

5 DISKUSSION

Einführung

Ausgangspunkt der Untersuchung war es, mehr über die Osmoregulation der Pansenflüssigkeit in Erfahrung zu bringen. Dabei war bereits bekannt, dass es bei Erhöhung der ruminalen Kaliumkonzentrationen in der Regel zu einer adäquaten Osmoregulation kommt (CARTER und GROVUM, 1990), vermutlich über eine magnesiumabhängige Zunahme der elektrogenen Natriumaufnahme (LEONHARD-MAREK et al., 2005). Demgegenüber kommt es bei Anstieg der Osmolarität durch nicht-ionale Bestandteile, z.B. nach gesteigerter Verfütterung von Krafffutter, zu Störungen der Osmoregulation, die zu Verweigerung der weiteren Nahrungsaufnahme und schwerwiegenden Schädigungen mit Nekrosen am Pansenepithel führen können (OWENS et al., 1998). Es ist deshalb von großem veterinärmedizinischem Interesse herauszufinden, mit welchen Mechanismen Pansenepithelien ihr Mikroklima beeinflussen, um die Entstehung derartiger Nekrosen möglichst zu vermeiden.

Dabei ist davon auszugehen, dass diese Regulation – in Analogie zur Niere – auch einer komplexen hormonellen Steuerung unterliegt. Nachgewiesen ist die endogene Produktion von Prostaglandinen durch das Pansenepithel (GÄBEL et al., 1999). Über die Funktion dieser Produktion ist hingegen fast nichts bekannt. Unstrittig ist die Hemmung des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers, sichere Erkenntnisse zu der Wirkung von Prostaglandinen auf die elektrogene Natriumresorption liegen hingegen nicht vor.

Zur Klärung dieser Frage – und zur weiteren Charakterisierung des Mechanismus der Natriumresorption – wurde das Verhalten der Ströme über die Membran von kultivierten Pansenepithelzellen, insbesondere nach Erhöhung von intrazellulärem cAMP, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht.

5.1. Material und Methoden

5.1.1 Lösungen

Viele Probleme ergeben sich aus der Zusammensetzung der extra- und intrazellulären Lösungen. Unterschiede in der Osmolarität und dem pH zwischen Bad- und Pipettenlösung können eine Reihe von Ionenströmen beeinflussen und müssen deshalb vermieden werden (es sei denn man möchte eben diese Effekte studieren). Zum Beispiel können hypo- oder hyperosmotische Lösungen das Schrumpfen oder Anschwellen von Zellen verursachen, begleitet von veränderten volumenregulierten Leitfähigkeiten, wie sie von Chlorid-, Kalium- oder Kationenkanälen bekannt sind (SARKADI und PARKER, 1991; HOFFMANN, 1992). Auch Protonen können die Eigenschaften vieler Kanäle modifizieren (CHESLER und KAILA, 1992). Alle verwendeten Badlösungen wurden deshalb mit Tris-OH auf einen gemeinsamen pH-Wert von 7,4 eingestellt, die Pipettenlösungen auf einen Wert von 7,2.

Die Osmolaritäten der Bad- und Pipettenlösungen wurden bei jeder neu angesetzten Lösung mit einem Osmometer überprüft. Gegebenenfalls wurden passende Mengen des dominierenden Ions der Lösung hinzugefügt, um eine Osmolarität von 295 mmol/l (inklusive 5 mmol/l Glukose) in der extrazellulären Lösung bzw. 289 mmol/l in der intrazellulären Lösung zu erreichen. Die intrazelluläre Lösung sollte leicht hypoosmotisch gegenüber der Badlösung sein, da dies die Sealbildung erleichtert (SAKMANN und NEHER, 1995).

In einer Reihe von Versuchen wurden die divalenten Kationen in der Badlösung entfernt, um die Leitfähigkeit des NSCC zu erhöhen und um direkte Effekte auf den Kanal zu untersuchen. Vor allem Calcium ist allerdings dafür bekannt, die Stabilität des Seals zu gewährleisten. Versuche mit calciumfreien Lösungen können dementsprechend unspezifische Leckströme produzieren und die Ergebnisse verfälschen. Diese Leckströme lassen sich von spezifischen Ionenströmen jedoch durch eine Analyse der Membranpotentiale abgrenzen. So ist davon auszugehen, dass bei einem Verlust der Sealstabilität das Umkehrpotential gegen Null geht – der Strom fließt nun nicht mehr über die Membran und entsprechend wird die Spannung nicht mehr durch selektive oder spannungsabhängige Ionenkanäle beeinflusst. Vor

allem frühere Patch-Clamp-Versuche an unserem Institut mit verschiedenen intrazellulären Lösungen haben jedoch gezeigt, dass nach der Entfernung der divalenten Kationen aus den Lösungen die Zellen deutlich depolarisierten. Gegen Leckströme sprachen auch die höheren Umkehrpotentiale der Zellen in KCl-Perfusionslösung gegenüber der NaCl-Lösung. Auch war noch nach Entfernung der divalenten Kationen eine gewisse Rektifikation zu beobachten (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Die vollständige Entfernung bestimmter Ionen hat aber nicht nur Auswirkungen auf die Sealstabilität. Eine Reihe von Enzymen und Pharmaka sind beispielsweise abhängig von der Anwesenheit von Magnesium, dessen physiologische zytosolische Konzentration im millimolaren Bereich liegt. Aus diesem Grund wurden die Pipettenlösungen mit EGTA (*Ethylene glycol tetraacetic acid*) gepuffert, dessen Affinität zu Magnesium, im Gegensatz zu Calcium, eher gering ist.

5.1.2 Liquid Junction Potentials

Liquid Junction Potentials (LJP) stellen Potentialdifferenzen zwischen zwei Lösungen dar und kommen an allen Grenzen vor, an denen Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Zusammensetzung aufeinander treffen. Sie resultieren aus der Ladungstrennung, die entsteht, wenn Anionen und Kationen mit unterschiedlicher Mobilität über Grenzen bzw. Membranen diffundieren. So kann der Einsatz eines großen Anions in der intrazellulären Lösung (z.B. Gluconat) und eines kleineren extrazellulären Anions (z.B. Chlorid) Potentialdifferenzen von über 10 mV (Zellinneres negativ) hervorrufen. Aus diesem Grund wurden sämtliche LJP vor der Datenanalyse mit Hilfe der Henderson-Gleichung entsprechend der Ionenzusammensetzungen kalkuliert (BARRY und LYNCH, 1991) und in die Auswertung mit einbezogen.

5.1.3 Die Whole-Cell-Konfiguration

Der Austausch von Ionen zwischen Pipette und Zellinnerem findet innerhalb von Sekunden statt (PUSCH und NEHER, 1988). Die Geschwindigkeit des Stoffaustausches zwischen Pipette und Zelle hängt aber letztendlich vom Volumen der Zelle und vom Durchmesser der Pipettenspitze ab. Bei den eigenen Versuchen dauerte es ca. 2 bis 4 min nach dem Einbruch in die Whole-Cell-Konfiguration bis sich stabile Verhältnisse einstellten.

Da das Volumen der Pipettenlösung wesentlich größer als das Zellvolumen ist, bleibt die Zusammensetzung der Pipettenlösung dabei praktisch unverändert.

Für die Experimente hat dieser Vorgang sowohl positive als auch negative Aspekte: Einerseits verliert das Zytoplasma seine natürliche Zusammensetzung und damit auch Substanzen wie ATP oder kleine Proteine, die möglicherweise für die Funktion der untersuchten Kanäle wichtig sind (NUMBERGER und DRAGUHN, 1996). Andererseits ist es möglich, das intrazelluläre Milieu in der Whole-Cell-Konfiguration genau zu kontrollieren und bestimmte Substanzen (wie cAMP) in die Zelle einzubringen.

Da das Pansenepithel *in vivo* ein polares Epithel ist, besteht ein Unterschied zwischen der apikalen und basolateralen Membran. Während es in Ussingkammerexperimenten möglich ist, diese Polarität durch das Einspannen eines ganzen Epithelstücks zu erhalten, geht bei den Patch-Clamp-Versuchen mit kultivierten und isolierten Zellen diese Polarität verloren. Indem nur einzelne Zellen untersucht werden, die im Ganzen von einer Badlösung umspült werden, ist es nicht zweifelsfrei möglich, Effekte bestimmten Membranabschnitten, bzw. Kanälen auf einer Seite der Zelle zuzuordnen. Bei der Diskussion der Daten in den folgenden Abschnitten wurde darauf Rücksicht genommen.

5.1.4 Die Inside-Out-Konfiguration

Die Inside-Out-Konfiguration erlaubt auf einfache Weise den Wechsel von Lösungen auf der zytosolischen Seite des Membranstücks. Aus diesem Grund ist sie die Methode der Wahl, um beispielsweise durch *second messenger* aktivierbare Kanäle zu studieren. Weil die meisten Kanäle auf die eine oder andere Weise durch intrazelluläre Prozesse moduliert werden, können Effekte von zytosolischen Molekülen oder enzymatische Aktivitäten mit dieser Konfiguration untersucht werden.

Das ausgerissene Membranstück enthält jedoch nicht nur die integralen Membranproteine, sondern oft auch Strukturen, die an der Membraninnenseite haften, wie Transduktionsproteine, Organellen oder Teile des Zytoskeletts. Vom NHE3 ist bekannt, dass für seine optimale Funktion ein intaktes Zytoskelett nötig ist (SZÁSZI et al., 2000). Durch Herstellung der Inside-Out-Konfiguration wird dieses zerstört und der Austauscher wird demnach unter Umständen nicht mehr so wie *in vivo* reguliert. Einen ähnlichen Effekt kann man bei anderen Transportmechanismen und auch beim NSCC nicht grundsätzlich ausschließen.

Ein weiteres Problem dieser Konfiguration ergibt sich aus dem Auswaschen von niedermolekularen intrazellulären Bestandteilen, mit der Folge, dass regulatorische Vorgänge an den Kanälen verändert sein können.

5.1.5 Die Outside-Out-Konfiguration

Diese Konfiguration ermöglicht den einfachen Wechsel von Lösungen auf der extrazellulären Seite der Membran. Dabei ergeben sich jedoch vergleichbare Nachteile, wie in der Inside-Out-Konfiguration. So wird auch hier das zytosolische Milieu durch die Versuchslösungen ersetzt und der Membranpatch vom Zytoskelett abgetrennt.

