

Institut für Tierphysiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
**Prof. Dr. W. Clauß**

Dissertationsarbeit im Fachbereich 08 –  
Biologie und Chemie

---

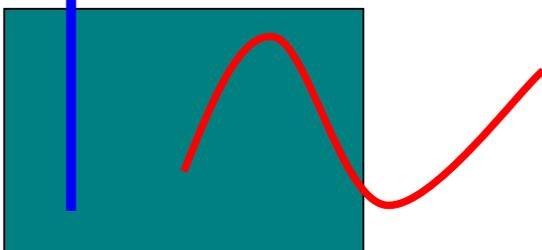
**Der Regenwurm als Bioindikator:**

Einfluss von Schwermetallen und Pestiziden auf den  
Ionen-transport über das Integument von *Lumbricus  
terrestris*

---

Vorgelegt von  
**Steffen Krumm**

September 2005



# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis .....	2
II	Vorwort .....	7
III	Einführung.....	10
III.1	Clitellata .....	10
III.2	Oligochaeten.....	10
III.2.1	Systematik.....	10
III.2.2	Fortpflanzung.....	14
III.2.3	Entwicklung .....	15
III.2.4	Ungeschlechtliche Fortpflanzung.....	16
III.2.5	Regeneration .....	17
III.2.6	Lebensweise.....	18
III.2.7	Fortbewegung .....	21
III.2.8	Sinnesleistung .....	22
III.2.9	Nervensystem.....	23
III.2.10	Ernährung.....	23
III.2.11	Exkretion.....	25
III.2.12	Osmoregulation .....	26
IV	Material und Methoden.....	27
IV.1	Präparation.....	27
IV.2	Stammlösungen.....	27
IV.2.1	Versuchsablauf.....	28
IV.3	Versuchsaufbau und elektrisches Messverfahren .....	29
IV.3.1	Die Ussing-Kammer.....	29
IV.3.2	Elektroden.....	29
IV.3.3	Current-clamp-Methode .....	30
IV.4	Datenerfassung .....	32
IV.5	Statistik.....	32
IV.6	Vorzeichenkonvention .....	33
IV.7	Verwendung von Fachbegriffen .....	33
IV.8	Grafische Darstellung.....	33
IV.9	Versuchsnummerierung .....	34

---

IV.10	Präsentation der Daten.....	34
V	Ergebnisse .....	36
V.1	Ca <sup>2+</sup> -frei.....	36
V.1.1	Ca <sup>2+</sup> -frei und Amilorid .....	36
V.2	Ca <sup>2+</sup> und Amilorid.....	37
V.2.1	Einfluss von Amilorid auf die Ca <sup>2+</sup> -Reaktion.....	38
V.2.2	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> auf die Amiloridreaktion .....	38
V.3	cAMP .....	39
V.3.1	cAMP und Amilorid.....	39
V.4	Cocktail .....	41
V.5	Cocktail und Calcium.....	41
V.6	Deltamethrin .....	42
V.6.1	Deltamethrin und Amilorid.....	43
V.6.2	Deltamethrin und Calcium.....	44
V.6.3	Deltamethrin basolateral.....	45
V.7	Ethosuximid.....	46
V.7.1	Ethosuximid und Calcium .....	46
V.8	Verapamil .....	48
V.8.1	Verapamil und Amilorid.....	49
V.8.2	Verapamil und Calcium.....	50
V.9	Nifedipin.....	51
V.9.1	Nifedipin und Amilorid .....	51
V.9.2	Nifedipin und Calcium .....	52
V.10	Blei.....	53
V.10.1	Blei und Amilorid.....	53
V.11	Eisen(II).....	55
V.11.1	Eisen(II) und Amilorid .....	56
V.12	Eisen(III) .....	57
V.12.1	Eisen(III) und Amilorid.....	57
V.13	Kobalt.....	58
V.13.1	Kobalt und Amilorid .....	59
V.14	Kupfer.....	60

---

---

V.14.1	Kupfer und Amilorid.....	61
V.14.2	Kupfer und Calcium.....	63
V.14.3	Langzeitwirkung von Kupfer.....	65
V.15	Nickel.....	65
V.15.1	Nickel und Amilorid.....	66
V.15.2	Nickel und Calcium.....	68
V.16	Quecksilber.....	70
V.16.1	Quecksilber und Amilorid.....	71
V.16.2	Quecksilber und Calcium.....	72
V.16.3	Langzeitwirkung von Quecksilber.....	73
V.17	Zink.....	74
V.17.1	Zink und Amilorid.....	75
V.17.2	Zink und Calcium.....	77
V.17.3	Regenwurmringler unter Zink.....	77
V.18	pH-Wert.....	78
V.18.1	Wechsel von pH 6 nach pH 8 und vv.....	79
V.18.2	pH-Wert und Amilorid.....	79
VI	Diskussion.....	81
VI.1	Das Regenwurmepithel.....	81
VI.2	Der epitheliale Natrium-Kanal.....	82
VI.3	Calcium-Kanäle.....	86
VI.4	Amilorid und Calcium.....	88
VI.5	cAMP.....	90
VI.6	Deltamethrin.....	91
VI.7	Ethosuximid.....	93
VI.8	Verapamil.....	94
VI.9	Nifedipin.....	95
VI.10	Blei.....	96
VI.10.1	Charakterisierung.....	96
VI.10.2	Biologische Relevanz.....	97
VI.10.3	Wirkung von Blei auf den Natriumtransport.....	97
VI.11	Kobalt.....	98

---

---

VI.11.1	Charakterisierung .....	98
VI.11.2	Biologische Relevanz .....	99
VI.11.3	Wirkung von Kobalt auf den Natriumtransport .....	99
VI.12	Kupfer.....	100
VI.12.1	Charakterisierung .....	100
VI.12.2	Biologische Relevanz .....	100
VI.12.3	Wirkung von Kupfer auf den Natriumtransport.....	101
VI.12.4	Wirkung von Kupfer auf den Calciumtransport.....	102
VI.13	Nickel .....	102
VI.13.1	Charakterisierung .....	102
VI.13.2	Biologische Relevanz .....	103
VI.13.3	Wirkung von Nickel auf den Natriumtransport .....	104
VI.13.4	Wirkung von Nickel auf den Calciumtransport .....	105
VI.14	Quecksilber.....	106
VI.14.1	Charakterisierung .....	106
VI.14.2	Biologische Relevanz .....	107
VI.14.3	Wirkung von Quecksilber auf den Natriumtransport .....	107
VI.14.4	Wirkung von Quecksilber auf den Calciumtransport.....	108
VI.15	Zink .....	109
VI.15.1	Charakterisierung .....	109
VI.15.2	Biologische Relevanz .....	109
VI.15.3	Wirkung von Zink auf den Natriumtransport .....	110
VI.15.4	Wirkung von Zink auf den Calciumtransport .....	111
VI.16	Natriumtransport.....	112
VI.17	Calciumtransport.....	115
VI.18	pH-Wert.....	117
VII	Zusammenfassung .....	119
VIII	Summary .....	121
IX	Bedeutung und Ausblick.....	122
X	Anhang.....	123
X.1	Literatur.....	123
X.2	Abbildungsverzeichnis .....	129

---

---

X.3	Tabellenverzeichnis .....	131
X.4	Chemikalien.....	133
X.5	Sonstiges.....	134
X.6	Bezugsquellen.....	134
X.7	Versicherung.....	136
X.8	Danksagung .....	137

## II Vorwort

### Der Wurm

Am Fuß von einem Aussichtsturm  
Saß ganz erstarrt ein langer Wurm.

Doch plötzlich kommt die Sonn' herfür  
Erwärmt den Turm und auch das Tier.

Da fängt der Wurm an, sich zu regen,  
Und Regenwurm heißt er deswegen.

*(Heinz Erhardt)*

Treffend, wie der große deutsche Komiker Heinz Erhardt dem Regenwurm ein Kurzgedicht widmete. Heinz Erhardt als anspruchsvoller Künstler bezieht sich auf die Namensgebung aus dem 16. Jahrhundert, wonach der Regenwurm seinen Namen aufgrund seiner Aktivität erhalten hat. Doch sind auch viele der Meinung, dass die Würmer ihre Bezeichnung von der Eigenart erhalten haben, bei Regen ihre Gänge zu verlassen und auf der Erdoberfläche herumzukriechen. Geht man mal über die Nomenklatur der deutschen Sprache hinaus, so finden wir treffendere Bezeichnungen für den kleinen Bodenbewohner. Die englische Bezeichnung „earthworm“ oder auch das französische „ver de terre“ liefern viel passendere Namen, da sie sich auf den Lebensraum des Regenwurms beziehen. In dieser Arbeit werden Regenwurm und *Lumbricus* parallel verwendet.

Der „Stellenwert“ dieses Tieres im Laufe der Geschichte war sehr unterschiedlich. Wie vieles wurde er verteufelt und gelobt. Es gab Zeiten, in denen der Regenwurm von Gärtnern als Schädling verschrien war, fräße er doch die Wurzeln der Pflanzen und mindere so den Ertrag auf dem Feld oder im Garten. Im Mittelalter wiederum besaß er große Beliebtheit. Damals wurde er, oder zumindest Teile von ihm, zur Senkung von Fieber und als wehenauslösendes Mittel eingesetzt. Noch heute findet er Verwendung in der traditionellen chinesischen

Medizin. Dort setzen sie getrockneten und pulverisierten Regenwurm zur Herstellung von „Funaikang“-Kapseln ein, die zur Behandlung von Krebs herangezogen werden. Nicht vergessen werden darf sein Einsatz bei der Nahrungsbeschaffung des Menschen, wo er, als Angelköder verwendet, viele hungrige Mäuler stopfte. Oder aber, direkt verspeist, zur Belustigung von Kindern und zur finanziellen Bereicherung des „Essers“ beitrug. Denn wer kennt nicht die Geschichten, in denen Kinder ganze Würmer für ein paar Pfennige oder Cents aßen?!

Heutzutage ist der Regenwurm ein gern gesehener Bewohner der heimischen Gärten, trägt er doch mit seinem Kot, dem „Gärtnergold“, zur Bereicherung des Erdreichs, und damit zu gedeihenden Pflanzen bei.

Sein Lebensraum „Boden“ ist es auch, der den Regenwurm so interessant für wissenschaftliche Untersuchungen macht. Da er in nahezu allen Böden zu finden ist, liegt der Einsatz als Bioindikator nahe. Wie reagiert dieser Bodennützlichling auf Belastungen der Erde mit Schwermetallen? Welche Dosen an Pflanzenschutz- oder Unkrautvernichtungsmitteln sind in Hinblick auf die Bodenfauna noch vertretbar? Die bisherigen Versuche, die zur Ermittlung von Grenzwerten führte, gestalteten sich als „dosis-letalis-Versuche“, die zwar Ergebnisse, aber keine reell vertretbaren Grenzwerte liefern können. In diesen Untersuchungen wurde nur die Frage geklärt, bei welcher Konzentration die Hälfte der eingesetzten Würmer starb. Tiefgehende Veränderungen, die irgendwelche Langzeitschäden hervorriefen, wurden dabei völlig außer Acht gelassen. Die erstmals von uns beim Regenwurm eingesetzte Ussing-Kammer-Methode bietet vollkommen neue Möglichkeiten, genauere und sensiblere Messungen vorzunehmen.

Um diesen neuen Bioindikator näher kennen zu lernen, sind einige grundlegende Untersuchungen von Nöten, da noch nicht viel auf dem Gebiet der Elektrophysiologie vom Regenwurm bekannt ist. Den Grundstein für diese Untersuchungen legten Cornell 1982 (Cornell 1982), Dietz und Alvarado 1970 (Dietz and Alvarado 1970) und Prusch und Otter 1977 (Prusch and Otter 1977) mit Untersuchungen zum Ionentransport. Allerdings beschränkten sich diese Experimente auf die Analyse der Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten von *Lumbricus terrestris*. Die Versuche mit der Ussing-Kammer liefern nun die Chance, Transportvorgänge über das Epithel der Regenwurmhaut direkt zu untersuchen. Damit stehen uns nun Möglichkeiten offen, dieses Gewebe grundlegend zu charakterisieren und bereits Einflüsse verschiedenster Substanzen zu untersuchen.

---

Aber erst einmal zurück zum Hauptdarsteller „Regenwurm“. Der bekannteste Regenwurm der Familie *Lumbricidae* ist wohl der lange Tauwurm oder gemeine Regenwurm *Lumbricus terrestris*, der als „der“ Regenwurm angesehen wird. 2004 wurde der Regenwurm zum „Wirbellosen Tier des Jahres“ gekürt, was seinen Stellenwert noch unterstreicht. Der von den Gärtnern geschätzte Wurm gehört zum Stamm der *Annelida* und dort zur Klasse der *Clitellata*. Von den weltweit rund 3500 Arten der Ordnung *Oligochaeta* gehören 10 Gattungen mit 220 Arten zu den *Lumbricidae*. 39 Arten leben von ihnen in Deutschland. Um dieses Tier nun in seiner Physiologie besser erfassen zu können und auch seine Einordnung zu verstehen, betrachten wir zunächst mal den Regenwurm in der Systematik der Clitellata.

### III Einführung

Diese Einführung soll zum besseren Verständnis der Physiologie des Regenwurms dienen und seine Verwandtschaftsverhältnisse zu anderen „Würmern“ verdeutlichen. Dabei werden Themen wie Systematik, Fortpflanzung, Entwicklung usw. behandelt, damit ein Verständnis für den Regenwurm als Bioindikator entwickelt werden kann.

#### III.1 Clitellata

Bei den Clitellata, deren überwiegende Zahl im Süßwasser oder im Boden des Festlandes lebt, wird, wie bei anderen Tierklassen unter selbigen Umständen, das freie Larvenstadium unterdrückt. Die Entwicklung bis zum Imago findet in einem festen Kokon statt. Dieser wird von stark ausgebildeten, einzelligen Hautdrüsen erzeugt, die in der Gegend der Geschlechtsöffnungen eine auffällig verdickte Zone, das „Clitellum“, bilden. Das dort erzeugte Sekret spielt auch bei der Begattung der Oligochaeten eine wichtige Rolle.

Die Verwandtschaft zu den Polychaeten zeigt sich am deutlichsten bei der Ordnung der Oligochaeten. Bei ihnen befinden sich ebenfalls in jedem Segment vier Borstentaschen mit Borsten. Auch ist die Cölomhöhle gut ausgebildet und die Geschlechtsprodukte werden durch, mit einem Trichter versehene, Gonodukte nach außen geleitet. Die Gonaden sind bereits auf wenige Segmente beschränkt.

Im Folgenden wird die Ordnung „Oligochaeta“ genauer betrachtet.

#### III.2 Oligochaeten

##### III.2.1 Systematik

*„Zwittrige Anneliden, deren äußerliche und innerliche sehr deutlich gegeneinander abgegrenzte Segmente mindestens je 4 Paar Borstensäcke, nie aber Parapodien aufweisen. Prostomium klein, ohne Anhänge. Gonaden auf wenige Metameren beschränkt.“* So beschreibt Alfred Kästner in seinem „Lehrbuch der Speziellen Zoologie“ 3. Auflage die Ordnung „Oligochaeta, Wenigborster“ (Kaestner 1969). Die Anzahl der Segmente dieser Ordnung schwankt zwischen 7 und 600. Diesen ist meist ein winziges Prostomium vorge-lagert, welches bei einigen wenigen Gattungen fadenartig zu einem Tastfortsatz mit vielen Sinneszellen ausgezogen sein kann (z.B. bei *Stylaria*, *Ripistes*, *Pristina*). Die Anzahl der Borsten pro Segment ist, abgesehen von den aquatischen, im Vergleich zu den Polychaeten

sehr gering. Bei den Regenwürmern sinkt diese Zahl sogar auf zwei, die zudem noch recht kurz ausfallen. Eine Ausnahme hierzu machen die *Megascoleciden*. Deren Borsten sind nicht auf vier Bündel verteilt, sondern bilden einen mehr oder weniger vollständigen Kranz. Dieser, das ganze Segment umfassend, kann über 100 Borsten enthalten.

Eine Kutikula schützt die Außenwand der Oligochaeten. Diese besteht bei den europäischen Regenwürmern aus mehreren Schichten collagener Fibrillen. Sie sind in eine Grundsubstanz eingelagert und ähneln sehr dem Collagen der Wirbeltiere. Die Fibrillen werden von den zahlreich in der Haut vorkommenden Drüsenzellen abgeschieden.

Wasserbewohnende Gattungen sind meist durchsichtig, so dass deren innere Organe von außen gut zu erkennen sind. Die Erdwürmer hingegen besitzen eine undurchsichtige Haut, deren Unterhaut meist rotbraune, graue und violette Pigmente enthält. Tropische Arten sind manchmal grell gefärbt, so ist z.B. der meterlange *Pheretima* himmelblau mit gelben Tupfen. Der Hautmuskelschlauch, der bei den Regenwürmern wesentlich dicker ist als bei den aquatischen Vertretern, besteht aus Ring- und Längsmuskulatur und ist nicht segmentiert.

Zwischen den Epidermiszellen der Haut befinden sich Sinneszellen oder Sinnesknospen, sowie freie Nervenendigungen. Man findet auch Zellen mit einem Phaosom, einem großen, lichtbrechenden Körper, welcher als Rezeptor für Licht dient. Die größte Dichte an Sinneszellen findet man auf dem Prostomium ( $700/\text{mm}^2$ ), aber auch in großer Anzahl auf dem Rücken und auf den Flanken der vorderen Segmente. Nach hinten laufend nimmt die Dichte der Sinneszellen ab, wohingegen das Körperende reichlich mit Phaosomzellen ausgestattet ist. Die strickleiterförmige Anlage des Nervensystems und der Sitz des Oberschlundganglions im Prostomium werden nur in wenigen Fällen, wie z.B. bei den *Äolosomatiden*, beibehalten. Vielmehr ist das Oberschlundganglion bei den Regenwürmern im 3. Segment im Laufe der Ontogenese verschoben worden. Die Bauchganglien sind in die Mediane gewandert und äußerlich miteinander verschmolzen. Die Neuomere 1-4 haben sich außerdem noch zu einem Knoten, dem Unterschlundganglion vereint. Einige Riesenfaser verlaufen in den Konnektiven, in welchen die Erregung, verglichen mit anderen Wirbellosen, recht schnell verläuft (bei *Lumbricus* 10m/sec bis 45m/sec bei 24°C). Diese hohe Leitgeschwindigkeit ermöglicht es dem Wurm, sich blitzschnell bei starker Reizung des Vorderendes zusammen zu ziehen und so in sein Erdloch zurück zu gleiten. Bei *Lumbricus* fallen die zu den Sinnesorganen ziehenden Gehirnnerven und ein Plexus auf, der sich über das ganze Tier ausdehnt und direkt unter der Epidermis liegt.

Die Mundhöhle, ebenfalls mit Kutikula ausgekleidet, ist mit kräftiger Muskulatur ausgestattet. Bei den *Enchytraeidae* findet man eine scharfkantige, kutikularisierte Schableiste oder zwei

harte Stilette. Bei *Branchiobdellidae* erzeugt die Pharynxwand einen ventralen und einen dorsalen, sklerotisierten „Kiefer“.

Der Mundhöhle schließt sich der Pharynx an. Bei den räuberischen *Chaetogaster* ist dieser ein sehr geräumiger, durch Muskeln erweiterungsfähiger Sack. Bei den meisten anderen Oligochaeten ist sein Epithel dorsal verdickt. Zusätzlich noch ist er von langen Drüsenzellen durchzogen und mit starker Muskulatur unterlagert. Dieses ganze „Kissen“ kann nach vorne gedrückt und aus dem Mund heraus geschoben werden. So bildet sich eine klebrige Scheibe, die an die Nahrung gepresst und durch Retraktoren zurück in den Mundraum gezogen werden kann, wobei die Nahrung direkt in den Vorderdarm gelangt. Sie kann aber auch bei Regenwürmern wie ein Pumpenstempel eine Saugwirkung erzeugen.

Der anschließende Ösophagus ist in mehrere Abschnitte unterteilt. Der erste, an den Pharynx anschließende Abschnitt, ist ziemlich eng. Er besitzt jedoch ein Paar seitlicher Divertikel, die bei den *Opisthophoren* durch zwei Einschnürungen zu den drei Säcken der recht komplizierten Kalkdrüsen differenziert sind. Es folgt ein erweiterter Abschnitt, der die Funktion eines Kropfs übernimmt. Der nächste Abschnitt, bei den *Lumbriciden* der hinterste, ist als Quetschorgan gestaltet. Dieses ist von einer Wand aus fester Kutikula umgeben, welche Chitin- $\beta$  und eine dicke Außenmuskulatur enthält.

Dem Ösophagus folgt das Intestinum. Dieses besitzt sehr selten Blindsäcke, weist jedoch bei allen Erdwürmern eine mehr oder weniger komplizierte dorsomediane Einfaltung auf. Diese Einfaltung wird als Typhlosolis bezeichnet und hat die Aufgabe der Oberflächenvergrößerung im Darm. Zudem ziehen Blutgefäße in die Typhlosolis hinab und erhöhen somit die Grenzfläche zur Nahrungsaufnahme ins Blut. Der Darm ist von Ring- und Längsmuskeln umgeben, die eine Peristaltik bewirken.

Das Cölom der Oligochaeten besteht aus regelmäßig hintereinander geschalteten Säcken. Diese treten paarig auf und haben einen geräumigen Innenraum. Die Dissepimente, die Muskelfasern enthalten, sind von Öffnungen für Darm, Rückengefäß usw. unterbrochen. Aufgrund des ventralen Durchlasses für den Bauchganglienstrang stehen sie so miteinander in Verbindung, welcher jedoch beim Kriechen durch einen Sphinkter geschlossen wird. In der ganzen Körperlänge ist das dorsale Mesenterium jedoch nicht ausgebildet. Im Rücken der Erdwürmer treten einfache Poren auf, durch welche eine Ausscheidung der Cölomflüssigkeit stattfinden kann. Die Homonomie der Metameren ist nur im vorderen Teil der Tiere nicht zu finden, da dort keine Poren und Dissepimente auftreten. Man findet in der Cölomflüssigkeit verschiedenartige Cölokozyten, die ein Bestandteil des Abwehrsystems der *Lumbriciden* sind (Selbst- und Fremderkennung, Phagozytose, Einkapselung, Abstoßung von Implantaten)

(Sima and Vetvicka 1993). Man wies zwar in der Cöloflüssigkeit von *Pheretima* Exkrete wie Harnstoff und  $\text{NH}_3$  nach, jedoch fehlten Nährstoffe wie Glukose, Fette und Aminosäuren. Man geht daher davon aus, dass die Cöloflüssigkeit, zumindest bei dieser Gruppe, nicht dem Nährstofftransport dient. Das Cölothel differenziert sich auf der Wand des Darms sowie der größeren Blutgefäße zu gelben Chloragog-Zellen.

Das Blut vieler Oligochaeten enthält Hämoglobin, aber nur wenige schwimmende Blutzellen. Bei *Pheretima* konnte man Glukose, Aminosäuren und Fette nachweisen, was den Schluss zulässt, dass es der Verteilung von Nahrungsbestandteilen dient. Obwohl zwischen Darmepithel und Chloragog ein ausgedehntes und nahrungsaufnehmendes Gefäß vorhanden ist, ist der Blutkreislauf geschlossen. Als Motor dient das Rückengefäß, dass durch Kontraktionswellen das Blut aus dem Darmnetz ansaugt und nach vorne befördert. Von diesem Rückengefäß ziehen mehr oder weniger regelmäßig metamer angeordnete Gefäße halbringförmig zum Subintestinalgefäß, welches auf dem Ganglienstrang liegt. Diese Kommissurgefäße sind im vorderen Teil des Körpers mit starker Muskulatur ausgerüstet. Diese pulsieren rhythmisch und treiben das Blut ventralwärts. Diese so genannten „Lateralherzen“ unterstützen das Rückengefäß bei seiner Pumpleistung. Im Ventralgefäß fließt nun das Blut wieder nach hinten und wird dem Darmnetz zugeführt.

Die Sauerstoffversorgung dieser Tiere erfolgt in den meisten Fällen über Hautatmung. Zu diesem Zweck ist die Epidermis von einer Unmenge von Kapillaren durchzogen, die bis zur Kutikula vordringen. Lokalisierte Atmungsorgane wurden nur bei einigen Wasserbewohnern festgestellt. *Dero* z.B. besitzt im After einziehbare, fingerförmige Fortsätze, in welche Gefäßschleifen hineinragen und somit die Atmung unterstützen. Bei *Branchiura* findet man paarige, fadenartige Ausstülpungen an den hinteren Segmenten. Enddarmatmung hingegen konnte bei manchen *Naididae*, *Tubificidae* und *Enchytraeidae* festgestellt werden. Unterstützend dazu laufen bei diesen Wasserbewohnern alle 2-3 Sekunden peristaltische Wellen kopfwärts. Verstärkt wird deren Saugwirkung oftmals durch eine oral gerichtete Flimmerströmung des Enddarms. Auf diese Art und Weise wird  $\text{O}_2$  dem im Darm befindlichen Wasser entzogen und über das Blut der Darmgefäße aufgenommen.

In sämtlichen Segmenten, ausgenommen die ersten bei den *Opisthoporen*, findet man Metanephridien. Bei den Wasserbewohnern fehlen sie in den Segmenten mit den Geschlechtsorganen. Ihr Ausführgang ist in mehrere Schleifen gelegt und von Blutgefäßen umgeben. Bei einigen *Megascolecidae* heißer Länder bringt das Nephroblastenpaar durch Spaltung eine große Anzahl Nephridien hervor. Bei *Pheretima posthuma* und anderen Oligochaeten verwandter Gattungen münden viele der Metanephridien in den Darm. So kann eine aus-

giebige Rückresorption des Wassers erfolgen, wodurch die Tiere in der Lage sind, trockene Böden zu bewohnen und selbst in regenlosen Jahreszeiten die Oberflächenschichten aktiv zu nutzen.

Oligochaeten sind im Gegensatz zu den Polychaeten Zwitter. Sie besitzen kompakte, fest umrissene Gonaden, die jedoch auf sehr wenige Segmente der vorderen Körperhälfte beschränkt sind. Diese können als wichtiges Merkmal für die Taxonomie herangezogen werden. Die Hoden liegen in 1-4 Paaren vor und befinden sich in ebenso vielen aufeinander folgenden Metameren. Die Geschlechtszellen lösen sich schon frühzeitig von ihnen ab und durchlaufen ihre Meiose in der Cölomflüssigkeit, häufig in großen Aussackungen der Dissepimente (Samensäcken). Bei vielen *Opisthoporen* bilden sich außerdem noch waagerechte breite Scheidenwände in den Geschlechtssegmenten aus. Diese teilen das Cölom in ein oberes, steriles Stockwerk und in eine untere Etage mit Hodenpaar und Samensäcken. Auf diese Art und Weise entstehen Samenkapseln, denen Gonodukte mit großen Trichtern als Ausführgänge dienen. Diese durchziehen bei den *Lumbriciden* mehrere folgende Körperringe und treten innerhalb einer Hautrinne (Samenrinne) nach außen.

Die, häufig nur einpaarigen, Ovarien befinden sich hinter den männlichen Segmenten. Die zugehörige Cölohmöhle ähnelt denen der Hoden und ist ebenfalls mit einer Aussackung ausgestattet, in welcher die Meiose stattfindet. Davor oder dahinter sind in einigen Körperringen als sackförmige Einstülpungen der Epidermis kleine paarige, blind endende Receptacula seminis ausgebildet.

### III.2.2 Fortpflanzung

Die Oligochaeten sind in der Regel proterandrische Zwitter. Nur bei *Eiseniella tetraedra* wurde bei polyploiden Rassen Parthenogenese festgestellt. Die Kopulationsstellung, bei denen sich die Partner wechselseitig gleichzeitig ihre Receptacula mit Sperma füllen, ist bei allen gleich. Die beiden Würmer legen sich so aneinander, dass der Hinterrand des Clitellums an die Receptacula-Eingänge des Partners zu liegen kommt. Da sich bei den meisten Oligochaeten die männlichen Geschlechtsöffnungen auch am Ende des Clitellums befinden, kann so das Sperma direkt in die Receptacula des Partners entleert werden. Die Öffnungen sind oftmals mit einer erhabenen Lippe, manchmal sogar mit einem Penis ausgestattet. Dies gestaltet sich bei den *Lumbriciden* ganz anders, da dort die männlichen Öffnungen im Abstand von 16 Ringen zum Clitellum liegen. Auch diese Würmer schmiegen das Clitellum an die Receptacula-Öffnungen des Partners, wodurch nun das Sperma einen weiteren Weg

zurückzulegen muss. Gesichert wird dieser Vorgang durch eine Schleimscheide, in welche sich beide Würmer während der Paarung hüllen. *Lumbricus terrestris* kriecht vor der Kopulation nur mit halbem Körper aus seinem Erdgang. Nun legt er sich auf die oben beschriebene Weise neben seinen Partner auf die Oberfläche des Bodens. Für eine feste Verankerung haken sich die dicken, gebogenen Ventralborsten der vorderen Segmente in den Nachbarn; die spitzen Bauchborsten der Gürtelgegend bohren sich sogar in dessen Hautmuskelschlauch ein. Nun hüllen die Würmer ihre Vorderenden in einen von der Haut ausgeschiedenen Schleim, der erhärtet und so die Samenrinne überbrückt und zu einem geschlossenen Kanal werden lässt. Auch die Clitella sezernieren reichlich Schleim, der beide Würmer zusammen in eine Röhre einschließt. Nun wird ein Spermatropfen abgeschieden, der durch die Peristaltik der Rinnenwand zur Receptacula-Öffnung des Partners transportiert wird. Dieser Transport dauert etwa 30min, die Füllung des Receptacula-Paares eine Stunde und der ganze Vorgang der Kopulation 2-3 Stunden.

Die Eier werden in einem Kokon abgelegt, der in Form eines erhärtenden Schleimgürtels abgeschieden wird. Gleichzeitig wird unter ihm eine große Menge einer eiweißhaltigen Flüssigkeit abgesondert, die den Embryonen als Nahrung dient. Durch peristaltische Bewegungen des Hautmuskelschlauches wird der Gürtel über den Kopf des Wurmes gestülpt. Dabei werden bei dem Passieren der weiblichen Geschlechtsöffnungen (bei *Eisenia* schon vorher) ein bis mehrere Eier in den Schlauch abgegeben. Beim Vorbeigleiten an den Receptacula wird nun Sperma in den Kokon entlassen, welches später die in der Flüssigkeit liegenden Eier befruchtet. Gleitet der Gürtel nun vom Wurm, schließt sich zuerst das vordere Ende durch elastisches Zusammenziehen, anschließend auch das hintere Ende. Der Kokon nimmt z.B. beim Regenwurm die Form einer Zitrone an und seine Länge wechselt nicht nur bei den einzelnen Arten, sondern auch intraspezifisch (bei *Eisenia foetida* zwischen 1,5mm und 6mm Länge). Bei vielen mitteleuropäischen Regenwurmartens schlüpft aus jedem Kokon nur ein einziger Wurm, während bei *Eisenia foetida* ca. 2-5 junge Würmer schlüpfen. Bei *Lumbricus terrestris* sind die Jungtiere etwas 10mm lang.

### III.2.3 Entwicklung

Die Entwicklung der Oligochaeteneier besteht bei manchen Regenwürmern aus einer etwas abgeänderten Spiralfurchung. Die Makromeren werden anschließend durch Invagination oder Epibolie zur Ausbildung des Mitteldarms ins Innere der Mikromerenkugelschale verlagert. Wie auch bei anderen Süßwassertieren entsteht aus der Gastrula nie eine Wimpernlarve. Auf

der Oberfläche bildet sich hingegen eine Keimscheibe, die aus zwei Längshälften besteht. Diese stellt die zukünftige Bauchseite des Wurms dar.

Für die Betrachtung der weiteren Entwicklung soll *Tubifex* als Modell dienen, auch wenn die anderen Familien sich grundsätzlich ähnlich verhalten. Jede Hälfte der Keimscheibe sprosst aus fünf Teloblasten streifenartig hervor, von denen vier in bestimmter Teilungsfolge aus der Zelle 2d entstanden sind. Sie liegen auf der Oberfläche nebeneinander und erzeugen vier parallele Zellketten, die längere Zeit einkettig bleiben. Aus dem median gelegenen Teloblasten jedes Keimstreifens entsteht in der Hauptsache der Bauchganglienstrang. Die drei seitlichen Teloblasten hingegen bilden sich zur Ringmuskulatur des Hautmuskelschlauchs aus. Alle vier Teloblasten geben Zellen für die Epidermis ab. Teloblast Nr. 5 stammt aus der Zelle 4d ab. Aus ihm sprossen auf jeder Körperseite eine Reihe von Mesoblastenzellen. Sie schieben sich unter den Keimstreifen und geben der Cölomhöhle und der Längsmuskulatur ihren Ursprung. Es erfolgt eine Streckung des Eies und der Dotter schwindet. Beide Keimstreifenhälften legen sich von vorne beginnend in der Mittellinie aneinander. Das verleiht dem Wurm die typische „Wurmform“. Die Keimstreifen beginnen gleichzeitig, mit den darunter liegenden Meroblasten, die Seitenwand des Eies zu umwachsen. Das erfolgt so lange, bis sie sich längs der Dorsomedianen treffen. Dadurch wird der flächenhafte Keim zu einem Wurmkörper, der den aus den Makromeren entstandenen Darm umschließt.

Da die Regenwurmeier arm an Dotter sind, ist der Keim auf die ihn umgebende eiweißhaltige Flüssigkeit angewiesen. Diese strudelt er mit Hilfe von Wimpernzellenstreifen zum Mund, wo die Aufnahme durch einen provisorischen Pharynx erfolgt, der mit Schluckmuskeln ausgestattet ist. Dieser füllt den blind endenden Mitteldarm dermaßen mit Flüssigkeit, so dass er sich aufbläht. Die Entwicklung mitteleuropäischer Regenwürmer dauert in normal feuchten Böden drei bis vier Wochen und die Lebensdauer in Gefangenschaft lag bei *Lumbricus terrestris* bei sechs und bei *Allolobophora longa* sogar bei zehn Jahren.

### III.2.4 Ungeschlechtliche Fortpflanzung

Die ungeschlechtliche Fortpflanzung spielt bei den süßwasserlebenden Äolosomatiden und Naididen eine bedeutende Rolle. Bei den *Naididae* erfolgt sie, sobald die Anzahl der Segmente eine bestimmte Schwelle überschreitet. Sie findet durch Querteilung statt und wird dadurch vorbereitet, indem sich an der Stelle, wo später die Abtrennung des Tochtertieres erfolgt, eine Zellwucherung bildet. Diese bildet eine ringförmige Sprossungszone aus, deren Vorderabschnitt sich zu einem Hinterende differenziert, das den Abschluss des Muttertieres

bildet. Die hintere Zone wird demnach zum Vorderteil des Tochtertieres, der sich bei vielen Naididen aus dem Kopflappen und fünf weiteren Segmenten ohne Rückenborsten zusammensetzt. Die Trennung von Mutter- und Tochtertier erfolgt durch Autotomie in der Sprossungszone. Oft bildet sich auch schon vorher im Muttertier, bei anderen Spezies auch in der Sprossungszone oder im Tochtertier, eine weitere Sprossungszone, so dass eine Tierkette entsteht. Die ungeschlechtliche Vermehrung steht in vielen Fällen im Vordergrund und die geschlechtliche Fortpflanzung tritt nur einmal im Jahr auf. So liegt ein echter Generationswechsel (Metagenese) vor. *Aeolosoma hemprichi* wie auch andere Arten vermehren sich ausschließlich durch ungeschlechtliche Fortpflanzung.

### III.2.5 Regeneration

Regeneration tritt auch bei bodenbewohnenden Arten häufig auf. Wird ein vorderes Stück der Regenwürmer abgetrennt, so kann dieses ein neues Hinterende bilden. Ein hinteres Reststück hingegen kann nur unter bestimmten, artspezifisch verschiedenen Bedingungen ein neues Vorderende mit Prostomium regenerieren. *Lumbricus terrestris* ist in der Lage, das Prostomium sowie die ersten 4 Segmente zu regenerieren, wenn diese alleine abgetrennt wurden. Schneidet man ihm jedoch 5 bis 16 der vorderen Segmente ab, so kann der Verlust nie vollständig wieder wettgemacht werden. Vielmehr regeneriert das Hinterende meist nur 3-4 Metameren samt Prostomium. Bei der Entfernung von mehr als 16 Segmenten unterbleibt die Wiederherstellung komplett. *Eisenia foetida* kann dagegen die vorderen acht Somiten vollständig rekonstruieren. Verliert diese Art jedoch mehr als 9 bis 23 Ringe, können nur bis maximal sechs ersetzt werden. Entfernt man mehr als 24 Metamere, so bildete das hintere Reststück keinen Kopf sondern einen heteromorphen „Schwanzstück“. Nur bei wasserbewohnenden Arten ist es möglich, die verloren gegangenen Geschlechtsorgane nachzubilden, nicht so bei den Erdwürmern.

Das Regenerat wird durch die „alte“ Epidermis und den „alten“ Darm aufgebaut. Auch sind Neoblasten beteiligt, die entlang des Nervensystems zur Wundstelle wandern. Bei einigen Regenwürmern ist die Regeneration der Vorderenden abhängig vom Nervensystem, wird dieses allerdings in der Nähe der Wundstelle entfernt, so unterbleibt eine Reproduktion.

### III.2.6 Lebensweise

Oligochaeten sind im wesentlichen Süßwassertiere. Sie haben jedoch über die schlammige Uferzone hinweg Wälder, Wiesen und Äcker besiedelt. In den feuchten Tropen sind sogar einige Arten bis in die Mulmansammlungen der Blattachsen der Bäume sowie der Bromeliaceen-Reservoirs vorgedrungen. Auch im Meeresgrund trifft man sie vom Litoral bis in etwa 40m Tiefe an.

Die Äolosomatiden sowie die sehr kleinen, durchsichtigen und zarten Naididen leben im Pflanzengewirr des Süßwassers. Auf der Oberfläche und im Inneren des Schlammes hingegen halten sich neben den kleinen Arten auch große Formen auf. Die Gruppe der marinen Oligochaeten ist weniger umfangreich. Einige Arten vertragen nur niedrige Salzgehalte, während wiederum andere stark euryhalin sind. Diese kommen in Meerwasser wie auch in reinem Süßwasser vor. Beide Gruppen gehören Gattungen an, die im Süßwasser wie auch in Festlandböden zu finden sind. Die stenohalinen Arten sind reine marine Tiere (z.B. *Helodrilus*, *Limnodriloides*). Auch die Auswürfe des Meeres, bestehend aus Tangen, *Zostera*, Tierleiche, usw., werden von großen Individuenmengen bevölkert, insbesondere durch *Enchytraeus albidus* und *Pachydrilus lineatus*.

Die Regenwürmer (zusammenfassend für alle Oligochaeten des Festlandes) haben eine große Artenzahl entwickelt und leben oft in großen Wohndichten. Dabei sind 400 Individuen pro m<sup>2</sup> keine Seltenheit. Äußerlich zeigen sie keine großen Unterschiede zu den limnischen Arten, abgesehen von der Kürze ihrer Borsten.

Verschiedene funktionelle Eigenheiten des Lebens tief im Erdreich haben die Regenwürmer gemeistert und sich ihnen verschiedenartig angepasst:

- a) Ein Verdunstungsschutz ist, bedingt durch den feuchten Lebensraum, kaum vorhanden. Auch ist die Exkretion nur bei tropischen Megascoleciden wassersparend. Der Harn von *Lumbricus* ist gegenüber dem Blut und der Cöloflüssigkeit hypotonisch, es sind aber Einbußen im Wassergehalt von 15% ohne nennenswerte Beeinträchtigungen. Verluste von fast 70% sind durch starke Wasserresorption über Haut und Mund nach Einbringen in Wasser wieder ausgleichbar. Die Würmer fallen bei starkem Wassermangel in einen Zustand der Inaktivität und sparen auf diese Weise. In diesem Zusammenhang sind Hydro- und Thigmotaxis sowie negative Phototaxis dieser Würmer von Bedeutung. Dadurch werden sie bei ungünstigen Lebensbedingungen in geeignetere Lebensräume geleitet, d.h. bei heißen, trockenen Tagen ziehen sie sich in

tiefere Schichten des Erdreiches zurück. *Lumbricus terrestris* sucht dazu vertikale Schächte von 1,5m Länge auf.

- b) Die Konzentrationen der Atemgase im Erdreich weichen stark von denen in der Atmosphäre ab. Der O<sub>2</sub>-Gehalt nimmt mit zunehmender Tiefe ab, wohingegen der CO<sub>2</sub>-Gehalt bereits in 15cm Tiefe auf 0,25Vol.-% ansteigt. Dieser Wert ist rund 6mal so hoch wie in der Atemluft oberhalb der Erdoberfläche.
- c) Auch haben sich die Erdwürmer an die Frost- und Trockenperioden durch Ruhezustände angepasst. Limnische Vertreter der Oligochaeten hingegen werden selten von diesen Extremzuständen betroffen. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den Ruhephasen der Regenwürmer um echte Diapausen handelt, da junge und adulte *Lumbricus terrestris*, sowie *Allolobophora caliginosa* unter gleichen Haltungsbedingungen von konstanter Temperatur, Feuchtigkeit und Nahrungsmenge zu gleichem Zeitpunkt sich in solchen Ruhezuständen befanden. In den betroffenen Monaten verlassen die Regenwürmer die oberen Humusschichten und fliehen in tiefere Regionen. Dort, in ca. 35 bis 50cm Tiefe, knäueln sich die Würmer in ovalen, mit Kot ausgekleideten Sackgassen eines vertikalen Ganges zusammen. Da der Boden in Mitteleuropa selten so weit durchfriert, sind die Würmer dort gut gegen Kälte und Frost geschützt. Größere Arten ziehen sich sogar noch weiter ins Erdreich zurück

In tiefgründigen Böden Deutschlands sind die verschiedenen Regenwurmart auf einzelne Stockwerke verteilt:

- a) Die unter der Humusschicht liegende Erde (bestehend aus reinem Lehm, Löß, usw., meist keinerlei Pflanzenreste außer abgestorbenen Wurzeln) beherbergt im Wesentlichen überall die gleichen 4 Arten. *Allolobophora caliginosa* und *A. rosea* sind dort in bis 1m tiefen, senkrechten Schächten mit 6mm Durchmesser zuhause. Noch tiefer (bis 2m) zum Grundwasser hin treiben *A. terrestris longa* und *Lumbricus terrestris* ihre Gänge (bis 12mm Durchmesser). Alle 4 Arten besitzen zudem noch horizontale Gänge in der Humusschicht, die ja ihre Hauptnahrungsquelle darstellt.
- b) Die übrigen Regenwürmer sind auf die obere Humusschicht beschränkt. Dadurch weist diese eine deutlich höhere Bevölkerungsdichte als die tieferen Schichten auf. Die von ihnen gegrabenen Gänge haben einen Durchmesser von ca. 4mm. Die Jungtiere aller Arten leben in den obersten Humusschichten, da diese einen hohen Gehalt an Nahrung und Feuchtigkeit aufweisen. Auch begünstigt hier die Lockerheit der Krume das Kriechen der kleinen Würmer. Da diese oberen Zonen gut durchlüftet werden, legen die Regenwürmer dieser Schichten ihre Kokons ebenfalls hier ab.

