

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Einfluss von Wachstumsfaktoren und Moxonidin
auf den intrazellulären pH und die Proliferation
bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Julie Anna Geraldine Mertens
aus Bielefeld

Marburg, 2008

Angenommen vom
Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
am 29.05.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Rupp

1. Korreferent: Prof. Dr. R. Jacob

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 <i>Proliferation und Wachstum von Zellen</i>	10
1.2 <i>Klinische Beispiele für die pathophysiologische Bedeutung von Proliferation und Wachstum</i>	10
1.2.1 <i>Kardiale Fibrose und Herzinsuffizienz als Folge der Proliferation kardialer Fibroblasten</i>	12
1.2.2 <i>Arterielle Hypertonie und Mediahypertrophie</i>	13
1.2.3 <i>Restenosen nach perkutaner Koronarintervention (PCI) durch Hypertrophie der glatten Muskelzellen</i>	14
1.2.4 <i>Wachstum von Tumorzellen</i>	15
1.3 <i>Wachstumsfaktoren</i>	16
1.4 <i>Arbeitshypothesen</i>	17
1.4.1 <i>Änderungen des pH-Wertes werden durch veränderte Aktivität von Ionentransportern bewirkt</i>	17
1.4.2 <i>Wachstumsfaktoren bewirken bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen eine Alkalinisierung</i>	18
1.4.3 <i>Moxonidin führt zu einer Hemmung von Anionenaustauschern</i>	18
1.4.4 <i>Die intrazelluläre Alkalinisierung steht in einem Zusammenhang mit der Zellproliferation</i>	22
2. Material und Methoden	23
2.1 <i>Zellkultur</i>	23
2.1.1 <i>Kultur kardialer Fibroblasten von Ratten</i>	23
2.1.1.1 <i>Explantmethode</i>	23
2.1.1.2 <i>Kulturmedium und Kulturbedingungen</i>	24
2.1.1.3 <i>Passagieren kardialer Fibroblasten</i>	24
2.1.1.4 <i>Aussaat und Kultur der kardialen Fibroblasten auf Plättchen</i>	25

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
2.1.2 Kultur von HeLa Zellen	27
2.1.2.1 Kulturmedium und Kulturbedingungen	27
2.1.2.2 Passagieren von HeLa Zellen	27
2.1.2.3 Einfrieren von HeLa Zellen	27
2.1.2.4 Aussaat und Kultur der HeLa Zellen auf Plättchen	27
2.1.3 Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer	28
2.2. Fluoreszenzphotometrie	28
2.2.1 Prinzip der pH-Wert-Registrierung mittels Fluoreszenz- photometrie	28
2.2.2 Aufbau der Messapparatur	29
2.2.3 Vorinkubation	30
2.2.3.1 Fluoreszenzfarbstoff BCECF	30
2.2.3.2 Ablauf der Vorinkubation	32
2.2.4 Superfusionslösungen	32
2.2.4.1 Krebs-Henseleit-Lösung	32
2.2.4.2 Acetat-Lösung	32
2.2.4.3 Ammoniumchlorid-Lösung	33
2.2.5 pH-Registrierung	33
2.2.5.1 pH-Eichung	33
2.2.5.1.1 Nigericin Lösungen	35
2.2.5.1.2 Ablauf der pH-Eichung	35
2.2.5.2 Messung des basalen intrazellulären pH	37
2.2.6 Ablauf eines Acetatpulses	37
2.2.6.1 Einfacher Acetatpuls	37
2.2.6.2 Doppelpuls	37
2.2.7 Ablauf eines Ammoniumchloridpulses	37
2.2.8 Pharmakologische Interventionen	38
2.2.8.1 Variation der FBS Konzentrationen	38
2.2.8.2 Behandlung mit Moxonidin	38
2.2.8.3 Behandlung mit HOE694	38
2.3. Bestimmung der Pufferkapazität	38
2.3.1 Prinzip	38
2.3.2 Protokoll zur Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität	40

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
2.3.2.1 Ansatz der Lösungen	42
2.3.3 Ermittlung einer Gleichung für die intrinsische Pufferkapazität	42
2.4 Berechnung des Protonen-Flusses J_H	45
2.5 Proliferationsassay WST-1	46
2.5.1 Prinzip	46
2.5.2 Durchführung	46
2.5.3 Behandlungen mit HOE694 und Moxonidin	48
2.5.4 Behandlungen mit HOE694 und Moxonidin bei unterschiedlichen pH-Werten	48
2.6 Statistische Analysen	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Basaler intrazellulärer pH bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen	50
3.2 Aktivität pH-regulierender Austauscher bei kardialen Fibroblasten	55
3.2.1 Acetatpulse	55
3.2.1.1 FBS	55
3.2.1.2 Moxonidin und HOE694	55
3.2.2 Doppelpulse	62
3.2.3 Ammoniumchloridpulse	65
3.3 Aktivität pH-regulierender Austauscher bei HeLa Zellen	67
3.4 Proliferation der kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen im Proliferationsassay WST-1	73
4. Diskussion	76
4.1 Methoden zur Untersuchung der pH-Regulation	76
4.2 Die pH-Regulation bei kardialen Fibroblasten	81
4.2.1 Beeinflussung des basalen intrazellulären pH	81
4.2.2 Erholung aus dem Säuren im Zusammenhang mit der ERK-Signaltransduktionskaskade	82

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
4.2.2.1 <i>Erholung aus dem Sauren beschleunigt durch Inkubation mit FBS</i>	82
4.2.2.2 <i>ERK-Signaltransduktionskaskade</i>	82
4.2.2.3 <i>Zusammenhang zwischen der ERK-Signaltransduktionskaskade und der Aktivität des NBC</i>	83
4.2.3 <i>Erholung aus dem Alkalischen und der Einfluss von Hormonen</i>	85
4.2.3.1 <i>FBS hemmt die Erholung aus dem Alkalischen</i>	85
4.2.3.2 <i>Die Familie der SLC (engl. „solute carriers“)</i>	85
4.2.3.3 <i>Beeinflussung der Anionenaustauscher SLC4A3 und SLC26A6 durch Hormone und Second Messenger</i>	89
4.2.4 <i>pH-Regulation bei kardialen Fibroblasten unter Einfluss von Wachstumsfaktoren</i>	91
4.2.5 <i>Einfluss von Moxonidin</i>	91
4.3 <i>Die pH-Regulation bei HeLa Zellen</i>	93
4.4 <i>Die Proliferation von Zellen im Proliferationsassay WST-1</i>	94
4.5 <i>Ausblick</i>	94
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	99
<u>Anhang:</u>	105
Lebenslauf	105
Verzeichnis der akademischen Lehrer	106
Danksagung	107
Ehrenwörtliche Erklärung	108