5.2 Identifizierung der Ionenströme über die Membran

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den in Ussingkammer- und Patch-Clamp-Studien nachgewiesenen elektrogenen Natriumtransport über das Pansenepithel näher zu charakterisieren und mögliche Regulationsmechanismen aufzuzeigen.

In früheren Ussingkammerstudien konnten bereits Effekte durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration auf den I_{sc} , die Natriumleitfähigkeit, die Chloridleitfähigkeit und den Transport freier Fettsäuren nachgewiesen werden (WOLFFRAM et al., 1989; GÄBEL et al., 1999; ASCHENBACH et al., 2005).

Die Angaben über die Auswirkungen von cAMP auf den Chloridtransport waren allerdings uneinheitlich (WOLFFRAM et al., 1989; GÄBEL et al., 1999) und auch Auswirkungen auf andere elektrogene Transportmechanismen konnten von den Autoren nicht ausgeschlossen werden, da Effekte auf den I_{sc} – als Differenz aller Kationen und Anionenströme – nicht mit dem elektrogenen Natriumtransport über das Epithel gleichgesetzt werden können.

Ausgehend von verschiedenen Studien, die elektrogene Transporte von Natrium, Kalium, Chlorid und Cäsium über das Pansenepithel beschrieben (MARTENS und GÄBEL, 1984; DIERNÆS et al., 1994; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; BÖDEKER und KEMKOWSKI, 1996; RÜBBELKE, 1998; LEONHARD-MAREK et al., 2005), wurden zunächst Versuche konzipiert, die Aufschluss geben sollten über die Leitfähigkeiten der genannten Ionen bei Versuchen mit verschiedenen Perfusions- und Pipettenlösungen ohne cAMP. Dies sollte die Abgrenzung der Effekte des zyklischen Nukleotids auf verschiedene Ionentransporte in den darauf folgenden Experimenten ermöglichen bzw. erleichtern.

5.2.1 Chlorid

Chlorid wird entgegen einem Konzentrationsgradienten über das Pansenepithel transportiert (PARTHASARATHY und PHILLIPSON, 1953), wobei inzwischen gezeigt

wurde, dass die apikale Resorption über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ erfolgt (MARTENS und GÄBEL, 1988). Wie Chlorid basolateral die Zelle verlässt konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Ussingkammerstudien von MARTENS und GÄBEL (1984) und DIERNÆS et al. (1994) deuten auf einen basolateralen, wahrscheinlich elektrogenen Efflux von Chlorid hin.

Eine einfach zu realisierende Möglichkeit, die elektrogene Leitfähigkeit eines Ions zu überprüfen, besteht darin, es aus der Versuchslösung zu entfernen und durch ein impermeables Ion zu ersetzen. In Ussingkammerversuchen dokumentierten MARTENS et al. (1991) so eine um 34 % herabgesetzte G_t des Pansenepithels nach Ersatz von Chlorid durch Gluconat, was auf die Anwesenheit eines Cl^- -Kanals hindeutete. In den eigenen Austauschversuchen, bei denen ebenfalls extrazelluläres Chlorid durch impermeables Gluconat ersetzt wurde, gelang der Nachweis deutlicher Effekte an isolierten PEZ auf den Auswärtsstrom und das Membranpotential. So sank der Auswärtsstrom bei den mit K-Gluconat gefüllten Zellen mit dem Wechsel zur chloridfreien Perfusionslösung auf $40 \pm 4\%$ der Werte in chloridhaltiger Lösung ($p < 0,001$). Begleitet war das Absinken des Auswärtsstroms von einer ebenfalls signifikanten Depolarisation des Membranpotentials, was als Resultat der geringeren Einwärtsströme des negativ geladenen Ions gedeutet werden kann.

Für eine Leitfähigkeit von Chlorid sprachen zusätzlich die Versuche, die mit Cäsium als dominierendem Ion in der intrazellulären Lösung durchgeführt wurden. Der Ersatz von intrazellulärem Chlorid durch Methansulfonat resultierte bei diesen Experimenten in einem signifikant niedrigeren Umkehrpotential und einer deutlichen Auswärtsrektifikation, die den geringeren Ausstrom von Chlorid bei negativen Haltepotentialen reflektierte.

Die nachgewiesenen Effekte in allen Versuchen wiesen auf eine ausgeprägte Leitfähigkeit von Chlorid über die Membran hin, die jedoch keinem Membranabschnitt bzw. einer Seite der PEZ (apikal oder basolateral) zugeordnet werden konnte. Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Leitfähigkeit um den postulierten basolateralen Cl^- -Kanal handelt.

5.2.2 Cäsium

Bei den Zellen, die mit Cäsiumchlorid als hauptsächlichem Bestandteil der Pipettenlösung gefüllt waren, war das Umkehrpotential negativer als bei Zellen, die mit Cholinchlorid gefüllt waren, was für eine deutliche Cäsiumleitfähigkeit sprach. Das negative Umkehrpotential (-4 ± 1 mV) reflektierte dabei den Ausstrom von Cäsiumionen, der den Einstrom von Natriumionen aus der Perfusionslösung überstieg.

Zudem unterschied sich das negative Umkehrpotential der Zellen signifikant von dem Ruhemembranpotential von Chlorid unter diesen Bedingungen (≈ 0 mV, $p = 0,002$), was ebenfalls für einen Cäsiumefflux spricht.

Für einen Ausstrom des Ions sprechen auch Ergebnisse aus Patch-Clamp-Experimenten an unserem Institut, bei denen die divalenten Kationen aus der extrazellulären Lösung entfernt wurden. So blieb dabei das Umkehrpotential auch nach Entfernung von Calcium und Magnesium aus der Perfusionslösung deutlich im negativen Bereich (-6 ± 1 mV) und bei einem Haltepotential von 0 mV war der divalentsensitive Auswärtsstrom bei Zellen, die mit CsCl gefüllt waren signifikant höher als bei Zellen, die mit CholinCl gefüllt waren (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Als ein nicht erwarteter Effekt bei den mit CsCl gefüllten Zellen erwies sich die Erhöhung des Einwärtsstroms auf -44 ± 6 pA/pF gegenüber Zellen, die mit CholinCl (-13 ± 3 pA/pF, $p < 0,001$) gefüllt waren. Diese Beobachtung lässt sich nicht zweifelsfrei einer Leitfähigkeitsveränderung eines bestimmten Ions zuordnen. Der einzige Unterschied zwischen den Messreihen bestand im Ersatz von Cholin durch Cäsium. Umspült wurden die Zellen jeweils von NaCl-Perfusionslösung. Ein höherer Einwärtsstrom müsste entweder das Resultat eines verminderten Stroms von Anionen aus der Zelle heraus oder ein gesteigerter Strom von Kationen in die Zelle hinein sein. Mit den hier dargestellten Versuchen ließ sich dieser Effekt nicht hinreichend klären.

5.2.3 Kalium

Es ist hinreichend bewiesen, dass Kalium über das Pansenepithel resorbiert wird (SCOTT, 1967), damit zum Kurzschlussstrom beiträgt (BÖDEKER und KEMKOWSKI, 1996) und dass eine Erhöhung der ruminalen Kaliumkonzentration zur Depolarisation der apikalen Membran führt (FERREIRA et al., 1966; MARTENS et al., 1987; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996). Erklärbar sind diese Effekte nur über die Existenz einer apikalen elektrogenen Leitfähigkeit von Kalium über die Membran (LEONHARD-MAREK, 1996). Doch trotz eines apikalen Membranpotentials, welches erheblich höher ist als das Nernst-Potential für Kalium, konnte LEONHARD-MAREK (1996) zunächst nur eine minimale Sekretion von Kalium in Natriumchlorid-Lösung trotz aktiver Na^+/K^+ -ATPase nachweisen. Das ließ darauf schließen, dass das negative zytosolische Potential überwiegend durch einen basolateralen Efflux von Kalium aufgebaut wird.

Dass es dennoch nach Erhöhung der apikalen Kaliumkonzentration zu einer deutlichen Depolarisation kommt, konnte durch den Nachweis einer Steigerung der Permeabilität von Kalium nach Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration erklärt werden (ABDOUN et al., 2005). Diese Leitfähigkeitserhöhung mit zunehmender Kaliumkonzentration stellt eine typische Eigenschaft von Kaliumkanälen dar (HILLE, 2001). Bedeutsam ist dieser Mechanismus möglicherweise, um Kaliumverlusten (Sekretion von serosal ins Pansenlumen) bei niedrigen ruminalen Kaliumkonzentrationen vorzubeugen (ABDOUN et al., 2005).

In den eigenen Versuchen erhöhte der Ersatz von Natrium durch Kalium in der Badlösung den Einwärtsstrom um $176 \pm 16 \%$ ($p < 0,001$). Dabei depolarisierten die Zellen von $-4 \pm 1 \text{ mV}$ auf $7 \pm 1 \text{ mV}$ ($p < 0,001$). Beide Effekte repräsentieren den erhöhten Kaliuminflux unter diesen Versuchsbedingungen. In früheren Patch-Clamp Versuchen wurde bereits die Calciumsensitivität der einwärtsgerichteten Kaliumleitfähigkeit nachgewiesen, wobei der gesamte Kaliuminflux in das Zytosol aus einer calciumsensitiven und einer calciuminsensitiven Komponente besteht (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

5.2.4 Natrium

In den eigenen Versuchen mittels Patch-Clamp-Technik gelang es nicht, den Nachweis einer in Ussingkammer-Experimenten bereits gezeigten elektrogenen Natriumleitfähigkeit zu erbringen, wenn die Pipetten- und Perfusionslösungen physiologische Mengen an divalenten Kationen enthielten. Der Ersatz von Natrium durch Cholin hatte sowohl bei den mit K-Gluconat als auch bei den mit CholinCl gefüllten Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Höhe des Einwärts- oder Auswärtsstroms und auch die Umkehrpotentiale blieben durch den Lösungswechsel unbeeinflusst. Die relative Permeabilität P_{Na}/P_{Cholin} lag in beiden Versuchsreihen bei 1 ± 1 ($n = 6$ [K-Gluconat]; $n = 8$ [CholinCl]).