Die Humusdecken verschiedener Böden unterscheiden sich im Gegensatz zum tiefer gelegenen Erdreich stark in der Regenwurmfauna. Die Erde der Buchenwälder ist besonders artenreich, auch die der Wiesen, da diese wegen der vielen absterbenden Graswurzeln nahrungsreich sind. Der Humus der Äcker hingegen ist artenarm, da er durch die Kulturbedingungen zwischen Ernte und Saat kahl liegt und demzufolge stark Hitze und Kälte ausgesetzt ist. In Dünger- und Komposthaufen leben nur Vertreter von *Eisenia foetida*, die dank ihrer osmotischen Eigenschaften dieses Substrat vertragen.

Die Regenwürmer haben eine sehr große Bedeutung für die Humuserzeugung:

1. Ihre waagerechten und senkrechten Gänge, die in Deutschland bis zu 1,5m tief werden können, erleichtern den Eintritt von Regenwasser und Luft in den Boden. Das fördert das Gedeihen der aeroben Bakterien und damit die Verwesung sowie den Pflanzenwuchs. Die Bedeutung dieser Leistung ist an der großen Anzahl an Röhren zu erkennen. So zählte man in einem Acker mit Gründüngung in einem Tiefenhorizont von 30cm 280 senkrechte Röhren pro m<sup>2</sup>. In anderen Böden kann diese Zahl noch auf über 400 je m<sup>2</sup> steigen.
2. Auch sind die Leistungen der Regenwürmer bei der Bodendurchmischung zu nennen. Sie fressen das Substrat und setzen den Kot dann an anderer Stelle ab oder nutzen ihn als Wandbefestigung in ihren Gängen. So werden die Oberflächenschichten mit Kothaufen aus Material der mittleren und unteren Schichten bedeckt. Da viele der waagerechten Tunnel zusammen fallen, sacken die oberen Zonen langsam ab und so findet eine Durchmischung statt.
3. Die Zusammensetzung der Erde wird bei der Darmpassage verändert. Der abgeschiedene Kot hat eine festere Konsistenz mit einhergehender höherer Wasserkapazität. Kotkrümel aus Lehmböden speichern 40% mehr Wasser als der Lehm, Kot sandbewohnender Arten sogar 110% mehr als reiner Sand. Auch steigt die Anzahl der Bodenbakterien im Kot um 33%, die Zahl der Pektinvergärer soll sogar um 1400% zunehmen. Der Anteil an abgebauten organischen Stoffen wird im Kot ebenfalls erhöht. Diese bilden durch die starke Vermischung mit dem mineralischen Boden im Darm Ton-Humus-Komplexe, die den wesentlichen Bestandteil des milden Humus und des Mulls darstellen. Die besten Humusproduzenten sind die Arten, die viele pflanzliche Abfallstoffe aufnehmen. Zu ihnen gehören *Lumbricus rubellus* und auch *L. terrestris*, der nachts aus seinen Gängen kriecht und umliegende Blätter in seinen Röhren zieht, um sie dort verrotten zu lassen und dann aufzufressen.

### III.2.7 Fortbewegung

Die Fortbewegung der Oligochaeten erfolgt fast immer durch Kriechen. Meist bewerkstelligen sie dies durch Strecken und anschließendes Verkürzen des Körpers. Dabei kann man einen Moment lang ein bis zwei verdickte Zonen erkennen, die ihre Borsten in die Erde gebohrt haben. Diese verhindern durch diese Verankerung das Zurückgleiten des Wurms. Die dazwischen liegenden Regionen sind stark verdünnt und haben ihre Borsten eingezogen. Dadurch können diese Körperregionen nach vorne rutschen. *Lumbricus* kontrahiert im ersten Segment beginnend die Ringmuskeln aller Metamere bis etwa zur Körpermitte. Dies erfolgt nach der Erschlaffung der Längsmuskeln und unter Einziehung der Borsten. Dadurch erhöht sich der Druck auf die Cölomflüssigkeit, so dass sich jedes Metamer verlängert und das davor liegende vorwärts schiebt. Damit ist nun das Prostomium um 2-3cm über seine Ausgangslage hinausgerutscht. Anschließend erfolgt nun die Kontraktion der Längsmuskulatur des ersten Segments. Dabei werden die Borsten ausgestülpt und in die Erde eingehohlet. Gleichzeitig erschlaffen die Ringmuskeln. So verkürzt sich das entsprechende Metamer und zieht, durch die Borsten verankert, das nächste Metamer an sich heran. Dieses setzt den Vorgang fort.

Die Peristaltik der Fortbewegung wird durch die Bauchganglien jedes Segments gesteuert. 2 Faktoren sichern deren rhythmische Weiterleitung durch den Wurmkörper:

- a) die Erregungsleitung im Bauchganglienstrang
- b) Erregung beim Vorwärtsgezogenwerden durch äußere und propriorezeptorische Empfindungen

Beim Bohren pressen die Regenwürmer ihre vorderen Ringe in kleine Lücken zwischen den Erdpartikeln. Die Segmente wurden durch die Ringmuskulatur zusammengezogen und sind daher spitz. Dabei kann der Wurm einen Bohrdruck von fast  $1\text{kg/cm}^2$  ausüben. Anschließend kontrahieren die Längsmuskeln und blähen das eingehohlete Vorderende wieder auf. Zum Erweitern der Erdlücke genügt der Überdruck der Cölomflüssigkeit, die manometrisch gemessen, bis 16cm Wasser erreichen kann. Nun ist genug Raum, um den restlichen Körper nachzuziehen.

Bei festem Erdreich genügt die Peristaltik des Hautmuskelschlauches nicht mehr. In diesem Fall erweichen die Würmer die vor ihnen liegende Substrate und verschlingen diese. Sie fressen sich also förmlich durch den Boden.

*Aeolosoma* kriecht im Gegensatz zu allen anderen Oligochaeten nicht mit Hilfe des Hautmuskelschlauches, sondern nutzt die ventrale Bewimperung ihres ungewöhnlich großen Kopf-

lappens. *Branchiobdella* wiederum bewegt sich „egelartig“ vorwärts. Dazu nutzt sie ihren Mund und die am Körperende befindlichen Saugnäpfe.

Im freien Wasser schwimmen nur sehr wenige Arten, zumal nur kürzere Strecken. Unter Schlängelung des Körpers bewegen sich manche *Nais* fort, peitschend hingegen die *Ripistes*. Das Absinken verhindern diese Arten durch die sehr langen Haarborsten ihres Körpers.

### III.2.8 Sinnesleistung

Die Leistung der Reizaufnahme ist besonders bei den Regenwürmern untersucht worden. Sie reagieren in verstärktem Maße auf Erschütterungen des Untergrundes, auch ist ihr „Geschmackssinn“ gut entwickelt. So können sie z.B. auf chemischem Wege den Blattstiel von der bevorzugten Blattspreite unterscheiden. Bestreicht man jedoch den Blattstiel mit aufgeschwemmtem Pulver aus der Blattspreite, so saugen sich die Würmer auch daran fest. Bei Kiefernadeln unterscheiden sie auf chemische Weise das basale Drittel vom distalen Abschnitt.

Die Haut der Regenwürmer registriert Unterschiede im Säurehaushalt des sie umgebenden Mediums. Das erklärt z.B. die unterschiedliche Verteilung einzelner Arten auf Böden mit verschiedenen pH-Werten. Diese Reaktionen können auch im Labor mit verschiedenen Pufferlösungen nachgestellt werden. So zieht sich *Allolobophora longa*, welche in neutralen bis alkalischen Böden lebt, bei pH 4,5 oder saurer nach 30sec. zurück, *Lumbricus terrestris* hingegen erst bei pH 4,1 und der in sauren Böden lebende *Lumbricus rubellus* erst bei pH 3,9. Leitet man Impulse von Segmentalnerven ab, so zeigen diese bei Applikation höherer Säuregrade eine verstärkte Aktivität im Vergleich zur Applikation geringerer Azidität.

Den Feuchtigkeitsgehalt des Bodens nimmt *Lumbricus terrestris* mit Hilfe der Sinneszellen seines Prostomiums wahr. Er bevorzugt feuchte Erde, in die er sogar hineinkriecht, wohingegen er vor trockener Erde zurückweicht. Entfernt man nun das Prostomium so geht damit auch das Unterscheidungsvermögen verloren.

Ein Schweresinn konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Die gesamte Oberfläche der Würmer ist lichtempfindlich. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der lokalen Reizschwelle der einzelnen Regionen und der Dichte der darin befindlichen Lichtsinneszellen. Das Prostomium ist am empfindlichsten bei Belichtung und spricht schon bei sehr geringer Intensität an. Die Reizschwelle steigt in den nachfolgenden Segmenten rasch an. Die Lichtempfindlichkeit ist somit hinter dem Clitellum am geringsten. Erst in den letzten Metameren sinkt die Schwelle wieder ab, obwohl die Reizempfindlichkeit

des Prostomiums nicht mehr erreicht wird. Diese Verteilung ist damit zu erklären, dass der Wurm bei der Nahrungssuche mit dem vorderen Ende, bei der Kotablage mit dem hinteren Ende aus der Erde ragt. Er verhält sich dem Licht gegenüber negativ phototaktisch, was ihn vor zu hoher UV-Strahlung schützt. Bei Entfernung oder Spaltung des Cerebralganglions sinkt die Zahl der Abwendereaktionen und der Wurm wendet sich sogar öfters der Lichtquelle zu.

### III.2.9 Nervensystem

Jedes Ganglienpaar eines Segments regiert alle Reflexe dieses Bereiches autonom. Spontane Bewegungen, vor allem die, welche der Orientierung dienen, werden jedoch vom Unterschlundganglion gesteuert. Nach dessen Entfernung ist der Wurm nicht mehr in der Lage, sich in die Erde einzubohren und kriecht nur noch nach starker Reizung. Das Oberschlundganglion stellt das Sinneszentrum dar, welches die Bewegungen zu den Außenbedingungen in Beziehung bringt. Allerdings ist *Lumbricus* nach dessen Entfernung noch in der Lage, zu kriechen. Die Würmer besitzen die Fähigkeit, Assoziationen zu bilden. *Lumbriculus variegatus* lernte, Licht oder Dunkelheit zu meiden, wenn er durch spezielle Reize bestraft wurde. Der nachtaktive *Lumbricus terrestris* „sammelt“ Blätter, die er in seine Gänge zieht (siehe III.2.6 Lebensweise und III.2.10 Ernährung). Er lässt jedoch von einem Blatt nach 10-15min ab, wenn man dieses am Stiel festhält. Auch rührt er dieses nicht mehr an; er wendet sich sofort einem anderen Blatt zu. Mit ihm gelangen auch Dressurversuche, die ihn dazu veranlassen, bestimmte Röhren zu nehmen und andere zu vermeiden.

### III.2.10 Ernährung

Die meisten Oligochaeten ernähren sich von abgestorbenen Pflanzenresten oder sind Mikrophagen. Nur wenige leben als Aasfresser, Räuber oder Parasiten.

Viele der im Pflanzendickicht umher kriechenden, kleinen Süßwasserbewohner, insbesondere die *Naididae*, sind Mikrophagen. *Nais* und *Stylaria* stülpen den Boden und die Decke ihres Pharynx aus und pressen sie an die Oberfläche von Blättern und Algen. Beim zurückziehen werden haften bleibende Kleinalgen wie zwischen zwei Walzen in den Mund hineingerollt. *Ripistes* streckt seinen Körper aus der Wohnröhre und entfaltet die drei Paar sehr langen Borstenbündel des 6. bis 8. Segments. Nun schwingt er seinen Vorderkörper wie ein Fächer rhythmisch hin und her und fängt so schwebende, einzellige Algen und Detritus ein. Nach

einiger Zeit faltet der Wurm seinen Borstenfächer zusammen und zieht in durch seinen Mundspalt, um das Gewebe abzulutschen. Alle Regenwürmer, die Humuserde mit den darin enthaltenen Detritusteilchen, Bakterien, Desmidiaceen, Pilzsporen, Rhizopoden usw. fressen, zählen zu den Mikrophagen. Sie nehmen jedoch auch gleichzeitig, für ihre Ernährung bedeutsame Pflanzenreste auf.

*Lumbricus terrestris* (seltener Spezies von *Allolobophora*) sammeln nachts auf der Erdoberfläche abgestorbene Pflanzenteile, insbesondere Blätter. Um diese festzuhalten, blähen sie ihr Vorderende knopfartig auf. So liegt ihr Mund nun innerhalb einer Art Saugscheibe, die er dann an das Blatt drückt und sich mit dem Pharynx daran festsaugt. So haftet die Blattoberfläche fest am Mund und wird manchmal trichterartig in diesen hineingezogen. Beim zurückziehen lässt der Wurm es mehrmals los, um es weiter vorne greifen zu können. Dadurch wird das Blatt in der Mündungszone durch das Sekret der Schlunddrüsen angefeuchtet und verrottet leichter. Der Regenwurm kann später mit Hilfe des Schlundkopfes das Parenchym zwischen den Blattadern herausaugen, so dass vom Blatt nur noch das Skelett übrig bleibt. Auch viele der kleinen und großen Oligochaeten, die im Schlamm am Boden oder am Rand der Gewässer leben, fressen diesen mit den darin befindlichen Pflanzenresten und Tieren (so z.B. *Tubificidae*, viele *Enchytraeidae*, usw.). Manche der Enchytraeiden benagen mit den Schableisten oder Stiletten ihrer Mundhöhle Wurzeln von Rüben, die durch Nematoden geschädigt wurden.

Der kleine *Chaetogaster* gehört zu den wenigen Räubern unter den Oligochaeten. Er kriecht zwischen Pflanzen umher und frisst Stentoren, Tubificiden, Rotatorien und Cladoceren (z.B. *Chydorus*). Dazu reißt er seinen glockenförmigen Schlund auf und verschluckt seine Beute (Saugschnappen). Ein echtes Raubtier ist auch der Baikalsee-Lumbriculide *Agriodrilus vermivorus*. Ihm dienen andere Oligochaeten als Nahrung.

Zu den Aasfressen gehören manche Enchytraeiden. Diese finden sich meist am Meeresstrand und fressen angespülte Fischkadaver und Leichen wirbelloser Tiere von unten her an. Dazu verflüssigen sie das Eiweiß des Aases extraoral und saugen den entstandenen Brei auf. Dabei hilft ihnen ihr dorsaler Schlundkopf, der wie ein Pumpkolben funktioniert.

Neben wenigen Kommensalen haben die Oligochaeten einige echte Außenschmarotzer hervorgebracht. Zu ihnen gehören z.B. die Branchiobdellidae. Diese leben auf dem Körper und in den Kiemenhöhlen von Flusskrebse. Dort beißen sie mit Hilfe ihrer „Kiefer“ Löcher in dünne Hautstellen (Gelenkmembranen, usw.) und saugen das Blut ihres Wirtstieres.

Doch nun mehr über die Verdauung von *Lumbricus terrestris*. Diese setzt bereits im Pharynx ein, in welchen ein Ferment abgeschieden wird. Eine Proteolyse ist im Darm bis zum 60.

Segment nachweisbar. Daran beteiligt ist ein Ferment, das im sauren pH von 5,2 – 5,7 und im basischen pH von 7,7 – 8,3 arbeitet. Zusätzlich besitzt der Wurm noch eine Amylase und eine Lipase. Nach dem 60. Segment ist der Darminhalt eine Strecke lang stark alkalisch (pH 7,7 – 8,1). Bei *Allolobophora*-Spezies und *Lumbricus rubellus* wurden vor allem im vorderen Intestinum eine Cellulase und eine Chitinase (für die Pilzhyphen in der als Nahrung dienenden Erde) nachgewiesen.

Im Ösophagus befinden sich Kalkdrüsen, welche nicht zur Ausscheidung von Verdauungsfermenten dienen, sondern Kalk produzieren. Daher weisen sie eine hohe Konzentration von Karboanhydratase auf. Diese Zellen verhalten sich wie Organe anderer Tiergruppen, die Kalk auflösen oder sezernieren. Der produzierte Kalk (Calcit) gelangt durch den Darm zum After und wird dort ausgeschieden. Die Kalkdrüsen dienen dem Erhalt des Säure-Base-Haushalts des Wurms, da sie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{CO}_2$  aus dem Blut entfernen. Die Kalkproduktion der Würmer korreliert mit dem pH-Wert der sie umgebenden und als Nahrung aufgenommenen Erde. In Würmern, die in alkalischer Erde leben, wurden kleine, aber zahlreiche Kalkdivertikel gefunden. Die Würmer saurer Böden hingegen weisen wenige, aber dafür große Kalkkörnchen auf.

Dem Chloragog-Gewebe kommt eine wichtige Aufgabe bei der Verdauung bzw. Ernährung zu. Ähnlich der Wirbeltierleber speichert es Fette und synthetisiert Glykogen. Beide Nahrungsreserven können bei Hunger wieder abgegeben werden. Auch der Vorgang der Deamination findet in diesem Gewebe statt. Dabei entsteht Ammoniak, der zum Teil zu Harnstoff verarbeitet wird. Ihre gelblich grüne Farbe erhalten sie durch Heteroxanthin, das dort zu Harnsäure umgewandelt wird. Kreatinin ist ebenfalls vertreten. Viele der Chloragog-Zellen fallen in die Cöloflüssigkeit. Sie werden entweder durch Cöloporien und Nephridien ausgeschieden oder wandern zu den verschiedensten Organen, um dort ihre gespeicherten Nahrungsstoffe abzugeben.

### III.2.11 Exkretion

Die Trichter der Nephridien wasserbewohnender Arten strudeln auch Zellbruchstücke und Zellen in den Nephridialkanal, wohingegen Regenwürmer lediglich Cöloflüssigkeit einstrudeln. Der Regenwurmharn enthält vorwiegend  $\text{NH}_3$ . Harnstoff ist, je nach Art und den äußeren Umständen, auch vorhanden. Ihre Exkrete nähern sich gegenüber den Polychaeten denen der Landtiere an. In den distalen Abschnitten des Nephridialkanals von *Lumbricus* und

*Pheretima* werden Aminosäuren, Glukose,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  sowie Wasser rückresorbiert. Der Harn ist dem Blut gegenüber hypotonisch.

Aus der Haut scheiden die Würmer Mucoproteine ab, die die Kutikula schlüpfrig machen, die Röhrenwände in der Erde verfestigen und den Körper wohl auch etwas gegen die Umwelt abschirmen.

### III.2.12 Osmoregulation

Die Regenwürmer verhalten sich dem Wasser gegenüber wie Süßwasserorganismen. Ihr Körperinneres ist hyperten, so dass das Wasser (wie auch Chlor) leicht über die Haut eindringt und durch die Nephridien (hypotonischer Urin) und über den Darm wieder ausgeschieden werden kann. Diese Regulation ist notwendig, damit die Würmer in Extremsituation, wie z.B. nach schweren Regenfällen, in ihren Gängen nicht ertrinken. So halten es *Lumbricus terrestris* und *Allolobophora longa* fast ein Jahr in mit Wasser überlagerten Böden aus.

Unklarheit besteht in der Osmolarität des Bodens. Da es sich hierbei um kein flüssiges Medium handelt, ist die Bestimmung der Osmolarität schwierig. Auszugehen ist von einer sehr geringen Osmolarität, da die im Boden vorhandenen Minerale nicht im Bodenwasser gelöst vorliegen, sondern in fester Form in den Bodenkrumen vorhanden sind. Daher wurden die Versuche dieser Arbeit auch mit hypotonem pond water durchgeführt. Diese Lösung stellt daher die natürlichen Bedingungen besser dar als die isotone Messverhältnisse, die von vielen bevorzugt werden.

## IV Material und Methoden

### IV.1 Präparation

Die Präparation des Versuchstieres erfolgte in einer mit Wasser gefüllten Wachsschale. Das Wasser ermöglichte es dem Gewebe leicht auf zu schwimmen, was eine gewisse Plastizität lieferte und so die Präparation einfacher gestaltete. Der erste Schritt bestand darin, den Wurm zu dekapieren. Dazu wurde eine scharfe Skalpellklinge verwendet und der entfernte Kopf wurde sofort in ein Gefäß mit Wasser-Alkohol-Mischung gegeben, um diesen abzutöten. Nun positionierte man den Wurm so, dass die ventrale Seite nach oben zu liegen kam und fixierte das Tier mit Nadeln. Es folgte die Eröffnung des Hautmuskelschlauchs von cranial nach caudal. Dieses ermöglichte das „zur-Seite-Klappen“ der Haut, welche erneut mit Nadeln fixiert wurde. Der so sichtbar werdende Darm und die der Haut aufsitzenden Nephridien konnten nun durch vorsichtiges Zupfen mit einer Pinzette entfernt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Haut nicht zu sehr gespannt oder evtl. gar verletzt wurde. Als letztes musste noch der Bauchganglienstrang, der sich je nach Eröffnung links oder rechts der Schnittkante befand, und die Dissepimente entfernt werden. Ein Stück der nun so aufgearbeiteten Haut wurde auf einen, mit Edelstahlzähnen versehenen Kunststoffring fixiert und mit dem passenden Gegenring „eingeklemmt“. Das fertige Präparat kann so in die Ussing-Kammer eingebracht werden, in welcher man die Kontaktstellen zwischen Kammer und Gewebe mit Silikonpaste abgedichtet hatte.

### IV.2 Stammlösungen

Die hier aufgeführten Rezepte stellen die Ausgangslösungen für die Versuche dar. Diese wurde je nach Fragestellung verändert oder erweitert. Im entsprechenden Versuchsteil wird explizit darauf hingewiesen.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Regenwurm-Ringer	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>
Molarität in mM/l	71	4	1,5

Konzentrationen verändert nach Cornell (Cornell 1982).

Na-freier Ringer	KCl	CaCl <sub>2</sub>	TMA-Cl
Molarität in mM/l	4	1,5	71

pond water	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	NaHCO <sub>3</sub>
Molarität in mM/l	0,5	0,05	0,4	0,2

Konzentrationen nach Dietz und Alvarado (Dietz and Alvarado 1970).

#### IV.2.1 Versuchsablauf

Generell starteten die Versuche mit pond water (pw) auf der apikalen und Regenwurm-Ringer (RR) auf der basolateralen Seite. Es folgte eine Anpassungszeit von ca. 30min, in welcher sich das Gewebe anpassen konnte. Das zeigte sich in einem konstant bleibendem Kurzschlussstrom  $I_{SC}$ . Dieser „steady state“-Zustand wurde teilweise bereits vor Ablauf der 30min erreicht, so dass die Versuche früher gestartet werden konnten. In wenigen Fällen kam es auch vor, dass die Anpassungszeit nicht ausreichend war. Daraufhin wurde trotzdem nach 30min mit dem eigentlichen Versuch begonnen, um annähernd gleiche Versuchsbedingungen zu erreichen und das Gewebe nicht zu sehr in den Kammern „altern“ zu lassen.

Wenn nicht anders erwähnt, wurde dem Gewebe auf der basolateralen Seite permanent RR zugeführt. Die untersuchten Substanzen wurden apikal verabreicht.

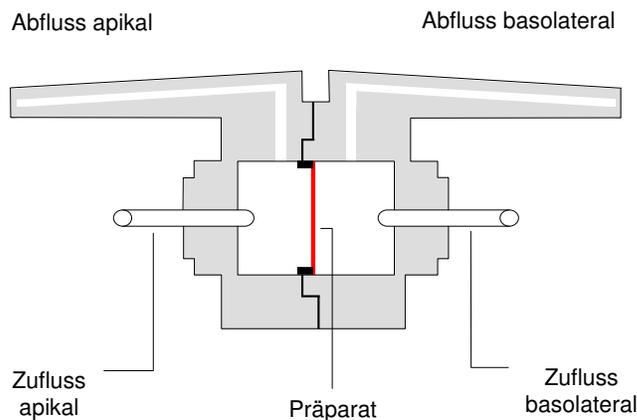
Die Calcium- und Amiloridversuche wiesen, wenn nicht anders erwähnt, einen gleichartigen Versuchsablauf auf. Zuerst perfundierte man das Gewebe nach Anpassungszeit mit 2mM Calcium oder 50 $\mu$ M Amilorid und wusch nach Erreichen eines Plateaus wieder mit pw aus. Nun gab man die zu untersuchende Substanz in gewünschter Konzentration auf das Gewebe und lies das Epithel sich an die neuen Bedingungen anpassen. Anschließend, ohne zwischengeschalteten Auswasch-Schritt, gab man erneut Calcium oder Amilorid in pw mit der zuvor applizierten Konzentration an Testsubstanz auf das Gewebe. So war es nun möglich, die Reaktionen von Calcium bzw. Amilorid unter normalen (pw-) Bedingungen und unter veränderten Bedingungen mit der zu testenden Substanz zu vergleichen.

## IV.3 Versuchsaufbau und elektrisches Messverfahren

### IV.3.1 Die Ussing-Kammer

Für die Versuche wurden modifizierte Ussing-Kammern mit dem in Abbildung 1 aufgeführten Prinzip verwendet. Sie bestanden aus Plexiglas und hatten je Hälfte einen aus Edelstahl bestehenden Zufluss in Form eines kleinen Rohres. Dieses Modell ermöglicht die getrennte Perfundierung des Gewebes, da das Präparat in apikale und basolaterale Seite unterteilt wurde. In die Kammer wurden 2 Arten von Elektroden eingesetzt:

1. Zwei gewebnsnahe Elektroden, die für die Messung des Potentials genutzt wurden
2. Zwei gewebnsferne Elektroden, die zum Applizieren der Stromimpulse verwendet wurden.

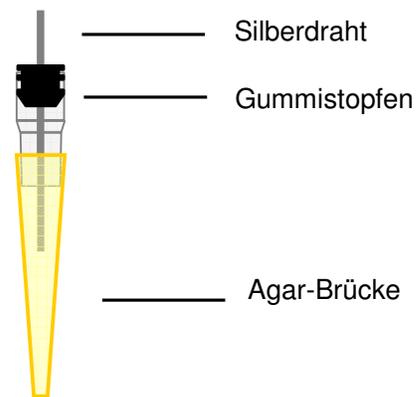


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer verwendeten Ussing-Kammer. Hauptmaterial ist Plexiglas. Die Zuflussrohre bestehen aus rostfreiem Edelstahl V<sub>2</sub>A.

### IV.3.2 Elektroden

Als Elektrode diente ein in 1 M KCl chlorierter Silberdraht (siehe Abbildung 2). Die Chlorierung erfolgte nach Anrauen der Spitze mit Schleifpapier für ca. 10 sec im KCl-Bad. Der Draht wurde anschließend in gekürzte, der Ussing-Kammer angepasste Eppendorf-Spitzen eingebracht. Diese waren mit Agar, aufgekocht mit 1 M KCL, gefüllt. Abgedichtet wurde das Ganze mit der Spitze einer Spritze und dem Gummikopf des Spritzenstempels. Nicht mit Agar gefüllte Räume füllte man mit 1 M KCl auf.

Potential- und Stromelektroden unterscheiden sich im Aufbau lediglich in der Länge der verwendeten Eppendorf-Spitzen.

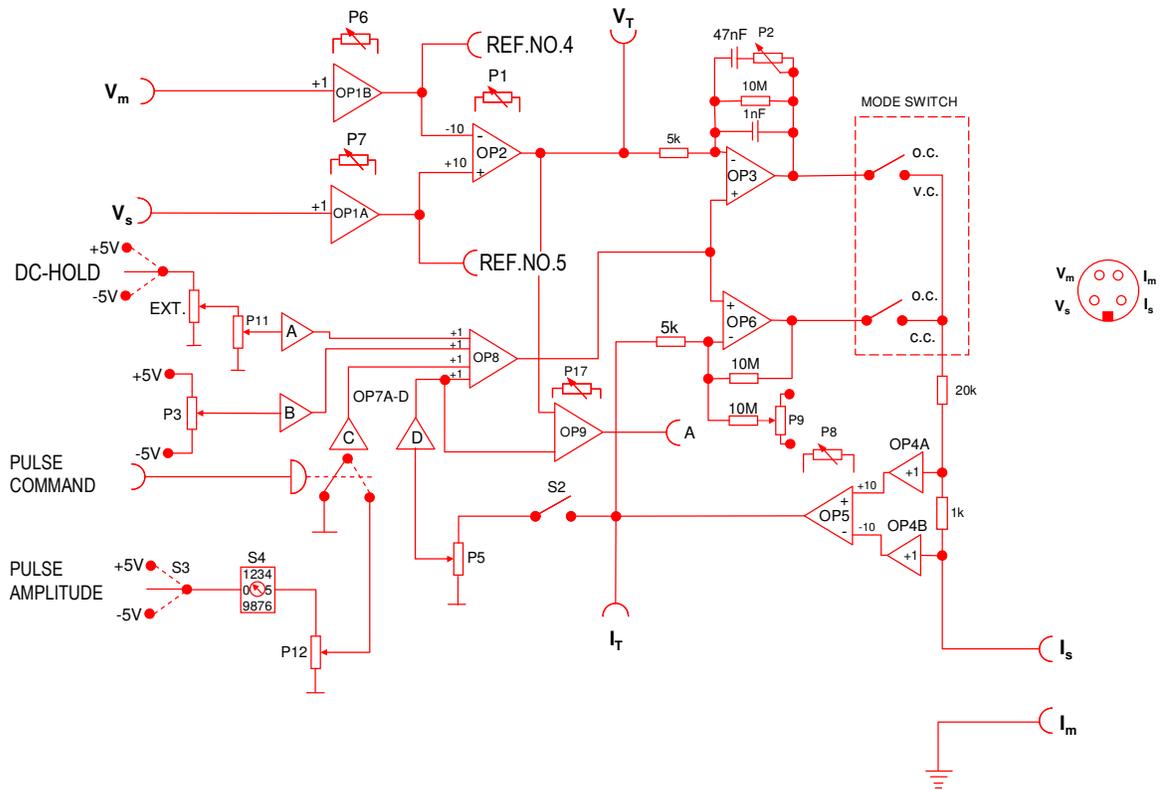


**Abbildung 2 Schema einer Strom- oder Spannungselektrode.** Die beiden Elektrodentypen unterscheiden sich lediglich in der Länge der Spitzen.

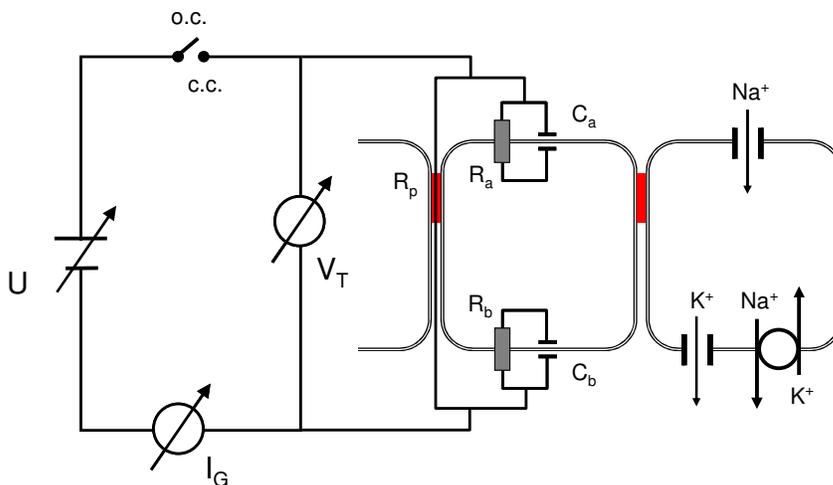
### IV.3.3 Current-clamp-Methode

Bei dem verwendeten Steuergerät handelte es sich um einen modifizierten Amplifier, der von Prof. Nagel, München, den Vorgaben und Eigenschaften des Regenwurminteguments angepasst wurde (der Schaltplan ist in Abbildung 3 dargestellt).

Das Gerät ist in der Lage, Pulse mit definierter Länge und Amplitude in regelbaren Abständen in die Kammern zu senden. Dies ist wichtig, da im Gegensatz zur voltage-clamp-Methode während der current-clamp-Methode nicht ständig ein Strom an die Kammer, und damit an das Gewebe angelegt wird. Durch diese Pulse kann nun der virtuelle Kurzschlussstrom  $I_{SC}$  und der Widerstand  $R_T$  nach dem Ohmschen Gesetz ermittelt werden. Die „Lücken“ zwischen den Impulsen werden vom Messgerät eigenständig interpoliert. Diese Art der Messung erweist sich als „schonender“ für das Gewebe. Ein Schema der Widerstandsverhältnisse und der Messmethodik des Epithels ist in Abbildung 4 aufgeführt.



**Abbildung 3 Schaltplan des modifizierten Voltage-Clamp Amplifiers nach Nagel.** Ein maßgeblicher Unterschied zum Standard Voltage-Clamp Amplifier besteht im "Mode Switch", der die Messung im current clamp (c.c.) ermöglicht.



**Abbildung 4: Schaltbild der Messung über das Epithel.** Zu beachten ist, dass für c.c. nur impulsweise der Kreislauf geschlossen wird. (o.c. open-circuit, c.c. current-clamp,  $V_T$  Potentialdifferenz,  $U$  regelbare Spannungsquelle,  $I_G$  Gegenstrom ( $I_{SC}$ ),  $R_a/C_a$  Widerstand/Kapazität der apikalen Membran,  $R_b/C_b$  Widerstand/Kapazität der basolateralen Membran,  $R_p$  parazellulärer Widerstand)

#### IV.4 Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte über den unter IV.3.3 Current-clamp-Methode beschriebenen Amplifier. Dieser sendet die Daten über ein 2-Kanal bzw. ein 4-Kanal A/D-Wandler (PowerLab Interface; ADInstruments, Australien) an einen PC, der diese kontinuierlich aufzeichnet. Die Aufarbeitung erfolgt nach dem Schema von IV.8 Grafische Darstellung.

#### IV.5 Statistik

Die angegebenen Werte spiegeln Mittelwerte  $\pm$  SEM („standard error of the mean“) wider, wobei eine Grundfläche von 1 cm<sup>2</sup> Versuchsgrundlage ist. „n“ gibt die Anzahl der Versuche an, und die Signifikanz wurde mittels gepaarten t-Tests erstellt. Als Signifikanzgrenze wurde ein  $p \leq 0,05$  (entspricht 5%) festgelegt. Werte, die oberhalb dieser Grenze liegen, und sich somit signifikant von den Kontrollwerten unterscheiden, werden gesondert gekennzeichnet.

Die verwendete Formel lautet wie folgt:

$$t = \frac{\bar{\Delta}}{s_{em}(\Delta)}$$

**Formel 1** Verwendete Formel des "gepaarten t-Test".  $\bar{\Delta}$  entspricht dem 'Mittelwert der Differenzen' und  $s_{em}$  gibt den Standardfehler ("error of the mean") wieder.

Anzahl der Freiheitsgrade beträgt:  $df = n - 1$

Zu beachten ist, dass die in dieser Arbeit angegebenen Mittelwerte nicht direkt zum Test herangezogen werden können, da nicht der Student t-Test verwendet wurde. Oftmals spiegelt sich eine signifikante Änderung nicht in den Mittelwerten wider, sondern zeigt sich erst in der Berechnung mit dem gepaarten t-Test. Daher sind manchmal „versteckte“ Signifikanzen in dieser Arbeit zu finden.

## IV.6 Vorzeichenkonvention

Der  $I_{SC}$  stellt den virtuellen Kurzschlussstrom dar. Dabei handelt es sich um den durch das gesamte Epithel geflossenen Nettostrom. Positiver  $I_{SC}$  resultiert aus einem Nettostrom positiver Ladungen von der apikalen zur basolateralen Seite, negativer  $I_{SC}$  dementsprechend aus einem Nettostrom positiver Ladungen von der basolateralen Seite zur apikalen Seite.

Das transepitheliale Potential ( $V_T$ ) entsteht durch die Konzentrationsunterschiede beiderseits des Epithels. Dabei dient apikal als Referenzelektrode.

$R_T$  stellt den transepithelialen Widerstand des Gewebes dar. Dieser wird entweder durch den Amplifier direkt ausgegeben oder durch den PC nach dem Ohm'schen Gesetz mittels Potential und Strom errechnet.

## IV.7 Verwendung von Fachbegriffen

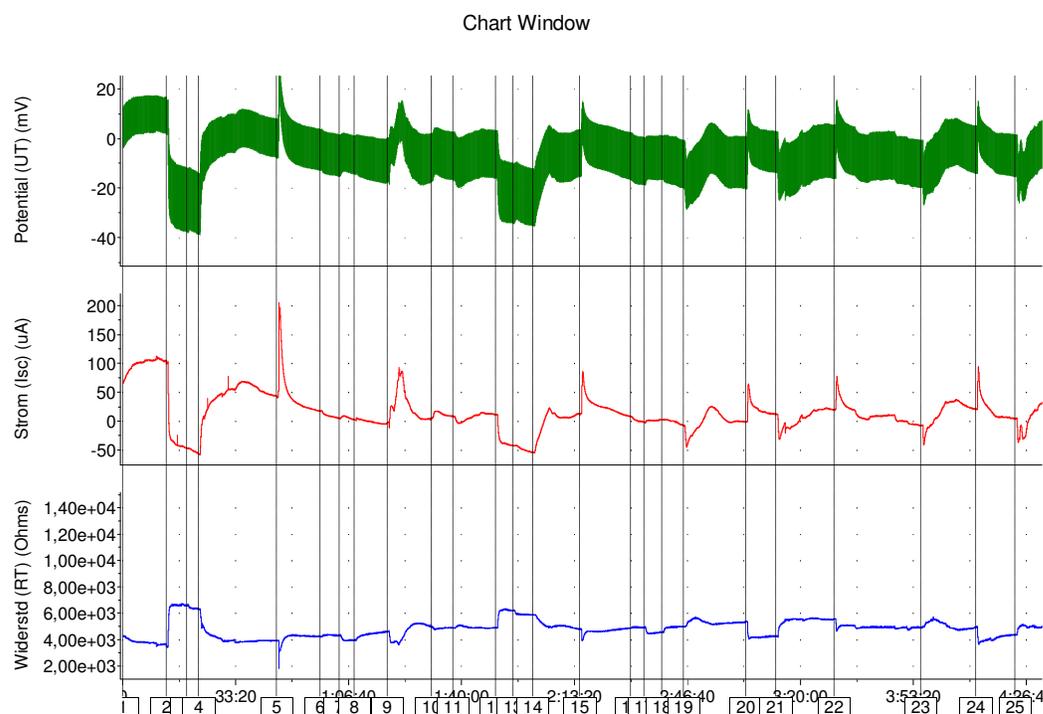
Die im Text verwendete Bezeichnung Strom ist adäquat zu Kurzschlussstrom. Ebenfalls werden Potential und Spannung parallel verwendet und bezeichnen die gleiche Messgröße.

Es entsprechen:

- amiloridsensitiver Strom: Der durch Amilorid hemmbare Stromanteil.
- calciuminduzierter Strom: Der Strom, der durch 2mM Calcium induziert wird.

## IV.8 Grafische Darstellung

Die Daten wurden mittels des von ADInstruments entwickelten Chart v4.04 aufgezeichnet. Dabei wurden parallel alle drei Parameter,  $V_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$ , erfasst und in Kurven wie in Abbildung 5 dargestellt. Die hier aufgeführten Grafiken beziehen sich in der Regel auf den Strom ( $I_{SC}$ ), da dieser maßgeblich die Reaktionen des Epithels widerspiegelt. Dabei wurden die Daten aus den Originaldateien nach Adobe Photoshop 5.5 exportiert und dort eine Grafik mit Anmerkungen erstellt. Die Zeitachse wurde den Ausschnitten angepasst und gibt nicht die Gesamtzeit des Versuchs wider. Sie dient lediglich dem Verständnis der zeitlichen Dimension der verschiedenen Abläufe.



**Abbildung 5: Datenerfassung im PC.** Dargestellt sind von oben nach unten Potential ( $V_T$ ) in mV, Strom ( $I_{SC}$ ) in  $\mu A/cm^2$  und Widerstand ( $R_T$ ) in  $\Omega \cdot cm^2$ .

## IV.9 Versuchsnummerierung

Versuche einer Versuchsreihe werden mit fortlaufenden Versuchsnummern versehen. Die Bezeichnung der einzelnen Versuche setzt sich wie folgt zusammen:

**KECA-32**

**K** = Krumm

**E** = Earthworm

**CA** = untersuchtes Ion oder verwendete Chemikalie, wie z.B. bei KEAMI Amilorid

Die Versuche sind paarweise zu betrachten. So stammen Versuch KECA-31 und KECA-32 von ein und demselben Wurm.

## IV.10 Präsentation der Daten

In Grafiken und Tabellen dargestellte Daten weisen mit ihrem Vorzeichen jeweils auf die Reaktionsrichtung hin. Handelt es sich z.B. um einen Abfall des Kurzschlussstroms  $I_{SC}$  so

werden diese Daten als Negativwerte präsentiert. Änderungen, die einen Anstieg zur Folge haben, findet man dementsprechend als positive Werte wieder.

Die Einheiten der drei Parameter sind für  $U_T$  mV, für  $I_{SC}$   $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für  $R_T$   $\Omega\cdot\text{cm}^2$ . Im Text dieser Arbeit werden bei Erwähnung von Messwerten die Flächenbezüge nicht genannt, jedoch im Hinterkopf behalten.

