

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. Arnold
Klinik für Innere Medizin, SP Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch

Pharmakologische Beeinflussung der pH-Regulation kardialer Fibroblasten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dirk Witzel

aus Fulda

Marburg 2003

Angenommen vom
**Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg**

am 12.06.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. Rupp

Correferent: Prof. Dr. G. Aumüller

Meinen Eltern
Gerlinde und Josef

sowie
meiner Großmutter
Rosi

In memoriam:

Vinzenz

Frieda

Oskar

Inhalt**Seite****1. Einleitung**

1.1 Ionentransportmechanismen	4
1.2 Ionentransporter als etablierte therapeutische Angriffspunkte	4
1.2.1 Natrium-abhängige Ionentransporter der Niere und Diuretika	4
1.2.2 Na^+/Cl^- -Kotransporter und Thiaziddiuretika	5
1.2.3 $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter und Schleifendiuretika	5
1.2.4 Na^+/H^+ -Austauscher (NHE), Na^+ -Kanäle und Amilorid / HOE694	5
1.2.5 Na^+/K^+ -ATPase und Aldosteronantagonisten	7
1.2.6 Protonenpumpe des Magens und Säuresekretionshemmer	7
1.3 Ionentransporter ohne bisher etablierte therapeutische Nutzung	8
1.3.1 Bikarbonat-Transporter-Superfamilie, BTS	8
1.3.2 Mitglieder der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie	9
1.3.2.1 Natriumabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher NDAE1	10
1.3.2.2 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC	13
1.3.2.3 Natrium-unabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher AE	17
1.3.2.4 Cl^-/OH^- -Austauscher CHE	20
1.3.3 Physiologische Systeme, in denen Bikarbonattransporter eine zentrale Rolle spielen	21
1.3.4 Laborchemisch etablierte Inhibitoren von Bikarbonat-Transportern	26
1.3.4.1 Stilbendisulfonate	26
1.3.4.2 Wirkmechanismus von Stilbendisulfonaten	26
1.3.4.3 Unterschiede in der Affinität von Isoformen des Anionenaustauschers AE zu DIDS	29
1.4 Untersuchungsmöglichkeiten zur Charakterisierung von Ionentransportern	30
1.5 Auswahl der untersuchten Zellart	31
1.6 Auswahl der untersuchten Pharmaka	32

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
2. Material und Methoden	33
2.1 <i>Fluoreszenzphotometrie</i>	33
2.1.1 <i>Prinzip der Fluoreszenzphotometrie</i>	33
2.1.2 <i>Strahlengang und Datenfluß der Fluoreszenzphotometrischen Anlage</i>	33
2.1.3 <i>pH-Indikator BCECF</i>	36
2.1.4 <i>Beladung der Zellen mit BCECF</i>	37
2.1.4.1 <i>Prinzip der Beladung</i>	37
2.1.4.2 <i>Durchführung der Inkubation</i>	37
2.1.5 <i>Versuchsaufbau bei fluoreszenzphotometrischen Messungen</i>	38
2.1.5.1 <i>Spülsystem der Superfusionslösungen</i>	38
2.1.6 <i>Anwendung von Superfusionsmedien und pharmakologische Interventionen</i>	39
2.1.6.1 <i>Ammoniumchlorid-Impuls-Technik</i>	39
2.1.6.2 <i>Kontrolllösung und Ammoniumchlorid-Lösung</i>	39
2.1.6.3 <i>Na⁺-freie Lösung</i>	40
2.1.6.4 <i>Entzug von extrazellulärem Chlorid</i>	40
2.1.6.4.1 <i>Chloridhaltige Kontrolllösung</i>	40
2.1.6.4.2 <i>Chloridfreie Lösung</i>	40
2.1.6.5 <i>Vorbehandlung mit DIDS</i>	40
2.1.6.5.1 <i>Durchführung der Vorbehandlung mit DIDS</i>	41
2.1.6.6 <i>Direkter Einfluß von HOE 694</i>	41
2.1.6.7 <i>Direkter Einfluß von Moxonidin</i>	42
2.1.6.8 <i>Einfluß von Moxonidin nach Vorbehandlung</i>	42
2.1.6.9 <i>Einfluß von Clonidin und Guanabenz nach Vorbehandlung</i>	42
2.1.7 <i>pH-Eichung</i>	44
2.1.7.1 <i>Versuchsablauf der pH-Eichung und Superfusionsmedien</i>	44
2.1.7.1.1 <i>Kontrolllösung der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik</i>	46
2.1.7.1.2 <i>Nigericin Lösungen</i>	46
2.2 <i>Kultur von kardialen Fibroblasten</i>	47
2.2.1 <i>Explantmethode</i>	47
2.2.1.1 <i>Prinzip der Explantmethode</i>	47
2.2.1.1 <i>Anwendung der Explantmethode</i>	47
2.2.2 <i>Passagieren von Zellkulturen</i>	48
2.2.3 <i>Zellselektion durch „Differential attachment“</i>	49
2.2.4 <i>Kulturmedium und Kulturbedingungen</i>	49

	Inhalt
2.2.5 Identifizierung von Zellen	51
2.2.5.1 Morphologie und Wachstumsverhalten	51
2.2.5.2 Immunhistochemie	53
2.2.5.2.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	53
2.2.5.2.2 Immunhistochemische Färbung	57
2.2.5.2.3 Ansatz der Antikörper	57
2.3 Kultur einer Zelllinie aus Phäochromozytomzellen	58
2.3.1 Phäochromozytom	58
2.3.2 Kultur von Phäochromozytomzellen	58
2.3.3 Kulturmedium und Kulturbedingungen	59
2.3.4 Beschichtung mit Kollagen S	61
2.3.5 Beschichtung mit Poly-L-Lysin	61
2.3.6 Fluoreszenzphotometrische pH-Messungen in PC12-Zellen	61
2.4 Statistische Analysen	63
3. Ergebnisse	64
4. Diskussion	82
4.1 Ammoniumchlorid-Impuls-Technik	82
4.2 Hemmung mit DIDS und Moxonidin	89
4.3 Aktivierung von Ionentransportern durch AVP und Angiotensin	93
4.4 Änderungen im basalen pH	96
4.5 Weitere Hemmer von Anionenaustauschern	98
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturnachweis	104
Lebenslauf	114
Verzeichnis der akademischen Lehrer	115
Danksagung	116

1. Einleitung

1.1 Ionentransportmechanismen

Die Regulation von intra- und extrazellulären Ionenaktivitäten ist von zentraler Bedeutung für die Funktion von Zentralnervensystem, Verdauungstrakt, Atmungstrakt und Harntrakt (1). Sowohl das kardiale Erregungsbildungs- und -leitungssystem, als auch kontraktile Muskelsysteme wie Herz, Skelettmuskulatur und glatte Muskulatur benötigen eine genaue Regulation von intra- und extrazellulären Ionenaktivitäten. Ein aktiver Transport von Ionen durch ATPase-gekoppelte Pumpen bewahrt Ionengradienten und hilft Ionenkanälen beim Einstellen des Membranpotentials. Ionentransporter gebrauchen ein oder mehrere Elemente von elektrochemischen Gradienten an Membranen, um spezifisch Ionen und Nährstoffe zwischen zellulären Kompartimenten zu bewegen (1). Die pharmakologische Beeinflussung von Ionentransportmechanismen ermöglicht es, verschiedene pathologische Zustände therapeutisch zu beeinflussen.

1.2 Ionentransporter als etablierte therapeutische Angriffspunkte

1.2.1 Natrium-abhängige Ionentransporter der Niere und Diuretika

In der Behandlung der arteriellen Hypertonie werden Pharmaka verwendet, die Na^+ -abhängige Ionentransportmechanismen der Niere beeinflussen. Genutzt wird hier eine pharmakologische Hemmung des Na^+/Cl^- -Kotransporters im frühdistalen Tubulus, des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters der Henleschen Schleife und der Na^+ -Kanäle bzw. des Na^+/H^+ -Austauschers NHE im distalen Tubulus. Auch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im distalen Tubulus und in den Sammelrohren kann pharmakologisch gehemmt werden. Hierdurch wird jeweils der Fluss von Natrium vom Tubuluslumen in die Zelle und damit der erste Schritt der Natriumrückresorption unterbunden. Es resultieren Natriuresis und konsekutiv Diuresis. Für die Behandlung der arteriellen Hypertonie bedeutet dies eine Minderung der Hypervolämie und eine Senkung der kardialen Vorlast.

1.2.2 Na^+/Cl^- -Kotransporter und Thiaziddiuretika

Der Na^+/Cl^- -Kotransporter vermittelt die Bewegung von Natrium und Chlorid im Symport vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle. Lokalisiert ist dieser Transport im frühdistalen Tubulus. Die treibende Kraft ist der Gradient des Natriums vom Tubuluslumen zum Zytoplasma der Tubuluszelle. Da die Konzentration von Natrium im Bereich des distalen Tubulus im Nierenparenchym höher als im Tubuluslumen ist, geschieht der Weitertransport von der Tubuluszelle ins Interstitium durch eine Na^+/K^+ -ATPase. Bekannte Hemmsubstanzen des Na^+/Cl^- -Kotransporters sind die jeweiligen Varianten der Thiazide (2).

1.2.3 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ - Kotransporter und Schleifendiuretika

Die Funktionsweise des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ - Kotransporters entspricht der des Na^+/Cl^- -Kotransporters. Auch hier werden Natrium und Chlorid vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle transportiert. Zusätzlich zu NaCl werden im Symport noch ein K^+ - und ein Cl^- -Ion in die Zelle transportiert. Lokalisiert ist dieser Transport im Bereich des aufsteigenden Teils der Henle-Schleife. Die treibende Kraft ist auch hier der Gradient des Natriums vom Tubuluslumen zum Zytoplasma der Tubuluszelle. Ebenso erfolgt der Weitertransport des Natriums aus der Zelle ins hyperosmolare Interstitium über Na^+/K^+ -ATPasen. Als Hemmstoffe des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ - Kotransporters sind die Schleifendiuretika im Gebrauch, von denen das Furosemid in der Praxis die bekannteste Substanz ist. Die Hemmung des Kotransporters bewirkt eine erhöhte Natriumkonzentration des Urins, die jedoch im distalen Tubulus wieder durch den Na^+/Cl^- -Kotransport, also durch Resorption von Natrium, vermindert wird. Letztlich wird ein plasmaisotoner bis hypotoner Harn unter Furosemidanwendung ausgeschieden (2).

1.2.4 Na^+/H^+ - Austausch (NHE), Na^+ -Kanäle und Amilorid / HOE694

Im distalen Tubulus vermitteln Natriumkanäle und der gradientgetriebene Na^+/H^+ -Austauscher NHE den Strom von Natrium vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle. Auch hier ist wieder der Gradient von Natrium die treibende Kraft. Während im Falle von Natrium-Ionenkanälen ein bezüglich des Ionentyps monovalenter Fluss von Na^+ möglich ist, transportiert NHE Natrium in die Zelle hinein und im Gegenzug Protonen aus der Zelle heraus. Beide Mechanismen werden von Amilorid gehemmt, welches als kaliumsparendes Diuretikum im

klinischen Gebrauch etabliert ist. Im Falle des Amilorids liegt der kaliumsparende Effekt darin begründet, dass primär die Rückresorption von Na^+ gehemmt wird. Dadurch wird das lumennegative transepitheliale Potential weniger negativ, also schwächer, sodass sekundär die spannungsabhängige Sekretion von K^+ in Tubuluslumen vermindert wird (2).

Eine dem Amilorid verwandte und experimental etablierte Hemmsubstanz des Na^+/H^+ -Austauschers ist HOE694, welche eine hohe Affinität zur kardialen Isoform des NHE zeigt (3). Dies ist insofern von Bedeutung, dass Untersuchungen bereits 1992 eine kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von Inhibitoren des Na^+/H^+ -Austauschers gezeigt haben (4). So verminderten Amilorid und das Analogon EIPA im Tierversuch Reperfusionsarrhythmien nach kardialer Ischämie mit anschließender Reperfusion (4). EIPA konnte sogar in Experimenten mit Ratten- und Hasen-Herzen die Größe von Myokardinfarkten reduzieren (5-8). HOE694 zeigte insgesamt eine dem EIPA vergleichbare Wirkung als Hemmer des Na^+/H^+ -Austauschers (9). Unter experimentalen Bedingungen konnte HOE694 ein Kammerflimmern nach Ischämie mit nachfolgender Reperfusion nahezu verhindern. Auch myokardiale Marker für zelluläre Läsionen wie die Laktatdehydrogenase LDH und Creatinkinase CK konnten unter HOE694-Anwendung gesenkt werden (9). Ähnliche Effekte zeigte auch der als „Cariporide“ bekannt gewordene NHE-Inhibitor HOE642. Dieser besitzt eine besonders hohe Selektivität für die kardiale Isoform des Na^+/H^+ -Austauschers NHE 1 (10).

Als Wirkprinzip der NHE-Inhibitoren wird diskutiert, dass durch die Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers ein Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration mit nachfolgender Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} vermieden wird (11). Aktuelle klinische Studien wie „GUARDIAN“ und „ESCAMI“ erbrachten widersprüchliche Daten bezüglich des klinischen Nutzens (11). Diese sollen klären, ob therapeutische Anwendungen im Bereich der Herzchirurgie von Vorteil sind. Vorklinische Untersuchungen suchen nach einem Nutzen der NHE-Inhibitoren in der Behandlung anderer kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz (11).

1.2.5 Na⁺/K⁺-ATPase und Aldosteronantagonisten

Das Hormon Aldosteron wirkt im spätdistalen Tubulus und den Sammelrohren, wo es die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase steigert. Diese pumpt unter Energieverbrauch Natrium aus dem Tubuluslumen in die Zelle und Kalium aus der Zelle in das Tubuluslumen. Dieser aktive Prozess ist unabhängig vom jeweiligen Ionengradienten. Eine Minderung der Aktivität dieser Pumpe kann pharmakologisch durch den Einsatz von Spironolacton herbeigeführt werden. Es handelt sich hierbei um einen Aldosteronantagonisten, der das Angreifen des Hormons am zytoplasmatischen Mineralokortikoidrezeptor kompetitiv hemmt. Die Wirkung erreicht erst nach 3-5 Tagen ihr Maximum, da die durch Aldosteron induzierten Proteine erst abgebaut werden müssen (2, 12).

1.2.6 Protonenpumpe des Magens und Säuresekreteionshemmer

Bei der Behandlung der bakteriellen Gastritis durch *Helicobacter Pylori* und der Refluxösophagitis ist ein wesentliches Therapieziel die Verminderung der gastralen Säuresekretion. Diese wird über die H⁺/K⁺-ATPase vermittelt, welche Protonen gegen ein Konzentrationsgefälle in das Magenlumen pumpt. Die Aktivität dieser Protonenpumpe ist komplex reguliert, wobei im Rahmen der neurohumoralen Steuerung dem cholinergen Nervensystem und dem Histamin zentrale Bedeutung zukommt. Durch anticholinerge Substanzen und Histamin-Rezeptor-Blocker kann die Aktivität der H⁺/K⁺-ATPase pharmakologisch reduziert werden. Zur vollständigen Inaktivierung der Protonenpumpe steht eine Substanzgruppe zur Verfügung, welche das Ionentransportprotein durch kovalente Bindung irreversibel inaktiviert. Es handelt sich hierbei um die gut bekannte Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren (PPI), deren ursprünglicher Vertreter das Omeprazol ist (2).

1.3 Ionentransporter ohne bisher etablierte therapeutische Nutzung

1.3.1 Bikarbonat-Transporter-Superfamilie, BTS

Eine wesentliche Gruppe von gradientengetriebenen Ionentransportern wird in jüngster Zeit als Bikarbonat-Transporter-Superfamilie, BTS, beschrieben (1). Gemeinsames Element dieser Transporterfamilie ist die Vermittlung des Bikarbonatflusses in und aus der Zelle und damit eine Beteiligung dieser Proteine an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Zwar unterscheiden sich diese Transporter hinsichtlich der Flussrichtung des Bikarbonats von intra- nach extrazellulär und den damit verbundenen Flüssen anderer Ionen, jedoch zeigt die Primärstruktur der Bikarbonat-Transporter sehr große Übereinstimmungen (1, 13). Zur Beeinflussung der Aktivität der Mitglieder dieser Superfamilie sind gegenwärtig noch keine Pharmaka im klinischen Gebrauch, allerdings ist die funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Bikarbonat-Transporter Gegenstand der aktuellen Forschung.

Möglicherweise bieten diese Transportproteine neue erfolgversprechende Ansatzpunkte für therapeutische Anwendungen. Denn die Regulation von intra- und extrazellulären Ionenaktivitäten wie die von H^+ , Cl^- oder Na^+ ist ein Schlüssel zur normalen Funktion von vielen biologischen Systemen wie dem Zentralnervensystem, dem Verdauungstrakt, dem Respirationstrakt und dem Harnsystem (1). So ist der intrazelluläre pH ein wichtiger Regulator für eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z.B. metabolischen Reaktionswegen, Kalziumhomöostase, Zellkontraktilität, Zellerregbarkeit (14), Genexpression (15) und Zelltod (16, 17). Die Verteilung eines jeden Prozesses variiert mit dem Zelltyp, den metabolischen Erfordernissen der jeweiligen Zelle und den lokalen Umgebungbedingungen (18). Muskelzellen produzieren beispielsweise in Perioden gesteigerten Energiebedarfs oder unter Ischämie-Bedingungen große Mengen Milchsäure (19). Unter solchen Umständen verhindern pH-Regulationsprozesse eine laktisch bedingte Säureanhäufung (18).

CO_2 und HCO_3^- stellen das wichtigste pH-Puffer-System in biologischen Flüssigkeiten dar. HCO_3^- ist ein Anion, welches neben CO_2 -Gas in Lösung existiert. Die Reaktion $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ ist vollständig reversibel und wird in biologischen Systemen durch die Familie der Carboanhydrase-Enzyme zur schnellen Einstellung des Gleichgewichtes katalysiert (13). Dement-

sprechend wichtig sind die Mitglieder der Bikarbonat-Transporter, die häufig Haupt-pH-Regulatoren in tierischen Zellen und damit entscheidend für Säure-Base-Bewegungen sind (13).

1.3.2 Mitglieder der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie

Im Jahre 1988 wurde ein natriumunabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch, welcher als „acid-loader“ fungierte, und ein natriumabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transport, der als „base-loader“ fungierte, beschrieben. Eine Familie von verschiedenen jedoch eng verwandten Antiporter-Molekülen wurde damals vermutet (20). Heute sind diese funktionell charakterisiert und kloniert (Abb. 1).

Das älteste Mitglied der BTS stellt der Anionen-Austauscher AE dar. Dieser $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher transportiert gradientabhängig HCO_3^- aus der Zelle heraus und Cl^- in die Zelle hinein. Erstmals wurde die Isoform AE1, welche ursprünglich als „Bande 3-Protein“ des Erythrozyten bekannt wurde, im Jahre 1985 kloniert (21). 1997 folgte die Klonierung und Charakterisierung des Natrium-Bikarbonat-Kotransporters NBC aus Tubuluszellen der Niere (22), welcher gradientabhängig Na^+ und HCO_3^- im Symport aus der Tubuluszelle heraus transportiert, wobei hier erwähnt werden muss, dass die Flussrichtung nach intra- bzw. extrazellulär mit dem Zelltyp variiert. Die Klonierung dieses elektrogeneren $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters ergab eine große Übereinstimmung der Primärstruktur von AE und NBC, was zum Begriff der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie führte (13, 22, 23). Hinweise für weitere Varianten von Anionen-Transportern existieren (1). Hierbei ist besonders der funktionelle Nachweis des noch nicht klonierten Cl^-/OH^- -Austauschers CHE (Chlorid-hydroxyl-exchanger) zu nennen, welcher OH^- an Stelle von HCO_3^- nach extrazellulär und Cl^- nach intrazellulär transportiert (3). Das gegenwärtig jüngste und im Jahr 2000 klonierte und charakterisierte Mitglied der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie stellt der natriumabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, NDAE 1 (Na⁺-driven anion exchanger 1) dar (1). Er transportiert in „vorwärts“ gerichteter Flussrichtung gradientabhängig Na^+ und HCO_3^- im Symport nach intrazellulär, im Antiport dagegen Chlorid und möglicherweise Protonen nach extrazellulär (1).

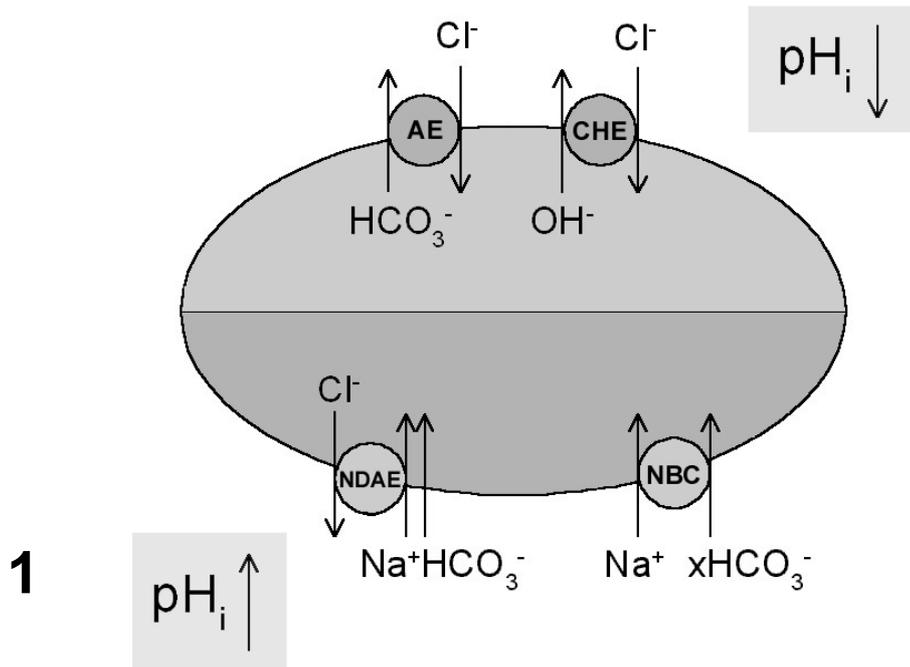


Abb. 1 Schematische Übersicht über die gegenwärtig bekannten Mitglieder der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie. Dargestellt ist die vorwärtsgerichtete Funktionsweise der Transporter, welche sich auch umkehren kann. Im oberen Bildteil finden sich säurebeladende Ionentransporter, die entsprechend einen Abfall des intrazellulären pH bewirken. Den intrazellulären pH anhebende, also säureelimierende Ionentransporter sind im unteren Bildteil dargestellt. Nähere Beschreibungen der einzelnen Mitglieder der BTS finden sich im Text.

1.3.2.1 Natriumabhängiger Cl/HCO_3^- -Austauscher NDAE1

Im Jahre 2000 erfolgte die Klonierung und Charakterisierung eines Na^+ -gekoppelten Cl/HCO_3^- -Austauschers, dem NDAE1 (N a^+ -driven anion exchanger 1), der ein physiologisch einzigartiges neues Mitglied der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie darstellt (1)(Abb. 2). In *Drosophila* kodiert die cDNA ein 1030 Aminosäuren langes Membranprotein mit einer Sequenz-Homologie von 32% zu AEs und von 43% zu NBCs. Auch die Topologie dieser Proteine ist ähnlich. Das Membranprotein NDAE1 vermittelt den Transport von Cl^- , Na^+ , H^+ und HCO_3^- , welcher durch den Inhibitor DIDS mit Dosen von 200 $\mu\text{mol/l}$ vollständig blockiert wird und möglicherweise nicht streng elektroneutral ist (1). NDAE1 transportiert Na^+ und HCO_3^- im Symport nach intrazellulär und im Austausch Cl^- und H^+ nach extrazellulär (1). Deshalb fungiert NDAE letztlich als ein

„acid extruder“, der sich jedoch von NBC-Klonen unterscheidet, da NBCs weder Cl^- -abhängig sind noch Cl^- transportieren (1). Der „vorwärts“ gerichtete Ionenfluss lässt sich durch Entzug von extrazellulärem Na^+ umkehren, sodass NDAE unter diesen Bedingungen als „acid loader“ arbeitet (1).

In Fibroblasten (24), Neuronen (25-27), Mesangiumzellen der Niere und renalen Tubuluszellen (28, 29) wurde bereits funktionell ein natrium-abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch identifiziert (1). Es erscheint wahrscheinlich, dass NDAE1 die Drosophila-Form ist, welche für diesen Transport verantwortlich ist (1).

Bezüglich der Regulierung der Transporteraktivität ist von Bedeutung, dass in Mesangiumzellen Substanzen wie Angiotensin II, Serotonin und Vasopressin, sowie Epidermal Growth Factor und PDF die Ionentransportaktivität einschließlich des natriumabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschs stimulieren (29). Möglicherweise ist dies von pathophysiologischer Bedeutung, da Angiotensin II, Serotonin und Vasopressin auch als lokale Wachstumsfaktoren wirken (30).

Neuere Untersuchungen bewerten den elektroneutralen Na^+ -getriebenen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher als einen Schlüsselmechanismus der intrazellulären pH-Regulation in Neuronen, Glia und anderen Zellen (31). Ein weiterer derartiger Transportertyp wurde im Jahr 2001 kloniert, charakterisiert und als NDCBE1 (N $^+$ -driven-chloride-bicarbonate-exchanger) benannt. Er kommt im humanen Gehirn vor und ist 1044 Aminosäuren lang. Zu 34% ist seine Struktur identisch mit Säuger-AE2 und zu rund 50% mit dem elektrogenen NBC von Ratte und Mensch. Während zum elektroneutralen NBC von Säugetieren eine Übereinstimmung von 73% besteht, stimmt die Struktur zu 47% mit NDAE1 von Drosophila überein. Der Ionentransport ist elektroneutral und vermittelt Anstiege des intrazellulären pH und des intrazellulären Na^+ , ist abhängig von HCO_3^- und wird durch DIDS blockiert. Die Anhebung des intrazellulären pH benötigt extrazelluläres Na^+ , wobei das Verhältnis von $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ im Symport 1:2 beträgt (31).

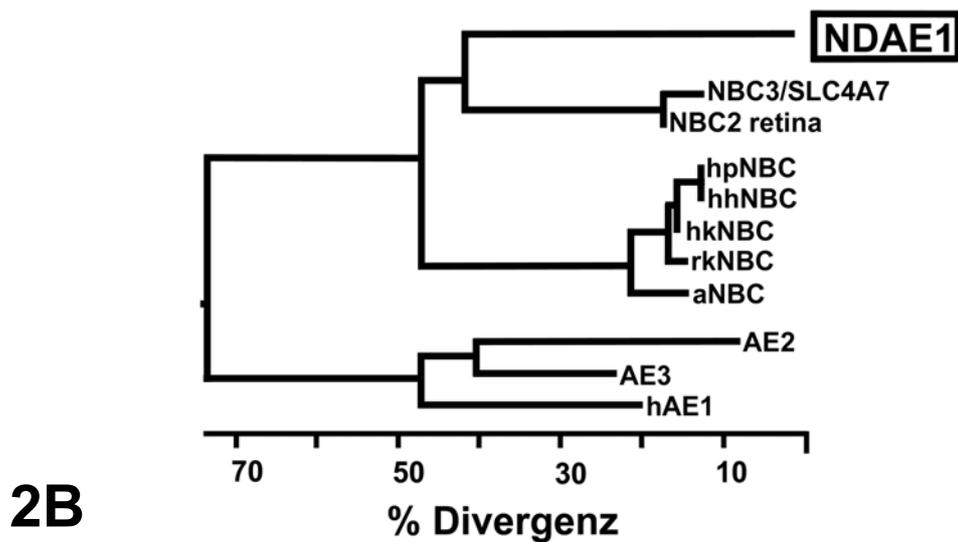
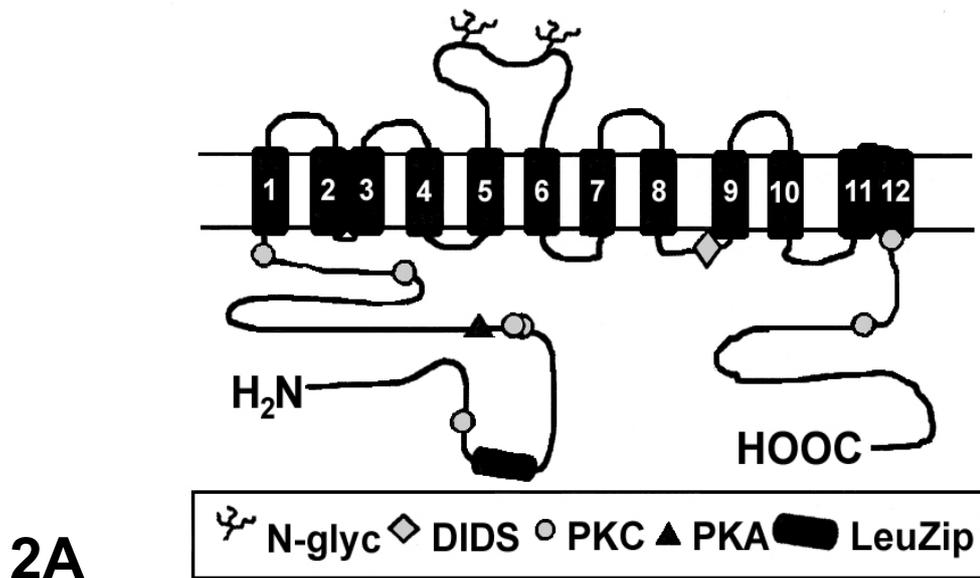


Abb. 2 NDAE1 als Mitglied der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie. **A** Membranmodell des NDAE1-Proteins. **B** das Dendrogramm zeigt die prozentuale Abweichung der Aminosäuresequenz der ausgewählten Mitglieder der Superfamilie (NDAE1, NBC-Typen und AE-Typen) (1). Die vollständige Länge der horizontalen Liniensegmente eines Labels, z.B. AE1, zu einem anderen zeigt die prozentuale Divergenz an (23). Auf diese Weise entspricht ein niedriger Prozentwert höherer Verwandtschaft, ein höherer Prozentwert niedriger Verwandtschaft.

1.3.2.2 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC

Seit der Klonierung von NBC spricht man von der Familie der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie, zu der im engeren Sinne NBC und AE gerechnet wurden, was darin begründet lag, dass der von Romero und Boron 1997 erstmals klonierte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC eine Übereinstimmung von 30 bis 35% zu AE1, AE2 und AE3 zeigt (13, 22) (Abb. 3). Aus funktioneller Sicht umfasste die Familie der BTS $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter mit verschiedenen Stöchiometrien, einen $\text{K}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter und Na^+ -getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (13, 22), wobei außer dem $\text{K}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter fast alle Mitglieder der funktionellen Familie durch DIDS blockierbar sind (13).

Während in sekretorischen Epithelien wie den Pankreasgang-Zellen NBC für den Transport von HCO_3^- aus dem Blut in die Zelle zur späteren apikalen Sekretion verantwortlich ist, vermittelt NBC in reabsorptiven Epithelien wie in proximalen Tubuluszellen der Niere dagegen den Transport von HCO_3^- aus der Zelle ins Blut (32). In nichtepithelialen Zellen ist NBC hauptsächlich an der Regulation des intrazellulären pH beteiligt. Bisher wurden vier Isoformen identifiziert, NBC1,2,3 und 4 und weitere NBC-verwandte Proteine wie z.B. der oben beschriebene NCBE (32). NBC1 zeigt ein limitiertes Gewebsverteilungsmuster, ist elektrogen und spielt eine wichtige Rolle in der HCO_3^- -Reabsorption im proximalen Tubulus der Niere. Außerdem wird NBC1 in Zellen des Ductus pancreaticus exprimiert, wo er durch den Chloridkanal CFTR aktiviert wird, und spielt eine wichtige Rolle in der HCO_3^- -Sekretion. NBC2 und NBC3 haben eine weiterreichende Gewebsverteilung als NBC1, sind elektroneutral und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrazellulären pH. Die Charakterisierung von NBC4 ist gegenwärtig noch unvollständig (32).

Bis zum Zeitpunkt der Klonierung von NBC lagen lediglich für $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, AEs, Informationen zur molekularen Struktur vor, da deren cDNA einige Jahre zuvor kloniert wurde (13). Nach Klonierung des elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters NBC der Niere (22) folgten vielfältige funktionelle und molekulare Informationen über die jeweiligen NBC-Formen:

Während der renale NBC aus 1035 Aminosäuren besteht (22), ist der prostatistische (13) sowie der pankreatische NBC 1079 Aminosäuren lang (13, 33). Der NBC3 in Herz- und Skelett-Muskelgewebe hat 1214 Aminosäuren in 12

membranären Domänen. Der renale NBC umfasst dagegen nur 10 transmembranäre Domänen und ist wahrscheinlich ähnlich wie AE gefaltet. Beide Enden, das N-terminale und C-terminale, sind intrazellulär lokalisiert. Lysin-Reste, welche als DIDS-Reaktionsstellen angesehen werden, sind konserviert, was eine Gemeinsamkeit von AE und NBC darstellt (13). Darüber hinaus existiert ein molekulares Charakteristikum der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie, das aus einer Signatur-Sequenz ähnlicher Aminosäure-Sequenzen der BTS besteht (13). So haben die beiden seit 1999 bekannten NBC-Klone C-terminal die originale AE-Konsensus-Sequenz (13).

Für den renalen NBC, der in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert ist, wurde von Romero et al. gezeigt, dass er elektrogen ist. Darüber hinaus ist er unabhängig von Cl^- , abhängig von Na^+ und HCO_3^- und wird durch den Inhibitor DIDS in Dosen von $200 \mu\text{mol/l}$ blockiert (13, 22). Die reguläre Flussrichtung dieses NBC im proximalen Tubulus ist auswärtsgerichtet, so dass er eine intrazelluläre Ansäuerung und Depolarisierung bewirkt, da Na^+ und HCO_3^- die Zelle im Verhältnis 1:3 verlassen (13, 22). Unter den Versuchsbedingungen von Romero und Boron ist die Laufrichtung des Ionentransporters umkehrbar und wird durch extrazellulären Entzug von Na^+ in die genannte Auswärtsrichtung gezwungen (13, 22).

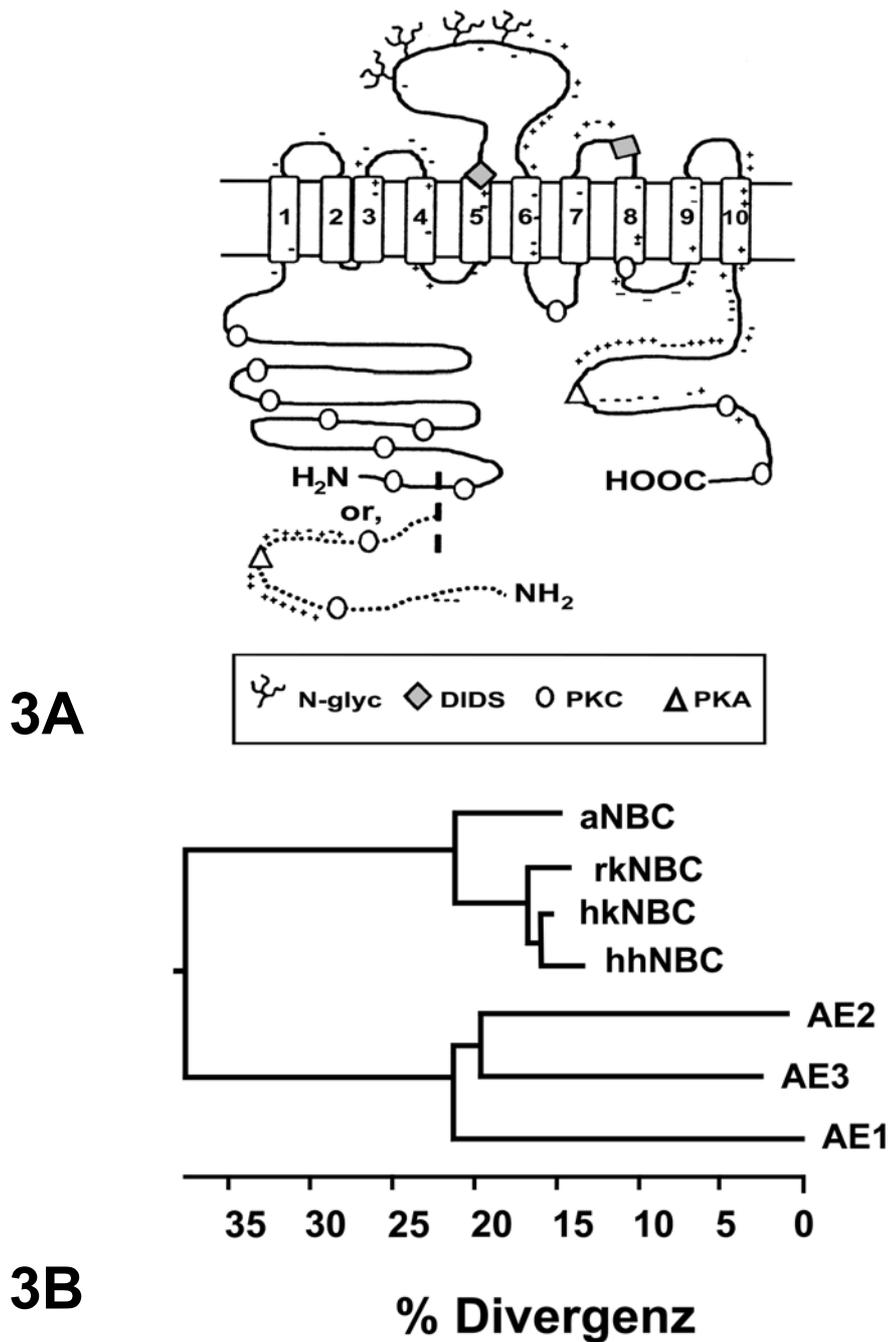


Abb. 3 NBC als Mitglied der Bikarbonat-Transporter-Superfamilie. **A** Membranmodell des elektrogenen NBC-Proteins, die Raute markiert die DIDS-Bindungsstelle, **B** das Dendrogramm zeigt die prozentuale Abweichung der Aminosäuresequenz der ausgewählten Mitglieder der Superfamilie (NBC-Typen und AE-Typen) (13). Die mathematische Definition der Divergenz findet sich in (22). Die vollständige Länge der horizontalen Liniensegmente eines Labels, z.B. AE1, zu einem anderen zeigt die prozentuale Divergenz an (23). Auf diese Weise entspricht ein niedriger Prozentwert höherer Verwandtschaft, ein höherer Prozentwert niedriger Verwandtschaft.