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen früherer Patch-Clamp-Studien, in denen gezeigt wurde, dass erst durch das (völlig unphysiologische) Entfernen der divalenten Kationen der elektrogene Natriumtransport gesteigert werden konnte. Dabei wurde erst kürzlich der Nachweis erbracht, dass der NSCC nicht nur durch extrazelluläre, sondern auch durch intrazelluläre divalente Kationen reguliert wird (LEONHARD-MAREK et al., 2005). Durch Entfernung von Calcium und Magnesium aus kaliumgluconathaltiger Pipettenlösung stieg die relative Leitfähigkeit P_{Na}/P_{Cholin} nun von 1 ± 1 auf $1,6 \pm 0,1$ ($p = 0,004$) und der Ersatz von Natrium durch Cholin bewirkte eine Abnahme des Einwärtsstroms auf $75 \pm 4 \%$ ($p = 0,002$) des Ausgangswertes, welche von einer Hyperpolarisation von -20 ± 3 mV auf -30 ± 3 mV ($p = 0,001$) begleitet war (F. Stumpff, unveröffentlichte Daten).

In **Abbildung 5.1** ist das daraufhin entwickelte Modell der am elektrogenen Natriumtransport beteiligten Mechanismen dargestellt.

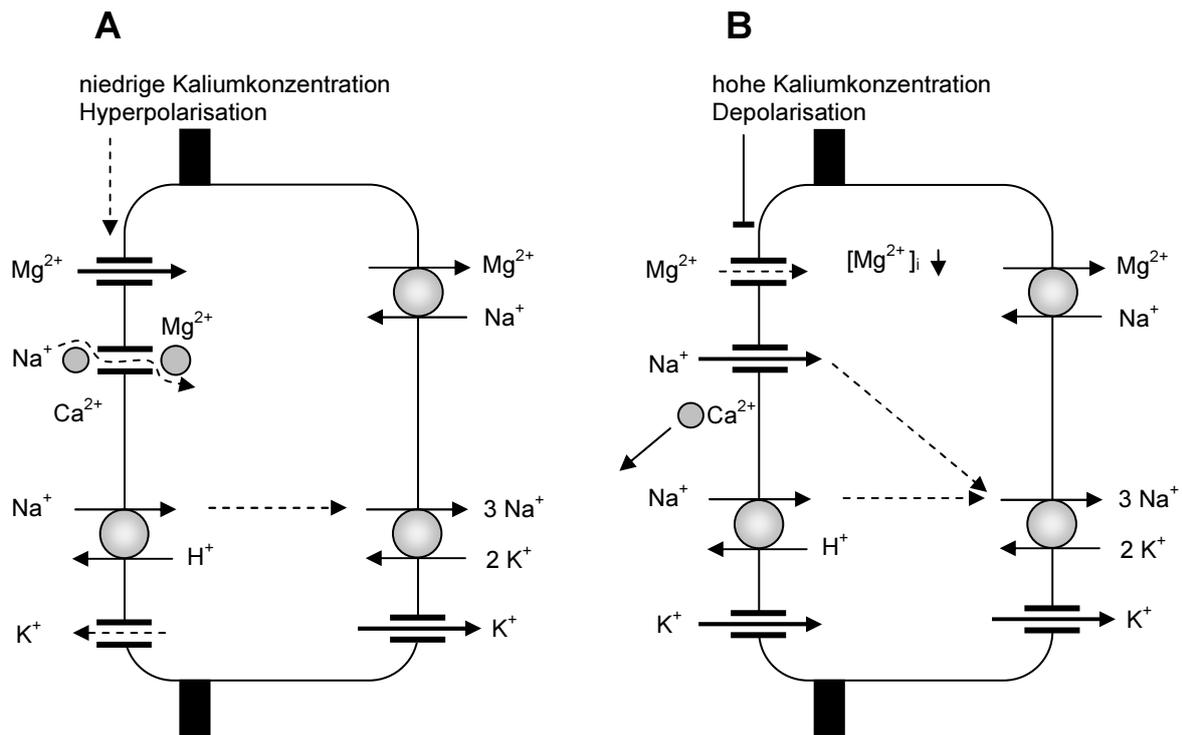


Abbildung 5.1: Modellvorschlag für die Regulation des elektrogenen Natriumtransports durch intrazelluläres Magnesium (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

A: Bei niedrigen ruminalen Kaliumkonzentrationen wird die elektrogene Natriumleitfähigkeit über den nicht selektiven Kationenkanal durch intra- und extrazelluläre divalente Kationen gehemmt, jedoch nicht vollständig blockiert. Die Aufnahme von Natrium erfolgt hauptsächlich elektroneutral über den Na^+/H^+ -Austauscher. **B:** Die hohe ruminale Kaliumkonzentration bewirkt eine Depolarisation der apikalen Membran, wodurch die elektrogene Aufnahme von Magnesium gehemmt wird (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; SCHWEIGEL et al, 1999). Die niedrige intrazelluläre Magnesiumkonzentration öffnet den NSCC von innen [Ein ähnlicher spannungsabhängiger Mechanismus ist vom *inward rectifier K^+ channel* bekannt (HILLE, 2001).] Gleichzeitig führt die Depolarisation zu einem Potentialgradienten über der Membran, wodurch positive Ionen aus der äußeren Kanalöffnung gestoßen werden. Dies bewirkt die Öffnung des Kanals. Die mit der luminalen Kaliumkonzentration steigende Natriumabsorption wurde bereits mehrfach beschrieben (SCOTT, 1967; SELLERS und DOBSON, 1960; WARNER und STACY, 1972).

5.2.5 Selektivität des NSCC

Bei Versuchen an der Froschhaut beobachteten Van DRIESSCHE und ZEISKE (1985), dass die apikale Membran des Epithels für verschiedene Kationen durchlässiger wurde, wenn der mukosalen Lösung Calcium entzogen wurde. So beschrieben sie eine erhöhte Durchlässigkeit für Kalium, Rubidium, Cäsium, Thallium

und Ammonium. Diese unspezifische Leitfähigkeit für monovalente Kationen ist inzwischen eine gängige Beobachtung in allen Studien über calciumsensitive Ströme an Epithelien.

Trotz des kollektiven Kennzeichens von NSCC, verschiedene Kationen zu leiten, stellen sie eine große Gruppe von Kanälen dar, deren Heterogenität eine einfache zusammenfassende Definition ausschließt.

Allgemein zeigen sie eine hohe Selektivität für Kationen gegenüber Anionen, aber eine geringe Selektivität zwischen den monovalenten Kationen. Von vielen NSCC wird ebenfalls eine Leitfähigkeit für divalente Kationen angenommen (HARTENECK, 2005). Die Permeabilitätssequenzen für monovalente Kationen unterscheiden sich dabei deutlich. Im Gastrointestinaltrakt verschiedener Spezies wurden bereits folgende Sequenzen ermittelt: Hühnercoprodeum: $Cs^+ > Na^+ = K^+ > Rb^+ > Li^+$ (HEINZ et al., 1991), Kaninchencaecum: $Na^+ > K^+ > Li^+$ (SELLIN und DUBINSKY, 1994), Schafblättermagen: $Na^+ > Li^+ \approx K^+ \approx Rb^+ \approx Cs^+$ (SCHULTHEIß und MARTENS, 1999).

Am Schafpansen führte RÜBBELKE (1998) Ussingkammerversuche durch, bei denen sie Rubidium, Kalium, Cäsium und Lithium im völligen Austausch gegen Natrium in der mukosalen Lösung einsetzte und erhielt folgende Permeabilitätssequenz: $Rb^+ > Na^+ \geq Cs^+ > K^+ > Li^+$.

Bei den eigenen Versuchen ergaben sich negative Umkehrpotentiale (-4 ± 1 mV) bei Zellen, die mit Cäsiumchlorid gefüllt und mit NaCl-Perfusionslösung umspült wurden. Durch den Wechsel zur KCl-Perfusionslösung depolarisierten die Zellen deutlich auf 7 ± 1 mV ($p < 0,01$). Zusammen mit dem divalentsensitiven Anteil des Cäsiumauswärtsstroms (LEONHARD-MAREK et al., 2005) spricht das negative Umkehrpotential der mit CsCl gefüllten Zellen (Perfusionslösung: NaCl) für eine Cäsiumleitfähigkeit durch den NSCC, die über der von Natrium liegt. Der erhöhte Einwärtsstrom und die signifikante Depolarisation beim Wechsel zur Perfusionslösung mit Kaliumchlorid als hauptsächlichem Bestandteil offenbarte eine gesteigerte Leitfähigkeit von Kalium gegenüber Natrium (**siehe 4.3.3.2**). Die positiven Umkehrpotentiale der mit CholinCl gefüllten und mit NaCl umspülten Zellen wiesen auf eine höhere Leitfähigkeit von Natrium gegenüber Cholin hin (**siehe 4.3.2**). Insgesamt ergab sich dadurch die Leitfähigkeitssequenz: $K^+ > Cs^+ > Na^+ > Cholin$ und entspricht damit einer Eisenmann Sequenz III oder IV.

Die Reihenfolge dieser Ionenselektivität ist nicht aufgrund der Ionengrößen zu erklären (z.B. $\varnothing K^+ = 2,66 \text{ \AA}$, $\varnothing Na^+ = 1,90 \text{ \AA}$). Vielmehr scheinen in diesem Fall hauptsächlich Unterschiede in der Hydratationsenergie darüber zu entscheiden, welche Ionen in welcher Reihenfolge geleitet werden ($K^+ = -85 \text{ kcal/mol}$, $Na^+ = -105 \text{ kcal/mol}$). So gelangen hydratisierte Ionen im Allgemeinen nicht durch die Poren von Ionenkanälen, weil der Porendurchmesser an der engsten Stelle nur wenig größer ist als das transportierende Ion. Eine Voraussetzung für den Ionenfluss durch die Kanalpore ist deshalb die Entfernung des Hydratmantels. Dazu muss die Hydratationsenergie durch die Bindungsenergie an die Kanalpore ersetzt werden. Die Energiedifferenz (Bindungsenergie – Hydratationsenergie) entscheidet letztlich darüber, ob ein Ion von einem Kanal über die Membran geleitet wird.

