

4 ERGEBNISSE

4.1 Immunzytochemische Charakterisierung der aus dem Pansenepithel isolierten Zellen

Voraussetzung für die Durchführung der eigenen Versuche war die Überprüfung des epithelialen Ursprungs der verwendeten Primärkulturzellen. Dies erfolgte mittels des immunzytochemischen Nachweises von Zytokeratinen (PARK, 2003). Diese Intermediärfilamente sind ausschließlich bei epithelialen Zellen zu finden und werden daher für die Zelltypisierung als spezifische Markerproteine verwendet.

Unter dem Mikroskop zeigten sich die Zellen deutlich Pan-Zytokeratin-positiv gefärbt (**siehe Abbildung 4.1**), d.h. der epitheliale Charakter und die Uniformität des Zelltyps wurde bei den aus Primärkulturen stammenden Zellen nachgewiesen. Das Vorhandensein von Zellen anderen Ursprungs wie Bindegewebszellen wurde ausgeschlossen.

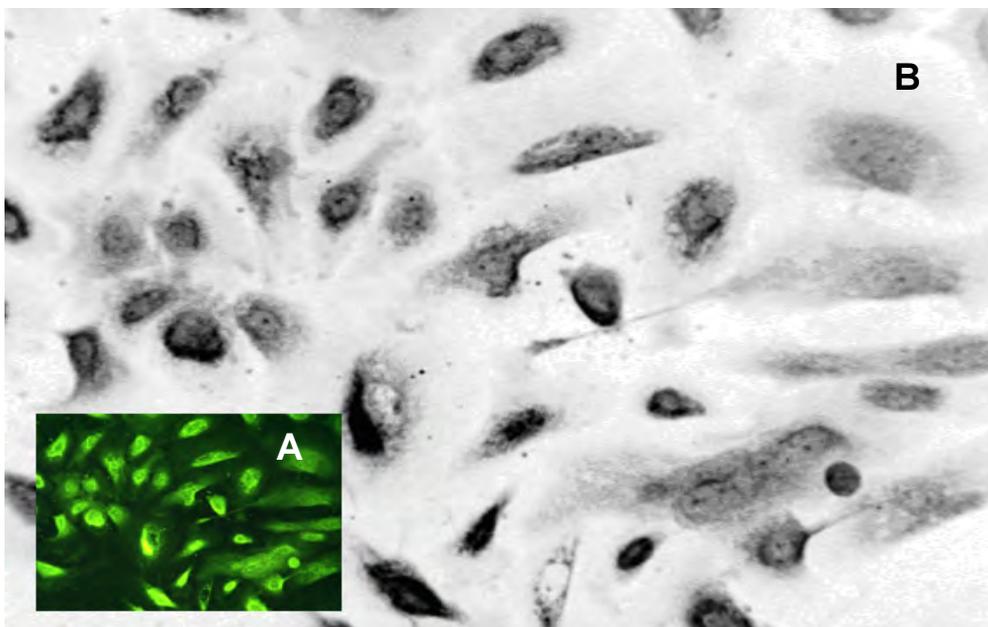


Abbildung 4.1: Nachweis des epithelialen Ursprungs der kultivierten Zellen mittels Zytokeratinbestimmung.

Die Zellen wurden mit dem Maus-anti-Zytokeratin-Pan-Antikörpers (Klon Lu5) gegen die Zytokeratine 1-19 behandelt, anschließend mit einem fluoreszierenden Anti-Maus-Ig-Antikörper inkubiert und mikroskopisch beurteilt. Die Zytoskelettstrukturen der Zellen zeigen sich deutlich gefärbt.

A: Originalbild, **B:** Greyscale invertiert; jeweils in 400-facher Vergrößerung (PARK, 2003)

4.2 Allgemeine Identifizierung und Trennung der Ionenströme

Es ist selten der Fall, dass eine Zellmembran nur die Kanäle beinhaltet, die untersucht werden sollen. Die Versuchsbedingungen müssen deshalb so gewählt werden, dass die Ströme, die von Interesse sind (in der vorliegenden Arbeit waren dies vorrangig die Natrium-Ströme), eindeutig von anderen Strömen getrennt werden können. Möglich wird das 1) durch die Wahl der Versuchslösungen und 2) elektrophysiologische Merkmale.

1. Wahl der Versuchslösungen

Mit der Whole-Cell- und der Inside-Out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik kann sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Lösung gewählt werden. Ströme können durch ihre Abhängigkeit vom permeierenden Ion identifiziert werden. Teilersatz des Ions durch ein nicht permeierendes Ion (z.B. Cholin oder Gluconat) ist ein häufig verwendetes Identifizierungsmerkmal.

Unerwünschte Ströme können entweder durch Entzug der permeierenden Ionen oder pharmakologisch unterdrückt werden. Für die Identifizierung von Kanaltypen oder Kanalisofomen stehen oft sehr spezifische Hemmstoffe zur Verfügung, zum Beispiel blockierende Ionen, Pharmaka oder pflanzliche und tierische Giftstoffe.

2. Elektrophysiologische Merkmale

Die Richtung und Höhe des Stromflusses, die Spannungsabhängigkeit der Ströme und Änderungen der Umkehrpotentiale (zum Beispiel nach Lösungswechseln) sind Eigenschaften, die benutzt werden können, um Ströme zu identifizieren.

4.3 Identifizierung der Ionenströme über die Membran

Um die Ströme über die Membran einer Pansenepithelzelle zu identifizieren, wurden die Zellen zunächst mit K-Gluconat-Pipettenlösung gefüllt. Die hohen Kalium- und niedrigen Chloridanteile in der intrazellulären Lösung (**siehe Tabelle 3.3**) entsprachen dabei weitgehend den physiologischen Werten von Epithelzellen.

Umspült wurden die Zellen mit der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen NaCl-Standardlösung (NaCl).

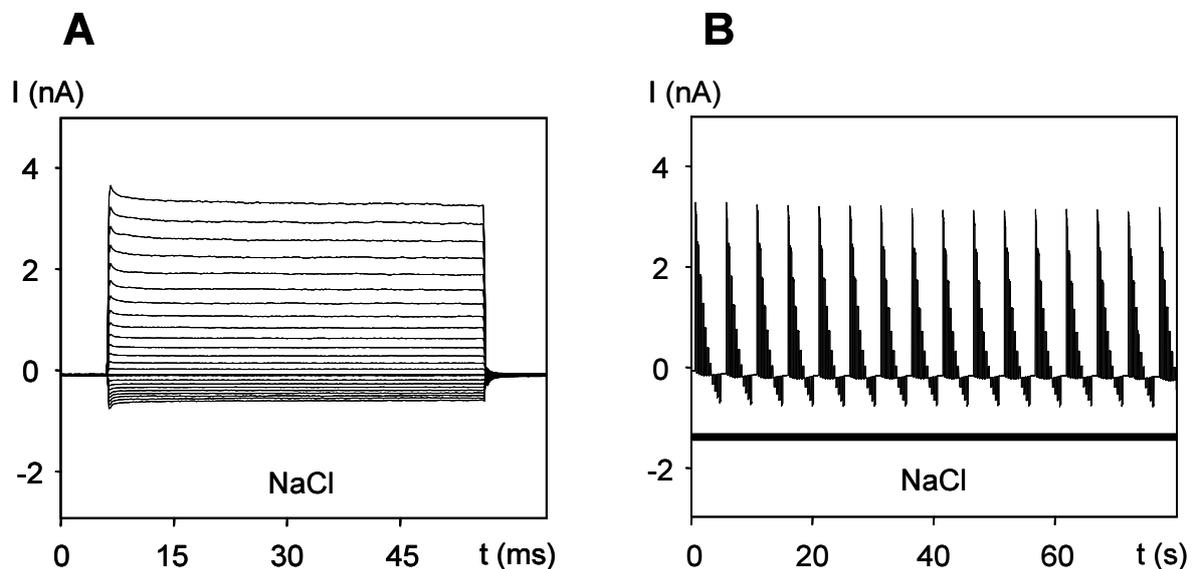


Abbildung 4.2: Charakteristischer Membranstrom einer PEZ in NaCl-Standardlösung

A. Ganzzellströme als Antwort auf ein Protokoll von Spannungspulsen. Die Ströme der mit K-Gluconat gefüllten Zelle erwiesen sich als deutlich auswärtsrektifizierend. Die Spannungspulse reichten von -120 bis +100 mV in Schritten von 10 mV. Zwischen den Pulsen wurden die Zellen auf ein Potential von -40 mV geklemmt.

B. Darstellung des kontinuierlichen Pulsprotokolls derselben Zelle. Bei gleich bleibenden Bedingungen änderten sich die Ein- und Auswärtsströme kaum: deutliches Zeichen für einen konstanten Seal.

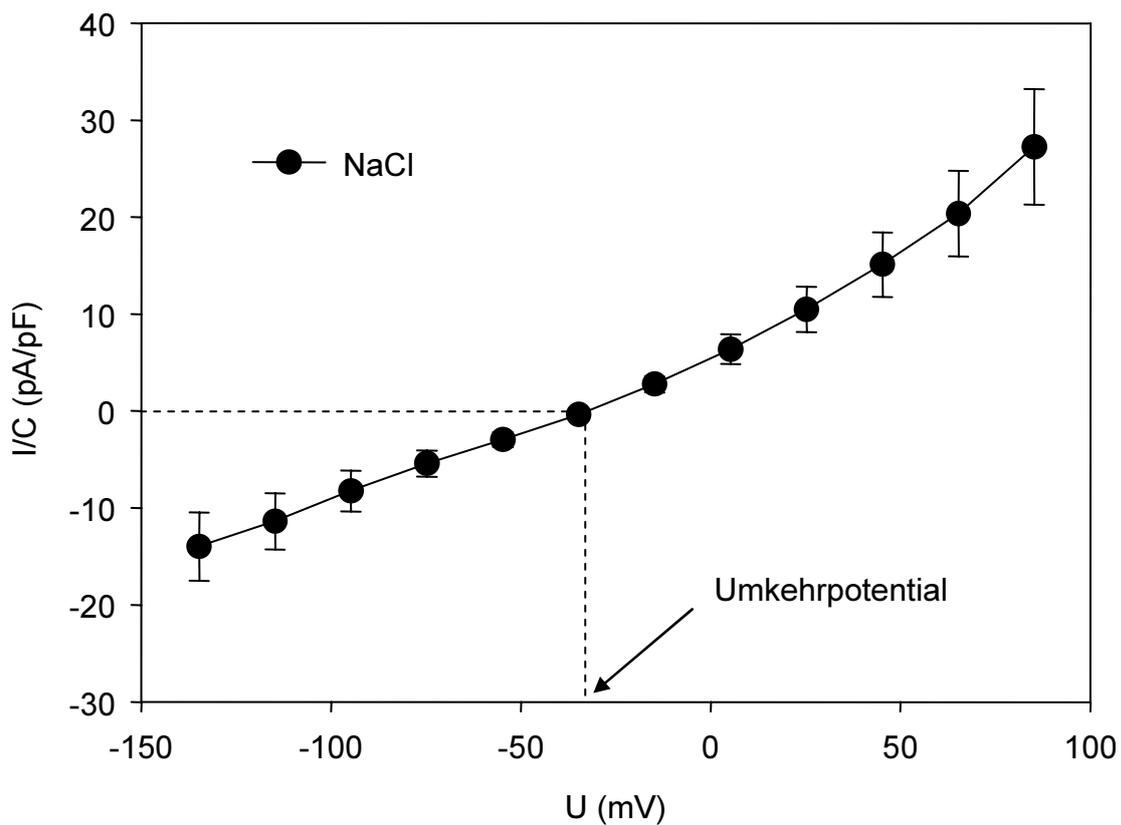


Abbildung 4.3: Strom-Spannungs-Beziehung aus 23 Einzelmessungen der mit K-Gluconat gefüllten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Das Potential, bei dem kein Nettostrom fließt, gilt als Umkehrpotential der Zelle.

Abbildung 4.3 zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung von insgesamt 23 Einzelmessungen. Die gemessenen Stromwerte jeder einzelnen Zelle bei den verschiedenen Spannungspulsen wurden zuvor auf die jeweilige Zellkapazität (C) normiert und in pA/pF angegeben.

Die Strom-Spannungs-Kurve der mit K-Gluconat gefüllten Zellen verlief deutlich gekrümmt, wobei der auswärts gerichtete Strom bei gleicher elektrischer Triebkraft wesentlich größer war als der Einwärtsstrom (= auswärtsrektifizierend). Bei einem Pipettenpotential von 100 mV ergab sich ein mittlerer Auswärtsstrom von 27 ± 5 pA/pF ($n = 28$). Die Einwärtsströme, gemessen bei einer Membranspannung von -120 mV, betragen im Mittel -14 ± 4 pA/pF und entsprachen damit 51 ± 4 % der nach auswärts gerichteten Ströme. Das Umkehrpotential der Zellen lag bei -30 ± 3 mV.

Ein Hilfsmittel zur Identifizierung der Ionenströme über die Zellmembran stellt die Nernst-Gleichung dar, mit deren Hilfe sich das Umkehrpotential einer Zelle berechnen lässt. Voraussetzung ist allerdings, dass nur ein einziges Ion an der Entstehung des Umkehrpotentials beteiligt ist, also als alleiniges Ion die Membran passieren kann und damit das Membranpotential bestimmt. Entspricht das gemessene Umkehrpotential keinem errechneten Nernst-Potential der im Experiment dominierenden Ionen, deutet dies bereits darauf hin, dass mehrere Ionen Einfluss auf das Umkehrpotential ausüben.

Nernst-Gleichung:

$$E_X = \frac{RT}{z_X F} \ln \frac{[X_i]}{[X_a]}$$

- E_X = Nernst-Potential für das Ion X
- $[X_i]$ = Konzentration von Ion X innerhalb der Zelle
- $[X_a]$ = Konzentration von Ion X außerhalb der Zelle
- z_X = Wertigkeit von Ion X
- R = Gaskonstante
- T = Temperatur
- F = Faraday Konstante

Bei den durchgeführten Versuchen lag das Umkehrpotential der Zellen im Mittel bei -30 ± 3 mV und entsprach damit nicht den kalkulierten Nernst-Potentialen von Natrium, Kalium oder Chlorid unter den gegebenen Bedingungen.

Mit der Nernst-Gleichung berechnete Umkehrpotentiale:

$$E_{(K^+)} = -81,10 \text{ mV}$$

$$E_{(Na^+)} = +64,98 \text{ mV}$$

$$E_{(Cl^-)} = -62,90 \text{ mV}$$

Die abweichenden berechneten Nernst-Potentiale von dem tatsächlich gemessenen mittleren Umkehrpotential der Zellen ließen darauf schließen, dass mehrere Ionen elektrogen über die Membran der PEZ transportiert wurden und am Aufbau des Umkehrpotentials beteiligt waren. Das entsprach auch den Erkenntnissen früherer Studien, bei denen Leitfähigkeiten für die monovalenten Ionen Natrium, Chlorid, Kalium und Cäsium über das Pansenepithel nachgewiesen wurden (MARTENS und GÄBEL, 1984; DIERNÆS et al., 1994; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; RÜBBELKE, 1998; LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Auf der Grundlage der vorangegangenen Versuchsanordnung war es jedoch noch nicht möglich, einzelne Ströme voneinander zu unterscheiden oder zu identifizieren. Dabei galt es, die Ladung der Ionen zu bedenken. Die Auswärtsströme konnten so zum Beispiel auf Kaliumströmen aus der Zelle **heraus** basieren, oder Chloridströme in die Zelle **hinein** darstellen.

Das Wissen um die verschiedenen Anteile der einzelnen Ionen an den Ganzzellströmen und an dem Aufbau der Umkehrpotentiale war jedoch von entscheidender Bedeutung für die spätere Interpretation der geplanten Versuche. So konnte bei dem Einsatz verschiedener Pharmaka nicht von vorneherein ausgeschlossen werden, dass sie Effekte auf die Leitfähigkeit verschiedener Ionen hervorrufen.

Die folgenden Versuche sollten deshalb Aufschluss geben über die möglichen Anteile verschiedener Ionen an den Ganzzellströmen über die Membran der PEZ.

4.3.1 Einfluss von extrazellulärem Chlorid

Um die „Auswärtsströme“ der mit K-Gluconat gefüllten Zellen genauer zu charakterisieren, wurde im Verlauf der folgenden Messungen Natriumchlorid durch Natriumgluconat in der Perfusionslösung ersetzt. Da Gluconat aufgrund seiner Größe impermeabel für Zellmembranen ist, sollte auf diese Weise der Anteil der Chlorid-Ionen an den Ganzzellströmen über die Membran bestimmt werden.

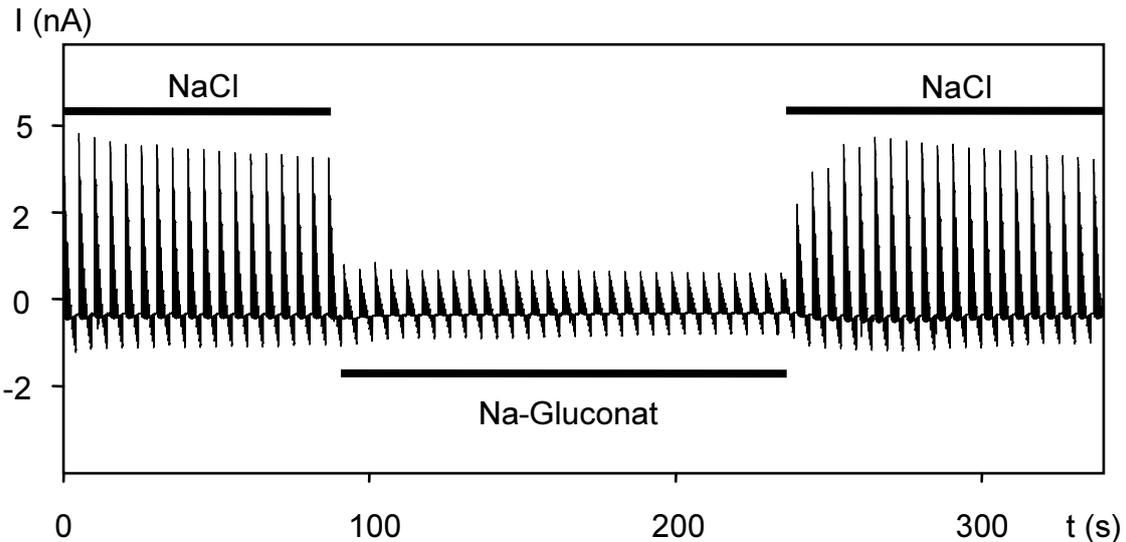


Abbildung 4.4: Darstellung der Ganzzellströme einer mit K-Gluconat gefüllten Zelle. Im Verlauf der Messung wurde extrazelluläres Chlorid durch Gluconat ersetzt, woraufhin die Auswärtsströme deutlich sichtbar sanken. Mit dem erneuten Wechsel zur Standardlösung stiegen auch wieder die auswärtsgerichteten Ströme.

Der Ersatz von Chlorid durch Gluconat in der extrazellulären Lösung hemmte, wie in **Abbildung 4.4** deutlich sichtbar, den nach auswärts gerichteten Strom. Im Mittel sanken die Auswärtsströme durch den Lösungswechsel von 27 ± 6 pA/pF auf 14 ± 4 pA/pF ($n = 7, p = 0,01$) und entsprachen damit nur noch 40 ± 4 % der Stromwerte, die in der chloridhaltigen Lösung gemessen wurden ($p < 0,001$). Die Einwärtsströme änderten sich hingegen nicht signifikant.

Mit der Hemmung des Auswärtsstromes kam es zu einer Depolarisation des Membranpotentials von -30 ± 3 mV auf -11 ± 7 mV ($p < 0,001$). Da sich die Versuchsbedingungen – abgesehen von dem Ersatz von Chlorid durch Gluconat – nicht geändert hatten, sprachen die Ergebnisse für eine Chloridleitfähigkeit in die Zelle hinein, die bei der Interpretation weiterer Versuche berücksichtigt werden musste.

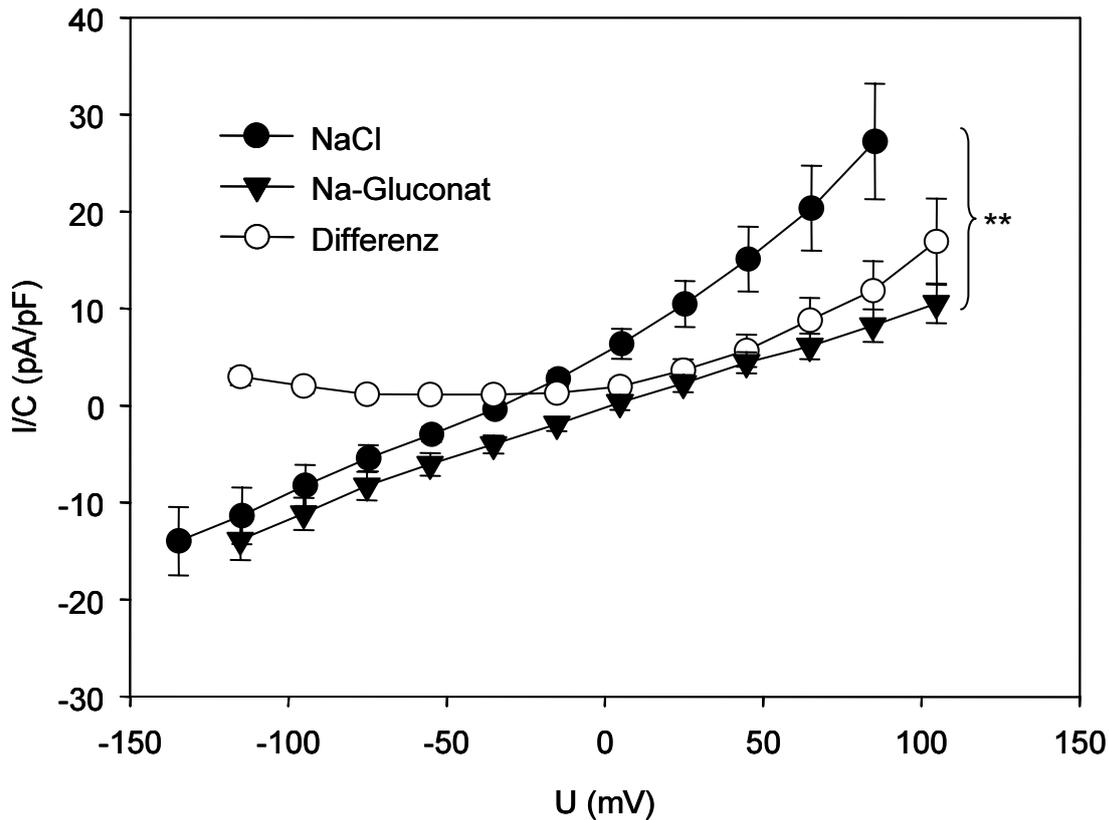


Abbildung 4.5: Strom-Spannungs-Beziehungen von sieben Einzelexperimenten vor und nach dem Ersatz von Chlorid durch Gluconat in der Badlösung (Pipettenlösung: K-Gluconat). Zusätzlich ist der Differenzstrom dargestellt, der die Chloridleitfähigkeit über die Membran repräsentiert.