## V Ergebnisse

### V.1 Ca<sup>2+</sup>-frei

Entfernt man apikal in pw das Calcium vollständig, so fallen Potential und Strom signifikant ab.  $U_T$  sinkt dabei um  $23,0 \pm 2,2$  mV und  $I_{SC}$  um  $2,63 \pm 0,38$   $\mu$ A.  $R_T$  fällt zwar auch, jedoch ist diese Reaktion nicht signifikant (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1 Änderungen bei der Entfernung von Calcium aus der Lösung.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu$ A·cm <sup>-2</sup> )		$R_T$ ( $\Omega$ ·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
Ca <sup>2+</sup> -frei	-7,5 ± 1,8	-30,6 ± 3,4 *	-0,90 ± 0,23	-3,53 ± 0,58 *	13236 ± 3939	10455 ± 1153	13

Apikal wurde zunächst pw perfundiert und anschließend auf Ca<sup>2+</sup>-freies pw gewechselt. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

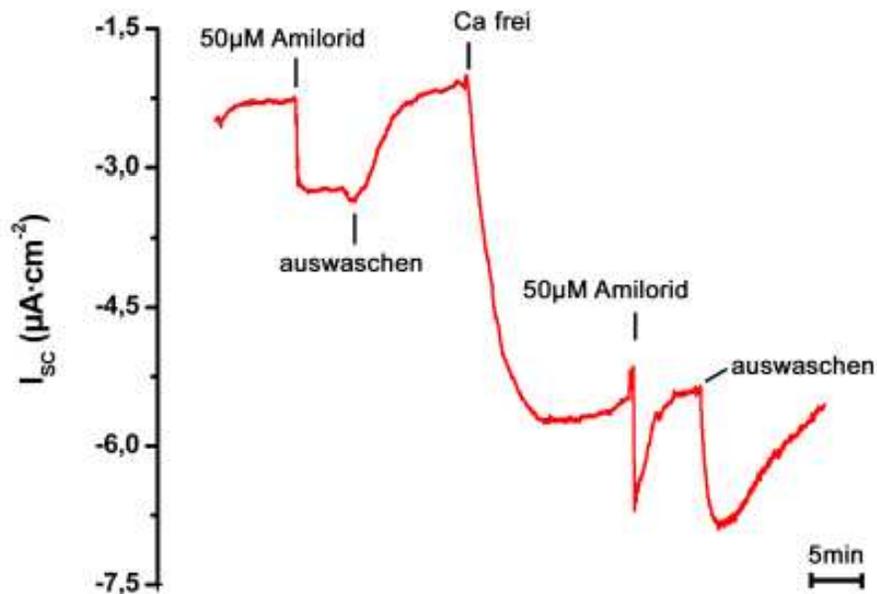
#### V.1.1 Ca<sup>2+</sup>-frei und Amilorid

Unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen blieb eine stabile Reaktion von Amilorid aus. Während  $U_T$  und  $R_T$  ihre Reaktionsrichtung beibehielten, kehrte sich diese bei  $I_{SC}$  um. Der Abfall bei  $U_T$  nahm um  $3,0 \pm 3,7$  mV zu. Auch  $R_T$  stieg um  $1482 \pm 1020$   $\Omega$  stärker an (siehe Tabelle 2). Die Reaktion des  $I_{SC}$  kehrte sich von einem Abfall von  $-0,83 \pm 0,21$   $\mu$ A in einen Anstieg von  $0,15 \pm 0,24$   $\mu$ A um. Hier ist auch die einzige signifikante Reaktion zu finden.

**Tabelle 2 Unterschiede in der Amiloridreaktion unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu$ A·cm <sup>-2</sup> )		$\Delta R_T$ ( $\Omega$ ·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	normal	Ca <sup>2+</sup> -frei	normal	Ca <sup>2+</sup> -frei	normal	Ca <sup>2+</sup> -frei	
Ca <sup>2+</sup> -frei	-9,5 ± 1,5	-12,4 ± 4,8	-0,83 ± 0,21	0,15 ± 0,24 *	2077 ± 857	3559 ± 590	13

Die Gabe von Amilorid erfolgte in pw und Ca<sup>2+</sup>-freiem pw. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$ . Zu beachten ist, dass die dargestellten Werte ein Vergleich von Deltawerten sind. Dabei wurde die Reaktion unter Ca<sup>2+</sup>-frei mit der Reaktion unter normalen Bedingungen verglichen.



**Abbildung 6** Typischer Kurvenverlauf einer Amiloridreaktion unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. Basolateral wurde ständig RR perfundiert. Das Auswaschen erfolgte jeweils mit reinem pw.

In allen Versuchen konnte das Phänomen beobachtet werden, dass bei Gabe von Amilorid unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen der Strom erst rapide, wie bei einer „normalen“ Amiloridreaktion, abfiel und anschließend sofort wieder anstieg. Dabei pendelte er sich auf einem höheren Niveau als vor der Gabe ein (siehe Abbildung 6).

## V.2 $\text{Ca}^{2+}$ und Amilorid

Neben den oben erwähnten  $\text{Ca}^{2+}$ -frei-Versuchen, wurden gleichartige Versuche mit einer hohen Konzentration an Calcium durchgeführt.  $\text{Ca}^{2+}$  wurde 2mM auf das Gewebe gegeben und sein Einfluss auf die Amiloridreaktion des Gewebes untersucht. Zusätzlich dazu wurde vice versa der Einfluss von Amilorid auf die Reaktion von 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  getestet.

2mM  $\text{Ca}^{2+}$  ließ  $U_T$  von  $-3,2 \pm 0,8$  auf  $6,8 \pm 0,6$  mV und  $I_{SC}$  von  $-0,33 \pm 0,10$  auf  $0,98 \pm 0,10$   $\mu\text{A}$  signifikant ansteigen, während  $R_T$  signifikant von  $10153 \pm 545$  auf  $9187 \pm 437$   $\Omega$  abfiel (siehe Tabelle 3). Diese Reaktion stellte sich sofort und ohne Verzögerung ein. Auch war dieser Vorgang reversibel.

**Tabelle 3 Reaktion des Epithels auf 2mM Ca<sup>2+</sup>.**

	U <sub>T</sub> (mV)		I <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		R <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	normal	2mM Ca <sup>2+</sup>	normal	2mM Ca <sup>2+</sup>	normal	2mM Ca <sup>2+</sup>	
2mM Ca <sup>2+</sup>	-3,2 ± 0,8	6,8 ± 0,6 *	-0,33 ± 0,10	0,98 ± 0,10 *	10153 ± 545	9187 ± 437 *	152

\*=signifikant, p≤0,05

### V.2.1 Einfluss von Amilorid auf die Ca<sup>2+</sup>-Reaktion

Um den Einfluss von Amilorid auf die Calciumreaktion zu testen, wurde 2mM Ca<sup>2+</sup> unter Amilorid gegeben. Es zeigte sich zwar in U<sub>T</sub> und I<sub>SC</sub> eine leichte Verstärkung der Calciumantwort, die jedoch nicht signifikant ausfiel. In R<sub>T</sub> erkannte man sogar eine Umkehrung der Reaktionsrichtung (siehe Tabelle 4). Bedingt durch die großen Abweichungen der Werte konnte hier keine Signifikanz ermittelt werden.

**Tabelle 4 Calciumreaktion unter Amiloridbedingungen.**

	ΔU <sub>T</sub> (mV)		ΔI <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		ΔR <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	normal	Amilorid	normal	Amilorid	normal	Amilorid	
2mM Ca <sup>2+</sup>	11,2 ± 2,0	16,9 ± 0,7	1,11 ± 0,27	1,38 ± 0,30	17324 ± 15279	-2687 ± 516	4

Verglichen wurde die Reaktion von Calcium unter pw-Bedingungen („normal“) und unter 50μM Amilorid („Amilorid“). Calcium wurde in einer Konzentration von 2mM verabreicht. \*=signifikant, p≤0,05

### V.2.2 Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf die Amiloridreaktion

Mit einem etwas abgewandelten Versuchsablauf wurde der Einfluss von 2mM Ca<sup>2+</sup> auf die Amiloridreaktion getestet. Dabei wurde zu Beginn die Reaktion auf 50μM Amilorid erfasst, dargestellt als Δ-Werte in Tabelle 5 mit der Bezeichnung „normal“. Als Vergleich dazu sind die Daten der Amiloridreaktion unter Anwesenheit von 2mM Ca<sup>2+</sup> („Ca<sup>2+</sup>“) aufgeführt. Die Reaktion nahm bei U<sub>T</sub> und I<sub>SC</sub> signifikant ab. So betrug die Amiloridantwort bei U<sub>T</sub> nur noch 28,7%, bei I<sub>SC</sub> nur noch 30,9%. Lediglich R<sub>T</sub> zeigte keine signifikante Änderung.

**Tabelle 5 Einfluss von 2mM Ca<sup>2+</sup> auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Ca <sup>2+</sup>	normal	Ca <sup>2+</sup>	normal	Ca <sup>2+</sup>	
50 $\mu$ M Amilorid	-16,4 $\pm$ 2,4	-4,7 $\pm$ 0,9 *	-1,78 $\pm$ 0,42	-0,55 $\pm$ 0,11 *	3632 $\pm$ 888	981 $\pm$ 2500	4

„normal“ bezeichnet die Reaktion des Gewebes auf 50 $\mu$ M Amilorid. „Ca<sup>2+</sup>“ bezieht sich auf die Antworten des Epithels auf Amilorid bei gleichzeitiger Gabe von 2mM Ca<sup>2+</sup>. \*=signifikant, p $\leq$ 0,05

### V.3 cAMP

cAMP hatte auf das Gewebe einen stimulierenden Effekt. Bei der Gabe von 0,1mM cAMP und 1mM IBMX in Kombination stieg das Potential von  $-3,0 \pm 1,6$  auf  $5,5 \pm 1,5$ mV und der Strom von  $-0,11 \pm 0,18$  auf  $0,67 \pm 0,23$ . Beide Steigerungen waren, im Gegensatz zu der des Widerstands, signifikant. R<sub>T</sub> hingegen fiel von  $14263 \pm 1599$  auf  $12143 \pm 1315 \Omega$  ab (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6 Reaktion auf cAMP.**

	U <sub>T</sub> (mV·cm)		I <sub>SC</sub> ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		R <sub>T</sub> ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
cAMP	-3,0 $\pm$ 1,6	5,5 $\pm$ 1,5 *	-0,11 $\pm$ 0,18	0,67 $\pm$ 0,23 *	14263 $\pm$ 1599	12143 $\pm$ 1315	18

cAMP wurde in einer Konzentration von 0,1mM apikal appliziert. Zusätzlich dazu fand eine Gabe von 1mM IBMX statt. \*=signifikant, p $\leq$ 0,05

Diesen deutlichen Anstieg in I<sub>SC</sub> zeigt auch Abbildung 7. Man sieht eine doch recht schnelle Reaktion des Gewebes auf cAMP.

#### V.3.1 cAMP und Amilorid

Wie unter V.3 cAMP bereits aufgeführt, hatte cAMP eine signifikante Wirkung auf U<sub>T</sub> und I<sub>SC</sub>. Um nun herauszufinden, ob diese Steigerung auf den erhöhten Transport von Natrium zurückzuführen ist, wurde 50 $\mu$ M Amilorid eingesetzt. Zu Beginn der Versuche fand die Gabe von Amilorid in reinem pw statt. Nach anschließendem Auswaschen wurde pw mit 0,1mM cAMP und 1mM IBMX perfundiert. Unter diesen Bedingungen wurde nun erneut 50 $\mu$ M

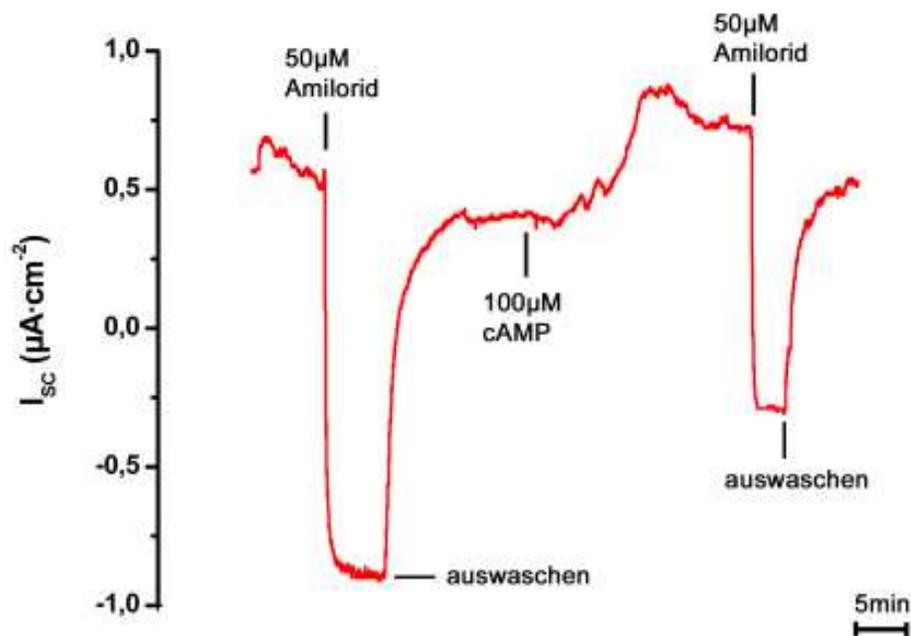
Amilorid auf das Gewebe gegeben. Während bei  $R_T$  keine signifikanten Unterschiede in den Amiloridreaktion zu finden waren, änderten sich die Reaktionen bei  $U_T$  und  $I_{SC}$  signifikant. Dabei verringerte sich die Antwort auf Amilorid bei  $U_T$  von  $-11,9 \pm 2,3$  auf  $-6,0 \pm 1,5$  mV und bei  $I_{SC}$  von  $-0,80 \pm 0,19$  auf  $-0,45 \pm 0,13$   $\mu$ A (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7** Veränderte Reaktion von Amilorid unter cAMP-Bedingungen.

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu$ A $\cdot$ cm $^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega$ $\cdot$ cm $^2$ )		Anzahl
	normal	cAMP	normal	cAMP	normal	cAMP	
cAMP	-11,9 $\pm$ 2,3	-6,0 $\pm$ 1,5 *	-0,80 $\pm$ 0,19	-0,45 $\pm$ 0,13 *	1668 $\pm$ 1011	2764 $\pm$ 1380	18

cAMP wurde mit IBMX apikal verabreicht. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Abbildung 7 zeigt zusätzlich zu der Reaktion auf cAMP die beiden Antworten auf 50  $\mu$ M Amilorid. Auf Anhieb ist die Verminderung der Reaktion unter der Anwesenheit von cAMP zu erkennen.



**Abbildung 7** Reaktion von Amilorid unter cAMP-Bedingungen. cAMP wurde 0,1mM apikal mit 1mM IBMX gegeben. Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt. Das Auswaschen erfolgte mit reinem pw.

## V.4 Cocktail

Die Erhöhung der Calciumkonzentration kann zu unterschiedlichen Effekten am Epithel führen. Um auszuschließen, dass evtl. Potential-, Strom- und Widerstandsänderungen durch Sekundäreffekte des Calciums ausgelöst werden, wurde ein Blockercocktail aus 50 $\mu$ M Amilorid, 1mM Quinine und 0,1mM Furosemid apikal auf das Gewebe gegeben. Die ermittelten Daten in Tabelle 8 zeigen, dass der Cocktail keine signifikanten Änderungen in allen drei Parametern hervorrief. Abbildung 8 verbildlicht diese Ergebnisse nochmals anhand einer charakteristischen Stromkurve.

**Tabelle 8 Reaktion auf die Gabe eines Blockercocktails.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
Cocktail	-7,0 $\pm$ 1,0	-10,1 $\pm$ 0,4	-0,56 $\pm$ 0,08	-0,86 $\pm$ 0,16	14778 $\pm$ 3091	14121 $\pm$ 2740	4

Der Cocktail wurde apikal perfundiert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## V.5 Cocktail und Calcium

Nachdem geklärt war, dass der Blockercocktail keinen signifikanten Einfluss auf das Gewebe hatte, wurde nun seine Wirkung auf die  $Ca^{2+}$ -Reaktion untersucht. Abbildung 8 zeigt einen exemplarischen Kurvenverlauf des  $I_{SC}$ . Dort und in Tabelle 9 ist erkennbar, dass dieser Cocktail eher einen stimulierenden, wenn auch nicht signifikanten Effekt auf die Calciumantwort hat.

**Tabelle 9 Amiloridreaktion unter Anwesenheit des Blockercocktails.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Cocktail	normal	Cocktail	normal	Cocktail	
2mM $Ca^{2+}$	12,5 $\pm$ 0,5	13,6 $\pm$ 0,5	1,07 $\pm$ 0,18	1,19 $\pm$ 0,24	-1794 $\pm$ 530	-2781 $\pm$ 686	4

Amilorid und der Cocktail wurden apikal verabreicht. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

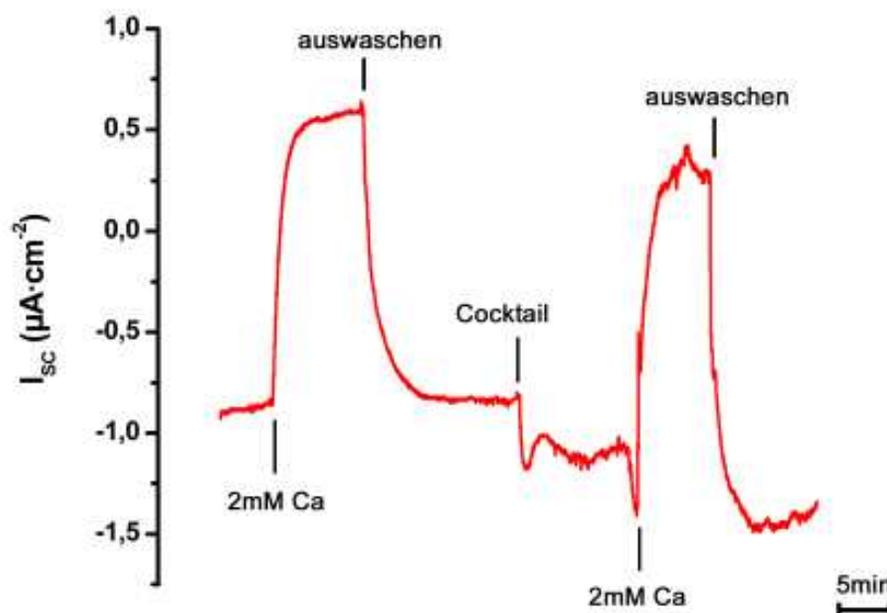


Abbildung 8 Einfluss des Blockercocktails auf den Strom  $I_{sc}$  und auf dessen Reaktion auf  $Ca^{2+}$ . Basolateral wurde RR perfundiert und das Auswaschen erfolgte mit pw.

## V.6 Deltamethrin

Deltamethrin ist ein bekanntes Schädlingsbekämpfungsmittel. Es findet starken Einsatz in der Landwirtschaft und ist daher im Bezug auf den ökologischen Effekt auch beim Regenwurm von Interesse. Deshalb wurde sein Einfluss auf die Calciumreaktion, und zusätzlich auch auf die Amiloridreaktion getestet. Es selbst zeigte erst in höheren Konzentrationen eine signifikante Reaktion von  $U_T$  und  $I_{sc}$ .  $R_T$  hingegen blieb davon unberührt (siehe Tabelle 10). Bei einer Konzentration von  $10\mu M$  fiel das Potential signifikant von  $-16,7\pm 5,8$  auf  $-16,1\pm 5,7$  mV ab. Bereits bei  $5\mu M$  zeigte sich eine signifikante Änderung. Der Strom hingegen stieg bei  $10\mu M$  von  $-1,03\pm 0,29$  auf  $-0,97\pm 0,30\mu A$  an.

**Tabelle 10 Unterschiedliche Konzentrationen von Deltamethrin und deren Einfluss auf die drei Grundparameter.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
1 $\mu M$	-3,3 $\pm$ 2,6	-3,0 $\pm$ 2,7	-0,14 $\pm$ 0,27	-0,29 $\pm$ 0,32	12540 $\pm$ 2895	11820 $\pm$ 2530	8
2,5 $\mu M$	3,5 $\pm$ 2,1	4,1 $\pm$ 2,4	0,49 $\pm$ 0,33	0,66 $\pm$ 0,41	8840 $\pm$ 1135	8916 $\pm$ 1183	7
5 $\mu M$	-4,3 $\pm$ 2,2	-3,8 $\pm$ 2,2 *	-0,38 $\pm$ 0,25	-0,29 $\pm$ 0,27	13831 $\pm$ 3233	13703 $\pm$ 3300	6
10 $\mu M$	-16,7 $\pm$ 5,8	-16,1 $\pm$ 5,7 *	-1,03 $\pm$ 0,29	-0,97 $\pm$ 0,30 *	16557 $\pm$ 2453	16636 $\pm$ 2410	5

Deltamethrin wurde jeweils apikal in pw verabreicht. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.6.1 Deltamethrin und Amilorid

In diesem Versuchteil wurde der Einfluss von 5 und 10  $\mu M$  Deltamethrin auf die Amiloridreaktion untersucht. Der Ablauf gestaltete sich wie unter IV.2.1 Versuchsablauf angegeben. Deltamethrin hatte jedoch keine signifikante Änderung der Amiloridreaktion zur Folge. Weder 5  $\mu M$  noch 10  $\mu M$  Deltamethrin beeinflussten die Antwort des Epithels auf 50  $\mu M$  Amilorid.

**Tabelle 11 Einfluss von Deltamethrin auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Deltamethrin	normal	Deltamethrin	normal	Deltamethrin	
5 $\mu M$	-13,0 $\pm$ 3,0	-16,9 $\pm$ 2,6	-1,23 $\pm$ 0,45	-1,32 $\pm$ 0,32	2478 $\pm$ 750	1937 $\pm$ 914	8
10 $\mu M$	-14,8 $\pm$ 2,4	-12,5 $\pm$ 0,9	-1,70 $\pm$ 0,29	-1,41 $\pm$ 0,08	2927 $\pm$ 952	1698 $\pm$ 334	9

Aufgeführt sind die Reaktionen von 50  $\mu M$  Amilorid in pw („normal“) und unter Anwesenheit von Deltamethrin („Deltamethrin“). \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## V.6.2 Deltamethrin und Calcium

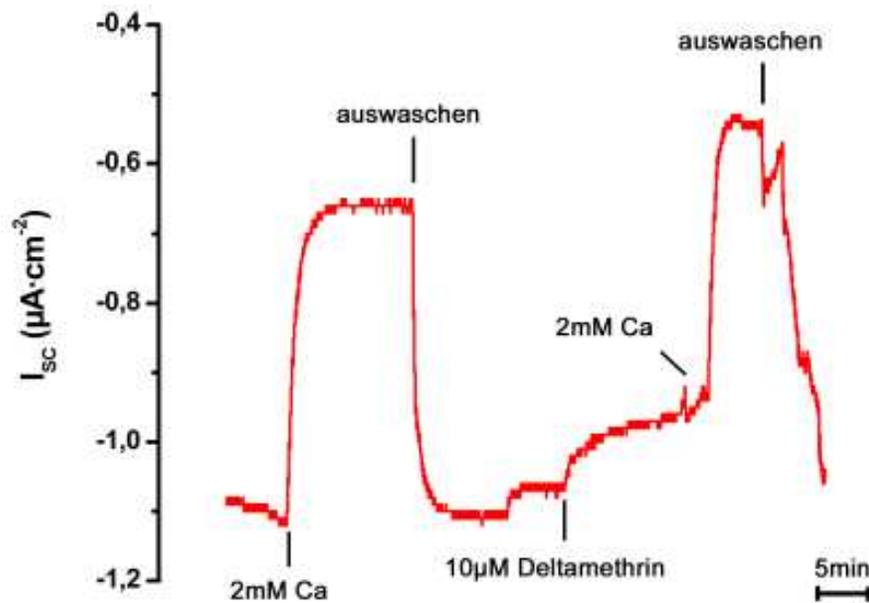
Deltamethrin zeigte erst in höheren Konzentrationen einen Einfluss auf die Calciumreaktion. Dies jedoch nur bei  $I_{SC}$ .  $U_T$  weist zwar bei  $2,5\mu\text{M}$  eine signifikante Reaktion auf, die aber als Ausreißer zu betrachten ist. Bei  $R_T$  zeigten sich keine signifikanten Änderungen (Tabelle 12).

**Tabelle 12 Einfluss von Deltamethrin auf die Calcium-Reaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )		Anzahl
	normal	Deltamethrin	normal	Deltamethrin	normal	Deltamethrin	
1 $\mu\text{M}$	6,9	6,7	0,79	0,79	-501	-1714	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,6	0,9	0,17	0,16	1751	1743	
2,5 $\mu\text{M}$	10,7	7,8	1,25	0,89	-279	-667	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,4	1,9*	0,32	0,29	230	451	
5 $\mu\text{M}$	11,1	11,1	1,09	1,00	2541	-3050	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,5	1,2	0,33	0,30 *	4048	1144	
10 $\mu\text{M}$	12,9	9,0	0,74	0,62	-2478	-390	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,1	0,7	0,11	0,09 *	1744	642	

„Normal“-Bedingungen spiegeln die Reaktionen von Calcium unter pw-Bedingungen wieder, wohingegen „Deltamethrin“ die Calciumreaktion in pw mit Deltamethrin darstellt. \*=signifikant,  $p\leq 0,05$

Tendenziell sinkt die Reaktion auf  $2\text{mM Ca}^{2+}$  unter Anwesenheit von Deltamethrin. So verringerte sich der Anstieg des Stroms signifikant durch  $10\mu\text{M}$  um  $0,12\mu\text{A}$  von  $0,74\pm 0,11$  auf  $0,62\pm 0,09\mu\text{A}$ . Ein repräsentativer Kurvenverlauf ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9** Typischer Kurvenverlauf einer Deltamethrin/ $\text{Ca}^{2+}$  Reaktion. Auf der basolateralen Seite fand eine Perfundierung mit RR statt. Ausgewaschen wurde mit pw.

### V.6.3 Deltamethrin basolateral

Da Deltamethrin basolateral den  $\text{Cl}^-$ -Transport beeinflussen soll (Cassano, Bellantuono et al. 2003), wurde es in einer Konzentration von  $5\mu\text{M}$  auf dieser Seite perfundiert. Bei Anwesenheit von  $\text{Cl}^-$ -Ionen zeigten sich signifikante Reaktion in  $U_T$ , wobei das Potential von  $-2,7\pm 4,3$  auf  $-1,4\pm 4,1\text{mV}$  anstieg, und in  $I_{\text{SC}}$ , wo ebenfalls ein Anstieg von  $-0,29\pm 0,40$  auf  $-0,17\pm 0,40\mu\text{A}$  stattfand. Der Widerstand  $R_T$  wurde von Deltamethrin nicht beeinflusst (siehe Tabelle 13).

Im Vergleich dazu wurden die Experiment auch mit  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung durchgeführt. Dazu wurden die  $\text{Cl}^-$ -Ionen in RR durch  $\text{SO}_4^{2-}$  ersetzt. Unter diesen Bedingungen blieb eine signifikante Reaktion des Epithels aus.

**Tabelle 13 Vergleich von Deltamethrin auf basolateraler Seite unter normalen Bedingungen und unter SO<sub>4</sub>-Bedingungen.**

	U <sub>T</sub> (mV)		I <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		R <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
normal	-2,7	-1,4	-0,29	-0,17	13464	13432	4
	±	±	±	±	±	±	
	4,3	4,1 *	0,40	0,40 *	2816	2951	
SO <sub>4</sub>	-1,0	-1,2	-0,32	-0,38	5483	5080	6
	±	±	±	±	±	±	
	1,3	1,1	0,26	0,22	1051	871	

Deltamethrin wurde in einer Konzentration von 5μM auf basolateraler Seite perfundiert. „Normal“ stellt die Bedingungen unter RR basolateral dar, während „SO<sub>4</sub>“ Cl<sup>-</sup>-freie Bedingungen (ebenfalls basolateral) darstellt.

\*=signifikant, p≤0,05

## V.7 Ethosuximid

Ethosuximid ist ein bekannter Blocker von T-Typ Calciumkanälen. In diesem Zusammenhang wurde es auf seine Wirkung auf die Calciumantwort des Epithels getestet. Die Reaktion auf reines Ethosuximid ist in Tabelle 14 dargestellt. Man sieht, dass bei beiden verwendeten Konzentrationen weder bei U<sub>T</sub>, I<sub>SC</sub> noch bei R<sub>T</sub> eine signifikante Reaktion zu entdecken ist. Grafisch dargestellt findet man das Ergebnis in Abbildung 10, in welcher man deutlich die ausbleibende Reaktion des Epithels auf 500μM Ethosuximid erkennen kann.

**Tabelle 14 Reaktionen der drei Parameter auf unterschiedliche Ethosuximidkonzentrationen.**

	U <sub>T</sub> (mV)		I <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		R <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
250μM	0,9	2,5	0,16	0,25	15797	12815	4
	±	±	±	±	±	±	
	2,1	2,0	0,18	0,17	3550	2025	
500μM	0,9	2,6	0,14	0,39	10773	8213	3
	±	±	±	±	±	±	
	1,6	2,0	0,27	0,36	3797	1706	

Ethosuximid wurde in den angegebenen Konzentrationen apikal verabreicht. \*=signifikant, p≤0,05

### V.7.1 Ethosuximid und Calcium

Anders als bei der Reaktion des Gewebes auf reines Ethosuximid verhält es sich bei seinem Einfluss auf die Calciumreaktion. Der Vergleich von Reaktionen auf 2mM Calcium mit

Reaktion auf 2mM Calcium unter Anwesenheit von Ethosuximid zeigte einen signifikanten Einfluss. Bereits bei 250 $\mu$ M Ethosuximid verringerte sich die Reaktion von  $U_T$  von einem  $\Delta$  von  $13,3\pm 1,4$  auf  $8,9\pm 1,4$ mV und ebenfalls bei  $I_{SC}$  von einem  $\Delta$  von  $1,11\pm 0,27$  auf  $0,82\pm 0,20\mu$ A. Nur die Reaktion von  $R_T$  blieb unbeeinflusst. Bei 500 $\mu$ M blieb die Veränderung von  $U_T$  nahezu gleich, während der Einfluss auf  $I_{SC}$  deutlich zugenommen hatte. Hier nahm die Antwort um 34% ab.

**Tabelle 15 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Ethosuximid auf die Calciumreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu$ A $\cdot$ cm $^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega\cdot$ cm $^2$ )		Anzahl
	normal	Ethosuximid	normal	Ethosuximid	normal	Ethosuximid	
250 $\mu$ M	13,3	8,9	1,11	0,82	-2136	-794	4
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,4	1,4 *	0,27	0,20 *	951	437	
500 $\mu$ M	15,1	10,3	2,23	1,47	-4217	400	3
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,7	1,1 *	0,42	0,25 *	2855	802	

„normal“ kennzeichnet die Reaktion des Gewebes auf 2mM Ca $^{2+}$  unter pw-Bedingungen, „Ethosuximid“ die Reaktion unter der Anwesenheit von Ethosuximid. \*=signifikant,  $p\leq 0,05$

Abbildung 10 zeigt sehr deutlich den Einfluss von 500 $\mu$ M Ethosuximid auf die Reaktion von 2mM Calcium.

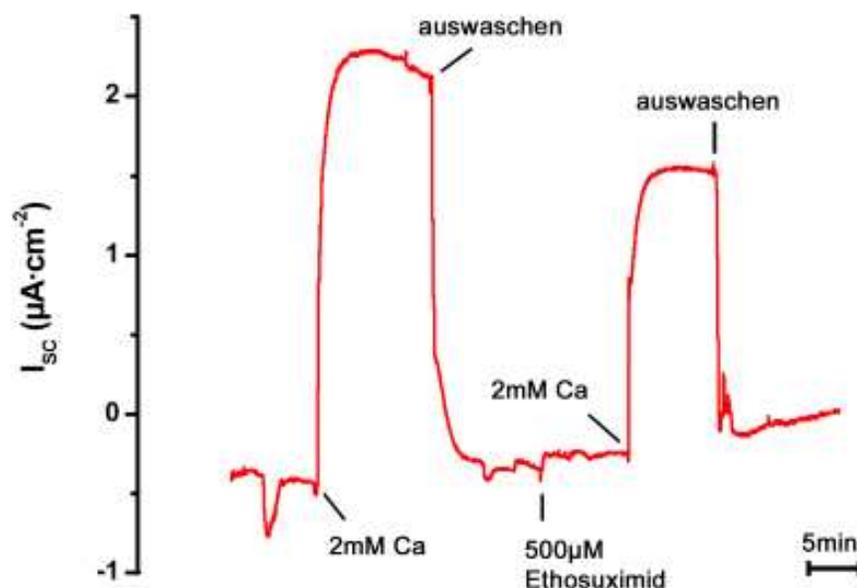


Abbildung 10 Der Kurvenverlauf beschreibt den Einfluss von 500µM Ethosuximid auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. Apikal wurde RR perfundiert. Das Auswaschen erfolgte mit reinem pw.

## V.8 Verapamil

Verapamil hatte in der Konzentration 100µM keinen signifikanten Einfluss auf das Gewebe (siehe Tabelle 16).  $U_T$  zeigte zwar einen leichten Abfall und  $R_T$  einen leichten Anstieg, jedoch konnten diese nicht statistisch gesichert werden. Wie man in Abbildung 11 und Abbildung 12 erkennen kann, sind die Reaktionen auf Verapamil im Strom nicht erwähnenswert.

Tabelle 16 Reaktion des Gewebes auf 100µM Verapamil.

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
100µM	-2,9 ± 3,3	-3,1 ± 3,3	-0,24 ± 0,41	-0,24 ± 0,40	10019 ± 1499	10329 ± 1692	8

Die Perfundierung von 100µM Verapamil fand apikal statt. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.8.1 Verapamil und Amilorid

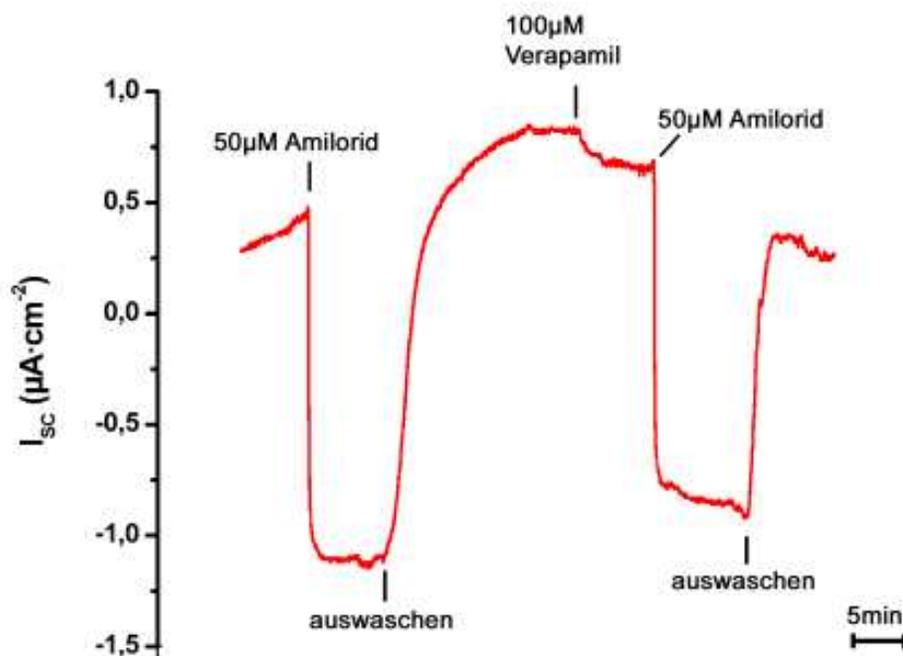
100 $\mu$ M Verapamil zeigte keine signifikante Wirkung auf die Amiloridantwort. Weder  $U_T$ ,  $I_{SC}$  noch  $R_T$  wurden durch die Anwesenheit von Verapamil beeinflusst (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17 Unterschiedliche Reaktionen von Amilorid unter An- und Abwesenheit von Verapamil.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Verapamil	normal	Verapamil	normal	Verapamil	
50 $\mu$ M Amilorid	-7,6 $\pm$ 3,2	-7,5 $\pm$ 3,2	-0,63 $\pm$ 0,30	-0,62 $\pm$ 0,30	1916 $\pm$ 1174	2169 $\pm$ 1460	4

Verglichen wurde die Reaktion des Gewebes auf 50 $\mu$ M Amilorid unter pw-Bedingungen („normal“) und unter Anwesenheit von 100 $\mu$ M Verapamil („Verapamil“). \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Abbildung 11 zeigt einen typischen Kurvenverlauf in  $I_{SC}$ . Man erkennt, dass die Reaktionen des Epithels auf 50 $\mu$ M Amilorid annähernd gleich verlaufen. Das „unruhigere“ Aussehen der Kurve nach der Verapamilgabe ist kein direkter Effekt des Verapamils. Es ist eher auf die Dauer des Versuchs zurückzuführen.



**Abbildung 11 Reaktion von 50 $\mu$ M Amilorid unter Anwesenheit von 100 $\mu$ M Verapamil.** Amilorid und Verapamil wurden in pw verabreicht, während basolateral RR perfundiert wurde. Auch das Auswaschen erfolgte mit pw.

## V.8.2 Verapamil und Calcium

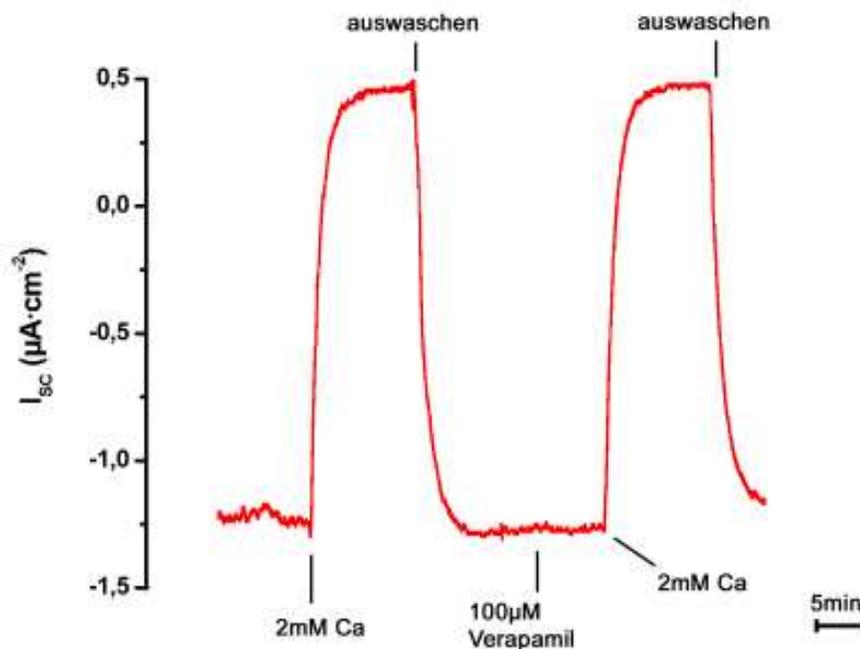
Auch auf die Reaktion des Gewebes auf 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  hatte 100 $\mu\text{M}$  Verapamil keinen signifikanten Einfluss. Tendenzen sind auf Grund der großen Streuung der Messwerte nicht zu erkennen (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18 Einfluss von 100 $\mu\text{M}$  Verapamil auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )		Anzahl
	normal	Verapamil	normal	Verapamil	normal	Verapamil	
2mM $\text{Ca}^{2+}$	9,3 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 1,2	1,52 $\pm$ 0,46	1,44 $\pm$ 0,36	-512 $\pm$ 20	371 $\pm$ 571	4

Unterschiedliche Reaktionen auf 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  unter pw-Bedingungen („normal“) und unter gleichzeitiger Gabe von 100 $\mu\text{M}$  Verapamil („Verapamil“). \*=signifikant,  $p < 0,05$

Grafisch dargestellt findet man einen typischen Kurvenverlauf von  $I_{SC}$  in Abbildung 12. Man erkennt deutlich, dass das Epithel keine Reaktion auf 100 $\mu\text{M}$  Verapamil zeigte. Auch blieb die Calciumreaktion gänzlich unbeeinflusst.



**Abbildung 12 Beispielhafter Verlauf eines Versuchs mit 100 $\mu\text{M}$  Verapamil.** Calcium und Verapamil wurden in pw perfundiert. Auch das Auswaschen erfolgte mit reinem pw. Basolateral wurde das Epithel mit RR umspült.

## V.9 Nifedipin

Nifedipin ist, wie auch Verapamil, ein Blocker von L-Typ Calciumkanälen. Eine Reaktion des Gewebes auf den Blocker selbst blieb jedoch aus. Auch zeigen die Messwerte aus Tabelle 19 keine wirkliche Tendenz einer  $U_T$ ,  $I_{SC}$ - oder  $R_T$ -Änderung. Die in Abbildung 13 ersichtliche kurze Reaktion auf Nifedipin ist eine Ausnahme. Die Kurve wurde als Beispiel für den Einfluss auf die Amiloridreaktion ausgewählt.

**Tabelle 19 Messwertänderungen bei der Gabe von 100 $\mu$ M Nifedipin.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
100 $\mu$ M	1,8	1,7	0,33	0,30	10741	11204	14
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,3	2,0	0,25	0,21	941	992	

Nifedipin wurde in einer Konzentration von 100 $\mu$ M apikal perfundiert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.9.1 Nifedipin und Amilorid

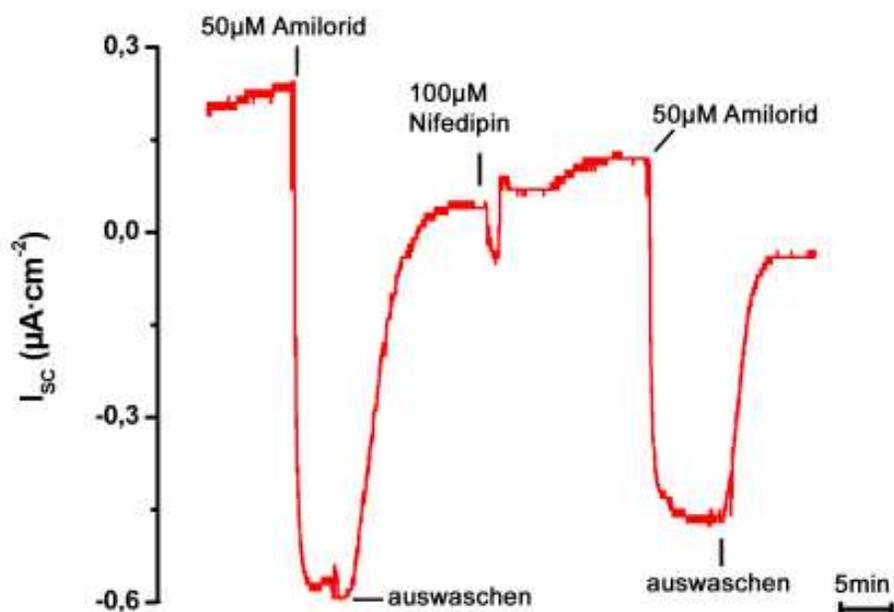
Nifedipin zeigte, anders als Verapamil, eine signifikante Wirkung auf die Amiloridantwort des Epithel. Während  $U_T$  und  $R_T$  davon unbeeinflusst blieben, änderte sich die Reaktionshöhe ( $\Delta$ ) bei der Gabe von 50 $\mu$ M Amilorid bei  $I_{SC}$  von  $-1,51 \pm 0,40$  auf  $-1,17 \pm 0,31 \mu A$  (siehe Tabelle 20).