Die ermittelte Leitfähigkeitssequenz unterschied sich gering von der von RÜBBELKE (1996) berechneten Sequenz. Dabei gilt es in Betracht zu ziehen, dass bei Untersuchungen am intakten Epithel eine endogene Produktion von Prostaglandinen vermutet werden kann und sich in der Folge möglicherweise die Leitfähigkeit zugunsten eines bestimmten Ions verschiebt. Zur endgültigen Klärung bedarf es jedoch noch weiterer Versuche.

Bei Zellen, die mit CsCl gefüllt waren, ergab die Berechnung der relativen Permeabilität eine höhere Selektivität für Kalium gegenüber Natrium ($P_K/P_{Na} = 1,3 \pm 0,1$). Literaturangaben zufolge werden Kaliumkanäle durch zytosolisches Cäsium geblockt, so dass Kalium vermutlich über den NSCC in die Zelle gelangt. Allerdings sollte die Möglichkeit, dass einströmendes Kalium den intrazellulären Cäsiumblock aufhebt, indem es Cäsium aus der Kanalpore drückt, in Betracht gezogen werden.

Der durch den Entzug der divalenten Kationen ausgelöste elektrogene Natriumtransport konnte nicht durch Amilorid gehemmt werden (**siehe 4.7.1**). Dagegen wurde der divalentsensitive Einwärtsstrom – im Gegensatz zum Auswärtsstrom – durch Verapamil, einem bekannten Blocker von NSCC, deutlich vermindert, was gegen eine bloße Sealschwankung nach Entzug von Calcium und Magnesium sprach. Beide Ergebnisse untermauern die Annahme, dass es sich bei dem elektrogenen Transportmechanismus für Natrium nicht um einen klassischen

epithelialen Natriumkanal handelt, sondern um einen nicht durch Amilorid hemmbaren NSCC.

5.3 Effekte von cAMP

WOLFFRAM et al. (1989) und GÄBEL et al. (1999) untersuchten die Wirkung von Theophyllin an isolierten Pansenepithelien in Ussingkammerversuchen. Beide Arbeitsgruppen stellten übereinstimmend fest, dass die Zugabe des Inhibitors zur serosalen Pufferlösung in einem Abfall des Transports von Natrium von mukosal nach serosal - und damit in einem verringerten Nettonatriumstrom - und einem Absinken des I_{sc} resultierte.

Sowohl GÄBEL et al. (1999) als auch WOLFFRAM et al. (1989) wiesen in diesen Versuchen einen Effekt auf den I_{sc} nach, der deutlich geringer ausfiel als der Effekt auf den Nettonatriumtransport.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen dem Abfall des Nettonatriumtransports und des I_{sc} schlussfolgerten sie, dass cAMP die Natriumtransportraten senkt, indem es hauptsächlich den elektroneutralen Na^+/H^+ -Austauscher hemmt. Durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase hemmbare (humane) Isoform des Austauschers (NHE 3) wurde bereits nachgewiesen (YUN et al., 1997).

Der Abfall des I_{sc} wäre den Autoren zufolge durch eine vergleichbar geringere Hemmwirkung des Nukleotids auf den elektrogenen Natriumtransport erklärbar.

Dieser Erklärungsansatz impliziert jedoch, dass Natrium, welches über den Na^+/H^+ -Austauscher in der apikalen Membran elektroneutral aufgenommen wird, auch auf der basolateralen Seite die Zelle ohne Ladungstransport wieder verlässt und eine Hemmung des Austauschers dementsprechend keine Auswirkungen auf den I_{sc} hätte.

Nach bisherigen Erkenntnissen kann Natrium die Zelle basolateral nur aktiv mittels der Na^+/K^+ -ATPase verlassen. Dabei werden für jeweils drei Natriumionen zwei Kaliumionen in die Zelle transportiert. Kalium selbst wird nur minimal über die apikale Membran sezerniert und rezirkuliert zum größten Teil gleich wieder über die basolaterale Membran (LEONHARD, 1990), wodurch Kalium nur minimal zum Ladungstransfer über das Epithel beiträgt (PARTHASARATHY und PHILLIPSON, 1953; FERREIRA et al., 1972; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996).

Damit es in der Folge auf der Blutseite des Epithels keine Anhäufung von positiven Ladungen durch den Natriumtransport gibt, müssen gleichzeitig negative Ladungen das Pansenepithel von mukosal nach serosal passieren – möglicherweise über den postulierten basolateralen Chloridkanal nach apikaler Aufnahme über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (MARTENS und GÄBEL, 1988) – oder positive Ladungen die Zelle Richtung Lumen verlassen – eventuell über die apikale vH^+ -ATPase (SCHWEIGEL und MARTENS, 2003).

Bei dem Versuch, Auswirkungen verschiedener Pharmaka auf den I_{sc} oder die Membranpotentiale zu diskutieren, gilt es deshalb genau zu überprüfen, ob Effekte auf verschiedene andere elektrogene Transportmechanismen vorliegen können.

So muss beachtet werden, dass die Erhöhung von intrazellulärem cAMP durch Theophyllin oder Forskolin die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase in einer Reihe verschiedener Zellen und Plasmamembranen hemmt (EWART und KLIP, 1995). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung der ATPase den I_{sc} absenkt, indem weniger positive Ladungen über die basolaterale Membran transportiert werden (GÄBEL et al., 1999; LEONHARD-MAREK et al., 2005).

In den eigenen Experimenten konnten zudem deutliche Chloridleitfähigkeiten mit Einfluss auf den Membranstrom nachgewiesen werden. Ein durch Theophyllin induzierter reduzierter I_{sc} könnte also theoretisch auch die Folge veränderter Chloridströme über die Membran sein. So gilt der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), ein durch cAMP aktivierbarer Chlorid-Kanal, der in einer Reihe von epithelialen Zellen exprimiert wird, im Intestinaltrakt als der wichtigste Transportmechanismus für Chlorid (GALIETTA und MORAN, 2004). Daten aus Patch-Clamp-Experimenten an unserem Institut wiesen auf eine Wirkung von Glibenclamid, einem der wenigen relativ spezifischen Hemmstoffe von CFTR, auf den Auswärtsstrom von Pansenepithelzellen hin (F. Stumpff, unveröffentlichte Daten).

Mehrere Beobachtungen sprechen jedoch gegen eine (deutliche) Wirkung von cAMP auf die Chloridleitfähigkeit über die Membran der PEZ: (1) die Versuche von WOLFFRAM et al. (1989) zeigten keinen Einfluss von Theophyllin auf den Transport von Chlorid, (2) GÄBEL et al. (1999) konnten durch den Einsatz von Indomethacin, welches die Prostaglandinsynthese hemmt und so die cAMP-Konzentration absenkt,

ebenfalls keine veränderten Chloridtransportraten nachweisen. Theophyllin (in Kombination mit Forskolin) hemmte in ihren Experimenten den Chloridtransport zwar zwei Stunden nach Zugabe der Pharmaka signifikant, der Effekt der Pharmaka auf den I_{sc} war jedoch bereits nach einer Stunde hoch signifikant, (3) ergaben sich keine signifikanten Änderungen der G_t durch den Einsatz von Theophyllin (WOLFFRAM et al., 1989; GÄBEL et al., 1999) und (4) sprechen auch die eigenen Ergebnisse gegen einen Effekt auf die Chloridleitfähigkeit. So ergab sich auch am Umkehrpotential für Chlorid durch den Ersatz von Natriumchlorid durch Cholinchlorid als Hauptbestandteil der Perfusionslösung ein deutlicher Effekt auf den Einwärtsstrom (-7 ± 2 pA/pF [NaCl] gegenüber -2 ± 1 pA/pF [CholinCl], $p = 0,009$).

Auch der apikale Efflux von Protonen spielt möglicherweise am Aufbau des Kurzschlussstroms eine Rolle. Untersuchungen zu einem Einfluss von cAMP auf die am Pansenepithel nachgewiesene vH^+ -ATPase von SCHWEIGEL und MARTENS (2003) liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor. Denkbar wäre aber ein Anstieg der Aktivität nach vorhergehender Ansäuerung des Zytosols, wie es zum Beispiel nach einer Hemmung des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers durch cAMP der Fall wäre. Dies hätte ein Absinken des Kurzschlussstroms zur Folge.

In der erst kürzlich veröffentlichten Studie von LEONHARD-MAREK et al. (2005) wurde mittels Ussingkammerexperimenten gezeigt, dass die Erhöhung von intrazellulärem cAMP den Kurzschlussstrom erhöht, wenn zuvor Calcium aus der mukosalen Lösung entfernt wurde. Dieser Anstieg des I_{sc} war abhängig von der Anwesenheit von mukosalem Magnesium und wurde durch Absenkung der serosalen Natriumkonzentration reduziert. Das ließ auf einen Effekt von cAMP auf einen basolateralen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher schließen. Durch die Stimulation des Austauschers sinkt in der Folge die zytosolische Magnesiumkonzentration (SCHWEIGEL, 1999) und führt so zu einer indirekten Stimulation des divalentsensitiven Stroms durch den NSCC (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Ungeklärt war, ob cAMP auch einen direkten Effekt auf den NSCC ausübt. Allerdings sprach die Tatsache, dass die cAMP-erhöhenden Pharmaka in der mukosalen Pufferlösung einen größeren Effekt hatten als in der serosalen Lösung (LEONHARD-

MAREK et al., 2005), eventuell für eine direkte Wirkung des Nukleotids auf elektrogene Leitfähigkeiten in der apikalen Membran.