Der genaue Anteil der Chloridströme an den Ganzzellströmen konnte errechnet werden, indem man die erhaltenen Stromwerte der einzelnen Zellen in Na-Gluconat-Lösung von den Werten abzieht, die in NaCl-Lösung gemessen wurden. Dieser resultierende so genannte Differenzstrom stellt die Chloridleitfähigkeit über die Zellmembran dar und ist in **Abbildung 4.5** ebenfalls abgebildet. Im Einwärtsbereich ergab sich so eine relativ geringe Leitfähigkeit von 5 ± 2 pA/pF während im Auswärtsbereich eine deutlich höhere Leitfähigkeit von 17 ± 9 pA/pF berechnet wurde.

4.3.2 Einfluss von intrazellulärem Kalium

Es ist bekannt, dass Kalium über das Pansenepithel transportiert wird. In Ussingkammerversuchen gelangen es LEONHARD-MAREK und MARTENS (1996) Kaliumleitfähigkeiten sowohl in der basolateralen als auch in der apikalen Membran von PEZ nachzuweisen. Neuere Patch-Clamp-Versuche an unserem Institut haben ebenfalls zu dem Nachweis erheblicher Kaliumleitfähigkeiten über die Membran isolierter PEZ geführt (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Bei einer Versuchsanordnung, bei der die Zellen als hauptsächlichen zytosolischen Bestandteil Kaliumgluconat enthielten, beeinflussten also wahrscheinlich auch Kaliumströme die Ganzzellströme.

Um herauszufinden, welchen Einfluss intrazelluläres Kalium auf die Ganzzellströme hatte, wurde deshalb in den folgenden Versuchen eine Pipettenlösung verwendet, die statt Kaliumgluconat Cäsiummethansulfonat als Hauptbestandteil enthielt. Umspült wurden die Zellen wieder jeweils mit der divalenthaltigen NaCl-Lösung.

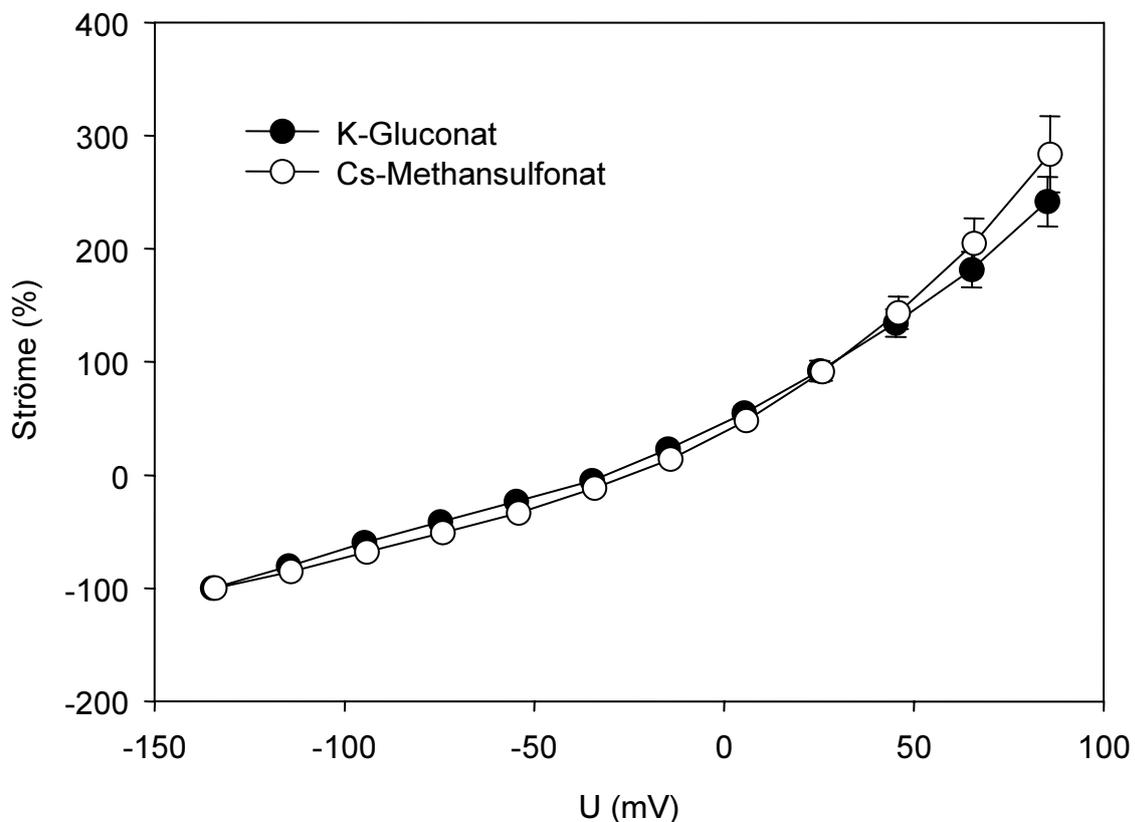


Abbildung 4.6: Strom-Spannungs-Beziehungen von Messreihen mit Kaliumgluconat ($n = 28$) und Cäsiummethansulfonat ($n = 4$) als Hauptbestandteil der Pipettenlösung. Umspült wurden die Zellen jeweils mit NaCl-Perfusionslösung. Normiert wurden die Ströme auf die Werte bei -120 mV zu Beginn der Messung.

Der Vergleich der Daten, die mit K-Gluconat ($n = 28$) und Cs-Methansulfonat ($n = 4$) als Pipettenlösungen ermittelt wurden, erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Nach Normierung der Werte auf die Ströme bei -120 mV zu Beginn der Messungen lag der Auswärtsstrom bei den mit K-Gluconat gefüllten Zellen bei -242 ± 22 %, während der auswärts gerichtete Strom der mit Cs-Methansulfonat gefüllten Zellen im Mittel -284 ± 34 % betrug (ungepaarter t-Test: $p = 0,3$).

Die Umkehrpotentiale lagen bei -29 ± 3 mV (K-Gluconat) und -25 ± 1 mV (Cs-Methansulfonat, $p = 0,4$).

Sowohl Gluconat als auch Methansulfonat gelten als impermeabel für die Zellmembran und üben deshalb keinen Einfluss auf den Ladungstransport über die Membran aus. Da Cäsium nicht durch Kaliumkanäle geleitet wird, sprechen diese Daten dafür, dass der auswärtsgerichtete Strom nicht auf dem Ausstrom von Kalium durch Kaliumkanäle beruht.

4.3.3 Einfluss von intrazellulärem Cäsium

Von vielen NSCC ist bekannt, dass sie das monovalente Kation Cäsium leiten. Auch am Pansenepithel sind mit Hilfe von Ussingkammerexperimenten bereits Leitfähigkeiten des Ions nachgewiesen worden (RÜBBELKE, 1998). Die folgenden Versuche sollten zunächst den Nachweis der Cäsiumleitfähigkeit über die Membran von **isolierten** PEZ erbringen.

In einem zweiten Versuchsabschnitt wurde anschließend geprüft, ob Cäsium die bereits durch umfangreiche Patch-Clamp-Messungen an unserem Institut nachgewiesene Kaliumleitfähigkeit über isolierte PEZ (LEONHARD-MAREK et al., 2005) hemmen kann. Da Cäsium als Kaliumkanalblocker gilt, wäre eine messbare Leitfähigkeit für Kalium mit cäsiumhaltigen Versuchslösungen ein weiterer Beleg für einen NSCC.

4.3.3.1 Cäsiumleitfähigkeit

Der Ersatz von Cholin durch Cäsium in der Pipettenlösung führte zu einem deutlich negativen Umkehrpotential von -4 ± 1 mV ($n = 23$) (CholinCl-Pipettenlösung: 10 ± 2 mV, $n = 24$, $p < 0,001$). Die Auswärtsströme erwiesen sich mit 55 ± 8 pA/pF als deutlich höher gegenüber Versuchen mit CholinCl als Hauptbestandteil der Pipettenlösung (16 ± 3 pA/pF, $p < 0,001$).

Als ebenfalls bemerkenswerter und nicht erwarteter Effekt erwiesen sich die gestiegenen Einwärtsströme, die mit -44 ± 6 pA/pF signifikant größer waren als bei den Zellen, die mit der CholinCl-Pipettenlösung (-13 ± 3 pA/pF, $p < 0,001$) gefüllt waren.

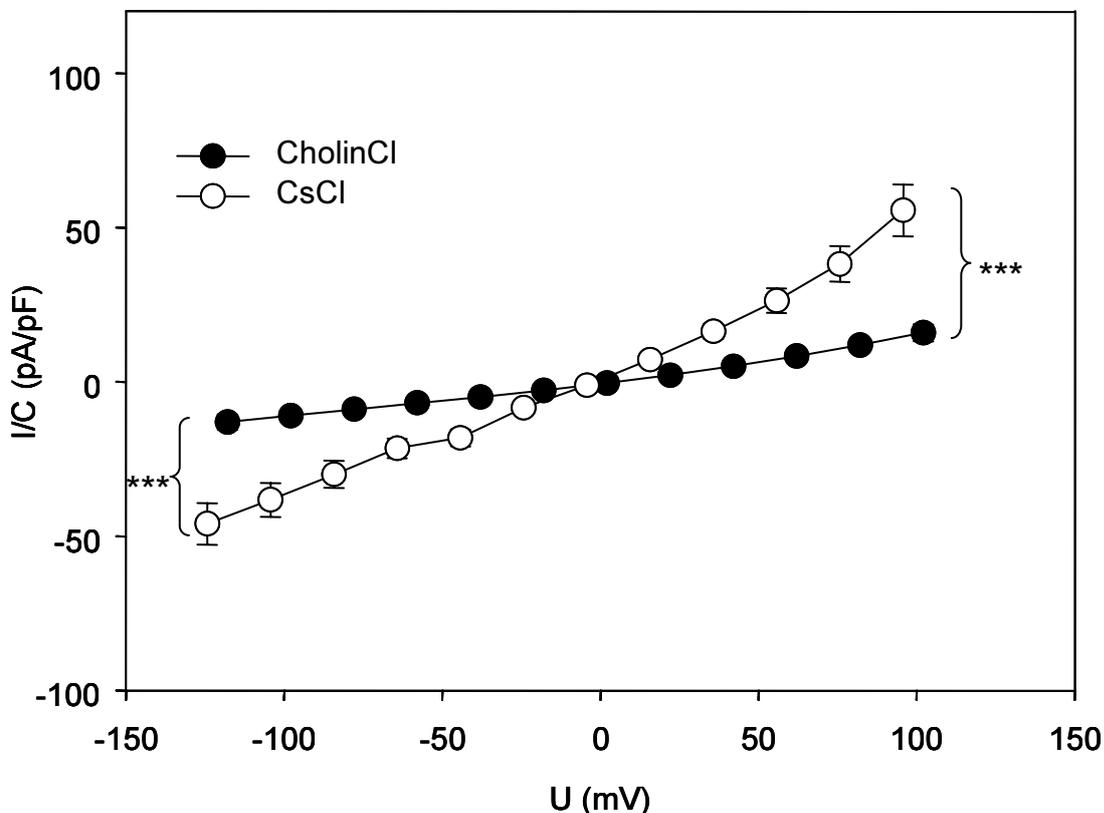


Abbildung 4.7: Strom-Spannungs-Beziehungen von Messreihen mit Cholinchlorid ($n = 24$) und Cäsiumchlorid ($n = 23$) als Hauptbestandteil der Pipettenlösung. Umspült wurden die Zellen mit der NaCl-Perfusionslösung.

4.3.3.2 Einfluss von Cäsium auf die Kaliumleitfähigkeit

Die folgenden Versuche dienen dazu, herauszufinden, ob intrazelluläres Cäsium Auswirkungen auf die bereits nachgewiesenen Kaliumleitfähigkeiten (LEONHARD-

MAREK et al., 2005) hat. Dazu wurde im Laufe der Messungen Natrium durch Kalium in der Badlösung ersetzt.

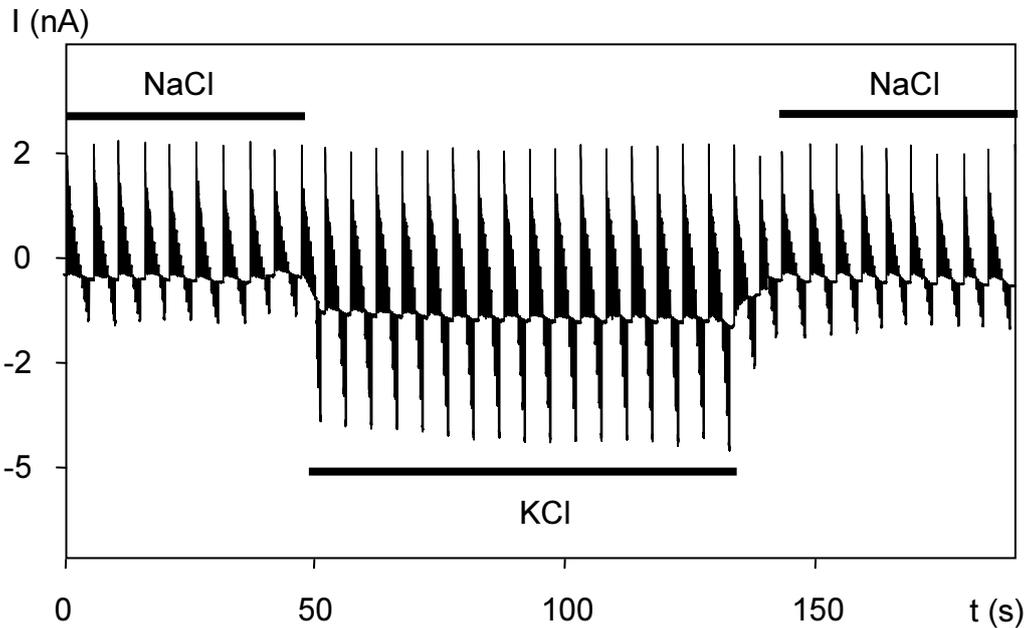


Abbildung 4.8: Pulsprotokoll einer Messung, in deren Verlauf Natrium durch Kalium in der Badlösung ersetzt wurde. Die Einwärtsströme erhöhten sich bei den mit CsCl gefüllten Zellen deutlich sichtbar durch den Lösungswechsel.

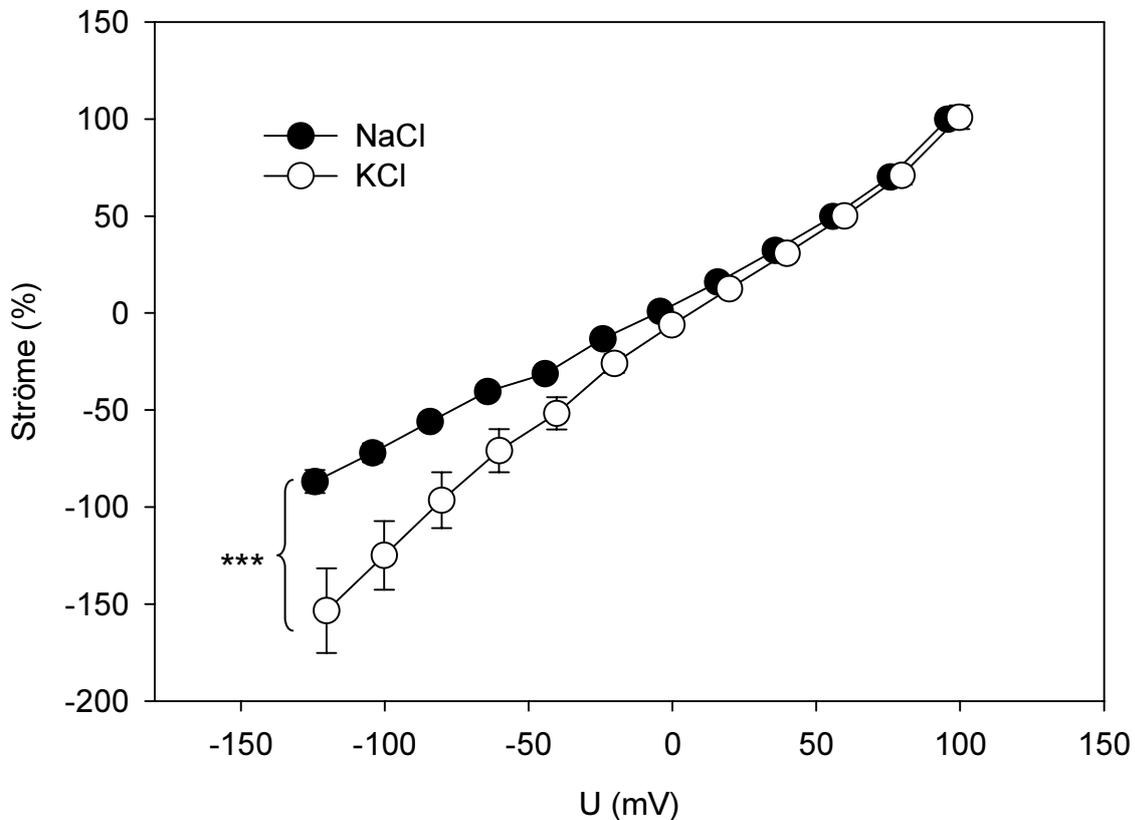


Abbildung 4.9: Strom-Spannungs-Beziehungen von zehn Versuchen vor und nach dem Ersatz von Natrium durch Kalium in der Badlösung (Pipettenlösung: CsCl). Die Ströme wurden normiert auf die Werte bei 100 mV zu Beginn der Messung.

Das in **Abbildung 4.8** dargestellte Messprotokoll einer Zelle zeigte deutliche Kaliumleitfähigkeiten trotz Cäsium als einem Hauptbestandteil in der intrazellulären Lösung. Tatsächlich erhöhte der Ersatz von Natrium durch Kalium in der Badlösung den Einwärtsstrom im Mittel von -44 ± 6 pA/pF auf -86 ± 29 pA/pF ($p = 0,005$, $n = 10$), was einem prozentualen Anstieg von 176 ± 16 % entsprach ($p < 0,001$). Mit dem Anstieg des einwärts gerichteten Stroms depolarisierten die Zellen -4 ± 1 mV auf 7 ± 1 mV ($p < 0,001$). Die Höhe des Auswärtsstroms blieb durch den Lösungswechsel unbeeinflusst (122 ± 24 %, $p = 0,4$).

4.3.4 Einfluss von intrazellulärem Chlorid

Um herauszufinden, welchen Einfluss intrazelluläres Chlorid auf die Ganzzellströme hat, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die CsCl-Pipettenlösung durch eine Pipettenlösung ersetzt, die Cäsiummethansulfonat als hauptsächlichem Bestandteil enthält.

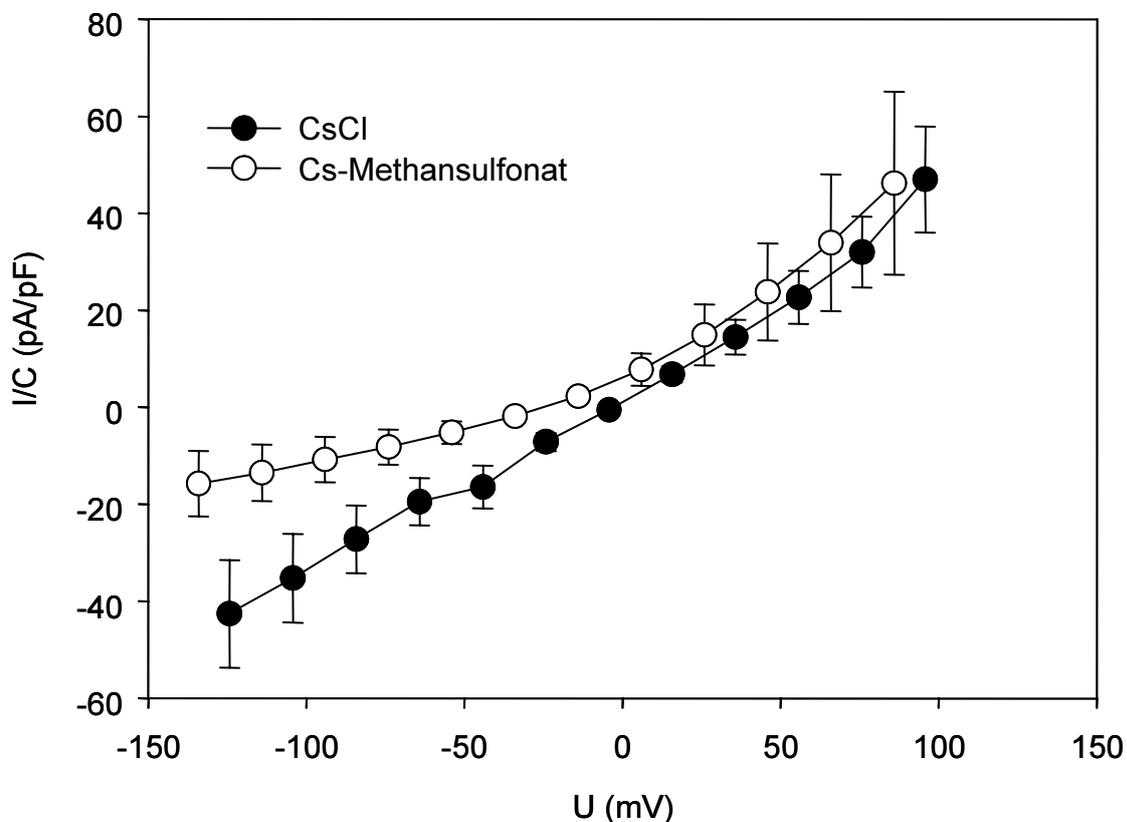


Abbildung 4.10: Strom-Spannungs-Beziehungen von Messreihen mit Cäsiumchlorid ($n = 23$) und Cäsiummethansulfonat ($n = 4$) als hauptsächlichem Bestandteil der Pipettenlösung. Der Ersatz von Chlorid durch Methansulfonat bewirkte eine deutliche Auswärtsrektifikation der Zellen. Als Perfusionslösung diente die NaCl-Standardlösung.

Die Zellen zeigten durch den Ersatz von intrazellulärem Chlorid durch Methansulfonat eine deutliche Hyperpolarisation. So sanken die Umkehrpotentiale auf -25 ± 1 mV ($n = 4$) und waren damit deutlich niedriger als bei Experimenten mit der CsCl-Pipettenlösung (-4 ± 1 mV, $p < 0,001$).

