

4 Diskussion

4.1 Diskussion und Abgrenzung der Methode

Amilorid hemmt Natriumtransportprozesse, ohne andere Ionentransporte nennenswert zu beeinflussen (Benos, 1982). Einer dieser Natriumtransportprozesse ist der in der Einleitung beschriebene Transport durch den apikalen Natriumkanal ENaC (Gen-symbol SCNN1). Amilorid hat einen IC_{50} -Wert zwischen 0,1 und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ (Kleyman & Cragoe, 1988).

Ein zweites Amilorid-sensitives Transportsystem ist der apikale Na^+/H^+ -Antiporter NHE3 (SLC9A3), der einen elektroneutralen Austausch bewirkt und folglich nicht als Ursache des Kurzschlussstroms in Frage kommt. Das dritte Transportsystem schließlich ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter NCX3 (SLC8A3). Dieser ist zwar bei einer Stöchiometrie von $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+} = 3:1$ elektrogen, kann aber aus zwei Gründen auch nicht ursächlich für den gemessenen Kurzschlussstrom sein: Erstens ist dieser Antiport nur in den erregbaren Zellen von Herz, Gehirn und Hypophyse nachgewiesen worden, also nicht in Epithelzellen (Philipson et al., 2002). Und zweitens hat NCX3, ebenso wie NHE3, eine geringe Affinität zu Amilorid mit einem K_M -Wert im millimolaren Bereich. Mit der verwendeten Konzentration von 10^{-4} mol/l wäre NCX3 demnach kaum gehemmt worden (Garty & Benos, 1988). In den von Fromm et al. durchgeführten Untersuchungen wurde eine nahezu vollständige Übereinstimmung des Amilorid-hemmbareren Kurzschlussstroms mit dem durch radioaktive Isotope bestimmten elektrogenen Natriumtransport festgestellt, was die obigen Ausführungen bestätigt (Fromm et al., 1993). Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass Amilorid in der verwendeten Konzentration durch Blockade des apikalen Natriumkanals ENaC den transepithelialen elektrogenen Natriumtransport eindeutig identifiziert. Ein Vorteil der Methode ist die direkte Korrelation von elektrophysiologisch und biochemisch gewonnenen Daten.

Die verwendeten Methoden weisen nicht die Proteine der ENaC-Untereinheiten selbst nach und zeigen nicht direkt die Regulation auf Proteinebene. Dennoch wird hier die funktionelle Regulation des ENaC am nativen Rattenepithel analysiert, welche im distalen Kolon der Ratte primär auf transkriptioneller Regulation beruht (Epple et al., 2000). Darüber hinaus konnte im entsprechenden humanen Darmabschnitt, dem Kolon sigmoideum, eine direkte Übereinstimmung der Regulation der ENaC-mRNA mit der Induktion auf Proteinebene gezeigt werden (Amasheh et al., 2004).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Heterogenität der Darmabschnitte

Bereits vor molekularer Identifikation des ENaC konnte gezeigt werden, dass die transportinduzierende Wirkung von Aldosteron vornehmlich über Natriumkanäle des distalen menschlichen Kolons abläuft (Sandle, 1989). In der genauen Untersuchung des distalen Kolons fanden Fromm et al. (Fromm et al., 1993) den maximalen Effekt des Aldosterons im spätdistalen Kolon (LDC-1 u. -2), welches sich vom fröhdistalen Kolon unterschied. Sie postulierten damals, dass eine Zusammenfassung von LDC-1 und LDC-2 aufgrund der geringen Unterschiede im aldosteroninduzierten elektrogeneren Natriumtransport gerechtfertigt sei. Wir fanden in unseren Versuchen trotz der engen räumliche Nähe einen Unterschied zwischen LDC-1 und LDC-2, der nach acht Stunden seine größte Ausprägung erreichte und einem Strom von ca. $6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ entsprach. Dies ist konsistent mit dem herrschenden Verständnis der Heterogenität des Darms. Nach diesem Verständnis ändert sich die Resorptionskapazität von oral nach aboral. Während in den weiter oral gelegenen Darmabschnitten eine große Anzahl von Ionen nur entgegen einem kleinen oder mittleren elektrochemischen Gradienten resorbiert wird, kann im aboralen (=distalen) Darmsegment die Resorption durch Aldosteron reguliert werden. Hier ist eine Spanne zwischen fehlender Resorption und hohen Resorptionsraten, so dass dieses aldosteronsensitive Segment, analog dem distalen Nephron zur Feinregulation der Salz- und Wasserzusammensetzung des Darminhalts dient (Fromm et al., 1993). Deshalb wurde LDC-2 als Gewebe mit dem maximalen Aldosteron-Effekt für die weiteren Experimente ausgewählt.