Abkürzungsverzeichnis

β_{CO_2}	Bikarbonat-abhängige Pufferkapazität
β_i	intrinsische Pufferkapazität
β_{tot}	totale Pufferkapazität
AE	Anionenaustauscher
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II – Rezeptor 1
ATII	Angiotensin II
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
CHE	Chlorid-Hydroxyl-Austauscher
c-myc	Transkriptionsfaktor c-myc
DES	engl. „drug-eluting stents“
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, Inhibitor von Anionenaustauschern (AE)
DMA	5-(N,N-dimethyl)-amiloride, Inhibitor von Natrium-Protonen-Austauschern (NHE)
DMEM	engl. „Dulbecco's Modified Eagle Medium“, Medium für die Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDG	engl. „endothelial differentiation gene“
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride, Inhibitor von Natrium-Protonen-Austauschern (NHE)
ELISA	engl. „enzyme-linked immunosorbent assay“
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	engl. „fetal bovine serum“ (Fetales Kälberserum)
HDL	engl. „high-density lipoproteins“
HeLa Zellen	Tumor-Zell-Linie benannt nach der Patientin „Henrietta Lacks“
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure), Bikarbonat-freier Puffer
HOE694	Inhibitor von Natrium-Protonen-Austauschern (NHE)
HPV	Humanes Papillomavirus
I ₁ R	I ₁ -Imidazolin-Rezeptor
J _H	Protonen-Fluss
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAP	Mitogen-aktiviertes-Protein
MAPK	Mitogen-aktiviertes-Protein Kinase

Abkürzungsverzeichnis

MK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
NBC	Natrium-Bikarbonat-Kotransporter
NCI	engl. „National Cancer Institute“ (der USA)
NDCBE	Natrium-abhängiger-Chlorid-Bikarbonat-Austauscher, engl. „Na ⁺ -dependent-chloride-bicarbonate-exchanger“
NGF	engl. „nerve growth factor“
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NYHA	Klassifikation der New York Heart Association
PCI	perkutane Koronarintervention
pH _a	extrazellulärer pH-Wert
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RSK	Ribosomale S6 Kinase (Transkriptionsfaktor)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P ₁ -Rezeptor	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1
SEER	engl. „Surveillance, Epidemiology and End Results“, Studie zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz aus den USA
Slc	engl. „solute carriers“
SphK	Sphingosinkinase, Schlüsselenzym in der Synthese von Sphingosin-1-Phosphat
WST	engl. „water soluble tetrazolium“

1. Einleitung

1.1 Proliferation und Wachstum von Zellen

Die Zellproliferation ist die unmittelbare Voraussetzung für das Leben. Sie umfasst mehrere Mechanismen, z.B. die Zellteilung, die Zelldifferenzierung sowie die Veränderungen der extrazellulären Matrix und der Anordnung von Zellen in einem Gewebe. Neben dem geregelten Ablauf des Zellwachstums ist auch der geregelte Zelltod, die Apoptose, von großer Bedeutung für die Proliferation, da sie eine flexible Umgestaltung der Gewebe und Organe je nach funktioneller Beanspruchung erst ermöglicht.

Die Zellkultur entspricht in dieser Hinsicht zwar nicht dem Modell eines Organs oder gar eines ganzen Organismus, weil sie nicht die Möglichkeit bietet, alle verschiedenen Beanspruchungen an die Zellen zu simulieren. Aber dennoch ermöglicht sie die Untersuchung des Einflusses verschiedener äußerer Bedingungen auf eine wesentliche Komponente der Proliferation: die Zellteilung, bzw. die Rate der Zellteilungen. Die Voraussetzung für das Wachstum von Zellen ist das Vorhandensein von Zellinteraktionen, Wachstumsfaktoren, Stoffwechsel, Nährstoffen, Vitaminen, Spurenelementen und bestimmten Bedingungen des extrazellulären Milieus. Hierzu zählen die Konzentrationen von Ionen und Metaboliten sowie der pH-Wert. In Abhängigkeit von der funktionellen Beanspruchung kommt es zu strukturellen Veränderungen durch veränderte Zellteilung und Differenzierung. Hierbei kommt der Interaktion zwischen den einzelnen Zellen eine besondere Bedeutung zu: der Interaktion mittels Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 1.3).

1.2 Klinische Beispiele für die pathophysiologische Bedeutung von Proliferation und Wachstum

Anhand folgender Beispiele möchte ich die Bedeutung von Proliferation und Wachstum von Zellen für die Entstehung von Krankheiten näher erläutern. Dabei handelt es sich um Erkrankungen, die in der Todesursachenstatistik sehr weit oben rangieren: die chronische Herzinsuffizienz und Tumorerkrankungen.

Die chronische Herzinsuffizienz ist in unserer alternden Gesellschaft von besonderer Bedeutung, da ihre Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt (vgl. Gottdiener et al. (15)). So sind die meisten Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz 65 Jahre oder älter. In der Gruppe der 45- bis 55-Jährigen beträgt die Prävalenz weniger als ein Prozent, in der Gruppe der 65- bis 75-Jährigen zwei bis fünf Prozent und in der Gruppe der über 80-Jährigen bereits ca. 10 Prozent (vgl. McMurray und Stewart (31)). Das

1. Einleitung

Lebenszeitrisiko, eine chronische Herzinsuffizienz zu entwickeln, liegt für Männer und Frauen bei etwa 20 Prozent (vgl. Lloyd-Jones et al. (26)). Dabei sind die Mortalität und die Morbidität der chronischen Herzinsuffizienz auch bei optimaler Therapie nach wie vor sehr hoch (26). So betrug in der „Framingham Heart Study“ im Zeitraum von 1990 bis 1999 die altersstandardisierte 1-Jahres-Mortalität bei Männern 28 Prozent und bei Frauen 24 Prozent sowie die 5-Jahres-Mortalität bei Männern 59 Prozent und bei Frauen 45 Prozent (vgl. Levy et al. (25)). Die häufigsten Todesursachen sind das fortschreitende Pumpversagen und der plötzliche Herztod. Darüber hinaus trägt die dekompensierte Herzinsuffizienz in größerem Maße zur Hospitalisierung der älteren Bevölkerung bei.

Die Herzinsuffizienz ist ein Endpunkt verschiedener Erkrankungen. Sie wird als ein Symptomenkomplex angesehen und wird durch folgende Symptome charakterisiert: paroxysmale nächtliche Dyspnoe, Orthopnoe, Halsvenenstauung, Kardiomegalie, akutes Lungenödem, einen zusätzlichen 3. und 4. Herzton, einen erhöhten zentralen Venendruck (ZVD), die verlängerte Zirkulationszeit sowie den hepatojugulären Reflux (aus den Hauptkriterien zur Diagnose der Herzinsuffizienz in der „Framingham Heart Study“, Levy et al. (25)). Nebenkriterien nach der „Framingham Heart Study“ waren Knöchelödeme, nächtlicher Husten, Belastungsdyspnoe, Hepatomegalie, Pleuraergüsse, reduzierte Vitalkapazität in der Lungenfunktion und eine Tachykardie.

Es lassen sich viele verschiedene Ursachen der Herzinsuffizienz aufzählen. Doch machen die arterielle Hypertonie und der akute Myokardinfarkt zusammen etwa 75% des attributiven Risikos der Herzinsuffizienz aus (vgl. Yusuf und Pitt (64) und Lloyd-Jones et al. (26)). Daher ist es wichtig, Prävention im Bereich der arteriellen Hypertonie bzw. des metabolischen Syndroms zu betreiben. Denn neben der Prävalenz der Herzinsuffizienz an sich können noch Risikopopulationen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz erfasst werden. So zeigen in der Bevölkerung in der Population über 40 Jahre nach Yusuf und Pitt (64) weniger als 0,2 Prozent eine Herzinsuffizienz des Stadiums IV der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) und weniger als zwei Prozent eine manifeste Herzinsuffizienz jeglichen Schweregrades. Jedoch haben mehr als 20 Prozent eine Hochrisikokonstellation für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit arterieller Hypertonie oder abgelaufenem Myokardinfarkt und mehr als 40 Prozent eine Hochrisikokonstellation mit zusätzlichem Übergewicht. Durch präventive Maßnahmen im Bereich der arteriellen Hypertonie und der Hyperalimentation könnte also auch die Inzidenz der Herzinsuffizienz reduziert werden.