Tatsächlich gelang es in den eigenen Patch-Clamp-Experimenten zu zeigen, dass es nach der Erhöhung der zytosolischen cAMP-Konzentration auch in Gegenwart von divalenten Kationen zu einer erheblichen Zunahme der Natriumleitfähigkeit kam. Dafür, dass es sich dabei tatsächlich um durch Natrium hervorgerufene Effekte handelte, sprachen folgende Beobachtungen: (1) die deutliche Depolarisation der Zellen auf 28 ± 3 mV (gegenüber 10 ± 2 mV ohne cAMP), (2) die Steigerung der relativen Permeabilität P_{Na}/P_{Cholin} von $1,07 \pm 0,06$ in cAMP-freier Lösung auf $1,7 \pm 0,02$ ($p = 0,004$) in Anwesenheit von cAMP und (3) der signifikante Effekt auf den Einwärtsstrom am Umkehrpotential für Chlorid, wenn Natrium in der Perfusionslösung durch Cholin ersetzt wird (-7 ± 2 pA/pF [NaCl] gegenüber -2 ± 1 pA/pF [CholinCl], $p = 0,009$), wohingegen ein signifikanter Effekt am Umkehrpotential für Natrium nicht beobachtet wurde (16 ± 4 pA/pF [NaCl] gegenüber 13 ± 5 pA/pF [CholinCl], $p = 0,08$). Zudem sank am für die Pansenepithelzelle physiologischen Potential von -47 mV 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 %, $p = 0,5$).

Schließlich konnte durch den Entzug von extrazellulärem Calcium und Magnesium kein signifikanter Effekt von intrazellulärem cAMP mehr auf die Ströme beobachtet werden. Offenbar schien cAMP den blockierenden Effekt der divalenten Kationen zu lösen.

5.4 Effekte von PGE₂, Forskolin und Theophyllin

Die Wirkung auf die Natriumleitfähigkeit konnte sowohl bei direkter Applikation von cAMP mit der Pipettenlösung, als auch durch akute Applikation von Forskolin oder PGE₂ ausgelöst werden, wobei durch den Vergleich der Ströme bei verschiedenen Umkehrpotentialen die Effekte ebenfalls Natrium zugeordnet werden konnten.

So ergaben sich trotz erheblicher Triebkräfte für den Chloridinflux bzw. Kaliumefflux am Umkehrpotential für Natrium ($64,98$ mV) keine signifikanten Änderungen bei den

mit K-Gluconat gefüllten Zellen. Ein kaliumbedingter Strom sollte dagegen am Umkehrpotential für Kalium (-81,1 mV) bei Null liegen. Tatsächlich sah man aber deutliche Effekte, wie auch am Umkehrpotential für Chlorid (-62,9 mV).

Diese Effekte waren auch bei den mit CholinCl und CäsiumCl gefüllten Zellen reproduzierbar und signifikant.

Interessanterweise ergab sich bei den mit CäsiumCl gefüllten Zellen ebenfalls ein – wenn auch schwach – signifikanter Abfall des Auswärtsstroms durch PGE₂ am Umkehrpotential für Natrium ($p = 0,05$). Eine vergleichbare, allerdings nicht signifikante Tendenz war auch bei den Versuchen mit K-Gluconat als Pipettenlösung zu beobachten ($p = 0,25$). Möglicherweise steigt nach Erhöhung von intrazellulärem cAMP die Leitfähigkeit für extrazelluläres Natrium, während sie für intrazelluläre Kationen sinkt. Damit könnte eventuell ein Verlust von Kalium bei einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ins Pansenlumen vermieden werden.

Dass Theophyllin keine signifikante Wirkung auf die Ströme und Umkehrpotentiale hervorrief, liegt vermutlich in der mangelnden Produktion endogener Prostaglandine von isolierten, kultivierten PEZ begründet. Demnach wird kein cAMP gebildet und der Phosphodiesterasehemmer Theophyllin erzeugt keine Reaktion. Daneben hat der Versuch gezeigt, dass keine unspezifischen Effekte von Theophyllin auf die Ionenkanäle zu beobachten sind.

5.5 Signaltransduktion und Mikrodomäne

cAMP ist ein ubiquitäres Signalmolekül, welches zahlreiche zelluläre Vorgänge kontrolliert. Es wird von in der Zellmembran lokalisierten Adenylatcyclasen (AC) aus Adenosin-Triphosphat (ATP) gebildet.

Um die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen, sind neben einer AC noch mindestens zwei weitere Membrankomponenten nötig: ein Rezeptor und ein stimulatorisches G-Protein (G_s-Protein) (CERIONE et al., 1984; MAY et al., 1985). Der erste Schritt der Kaskade zur Weiterleitung eines hormonellen Signals beginnt mit der Bindung eines extrazellulären Liganden (z.B. PGE₂) an den mit einem G_s-Protein gekoppelten Rezeptor (*G-Protein-coupled receptor*, GPCR).

Allgemein sind G-Proteine Heterotrimeren, die aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Sie verhalten sich jedoch wie dissoziierbare Dimere, denn die α -Untereinheit kann sich von dem $\beta\gamma$ -Komplex trennen, der als Einheit zusammenbleibt. Die α -Untereinheit mit gebundenem GDP ist inaktiv und hat eine hohe Affinität zum $\beta\gamma$ -Komplex. Durch die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird der Austausch von GDP gegen GTP katalysiert. Die damit einhergehende Konformationsänderung verursacht die Dissoziation der aktivierten α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex, welche nun mit dem Effektor (AC) interagiert.

Der von der AC gebildete *second messenger* cAMP vermittelt schließlich die Mehrzahl seiner Effekte, indem es die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA, Proteinkinase A) aktiviert. Wichtige zelluläre Prozesse wie Stoffwechselforgänge, Zellteilung, Neuordnungen des Zytoskeletts und die Leitfähigkeit von Ionenkanälen werden durch die PKA-katalysierte Phosphorylierung zahlreicher Proteine – letztendlich als Antwort auf einen hormonellen Stimulus – moduliert (FRANCIS und CORBIN, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene PKA-Isoformen durch Ankerproteine (*A-kinase anchoring proteins*, AKAP) an distinkten intrazellulären Orten verankert werden können. Damit wird eine Kompartimentalisierung der cAMP-vermittelten Signaltransduktion erreicht; räumlich getrennte PKA können differenziell aktiviert werden (HOUSLAY und ADAMS, 2003).

Auch die für die Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden verantwortlichen PDE spielen eine streng regulierte Rolle bei der Kontrolle der intrazellulären cAMP-Konzentrationen (JIN et al., 1999) und sind an dem Aufbau der lokalen Gradienten von cAMP in Epithelzellen beteiligt (BARNES et al., 2005). Wie die PKAs sind inzwischen auch PDEs in PKA-AKAP-Komplexen nachgewiesen worden (TASKEN et al., 2001; DODGE et al., 2001) und besitzen dazu Bindungsstellen, mit denen sie sich an intrazelluläre Organellen oder Membranen verankern können (DEGERMAN et al., 1997; BAILLIE et al., 2002).

Zur vereinfachten Kontrolle der cAMP-Konzentration sind AC, PKA und die cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen (PDE) häufig in so genannten Mikrodomänen kolokalisiert. Dies führt dazu, dass lokale cAMP-Konzentrationen nicht zwangsläufig auf Gesamtzellebene abbildbar sind (COOPER, 2003).

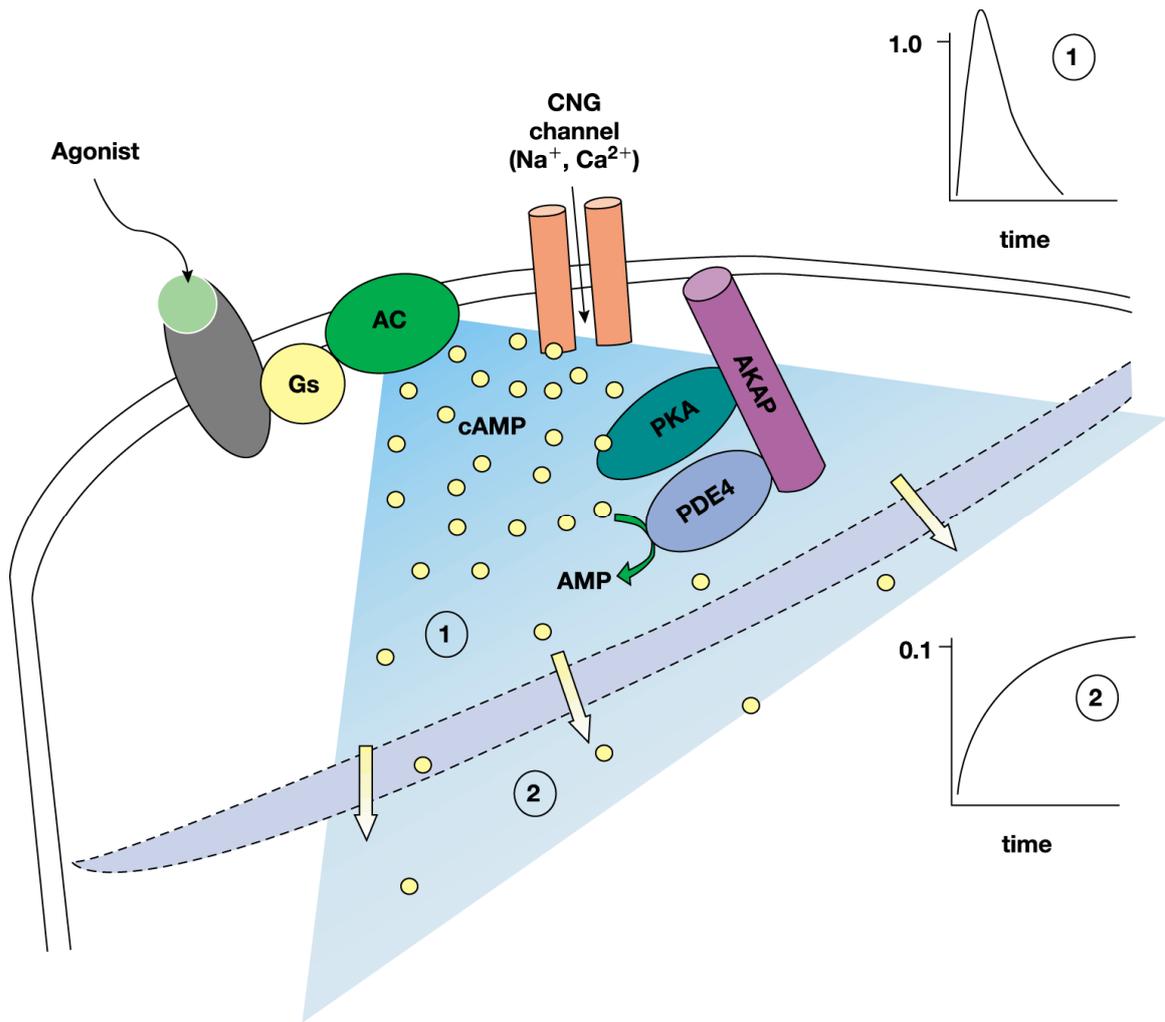


Abbildung 5.2: Die Organisation einer Mikrodomäne.