4.2.2 Diskussion des Zeitverlaufs

Fromm et al. hatten 1993 ein Maximum des aldosteroninduzierten elektrogeneren Natriumtransports nach 8 Stunden Einwirkung von Aldosteron gefunden, so dass unsere Experimente ebenfalls nach 8 Stunden beendet wurden (Fromm et al., 1993). Uneinigkeit herrscht in der Literatur darüber, wieviel Einfluss auf den frühen Anstieg des Aldosteron-induzierten Natriumtransports die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase hat. Eine Arbeitsgruppe zeigte an Sammelrohrzellen der Rattenniere, dass die Ausbildung von bereits vorhandenen Na^+/K^+ -ATPasen an der Zelloberfläche bereits kurz (bis 3 h) nach Aldosterongabe auftrat (Summa et al., 2001). Ein Effekt des bereits einströmenden Natriums wurde hier ausgeschlossen. Längerfristige Effekte, wie sie z.B.

durch Induktion von den im Vergleich zu ENaC-Proteinen langlebigeren Untereinheiten der Na⁺/K⁺-ATPase entstehen, nehmen über einen Zeitraum von Tagen zu (Verrey et al., 2003). Dies war jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen und wäre auch in unserem In-vitro-Modell kaum messbar gewesen. Die Halbwertszeit von alpha-ENaC ist ca. 1 h (Staub et al., 1997).

4.2.3 Wirkung der ERK/MAPK-Inhibitoren PD98059 und U0126

Mit dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob der ERK 1/2-Signaltransduktionsweg mit der Aldosteron-vermittelten Wirkung auf den epithelialen Natriumtransport verknüpft ist.

Zentner et. al hatten ursprünglich ein System entwickelt, in dem sie ein Fusionsprotein aus der Raf-1-Kinase und dem Östradiol-Rezeptor (ER) durch Transfektion einer Speicheldrüsenzelle der Ratte gebildet hatten. Dieses Fusionsprotein aktivierte bei Stimulierung mit Östradiol den ERK 1/2-Signaltransduktionsweg. Mittels semiquantitativer PCR wurde nachgewiesen, dass die mRNA der ENaC- α -Untereinheit durch Aktivierung des ERK 1/2-Signaltransduktionsweg herabreguliert wird. Durch Vorbehandlung der Zellen mit 12-O-Tetradecanoyl-1-phorbol-13-acetat (TPA) wurde ebenfalls eine Herabregulation der ENaC- α -Untereinheit erreicht, so dass eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) vermutet wurde, da TPA ein PKC-Aktivator ist (Zentner et al., 1998).

Unsere Kurzschlussstromexperimente zeigten einen Anstieg des Kurzschlussstroms durch Inkubation mit Aldosteron, wie er aus der Literatur und Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe zu erwarten war (Fromm et al., 1993). Durch Zugabe von Amilorid wurde dieser Kurzschlussstrom als elektrogene Natriumresorption identifiziert. Die alleinige Gabe von PD98059 führte zu keiner Induktion eines Kurzschlussstroms. Wurden die Epithelien zusammen mit Aldosteron und dem ERK-Inhibitor PD98059 inkubiert, fiel der Aldosteron-induzierte Kurzschlussstrom bedeutend geringer aus als ohne Zusatz von PD98059. Dies deutete auf einen Zusammenhang zwischen dem ERK-Signaltransduktionsweg und dem Aldosteron-induzierten Natriumtransport hin.