Unterschiede unter den NBC-Formen ergeben sich hinsichtlich der Stöchiometrie für die transportierten Ionen. Diese liegt im Verhältnis von Na^+ zu HCO_3^- bei 3:1, 2:1 oder 1:1 (33). Der renale Kotransporter in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus vermittelt den Efflux von Na^+ und HCO_3^- im Verhältnis 1:3 (13). Andere NBC-Isoformen sind entweder elektrogen oder elektroneutral und vermitteln netto einen Na^+ -gekoppelten HCO_3^- -Influx, wirken also in einem säureausschleusenden Modus. Die Stöchiometrie ist dabei weniger als 1:3, also 1:2 oder 1:1. Kotransporter mit einer Stöchiometrie von 1:2 werden in Glia, Astrozyten, Leber, Pankreas, Colon und Gl. Parotis gefunden. Vaughan-Jones zeigte in Säugetier-Herzen Kotransporter mit einer 1:1-Stöchiometrie (13, 34, 35).

Während fast alle Mitglieder der BTS durch DIDS hemmbar sind (13), wurde für NBC3 eine Insensitivität für die Hemmung durch DIDS beschrieben (18). Diese Isoform wurde durch 1 mmol/l DIDS nichtsignifikant, dagegen durch 0,05 mmol/l EIPA komplett gehemmt (18). Funktionelle Unterschiede, die in verschiedenen Skelettmuskel-, Glattmuskel- und Kardiozyten-Präparationen berichtet wurden, legen nahe, dass verschiedene Transporter existieren, die sich in ihren funktionellen Eigenschaften und in der Sensitivität für Inhibitoren unterscheiden (18). Die Sensitivität von NBC für DIDS wird an anderer Stelle dadurch belegt, dass die pankreatische NBC-Form durch 0,3 mmol/l DIDS hemmbar ist und 0,01 mmol/l EIPA keinen Effekt hat (33).

Die Regulierung der Transporter-Aktivität ist teilweise bekannt. So kann die NBC-Aktivität über Proteinkinase-A-Signalwege moduliert werden (13). Angiotensin II stimuliert den Kotransporter über Hemmung des PKA-Signalwegs, denn die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in die Zelle ist nach Stimulation mit Angiotensin II (36) und Endothelin (37) wegen des stimulierten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransports erhöht. Dagegen bewirkt die direkte Aktivierung der PKA eine Hemmung des Kotransports (38). Im Pankreas stimulieren sowohl Sekretin, als auch Forskolin die pankreatische HCO_3^- -Sekretion (13, 39).

Für Proteinkinase C und Casein-Kinase-II existieren am NBC-Molekül mehrere Phosphorylierungsstellen. Auch eine oder zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen werden vermutet. Zwar ist der Signalweg derzeit unbekannt, jedoch vermindert Noradrenalin die Aktivität von NBC (40, 41).

1.3.2.3 Natrium-unabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher AE

Das älteste bekannte Mitglied der BTS, der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher AE, erstmalig bekannt geworden als Bande 3-Protein, kommt in vielen Zelltypen und Geweben vor (42), was sowohl auf immunologischer (43, 44) wie auf gentechnologischer Ebene (45) nachgewiesen worden ist. In diesem weiten Spektrum von Zelltypen dienen Anionenaustauscher des AE-Typs einer Vielzahl von Funktionen.

Neben der Regulierung des intrazellulären pH über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch üben AEs verschiedene zelluläre Funktionen aus. So generiert AE ein „senescent antigen“, einen Marker für den Zellersatz durch das Immunsystem (46). Auch die Verankerung des Zytoskeletts an der Membran ist eine der Funktionen von AE (47). AE1 trägt auf diese Weise zur Flexibilität des Erythrozyten-Zytoskeletts und damit zur Zellgestalt (48) bei. So besitzt AE1 im Erythrozyten zwei wichtige Strukturdomänen, welche den voneinander unabhängigen Funktionen der Zellstabilität einerseits und der pH-Regulierung andererseits dienen. Während die N-terminale zytoplasmatische Domäne das Spectrin-Actin-Zytoskelett an der Plasmamembran durch seine Bindungsinteraktionen mit Ankyrin, Protein 4.1 und Protein 4.2 befestigt (49), vermittelt die C-terminale in die Membran eingebundene Domäne den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch (50). Dieser erythrozytäre Anionen-Austausch dient dazu, die Kapazität des Zytoplasmas für den CO_2 -Transport durch den Austausch von extrazellulärem Cl^- gegen intrazelluläres HCO_3^- , welches aus der intrazellulären Carboanhydrase-Reaktion generiert wird, zu steigern (51). Die gesamte CO_2 -Transportkapazität des Blutes wird hierdurch um das fünffache gesteigert (50). In der Physiologie ist dieses CO_2 -Transportsystem des Blutes als „Hamburger Shift“ bekannt (52).

In nicht-erythrozytären Zellen dienen AEs im Zusammenspiel mit anderen Transportsystemen der Regulierung des zellulären pH, des Zellvolumens und des zellulären Chloridgehalts (49). Ionen-Konzentrationsgradienten über Plasmamembranen treiben den Austausch von intrazellulärem HCO_3^- für extrazelluläres Cl^- an, wodurch intrazelluläre pH-Veränderungen entstehen (49). Studien über die Ionen-Austausch-Kinetik zeigen, dass der Modus der Bande 3-Aktion sich von der der Ionen-Kanäle unterscheidet und eine vorhergehende Substrat-Bindung und nachfolgende Substrat-Translokation einschließt (42). Dieser Vorgang kann als eine Art Ping-Pong-Mechanismus erklärt werden, bei

dem eine einzelne Transportstelle sich entweder zur Innen- oder Außenseite der Membran stellt (53).

Über die Regulierung des intrazellulären pH hinaus beeinflusst AE den Zellstoffwechsel (47), denn AE1 reguliert die Glykolyse in Erythrozyten durch Bindung und Hemmung von Aldolase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphofruktokinase (54). Nach Harrison et al. sollen die an Bande 3 gebundenen Glykolyseenzyme gehemmt sein, wobei die Bindung durch Tyrosin-abhängige Phosphorylierung des Bande 3-Proteins gelöst und damit die Glykolyse aktiviert werden kann (54).

In Zellen von Vertebraten ist der Anionen-Austausch eine nahezu ubiquitäre Funktion (49). Während die meisten Zellen verschiedene AE-Isoformen exprimieren, kommen auch innerhalb des selben Zelltyps multiple Gen- und Proteinmuster von AE vor (47). Kodiert wird die AE-Familie von drei Genen, AE1, AE2 und AE3 (47, 49), welche auf verschiedenen Chromosomen liegen, nämlich den Chromosomen 2, 7 und 17 (55).

Das AE1-Gen wird in der Milz exprimiert und kodiert weiterhin das erythrozytäre Bande 3-Protein (47). Die in der Niere vorkommende AE1-Isoform (kAE1) ist eine beschnittene Form des erythrozytären AE1 (eAE1) (56, 57) und ist in der basolateralen Membran von säuresezernierenden Tubuluszellen der Niere lokalisiert (58). Insgesamt ist das Vorkommen des erythrozytären Bande 3-Proteins in der Niere, den Testes, im Herzen, der Leber und im Gastrointestinal-Trakt beschrieben (57).

Die Isoform AE2 wird dagegen in den meisten Gewebearten exprimiert (59). AE2 kommt in epithelialen wie nicht epithelialen Geweben vor (58).

AE3 kommt überwiegend in erregbaren Geweben vor, wie in Neuronen und Muskelgewebe (58), allerdings ist AE3 außer im Herzen auch in Testes, Lunge und Niere (57) sowie im Gehirn (51) beschrieben worden. Als bAE3 ist die Isoform im Gehirn (51) und als cAE3 die Isoform im Herzen (55, 60, 61) bezeichnet worden. Erwähnt werden sollen Hinweise für das gleichzeitige Vorkommen der Isoformen. So findet sich in isolierten Kardiozyten die Expression von AE1 und cAE3 (61, 62).

Untereinander teilen die drei bisher genannten Isoformen eine Sequenzhomologie von 65% im Bereich der membranassoziierten Transportdomänen,

wohingegen die zytoplasmatischen Anteile stärker divergieren (49), was durch alternatives Splicing der jeweiligen Genprodukte erklärt wird (47).

Eine in jüngster Zeit klonierte Isoform des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers ist AE4. Dieses im Jahre 2001 untersuchte Mitglied der AE-Familie ist 104 kDA schwer und kommt hauptsächlich in der Niere vor. Dort vermittelt AE4 den Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch (63) und ist in der apikalen Membran bestimmter Tubuluszellen („beta-intercalated cells“) lokalisiert (64). AE4 zeigt eine 30%-ige Homologie mit AE1-3 und ist insensitive für die Hemmung durch DIDS (64).

Der Gleichgewichts- pH_i für AE und den unten beschriebenen Ionen-transporter CHE liegt bei etwa 6,7 (65). Oberhalb dieses pH-Wertes fungieren diese als Säure-beladende Transporter (66). Stark aktiviert wird der Na^+ -unabhängige Anionen-Antiport durch einen alkalischen pH_i (67-69). Allerdings ist in verschiedenen Zelllinien die Austauschrate in unterschiedlichem Maße abhängig vom intrazellulären pH. Zwar war in manchen Zelllinien die Aktivität bei hohem pH_i hoch und dementsprechend niedrig bei niedrigem pH_i , jedoch veränderte sich die Antiportrate in anderen Zelllinien nur unwesentlich mit Veränderungen des pH_i (20). Für in Oozyten exprimierte Isoformen von AE wurden unterschiedliche Aktivitäten nachgewiesen: cAE3 oder bAE3 zeigten gerade einen 2-fach aktiveren Transport gegenüber den Kontrollen (55). Unter den selben experimentellen Bedingungen war dagegen der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch von AE1 und AE2 um das 10- bis 20-fache größer als in den Kontrollen (70). Auch für AE-Formen in verschiedenen Zelltypen soll es jeweils charakteristische Profile hinsichtlich des pH_i -Setpoints, der halbmaximalen und maximalen Austauschaktivität und der Hormonansprechbarkeit geben (49).

In Mesangium-Zellen der Niere aktiviert ein einzelnes Hormon, Arginin-Vasopressin (AVP), gleichzeitig den Na^+/H^+ -Austauscher NHE, den Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transport und den Na^+ -unabhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter AE (29). Eine ähnliche Simultanaktivierung von NHE und AE findet sich in Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife, welche einer hypertonen Umgebung ausgesetzt sind. Um zu überleben, müssen diese Zellen Mechanismen besitzen, welche ein Schrumpfen verhindern bzw. das Zellvolumen wiederherstellen. Dieses wird als regulatorische Volumenzunahme, RVI „regulatory volume increase“- bezeichnet (71). Diese Volumenzunahme

soll möglicherweise durch die gleichzeitige Aktivierung von NHE und AE vermittelt sein (71). Eine Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers NHE in Tubuluszellen durch einen osmotischen Hypertonus (71, 72) und AVP (73) wurde in der Literatur beschrieben.

In einer Osteoblasten-Zelllinie konnte der Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch aktivieren (74). Ferner sind aktivierende Effekte auf AE durch Substanzen wie Cholecystokinin (75) und TPA (76) beschrieben. Eine hemmende Wirkung wurde für Isoproterenol beobachtet (77). Zyklisches AMP hatte dagegen entweder eine stimulierende (78) oder hemmende (77) Wirkung auf den Anionenaustausch. Serum konnte den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch stark aktivieren, während es den Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch hemmte, wobei beide Wirkungen durch Proteinkinase C vermittelt sein sollen (76).

Im Herzen wird die AE-Aktivität über β -adrenerge Agonisten (79), purinerge Agonisten (80) und Angiotensin II (81, 82) stimuliert. Dabei ist die purinerge Aktivierung der Anionen-Austausch-Aktivität in Kardiozyten durch Tyrosinkinase-Inhibitoren hemmbar (83).

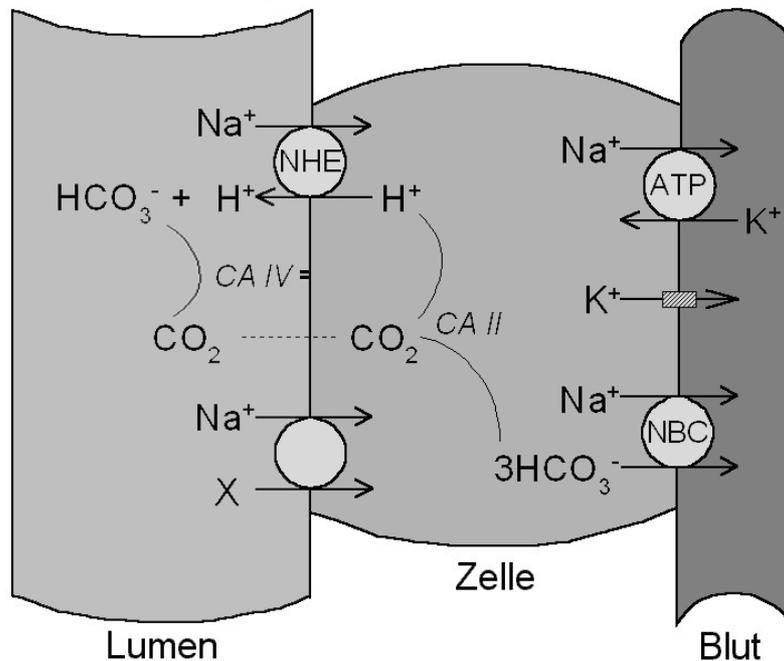
1.3.2.4 Cl^-/OH^- -Austauscher CHE

Für ein weiteres Mitglied der Anionen-Austauscher-Familie (AE) existieren in der Literatur konkrete Hinweise, während die Proteinstruktur dieses funktionell nachgewiesenen Transporters gegenwärtig noch nicht geklärt werden konnte (65, 84, 85). Es soll sich um einen von AE verschiedenen Transporter handeln (86), der unabhängig von Bikarbonat und Na^+ ist. Abhängig ist er dagegen von Chlorid. Aktiviert wird er durch einen alkalischen pH_i und ist sensitiv für ein von DIDS verschiedenes Stilben namens DBDS, was seine Verwandtschaft mit AE nahelegt (85). Allerdings ist CHE insensitiv für höhere Dosen von DIDS (0,2 mmol/l) (86). Funktionell wirkt CHE wie ein mit sauren Valenzen beladender Transporter, indem er Cl^- in die Zelle und OH^- aus der Zelle transportiert (85).

1.3.3 Physiologische Systeme, in denen Bikarbonattransporter eine zentrale Rolle spielen

Die folgenden Abbildungen zeigen physiologische Systeme, in denen Bikarbonattransporter eine zentrale Rolle einnehmen. Hierzu sind jeweils Schemata erstellt worden, die auf Informationen aus der Literatur beruhen. In den Legenden finden sich entsprechende Hinweise. Für den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC ist seine Beteiligung an der Rückresorption von Natrium im proximalen Tubulus der Niere dargestellt (Abb. 4). Die Rolle des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers AE bei der Protonensekretion im distalen Tubulus der Niere zeigt Abb. 5. Ähnliche Mechanismen, die der Sekretion von H^+ -Ionen dienen und das Zusammenspiel mit AE erfordern, finden sich in der Parietalzelle des Magens sowie in knochenabbauenden Osteoklasten (Abb. 6,7).

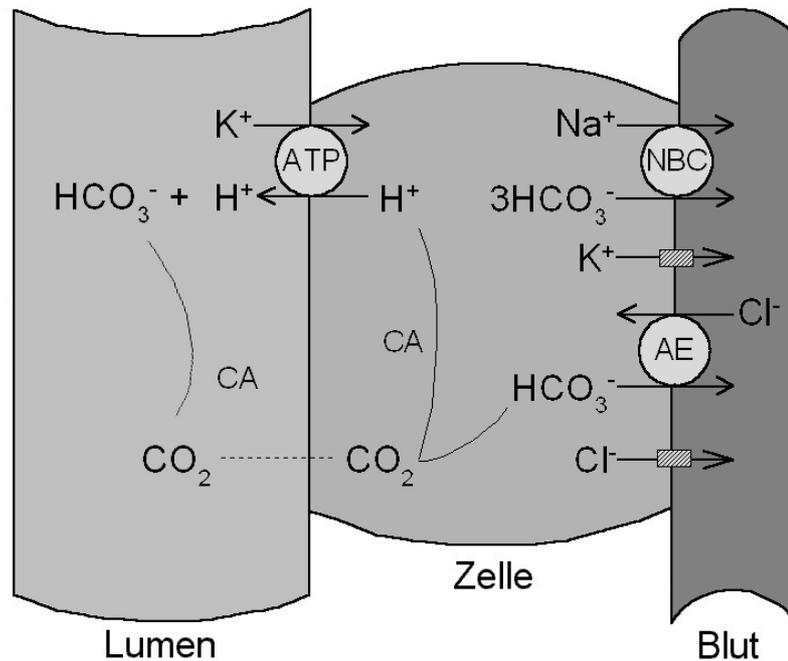
Natrium- und Bicarbonatresorption im proximalen Tubulus



4

Abb. 4 Im Proximalen Tubulus der Niere werden 80-90 % des glomerulär filtrierte Bicarbonats und Natriums rückresorbiert, wobei der NBC den Hauptweg für die Rückresorption von HCO_3^- darstellt und die Rückresorption von Na^+ über die basolaterale Membran des proximalen Tubulus der Niere unterstützt (23). Luminales Na^+ tritt in die Zelle über verschiedene Na^+ -gekoppelte Transportsysteme ein, z.B. den Na^+/H^+ -Austauscher, $\text{Na}^+/\text{Glucose}$ -Kotransporter und möglicherweise über Na^+ -Kanäle. Die Zelle des Proximalen Tubulus schleust Natriumionen über die basolaterale Membran über eine Na^+/K^+ -Pumpe aus, wodurch ein niedriger intrazellulärer Natriumgehalt beibehalten wird. Über den Na^+/H^+ -Austauscher ins Lumen sezernierte Protonen titrieren das filtrierte HCO_3^- . Im Tubuluslumen entsteht CO_2 aus der Carboanhydrase-Reaktion, welche über die membrangebundene Isoform CA IV katalysiert wird. CO_2 und Wasser gelangen schnell in die Zelle, wo die lösliche Isoform CA II Protonen und HCO_3^- regeneriert. Der größte Teil des intrazellulären HCO_3^- gelangt über die basolaterale Membran ins Blut über den elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (13).

Distale tubuläre Protonensekretion



5

Abb. 5 Zur Feinmodulierung der Urin-Säuresekretion gibt es im distalen Nephron säuresezernierende Typ- α -Zellen und bikarbonatsezernierende Typ- β -Zellen. H^+ -ATPasen und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher zeigen in diesen beiden Zelltypen entgegengesetzte Polaritäten (64). In säuresezernierenden Tubuluszellen transportieren Protonenpumpen H^+ -Ionen im Austausch gegen K^+ und unter ATP-Verbrauch ins Tubuluslumen (87). Diese Protonen entstehen intrazellulär aus der Carboanhydrase-Reaktion. Das dabei anfallende HCO_3^- verlässt die Tubuluszelle einerseits über den basolateralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher AE, welcher HCO_3^- ins Blut und Cl^- in die Tubuluszelle transportiert, andererseits über den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC. Über AE aufgenommene Cl^- -Ionen und über die H^+/K^+ -ATPase aufgenommene K^+ -Ionen verlassen die Tubuluszelle über entsprechende Kanäle (87).

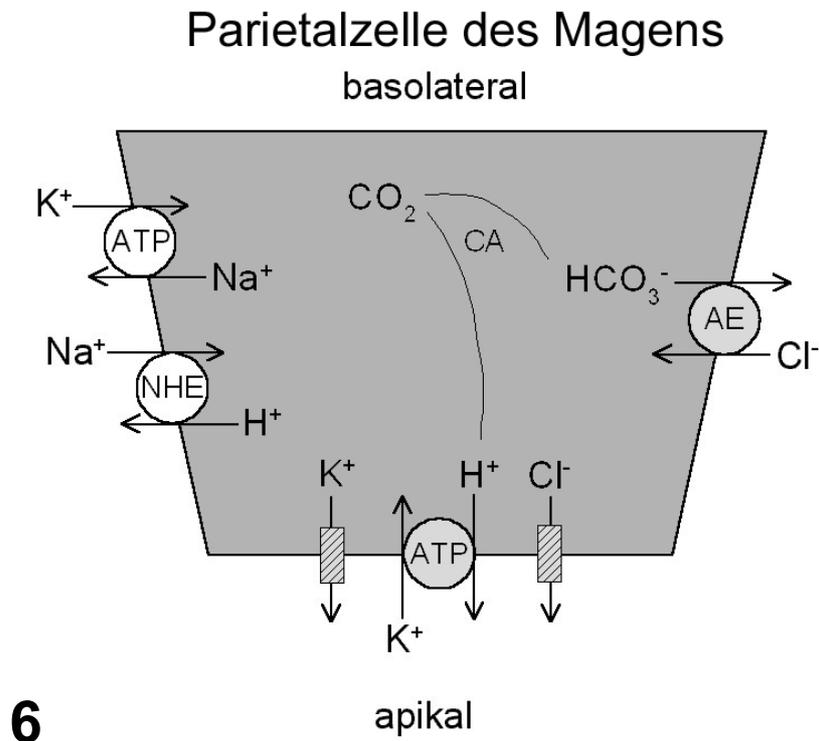
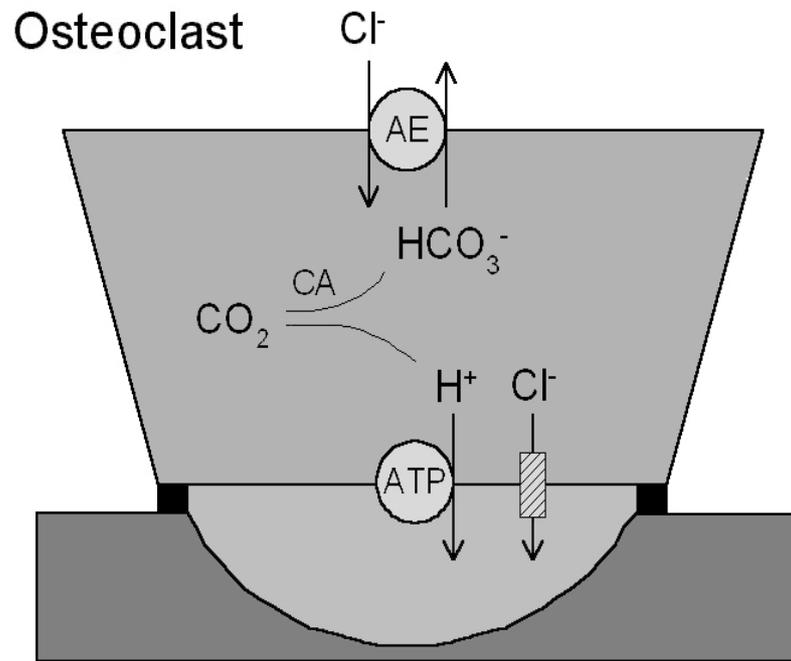


Abb. 6 Zur proteolytischen Spaltung von Nahrungsprotein wirkt im Magenlumen Pepsin, das durch HCl aktiviert wird und dessen Wirkoptimum bei pH 1,8 - 3,5 liegt (52). Um diesen sauren pH einzustellen, sezernieren Parietalzellen (Belegzellen) des Magens H^+ -Ionen, welche gegen das Konzentrationsgefälle ins Lumen transportiert werden müssen. Hierzu dient die apikal gelegene H^+/K^+ -ATPase (Protonenpumpe), die im Austausch H^+ aus der Zelle und K^+ in die Parietalzelle aufnimmt (88). Diese K^+ -Ionen werden über luminalen K^+ -Kanäle wieder ins Lumen abgegeben (89). H^+ -Ionen entstehen intrazellulär aus der Carboanhydrase-Reaktion (52). Das ebenfalls anfallende HCO_3^- wird über den basolateralen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher AE abgegeben (88). Zur Regulierung des intrazellulären pH der Parietalzelle transportiert der basolaterale Na^+/H^+ -Austauscher NHE Protonen nach außen (88). Das dabei in die Zelle gelangende Na^+ wird über die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase gegen den Konzentrationsgradienten wieder nach außen gepumpt (90). K^+ verlässt die Zelle durch K^+ -Kanäle (89).



7

Abb. 7 Osteoclast mit Resorptionslakune im Osteoid. Im gesunden Knochen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Aufbau von Knochenmatrix durch Osteoblasten und Abbau von Matrix durch Osteoclasten. Im Kompartiment Resorptionslakune findet sich ein saurer pH, welcher ein Optimum für proteolytische Enzyme (saure Phosphatase, Cathepsin C etc.) darstellt (91). Die hierfür notwendigen Protonen werden an der „rauen Seite“ des Osteoclasten in die Lakune sezerniert (92). Diese ist durch enge Anheftung an die mineralisierte Knochenoberfläche an der „clear zone“ abgedichtet (93). Durch Lyse und nachfolgende Resorption der Matrix entsteht die Howship-lakune. Die Abgabe von Protonen geschieht ähnlich der im Magen: Eine Protonenpumpe transportiert H^+ -Ionen (ohne den Austausch gegen K^+) unter ATP-Verbrauch in die Lakune (92). Die Protonen stammen aus der Carboanhydrase-Reaktion (93), aus der auch HCO_3^- hervorgeht. Dieses wird über den Cl^-/HCO_3^- -Austauscher AE an der osteoidfernen basolateralen Membran abgegeben (91, 92). Das aufgenommene Chlorid wird über Chloridkanäle der rauen Seite in die Howship-lakune abgegeben (91).

1.3.4 Laborchemisch etablierte Inhibitoren von Bikarbonat-Transportern

1.3.4.1 Stilbendisulfonate

Zuvor fand bei der Beschreibung der Bikarbonat-Transporter ihre Hemmbarkeit durch DIDS Erwähnung, welche geradezu ein Erkennungsmerkmal dieser Proteine in Literatur und Forschung ist. DIDS gehört zur Substanzgruppe der Stilbendisulfonate und trägt die chemische Bezeichnung 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonat. Beispiele anderer Derivate sind SITS, 4-Azetamido-4'-Isothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonat, und DNDS, 4,4'-Dinitro-2,2'-Stilbendisulfonat. Stilbendisulfonate sind wichtige kompetitive Inhibitoren für Anionen-Austauscher-Funktionen in Plasma-Membranen verschiedener Zellen (94), da sie sich durch die hohe Potenz ihrer Hemmwirkung auszeichnen (95). Zwar sah man Stilbendisulfonate als hoch spezifische Inhibitoren des Bande 3-vermittelten Anionen-Austauschs in roten Blutzellen an (42), jedoch wurden DIDS und andere Stilbendisulfonate auch als effektive Inhibitoren einer Anzahl anderer Anionen-Transporter wie z.B. von Chlorid-Kanälen bekannt (96). Ferner werden neben Anionenkanälen auch andere Bikarbonattransporter wie NBC und NDAE durch DIDS gehemmt (86), was wie oben beschrieben gut charakterisiert ist. Die folgende Beschreibung der Wirkungsweise von Stilbendisulfonaten, insbesondere von DIDS, bezieht sich auf dessen Wechselwirkungen mit den Anionen-Transportern des AE-Typs.

1.3.4.2 Wirkmechanismus von Stilbendisulfonaten

Für Stilbendisulfonate sind zwei verschiedene Wirkweisen bekannt. Diese basieren zum einen auf einer kovalenten Bindung an Bande 3-Proteine, zum anderen auf einer nicht kovalenten Interaktion. So ist das DIDS-Derivat DNDS als nicht kovalent bindender Inhibitor bekannt (53). DIDS und SITS stellen darüber hinaus Substanzen dar, die zusätzlich auch kovalent mit Bande 3-Proteinen reagieren, wobei die kovalente Reaktion für den Hemmeffekt nicht notwendig ist (53).

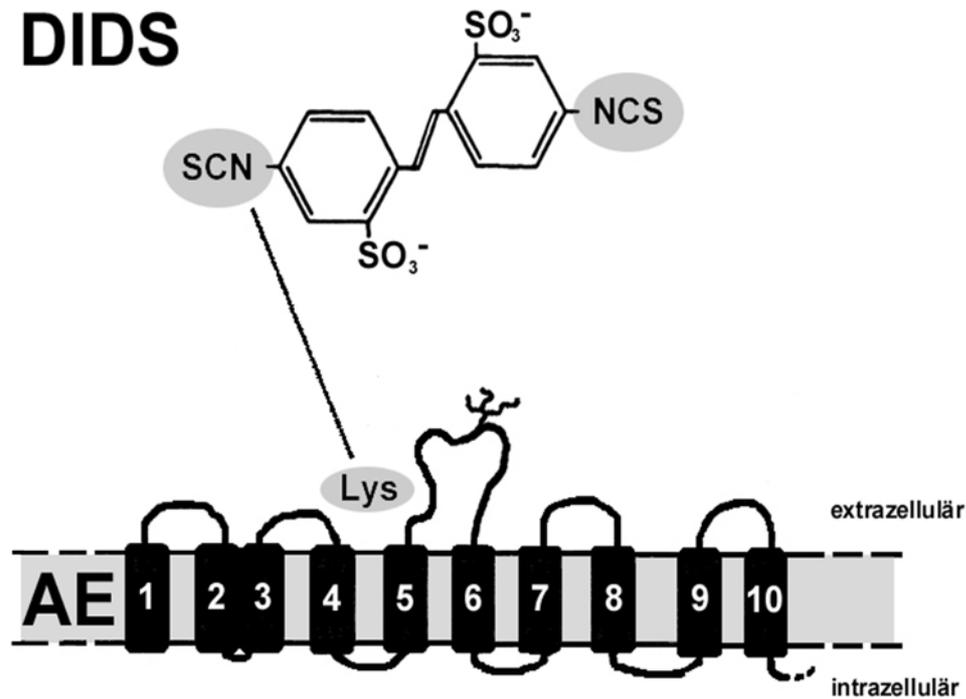
Die nicht-kovalente Hemmwirkung kommt durch die Konkurrenz von DIDS mit extrazellulären Cl^- -Ionen zustande (97, 98) und stellt einen reversiblen Effekt dar (99). Nach einer Modellvorstellung soll dies nach einem Zweischritt-Mechanismus erfolgen. Cl^- , Stilbendisulfonat und Bande 3-Protein sollen

zunächst einen Dreifachkomplex bilden, bei dem Cl^- dann die Stilbendisulfonat-Affinität allosterisch vermindert, sodass die Freigabe von Stilbendisulfonaten aus der Bindungsstelle an der äußeren Oberfläche vom Bande 3-Protein beschleunigt wird (94).

Unterschiede ergeben sich in der Wirkstärke der Stilbendisulfonate. Für den kompetitiven Hemmeffekt wird eine höhere DIDS-Konzentration benötigt, als das für SITS notwendig ist, allerdings verläuft die kovalente Reaktion von SITS langsamer und weniger effizient als die von DIDS ab (53). Entscheidend sind auch die Einwirkbedingungen für die Art des Hemmeffektes. Bei relativ kurzen Einwirkzeiten und bei niedrigen Temperaturen (um $0\text{ }^\circ\text{C}$) ist die Interaktion von DIDS mit Bande 3-Proteinen größtenteils reversibel (97). Wird eine längere Einwirkzeit gewählt, so kann die kovalente Reaktion ablaufen, da diese eine lineare Funktion der Expositionszeit darstellt (100). Interagiert DIDS kovalent mit bestimmten Bindungsstellen von Anionenaustauschern, führt dies zu einer irreversiblen Hemmung (21, 97)(Abb. 8).

Auch diese irreversible kovalente Reaktion soll unter Konkurrenz mit externen Anionen zustande kommen. Allerdings soll der Ort dieser kompetitiven Interaktion am AE-Molekül sich von der eigentlichen kovalenten Bindungsstelle unterscheiden (100). Die eigentliche DIDS-Bindungsstelle besteht aus Lysin-Resten (101), die hoch konserviert sind (51, 58, 100). Beim Benennen dieses Lysin-Restes muss auf die Nomenklatur bzw. Zählweise in den Quellen geachtet werden, da sich die Molekulargewichte der jeweiligen AE-Isoformen unterscheiden, was beim Vergleich der homologen Primärsequenzen auffällt (51). Während im humanen AE1 die kovalenten DIDS-Bindungsstellen beispielsweise die Lysine 539 und 542 darstellen (53, 100, 102) und laut anderen Autoren Lys 539 und Lys 851 (103), soll im Maus-AE1 das Lys 558 für die kovalente DIDS-Bindung verantwortlich sein, wodurch eine irreversible Hemmung von Bande 3-vermitteltem Cl^- -Austausch bewirkt wird (42). Im AE3 der Maus wird die kovalente DIDS-Bindungsstelle als Lys 844 angegeben (51).

Gemeinsam ist den unterschiedlich bezifferten Bindungsstellen, dass sie sowohl in humanem AE1, wie auch in humanem AE2 und AE3 zwischen der 5. und 6. transmembranären Domäne liegen (100). Insgesamt unterscheiden sich die Lysin-Bindungsstellen vom Ort des Cl^- -Austausches (42).



8

Abb. 8 Modell der kovalenten Bindung von DIDS an einen Lysin-Rest in der Nähe der exoplasmatischen Schleife zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6. Zur Darstellung wurde die Isoform AE3 angenommen, bei der zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6 ein Oligosaccharid zu finden ist. Vermittelt wird die Bindung durch eine der Isothiocyanat-Gruppen (nähere Beschreibungen der einzelnen Grafikelemente finden sich im Text).

Seitens des DIDS-Moleküls wird die kovalente Bindung über zwei reaktive Gruppen vermittelt. Das nicht in die Zelle penetrierende DIDS besitzt zwei Isothiocyanat-Gruppen, von denen sich eine mit einem Lysin-Rest des AE-Proteins verbindet, wodurch eine kovalente Bindung zustande kommt (42). Diese Bindung der Stilbendisulfonate wird an der Bindungsstelle sowohl durch negative Ladungen der Sulfonate als auch durch die Gegenwart hydrophober Elemente stabilisiert (104). Die Isothiocyanat-Gruppen in DIDS ermöglichen die eigentliche kovalente Reaktion mit der Aminogruppe von Lysin in einer Seitenkette, welche nur dann von der Außenseite der Zellmembran erreichbar ist,

wenn die Transport-Domäne nach außen gerichtet ist (53). Der Effekt der kovalenten Bindung von Stilbendisulfonaten an eine AE-Untereinheit bewirkt allosterische Effekte. Stilbendisulfonate sind also allosterische Inhibitoren des Bande 3-Anionenaustausches (105).

1.3.4.3 Unterschiede in der Affinität von Isoformen des Anionenaustauschers AE zu DIDS

Bezüglich der Affinität der Bikarbonattransporter zu dem Inhibitor DIDS gibt es deutliche Unterschiede. Bekannt ist, dass AE2 und AE3 deutlich weniger sensitiv für DIDS sind als AE1 (98, 106). So liegen die Werte für die halbmaximale reversible Hemmung (IC_{50} -Werte) der nicht-erythrozytären Anionenaustauscher AE2 und AE3 durch DIDS bei 142 $\mu\text{mol/l}$ (AE2) und 0,43 $\mu\text{mol/l}$ (AE3). Damit liegt der Affinitätsunterschied dieser beiden hoch konservierten Anionenaustauscher bei dem Faktor 330 (100).

Betrachtet man die hohe Übereinstimmung der konservierten Primär-Sequenz in den Membran-umspannenden Domänen von 82% (58), so verblüfft der große Unterschied bezüglich der DIDS-Sensitivität. Allerdings finden sich bei der sonst sehr großen Homologie Unterschiede im Bereich der extrazellulären Schleifen zwischen der 5. und 6. transmembranären Domäne, den Resten 549-567 (humane AE1-Nomenklatur) bzw. 854-899 (AE3-Nomenklatur). Diese Region stellt den Bereich größter Verschiedenheit dar (51). Weder die Länge, noch die Sequenz dieser Schleife sind in den klonierten AE-Genen konserviert. Dementsprechend findet sich ein auffälliger Unterschied in den Strukturen von AE1-3 hinsichtlich der Zahl der potentiellen N-Glykosylierungs-Stellen, denn während AE1 an anderer Stelle, nämlich einer extrazellulären Schleife zwischen den transmembranären Bereichen 7 und 8 an einer einzelnen Stelle glykosyliert wird, findet sich zwischen den Bereichen 5 und 6 von AE2 drei und von AE3 ein Oligosaccharid (100). Diese Befunde könnten im Zusammenhang mit der unterschiedlichen DIDS-Affinität stehen, da die potentiellen DIDS-bindenden Lysin-Reste an den Stellen 539 und 542 (humane AE1-Nomenklatur) der o.g. Schleife sequenziell eng benachbart sind (100).

1.4 Untersuchungsmöglichkeiten zur Charakterisierung von Ionentransportern

An Methoden, die Aktivität von Ionentransportern zu messen und diese funktionell zu charakterisieren, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. So kann man beispielsweise intakte Organe mit Testlösungen perfundieren und die Konzentrationen der zu untersuchenden Ionen im zugeführten und austretenden Perfusat bestimmen, um so auf diejenigen Prozesse zu schließen, die mit den entsprechenden Ionenbewegungen in Verbindung stehen. Diese Langendorff-Technik wurde an isolierten Herzen von Meerschweinchen von Nagashima et al. verwendet (107). Im Perfusat wurden hier die Konzentrationen von Na^+ und K^+ sowie der pH-Wert der Lösungen bestimmt, um einen vermuteten transmembranären K^+/H^+ -Austauscher funktionell nachzuweisen.