**Tabelle 20 Wirkung von 100 $\mu$ M Nifedipin auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Nifedipin	normal	Nifedipin	normal	Nifedipin	
50 $\mu$ M Amilorid	-10,6	-12,5	-1,51	-1,17	3218	1310	10
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,7	2,7	0,40	0,31 *	838	2391	

In dieser Tabelle wird die Reaktion von 50 $\mu$ M Amilorid in pw („normal“) der Reaktion von 50 $\mu$ M Amilorid unter Anwesenheit von 100 $\mu$ M Nifedipin („Nifedipin“) gegenübergestellt. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Abbildung 13 zeigt zwar eine untypische Reaktion auf Nifedipin, jedoch erkennt man an ihr sehr schön den Einfluss von 100 $\mu$ M Nifedipin auf die Reaktion des Gewebes auf 50 $\mu$ M Amilorid. Ausgewählt wurde der Kurvenverlauf von  $I_{SC}$ , da sich nur hier eine signifikante Reaktion zeigte.



**Abbildung 13 Wirkung von 100µM Nifedipin auf die Amiloridantwort.** Die Substanzen wurden apikal in pw perfundiert und das Auswaschen erfolgte ebenfalls mit pw. Basolateral befand sich RR in der Kammer.

## V.9.2 Nifedipin und Calcium

Im Vergleich mit Verapamil zeigte auch 100µM Nifedipin keine signifikante Wirkung auf die Calciumreaktion. Lediglich nahm  $\Delta R_T$  von  $-1117 \pm 450$  auf  $-1003 \pm 441 \Omega$  ab (siehe Tabelle 21).  $\Delta U_T$  und  $\Delta I_{SC}$  bleiben jedoch davon unbeeinflusst.

**Tabelle 21 Einfluss von 100µM Nifedipin auf die  $Ca^{2+}$ -Reaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Nifedipin	normal	Nifedipin	normal	Nifedipin	
2mM $Ca^{2+}$	12,1 ± 1,0	12,5 ± 1,8	1,32 ± 0,26	1,28 ± 0,18	-1117 ± 450	-1003 ± 441 *	4

„normal“ bezeichnet die Reaktion des Gewebes auf die Perfundierung von 2mM  $Ca^{2+}$  in reinem pw. „Nifedipin“ stellt die Reaktion des Gewebes auf 2mM  $Ca^{2+}$  mit gleichzeitiger Gabe von 100µM Nifedipin dar. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## V.10 Blei

Blei wurde in seiner Funktion als Schwermetall auf seine Wirkung auf die Amiloridreaktion getestet. Dabei wurde es in den Konzentrationen 0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M verwendet. Signifikante Reaktionen präsentierten sich erst mit zunehmender Konzentration (siehe Tabelle 22), diese jedoch nur bei  $U_T$  und  $I_{SC}$ . In den Konzentrationen 0,1 und 1 $\mu$ M zeigte die Wirkung von Blei auf  $U_T$  und  $I_{SC}$  eine tendenziell steigernde Wirkung. So stieg z.B.  $I_{SC}$  bei 1 $\mu$ M von  $2,26 \pm 0,91$  auf  $2,51 \pm 0,89 \mu A$  an. Bei 10 $\mu$ M Blei hingegen sanken  $U_T$  und  $I_{SC}$  ab. Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen deutlich die unterschiedlichen Reaktionen auf Blei. Während bei Abbildung 14 der Strom auf die Gabe von 1 $\mu$ M Blei hin ansteigt, so fiel er bei der Gabe von 10 $\mu$ M Blei ab (Abbildung 15).

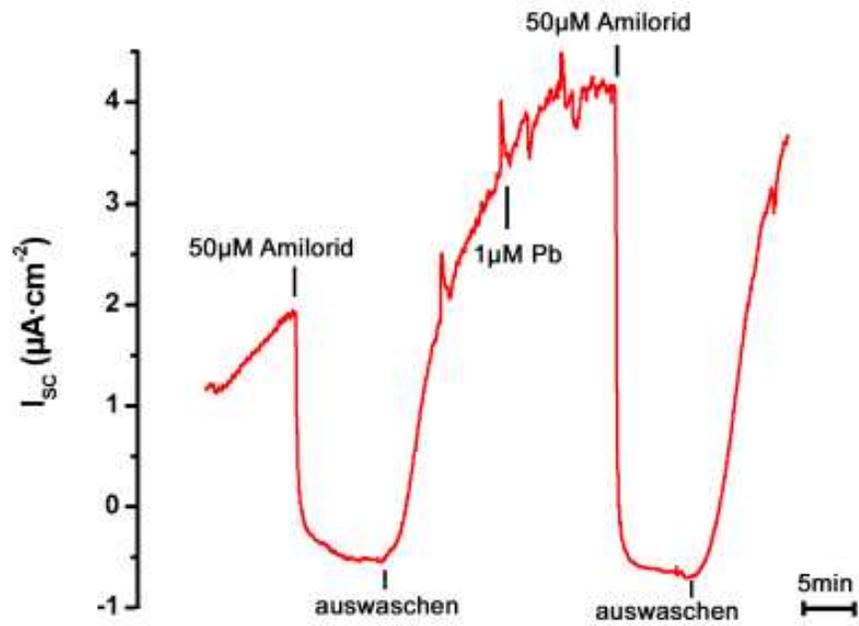
Tabelle 22 Reaktionen des Gewebes auf die Perfundierung mit unterschiedlichen Bleikonzentrationen.

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
0,1 $\mu$ M	-4,2	-0,7	-1,23	-1,09	7581	6716	7
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	4,2	4,3	0,89	1,13	941	951	
1 $\mu$ M	16,2	17,5	2,26	2,51	8675	8534	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	4,8	4,8 *	0,91	0,89 *	1207	1150	
10 $\mu$ M	7,2	2,9	0,51	0,10	9498	10184	10
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,6	1,6 *	0,48	0,38 *	1502	1570	

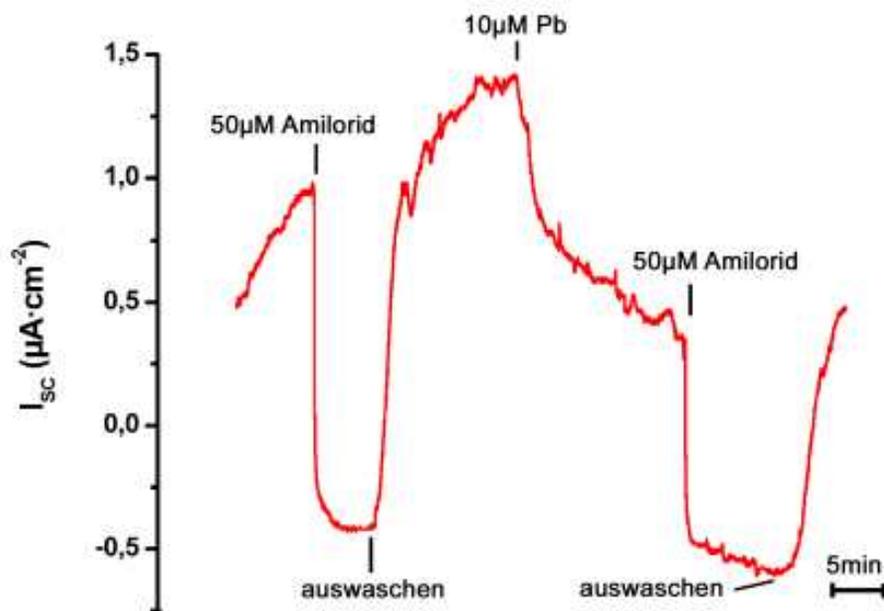
Blei wurde in den aufgeführten Konzentrationen apikal gegeben. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.10.1 Blei und Amilorid

Der Einfluss von Blei auf die Amiloridreaktion setzte die unterschiedliche Beeinflussungsweise von Blei fort. Während bei 0,1 $\mu$ M Blei in  $U_T$  die Reaktion auf 50 $\mu$ M Amilorid tendenziell stimuliert wurde, hemmte es im Gegenzug die Reaktion in  $I_{SC}$  (Tabelle 23). Gleiche Wirkungsweise zeigte Blei in einer Konzentration von 1 $\mu$ M. Dabei fand eine Stimulation der Antwort auf Amilorid statt, wie man in Abbildung 14 schön anhand der Stromkurve erkennen kann. Ebenfalls bei  $U_T$  wirkte sich Blei in dieser Konzentration stimulierend aus. Anders sah die Wirkung von 10 $\mu$ M Blei aus. Abbildung 15 lässt eine signifikante Hemmung in  $I_{SC}$  erkennen. Diese Hemmung fand man auch in  $U_T$ , wo die Reaktion anstatt  $-8,8 \pm 2,1$  nur noch  $-6,0 \pm 1,2$  mV betrug.



**Abbildung 14 Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Blei auf die Amiloridreaktion.** Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt. Das Auswaschen erfolgte mit reinem pw.



**Abbildung 15 Beispielhafter Kurvenverlauf von 10  $\mu\text{M}$  Blei und seiner Wirkung auf die Amiloridantwort.** Basolateral befand sich RR und ausgewaschen wurde mit reinem pw.

$R_T$ , bedingt durch große Schwankungen der Messwerte, zeigte in keiner Konzentration eine signifikante Reaktion. Auch hier variierten hemmende und stimulierende Wirkung wie bei  $U_T$  und  $I_{SC}$ . Eine stringente Reaktionsrichtung ist auch hier nicht zu erkennen.

**Tabelle 23 Einfluss unterschiedlicher Bleikonzentrationen auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Blei	normal	Blei	normal	Blei	
0,1 $\mu M$	-4,6 $\pm$ 0,8	-6,6 $\pm$ 1,5	-0,56 $\pm$ 0,16	-0,43 $\pm$ 0,40	2102 $\pm$ 1110	2635 $\pm$ 705	7
1 $\mu M$	-13,5 $\pm$ 2,8	-16,4 $\pm$ 4,4	-1,86 $\pm$ 0,57	-2,53 $\pm$ 0,74 *	4618 $\pm$ 1083	2524 $\pm$ 3153	8
10 $\mu M$	-8,8 $\pm$ 2,1	-6,0 $\pm$ 1,2	-1,00 $\pm$ 0,25	-0,59 $\pm$ 0,21 *	-1170 $\pm$ 4874	10901 $\pm$ 6288	10

„normal“ kennzeichnet die Gewebereaktion auf 50 $\mu M$  Amilorid. „Blei“ stellt die Reaktion auf Amilorid unter Anwesenheit von Blei dar. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## V.11 Eisen(II)

Eisen wurde in den Redoxstufen II und III auf dem Gewebe getestet. 100 $\mu M$  Eisen(II) zeigte keine signifikante Wirkung auf  $U_T$  und  $I_{SC}$ . Lediglich fand man eine signifikante Stimulation des Widerstands (siehe Tabelle 24). Hier stieg  $R_T$  von 10395 $\pm$ 1125 auf 11692 $\pm$ 1411  $\Omega$ . In Abbildung 16 scheint zwar eine deutliche Reaktion des  $I_{SC}$  erkenntlich zu sein, jedoch wurde diese Kurve als Beispielkurve für den Einfluss von Amilorid auf den Kurzschlussstrom gewählt. Im Mittel zeigte der  $I_{SC}$  keine signifikante Antwort auf 100 $\mu M$  Eisen(II).

**Tabelle 24 Eisen(II)reaktion des Gewebes.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
100 $\mu M$	7,9 $\pm$ 4,1	5,7 $\pm$ 3,4	0,62 $\pm$ 0,42	0,35 $\pm$ 0,32	10395 $\pm$ 1125	11692 $\pm$ 1411 *	4

Eisen(II) wurde apikal perfundiert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

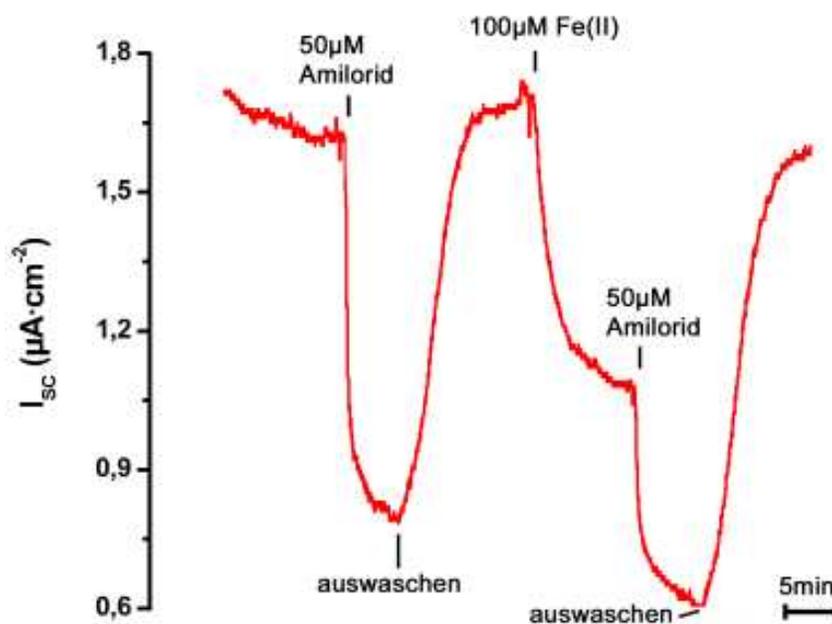
### V.11.1 Eisen(II) und Amilorid

Im Gegensatz zur Reaktion von Eisen(II) auf die drei Parameter, zeigte es eine signifikante Wirkung auf die Amiloridreaktion. Zwar fand man diese nur in  $I_{SC}$ , wo die Antwort auf  $50\mu\text{M}$  Amilorid von  $\Delta-0,51\pm 0,09$  auf  $\Delta-0,39\pm 0,06\mu\text{A}$  absank (siehe Abbildung 16).  $U_T$  und  $R_T$  unterlagen keinem deutlichen Einfluss von  $100\mu\text{M}$  Eisen(II).

**Tabelle 25 Reaktionen auf Amilorid unter An- und Abwesenheit von  $100\mu\text{M}$  Eisen(II).**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )		Anzahl
	normal	Eisen(II)	normal	Eisen(II)	normal	Eisen(II)	
50 $\mu\text{M}$ Amilorid	-4,9 $\pm$ 0,9	-4,1 $\pm$ 1,0	-0,51 $\pm$ 0,09	-0,39 $\pm$ 0,06 *	1484 $\pm$ 482	2319 $\pm$ 1641	4

Reaktionen des Gewebes auf  $50\mu\text{M}$  Amilorid in pw („normal“) und bei gleichzeitiger Gabe von  $100\mu\text{M}$  Eisen(II) („Eisen(II)“). \*=signifikant,  $p\leq 0,05$



**Abbildung 16 Beispielhafter Kurvenverlauf der Wirkung von  $100\mu\text{M}$  Eisen(II) auf die Amiloridreaktion.**

Eisen(II) und Amilorid wurden in pw appliziert. Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt.

## V.12 Eisen(III)

Anders als Eisen(II) zeigte 100 $\mu$ M Eisen(III) eine signifikante Wirkung auf  $U_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$ . So stiegen alle drei Parameter teils enorm an,  $U_T$  von  $-1,5 \pm 1,1$  auf  $25,5 \pm 6,4$  mV,  $I_{SC}$  von  $-0,20 \pm 0,13$  auf  $1,58 \pm 0,51$   $\mu$ A und  $R_T$  von  $10459 \pm 1009$  auf  $18238 \pm 1386$   $\Omega$  (siehe Tabelle 26).

**Tabelle 26 Reaktionen des Epithels auf 100 $\mu$ M Eisen(III).**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu$ A $\cdot$ cm $^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega$ $\cdot$ cm $^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
100 $\mu$ M	-1,5 $\pm$ 1,1	25,5 $\pm$ 6,4 *	-0,20 $\pm$ 0,13	1,58 $\pm$ 0,51 *	10459 $\pm$ 1009	18238 $\pm$ 1386 *	6

100 $\mu$ M Eisen(III) wurde apikal in pw perfundiert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.12.1 Eisen(III) und Amilorid

Auch die Wirkung von Eisen(III) auf die Amiloridantwort war in  $U_T$  und  $I_{SC}$  signifikant. Im Gegensatz zu Eisen(II) jedoch kehrten sich die Reaktionsrichtungen von  $U_T$  und  $I_{SC}$  sogar um. Fand unter pw-Bedingungen eine Hemmung des Potentials und des Kurzschlussstroms statt, so stimulierte 50 $\mu$ M Amilorid diese Parameter unter der Anwesenheit von 100 $\mu$ M Eisen(III). Abbildung 17 zeigt einen exemplarischen Verlauf der  $I_{SC}$ -Kurve.

**Tabelle 27 Einfluss von 100 $\mu$ M Eisen(III) auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu$ A $\cdot$ cm $^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega$ $\cdot$ cm $^2$ )		Anzahl
	normal	Eisen(III)	normal	Eisen(III)	normal	Eisen(III)	
50 $\mu$ M Amilorid	-5,6 $\pm$ 1,5	0,9 $\pm$ 0,6 *	-0,48 $\pm$ 0,14	0,10 $\pm$ 0,07 *	1820 $\pm$ 489	781 $\pm$ 626	6

„normal“ bezeichnet die Reaktion auf 50 $\mu$ M Amilorid in pw und „Eisen(III)“ die Reaktion auf Amilorid unter Anwesenheit von 100 $\mu$ M Eisen(III). \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Nicht aufgeführt sind die Werte des veränderten Versuchsablaufs mit Eisen(III) und Amilorid. Dabei wurde die Reaktionsfolge insofern abgewandelt, dass zuerst 100 $\mu$ M Eisen(III) gegeben wurde. Nach dem Auswaschen erfolgte die Gabe von 50 $\mu$ M Amilorid und unter diesen neuen „Amiloridbedingungen“ wurde erneut 100 $\mu$ M Eisen(III) appliziert. Bei dieser Versuchsan-

ordnung fand in keinster Weise eine signifikante Reaktion statt. Daher wurde von der Präsentation der Werte abgesehen.

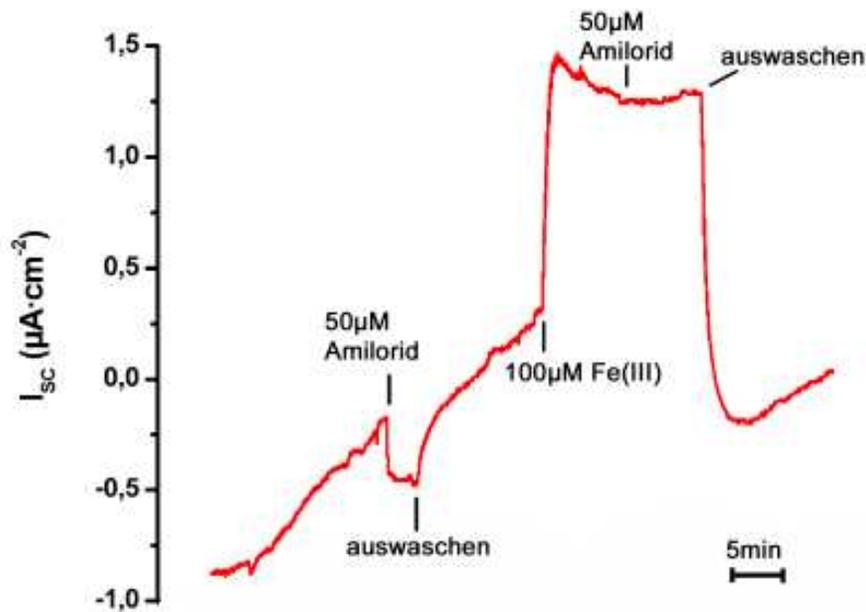


Abbildung 17 Wirkung von 100µM Eisen (III) auf die Reaktion von 50µM Amilorid. Auswaschen erfolgte mit reinem pw und basolateral wurde RR perfundiert.

### V.13 Kobalt

Kobalt zeigte in niedriger Konzentration keine Wirkung auf das Epithel. Erst bei 100µM änderten sich  $U_T$  und  $I_{SC}$  signifikant.  $U_T$  sank von  $10,9 \pm 4,6$  auf  $6,4 \pm 3,7$  mV und  $I_{SC}$  von  $1,11 \pm 0,52$  auf  $0,58 \pm 0,42$  µA. Diese Tendenz zeigte sich zwar bereits bei 50µM, war jedoch dort noch nicht signifikant.  $R_T$  wies keine signifikante Reaktion auf. Auch wechselte die Reaktionsrichtung von Absinken nach Ansteigen (siehe Tabelle 28).

**Tabelle 28 Wirkung von Kobalt auf das Epithel.**

	U <sub>T</sub> (mV)		I <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		R <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
50μM	6,1	5,2	0,41	0,30	15322	14814	4
	±	±	±	±	±	±	
	4,0	3,3	0,26	0,20	2383	1362	
100μM	10,9	6,4	1,11	0,58	8802	10028	6
	±	±	±	±	±	±	
	4,6	3,7 *	0,52	0,42 *	1116	1171	

Kobalt wurde in pw apikal appliziert. \*=signifikant, p≤0,05

### V.13.1 Kobalt und Amilorid

Im Gegensatz zur Wirkweise von Kobalt auf das Gewebe selbst, wirkte es auf die Amiloridreaktion schon in geringeren Konzentrationen.

**Tabelle 29 Einfluss von Kobalt auf die Amiloridreaktion.**

	ΔU <sub>T</sub> (mV)		ΔI <sub>SC</sub> (μA·cm <sup>-2</sup> )		ΔR <sub>T</sub> (Ω·cm <sup>2</sup> )		Anzahl
	normal	Kobalt	normal	Kobalt	normal	Kobalt	
50μM	-6,5	-2,9	-0,48	-0,16	4002	-3035	4
	±	±	±	±	±	±	
	1,9	1,4 *	0,14	0,08 *	2320	2641	
100μM	-5,3	-1,5	-0,75	-0,21	2127	637	6
	±	±	±	±	±	±	
	1,6	0,3 *	0,17	0,03 *	673	493 *	

\*=signifikant, p≤0,05

Kobalt hemmte die Antwort auf 50μM Amilorid schon bei 50μM signifikant, und bei 100μM sogar bei allen drei Parametern (siehe Tabelle 29). ΔI<sub>SC</sub> nahm von -0,75±0,17 auf -0,21±0,03μA ab. Auch ΔU<sub>T</sub> sank von -5,3±1,6 auf -1,5±0,3mV ab. Die Wirkung von 100μM Kobalt war auch bei R<sub>T</sub> signifikant. So sank ΔR<sub>T</sub> von 2127±673 auf 637±493Ω.

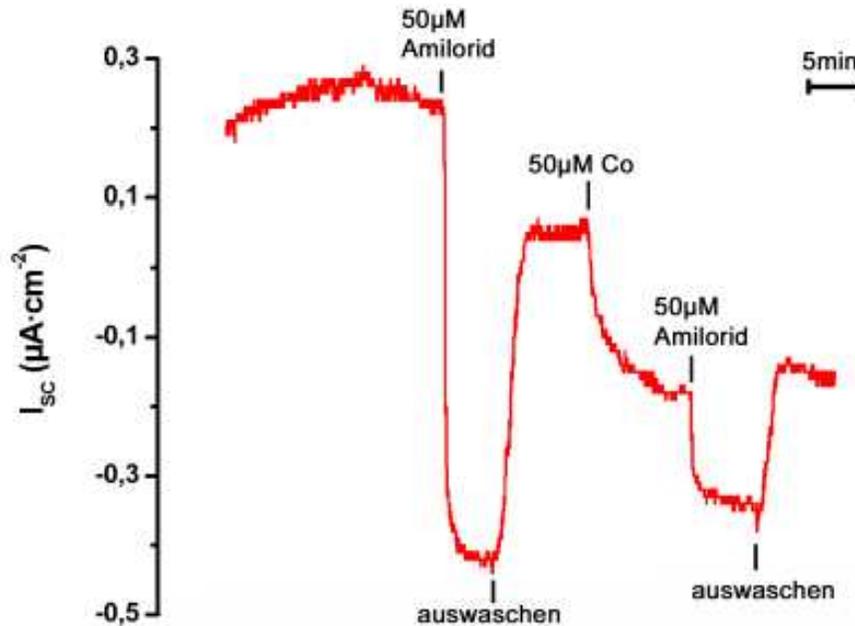


Abbildung 18 Die Amiloridreaktion zeigt unter 50µM Kobalt eine deutlich geringere Inhibition. Die Perfundierung erfolgte apikal in pw. Auch wurde pw zum auswaschen verwendet. Basolateral wurde RR gegeben.

Abbildung 18 zeigt sehr deutlich den signifikanten Einfluss, den bereits 50µM Kobalt auf die Reaktion des Epithels auf 50µM Amilorid hatte. Die hier signifikant erscheinende Wirkung von Kobalt auf das Gewebe relativiert sich im Mittel allerdings wieder.

## V.14 Kupfer

Kupfer wurde in verschiedenen Konzentrationen jeweils apikal in pw auf das Gewebe gegeben. Dabei hatten sowohl die Versuche mit Calcium wie auch die Versuche mit Amilorid die unter IV.2.1 Versuchsablauf gestaltete Durchführung.

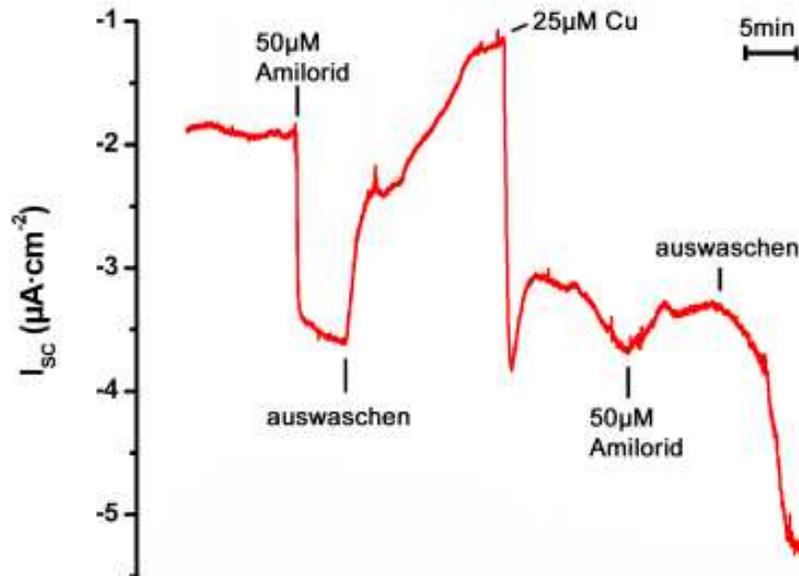
Führte man nun aus beiden Versuchteilen jeweils die reine Reaktion auf Kupfer zusammen, so zeigte es sich, dass alle drei Konzentrationen (10µM, 25µM und 50µM) an Kupfer einen signifikanten Abfall des  $I_{SC}$  von  $0,79 \pm 0,29$ ,  $0,77 \pm 0,34$  und  $1,61 \pm 0,33 \mu A$  zur Folge hatten. In Abbildung 19 sieht man diese Abnahme sehr deutlich. Auch wiesen  $U_T$  und  $R_T$  einen Abfall der Werte auf, welcher jedoch nur beim Potential erst bei höheren Kupferkonzentrationen signifikant war (siehe Tabelle 30). So fiel  $U_T$  bei 50µM Kupfer um  $7,3 \pm 1,1 mV$  ab.

**Tabelle 30** Änderungen der Basisparameter unter verschiedenen Kupferkonzentrationen.

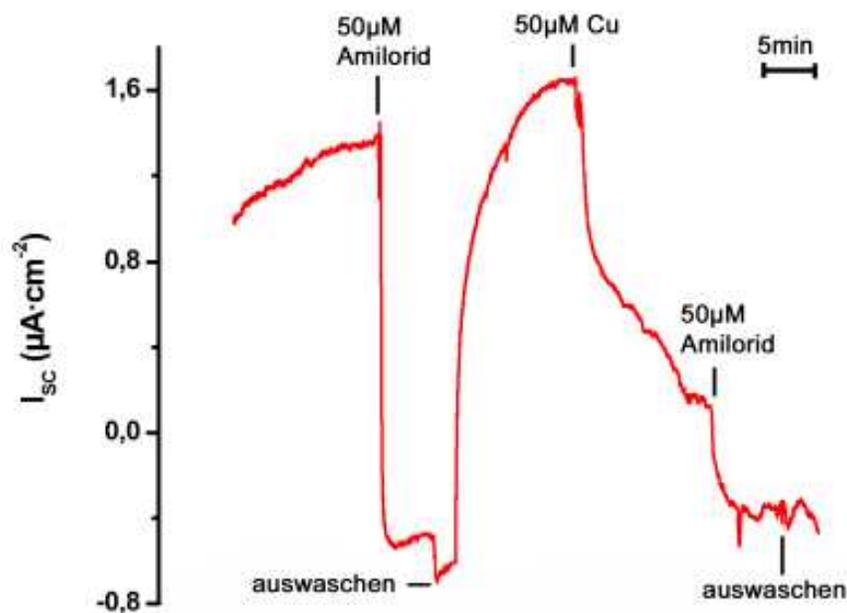
	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
10 $\mu$ M	1,1	-1,4	0,25	-0,54	8236	7837	14
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,5	2,0	0,53	0,37 *	1088	1342	
25 $\mu$ M	0,1	-3,4	-0,09	-0,80	6829	5098	12
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,3	1,9 *	0,30	0,55 *	1354	690	
50 $\mu$ M	-0,3	-14,8	0,10	-3,05	10571	6180	10
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,0	5,4 *	0,34	1,03 *	1819	830	

Die Konzentrationen sind aus beiden Versuchteilen zusammen getragen. Kupfer wurde jeweils apikal in pw appliziert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.14.1 Kupfer und Amilorid



**Abbildung 19** Einfluss von 25 $\mu$ M Kupfer auf die Amiloridreaktion. Beachtlich ist die Umkehrung der Amiloridreaktion unter Kupferbedingungen. Ausgewaschen wurde stets mit reinem pw und basolaterel fand konstant eine Perfundierung mit RR statt.



**Abbildung 20** 50  $\mu M$  Kupfer vermindert die Inhibition von 50  $\mu M$  Amilorid. Zum Auswaschen wurde reines pw verwendet. Die Perfundierung der getesteten Substanzen erfolgte jeweils apikal und in pw gelöst. Basolateral wurde permanent RR verabreicht.

Kupfer beeinflusste die Amiloridreaktion deutlich, wie man an den in Tabelle 31 aufgeführten Werten erkennen kann. Die Senkung des Potentials unter normalen Bedingungen wurde unter Kupferbedingungen verringert, und dass bei allen drei getesteten Konzentrationen signifikant. Die Änderungen im Widerstand zeigen eine tendenzielle Abnahme der Amiloridreaktion.

**Tabelle 31 Änderungen der Amiloridreaktion unter verschiedenen Kupferkonzentrationen.**

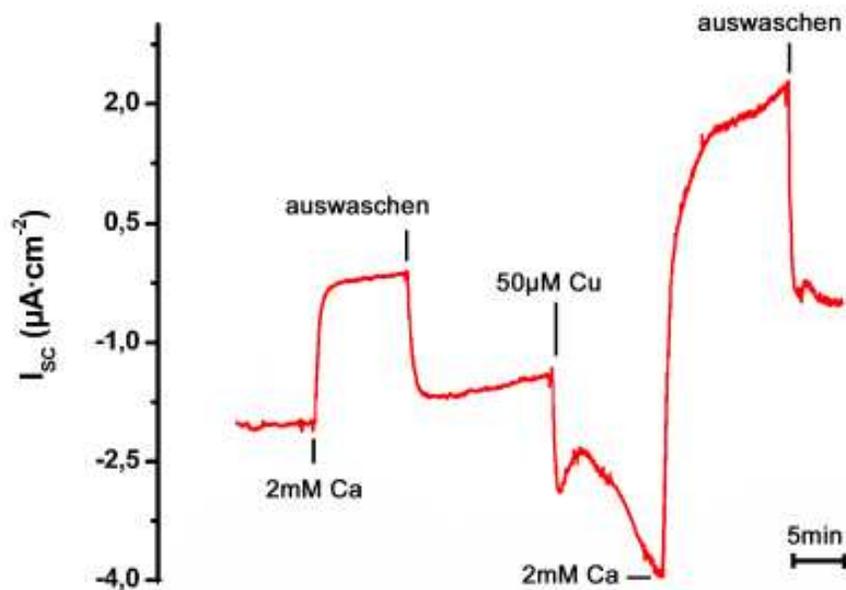
	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Kupfer	normal	Kupfer	normal	Kupfer	
10 $\mu$ M	-11,3 ± 2,0	-4,8 ± 0,9 *	-1,17 ± 0,30	-0,53 ± 0,13 *	1225 ± 473	1257 ± 1606	6
25 $\mu$ M	-6,0 ± 0,7	1,8 ± 1,2 *	-1,05 ± 0,18	0,48 ± 0,29 *	501 ± 317	206 ± 475	7
50 $\mu$ M	-6,6 ± 2,3	-0,3 ± 1,4 *	-0,79 ± 0,32	-0,02 ± 0,16 *	1310 ± 307	-588 ± 308 *	6

„Normal“ beschreibt die Reaktionen des Epithels auf 50 $\mu$ M Amilorid in reinem pw. „Kupfer“ hingegen stellt die Reaktionen von Amilorid unter Kupferbedingungen dar. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Auch nahmen die Änderungen des Kurzschlussstroms unter Kupferbedingungen deutlich ab. Eine Signifikanz war bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 10 $\mu$ M zu finden. Abbildung 20 zeigt einen beispielhaften Kurvenverlauf der Beeinflussung durch Kupfer. In Abbildung 19 erkennt man, wie auch anhand der Werte in Tabelle 31 ersichtlich, dass bei 25 $\mu$ M Kupfer eine Umkehr der Amiloridreaktion stattgefunden hat. Jedoch reagierten nicht alle Versuche mit einem Anstieg. Das Zahlenverhältnis lag bei 4 Versuchen mit Anstieg zu 3 Versuchen mit Abfall. Die Reaktion auf Amilorid fiel bei den Versuchen mit einer Hemmung jedoch so gering, und bei den Versuchen mit einer Stimulierung so deutlich aus, dass im Mittel eine Steigung des  $I_{SC}$  resultierte.

#### V.14.2 Kupfer und Calcium

Der Einfluss von Kupfer auf die Calciumreaktion zeigte erst bei der höchsten verwendeten Konzentration von 50 $\mu$ M einen signifikanten Einfluss (siehe Abbildung 21). Tendenziell zeigte sich bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine Stimulation der Calciumreaktion.



**Abbildung 21 Einfluss von 50µM Cu auf die Calcium-Reaktion.** Das Auswaschen erfolgte stets mit reinem pw. Kupfer und Calcium wurden jeweils in pw gelöst und apikal perfundiert. Basolateral wurde ständig RR gegeben.

Die Reaktionen des Potentials waren jedoch eher diffus. Die Unterschiede der Deltawerte des Widerstands, bezogen auf die Calciumreaktion unter normalen Bedingungen und auf die Reaktionen unter Kupferbedingungen, wurden mit zunehmender Konzentration geringer, jedoch bei keiner Konzentration signifikant (siehe Tabelle 32).

**Tabelle 32** Veränderte Calciumreaktionen unter dem Einfluss von Kupfer.

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Kupfer	normal	Kupfer	normal	Kupfer	
10 $\mu$ M	11,7	13,6	2,33	3,03	56	-3686	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,0	1,6	0,35	0,33	240	2832	
25 $\mu$ M	10,4	5,6	2,27	2,84	-85	-2140	5
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,1	1,8 *	0,36	0,86	256	741	
50 $\mu$ M	9,9	14,8	1,85	3,84	-373	-1890	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,6	3,1	0,18	0,51 *	632	545	

Calcium wurde in einer Konzentration von 2mM verabreicht. Mit „normal“ ist die Reaktion des Gewebes auf reines Calcium gemeint, „Kupfer“ stellt die Reaktion von Calcium unter Kupferbedingungen dar. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.14.3 Langzeitwirkung von Kupfer

Auch die Langzeitwirkung von 50 $\mu$ M und 100 $\mu$ M Kupfer auf das Epithel wurde getestet. Die Perfundierung erfolgte teilweise bis zu 4 Stunden. Unter 50 $\mu$ M Kupfer zeigte sich eine signifikante Reaktion beim  $I_{SC}$ , unter 100 $\mu$ M Kupfer eine signifikante Reaktion beim  $R_T$  (siehe Tabelle 33).

**Tabelle 33** Langzeiteinfluss von Kupfer auf  $U_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$ .

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	
50 $\mu$ M	-6,6	-13,2	-0,74	-8,28	12850	1641	3
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,9	2,2	0,22	1,43 *	4263	59	
100 $\mu$ M	-1,7	-2,1	-0,48	-0,6	3564	-1722	4
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,7	3,8	1,15	1,7	444	498 *	

Kupfer wurde apikal in pw perfundiert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.15 Nickel

Nickel hatte in allen verwendeten Konzentrationen eine signifikante Wirkung auf das Epithel. Dabei sanken, wie in Tabelle 34 angegeben,  $U_T$  und  $I_{SC}$  durchgängig ab und  $R_T$  stieg jeweils

an. Eine Abhängigkeit zwischen Hemmung bzw. Stimulation und Konzentration konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

**Tabelle 34 Reaktionen des Gewebes aus unterschiedliche Konzentrationen von Nickel.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
100 $\mu M$	-3,3	-11,7	-0,44	-1,27	9423	11428	12
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,5	2,2 *	0,37	0,29 *	1096	1278 *	
250 $\mu M$	4,7	-5,6	0,42	-0,72	8595	11834	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,9	1,6 *	0,44	0,24 *	974	1804 *	
500 $\mu M$	-1,9	-9,2	-0,17	-0,80	9077	13261	14
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,8	1,3 *	0,24	0,13 *	1013	1408 *	
1000 $\mu M$	-2,4	-13,0	-0,04	-0,89	11635	16723	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,2	2,5 *	0,32	0,15 *	2397	2487 *	

Nickel wurde apikal in pw appliziert. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.15.1 Nickel und Amilorid

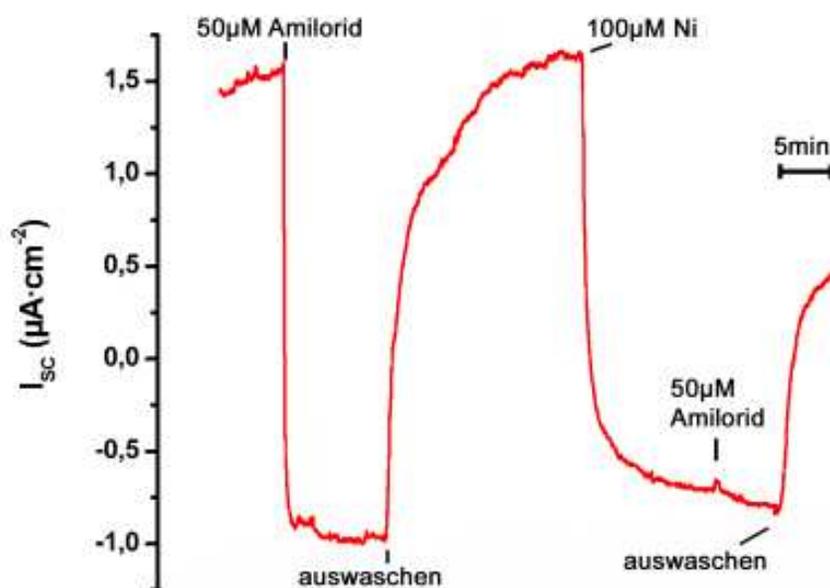
Nickel zeigte einen enormen Einfluss auf die Amiloridreaktion des Gewebes. Es hemmte bereits bei 100 $\mu M$  die Reaktion von  $U_T$  und  $I_{SC}$  signifikant. Bei 500 $\mu M$  veränderte es sogar die Reaktionsrichtung der Gewebeantwort auf 50 $\mu M$  Amilorid. Betrag dort die Änderung in  $I_{SC}$  unter normalen Bedingungen  $-0,88 \pm 0,16 \mu A$ , so wechselte sie unter der Anwesenheit von 500 $\mu M$  Nickel auf  $0,01 \pm 0,01 \mu A$ . Bei dieser Konzentration fand auch eine signifikante Hemmung der Amiloridantwort bezogen auf  $R_T$  statt (siehe Tabelle 35).

**Tabelle 35 Wirkung von Nickel auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Nickel	normal	Nickel	normal	Nickel	
100 $\mu$ M	-12,5	-1,3	-1,33	-0,09	2008	307	4
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,1	0,5 *	0,37	0,05 *	574	194	
500 $\mu$ M	-10,8	-0,2	-0,88	0,01	2117	320	4
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,9	0,2 *	0,16	0,01 *	373	184 *	

Unter „normal“ versteht sich die Reaktion des Epithels auf 50 $\mu$ M Amilorid in reinem pw. „Nickel“ kennzeichnet die Reaktion von Amilorid unter Anwesenheit der entsprechenden Nickelkonzentration. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Deutlich sieht man die erwähnte Umkehrung der Reaktionsrichtung auf 50 $\mu$ M Amilorid anhand von Abbildung 22 für 100 $\mu$ M Nickel und von Abbildung 23 für 500 $\mu$ M Nickel.

**Abbildung 22 Beispielhafter Kurvenverlauf der Wirkung von 100 $\mu$ M Nickel auf die Amiloridreaktion.**

Auswaschen erfolgte mit reinem pw. Basolateral wurde permanent RR perfundiert.

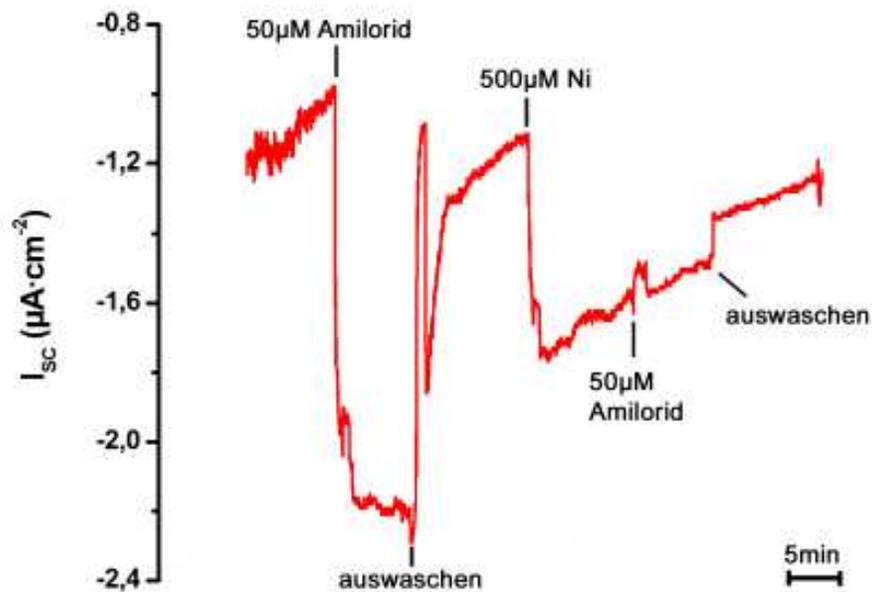


Abbildung 23 500  $\mu M$  Nickel verändert die Reaktion von 50  $\mu M$  Amilorid. Alle Chemikalien wurden apikal in pw verabreicht. Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt.