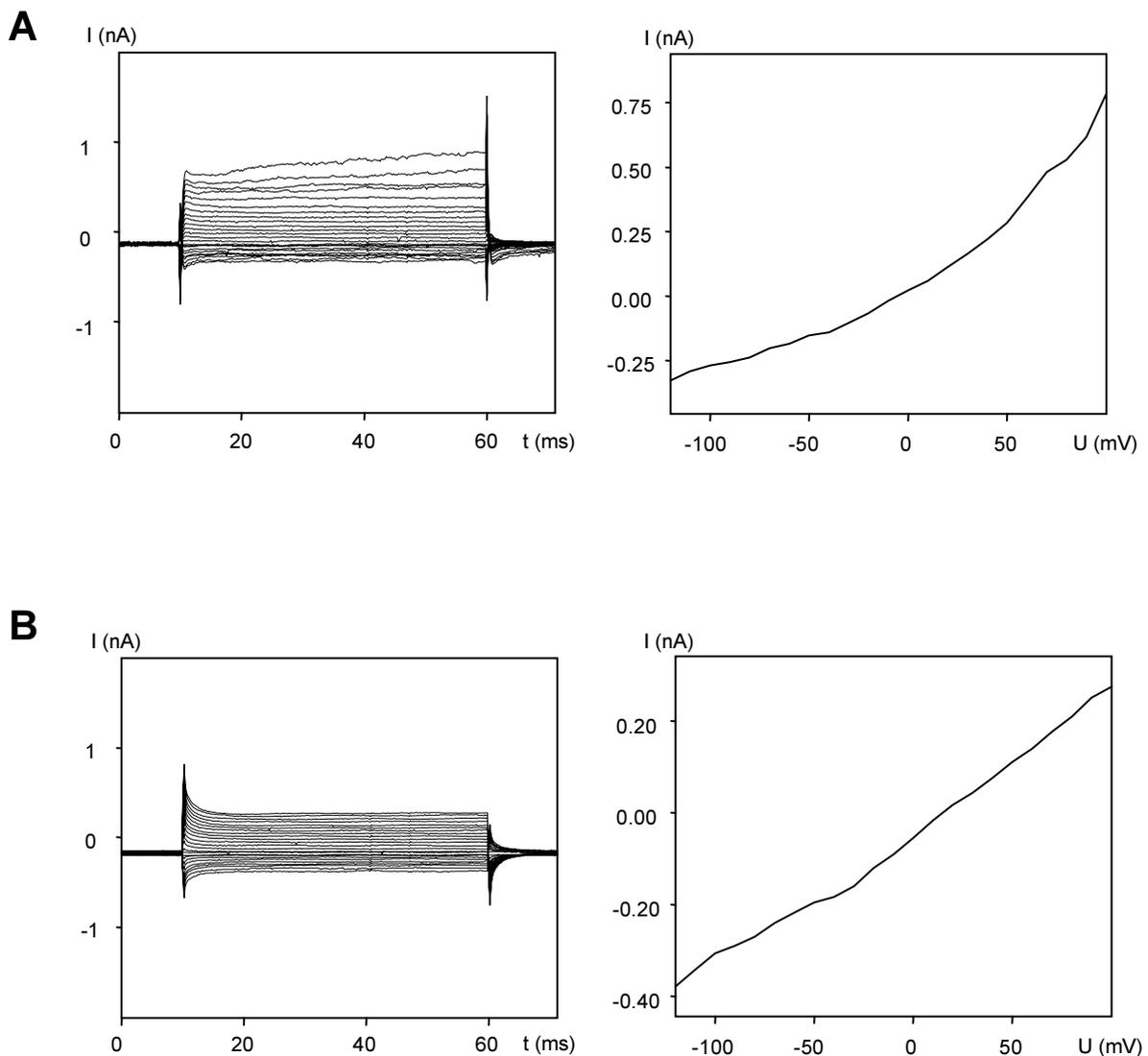
Die Kolokalisation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und AC mit PKA und einer PDE (hier PDE4) wird durch Ankerproteine (*A-kinase anchoring protein*, AKAP) gewährleistet. Eine hier postulierte interne physikalische Barriere verhindert möglicherweise die Diffusion von cAMP, was in unterschiedlichen Verläufen der cAMP-Konzentration in der Mikrodomäne (1) und im Zytosol (2) resultiert. y-Achse: [cAMP], x-Achse: Zeit. CNG: *cyclic nucleotide gated channel*, Gs: stimulatorisches G-Protein (aus: COOPER, 2003).

Nach BARNES et al. (2005) sind, statt der von COOPER (2003) postulierten physikalische Diffusionsbarriere, allein die PDE für die Abgrenzung der Mikrodomänen verantwortlich.

Nur so lassen sich auch die Effekte bei den eigenen Experimenten erklären, bei denen cAMP der Pipettenlösung hinzugefügt wurde. Bei einer vollständig

undurchlässigen Diffusionsbarriere hätte das zytosolische cAMP gar nicht zu Kanälen gelangen können.

Wie bei Versuchen von RICH et al. (2000) an CNG-Kanälen (*cyclic nucleotide gated channel*) war jedoch auch bei den eigenen Versuchen feststellbar, dass die Wirkung von cAMP auf die Kanäle nicht sofort messbar war. Stattdessen veränderten sich die Ionenströme relativ langsam (**siehe Abbildung 5.3**).



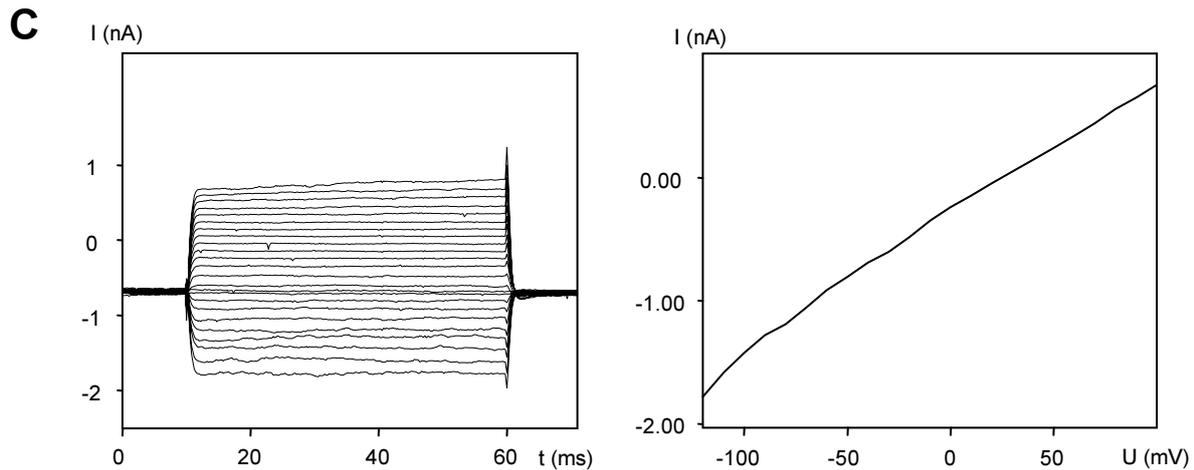


Abbildung 5.3: Beispielhafte Darstellung des Angleichs des intrazellulären Milieus an die Pipettenlösung anhand der Pulsprotokolle und Strom-Spannungs-Kurven einer Zelle zu Beginn der Messung. Die Pipettenlösung bestand aus CholinCl + 1 mM cAMP. Kurz nach dem Durchbrechen der Zellmembran in die Whole-Cell-Konfiguration (< 1 min) lag das Membranpotential bereits bei -4,4 mV, also deutlich über dem physiologischen Ruhemembranpotential, was für einen raschen Austausch der Pipettenflüssigkeit mit dem Zytosol spricht (A). Nach 2,5 Minuten betrug das Umkehrpotential 15,5 mV (B) und erreichte nach weiteren 2 Minuten ein stabiles Niveau bei 25,3 mV (C). Die deutlichen Stromschwankungen traten allgemein häufig zu Beginn einer Messung auf. Mit den Austauscherversuchen und Auswertungen wurde erst begonnen, wenn sich stabile Verhältnisse eingestellt hatten.

Bemerkenswert war die Entwicklung des Umkehrpotentials. Die Angleichung der zytosolischen Kalium- und Chloridkonzentration an die der Pipettenlösung schien dabei zu erfolgen, bevor ausreichende Konzentrationen von cAMP im Bereich der NSCC vorhanden sind (Umkehrpotential bereits bei -4,4 mV kurz nach dem Durchbrechen der Membran). Offensichtlich scheint die Mikrodomäne auch für größere Ionen keine Barriere darzustellen. RICH et al. (2000) machten die gleiche Beobachtung bei Ionenersatzexperimenten. So ließ sich der Strom eines auswärtsrektifizierenden Kaliumkanals durch Ersatz von Kalium durch Natrium in der Pipettenlösung ungleich schneller hemmen (90-prozentige Hemmung in 22 ± 4 s) als sich der CNG-Kanal durch cAMP stimulieren ließ (90-prozentige Stimulation nach 194 ± 62 s).