1. Einleitung

Im Vergleich dazu steht die Epidemiologie der Krebserkrankungen. Laut der deutschen Todesursachenstatistik waren im Jahr 2005 25,5 Prozent der Todesfälle bedingt durch bösartige Neubildungen (vgl. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (13)). Daher sind die Krebserkrankungen neben den kardiovaskulären Erkrankungen von großer Bedeutung. Genauere Daten liegen aus den USA vor. Dort veröffentlicht das „National Cancer Institute“ (NCI) im sog. „Surveillance, Epidemiology and End Results“ (SEER) Programm in regelmäßigen Zeitabständen Daten über die Krebs-Statistik der USA. Dabei wurde eine große Gruppe der Bevölkerung in diese epidemiologischen Studien mit einbezogen. Waren es im SEER-9-Programm aus dem Jahr 1973 noch 10 Prozent der Bevölkerung, so wurden im SEER-17-Programm aus dem Zeitraum von 2000 bis 2003 bereits etwa 26 Prozent der Bevölkerung der USA mit in die Statistik einbezogen. Im SEER-17-Programm betrug das Lebenszeitrisko, an bösartigen Neubildungen zu erkranken, bei Männern ungefähr 45 Prozent und bei Frauen etwa 38 Prozent (vgl. Hayat et al. (18)). Das Lebenszeitrisko, an einer bösartigen Neubildung zu versterben, betrug für Männer 23 Prozent und für Frauen 20 Prozent.

Im Folgenden wird nun beispielhaft die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, der arteriellen Hypertonie sowie der Restenose aus dem Bereich der Kardiologie und die Proliferation von Tumorzellen aus dem Bereich der gynäkologischen Onkologie erläutert.

1.2.1 Kardiale Fibrose und Herzinsuffizienz als Folge der Proliferation kardialer Fibroblasten

Kardiomyozyten repräsentieren ungefähr 75% des gesunden myokardialen Gewebes, obwohl sie nur 30 bis 40% der kardialen Zellen stellen. Betrachtet man jedoch die absolute Zellzahl im Herzen, so gehören hingegen kardiale Fibroblasten zu der größten Zellpopulation. Andere Zellarten im Herzen sind endotheliale Zellen und Glattmuskelzellen, die jedoch nur einen geringen Anteil der Gesamtpopulation ausmachen. Kardiale Fibroblasten sind Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM). Sie werden traditionell definiert als Zellen mesenchymaler Herkunft, die zur Kollagensynthese befähigt sind (vgl. Camelliti et al. (7)). Der Anteil der Fibroblasten im Herzen nimmt mit steigendem Alter zu. Dabei ist der Netto-Gehalt an Kollagen in erwachsenen Herzen sehr gering und beträgt nach einer Arbeit von Brilla et al. (6) ca. 0,5% Kollagenvolumenfraktion. Die Alterung des Herzens geht auch beim Gesunden mit einer Quervernetzung der Kollagenfasern einher, was zu einer vermehrten Steifheit des Gewebes führt.

1. Einleitung

Im Rahmen pathologischer Vorgänge wie z.B. der linksventrikulären Hypertrophie, der koronaren Herzkrankheit, dem Herzinfarkt und der Herzinsuffizienz kommt es zu einem Umbau der EZM. Die Proteine der EZM werden von kardialen Fibroblasten synthetisiert. Dazu zählen nicht nur Kollagen I und III, sondern auch Enzyme, die zum Abbau der EZM befähigt sind: Matrix-Metallo-Proteinase (MMP) (vgl. Brilla et al. (6)). Durch die Zunahme der Kollagen-Produktion oder die Abnahme der Aktivität der MMP kommt es zu einer Kollagenablagerung im Interstitium, die weit über das Maß der gewöhnlichen Alterung des Gewebes hinausgeht. Anhand einer klinischen und einer tierexperimentellen Studie wurde von Brilla et al. (6) gezeigt, dass die linksventrikuläre Hypertrophie morphologisch durch eine Myozytenhypertrophie und eine Myokardfibrose charakterisiert ist. Die myokardiale Steifheit wird dabei durch die Myokardfibrose und nicht durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten bestimmt.

Dabei können nach Weber (59) zwei verschiedene Kategorien der Fibrosierung unterschieden werden: erstens die reparative Fibrosierung, die sich unregelmäßig im Myokard verteilt, und zweitens die reaktive Fibrosierung, die initial mit den Kapillaren assoziiert ist und erst sekundär auf das Myokard übergreift (vgl. Kapitel 1.2.2). Letztere entwickelt sich im Rahmen der langjährigen arteriellen Hypertonie. Beide Arten der Fibrosierung führen jedoch letztlich zu einer Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion und gehen klinisch mit den Zeichen der Herzinsuffizienz einher (vgl. Kapitel 1.2). Mit Hilfe der Echokardiographie, der Kardio-MRT und der Herzkatheter-Untersuchung lässt sich in diesen Fällen neben der verminderten Ejektionsfraktion eine Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes nachweisen.

1.2.2 Arterielle Hypertonie und Mediahypertrophie

Die arterielle Hypertonie mit ihren Folgen der hypertensiven Herzkrankheit, der Herzinsuffizienz und der Arteriosklerose ist weltweit ein großes medizinisches Problem (vgl. Kapitel 1.2). Viele Patienten entwickeln im Laufe der Zeit eine linksventrikuläre Hypertrophie als Reaktion auf den chronisch erhöhten arteriellen Blutdruck. Morphologisch lässt sich anhand von Endomyokardbiopsien und postmortalen Untersuchungen eine reaktive perivaskuläre Fibrose der intramuralen Koronararterien und Arteriolen mit einer Ausbreitung in das interstitielle Gewebe nachweisen (vgl. Weber (61)). Als eine Antwort auf die Nekrose von Kardiomyozyten lässt sich ebenfalls eine Narbenfibrosierung feststellen. Doch welche Faktoren tragen zur Fibrosierung des Myokards bei? Während die Hypertrophie der Kardiomyozyten durch rein hämodynamische Faktoren wie die chronische linksventrikuläre Belastung infolge der Nachlasterhöhung erklärt werden kann, ist die reaktive Fibrosierung nicht direkt vom

1. Einleitung

chronisch erhöhten Blutdruck abhängig (vgl. Weber (60)). Stattdessen scheint die chronische und inadäquate Erhöhung der Serumspiegel von Angiotensin II (ATII), Aldosteron und Endothelin-1 (ET-1) dafür verantwortlich zu sein. Diese Substanzen werden u.a. im kardialen Gewebe gebildet. Zytokine wie der transformierende Wachstumsfaktor β_1 (TGF- β_1 , engl. „transforming growth factor β_1 “) und der Bindegewebs-Wachstumsfaktor (CTGF, engl. „connective tissue growth factor“) stellen dabei das Bindeglied zwischen der arteriellen Hypertonie und der Wachstumsstimulation her (vgl. Weber (61)).