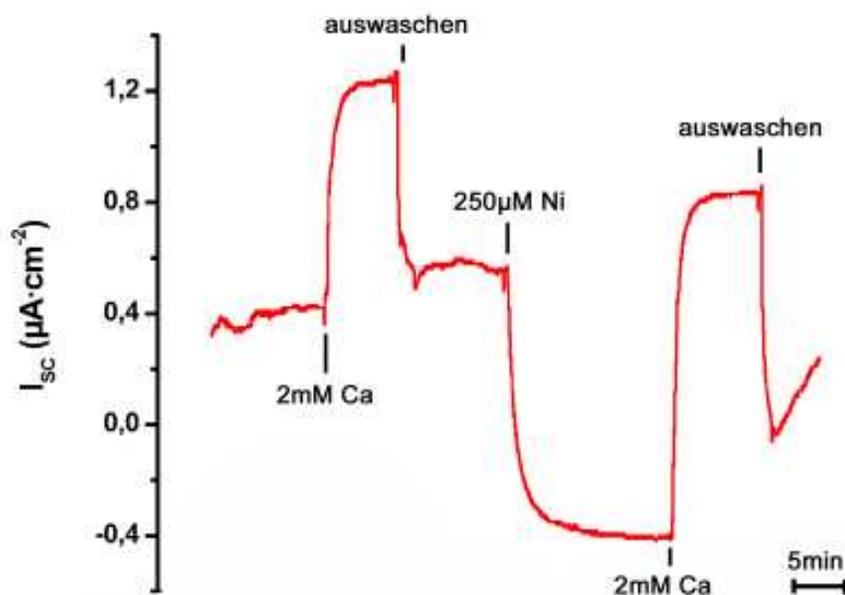
### V.15.2 Nickel und Calcium

Ebenso wie auf Amilorid zeigte Nickel eine deutliche Wirkung auf die Calciumreaktion. Schon in geringen Konzentrationen stimulierte 100  $\mu M$  Nickel die Antwort des Epithels auf 2mM  $Ca^{2+}$  signifikant. Eine deutliche Wirkung in  $I_{sc}$  erkannte man ab 250  $\mu M$  Nickel. Interessanter Weise ist dort zu beobachten, dass zu Beginn eine Stimulation der Calciumreaktion statt fand, jedoch bei 1000  $\mu M$  Nickel eine Hemmung dieser auftrat (siehe Tabelle 36).

**Tabelle 36 Einfluss von unterschiedlichen Nickelkonzentrationen auf die Gewebereaktion auf 2mM Ca<sup>2+</sup>.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Nickel	normal	Nickel	normal	Nickel	
100 $\mu M$	10,5	14,6	1,31	1,53	1430	-698	8
	$\pm$ 0,4	$\pm$ 1,2 *	$\pm$ 0,20	$\pm$ 0,33	$\pm$ 1059	$\pm$ 510	
250 $\mu M$	8,5	15,5	1,20	1,68	-1655	-1913	8
	$\pm$ 1,1	$\pm$ 0,4 *	$\pm$ 0,26	$\pm$ 0,20 *	$\pm$ 1307	$\pm$ 561	
500 $\mu M$	13,4	16,4	1,83	1,93	-828	-2027	10
	$\pm$ 1,6	$\pm$ 1,3 *	$\pm$ 0,24	$\pm$ 0,24 *	$\pm$ 253	$\pm$ 726 *	
1000 $\mu M$	12,9	15,8	1,70	1,27	-2244	-2195	6
	$\pm$ 1,8	$\pm$ 1,5	$\pm$ 0,31	$\pm$ 0,22 *	$\pm$ 2013	$\pm$ 1976	

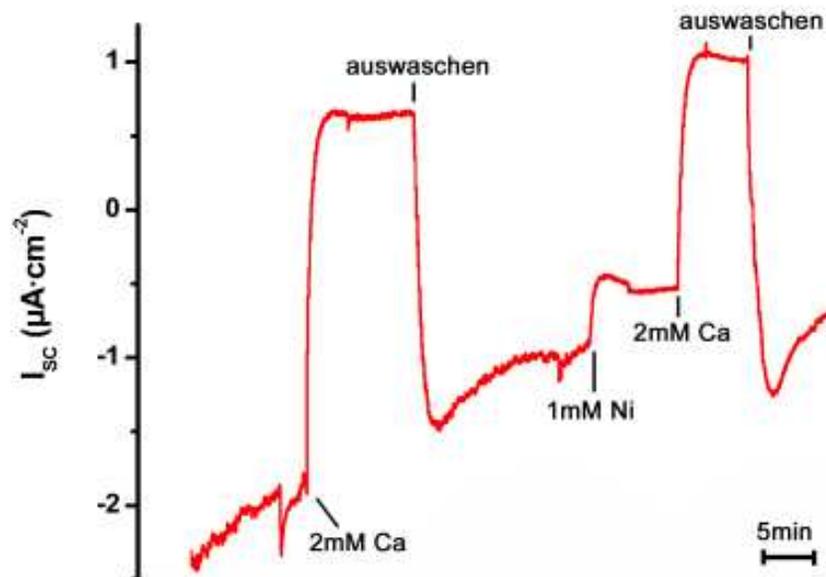
„normal“ stellt die Reaktion von 2mM Ca<sup>2+</sup> auf das Epithel dar. „Nickel“ beschreibt die Antwort des Gewebes auf Calcium unter Anwesenheit von der entsprechenden Nickelkonzentration. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$



**Abbildung 24** Veränderte Calciumreaktion unter 250 $\mu M$  Nickel. Nickel verursacht hier eine Stimulation der Calciumreaktion. Basolateral wurde permanent RR zugeführt.

Im direkten Vergleich der Abbildung 24 mit Abbildung 25 zeigt sich der unterschiedliche Einfluss von Nickel auf die Calciumreaktion. Abbildung 25 weist jedoch eine selten auftre-

tende Reaktion auf Nickel auf. Die Grafik wurde lediglich als Exempel für die Wirkung auf den Calciumtransport ausgewählt.



**Abbildung 25** Auswirkung von 1mM Nickel auf die Calciumreaktion. Hier erkennt man die Hemmung, die 1mM Nickel auf die Reaktion von 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  zeigt. Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt.

## V.16 Quecksilber

Quecksilber zeigte erst mit zunehmender Konzentration eine signifikante Reaktion in allen 3 Parametern.  $U_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$  fielen bei  $20\mu\text{M Hg}^{2+}$  signifikant ab (siehe Tabelle 37). Im Strom fand man jedoch bereits bei  $10\mu\text{M}$  Quecksilber einen deutlichen Abfall. Abbildung 26 zeigt schön den doch starken Einfluss von Quecksilber auf das Gewebe, wo, nach Zugabe von  $20\mu\text{M}$  Quecksilber, der Strom unregelmäßig zu schwanken begann. Anhand der Werte kann man auch eine Dosisabhängigkeit vermuten, da die Reaktionsstärke (inhibierter Strom) mit steigender Konzentration zunahm.

**Tabelle 37 Reaktionen unterschiedlicher Quecksilberkonzentrationen auf  $U_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$ .**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
5 $\mu M$	-0,2 $\pm$ 1,8	-1,1 $\pm$ 1,3	-0,18 $\pm$ 0,23	-0,18 $\pm$ 0,20	9359 $\pm$ 2135	9606 $\pm$ 2363 *	9
10 $\mu M$	-5,7 $\pm$ 2,2	-8,6 $\pm$ 2,6	-0,67 $\pm$ 0,25	-1,72 $\pm$ 0,52 *	10100 $\pm$ 1177	9475 $\pm$ 1351	17
20 $\mu M$	0,0 $\pm$ 2,6	-13,6 $\pm$ 4,8 *	0,13 $\pm$ 0,30	-2,83 $\pm$ 0,93 *	9856 $\pm$ 1584	5828 $\pm$ 729 *	10

Quecksilber wurde in pw gelöst auf das Gewebe gegeben. Basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt.

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.16.1 Quecksilber und Amilorid

Anders als bei seiner Wirkung auf das Gewebe zeigte Quecksilber schon bei niedriger Konzentration eine deutliche Wirkung auf die Amiloridantwort. So waren 5 $\mu M$  und 10 $\mu M$  Quecksilber in der Lage, die Reaktion von  $U_T$  und  $I_{SC}$  deutlich zu hemmen. Bei einer Konzentration von 20 $\mu M$  Quecksilber kehrte sich sogar die Reaktionsrichtung um. So veränderte sich das Absinken von  $U_T$  um  $3,7 \pm 1,1$  mV zu einem Anstieg von  $2,4 \pm 1,8$  mV. Auch wandelte sich die Hemmung von  $I_{SC}$  von  $-0,40 \pm 0,21 \mu A$  zu einer Stimulation von  $0,31 \pm 0,25 \mu A$ .

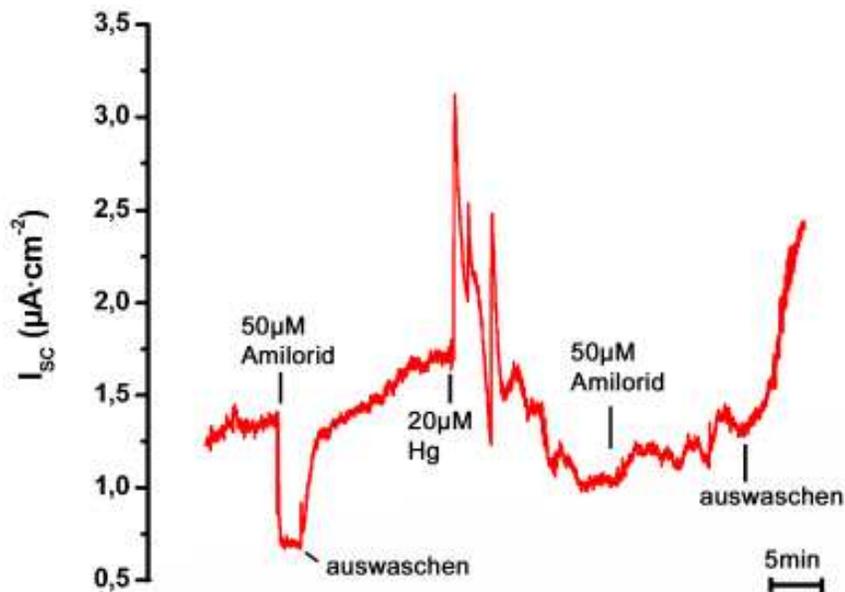
**Tabelle 38 Auswirkung von Quecksilber auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Quecksilber	normal	Quecksilber	normal	Quecksilber	
5 $\mu M$	-4,5 $\pm$ 1,2	-1,9 $\pm$ 1,1 *	-0,68 $\pm$ 0,15	-0,17 $\pm$ 0,23 *	1107 $\pm$ 488	-3362 $\pm$ 2486	5
10 $\mu M$	-6,4 $\pm$ 1,3	-2,0 $\pm$ 0,7 *	-0,57 $\pm$ 0,12	-0,20 $\pm$ 0,08 *	1030 $\pm$ 230	17 $\pm$ 203 *	6
20 $\mu M$	-3,7 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 1,8	-0,40 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,25 *	1376 $\pm$ 823	-99 $\pm$ 352	4

Amilorid wurde in einer Konzentration von 50 $\mu M$  Appliziert. Dabei erfolgte die Perfundierung unter „normal“-Bedingungen in reinem pw und unter „Quecksilber“-Bedingungen in pw und der jeweiligen Quecksilberkonzentration. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

In Tabelle 38 findet man die ermittelten  $\Delta$ -Werte dieser Reaktionen. Dort ist auch ersichtlich, dass  $R_T$  kein einheitliches Verhalten zeigte. Die signifikante Reaktion bei  $10\mu\text{M}$  Quecksilber ist daher unter Vorbehalt zu sehen.

Abbildung 26 zeigt das Phänomen der umgekehrten Amiloridreaktion. Dort ist auch zu sehen, dass nach dem letzten Auswaschen der Strom auf ein höheres Niveau als zu Beginn der Hg-Gabe anstieg.



**Abbildung 26** Unterschiedliche Reaktionen von  $50\mu\text{M}$  Amilorid ohne und mit  $20\mu\text{M}$  Quecksilber. Das Auswaschen erfolgte stets mit reinem pw und basolateral wurde konstant RR perfundiert.

### V.16.2 Quecksilber und Calcium

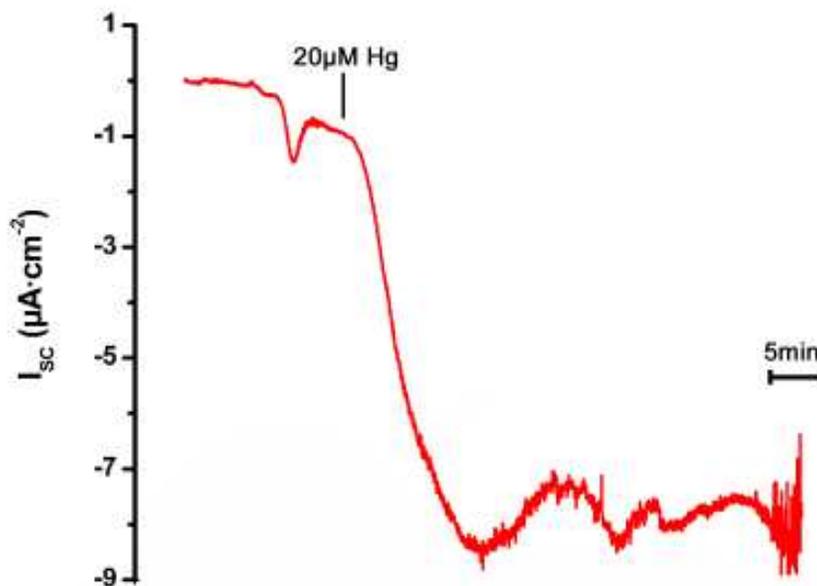
Die Reaktion des Gewebes auf  $2\text{mM}$  Ca wurde, im Gegensatz zu der Reaktion auf Amilorid, nicht durch Quecksilber beeinflusst. Zwar fand sich bei  $20\mu\text{M}$  Quecksilber eine Stimulation der Calciumreaktion von  $10,0\pm 1,6$  auf  $14,5\pm 1,1\text{mV}$ , bei allen anderen Parametern war jedoch bei keiner Konzentration eine Signifikanz festzustellen (siehe Tabelle 39). Zwar fand sich in  $I_{\text{SC}}$  tendenziell die gleiche Art Veränderung der Reaktion wie bei Amilorid, so dass z.B.  $5\mu\text{M}$  und  $10\mu\text{M}$  Quecksilber die Calciumreaktion stimulierten und  $20\mu\text{M}$  Quecksilber diese hemmten, jedoch waren keine dieser Wert signifikant.

**Tabelle 39** Veränderte Calciumreaktion unter verschiedenen Quecksilberkonzentrationen.

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Quecksilber	normal	Quecksilber	normal	Quecksilber	
5 $\mu$ M	9,7	8,5	1,14	1,36	-5005	-3110	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,1	1,2	0,29	0,29	3115	1205	
10 $\mu$ M	9,6	9,8	1,17	1,37	13	-286	11
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,2	2,4	0,13	0,38	754	980	
20 $\mu$ M	10,0	14,5	0,90	0,71	-1178	-1595	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,6	1,1 *	0,13	0,57	728	309	

„Normal“ kennzeichnet die Bedingungen in reinem pw. Unter „Quecksilber“ versteht man die Perfundierung von 2mM Calcium in pw und Quecksilber. Basolateral wurde ständig RR verabreicht. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.16.3 Langzeitwirkung von Quecksilber



**Abbildung 27** Beispiel für die Langzeitwirkung von 20 $\mu$ M Quecksilber. Die Messung wurde abgebrochen, da der Strom gegen Ende hin nicht mehr messbar war. Basolateral wurde RR perfundiert.

Gab man 20 $\mu$ M Quecksilber, ohne vorher mit 50 $\mu$ M Amilorid perfundiert zu haben, auf das Epithel, so fiel auf, dass das „Zittern“ in der Kurve erst später auftrat (siehe Abbildung 27).

Nach dem Einsetzen der Perfundierung fielen Potential, Strom und Widerstand massiv ab. Die vorher-/nachher-Werte sind Tabelle 40 zu entnehmen. Nach dem Abfallen fand ein Oszillieren um einen Mittelwert statt. Gegen Ende hin setzte jedoch das bereits bekannte „Zittern“ ein, welches auch zum Abbruch des Versuchs führte, da die Werte nicht mehr zu ermitteln waren.

**Tabelle 40 Langzeiteinfluss von 20 $\mu$ M Quecksilber auf das Gewebe.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
20 $\mu$ M	-2,8 $\pm$ 1,4	-13,4 $\pm$ 4,8	-1,13 $\pm$ 0,42	-8,14 $\pm$ 0,86 *	4956 $\pm$ 1627	1818 $\pm$ 606	4

Quecksilber wurde in reinem pw apikal verabreicht während basolateral permanent RR zugeführt wurde.

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## V.17 Zink

Bereits auf geringe Konzentrationen von Zink zeigte das Epithel eine signifikante Reaktion, wie in Tabelle 41 ersichtlich ist. So fielen  $U_T$  und  $I_{SC}$  ab. Abbildung 28 zeigt zwar einen Anstieg des  $I_{SC}$ , wobei dieser Versuch jedoch einen Ausreißer darstellt und nur wegen der deutlichen Amiloridreaktion verwendet wurde. Schon bei 10 $\mu$ M Zink fiel  $I_{SC}$  von  $-0,47 \pm 0,38$  auf  $-0,73 \pm 0,32 \mu A$  ab. Auch  $U_T$  zeigte eine deutliche Reaktion, wobei der Wert von  $0,4 \pm 2,1$  auf  $-2,4 \pm 1,9 mV$  abfiel.  $R_T$ , im Gegensatz, steigt bei allen 3 verwendeten Konzentrationen an. Bei 10 $\mu$ M Zink kletterte der Wert von  $8141 \pm 1419$  auf  $10203 \pm 1931 \Omega$ .

**Tabelle 41 Reaktionen des Epithels auf unterschiedliche Konzentrationen von Zink.**

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
10 $\mu$ M	0,4	-2,4	-0,47	-0,73	8141	10203	13
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,1	1,9 *	0,38	0,32 *	1419	1931 *	
20 $\mu$ M	4,2	-1,4	0,59	-0,03	11181	13039	14
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	3,9	3,1 *	0,45	0,34 *	1146	1344 *	
50 $\mu$ M	0,5	-5,5	0,31	-0,52	8469	10488	20
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,5	2,0 *	0,40	0,17 *	961	940 *	

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.17.1 Zink und Amilorid

Der Einfluss von Zink auf die Amiloridreaktion des Gewebes nahm erst mit steigender Konzentration zu. Im direkten Vergleich von Abbildung 28 und Abbildung 29 erkennt man deutlich, dass erst beim Einsatz von 20 $\mu$ M Zink eine Wirkung von Zink auf die Antwort des Gewebes auf 50 $\mu$ M Amilorid eintrat. Erst dann hemmte Zink  $U_T$  und  $I_{SC}$ , wohingegen  $R_T$  erst bei 50 $\mu$ M Zink beeinflusst wurde.

**Tabelle 42 Wirkung von Zink in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Amiloridreaktion.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Zink	normal	Zink	normal	Zink	
10 $\mu$ M	-8,7	-8,7	-0,75	-0,67	2372	1222	5
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,6	3,6	0,10	0,13	975	463	
20 $\mu$ M	-16,1	-12,0	-1,26	-0,93	4432	5715	6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	2,3	2,5 *	0,22	0,21 *	1058	1886	
50 $\mu$ M	-7,3	-2,3	-0,85	-0,18	1333	425	12
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,8	0,6 *	0,28	0,06 *	469	323 *	

„normal“ bezeichnet die Reaktion des Gewebes auf 50 $\mu$ M Amilorid. „Zink“ kennzeichnet die Reaktion von Amilorid unter Anwesenheit der jeweiligen Konzentration von Zink. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Tabelle 42 zeigt die ermittelten  $\Delta$ -Werte aller drei Parameter. Man erkennt, dass Zink, bei ermittelter Signifikanz, alle drei Parameter hemmt und keinen von ihnen stimuliert.

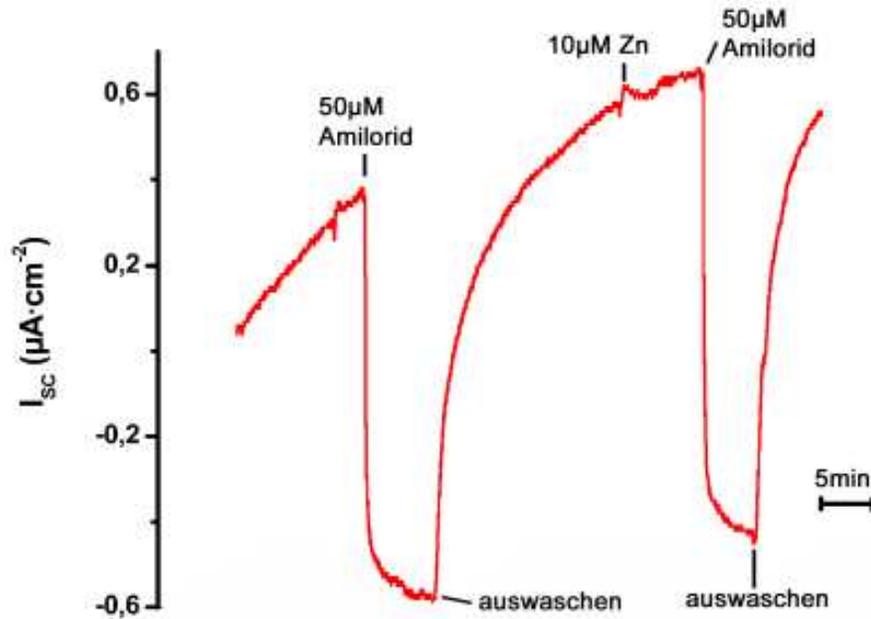


Abbildung 28 Beispielhafter Verlauf einer Amiloridreaktion mit und ohne 10  $\mu M$  Zn. Alle Lösungen wurde mit pw perfundiert. Basolateral befand sich ständig RR.

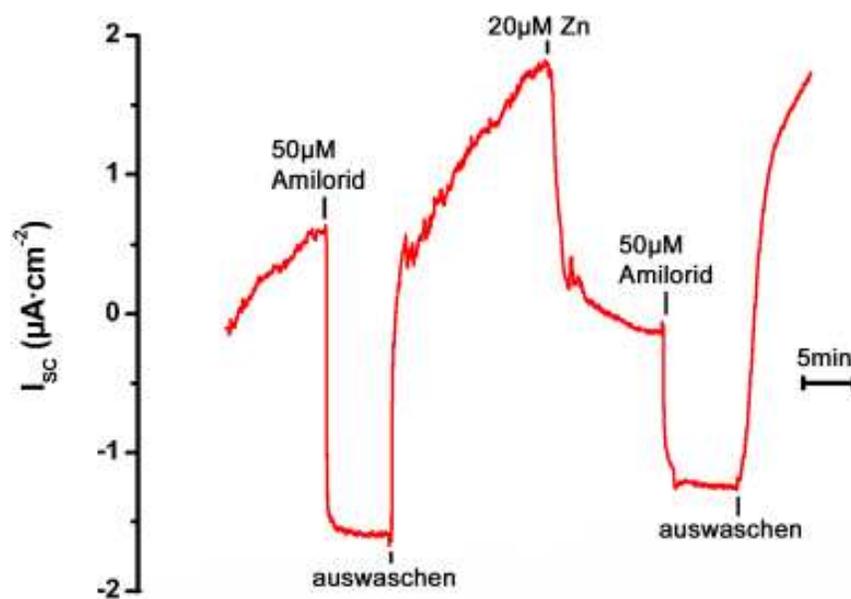


Abbildung 29 Auswirkung von 20  $\mu M$  Zink auf die Reaktion von 50  $\mu M$  Amilorid. Ausgewaschen wurde mit reinem pw und basolateral fand eine Perfundierung mit RR statt.

### V.17.2 Zink und Calcium

Alle verwendeten Konzentrationen von Zink hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion des Epithels auf 2mM Calcium. Wie in Tabelle 43 erkennbar, blieb die Antwort auf Calcium gänzlich unbeeinflusst. Lediglich  $R_T$  zeigte bei einer Konzentration von 20 $\mu$ M Zink eine signifikante Reaktion an. Zwar sind Tendenzen für eine Stimulation der Calciumreaktion auch bei 10 $\mu$ M und 50 $\mu$ M Zink zu erkennen, allerdings sind diese Werte als Abweichung zu betrachten.

**Tabelle 43 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Reaktion von  $Ca^{2+}$ .**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	normal	Zink	normal	Zink	normal	Zink	
10 $\mu$ M	8,4	9,3	1,73	1,70	-437	-1125	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	0,7	0,8	0,48	0,43	381	698	
20 $\mu$ M	10,7	11,5	1,09	1,20	-264	-2168	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,8	2,7	0,22	0,17	271	557 *	
50 $\mu$ M	8,7	12,4	0,99	1,27	-251	-1318	8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	
	1,0	1,2	0,14	0,22	345	283	

„normal“ kennzeichnet die Reaktion von 50 $\mu$ M Amilorid in reinem pw. „Zink“ hingegen unter gleichzeitiger Gabe von Zink. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.17.3 Regenwurmring unter Zink

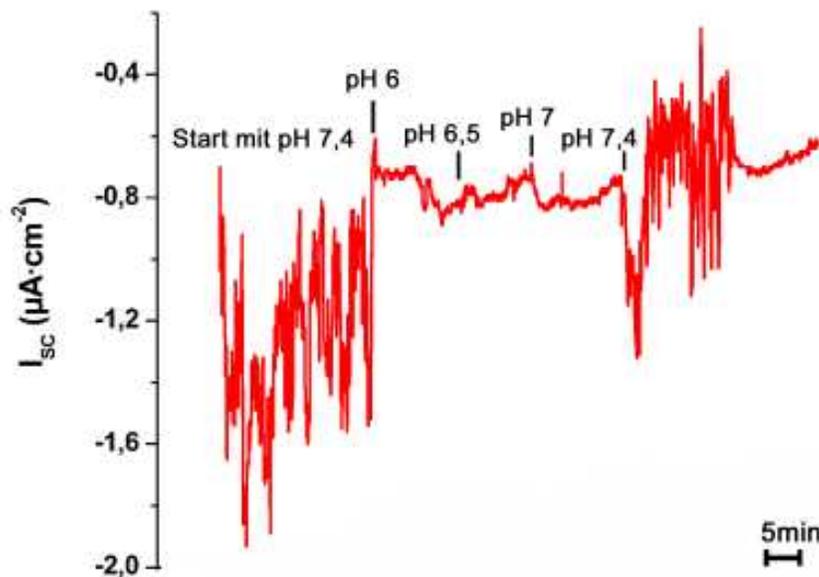
Zink steht im Verdacht, die Selbstinhibition des ENaCs herabzusetzen (Sheng, Perry et al. 2004). Um diese Vermutung zu testen, wurden 2 unterschiedliche Versuchsabläufe konzipiert. Beim ersten Versuch wurde zunächst unter pw-Bedingungen 10 $\mu$ M Zink perfundiert. Nach anschließendem Auswaschen wurden die apikalen Bedingungen auf RR geändert. Nun fand eine Perfundierung von 10 $\mu$ M Zink unter RR statt. Weder unter pw- noch unter RR-Bedingungen kam es dabei zu einer signifikanten Reaktion.

Der zweite Versuch wurde mit „vertauschten Rollen“ durchgeführt. Als erste Maßnahme fand, nach Einpendelung mit pw, eine Perfundierung mit RR statt. Dieses wurde wieder ausgewaschen und daraufhin 20 $\mu$ M Zink gegeben. Nun fand eine Gabe von RR unter Anwesenheit von Zink statt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Reaktionen.

## V.18 pH-Wert

Zu Beginn der Untersuchungen am Regenwurmepithel wurde pw mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. Da nun öfters starke Unruhe in den Kurven auftauchte, fand eine Testreihe mit unterschiedlichen pH-Werten statt. Zum Einsatz kam pw mit den pH-Werten 6, 6,5, 7, 7,4 und 8. Der pH-Wert von RR wurde nicht verändert, da dieser durch physiologische und chemische Untersuchungen des Regenwurmbldes durch Cornell ermittelt wurde (Cornell 1982). RR stellt eine physiologische Ringerlösung dar, die die Eigenschaften des Blutes von *Lumbricus terrestris* besitzen soll. Da der Wurm den pH-Wert seines inneren Milieus konstant hält, würde es keinen Sinn machen, in den Versuchen RR unterschiedlicher pH-Werte einzusetzen. Zwar könnte dies zu Versuchszwecken geschehen, jedoch würde es nicht die nativen Bedingungen des Regenwurms widerspiegeln.

Abbildung 30 zeigt einen charakteristischen Kurvenverlauf des  $I_{SC}$  bei einem pH-Wert-Versuch. Man erkennt deutlich, dass ausgerechnet bei einem pH-Wert des pw von 7,4 ein unruhiges Zucken der Kurve zu beobachten ist. Bei den anderen verwendeten pH-Werten blieb dies jedoch aus.



**Abbildung 30** Charakteristischer Kurvenverlauf einer pH-Wert-Meßreihe. Eingesetzt wurde pw mit unterschiedlichen pH-Werten, während basolateral RR perfundiert wurde.

### V.18.1 Wechsel von pH 6 nach pH 8 und vv.

Abbildung 30 zeigt leichte Veränderungen im Strom, die bei einem Wechsel des pH-Werts auftraten. Um dies nun deutlicher zu untersuchen, wurden Experimente mit einem größeren Wechsel des pH-Werts durchgeführt. Dabei kam pw mit einem pH-Wert von 6 und 8 zum Einsatz. Wie in Tabelle 44 aufgeführt, zeigte das Gewebe eine signifikante Reaktion auf den Wechsel von pH 6 nach pH 8. Alle drei Parameter sanken dabei deutlich ab.  $U_T$  fiel von  $-10,5 \pm 1,5$  auf  $-12,1 \pm 1,7$  mV,  $I_{SC}$  von  $-0,79 \pm 0,14$  auf  $-0,95 \pm 0,15$   $\mu\text{A}$  und  $R_T$  von  $17461 \pm 1950$  auf  $16814 \pm 1921 \Omega$ .

Tabelle 44 Wechsel von pH 6 nach pH 8.

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
pH6 → pH8	-10,5 ± 1,5	-12,1 ± 1,7 *	-0,79 ± 0,14	-0,95 ± 0,15 *	17461 ± 1950	16814 ± 1921 *	10

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

Auch beim Wechsel von pH 8 nach pH 6 zeigte das Epithel eine deutliche Reaktion. Zwar änderte sich  $U_T$  nicht signifikant, jedoch stiegen  $I_{SC}$  von  $-0,61 \pm 0,11$  auf  $-0,42 \pm 0,10$   $\mu\text{A}$  und  $R_T$  von  $14988 \pm 1769$  auf  $16109 \pm 1867 \Omega$  (siehe Tabelle 45). Man erkennt, dass diese Reaktionsrichtung entgegengesetzt der vom Wechsel pH6 auf pH8 ist.

Tabelle 45 Reaktionen der drei Parameter auf den Wechsel von pH 8 nach pH 6.

	$U_T$ (mV)		$I_{SC}$ ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )		$R_T$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )		Anzahl
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
pH8 → pH6	-6,9 ± 1,8	-5,5 ± 1,9	-0,61 ± 0,11	-0,42 ± 0,10 *	14988 ± 1769	16109 ± 1867 *	8

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

### V.18.2 pH-Wert und Amilorid

Um nun den Einfluss des pH-Wertes auf die Amiloridreaktion zu testen, wurde  $50 \mu\text{M}$  Amilorid unter pH 6 und pH 8 gegeben. Trotz der signifikanten Reaktionen auf den pH-Wert-Wechsel, zeigte der pH-Wert keinen Einfluss auf die Amiloridantwort des Epithels. Wie

Tabelle 46 und Tabelle 47 zu entnehmen ist, änderte sich keiner der drei Parameter signifikant. Tendenziell ließe sich eine Hemmung beim Vergleich pH 6 → pH 8 vermuten und eine Stimulierung beim Vergleich pH 8 → pH 6. Diese Aussage wäre jedoch sehr spekulativ, da die Werte sich sehr gering unterscheiden.

**Tabelle 46 Reaktion von Amilorid unter pH 6 und pH 8.**

	$\Delta U_T$ (mV)		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	pH6	pH8	pH6	pH8	pH6	pH8	
50 $\mu$ M Amilorid	-4,7 ± 1,2	-4,5 ± 1,2	-0,32 ± 0,11	-0,31 ± 0,10	698 ± 314	557 ± 323	10

Zuerst wurden 50 $\mu$ M Amilorid unter pH 6 perfundiert. Anschließend fand eine Gabe bei pH 8 statt.

\*=signifikant,  $p \leq 0,05$

**Tabelle 47 Unterschiedliche Reaktion von Amilorid unter pH 8 und pH 6.**

	$\Delta U_T$ (mV $\cdot cm^{-2}$ )		$\Delta I_{SC}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )		$\Delta R_T$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )		Anzahl
	pH8	pH6	pH8	pH6	pH8	pH6	
50 $\mu$ M Amilorid	-6,2 ± 2,1	-9,2 ± 3,2	-0,40 ± 0,16	-0,45 ± 0,21	1556 ± 400	795 ± 452	8

Die Reaktion von 50 $\mu$ M Amilorid unter pH 8 und anschließend unter pH 6. \*=signifikant,  $p \leq 0,05$

## VI Diskussion

### VI.1 Das Regenwurmepithel

Epithelien sind Gewebe, die aus allen drei Keimblättern stammen und die inneren und äußeren Oberflächen eines Organismus auskleiden. Aus dem Griechischen hergeleitet heißt „epi“ über und „thele“ Brustwarze. Diese Gewebe bestehen aus polarisierten Zellen, die auf der basolateralen Seite mit einer Basalmembran verbunden sind.

Das Epithelgewebe lässt sich immunhistochemisch über den Nachweis von Zytokeratinen als Intermediärfilamente von anderen Grundgeweben abgrenzen.

Epithelien haben vielfältige Aufgaben. Maßgeblich dienen sie als Schutz vor mechanischer Schädigung und vor Wasserverlust durch Verdunstung. Sie verhindern das Eindringen von Mikroorganismen und dienen der Wahrnehmung von Reizen. Eine weitere, sehr wichtige, Aufgabe besteht in der Steuerung des Stoffwechsels über die Oberfläche des Organismus, indem sie die Resorption und die Sekretion regulieren. Die Einteilung der Epithelien erfolgt nach der Anzahl der Zellschichten, die von einschichtig über mehrreihig (mehrere Schichten von Zellen, die jedoch alle in Kontakt mit der Basalmembran stehen) bis hin zu mehrschichtig reichen können. Auch die Form der Zellen der oberflächlichen Schicht spielt eine Rolle, die flach, prismatisch oder hochprismatisch/zylindrisch sein kann:

1) Einschichtiges Plattenepithel

Z.B.: seröse Häute, Endothel von Herz, Blut- und Lymphgefäßen (cave: im eigentlichen Sinne kein Epithelgewebe), hinteres Hornhautepithel

2) Einschichtiges, hochprismatisches Epithel

Z.B.: Magen, Dünn- und Dickdarm, Gallenblase, Eileiter (Tuba uterina), Uterus

3) Zweireihiges Epithel

Z.B.: Ausführungsgänge der großen Speicheldrüsen der Mundhöhle, Tränen-Nasen-Gang (Ductus nasolacrimalis), Nebenhodengang (Ductus epididymidis), Samenleiter (Ductus deferens)

4) Mehrreihiges, hochprismatisches Epithel

Z.B.: Nasenhöhle außer Regio olfactoria, Epipharynx, Kehlkopf (Larynx) außer den Stimmlippen (Plica vocalis), Trachea und Bronchialbaum, männliche Harnröhre (Urethra), Tuba auditiva

5) Übergangsepithel (Urothel), besondere Form des mehrreihigen Epithels, welche Hohlorgane mit veränderlicher Ausdehnung auskleidet

Z.B.: Nierenbecken, Harnleiter (Ureter), Harnblase, Anfangsteil der Urethra → besondere Deckzellen (harnsichere Zellen), oft mehrkernig, weisen oberflächliche Zytoplasmaverdichtungen auf, schützen empfindlichere Gewebe

6) Mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel

Z.B.: Vorderes Hornhautepithel, Plica vocalis, Mundhöhle, Pharynx (außer Epipharynx), Ösophagus, After, Vagina, Endteil der weiblichen Urethra

7) Mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel

Z.B.: Epidermis, Nasenvorhof, äußerer Gehörgang (Meatus acusticus externus), Zahnfleisch (Gingiva), parakeratinisiert, Papillae filiformes

Seitlich stehen die Epithelzellen mit anderen Zellen über Zellkontakte wie z.B. gap junctions oder tight junctions in Verbindung. Das Epithel des Regenwurminteguments weist drei spezielle Arten von intercellular junctions auf. Diese sind maßgeblich mitverantwortlich für das Absorptionsverhalten dieses Gewebes und beeinflussen auch direkt den parazellulären Widerstand:

- 1) Zonula adhaerens: In der Epidermis des Regenwurms nur ca.  $\frac{1}{3}$  so tief wie im Darm (~ 300 bis 500Å im Vergleich zu 1µ).
- 2) Desmosomen: Die Desmosomen finden sich vom apikalen bis basolateralen Ende der Zellen.
- 3) Septate intercellular junctions: Diese Zell-Zell-Verbindungen befinden sich zahlreich unter der Zonula adhaerens am apikalen Ende der Zellen. Sie bilden Balken, die den interzellulären Spalt durchziehen.

Die tight junctions bedingen die Durchlässigkeit zwischen den Zellen und lassen eine Einteilung in „leaky“ (durchlässig) oder „tight“ (undurchlässig) zu.

## VI.2 Der epitheliale Natrium-Kanal

Das von Koefoed-Johnson und Ussing 1958 beschriebene Modell des elektrogenen Natriumtransports sieht als treibende Kraft eine Natrium-Kalium-Pumpe in der basolateralen Membran einer Zelle, wie z.B. einer Epithelzelle (Koefoed-Johnson and Ussing 1958). Diese Pumpe, welche zu den P-Typ-ATPasen gehört, befördert durch Hydrolyse permanent Natrium aus der Zelle. Gleichzeitig schaufelt sie jedoch Kalium in die Zelle hinein. Da dadurch die intrazelluläre Kaliumkonzentration über der extrazellulären liegt, strömt Kalium passiv durch Kaliumkanäle wieder aus der Zelle aus. Die Natriumkonzentration hingegen sinkt in

der Zelle durch die Transportvorgänge der ATPase ab. Dieser Verlust wird ausgeglichen, indem Natrium entlang des Konzentrationsgradienten von außen in die Zelle zurückströmt. Dies erfolgt durch apikal in der Membran befindliche, spezielle Natriumkanäle, die ENaCs. Diese Kanäle wurden erstmals 1951 von Hans Ussing beschrieben (Ussing and Zerahn 1951). Neben  $\text{Na}^+$  kann auch noch  $\text{Li}^+$  den Kanal passieren. Andere monovalente Ionen werden jedoch nicht hindurch gelassen.

Eine Störung des Natriumhaushaltes der Zelle geht einher mit schweren Erkrankungen beim Menschen:

- Cystische Fibrose

Bei cystischer Fibrose handelt es sich primär um eine Erkrankung der Atemwege, die jedoch weitreichendere Schäden im ganzen Körper verursacht. Daran beteiligt ist der „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR), der aufgrund einer Mutation zu erhöhter  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, und damit einhergehend einer verstärkten  $\text{Na}^+$ -Resorption, in der Lunge neigt. Dabei scheint es eine sehr enge Beziehung zwischen der Regulations des CFTRs und der Struktur des ENaCs zu geben, so dass bei der übersteigerten Aktivität des  $\text{Cl}^-$ -Kanals der inhibitorische Effekt auf den ENaC verloren geht (Clauss 1998).

Durch die verstärkte Resorption von  $\text{Na}^+$  verliert der Schleim, der das Lungenepithel bedeckt, Wasser. Das führt dazu, dass dieser schlechter abgehustet werden kann.

- Liddle-Syndrom

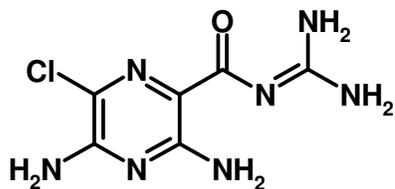
Das Liddle-Syndrom oder auch Pseudoaldosteronismus zeichnet sich durch funktionelle Mutationen des ENaCs der Niere aus. Diese Mutation führt zu einer übersteigerten Aktivität und ist eine erbliche Form arterieller Hypertonie, die mit Hypokaliämie einhergeht. Diese Form des Bluthochdrucks kennzeichnet ein niedriger Gehalt an Aldosteron und Renin im Blutplasma (Kellenberger and Schild 2002).

- Pseudohypoaldosteronismus

Pseudohypoaldosteronismus oder PHA-I beruht auf dem Verlust funktioneller Mutationen im ENaC. Auch diese Erkrankung tritt typischer Weise in der Niere auf und ist verbunden mit Hyponatriämie, Hypotension und Hyperkaliämie. Im Gegensatz zum Liddle-Syndrom findet man im Plasma hohe Konzentrationen an Aldosteron und Renin. Die Krankheit wird durch eine verminderte Aktivität oder Inaktivierung des ENaCs ausgelöst, was durch eine Mutation auf der Unterseite des Kanals verursacht wird (Kellenberger and Schild 2002).

1993/1994 gelangt erstmals die Klonierung des Kanals aus dem Rattencolon, welches die Exprimierung in *Xenopus laevis* Oocyten möglich machte (Canessa, Schild et al. 1994), (Lingueglia, Renard et al. 1993), (Lingueglia, Voilley et al. 1993). Daraus resultierte die Beschreibung des Kanals, der aus drei Untereinheiten (alpha, beta, gamma) besteht. Die einzelnen Untereinheiten sind zu 70% homolog und jede besteht aus ca. 680 Aminosäuren (Le and Saier 1996). Ihre Aminosäureketten haben zwei Membrandurchgänge und daraus resultierend zwei Transmembrandomänen (M1 und M2). Außerhalb der Zelle besitzen die Untereinheiten eine große Schleife und zwischen M1 und M2 eine kleinere P-Schleife. Das Amino- und das Carboxy-Ende der Kette liegen intrazellulär. Alle Untereinheiten zusammen bilden also in der Membran eine Pore. Das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Untereinheiten ist jedoch noch etwas im Unklaren. So wurde erst 2004 eine vierte Untereinheit ( $\delta$ ) bei Säugetieren entdeckt (Yamamura, Ugawa et al. 2004). Ein Modell mit zwei  $\alpha$ - und je einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit wird heute jedoch favorisiert (Sheng, Li et al. 2000).