Der „Einwärtsstrom“ (entspricht hier einem Auswärtsstrom negativ geladener Ionen bei negativem Membranpotential) unter dem Einfluss einer chloridfreien Pipettenlösung, sank auf -16 ± 7 pA/pF (CsCl-Pipettenlösung: -44 ± 6 pA/pF; ungepaarter t-Test: $p = 0,074$).

4.3.5 Einfluss von extrazellulärem Natrium

Durch zahlreiche Ussingkammerexperimente wurde bereits der Nachweis einer transepithelialen elektrogenen Natriumleitfähigkeit erbracht, welche durch die Entfernung von Calcium und Magnesium aus der mukosalen Badlösung beträchtlich gesteigert werden konnte (RÜBBELKE, 1998; LANG und MARTENS, 1999; LEONHARD et al., 1990; LEONHARD-MAREK, 2002; LEONHARD-MAREK et al., 2005). Neuere Ergebnisse aus Patch-Clamp-Experimenten zeigten, dass der Natriumtransport sowohl durch extrazellulären Entzug von Calcium und Magnesium als auch durch den intrazellulären Entzug von Magnesium stimulierbar ist (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Die folgenden Versuche sollten klären, welchen Anteil der Natriumstrom an den Ganzzellströmen hat, wenn Calcium und Magnesium in den Lösungen vorhanden ist. Das sollte vor allem Aufschluss über die physiologischen Vorgänge im Pansen geben, da die vollständige Abwesenheit der divalenten Kationen in der Natur nicht vorkommt. Zu diesem Zweck wurde Natrium in der Perfusionslösung im Verlauf der Messungen durch Cholin ersetzt, welches nicht zum Strom beitragen kann, weil es als impermeabel gilt.

Diese Versuche wurden sowohl mit einer (physiologischen) K-Gluconat als auch mit der CholinCl-Pipettenlösung durchgeführt. Die Experimente mit der CholinCl-Pipettenlösung dienten dazu, eventuelle Überlagerungen der Stromantworten durch Kalium zu vermeiden.

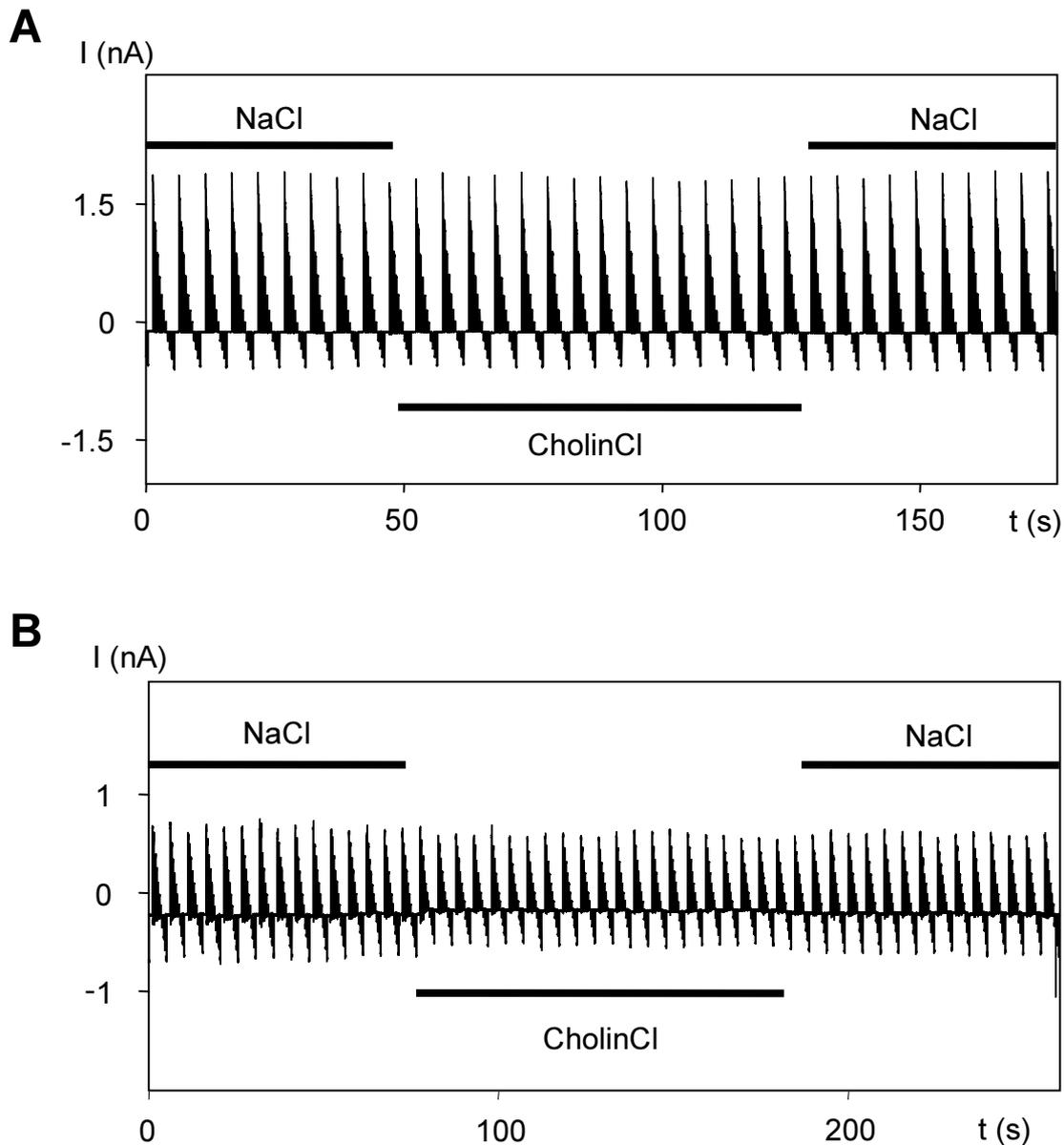
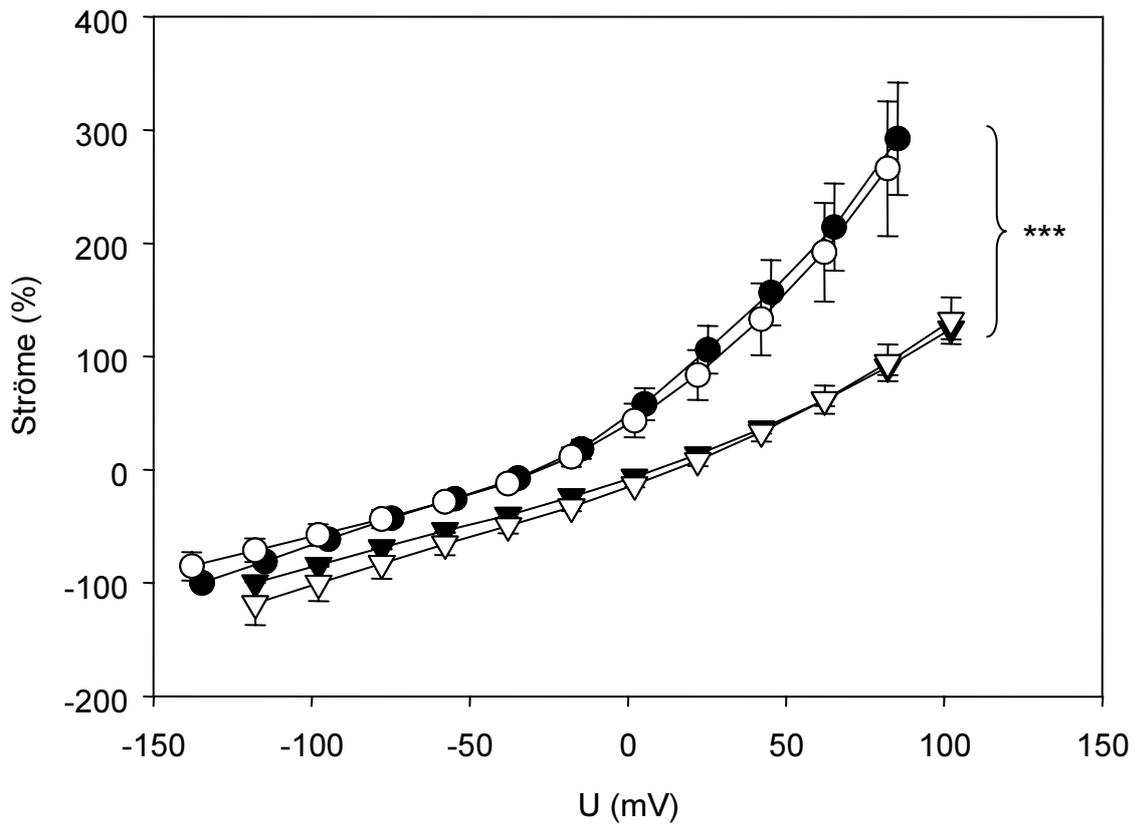


Abbildung 4.11: Repräsentative Stromantwort zweier Zellen auf den Entzug von extrazellulärem Natrium. Im Verlauf der Messungen wurde jeweils Natrium durch Cholin in der Perfusionslösung ersetzt.

A: Pipettenlösung: K-Gluconat; **B:** Pipettenlösung: CholinCl.

In Ussingkammer-Experimenten konnte bereits ein natriumabhängiger Kurzschlussstrom in Anwesenheit von Calcium und Magnesium nachgewiesen werden (MARTENS und GÄBEL, 1988). Durch den Ersatz von Natrium durch Cholin in der extrazellulären Lösung wäre also ein Absinken der Einwärtsströme zu erwarten gewesen – entsprechend der fehlenden Natriumströme in die Zelle hinein.



Bad	//	Pipette
● NaCl	//	K-Gluconat
○ CholinCl	//	K-Gluconat
▼ NaCl	//	CholinCl
▽ CholinCl	//	CholinCl

Abbildung 4.12: Strom-Spannungs-Beziehungen von zwei Versuchsreihen mit CholinCl (n = 8) und K-Gluconat (n = 6) als Pipettenlösung, in deren Messverlauf jeweils Natrium durch impermeables Cholin in der extrazellulären Lösung ersetzt wurde. Die Lösungswechsel hatten unabhängig von der Pipettenlösung keine signifikanten Effekte. Die Auswärtsströme bei den verschiedenen Pipettenlösungen unterschieden sich jedoch deutlich. Normiert wurden die Ströme bei dieser Abbildung auf die Werte bei -120 mV zu Beginn der Messung.

Weder bei den Messungen mit der (physiologischen) K-Gluconat-Pipettenlösung als auch in Experimenten, bei denen die Zellen mit CholinCl gefüllt wurden, ergaben sich durch den Wechsel der Perfusionslösungen Unterschiede im signifikanten Bereich.

So lag der Einwärtsstrom bei den mit **K-Gluconat** gefüllten Zellen bei 15 ± 9 pA/pF (n = 6, p = 0,43). Bei den Auswärtsströmen ergaben sich im Mittel Werte von

31 ± 13 pA/pF (Badlösung: NaCl) bzw. 31 ± 14 pA/pF (Badlösung: CholinCl) ($p = 0,96$). Auch die Umkehrpotentiale änderten sich kaum und lagen bei -26 ± 7 mV in der NaCl-Lösung und bei -25 ± 7 mV in der CholinCl-Badlösung ($p = 0,74$).

Auch bei den Experimenten mit der **CholinCl**-Pipettenlösung blieben deutliche Effekte durch den Austausch der Badlösungen aus. Die Änderung des Einwärtsstroms von -13 ± 3 pA/pF (NaCl) auf -10 ± 2 pA/pF (CholinCl) ($n = 8$) blieb nicht signifikant ($p = 0,5$); ebenso sank der Auswärtsstrom durch den Lösungswechsel nur undeutlich von 16 ± 3 pA/pF auf 11 ± 2 pA/pF ($p = 0,7$). Das Umkehrpotential in der CholinCl-Badlösung (10 ± 3 mV) war vergleichbar mit dem Potential vor dem Lösungswechsel in mit NaCl umspülten Zellen (10 ± 3 mV, $p = 0,8$).

Die auswärts gerichteten Ströme bei den verschiedenen Pipettenlösungen unterschieden sich dagegen deutlich. Die Messungen der mit K-Gluconat gefüllten Zellen ergaben einen mittleren Strom von 27 ± 5 pA/pF ($n = 8$). Mit der CholinCl-Pipettenlösung sank der Auswärtsstrom auf 16 ± 3 pA/pF ($p = 0,12$). Normiert auf die Ströme bei -120 mV zu Beginn der Messung bedeutete dies eine Absenkung von 292 ± 50 % (K-Gluconat) auf 124 ± 9 % (CholinCl, Badlösung jeweils NaCl, $p < 0,001$).

4.3.6 Zusammenfassung

Mit den vorangegangenen Versuchsanordnungen gelang es nicht, die durch Entfernung von divalenten Kationen stimulierbare elektrogene Natriumleitfähigkeit nachzuweisen. So gab es keinen messbaren Effekt durch den Ersatz von extrazellulärem Natrium durch Cholin bei Anwesenheit von physiologischen Mengen an Calcium und Magnesium. Demgegenüber konnte die Leitfähigkeit durch den Ersatz von Natrium durch Kalium in der extrazellulären Lösung gesteigert werden. Diese Kaliumleitfähigkeit wurde nicht durch intrazelluläres Cäsium blockiert (**siehe 4.3.3.2**).

Cäsium selbst wird offenbar ebenfalls geleitet. Das negative Umkehrpotential der mit CsCl gefüllten und mit NaCl umspülten Zellen sprach zudem für eine höhere Leitfähigkeit von Cäsium gegenüber Natrium.

Ebenfalls wurde eine deutliche Leitfähigkeit für Chlorid nachgewiesen. Dies ergaben zum einen die Versuche, bei denen extrazelluläres Chlorid durch Gluconat ersetzt wurde und sich deutliche Effekte beim auswärtsgerichteten Strom ergaben (**siehe 4.3.1**). Hätte es sich beim Auswärtsstrom überwiegend um einen durch Kaliumionen geleiteten Strom gehandelt, wäre der Effekt weitaus geringer gewesen.

Ein Vergleich der Auswärtsströme bei Versuchen mit chloridhaltigen Pipettenlösungen (CholinCl) und Pipettenlösungen ohne Chlorid (K-Gluconat; Badlösung jeweils NaCl) erbrachte ebenfalls signifikante Abweichungen (**siehe 4.3.5**). Dafür, dass die Auswärtsströme maßgeblich aus einem Chloridinflux bestehen, sprach zudem der Vergleich der Auswärtsströme bei den mit K-Gluconat bzw. Cs-Methansulfonat gefüllten Zellen. Denn wenn zum größten Teil Kalium statt Chlorid an den Auswärtsströmen beteiligt wäre, hätten sich durch einen Wechsel zur kaliumfreien Pipettenlösung deutliche Abweichungen ergeben müssen (**siehe 4.3.2**).

4.4 Effekt von cAMP

Die Blockade der Natriumleitfähigkeit durch sehr niedrige Calciumkonzentrationen (μM) warf die Frage auf, ob es weitere Faktoren gibt, die den Natriumtransport modulieren.

Die folgenden Versuche sollten klären, ob die elektrogene Natriumleitfähigkeit durch physiologischerweise vorhandene *second messenger* auch in Anwesenheit von divalenten Kationen moduliert werden kann. Die nachgewiesene endogene Prostaglandinsynthese im Pansenepithel (GÄBEL et al., 1999) mit Erhöhung von zytosolischem cAMP legte es nahe, den Einfluss dieses *second messengers* auf die elektrogene Natriumleitfähigkeit von isolierten Pansenepithelzellen in Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen divalenter Kationen zu untersuchen.

Bei der folgenden Versuchsreihe wurden die Zellen mit CholinCl-Lösung gefüllt, die neben physiologischen Mengen von Calcium und Magnesium zusätzlich 1mM Na-cAMP enthielt, sich aber ansonsten nicht von der Standardlösung (Kontrolle) unterschied. Umspült wurden die Zellen jeweils von der ebenfalls divalenthaltigen NaCl-Perfusionslösung.

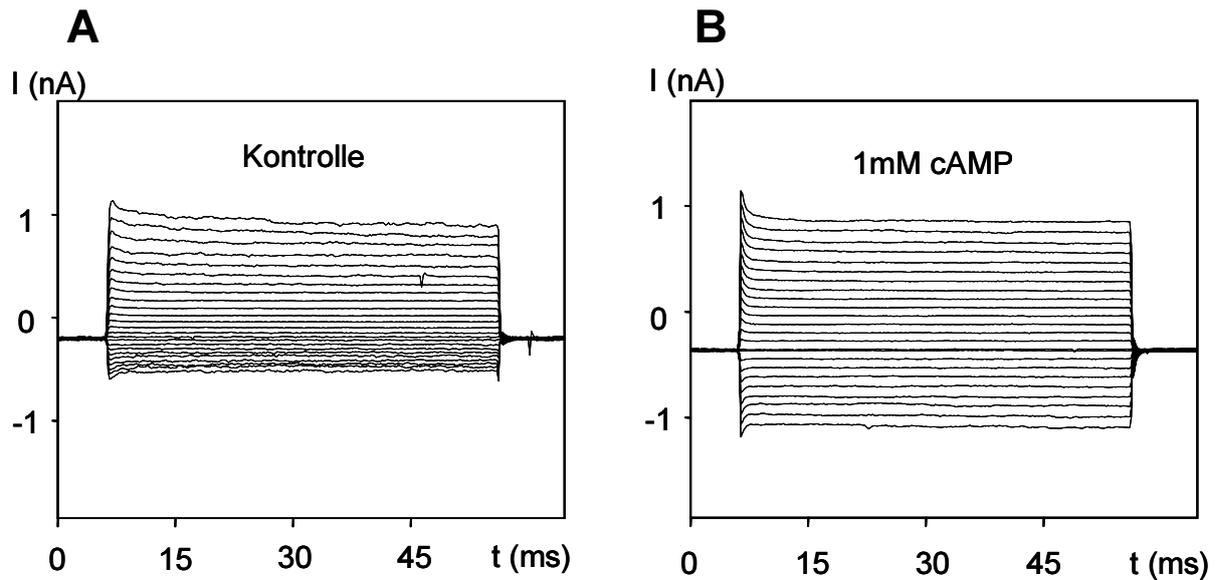


Abbildung 4.13: Repräsentative Pulsprotokolle zweier Zellen, die mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltiger CholinCl-Lösung gefüllt waren. Umspült wurden die Zellen mit NaCl-Standardlösung.

A: Ganzzellströme einer Zelle **ohne cAMP** in der Pipettenlösung

B: Ganzzellströme einer Zelle **mit 1 mM cAMP** in der Pipettenlösung

Beim Vergleich der Stromantworten auf die Spannungspulse fiel deutlich die fehlende Rektifikation der Ströme auf, die über die Membran der mit der cAMP-haltigen Lösung gefüllten Zellen gemessen wurden (**siehe Abbildung 4.13 B**).

Zunächst musste in Betracht gezogen werden, dass es sich um einfache Leckströme bei mangelhafter Sealbildung handelt, die sich ebenfalls ohne Rektifikation darstellen würden. Charakteristisch für solche Leckströme wäre ein Umkehrpotential, welches gegen Null tendiert. Die Zugabe von cAMP hatte jedoch eine deutliche Depolarisation auf 28 ± 3 mV ($n = 19$) gegenüber 10 ± 2 mV in cAMP-freier CholinCl-Lösung ($n = 23$, $p < 0,001$) zur Folge.

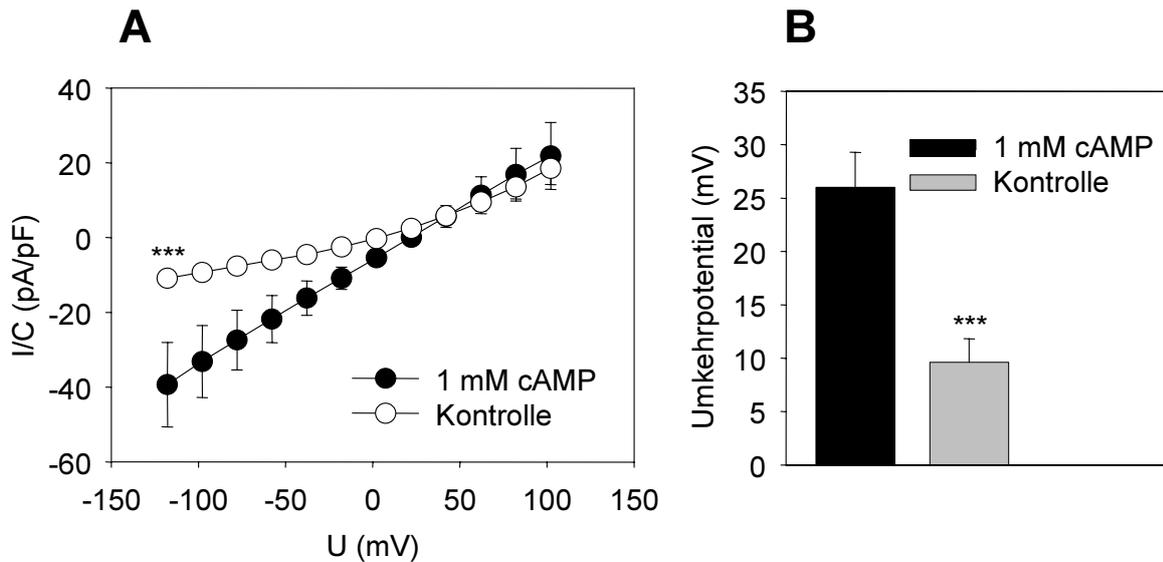


Abbildung 4.14: **A:** Strom-Spannungs-Beziehungen von Experimenten mit der CholinCl-Pipettenlösung ohne cAMP (Kontrolle, n = 23) und mit cAMP (n = 19). Umspült wurden die Zellen jeweils mit NaCl-Standardlösung.
B: Darstellung der depolarisierenden Wirkung von cAMP.

Der Einwärtsstrom der zusätzlich mit cAMP gefüllten Zellen lag bei -53 ± 9 pA/pF (n = 19) und war somit deutlich höher als bei Messungen ohne cAMP in der Pipettenlösung (-13 ± 3 pA/pF, n = 23, $p < 0,001$). Damit stieg der einwärts gerichtete Strom von 100 ± 7 % auf 236 ± 26 % ($p < 0,001$). Die Auswärtsströme unterschieden sich mit 13 ± 2 pA/pF dagegen nicht in einem signifikanten Maß von den Werten der Experimente, die mit cAMP-freier Pipettenlösung durchgeführt wurden ($p = 0,42$). Der cAMP-abhängige Differenzstrom gemessen bei -120 mV lag bei -19 ± 5 pA/pF, bei einer Spannung von 100 mV resultierte ein Differenzstrom von 0 ± 4 mV.