Während bei diesen Untersuchungen Ionenkonzentrationen in extrazellulären Kompartimenten bestimmt wurden, besteht auch die Möglichkeit zur Darstellung von Ionenbewegungen ins Zellinnere durch die Verwendung von radioaktiven Isotopen der betreffenden Ionen, z.B. $^{22}\text{Na}^+$ oder $^{36}\text{Cl}^-$ (20). Insbesondere gaben Influx- und Effluxmessungen von $^{36}\text{Cl}^-$ Aufschluss über die Aktivität von Anionen-Austauschern (42). Die Verwendung von radioaktiven Tracern war damals nötig, da der Bande 3-vermittelte Anionenfluss sich nicht auf Parameter wie die elektrische Ladung auswirkt (42). Dagegen können Flüsse über Ionenkanäle mit Methoden wie Patch-Clamp mit hoher Sensitivität untersucht werden, da diese sich in Ladungsänderungen bemerkbar machen (42). Im Falle von spannungsrelevanten Veränderungen durch Anionen-Transporter können elektrophysiologische Methoden auch hier von Nutzen sein. Boron et al. klonierten und charakterisierten den elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC. Hierbei wurden transmembranäre Potentialmessungen verwendet, um die Elektrogenität des Transporters zu überprüfen (22).

Da alle Bikarbonattransporter letztendlich Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes produzieren, kann der Endpunkt aller dieser Transporteraktivitäten zur Beobachtung genutzt werden. Ursprünglich wurde hierfür die pH-Messung mittels Mikroelektroden eingesetzt (13).

Allerdings liegt heute eine Methode vor, die weniger invasiv ist, da untersuchte Zellen nicht penetriert werden müssen. Diese besteht darin, Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff zu beladen, der seine Fluoreszenzemission in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert ändert. Der Endpunkt der Bikarbonat-Transportvorgänge kann also schonend beobachtet werden. Die Anwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe ist seit Jahren in der Forschung etabliert. Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre pH durch den Farbstoff BCECF bestimmt, was unten detailliert beschrieben ist. Um den Fluss von Säureequivalenten in Verbindung mit anderen Ionenarten wie Na^+ oder Cl^- zu untersuchen, können unterschiedlich zusammengesetzte Lösungen, bei denen einzelne Ionenarten weggelassen und durch andere ersetzt werden, sowie durch pharmakologische Inhibitoren verwendet werden (3).

1.5 Auswahl der untersuchten Zellart

Als Untersuchungsmaterial boten sich kultivierte Zellen an, die wegen ihrer Fähigkeit zur Proliferation und relativ stabiler Merkmale für eine große Zahl von Experimenten zur Verfügung stehen. Einer der Schwerpunkte der Abteilung, in der die vorliegende Arbeit gefertigt wurde, ist die Untersuchung der kardialen interstitiellen Fibrose. So zeigte eine Arbeit von Brilla et al. eine durch Aldosteron induzierte kardiale Fibrose, was in Untersuchungen an 2-Nieren-1-Clip-Modellen videodensitometrisch nach Aldosteronverabreichung dargestellt wurde (108). Bekannt ist, dass eine erhöhte Anzahl von Fibroblasten für eine gesteigerte Kollagensynthese verantwortlich sein könnte (109). Mittels ^3H -Prolin-Assay zeigten Brilla, Scheer und Rupp die Stimulierung der Kollagensynthese durch Angiotensin II an kultivierten kardialen Fibroblasten (110). Eine alkalinisierende Wirkung von Aldosteron auf kultivierte kardiale Fibroblasten wurde in einer früheren Arbeit nachgewiesen (111). Da kardiale Fibroblasten offensichtlich an pathologischen Veränderungen beteiligt sind und diese mit Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes in Verbindung gebracht werden können, bot sich die Verwendung kultivierter kardialer Fibroblasten an.

1.6 Auswahl der untersuchten Pharmaka

Zur Gruppe der antihypertensiven Pharmaka gehören neben den Substanzgruppen, welche an Herz, Gefäßsystem und Niere angreifen, auch Substanzen, die über zentralnervöse Effekte eine blutdrucksenkende Wirkung vermitteln. Hierunter fallen die Imidazolin-Derivate Moxonidin und Clonidin. Diesen Pharmaka wurde auch eine Wirkung an α_2 -Rezeptoren des ZNS zugeschrieben. In den letzten Jahren häuften sich in der Literatur aber Hinweise, dass die Wirkung von Moxonidin durch die Bindung an Imidazolin-Rezeptoren vermittelt ist. Gegenwärtig liegen jedoch noch keine Befunde vor, die ein Rezeptorprotein strukturell eindeutig identifizieren.

Arbeiten von Smyth (112) und Schlatter (113) bieten überdies Hinweise darauf, dass „Imidazolin-Agonisten“ neben ihren zentralnervösen Effekten auch periphere, also vom sympathischen Nervensystem unabhängige Wirkungen besitzen. Smyth et al. konnten zeigen, dass Moxonidin auch an denervierten Nieren der Ratte bei direkter Applikation in die Nierenarterien eine diuretische Wirkung hat (112). Ferner beschrieben Schlatter und Hohage einen hemmenden Effekt von Moxonidin auf den renalen Na^+/H^+ -Austauscher NHE (113).

Aufgrund dieser Befunde, die eine pharmakologische Wirkung von Imidazolinen wie Moxonidin außerhalb des ZNS nahelegen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht, ob Moxonidin einen Einfluss auf die Aktivität zellulärer pH-Regulationsmechanismen und vor allem auf Mitglieder der Bikarbonattransporter-Superfamilie hat.

2. Material und Methoden

2.1 Fluoreszenzphotometrie

2.1.1 Prinzip der Fluoreszenzphotometrie

Als Endpunkt von zellulären pH-Regulationsvorgängen kann der intrazelluläre pH-Wert mittels Fluoreszenzphotometrie verfolgt werden. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf dem Einbringen eines Farbstoffes in die Zelle, der in Abhängigkeit vom pH-Wert sein Fluoreszenzverhalten ändert. Licht von definierter Wellenlänge trifft auf den Farbstoff. Diese Wellen heben Elektronen auf ein höheres Energieniveau und deren anschließender Abfall auf ein niedrigeres Energieniveau führt zur Emission von längerwelligem Licht. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Das emittierte Licht wird nun über einen Lichtleiter auf einen Photomultiplier geführt, wo die Energie der emittierten Wellen in ein elektrisches Signal umgewandelt wird, welches von einem Computer registriert und aufgezeichnet wird. Über die Zeit aufgetragen lassen sich so Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes darstellen und Rückschlüsse auf die Aktivität von pH-Regulationsvorgängen ziehen.

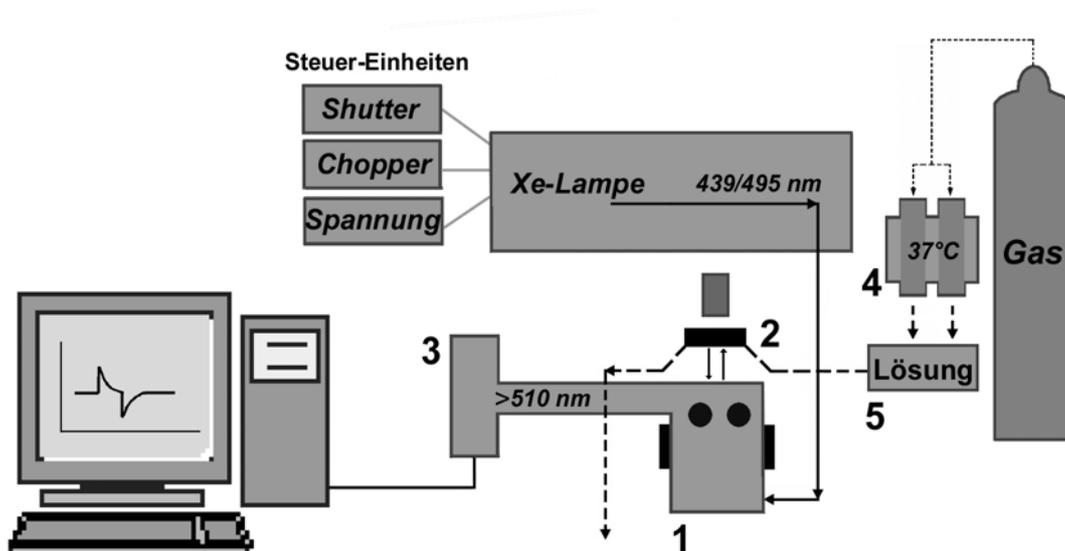
2.1.2 Strahlengang und Datenfluß der Fluoreszenzphotometrischen Anlage

Eine Xenondampflampe dient als Lichtquelle (Abb. 9). Monochromatoren filtern das Licht der Xenondampflampe und liefern so monochromatisches Licht von 439 nm bzw. 495 nm. Ein Chopper lässt für je 1 Sek. Licht der jeweiligen Wellenlängen weiter passieren. Für weitere 8 Sek. schließt ein Shutter den Strahlengang vollständig. Diese insgesamt 10 Sek. stellen eine Meßeinheit dar und liefern in der späteren Registrierung einen Datenpunkt. Nach dem Shutter gelangt das Licht über einen Lichtleiter auf das Objektiv des inversen Mikroskops, wo es durch ein bewachsenes Glasplättchen von unten auf die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff trifft. Das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt wiederum nach unten durch das Glasplättchen und läuft so retrograd wieder ins Objektiv. Über einen Lichtleiter innerhalb des Mikroskops gelangt das Licht an einen Kantenfilter, der nur Wellenlängen oberhalb 510 nm hindurchlässt und so das Anregungslicht von 439/495 nm eliminiert. Das Fluoreszenzlicht trifft dann

auf den Photomultiplier, wo aus den elektromagnetischen Wellen des Lichts elektrische Spannungssignale entstehen. Diese wiederum werden von einem Computer verarbeitet, dessen Software die Spannungssignale als Kurven darstellt. Ersichtlich sind so Registrierungen in „counts/sec.“, die aus der Fluoreszenz nach der Anregung durch die beiden Wellenlängen hervorgehen. Zusammengefasst werden diese „counts/sec.“ als „Ratio“, welche als Quotient der Fluoreszenz zweier verschiedener Anregungswellenlängen von der Software errechnet wird. Zur weiteren Datenauswertung wurde die Kurve der „Ratio“ ausgedruckt.

Material

- Fluoreszenzphotometer: „PTI 170“ Photon-Counting Detection System
- Inverses Mikroskop Zeiss-Axiovert 135
- Objektiv: Fluar 442055 (40x Vergrößerung)
- Pentium 90 PC, „Ratio-Master“ ratio fluorescence spectrometer
- Software „FeliX“ Ver.1.1
- Immersionsöl, Zeiss 518 C (Brechungsindex: $n_e = 1,518$ bei 23 C° , PCB-frei)

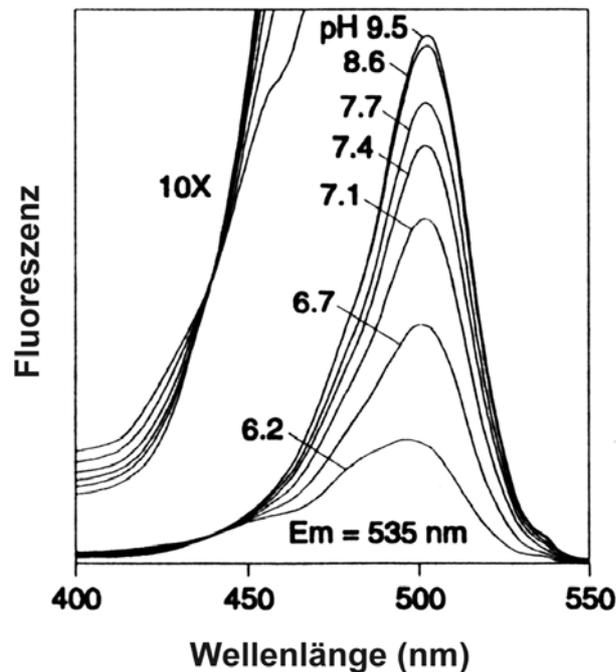


9

Abb. 9 Versuchsaufbau bei fluoreszenzphotometrischen Messungen des intrazellulären pH. Die Steuerelemente **Shutter**, **Chopper** und **Spannung** regulierten die **Xenondampflampe** bzw. die Lichtquelle (**439/495 nm**) im „PTI 170“ Detektionssystem. Das Licht wurde im Axiovert-Inversions-Mikroskop (1) von unten in die auf 37 C° temperierte Spülkammer (2), welche mit bewachsenen Glasplättchen bestückt war, geleitet. Angeregtes UV-Licht verließ durch das Glasplättchen nach unten die Spülkammer und wurde in der Mikroskop-Optik über einen Kantenfilter, der nur Wellenlängen oberhalb 510 nm passieren ließ, zum Photomultiplier (3), welcher mit dem verarbeitenden Computer verbunden war, geführt. Auf diese Weise gelangte nur angeregtes Licht zur Verarbeitung. Die CO₂ – begasten Superfusionslösungen (4) wurden auf 37 C° temperiert und über die Ventilbank (5) in die Spülkammer (2) mit den Zellen geleitet und schließlich verworfen.

2.1.3 pH-Indikator BCECF

Verwendet wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Bis-(Carboxyethyl)-5,6-Carboxyfluorescein (BCECF). Charakteristisch für BCECF ist, dass in einem gewissen Bereich von Anregungslicht das Emissionslicht unabhängig von der H^+ -Ionenkonzentration bzw. vom pH-Wert ist. Dieser sogenannte isosbestische Punkt liegt bei 439 nm (114). Wird BCECF mit Licht von 495 nm angeregt, so ist die Intensität des Fluoreszenzlichtes aber vom pH-Wert abhängig. Im alkalischen pH-Bereich steigt die Intensität des emittierten Lichtes (114). Wird nun der Farbstoff in unmittelbarer Abfolge von Licht mit je 439 nm und 495 nm angeregt, so kann man die emittierten Intensitäten, hier registriert in „counts/sec.“, als „Ratio“ ausdrücken. Dabei werden die „counts/sec.“ der 495 nm-Anregung dividiert durch die der 439 nm-angeregten. Eine hohe „Ratio“ zeigt einen erhöhten, eine geringe einen erniedrigten pH-Wert an. Durch die Quotientenbildung mit den Emissionen am isosbestischen Punkt wird ermöglicht, Artefakte wie Ausbleichen des Farbstoffes zu berücksichtigen.



10

Abb. 10 pH-abhängiges Spektrum der Fluoreszenz von BCECF. Im linken Abschnitt zeigt die 10-fache Vergrößerung den isosbestischen Punkt bei 439 nm (115). Die Fluoreszenz-Intensität ist bei einer emittierten Wellenlänge von 535 nm dargestellt. In unseren Registrierungen wurde das Wellenlängen-Spektrum oberhalb 510 nm verarbeitet, da Licht kürzerer Wellenlängen mithilfe eines Kantenfilters eliminiert wurde.

2.1.4 Beladung der Zellen mit BCECF

2.1.4.1 Prinzip der Beladung

Zur Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF wurde das Prinzip der „Ionenfalle“ angewendet. Das Molekül BCECF trägt vier Carboxylgruppen (114), sodass es wegen dieser polaren Gruppen biologische Membranen schlecht permeiert (114). Deshalb wird eine Vorstufe, nämlich der Azetoxymethylester, BCECF-AM, verwendet. Dieses unpolare Molekül permeiert die Zellmembran. Intrazellulär hydrolysieren Esterasen die Acetylgruppen (114), der freie Farbstoff kumuliert wegen seiner Polarität in der Zelle. Erst das hydrolysierte BCECF besitzt die Fähigkeit zur Fluoreszenz, der AM-Ester fluoresziert kaum (114).

Um die Löslichkeit im Inkubationsmedium zu erhöhen, wurden die BCECF-Kristalle in Dimethylsulfoxid (DMSO), einem hoch polaren organischen Lösungsmittel, gelöst. Diese Emulsion wiederum wurde in Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Pluronic wurde ebenfalls zur Inkubationslösung zugefügt. Der nichtionische Surfactant-Polyol fördert die Dispersion von AM-Estern (116).

In der Literatur ist eine Zeit von 30 Min. beschrieben, nach der die Esterhydrolyse in Thymozyten von BCECF-AM und damit die Beladung der Zellen vollständig ist (114). Deshalb wurde eine Inkubationszeit von 30 Min. im Brutschrank gewählt. Als Ausdruck von vollständiger Beladung der Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop visuell das deutliche Aufleuchten der Zellen bei Anregung mit 439 nm-Licht kontrolliert. Eine gut sichtbare grüne intrazelluläre Fluoreszenz wurde als hohe Beladung gewertet.

2.1.4.2 Durchführung der Inkubation

Der Inhalt eines Eppendorf-Gefäßes von 50 µg BCECF-AM Kristallen wurde in 16,4 µl DMSO gelöst. Nun wurden 2 µl dieser Lösung und 1 µl Pluronic in einem Zentrifugenröhrchen vermischt. Diese Suspension wiederum wurde mit 2 ml Krebs-Henseleit-Lösung, die als Inkubations-Medium diente, vermischt. So wurden Konzentrationen von 0,05% Pluronic und 5 mmol/l BCECF-AM erreicht, was einer üblichen Arbeitskonzentration entspricht (116). Ein mit Fibroblasten bewachsenes Glasplättchen wurde nun in eine 20 mm-Petrischale gegeben. Darüber wurden die 2 ml Inkubationsmedium pipettiert. Die so vorberei-

teten Fibroblasten wurden dann für 30 Min. im Brutschrank bei 37 C° und 5% CO₂ inkubiert.

Materialien

- BCECF-AM, Molecular Probes
- DMSO, Merck
- Pluronic F-127, Molecular Probes, 20%ige Lösung in DMSO
- Krebs-Henseleit-Lösung (Vorschrift siehe unter „Kontrolllösung“)

2.1.5 Versuchsaufbau bei fluoreszenzphotometrischen Messungen

Ein mit Fibroblasten bewachsenes Glasplättchen wurde in die von der Werkstatt der Medizinischen Forschungseinheiten angefertigten Spülkammer, welche auf den Objektträgertisch des Axiovert-Mikroskopes eingespannt war, nach 30-minütiger Vorinkubation eingebracht. Die Spülkammer war an ein Spülsystem angeschlossen, das einen Wechsel der verschiedenen Lösungen ermöglichte, um je nach Zusammensetzung intrazelluläre pH-Veränderungen auszulösen.

2.1.5.1 Spülsystem der Superfusionslösungen

Die jeweiligen Superfusionsmedien wurden als Vorrat kontinuierlich in einem Wasserbad bei 37 C° gewärmt und mit 5% CO₂-haltigem Mischgas begast. Aus diesem Vorrat wurden die Superfusionsmedien in 100 ml Blasenspritzen, welche als Reservoir dienten und ebenfalls kontinuierlich mittels eines Warmwassersystems auf 37 C° gehalten und mit 5% CO₂-haltigem Mischgas begast wurden, überführt. Schläuche führten von den Reservoiren zu der Ventilbank, über die der Zufluß der jeweiligen Superfusionslösungen gesteuert wurde. Weiter von der Ventilbank führte ein kurzer dünner Schlauch ($\varnothing=1\text{mm}$) in die Spülkammer mit den Fibroblasten, welche ebenfalls kontinuierlich mittels eines Warmwassersystems auf 37 C° gehalten wurde. Über einen der Spülkammer nachgeschalteten Schlauch konnten die Superfusionsmedien austreten.

Als Superfusionsgeschwindigkeit wurde eine Tropfrate von etwa 3 ml/Min. gewählt, welche anhand von Infusionsrädchen an den Schläuchen zwischen Reservoir und Ventilbank reguliert wurde.

Materialien

- Mischgas: 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂, Klinikumsapotheke
- Ventilbank: Valve Bank 4, AutoMate Scientific
- Spülkammer : Einzelanfertigung der Werkstatt der Medizinischen Forschungseinheiten

2.1.6 Anwendung von Superfusionsmedien und pharmakologische Interventionen

2.1.6.1 Ammoniumchlorid-Impuls-Technik

Um Zellen Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes aufzuzwingen, wurde die Ammoniumchlorid-Impuls-Technik verwendet. Zunächst wurde eine Kontrolllösung über die Fibroblasten geführt, unter welcher sich der intrazelluläre pH-Wert innerhalb geringer Schwankungen konstant einstellte. Nach einer etwa zweiminütigen Registrierung eines stabilen pH-Wertes wurde die Superfusionslösung statt der Kontrolllösung nun auf eine Lösung, welche NH₄Cl in einer Konzentration von 5 mmol/l enthielt, umgeschaltet, was solange beibehalten wurde, bis sich die Veränderungen der „Fluoreszenz-Ratio“ bzw. des intrazellulären pH-Wertes über einen Zeitraum von ca. 10 Min. stabil zeigten. Erst dann wurde wieder auf die ursprüngliche Kontrolllösung zurückgeschaltet. Die Messung wurde solange fortgeführt, bis die auf einen Impuls folgenden reaktiven Fluoreszenzveränderungen einen stabilen Zustand erreichten.

2.1.6.2 Kontrolllösung und Ammoniumchlorid-Lösung

Als Basis der Kontrolllösung diente die Vorschrift der Krebs-Henseleit-Lösung: In Aqua bidestillata wurden NaCl 118,00 mmol/l, KCl 4,70 mmol/l, CaCl₂ x 2H₂O 2,52 mmol/l, MgSO₄ x 7H₂O 1,64 mmol/l, NaHCO₃ 24,88 mmol/l, KH₂PO₄ 1,18 mmol/l und Glucose 5,55 mmol/l unter kontinuierlichem Rühren gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 Vol.% FCS hinzugefügt. Begast wurde mit Mischgas, das 5% CO₂, 20 %O₂, 75% N₂ enthielt. Zu beachten war bezüglich der Reihenfolge beim Ansatz der Lösung, dass CaCl₂ zuerst zugefügt wurde, um dessen Ausfällen zu verhindern.

Als Basis der Ammoniumchlorid-Lösung diente die eben beschriebene Kontrolllösung, der NH_4Cl in einer Konzentration von 5 mmol/l zugesetzt wurde.

2.1.6.3 Na^+ -freie Lösung

Um die Ammoniumchlorid-Impuls-Technik unter Na^+ -freien Bedingungen anwenden zu können, wurde die entsprechende Kontrolllösung und NH_4Cl -Lösung in glasfreien Behältnissen angesetzt. NaCl und NaHCO_3 wurden durch 188 mmol/l Cholinchlorid für NaCl und 24,88 mmol/l Cholinbikarbonat für NaHCO_3 ersetzt.

2.1.6.4 Entzug von extrazellulärem Chlorid

Um den Einfluß des Entzuges von extrazellulärem Chlorid zu untersuchen, wurde zunächst eine chloridhaltige Kontrolllösung über die Zellen geführt. Nach 3 Min. Messung wurde auf eine chloridfreie Lösung umgeschaltet und der weitere Fluoreszenzverlauf für 14 Min. aufgezeichnet.

2.1.6.4.1 Chloridhaltige Kontrolllösung

Die hier verwendete Kontrolllösung war in ihrer Elektrolytzusammensetzung entsprechend der chloridfreien Lösung aufgebaut: 120 mmol/l NaCl , 5,7 mmol/l KHCO_3 , 1,2 mmol/l NaH_2PO_4 , 1,7 mmol/l MgSO_4 , 1 mmol/l NaHCO_3 und 20mmol/l HEPES wurden in Aqua bidestillata gelöst.

2.1.6.4.2 Chloridfreie Lösung

In der chloridfreien Lösung wurde NaCl durch 120 mmol/l Na-Gluconat ersetzt.

2.1.6.5 Vorbehandlung mit DIDS

Die irreversible kovalente Bindung von DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonat) an Anionenaustauscher benötigt höhere Konzentrationen und eine längere Inkubationszeit als bei der reversiblen (100). So ergaben Untersuchungen von Lee et Kopito, dass die kovalente Hemmung durch DIDS sowohl bei AE2, als auch AE3 eine lineare Funktion der Einwirkzeit mit dem Inhibitor ist. Die Autoren verwendeten DIDS-Konzentrationen vom 7-fachen der IC_{50} , also 1000 $\mu\text{mol/l}$ für AE2 und 3 $\mu\text{mol/l}$ für AE3. So wurde nach gleicher Inkuba-

tionsdauer in beiden Fällen eine ähnlich große Hemmung der AEs erreicht. Beide waren nach dem größten untersuchten Zeitraum von 15 Min. zu ca. 70% gehemmt (100). Da zur Zeit der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht bekannt war, welche Affinität der Ionentransporter zu DIDS in unseren Fibroblasten vorlagen, wurde der Inhibitor in einer Konzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$, also 1 mmol/l verwendet.

Als Inkubationszeit wurde bei den Versuchen zu der vorliegenden Arbeit 30 Min. gewählt, da die Extrapolierung der Linearfunktion von Lee und Kopito (100) nach dieser Zeitspanne eine annähernd 100 %-ige Hemmung der Anionenaustauscher als wahrscheinlich erscheinen lässt.

In einer Arbeit von Bartel und Passow (42) wurde bei der Vorbehandlung von Bande 3-transfizierten Oozyten (entsprechend Maus AE1) mit DIDS mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ für 1 Stunde bei entweder pH 6,8 oder pH 8,5 und 20 C° vorinkubiert. Anschließend wurde DIDS durch Auswaschen entfernt. Während sich der irreversible Effekt bei alkalischem extrazellulärem pH zeigte, wurde er bei pH_o 6,8 nur als reversibler Effekt, also bei nochmaligem Zufügen des Inhibitors, beobachtet (42). Bei den Vorinkubationen der vorliegenden Arbeit mit DIDS lag im Lösungsansatz ein extrazellulärer pH von 7,5 bis 7,8 vor.

2.1.6.5.1 Durchführung der Vorbehandlung mit DIDS

Fibroblasten wurden gleichzeitig mit DIDS und BCECF inkubiert. Vor der Inkubation wurde 1 mg DIDS abgewogen und zu 2 ml der BCECF-AM und Pluronic enthaltenden Inkubationslösung gegeben. Auf diese Weise entstand eine Lösung mit einer DIDS-Konzentration von 1 mmol/l , die für 30 Min. bei 37 C° einwirkte. Die Superfusionslösungen während der fluoreszenzphotometrischen Messungen enthielten kein DIDS mehr.

2.1.6.6 Direkter Einfluß von HOE 694

HOE 694 wurde in die Superfusionslösungen der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik zugegeben. Eine Einwaage von 21,1 mg in 50 ml Krebslösung ergab eine 1 mmol/l Stammlösung. Von dieser 1 mmol/l Stammlösung wurden 2 ml in 200 ml Kontrolllösung, bzw. in 200 ml der NH_4Cl -Lösung gelöst. Auf

diese Weise wirkten während der fluoreszenzphotometrischen Messungen 10^{-5} mol/l HOE 694 auf die Zellen ein.

2.1.6.7 Direkter Einfluß von Moxonidin

Moxonidin wurde direkt in die Superfusionslösungen der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik zugegeben. 12 mg Moxonidin wurden in 50 ml Aqua bidestillata unter Rühren gelöst. Von dieser 1 mmol/l Stammlösung wurden 200 µl in 200 ml Kontrollösung, bzw. in 200 ml der NH_4Cl -Lösung gelöst. Auf diese Weise wirkten während der fluoreszenzphotometrischen Messungen 10^{-6} mol/l Moxonidin auf die Zellen ein.

2.1.6.8 Einfluß von Moxonidin nach Vorbehandlung

Fibroblasten wurden gleichzeitig mit Moxonidin und BCECF inkubiert. Zunächst wurde eine 1 mmol/l Stammlösung wie eben beschrieben angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden nun 2 µl zu 2 ml der BCECF-AM und Pluronic enthaltenden Vorinkubationslösung hinzupipettiert, um eine Konzentration von 10^{-6} mol/l zu erreichen. Wurden niedrigere Konzentrationen gewünscht, so wurde die 1 mmol/l Stammlösung zunächst auf eine 10^{-6} mol/l Stammlösung verdünnt. Von dieser 10^{-6} mol/l Stammlösung wurden Volumina von 200 µl für 10^{-7} mol/l, 20 µl für 10^{-8} mol/l und 2 µl für 10^{-9} mol/l zu 2 ml Inkubationslösung pipettiert. Auf diese Weise konnte Moxonidin für 30 Min. bei 37 C° mit den jeweiligen Konzentrationen auf die Zellen einwirken. Zu den Superfusionslösungen der fluoreszenzphotometrischen Messungen wurde kein Moxonidin mehr zugefügt.

2.1.6.9 Einfluß von Clonidin und Guanabenz nach Vorbehandlung

Fibroblasten wurden gleichzeitig mit entweder Clonidin oder Guanabenz und BCECF inkubiert. Zunächst wurden Stammlösungen von 1 mmol/l angesetzt. 2,6 mg Clonidin wurden unter Rühren in 10 ml Krebslösung gelöst. 5,8 mg Guanabenz wurden in 10 ml Aqua bidestillata gelöst. Zum Auflösen von Guanabenz war es notwendig, die Lösung zunächst mit Essigsäure auf pH 3,5 anzusäuern und nach dem Lösevorgang wieder mit NaOH auf pH 7.0 zu titrieren. Von den jeweiligen 1 mmol/l Stammlösungen wurden 2 µl zu 2 ml der BCECF-AM und Pluronic enthaltenden Vorinkubationslösung hinzupipettiert, um eine Konzentration von 10^{-6} mol/l zu erreichen. Auf diese Weise konnten Cloni-

din, bzw. Guanabenz für 30 Min. bei 37 C° auf die Zellen einwirken. Zu den Superfusionslösungen der fluoreszenzphotometrischen Messungen wurde kein Clonidin, bzw. Guanabenz mehr zugefügt.

Materialien

Messer-Griesheim

- Mischgas, 5% CO₂, 20 %O₂, 75% N₂ .

Sigma

- Cholin-Bicarbonat, Cholin-Chlorid, Clonidin, Glucose, Guanabenz, MgSO₄ .

Merck

- CaCl₂ x2H₂O, Essigsäure, KHCO₃ , KH₂PO₄, MgSO₄ x7H₂O, Na-Gluconat, NaHCO₃, NaH₂PO₄ , NaOH.

Roth

- NaCl, KCl, HEPES

J.T. Baker

- NH₄Cl

Gibco

- FCS

Molecular Probes

- DIDS

Solvay (Hannover) stellte freundlicherweise Moxonidin zur Verfügung.

Aventis (Frankfurt) stellte freundlicherweise HOE 694 zur Verfügung.

2.1.7 pH-Eichung

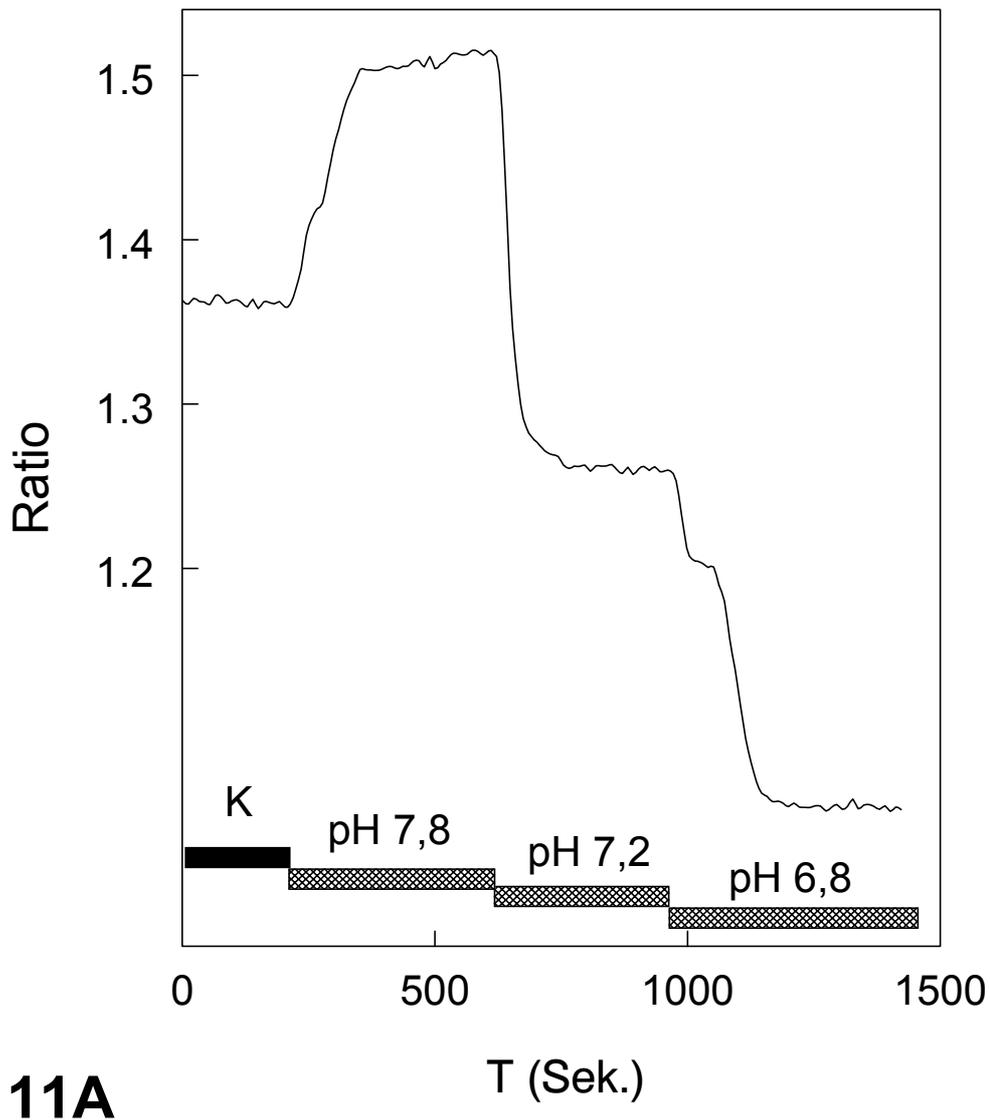
Um Werte der „Fluoreszenz-Ratio“ in pH-Werte überführen zu können, wurde eine Eichung vorgenommen. Hierbei wurde die Nigericinmethode angewendet, bei der intra- und extrazellulärer pH-Wert angeglichen wurden. Nigericin ist ein Ionophor, der die Zellmembran permeabel für K^+ - und H^+ -Ionen macht. Eine extrazellulär hoch angesetzte Kaliumkonzentration sorgte für innen und außen etwa gleiche K^+ -Konzentrationen. Wurden Nigericinlösungen verschiedener pH-Werte nacheinander über die Zellen gegeben, so stellte sich der jeweils extrazellulär vorgegebene pH-Wert auch intrazellulär ein. Auf diese Weise ließen sich pH-Werte den entsprechenden Werten der „Fluoreszenz-Ratio“ zuordnen und eine Eichgerade konnte ermittelt werden, wobei diese einen Mittelwert aus $n = 4$ Kalibrierungs-Messungen darstellte. Die Gleichung der gewonnenen Gerade lautet:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= (\text{Ratio} + 1,63) / 0,398 \\ \text{oder} \\ \text{Ratio} &= 0,398 \text{ pH} - 1,63 \end{aligned}$$

Mithilfe der umgestellten Gerade konnten die einzelnen Kurven der „Fluoreszenz-Ratio“ in pH-Kurvenverläufe transformiert werden (Abb.11).

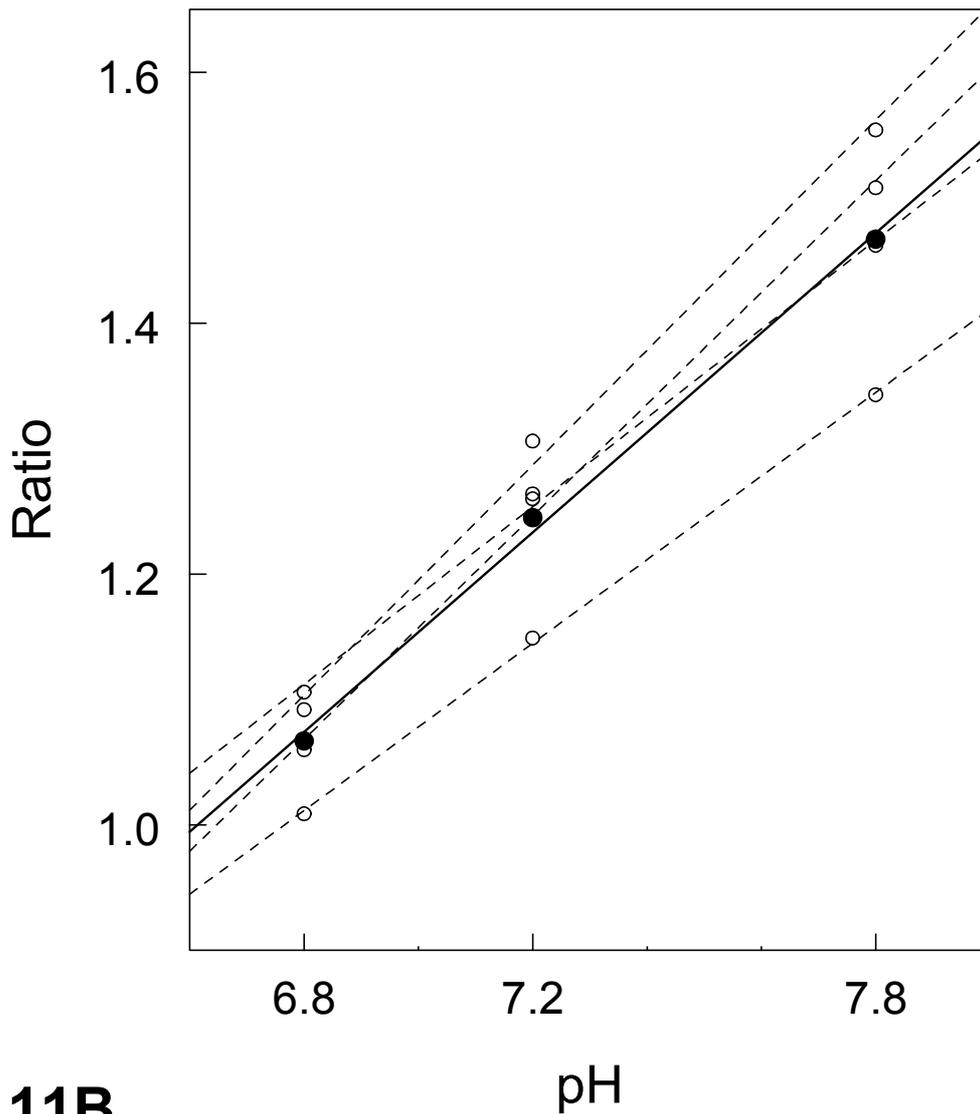
2.1.7.1 Versuchsablauf der pH-Eichung und Superfusionsmedien

Initial wurden die Zellen mit Kontrolllösung der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik überspült. Nach Einstellen einer Basislinie wurden dann Nigericinlösungen mit den pH-Werten 7,8 – 7,2 – 6,8 jeweils solange verwendet, bis sich ein Plateau einstellte.