Eng verbunden mit der Geschichte des ENaCs ist auch die des Amilorids (Abbildung 31). Amilorid wurde in den fünfziger Jahren entwickelt und wird meist in Kombination mit einem Thiazid-Diuretikum eingesetzt. Thiazid-Diuretika fördern die Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Chlorid in der Niere. Der Ausscheidung der Ionen folgt auch immer eine Ausscheidung von Wasser, was den diuretischen Effekt dieser Pharmaka bedingt. Amilorid als Partner-Pharmakon verhindert nun die Entfernung von Kalium aus dem Blut. Durch das Konstanthalten des Kaliumspiegels im Blut kann nun Muskelschwächen und Herzrhythmusstörungen entgegen gewirkt werden.



**Abbildung 31 Amilorid** N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamid

Amilorid hemmt die passive Natrium-Resorption, indem es mit den epithelialen Natriumkanälen interagiert. Dadurch entzieht es der Zelle und der basolateral sitzenden  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  das Natrium.

Mit Amilorid war es nun möglich, in vielen verschiedenen Geweben nach amiloridsensitiven Natriumkanälen zu suchen. Beschrieben wurden die Kanäle in unterschiedlichen Epithelien von Mensch und Säugetier. So fand man sie in der Niere (Almeida and Burg 1982), (Stanton 1989), (Frindt, Sackin et al. 1990) und im Colon (Amasheh, Epple et al. 2000), aber auch in den Atemwegen (Boucher and Gatzky 1983), (Blank 1996) und in Schweißdrüsen (Quinton 1981). Auch in Amphibien war der Kanal zu finden und wurde dort auch untersucht. So z.B. in der Haut (Ussing and Zerahn 1951), (van Driessche and Lindemann 1979), im Colon (Krattenmacher and Clauss 1988) und in der Lunge (Fischer, Van Driessche et al. 1989), (Fronius, Berk et al. 2004) des Frosches sowie in der Harnblase (Palmer, Edelman et al. 1980) der Kröte. Das Coprodeum des Huhns weist auch amiloridsensitive Kanäle auf (Bindslev, Cuthbert et al. 1982), (Clauss, Dürr et al. 1987).

Bereits bei Invertebraten sind solche amiloridsensitiven Kanäle beschrieben. Man findet sie bei Mollusken in der Haut der Spitzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis* (De With, Sloodstra et al. 1988) oder bei der zu den Crustaceen gehörigen Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* (Zeiske, Onken et al. 1992). Zwei ENaC-Orthologe wurden in der Fruchtfliege *Drosophila* (Insekten) gefunden (Darboux, Lingueglia et al. 1998). Phylogenetisch früher findet man bereits in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* Degenerine, welche in der Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten mit denen der ENaCs von Vertebraten aufweisen. Die Degenerine und die ENaCs gehören zu einer Protein-Superfamilie, wobei es sich bei den Degenerinen lediglich um Prototypen eines Natriumkanals handelt. Funktionell sind sie an der Mechano-sensorik beteiligt (Kellenberger and Schild 2002).

Auch in diesem Fall kann Amilorid physiologisch und phylogenetisch genutzt werden. Ein wichtiges Merkmal ist die halbmaximale Hemmkonzentration bezogen auf den amilorid-sensitiven Strom. Young definierte die Grenze von hochaffinen (unterhalb) und niedrigaffinen (oberhalb) bei  $1\mu\text{M}$  für  $K_{1/2}$  (halbmaximale Hemmkonzentration) (Young and Benos 1992). Susanne Goebel-Lauth ermittelte in ihrer Arbeit über den Regenwurm für dessen Integument ein  $K_{1/2}$  von  $1,28\pm 0,08\mu\text{M}$  (Goebel-Lauth 2004). Dieser Wert liegt zwar über der Grenze von  $1\mu\text{M}$ , d.h. es handelt sich hierbei um niedrigaffine Natriumkanäle, jedoch deutlich unter der des Blutegelinteguments, dessen  $K_{1/2}$  bei  $2,9\pm 0,4\mu\text{M}$  liegt (Weber, Blank et al. 1995).

### VI.3 Calcium-Kanäle

Calcium ist eines der häufigsten Kationen im menschlichen Körper. Eine 70kg schwere Person besitzt nahezu ein kg Calcium. Dieses Calcium ist zu 99% in mineralischer Phase in Knochen und Zähnen eingebaut und zu 1% in den extra- und intrazellulären Flüssigkeiten vorhanden (Peng, Brown et al. 2003). Calcium spielt eine wichtige Rolle bei der Erregbarkeit von Membranen, Kontraktion von Muskeln und der synaptischen Weiterleitung von Signalen und ist in verschiedene Formen der Sekretion involviert. Der Eintritt des Calciums kann nun über 2 Wege erfolgen: Parazellulär durch die tight junctions zwischen den Epithelzellen hindurch und transzellulär von apikal oder basolateral in die Zelle hinein. Aufgrund des hohen parazellulären Widerstands des Regenwurminteguments von  $20\text{M}\Omega$  bis  $\infty$  spielt die Aufnahme an den Epithelzellen vorbei eine untergeordnete bis keine Rolle (Krumm 2002). Damit nun Calcium in die Zellen aufgenommen werden kann, müssen Transporter für dieses Ion in der Membran der Zellen vorhanden sein. Es gibt zwei Arten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen: spannungsabhängige und spannungsunabhängige. In den letzten Jahren wurden verschiedenen Typen von spannungsabhängigen Kanälen identifiziert. Dabei fand man vier Typen, die aufgrund ihrer zeit- und potentialabhängigen Kinetik, Einzelkanal-Leitwert und Pharmakologie unterteilt wurden:

- L-Typ
- N-Typ
- P-Typ
- T-Typ

Neben dem physiologischen Verhalten der Kanäle konnte diese Charakterisierung auch auf molekularer Ebene bestätigt werden (Mori 1994). Elektrophysiologische Unterschiede zeigen sich bei der Aktivierung der Kanäle. Während L-, N- und P-Typ durch eine hohe Depolarisation aktiviert werden, reichen bei Kanälen des T-Typs geringe Auslenkungen des Ruhepotentials zur Aktivierung aus. Diese Kanäle findet man in nahezu jedem erregbaren und in vielen nicht-erregbaren Geweben. Sie lösen erregungsgebundene Kontraktionen in Skelettmuskeln, in der glatten Muskulatur und im Herzen aus, und steuern die Sezernierung von Hormonen und Transmittern aus endokrinen Zellen und aus einigen Neuronen.

### N-Typ

Der N-Typ-Kanal unterscheidet sich vom L-Typ-Kanal durch unterschiedliche Charakteristiken in Spannungsabhängigkeit, Kinetik und Einzelkanalverhalten. Doch maßgeblich unterscheiden sie sich in ihrer Pharmakologie. Ein hoch selektiver Blocker der N-Typ-Kanäle ist  $\omega$ -Conotoxin, das Gift der Seeschnecke *Conus geographus*. Sie lebt in warmen Meeresgebieten bis in einer Tiefe von 30m. Die 300-500 Conus-Arten immobilisieren ihre Beute mit einem Gift, das durch einen modifizierten, harpunenähnlichen und abwerfbaren Zahn in das Opfer eingespritzt wird. Dieses Gift ist so effektiv, dass dessen LD<sub>50</sub>, bezogen auf den Menschen, bei 0,82mg/kg iv und bei 1,3mg/kg iv liegt (Gerd Liebezeit, Forschungszentrum Terramare).

### P-Typ

Namensgeber für die P-Typ-Kanäle waren die Purkinje-Neurone. Man fand anhand dieser Fasern heraus, dass L-Typ und N-Typ-Kanäle nur einen geringen Anteil am hohen Schwellenstrom besaßen, da Dihydropyridine und  $\omega$ -Conotoxin nur einen geringen Teil des Stromes blockten (Bean and Mintz 1994).  $\omega$ -AgaIV A, ein 48-Aminosäuren-Peptid aus dem Gift der Trichterspinne *Agelenopsis aperta* hingegen blockte den Strom durch die Calcium-Kanäle fast vollständig. Auch dieses Gift, ein Blocker der P-Typ-Kanäle, wirkt sehr effektiv, wobei seine halb-maximale Dosis bei wenigen nM liegt (Bean and Mintz 1994).

### L-Typ

Die L-Typ-Kanäle haben alle die hohe Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen gemein. Wichtige Vertreter dieser Blockerfamilie sind Nifedipin, Nitrendipin und Nimodipin. Dieser Kanaltyp scheint für nahezu den gesamten Calcium-Strom in der Skelettmuskulatur, der Herzmuskeln und den glatten Muskeln verantwortlich zu sein. In Neuronen sind sie zwar auch vertreten, spielen jedoch keine so große Rolle. Obwohl alle mit Dihydropyridinen blockierbar sind, unterscheiden sich L-Typ-Kanäle verschiedener Gewebe durch ihre Kinetik und Spannungsabhängigkeit.

### T-Typ

Die T-Typ-Kanäle unterscheiden sich von den anderen Typen hinsichtlich ihres geringeren Einzelkanalstroms, ihrer niedrigeren Aktivierungsschwelle und ihrer schnelleren Inaktivierung. Bekannte Blocker dieses Typs sind Ni<sup>2+</sup>, Octanol (Mori 1994) und Ethosuximid (Coulter, Huguenard et al. 1989), (Bean and Mintz 1994).

Neben den spannungsabhängigen Calcium-Kanälen gibt es noch die epithelialen Calcium-Kanäle. Diese finden sich in  $\text{Ca}^{2+}$  transportierenden Geweben und gehören zu einer neuen Familie von Calcium-Kanälen (TRPV-Familie) (Peng, Brown et al. 2003). Sie steuern den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die unter anderem an Signalkaskaden, der Apoptose, der Zellproliferation, der Modulation des Zellzykluses und der Ionenhomöostase beteiligt sind. Zwei Vertreter dieser Familie sind CaT1 („calcium transport protein subtype 1“) und ECaC („epithelial Ca channel“). Im Gegensatz zu den anderen 4 Mitgliedern der TRPV-Familie, sind diese beiden bemerkenswert calciumselektiv. Der Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen ist jedoch nicht an  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{H}^+$  gekoppelt. CaT1 befindet sich beim Mensch und bei der Maus im Magen-Darm-Trakt und im Pankreas, ECaC wurde bisher in der Niere der Maus und der Ratte gefunden (Peng, Brown et al. 2003).

#### VI.4 Amilorid und Calcium

Man hat herausgefunden, dass Calcium den Transport von Natrium beeinflussen kann. Es bestehen allerdings Kontroversen in seiner Wirkung. So postulierten Benos et al. 1979, dass die Abwesenheit von Calcium in der apikalen Lösung das  $\text{K}_i$  von Amilorid steigert. Dies war jedoch speziesabhängig. So stieg das  $\text{K}_i$  der Haut von *Bufo marinus* an, während das von *Rana catesbeiana* gleich blieb (Benos, Mandel et al. 1979). Auch Cuthbert und Wong beobachteten, dass das  $\text{K}_i$  von Amilorid der Haut von *Rana temporaria* bei Fehlen von Calcium um das 400fache höher lag (Cuthbert and Wong 1972). Bei Versuchen an der Harnblase von *Bufo marinus* zeigte sich, dass Calcium in der Lage war, den Transport von Natrium zu inhibieren, in dem es direkt mit dem Natriumkanal interagierte (Chase and Al-Awqati 1983). Alternativ dazu könne Calcium auch in der Lage sein, die Ladungen auf der Oberfläche der Membran zu verändern und damit, indirekt, den Durchgang der Natriumionen durch den Kanal beeinflussen. Desmedt et al. hingegen fanden heraus, dass die Blockade der Natriumkanäle durch Amilorid unabhängig von Calcium ist (Desmedt, Simaels et al. 1991). Ihre Untersuchungen fanden an der Haut von *Rana temporaria* und *Rana catesbeiana*, an der Harnblase von *Bufo marinus* und an A6-Zellen statt.

In dieser Arbeit zeigte sich nun ein erheblicher Einfluss von Calcium auf  $I_{\text{SC}}$  und  $U_{\text{T}}$ . Wurde apikal Calcium aus der Lösung entfernt, so sanken  $U_{\text{T}}$  und  $I_{\text{SC}}$  signifikant ab. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Weber et al. am Integument des Blutegels, wo das Entfernen von Calcium aus der apikalen Lösung zu einem Anstieg des Stroms führte (Weber,

Blank et al. 1995). Auch bei der Gabe von 2mM Calcium, also Hoch-Calcium-Bedingungen, änderten sich die drei Parameter signifikant. Diese Änderungen können nun aus zwei Wirkmechanismen resultieren: Der Transport von positiven Ladungen (in diesem Fall  $\text{Ca}^{2+}$ ) fällt weg (wird verstärkt) oder Calcium verändert durch seine An-, bzw. Abwesenheit anderer Kanäle so, dass der Transport von Kationen vermindert/gefördert wird.

Ergebnisse dieser Arbeit am Regenwurmintegument sprechen für beide Möglichkeiten. Der erste Mechanismus lässt sich durch die Tatsache belegen, dass diverse Blocker von unterschiedlichen Calciumkanälen getestet wurden, die teilweise den Calciumtransport signifikant hemmten. Auch die Ergebnisse von V.5 Cocktail und Calcium sprechen für einen Transport von Calcium. Der Cocktail, der aus 50 $\mu\text{M}$  Amilorid, 1mM Quinine und 0,1mM Furosemid bestand, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den calciuminduzierten Strom. So können sekundäre Transporte, bedingt durch Calcium, von amiloridsensitiven Natriumkanälen,  $\text{K}^+$ -Kanälen und dem  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Transporter, ausgeschlossen werden.

Für Möglichkeit 2 spricht der enorme Abfall bei der Entfernung von Calcium aus der apikalen Lösung. Im Gegensatz zu Weber et al. hätte Calcium hier eine stimulierende Wirkung auf die amiloridsensitiven Natriumkanäle. Dafür sprechen auch die Versuche mit Calcium und Amilorid. Unter Abwesenheit von Calcium in der apikalen Lösung zeigt sich eine deutliche Veränderung der Amiloridreaktion des Epithels. Anstatt eines Abfalls, wie vielfach belegt, zeigt  $I_{\text{SC}}$  auf 50 $\mu\text{M}$  Amilorid unter Fehlen von Calciumionen einen Anstieg. So stieg dieser von  $-0,83 \pm 0,21$  auf  $0,15 \pm 0,24 \mu\text{A}$  an. Dieses Ergebnis würde die Theorie von Cuthbert und Benos unterstützen, da ausbleibende Amiloridreaktion ein Zeichen für gestiegenes  $\text{K}_i$  sein kann. Um diese These zu manifestieren, würde es sich anbieten, die Versuche mit einer erhöhten Konzentration von Amilorid durchzuführen. Einen gegenläufigen Effekt zeigen die Versuche mit 50 $\mu\text{M}$  Amilorid unter Anwesenheit von 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Anstatt bei erhöhter Konzentration von Calcium eine erhöhte Inhibition des  $I_{\text{SC}}$  durch Amilorid zu beobachten, fand unter diesen Bedingungen ebenfalls eine Hemmung der Amiloridreaktion statt. Es besteht nun die Möglichkeit, dass Calcium in zu hoher Dosierung einen ebenfalls inhibitorischen Effekt auf die Amiloridsensitivität der Natriumkanäle besitzen kann. Um diesem Phänomen auf die Spur gehen zu können, würde es sich anbieten, gleich gestaltete Versuche mit steigender Calciumkonzentration durchzuführen.

Ein umgekehrter Einfluss von Amilorid auf Calcium konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Wurde während dem inhibitorischen Effekt apikal eine Konzentration von 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  perfundiert, zeigten sich keine Unterschiede in der Reaktionshöhe zu der Reaktion unter normalen pw-Bedingungen. Möglich ist nun, dass Calcium und Amilorid kompetitiv um die

Bindungsstellen im amiloridsensitiven Natriumkanal konkurrieren. Ist der Kanal bereits durch ein Amiloridmolekül belegt, so kann Calcium nicht mehr binden. Möglich wäre eine Maskierung des Kanals, wenn Calcium an selbigen gebunden hat. So ist eine direkte Bindung, oder vielleicht auch nur eine Ladungsänderung des Kanals durch die Anwesenheit von Calcium, in der Lage, die Andockstelle des Amilorids so zu verändern, dass es diesem nicht mehr möglich ist, zu binden und seinen inhibitorischen Effekt zu entfalten. Diese Vermutung würde die Theorie von Chase unterstützen.

## VI.5 cAMP

Ein bekannter „second messenger“ ist zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat, cAMP. Es wird durch die Adenylat-Cyclase aus ATP gebildet und kann durch Phosphodiesterasen zu AMP hydrolysiert, und damit inaktiviert werden. cAMP führt zur Aktivierung der Protein-Kinase A, bei der es sich um eine Ser/Thr-Protein-Kinase handelt. Bei Aktivierung spaltet das tetramere Protein die 2 katalytischen Untereinheiten ab, die, unter ATP-Verbrauch, andere Proteine phosphorylieren können. cAMP kann aber auch auf die Odorant-Rezeptoren im Riechepithel wirken. Hier öffnen sich, nach Bindung von Liganden und unter Einwirkung von cAMP, Ionenkanäle, wodurch wiederum ein Aktionspotential ausgelöst wird. Bei dem zellulären Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* wirkt es als Chemoattraktans extrazellulär. Dabei veranlasst es die Zellen in Hungerzeiten zur Bildung vielzelliger Aggregate. Bei Prokaryoten bindet cAMP an ein CAP-Protein („catabolite activator protein“), welches sich spezifisch vor das *lac*-Operon setzt und andere Gene an die DNA anlagert. Dadurch erhöht sich die Affinität zwischen Promotor und RNA-Polymerase.

cAMP spielt als „second messenger“ in Geweben eine enorme Rolle. Seine Wirkung ist jedoch abhängig von untersuchten Geweben und Zelltypen. So ist der ENaC im Rattencolon nicht, in A6-Zellen und in der Rattenniere doch von cAMP regulierbar (c.f. Schnizler, Schaffert et al. 2001). Das Epithel des Regenwurminteguments zeigt eine signifikante Wirkung von cAMP. Dabei hat dieses einen stimulierenden Effekt auf  $I_{UT}$  und  $I_{SC}$ , während  $R_T$  abnimmt. Schon Weber et al. zeigten, dass cAMP den Strom über die Haut des Blutegels in einer Konzentration von 0,1mM nahezu verdoppelt (Weber, Blank et al. 1995). Dies läuft mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform. Auch hier stieg  $I_{SC}$  von  $-0,11 \pm 0,18$  auf  $0,67 \pm 0,23 \mu A$  (siehe Tabelle 6) an. Über die Ionen, die für den Stromanstieg verantwortlich sind, ist die Literatur geteilter Meinung. Segal et al. fanden bei rENaCs, die in Oocyten von *Xenopus laevis* exprimiert wurden, einen signifikanten Anstieg des amiloridsensitiven Stroms

durch die Gabe von cAMP (Segal, Cucu et al. 2002). Dieser sei darauf zurückzuführen, dass durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle vermehrt ENaCs durch Exocytose in die Zellmembran eingebaut würden. Schnizler et al. hingegen fanden keine Stimulation des amiloridsensitiven Stroms in Oocyten, die Hybrid-ENaCs (g $\alpha$ r $\beta$  $\gamma$ ENaC) ausgebildet hatten (Schnizler, Schaffert et al. 2001). Auch in dieser Arbeit konnte keine Stimulation des amiloridsensitiven I<sub>SC</sub> durch die Gabe von 0,1mM cAMP ermittelt werden. Es fand sogar eine signifikante Verminderung des Amiloridstroms statt.

Van Driessche et al. erklärten den cAMP-vermittelten Anstieg des Stroms in der Krötenharnblase damit, dass dadurch amiloridunabhängige Kanäle stimuliert würden (Van Driessche, Aelvoet et al. 1987). Möglich wäre eine Aktivierung der K<sup>+</sup>-Kanäle (Cuthbert, Hickman et al. 1999). Da allerdings die Konzentration an Kalium in der apikalen pw-Lösung sehr gering ist, muss diese Stimulation eine andere Ursache haben. Im gleichen Paper verweisen Cuthbert et al. darauf, dass im Mauscolon durch cAMP die Sekretion von Cl<sup>-</sup> angekurbelt würde. Aufgrund der geringen Konzentrationen an Kationen in der apikalen und der hohen Konzentration an Chlorid-Anionen in der basolateralen Lösung wäre dies eine plausible Erklärung für das durch cAMP vermittelte Phänomen.

Ausgehend davon könnten weiterführende Versuche, wie z.B. mit Cl<sup>-</sup>-freier Lösung basolateral oder einer modifizierten pw-Lösung apikal durchgeführt werden.

## VI.6 Deltamethrin

Deltamethrin gehört neben Permethrin und Phenothrin zu der Gruppe der Pyrethroide. Die natürlich vorkommenden Pyrethrine sind Insektizide, die schon lange in China benutzt wurden. Sie gewannen die Substanz als Puder (Pyrethrum) aus den Pflanzen der Chrysanthemum-Arten. Die synthetischen Analoga dazu sind die Pyrethroide, die weltweit 23% der verwendeten Insektizide ausmachen (Cassano, Bellantuono et al. 2003). Sie wirken neurotoxisch, indem sie die Öffnungszeiten von spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Kanälen, beteiligt an der Depolarisation von Nervenzellen während des Aktionspotentials, verlängern. Neben diesen nehmen Pyrethroide ebenfalls Einfluss auf spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, auf spannungsabhängige Cl<sup>-</sup>-Kanäle, auf die Glutamat-Rezeptoren und auf die nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren.

Die Pyrethroide dürfen heute laut EU-VO 2092/91 idgF nur in Form von Deltamethrin (siehe Abbildung 32) und Lambda-Cyhalothrin in Lockmittelfallen und zur Bekämpfung von *Batrocera oleae* und *Ceratitis capitata* eingesetzt werden. Dies war noch in den 40er und 50er

Jahren anders, als Fischsterben und erhöhte Vogelsterblichkeit als notwendiges Übel angesehen wurden.

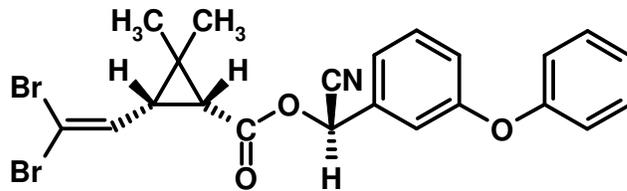


Abbildung 32 Strukturformel von Deltamethrin

Fischer et al. fanden 2001 heraus, dass mit Deltamethrin behandelte Regenwürmer an Körpergewicht verloren (Fischer, Tóth et al. 2001). Sie interpretierten den Verlust an Wasser mit der damit verbundenen osmotischen Kompensation aufgrund fehlender Elektrolyte. Deltamethrin verändere die Kinetik der Natriumkanäle und verlängere die Öffnungszeiten (s.o.). Dadurch ströme  $\text{Na}^+$  in das hypoosmotische Medium und ihm folge Wasser nach. Zusätzlich dazu inhibiere Deltamethrin die  $\text{Cl}^-$ -Kanäle. Versuche mit Amilorid zeigten gleiche Effekte, wenn auch die Reaktion langsamer ablief. Im Gegensatz zu Deltamethrin verhinderte Amilorid den Einstrom von  $\text{Na}^+$ . Fehlendes Natrium in der Körperflüssigkeit resultiert über kurz oder lang in einem Gewichtsverlust durch Wasser, welches maßgeblich durch die Natriumkonzentration und dem damit verbundenen osmotischen Gefälle in den Körper einströmt. Irreführend sind hier die gleichen Resultate, die allerdings durch verschiedene Wirkmechanismen bedingt sind.

In meinen Versuchen zeigte Deltamethrin erst bei einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  einen signifikanten Einfluss auf  $U_T$  und  $I_{\text{SC}}$ . Diese stiegen, wie auch  $R_T$  in der Tendenz, an. Da Deltamethrin apikal perfundiert wurde, wäre die Erhöhung des Stroms mit einem vermehrten Transport positiver Ladungen von apikal nach basolateral zu erklären. Durch die verlängerte Öffnungszeit der Natriumkanäle, die eine größere Anzahl an gleichzeitig geöffneten Kanälen zur Folge hat, kann nun mehr Natrium in die Zellen einströmen.

Wenn nun Deltamethrin den Natriumeinstrom positiv beeinflusst, so sollte es die Amiloridantwort ebenfalls verändern können. Allerdings konnte weder bei  $5\mu\text{M}$ , noch bei  $10\mu\text{M}$  eine signifikante Wirkung von Deltamethrin auf den amiloridsensitiven Strom gefunden werden (siehe Tabelle 11). Die Erhöhung des Stroms durch Deltamethrin muss also durch einen Transport durch andere als die amiloridsensitiven Kanäle erfolgen. Wie von Fisher et al.

postuliert, könnte es apikal die Aufnahme von  $\text{Cl}^-$ -Ionen unterbinden. Dadurch würde der Nettostrom ebenfalls einen Anstieg erfahren.

Auch basolateral wurde die Wirkung von  $5\mu\text{M}$  Deltamethrin untersucht, um die Wirkung auf den  $\text{Cl}^-$ -Transport zu ermitteln. Dabei wurde es unter An- und Abwesenheit von Chlorid basolateral perfundiert. Unter  $\text{Cl}^-$ -Bedingungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg von  $U_T$  und  $I_{SC}$ . Nur  $R_T$  blieb unbeeinflusst. Wurde nun  $\text{Cl}^-$  durch  $\text{SO}_4^{2-}$  ersetzt, so zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Da der Anstieg im Strom nur unter Anwesenheit von Chlorid vorhanden war, muss Deltamethrin also Einfluss auf den Transport von  $\text{Cl}^-$  genommen haben. Allerdings wäre dieses Ergebnis eher ein Indiz für die Stimulation von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen, da, definitionsgemäß, ein Anstieg im Strom aus einer Entfernung von negativen oder einer Anreicherung von positiven Ladungsträgern auf der basolateralen Seite resultiert. Daher könnte man vermuten, dass Deltamethrin eine stimulierende Wirkung auf die Chloridkanäle der basolateralen Membran besitzt, was den Vermutungen von Fisher et al. entgegenstehen würde.

## VI.7 Ethosuximid

Bei Ethosuximid (siehe Abbildung 33) handelt es sich um ein krampflösendes Mittel, welches bei epileptischen Erkrankungen zur Verwendung kommt. Die größte Wirksamkeit entwickelt es bei Absencen (vorübergehende, kurze Bewusstseinstörungen, Geistesabwesenheit, kurze epileptische Anfälle).

Ethosuximid blockt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des T-Typs. Coulter et al. vermuten, dass die Inhibition dieser Kanäle nicht durch die direkte Beeinflussung der Kanalkinetik oder des Öffnungsmechanismus hervorgerufen wird, sondern vielmehr auf eine Reduzierung der Kanalanzahl oder die Veränderung der Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals zurückzuführen ist (Coulter, Huguenard et al. 1989).

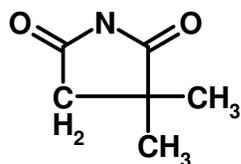


Abbildung 33 Strukturformel von Ethosuximid

Ethosuximid zeigte in dieser Arbeit in den Konzentrationen 250 $\mu$ M und 500 $\mu$ M keinen signifikanten Effekt auf Potential, Strom oder Widerstand (siehe Tabelle 14). Es zeigte sich zwar tendenziell eine Steigerung in  $U_T$  und  $I_{SC}$  und ein Absinken in  $R_T$ , doch sind diese Reaktionen nicht statistisch gesichert.

Bei der Wirkung auf den calciuminduzierten Strom bezogen, wurde ein signifikanter Einfluss auf  $U_T$  und  $I_{SC}$  erkennbar. Beide Parameter erfuhren eine Inhibition, während  $R_T$ , zwar nicht statistisch gesichert, stimuliert wurde. Dies ist, laut Coulter et al., ein Indiz für die Anwesenheit von Calciumkanälen des T-Typs (Coulter, Huguenard et al. 1989). Dieser Typ von Kanälen befindet sich in der Muskulatur, beim Menschen z.B. in der Gefäß- und Herzmuskulatur. Daher wirft sich die Frage auf, ob die gezeigte Reaktion von Ethosuximid von den Epithelzellen herrührt oder auf Reaktionen der darunter liegenden Muskelschicht zurückzuführen ist. Um diese Frage näher zu beantworten, würden sich Patch-Clamp-Versuche am Integument anbieten, die gezielt Kanäle der Epithelzellen abgreifen.

## VI.8 Verapamil

Verapamil, verwendet als Monopräparat, kommt bei der Behandlung verschiedener Formen von koronaren Herzerkrankungen zum Einsatz. Ebenfalls Verwendung findet es als blutdrucksenkendes Präparat. Zusätzlich zu der gefäßerweiternden Wirkung an den Gefäßen des Herzens und denen des gesamten Körpers, wirkt es direkt auf das Herz selbst. Dabei senkt es die Herzfrequenz und vermindert die Kontraktilität des Herzmuskels, d.h. es setzt die Fähigkeit des Herzmuskels, sich zusammen zu ziehen, herab. Als Folge nimmt der Sauerstoffbedarf des Herzens ab und der Blutdruck sinkt.

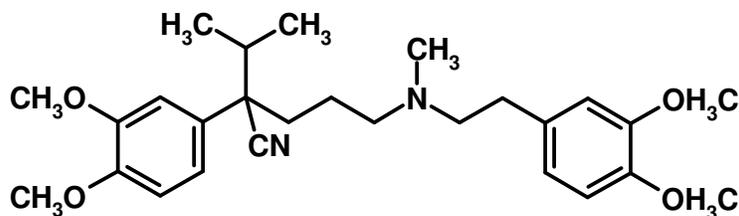


Abbildung 34 Strukturformel von Verapamil

Segal et al. testeten 2002 die Wirkung von Verapamil und Nifedipin auf den Natriumtransport (Segal, Hayslett et al. 2002). Verapamil (siehe Abbildung 34), als effektiver Blocker von  $Ca^{2+}$ -Kanälen des L-Typs bekannt, blockt in A6-Zellen den  $Na^+$ -Transport ebenfalls signifi-

kant. Diese Reaktion ist jedoch nicht mit dem inhibitorischen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle korreliert, da der Abfall im  $I_{\text{SC}}$  auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen auftrat. Eine Applikation von der basolateralen Seite zeigte keinen Effekt, obwohl Verapamil als lipophile Substanz membrangängig ist. Die Reaktion erfolgte nur bei direkter apikaler Gabe.

100 $\mu\text{M}$  Verapamil zeigte in dieser Arbeit keine Wirkung auf  $U_{\text{T}}$ ,  $I_{\text{SC}}$  oder  $R_{\text{T}}$ . Auch tendenziell konnte keine Veränderung in den Parameter festgestellt werden, wie die Stromkurve in Abbildung 12 deutlich zeigt. Auch blieb der von Segal et al. beschriebene Effekt auf den  $\text{Na}^{+}$ -Transport, der hier als amiloridsensitiver Strom getestet wurde, aus. Wie auch zuvor zeigte sich noch nicht einmal eine Reaktionsrichtung.

Auch die „eigentliche“ Wirkung des Verapamils auf die L-Typ-Kanäle konnte in den Versuchen nicht bestätigt werden. 100 $\mu\text{M}$  beeinflussten den calciuminduzierten Strom in keiner Weise.

## VI.9 Nifedipin

Nifedipin findet in der Medizin Anwendung bei essentiellen Bluthochdruck. Es wirkt sowohl bei den Gefäßen des Herzens wie auch bei den Gefäßen im gesamten Körper gefäßerweiternd. Nifedipin liefert ein gutes Beispiel, das der inhibitorische Effekt auf den  $I_{\text{SC}}$  nicht mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Block in Verbindung steht. Es hat auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom eine wesentlich effektivere Wirkung als Verapamil, jedoch hemmt es in A6-Zellen den (natriumbedingten)  $I_{\text{SC}}$  nicht signifikant (Segal, Hayslett et al. 2002).

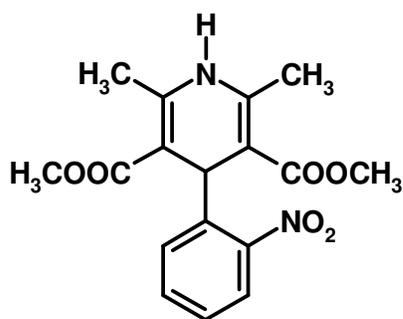


Abbildung 35 Strukturformel von Nifedipin

Wie Verapamil zeigte 100 $\mu\text{M}$  Nifedipin (siehe Abbildung 35) keine signifikante Wirkung auf  $U_{\text{T}}$ ,  $I_{\text{SC}}$  und  $R_{\text{T}}$ . Allerdings konnte ein statistisch gesicherter Einfluss auf den amilorid-sensitiven Strom ermittelt werden. Dabei hatte Nifedipin eine hemmende Wirkung (siehe

Tabelle 20). Dies widerspricht den von Segal et al. an A6-Zellen gemachten Beobachtungen. Auch konnte keine Wirkung von Nifedipin als Blocker der L-Typ-Calciumkanäle ermittelt werden.

Zusammen mit den Beobachtungen von Verapamil kann nun abschließend gesagt werden, dass typische L-Typ-Blocker keine Wirkung am Epithel des Regenwurminteguments zeigen. Das legt nun die Vermutung nahe, dass Kanäle dieses Typs nicht in der Haut des Regenwurms vorkommen.

## VI.10 Blei

### VI.10.1 Charakterisierung

Blei hat keine essentielle Bedeutung oder irgendeine günstige Wirkung auf Pflanzen oder Tiere. Es gehört der Gruppe IVa des Periodensystems an, hat die Ordnungszahl 82 und eine relative Atommasse von 207,2g/mol. Obwohl Blei in der Oxidationsstufe +2 als  $Pb^{2+}$  vorherrscht, kommt es auch in der Oxidationsstufe +4 vor. Durch die leichte Verformbarkeit und bedingt durch den geringen Schmelzpunkt von 327°C wurde es bereits in frühen Kulturen verarbeitet. Es fand Verwendung als Rohrleitungen und kam beim Dachdecken zum Einsatz. Blei-Antimon-Legierungen werden hauptsächlich für Akkumulatorenplatten und für Schrotkugeln, Blei-Zinn-Legierungen für Lötarbeiten verwendet. Große Bedeutung hat Blei auch als Tetraethylblei ( $Pb(C_2H_5)_4$ ) als Antiklopfmittel in Hochleistungs-Benzinmotoren.

Bleieintrag in den Boden:

- Landwirtschaft

Eintragung von Blei in der Landwirtschaft erfolgt maßgeblich durch Düngung. Da in den letzten Jahren die gemischte Landwirtschaft ab- und der spezialisierte Ackerbau zunahm, nahm die Verfügbarkeit an Hofdüngung für die Düngung ab. Dadurch kamen zunehmend kompostierte Haushaltsabfälle und Klärschlämme zum Einsatz. Das Blei darin stammt aus bleihaltigen Wasserleitungen und aus dem Straßenablauf.

- Atmosphäre

Bleiaerosole in der Atmosphäre werden durch Abgase von Fahrzeugen und durch Industriebetriebe eingetragen. Durch die Verordnungen vieler Länder, was den Bleigehalt in Kraftstoffen anbelangt, ist die Konzentration an Blei in der Atmosphäre in den letzten Jahren rückläufig.

- Sonstige Quellen

Bleiverunreinigungen in Böden resultieren zum großen Teil aus bleiverarbeitenden Betrieben und dem Bergbau. Auch heutige Industrieanlagen sorgen noch für eine erhebliche Belastung des Bodens in den sie umgebenden Bereichen. Beträchtlichere Schäden gehen jedoch von den Altlasten alter, verschmutzter Anlagen aus.

### **VI.10.2 Biologische Relevanz**

Blei ist im Stoffwechsel von Pflanze und Tier lediglich von toxischer Bedeutung. Schwermetalle im Allgemeinen können die Aktivität von Bodenmikroben beeinträchtigen. Blei im Speziellen kann die Stickstofffixierung im Boden behindern und vermindert die CO<sub>2</sub>-Entwicklung. Im menschlichen Körper wird Blei in den Knochen eingelagert und zeigt 3 Wirkungsorte:

- die glatte Muskulatur
- das erythrozytäre System
- das motorische Nervensystem

Die Wirkung von Blei auf die glatte Muskulatur äußert sich in Bleikolik. Es ist auch in der Lage, in die Häm-synthese einzugreifen und kann zur Degeneration von efferenten motorischen Neuronen führen.

### **VI.10.3 Wirkung von Blei auf den Natriumtransport**

Milde et al. fanden 1996 eine Hemmung des Natriumtransports durch Blei an der Blutegelhaut (Milde, Clauss et al. 1996). Sie verwendeten Blei in Konzentrationen von 1µM bis 100µM. Dabei wurde der Strom sukzessiv gehemmt. Auch hemmte Blei den amilorid-sensitiven Strom, indem es in die Zelle aufgenommen wurde und dort als Ca<sup>2+</sup>-Ersatz dient. Intrazellulär nun soll Blei, wie Calcium auch, die amiloridsensitiven Natriumkanäle inhibieren.

Andere Ergebnisse präsentierten Oortgiesen et al. 1990. Ihre Versuche zeigten, dass Konzentrationen von Blei in einer Bandbreite von 1µM bis 200µM einen Einwärtsstrom in Neuroblastomazellen der Maus stimulieren konnten (Oortgiesen, van Kleef et al. 1990).

Im Gegensatz zu Milde et al. fand in den hier ermittelten Versuchen anfangs eine Stimulation des Stroms statt, wie sie auch Oortgiesen et al. beobachteten, und eine Hemmung trat erst bei 10µM Blei auf (siehe Tabelle 22). Die Erhöhung des Stroms kann nun aus einem Transport

von Blei oder aus einem gesteigerten Natriumtransport resultieren. Für letzteres sprechen die Versuche mit Blei und Amilorid. Deren Ergebnisse laufen mit den Werten der Bleireaktion konform (siehe V.10.1 Blei und Amilorid). Man erkennt, dass bei  $0,1\mu\text{M}$  und  $1\mu\text{M}$  Blei eine Stimulation der Gewebeantwort auf  $50\mu\text{M}$  Amilorid erfolgt. Bei  $10\mu\text{M}$  Blei hingegen wird die Reaktion unter Anwesenheit von Blei gehemmt. Diese Aspekte sprechen eher für einen Einfluss von Blei auf den Natriumtransport als auf einen direkten Transport von Blei.

Zusätzlich dazu lässt sich auch eine Dosisabhängigkeit vermuten. Das ist jedoch schwierig zu beurteilen, da nur drei unterschiedliche Konzentrationen untersucht wurden. Auch sind von diesen drei Versuchsteilen lediglich zwei signifikant. Um dieses genauer zu untersuchen, sollten Experimente mit feineren Abstufungen durchgeführt werden.

Auch konnte, obwohl in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet, der von Milde et al. angegebene „Ersatz“ des Calciums durch das Blei nicht beobachtet werden (Milde, Clauss et al. 1996). Zwar fand bei  $1\mu\text{M}$  eine Stimulation, wie auch bei  $\text{Ca}^{2+}$ , statt, doch wurde der Strom bei  $10\mu\text{M}$  Blei gehemmt.

## **VI.11 Kobalt**

### **VI.11.1 Charakterisierung**

Kobalt stellt neben Mangan ein wichtiges Element in unserer industriellen Zivilisation dar. Es besitzt die Ordnungszahl 27 und hat eine relative Atommasse von  $58,93\text{g/mol}$ . Kobalt ist ein seltenes und teures Element und wird zur Herstellung von Spezialstählen verwendet. Es findet ebenfalls seit Jahrhunderten Einsatz in der Herstellung von blauen Pigmenten und von Gläsern. Anfang der sechziger Jahre hat man in Kanada, USA und in Belgien Getränken  $\text{CoSO}_4$  zur Stabilisierung des Bierschaums zugesetzt. Nach Auftreten von zahlreichen Vergiftungserscheinungen wurde von diesen Praktiken jedoch wieder abgesehen.

Kobalt ist für einige Mikroorganismen und für Tiere essentiell. Im Vergleich zu anderen Schwermetallen bereiten Verschmutzungen mit diesem Element kaum nennenswerte Probleme. Daher wird es auch eher in Verbindung mit Mangelerscheinungen erwähnt, als dass es mit Toxikosen Aufmerksamkeit erregen würde.

Kobalteintrag in den Boden findet einzig nennenswert durch die Ausgangsmaterialien wie Cobaltit oder Skudderudit und durch gezielte Zugabe von Kobaltsalzen und in Verbindung mit Phosphatdüngern zur Vorbeugung von Mangelerscheinungen von Wiederkäuern und Leguminosen statt.

### VI.11.2 Biologische Relevanz

Kobaltmangel führt, z.B. bei Wiederkäuern, zu Appetitlosigkeit, zu Mangelerscheinungen und einer schweren Anämie. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Kobalt zu 4% Bestandteil des „Anti-perniziöse(n)-Anämie-Faktor“<sup>s</sup>, besser bekannt als Vitamin B<sub>12</sub>, ist. Dieses Vitamin und sein Coenzym sind komplexe Moleküle, die Co<sup>3+</sup> im Zentrum einer porphyrinartigen Struktur (Corrin) enthalten. Neben Vitamin B<sub>12</sub> kommt Kobalt noch in der Glycyl-glycin-Dipeptidase und der β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase vor.

In der Pflanzenbiologie liegt das Interesse an Kobalt bei der biologischen Stickstofffixierung. Bei den mit Leguminosenzwurzeln symbiotischen *Rhizobium*-Bakterien und den freilebenden, stickstoffbindenden Bakterien wie *Azotobacter* stellt Kobalt ein essentielles Element dar. Auch scheint es für Grünalgen und höhere Pflanzen von Wichtigkeit zu sein, da es z.B. bei Getreide das Wachstum fördert und somit zu Ertragssteigerungen führt.

### VI.11.3 Wirkung von Kobalt auf den Natriumtransport

Natochin et al. untersuchten die Wirkung von CoCl<sub>2</sub> auf die Haut von *Rana temporaria* und auf die Niere von *Triturus vulgaris* (Natochin, Goncharevskaya et al. 1986). Kobalt hatte in ihren Experimenten einen stimulierenden Effekt auf Potential und Kurzschlussstrom an der Froschhaut. In der Niere erhöhte sich dadurch die Reabsorption im proximalen Teil. Sie führten den Stromanstieg auf den erhöhten Transport von Natrium zurück, da dieser Effekt auch unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen vorhanden war.

Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht am Regenwurmepithel bestätigt werden. Auf 100 μM Kobalt sanken U<sub>T</sub> und I<sub>SC</sub> signifikant ab. Dieser Abfall kann nun aus einem verminderten Transport von Kationen oder einem vermehrten Transport von Anionen resultieren. Ein direkter Transport von Kobalt ist jedoch auszuschließen, da Kobalt, zweifach positiv geladen, die basolaterale Seite „positiver“ machen würde und somit den virtuellen Kurzschlussstrom ansteigen ließe. Um dieser Ursache genauer auf den Grund zu gehen, wurde die Wirkung von Kobalt auf den amiloridsensitiven Strom untersucht. Die Experimente zeigten, dass bereits 50 μM Kobalt in der Lage war, die Reaktion des Integuments auf 50 μM Amilorid herabzusetzen (siehe auch Abbildung 18). Die Konzentration von 100 μM zeigte dies noch deutlicher. Auch nahm Δ<sub>Ami</sub> von U<sub>T</sub> und R<sub>T</sub> charakteristisch ab. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Kobalt in der Lage ist, den Natriumtransport durch die amiloridsensitiven Natriumkanäle zu hemmen.

## VI.12 Kupfer

### VI.12.1 Charakterisierung

Kupfer ist das 26. häufigste Element der Lithosphäre. Es kommt als Sulfide, Sulfate, Sulfosalze, Carbonate und in anderen Verbindungen vor. Unter reduzierenden Bedingungen kann es auch als gediegenes Metall auftreten. Kupfer hat die Ordnungszahl 29 und eine relative Atommasse von 63,55g/mol.  $\text{Cu}^{2+}$  ist in Wasser recht stabil, jedoch ist das zweite Ionisierungspotential viel höher als das erste, so dass auch Kupfer(I)-Verbindungen und  $-$ Ionen stabil vorkommen können.

Sein Hauptverwendungszweck liegt in der Herstellung von Drähten und von Bronze- und Messinglegierungen.

Kupfereintrag in den Boden:

- Landwirtschaft

Kupfer findet in der Landwirtschaft einen vielgestaltigen Einsatz. Ein maßgeblicher Anteil an anthropogen eingebrachtem Kupfer stammt aus Dünge- und Pflanzenschutzmitteln. Eines der ersten brauchbaren Laubsprühmittel war die „Bordeaux-Brühe“, erstmals 1885 von Millardet (1838-1902) beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Suspension aus gebranntem Kalk und wässriger Kupfersulfatlösung, die gegen den Falschen Mehltau *Plasmopara viticola* eingesetzt wurde. Bedingt durch die unselektive Wirkweise werden solche Schutzmittel in großen Mengen angewendet, unter anderem an Weinreben. Daraus resultierte auch seine Namensgebung.

- Atmosphäre

Die atmosphärische Verbreitung von Kupfer erfolgt durch Regen oder trockene Deposition. Die Konzentrationen sind abhängig von der Entfernung zu industriellen Standorten.

### VI.12.2 Biologische Relevanz

Kupfer ist eines der wichtigsten, essentiellen Elemente für Pflanze und Tier. Es führt z.B. bei Getreide zu einer Zunahme der Körneranzahl pro Ähre oder steigert den Knollenertrag von Zuckerrüben. Ein Mangel an Kupfer wirkt sich auf die Qualität der Ernteprodukte aus. So beeinflusst es die Größe, Form, Farbe und Festigkeit von Obst und Gemüse.

Im tierischen Organismus kommt Kupfer in verschiedenen Enzymen und im Hämocyanin der Wirbellosen vor.

Eine erbliche Erkrankung, die durch Kupfer hervorgerufen wird, ist die Wilson-Krankheit oder hepatolentikuläre Degeneration. Dabei sammelt sich Kupfer in der Leber betroffener Kinder kontinuierlich an und führt zu einer Kupfertoxikose. Symptome sind unter anderem Gedächtnisstörungen, Psychosen und später auch Demenz. Eine weitere Erkrankung des Kupferstoffwechsels ist die „Menke’s kinky hair disease“; zu deutsch etwa „Korkenzieherhaar-Syndrom“. Dabei handelt es sich um eine Erbkrankheit, die X-chromosomal rezessiv weitergegeben wird.

Kupferenthaltende Enzyme:

- Cytochrom-Oxidase

Die Cytochrom-Oxidase katalysiert den Transfer von Elektronen vom Cytochrom c zum O<sub>2</sub>. Dabei handelt es sich um einen Häm-Protein-Komplex, der aus 6 Untereinheiten besteht und die innere Mitochondrienmembran durchzieht.

- Uricase

Die Uricase wandelt Harnsäure in Allantoin um.

- Superoxid-Dismutase

Die Superoxid-Dismutasen sind alles Metalloproteine, die die gefährlichen Sauerstoff-Radikale (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), die z.B. bei der Autooxidation des Hämoglobins zum Methämoglobin entstehen, zu Wasserstoffperoxid weiterreagieren.

- Coeruloplasmin

Coeruloplasmin wird in der Leber synthetisiert und enthält 8 zweiwertige Kupfer-Ionen. Es ist am Kupfertransport beteiligt und besitzt Ferro-Oxidaseaktivität.

### VI.12.3 Wirkung von Kupfer auf den Natriumtransport

Oortgiesen et al. fanden heraus, dass eine Perfundierung mit Cu<sup>2+</sup> einen irreversiblen Einstrom von Kationen zur Folge hatte (Oortgiesen, van Kleef et al. 1990). Neben ihrem Forschungsobjekt, der Zellkultur von Neuroblastomazellen der Maus, konnte dieser Effekt auch an Neuronen von *Aplysia californica* beobachtet werden. Auch Flonta et al. ermittelten einen Stromanstieg bei der Froschhaut (Flonta, DeBeirSimaels et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnte kein Anstieg im Strom gemessen werden. Im Gegensatz zu den erwähnten Artikeln wurde ein signifikanter Abfall im Strom beobachtet. Bei den Langzeitversuchen mit Kupfer zeigte sich ebenfalls ein kontinuierlicher Abfall des Stroms. Dieses

Absinken könnte von einer Inhibition eines Kationenkanals herrühren. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen Kanälen um Natriumkanäle handelt. Flonta et al. fanden heraus, dass Kupfer die Assoziationskonstante von Amilorid um ein Drittel herabsetzt (Flonta, DeBeirSimaels et al. 1998). Sie schlagen vor, dass Kupfer Amilorid hemmt, indem es die Bindungsstelle des Amilorid elektrisch maskiert. Diese Vermutungen können die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern. Kupfer hatte einen hemmenden Effekt auf den amiloridsensitiven Strom. Die Reaktion des Epithels auf 50µM Amilorid wurde durch die Anwesenheit von Kupfer deutlich herabgesetzt, bei 25µM Kupfer sogar in eine Stimulation umgewandelt. So könnte auch hier eine kompetitive Hemmung von Amilorid und Kupfer vorliegen, die um die Bindungsstelle in Natriumkanal ringen. Ob dieser Effekt von Kupfer wirklich durch den Natriumstrom getragen wird, könnten Versuche mit Na<sup>+</sup>-freier Lösung zeigen.

#### **VI.12.4 Wirkung von Kupfer auf den Calciumtransport**

Kupfer gilt als Blocker der apikalen Calciumkanäle CaT1 (TRPV6) und ECaC (TRPV5), die immun gegen Blocker der L-Typ-Kanäle wie Nifedipin und Verapamil sind (Peng, Brown et al. 2003). Ein Block dieser Kanäle konnte in den hier durchgeführten Versuchen allerdings nicht gefunden werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Peng et al. stiegen die Reaktionen auf Calcium unter Anwesenheit von Kupfer an. Bei 50µM Kupfer war diese Stimulation so groß, dass sie sogar statistisch gesichert werden konnte. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich in der Haut von *Lumbricus terrestris* Calciumkanäle befinden, die durch Kupfer stimuliert werden können.

Mit den vorhergehenden und später aufgeführten (siehe VI.13.4 Wirkung von Nickel auf den Calciumtransport) Ergebnissen können nun der L-Typ, der CaT1 und ECaC als Calciumkanäle ausgeschlossen werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, könnten weitere Versuche mit spezifischeren Blockern vorgenommen werden.

### **VI.13 Nickel**

#### **VI.13.1 Charakterisierung**

Nickel gehört der Gruppe VIIIb des Periodensystems an und hat die Ordnungszahl 28. Seine Atommasse beträgt 58,71g/mol und es weist 7 Radioisotope auf. Nickel kann in einer Reihe von Oxidationsstufen auftreten, wobei nur Ni<sup>2+</sup> bei den in den Böden vorliegenden pH-

Werten und Redoxbedingungen stabil ist. Mit seinem Ionenradius von 0,0065nm ähnelt es denen von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ . Nickel wird aus sulfidischen und oxidischen Erzen gewonnen und findet vor allem Verwendung bei der Herstellung rostfreier Stähle.

Nickeleintragung in den Boden:

- Landwirtschaft

Nickel ist in den meisten Phosphatdüngern nur in geringer Konzentration vertreten, so dass durch deren Einsatz die Konzentration im Boden nicht maßgeblich angereichert wird. Auch ist im Dung aus der Viehhaltung nur wenig Nickel enthalten. In Pestiziden findet Nickel keine Verwendung.

- Atmosphäre

Die größte anthropogene Nickelquelle ist die Verbrennung von Heiz- und Treibstoffen. Neben der Verwehung von Bodestäuben und Vulkanaktivitäten macht die vom Menschen verursachte Verschmutzung mit Nickel mehr als 80% aus (Alloway 1999).

- Klärschlämme

Die Nickelbelastung in Abwässern stammt maßgeblich aus der galvanischen Industrie. Nickel ist jedoch auch in vielen Haushaltsreinigern enthalten, wie z.B. in Seife, Scheuermittel oder Bleichpulver.

- Sonstige Quellen

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Anreicherung von Nickel im Boden sind die Emissionen aus Hüttenbetrieben. Die Freisetzung von Nickel aus Bergbalden ist enorm.

### **VI.13.2 Biologische Relevanz**

Seine biologische Bedeutung findet Nickel bei den Stoffwechselfvorgängen höherer Pflanzen. So ist es zum Beispiel ein Bestandteil des Enzyms Urease in Bohnen und ein Mangel an Nickel setzt bei Gerste die Keimungsfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit herab (Alloway 1999).

Nickel spielt eine wichtige Rolle in und für diverse Enzyme:

- Superoxid-Dismutase

Nickel induziert die Expression von Ni-Superoxid-Dismutase und ist an der Reifung einer Polypeptid-Vorform beteiligt.

- Urease  
Urease spielt eine wichtige Rolle im Stickstoff-Stoffwechsel von Pflanzen und Mikroorganismen und stellt einen Virulenzfaktor für einige menschliche und tierische Pathogene dar. Nickel ist dabei direkt an eine größere Untereinheit des Enzyms gebunden.
- Hydrogenase  
Hydrogenasen können in 4 Typen unterteilt werden, von welchen 2, NiFeSe und NiFe, Nickel enthalten. In der Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* ist Nickel ein Teil der H<sub>2</sub>-aktivierenden Region (Ragsdale 1998).
- Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase  
Acetogene und methanogene Bakterien enthalten ein bifunktionales Protein, welches aus 2 Untereinheiten besteht und die Aufgaben der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (CODH) und der Acetyl-CoA-Synthase (ACS) übernehmen kann. Die aktive Region der CODH besteht aus einer Nickel-Ionen-Brücke zu einem 4Fe-4S-Cluster und Nickel stellt in ACS eine Bindungsstelle für Methyl- und Carbonylgruppen dar.
- Methyl-CoM-Reduktase  
Auch in der Methyl-CoM-Reduktase ist Nickel enthalten, wo es in der Lage ist, eine Methylgruppe zu binden.

### VI.13.3 Wirkung von Nickel auf den Natriumtransport

Nickel zeigte einen durchweg signifikanten Effekt auf Potential, Strom und Widerstand.  $U_T$  und  $I_{SC}$  werden dabei gehemmt,  $R_T$  stimuliert. Der Abfall des Stroms resultiert entweder aus einem gesteigerten Transport von  $Cl^-$  in die Zelle, oder einem verminderten Transport von positiven Ladungen. Die Sekretion wird außer Acht gelassen, da Nickel apikal verabreicht wurde. Bezogen auf die bekannte Literatur handelt es sich wohl um eine Hemmung des Transports von positiven Ladungen. Da der Strom maßgeblich von Natrium getragen wird, liegt die Vermutung einer Hemmung der Natriumkanäle nahe.

Der Effekt von Nickel auf den Natriumtransport ist abhängig vom untersuchten Gewebe. So hat  $Ni^{2+}$  einen stimulierenden Effekt bei nativen Epithelien wie der Amphibienhaut, jedoch hemmt es den  $Na^+$ -Transport von in Oocyten expremierten Ratten- oder Maus-ENaCs (Cucu, Simaels et al. 2003).

Diesen hemmenden Effekt beobachteten Segal et al. an rENaCs, wo Nickel bis zu 60% des Stromes durch diese Kanäle zu hemmen vermochte (Segal, Cucu et al. 2002). Dabei senkte

Nickel die Anzahl an aktiven Kanälen. Sheng et al. fanden in Oocyten ebenfalls eine hemmende Wirkung von Nickel auf den Natriumstrom (Sheng, Perry et al. 2002). Sie setzten Nickel in den Konzentrationen von 0,01 bis 50mM ein. Dabei stellten sie eine Abhängigkeit zwischen Konzentration und relativem Strom fest.

Die gleichen Effekte konnten auch im Verlauf dieser Arbeit beobachtet werden, ebenso könnte eine Dosisabhängigkeit vorhanden sein. Zwar wurden nur zwei Konzentrationen eingesetzt (100 und 500 $\mu$ M), tendenziell zeigt sich jedoch eine Steigerung der Hemmung mit steigender Konzentration. Damit kann nun festgestellt werden, dass die Reaktion auf Nickel durch die Hemmung der Natriumkanäle bedingt ist und dadurch zum Stromabfall führt.

Sheng et al. vermuteten, dass in der funktionellen Domäne des ENaCs Bindungsstellen für Metallionen lokalisiert sind (Sheng, Perry et al. 2002). Hierbei hat  $\text{Ni}^{2+}$  eine höhere Affinität als andere divalente Ionen. Wie in Metalloproteinen hängen dabei die Bindungsmöglichkeiten unter anderem von Größe, relativer Ladung, Polarisierbarkeit und Löslichkeit ab. Sheng ging jedoch davon aus, dass die Größe des Atoms keine so wichtige Rolle dabei spiele.  $\text{Mg}^{2+}$  als kleineres Kation habe eine wesentlich geringere inhibierende Wirkung als Nickel. Zink jedoch, mit etwa gleichem Radius wie Nickel, zeigte wiederum in Shengs Untersuchungen keine Wirkung. Anders in dieser Arbeit (siehe dazu V.17 Zink).

#### **VI.13.4 Wirkung von Nickel auf den Calciumtransport**

Nickel stellt nun, laut Lee et al., einen Blocker der T-Typ-Calciumkanäle dar (Lee, Gomora et al. 1999). Dabei würde es zwei Funktionen erfüllen: Es blockt den Strom und verschiebt die Spannungsabhängigkeit des Kanals. Zwar konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Effekt von Nickel auf den calciuminduzierten Strom gefunden werden, jedoch zeigte sich erst bei einer Konzentration von 1mM Nickel eine Hemmung. Bei 250 und 500 $\mu$ M hingegen fand eine Stimulation der Calciumreaktion statt. Dies ist kein eindeutiger Beweis für das Vorkommen eines Calciumkanals des T-Typs. Es besteht die Möglichkeit, dass zwar T-Typ-Kanäle vorhanden sind, diese aber sich in der Muskelschicht unterhalb des Epithels befinden (siehe oben). Dort würde Nickel dann erst in höheren Dosen wirken. Dem widersprechen würden die Ergebnisse mit Ethosuximid. Ethosuximid ist, bedingt durch seine Größe, schlechter transportierbar als Nickel und müsste daher also erst in noch größeren Konzentrationen wirken.

Lee et al. postulierten, dass Nickel, abhängig vom Kanaltyp, in unterschiedlichen Konzentrationen hemmt (Lee, Gomora et al. 1999). Der  $\alpha$ 1H-Kanal wird bereits von geringen Dosen Nickel gehemmt, wohingegen für die Hemmung des  $\alpha$ 1L und des  $\alpha$ 1G höhere Konzentra-

tionen nötig sind. Dies legt nun die Vermutung nahe, dass Calciumkanäle des  $\alpha 1L$ - und/oder  $\alpha 1G$ -Typs vorhanden sind.

## VI.14 Quecksilber

### VI.14.1 Charakterisierung

Die Ordnungszahl von Quecksilber ist 80 und seine relative Atommasse beträgt 200,59g/mol. Je nach vorherrschenden Redoxbedingungen kann es in 3 Oxidationsstufen, Hg,  $Hg_2^{2+}$  und  $Hg^{2+}$ , vorkommen. Das metallische Quecksilber und  $Hg^{2+}$  sind die Formen, die man üblicherweise im Boden antrifft. Schon die alten Ägypter konnten im 6. Jahrhundert vor Christus mit Quecksilber und Zinn/Kupfer Amalgame herstellen. Zinnober und metallisches Quecksilber fanden etwa zur gleichen Zeit Verwendung in der chinesischen und indischen Medizin. Die Nutzung des Metalls ist in der heutigen Zeit starken Veränderungen unterworfen. Während früher Quecksilber zur Gewinnung von Silber und Gold aus Erzen und zur Herstellung von Knallquecksilber genutzt wurde, findet man es heute noch in manchen elektrischen Geräten, in Chlor-Alkali-Anlagen und in der Zahnmedizin.

Quecksilbereintrag in den Boden:

- Landwirtschaft

Quecksilber in landwirtschaftlich genutzten Böden kommt aus Düngern, Kalk und Gülle. Die höchsten Werte findet man dabei in Phosphatdüngern. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts werden Quecksilberverbindungen auch als Fungizide und zur Desinfizierung von Saatgut eingesetzt.

- Atmosphäre

Der Gehalt an Quecksilber in der Atmosphäre stammt aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe und aus konsumbedingten Emissionen von Abfallverbrennungsanlagen. Es liegt in der Luft als metallische Form vor.

- Klärschlämme

Der in Abwässern enthaltene Anteil von Quecksilber stammt aus dem Bergbau und der Verhüttung von Erzen, sowie aus industriellen Verfahren. Dabei wird es für Quecksilberkathoden im Chlor-Alkali-Verfahren zur Herstellung von Chlor und Natronlauge verwendet.

### VI.14.2 Biologische Relevanz

Quecksilber und seine Salze weisen unterschiedliche Giftigkeit auf. Quecksilber(I)-chlorid wird in nur sehr kleinen Mengen resorbiert und wurde früher als Abführmittel eingesetzt. Das leicht wasserlösliche Quecksilber(II)-chlorid wird als Desinfektionsmittel eingesetzt und gehört zu den stärksten Ätzgiften. Ionogene Quecksilberverbindungen reagieren leicht mit freien SH-Gruppen von Proteinen. Sie wirken als starke Enzyminhibitoren und finden als solche in der Biochemie Verwendung. Chelatbildner sind jedoch in der Lage, solche Blockaden aufzuheben.

Quecksilber interagiert mit den GABA-aktivierten Chloridkanälen, erhöht die Freisetzung von Transmittern in den neuromuskulären Spalt des Frosches, reduziert die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, verhindert Phosphorylierung und moduliert den Metabolismus der mRNA (Büsselberg, Pekel et al. 1994).

### VI.14.3 Wirkung von Quecksilber auf den Natriumtransport

Den inhibitorischen Effekt, den Quecksilber auf das Epithel der Regenwurmhaut zeigte, trat erst mit zunehmenden Konzentrationen auf. Während  $5\mu\text{M Hg}^{2+}$  keine Reaktion hervorrief, waren  $10$  und  $20\mu\text{M Hg}^{2+}$  in der Lage, die Parameter signifikant zu beeinflussen. Zusätzlich dazu belegten die Langzeitversuche mit  $20\mu\text{M}$  Quecksilber, dass es sich nicht um kurzzeitige Effekte des Gewebes handelte. Diese Konzentration beeinflusste  $I_{\text{SC}}$  so maßgeblich, dass nach deren Perfundierung der Strom mit massiven Schwankungen antwortete (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). Den gleichen zunehmenden Effekt fanden bereits Suwalsky et al. 2000 an der Haut von *Pleurodema thaul* (Suwalsky, Norris et al. 2000). Sie stellten fest, dass zweiwertiges Quecksilber, neben dem signifikanten Effekt auf die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase auf der basolateralen Seite, auch einen deutlichen Einfluss bei der Gabe auf die apikale Seite zeigte. So sanken, wie auch in dieser Arbeit, der Strom und die Potentialdifferenz mit zunehmender Konzentration stärker ab. Suwalsky et al. vermuteten verschiedene Wirkmechanismen hinter der Reaktion des Gewebes auf Quecksilber:

- die Lipiddoppelschicht verliert ihre Stabilität
- Interaktionen mit Membranproteinen führen zu deren Konformationsänderungen
- Reaktionen mit Ionenkanälen oder mit Rezeptorproteinen
- Bindung an Ionenkanal-Rezeptor-Komplexen
- Herabsetzung der Wasserpermeabilität von Aquaporinen

Fluoreszenz-, NMR- und Röntgenanalysen untermauerten die ersten beiden Mechanismen, indem sie zeigten, dass Quecksilber mit den Aminogruppen der Phospholipide und den

Cysteiny-Sulphydryl-Gruppen der Proteine reagierten. Für den Abfall im Strom machten Suwalsky et al. jedoch die Interaktion mit Ionenkanälen verantwortlich. So ist  $\text{Hg}^{2+}$  in der Lage, an SH-Gruppen der Natriumkanäle zu binden und diese zu blockieren. Ergebnisse aus V.16.1 Quecksilber und Amilorid sprechen ebenfalls für diesen Mechanismus. Quecksilber zeigte bereits in der geringsten Konzentration von  $5\mu\text{M}$  einen signifikanten Einfluss auf den amiloridsensitiven Strom. So hemmte diese Konzentration die Reaktion des Epithels auf  $50\mu\text{M}$  Amilorid. Diese Hemmung ging so weit, dass bei  $20\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  die eigentliche Inhibition von Amilorid in eine Stimulierung umschlug. Die Wirkung von Quecksilber auf die epithelialen Natriumkanäle ist damit eindeutig belegt.

#### **VI.14.4 Wirkung von Quecksilber auf den Calciumtransport**

Die Meinungen über die Wirkung von Quecksilber auf den Calciumtransport driften in der Literatur auseinander. Yeh et al. fanden heraus, dass eine Übernachtsinkubation von MDCK-Zellen in Quecksilber zu einer Erhöhung der intrazellularen Calciumkonzentration führte (Yeh, Chung et al. 2004). Sie vermuten, dass die Proteinkinase-C in dem  $\text{Hg}^{2+}$ -induzierten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eine Rolle spielt. Dabei würden Calciumkanäle des L-Typs aktiviert, die den verstärkten Influx von Calcium ermöglichen.

Das Labor um Büsselberg und Pekel jedoch fanden eine entgegengerichtete Wirkung. Pekel et al. ermittelten, dass Quecksilber in der Lage ist, Calciumkanäle des T-, N- und L-Typs an DRG-Neuronen von Ratten und am Abdominalganglion von *Aplysia californica* zu blockieren (Pekel, Platt et al. 1993). Auch Büsselberg et al. fanden eine Blockade dieser Kanäle in DRG-Neuronen durch Quecksilber (Büsselberg, Pekel et al. 1994).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Ergebnissen konnte in dieser Arbeit keine signifikante Wirkung von Quecksilber auf den Calciumtransport gefunden werden. Zwar zeigte sich tendenziell bei den Konzentrationen von  $5$  und  $10\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  eine leichte Stimulation von  $I_{\text{SC}}$ , doch konnte diese nicht statistisch gesichert werden. Dieses Ergebnis würde mit der Arbeit von Yeh et al. konform laufen. Anders sieht dies bei der Konzentration von  $20\mu\text{M}$  Quecksilber aus. Dort nun zeigt sich eine angedeutete Hemmung des calciuminduzierten Stroms, was die Theorie von Pekel et al. und Büsselberg et al. unterstützen würde. Anhand dieser Ergebnisse kann jedoch nicht davon gesprochen werden, dass Quecksilber einen signifikanten Einfluss auf den calciuminduzierten Strom an der Haut des Regenwurms hat. Die Wirkung beschränkt sich auf die Modulation des Natriumtransports über das Epithel.

## VI.15 Zink

### VI.15.1 Charakterisierung

Zink ist ein für Menschen, Tiere und höhere Pflanzen essentielles Spurenelement. Es hat die Ordnungszahl 30 und eine relative Atommasse von 65,39g/mol. Zink kommt hauptsächlich in seiner zweiwertigen Form,  $Zn^{2+}$ , vor und findet sich in vielen Mineralien. Die weitest verbreiteten Mineralien sind ZnS-Mineralien wie Zinkblende (Sphalerit) und Wurtzit.

Zinkeintrag in den Boden:

- Landwirtschaft

Die Eintragung von Zink in der Landwirtschaft erfolgt durch Klärschlämme. Eine unregelmäßige Ausbringung dieser Schlämme kann zu einer Ansammlung von Zink im Boden führen, die eine potentielle Gefahr für Pflanzen darstellt.

- Atmosphäre

Zink als Faktor der Luftverschmutzung resultiert im Wesentlichen aus der Verbrennung von Kohlen und anderen fossilen Brennstoffen. Zusätzliche atmosphärische Quellen stellen Vulkanausbrüche und äolische Stäube dar.

- Agrochemikalien

Eine weitere Quelle für die Zinkbelastung des Bodens sind die in der Landwirtschaft eingesetzten Düngemittel und Pestizide. So enthalten z.B. einige Pestizide Zinkgehalte bis zu 25% (Alloway 1999).

### VI.15.2 Biologische Relevanz

Höhere Pflanzen nehmen Zink vorwiegend in seiner zweiwertigen, ionisierten Form auf. Ein Mangel an Zink kann, besonders bei Ackerpflanzen wie Mais, Hirse, Flachs oder Hopfen zu Zwischenader-Chlorose, Kümmerwuchs, Stängel- und Blattmissbildungen und punktförmige violette Verfärbung an Blättern führen.

Zink stellt als metallischer Faktor von Enzymen einen funktionellen, strukturellen oder steuernden Cofaktor dar. Es aktiviert z.B. die alkalische Phosphatase, Lecithinase und diverse Dipeptidasen.

Zinkenthaltende Enzyme sind z.B.:

- Carboanhydrase

Carboanhydrase liegt hauptsächlich in Erythrozyten vor, wo das Enzym die Reaktion von Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) zu Kohlensäure ( $H_2CO_3$ ) katalysiert.

- Carboxypeptidase  
Carboxypeptidasen sind Enzyme, welche die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen vom C-terminalen Ende der Peptide aus katalysieren.
- Alkoholdehydrogenase  
Das Enzym Alkoholdehydrogenase katalysiert die oxidative Metabolisierung von primären Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden.
- DNA-Polymerase  
Die Polymerase ist in der Lage, für den bestehenden DNA-Einzelstrang einen komplementären Strang zu synthetisieren und somit die DNA in die Doppelstruktur zu überführen.

### VI.15.3 Wirkung von Zink auf den Natriumtransport

Der ENaC weist bei hohen Natriumkonzentrationen eine Selbstinhibition auf. Chraïbi und Horisberger fanden bei ihren Versuchen am menschlichen ENaC, exprimiert in *Xenopus*-Oocyten, dass diese Selbsthemmung vom Kanalprotein selbst ausgeht (Chraïbi and Horisberger 2002). Auch Gilbertson und Zhang fanden eine Na-Selbstinhibition an Geschmacksrezeptorzellen, die mit zunehmender Natriumkonzentration immer ausgeprägter wurde (Gilbertson and Zhang 1998). Zudem sei die Selbstinhibition an die Anwesenheit von amiloridsensitiven Natriumkanälen gekoppelt. Auch in früheren Arbeiten fand sich dieses Phänomen (Krumm 2002). Das Epithel von *Lumbricus terrestris* zeigte eine ausgeprägte Hemmung des amiloridsensitiven Stroms durch hohe Konzentrationen von Natrium. So zeigte sich unter pw-Bedingungen eine signifikante Reaktion auf 50µM Amilorid, die wiederum unter den hohen Natriumkonzentrationen der RR auf der apikalen Seite ausblieb. Es zeigte sich auch, dass bei einem Wechsel von niedriger (pw) auf hohe (RR) Natriumkonzentration eine kurzer „Overshoot“ in der Stromkurve sichtbar wurde und sich dieser anschließend wieder auf das Ausgangsniveau von pw einpendelte. Sheng et al. fanden nun heraus, dass Zink an Maus-ENaCs in *Xenopus*-Oocyten diese Selbstinhibition aufhob (Sheng, Perry et al. 2004). Die Ergebnisse von Teil V.17.3 Regenwurmringer unter Zink widerlegen diese Vermutung für das Regenwurmintegument. Durch die Anwesenheit von Zink konnte der Strom nicht dazu stimuliert werden, sich unter RR-Bedingungen auf einem höheren Niveau als unter pw-Bedingungen einzupendeln. Es konnte mit einer höheren Konzentration von Natrium kein deutlich höherer Kurzschlussstrom hervorgerufen werden. Zink hat daher keinen Einfluss auf die Selbsthemmung hoher Natriumkonzentrationen auf die epithelialen

Natriumkanäle. Denn, im Gegensatz dazu, hemmt  $Zn^{2+}$ , bei einer Perfundierung von der apikalen Seite,  $U_T$  und  $I_{SC}$  und stimuliert  $R_T$  signifikant. Bereits bei  $10\mu M Zn^{2+}$  fällt  $U_T$  von  $0,4\pm 2,1$  auf  $-2,4\pm 1,9mV$  und  $I_{SC}$  von  $-0,47\pm 0,38$  auf  $-0,73\pm 0,32\mu A$  ab.  $R_T$  steigt von  $8141\pm 1419$  auf  $10203\pm 1931\Omega$  an. Zwar ist die Konzentration von Natrium unter pw-Bedingungen gering, so sollte jedoch, wenn Zink die Selbstinhibition tatsächlich aufhebt, der Strom zumindest gleich bleiben. Da er jedoch absinkt, kann davon nicht die Rede sein. Auch ist dies ein Indiz dafür, dass Zink selbst nicht transportiert wird. Denn durch seine zweifach positive Ladung sollte ein Zinktransport den Strom ansteigen lassen.

Um den Wirkmechanismus von Zink nun näher zu untersuchen, wurden Experimente mit Amilorid durchgeführt. Bereits 2002 sagten Sheng et al. aus, dass Zink keinen inhibitorischen Effekt auf die ENaCs besitzen würde (Sheng, Perry et al. 2002); 2004 sogar, dass Zink den amiloridsensitiven Strom stimuliere (Sheng, Perry et al. 2004). Dem entgegen steht die Arbeit von Amuzescu et al. an in *Xenopus* exprimierten Ratten-ENaCs, die Zink als einen Blocker von epithelialen Natriumkanälen identifizierten (Amuzescu, Segal et al. 2003). Darin sagen sie, dass Zink nicht mit Natrium um die Inhibition des Kanals konkurriert (siehe Selbstinhibition) oder die Ladung des Tores verändern, obwohl eine elektrostatische Interaktion möglich sei. Wie Amuzescu et al. fand in den Versuchen zu dieser Arbeit ein Absinken des Stroms auf Zink statt (Amuzescu, Segal et al. 2003). Die Experimente mit  $50\mu M$  Amilorid zeigten, dass Zink ab der Konzentration von  $20\mu M$  einen inhibitorischen Effekt auf den amiloridsensitiven Strom hatte. Bei  $50\mu M$  wurden sogar alle drei Parameter signifikant in ihrer Reaktion gehemmt. Diese Wirkung resultiert daraus, dass Zink direkt die Pore blockiert und so den Transport von Natrium inhibiert.

#### **VI.15.4 Wirkung von Zink auf den Calciumtransport**

Zink ist in der Lage, den Calciumtransport durch T-, L- und N-Typ-Kanäle zu blockieren. Büsselberg et al. fanden diese Wirkung an der Zellkultur von DRG-Neuronen der Ratte bestätigt (Büsselberg, Pekel et al. 1994). Dabei beobachteten sie, dass die T-Typ-Kanäle sensitiver gegenüber Zink sind als die L- und N-Typ-Kanäle. Es setzt die Aktivierungsschwelle dieser Kanäle herauf, indem es mit beispielsweise SH-Gruppen der Proteine reagiert und somit die Ladung der Membranoberfläche verändert.

Marshall ermittelte an Fischkiemen, dass Zink in gleicher Art und Weise wie Calcium aufgenommen würde und dazu sogar die gleichen Kanäle passiere (Marshall 2002). Dabei

hemmen diese beiden Ionen sich gegenseitig, d.h. Calcium die Aufnahme von Zink, und Zink die Aufnahme von Calcium.

Vergleichbare Reaktionen konnten am Epithel der Regenwurmhaut nicht beobachtet werden. Es findet weder ein Transport von  $Zn^{2+}$ -Ionen statt (siehe VI.15.4 Inhaltsverzeichnis), noch konnte eine Inhibition des calciuminduzierten Stroms ermittelt werden. Zink hatte dabei weder auf  $U_T$ , noch auf  $I_{SC}$  oder  $R_T$  einen signifikanten Einfluss was die Reaktion auf 2mM Calcium anbelangt.

## VI.16 Natriumtransport

In Abbildung 36 ist zusammenfassend noch einmal die Wirkung unterschiedlicher Chemikalien und Metalle auf die Amiloridreaktion aufgeführt. Viele von den getesteten Substanzen zeigen bereits bei geringen Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Amiloridreaktion und damit auf die im Epithel vorhandenen ENaCs. Unter den getesteten Substanzen fanden sich Blei, Kobalt, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink, die in zu hohen Konzentrationen im Boden zu erheblichen Belastungen für Pflanzen- und Tierwelt führen können. *Lumbricus terrestris* stellt nun in diesem Zusammenhang den idealen Bioindikator dar, da er in fast allen Böden heimisch ist. Eine Gegenüberstellung der Richtlinien des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, BMU, mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen zeigt die Abweichungen zwischen erlaubten und bereits wirksamen Konzentrationen auf (siehe Tabelle 48).

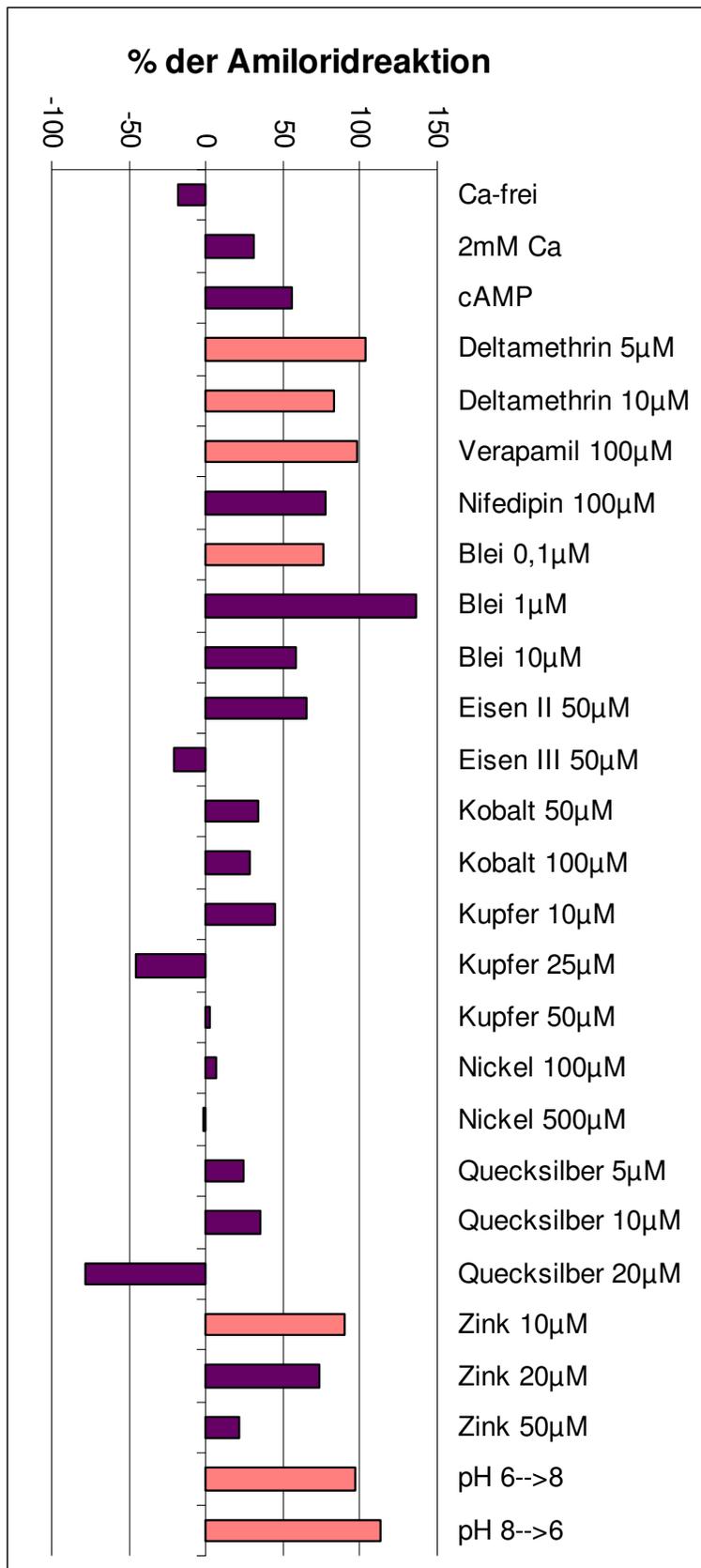
**Tabelle 48 Vergleich der Grenzwerte des BMU und der in dieser Arbeit ermittelten, wirksamen Konzentrationen. A Bodenschutzverordnung, B Wirkungspfad Boden - Grundwasser**

A	BBodSCHV		
	Kinderspielflächen	Wohngebiete	BWK
Substanz	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$
Blei	965	1931	1
Nickel	1193	2385	100
Quecksilber	50	100	5

B	Wirkungspfad Boden - Grundwasser	BWK
Substanz	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$
Blei	121	1
Kobalt	848	50
Kupfer	787	10
Nickel	852	100
Quecksilber	5	5
Zink	7646	20

Die Grenzwerte wurden der BBodSchV – Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung von 12. Juli 1999 entnommen und umgerechnet. Die bereits wirksamen Konzentrationen stellen die niedrigsten Konzentrationen dar, die eine signifikante Wirkung auf die Amiloridreaktion zeigten. BWK = bereits wirksame Konzentration

Es ist nun sehr leicht erkennbar, dass bereits erheblich unter den Grenzwertkonzentrationen signifikante Reaktionen der aufgeführten Substanzen am Epithel der Regenwurmhaut auftreten. Im Fall von Blei liegt der Grenzwert in Wohngebiet 1931fach über der bereits wirksamen Konzentration. Hier ist nun die Möglichkeit gegeben, mit elektrophysiologischen Untersuchungen mittels der Ussing-Kammer, neue und genauere Grenzwerte für die Verschmutzung mit Schwermetallen zu ermitteln. Der Regenwurm, der nahezu ubiquitär vorkommt und in regem Stoffaustausch mit seiner Umwelt steht, stellt dafür ein ideales Forschungsmodell dar.



**Abbildung 36: Wirkungen der untersuchten Substanzen auf die Amiloridantwort des Regenwurminteguments.** ■ kennzeichnet signifikante Reaktionen, ■ kennzeichnet nicht signifikante.

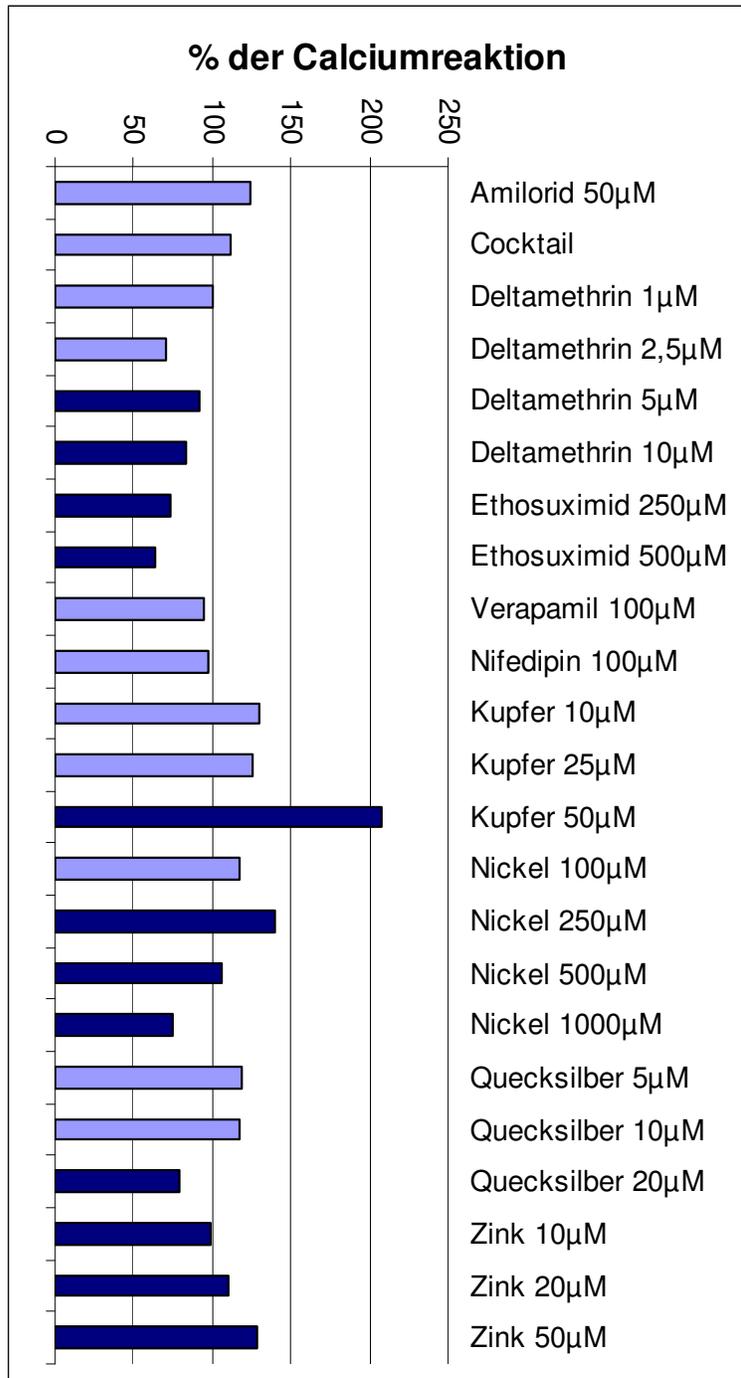
## VI.17 Calciumtransport

Im Zuge der Untersuchungen zum Transport von Calcium wurden bekannte Blocker verschiedener Kanaltypen getestet. Abbildung 37 zeigt alle verwendeten Substanzen. Dabei wurden 4 Typen von Calciumkanälen getestet, so der T-Typ, L-Typ, N-Typ und die CaT1/ECaC-Kanäle. Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden:

- T-Typ: Als Blocker wurden Zink, Nickel und Ethosuximid verwendet. Zwar zeigte Zink keine Wirkung auf den Transport von Calcium, jedoch hatten Nickel und Ethosuximid einen signifikanten Einfluss auf die Calciumreaktion. Calciumkanäle des T-Typs könnten somit im Epithel der Regenwurmhaut vorhanden sein.
- L-Typ: Der L-Typ-Calciumkanal ist blockierbar durch Zink, Quecksilber, Nifedipin und Verapamil. Allerdings zeigte keiner dieser bekannten Blocker eine nennenswerte Wirkung auf die Reaktion des Gewebes auf 2mM Ca. Daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Typ von Kanal nicht im Integument des Regenwurms vorhanden ist.
- N-Typ: Für die Kanäle des N-Typs wurde Zink als Blocker getestet. Wie bei den beiden oberen Kanaltypen zeigte Zink auch hier keine Wirkung. Ein Vorhandensein des N-Typs kann somit ausgeschlossen werden. Es bietet sich jedoch an, einen weiteren Blocker diesbezüglich an der Regenwurmhaut zu testen.
- CaT1/ECaC: Kupfer wurde als Blocker dieses Kanaltyps am Epithel getestet. Es zeigte sich allerdings keine signifikante Wirkung auf die Calciumreaktion. Dieser Kanaltyp konnte also auch nicht in der Haut nachgewiesen werden. Doch auch hier sollte dieses Ergebnis mittels eines zweiten Blockers überprüft werden.