4.4.1 Einfluss von extrazellulärem Natrium

In den darauf folgenden Versuchen sollte der mögliche Einfluss von cAMP auf die Natriumleitfähigkeit genauer bestimmt werden. So könnten die veränderten Einwärtsströme z.B. aus Natriumströmen in die Zelle hinein oder aus Chloridströmen aus der Zelle heraus bestehen.

Zu diesem Zweck wurde im Laufe der Messung Natrium durch Cholin in der Badlösung ersetzt. Abgesehen von 1 mM Na-cAMP in der Pipettenlösung entsprach der Versuchsaufbau dabei exakt den Bedingungen der vorangegangenen Versuche unter 4.1.6.

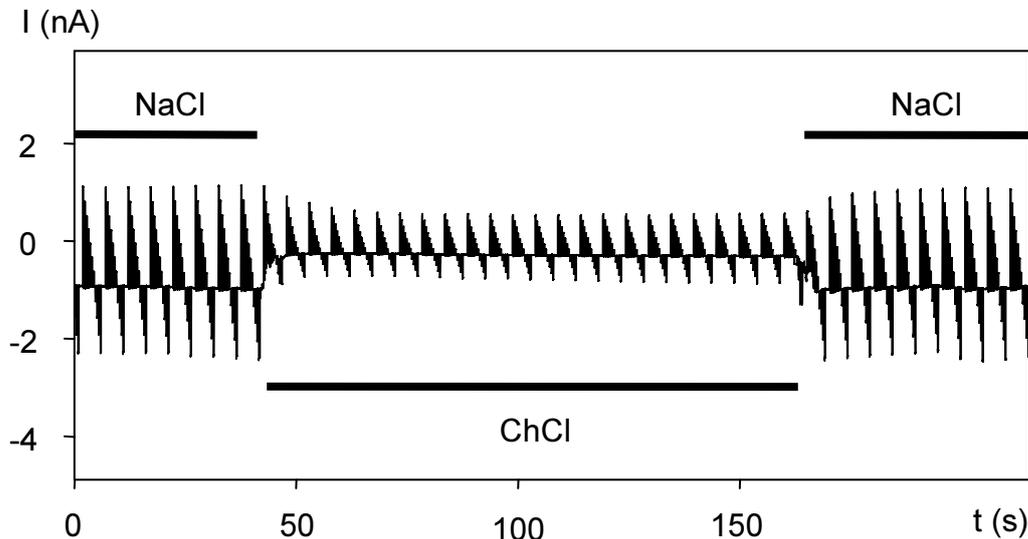


Abbildung 4.15: Darstellung der Ganzzellströme einer Messung, in deren Verlauf Natrium durch Cholin in der Badlösung ersetzt wurde. Gefüllt war die Zelle mit der CholinCl-Pipettenlösung + 1mM cAMP.

Der Ersatz von extrazellulärem Natrium durch Cholin bewirkte unter diesen Versuchsbedingungen eine Abnahme der Einwärtsströme von -42 ± 9 pA/pF auf -23 ± 8 pA/pF ($n = 11$, $p = 0,003$) und entsprach damit nur noch 46 ± 8 % der Ausgangswerte ($n = 11$, $p < 0,001$). Hierbei sank das Umkehrpotential von 22 ± 2 mV auf 14 ± 1 mV ($p < 0,001$).

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ist es möglich, die relativen Permeabilitäten zweier Ionen (P_B/P_A) zu berechnen. Nachdem das dominierende Ion (A) in der externen Lösung durch ein weiteres Ion (B) ersetzt wurde, können die korrespondierenden Umkehrpotentiale ermittelt werden, die in die folgende Gleichung eingesetzt werden (HILLE, 2001):

Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung:
$$E_{rev, B} - E_{rev, A} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln\left(\frac{P_B[B]_o}{P_A[A]_o}\right)$$

Ergebnisse

Bei Verwendung dieser Gleichung ergab sich eine Steigerung der relativen Permeabilität $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cholin}}$ von $1,07 \pm 0,06$ ($n = 11$) in cAMP-freier Lösung auf $1,7 \pm 0,02$ ($n = 11$, $p = 0,004$) in Anwesenheit von cAMP.

Auch am für die Pansenepithelzelle physiologischen Potential von -47 mV sank der Einwärtsstrom durch Ersatz von Natrium durch Cholin in Anwesenheit von cAMP auf 42 ± 8 % des Ausgangswertes ($p < 0,001$). In cAMP-freien Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (109 ± 14 %, $p = 0,5$).

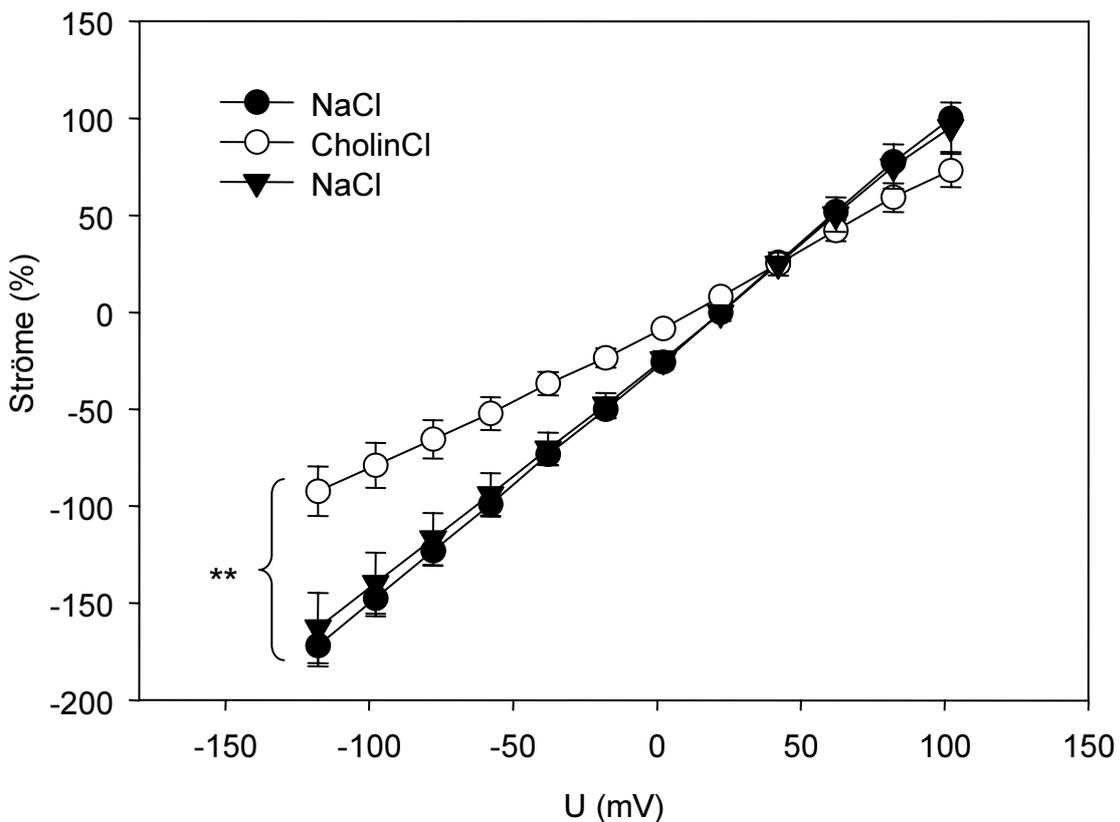


Abbildung 4.16: Strom-Spannungs-Beziehungen von elf mit CholinCl + cAMP (1mM) gefüllten Epithelzellen vor und nach dem Ersatz von Natrium durch Cholin in der Perfusionslösung. Dokumentiert wird hier der deutliche Rückgang der Einwärtsströme in CholinCl-Lösung. Die Ströme wurden zuvor normiert auf die Werte bei 100 mV zu Beginn der Messung.

4.4.2 Einfluss von extrazellulärem Calcium und Magnesium

Die folgende Versuchsreihe sollte Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss der Entzug von divalenten Kationen aus der extrazellulären Lösung auf die Leitfähigkeiten über die Membran der PEZ unter diesen Versuchsbedingungen (cAMP-haltige Pipettenlösung) ausübt.

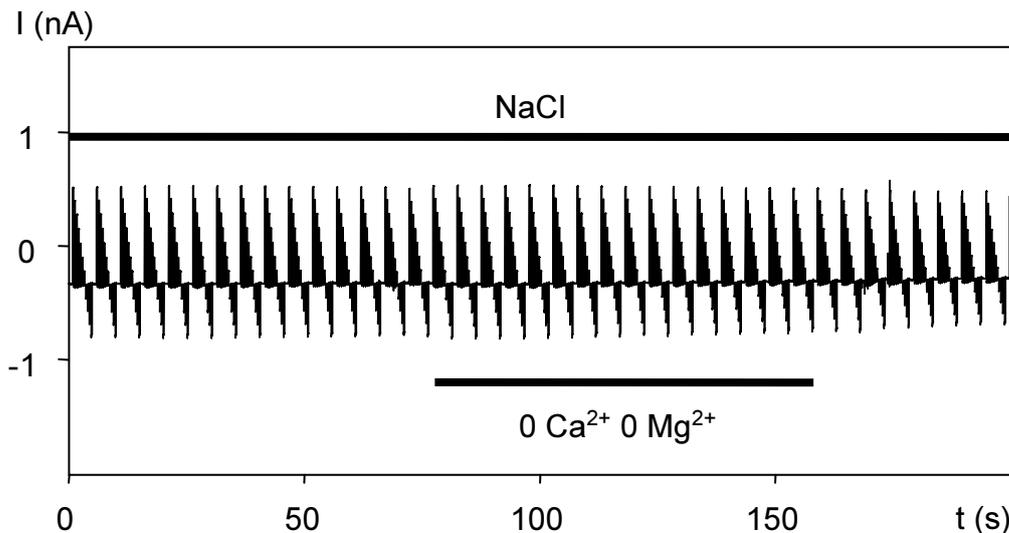


Abbildung 4.17: Darstellung der Ganzzellströme über die Membran einer PEZ. Im Verlauf der Messung wurde von einer divalenthaltigen zur divalentfreien NaCl-Perfusionslösung gewechselt. Gefüllt waren die Zellen mit cAMP-haltiger CholinCl-Lösung. Im Einwärtsbereich ist hier ein minimaler, kaum sichtbarer Effekt dokumentiert, der insgesamt jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Es zeigte sich, dass unter den Versuchsbedingungen mit cAMP in der intrazellulären Lösung das Entfernen der divalenten Kationen bei 4 von 14 Zellen zu einer sichtbaren Erhöhung der Ein- und Auswärtsströme führte. Insgesamt erreichten die Effekte jedoch nicht das Signifikanzniveau. So lag der Einwärtsstrom in divalentfreier Lösung bei -53 ± 15 pA/pF (gegenüber -39 ± 12 pA/pF in divalenthaltiger Lösung, $p = 0,07$).

Der Auswärtsstrom lag mit 23 ± 6 pA/pF nur undeutlich über dem Wert, der bei mit CholinCl ohne cAMP gefüllten Zellen ermittelt wurde (16 ± 3 pA/pF, $p = 0,2$).

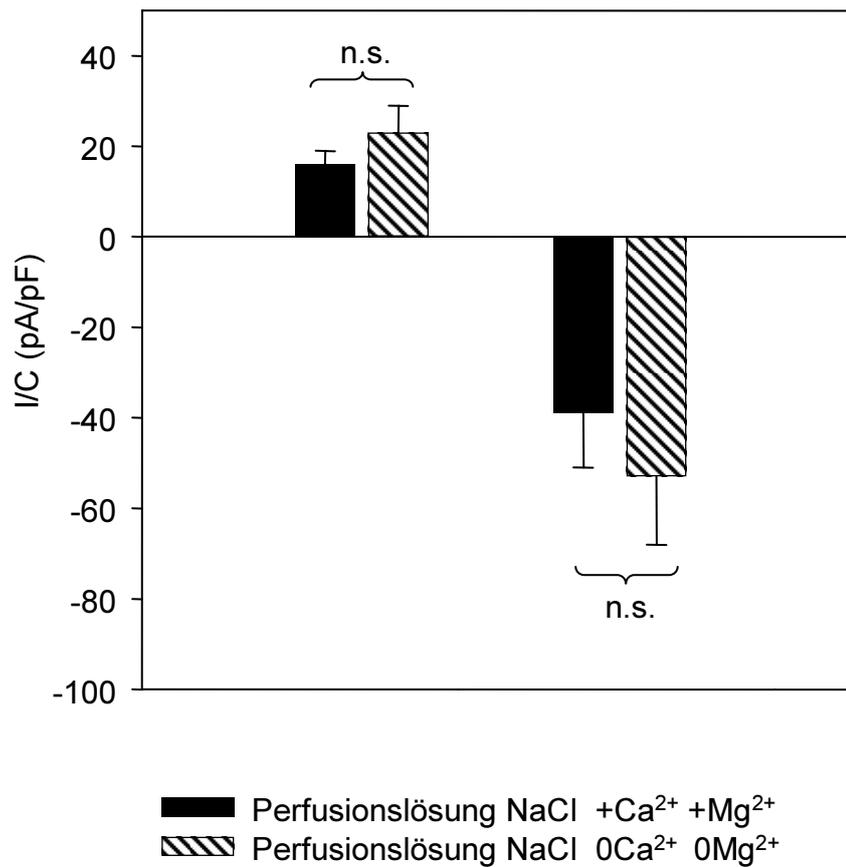


Abbildung 4.18: Effekt des Entzugs von extrazellulärem Calcium und Magnesium auf die Ganzzellströme in cAMP-haltiger CholinCl-Pipettenlösung (n = 14). Im Gegensatz zu Versuchen ohne intrazelluläres cAMP (LEONHARD-MAREK et al., 2005) bewirkte der Entzug der divalenten Kationen keine signifikante Steigerung der Ströme über die Membran.

4.4.3 Einfluss von extrazellulärem Magnesium

Von zahlreichen NSCC ist bekannt, dass sie nicht nur monovalente Kationen leiten, sondern auch eine Leitfähigkeit für divalente Kationen besitzen. Um eine eventuelle Leitfähigkeit für Magnesium nachzuweisen, wurde deshalb eine MgCl_2 -Perfusionslösungen (65 mM Mg^{2+} , Angleichung der Osmolarität durch Mannitol) im Wechsel zur NaCl-Lösung gegeben. Sowohl die intra- als auch extrazellulären Lösungen enthielten dabei physiologische Mengen an Calcium.

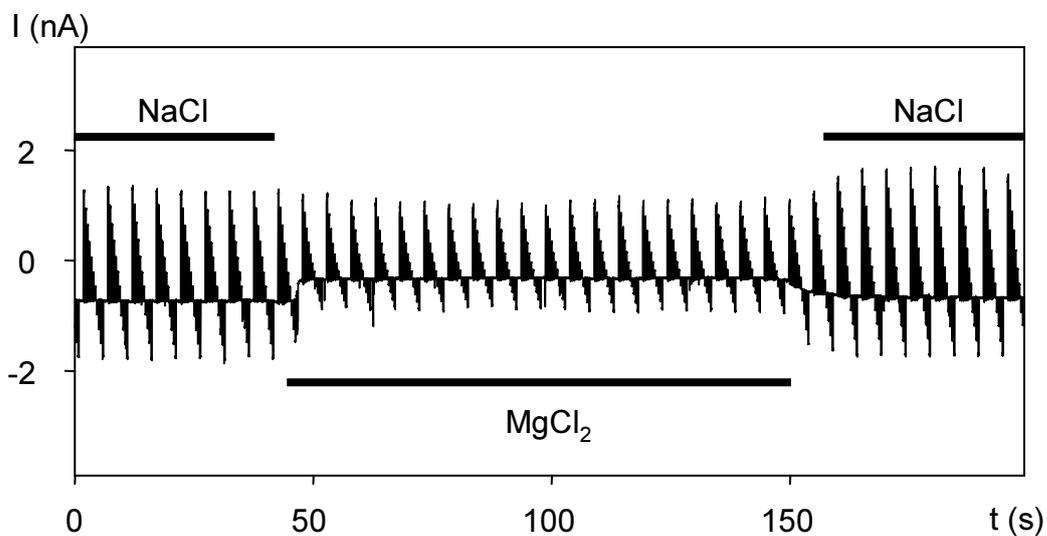


Abbildung 4.19: Repräsentatives Pulsprotokoll einer Messung, in deren Verlauf die NaCl-Perfusionslösung durch MgCl_2 -Lösung (65 mM) ersetzt wurde (Pipettenlösung CholinCl + cAMP).

Infolge des Wechsels zur MgCl_2 -Badlösung hyperpolarisierten die Zellen von 23 ± 2 mV auf 14 ± 11 mV ($n = 6$, $p = 0,04$). Die Einwärtsströme sanken durch den Wechsel der Badlösung von -27 ± 4 pA/pF auf -9 ± 3 pA/pF ($p = 0,008$) bzw. von -227 ± 24 % auf -98 ± 31 % ($p < 0,001$). Die Auswärtsströme änderten sich hingegen nicht signifikant durch den Lösungswechsel ($p = 0,7$).

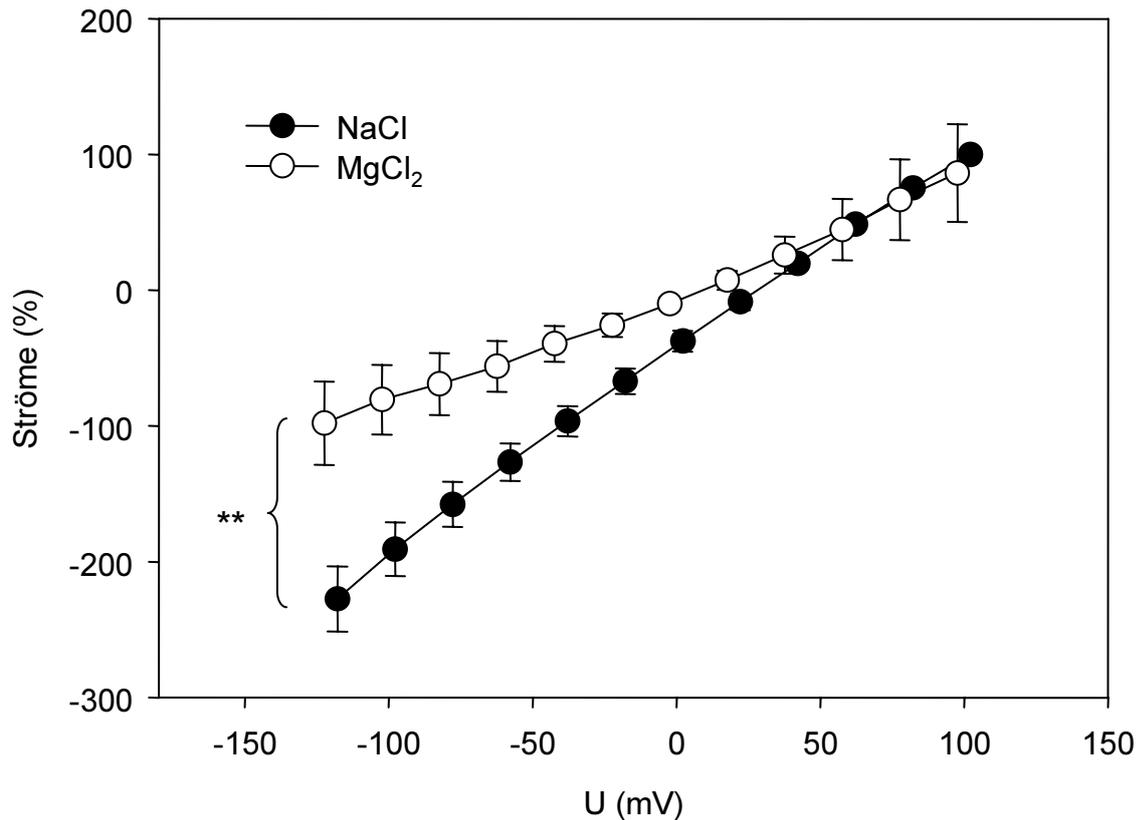
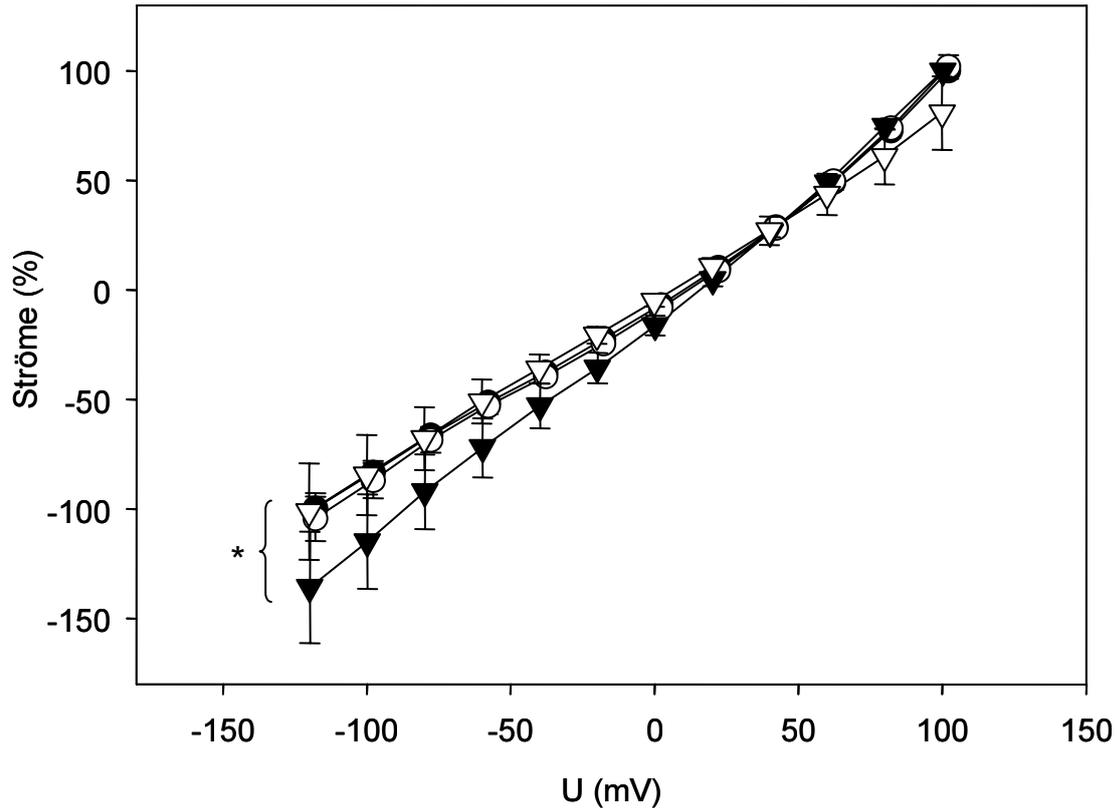


Abbildung 4.20: Strom-Spannungs-Beziehungen von sechs Experimenten, die den deutlichen Rückgang der Einwärtsströme durch den Lösungswechsel von NaCl zu MgCl₂ (65mM Mg²⁺) in der Badlösung dokumentieren. Normiert wurden die Ströme zuvor auf die Werte bei 100 mV zu Beginn der Messung (Pipettenlösung CholinCl + cAMP).