11A

Abb. 11 Schritte der pH-Eichung: **A** Repräsentative Registrierung einer pH-Kalibrierungsmessung. Kultivierte kardiale Fibroblasten wurden zunächst mit Kontrolllösung der Ammoniumchlorid-Impulstechnik überspült. Nach Registrierung der Basislinie wurden Nigericinlösungen der pH-Werte 7,8 / 7,2 und 6,8 verwendet. **B** Zuordnung der jeweiligen pH-Werte zu „Ratio“-Werten. Der Mittelwert aus vier Kalibrierungsmessungen ergab die Eichgerade.



11B

2.1.7.1.1 Kontrolllösung der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik

Vorschrift siehe oben.

2.1.7.1.2 Nigericin Lösungen

In Aqua bidestillata wurden 120 mmol/l KCl, 1 mmol/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/l Cholinchlorid, 2 mmol/l KH_2PO_4 , 20 mmol/l HEPES, 12,5 $\mu\text{mol/l}$ Nigericin unter Rühren gelöst. Die Titration auf pH-Werte von 7,8 – 7,2 – 6,8 erfolgte mit NaOH.

Material

- Sigma: Nigericin

2.2 Kultur von kardialen Fibroblasten

2.2.1 Explantmethode

2.2.1.1 Prinzip der Explantmethode

Bei dieser Art der Zellgewinnung nutzt man die Fähigkeit von Fibroblasten zur Migration aus. Das entnommene Organ wird in kleine Stückchen zerlegt, aus denen im Falle von Herzgewebe innerhalb der ersten Woche nach Entnahme fibroblastäre Zellen, nach der zweiten Woche Glattmuskelzellen auswachsen (117).

2.2.1.1 Anwendung der Explantmethode

Hierbei wurden entweder „junge“ Ratten mit einem Körpergewicht von 150-200 g oder „adulte“ Ratten von 350 – 400 g mittels Guillotine dekapitiert. Das entnommene Herz wurde in PBS zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert. Nach Abtrennen der Herzbasis wurde das übrige Herzgewebe gründlich mit PBS zum Entfernen der Erythrozyten gespült. Anschließend wurde das Myokard mit zwei spitzen Skalpellenspitzen zerkleinert, bis Stückchen von ca. 2 mm entstanden. Diese wurden dann in vorbehandelte Petrischalen überführt. Die Vorbehandlung der Petrischalen bestand im Einritzen von kleinen Kreuzchen und in der Beschichtung mit FCS. Durch diese Maßnahmen sollte ein besseres Anheften der Zellen erreicht werden. Am ersten Tag wurden 2 ml von 20% FCS enthaltendem DMEM über die Explantstückchen gegeben. Diese dünne Flüssigkeitsschicht sollte die Diffusionsstrecke für O₂ und CO₂ zunächst kurz halten. Schrittweise wurde die Menge an Medium erhöht, indem an jedem folgenden Tag je 2 ml von 10% FCS enthaltendem Medium zugefügt wurden, bis der Mediumüberstand 8 ml betrug. Auf diese Weise wurde das später weiterhin verwandte Flüssigkeitsniveau erreicht. Ferner wurde so die initial höhere FCS-Konzentration langsam reduziert. Sie wurde zu Beginn mit 20% hoch gewählt, um den auswachsenden Zellen einen intensiven Reiz zur Proliferation durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren zu bieten. In der weiteren Kultur wurde dann Medium mit 10% FCS verwandt.

Im Laufe der ersten Woche kam es zum Auswachsen der Zellen. Nach Erreichen der Zelldichte eines Monolayers wurden die Zellen passagiert und in einem Verhältnis 1:2 bis 1:3 neu ausgesät.

2.2.2 Passagieren von Zellkulturen

Waren kultivierte Zellen konfluent, so wurden sie abgelöst und neu ausgesät. Hierzu wurde die enzymatische Behandlung mit Trypsin, EDTA und ergänzend mechanisches Ablösen mittels Abklopfen („tapping“) angewandt.

Die Adhäsion der Zellen auf ihrem Untergrund soll durch faserförmige Zytoskelettstrukturen vermittelt werden, die auf der unteren Zellfläche als sog. „attachment points“ von etwa 1 μm lokalisiert sein sollen. Die Zellen sollen so lange an das Substrat geheftet bleiben, bis die Fasern entweder mechanisch durch „tapping“ oder chemisch durch Chelatoren und/oder Trypsin unterbrochen werden (118).

Neben der proteolytischen Wirkung der Trypsin/EDTA-Lösung ist die Rolle des Chelat-Bildners EDTA zu erwähnen, da interzelluläre Brücken in Form von Desmosomen bzw. Maculae adherentes zum Erhalt ihrer Integrität Ca^{2+} -Ionen benötigen (118). Um Ca^{2+} -Ionen beim Ablösen der Zellen zu entfernen, wurde deshalb zunächst das überstehende Medium verworfen und das Monolayer mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem PBS zweimal gespült, worauf 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Kulturgefäß auf die Zellen gegeben wurden. Dabei sollte der EDTA-Anteil noch verbliebene Ca^{2+} -Ionen durch Komplexbildung entfernen. Ergänzend wurden nach Bedarf noch adhärente Zellen durch klopfen abgelöst. Zum Abstoppen der proteolytischen Trypsinwirkung wurde die Trypsin-haltige Zellsuspension mit serumhaltigem Kulturmedium aufgefüllt. Diese Suspension wurde nun zum Trennen von dem Enzymanteil bei 1100 rpm 10 Min. zentrifugiert. Zum routinemäßigen Passagieren wurde eine Lösung mit 0,05% Trypsin + 0,02 % EDTA verwandt. Zellen der Passage Null nach Auswachsen aus Explantstückchen mussten mit 0,25% Trypsin + 0,038 % EDTA gelöst werden, da hier die geringere Konzentration der Lösung zum Ablösen nicht ausreichend war.

Die in Kulturmedium resuspendierten Zellen wurden mit einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 neu ausgesetzt. Zum Weiterkultivieren wurden Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm^2 verwandt. Für fluoreszenzphotometrische Messun-

gen wurden die Zellen auf sterilen Glasplättchen mit einem Durchmesser von 25 mm ausgesät. Acht dieser Plättchen befanden sich in einer Petrischale mit einer Fläche von 58 cm².

Rattenfibroblasten konnten 20-25 mal passagiert werden. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden kardiale Rattenfibroblasten der Passagen 1 bis 15 verwandt.

2.2.3 Zellselektion durch „Differential attachment“

Um sicherzustellen, dass es sich nach Aufbereitung um Fibroblasten handelt, und um während der Kulturphase möglich viele vitale Zellen im Kulturbehälter zu bewahren, wurde die Technik des „differential attachment“ angewandt. Hierbei gibt man den Zellen nach Passagieren und Neuaussaat 1-2 Stunden Zeit sich anzuheften. Fibroblasten tun dies in kurzer Zeit, während glatte Muskelzellen hierzu eine längere Zeit benötigen (119). Nach der Zeit von 1 Stunde wurde dann der Überstand abgezogen und frisches Medium vorsichtig hinzugefügt. Die so selektionierten Zellen zeigten während des Wachstums Spindelform und bei Konfluenz ein irreguläres Wachstumsmuster.

2.2.4 Kulturmedium und Kulturbedingungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wurde entweder mit 20 Vol.% oder 10 Vol.% FCS und mit 1 Vol.% Penicillin/Streptomycin, 1 Vol.% Fungizone und 1 Vol.% Glutamin angesetzt. Entsprechende Volumina an DMEM wurden einer 500 ml-Flasche entnommen und durch die Volumina an FCS, Penicillin/Streptomycin, Fungizone und Glutamin ersetzt.

Die Aufbewahrung der Fibroblasten erfolgte im Brutschrank, wo sie konstant bei 37 C° und in Anwesenheit von 5% CO₂ inkubiert wurden.

Materialien

Gibco

- PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^-)
- FCS
- DMEM (mit 0,11 g/l Na-Pyruvat, mit Pyridoxin)
- Trypsin / EDTA (0,05% / 0,02%)
- Trypsin / EDTA (0,25% / 0,038%)
- Fungizone (Amphotericin B, 250 $\mu\text{g/ml}$)

Seromed

- Penizillin/Streptomycin (10 000 U, entspr. 10 000 $\mu\text{g/ml}$)
- L-Glutamin (200 mmol/l)

Greiner

- Kulturflaschen 75 cm^2
- Petrischale 58 cm^2

Ratten

- „Junge“ Wistar-Kyoto-Ratten 150 - 200 g
- „Adulte“ Wistar-Kyoto-Ratten 350 - 400 g

Kobe

- Glasplättchen \varnothing 25 mm

Zeiss

- Inverses Phasenkontrast-Mikroskop „Telaval 31“

Nuaire

- Brutschrank IR Autoflow

2.2.5 Identifizierung von Zellen

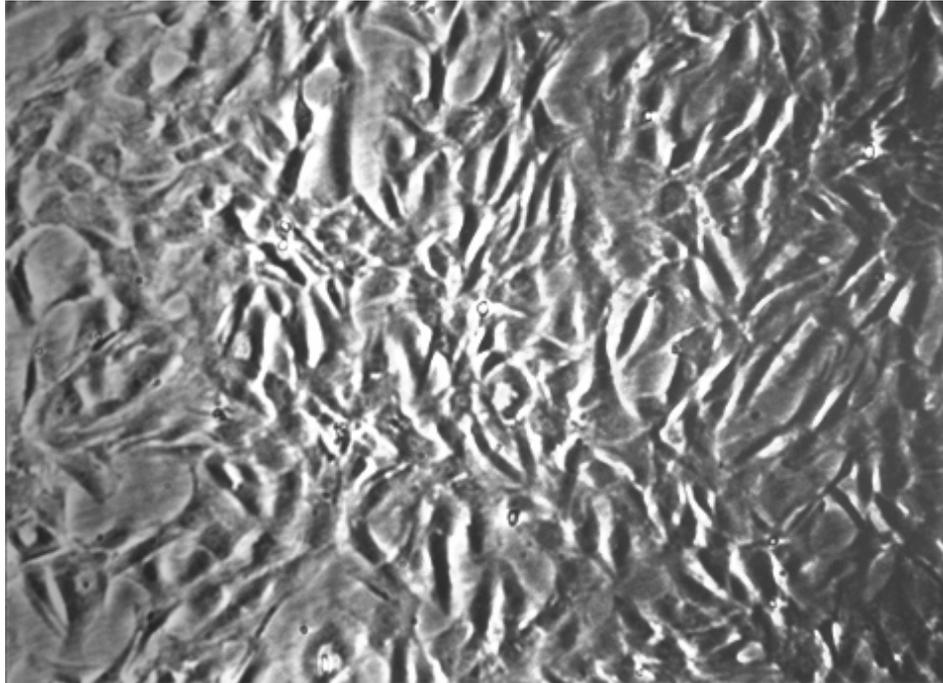
Als Grundlage zur Identifizierung der Zellen als kardiale Fibroblasten dienten die Beurteilung von Morphologie und Wachstumsverhalten sowie immunhistochemische Färbungen. Auch die Art der Zellgewinnung lässt die Annahme zu, dass kardiale Fibroblasten gewonnen wurden. Dies liegt zum einen darin begründet, dass innerhalb der ersten Woche üblicherweise Fibroblasten auswachsen, während erst innerhalb der zweiten Woche Glattmuskelzellen und Endothelzellen sogar erst in der dritten Woche aus Explantgeweben auswachsen (117). Zum anderen konnte durch das oben beschriebene „differential attachment“ die kürzere Zeit zum Anheften an die Kulturgefäße der Fibroblasten als Selektionskriterium herangezogen werden (119).

Als ein vergleichendes Kriterium wurde eine Population von aortalen Glattmuskelzellen gewonnen. Deshalb wurde im Zuge der Aufbereitung von kardialen Fibroblasten ebenfalls die Aorta thoracalis entnommen, die in ca. 2 mm dicke Aortenringe geschnitten wurde. Nach Auswachsen von Fibroblasten in der ersten Woche wurden die Aortenringe in frische Petrischalen überführt. Hier erfolgte in der zweiten Woche das Auswachsen von Glattmuskelzellen.

2.2.5.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Das Wachstumsmuster von Fibroblasten ist in Abb. 12A dargestellt. Es erscheint irregulär und ungeordnet, die einzelnen Zellen sind spindelförmig bis polygonal, was für subkonfluente Fibroblasten typisch ist (109, 117). Die schmalen spindelförmigen Glattmuskelzellen in Abb. 12B zeigen ein geordnetes Wachstumsmuster, wobei sich die Zellen in parallel gerichteter Weise in großen Wirbeln anordnen, dem klassischen „hill and valley pattern“, was den Beschreibungen in der Literatur entspricht (109, 117). Dieser lichtmikroskopische Vergleich ermöglicht eine Unterscheidung zwischen kardialen Fibroblasten und aortalen Glattmuskelzellen. Ferner sei hier erwähnt, dass Fibroblasten in den Kulturen der vorliegenden Arbeit ihre Proliferation bei Konfluenz einstellten, wohingegen Glattmuskelzellen über das gebildete Monolayer wuchsen und so mehrfache Schichten bildeten.

12A



12B

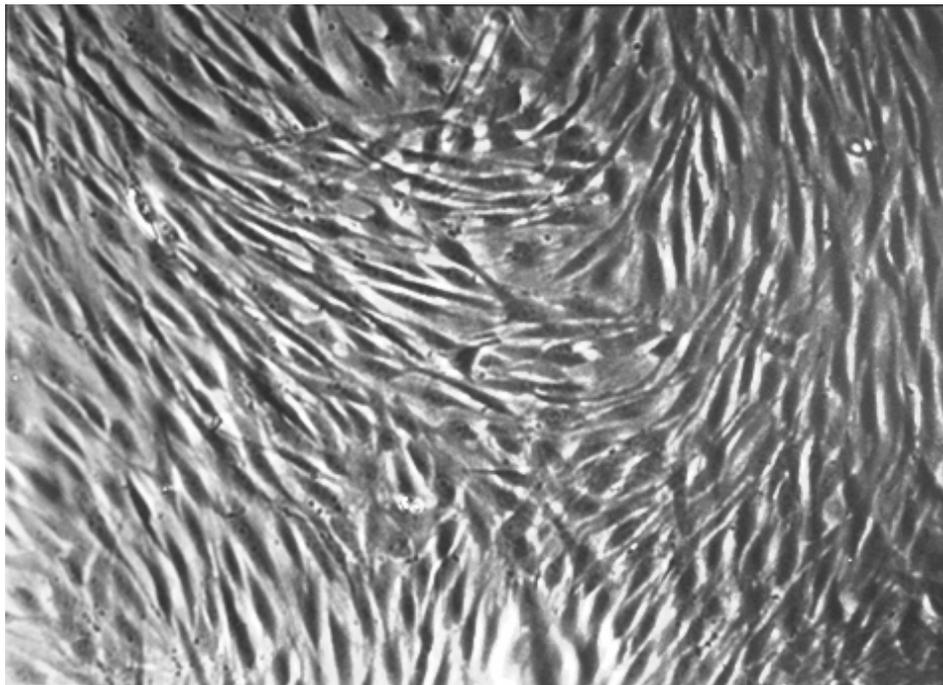


Abb.12 **A** Kardiale Fibroblasten der Ratte, **B** Aortale Glattmuskelzellen der Ratte (*Inverses Phasenkontrastmikroskop*).

2.2.5.2 Immunhistochemie

2.2.5.2.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

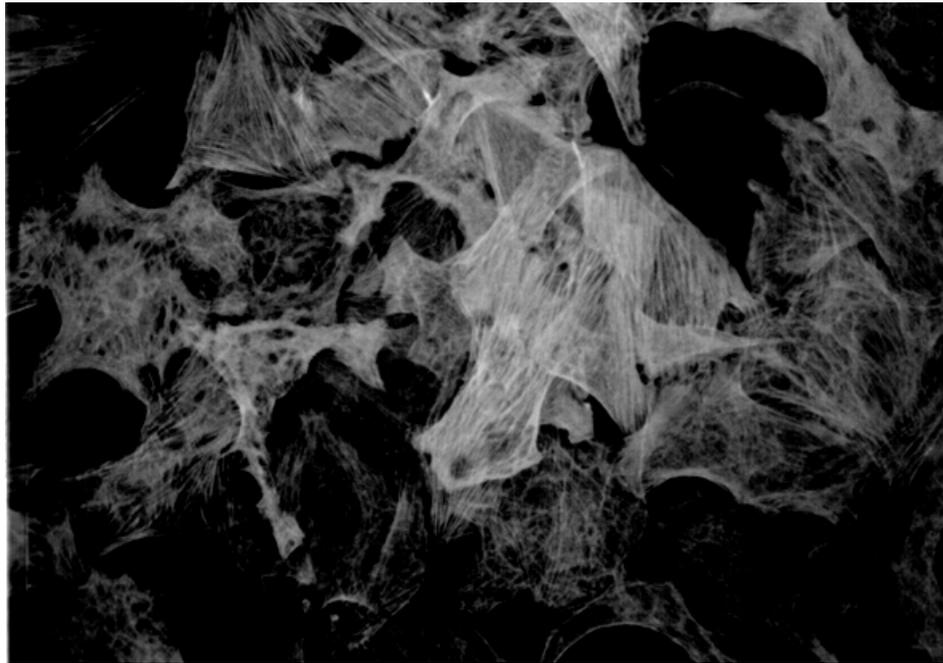
Ein monoklonaler Primärantikörper vom Kaninchen reagiert spezifisch mit antigenen Strukturen der Spezies Ratte. Ein mit Fluorescent-Isothiocyanat (FITC) konjugierter monoklonaler Antikörper, der gegen Kaninchenantikörper gerichtet ist, bindet an den Primärantikörper. Die so behandelten Zellen werden nun unter UV-Licht betrachtet. Die jeweils gefärbten Antigenstrukturen leuchten grün auf. Die Befunde werden mittels Fotografie dokumentiert. Bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen diente die Methode von Brouty-Boye (120) als Vorlage.

Monoklonale Antikörper gegen glattmuskuläres α -Aktin sind ein Marker für glatte Muskelzellen (121). Darüber hinaus markieren Anti-Glattmuskel-Aktin-Antikörper auch kardiale Fibroblasten der Ratte (122). Entsprechende Befunde zeigen Abb. 13A und B. Zwar kann durch unsere Färbung mit Anti-Aktin nicht zwischen Glattmuskelzellen und Fibroblasten differenziert werden, doch lässt sich so die Identität der beiden Zellpopulationen gegenüber anderen Typen wie z.B. Epithelzellen eingrenzen. Ein Kriterium zur Unterscheidung von Fibroblasten und Glattmuskelzellen ist die Färbung mit einem Anti-Desmin Antikörper. Entsprechend den Literaturbefunden (122) zeigt sich in den Färbungen der vorliegenden Arbeit eine negative Färbung für Desmin in Fibroblasten. Vaskuläre Glattmuskelzellen zeigen dagegen sowohl in der Literatur (121), als auch in den Färbungen der vorliegenden Arbeit eine positive Färbung für Desmin in Glattmuskelzellen (Abb. 14A und B). Zum Vergleich zeigen Abb. 15A und B Negativkontrollen, in welchen lediglich die unspezifische Hintergrundfärbung zu erkennen ist, als Primärantikörper wurde ein unspezifisches Anti-Maus-IgG verwendet.

Geräte

- UV-Mikroskop: Leica DMRXE
- Steuergerät: Mikrophotosystem Leica-Leitz DMRD

13A



13B

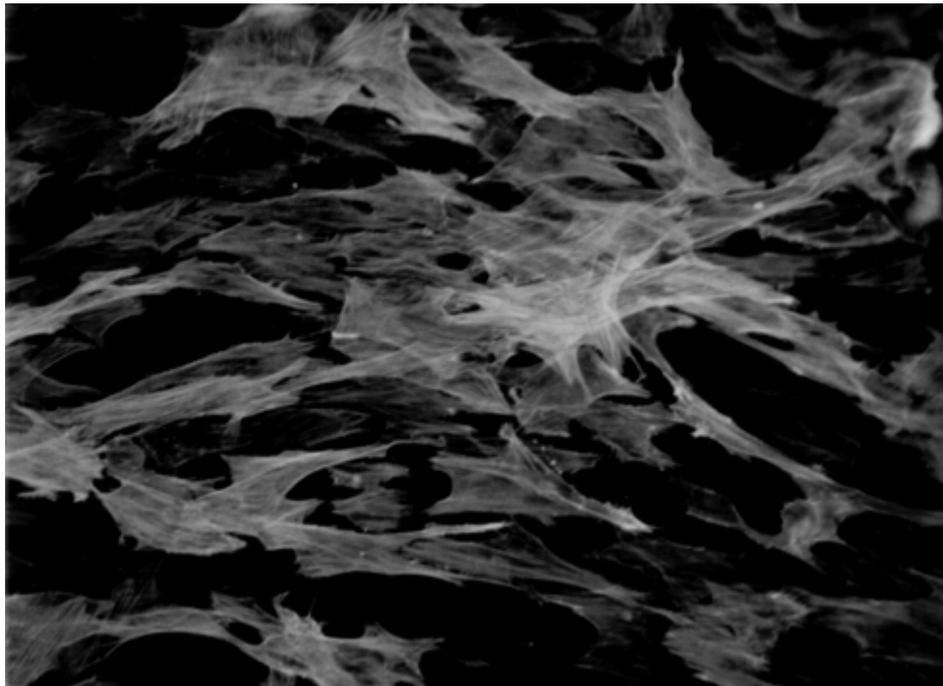
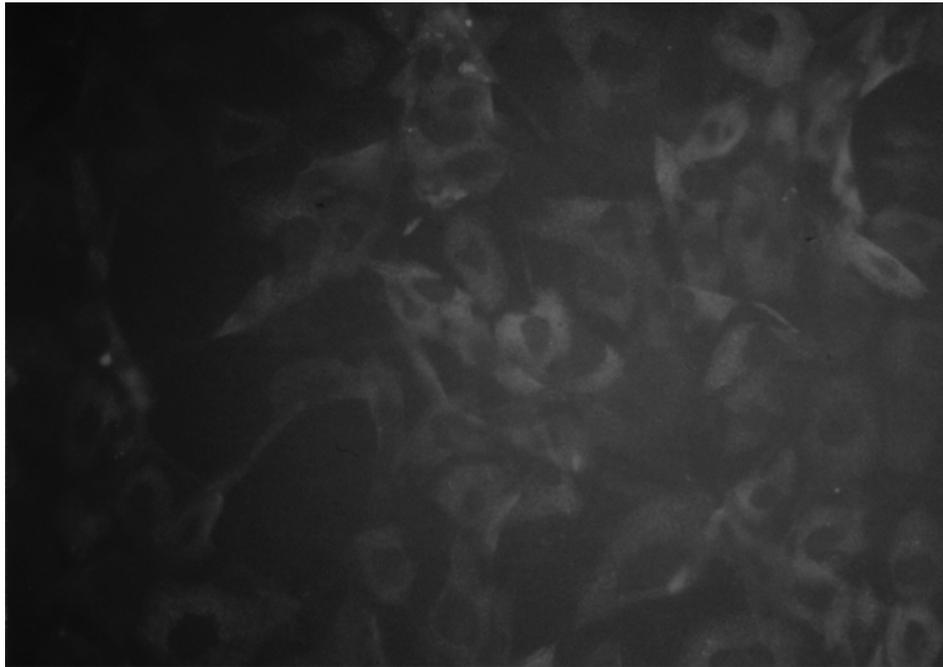


Abb. 13 *A* Kardiale Fibroblasten der Ratte, Anti- α -Aktin, **B** Aortale Glattmuskelzellen, Anti- α -Aktin (FITC-markiert, UV-Licht).

14A



14B

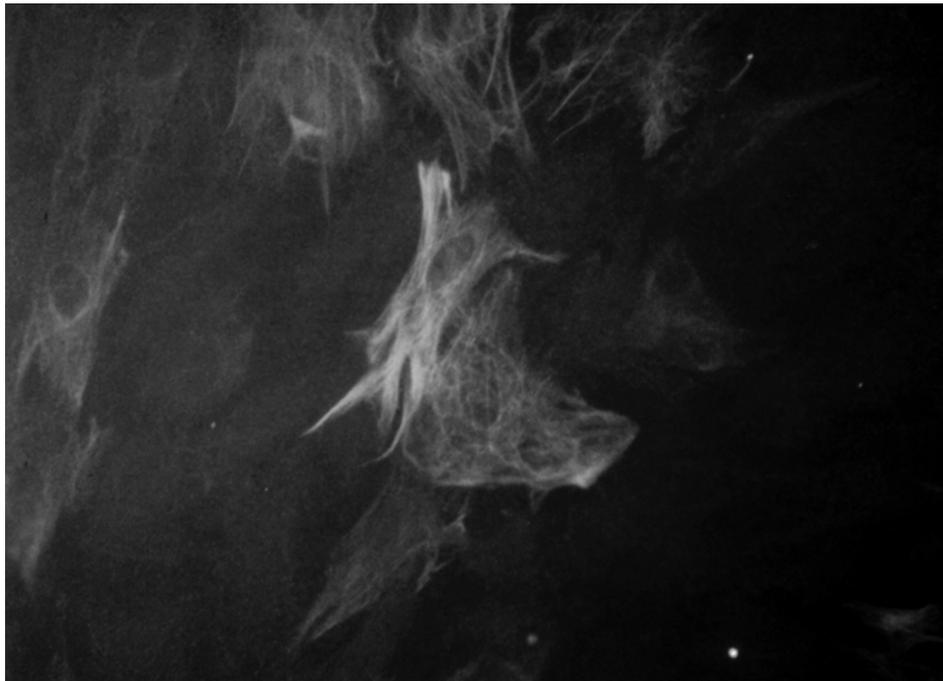
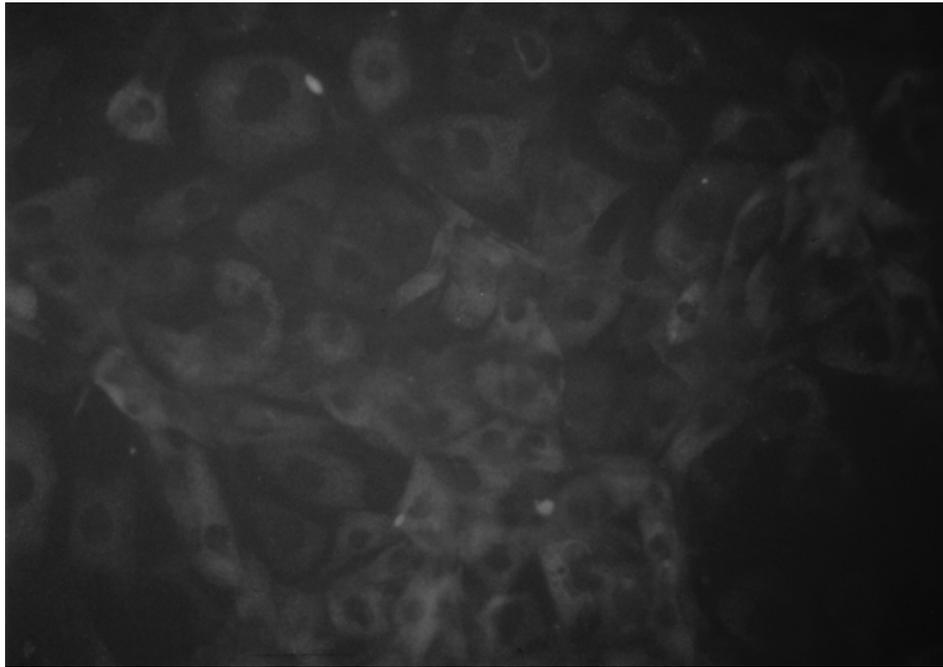


Abb.14 **A** Kardiale Fibroblasten der Ratte, Anti-Desmin, **B** Aortale Glattmuskelzellen, Anti-Desmin (FITC-markiert, UV-Licht).

15A



15B



Abb.15 *A* Kardiale Fibroblasten der Ratte, Negativkontrolle, *B* Aortale Glattmuskelzellen, Negativkontrolle (FITC-markiert, UV-Licht).

2.2.5.2.2 Immunhistochemische Färbung

Zunächst wurden die Zellen auf Glasplättchen entsprechend wie für Fluoreszenzphotometrische Messungen ausgesät und bei Konfluenz gefärbt. Die Proben wurden einmal in PBS für 5 Min. gespült. Anschließend fand die Fixation in -20 C⁰-kaltem Methanol im Kühlschrank (4 C⁰) für 15 Min. statt. Anschließend wurden die Zellen durch Waschen in PBS für wenige Minuten rehydriert. Nach Abziehen von PBS wurden die jeweiligen monoklonalen Primärantikörper zugegeben, die übernacht bei 4 C⁰ im Kühlschrank inkubiert wurden. Am darauffolgenden Morgen wurden die Proben dreimal in PBS gewaschen. Nun wurde der FITC- konjugierte Sekundärantikörper zugegeben, der für 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert wurde. Durch dreimaliges Waschen in PBS wurde er entfernt, worauf die Präparate in Histosafe - Fixationsmedium für Fluoreszenz - eingedeckt und auf Objektträger aufgebracht wurden.

2.2.5.2.3 Ansatz der Antikörper

Um ein bewachsenes Glasplättchen mit Antikörperlösungen zu benetzen war ein Volumen von 240 µl nötig. Es wurden entsprechende Volumenanteile von Antikörperlösungen der jeweiligen Firmen in Eppendorf-Gefäße vorgelegt. Auch ein 3%iger Volumenanteil von FCS wurde zum Blocken unspezifischer Bindungen in das Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Darauf wurde dann mit entsprechenden Volumina von PBS auf 240 µl aufgefüllt. Auf diese Weise entstanden Antikörperlösungen folgender Verdünnungen:

<i>Primärantikörper:</i>	Anti- α -SM-Aktin:	1:40
	Anti-Desmin:	1:40
	Anti-unspezifisch	1:40
<i>Sekundärantikörper:</i>	Anti-Mouse-FITC-konjugiert	1:50

Material

- Anti- α -SM-Aktin Klon 1A4, *Sigma*
- Anti-Desmin, Klon D33, *Dako*
- Anti-unspezifisch, *Dako*
- Anti-Mouse- FITC-konjugiert, *Dako*

2.3 Kultur einer Zelllinie aus Phäochromozytomzellen

Ein Bestandteil der Untersuchungen war die Wirkung von Moxonidin auf die Regulation des intrazellulären pH. In der Literatur wird versucht, den Wirkmechanismus dieser Imidazolin-Verbindung durch seine Affinität zu dem sogenannten Imidazolin-Rezeptor zu erklären. Dieser ist im Sinne eines Proteins bis heute nicht nachgewiesen worden. Lediglich anhand von ³H-Clonidin-Bindungsstudien wird sein Vorkommen wahrscheinlich gemacht (123). Mit entsprechenden Essays wurden Imidazolin-Bindungsstellen in PC12-Zelllinien aus Phäochromozytomzellen nachgewiesen (123, 124), während PC12-Zellen keine α_2 -Rezeptoren besitzen (123). Deshalb lag der Gedanke nahe, diese Zellen zu kultivieren und vergleichend mit Fibroblasten bezüglich der pH-Regulation und des Einflusses von Moxonidin auf die pH-Regulation zu untersuchen. Leider überstieg der Aufwand gewissenhafter Untersuchungen dieser Zellart den zeitlichen Rahmen dieser Promotionsarbeit. Dennoch soll hier die Methode der Kultivierung von Phäochromozytomzellen Erwähnung finden.

2.3.1 Phäochromozytom

Phäochromozytome sind zu 90% benigne Tumoren des chromaffinen Gewebes, die in zwei Dritteln der Fälle Adrenalin und Noradrenalin sezernieren. Maligne Phäochromozytome sezernieren auch Dopamin. Lokalisiert sind Phäochromozytome zu 85% im Nebennierenmark, der Rest in abdominellem oder thorakalen Grenzstrang als Paragangliom (125).

2.3.2 Kultur von Phäochromozytomzellen

Freundlicherweise wurde uns von Herrn Dr. Eichelmann, Solvay Pharma Hannover, eine Zelllinie von Phäochromozytomzellen (PC12) zur Verfügung gestellt. Bei einer Zelllinie handelt es sich um Zellen, deren Teilungsfähigkeit bedingt durch tumorartige Veränderungen uneingeschränkt fortbesteht. Somit ist es möglich, diese Zellen über beliebig viele Passagen in Kultur zu halten. Besonderheit der PC12-Zelllinie ist die Art der Kultur. Es handelt sich um eine Suspensionskultur, bei der die Zellen weniger zum Adhärenz neigen, als es Fibroblasten tun. Viele der Zellen schweben im überstehenden Kulturmedium, wo sie sich gut sichtbar vermehren. Um diese Zellen mit frischem Nährsubstrat

zu versorgen, wurden sie abzentrifugiert und in einem neuen vorbehandelten Kulturgefäß resuspendiert und ausgesetzt. Auch derjenige Anteil der Zellen, welcher adhärierte, wurde weiter zusammen mit den in Suspension schwebenden Zellen passagiert. Diese Zellen wurden analog der oben beschriebenen Ablösung von Fibroblasten mit Trypsin/EDTA passagiert. Das Aussetzen der PC12-Zellen erforderte die Vorbehandlung der Kulturbedingungen, um die Adhärenz zu verbessern. Deshalb wurden die Kulturgefäße entweder mit Kollagen S beim Aussäen auf Glasplättchen oder mit Poly-L-Lysin beim Aussäen in Kunststoff-Kulturflaschen beschichtet. Die Neuaussaat fand in einem Verhältnis von 1: 3 statt.

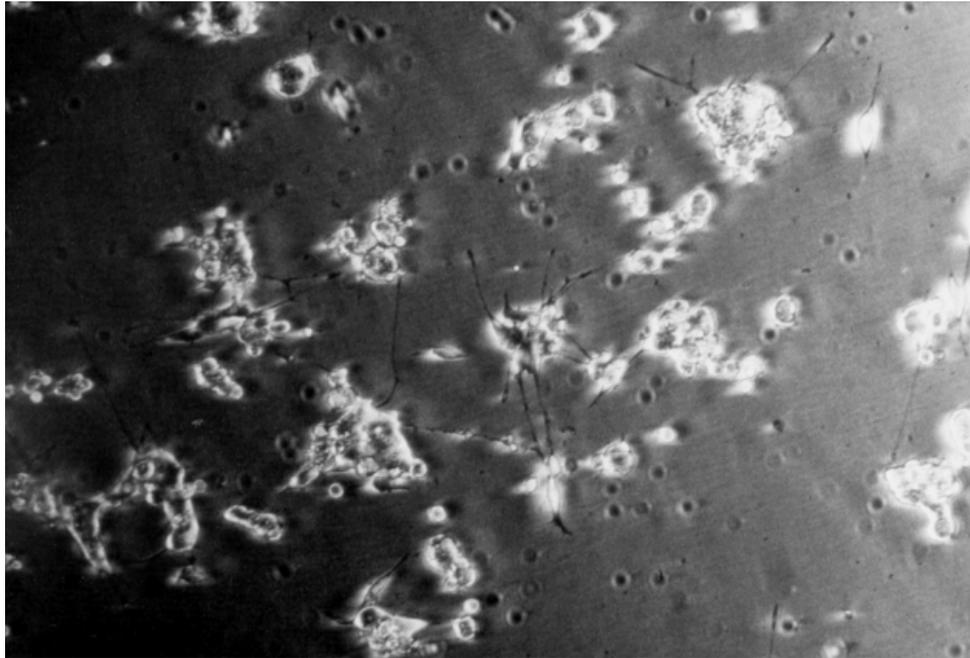
Durch Zugabe von Nervenwachstumsfaktor (123) oder Mangan-Salzen können PC12 Zellen zu einer Art Differenzierung angeregt werden (126). Dies wurde zunächst mithilfe von Manganchlorid versucht. Es war zu beobachten, dass die undifferenzierten Zellen, die klein und rund erschienen, während der Zellkern nicht abgrenzbar war, sich unter dem Einfluß des Mangan-Ions zu größeren Zellen mit abgrenzbarem Zellkern und neuritenartigen Ausläufern entwickelten (Abb.16A u. B). Dieser Vorgang wurde an adhärierenden Zellen beobachtet.

2.3.3 Kulturmedium und Kulturbedingungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wurde mit 10 Vol.% Pferdeserum und 5 Vol.% FCS sowie mit 1 Vol.% Penicillin/Streptomycin, 1 Vol.% Fungizone und 1 Vol.% Glutamin angesetzt. Entsprechende Volumina an DMEM wurden einer 500 ml-Flasche entnommen und durch entsprechende Volumina an FCS, Penicillin/Streptomycin, Fungizone und Glutamin ersetzt. Wenn erwünscht, wurden 50 ml des so hergestellten Kulturmediums 9,9 mg $MnCl_2$ hinzugefügt, sodass eine Mangan-Konzentration 1 mmol/l vorlag.

Die Aufbewahrung der PC12 -Zellen erfolgte im Brutschrank, wo sie konstant bei 37 °C und in Anwesenheit von 5% CO_2 inkubiert wurden.