1.2.3 Restenosen nach perkutaner Koronarintervention (PCI) durch Hypertrophie der glatten Muskelzellen

Die koronare Herzkrankheit mit dem akuten Myokardinfarkt ist eine Hauptmanifestation der Arteriosklerose. Im klinischen Alltag ist die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit nachfolgender Stent-Implantation zur Therapie des akuten Myokardinfarktes und der stabilen Angina pectoris etabliert (vgl. hierzu Doyle et al. (11)). Die hierfür benutzten Stents bestehen aus Edelstahl. Sie induzieren im umliegenden Gewebe eine Reaktion, die allgemein als Intimahyperplasie bezeichnet wird. Ist die Gewebereaktion ausgeprägt, kommt es zur sog. In-Stent-Stenose oder einfacher der Restenose. Diese muss von anderen Komplikationen der PTCA unterschieden werden, wie zum Beispiel der In-Stent-Thrombose, die in der Regel ein akutes Ereignis darstellt und nicht durch eine Zellproliferation sondern durch die lokale Aktivierung des Gerinnungssystems hervorgerufen wird.

Touchard und Schwartz (56) beschreiben in einer Arbeit aus dem Jahr 2006 verschiedene Tiermodelle, die zur Klärung der Pathogenese der Restenose nach erfolgter Angioplastie beitragen können. Die Antwort der arteriellen Wand auf eine Verletzung kann demnach in sechs Phasen eingeteilt werden:

- 1) die eigentliche Schädigung mit einer Endothelläsion, dem Riss der elastischen Membranen, der Medialäsion und der Adventitialäsion,
- 2) die Aktivierung des Gerinnungssystems und der Thrombozytenaggregation,
- 3) elastische Rückstellkräfte der Gefäße (engl. „elastic recoil“) in der Frühphase der PCI,
- 4) Inflammationsreaktionen,
- 5) die Migration von Glattmuskelzellen in die Gefäßwand, deren Proliferation sowie die Produktion von EZM und
- 6) arterielles Remodeling.

1. Einleitung

Aus 5) resultiert nun die eigentliche Intimaproliferation (vgl. Casscells (9)), wobei vermutlich jede einzelne der sechs Phasen ihren Teil zur Entwicklung der Restenose nach Angioplastie beiträgt.

Als eine therapeutische Anwendung wurden die in letzter Zeit kontrovers diskutierten Medikamente-freisetzenden Stents (engl. „drug-eluting stents“ (DES)) entwickelt. Dabei wurde der Metallstent mit antiproliferativen Substanzen beschichtet und anschließend wie nicht-beschichtete Stents (engl. „bare metal stents“ (BMS)) implantiert. Im Juli 2007 ist in der Zeitschrift „Der Kardiologe“ von Silber et al. (53) ein Positionspapier zur Einordnung der Sicherheit von DES herausgegeben worden. Von den Autoren wurden insgesamt 71 randomisierte Studien mit fast 29.000 Patienten untersucht, wobei zehn Medikamente auf ihre Wirksamkeit untersucht wurden. Hierzu zählten Actinomycin-D, Biolimus A9, Dexamethason, 17- β -Estradiol, Everolimus, Paclitaxel, 7-Hexanoyltaxol, Sirolimus, Tacrolimus und Zotarolimus. Dabei wurde die aktuelle Studienlage wie folgt beurteilt: Für nur drei der auf dem Markt erhältlichen Stents liegt eine so hohe Evidenz vor, dass sie für den klinischen Gebrauch empfohlen werden können. Dazu zählten Sirolimus-, Paclitaxel- und Zotarolimus-beschichtete DES. Ferner wurde darauf hingewiesen, dass möglicherweise das Problem in der klinischen Anwendung darin bestand, dass keine ausreichend lange Thrombozytenaggregation mit Clopidogrel durchgeführt wurde. So kann man sich vorstellen, dass durch das langsame Einwachsen bedingt eine späte Bildung einer Neointima resultiert. Deshalb sollte die auch bei nicht-beschichteten Stents übliche Thrombozytenaggregationshemmung mit Clopidogrel über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt werden.

1.2.4 Wachstum von Tumorzellen

In der Gruppe der gynäkologischen Tumoren gibt es neben dem Mamma-Karzinom und den malignen Ovarialtumoren eine weitere häufige Krebserkrankung, die überwiegend junge Frauen betrifft: das Zervix-Karzinom. Obwohl die Inzidenz dieses Karzinoms in den letzten Jahrzehnten bereits durch die Einführung der Vorsorgeuntersuchungen mit dem Abstrich nach Papanicolaou (Pap-Abstrich) gesenkt werden konnte, wurde das Zervix-Karzinom in letzter Zeit durch die Etablierung einer Impfung gegen das Humane Papillomavirus (HPV) in der Öffentlichkeit bekannt (32). So soll diese Impfung vor der Entwicklung einer zervikalen Dysplasie bzw. später des invasiven Zervix-Karzinoms schützen (vgl. Schneider et al. (51)). Für das Jahr 2007 wurde die HPV-Impfung für Mädchen im Alter zwischen 12 und 17 Jahren vom Robert Koch Institut (RKI) in die Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) übernommen (32). In der Vorstellung, dass die Infektion mit HPV die Voraussetzung für

1. Einleitung

die Entwicklung einer Dysplasie und eines Zervix-Karzinoms darstellt, schützt die HPV-Impfung vor der späteren Entwicklung des Karzinoms.

Seit vielen Jahren werden in der medizinischen Forschung die sog. HeLa Zellen benutzt. HeLa Zellen gehören zu einer epithelartigen Zell-Linie (vgl. Verma und Hansch (58)). Die Zellen, die aus einem Zervix-Karzinom einer Patientin isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert werden konnte. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück, deren Zellen bis heute kultiviert werden. Anfang der 50er Jahre begann ihre Ärztin Margaret Gey, mit diesen Zellen zu arbeiten.

1.3 Wachstumsfaktoren

Zellen sind in ihrem Zellverbund, aber auch gerade einzeln, in ihrer Existenz von Wachstumsfaktoren abhängig. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählen neben den klassischen glandulären Hormonen insbesondere die Gewebehormone. Zu letzteren gehören Amine wie Serotonin und Histamin, Kinine wie Bradykinin, Prostaglandine und Leukotriene sowie verschiedene gastrointestinale Hormone (27). Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Zytokinen zu. Zytokine sind Polypeptide, die überwiegend von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität produziert werden (28). Daher haben sie einen großen Anteil an der Regulation von Proliferation und Differenzierung - somit also auch der Funktion von Zellen und Zellverbänden.

Einige Wachstumsfaktoren sind physiologischerweise im Serum enthalten. Dazu zählen u.a. EGF (engl. „epidermal growth-factor“), IGF (engl. „insulin-like growth-factor“) und PDGF (engl. „platelet-derived growth-factor“) (27). In der Kultivierung von Zellen hat man sich dies zunutze gemacht. Den meisten Nährmedien für die Zellkultur wird das sog. fetale Kälberserum (FBS, engl. „fetal bovine serum“) in Konzentrationen von 5 bis 20 Prozent zugeführt, um ein optimales Wachstum der Zellen zu bewirken. Über die o.g. Wachstumsfaktoren hinaus enthält FBS auch Estradiol, Insulin, Progesteron, Testosteron und Thyroxin (aus Produktinformationen des Herstellers: „Certificate of Analysis“ von GIBCO™ Invitrogen Corporation, 2005). Als extrazelluläre Faktoren regulieren die Bestandteile des FBS den Zellzyklus. Ohne diesen Zusatz sterben die Zellen, da sie in die G₀-Phase übergehen und schließlich apoptotisch werden. Im Einzelnen regulieren die Zytokine u.a. den Zellstoffwechsel, die Biosynthese der EZM, die Biosynthese von Nukleotiden und DNA, Transkriptionsfaktoren und die Signaltransduktion. In unseren Versuchen wurde der

1. Einleitung

Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von FBS auf das Wachstumsverhalten sowie die pH-Regulation untersucht.