4.4.4 Einfluss von intrazellulärem Magnesium

Es stellte sich die Frage, ob die Effekte von intrazellulärem cAMP durch eine Abnahme der cytosolischen Magnesiumkonzentration zu erklären ist, z.B. durch Bindung von freiem Magnesium an cAMP oder durch Stimulation des Na⁺/Mg²⁺-Austauschers (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Aus diesem Grund wurden in der nächsten Versuchsreihe die Zellen mit CholinCl-Lösung gefüllt, die 1 mM cAMP, aber kein Magnesium enthielt.



Bad	//	Pipette
● NaCl	//	CholinCl
○ CholinCl	//	CholinCl
▼ NaCl	//	CholinCl + cAMP ohne Mg ²⁺
▽ CholinCl	//	CholinCl + cAMP ohne Mg ²⁺

Abbildung 4.21: Strom-Spannungs-Beziehungen von zwölf (CholinCl) bzw. sieben (CholinCl +cAMP ohne Mg²⁺) Experimenten, bei denen im Verlauf der Messung die NaCl-Perfusionslösung durch CholinCl ersetzt wurde.

In den in **Abbildung 4.21** dargestellten Austauschversuchen, bei denen die NaCl-Perfusionslösung durch CholinCl ersetzt wurde, konnte wieder eine signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit P_{Na}/P_{Cholin} $1,07 \pm 0,06$ auf $1,5 \pm 0,1$ ($n = 7$, $p = 0,04$ gegenüber Mg²⁺-haltiger, cAMP-freier Lösung) beobachtet werden. Dabei nahm der Einwärtsstrom beim Wechsel von NaCl ($-136 \pm 25 \%$) zu CholinCl ($-101 \pm 22 \%$) signifikant ab ($p = 0,03$) und auch das Umkehrpotential sank deutlich von 13 ± 3 mV auf 9 ± 3 mV ($p = 0,01$).

Allerdings lag das Umkehrpotential mit 13 ± 3 mV ($n = 12$) im Bereich der Werte, die für cAMP-freie Pipettenlösungen mit und ohne Magnesium ermittelt wurden

($p = 0,2$ [mit Mg^{2+}], $p = 0,06$ [ohne Mg^{2+}], (LEONHARD-MAREK et al., 2005)) und somit signifikant unter dem Wert von 28 ± 3 mV ($n = 19$, $p = 0,001$) von Zellen, die cAMP und Magnesium enthielten.

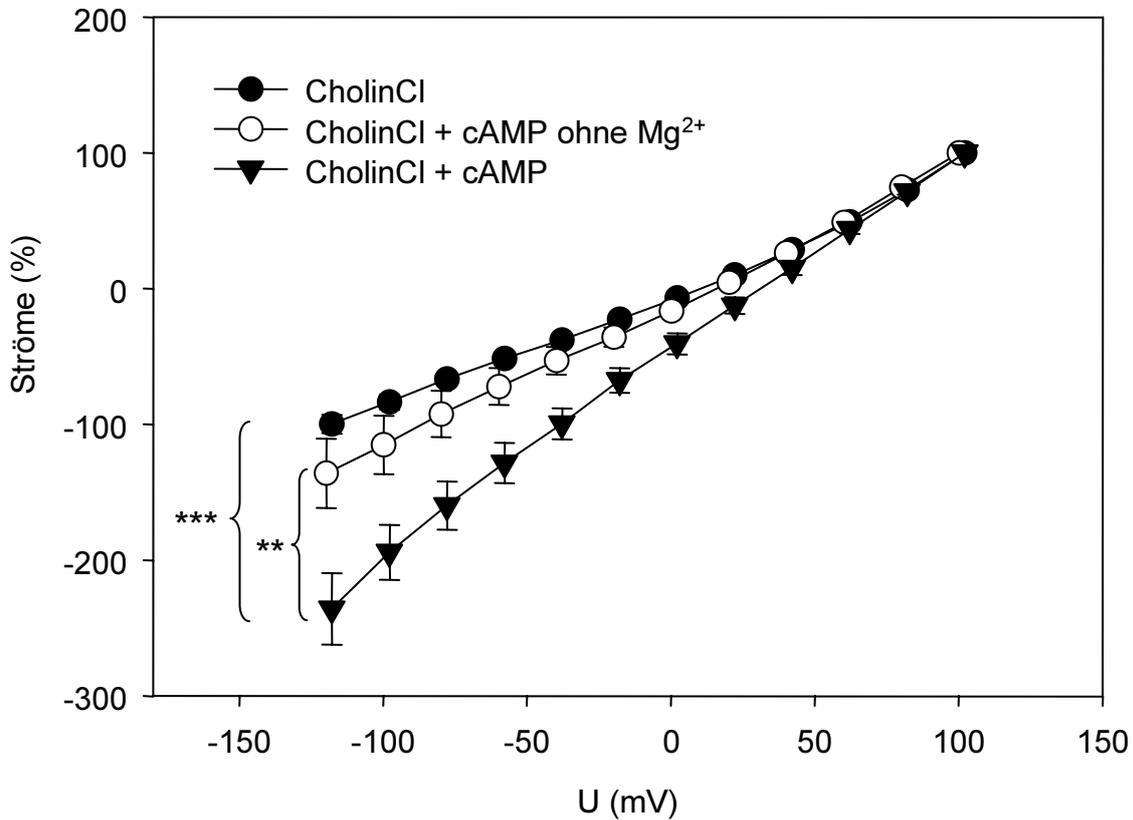


Abbildung 4.22: Effekt der verschiedenen intrazellulären Lösungen auf die Ganzzellströme (normiert auf die Werte bei 100 mV zu Beginn der Messung) von Zellen in NaCl-Persusionslösung. Die Einwärtsströme der Zellen, die mit CholinCl + cAMP *ohne* Mg^{2+} gefüllt waren, unterschieden sich deutlich von den Strömen, die gemessen wurden, wenn die Zellen cAMP *und* Mg^{2+} enthielten. (CholinCl: -100 ± 7 %, $n = 23$; CholinCl + cAMP ohne Mg^{2+} : -136 ± 26 %, $n = 7$; CholinCl + cAMP + Mg^{2+} : -263 ± 26 %, $n = 19$).

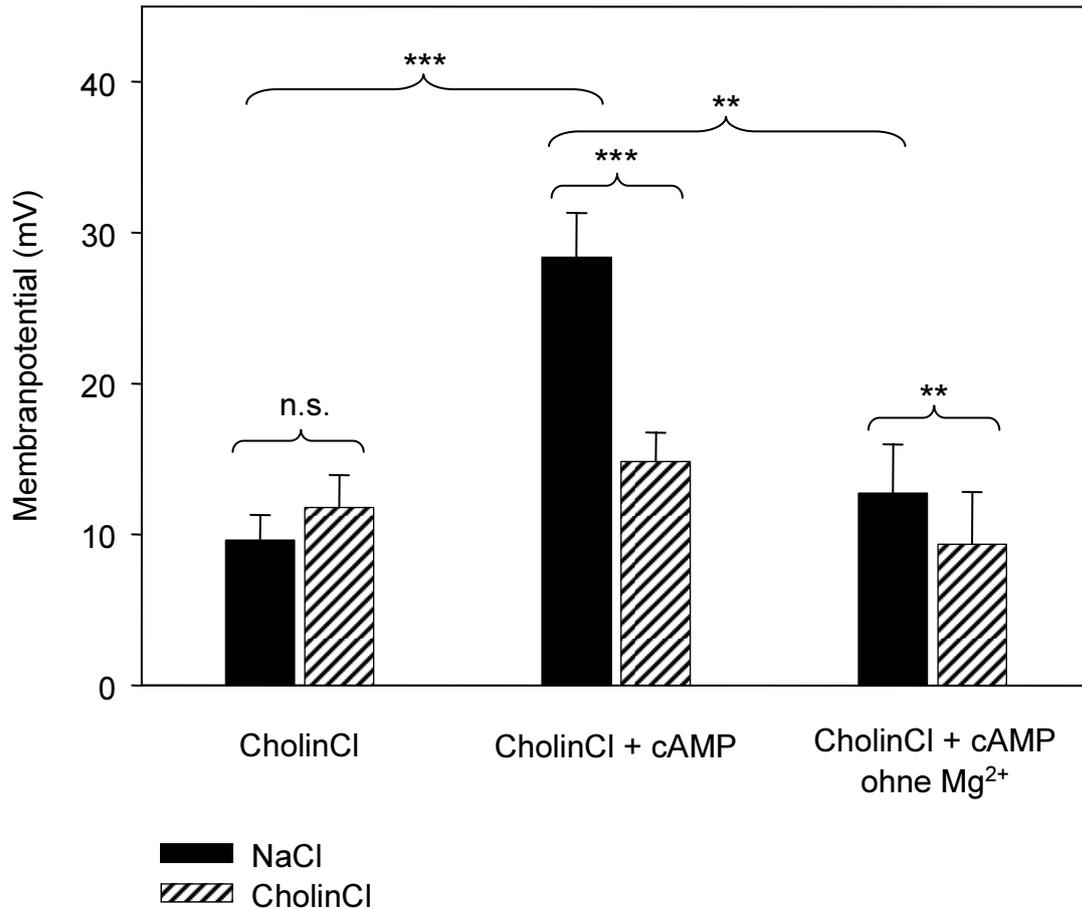


Abbildung 4.23: Zusammenfassung der Wirkung der verschiedenen Pipettenlösungen auf das Membranpotential in den Austauschversuchen. Während der Wechsel der Perfusionslösung von NaCl zu CholinCl bei Zellen, die kein cAMP enthielten, ohne Effekt blieb, bewirkte der Lösungswechsel bei den cAMP-haltigen Zellen ein deutliches Absinken des Umkehrpotentials. Demgegenüber war das Umkehrpotential der Zellen, die cAMP aber *kein* Mg²⁺ enthielten in NaCl-Badlösung signifikant niedriger als bei Zellen, die cAMP *und* Mg²⁺ enthielten.

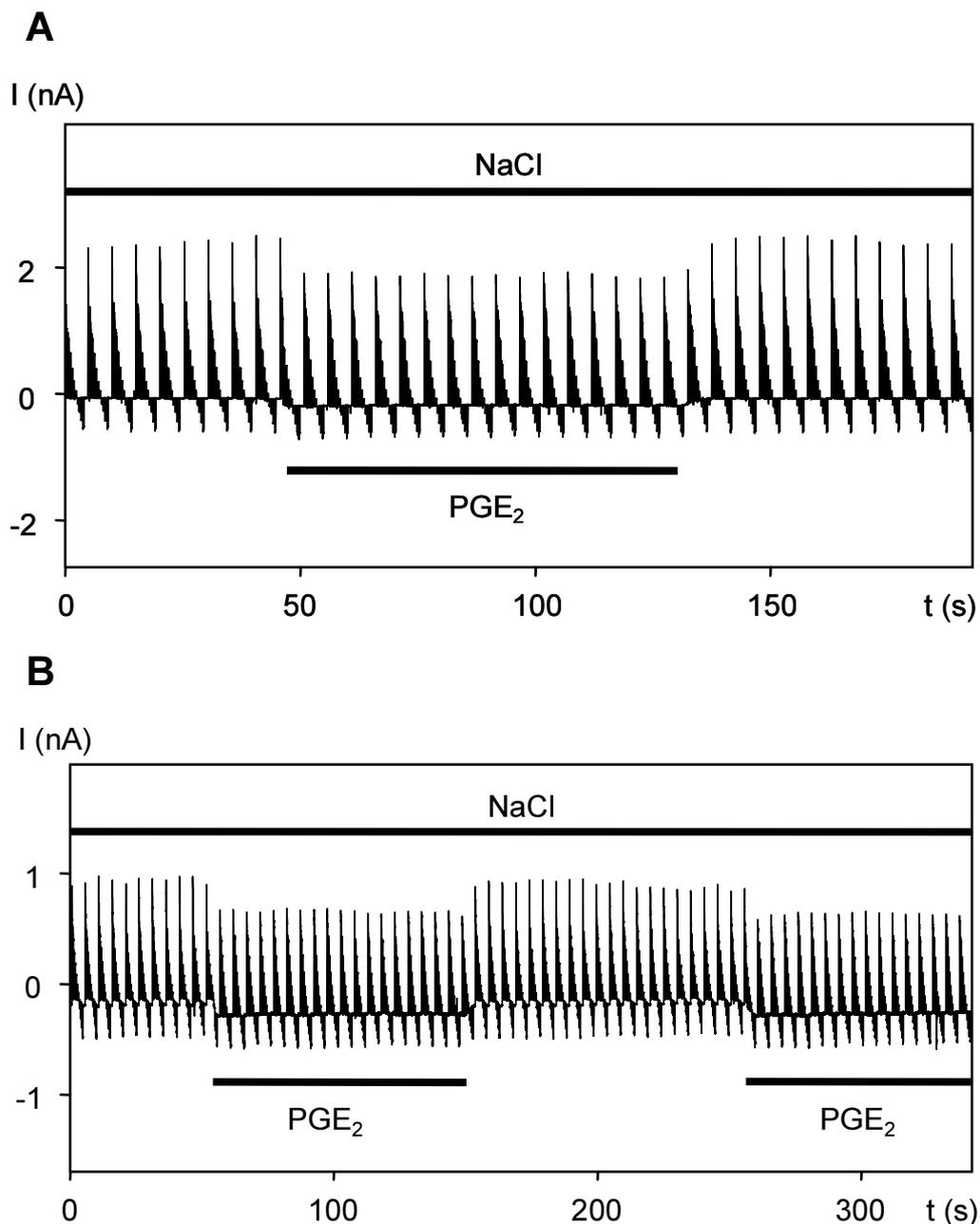
4.5 cGMP

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung von cGMP auf die Natriumleitfähigkeit untersucht werden. Ein Effekt des zyklischen Nukleotids auf die Einwärts- und Auswärtsströme bei $n = 8$ konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch das Umkehrpotential der Zellen, die mit CholinCl + 1 mM Na-cGMP gefüllt wurden lag unverändert bei 5 ± 3 mV ($p = 0,5$ gegenüber CholinCl ohne cGMP).

4.6 Effekte von PGE₂, Forskolin und Theophyllin

4.6.1 Prostaglandin E₂ (PGE₂)

Um die Wirkung einer pharmakologischen Erhöhung von zytosolischem cAMP zu untersuchen, wurden die Zellen in weiteren Versuchen mit verschiedenen Pipettenlösungen gefüllt (CholinCl, K-Gluconat, CsCl). Im Verlauf der Messungen wurde jeweils von der NaCl-Standardlösung zu einer PGE₂-haltigen Lösung (4 μ M) gewechselt, die sich ansonsten nicht von der Standardlösung unterschied.



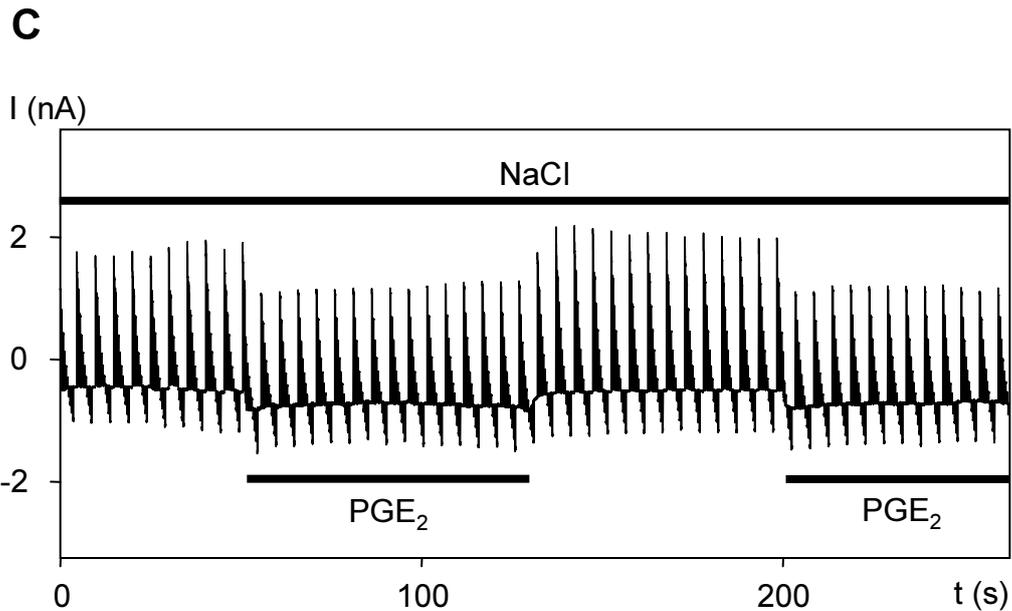


Abbildung 4.24: Repräsentative Stromantworten dreier Messungen, in deren Verlauf von der NaCl-Perfusionslösung zu einer PGE₂-haltigen Lösung gewechselt wurde, die sich ansonsten nicht von der Standardlösung unterschied. **A:** Pipettenlösung: K-Gluconat, **B:** Pipettenlösung: CholinCl, **C:** Pipettenlösung: CsCl.

Mit PGE₂ konnten – allerdings insgesamt nur bei etwa der Hälfte der Zellen – deutliche Effekte auf die Membranleitfähigkeit beobachtet werden, die zur reversiblen Zunahme der Einwärtströme und einer signifikanten Erhöhung der Umkehrpotentiale in NaCl-Lösung führten.

Bei einem erwähnenswerten Teil der mit CholinCl gefüllten Zellen (sechs von insgesamt elf untersuchten Zellen) und der mit K-Gluconat gefüllten Zellen (sieben von 14 Zellen) ergaben sich jedoch keinerlei Effekte auf die Leitfähigkeiten oder Membranpotentiale der Zellen durch das Hinzufügen von PGE₂ zur Perfusionslösung. Da die Effekte bei den übrigen Zellen aber deutlich sichtbar waren (**siehe Abbildungen 4.24 A – C**) und sich als hoch signifikant erwiesen, wurden die Zellen, bei denen sich keine Effekte ergaben, als *non responder* bezeichnet, in einer gesonderten Gruppe erfasst und flossen nicht in die hier dargestellte Auswertung mit ein.

Bei den übrigen mit K-Gluconat gefüllten Zellen kam es mit dem Wechsel zur PGE₂-haltigen Badlösung zu einer Depolarisation von -33 ± 6 mV auf $-16 \pm$ mV ($n = 7$, $p < 0,001$) mit einem Rückgang auf -38 ± 2 mV nach dem Auswaschen von PGE₂ (**siehe Abbildung 4.28**). Der Einwärtsstrom, gemessen am für die PEZ physio-

logischen Potential von -47 mV, erhöhte sich dabei von -3 ± 2 pA/pF auf -9 ± 1 pA/pF ($p = 0,002$). Der Auswärtsstrom bei 100 mV sank leicht auf 82 ± 8 % ($n = 0,08$) des Ausgangswertes ab.

Um die durch PGE_2 hervorgerufenen Effekte eindeutig Natrium zuordnen zu können, wurden die Änderungen der Einwärtsströme durch PGE_2 bei verschiedenen Membranpotentialen, einschließlich der Umkehrpotentiale der dominierenden Ionen, verglichen. Schließlich war nicht auszuschließen, dass PGE_2 auch die in den Vorversuchen nachgewiesenen elektrogenen Leitfähigkeiten von Chlorid oder Kalium beeinflusst.

Aus der **Abbildung 4.25** geht hervor, dass auch an den Umkehrpotentialen von Chlorid ($-62,9$ mV) und Kalium ($-81,1$ mV) signifikante Änderungen der Einwärtsströme beobachtet werden konnten (beide $p = 0,01$). Ein kaliumbedingter (bzw. chloridbedingter) Strom sollte am Umkehrpotential für Kalium (bzw. Chlorid) bei Null liegen. Die deutlichen Effekte deuten deshalb auf einen natriumbedingten Strom hin. Für eine Änderung der Natriumleitfähigkeit spricht ebenfalls, dass sich trotz erheblicher Triebkräfte für den Chlorideinstrom bzw. Kaliumausstrom am Umkehrpotential für Natrium ($64,98$ mV) keine signifikanten Änderungen bei den mit K-Gluconat gefüllten Zellen ergaben.

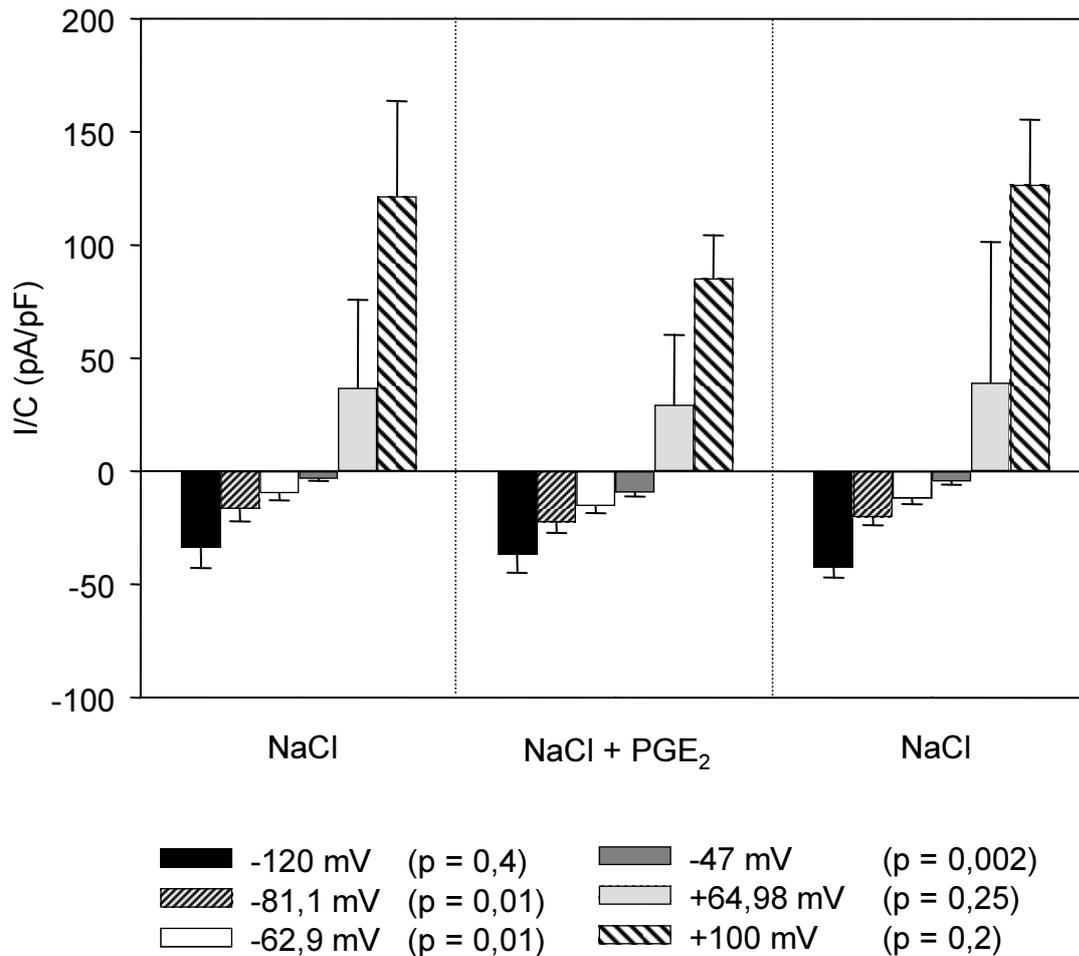


Abbildung 4.25: Zusammenfassung des Effekts von PGE₂ auf die mittleren Ströme bei verschiedenen Membranpotentialen. Dargestellt sind jeweils die Ströme in PGE₂-freier und PGE₂-haltiger (4μM) NaCl-Standardlösung (+ Rückgang) bei den Umkehrpotentialen von Na⁺ (64,98 mV), Cl⁻ (-62,9 mV), K⁺ (-81,1 mV), der physiologischen Membranspannung von PEZ (-47 mV) und den maximalen Haltepotentialen (100 mV und -120 mV). Mit p wurden die jeweiligen Unterschiede zwischen PGE₂-haltiger und PGE₂-freier Badlösung angegeben. Gefüllt waren die Zellen mit **K-Gluconat** (n = 7).