5.5.1 Direkter Effekt von cAMP auf den NSCC

Es bleibt festzuhalten, dass die Bindung eines extrazellulären Liganden (z.B. PGE₂), bzw. die Stimulation oder Hemmung der an der Signalkaskade beteiligten membranständigen AC durch Pharmaka auf einer bestimmten Seite der polarisierten Epithelzellen offenbar nicht zu einer allgemeinen zytosolischen Erhöhung der cAMP-Konzentration führt. Stattdessen steigt die Konzentration des Nukleotids hauptsächlich in den Mikrodomänen an und PDE verhindern die Diffusion ins Zytosol. Bei Ussingkammerversuchen an Pansenepithelien werden die Pharmaka üblicherweise der serosalen Pufferlösung beigelegt. Da die mukosale Seite des Epithels stark verhornt ist, erhofft man sich so eine bessere Diffusion der Pharmaka ins Epithel. LEONHARD-MAREK et al. (2005) beobachteten jedoch, dass der Zusatz von Theophyllin (in Kombination mit Forskolin) zur mukosalen Pufferlösung gegenüber der serosalen Zugabe ausgeprägtere Effekte hervorrief. Neben einem eventuellen Hinweis auf die Existenz der Mikrodomänen (unterschiedliche Reaktionen durch örtlich begrenzte Erhöhung der cAMP-Konzentration), lieferten diese Ergebnisse Anzeichen für die direkte Stimulation des apikal gelegenen NSCC durch cAMP.

Die in den eigenen Versuchen nachgewiesene Stimulation der elektrogenen Natriumleitfähigkeit mit dem hohen Anstieg des Umkehrpotentials fand dabei nur in Anwesenheit von zytosolischem Magnesium statt, und spricht eher gegen eine Wirkung allein durch die Absenkung von zytolischem Magnesium nach Stimulation des Na⁺/Mg²⁺-Austauschers (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

5.6 Einzelkanaluntersuchungen

Ein eindeutiger Hinweis auf einen durch Entzug divalenter Kationen oder Erhöhung von cAMP stimulierbaren Natrium leitenden Kanal konnte aus den insgesamt 39 Einzelkanalmessungen nicht abgeleitet werden. Allerdings wurde gezeigt, dass sich der Seal während der Messungen durch den Entzug von Calcium und Magnesium nicht verschlechterte. Die von verschiedenen NSCC vermutete Leitfähigkeit für

divalente Kationen konnte ebenfalls in den eigenen Versuchen ($n = 5$) nicht bestätigt werden.

Die auffällige Zunahme der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation in divalentfreier KCl-Lösung lässt sich möglicherweise mit einem konstanten Offen-Zustand eines Kanals erklären, wodurch sich Einzelkanalereignisse nicht dokumentieren lassen.

In insgesamt 5 Messungen wurde an Zellen zunächst in der Whole-Cell-Konfiguration die bekannte, durch Entzug divalenter Kationen stimulierbare Leitfähigkeit nachgewiesen. Im unmittelbaren Anschluss wurde der gleiche Seal in die Outside-Out-Konfiguration überführt. Jedoch konnten durch Entzug divalenter Kationen abermals keine Einzelkanalereignisse ausgelöst werden (**siehe Abbildung 4.37**).

Für das Scheitern des eindeutigen Nachweises des NSCC in Einzelkanalmessungen kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Die Versuchsreihe in der Outside-Out-Konfiguration lässt es möglich erscheinen, dass PEZ in Kultur eine gewisse Polarität aufweisen. Sollten die nicht selektiven Kationenkanäle eher lateral oder am Boden der Zelle lokalisiert sein, würden sie deshalb von einer von oben herabkommenden Pipette nicht erfasst.

Die Größe eines Membranpatches kann zwischen ~ 1 und $10 \mu\text{m}^2$ variieren (SOKABE und SACHS, 1990). Der Ionenkanal selber ist nur ungefähr 10 nm im Durchmesser, macht demnach maximal 0,1 % der gesamten Fläche des Patches aus und kann nach CLAPHAM (1994) mit der Größe eines Doughnuts in einem Football-Stadion verglichen werden. Viele Ionenkanäle sind zudem in einer geringen Dichte in der Membran exprimiert (ungefähr 1 Kanal/ μm). Deshalb besteht immer die Möglichkeit, dass sich auf dem untersuchten Abschnitt der Membran überhaupt kein Kanal oder nicht der Kanal, den man untersuchen möchte, befindet.

Veröffentlicht sind bereits gescheiterte Versuche, einen calciumsensitiven Natriumkanal in Nierentubuluszellen im Inside-Out-Patch darzustellen. Als Ursache wurde das Fehlen bestimmter vitaler Komponenten nach Präparation des Patches vermutet (GARTY und PALMER, 1997).

Bei den eigenen Versuchen sollte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass eine Verbindung des Kanals mit dem Zytoskelett und der daran befindlichen Enzymen (z.B. über AKAPs verankerte PKA) für eine basale Offenwahrscheinlichkeit notwendig ist.

Ferner könnte für das Wechselspiel zwischen Öffnen und Schließen des Kanals eine Magnesiumkonzentration notwendig sein, die auf einem definierten Niveau zwischen 0 mM und 0,9 mM liegt. Somit wäre der Kanal in den Versuchen entweder immer offen oder immer geschlossen, und Einzelkanalereignisse könnten nicht beobachtet werden.

5.7 Schlussfolgerungen

Das erst kürzlich entwickelte Modell (**siehe Abbildung 5.1**) machte die bekannte Zunahme der Natriumresorption am Pansenepithel durch hoch kaliumhaltige Lösungen (CARTER und GROVUM, 1990; SCOTT, 1967; WARNER und STACY, 1972) verständlich. Da am intakten Epithel die Aufnahme von Magnesium durch die apikale Membran nach Depolarisation durch luminales Kalium abnimmt (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; SCHWEIGEL et al., 1999), kommt es zur Abnahme der zytosolischen Magnesiumkonzentration mit nachfolgender Zunahme der elektrogener Leitfähigkeit für Natrium (LANG und MARTENS, 1999). Somit kommt es physiologischerweise nach einer Erhöhung der Osmolarität durch Kalium (z.B. aus Grass oder Heu) zu einer adäquaten Osmoregulation (CARTER und GROVUM, 1990; SCOTT, 1967; WARNER und STACY, 1972), die nach Erhöhung der Osmolarität durch nicht ionale Substanzen (z.B. nach akuter Umstellung auf Kraftfutter) ausbleibt (GÄBEL et al., 1987; OWENS et al., 1998 SCHWEIGEL et al., 2005).

Mit den Experimenten von GÄBEL et al. (1999) konnte die Wirkung von PGE₂ auf den Nettonatriumtransport nachgewiesen werden. Es erschien somit denkbar, dass unter Umständen auch Prostaglandine eine Rolle bei der Osmoregulation der Pansenflüssigkeit spielen. Bei nachfolgenden Ussingkammerversuchen von LEONHARD-MAREK et al. (2005) zeigte sich, dass die pharmakologische Erhöhung von intrazellulärem cAMP den Kurzschlussstrom *erhöht*, wenn zuvor Calcium aus der mukosalen Lösung entfernt wurde. Dieser Anstieg des I_{sc} ließ sich auf einen Effekt von cAMP auf einen basolateralen Na⁺/Mg²⁺-Austauscher zurückführen. Durch die Stimulation des Austauschers sinkt demnach die zytosolische Magnesium-

konzentration (SCHWEIGEL et al., 1999) und führt so zu einer indirekten Stimulation des divalentsensitiven Stroms durch den NSCC.

Ungeklärt war bislang, ob diese Leitfähigkeit durch physiologischerweise vorhandene *second messenger* (GÄBEL et al., 1999) auch in Anwesenheit von divalenten Kationen moduliert werden kann. So warf die Blockade der Natriumleitfähigkeit im Patch-Clamp-Experiment durch sehr niedrige Calciumkonzentrationen (μM) (LEONHARD-MAREK et al., 2005; eigene Ergebnisse) die Frage auf, ob es *in vivo* Faktoren gibt, die eine solche Blockade modulieren. Die Konzentrationen von Calcium und Magnesium in der Vormagenflüssigkeit von Schafen liegen in millimolaren Bereichen, bei denen NSCC im Allgemeinen blockiert sind (HALL et al., 1988).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten, dass es nach Erhöhung der zytosolischen cAMP-Konzentration auch in Gegenwart von divalenten Kationen zu einer erheblichen Zunahme der elektrogenen Leitfähigkeit für Natrium kommt. Dabei konnte dieser Effekt sowohl bei direkter Applikation über die Pipettenlösung, als auch durch akute extrazelluläre Applikation von PGE_2 oder Forskolin ausgelöst werden. Offenbar wurde durch intrazelluläres cAMP die blockierende Wirkung der extrazellulären divalenten Kationen aufgehoben. Diese Stimulation mit deutlichen Effekten auf das Umkehrpotential fand nur in Anwesenheit von zytosolischem Magnesium statt, und ist deshalb wahrscheinlich nicht allein durch eine Absenkung von zytolischem Magnesium nach Stimulation des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers erklärbar.

5.7.1 Mögliche physiologische Bedeutung und Entwicklung eines Zellmodells

Von überragender Bedeutung für die Gesundheit von Wiederkäuern ist die rasche Rückresorption des in großer Menge mit dem Speichel abgesonderten Natriums (**siehe Einleitung**).

Dabei unterliegt die Natriumresorption über das Pansenepithel zwei aktiven Transportmechanismen. Zum einen wird Natrium elektroneutral über einen Na^+/H^+ -Austauscher aufgenommen (CHIEN und STEVENS, 1972; MARTENS et al., 1991; SEHESTED et al., 1996). Ein wesentlich geringerer Teil gelangt über einen

elektrogenen Mechanismus in die Zelle (MARTENS und GÄBEL, 1988; HENSELEIT, 1991; LANG, 1997). Die eigenen Ergebnisse lassen in Übereinstimmung mit früheren Studien den Schluss zu, dass es sich dabei um einen durch divalente Kationen hemmbaren, nicht selektiven Kationenkanal (NSCC) handelt.

Die funktionelle Bedeutung der parallel arbeitenden Systeme wurde allgemein in der Gewährleistung einer optimalen Anpassung an schwankende Natriumkonzentrationen im Pansen gesehen. So werden bei hoher ruminaler Natriumkonzentration nahezu 90 Prozent des Ions über den elektroneutralen Mechanismus transportiert. Bei niedrigen Natriumkonzentrationen ist der Na^+/H^+ -Austauscher nur von geringer Bedeutung, da Ionengradienten als treibende Kraft für den Austausch unter solchen Bedingungen gering bzw. gar nicht vorhanden sind. Mit Abnahme der Natriumkonzentration in der Pansenflüssigkeit, wie sie etwa in Zusammenhang mit einer hohen Kaliumaufnahme auftritt, dominiert stattdessen der Transport über den elektrogenen Mechanismus (MARTENS, 1994).