1.4 Arbeitshypothesen

1.4.1 Änderungen des pH-Wertes werden durch veränderte Aktivität von Ionentransportern bewirkt

Veränderungen des extrazellulären Milieus werden einerseits durch intrinsische Puffersysteme und den Bikarbonatpuffer, andererseits durch Ionentransporter ausgeglichen. Umgekehrt können durch Veränderungen der Aktivität von Ionentransportern Veränderungen des intrazellulären pH bewirkt werden.

In einer Arbeit von Romero et al. (42) wurden die Bikarbonataustauscher nach neuen Kriterien, nämlich der genetischen Verwandtschaft, klassifiziert. So wurden folgende Transporter zur SLC4 Familie der Bikarbonat-Austauscher und -Kotransporter (SLC engl. für „solute carriers“) zusammengefasst (vgl. dazu auch Tabelle 6 in Kapitel 4.2.3.2): der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBC), die Anionenaustauscher der Isoformen 1 bis 3 (AE1-3) und der Natrium-abhängige-Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (NDCBE). Außerdem führten Mount et al. (35) 2004 die SLC26 Familie der multifunktionalen Anionenaustauscher ein (vgl. dazu Tabelle 7 in Kapitel 4.2.3.2). Die Vorteile der neuen Klassifikationen liegen zum einen in ihrer besseren Verständlichkeit und Eindeutigkeit - in früheren Publikationen wurden häufig synonyme Bezeichnungen benutzt. Zum anderen ist durch die Klonierung der Austauscher deren Nachweis in den verschiedenen Geweben einfacher geworden.

Dadurch, dass die Besetzung der zellulären Membranen unterschiedlicher Organe mit Ionentransportern nun überwiegend bekannt ist, kann durch spezifische Hemmstoffe auf die Aktivität einzelner Ionentransporter geschlossen werden. Dies lässt sich durch Veränderungen des intrazellulären pH abschätzen. Der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) ist in der Literatur schon hinreichend untersucht worden (vgl. Kapitel 1.4.2). Daher wurden in unseren Untersuchungen die Registrierungen des intrazellulären pH mittels Fluoreszenzphotometrie unter Hemmung des NHE durch den Hemmstoff HOE694 durchgeführt, um gezielt die Regulation des NBC sowie des AE untersuchen zu können.

1.4.2 Wachstumsfaktoren bewirken bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen eine Alkalinisierung

Es ist seit langem bekannt, dass in der Umgebung maligner solider Tumoren im Vergleich zu normalem Gewebe ein saures Milieu herrscht (pH ~ 6,9 bis 7,0; vgl. Wong et al. (62)). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Durchblutung maligner Tumoren durch Neovaskularisation in der Regel nicht proportional zum Tumorstadium zunimmt und es dadurch zu einer Anhäufung von Metaboliten und sauren Valenzen (z.B. Laktat und CO₂) in der Umgebung des Tumors kommt. Obwohl maligne Tumoren durch viele verschiedene genetische Veränderungen ihre normale Regulation des Zellwachstums verlieren können, gibt es eine Gemeinsamkeit der malignen Transformation: die intrazelluläre Alkalinisierung der Tumorzellen (vgl. Reshkin et al. (41)). So soll die intrazelluläre Alkalinisierung ein frühes Ereignis der malignen Transformation darstellen und auf die Aktivierung des NHE-1 durch die erhöhte Affinität der NHE-1 Protonen-regulierenden Bindungsstelle zurückzuführen sein (vgl. Reshkin et al. (41)). Auch soll bei transformierten Zellen die pH-Regulation dahingehend gestört sein, dass der NHE-1 sowohl bei Ansäuerung als auch bei Ruhe-pH-Werten eine Überaktivität aufweist (vgl. Harguindey et al. (17)). Ferner soll eine direkte Beziehung zwischen intrazellulärer Alkalinisierung und Zellproliferation bestehen.

Doch nicht nur bei Tumorzellen spielt die Alkalinisierung eine wichtige Rolle. In einer frühen Arbeit von Moolenaar et al. (34) wurde anhand menschlicher Fibroblasten der Vorhaut gezeigt, dass es etwa eine Stunde nach der Zugabe von Wachstumsfaktoren zu einer intrazellulären Alkalinisierung kommt. In den Untersuchungen von Moolenaar et al. (34) wurde dies auf einen Effekt des NHE zurückgeführt.

Daher wollten wir die intrazelluläre Alkalinisierung bei HeLa Zellen und kardialen Fibroblasten vergleichend untersuchen, insbesondere ob auch der NBC neben dem NHE an der intrazellulären Alkalinisierung beteiligt ist.

1.4.3 Moxonidin führt zu einer Hemmung von Anionenaustauschern

Moxonidin gehört wie auch Clonidin zur Gruppe der Imidazolinderivate (Strukturformeln siehe Abb. 1), die an sog. „I₁-Imidazolin-Rezeptoren“ (I₁R) in der rostralen ventrolateralen Medulla des Gehirns binden und dadurch die sympathischen Efferenzen vermindern (vgl. Sica (52)).