Entsprechend der Wirkung von PGE₂ bei den mit K-Gluconat gefüllten Zellen, konnten auch bei Messungen mit CholinCl als Pipettenlösung ähnliche Effekte beobachtet werden, wobei das Umkehrpotential nach Applikation von PGE₂ von 2 ± 1 mV auf 22 ± 2 mV ($p < 0,001$, $n = 5$) stieg (**siehe Abbildung 4.28**).

Auch ergaben sich signifikante Unterschiede der Ströme am physiologischen Membranpotential der PEZ (-47 mV) und am Umkehrpotential für Cl⁻ (-1,02 mV). Wie zuvor bei den mit K-Gluconat gefüllten Zellen deutete dies auf eine Änderung der Leitfähigkeit für Natrium hin.

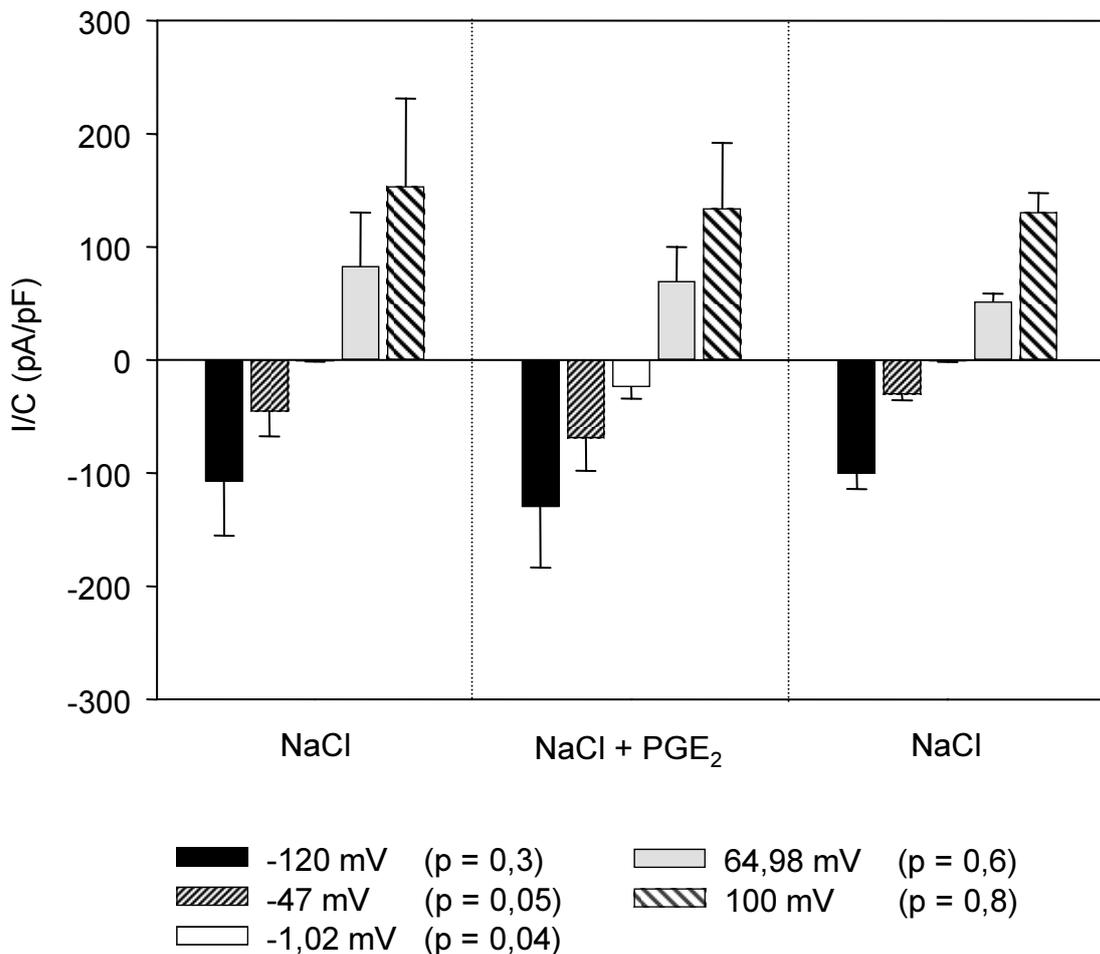


Abbildung 4.26: Effekt von PGE₂ auf die mittleren Ströme bei verschiedenen Membranpotentialen der mit **CholinCl** gefüllten Zellen ($n = 5$). Dargestellt sind die Ströme in PGE₂-freier und PGE₂-haltiger NaCl-Standardlösung (+ Rückgang) bei den Umkehrpotentialen von Na⁺ (64,98 mV), Cl⁻ (-1,02 mV), der physiologischen Membranspannung von PEZ (-47 mV) und den maximalen Haltepotentialen (100 mV und -120 mV). Mit p wurden die jeweiligen Unterschiede zwischen PGE₂-haltiger und PGE₂-freier Badlösung angegeben.

Die mit CsCl gefüllten Zellen zeigten ebenfalls signifikante Änderungen der Ströme bei verschiedenen Membranspannungen. Bemerkenswerterweise ergaben sich bei dieser Versuchsreihe auch deutliche Unterschiede bei positiven Haltepotentialen,, was auf eine reduzierte Cäsiumleitfähigkeit unter dem Einfluss des Prostaglandins hindeutete.

Das Umkehrpotential stieg nach Gabe von PGE₂ von -2 ± 1 mV auf 31 ± 5 mV ($p < 0,001$, siehe **Abbildung 4.28**).

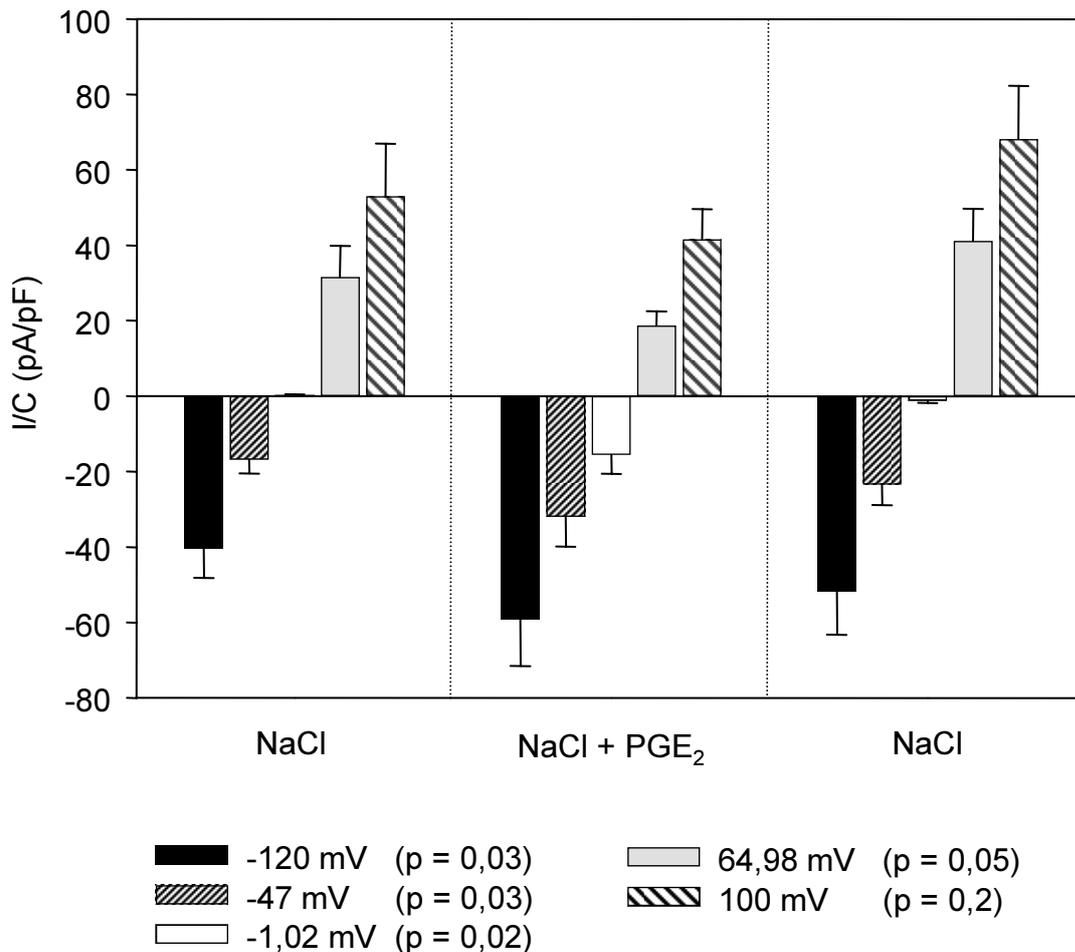


Abbildung 4.27: Zusammenfassung des Effekts von PGE₂ auf die mittleren Ströme bei verschiedenen Membranpotentialen der mit **CsCl** gefüllten Zellen (n = 8). Dargestellt sind die Ströme in PGE₂-freier und PGE₂-haltiger NaCl-Standardlösung (+ Rückgang) bei den Umkehrpotentialen von Na⁺ (64,98 mV), Cl⁻ (-1,02 mV), der physiologischen Membranspannung von PEZ (-47 mV) und den maximalen Haltepotentialen (100 mV, -120 mV). Mit p wurden die jeweiligen Unterschiede zwischen PGE₂-haltiger und PGE₂-freier Badlösung angegeben.

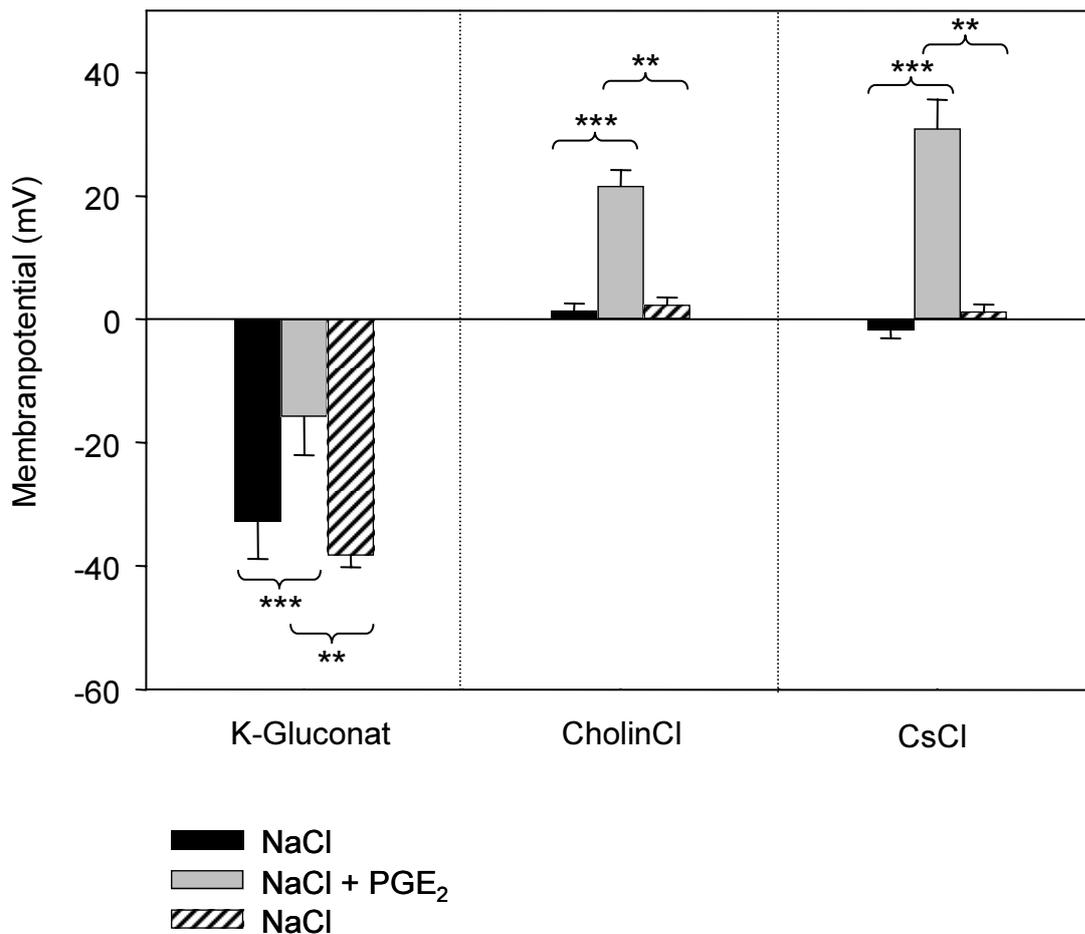


Abbildung 4.28: Darstellung der Wirkung von PGE₂ auf die Umkehrpotentiale. Das Ausmaß der Depolarisation wurde vergleichend dargestellt bei verschiedenen Pipettenlösungen (K-Gluconat (n = 7), CholinCl (n = 5), CsCl, (n = 8)). Signifikante Unterschiede ergaben sich jeweils durch den Wechsel zur PGE₂-haltigen Lösung wie auch nach dem erneuten Wechsel zur PGE₂-freien Badlösung.

4.6.2 Forskolin

Ähnliche Effekte wie durch PGE₂ wurden auch nach der Zugabe von 10 µM Forskolin zur NaCl-Perfusionslösung beobachtet, wobei das Umkehrpotential mit dem Lösungswechsel von $0,7 \pm 2$ mV auf 27 ± 2 mV (n = 3, p = 0,002) stieg (Pipettenlösung: CsCl). In den Versuchen konnte zudem eine signifikante Zunahme des Einwärtstromes von -70 ± 16 pA/pF auf -89 ± 19 pA/pF (p = 0,04), was einer Zunahme von 128 ± 2 % entsprach (p = 0,004), und eine sichtbare leichte Abnahme des Auswärtstromes beobachtet werden. Am physiologischen Membranpotential der

PEZ von -47 mV erhöhten sich die Einwärtsströme von -31 ± 7 pA/pF auf -54 ± 12 pA/pF ($p = 0,05$).

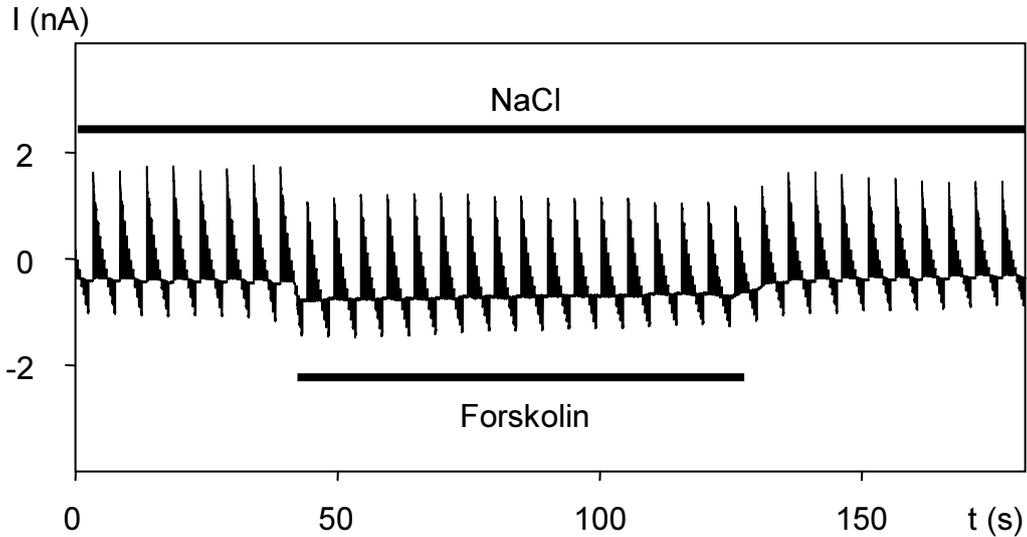


Abbildung 4.29: Repräsentatives Pulsprotokoll einer Messung in deren Verlauf von der NaCl-Standardlösung zu einer Perfusionslösung gewechselt wurde, die zusätzlich $10 \mu\text{M}$ Forskolin enthielt (Pipettenlösung: CsCl).

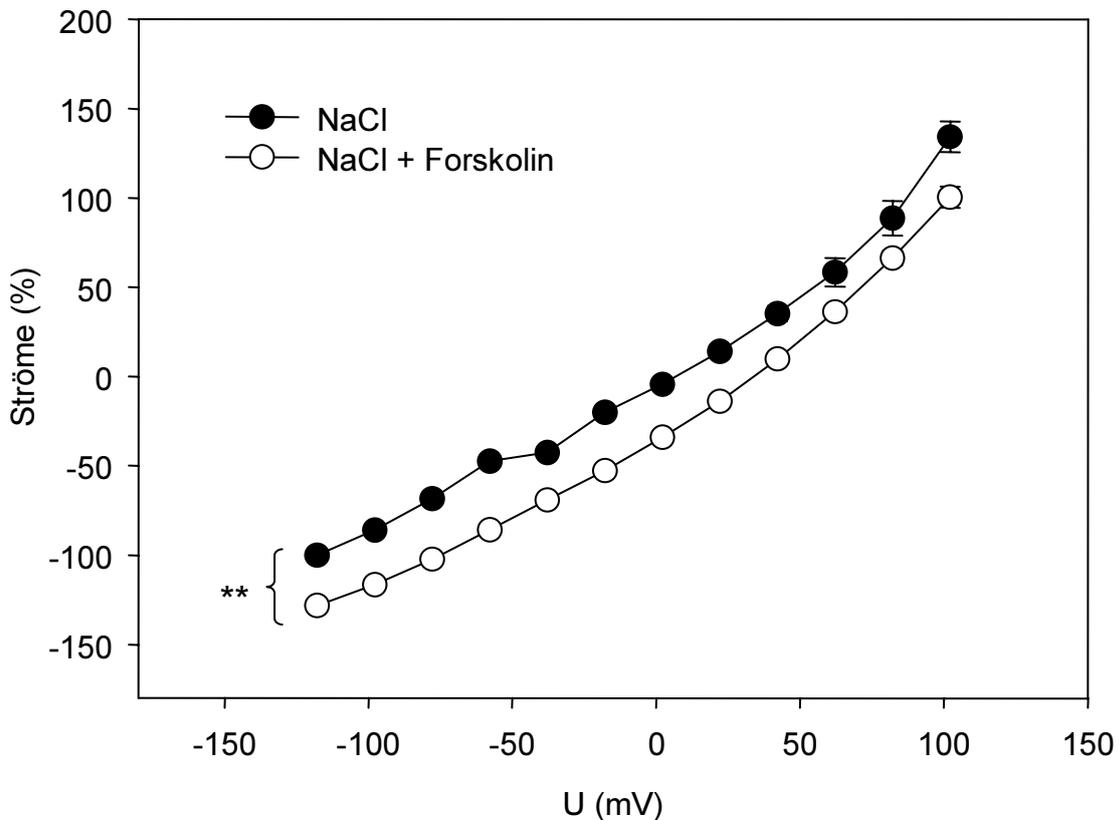


Abbildung 4.30: Strom-Spannungs-Beziehungen aus drei Versuchen vor und nach dem Wechsel der NaCl-Standardlösung zu einer Badlösung, die zusätzlich $10 \mu\text{M}$ Forskolin enthielt. Die Ströme der mit CsCl gefüllten Zellen wurden zuvor auf die Werte bei -120 mV zu Beginn der Messung normiert.

4.6.3 Theophyllin

Insgesamt an neun Zellen wurden in einer weiteren Versuchsreihe Effekte des Phosphodiesterasehemmers Theophyllin (10 mM) untersucht. Bei fünf der mit CholinCl gefüllten Zellen kam es unter Theophyllin zu einem leichten Abfall sowohl des Auswärts- als auch des Einwärtsstroms, der sich aber nicht statistisch signifikant absichern ließ (**siehe Abbildung 4.31**). Auch die Effekte auf das Umkehrpotential, wie sie bei der Zugabe von PGE₂ und Forskolin zu beobachten waren, erreichten kein signifikantes Maß.

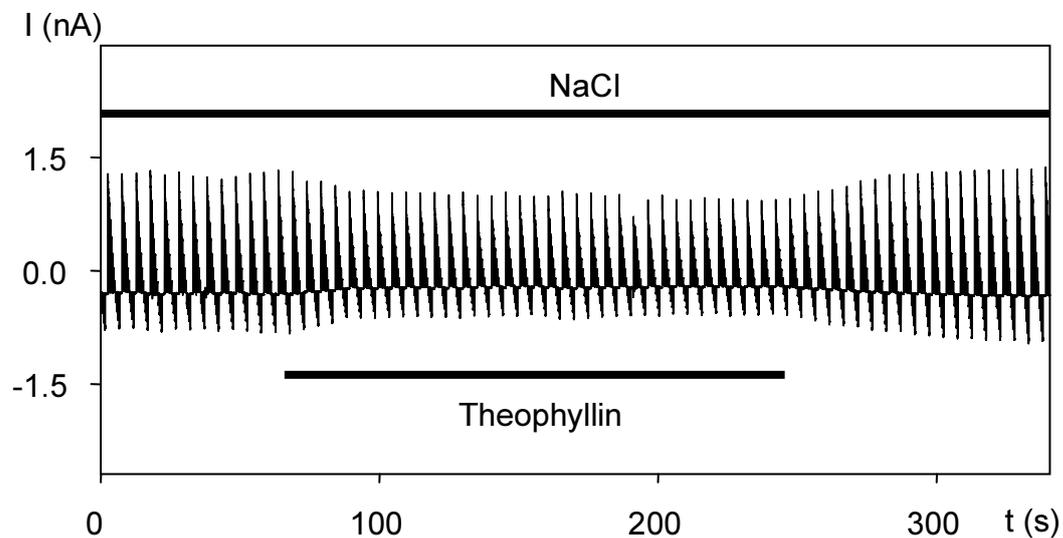


Abbildung 4.31: Darstellung der Ganzzellströme im Verlauf einer Messung. Bei dieser mit CholinCl gefüllten Zelle bewirkte Theophyllin einen leichten Rückgang der Ein- und Auswärtsströme, der jedoch nicht statistisch signifikant wurde.