Die mRNA der β - und γ -Untereinheiten im Northern Blot zeigten keine Expression unter Kontrollbedingungen und eine starke Expression bei Aldosteronzugabe. Bei alleiniger Zugabe von PD98059 ließ sich keine Änderung der mRNA detektieren. Gab man jedoch Aldosteron und PD98059 in Kombination, so war die mRNA der beiden Untereinheiten deutlich herabreguliert. Die mRNA der α -Untereinheit zeigte bereits unter Kontrollbedingungen eine Expression, die durch Zugabe von Aldosteron

vermindert wurde. Eine Zugabe von PD98059 alleine zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, während die Kombination von Aldosteron und PD98059 eine ähnliche Menge an mRNA der α -Untereinheit zeigte wie bei Aldosteron alleine. Diese Northern-Blot-Ergebnisse korrelierten sehr gut mit den elektrophysiologischen Ergebnissen, wenn man die in der Literatur vorherrschende Meinung berücksichtigt, die der β - und γ -Untereinheit die entscheidende Rolle bei der Regulation des ENaC zuschreibt (Booth & Stockand, 2003) (Epple et al., 2000) (Fuller et al., 2000). Die α -Untereinheit wird dabei konstitutiv exprimiert (Lingueglia et al., 1994) bzw. im distalen Kolon durch Aldosteroninkubation herabreguliert. Die Herabregulation der α -Untereinheit erfolgte dabei nach einem Zeitintervall von 3h nach Aldosteronzugabe. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Anstieg des aldosteroninduzierten Transports bereits begonnen, so dass die α -Untereinheit offensichtlich nicht an der akuten Regulation der ENaC-Aktivität in diesem Gewebe beteiligt war (Epple et al., 2000).

Bei Einsatz des ERK-Inhibitors U0126 konnte elektrophysiologisch ebenfalls eine Abnahme des aldosteroninduzierten Natriumtransports im Vergleich zu alleiniger Aldosterongabe nachgewiesen werden. Diese Abnahme war sogar stärker als bei PD98059. Da beide Inhibitoren der ERK-Vorläuferenzyme MEK 1/2 sind, waren diese ähnlichen Effekte zu erwarten gewesen. Ob die stärkere Hemmung des Natriumtransports enzymimmanent oder ein Dosisphänomen ist, konnte mit den vorgenommenen Versuchen nicht unterschieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des ERK 1/2-Signaltransduktionsweg auf die Aldosteron-induzierte Regulation des ENaC im distalen Kolon der Ratte untersucht.

Unsere Ergebnisse mit einer Reduktion des aldosteroninduzierten Natriumtransports und dem Abfall der mRNA der β - und γ -Untereinheiten durch den ERK-Inhibitor PD98059 deuten auf eine konstruktive Rolle des ERK-Signaltransduktionswegs für den Natriumtransport in diesem Epithel hin.

Die durch unsere Ergebnisse vermutete konstruktive Rolle des ERK 1/2-Signaltransduktionsweg für den Natriumtransport im distalen Kolon der Ratte schien im Widerspruch zu einigen Untersuchungen zu diesem Themenkomplex zu stehen, welche jedoch vorwiegend an Nierenzellen vorgenommen wurden. Zwischen Niere und Kolon zeigen sich jedoch grundsätzliche Unterschiede bezüglich der Regulation

des ENaC. So wurde z.B. gezeigt, dass die ENaC- α -Untereinheit im Gegensatz zur konstitutiven Expression im distalen Kolon, in der Niere durch Aldosteron selektiv hochreguliert wurde (Masilamani et al., 1999).

Darüber hinaus zeigten Booth und Stockand an der Nierenzelllinie A6, dass die durch Phorbol ester (TPA) herbeigeführte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC-) zu einer signifikanten Abnahme der Natriumresorption innerhalb einer Stunde und zur Abnahme der Proteine der β - und γ -Untereinheiten des ENaC führte (Booth & Stockand, 2003). Da diese Effekte zumindest teilweise durch die ERK-Inhibitoren U0126 und PD98059 reversibel waren, gingen die Autoren von einer über ERK vermittelten abbauenden Funktion der PKC auf ENaC aus.

Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe an MDCK-C7-Zellen hatten ergeben, dass Aldosteron neben einer kurzzeitigen Erhöhung des I_{SC} auch eine Phosphorylierung von ERK1/2 bewirkte. Da durch eine ERK-Hemmung mittels U0126 eine Zunahme des I_{SC} erfolgte, schlossen die Autoren, dass ERK zwar durch Aldosteron stimuliert wird, jedoch eine hemmende Funktion für den epithelialen Natriumtransport hat. Eine mögliche Erklärung wäre aus Sicht der Autoren die Rolle eines „Negative feedback“-Mechanismus von ERK1/2 (Grossmann et al., 2004).

Diese Ergebnisse wurden durch ein anderes Labor bestätigt, das nachweisen konnte, dass eine Aktivierung des ERK 1/2-Signaltransduktionswegs mit ebenfalls nachgewiesener Phosphorylierung, in diesem Fall durch EGF und ATP, eine Hemmung des amiloridsensitiven Kurzschlussstroms bewirkte (Falin et al., 2005). Diese Hemmung war ebenfalls durch Zugabe des ERK-Inhibitors PD98059 reversibel. Allerdings wurde in dieser Untersuchung der Natriumtransport nicht näher untersucht, so dass eine Wirkung über den ENaC zwar vermutet, jedoch nicht bewiesen wurde.

Shi et al zeigten, dass eine ERK-vermittelte Phosphorylierung der β - und γ -Untereinheiten des ENaC den Abbau des Kanals erleichterte. Die funktionellen Untersuchungen erfolgten hier an *Xenopus-levis*-Oozyten (Shi et al., 2002).

Eine Arbeit von Michlig und Mitarbeitern an Sammelrohrzellen von NMIR-Mäusen zeigte, dass Aldosteron keinen Effekt auf ERK hat, jedoch die ERK-Inhibition durch PD98059 sowohl den basalen als auch den aldosteroninduzierten Natriumtransport verringerte. Dieser Teil der Arbeit würde die von uns erhobenen Befunde unterstützen, jedoch wurden die Effekte von den Autoren auf die Na^+/K^+ -ATPase zurückgeführt und nicht auf den ENaC. Dieses wurde nachgewiesen, indem nach einem Protokoll jeweils der Natriumtransport von nur einem Natriumtransportsystem abhängig gemacht wurde. Zunächst wurde die apikale Membran mit Amphotericin B für mono-

valente Kationen selektiv durchlässig gemacht. Um die basolaterale Kalium-Leitfähigkeit zu blockieren, wurde der basolateralen Lösung 3 mM Ba^{2+} zugegeben. In diesen Bedingungen war der Kurzschlussstrom hauptsächlich von der Aktivierung der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase abhängig. In dieser Versuchsreihe war der Kurzschlussstrom durch PD98059 und U0126 hemmbar, was die Autoren auf eine ERK-abhängige Regulation der Na^+/K^+ -ATPase zurückführten. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die basolaterale Membran mit Amphotericin B permeabilisiert und mit 100 mM Kaliumgluconat umspült. Unter diesen Bedingungen war der amilorid-hemmbar Kurzschlussstrom lediglich von einem großen Natriumgradienten abhängig, der künstlich über der apikalen Membran aufrechterhalten wurde. In diesem Versuchsansatz zeigte die Zugabe von PD98059 oder U0126 keinen signifikanten Effekt auf den Kurzschlussstrom, weder basal noch nach Stimulation mit Aldosteron oder Vasopressin. Von den Autoren wurde somit ein neuer Regulationsmechanismus postuliert, der die Natriumresorption durch eine basale ERK-abhängige, jedoch Hormon-unabhängige Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase erklärt. Andererseits zeigten dieselben Autoren, dass PD98059 keinen Effekt hatte, wenn der ENaC durch Amilorid blockiert war (Michlig et al., 2004).