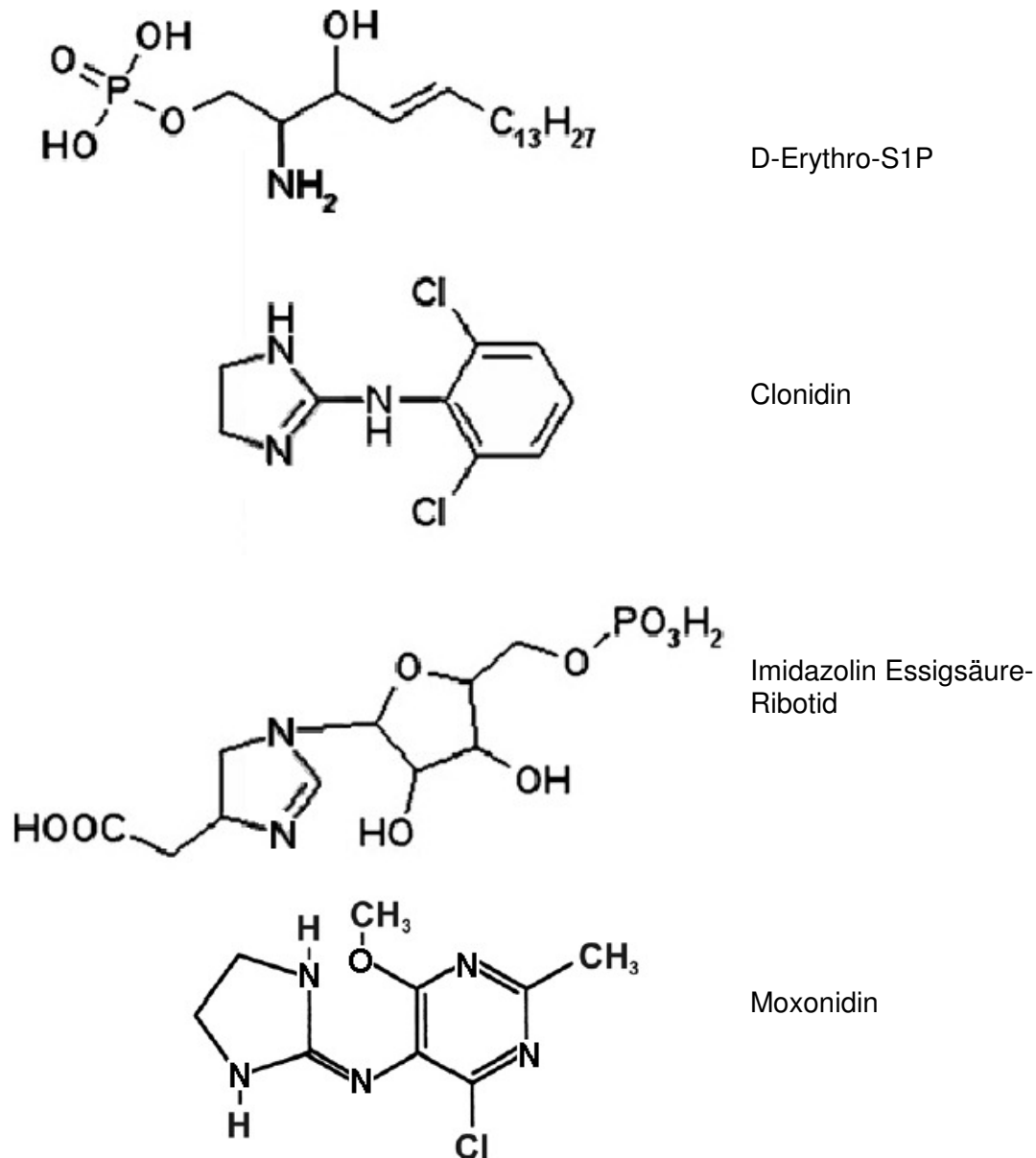


Abb. 1

Strukturformeln von D-Erythro-S1P, Clonidin, Imidazolin Essigsäure-Ribotid und Moxonidin. Modifiziert nach Molderings et al. (33).

Zusätzlich gibt es Hinweise für eine kardioprotektive Wirkung von Moxonidin im Tierexperiment. So konnte Moxonidin zum Beispiel Reperfusionsarrhythmien wie Kammerflimmern, ventrikuläre Tachykardien, Salven und Bradyarrhythmien im Rahmen eines durch Ligatur einer Koronararterie induzierten akuten Myokardinfarktes vermindern (vgl. Lepran und Papp (24)).

1. Einleitung

Verglichen mit Clonidin hat Moxonidin eine höhere Affinität zum I₁R und eine geringere Affinität zu zentralen α₂-Rezeptoren, die hauptverantwortlich für die bekannten Nebenwirkungen wie Sedierung und Mundtrockenheit bei Clonidin sind (vgl. Rupp und Jacob (47)). Neben der antihypertensiven Wirkung ist auch die Senkung der peripheren Insulinresistenz und die daraus resultierende Verminderung der Hyperinsulinämie ein bedeutsamer Effekt von Moxonidin (vgl. Haenni und Lithell (16) sowie Chazova et al. (10)). Im Vergleich zu anderen antihypertensiven Substanzen ist dies von großem therapeutischen Nutzen, da Patienten im Rahmen des metabolischen Syndroms neben der arteriellen Hypertonie auch eine Insulinresistenz aufweisen. So führt eine hyperkalorische Ernährung zu einer Steigerung des Sympathikotonus (vgl. Rupp und Maisch (48)). Dies bedingt eine periphere Vasokonstriktion, eine erhöhte Herzfrequenz sowie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, was letztlich auch ein sog. kardiovaskuläres „Remodeling“ bewirken kann.

Während die klinische Wirksamkeit von Moxonidin gut belegt ist, blieb die Identität des I₁R weitgehend unklar. Neuen Untersuchungen von Molderings et al. (33) zufolge, handelt es sich beim I₁R um den Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1 (S1P₁-Rezeptor). Synonyme Bezeichnungen für S1P-Rezeptoren sind EDG-Rezeptoren (engl. „endothelial differentiation gene“, vgl. Mazurais et al. (30)). Von den verschiedenen S1P-Rezeptoren werden im kardiovaskulären System die Isoformen S1P₁ (Syn. edg1), S1P₂ (Syn. edg5) und S1P₃ (Syn. edg3) exprimiert (33). Vorher war in einer Arbeit von Sun, Chang und Ernsberger (54) aus dem Jahr 2007 die Hypothese aufgestellt worden, dass es sich bei dem I₁R um einen Nischarin-Rezeptor bzw. ein IRAS (engl. „imidazoline receptor antisera-selected proteins“) handeln könnte. Nischarin allerdings ist ein lösliches regulatorisches Protein des Zytoskeletts. Daher schlugen Molderings et al. (33) in ihrer Diskussion folgende Erklärung für die Tatsache vor, dass die Transfektion von Zellen mit cDNA für Nischarin die I₁-Imidazolin-Bindestellen in Bindungsstudien mit Radioliganden erhöht: Nischarin könnte als regulierender Bestandteil des Zytoskeletts den Einbau der Rezeptoren in die Zellmembran beschleunigen und dadurch die Anzahl der I₁-Imidazolin-Bindungsstellen erhöhen. Insgesamt erscheint die Darstellung von Molderings et al. (33) überzeugend, da ihre Vergleiche des I₁R mit dem S1P₁-Rezeptor auf verschiedenen Ebenen stattfanden: der Signaltransduktion, der Gewebeverteilung, dem Molekulargewicht, der physiologischen Funktion und Bindungsstudien mit Radioliganden.

1. Einleitung

Endogene Liganden des S1P₁-Rezeptors sind Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA), die ähnlich wie Imidazoline bei intravenöser Injektion eine Senkung des arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz hervorrufen (vgl. Molderings et al. (33)). S1P gehört zu einer Familie evolutionär konservierter Signalmoleküle, die eine Vielzahl verschiedener zellulärer und physiologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellmotilität, Veränderungen des Zytoskeletts, Immunität und Angiogenese regulieren (vgl. Birgbauer et al. (4) und Rosen et al. (44)). S1P ist auch im HDL (engl. „high-density lipoproteins“) enthalten. HDL ist seit langem aufgrund seiner kardioprotektiven Wirkung im Rahmen der Arteriosklerose-Entstehung und als prognostischer Faktor beim akuten Myokardinfarkt bekannt (vgl. „National Cholesterol Education Program“ (37) sowie Gordon und Rifkind (14)). Umgekehrt haben klinische Studien zur Erhöhung des HDL-Spiegels durch verschiedene Pharmaka eine Verminderung des kardiovaskulären Risikos gezeigt (vgl. Rubins et al. (46)). In einer aktuellen Publikation von Keul et al. (21) wurde nun postuliert, dass die kardioprotektive Wirkung von HDL unabhängig von der Verhinderung einer Arteriosklerose auch auf einer direkten Wirkung auf das Myokard beruhen könnte. In Untersuchungen von Jin et al. (20) und Nofer et al. (38) konnte nun gezeigt werden, dass S1P als eine intrinsische Komponente des HDL für verschiedene physiologische Funktionen des HDL verantwortlich ist. Dabei hängt die Konzentration des S1P nicht allein von der HDL-Konzentration ab. Die Sphingosinkinase (SphK) ist das Schlüsselenzym in der Synthese von S1P. SphK selbst ist in einer Arbeit von Jin et al. (19) als ein bedeutender Faktor bei der ischämischen Präkonditionierung identifiziert worden.