16A



16B

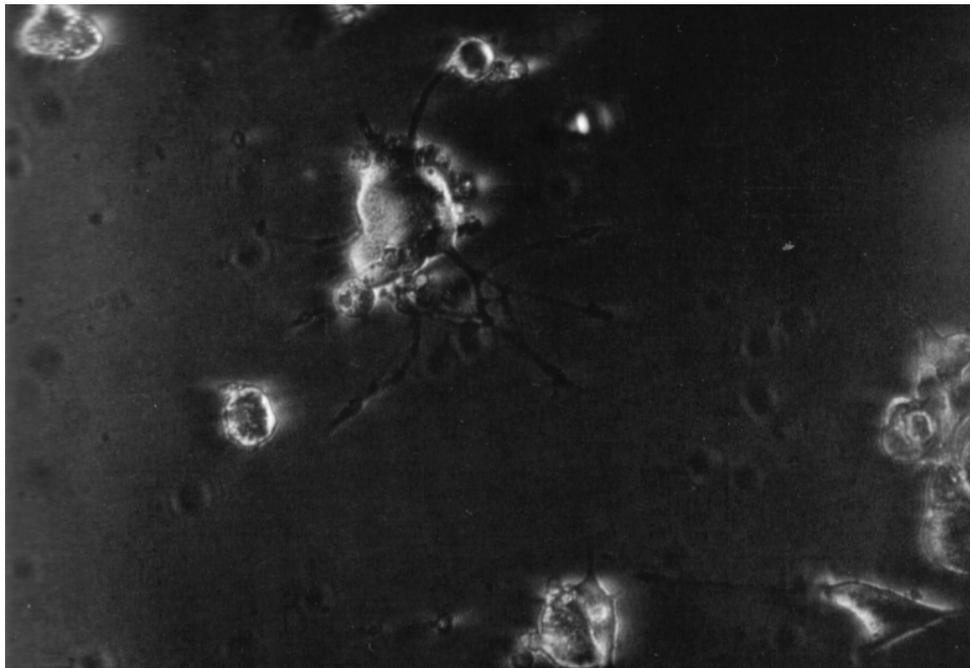


Abb. 16 PC12-Zellen (Phasenkontrastmikroskop) in Anwesenheit von Mangan. **A** Differenzierte Zellen mit neuritenartigen Ausläufern neben undifferenzierten kleinen runden Zellen **B** Differenzierte PC12-Zelle in Vergrößerung (Inverses Phasenkontrast-Mikroskop).

2.3.4 Beschichtung mit Kollagen S

Zum Vermehren der Zellzahl von PC12 -Zellen wurden diese in Kulturflaschen aus Plastik ausgesät. Um das Anheften zu verbessern, wurden die Behälter mit Kollagen S beschichtet. Dabei betrug die Kollagenmenge $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Zunächst wurden $96 \mu\text{l}$ der Kollagen S -Lösung, welche das Protein in einer Konzentration von $3 \text{ mg}/\text{ml}$ enthielt, in einem Mischgefäß vorgelegt und mit $1904 \mu\text{l}$ PBS auf 2 ml aufgefüllt. Dieses Volumen wurde in eine Kulturflasche gegeben. Nach Eintrocknen der Lösung wurden PC12-Zellen ausgesät.

2.3.5 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

An Glasplättchen angeheftete PC12 -Zellen konnten in der fluoreszenzphotometrischen Versuchsanordnung untersucht werden. Um das Anheften zu erleichtern, wurden die Glasplättchen vor der Aussaat mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wurde die gelieferte Lösung mit der ursprünglichen Konzentration genutzt. Ein Volumen von 2 ml Poly-L-Lysin wurde auf eine Petrischale gegeben, die 8 Glasplättchen enthielt. Nach Eintrocknen der Lösung wurden PC12-Zellen ausgesät.

2.3.6 Fluoreszenzphotometrische pH-Messungen in PC12-Zellen

In Pilotexperimenten wurden fluoreszenzphotometrische pH-Messungen an adhätierenden PC12 Zellen mit der Ammoniumchloridimpulstechnik durchgeführt (Abb. 16C). Hierfür wurden sowohl undifferenzierte runde Zellen als auch mit neuritenartigen Ausläufern differenzierte Zellen verwendet. Letztere waren in Anwesenheit von Mangan kultiviert worden.

Die Kurvenverläufe waren bezüglich der Erholung von pH-Auslenkungen nicht homogen. Sowohl Zellen mit einer raschen Erholung aus intrazellulärer pH-Erhöhung, als auch Zellen mit deutlich verzögerter Erholung wurden beobachtet. Dies war ebenso bei nichtdifferenzierten Zellen, die ohne Mangan kultiviert waren, der Fall, als auch bei differenzierten Zellen, die mit Mangan kultiviert waren. Allerdings muss bei den differenzierten PC12 Zellen angemerkt werden, dass beim Einstellen der Zellen auch nicht differenzierte Zellen mit im Bild waren.

Um weitergehende Aussagen über die Veränderungen des intrazellulären pH in PC12-Zellen treffen zu können wären also weitere umfangreiche Un-

tersuchungen nötig. Diese würden einerseits einen größeren Stichprobenumfang bieten, sodass Streuungen besser erkannt werden könnten, zum anderen könnte der Einfluß der manganinduzierten Differenzierung genauer untersucht werden. Dabei müsste streng darauf geachtet werden, dass lediglich differenzierte Zellen untersucht werden.

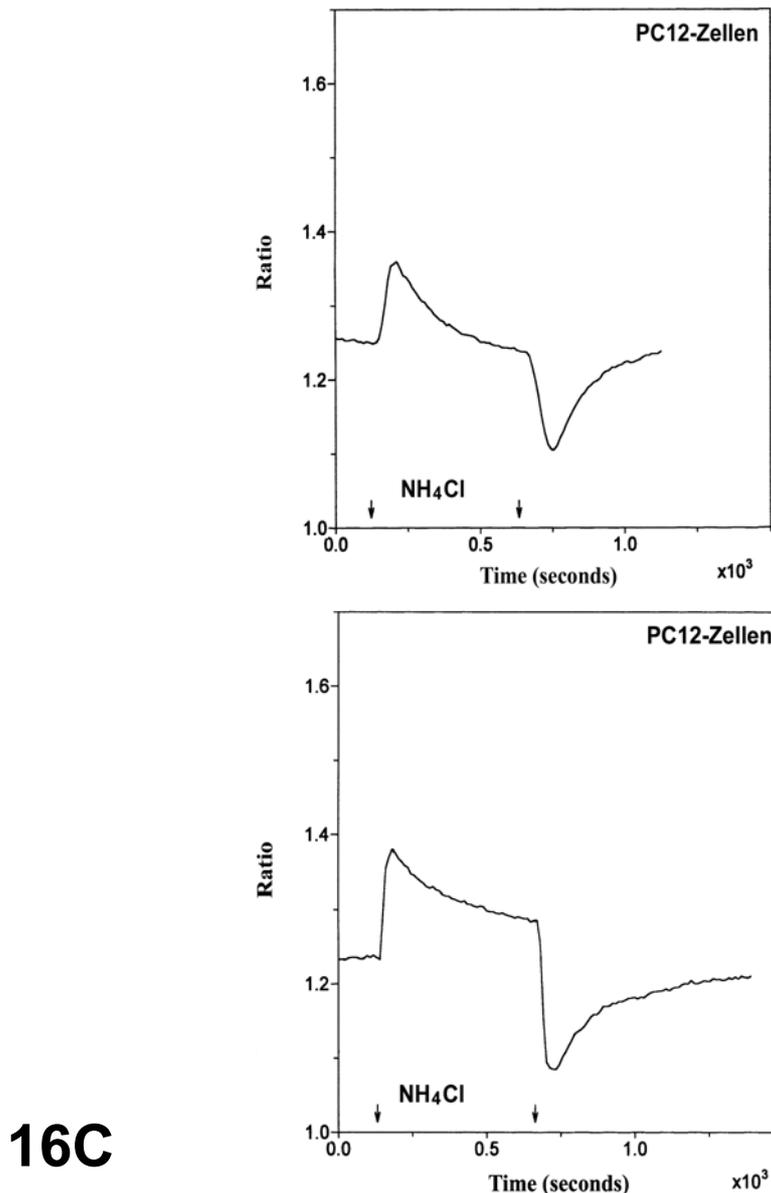


Abb. 16C Antwort des intrazellulären pH von BCECF-beladenen kultivierten PC12-Zellen auf einen 5 mmol/l NH₄Cl-Impuls. Repräsentative Messungen in Original-Registrierung mit der „Fluoreszenz-Ratio“. Pfeile markieren das Zufügen und Auswaschen von NH₄Cl, ein Anstieg der „Ratio“ markiert einen Anstieg des intrazellulären pH, ein Abfall eine Senkung des pH. Dargestellt sind unterschiedliche Antworten auf den Impuls jeweils unter Kontrollbedingungen. In beiden Messungen lagen mit Manganchlorid inkubierte Zellen vor. Analoge Kurvenverläufe wurden auch an nicht mit Manganchlorid inkubierten Zellen beobachtet (ohne Abbildung).

Material

Gibco

- Pferdeserum

Sigma

- $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
- Poly-L-Lysin, 0,01%

Boehringer

- Kollagen S Typ I, 3 mg/ml

2.4 Statistische Analysen

Die einzelnen verwendeten statistischen Tests sind im Ergebnisteil in Verbindung mit den jeweiligen Abbildungen aufgeführt. Dabei fand folgende Software Verwendung:

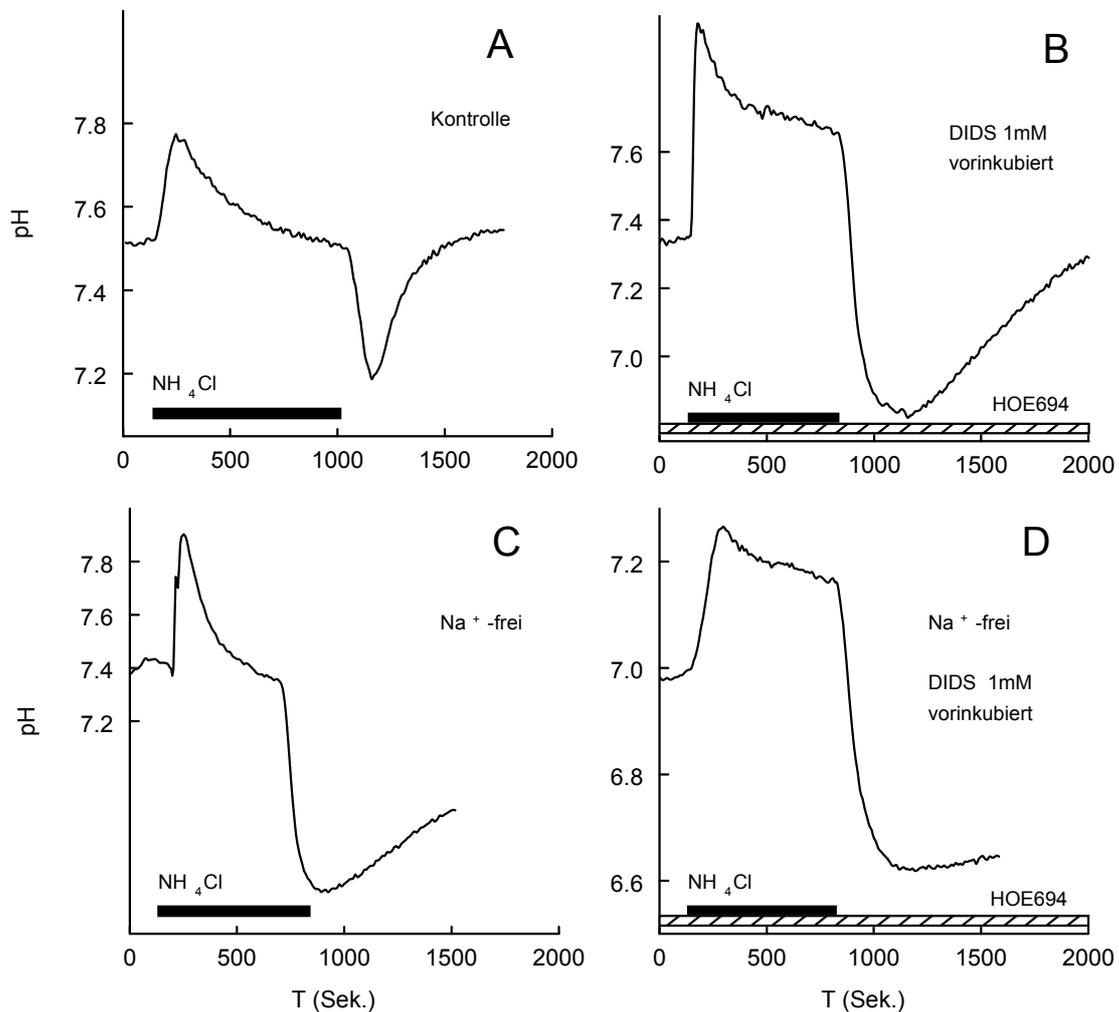
- Statistica (StatSoft, Tulsa Oklahoma, USA),
- InStat (GraphPad, CA San Diego, USA)
- Slide Write Plus (Encinitas, California, USA).

Wie unten angegeben, wurde zur Herstellung gleicher Varianzen eine Arcus-sinuustransformation nach „Zar“ (127) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die pH-regulierenden Systeme kardialer Fibroblasten der Ratte und ihre pharmakologische Beeinflussung durch etablierte Hemmsubstanzen von Ionen transportern, durch Veränderungen des extrazellulären Ionenmilieus und durch das Antihypertensivum Moxonidin wurden mithilfe der Fluoreszenzphotometrie untersucht.

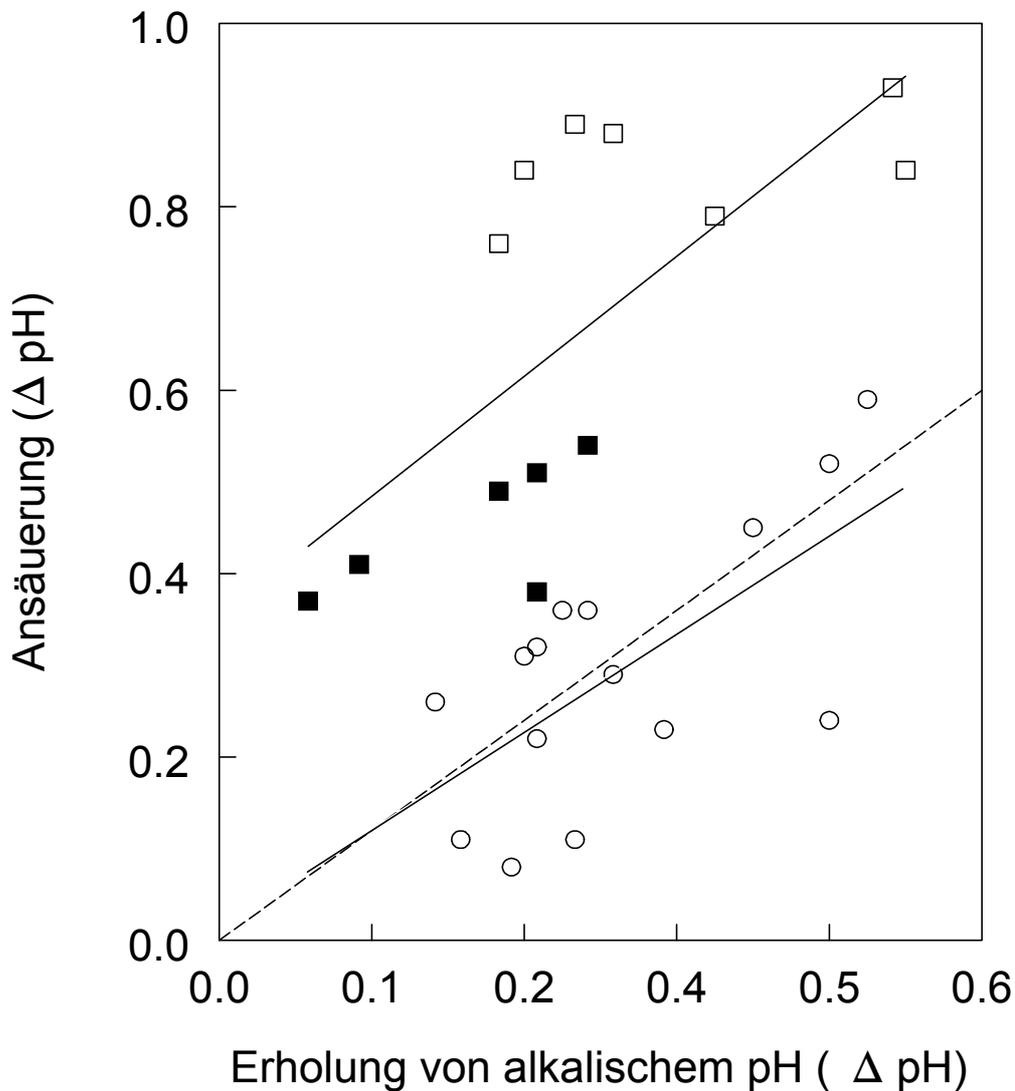
Die Ammoniumchlorid-Impuls-Technik wurde verwandt, um pH-Regulationssysteme während der Phase der intrazellulären Alkalinisierung unter Anwesenheit von 5 mmol/l NH_4Cl und der darauffolgenden Phase der intrazellulären Ansäuerung nach dem Entzug von NH_4Cl zu untersuchen (Abb. 17A). Der Betrag der pH-Erholung von der Alkalinisierung war linear mit dem Betrag der Ansäuerung korreliert ($p < 0,05$; Abb. 18A). Um Einflüsse der Hemmung von AE, CHE, NHE, NBC und NDAE zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit 10^{-3} mol/l DIDS für 30 Min. vorinkubiert und anschließend mit 10^{-5} mol/l HOE694 überspült. Sowohl die Erholung von der Alkalinisierung, als auch von der Ansäuerung wurden vermindert (Abb. 17B). Wurden Fibroblasten mit einer Na^+ -freien Lösung überspült, so blieb die Erholung von der Alkalinisierung unbeeinflusst, während die Erholung aus dem Säuren vermindert wurde (Abb. 17C). Zusätzliche Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS und Zufügen von HOE694 zur Na^+ -freien Lösung verminderten wieder die Erholung aus dem Alkalischen während sie auf die Erholung aus dem Säuren keinen zusätzlichen Effekt bezüglich der Säurebelastung 1 Min. nach Erreichen des Minimums hatten (Abb. 20B).



17

Abb.17 Antwort des intrazellulären pH von BCECF-beladenen kultivierten kardialen Fibroblasten auf einen 5 mmol/l NH_4Cl -Impuls. Repräsentative Messungen des pH im zeitlichen Verlauf während Zugabe von NH_4Cl (gefüllter horizontaler Balken) und darauffolgendem Auswaschen. **A** Kontrolllösung, **B** Zugabe von 10^{-5} mol/l HOE694 (schraffierter horizontaler Balken) bei mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubierten Fibroblasten, **C** Na^+ -freie Lösung, **D** Na^+ -freie Lösung und Zugabe von 10^{-5} mol/l HOE694 bei mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubierten Fibroblasten.

Überspülen der Fibroblasten mit Na⁺-freier Lösung erhöhte signifikant ($p < 0,05$, Abb. 18B) den Betrag der Ansäuerung nach einem NH₄Cl-Impuls. Vorinkubation mit 10⁻³ mol/l DIDS und Zufügen von 10⁻⁵ mol/l HOE694 zur Na⁺-freien Lösung konnte diese vergrößerte Ansäuerung gegenüber der Na⁺-freien Lösung signifikant reduzieren ($p < 0,05$, Abb. 18B), jedoch blieb der Betrag der Ansäuerung immernoch signifikant größer als unter Kontrollbedingungen ($p < 0,05$, Abb. 18B). Die Korrelation vom Betrag der Erholung aus dem Alkalischen mit dem Betrag der Erholung aus dem Säuren folgte daher im Fall der Na⁺-freien Anwendungen nicht mehr einer Einheitsgerade (Abb. 18A). Auch bei einer (Na⁺-haltigen) Kontrolllösung vergrößerte die gleichzeitige Anwesenheit von DIDS und HOE694 den Betrag der Ansäuerung gegenüber den Kontrollen signifikant ($p < 0,05$, Abb. 18B).



18A

Abb.18A Verhältnis zwischen dem Betrag der Erholung von der NH_4Cl -induzierten Alkalinisierung und dem Betrag der darauffolgenden Ansäuerung in BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten. Überspülen mit (Na^+ -haltiger) Kontrolllösung (○) und Na^+ -freier Lösung bei Kontroll-Fibroblasten (□) bzw. bei mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubierten Fibroblasten in Anwesenheit von 10^{-5} mol/l HOE694 (■). Für die Kontrolle betrug der Korrelationskoeffizient $r = 0,67$ ($p < 0,05$, „Statistica“), die Korrelationsgerade lautete $y = 0,9x + 0,01$ („Slidewrite“). Für die Na^+ -freien Anwendungen betrug der Korrelationskoeffizient $r = 0,7$ ($p < 0,05$, „Statistica“), die Korrelationsgerade lautete $y = 1,1x + 0,35$ („Slidewrite“).

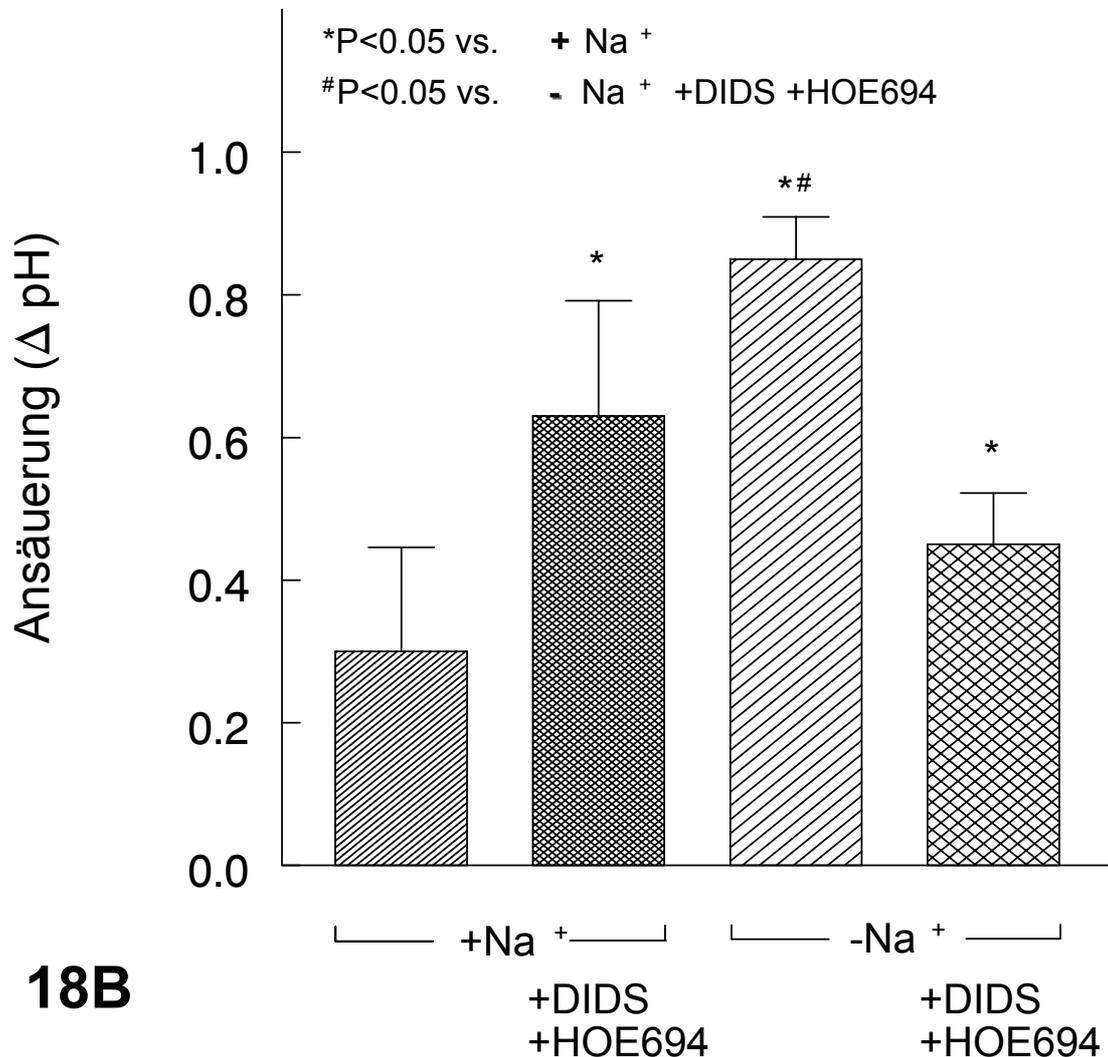
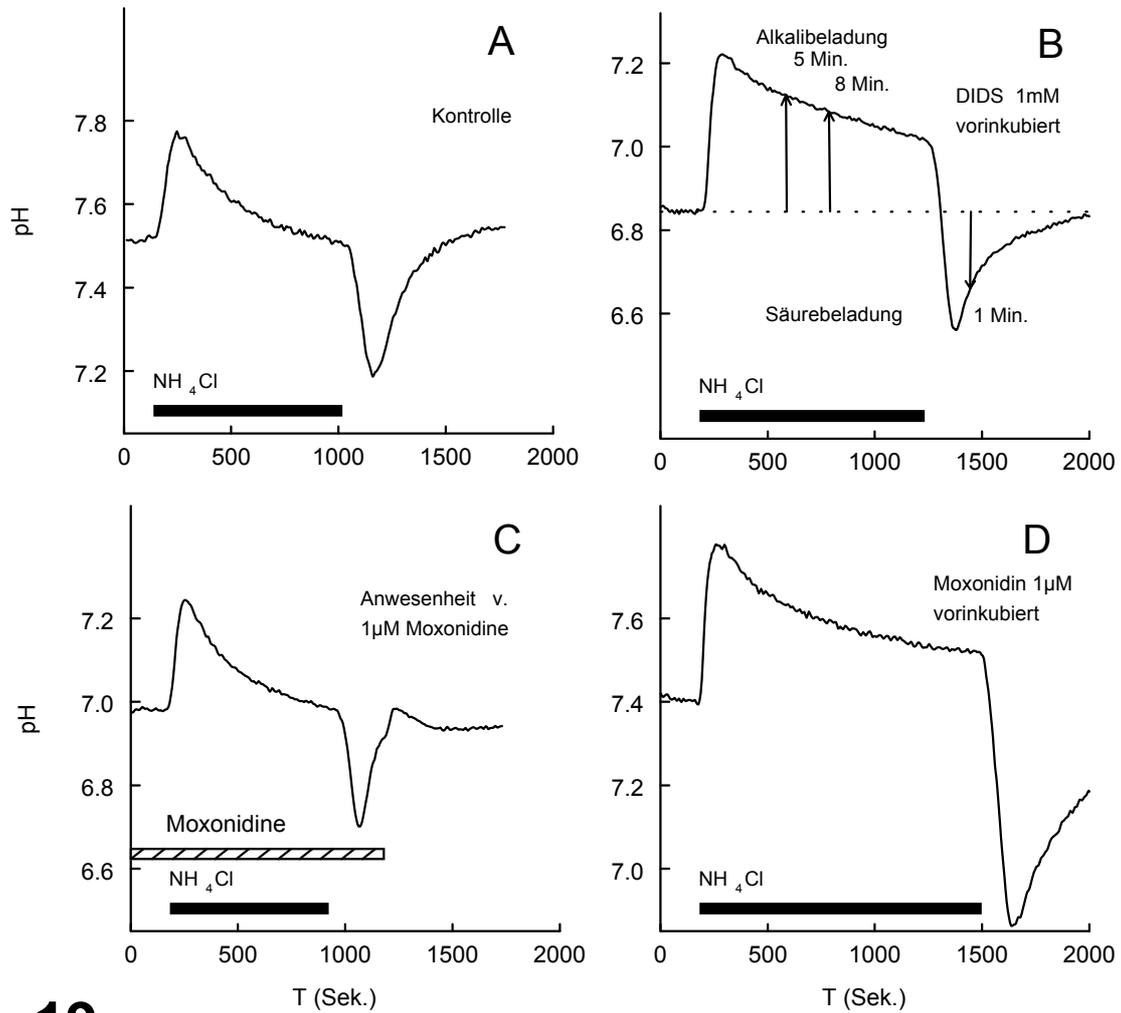


Abb.18B Verhältnis zwischen dem Betrag der Erholung von der NH_4Cl -induzierten Alkalinisierung und dem Betrag der darauffolgenden Ansäuerung in BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten. Mittelwert \pm Standardabweichung des Betrages der Ansäuerung von Fibroblasten in Gegenwart von Na^+ -haltiger Kontrolllösung und von Na^+ -freier Lösung. Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS und Zugabe von 10^{-5} mol/l HOE694 zu Na^+ -haltiger Kontrolllösung erhöhten den Betrag der Ansäuerung ($p < 0,05$, „Statistica“). Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS und Zugabe von 10^{-5} mol/l HOE694 zu einer Na^+ -freien Lösung reduzierten den Betrag der Ansäuerung gegenüber einer Na^+ -freien Lösung ohne Inhibitoranwendung ($p < 0,05$, „Statistica“). Eine Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test („Statistica“), Gleichheit der Varianzen mittels Levene-Test („Statistica“) und statistische Signifikanzen mittels Duncan-Test („Statistica“) überprüft.



19

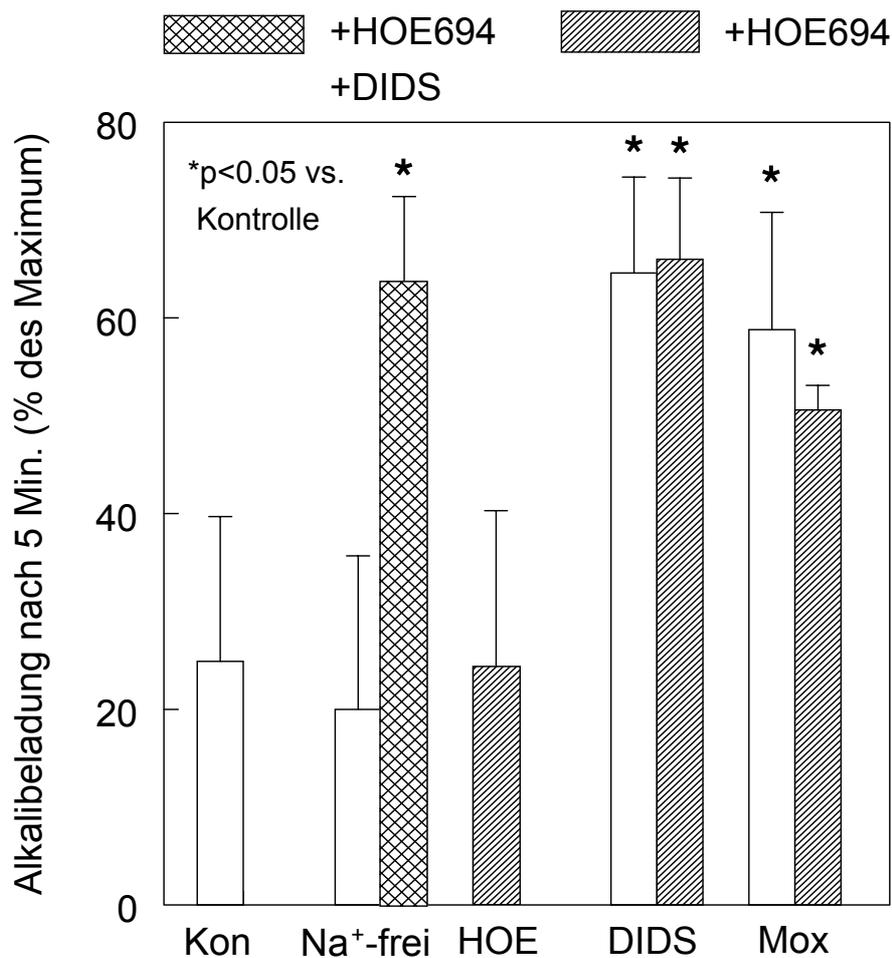
Abb.19 Antwort des intrazellulären pH von BCECF-beladenen kultivierten kardialen Fibroblasten auf einen 5 mmol/l NH_4Cl -Impuls. Repräsentative Messungen des pH im zeitlichen Verlauf während Zugabe von NH_4Cl (horizontaler Balken) und darauffolgendem Auswaschen. **A** Kontrolllösung, **B** mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubierte Fibroblasten (Messung in Abwesenheit von DIDS), **C** akutes Überspülen mit 10^{-6} mol/l Moxonidin und **D** mit 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubierte Fibroblasten (Messung in der Abwesenheit von Moxonidin).

Die alleinige Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS ohne die Anwesenheit von HOE694 in der Superfusionslösung verminderte die Erholung von der Alkalinisierung (Abb. 19B). Kurzfristiges Überspülen der Fibroblasten mit Moxonidin veränderte die Erholung von der Alkalinisierung nicht signifikant (Abb. 19C, Tab. 1), während der Hemmeffekt auf die Erholung von der Alkalinisierung nach Vorinkubation der Fibroblasten mit 10^{-6} mol/l Moxonidin statistisch signifikant war (Abb. 19D, Tab. 1).

Tab. 1 Wirkung von Moxonidin, Clonidin und Guanabenz auf Veränderungen der Alkalibeladung BCECF-beladener kultivierter kardialer Fibroblasten nach einem NH_4Cl -Impuls, gemessen 5 und 8 Minuten nach Erreichen des pH-Maximums in Prozent des maximal erreichten pH.

	nach 5 min	nach 8 min
Kontrolle	24.9 ± 14.8 %	14.4 ± 10.8 %
Moxonidin (akut)	38.2 ± 8.0 %	21.9 ± 10.2 %
Guanabenz (vorinkubiert)	20.6 ± 5.2 %	9.9 ± 2.7 %
Moxonidin (vorinkubiert)	58.8 ± 12.0 % *	41.9 ± 24.4 % *
Clonidin (vorinkubiert)	47.6 ± 14.2 % *	39.8 ± 15.3 % *

Die Werte sind Mittelwert und Standardabweichung von 3-5 Experimenten. Fibroblasten waren entweder unbehandelt (Moxonidin, akut) oder wurden mit 10^{-6} mol/l Moxonidin, Clonidin oder Guanabenz für 30 min. vorinkubiert (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle. „Statistica“).



20A

Abb. 20A Zeitabhängige Veränderungen der Alkalibeladung von BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten während des NH_4Cl -Impulses. Die Beladung mit basischen Valenzen wurde 5 Min. nach Erreichen des Maximums der Alkalinisierung in Prozent des Maximums bestimmt. Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 3-4 Messungen, welche je 13 ± 1 subkonfluente Fibroblasten erfasste. Überspült wurden die Zellen mit Standardlösungen (Kon.), natriumfreier Lösung und 10^{-5} mol/l HOE694 enthaltenden Standardlösungen. Mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubierte Fibroblasten wurden entweder mit Standardlösungen oder 10^{-5} mol/l HOE694 enthaltenden Standardlösungen überspült. Eine Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test („Statistica“) überprüft. Gleichheit der Varianzen wurde mittels Arcussinus-Transformation hergestellt (nach „Zar“) und mithilfe des Levene-Tests überprüft („Statistica“). Statistische Signifikanzen wurden mittels Duncan-Test („Statistica“) überprüft.

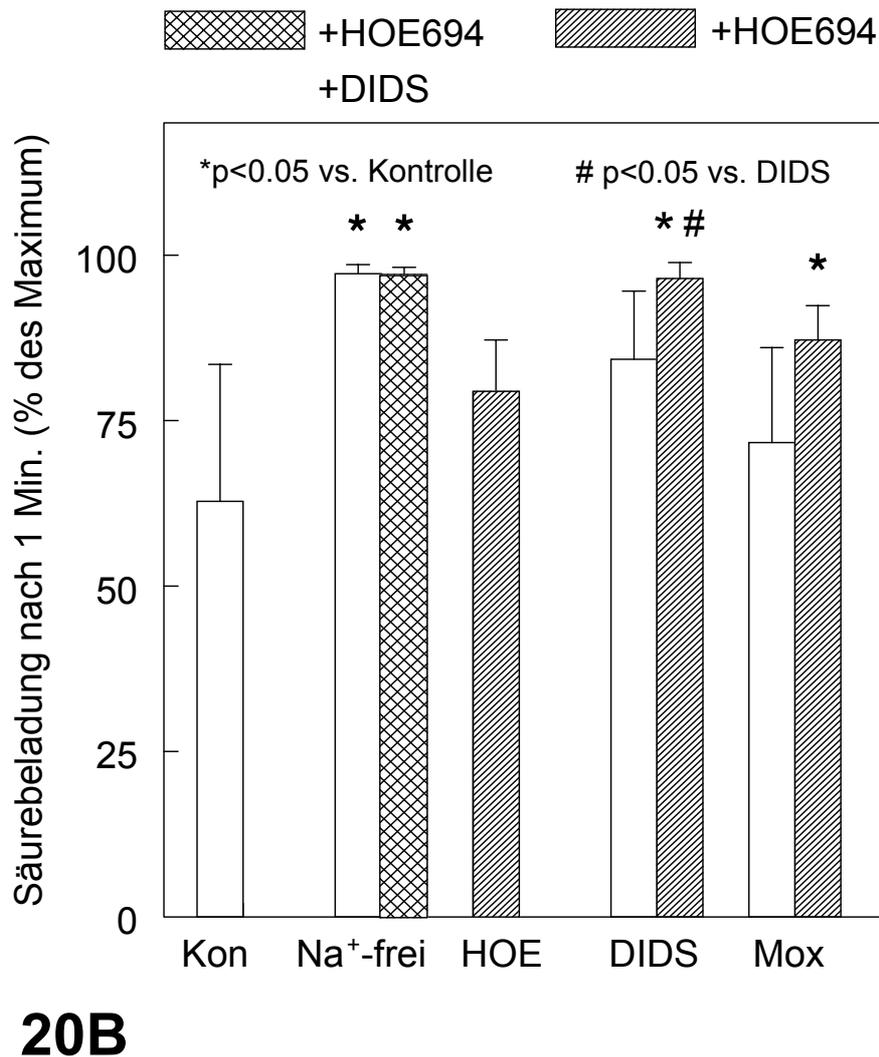


Abb. 20B Zeitabhängige Veränderungen der Säurebelastung von BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten nach einem NH_4Cl -Impuls. Die Beladung mit sauren Valenzen wurde 1 Min. nach Erreichen des Maximums der Ansäuerung als Prozentwert des jeweiligen Maximums bestimmt. Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 3-4 Messungen, welche je 13 ± 1 subkonfluente Fibroblasten erfasste. Überspült wurden die Zellen mit Standardlösungen (Kon.), natriumfreier Lösung und 10^{-5} mol/l HOE694 enthaltenden Standardlösungen. Mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubierte Fibroblasten wurden entweder mit Standardlösungen oder 10^{-5} mol/l HOE694 enthaltenden Standardlösungen überspült. Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test („Statistica“) überprüft. Gleichheit der Varianzen wurde mittels Arcussinus-Transformation hergestellt (nach „Zar“) und mithilfe des Levene-Tests („Statistica“) überprüft. Statistische Signifikanzen wurden mittels Duncan-Test („Statistica“) überprüft.