Es erscheint möglich, dass diese sinnvolle Arbeitsteilung zwischen den beiden Transportsystemen, die eine effektive Resorption bei praktisch allen physiologisch in der Vormagenflüssigkeit vorkommenden Natriumkonzentrationen ermöglicht (STROZYK, 1987; MARTENS und GÄBEL, 1988), unter verschiedenen Umständen zur Osmo- und pH-Regulation beiträgt.

So konnte BÖTTCHER (2000) zeigen, dass eine durch PGE_2 hervorgerufene Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration den intrazellulären pH (pH_i) deutlich absenkte. Sicher nachgewiesen ist, dass die cAMP-induzierte Hemmung der Austauscheraktivitäten spezifisch für den apikal lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher 3 (NHE3)² ist (AZARANI et al., 1995; KANDASAMY et al., 1995; CABADO et al., 1997). Demgegenüber wird die Aktivität des (meist basolateral lokalisierten) NHE1 durch eine erhöhte cAMP-Konzentration stimuliert (KANDASAMY, 1995; CABADO et al., 1997). Beide Austauscher konnten inzwischen molekularbiologisch im Pansenepithel nachgewiesen werden (SCHWEIGEL et al., 2005). Obwohl in Versuchen von GÄBEL et al. (1999) und WOLFFRAM et al. (1989) am intakten Epithel keine Stimulation des I_{sc} durch cAMP gezeigt werden konnte, erscheint es

² Bisher sind neun NHE-Subtypen bekannt, die sich hinsichtlich ihres Vorkommens im Gewebe, ihrer Lokalisation und Regulation in der Zelle unterscheiden. An Epithelien kommen hauptsächlich die Subtypen 1 – 3 vor. NHE2 und NHE3 sind auf der apikalen Seite der Zelle lokalisiert, der NHE1 vor allem auf der basolateralen Seite (WAKABAYASHI et al., 1997).

möglich, dass bei einer Hemmung des NHE3 die notwendige Natriumresorption aus dem Pansen über den NSCC gesteigert wird. Dem Abfall des pH_i wird eventuell nachfolgend über die Stimulation des basolateralen NHE1 durch intrazelluläre Protonen und Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase oder Stimulation der apikalen vH^+ -ATPase entgegengewirkt.

Als Hypothese erscheint denkbar, dass bei einer Pansenazidose Prostaglandine gebildet werden. Trotz Hemmung des apikalen NHE3 unter diesen Umständen wird die Resorption von Natrium über das Pansenepithel über den NSCC gewährleistet.

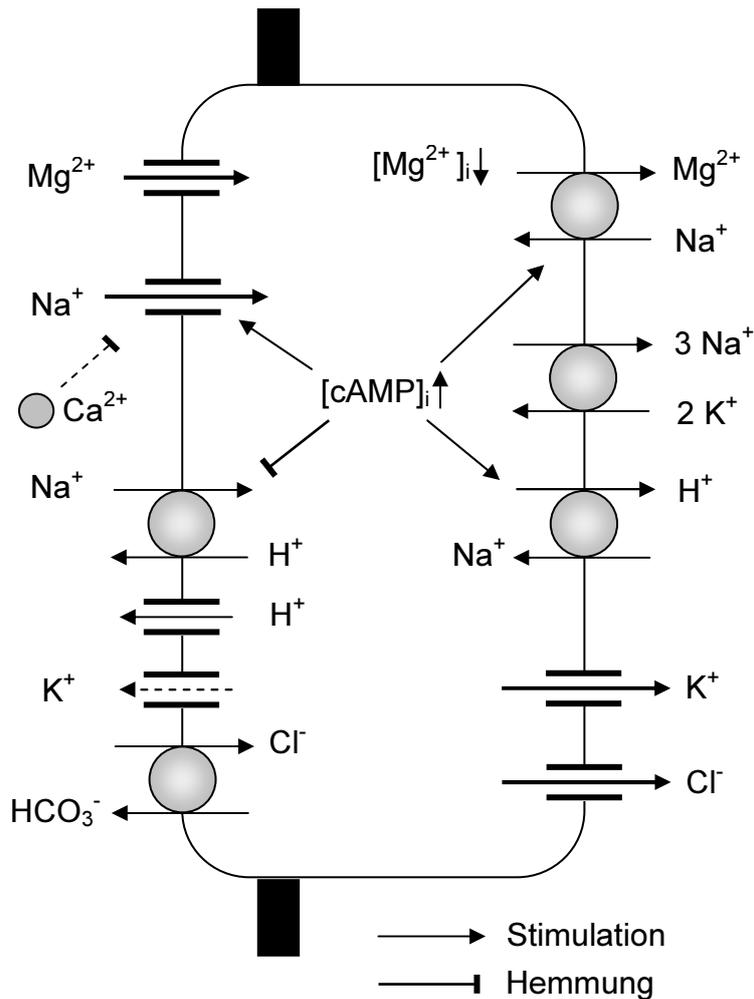


Abbildung 5.4: Modellvorschlag für die Regulation des elektrogenen Natriumtransports durch intrazelluläres cAMP. Die Stimulation des basolateralen Na^+/Mg^{2+} -Austauschers durch cAMP senkt die intrazelluläre Magnesiumkonzentration und führt so zu einer Öffnung des NSCC (LEONHARD-MAREK et al., 2005). Dieser Effekt scheint nach den eigenen Ergebnissen nicht allein für die Stimulation des elektrogenen Natriumtransports verantwortlich zu sein. So führt die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer direkten Stimulation der Natriumleitfähigkeit durch einen NSCC und die blockierende Wirkung der extrazellulären divalenten Kationen wird aufgehoben. Gleichzeitig wird der apikal gelegene NHE3 durch cAMP gehemmt. Eine letale Ansäuerung des Zytosols wird möglicherweise über eine cAMP-abhängige Stimulation des basolateralen NHE1 oder eine pH-abhängige Stimulation der apikalen vH^+ -ATPase vermieden.

5.7.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Die *transient receptor potential* (TRP) Kanalfamilie ist, basierend auf Sequenzhomologien, in drei Subfamilien gegliedert: TRPC (TRP classical), TRPV (TRP vanilloid) und TRPM (TRP melastatin).

TRPM7 gehört zur TRPM-Subfamilie, wird ubiquitär exprimiert und ist einzigartig in seiner Funktion als Ionenkanal und Proteinkinase. Jüngere Studien zeigen, dass TRPM7 unter anderem in die Aufrechterhaltung der Magnesiumhomöostase involviert ist (NADLER et al., 2001; SCHMITZ et al., 2003) und eine Rolle spielt bei Krankheiten, die durch eine gestörte Magnesiumresorption hervorgerufen werden (SCHLINGMANN et al., 2002; WALDER et al., 2002; CHUBANOV et al., 2004).

TRPM7 zeigen die Eigenschaften von nicht selektiven Kationenkanälen, die bei physiologischen Konzentrationen von Calcium und Magnesium mit einer deutlichen Auswärtsrektifikation divalente Kationen nach innen und monovalente Kationen nach außen leiten (RUNNELS et al., 2001; NADLER et al., 2001). Durch Entfernung der extrazellulären divalenten Kationen erhöht sich die Leitfähigkeit für monovalente Kationen und die Strom-Spannung-Beziehung wird eher linear (RUNNELS et al., 2001). Von der zytosolischen Seite aus wird der Kanal durch Magnesium (physiologische Konzentrationen von 0,5-1 mM) gehemmt (KOZAK und CAHALAN, 2003).

Obwohl die *Inaktivierungsmechanismen* des TRPM7 inzwischen ausführlich untersucht wurden, ist noch kaum etwas bekannt über Möglichkeiten der *Aktivierung* des Kanals unter physiologischen Bedingungen, jedoch ist es denkbar, dass bestimmte physiologische oder pathologische Stimuli die Leitfähigkeit des Kanals erhöhen können (JIANG et al., 2005). Interessanterweise konnte in dem Zusammenhang kürzlich von TAKEZAWA et al. (2004) eine rezeptorgekoppelte PKA-abhängige Öffnung von TRPM7 (mit Leitfähigkeiten für Kalium, Natrium und Cäsium) über eine Erhöhung von cAMP beschrieben werden.

In der Studie von JIANG et al. (2005) wurde zudem eine Erhöhung der von monovalenten Kationen getragenen Einwärtsströme durch extrazelluläre Protonen nachgewiesen. Die Autoren vermuteten, dass die Protonen den einwärtsgerichteten Strom durch Verdrängung der divalenten Kationen von ihrer Bindungsstelle an der Kanalpore erhöhen und dass dieser Mechanismus eine Rolle spielen könnte bei bestimmten, den pH-Wert erniedrigenden Erkrankungen.

Es erscheint möglich, dass dieser Kanal sowohl für den elektrogenen Magnesiuminflux am Pansenepithel verantwortlich ist (SCHWEIGEL et al., 1999) als auch für den elektrogenen Natriumtransport. Bei einer Pansenazidose mit pathologisch erniedrigtem pH-Wert wäre somit die Natriumaufnahme über den Kanal gewährleistet, während der Na^+/H^+ -Austauscher aufgrund des fehlenden chemischen Gradienten über der Membran gehemmt wäre. Der molekularbiologische Nachweis von TRPM7 an Pansenepithelzellen konnte mittlerweile an unserem Institut geführt werden (Z. Nikolic, unveröffentlichte Daten). Da der Kanal ubiquitär exprimiert wird, ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses jedoch eingeschränkt.

Mit den eigenen Versuchen gelang es nicht, eine Leitfähigkeit für Magnesium durch Erhöhung der extrazellulären Magnesiumkonzentration nachzuweisen. Dies liegt möglicherweise einerseits an der blockierenden Wirkung einer Zugabe dieses Ions auf Leitfähigkeiten von anderen im Medium enthaltenen Kationen, die eventuelle diskrete Veränderungen überlagern. Andererseits scheinen Pansenepithelzellen über Schutzmechanismen gegen den Ein- und Ausstrom größerer Mengen von Magnesium zu verfügen (SCHWEIGEL et al., 2005), wie sie zum Nachweis einer Magnesiumleitfähigkeit mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik notwendig wären.