Die ersten drei Typen von Calciumkanälen sind typische Vertreter von Kanälen von erregbaren Geweben. Daher wäre ein Vorkommen im Epithel der Regenwurmhaut eher ungewöhnlich. Allerdings handelt es sich beim Präparat der Integuments um ein „Kombination“ aus Epithel und Muskelgewebe. Da die Haut aufgrund ihrer Beschaffenheit nicht gestrippt werden kann und somit die Muskelsträngen im Präparat verbleiben, kann nie ganz ausgeschlossen werden, dass Reaktionen auch durch die Muskelschicht bedingt sind. Die Kanäle des CaT1/ECaC-Typs hingegen sind typischer Weise in Epithelien vorhanden. Dort übernehmen sie, anders als die oben erwähnten, den Transport von Calcium und sind nicht an der Erregung beteiligt. Daher wäre ihr Vorkommen in der Regenwurmhaut wahrscheinlicher. Da dies aber in den Versuchen nicht bestätigt werden konnte, muss Calcium auf einem anderen

Weg in die Zelle gelangen. Dieses umfassende Gebiet der Calciumkanäle lässt somit noch eine Menge Freiraum für zukünftige Untersuchungen an dem Epithel der Haut von *Lumbricus terrestris*.



**Abbildung 37:** Dargestellt sind die getesteten Substanzen und ihre Wirkung auf die Calciumreaktion des Epithels. ■ kennzeichnet signifikante Reaktionen, □ nicht signifikante.

## VI.18 pH-Wert

Der pH-Wert spielt eine wichtige Rolle beim Stofftransport über Epithelien. So ist er in der Lage, (Transport-) Proteine durch Ladungsverschiebung so zu verändern, dass sie ihrer Aufgabe nicht mehr nachkommen können. Extreme pH-Werte führen sogar zur Denaturierung der Proteine. Der pH-Wert spiegelt jedoch nur die Konzentration an  $H^+$ -Ionen wieder. Diese können, wie andere Ionen auch, ebenfalls transportiert werden und beschränken ihre Wirkung nicht nur auf die Beeinflussung von Proteinen. Im Laufe der Zeit entwickelten sich verschiedene Transportmechanismen für die Protonen:

- P-Typ-ATPasen: Diese Typen der ATPasen sind meist Monomere mit zehn oder weniger Membrandurchgängen und transportieren anorganische Kationen wie  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , und andere. Ein typischer Vertreter ist die  $Na^+K^+$ -ATPase.
- F-Typ-ATPase ( $F_0/F_1$ -ATPasen): Diese Oligomere sind in der Plasmamembran von Eubakterien und in den Thylakoiden der Chloroplasten vertreten. Sie transportieren  $H^+$  und seltener  $Na^+$ .
- V-Typ-ATPasen: Dieser Typ von ATPasen errichtet einen  $H^+$ -Gradienten. Hierbei handelt es sich um ein Oligomer, welches mit den F-Typ-ATPasen in eine Superfamilie eingruppiert wird.

Durch diese Transporter kann nun ein Gradient an Protonen aufgebaut werden. Die Zelle kann diesen Gradienten dazu nutzen, sekundär aktive Transporte durchzuführen. Dazu gehört z.B. auch der  $Na^+H^+$ -Ausstauscher oder der  $K^+H^+$ -Antiporter.

In früheren Versuchen konnte beobachtet werden, dass manche Kurvenverläufe ein sehr unruhiges Bild zeigten und die Werte teil massiven Schwankungen unterlagen. Daher wurden Versuche mit verschiedenen pH-Werten gestaltet, die evtl. Aufschluss über dieses Verhalten geben sollten. Wie in Abbildung 30 sichtbar, verlief die Kurve von  $I_{SC}$  wesentlich ruhiger bei pH-Werten abweichend von pH7,4. Daher wurde die pw-Lösung daraufhin mit dem pH-Wert 7 angesetzt, um ein optimaleres Ergebnis zu erhalten.

Versuche, bei denen von einem apikalen pH-Wert von 6 auf 8 und umgekehrt gewechselt wurde, zeigten signifikante Änderungen in  $U_T$ ,  $I_{SC}$  und  $R_T$ . Bei dem Wechsel von pH6 auf pH8 fielen Potential, Strom und Widerstand ab, während bei dem Wechsel von pH8 auf pH6 in allen drei Parametern ein Anstieg erfolgte. Das bedeutet, dass bei niedrigerem pH-Wert, und damit verbunden höherer  $H^+$ -Konzentration, ein höherer Strom über das Epithel fließt.

Dieser kann nun aus einem höheren Transport von Protonen resultieren oder durch sekundäre Transportvorgänge gesteigert sein. Lyall et al. trugen Zusammenhänge zwischen pH-Wert und Natriumtransport zusammen ((Lyall, Feldman et al. 1995). Dabei bewirkte ein steigender pH eine höhere Aktivität der apikalen Natriumkanäle, eine gesteigerte apikale Membranleitfähigkeit für Natrium und einen verstärkten transepithelialen Natriumtransport. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten. Das Epithel der Regenwurmhaut reagierte bei steigendem pH-Wert mit sinkendem Strom und, damit verbunden, mit sinkendem Transport von positiven Ladungen von apikal nach basolateral.

Die Erklärung für den steigenden Strom mit sinkendem pH-Wert kann in dem sich aufbauenden Protonengradienten gesucht werden. Da nun das Konzentrationsgefälle an  $H^+$ -Ionen vom Zellinneren (pH7,4) nach Zelläußeren (pH6) hin zunimmt, erhöht sich auch die Triebkraft für den  $Na^+-H^+$ -Ausstauscher der apikalen Zellmembran. Durch ihn strömen nun vermehrt Protonen nach außen und, im Gegenzug, Natriumionen nach innen. Diese Zunahme des Kationentransports spiegelt sich in einem Ansteigen des Stroms wieder.

Nun besteht auch die Möglichkeit, dass durch den veränderten pH-Wert die Transportproteine in ihrer Struktur, und damit in ihrer Funktion, verändert werden. Denkbar wäre z.B. eine Ladungsverschiebung im ENaC, die nun einen gesteigerten Transport von Natriumionen bewirkt. Um diese Vermutung zu testen, wurde der Einfluss vom pH-Wert auf die Amiloridreaktion untersucht. Wurde  $50\mu M$  Amilorid zunächst unter pH6 gegeben und anschließend die Gabe unter pH8 wiederholt, so zeigte sich kein Unterschied in den Reaktionen. Startete der Versuch mit pH8 und wurde danach auf pH6 gewechselt, so konnte auch hier keine signifikante Wirkung festgestellt werden. Der ENaC wird also nicht durch die unterschiedlichen pH-Werte beeinflusst. Der Stromanstieg ist also durch andere Vorgänge bedingt und nicht durch die gesteigerte Aktivität des ENaCs hervorgerufen.

## VII Zusammenfassung

Schwermetalle stellen oftmals eine erhebliche Belastung der Umwelt dar. Wie sich diese im Boden auf dessen Bewohner auswirken, konnte im Verlauf dieser Arbeit anhand des Regenwurms *Lumbricus terrestris* gezeigt werden. Dazu wurde die current-clamp-Technik verwendet und Messungen des Ionentransports über das Integument der Regenwurmhaut durchgeführt.

Blei, Eisen(II), Eisen(III), Kobalt, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink zeigten signifikante Wirkungen auf den Ionentransport im Regenwurmepithel. Um ihre Wirkweise detaillierter zu untersuchen, wurde der Einfluss der Schwermetalle auf den Transport von Calcium und Natrium über das Gewebe mit elektrophysiologischen Methoden erfasst. Dazu wurden die Natrium-, bzw. Calciumreaktionen des unbehandelten Gewebes den Reaktionen des Gewebes unter Schwermetalleinfluss entgegengestellt.

Die Reaktion des Epithels auf die Gabe von 2mM Calcium wurde meist erst durch höhere Konzentrationen der Metalle beeinflusst, wie die Versuche mit Kupfer, Nickel und Quecksilber zeigten. Nickel und Quecksilber wirkten in hohen Dosen hemmend auf den Strom, während Kupfer eine stimulierende Wirkung hatte. Nur Zink wirkte bereits in geringen Konzentrationen signifikant stimulierend auf den Calciumeinstrom.

Die Wirkung der Metallionen auf die Amiloridreaktion, und damit verbunden auf den Natriumtransport, war wesentlich stärker. Eisen(II), Eisen(III), Kobalt, Kupfer, Nickel und Quecksilber wirkten bereits in geringen Konzentrationen auf die Amiloridantwort. Eisen(II) und Kobalt setzten die Reaktion des Gewebes auf Amilorid herab. Eisen(III), Kupfer, Nickel und Quecksilber kehrten in hohen Konzentrationen sogar die Reaktionsrichtung von Amilorid von einer Hemmung in eine Stimulierung um. Bei Blei und Zink setzte eine hemmende Wirkung erst bei etwas höheren Konzentrationen ein.

Mit gleichartig gestalteten Versuchen wurden die Calciumkanalblocker Ethosuximid, Verapamil und Nifedipin, das Pflanzenschutzmittel Deltamethrin und der second messenger cAMP getestet. Auf den Calciumtransport zeigten nur Deltamethrin in hohen Dosen und Ethosuximid einen hemmenden Effekt. Auf den Natriumtransport wirkten hingegen nur Nifedipin und cAMP hemmend.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Schwermetalle, Metalle oder organische Substanzen in der Lage sind, den Transport von Calcium oder Natrium über das Epithel der Regenwurmhaut zu beeinflussen und zu modulieren. Teilweise sind bereits so geringe Konzentrationen wirksam, dass Spuren im Boden ausreichen, um die Ionenresorption von *Lumbricus terrestris*

zu verändern. *L. terrestris* stellt durch seine ubiquitäre Verbreitung in allen Arten von Böden einen idealen Bioindikator da. Mit ihm als Modellorganismus ist man nun in der Lage, neue Maßstäbe und Meßmethoden in der Ökotoxikologie zu definieren.

## VIII Summary

Heavy metals are often a sizable burden for the environment. Its influence on soil living animals are presented in this work considering *Lumbricus terrestris* as an example. The current clamp technique was used and the ion transport across the integument of earthworm skin was measured.

Lead, iron(II), iron(III), cobalt, copper, nickel, mercury and zinc showed significant control on the transport of ions across the earthworm epithelium. The effect of these heavy metals on the transport of calcium and sodium across the tissue was investigated with electrophysiological methods to specify its importance. Therefore the responses of the untreated epithelium to sodium and calcium were compared with the responses to these ions under heavy metal influence.

The experiments with copper, nickel and mercury showed that the effect of calcium on the tissues was modulated only by higher concentrations. Nickel and mercury had a decreasing sway at higher doses, whereas copper was increasing the effect. Only zinc showed a significantly stimulating influence on the calcium influx at lower concentrations.

The effects of the metal ions on the reactions of amiloride were stronger than on the ones of calcium. Iron (II), iron(III), cobalt, copper, nickel and mercury showed already in low concentrations effects on the amiloride control. Iron(II) and cobalt reduced the effect of amiloride. High concentrations of iron(III), copper, nickel and mercury even changed the inhibition of amiloride into a stimulation of  $I_{SC}$ . The inhibitory effects of lead and zinc first showed up at higher doses.

With the same form of experiments the calcium channel blocker ethosuximide, verapamil and nifedipine, the pesticide deltamethrin and the second messenger cAMP were tested. The calcium transport was only affected by high concentration of deltamethrin, which showed an inhibitory influence. On the other side only nifedipine and cAMP inhibited the transport of sodium.

In summary, heavy metals, metals or organic substances are able to affect and modulate the transport of calcium and sodium across the earthworm integument. Sometimes very low concentrations are effective, so that even tiny quantities in the soil are sufficient to change ion resorption of *Lumbricus terrestris*. Due to his ubiquist spreading in each type of soil *L. terrestris* represents a perfect bio indicator. Using him as a model organism it is possible to define new scales and measuring methods in ecological toxicology.

## IX Bedeutung und Ausblick

Der Regenwurm *Lumbricus terrestris* stellt aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung ein ideales Modell eines Bioindikators dar. Als ausgesprochener Bodennützlichling ist er zudem eine Bereicherung der Fauna des jeweiligen Biotops. In dieser Arbeit wurde er erstmals zu elektrophysiologischen Untersuchungen mit der Ussing-Kammer herangezogen. Dabei wurde das Integument seiner Haut mit Hilfe der current clamp Technik untersucht. Diese Methode ermöglicht es, bereits geringe Veränderungen im Transport von Ionen über ein Gewebe zu registrieren und die elektrogenen Transporter des Epithels zu identifizieren und zu charakterisieren. Das Meßsystem konnte deshalb auch als Testsystem für ökologische Untersuchungen verwendet werden.

Die Untersuchungen mit Schwermetallen haben gezeigt, dass zwischen den Konzentrationen, die vom BMU als Grenzwerte angesetzt wurden, und den Konzentrationen, die bereits auf das Epithel Wirkung zeigten, eine doch teilweise erhebliche Differenz besteht. Bisherige Untersuchungen zu Grenzwerten wurden oft mittels dosis-letalitäts-Versuche durchgeführt, bei welchen die Zahl der toten Tiere maßgebend war. Mit der von mir verwendeten Technik können bereits kleinste Veränderungen im Ionentransport der Regenwurmhaut erkannt werden, und somit Reaktionen, die dann sekundär evtl. stoffwechselwirksame Abweichungen hervorrufen. Es bietet sich deshalb für die Zukunft an, nähere Untersuchungen für die Spanne zwischen den amtlichen Grenzwerten und den bereits wirksamen Konzentrationen durchzuführen, um herauszufinden, welche Veränderungen mit den Tieren passieren und ob diese Veränderungen längerfristig auch zum Tod führen. Dazu könnten weitergehende Haltungsveruche und Beobachtungen von Regenwürmer belasteter Gebiete und deren Messung in der Ussing-Kammer herangezogen werden.

## X Anhang

### X.1 Literatur

**Alloway, B. J.** (1999). Schwermetalle in Böden. B. J. Alloway. Berlin, Springer-Verlag: 113-399.

**Almeida, A. J. and M. B. Burg** (1982). "Sodium transport in the rabbit connecting tubule." American Journal of Physiology **243**(4): F330-F334.

**Amasheh, S., H. J. Epple, et al.** (2000). "Differential regulation of ENaC by aldosterone in rat early and late distal colon." Annals of the New York Academy of Sciences **915**: 92-94.

**Amuzescu, B., A. Segal, et al.** (2003). "Zinc is a voltage-dependent blocker of native and heterologously expressed epithelial Na<sup>+</sup> channels." Pfluegers Archiv: European Journal of Physiology **446**(1): 69-77.

**Bean, B. P. and I. M. Mintz** (1994). Pharmacology of Different Types of Calcium Channels in Rat Neurons. Handbook of Membrane Channels - Molecular And Cellular Physiology. C. Peracchia. San Diego, Academic Press: 199-210.

**Benos, D. J., L. J. Mandel, et al.** (1979). "On the mechanism of the amiloride-sodium entry site interaction in Anuran skin epithelia." Journal of General Physiology **307**: 307-326.

**Bindslev, N., A. W. Cuthbert, et al.** (1982). "Kinetics of amiloride action in the hen coprodaeum in vitro." Pfluegers Archiv: European Journal of Physiology **392**(4): 340-346.

**Blank, U.** (1996). "Regulation des Iontentransports im menschlichen respiratorischen Epithel." Dissertation, Justus-Liebig-Universität **Giessen**.

**Boucher, R. C. and J. T. Gatzky** (1983). "Characteristics of sodium transport by excised rabbit trachea." Journal of Applied Physiology **55**(6): 1877-1883.

**Büsselberg, D., M. Pekel, et al.** (1994). "Mercury (Hg<sup>2+</sup>) nad Zinc (Zn<sup>2+</sup>): Two Divalent Cations with Different Actions on Voltage-Activated Calcium Channel Currents." Cellular and Molecular Neurobiology **14**(6): 675-687.

**Canessa, C. M., L. Schild, et al.** (1994). "Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits." Nature **367**(6462): 463-467.

**Cassano, G., V. Bellantuono, et al.** (2003). "Pyrethroid stimulation of ion transport across frog skin." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(6): 1330-4.

**Chase, H. S. and Q. Al-Awqati** (1983). "Calcium reduces the sodium permeability of luminal membrane vesicles from toad bladder." Journal of General Physiology **81**: 643-665.

- Chraibi, A. and J. D. Horisberger** (2002). "Na self inhibition of human epithelial na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases." Journal of General Physiology **120**(2): 133-45.
- Clauss, W.** (1998). "Molecular physiology of colonic epithelial sodium absorption." Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **105**(12): 453-455.
- Clauss, W., J. E. Dürr, et al.** (1987). "Effects of adrenal steroids on Na-transport in the lower intestine (coprodeum) of the hen." Journal of Membrane Biology **96**: 141-152.
- Cornell, J. C.** (1982). "Sodium and chloride transport in the isolated intestine of the earthworm, *Lumbricus terrestris*." Journal of Experimental Biology **97**: 197-216.
- Coulter, D. A., J. R. Huguenard, et al.** (1989). "Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons." Annals of Neurology **25**(6): 582-593.
- Cucu, D., J. Simaels, et al.** (2003). "External Ni<sup>2+</sup> and ENaC in A6 cells: Na<sup>+</sup> current stimulation by competition at a binding site for amiloride and Na<sup>+</sup>." Journal of Membrane Biology **194**(1): 33-45.
- Cuthbert, A. W., M. E. Hickman, et al.** (1999). "Activation of Ca<sup>2+</sup>- and cAMP-sensitive K<sup>+</sup> channels in murine colonic epithelia by 1-ethyl-2-benzimidazolone." American Journal of Physiology **277**(1): 111-120.
- Cuthbert, A. W. and P. Y. D. Wong** (1972). "The role of calcium ions in the interaction of amiloride with membrane receptors." Molecular Pharmacology **221**: 222-229.
- Darboux, I., E. Lingueglia, et al.** (1998). "A new member of the amiloride-sensitive sodium channel family in *Drosophila melanogaster* peripheral nervous system." Biochemical and Biophysical Research Communications **246**(1): 210-216.
- De With, N. D., J. W. Slotstra, et al.** (1988). "The Bioelectrical Activity of the Body Wall of the Pulmonate Freshwater Snail *Lymnea stagnalis* : Effects of Neurotransmitters and the Sodium Influx Stimulating Neuropeptides." General and Comparative Endocrinology **70**: 216-223.
- Desmedt, L., J. Simaels, et al.** (1991). "Amiloride Blockage of Na<sup>+</sup> Channels in Amphibian Epithelia Does Not Require External Ca<sup>2+</sup>." Pfluegers Archiv: European Journal of Physiology **419**(6): 632-638.
- Dietz, T. H. and R. H. Alvarado** (1970). "Osmotic and ionic regulation in *Lumbricus terrestris* L." Biological Bulletin **138**: 247-261.
- Fischer, E., A. Tóth, et al.** (2001). "Deltamethrin, Effects on Volume Control, and Water Balance in *Eisenia fetida* Sav. (Annelida, Lumbricidae)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **66**: 269-276.

- Fischer, H., W. Van Driessche, et al.** (1989). "Evidence for Apical Sodium Channels in Frog Lung Epithelial Cells." American Journal of Physiology **256**(4): C764-C771.
- Flonta, M. L., J. DeBeirSimaels, et al.** (1998). "Cu<sup>2+</sup> reveals different binding sites of amiloride and CDPC on the apical Na channel of frog skin." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1370**(1): 169-174.
- Frindt, G., H. Sackin, et al.** (1990). "Whole-Cell Currents in Rat Cortical Collecting Tubule - Low-Na Diet Increases Amiloride-Sensitive Conductance." American Journal of Physiology **258**(3): F562-F567.
- Fronius, M., A. Berk, et al.** (2004). "Ion transport across *Xenopus* alveolar epithelium is regulated by extracellular ATP, UTP and adenosine." Respiratory Physiology & Neurobiology **139**(2): 133-44.
- Gilbertson, T. A. and H. Zhang** (1998). "Self-inhibition in amiloride-sensitive sodium channels in taste receptor cells." Journal of General Physiology **111**(5): 667-77.
- Goebel-Lauth, S.** (2004). Untersuchung grundlegender Ionentransportmechanismen am Integument von *Lumbricus terrestris*. Wettenberg, VVb Laufersweiler Verlag.
- Kaestner, A.** (1969). Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Kellenberger, S. and L. Schild** (2002). "Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of Ion Channels: A Variety of Functions for a Shared Structure." Physiological Reviews **82**(3): 735-767.
- Koefoed-Johnson, V. and H. H. Ussing** (1958). "The nature of the frog skin potential." Acta Physiologica Scandinavica **42**: 298-308.
- Krattenmacher, R. and W. Clauss** (1988). "Electrophysiological analysis of sodium-transport in the colon of the frog (*Rana esculenta*). Modulation of apical membrane properties by antidiuretic hormone." Pfluegers Archiv: European Journal of Physiology **411**: 606-612.
- Krumm, S.** (2002). "Ionentransport über das Epithel des Regenwurminteguments am Beispiel von *Lumbricus terrestris*." Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität **Giessen**.
- Le, T. and M. H. Saier** (1996). "Phylogenetic characterization of the epithelial na<sup>+</sup> channel (ENaC) family." Molecular Membrane Biology **13**(3): 149-157.
- Lee, J.-H., J. C. Gomora, et al.** (1999). "Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively Block alpha1H." Biophysical Journal **77**: 3034-3042.
- Lingueglia, E., S. Renard, et al.** (1993). "Molecular cloning and functional expression of different molecular forms of rat Amiloride-Binding proteins." European Journal of Biochemistry **216**(2): 679-687.

- Lingueglia, E., N. Voilley, et al.** (1993). "Expression cloning of an epithelial Amiloride-Sensitive  $\text{Na}^+$  channel - a new channel type with homologies to Caenorhabditis-Elegans degenerins." FEBS Letters **318**(1): 95-99.
- Lyall, V., G. M. Feldman, et al.** (1995). "Regulation of apical  $\text{Na}^+$  conductive transport in epithelia by pH." Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes **1241**(1): 31-44.
- Marshall, W. S.** (2002). " $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis." Journal of Experimental Zoology **293**(3): 264-283.
- Milde, H., W. Clauss, et al.** (1996). "Modulation of  $\text{Na}^+$  transport across leech skin by pesticides and heavy metals." Experimental Biology Online **1:8**.
- Mori, Y.** (1994). Molecular Biology of Voltage-Dependent Calcium Channels. Handbook of Membrane Channels - Molecular And Cellular Physiology. C. Peracchia. San Diego, Academic Press: 163-176.
- Natochin, Y. V., O. A. Goncharevskaya, et al.** (1986). "Cobalt-dependent stimulation of sodium transport in the amphibian skin and nephron." Journal of Comparative Physiology B - Biochemical Systemic and Environmental Physiology **84A**(2): 353-355.
- Oortgiesen, M., R. G. van Kleef, et al.** (1990). "Novel type of channel activated by  $\text{Pb}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , and  $\text{Al}^{3+}$  in cultured mouse neuroblastoma cells." Journal of Membrane Biology **113**: 261-268.
- Palmer, L. G., I. S. Edelman, et al.** (1980). "Current-voltage analysis of apical sodium transport in toad urinary bladder: Effects of inhibitors of transport and metabolism." Journal of Membrane Biology **57**: 59-71.
- Pekel, M., B. Platt, et al.** (1993). "Mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) decreases voltage-gated calcium channel currents in rat DRG and *Aplysia* neurons." Brain Research **632**: 121-126.
- Peng, J. B., E. M. Brown, et al.** (2003). "Apical Entry Channels in Calcium-Transporting Epithelia." News in Physiological Science **18**: 158-163.
- Peng, J. B., E. M. Brown, et al.** (2003). "Epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  entry channels: transcellular  $\text{Ca}^{2+}$  transport and beyond." Journal of Physiology **551**(3): 729-740.
- Prusch, R. D. and T. Otter** (1977). "Annelid transepithelial ion transport." Comparative Biochemistry and Physiology - Part A **57A**: 87-92.
- Quinton, P. M.** (1981). "Effects of some ion transport inhibitors on secretion and reabsorption in intact and perfused single human sweat glands." Pfluegers Archiv: European Journal of Physiology **391**(4): 309-313.
- Ragsdale, S. W.** (1998). "Nickel biochemistry." Current Opinion in Chemical Biology **Apr** **2**(2): 208-215.

- Schnizler, M., S. Schaffert, et al.** (2001). "Regulation of cAMP-sensitive colonic epithelial Na<sup>+</sup> channel in oocyte expression system." Journal of Comparative Physiology B - Biochemical Systemic and Environmental Physiology **171**: 369-375.
- Segal, A., D. Cucu, et al.** (2002). "Rat ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes is activated by cAMP and blocked by Ni<sup>2+</sup>." FEBS Letters: 177-183.
- Segal, A. S., J. P. Hayslett, et al.** (2002). "On the natriuretic effect of verapamil: inhibition of ENaC and transepithelial sodium transport." American Journal of Physiology - Renal Physiology **283**(4): F765-F770.
- Sheng, S., J. Li, et al.** (2000). "Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel." Journal of Biological Chemistry **275**: 8572-8581.
- Sheng, S., C. J. Perry, et al.** (2002). "External Nickel Inhibits Epithelial Sodium Channel by Binding to Histidine Residues within the Extracellular Domains of alpha and gamma Subunits and Reducing Channel Open Probability." Journal of Biological Chemistry **277**(51): 50098-50111.
- Sheng, S., C. J. Perry, et al.** (2004). "Extracellular Zn<sup>2+</sup> activates epithelial Na<sup>+</sup> channels by eliminating Na<sup>+</sup> self-inhibition." Journal of Biological Chemistry **279**(30): 31687-31696.
- Sima, P. and V. Vetvicka** (1993). "Evolution of Immune Reactions." Critical Reviews in Immunology **13**(2): 83-114.
- Stanton, B. A.** (1989). "Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct." American Journal of Physiology **256**(5 Pt 2): F862-F868.
- Suwalsky, M., B. Norris, et al.** (2000). "Mercuric Chloride (HgCl<sub>2</sub>) and Methyl Mercury (CH<sub>3</sub>HgCl) Block Sodium Transport in the Isolated Skin of the Toad *Pleurodema thaul*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **65**: 794-802.
- Ussing, H. H. and K. Zerahn** (1951). "Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin." Acta Physiologica Scandinavica **23**: 110-127.
- Van Driessche, W., I. Aelvoet, et al.** (1987). "Oxytocin and cAMP stimulate monovalent cation movements through a Ca-sensitive, amiloride-insensitive channel in the apical membrane of toad urinary bladder." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **84**: 313-317.
- van Driessche, W. and B. Lindemann** (1979). "Concentration dependence of currents through single sodium-selective pores in frog skin." Nature **282**(5783): 519-520.
- Weber, W. M., U. Blank, et al.** (1995). "Regulation of electrogenic Na<sup>+</sup> transport across leech skin." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **37**(3): R605-R613.

- 
- Yamamura, H., S. Ugawa, et al.** (2004). "Protons activate the delta-subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in humans." Journal of Biological Chemistry **279**(13): 12529-12534.
- Yeh, J.-H., H.-M. Chung, et al.** (2004). "Mercury-induced Ca<sup>2+</sup> increase and cytotoxicity in renal tubular cells." Life Sciences **74**: 2075-2083.
- Young, O. S. and D. J. Benos** (1992). Amiloride-sensitive sodium channels. Amiloride and its analogs - Unique cation transport inhibitors. E. J. Cragoe jr., T. R. Kleyman and L. Simchowicz. New York, VHC Publishers, Inc.
- Zeiske, W., H. Onken, et al.** (1992). "Invertebrate epithelial Na<sup>+</sup> channels: amiloride-induced current-noise in crab gill." Biochimica et Biophysica Acta **1105**(2): 245-252.

## X.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer verwendeten Ussing-Kammer.....	29
Abbildung 2 Schema einer Strom- oder Spannungselektrode. ....	30
Abbildung 3 Schaltplan des modifizierten Voltage-Clamp Amplifiers nach Nagel.....	31
Abbildung 4: Schaltbild der Messung über das Epithel. ....	31
Abbildung 5: Datenerfassung im PC.....	34
Abbildung 6 Typischer Kurvenverlauf einer Amiloridreaktion unter $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. .....	37
Abbildung 7 Reaktion von Amilorid unter cAMP-Bedingungen. ....	40
Abbildung 8 Einfluss des Blockercocktails auf den Strom $I_{\text{SC}}$ und auf dessen Reaktion auf $\text{Ca}^{2+}$ .....	42
Abbildung 9 Typischer Kurvenverlauf einer Deltamethrin/ $\text{Ca}^{2+}$ Reaktion. ....	45
Abbildung 10 Der Kurvenverlauf beschreibt den Einfluss von 500 $\mu\text{M}$ Ethosuximid auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. ....	48
Abbildung 11 Reaktion von 50 $\mu\text{M}$ Amilorid unter Anwesenheit von 100 $\mu\text{M}$ Verapamil. ....	49
Abbildung 12 Beispielhafter Verlauf eines Versuchs mit 100 $\mu\text{M}$ Verapamil.....	50
Abbildung 13 Wirkung von 100 $\mu\text{M}$ Nifedipin auf die Amiloridantwort.....	52
Abbildung 14 Einfluss von 1 $\mu\text{M}$ Blei auf die Amiloridreaktion. ....	54
Abbildung 15 Beispielhafter Kurvenverlauf von 10 $\mu\text{M}$ Blei und seiner Wirkung auf die Amiloridantwort. ....	54
Abbildung 16 Beispielhafter Kurvenverlauf der Wirkung von 100 $\mu\text{M}$ Eisen(II) auf die Amiloridreaktion. ....	56
Abbildung 17 Wirkung von 100 $\mu\text{M}$ Eisen (III) auf die Reaktion von 50 $\mu\text{M}$ Amilorid. ....	58
Abbildung 18 Die Amiloridreaktion zeigt unter 50 $\mu\text{M}$ Kobalt eine deutlich geringere Inhibition. ....	60
Abbildung 19 Einfluss von 25 $\mu\text{M}$ Kupfer auf die Amiloridreaktion.....	61
Abbildung 20 50 $\mu\text{M}$ Kupfer vermindert die Inhibition von 50 $\mu\text{M}$ Amilorid. ....	62
Abbildung 21 Einfluss von 50 $\mu\text{M}$ Cu auf die Calcium-Reaktion.....	64
Abbildung 22 Beispielhafter Kurvenverlauf der Wirkung von 100 $\mu\text{M}$ Nickel auf die Amiloridreaktion. ....	67
Abbildung 23 500 $\mu\text{M}$ Nickel verändert die Reaktion von 50 $\mu\text{M}$ Amilorid.....	68
Abbildung 24 Veränderte Calciumreaktion unter 250 $\mu\text{M}$ Nickel. ....	69
Abbildung 25 Auswirkung von 1mM Nickel auf die Calciumreaktion. ....	70

---

Abbildung 26 Unterschiedliche Reaktionen von 50µM Amilorid ohne und mit 20µM Quecksilber.....	72
Abbildung 27 Beispiel für die Langzeitwirkung von 20µM Quecksilber.....	73
Abbildung 28 Beispielhafter Verlauf einer Amiloridreaktion mit und ohne 10µM Zn. ....	76
Abbildung 29 Auswirkung von 20µM Zink auf die Reaktion von 50µM Amilorid.....	76
Abbildung 30 Charakteristischer Kurvenverlauf einer pH-Wert-Meßreihe.....	78
Abbildung 31 Amilorid N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamid .....	84
Abbildung 32 Strukturformel von Deltamethrin.....	92
Abbildung 33 Strukturformel von Ethosuximid .....	93
Abbildung 34 Strukturformel von Verapamil.....	94
Abbildung 35 Strukturformel von Nifedipin .....	95
Abbildung 36: Wirkungen der untersuchten Substanzen auf die Amiloridantwort des Regenwurminteguments.....	114
Abbildung 37: Dargestellt sind die getesteten Substanzen und ihre Wirkung auf die Calciumreaktion des Epithels.....	116

### X.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Änderungen bei der Entfernung von Calcium aus der Lösung. ....	36
Tabelle 2 Unterschiede in der Amiloridreaktion unter $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. ....	36
Tabelle 3 Reaktion des Epithels auf 2mM $\text{Ca}^{2+}$ . ....	38
Tabelle 4 Calciumreaktion unter Amiloridbedingungen. ....	38
Tabelle 5 Einfluss von 2mM $\text{Ca}^{2+}$ auf die Amiloridreaktion. ....	39
Tabelle 6 Reaktion auf cAMP. ....	39
Tabelle 7 Veränderte Reaktion von Amilorid unter cAMP-Bedingungen. ....	40
Tabelle 8 Reaktion auf die Gabe eines Blockercocktails. ....	41
Tabelle 9 Amiloridreaktion unter Anwesenheit des Blockercocktails. ....	41
Tabelle 10 Unterschiedliche Konzentrationen von Deltamethrin und deren Einfluss auf die drei Grundparameter. ....	43
Tabelle 11 Einfluss von Deltamethrin auf die Amiloridreaktion. ....	43
Tabelle 12 Einfluss von Deltamethrin auf die Calcium-Reaktion. ....	44
Tabelle 13 Vergleich von Deltamethrin auf basolateraler Seite unter normalen Bedingungen und unter $\text{SO}_4$ -Bedingungen. ....	46
Tabelle 14 Reaktionen der drei Parameter auf unterschiedliche Ethosuximidkonzentrationen. ....	46
Tabelle 15 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Ethosuximid auf die Calciumreaktion. ....	47
Tabelle 16 Reaktion des Gewebes auf 100 $\mu\text{M}$ Verapamil. ....	48
Tabelle 17 Unterschiedliche Reaktionen von Amilorid unter An- und Abwesenheit von Verapamil. ....	49
Tabelle 18 Einfluss von 100 $\mu\text{M}$ Verapamil auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. ....	50
Tabelle 19 Messwertänderungen bei der Gabe von 100mM Nifedipin. ....	51
Tabelle 20 Wirkung von 100 $\mu\text{M}$ Nifedipin auf die Amiloridreaktion. ....	51
Tabelle 21 Einfluss von 100 $\mu\text{M}$ Nifedipin auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. ....	52
Tabelle 22 Reaktionen des Gewebes auf die Perfundierung mit unterschiedlichen Bleikonzentrationen. ....	53
Tabelle 23 Einfluss unterschiedlicher Bleikonzentrationen auf die Amiloridreaktion. ....	55
Tabelle 24 Eisen(II)reaktion des Gewebes. ....	55
Tabelle 25 Reaktionen auf Amilorid unter An- und Abwesenheit von 100 $\mu\text{M}$ Eisen(II). ....	56
Tabelle 26 Reaktionen des Epithels auf 100 $\mu\text{M}$ Eisen(III). ....	57

---

Tabelle 27 Einfluss von 100µM Eisen(III) auf die Amiloridreaktion.....	57
Tabelle 28 Wirkung von Kobalt auf das Epithel.....	59
Tabelle 29 Einfluss von Kobalt auf die Amiloridreaktion.....	59
Tabelle 30 Änderungen der Basisparameter unter verschiedenen Kupferkonzentrationen.....	61
Tabelle 31 Änderungen der Amiloridreaktion unter verschiedenen Kupferkonzentrationen..	63
Tabelle 32 Veränderte Calciumreaktionen unter dem Einfluss von Kupfer.....	65
Tabelle 33 Langzeiteinfluss von Kupfer auf $U_T$ , $I_{SC}$ und $R_T$ . ....	65
Tabelle 34 Reaktionen des Gewebes aus unterschiedliche Konzentrationen von Nickel. ....	66
Tabelle 35 Wirkung von Nickel auf die Amiloridreaktion.....	67
Tabelle 36 Einfluss von unterschiedlichen Nickelkonzentrationen auf die Gewebereaktion auf 2mM $Ca^{2+}$ .....	69
Tabelle 37 Reaktionen unterschiedlicher Quecksilberkonzentrationen auf $U_T$ , $I_{SC}$ und $R_T$ ....	71
Tabelle 38 Auswirkung von Quecksilber auf die Amiloridreaktion. ....	71
Tabelle 39 Veränderte Calciumreaktion unter verschiedenen Quecksilberkonzentrationen....	73
Tabelle 40 Langzeiteinfluss von 20µM Quecksilber auf das Gewebe.....	74
Tabelle 41 Reaktionen des Epithels auf unterschiedliche Konzentrationen von Zink.....	75
Tabelle 42 Wirkung von Zink in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Amiloridreaktion. .....	75
Tabelle 43 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Reaktion von $Ca^{2+}$ . ....	77
Tabelle 44 Wechsel von pH 6 nach pH 8. ....	79
Tabelle 45 Reaktionen der drei Parameter auf den Wechsel von pH 8 nach pH 6. ....	79
Tabelle 46 Reaktion von Amilorid unter pH 6 und pH 8. ....	80
Tabelle 47 Unterschiedliche Reaktion von Amilorid unter pH 8 und pH 6. ....	80
Tabelle 48 Vergleich der Grenzwerte des BMU und der in dieser Arbeit ermittelten, wirksamen Konzentrationen. A Bodenschutzverordnung, B Wirkungspfad Boden - Grundwasser.....	113
Tabelle 49 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen. ....	133
Tabelle 50 Verwendete Materialien .....	134
Tabelle 51 Firmenanschriften .....	134

## X.4 Chemikalien

Tabelle 49 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Substanz	Firma	Firmensitz
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine	Sigma	Steinheim
8-(4-Chlorophenylthio) Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphat	Sigma	Steinheim
Agar	Sigma	Steinheim
Amilorid	Sigma	Steinheim
Blei(II)-Chlorid	Riedel-de Haën	Seelze
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt
Deltamethrin	Riedel-de Haën	Seelze
DMSO	Sigma	Steinheim
Econazole	Sigma	Steinheim
Eisen(II)-Chlorid	Riedel-de Haën	Seelze
Eisen(III)-Chlorid	Riedel-de Haën	Seelze
Ethosuximid	Sigma	Steinheim
Furosemid	Sigma	Steinheim
Kaliumchlorid	Fluka	Steinheim
Kobalt(II)-Chlorid	Fluka	Steinheim
Kupfer(II)-Chlorid	Fluka	Steinheim
Natriumchlorid	Fluka	Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma	Steinheim
Nifedipin	Sigma	Steinheim
Nystatin	Fluka	Steinheim

Ouabain	Sigma	Steinheim
Quecksilber(II)-chlorid	Merck	Darmstadt
Quinine	Sigma	Steinheim
Salzsäure	Fluka	Steinheim
TMA-Chlorid	Fluka	Steinheim
TRIZMA	Sigma	Steinheim
Verapamil	Sigma	Steinheim
Zinkchlorid	Riedel-de Haën	Seelze

## X.5 Sonstiges

Tabelle 50 Verwendete Materialien

Material	Firma	Firmensitz
Silberdraht	Science Products GmbH	Hofheim
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH + Co.	Karlsruhe
Silikonpaste	Bayer	Leverkusen

## X.6 Bezugsquellen

Tabelle 51 Firmenanschriften

Firmenname	Postadresse	Telefonnummer	URL Homepage
Sigma	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	+49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Merck Biosciences GmbH	Ober der Röth 4 D-65824 Schwalbach	+49 6196 63955	<a href="http://www.merckbiosciences.de">http://www.merckbiosciences.de</a>
Fluka	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	+49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Bayer AG	51368 Leverkusen	+49 214 301	<a href="http://www.bayer.de">http://www.bayer.de</a>

---

Martin Langhoff	Felix-Wankel-Str.8 D-52351 Düren	+49 2421 2085955	<a href="http://www.superwurm.de">http://www.superwurm.de</a>
Carl Roth GmbH + Co.	Schoemperlenstr. 1-5 D-76185 Karlsruhe	+49 721 56060	<a href="http://www.Carl-Roth.de">http://www.Carl-Roth.de</a>
Riedel-de Haën	Eschenstr. 5 D-82024 Taufkirchen	+49 89 65130	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>

## **X.7 Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Zitate und übernommenen Darstellungen wurden durch Quellenangaben deutlich gemacht.

Steffen Krumm

Gießen, September 2005

## **X.8 Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauß für die Ermöglichung dieser Arbeit; für die Überlassung des Themas und der Arbeitsplätze, und im Speziellen für seine Bereitschaft, mir mit Hilfestellungen und Diskussionsbereitschaft jederzeit zur Seite zu stehen.

Ich danke meinen Eltern Inge und Wieland, die stets bereit waren, für ihre Kinder zurück zu stehen und mir diesen Lebensweg ermöglicht haben. Auch danke ich meinen Geschwistern Christoph und Susanne.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie für ihre Hilfe in technischen wie in kollegialen Dingen:

- Frau Ursula Eichelmann für den kollegialen Beistand
- Frau Margret Hündt für die produktive Kooperation bei den von mir betreuten Diplomarbeiten
- Herrn Bernhard Kahnert für die Unterstützung bei elektrischen Fragen
- Herrn Siegfried Kristek für die Anfertigung der Ussingkammern
- Frau Christa Schwarz für die nette Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen
- Frau Ursula Vogel für den mütterlichen Beistand

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dennis B. Langenbahn. Danke für alles!