).
- (b) Der Anstieg parazellulärer Permeabilität unter D-Glucose-Stimulation wurde als „100%“ gesetzt (I und geschweifte Klammer in (a) ). Die Zugabe des  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivators Diazoxid reduzierte diesen Effekt um ca. 50% (II), während der  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker Tolbutamid die L-[ $^{14}$ C]-Glucose-Aufnahme um ca. 125% erhöhte.