Zusammenfassend könnte man nun folgende Hypothese über die Wirkung von Moxonidin herleiten: Moxonidin entfaltet seine periphere Wirkung überwiegend durch die Bindung an den I₁R. Bei dem I₁R handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen S1P₁-Rezeptor, dessen endogener Ligand S1P ist. S1P ist auch ein physiologisch bedeutsamer Bestandteil des HDL, das vermutlich auch unabhängig von der Verhinderung der Arteriosklerose direkte kardioprotektive Wirkungen aufweist. Diese könnten u.a. durch die Induktion der ischämischen Präkonditionierung vermittelt werden. Bei der kardialen Ischämie kommt es durch die Verminderung der koronaren Durchblutung zu einer Ansäuerung des Interstitiums, was wiederum vermutlich Veränderungen der Aktivität von Ionen transportern bewirkt (vgl. hierzu Kapitel 1.4.1 und 1.4.2). Somit erschien es naheliegend, die Wirkung von Moxonidin auf die Aktivität von Ionen transportern zu untersuchen.

1. Einleitung

Da HDL auch im FBS enthalten ist (6 mg/dl; aus Produktinformationen des Herstellers: „Certificate of Analysis“ von GIBCO™ Invitrogen Corporation, 2005), kommt neben den o.g. Wachstumsfaktoren vermutlich auch S1P in ausreichenden Konzentrationen im FBS vor. Daher untersuchten wir die Einflüsse von Moxonidin auf die Aktivität von Anionenaustauschern auch in Abhängigkeit von der Stimulation mit FBS (hohe Konzentrationen mit 10% FBS vs. ein sog. Minimalmedium mit 0,4% FBS).

1.4.4 Die intrazelluläre Alkalinisierung steht in einem Zusammenhang mit der Zell-Proliferation

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben soll bei Zellen maligner Tumoren ein enger Zusammenhang zwischen intrazellulärer Alkalinisierung und der Zellproliferation bestehen. Daher wurden mit Hilfe des WST-1 Proliferationsassays die Wachstumsraten von HeLa Zellen und kardialen Fibroblasten bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht.

Mit Moxonidin ist eine etablierte Substanz verfügbar, die einerseits möglicherweise Ionentransporter hemmt und andererseits möglicherweise am selben Rezeptor wie S1P seine agonistische Wirkung entfaltet. Daher wurden Moxonidin und FBS auch im Hinblick auf die Bedeutung bei der Zellproliferation bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultur kardialer Fibroblasten von Ratten

2.1.1.1 Explantmethode

Bei der Explantmethode zur Kultur kardialer Fibroblasten wird deren Fähigkeit zur Migration ausgenutzt. Das Herz wird dabei in kleine Stückchen zerteilt und in Petrischalen kultiviert. Nach einer Woche wachsen überwiegend kardiale Fibroblasten, nach zwei Wochen überwiegend kardiale Glattmuskelzellen heraus, die dann weiter kultiviert werden können (50).

Am Vortag wurde eine Petrischale mit einer Fläche von 58 cm² mit 5 ml 100%igem FBS beschichtet. Anschließend wurden mit einem Einmalskalpell mehrere Linien in den Boden geritzt, so dass Kreuze entstanden. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit FBS wurde kurz vor der Entnahme des Herzens die Flüssigkeit steril abgesaugt. Die Beschichtung mit FBS diente dazu, einen zusätzlichen Wachstumsreiz auf die Zellen auszuüben und sie zum Auswachsen aus den Explant-Stückchen anzuregen. Die Kreuze dienten dazu, die Explant-Stückchen zu fixieren, da sie ansonsten bei dem Transport zum Brutschrank oder bei Mediumwechseln abschwammen und das Auswachsen somit erschwerten.

Zur Kultivierung eigneten sich insbesondere junge Wistar-WU Ratten, da deren kardiale Fibroblasten eine höhere Proliferationsrate haben als ältere Tiere. Die Ratten wurden mit einer Guillotine dekapitiert, woran sich eine rasche Präparation des Thorax in der Sternallinie anschloss, um das Herz noch im schlagenden Zustand in ein mit PBS gefülltes Falcon Tube überführen zu können. Das Herz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen. Nach Überführung des Herzens in die mit PBS gefüllten Petrischalen wurden die Vorhöfe abgetrennt und das Herz mehrmals mit PBS gespült, um die verbliebenen Erythrozyten auszuwaschen. Mit zwei Einmalskalpellen wurden die Ventrikel in ein bis zwei mm große Stückchen zerteilt, wobei besonders darauf zu achten war, dass glatte Schnittränder entstanden. Anschließend wurden die Stückchen einzeln auf die Kreuze in der vorbereiteten Petrischale gesetzt. Je nach Alter der Ratten entstanden aus einem Herzen zwei bis vier Zelllinien. Im Anschluss wurden die Explant-Stückchen tropfenweise mit 2 ml Quantum-Medium benetzt. Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank bei 37° C und 5 Vol.-% CO₂.

An den folgenden drei Tagen wurden die Explant-Stückchen erneut mit 2 ml Quantum-Medium benetzt, so dass sich am vierten Tag ein Überstand von 8 ml Quantum-

2. Material und Methoden

Medium in der Petrischale befand. Ein Medium-Wechsel erfolgte frühestens nach einer Woche. Nach Erreichen einer ausreichenden Zell-Dichte wurden die Explant-Stückchen entfernt, die Zellen passagiert und in einem Verhältnis von 1:2 neu ausgesät. Dabei eigneten sich bei der ersten Aussaat Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm². Anschließend konnten die Zellen auch in größere Flaschen von 75 cm² ausgesät und kultiviert werden.

2.1.1.2 Kulturmedium und Kulturbedingungen

Bei der Kultur der Zellen wurde ein besonderes Kulturmedium für Fibroblasten, Quantum 333, verwendet. Es besteht aus Serum-Komponenten, L-Glutamin, Wachstumsfaktoren und einem synthetischen Eisen-bindenden Molekül. Dem Medium wurden noch 2,5 mM HEPES (Abk. für N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)) und 1% Penicillin/ Streptomycin (100.000 IE/l Penicillin, 100.000 µg/l Streptomycin) zugefügt. Es zeigte sich, dass bei der Kultivierung der kardialen Fibroblasten mit Quantum 333 schneller die erforderliche Zelldichte erreicht wurde als mit anderen Kulturmedien, z.B. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 – 20% FBS. Deshalb wurden die Zellen bis nach dem Überführen auf die Plättchen für die Fluoreszenzmessungen in Quantum kultiviert und erst dann in DMEM mit 10% bzw. 0,4% FBS kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 5 Vol.-% CO₂ und 37° C.