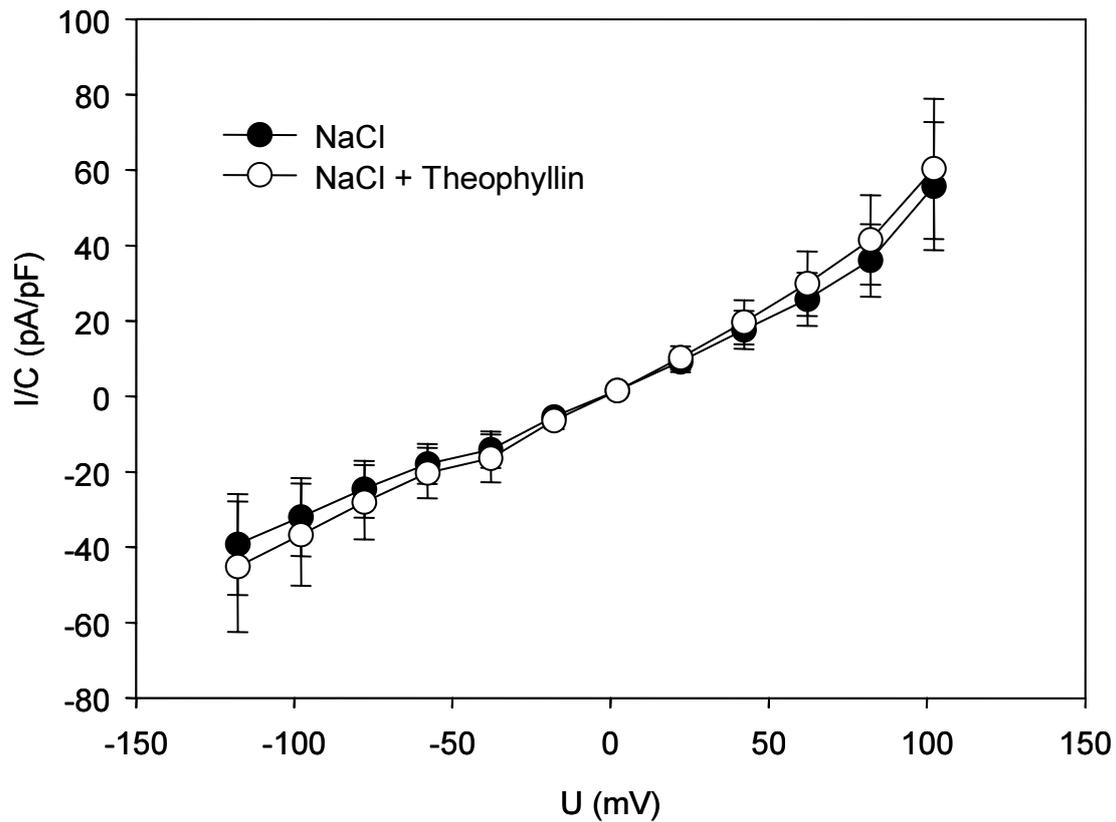


Abbildung 4.32: Strom-Spannungs-Beziehungen von neun Experimenten vor und nach der Zugabe von Theophyllin zur Badlösung. Bei keiner Membranspannung der mit CholinCl gefüllten Zellen ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede.

4.6.4 Zusammenfassung

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte eine Erhöhung der elektrogenen Natriumleitfähigkeit durch cAMP auch bei Anwesenheit von physiologischen Mengen an Calcium und Magnesium in der extrazellulären Lösung nachgewiesen werden. Dabei hatte die direkte Applikation von cAMP mit der Pipettenlösung vergleichbare Effekte wie die pharmakologische Erhöhung von zytosolischem cAMP durch PGE₂ und Forskolin.

Die Stimulation der elektrogenen Natriumleitfähigkeit mit dem hohen Anstieg des Umkehrpotentials und des Einwärtsstroms fand dabei nur in Anwesenheit von zytosolischem Magnesium statt und kann somit vermutlich nicht allein durch den Abfall der intrazellulären Magnesiumkonzentration durch Stimulation des Na⁺/Mg²⁺-Austauschers erklärt werden.

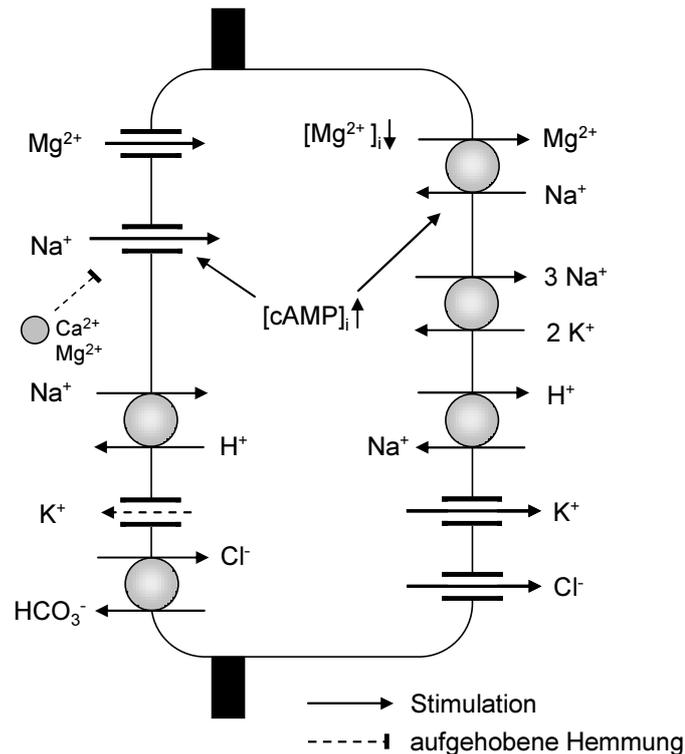


Abbildung 4.33: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse in einem Zellmodell. Neben der Stimulation des basolateralen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers durch cAMP – und damit der Absenkung der intrazelluläre Magnesiumkonzentration – führt offenbar die Erhöhung der zytosolischen cAMP-Konzentration auch zu einer direkten Stimulation der Natriumleitfähigkeit durch einen NSCC ($\text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$). Die blockierende Wirkung der extrazellulären divalenten Kationen wird dabei aufgehoben. Der elektrogene Chloridtransport erfolgt möglicherweise über den postulierten basolateralen Chloridkanal.

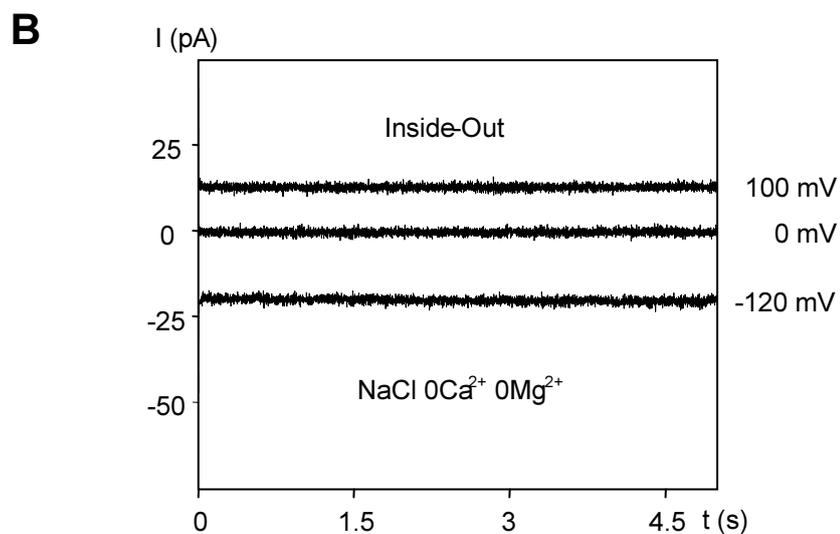
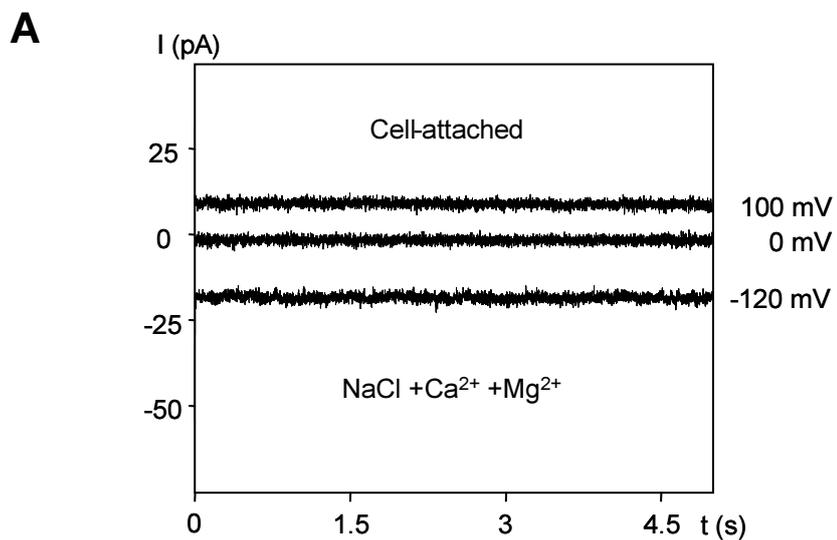
4.7 Einzelkanalmessungen

Es wurden insgesamt 39 Zellen in der Inside-Out- und Outside-Out-Konfiguration auf Einzelkanalereignisse untersucht. Dabei sollte zunächst die Wirkung des Entzugs von Calcium und Magnesium aus der Perfusionslösung und ein Effekt durch den Ersatz von Natrium durch Kalium überprüft werden. Ein eindeutiger Hinweis auf einen durch den Entzug divalenter Kationen stimulierbaren, natriumleitenden Kanal konnte bei $n = 12$ Messungen jedoch nicht abgeleitet werden.

Gezeigt werden konnte aber, dass der Sealwiderstand im *excised patch* trotz Entzugs der divalenten Kationen aus der NaCl-Lösung nicht abnahm.

Auffällig war, dass bei Gabe von divalentfreier KCl-Lösung ($n = 8$) eine Zunahme der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation erfolgte, während sich die Leitfähigkeit bei Depolarisation nicht veränderte.

In den folgenden Abbildungen sind beispielhaft die Einzelkanalströme einer Zelle bei verschiedenen Membranspannungen (100 mV, 0 mV, -120 mV) in der Cell-attached- und der Inside-Out-Konfiguration dargestellt. Die Pipette enthielt die calcium- und magnesiumhaltige NaCl-Standardlösung.



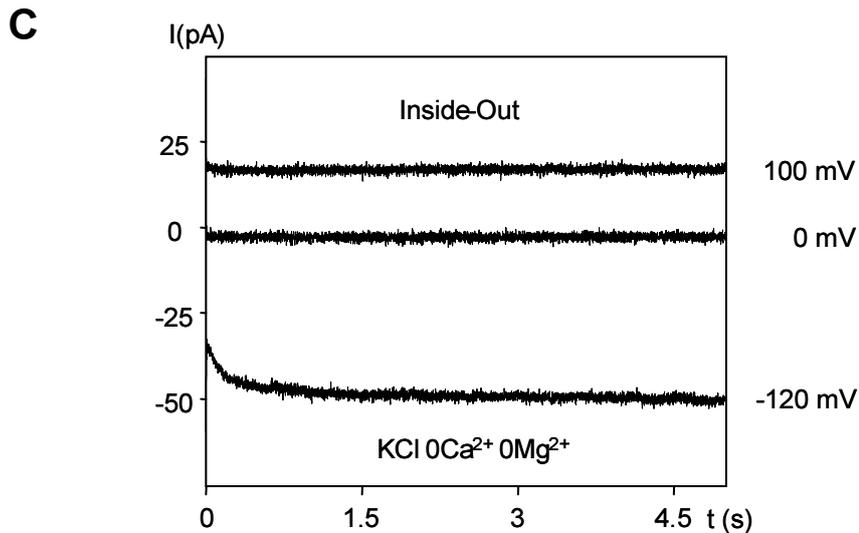
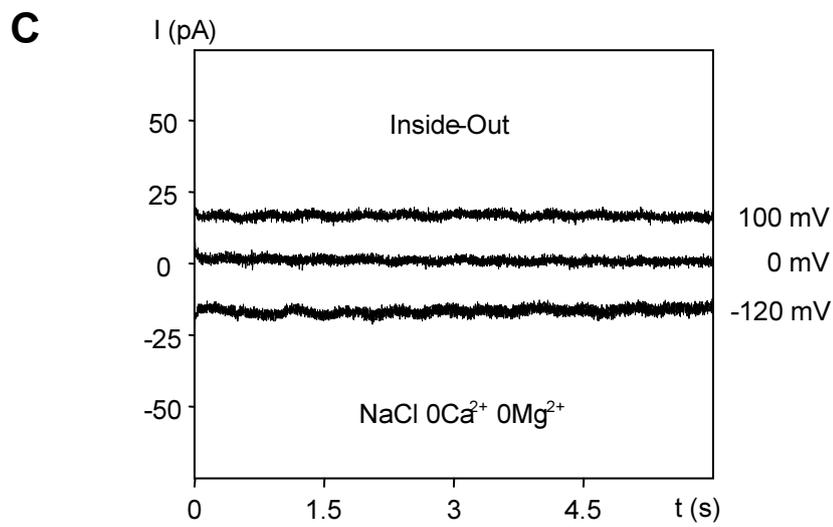
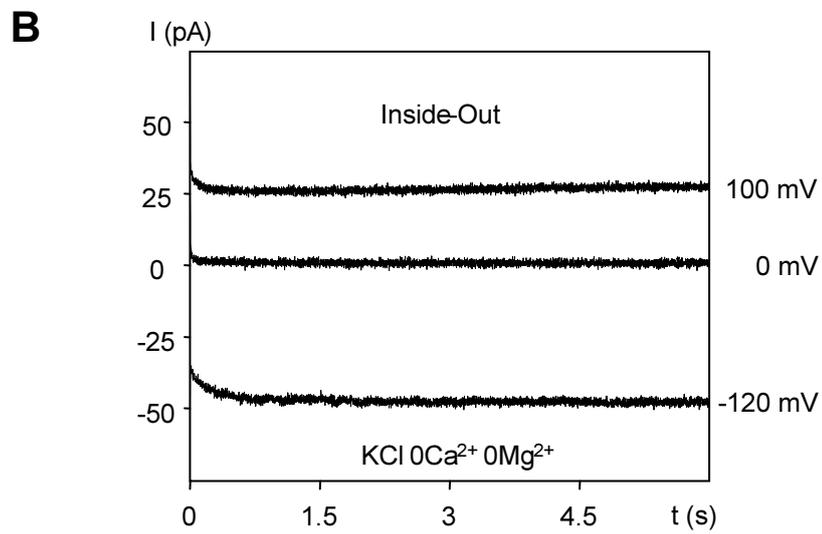
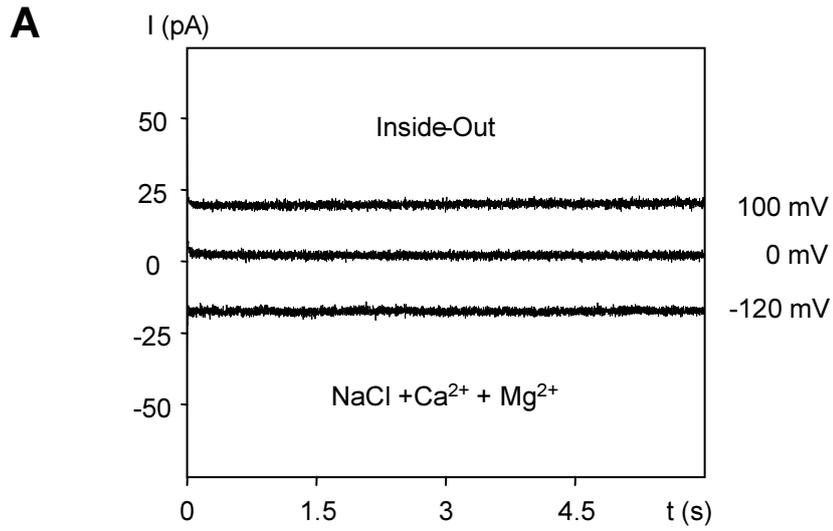


Abbildung 4.34: Darstellung der Messprotokolle von Einzelkanalmessungen einer einzelnen Zelle. Die Pipette enthielt die NaCl-Standardlösung mit physiologischen Mengen an Calcium und Magnesium. **A:** Messprotokoll in der Cell-attached-Konfiguration. Umspült wurde die Zelle mit divalenthaltiger NaCl-Lösung. **B:** Die Zelle wurde in die Inside-Out-Konfiguration überführt und mit divalentfreier NaCl-Lösung perfundiert. Bemerkenswert war der stabile Sealwiderstand trotz Entzugs von Calcium und Magnesium. **C:** Dieselbe Zelle nach dem Wechsel der Perfusionslösung zu einer divalentfreien KCl-Lösung. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation. Bei Depolarisation ergaben sich keine deutlichen Veränderungen.

Bei der im Folgenden dargestellten Messung an einer einzelnen Zelle (Pipettenlösung NaCl-Standardlösung) wurde wie zuvor die Leitfähigkeitserhöhung bei Hyperpolarisation durch den Wechsel von NaCl-Lösung zu einer calcium- und magnesiumfreien KCl-Lösung beobachtet. Hingegen blieb ein Effekt durch den alleinigen Entzug der divalenten Kationen (1,7 mM Ca²⁺, 0,9 mM Mg²⁺) aus (**siehe Abbildung 4.35 A-C**).

Im Laufe des Versuchs wurde zusätzlich zu einer hoch calcium- und hoch magnesiumhaltigen Perfusionslösung (jeweils 92,66 mM) gewechselt. Insgesamt wurde dieser Wechsel bei 5 Zellen durchgeführt. In allen Fällen verringerten sich die Einwärtsströme durch den Lösungswechsel deutlich.



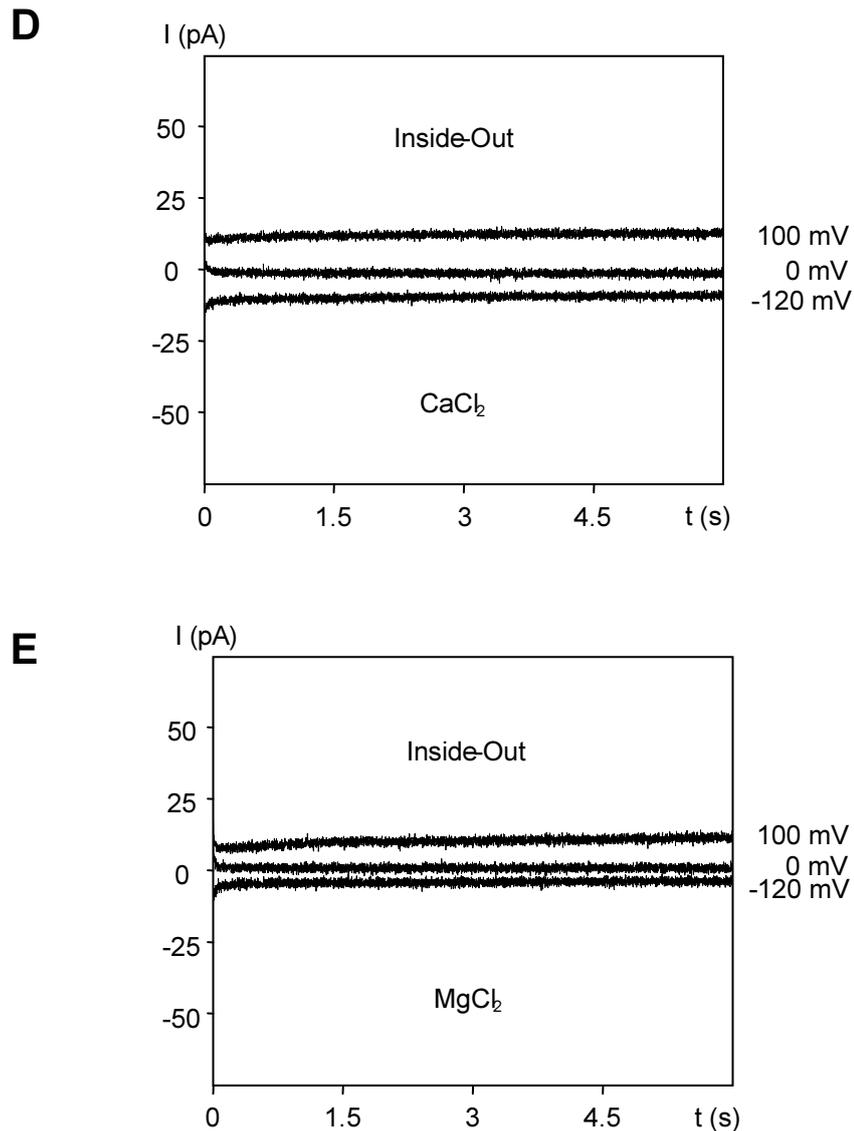


Abbildung 4.35: Darstellung von Einzelkanalmessungen bei einer einzelnen Zelle. Die Pipette enthielt die NaCl-Standardlösung mit physiologischen Mengen an Calcium und Magnesium. Alle Messungen wurden in der Inside-Out-Konfiguration aufgezeichnet. **A:** Nach dem Aufreißen der Zellmembran und Überführung in die Inside-Out-Konfiguration wurde die Zelle zunächst mit divalenthaltiger NaCl-Lösung umspült. Der Wechsel zur calcium- und magnesiumfreien KCl-Lösung führte zur Erhöhung der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation (**B**) während die Entfernung der divalenten Kationen allein keine Auswirkungen auf die Ströme hatte (**C**). Das Umspülen der Zellen mit einer hoch calciumhaltigen (**D**) bzw. hoch magnesiumhaltigen (**E**) Lösung (jeweils 92,66 mM) führte zu einer sichtbaren Erniedrigung der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation, wobei der Effekt in MgCl₂-Lösung ausgeprägter zu sein schien.