Da durch unsere Versuche eindeutig die Korrelation von Natriumtransport mit Hochregulation von β - und γ -ENaC gezeigt werden konnte, ist von einer Regulation des ENaC unter Beteiligung des ERK 1/2-Signaltransduktionswegs auszugehen. Allerdings soll nicht bestritten werden, dass ENaC und Na^+/K^+ -ATPase bei der Steuerung des transepithelialen Natriumtransports aufeinander angewiesen sind. Es sind zur Zeit keine Daten zur ERK-vermittelten Regulation des Natriumtransports an Zellen des Kolons verfügbar, so dass die oben angeführten Arbeiten, deren Untersuchungen fast ausschließlich an Nierenzellen vorgenommen wurden, herangezogen wurden. In diesem Zusammenhang liegt es nahe, dass nicht übereinstimmende Befunde durch den Gewebeunterschied von Niere und Kolon zu erklären sein könnten.

4.2.4 Wirkung des p38-Inhibitors SB202190

Dieser Inhibitor zeigte elektrophysiologisch ein ähnliches Ergebnis wie die MEK-Hemmstoffe PD98059 und U0126. Der aldosteroninduzierte Natriumtransport nahm in Anwesenheit von SB202190 signifikant ab.

Obwohl in der Literatur bis jetzt wenig Untersuchungen zu p38 und ENaC zu finden sind, gab es Hinweise auf eine Verknüpfung. In einer Untersuchung an *Xenopus*-Oozyten konnten Volk und Mitarbeiter zeigen, dass der p38-Inhibitor SB203580 einen hemmenden Effekt auf die ENaC-Aktivität hatte (Volk et al., 2000). Zwei weitere Arbeiten haben in ihren Untersuchungen den von uns verwendeten p38-Inhibitor SB202190 eingesetzt. Itani und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid eine Superinduktion der durch Glucokortikoide stimulierten Expression von α -ENaC bewirkte (Itani et al., 2003). Diese Superinduktion war durch SB202190 komplett hemmbar, was eine Vermittlung über den p38-Weg anzeigte. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Mitarbeiter desselben Labors, die 2004 an der Bronchialzelllinie H441 zeigen konnten, dass ein durch cAMP stimulierter Natriumtransport, der mit einer Hochregulation von α -ENaC einhergeht, durch SB202190 reversibel war (Thomas et al., 2004). Unsere elektrophysiologischen Daten zur Hemmung des Natriumtransports durch SB202190 sind dementsprechend konsistent mit der Literatur. Welche Untereinheit durch SB202190 beeinflusst wird, konnte durch unsere Experimente allerdings nicht gezeigt werden.

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

Mit der Gabe des Phorbolesters 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der Proteinkinase C und damit des ERK 1/2-Signaltransduktionswegs einen Effekt auf den amiloridsensitiven Kurzschlussstrom und die mRNA der Untereinheiten hat. Der amiloridsensitive Kurzschlussstrom, nach achtstündiger Inkubation mit Aldosteron und TPA gemessen, zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Inkubation mit Aldosteron. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass durch Aldosteron der über ENaC vermittelte Natriumtransport bereits maximal stimuliert und nicht weiter induzierbar war.

Zu beobachten war jedoch eine kurzzeitige vorübergehende Zunahme des I_{SC} nach der TPA-Gabe. Da in dieser Phase kein Amilorid gegeben wurde, kann diese Zunahme nicht mit Sicherheit als ENaC-äquivalenter amiloridsensitiver Kurzschluss-

strom identifiziert werden. Somit könnte diese Zunahme beispielsweise auch durch eine Chloridsekretion verursacht worden sein. Um dies zu unterscheiden, müsste auf der Höhe des I_{SC} –Anstiegs Amilorid gegeben werden.

Auf biochemischer Ebene konnte für die γ -Untereinheit eine Hochregulation bei Kombination von Aldosteron mit TPA beobachtet werden. Diese Beobachtung korrelierte jedoch nicht mit den Ergebnissen aus den Ussing-Kammer-Versuchen.

4.2.6 Andere Signaltransduktionswege

Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte an der Nierenepithelzelllinie A6 gezeigt werden, dass die Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-Kinase) benötigt wird, um die Induktion der Natriumresorption durch Aldosteron zu vermitteln. Eine Hemmung der PI-3-Kinase durch den spezifischen Inhibitor LY294002 verminderte die Anzahl der funktionell offenen ENaC-Kanäle in der apikalen Membran (Blazer-Yost et al., 1999).