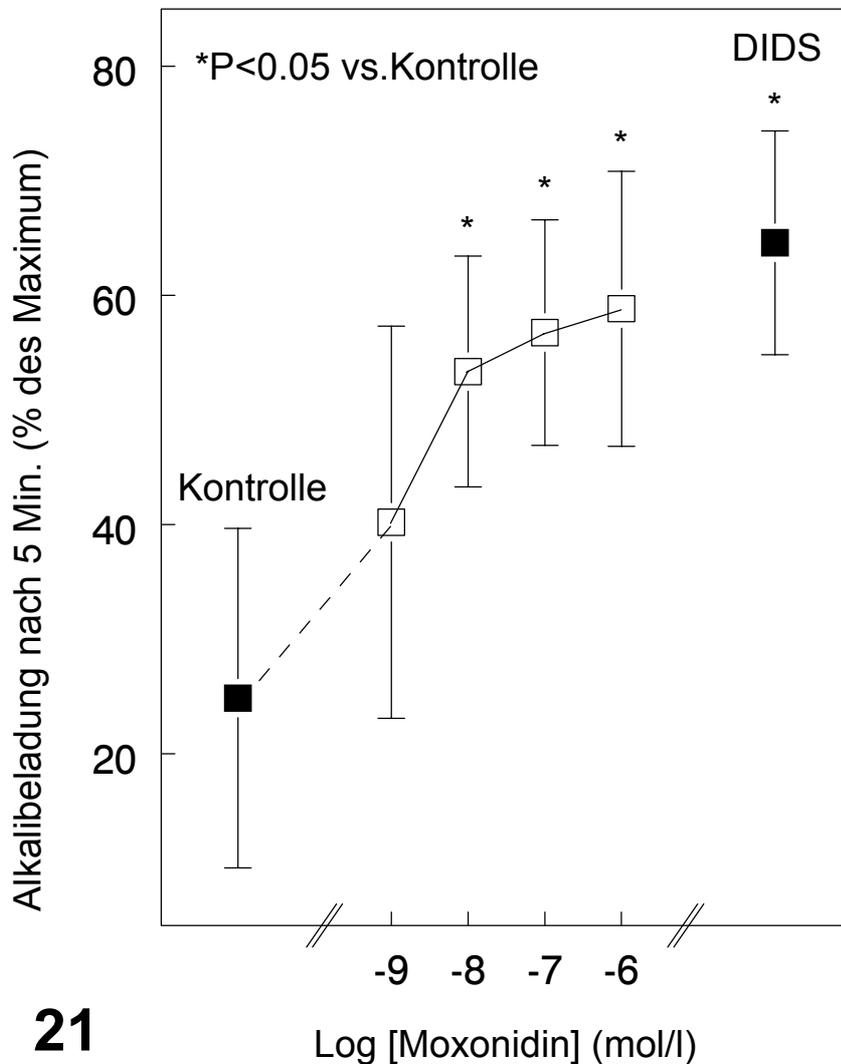
Die mögliche Wirkung von HOE694 in Verbindung mit der Vorinkubation mit DIDS bzw. Moxonidin ist in Abb. 20 dargestellt. Während die alleinige Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS bzw. 10^{-6} mol/l Moxonidin die Alkalibeladung 5 Minuten nach Erreichen des pH-Maximums -gemessen in Prozent des maximal erreichten alkalischen pH- signifikant erhöhte ($p < 0,05$), hatte die Anwesenheit von HOE694 keinen zusätzlichen Einfluß (Abb. 20A). Dagegen wurde die Säurebeladung 1 Minute nach Erreichen des pH-Minimums -gemessen in Prozent des minimal erreichten pH- durch die alleinige Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS bzw. 10^{-6} mol/l Moxonidin oder die alleinige Zugabe von 10^{-5} mol/l HOE694 nicht signifikant beeinflusst (Abb. 20B). Das Überspülen von Fibroblasten mit HOE694, die entweder mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubiert waren, bewirkte jedoch eine signifikante Erhöhung der Säurebeladung, die vergleichbar mit der durch die Na^+ -freie Lösung induzierten Säurebeladung (Abb. 20B) war.

Eine Dosis-Wirkungskurve für die Hemmwirkung von Moxonidin auf die Erholung vom alkalischen pH wurde erstellt. Die Alkalibeladung 5 Min. nach Erreichen des pH-Maximums wurde bei Fibroblasten, die mit 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubiert wurden, erhöht ($p < 0,05$, Abb. 21). Zum Vergleich wurde die Wirkung einer Inkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS in die Darstellung aufgenommen (Abb. 21).

Eine Hemmwirkung von Moxonidin speziell auf Anionenaustauscher wurde durch Überspülen von Fibroblasten mit einer chloridfreien Lösung gezeigt. Diese bewirkte einen gradientenabhängigen Efflux von Chlorid und einen Influx von Bicarbonat, was sich in einer Alkalinisierung zeigte (Abb. 22A u. B). Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-6} mol/l Moxonidin reduzierte ($p < 0,05$) den Betrag der Alkalinisierung, gemessen 8 Min. nach Überspülen von Fibroblasten mit einer chloridfreien Lösung (Abb. 22A u. B).

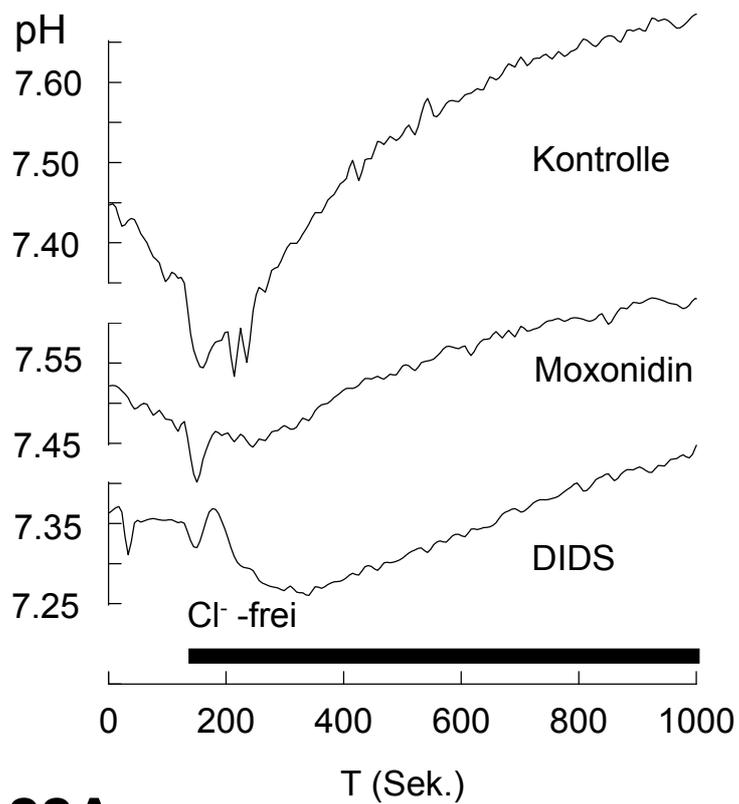
Die verminderte pH-Erholung aus dem Alkalischen nach Vorinkubation mit 10^{-6} mol/l Moxonidin wurde mit der Erholung nach Vorinkubation mit 10^{-6} mol/l Clonidin bzw. 10^{-6} mol/l Guanabenz verglichen. Weiterhin wurde der Einfluss von Moxonidin im Superfusionsmedium ohne Vorinkubation untersucht (Tab. 1). Während die Vorinkubation mit Moxonidin und Clonidin die Alkalibeladung 5 Min. nach Erreichen des pH-Maximums erhöhte ($p < 0,05$), hatte die Vor-

behandlung mit Guanabenz keinen signifikanten Effekt (Tab. 1). Ohne Vorinkubation reduzierte Moxonidin die Erholung nur nicht signifikant (Tab. 1).



21

Abb. 21 Dosis-Wirkungskurve für die Beeinflussung der Erholung von der Beladung mit alkalischen Valenzen in BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten während eines NH_4Cl -Impulses bestimmt als Prozentwert des pH-Maximums 5 Min. nach Erreichen des pH-Maximums. Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 3-4 Messungen, welche je 13 ± 1 subkonfluente Fibroblasten erfassten. Zellen wurden mit 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol/l Moxonidin vorinkubiert. Zum Vergleich wurde der Effekt einer Vorinkubation mit 10^{-3} mol/l DIDS dargestellt. Eine Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test („Statistica“) überprüft. Gleichheit der Varianzen wurde mittels Arcussinus-Transformation hergestellt (nach „Zar“) und mithilfe des Levene-Tests („Statistica“) überprüft, Statistische Signifikanzen wurden mittels Duncan-Test („Statistica“) überprüft.



22A

Abb. 22A Effekt einer chloridfreien Lösung auf die Veränderung des intrazellulären pH in BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten. Repräsentative Messungen für das Überspülen mit chloridfreier Lösung. Verwendet wurden unbehandelte und mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubierte Fibroblasten.

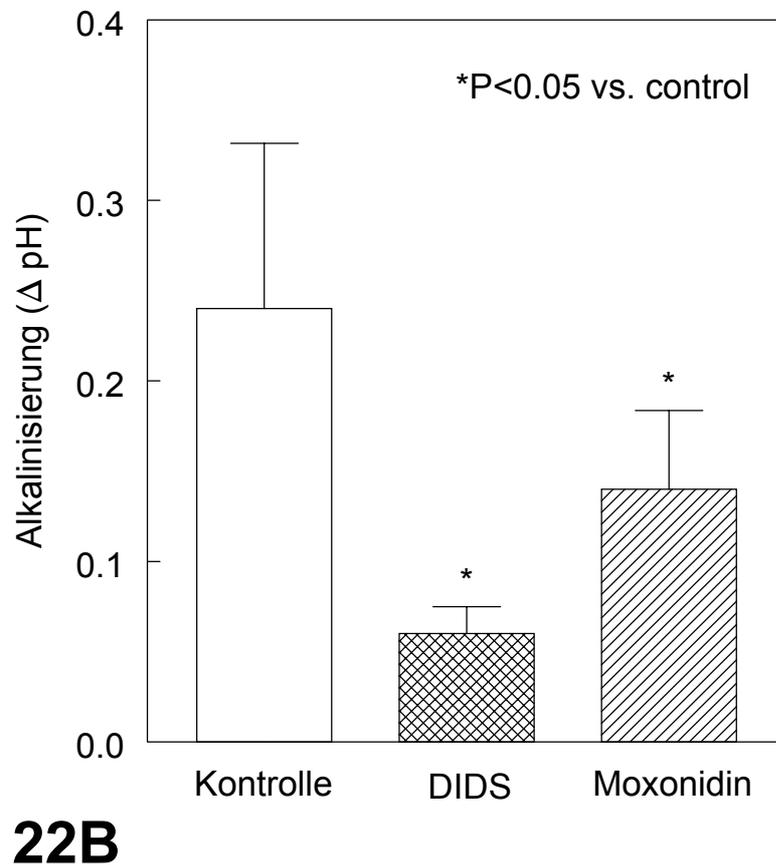


Abb. 22B Effekt einer chloridfreien Lösung auf die Veränderung des intrazellulären pH in BCECF-beladenen kardialen Fibroblasten. pH-Wertveränderungen 8 Min. nach Beginn der Superfusion mit einer chloridfreien Lösung. Werte sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 4-6 Messungen. Eine Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test („Statistica“) überprüft. Gleichheit der Varianzen wurde mithilfe der Square-Root-Transformation („Instat“) hergestellt und mithilfe des Levene-Tests („Statistica“) überprüft. Signifikanz wurde mittels Duncan-Test („Statistica“) ermittelt.

Die Untersuchungen erfolgten bei einer Zellpopulation, die aus ca. 7 verschiedenen Fibroblastenaufbereitungen von Zellen der Passagen 1-15 bestanden. Als Ausgangsmaterial für diese Kulturen wurden Herzen „junger“ Ratten mit einem Gewicht von 150 bis 200 g verwendet. Im Anschluss an die Auswertung dieser Versuche, welche die Grundlage der Abbildungen 1-7 darstellt, wurden Versuche an einer neuen Population von Zellen aus 2 Fibroblastenaufbereitungen und Zellen der Passagen 1-15 angeschlossen. Diese Zellen wurden aus den Herzen von „adulten“ Ratten gewonnen, deren Gewicht zwischen 350 und 400 g lag. Dabei fiel ein gegenüber der „jungen“ Population signifikant erhöhter basaler intrazellulärer pH-Wert, also ein erhöhter „Ruhe-pH“ vor dem Start des Ammoniumchlorid-Impulses, in der Gruppe der „adulten“ Population auf ($p < 0,05$. Abb. 23A).

Während der basale pH_i in Fibroblasten aus „jungen“ Ratten im Kontrollexperiment $7,53 \pm 0,30$ betrug, lag er in Kontrollfibroblasten der „adulten“ Ratten im Mittel um 0,68 pH-Einheiten höher, also bei $8,21 \pm 0,53$ (Tab. 2). Auch im Vergleich des pH_i in Fibroblasten aus „jungen“ Ratten und „adulten“ Ratten unter pharmakologischen Anwendungen lag der basale intrazelluläre pH jeweils in den Fibroblasten aus „adulten“ Ratten signifikant höher ($p < 0,05$. Abb. 23A und Tab. 2).

In Fibroblasten aus „jungen“ Ratten, die mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubiert waren, war der basale pH_i gegenüber der Kontrolle in „jungen“ Fibroblasten, die mit Standardlösungen vorinkubiert war, signifikant niedriger ($p < 0,05$. Abb. 23 A, Tab. 2). In Fibroblasten aus „jungen“ Ratten, die mit 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubiert waren, zeigte der basale pH_i keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle in „jungen“ Fibroblasten, die mit Standardlösungen vorinkubiert war (Abb. 23A, Tab. 2).

Um zu überprüfen, inwieweit die Erholung aus dem Alkalischen während eines NH_4Cl -Impulses vom basalen intrazellulären pH abhängen könnte, wurde die Alkalibeladung -gemessen 5 Min. nach Erreichen des pH-Maximums als Prozent des Maximums- mit dem basalen intrazellulären pH korreliert. Im Falle der Kontrollexperimente betrug der Korrelationskoeffizient $r = 0,18$ ($p > 0,05$. Abb. 23B). Für Experimente, bei denen Fibroblasten mit 10^{-3} mol/l DIDS vorinkubiert wurden, betrug der Korrelationskoeffizient $r = -0,65$ ($p < 0,05$. Abb. 23C),

für Experimente, bei denen Fibroblasten mit 10^{-6} mol/l Moxonidin vorinkubiert wurden, betrug der Korrelationskoeffizient $r = -0,7$ ($p < 0,05$, Abb. 23C).

Tab. 2 Vergleich des basalen intrazellulären pH-Wertes, also des „Ruhe-pH“ vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses, in Populationen von kultivierten kardialen Fibroblasten von „jungen“ Ratten mit 150-200 g Gewicht und „adulten“ Ratten mit 350-400 g Gewicht.

	MW \pm SD (pH)	Differenz
Kontrolle (150-200 g)	7,53 \pm 0,30	
Kontrolle (350-450 g)	8,21 \pm 0,53 *	0,68
DIDS (150-200 g)	7,06 \pm 0,21 #	
DIDS (350-450 g)	8,04 \pm 0,48 *	0,98
Moxonidin (150-200 g)	7,46 \pm 0,19	
Moxonidin (350-450 g)	7,80 \pm 0,22 *	0,34

Im Fall der „Kontrolle“ wurden kardiale Fibroblasten mit dem Standard-Inkubationsmedium inkubiert, bei „DIDS“ wurde zusätzlich mit 10^{-3} mol/l DIDS, bei „Moxonidin“ mit 10^{-6} mol/l Moxonidin inkubiert. Werte sind Mittelwert und Standardabweichung von 15 und 8 (Kontrolle), 7 und 9 (DIDS) bzw. 7 und 6 (Moxonidin) Experimenten (* $p < 0,05$ vs. 150-200 g. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle 150-200 g. „Instat“).

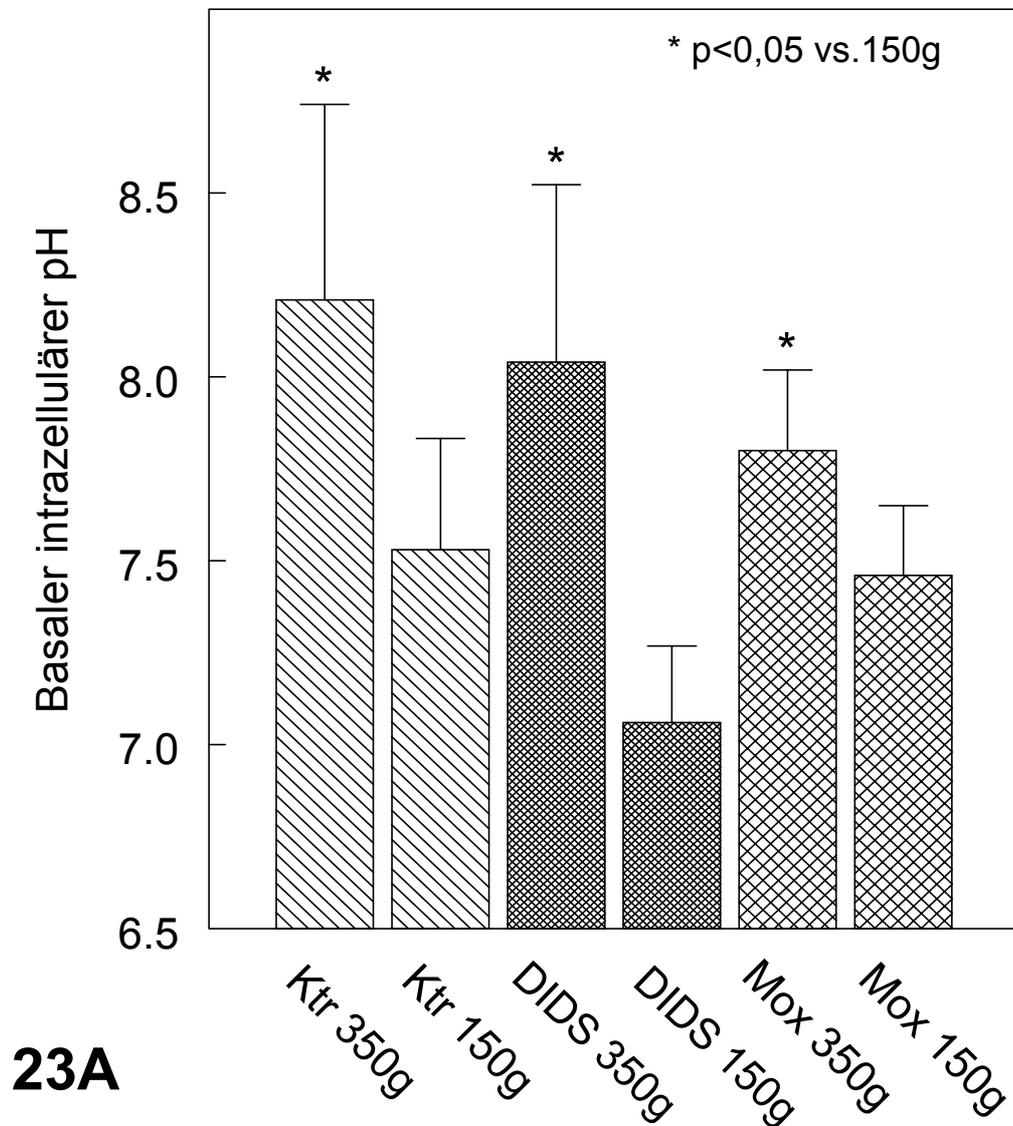
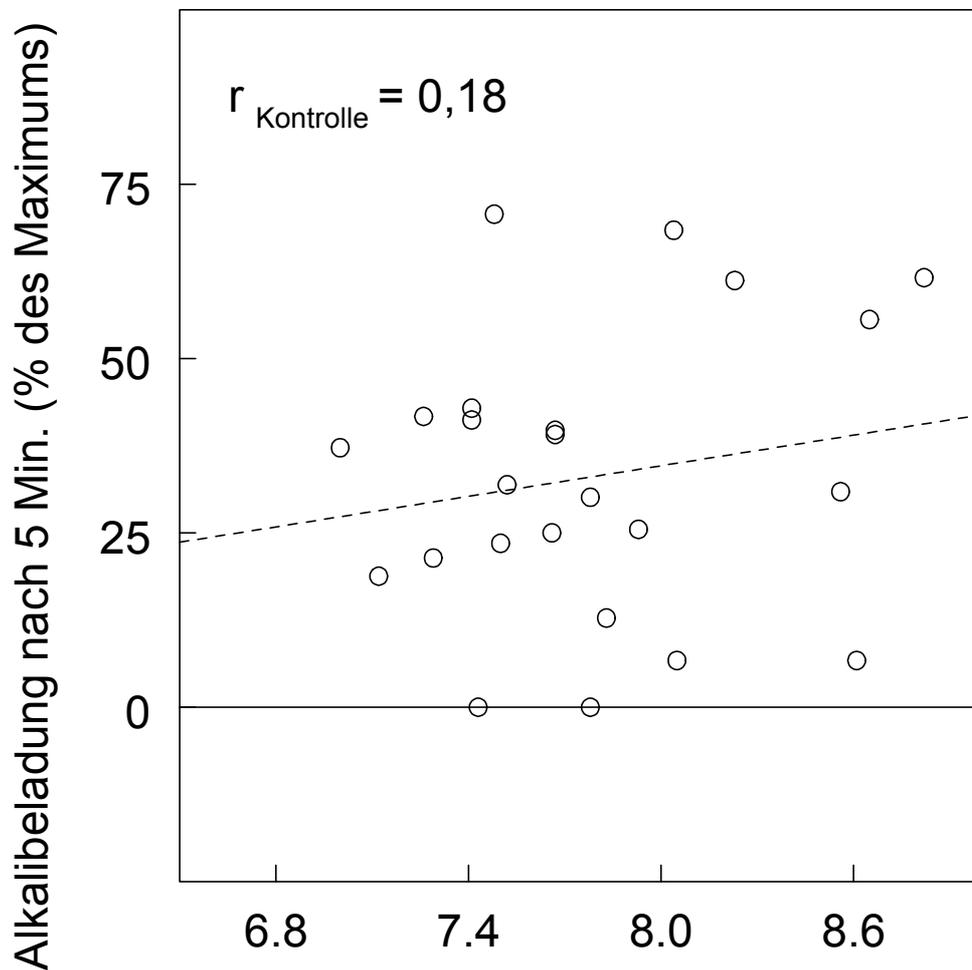


Abb. 23A Vergleich des basalen intrazellulären pH vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses. Für die „junge“ Population wurden Herzen von 150-200 g schweren Ratten bzw. für die „adulte“ von 350-400 g schweren Ratten als Ausgangsmaterial verwendet. Auf Signifikanz wurden die Populationen mithilfe des beidseitigen Student's t-Tests („Instat“) geprüft. Normalverteilung wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests („Statistica“), Gleichheit der Varianzen mithilfe des Bartlett-Tests („Instat“) überprüft. In den Kontroll- und DIDS-Gruppen lagen ungleiche Varianzen vor und wurden durch Welch-Korrektur („Instat“) berücksichtigt. Die „junge“ Population umfasste ca. 7 Kulturen kardialer Fibroblasten der Passagen 1-15, die der „adulten“ Population 2 Kulturen kardialer Fibroblasten der Passagen 1-15.

**23B**

Basaler intrazellulärer pH

Abb. 23B Verhältnis von basalem intrazellulärem pH vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses zu der Alkalibelastung -gemessen nach 5 Min. nach Erreichen des Maximums in Prozent des Maximums. Fibroblasten aus der „jungen“ und der „adulten“ Population, wurden mit Kontrolllösungen überspült. Der Korrelationskoeffizient lag bei $r = 0,18$ ($p > 0,05$, „Statistica“). Die Gleichung der Korrelationsgeraden lautete $y = 7x - 24$ („Slidewrite“).

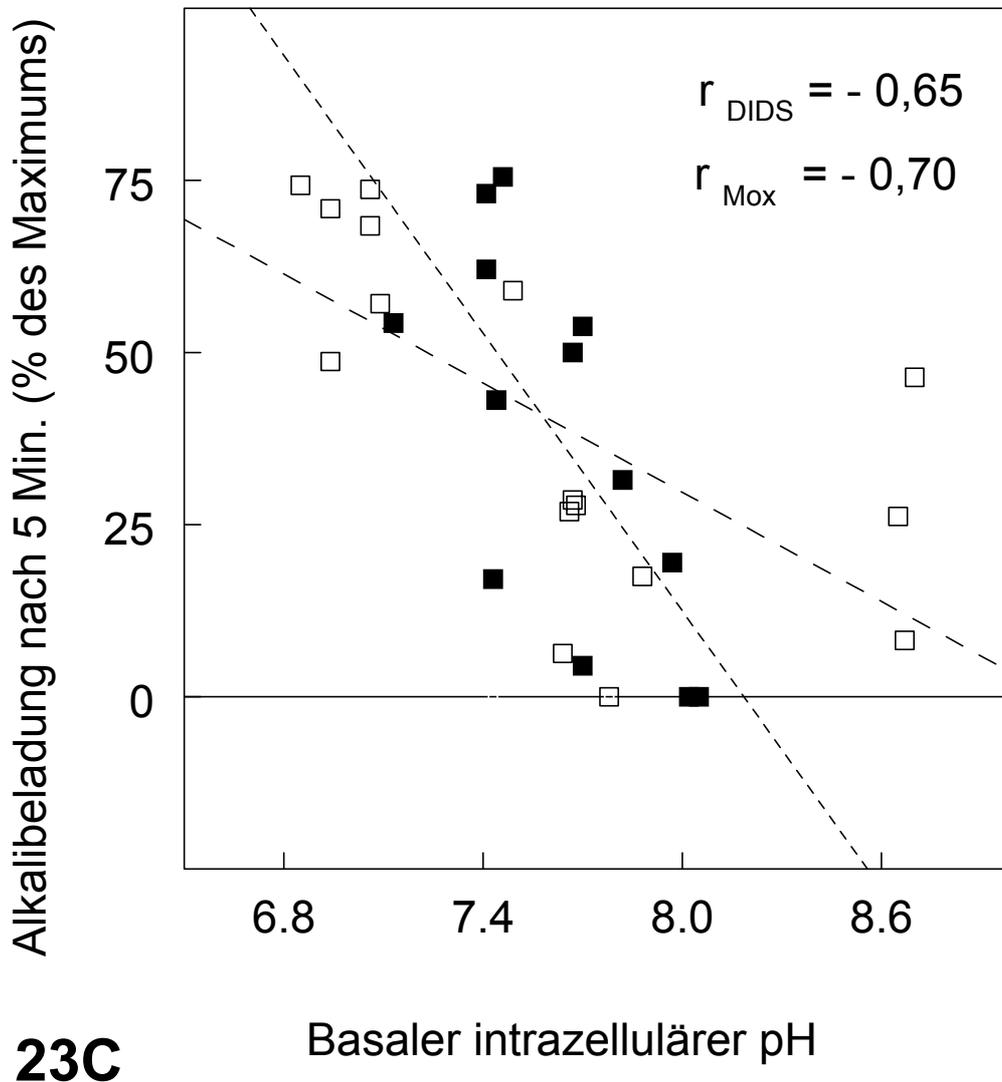


Abb. 23C Verhältnis von basalem intrazellulärem pH vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses zu der Alkalibeladung -gemessen nach 5 Min. nach Erreichen des Maximums in Prozent des Maximums. Fibroblasten aus der „jungen“ und der „adulten“ Population wurden mit 10^{-3} mol/l DIDS oder 10^{-3} mol/l Moxonidin vorinkubiert und mit Kontrolllösung überspült. Der Korrelationskoeffizient lag bei $r = -0,65$ ($p < 0,05$, „Statistica“) für mit DIDS vorinkubierte Fibroblasten (□) und bei $r = -0,70$ ($p < 0,05$, „Statistica“) für mit Moxonidin vorinkubierte Fibroblasten (■). Die Gleichungen der Korrelationsgeraden lauteten für „DIDS“ $y = -26x + 241$ und für „Moxonidin“ $y = -67x + 550$ („Slidewrite“).

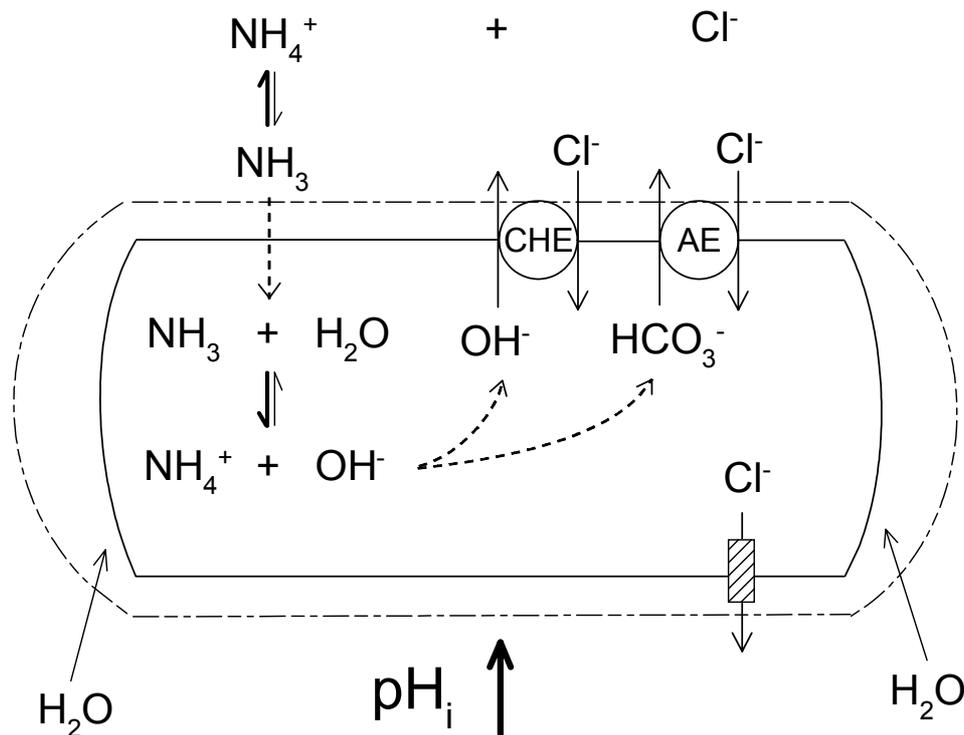
4. Diskussion

4.1 Ammoniumchlorid-Impuls-Technik

Um pH-Regulationsmechanismen kardialer Fibroblasten untersuchen zu können, wurde den Zellen eine Veränderung des intrazellulären pH aufgezwungen. Hierfür fand die Ammoniumchlorid-Impuls-Technik Verwendung. Nach Zugabe von NH_4Cl stieg der intrazelluläre pH gefolgt von einer vollständigen Erholung des pH. Nach Auswaschen von NH_4Cl kam es zu einer transienten Ansäuerung und einer anschließenden vollständigen Erholung des pH (Abb. 17A). Die so erreichte Auslenkung des intrazellulären pH in alkalische und saure Bereiche und deren Kompensation ermöglichte es, die hierfür notwendigen pH-Regulationsmechanismen unter Veränderung des extrazellulären Ionenmilieus und durch pharmakologische Interventionen zu untersuchen.

Der Betrag der Erholung von der Alkalinisierung war linear korreliert mit dem Betrag der Erholung von der Ansäuerung (Abb. 18A). Da die Korrelationsgerade im Kontrolleexperiment annähernd der Ursprungsgeraden entspricht, scheinen sich Ausmaß der Erholung aus intrazellulärer Alkalose und das Ausmaß der resultierenden Ansäuerung hinsichtlich des Betrages zu entsprechen. Dies lässt auf einen intrazellulären Verlust von OH^- -Ionen bzw. basischen Valenzen während der Erholungsphase der Alkalinisierung schließen, der sich nach dem Auswaschen von NH_4Cl in einer Ansäuerung zeigt. Geht man der Frage nach, wie die intrazelluläre Alkalose und im weiteren Versuchsverlauf die Azidose und die jeweiligen Kompensationen zustandekommen, kann man die Bewegungen des Ammoniumchlorid einerseits und die Ionentransport- und Puffermechanismen andererseits betrachten. Zunächst zur Wirkung eines Ammoniumchlorid-Impulses:

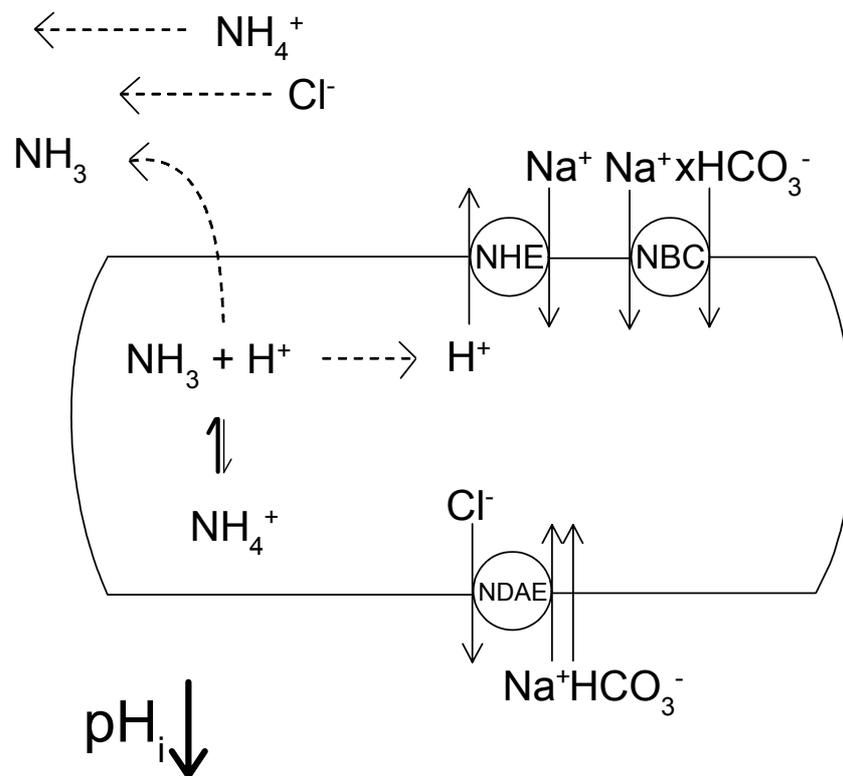
Im Superfusionsmedium ist Ammoniumchlorid in NH_4^+ -Ionen und Cl^- -Ionen dissoziiert. Extrazelluläre NH_4^+ -Ionen stehen im Gleichgewicht mit Protonen und NH_3 . Zellmembranen sind für das unpolare Ammoniak permeabel. Auf diesem Wege gelangt es ins Innere der Fibroblasten. Intrazellulär steht Ammoniak wieder im Gleichgewicht mit Ammoniumionen und Hydroxylionen, die einen alkalischen intrazellulären pH bewirken. Da Ammonium als polares Molekül die Zellen nicht verlassen kann, akkumuliert es intrazellulär, bis es zu einem Gleichgewicht zwischen extrazellulär vorhandenem und nach intrazellulär gelangendem Ammonium kommt.



24

Abb. 24 Zugabe von NH_4Cl . Alkalische Phase.

Ist dieses erreicht, zeigt sich in der pH-Registrierung ein Maximum an Alkalinisierung. Im Zuge der Erholung von dieser Alkalose sind verschiedene Mechanismen aktiv, die unten genauer beschrieben sind. Um den Weg des Chloridanteils aus dem Ammoniumchlorid nachzuvollziehen werden hier die Anionentransporter AE und CHE erwähnt, die basische Valenzen nach extrazellulär und im Austausch Chloridionen nach intrazellulär transportieren. Sind diese Transporter aktiv, so erscheint von dem extrazellulären Ammoniumchlorid nun auch das Chlorid intrazellulär. Dies bedeutet für die Zelle eine Belastung mit osmotisch aktiven Teilchen, denen Wasser nach intrazellulär folgt. Dadurch kommt es zu einer Schwellung der Zellen, was zur Aktivierung von Volumenregulationsmechanismen der Zelle führt. Hierfür sind volumensensitive Cl^- -Kanäle beschrieben, die sich unter Zellschwellung für Chloridionen öffnen. So kann Chlorid die Zelle verlassen, was konsekutiv wieder zum Absinken des osmotischen Druckes und damit des Zellvolumens führt.

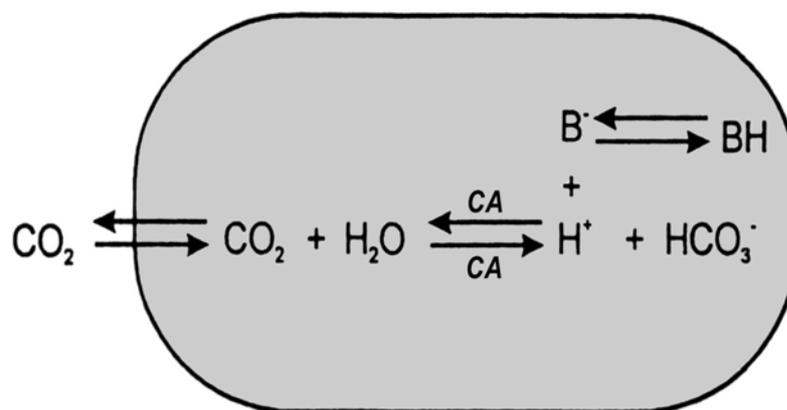


25

Abb. 25 Auswaschen von NH_4Cl . Saure Phase.