In weiteren 5 Messungen wurde an Zellen zunächst in der Whole-Cell-Konfiguration die bereits beschriebene, durch Entzug divalenter Kationen stimulierbare Leitfähigkeit nachgewiesen. Im unmittelbaren Anschluss wurde der gleiche Seal in die Outside-Out-Konfiguration überführt. Auch hier konnten durch Entzug divalenter Kationen keine Einzelkanalereignisse ausgelöst werden. Allerdings nahm die Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation zu (**siehe Abbildung 4.37 B**).

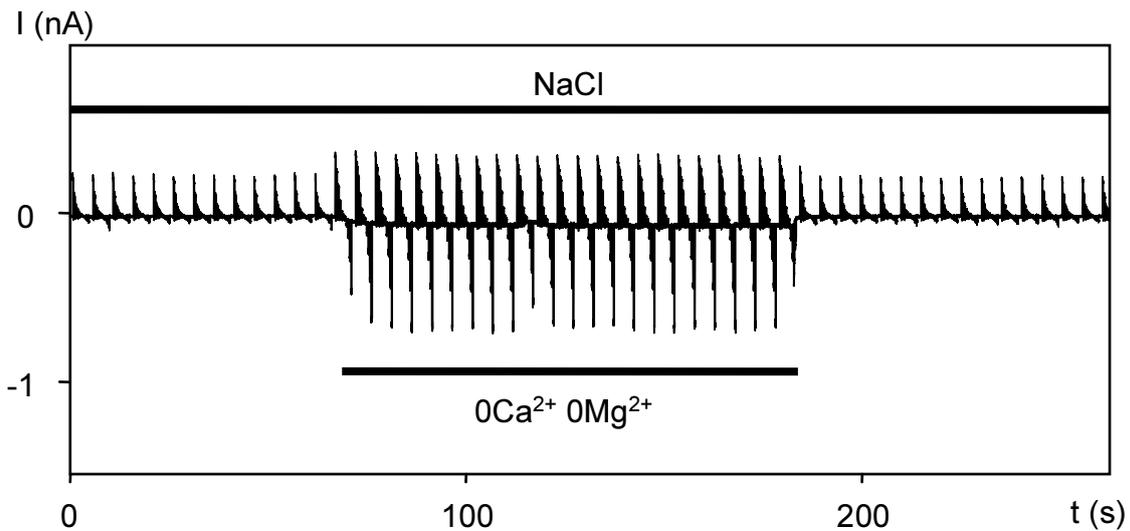


Abbildung 4.36: Darstellung der Ganzzellströme über die Membran einer mit K-Gluconat gefüllten Zelle. Deutlich sichtbar ließ sich der Einwärtsstrom in der Whole-Cell-Konfiguration durch den Entzug der divalenten Kationen stimulieren.

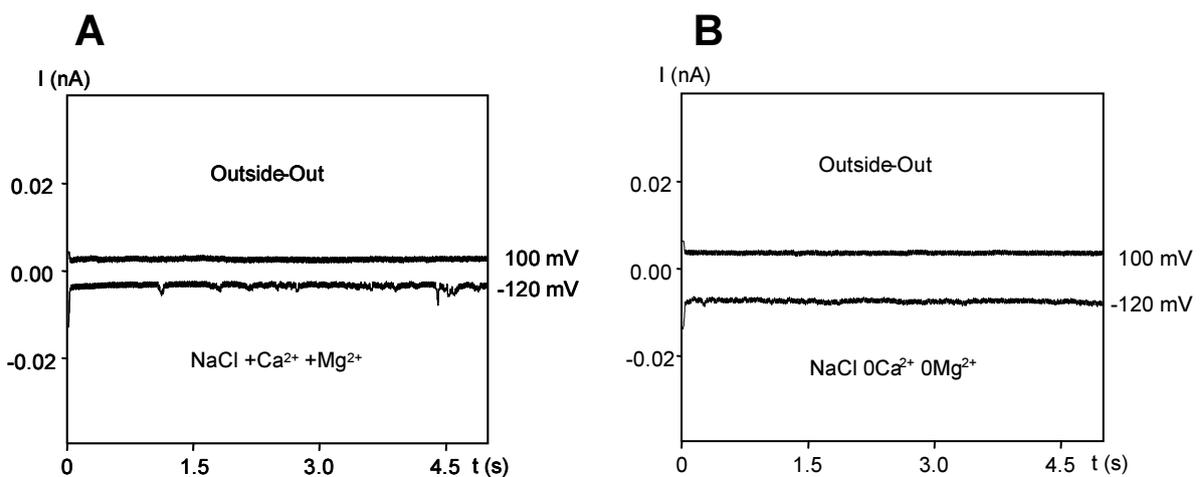
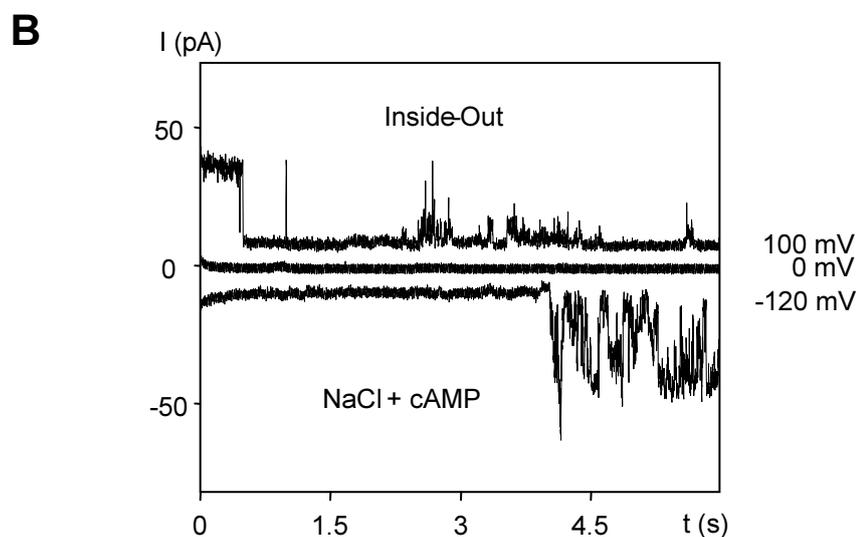
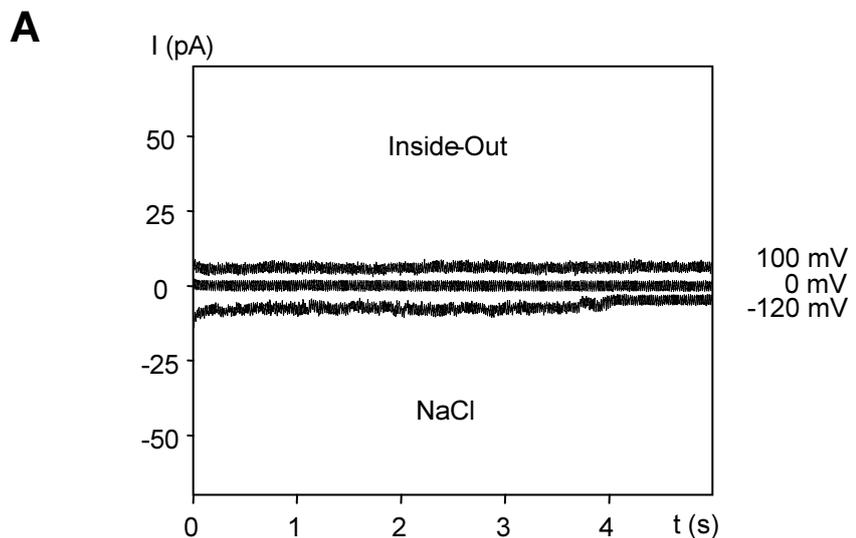


Abbildung 4.37: In der Outside-Out-Konfiguration löste der Wechsel von einer calcium- und magnesiumhaltigen Perfusionslösung (**A**) zur divalentfreien Lösung keine Einzelkanalereignisse aus. Einzig eine leichte Leitfähigkeitserhöhung bei Hyperpolarisation war erkennbar (**B**) (Pipettenlösung: K-Gluconat).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung von cAMP in der Inside-Out-Konfiguration überprüft werden. Dazu wurde wie zuvor die NaCl-Standardlösung als Pipettenlösung verwendet und die Zellen zunächst mit der divalentenhaltigen NaCl-Lösung umspült. Nachdem sich stabile Verhältnisse eingestellt hatten, wurde zu einer Perfusionslösung gewechselt, die zusätzlich 1 mM cAMP enthielt. Durchgeführt wurde dieser Versuch bei insgesamt 9 Zellen. Nur bei 3 Zellen sah man deutliche Leitfähigkeitserhöhungen, die zeitlich mit dem Wechsel zur cAMP-haltigen Lösung korrelierten. Bei den übrigen Zellen konnten keine Veränderungen nach der Zugabe von cAMP beobachtet werden. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die veränderten Ströme einer einzelnen Zelle nach Zugabe des Nukleotids.



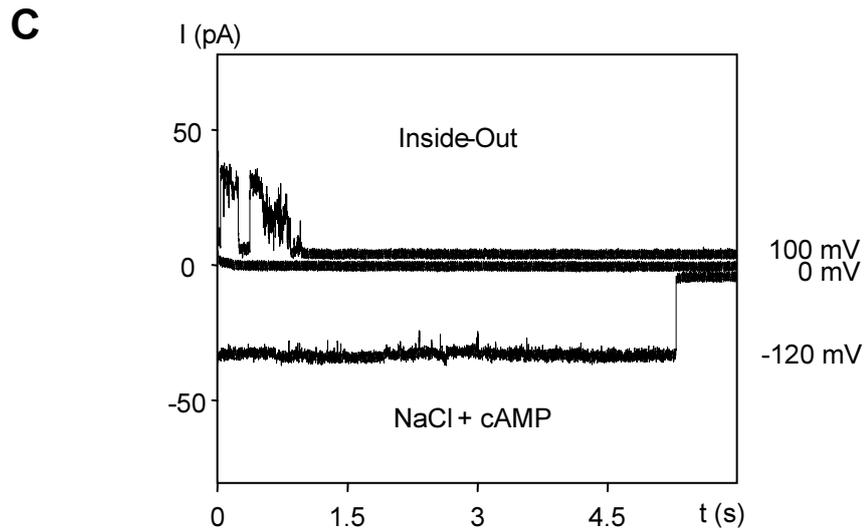


Abbildung 4.38: Beispielhafte Darstellung der Einzelkanalströme über den Membranpatch einer Zelle (Pipettenlösung: NaCl-Standardlösung). Im Verlauf der Messung wurde von einer divalenthaltigen NaCl-Lösung (A) zu einer NaCl-Perfusionslösung gewechselt, die zusätzlich 1 mM cAMP enthielt. Sehr deutlich sind die Leitfähigkeitserhöhungen sowohl bei Depolarisation und – noch stärker ausgeprägt – bei Hyperpolarisation zu erkennen. Dabei schien es, als würde nach kurzem „Flackern“ (B) ein relativ großer Kanal öffnen, der entweder dauerhaft geöffnet oder geschlossen ist (C).

4.8 Einsatz von Kanalblockern

4.8.1 Amilorid

Im Gegensatz zu den nicht selektiven Kationenkanälen (NSCC) ist eine gemeinsame Eigenschaft der klassischen epithelialen Natriumkanäle (ENaC) die Hemmbarkeit ihrer Leitfähigkeit durch geringe Dosen des Diuretikums Amilorid.

Bei den folgenden Versuchen wurde die Leitfähigkeit des vermuteten NSCC zunächst durch den Entzug von Calcium und Magnesium stimuliert und anschließend 1mM Amilorid der Badlösung zugesetzt. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die durch den Entzug der divalenten Kationen stimulierbare Natriumleitfähigkeit über die Membran der PEZ durch Amilorid gehemmt werden kann. Gefüllt wurden die Zellen in dieser Versuchsreihe mit der physiologischen K-Gluconat-Pipettenlösung.

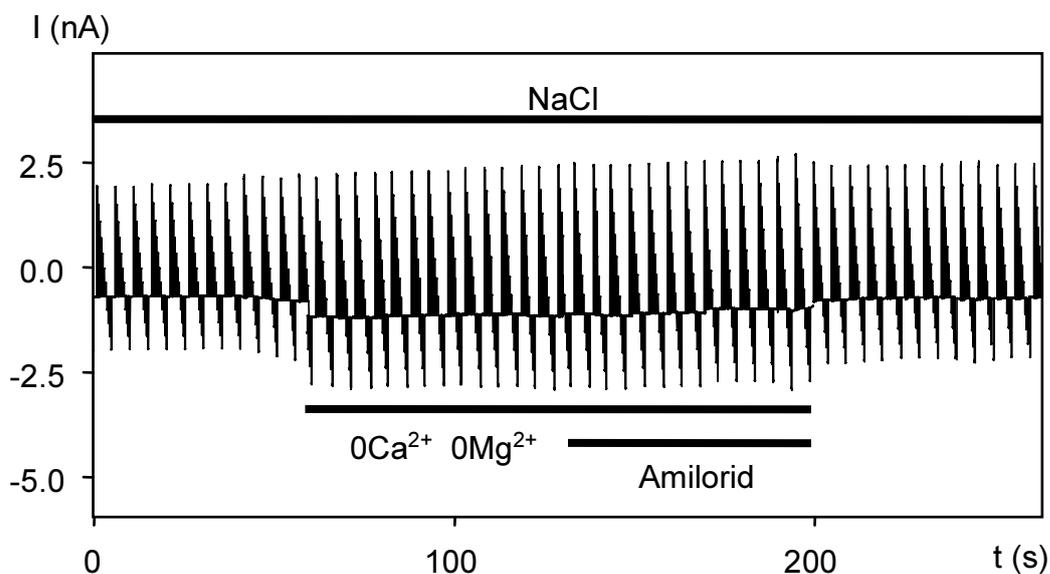


Abbildung 4.39: Repräsentative Darstellung eines Experiments in deren Verlauf zunächst Calcium und Magnesium aus der NaCl-Perfusionslösung entfernt wurden. Anschließend wurde der divalentfreien Lösung 1 mM Amilorid – ohne sichtbaren und signifikanten Effekt – zugefügt (Pipettenlösung: K-Gluconat).

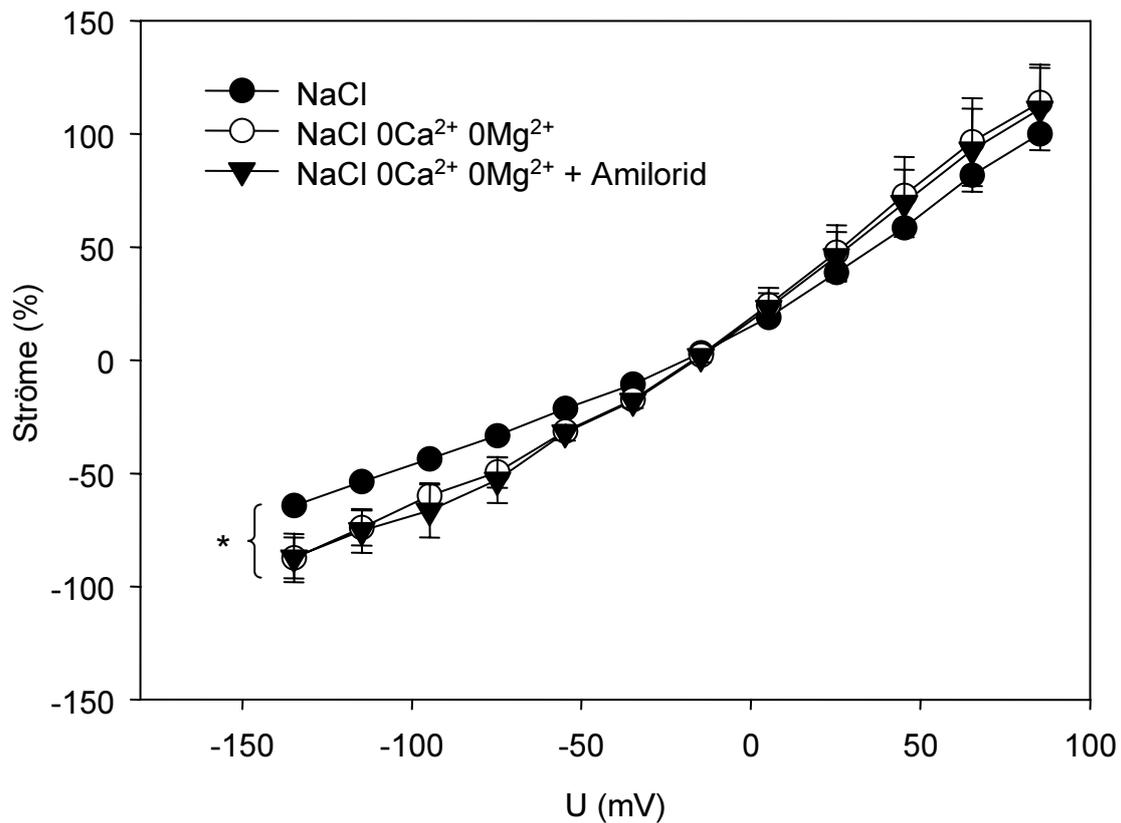


Abbildung 4.40: Strom-Spannungs-Beziehungen von vier Experimenten in deren Verlauf zunächst der Perfusionslösung die divalenten Kationen aus entzogen wurden. Anschließend wurde der Lösung 1 mM Amilorid ohne signifikanten Effekt zugesetzt (Pipettenlösung: K-Gluconat).

In Folge des Entzugs der divalenten Kationen aus der Perfusionslösung stiegen die Einwärtsströme der mit K-Gluconat gefüllten Zellen um $135 \pm 11 \%$ im Vergleich zu den Ausgangswerten ($n = 4$, $p = 0,05$) bzw. von -41 ± 10 pA/pF auf -53 ± 8 pA/pF ($p = 0,01$). Durch die Zugabe des Kanalblockers Amilorid kam es weiterhin weder zu signifikanten Veränderungen des Einwärtsstroms über die Membran (-52 ± 7 pA/pF, $p = 0,8$), noch hatte es Auswirkungen auf das Umkehrpotential ($p = 0,3$).

4.8.2 Verapamil

Um die Wirkung von Verapamil auf die Natriumleitfähigkeit über die Membran zu überprüfen, wurden die Zellen zunächst wieder mit der kaliumgluconathaltigen Pipettenlösung gefüllt und mit NaCl umspült. Durch den anschließenden Entzug der

divalenten Kationen stieg der Einwärtsstrom in NaCl-Lösung von -18 ± 10 pA/pF auf -32 ± 14 pA/pF ($n = 8$, $p = 0,01$) bzw. von -34 ± 7 % auf -90 ± 17 % des Auswärtsstroms zu Beginn der Messung ($p = 0,01$). Die anschließende Zugabe von $100 \mu\text{m}$ Verapamil bewirkte ein Absinken des Einwärtsstroms auf -23 ± 12 pA/pF ($n = 8$, $p = 0,01$) bzw. auf -64 ± 14 % ($p = 0,04$) des Wertes in divalentfreier Lösung.

Auf den Auswärtstrom, der durch den Entzug von Calcium und Magnesium leicht von 44 ± 14 pA/pF auf 50 ± 16 pA/pF ($n = 8$, $p = 0,05$) stieg, zeigte Verapamil nur eine leichte Wirkung (86 ± 15 %, $p = 0,1$). Das Umkehrpotential veränderte sich ebenfalls nur gering während der Messung von -29 ± 5 mV (NaCl) auf -21 ± 3 mV (NaCl 0Ca^{2+} 0Mg^{2+}) ($p = 0,08$). Verapamil hatte dagegen keinen Effekt auf das Umkehrpotential in der divalentfreien Lösung ($p = 0,2$).

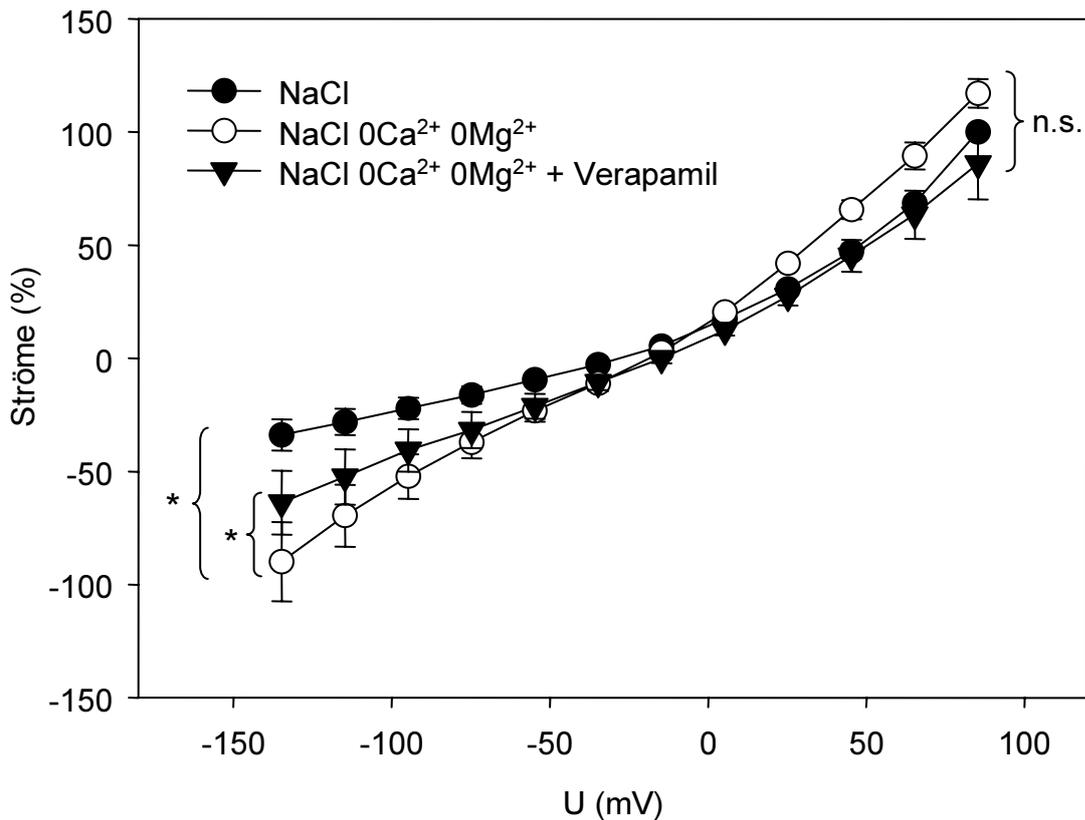


Abbildung 4.41: Strom-Spannungs-Beziehungen von acht Experimenten in deren Verlauf zunächst die divalenten Kationen aus der Perfusionslösung entzogen wurden. Anschließend wurde der Lösung $100 \mu\text{M}$ Verapamil zugefügt, wodurch sich der Einwärtsstrom signifikant verminderte (Pipettenlösung: K-Gluconat).