Nach abgelaufener Erholung aus dem Alkalischen wurde Ammoniumchlorid und NH_3 extrazellulär durch Auswaschen entfernt. NH_3 verlässt die Zelle durch freie Permeation. Dies hat zur Folge, dass intrazelluläres NH_4^+ in Ammoniak und Protonen dissoziiert. So entsteht ein Nettoüberschuss an H^+ - Ionen, da in der alkalischen Phase basische Valenzen verloren gingen. Es resultiert so eine intrazelluläre Azidose, die sich in der pH-Registrierung als Minimum zeigt. Von dieser Ansäuerung erholt sich die Zelle ebenfalls. Welchen Weg der Chloridanteil aus dem ursprünglichen Ammoniumchlorid zu diesem Zeitpunkt genommen hat und welche mögliche Bedeutung er in dieser Erholungsphase hat, lässt sich nur schwer angeben, da zum Ausgleich der osmotischen Veränderungen in der Alkalosephase bereits Chlorid über volumensensitive Kanäle die Zelle verlassen hat. So sind hier die osmotischen Vorgänge nur schwer anzugeben.

Um Auslenkungen des zytoplasmatischen pH begegnen zu können, besitzen Zellen unterschiedliche Kompensationsmechanismen. So existieren im Zytoplasma zum einen intrinsische Puffersysteme durch zytoplasmatische Proteine und zum anderen ein $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffer (3, 66)(Abb.26). Für das Funktionieren des Kohlendioxid/Bikarbonatpuffers ist die Carboanhydrasereaktion, welche das Gleichgewicht CO_2 plus Wasser \leftrightarrow Bikarbonat plus Proton katalysiert, Voraussetzung. Die Aktivität des Schlüsselenzyms Carboanhydrase wird in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlich hoher Menge exprimiert (66). Ausführlich untersucht ist die Aktivität der Carboanhydrase in Kardiozyten. Das Verhältnis von Vorwärts- und Rückwärtskonstante der Reaktion ist so ausgelegt, dass halbmillionenfach schneller CO_2 aus Bikarbonat und Protonen entsteht als umgekehrt. CO_2 kann als apolares Molekül die Zelle leicht verlassen. So steht der Zelle ein potenter Schutz gegen längerdauernde Azidose zur Verfügung (66).



26

Abb. 26 Schema für das Zusammenarbeiten des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffers und von intrazellulären intrinsischen Puffern (B^- bzw. BH). CO_2 gelangt über freie Permeation nach intrazellulär und wird durch die Carboanhydrase letztlich in Protonen und Bikarbonat übergeführt, wobei freiwerdende H^+ -Ionen durch intrinsische Puffer gebunden werden (Entnommen und gering modifiziert aus (66)).

Neben diesen Puffersystemen stehen der Zelle weitere wirkungsvolle Mechanismen zur Kompensation von pH-Schwankungen zur Verfügung. Im Kardiozyten kommen sowohl säurebeladende Ionentransporter, wie auch säureausschleusende Ionentransporter vor. Während der Na^+/H^+ -Austauscher NHE, der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC (3, 34, 35) und der natriumabhängige NDAE1 (1) als säureausschleusende Transporter fungieren und so die membrangebundenen Mechanismen für die Erholung von saurer Beladung darstellen, gewährleisten der säurebeladende $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher AE und der Cl^-/OH^- -Austauscher CHE die Erholung von alkalischen pH-Bereichen als membrangebundene Mechanismen (3, 65, 85, 128). Im Bereich des Ruhe-pH_i in Kardiozyten von 7,04 bis 7,07 sind alle vier Transporter gleichermaßen aktiv, wenn auch mit einer geringen Austauschrate (3). So bestimmt das Gleichgewicht zwischen diesen Säureäquivalent-Transportern den intrazellulären pH in Säugetier-Kardiozyten (65). Durch größere Auslenkungen des pH_i erfahren die jeweiligen Ionentransporter eine unterschiedlich große Aktivierung. Während AE in Kardiozyten bis pH 7,15 einen moderaten Anstieg seiner Aktivität zeigt, steigt seine Aktivität bei höheren pH-Werten steil an (3, 129). CHE im Kardiozyten dagegen zeigt insgesamt einen nahezu linearen Anstieg der Aktivität über den gesamten untersuchten Bereich von 7,05 bis 7,5. Die steilere Aktivierung von AE zeigt seine wichtige Rolle zum Schutz vor intrazellulärer Alkaliüberbeladung (3). Nach Vaughan-Jones werden etwa 70% des Säure-Influxes durch AE und etwa 30% von CHE vermittelt (85). Die Transporter NHE und NBC sind im Kardiozyten bei Ruhe-pH mäßig aktiv und werden durch das Absinken des pH_i stark aktiviert. Die größere Aktivierung geschieht bei NHE, wenn der zytosolische pH unter 6,9 fällt. Im Bereich von 7,03 bis 6,55 wird die NHE-Aktivität 30-fach gesteigert. Im Gegensatz dazu wird NBC mit sinkendem pH_i etwa linear aktiviert. Bei moderaten Säurebeladungen um pH 6,9 sind NHE und NBC etwa gleich aktiv. So erscheinen beide Transporter bei physiologischem pH gleich wichtig zu sein (3).

Betrachtet man die Kurvenverläufe in der alkalischen Phase unserer und die in der Literatur beschriebenen pH-Registrierungen, so lässt sich eine steilere schnellere Phase der pH-Erholung von einer flacheren langsameren Phase unterscheiden. In Untersuchungen an Kardiozyten wurde von Vaughan-Jones verdeutlicht, dass dieses Phänomen durch die oben genannten Kompensati-

onsmechanismen ausgelöst wird. Die schnelle Phase während der Alkalinisierung dauert in Kardiozyten 2 bis 2,5 Minuten (85, 86). Nach Vaughan-Jones bleibt sie auch unter Einsatz der Hemmsubstanz DIDS oder unter Chloridentzug bestehen (85). Auch in unseren Messungen bleibt die schnelle Phase unter der Einwirkung von DIDS bestehen. In der Literatur wird angegeben, sie sei nur durch die nominelle Abwesenheit von CO_2 und HCO_3^- zu unterdrücken (66, 85). Eine Verlangsamung kann durch den Einsatz eines Carboanhydrasehemmers wie Acetacolamid erreicht werden. Die Dauer dieser Periode hängt also ab von der Aktivität der Carboanhydrase. So repräsentiert die schnelle Phase der Erholung von der Alkalinisierung eine Periode, in der das oben beschriebene intrazelluläre $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystem außerhalb des Gleichgewichtes steht (66). Der membrangebundene Transport von Säure-Valenzen müsste auch unter Ungleichgewichtsbedingungen des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffers vorkommen, jedoch kann in dieser Phase nicht exakt unterschieden werden zwischen Membrantransport und Bikarbonatpufferungleichgewicht (66, 85). Wird die pH_i -Erholungsrate in Alkalose zu diesem Zeitpunkt den membranären Transportern zugerechnet, so wird die Transporteraktivität zu hoch bewertet (85). Folglich ist hierbei ein ausreichender Abstand vom Zeitpunkt der maximalen Alkalinisierung einzuhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Aktivität der säurebeladenden Ionentransporter 5 Minuten nach Erreichen des Maximums beurteilt, davon ausgehend, dass das Gleichgewicht des Bikarbonatpuffers erreicht wurde.

Während der Erholung von einer intrazellulären Ansäuerung wurde bisher keine Ungleichgewichtsphase des Bikarbonatpuffers beschrieben, insbesondere nicht unter Verwendung der Ammoniumchlorid-Impuls-Technik (35, 85). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Carboanhydrasereaktion sehr schnell, nämlich ca. halbmillionenfach schneller, in die säureeliminierende Richtung läuft. Nach einer Computersimulation (85) könnte eine schnelle Phase der pH-Erholung für 10 Sekunden nach einer Säurebeladung sichtbar werden. Dieses Zeitfenster ist viel kürzer als das unter intrazellulärer Alkalose und ist deshalb schwer zu detektieren (85). Somit kann der zeitliche Abstand vom pH-Minimum bei der Bewertung der membranären Ionentransporter relativ klein gewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transporteraktivität 1 Minute nach Erreichen des pH-Minimums bewertet.

Überspülen von Fibroblasten, die mit 10^{-3} mol/l DIDS-vorinkubiert waren, mit 10^{-5} mol/l HOE694 reduzierte die Erholung sowohl aus dem Alkalischen, als auch aus dem Sauren (Abb. 17B). Im Gegensatz dazu zeigte das Überspülen von unbehandelten Fibroblasten mit Na^+ -freier Lösung keinen Einfluß auf die alkalische Phase, jedoch verminderte dies eine Erholung aus dem Sauren (Abb. 17C). Vorinkubation mit DIDS und Zugabe von HOE694 zu der Na^+ -freien Lösung verminderte wiederum die Erholung aus dem Alkalischen, hatte aber keinen zusätzlichen Effekt in der sauren Phase bezüglich der Erholung 1 Minute nach Erreichen des Minimums (Abb. 20B). Die stark verminderte Erholung aus dem Sauren beim Fehlen von extrazellulärem Natrium kann auf die Hemmung der natriumabhängigen Ionentransporter, dem Na^+/H^+ -Austauscher NHE, dem $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC und dem natriumgetriebenen Anionenaustauscher NDAE zurückgeführt werden. Die unvollständige Hemmung der Erholung aus der Azidose in Anwesenheit von Natrium bei der Anwendung von DIDS und HOE694 (Abb. 17B) kann der nicht vollständigen Hemmung des NHE-Austauschers bzw. NBC-Kotransporters und NDAE-Austauschers oder dem Vorhandensein weiterer pH-Regulationsmechanismen wie Proteinpuffer zugerechnet werden.

Überspülen mit Na^+ -freier Lösung vergrößerte signifikant ($p < 0,05$) den Betrag der Ansäuerung nach einem NH_4Cl -Impuls (Abb. 18A u. B). Es ist vorstellbar, dass die frühzeitige membrangebundene Gegenregulation gegen die Ansäuerung, welche durch die natriumabhängigen Austauscher NHE, NBC und NDAE vermittelt wird, durch die Abwesenheit von Natrium derart unterbunden wurde, dass jetzt die maximale Ansäuerung größer wird als unter Kontrollbedingungen. Möglicherweise wird unter Kontrollbedingungen die Ansäuerung weniger ausgeprägt sichtbar, da die hier aktiven säureausschleusenden Transporter durch ihre Aktivität eine noch größere pH-Auslenkung verhindern. Unterstützt wird diese Überlegung durch Abb. 18B, die zeigt, dass auch unter Anwesenheit von Na^+ und Hemmung der Transporter durch DIDS und HOE694 die maximale Ansäuerung gegenüber der Kontrolle verstärkt wird.

Zusätzlich zu dieser Überlegung kann auch ein vermehrter Anfall von Protonen im Verlauf der Messung in Betracht gezogen werden. Unter sinkenden intrazellulären pH-Werten werden die säureausschleusenden Transporter NBC und NHE aktiviert (3). Für NDAE1 ist die pH-abhängige Aktivierung ge-

genwärtig noch nicht charakterisiert. Denkbar ist, dass diese natriumabhängigen Transporter unter extrazellulär natriumfreien Bedingungen und besonders unter intrazellulärer Azidose in einem umgekehrten Modus laufen und so im Gegenzug für einen gradientenabhängigen Natriumausstrom saure Valenzen nach intrazellulär bringen. Zwar wurde für den Natrium-Protonenaustauscher NHE gezeigt, dass sich seine Laufrichtung in Kardiozyten in natriumfreier Lösung nicht signifikant umkehrt (130), jedoch ist diese mögliche Umkehrung für NBC (13) und NDAE (1) nachgewiesen. Diese Umkehrung könnte also in unserem Fall zu einem vermehrten Anfall von Protonen nach dem NH_4Cl -Impuls führen, nämlich wenn die Transporter NBC und NDAE unter extrazellulär natriumfreien Bedingungen im umgekehrten Modus vermehrt saure Valenzen in die Zelle tragen würden. Für die These der im umgekehrten Modus laufenden Transporter sprechen unsere Daten, die zeigen, dass die Hemmung der Ionentransporter durch DIDS und HOE694 im natriumfreien Experiment die im natriumfreien Kontrollexperiment verstärkte Ansäuerung wieder vermindern können (vgl. $p < 0,05$ in Abb. 18B).

4.2 Hemmung mit DIDS und Moxonidin

Moxonidin und die strukturverwandte Substanz Rilmenidin werden zur Senkung der Aktivität des sympathischen Nervensystems bei Bluthochdruck eingesetzt. Weiterhin reduziert Moxonidin die Insulin-Resistenz bei übergewichtigen hypertonen Personen (131). Für beide Therapieziele konnte bisher kein Protein von bekannter Struktur für die Interaktion mit Moxonidin nachgewiesen werden. Beweise liegen lediglich für zwei unterschiedliche Imidazolin-Bindungsstellen in verschiedenen Organen vor (132, 133). Die Entwicklung einer Substanz mit möglicherweise weiterem therapeutischem Profil wird dadurch erschwert, dass ein molekulares Zielprotein von bekannter Struktur bisher nicht gefunden wurde. Es wurde berichtet, dass Moxonidin die myokardiale Fibrose in spontanhypertensiven Ratten weitgehend verhindert, obwohl der Bluthochdruck nicht vollständig normalisiert wurde (134). Weiterhin wurde auch die Glomerulosklerose und die interstitielle Fibrose bei experimentellem Nierenversagen reduziert (135). Obwohl die reduzierte Aktivität des sympathischen Nervensystems möglicherweise zu den antifibrotischen Effekten beisteuert, könnten zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen. Da eine intrazelluläre Alkalinisie-

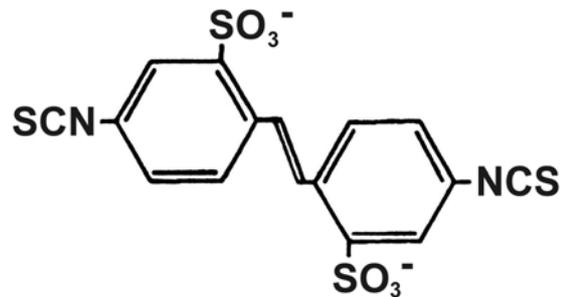
rung ein Signal für das Zellwachstum darstellt (136, 137), untersuchten wir die Hypothese, dass Moxonidin einen direkten Einfluß auf pH-Regulationssysteme kardialer Fibroblasten hat.

Eine Vorinkubation von Fibroblasten mit 10^{-6} mol/l Moxonidin reduzierte die Erholung aus dem Alkalischen, wohingegen die Erholung aus dem Sauren nicht signifikant beeinflusst wurde (Abb. 19D u. 20). Wenn Fibroblasten lediglich mit 10^{-6} mol/l Moxonidin überspült wurden, was einer Inkubationszeit von maximal 10 Min. entspricht, wurde die Erholung aus dem Alkalischen nicht signifikant vermindert (Abb. 19C, Tab. 1). Es ist bemerkenswert, dass im Falle der Vorinkubation mit Moxonidin für 30 Min. die Substanz im Superfusionsmedium nicht mehr anwesend war, analog dem Versuchsaufbau mit der Vorinkubation mit DIDS (Abb. 19B). Dies legt die Vermutung nahe, dass Moxonidin einen langanhaltenden Effekt ausübt oder verzögert intrazellulär aufgenommen wird. Es sollte in diesem Zusammenhang bemerkt werden, dass die Plasmahalbwertszeit von Moxonidin in vivo ca. 2,5 h beträgt. Ein antihypertensiver Effekt wird aber noch nach 2-4 h nach Erreichen der maximalen Konzentration im Blut beobachtet (138). Nach Prichard hält der antihypertensive Effekt länger an, als aufgrund der Plasmahalbwertszeit zu erwarten ist (138). Die Substanz wird daher auch nur einmal täglich verabreicht (139).

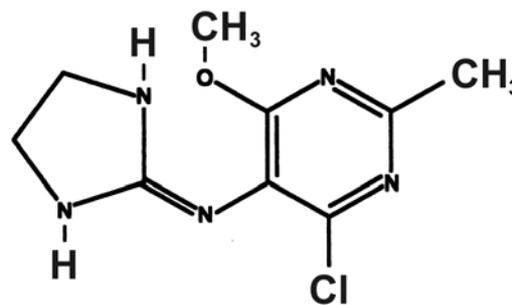
Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Wirkung von Moxonidin war vergleichbar mit der von DIDS, einer Standardsubstanz zur Hemmung von Bikarbonat-Austauschern wie AE, NBC und NDAE. Während DIDS bei den vorliegenden Untersuchungen wahrscheinlich über die irreversible kovalente Bindung wirkt, so erscheint dies im Falle von Moxonidin als unwahrscheinlich, da beim Vergleich der chemischen Strukturen von DIDS und Moxonidin das Fehlen der beiden DIDS-Thiozyanatgruppen bei Moxonidin auffällt (Abb. 27). Diese beiden Gruppen vermitteln die kovalente Bindung von DIDS an diverse Bindungsstellen der Bikarbonat-Transporter (vgl. Einleitung). In welcher Weise Moxonidin Wirkungen auch bei Abwesenheit im Superfusionsmedium ausübt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Eine intrazelluläre Aufnahme von Moxonidin während der Vorinkubation erscheint möglich, da während dieses Vorgangs Pluronic anwesend war, welches die Dispersion von lipophilen Substanzen und damit deren Aufnahme in die Zelle aus der wässrigen Lösung verbessert. Auch DMSO verbessert die Löslichkeit lipophiler Sub-

stanzen in Wasser, so könnte Moxonidin während der Vorinkubation besser aufgenommen werden als beim kurzfristigen Zufügen im Superfusionsmedium.

DIDS



Moxonidin



27

Abb. 27 Struktur des Anionen-Transporter-Inhibitors H_2DIDS (4,4'-Diisothiocyano-Stilben-2,2'-Disulfonsäure) und des Antihypertensivums Moxonidin (Struktur von DIDS wurde aus (140) entnommen, die Struktur von Moxonidin wurde aus (141) entnommen).

Fragt man nach der Wirkung von Moxonidin und DIDS auf die Ionen-transporter der sauren Phase, so fällt auf, dass der alleinige Einsatz der Hemmsubstanzen die Erholung aus dem Säuren -gemessen 1 Minute nach Erreichen des pH-Minimums als Prozent vom Minimum (Abb. 20B)- nicht signifikant zu beeinflussen mag. Erst die Kombination von Hemmung der säureausschleusenden Bikarbonataustauscher mittels DIDS und des Na^+/H^+ -Austauschers mittels HOE694 vermag die Erholung aus dem Säuren signifikant zu vermindern (Abb. 20B). Dies spricht dafür, dass säureausschleusende Transporter in kardialen kultivierten Fibroblasten sich gegenseitig funktionell ersetzen

können. Analog beeinflusst die alleinige Vorinkubation mit Moxonidin die Erholung aus einer Azidose nicht signifikant, erst die Kombination mit HOE694 lässt eine signifikante Hemmwirkung erkennen. Dies ergibt den Hinweis, dass die Wirkung von Moxonidin einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der säureausschleusenden Bikarbonattransporter NBC und/oder NDAE beinhaltet.

Moxonidin verminderte die Erholung aus dem Alkalischen im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-6} mol/l (Abb. 21). Die Konzentration von 10^{-6} mol/l ist vergleichbar mit der maximalen Plasmakonzentration 0,74 h nach Moxonidin-Einnahme, welche $1,29 \pm 0,32$ ng/ml beträgt (142). Umgerechnet entspricht dies einer Konzentration von etwa $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Deshalb kann eine Beeinflussung des intrazellulären pH auch in vivo angenommen werden.

Um die Wirkweise von Moxonidin auf pH-Regulationsmechanismen und insbesondere auf den Anionenaustauscher AE weiter zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit einer Chlorid-freien Lösung überspült (Abb. 22). Unter diesen Bedingungen läuft der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in umgekehrter Richtung, was zu einer intrazellulären Alkalinisierung führt (143). Eine Hemmung dieser Alkalinisierung durch DIDS wurde als Beweis für die Anwesenheit des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschers angenommen. So zeigt sich dieser Bikarbonattransporter aktiv in kardialen Fibroblasten und wird nicht nur von DIDS gehemmt, sondern auch von Moxonidin in seiner Aktivität vermindert. Leider kann dieser Versuchsaufbau nicht zwischen einer Beeinflussung von AE und CHE differenzieren. Hierzu wären weitere Experimente in nomineller Abwesenheit von Bikarbonat und Chlorid im Superfusionsmedium notwendig.

Um zu klären, ob die Wirkung von Moxonidin auf eine schwache α_2 -Rezeptor-Agonisten-Aktivität zurückzuführen ist, wurde der Einfluß von Guanabenz auf die Erholung aus dem Alkalischen untersucht. Guanabenz ist ein etablierter α_2 -Agonist (144). Im Gegensatz zu Moxonidin hemmten 10^{-6} mol/l Guanabenz die Erholung aus dem Alkalischen nicht (Tab. 1). Eine Moxonidin-ähnliche Wirkung wurde aber bei 10^{-6} mol/l Clonidin beobachtet (Tab. 1). Da Clonidin wie Moxonidin eine Affinität zu Imidazolin-Rezeptoren hat und da Guanabenz keine Wirkung zeigte, kann die bei Moxonidin und Clonidin beobachtete Hemmung der Erholung von intrazellulärer Alkalinisierung als nicht α_2 -Adrenozeptor-Effekt eingestuft werden.

Da pH-Regulationssysteme der Zelle stark konserviert sind (13), ist es wahrscheinlich, dass andere Zellen des Organismus ähnlich wie Fibroblasten beeinflusst werden. So ist für die Niere gezeigt worden, dass der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter des proximalen Tubulus beim Transport von Natrium ins Blut beteiligt ist (13)(Abb. 4). Wenn Moxonidin ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Aktivität von Natrium-Bikarbonat-Kotransportern hätte, würde hieraus eine Natriurese und Diurese resultieren. So hätte Moxonidin auch direkte Effekte auf die Niere, die unabhängig von einer reduzierten Aktivität des sympathischen Nervensystems wäre (112). In den Studien von Smyth et al. (112) wurde die periphere Wirkung von Moxonidin einer Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers zugeschrieben. Unsere Untersuchungen an kardialen Fibroblasten machen jedoch einen Effekt auf die Aktivität des renalen Na^+/H^+ -Austauschers unwahrscheinlich.

4.3 Aktivierung von Ionentransportern durch AVP und Angiotensin

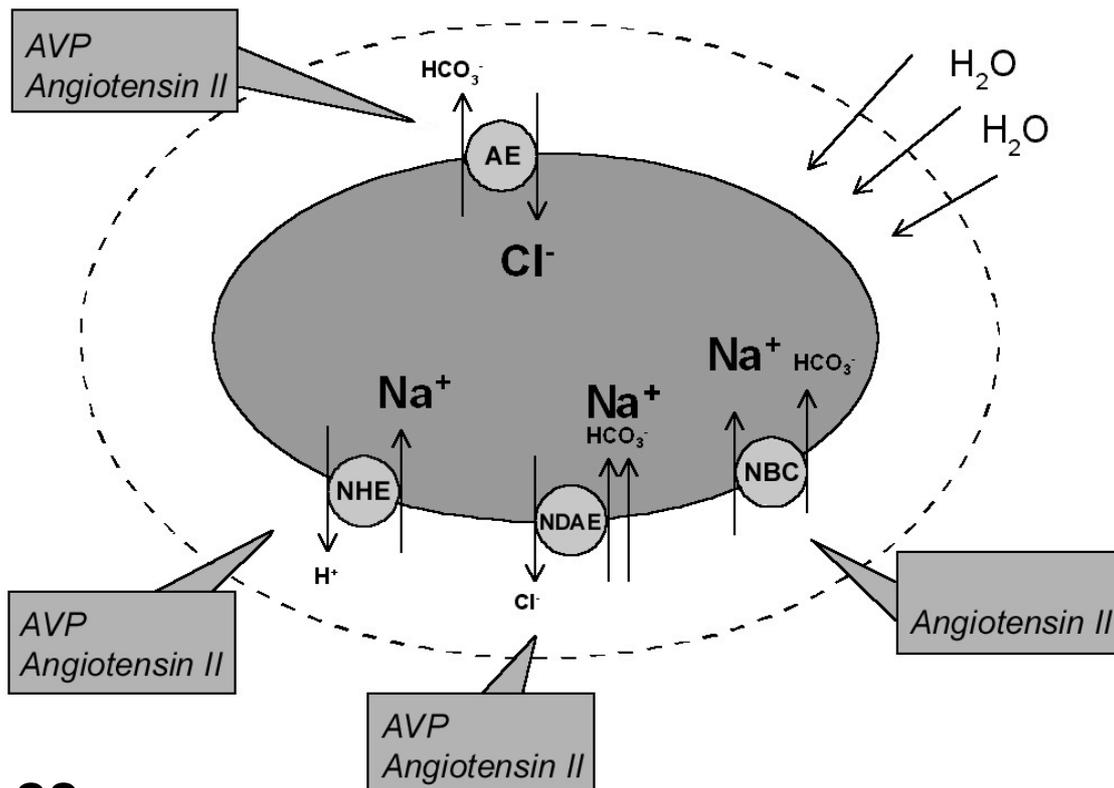
Ein Anstieg des intrazellulären pH ist als Signal für die Proliferation bzw. das Wachstum von Zellen eingestuft worden (136, 137). So ist ein moderater Anstieg des zytosolischen pH beobachtet worden, wenn verschiedene hormonelle Reize Zellwachstum und Zellteilung induzierten (20). Da diese Studien zumeist in nomineller Abwesenheit von HCO_3^- durchgeführt wurden, nahm man eine Aktivierung von NHE und damit einen Anstieg des pH_i an. In Gegenwart von Bikarbonat wurde jedoch nur ein kleinerer Anstieg des pH_i beobachtet und stattdessen wurde ein Anstieg des Zellvolumens gefunden (145, 146). Nach der These von Reinertsen und Olsnes (20) wird in Anwesenheit von Bikarbonat nicht nur der Natrium-Protonenaustauscher aktiviert, sondern auch der Anionenaustauscher AE. Zusätzlich zur Aktivierung dieser 1988 bereits identifizierten Ionentransporter wurde die Aktivierung weiterer Ionenbewegungen vermutet, bei welchen es zum Transport von Na^+ und Bikarbonat in die Zelle käme, was -wie heute bekannt- durch NBC und NDAE vermittelt wird. Durch gleichzeitige Aktivierung dieser Ionenbewegungen würde intrazellulär NaCl akkumulieren (20), was konsekutiv zu einem Wassereinstrom und damit zum Schwellen der Zelle führen würde. Unter Berücksichtigung der in den letzten Jahren beschriebenen Austauscher würde man vermuten, dass Na^+ über NHE, NBC und NDAE in die Zelle gelangen würde und Chlorid über AE und CHE (Abb. 28). Mögli-

cherweise stellt diese Schwellung das Signal für Zellwachstum und Zellteilung dar (20). In Bikarbonat-haltigem Medium konnte sogar in Abwesenheit des NHE oder unter dessen Hemmung Zellwachstum initiiert werden (20). Demnach würde die Aktivierung des natriumabhängigen und natriumunabhängigen Austauschs alleine den zellulären NaCl-Gehalt steigern und so die Zelle zum Schwellen bringen (20). Dies entspräche nach heutiger Vorstellung einer gleichzeitigen Aktivierung von AE und NDAE. Würden diese beiden und gegebenenfalls auch NBC simultan gehemmt werden und die assoziierte Schwellung wäre der Reiz für Wachstum und Teilung, so ließe sich durch eine entsprechende pharmakologische Intervention Proliferation und Hypertrophie hemmen.

Einer der Reize, welcher eine gleichzeitige Aktivierung der infrage kommenden Ionentransporter verursachen kann, wurde von Ganz und Boron gezielt an renalen Mesangium-Zellen untersucht. So hebt Arginin-Vasopressin (AVP) bei renalen Mesangium-Zellen mit einer Konzentration von 10^{-7} mol/l und Abwesenheit von HCO_3^- den pH_i , senkt ihn jedoch in Gegenwart von HCO_3^- . Wachstum wird nach Ganz und Sterzel unter beiden Bedingungen stimuliert (147). Nach Ganz und Boron aktiviert AVP den Na^+/H^+ -Austauscher NHE, den natrium-unabhängigen säurebeladenden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch und den natriumabhängigen säure-eliminierenden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch, ohne dabei einen Effekt auf den chloridunabhängigen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport zu haben (29). Da AVP den pH_i letztlich senkt, muss die säurebeladende Stimulierung größer sein als die säureeliminierende (29). Interessanterweise umfasst die Wirkung von AVP nur eine kleine Senkung vom „steady-state“- pH_i , obwohl eine starke Aktivierung von Ionentransportern vorliegt. Acht weitere Wachstumsfaktoren konnten in der Anwesenheit von Bicarbonat kleine Senkungen des pH_i auslösen (29).

Ein pathologischer Zustand, bei dem es wahrscheinlich zu einer Aktivierung von Bikarbonattransportern kommen könnte, ist die arterielle Hypertonie. Untersuchungen von Cingolani et al. wiesen im Jahr 2001 eine gesteigerte Aktivität des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers AE im hypertrophierten Myokard von spontanhypertensiven Ratten nach (148). So war im Vergleich mit normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten die Transporteraktivität in spontanhypertensiven Ratten signifikant gesteigert. In welcher Weise sich dies in ein pathophysiologisches Gesamtbild eingliedert und welche Auswirkungen eine pharmakologische

Hemmung der Transporteraktivität hätte, ist gegenwärtig nicht bekannt. Unter dem oben genannten Aspekt einer möglichen Verminderung einer Proliferation und Hypertrophie könnte der Einsatz eines entsprechenden Inhibitors als nützlich erscheinen.



28

Abb. 28 Gleichzeitige Aktivierung von pH-wirksamen Ionentransportern mit konsekutiver intrazellulärer Akkumulation von NaCl und nachfolgender Zellschwellung. Wie im Diskussionsteil beschrieben, kann AVP (Argininvasopressin) eine Stimulierung der Ionentransporter AE, NHE und NDAE bewirken. Eine gekoppelte Zellschwellung wurde in der Literatur beschrieben und als Signal zu Zellwachstum und Proliferation eingestuft. In dieses Modell wurde der aktivierende Effekt von Angiotensin II auf die Ionentransporter AE, NHE, NDAE und NBC eingebunden (zu Literaturnachweisen siehe Einleitungsteil), da bei gleichzeitiger Erhöhung der Transporteraktivität unter diesem Reiz ebenfalls eine Akkumulation von NaCl vorstellbar ist. Eine Hemmung solcher simultaner Aktivierungen könnte möglicherweise Zellschwellung und nachfolgendes Wachstum und Proliferation vermindern. Wichtig zu erwähnen ist, dass dieses Modell nicht alle hormonellen Reize einschließt, die die Aktivität der Ionentransporter aktivieren. Insbesondere im Hinblick auf die Zusammenhänge zwischen pH und Proliferation finden sich in der Literatur noch weitere Zusammenhänge.

4.4 Änderungen im basalen pH

Nach der Auswertung der in der Arbeit beschriebenen Daten wurden erneute Versuche an einer weiteren Population von Fibroblasten durchgeführt. Während die kardialen Fibroblasten in früheren Aufbereitungen von „jungen“ 150 bis 200 g schweren Ratten gewonnen wurden, entstammten die späteren Aufbereitungen 350 bis 400 g schweren „adulten“ Ratten. Dabei fiel ein grundlegender Unterschied dieser beiden Populationen auf, nämlich dass sich der basale intrazelluläre pH, also der gemessene „Ruhe“- pH_i vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses, signifikant unterschied (Tab. 2, Abb. 23A), wobei der um 0,34 bis 0,98 pH-Einheiten höhere pH_i in den Fibroblasten aus „adulten“ Ratten zu finden war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es altersabhängige Unterschiede im Proliferationsverhalten gab. Wie Aperia et al. beobachteten (137), ist der intrazelluläre pH-Wert in proliferierenden Zellen signifikant niedriger als in sich langsam teilenden Zellen, in denen der intrazelluläre pH-Wert alkalischer ist. In unserer adulten Population könnte, entsprechend dem fortgeschrittenen Alter der Ratten, die Proliferationsrate unter der der jüngeren Population liegen, wodurch der alkalischere Basal-pH erklärt werden könnte. Zwar wurde die Proliferationsrate nicht quantifiziert, jedoch war die Zeit des Auswachsens aus den kardialen Explantstücken bei der Zellgewinnung aus adulten Ratten deutlich verzögert.

Unterstützt wird diese Überlegung durch die Befunde, dass sich im Expressionsverhalten von Anionen-Austauschern in Kardiozyten Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Entwicklung zeigen (47). So werden in neonatalen Kardiozyten der Ratte andere Expressions- und Translationsmuster der einzelnen Isoformen des Anionenaustauschers AE beschrieben als in adulten Kardiozyten. Während in neonatalen Kardiozyten AE1-, AE2- und AE3-Isoformen gefunden wurden, zeigten sich in adulten Kardiozyten nur AE1 und AE3 (47). AE2 fehlte also in den adulten Zellen. Ob Analoges auch für kardiale Fibroblasten gilt, kann gegenwärtig nur vermutet werden. Auch ist nicht bekannt, ob sich ein verändertes Expressionsmuster auf den basalen pH_i auswirkt. In Kardiozyten soll laut Richards und Puceat die pH-Regulation überwiegend auf die Isoform AE1 entfallen, während AE3 nur eine geringe Transporteraktivität zeigte (47). In Versuchen mit transfizierten Oozyten zeigte außer AE1 auch AE2 eine hohe Austauscheraktivität, während AE3 nur eine geringe Aktivität aufwies (47). Falls der Transporter AE2 nur in Fibroblasten von jungen Ratten vorkäme, so könnte

Transporter AE2 nur in Fibroblasten von jungen Ratten vorkäme, so könnte sein Fehlen in adulten Fibroblasten quantitativ ins Gewicht fallen und einen höheren Basal-pH bewirken. Bei zukünftigen Projekten sollten deshalb auch Expressionsmuster der AE-Isoformen berücksichtigt werden.

Neben der Proliferationsrate ist der Grad der Konfluenz kultivierter Zellen eine Einflussgröße auf den intrazellulären pH (137). Aperia et al zeigten, dass bei hoher Konfluenz kultivierter Zellen der intrazelluläre pH alkalischer wird als in nicht konfluenten Zellen, wobei auch die Mitoserate konfluenten Zellen sinkt. Beim Einstellen eines Gesichtsfeldes während unserer Untersuchungen im Fluoreszenzphotometer wurde Wert darauf gelegt, dass subkonfluente Zellen verwendet wurden. Sollte sich eine für das bloße Auge nicht sichtbare Schwankung im Grad der Konfluenz ergeben haben, was eigentlich durch die Mittelung über 13 ± 1 Zellen ausgeglichen werden müsste, wäre in zukünftigen Experimenten eine Technik empfehlenswert, welche genauere Unterscheidungskriterien in der Auswahl der zu untersuchenden Zellen bieten würde. So könnte der Grad der Konfluenz bzw. die Proliferationsaktivität vor Versuchsdurchführung durch eine direkte Visualisierung des pH_i abgeschätzt werden und so als Zuordnungskriterium dienen. Hierfür bietet sich das Imaging-Verfahren an, bei dem der pH_i in unterschiedlichen Farben in einem Monitorbild kodiert wird. Innerhalb des auf diese Weise eingesehenen Gesichtsfeldes können durch Verwenden von „Regions of Interest“ verschiedene Zellen einzeln ausgewählt und im Versuchsablauf getrennt gemessen werden. So könnten Unterschiede hinsichtlich des Basal-pH-Wertes und des Grades der Konfluenz innerhalb eines Gesichtsfeldes bereits in den jeweiligen Messungen berücksichtigt und ausgewertet werden.

In unseren Experimenten wurde zum Bestimmen eines Hemmeffektes auf die Erholung aus dem Alkalischen nach NH_4Cl -Impuls die Erholung als Prozentwert des zuvor erreichten Maximums berechnet. Eine Hemmung zeigte sich so als ein höherer Prozentwert. Um zu kontrollieren, ob dieses Kriterium vom basalen pH_i , also dem gemessenen „Ruhe“- pH_i vor Start des Ammoniumchlorid-Impulses abhängt, wurde in den Kontrollexperimenten dieser Fünfminutenwert mit dem Basal-pH korreliert (Abb. 23B). Hierfür ergab sich mit $r = 0,18$ keine signifikante Korrelation, eine Abhängigkeit bestand also nicht. Dass der basale intrazelluläre pH für unsere Untersuchungen aber Relevanz besitzt wird

dadurch deutlich, dass die untersuchten Substanzeffekte offensichtlich vom basalen intrazellulären pH beeinflusst werden. Wie Abb. 23B und C zeigen, korreliert der Hemmeffekt von DIDS und Moxonidin negativ mit dem basalen intrazellulären pH. Je alkalischer das Zytoplasma war, desto geringer war die Verminderung der Erholung aus dem Alkalischen, d.h. umso niedriger war der Prozentwert der Alkalibeladung 5 Min. nach Erreichen des pH-Maximums und umso geringer war der Hemmeffekt von DIDS und Moxonidin.

Darüber hinaus lässt sich auf eine mögliche Wirkung von DIDS schließen, die ebenso vom basalen intrazellulären pH abhängen könnte (Abb. 23A; Tab. 2). In Fibroblasten aus „jungen“ 150-200 g schweren Ratten, die mit DIDS vorinkubiert waren, lag der basale pH_i signifikant unter dem der Kontrollen in Fibroblasten aus „jungen“ Ratten ($p < 0,05$. Abb. 23A; Tab. 2). Diese mögliche DIDS-Wirkung war im entsprechenden Vergleichspaar in Fibroblasten aus „adulten“ 350-400 g schweren Ratten nicht mehr zu beobachten, was ein weiterer Hinweis für die pH-Abhängigkeit der Wirkungen sein könnte. Diese Zusammenhänge könnten wie bereits erwähnt durch das Imaging-Verfahren genauer untersucht werden.

4.5 Weitere Hemmer von Anionenaustauschern

Auch in jüngster Zeit wurden von anderen Arbeitsgruppen Versuche unternommen, Substanzen zu finden, welche die pH-Regulation von Zellen und insbesondere Bikarbonattransporter beeinflussen. Dabei wurde eine neue Hemmsubstanz beschrieben, welche gezielt den Anionen-Austauscher AE in Kardiozyten hemmt. So wurde die von der Firma Servier entwickelte Substanz S20787 erstmalig im Jahr 1996 untersucht (149). Sie sollte den AE-Austauscher zu 50 % hemmen. Loh und Vaughan-Jones charakterisierten 2001 die Effekte von S20787 genauer (86) und zeigten, dass diese Substanz selektiv den AE um 70-80% mit einem Wirkmaximum bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ hemmt. Sie führten die früher als niedriger ermittelte Hemmmrate darauf zurück, dass die Rolle des CHE-Austauschers nicht berücksichtigt worden war. Wie Loh und Vaughan-Jones zeigten, ist dieser Ionentransporter selbst in höheren Konzentrationen von 1-20 $\mu\text{mol/l}$ S20787 nicht hemmbar. Durch die Wahl der Versuchsbedingungen konnte der Anteil der pH-Erholung von intrazellulärer Alkalose, welcher auf CHE zurückzuführen ist, eliminiert und so die selektive

Hemmwirkung von S20787 auf den AE gezeigt werden. Ausschließen konnten diese Untersuchungen einen Effekt von S20787 auf die Ionenporter NHE und NBC.

Loh und Vaughan-Jones erwarten von S20787 kardioprotektive Wirkungen. Da eine Natriumüberladung einen Vorläufer für intrazelluläre Kalziumüberladung und so für kardiale Dysfunktion und Arrhythmien darstellt (86), ist es vorstellbar, dass eine Hemmsubstanz des AE indirekt die säureausschleusenden Ionenporter hemmt, denn ein alkalischerer pH_i würde eine gegenregulatorische Aktivierung von NHE, NBC und NDAE, die Na^+ in die Zelle einbringen, vermindern. Ebenso würde ein in den alkalischen Bereich verschobener pH_i auch durch eine Azidose induzierte Arrhythmie verhindern und azidosebedingte Kontraktilitätsschwächen verhindern (86).

Da der selektive Hemmstoff S20787 die Erholung aus dem Alkalischen vermindert, liegt es nahe, ihn mit den hier beschriebenen Effekten von Moxonidin zu vergleichen, das auch eine hemmende Wirkung auf die Erholung von intrazellulärer Alkalose hat. Da zum Zeitpunkt unserer Datengewinnung das Wissen um den CHE-Transporter noch nicht vorlag, wurde bei unserer Wahl der Versuchsbedingungen dieser nicht berücksichtigt, sodass wir nicht zwischen einer Beeinflussung der Aktivität von AE oder CHE unterscheiden können. Hierzu wären erneute Versuche mit Moxonidin unter nominell CO_2/HCO_3^- -freien Bedingungen notwendig. Auch ein experimenteller Einsatz von S20787 im Vergleich mit Moxonidin wäre interessant. Durch gezielte Hemmung des AE durch S20787 könnten mögliche Effekte von Moxonidin auf CHE untersucht werden.

Nach Auswaschen von S20787 fällt auch dessen Hemmeffekt auf AE weg, sodass die Hemmwirkung der Substanz reversibel erscheint (86). Moxonidin dagegen scheint mit einem Langzeiteffekt zu wirken, denn nach Entfernen von Moxonidin aus dem Superfusionsmedium bleibt dessen hemmender Einfluß auf die Erholung aus dem Alkalischen zumindest über ca. 20 Min. bestehen. Moxonidin besitzt neben dem hemmenden Einfluß auf die Erholung aus dem Alkalischen auch einen hemmenden Effekt auf die Erholung aus dem Sauren, was für S20787 von Loh et Vaughan-Jones ausgeschlossen wurde. Der Vorteil der Einflüsse von Moxonidin könnte darin liegen, dass unter Moxonidin eine gleichzeitige Aktivitätsminderung der Transporter beider pH-Bereiche eine Ver-

minderung bzw. ausbleibende Erhöhung des intrazellulären NaCl-Gehaltes unter pathologischen Bedingungen nach sich ziehen könnte. Auf diese Weise könnten Zellen vor Schwellung und konsekutiver Hypertrophie und Proliferation geschützt werden. Dies scheint für S20787 weniger sicher, da sich der Hemmeffekt von S20787 nur auf einen Transporter, nämlich AE, erstreckt.

Das Wirkoptimum von S20787 lag bei einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l (86), wobei der Dosisbereich von 1 bis 20 $\mu\text{mol/l}$ untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit lag der untersuchte Konzentrationsbereich von Moxonidin bei 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l. Leider kann wegen der sich nur gering überschneidenden Daten und unserer fehlenden Berücksichtigung von CHE die Wirkpotenz von S20787 und Moxonidin nicht direkt verglichen werden. Gegenwärtig ist die chemische Struktur von S20787 noch nicht veröffentlicht (86). Ein Vergleich mit der Struktur von Moxonidin könnte möglicherweise Aufschluss über die Wirkweise von Moxonidin geben, die wir auf molekularer Ebene noch nicht klären konnten und weiterführende Arbeiten erfordert.

5. Zusammenfassung

Die Regulation von intra- und extrazellulären Ionenaktivitäten ist von zentraler Bedeutung für physiologische Vorgänge in Organsystemen, Geweben und einzelnen Zellen. Sie wird über energieverbrauchende Pumpen, Kanäle und membranäre Antiporter vermittelt. Eine pharmakologische Beeinflussung dieser Mechanismen ermöglicht es, pathologisch veränderte Zustände zu verändern. So stellen die verschiedenen Diuretika bzw. die Säuresekretionshemmer im klinischen Alltag etablierte Therapeutika dar, welche über Wechselwirkungen mit membrangebundenen Ionentransportmechanismen von Niere und Magen wirken.

Demgegenüber existiert eine Gruppe von Ionentransportern, die zwar Gegenstand der aktuellen Forschung ist, die jedoch gegenwärtig noch nicht als Ziel von therapeutischen pharmakologischen Interventionen etabliert ist. Zwar sind Vertreter dieser Bikarbonat-Transporter-Superfamilie (BTS) schon 1985 identifiziert worden, jedoch beschreiben Arbeiten aus dem Jahr

2001 weitere neue Mitglieder dieser Proteinfamilie. Diesen Ionentransportern ist der Transport von Bikarbonat und damit eine Rolle in der Regulation des intrazellulären pH gemeinsam. Ihre Mitglieder sind in der zeitlichen Reihenfolge der molekularen Identifizierung der natriumunabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionenaustauscher AE, der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC, der natriumabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionenaustauscher NDAE1 und der funktionell nachgewiesene Cl^-/OH^- -Austauscher CHE. Diese Ionentransporter gliedern sich in physiologische Systeme wie die Sekretions- und Resorptionsmechanismen der Niere, des Magens und des Knochens ein. Auch in erregbaren Geweben wie der Herzmuskulatur spielen sie eine Rolle im Sinne der Regulierung des intrazellulären pH.

Im experimentellen Gebrauch sind Hemmsubstanzen von Bikarbonattransportern etabliert, welche zur Gruppe der Stilbendisulfonate gehören. Als eine Art Standardsubstanz zur Hemmung der Bikarbonataustauscher ist hier das 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonat (DIDS) gut bekannt.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Hemmung von Bikarbonataustauschern auch durch klinisch etablierte Pharmaka möglich ist. Im Vordergrund stand Moxonidin, von dem durch Schlatter et al. (113) berichtet wurde,

dass es einen Ionentransporter, den alkalinisierenden renalen Na^+/H^+ -Austauscher NHE hemmt. Moxonidin und Clonidin gehören zur Gruppe antihypertensiver Pharmaka, welche neben der Bindung an α_2 -Rezeptoren des ZNS über eine Wechselwirkung mit Imidazolin-Rezeptoren wirken. Zusätzlich zu Effekten am ZNS wurden Moxonidin auch direkte Wirkungen an peripheren Organen wie der Niere zugeschrieben.

Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit der mögliche Einfluss von Moxonidin auf Bikarbonattransporter in kardialen kultivierten Fibroblasten untersucht. Hierbei wurde als Endpunkt der Aktivität dieser Ionentransporter der intrazelluläre pH mithilfe der Fluoreszenzphotometrie beobachtet. So konnte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Moxonidin Einflüsse auf die Aktivität von Bikarbonattransportern und Na^+/H^+ -Austauschern ausübt.

In ersten Untersuchungen konnten zunächst die aus der Literatur bekannten zellulären pH-Regulationsvorgänge in kultivierten kardialen Fibroblasten nachvollzogen werden, da erzeugte Auslenkungen des intrazellulären pH entsprechende gegenregulatorische Reaktionen hervorriefen. Diese waren unter dem Einsatz von etablierten Hemmsubstanzen bzw. durch Veränderungen des extrazellulären Ionenmilieus beeinflussbar. Auf diese Weise konnte auf die vorhandene Aktivität bestimmter Ionentransporter geschlossen werden. Insbesondere konnte die Wirkung von DIDS auf säurebeladende und säureelimierende Bikarbonattransporter nachvollzogen werden, was als eine Art vergleichbarer Referenz angesehen wurde. Der hemmende Einfluss von DIDS wurde mit der Wirkung der zu testenden Substanz Moxonidin verglichen. Dabei hatte Moxonidin DIDS-ähnliche Wirkung auf säurebeladende und säureelimierende Bikarbonattransporter. Eine Wirkung auf Na^+/H^+ -Austauscher wie sie die etablierte Experimentalsubstanz HOE694 hat, erschien für Moxonidin nicht wahrscheinlich.

Die Aktivität vom säurebeladenden natriumunabhängigen Anionen Austauscher AE, als auch von säureelimierenden NDAE bzw. NBC wurden vermindert. Der hemmende Einfluss von Moxonidin auf AE war dosisabhängig, was ein wesentliches Kriterium für einen pharmakologischen Effekt ist. Moxonidin hatte auch eine hemmende Wirkung auf AE in Versuchen, bei denen der Ionentransporter durch Entzug von extrazellulärem Chlorid in seiner Funktions-

weise umgekehrt wurde. Dieser umgekehrte Ionenfluss konnte durch DIDS und Moxonidin signifikant vermindert werden.

Da Moxonidin bei hoher Dosierung auch eine Wirkung auf α_2 -Rezeptoren hat, wurde überprüft, inwieweit α_2 -vermittelte Reaktionen an den beobachteten Wirkungen auf Ionentransporter beteiligt sind. Es wurde daher die Wirkung von Moxonidin mit der von Guanabenz, einem etablierten α_2 -Agonisten und Clonidin, das eine im Vergleich zu Moxonidin stärkere α_2 -Wirkung hat, verglichen. Guanabenz hatte keine signifikante Wirkung auf säurebeladende Ionentransporter. Clonidin hatte eine geringer hemmende Wirkung als Moxonidin.

Abschließende Untersuchungen zeigten, dass die Effekte von DIDS und Moxonidin auf die Aktivität des Bikarbonattransporters AE pH-abhängig waren. Während die Aktivität von säurebeladenden Ionentransportern in der Kontrolle keine Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert zeigte, war der hemmende Einfluss von DIDS und Moxonidin pH-abhängig.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene hemmende Wirkung auf die Austauschaktivität von Ionentransportern wurde bei kultivierten kardialen Fibroblasten beobachtet. Es stellt sich die Frage, ob Moxonidin auch bei anderen Zellen eine ähnliche Wirkung hat. Dementsprechend sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um zu prüfen, ob die diuretische Wirkung von Moxonidin auf eine solche Hemmung zurückzuführen ist.

6. Literaturnachweis

1. Romero MF, Henry D, Nelson S, Harte PJ, Dillon AK, Sciortino CM: Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *J Biol Chem* 2000; 275(32):24552-9.
2. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, 1996
3. Leem CH, Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD: Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1999; 517(Pt 1):159-80.
4. Scholz W, Albus U, Linz W, Martorana P, Lang HJ, Scholkens BA: Effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibitors in cardiac ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24(7):731-9.
5. Bugge E, Ytrehus K: Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart--a protective additive to ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1995; 29(2):269-74.
6. Bugge E, Munch-Ellingsen J, Ytrehus K: Reduced infarct size in the rabbit heart in vivo by ethylisopropyl-amiloride. A role for Na⁺/H⁺ exchange. *Basic Res Cardiol* 1996; 91(3):203-9.
7. Munch-Ellingsen J, Lokebo JE, Bugge E, Ytrehus K: Equal reduction in infarct size by ethylisopropyl-amiloride pretreatment and ischemic preconditioning in the in situ rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 1998; 186(1-2):13-8.
8. Sato H, Miki T, Vallabhapurapu RP, Wang P, Liu GS, Cohen MV, Downey JM: The mechanism of protection from 5 (N-ethyl-N-isopropyl)amiloride differs from that of ischemic preconditioning in rabbit heart. *Basic Res Cardiol* 1997; 92(5):339-50.
9. Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, Scholkens BA: Hoe 694, a new Na⁺/H⁺ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Br J Pharmacol* 1993; 109(2):562-8.
10. Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Scholkens BA: Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1995; 29(2):260-8.
11. Avkiran M, Marber MS: Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(5):747-53.
12. Karow T, Lang L: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Bergisch-Gladbach, Druckerei F. Hansen, 2000
13. Romero M, Boron W: Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61:699-723
14. Busa WB, Nuccitelli R: Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol* 1984; 246(4 Pt 2):R409-38.
15. Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, LeBoeuf RA: Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. *Eur J Biochem* 1993; 213(1):349-57.

6. Literaturnachweis

16. McConkey DJ, Orrenius S: Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 1996; 14(6):619-31.
17. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL: Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 97(10):2391-8.
18. Pushkin A, Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Kurtz I: Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* 1999; 274(23):16569-75.
19. Juel C: Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiol Scand* 1996; 156(3):369-74.
20. Reinertsen KV, Tonnessen TI, Jacobsen J, Sandvig K, Olsnes S: Role of chloride/bicarbonate antiport in the control of cytosolic pH. Cell-line differences in activity and regulation of antiport. *J Biol Chem* 1988; 263(23):11117-25.
21. Kopito RR, Lodish HF: Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* 1985; 316(6025):234-8.
22. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF: Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature* 1997; 387(6631):409-13.
23. Romero MF, Fong P, Berger UV, Hediger MA, Boron WF: Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ cotransporter from rat kidney. *Am J Physiol* 1998; 274(2 Pt 2):F425-32.
24. Kaplan DL, Boron WF: Long-term expression of c-H-ras stimulates Na-H and Na⁽⁺⁾-dependent Cl⁻ HCO₃⁻ exchange in NIH-3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269(6):4116-24.
25. Russell JM, Boron WF: Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* 1976; 264(5581):73-4.
26. Thomas RC: The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. *J Physiol* 1977; 273(1):317-38.
27. Schwiening CJ, Boron WF: Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na⁽⁺⁾-dependent Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ exchange. *J Physiol* 1994; 475(1):59-67.
28. Guggino WB, London R, Boulpaep EL, Giebisch G: Chloride transport across the basolateral cell membrane of the *Necturus* proximal tubule: dependence on bicarbonate and sodium. *J Membr Biol* 1983; 71(3):227-40
29. Ganz MB, Boyarsky G, Sterzel RB, Boron WF: Arginine vasopressin enhances pH_i regulation in the presence of HCO₃⁻ by stimulating three acid-base transport systems. *Nature* 1989; 337(6208):648-51.
30. Ganz MB, Boron WF: Long-term effects of growth factors on pH and acid-base transport in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 1994; 266(4 Pt 2):F576-85.
31. Grichtchenko, II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF: Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na⁽⁺⁾-driven Cl⁻-HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8358-63.

6. Literaturnachweis

32. Soleimani M, Burnham CE: Na⁺:HCO₃⁻ cotransporters (NBC): cloning and characterization. *J Membr Biol* 2001; 183(2):71-84.
33. Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I: Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 1998; 273(28):17689-95.
34. Dart C, Vaughan-Jones RD: Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ symport in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol* 1992; 451:365-85
35. Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD: Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1992; 458:361-84.
36. Eiam-Ong S, Hilden SA, Johns CA, Madias NE: Stimulation of basolateral Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. *Am J Physiol* 1993; 265(2 Pt 2):F195-203.
37. Eiam-Ong S, Hilden SA, King AJ, Johns CA, Madias NE: Endothelin-1 stimulates the Na⁺/H⁺ and Na⁺/HCO₃⁻ transporters in rabbit renal cortex. *Kidney Int* 1992; 42(1):18-24.
38. Ruiz OS, Arruda JA: Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases. *Am J Physiol* 1992; 262(4 Pt 2):F560-5.
39. Ishiguro H, Steward MC, Wilson RW, Case RM: Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 1996; 495(Pt 1):179-91.
40. Abdulnour-Nakhoul S, Khuri RN, Nakhoul NL: Effect of norepinephrine on intracellular pH in kidney proximal tubule: role of Na⁺-(HCO₃)_n cotransport. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 2):F33-45.
41. Muller-Berger S, Nesterov VV, Fromter E: Partial recovery of in vivo function by improved incubation conditions of isolated renal proximal tubule. II. Change of Na-HCO₃ cotransport stoichiometry and of response to acetazolamide. *Pflugers Arch* 1997; 434(4):383-91.
42. Bartel D, Lepke S, Layh-Schmitt G, Legrum B, Passow H: Anion transport in oocytes of *Xenopus laevis* induced by expression of mouse erythroid band 3 protein--encoding cRNA and of a cRNA derivative obtained by site-directed mutagenesis at the stilbene disulfonate binding site. *Embo J* 1989; 8(12):3601-9.
43. Kay MM, Tracey CM, Goodman JR, Cone JC, Bassel PS: Polypeptides immunologically related to band 3 are present in nucleated somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(22):6882-6.
44. Drenckhahn D, Schluter K, Allen DP, Bennett V: Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. *Science* 1985; 230(4731):1287-9.
45. Alper SL, Kopito RR, Lodish HF: A molecular biological approach to the study of anion transport. *Kidney Int Suppl* 1987; 23:S117-33.

6. Literaturnachweis

46. Kay MM: Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature* 1981; 289(5797):491-4.
47. Richards SM, Jaconi ME, Vassort G, Puceat M: A spliced variant of AE1 gene encodes a truncated form of Band 3 in heart: the predominant anion exchanger in ventricular myocytes. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 10):1519-28.
48. Jay DG: Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell* 1996; 86(6):853-4.
49. Alper SL: The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:549-64
50. Wieth JO, Andersen OS, Brahm J, Bjerrum PJ, Borders CL, Jr.: Chloride--bicarbonate exchange in red blood cells: physiology of transport and chemical modification of binding sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1982; 299(1097):383-99.
51. Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K: Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* 1989; 59(5):927-37.
52. Hick C: *Physiologie*. Neckarsulm, Lübeck, Ulm, Jungjohann Verlagsgesellschaft mbH, 1996
53. Garcia AM, Lodish HF: Lysine 539 of human band 3 is not essential for ion transport or inhibition by stilbene disulfonates. *J Biol Chem* 1989; 264(33):19607-13.
54. Harrison ML, Rathinavelu P, Arese P, Geahlen RL, Low PS: Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. *J Biol Chem* 1991; 266(7):4106-11.
55. Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. *Circ Res* 1994; 75(4):603-14.
56. Brosius FC, 3rd, Alper SL, Garcia AM, Lodish HF: The major kidney band 3 gene transcript predicts an amino-terminal truncated band 3 polypeptide. *J Biol Chem* 1989; 264(14):7784-7.
57. Kudrycki KE, Newman PR, Shull GE: cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl-/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* 1990; 265(1):462-71.
58. Kopito RR: Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int Rev Cytol* 1990; 123:177-99
59. Wang Z, Schultheis PJ, Shull GE: Three N-terminal variants of the AE2 Cl-/HCO₃⁻ exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem* 1996; 271(13):7835-43.
60. Linn SC, Kudrycki KE, Shull GE: The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N terminus distinct from that of the brain AE3 Cl-/HCO₃⁻ exchanger. Cloning of a cardiac AE3 cDNA, organization of the AE3 gene, and identification of an alternative transcription initiation site. *J Biol Chem* 1992; 267(11):7927-35.
61. Puceat M, Korichneva I, Cassoly R, Vassort G: Identification of band 3-like proteins and Cl-/HCO₃⁻ exchange in isolated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1995; 270(3):1315-22.

6. Literaturnachweis

62. Korichneva I, Puceat M, Cassoly R, Vassort G: Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in developing neonatal rat cardiac cells. Biochemical identification and immunolocalization of band 3-like proteins. *Circ Res* 1995; 77(3):556-64.
63. Parker MD, Ourmozdi EP, Tanner MJ: Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(5):1103-9.
64. Tsuganezawa H, Kobayashi K, Iyori M, Araki T, Koizumi A, Watanabe S, Kaneko A, Fukao T, Monkawa T, Yoshida T, Kim DK, Kanai Y, Endou H, Hayashi M, Saruta T: A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8180-9.
65. Sun B, Leem CH, Vaughan-Jones RD: Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism. *J Physiol* 1996; 495(Pt 1):65-82.
66. Leem CH, Vaughan-Jones RD: Out-of-equilibrium pH transients in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1998; 509(Pt 2):471-85.
67. Tonnessen TI, Ludt J, Sandvig K, Olsnes S: Bicarbonate/chloride antiport in Vero cells: I. Evidence for both sodium-linked and sodium-independent exchange. *J Cell Physiol* 1987; 132(2):183-91.
68. Olsnes S, Tonnessen TI, Sandvig K: pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. *J Cell Biol* 1986; 102(3):967-71.
69. Olsnes S, Tonnessen TI, Ludt J, Sandvig K: Effect of intracellular pH on the rate of chloride uptake and efflux in different mammalian cell lines. *Biochemistry* 1987; 26(10):2778-85.
70. Humphreys BD, Jiang L, Chernova MN, Alper SL: Functional characterization and regulation by pH of murine AE2 anion exchanger expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 1):C1295-307.
71. Sun AM: Expression of Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the basolateral membrane of mouse medullary thick ascending limb. *Am J Physiol* 1998; 274(2 Pt 2):F358-64.
72. Sun AM, Hebert SC: Effects of hyperosmolality on the basolateral Na⁺-H⁺ antiporter in mouse thick ascending limb of Henle (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992; 3:799
73. Sun AM, Kikeri D, Hebert SC: Vasopressin regulates apical and basolateral Na⁽⁺⁾-H⁺ antiporters in mouse medullary thick ascending limbs. *Am J Physiol* 1992; 262(2 Pt 2):F241-7.
74. Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR, Muallem S: Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Regulation of anion exchange by intracellular pH and Ca²⁺ ions. *J Gen Physiol* 1990; 95(1):121-45.
75. Muallem S, Loessberg PA: Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acinar cells. II. Regulation of H⁺ and HCO₃⁻ transporters by Ca²⁺(+)-mobilizing agonists. *J Biol Chem* 1990; 265(22):12813-9.
76. Tonnessen TI, Sandvig K, Olsnes S: Role of Na⁽⁺⁾-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality. *Am J Physiol* 1990; 258(6 Pt 1):C1117-26.

6. Literaturnachweis

77. Vigne P, Breittmayer JP, Frelin C, Lazdunski M: Dual control of the intracellular pH in aortic smooth muscle cells by a cAMP-sensitive HCO₃⁻/Cl⁻ antiporter and a protein kinase C-sensitive Na⁺/H⁺ antiporter. *J Biol Chem* 1988; 263(34):18023-9.
78. Schuster VL, Bonsib SM, Jennings ML: Two types of collecting duct mitochondria-rich (intercalated) cells: lectin and band 3 cytochemistry. *Am J Physiol* 1986; 251(3 Pt 1):C347-55.
79. Desilets M, Puceat M, Vassort G: Chloride dependence of pH modulation by beta-adrenergic agonist in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75(5):862-9.
80. Puceat M, Clement O, Vassort G: Extracellular MgATP activates the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in single rat cardiac cells. *J Physiol* 1991; 444:241-56.
81. Grace A, Vandenberg J: Angiotensin II enhances cardiac pHi regulation in the presence of HCO₃ via three acid-base transport mechanisms (Abstract). *Circulation* 1993; 88:1331
82. Puceat M, Vassort G: Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29(2):178-83.
83. Puceat M, Roche S, Vassort G: Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 1998; 141(7):1637-46.
84. Hun Leem C, Vaughan-Jones RD: Chloride-hydroxyl exchange in the guinea-pig ventricular myocyte: no role for bicarbonate. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(9):2483-9.
85. Leem CH, Vaughan-Jones RD: Sarcolemmal mechanisms for pHi recovery from alkalosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1998; 509(Pt 2):487-96.
86. Loh SH, Tsai CS, Lin CI, Jin JS, Vaughan-Jones RD: Effect of S20787, a novel Cl⁻/HCO₃⁻ exchange inhibitor, on intracellular pH regulation in guinea pig ventricular myocytes. *J Biomed Sci* 2001; 8(5):395-405.
87. Silver RB, Soleimani M: H⁺-K⁺-ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 2):F799-811.
88. Stuart-Tilley A, Sardet C, Pouyssegur J, Schwartz MA, Brown D, Alper SL: Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol* 1994; 266(2 Pt 1):C559-68.
89. Lopina OD, Rubtsov AM: H,K-ATPase and acid secretion control in gastric mucosa. *Biochemistry (Mosc)* 1997; 62(10):1057-63.
90. Muth TR, Gottardi CJ, Roush DL, Caplan MJ: A basolateral sorting signal is encoded in the alpha-subunit of Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 1998; 274(3 Pt 1):C688-96.
91. Blair HC, Schlesinger PH, Ross FP, Teitelbaum SL: Recent advances toward understanding osteoclast physiology. *Clin Orthop* 1993(294):7-22.
92. Bastani B, Ross FP, Kopito RR, Gluck SL: Immunocytochemical localization of vacuolar H⁺-ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger (erythrocyte band-3 protein) in avian osteoclasts: effect of calcium-deficient diet on polar expression of the H⁺-ATPase pump. *Calcif Tissue Int* 1996; 58(5):332-6.
93. Hakeda Y, Kumegawa M: [Osteoclasts in bone metabolism]. *Kaibogaku Zasshi* 1991; 66(4):215-25.

6. Literaturnachweis

94. Salhany JM: Mechanism of competition between chloride and stilbenedisulfonates for binding to human erythrocyte band 3 (AE1). *Biochem Cell Biol* 1998; 76(5):715-22
95. Cabantchik ZI, Knauf PA, Rothstein A: The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes'. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515(3):239-302.
96. Bretag AH: Muscle chloride channels. *Physiol Rev* 1987; 67(2):618-724.
97. Shami Y, Rothstein A, Knauf PA: Identification of the Cl⁻ transport site of human red blood cells by a kinetic analysis of the inhibitory effects of a chemical probe. *Biochim Biophys Acta* 1978; 508(2):357-63.
98. Jessen F, Sjöholm C, Hoffmann EK: Identification of the anion exchange protein of Ehrlich cells: a kinetic analysis of the inhibitory effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) and labeling of membrane proteins with 3H-DIDS. *J Membr Biol* 1986; 92(3):195-205
99. Lambert A, Lowe AG: Chloride/bicarbonate exchange in human erythrocytes. *J Physiol* 1978; 275:51-63.
100. Lee BS, Gunn RB, Kopito RR: Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *J Biol Chem* 1991; 266(18):11448-54.
101. Cabantchik ZI, Rothstein A: Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. I. Localization of disulfonic stilbene binding sites in proteins involved in permeation. *J Membr Biol* 1974; 15(3):207-26
102. Lux SE, John KM, Kopito RR, Lodish HF: Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(23):9089-93.
103. Okubo K, Kang D, Hamasaki N, Jennings ML: Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H2DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule. *J Biol Chem* 1994; 269(3):1918-26.
104. Cabantchik ZI, Rothstein A: The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. *J Membr Biol* 1972; 10(3):311-30.
105. Salhany JM: Allosteric effects in stilbenedisulfonate binding to band 3 protein (AE1). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1996; 42(7):1065-96.
106. Sterling D, Casey JR: Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *Biochem J* 1999; 344 Pt 1:221-9.
107. Nagashima R, Tsuda Y, Maruyama T, Kanaya S, Fujino T, Niho Y: Possible evidence for transmembrane K⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange system in guinea pig myocardium. *Jpn Heart J* 1999; 40(3):351-64.
108. Brilla CG: Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25(3):299-306.

6. Literaturnachweis

109. Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE: Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur J Cell Biol* 1995; 68(3):330-5.
110. Brilla CG, Scheer C, Rupp H: Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix: modulation of cardiac fibroblast function by angiotensin II type 1 receptor antagonism. *J Hypertens Suppl* 1997; 15(6):S13-9.
111. Schlieck A: Schnelle Effekte von Aldosteron auf den intrazellulären pH in kardialen Fibroblasten - Vergleich mit NH₄Cl. Dissertation Phillips-Universität Marburg 2000
112. Allan DR, Penner SB, Smyth DD: Renal imidazoline preferring sites and solute excretion in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 108(4):870-5.
113. Schlatter E, Ankorina-Stark I, Haxelmans S, Hohage H: Moxonidine inhibits Na⁺/H⁺ exchange in proximal tubule cells and cortical collecting duct. *Kidney Int* 1997; 52(2):454-9.
114. Fleischer, Fleischer: Detection of Na⁺/H⁺ Exchange by Measurement of Intracellular pH (pHi), pHi Determination, in *Methods in Encymology*, vol 173, Academic Press, pp 782-784
115. Molecular-Probes: Product Information Sheet BCECF-AM. Göttingen, Molecular Probes, 1998
116. Molecular-Probes: Product Information Sheet Pluronic F-127. Göttingen, Molecular Probes, 1999
117. Saward L, Zahradka P: Coronary artery smooth muscle in culture: migration of heterogeneous cell populations from vessel wall. *Mol Cell Biochem* 1997; 176(1-2):53-9.
118. Worthington-Biochem-Corporation: "Tissue dissociation manual" (www.worthington-biochem.com), 2002
119. Blondel B, Roijen I, Cheneval J: Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 1971; 27:356-358
120. Brouty-Boye D, Raux H, Azzarone B, Tamboise A, Tamboise E, Beranger S, Magnien V, Pihan I, Zardi L, Israel L: Fetal myofibroblast-like cells isolated from post-radiation fibrosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 47(5):697-702
121. Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G: Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989; 60(2):275-85.
122. Brouty-Boye D, Kolonias D, Savaraj N, Lampidis TJ: Alpha-smooth muscle actin expression in cultured cardiac fibroblasts of newborn rat. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28A(4):293-6
123. Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, Collins LA, Westbrook KL, Johnson GG: I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 763:22-42.
124. Steffen G, Dendorfer A, Dominiak P: Imidazoline binding sites on PC12 cells and bovine chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 763:157-62.
125. Herold G: *Innere Medizin*. Köln, Gerd Herold, 1998

6. Literaturnachweis

126. Lin WH, Higgins D, Pacheco M, Aletta J, Perini S, Marcucci KA, Roth JA: Manganese induces spreading and process outgrowth in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Neurosci Res* 1993; 34(5):546-61.
127. Zar JH: *Biostatistical Analysis*. , Prentice-Hall, Inc., 1999
128. Vaughan-Jones RD: Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. *J Physiol* 1979; 295:111-37.
129. Xu P, Spitzer KW: Na-independent Cl(-)-HCO₃⁻ exchange mediates recovery of pHi from alkalosis in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(1 Pt 2):H85-91.
130. Loh SH, Sun B, Vaughan-Jones RD: Effect of Hoe 694, a novel Na(+)-H⁺ exchange inhibitor, on intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *Br J Pharmacol* 1996; 118(8):1905-12.
131. Haenni A, Lithell H: Moxonidine improves insulin sensitivity in insulin-resistant hypertensives. *J Hypertens* 1999; 17 Suppl 3:S29-35.
132. Ernsberger P: The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 881:35-53.
133. Bousquet P, Feldman J: Drugs acting on imidazoline receptors: a review of their pharmacology, their use in blood pressure control and their potential interest in cardioprotection. *Drugs* 1999; 58(5):799-812.
134. Amann K, Greber D, Gharehbaghi H, Wiest G, Lange B, Ganten U, Mattfeldt T, Mall G: Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats. Stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium. *Am J Hypertens* 1992; 5(2):76-83.
135. Irzyniec T, Mall G, Greber D, Ritz E: Beneficial effect of nifedipine and moxonidine on glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. A micromorphometric study. *Am J Hypertens* 1992; 5(7):437-43.
136. Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camilion de Hurtado MC: Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle: an autocrine- paracrine system. *Circ Res* 1998; 83(8):775-80.
137. Larsson SH, Fukuda Y, Kolare S, Aperia A: Proliferation and intracellular pH in cultured proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1990; 258(3 Pt 2):F697-704.
138. Prichard BN: Clinical experience with moxonidine. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994; 8 Suppl 1:49-58.
139. Kirch W, Hutt HJ, Planitz V: Pharmacodynamic action and pharmacokinetics of moxonidine after single oral administration in hypertension patients. *J Clin Pharmacol* 1990; 30(12):1088-95.
140. Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B: Anion transport in heart. *Physiol Rev* 2000; 80(1):31-81.
141. Ernsberger P: The I1-Imidazoline Receptor Agonist Moxonidine: Molecular, Cellular and Organismic Actions. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 1998; 9:441-462

6. Literaturnachweis

142. Trenk D, Wagner F, Jahnchen E, Planitz V: Pharmacokinetics of moxonidine after single and repeated daily doses in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1987; 27(12):988-93.
143. Korichneva I, Puceat M, Millanvoeye-Van Brussel E, Geraud G, Vassort G: Aldosterone modulates both the Na/H antiport and Cl/HCO₃ exchanger in cultured neonatal rat cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(11):2521-8.
144. Jasper JR, Lesnick JD, Chang LK, Yamanishi SS, Chang TK, Hsu SA, Daunt DA, Bonhaus DW, Eglen RM: Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist-mediated [³⁵S]GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol* 1998; 55(7):1035-43.
145. Cassel D, Whiteley B, Zhuang YX, Glaser L: Mitogen-independent activation of Na⁺/H⁺ exchange in human epidermoid carcinoma A431 cells: regulation by medium osmolarity. *J Cell Physiol* 1985; 122(2):178-86.
146. Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, Rothstein A, Gelfand EW: Characterization of the activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by phorbol esters: change in cytoplasmic pH dependence of the antiport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(5):1429-33.
147. Ganz MB, Boyarsky G, Boron WF, Sterzel RB: Effects of angiotensin II and vasopressin on intracellular pH of glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 1988; 254(6 Pt 2):F787-94.
148. Chiappe de Cingolani G, Morgan P, Mundina-Weilenmann C, Casey J, Fujinaga J, Camillion de Hurtado M, Cingolani H: Hyperactivity and altered mRNA isoform expression of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion-exchanger in the hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res* 2001; 51(1):71-9.
149. Lagadic-Gossmann D, Le Prigent K, Baut GL, Caignard DH, Renard P, Scalbert E, Feuvray D: Effects of S20787 on pHi-regulating mechanisms in isolated rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28(4):547-52.

Lebenslauf

Name: **Dirk Witzel**

Geburtsdatum: 10.12.1971 in Fulda

Familienstand: ledig

Wohnungsanschrift: Hansteinstr. 20, 34121 Kassel

Heimatanschrift: Frankfurter Str. 139, 36043 Fulda

1978 - 1982 Grundschulen Kohlhaus und St. Sturmius

1982 - 1991 Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium) Fulda

10.06.1991 **Abitur**

08.1991 - 10.1992 **Zivildienst** auf der Sozialstation des Malteser Hilfsdienstes in Fulda (Ambulante Krankenpflege und Behindertenfahrdienst)

08.1992 - 10.1992 Stationäres Krankenpflege-Praktikum im Städtischen Klinikum Fulda

11.1992 - 10.1994 **Berufsausbildung Physiotherapie** an der Orthopädischen Klinik in Hessisch Lichtenau

11.1994 - 10.1995 **Anerkennungsjahr als Physiotherapeut** im Städtischen Klinikum Fulda

14.11.1995 **Staatliche Anerkennung als „Physiotherapeut“**

28.04.1997 Zusatzbezeichnung „**Manuelle Therapie**“

10.1995-09.1997 **Vorklinisches Studium** / Philipps-Universität Marburg

09.1997 Ärztliche Vorprüfung

10.1997-03.2001 **Klinisches Studium** / Philipps-Universität Marburg

08.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08.1998 Beginn der vorliegenden Dissertation

03.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04.2001 **Praktisches Jahr** in Kassel im Rot-Kreuz-Krankenhaus und der Orthopädischen Klinik

05.2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Gesamtnote: „gut“

01.07.2002 **Arzt im Praktikum**
an der Orthopädischen Klinik Kassel

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Beato, Barth, Baum, Basler, Betalanffy, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Doss, Effendy, Feuser, Fruhstorffer, Gemsa, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hesterberg, Hilgermann, Hofmann, Hoffmann, Jungclas, Joseph, Kälble, Kern, Kienapfel, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lammell, Lang, Lange, Lennartz, Leppek, Löser, Maser, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Niessing, Oertel, Peter, Pfeiffer, Pfab, Ramaswamy, Reichard, Remschmidt, Renz, Rothmund, Röhm, Rupp, Schäfer, Schachtschabel, Schmitz, Schmitd, Schnabel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siebert, Slenczka, Steiniger, Sturm, Suske, Töllner, Vohland, Voigt, Walter, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wübbena.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke besonders **Herrn Prof. Dr. B. Maisch** (Klinik für Innere Medizin-Kardiologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg) für die Überlassung des Dissertationsthemas. Ausserdem danke ich **Herrn Prof. Dr. H. Rupp** (Molekularkardiologisches Labor der Philipps-Universität Marburg) als Betreuer dieser Arbeit für die Einführung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und für sein hohes Engagement bei der Durchführung der Arbeit.

Meiner Kollegin **Frau U. Gey** danke ich für die kameradschaftliche Zusammenarbeit.