2.1.1.3 Passagieren kardialer Fibroblasten

Die Passage kardialer Fibroblasten führte dazu, dass eine Kulturflasche mit konfluenten kardialen Fibroblasten in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 neu ausgesät wurde. Dazu wurde das alte Medium steril abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit 10 ml PBS, einer Calcium- und Magnesiumfreien Lösung gespült, um die Calcium-Konzentration zu minimieren. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden 2 ml Trypsin/EDTA hinzugefügt. Da die kardialen Fibroblasten vor der ersten Passage besonders fest anhaften, musste für die erste Passage eine Lösung mit höheren Konzentrationen von 0,25% Trypsin und 0,038% EDTA benutzt werden. Bei den weiteren Passagen war eine Lösung der Zellen mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA möglich. Durch das EDTA wird das freie Calcium komplexiert, so dass sich die Calcium-Konzentration weiter minimiert; das Trypsin führt dazu, dass sich die Zellen vom Untergrund ablösen und sich auch die Zell-Zell-Verbindungen lösen. Die Flasche wurde für eine Minute im Brutschrank inkubiert und anschließend führte das Klopfen an den Rand der Kulturflasche („tapping“) dazu, dass sich auch noch angeheftete Zellen ablösten. Insbesondere bei der ersten Passage der kardialen Fibroblasten empfiehlt es

2. Material und Methoden

sich, die Ablösung der Zellen lichtmikroskopisch zu überprüfen und gegebenenfalls erneut eine mechanische Lösung durch weiteres Klopfen zu bewirken. Anschließend wurde die Suspension in ein Falcon Tube überführt und 8 ml Medium zugegeben. Dadurch wurden die Calcium- und Magnesium-Konzentrationen wieder auf physiologische Werte erhöht. Zu langes Behandeln der Zellen mit Trypsin sollte vermieden werden. Bei der Zentrifugation der Zellen bei 1100 rpm. bei 27° C für 5 Minuten setzten sich die Zellen am Boden ab und bildeten ein Pellet, das bei kardialen Fibroblasten allerdings kaum sichtbar war. Das überstehende Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 neu ausgesät. Größere Verhältnisse sollten möglichst nicht gewählt werden. Innerhalb von einem Tag erfolgte das Anheften der Zellen, die nach einem weiteren Tag ihre typische Morphologie aufwiesen. Ein Mediumwechsel sollte zweimal wöchentlich durchgeführt werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit der kardialen Fibroblasten variierte je nach Alter der Zelllinie und Aussaat-Verhältnis. Das Stadium der Subkonfluenz, in dem die Zellen spätestens passagiert und gesplittet werden sollten, wurde nach einer bis drei Wochen erreicht. Routinemäßig erfolgte die Passage in Abhängigkeit von der erreichten Zelldichte und der Konfluenz ein- bis zweimal wöchentlich.

Die kardialen Fibroblasten ließen sich bis zu 25mal passagieren. Für die Versuche wurden die Passagen 2 bis 20 verwendet.

2.1.1.4 Aussaat und Kultur der kardialen Fibroblasten auf Plättchen

Um Fluoreszenz-Messungen vornehmen zu können, wurden die kardialen Fibroblasten auf acht kleinen Glasplättchen mit einem Durchmesser von 25 mm in einer Petrischale von 58 cm² ausgesät. Zuerst erfolgte die Behandlung der Zellen wie oben beschrieben. Bei mehrmaligen Messungen stellte sich heraus, dass beim Splitten der Zellen im Verhältnis von 1:4 eine Zelldichte von ca. 150 000 Zellen in 8 ml Kulturmedium erreicht wurde, was nach einer eintägigen Kultivierung der Zellen optimale Messbedingungen für die Fluoreszenzphotometrie bot. Die Zellen wurden also in einem Verhältnis von 1:4 resuspendiert und in eine mit acht Plättchen bestückte Petrischale überführt. Während und nach der Passage wurde zunächst weiterhin Quantum als Kulturmedium verwendet. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 8 ml DMEM mit 10% FBS zugefügt. Einen Tag vor der Fluoreszenz-Messung wurden die Zellen auf ein Minimal-Medium von 0,4% FBS in DMEM umgesetzt, wobei vorher wiederum zweimalig mit PBS gewaschen wurde. Das Spülen mit PBS diente dazu, das FBS-haltige Medium sicher auszuwaschen.

2. Material und Methoden

Materialien für die Zellkultur

PAA Laboratories

- Quantum 333
- PBS

Gibco

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- FBS
- L-Glutamin
- Penicillin/ Streptomycin
- Fungizone (Amphotericin B, 250 µg/ml)
- HEPES-Puffer (1 M)
- Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)
- Trypsin/EDTA (0,25% / 0,038%)

Greiner

- Kulturflaschen 25 cm² Grundfläche, 50 ml Fassungsvermögen
- Kulturflaschen 75 cm² Grundfläche, 250 ml Fassungsvermögen
- Petrischalen 58 cm² Grundfläche
- Sterile Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml

Marienfeld

- Glasplättchen 25 mm Durchmesser

Feather

- Sterile Einmal-Skalpelle No 11

Zeiss

- Inverses Phasenkontrast-Mikroskop (Telaval 31)

Nuaire

- Brutschrank (IR Autoflow, CO₂ Water-Jacketed Incubator)
- Sterilbank (Klasse II, Typ A/B3)

Kobe Marburg

- Vakuumpumpe für Sterilbank

2. Material und Methoden

Ratten

- Wistar-WU Ratten, Charles River

2.1.2 Kultur von HeLa Zellen

2.1.2.1 Kulturmedium und Kulturbedingungen

HeLa Zellen sind bezüglich der Zusammensetzung des Kulturmediums weniger anspruchsvoll als kardiale Fibroblasten. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wurden 5% FBS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone zugesetzt. Die HeLa Zellen wurden bei 37° C und 5 Vol.-% CO₂ kultiviert.

2.1.2.2 Passagieren von HeLa Zellen

Die HeLa Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. V. Ruppert (Kardiologisch-immunologisches Spezialroutinelabor, Marburg) zur Verfügung gestellt.

Die HeLa Zellen wurden in Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte analog zu der oben beschriebenen Methode der Passage bei kardialen Fibroblasten. Das Verhältnis der Aussaat konnte allerdings viel variabler ausgewählt werden und reichte von 1:2 bis 1:20. Routinemäßig wurden die HeLa Zellen wöchentlich in einem Verhältnis von 1:5 passagiert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

2.1.2.3 Einfrieren von HeLa Zellen

Das Prinzip des Einfrierens besteht darin, die Zellen in einem organischen Lösungsmittel, z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) zu resuspendieren und dann zu gefrieren. Die Zellen wurden dazu wie zur Passage vorbereitet, anschließend erfolgte jedoch eine Resuspension der Zellen in 2 ml einer Lösung aus Medium und 10% DMSO. Die Zellen wurden in ein kleines Eppendorf Tube überführt und über Nacht bei -30° C gelagert. Die dauerhafte Aufbewahrung erfolgte über bis zu zwei Monate lang bei -70° C. Zum Auftauen wurden die Zellen in ein Wasserbad bei 37° C gestellt und anschließend in eine mit 8 ml Medium gefüllte Kulturflasche überführt.

2.1.2.4 Aussaat und Kultur der HeLa Zellen auf Plättchen

Analog der Vorgehensweise bei kardialen Fibroblasten wurden die HeLa Zellen auf acht kleinen Glasplättchen mit einem Durchmesser von 25 mm in einer Petrischale von 58 cm² ausgesät. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 5% FBS verwendet. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 8 ml des Minimalmediums (0,4% FBS) zugefügt.

2. Material und Methoden

2.1.3 Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer

Nach der Resuspension der Zellen im Medium wurde häufig die Zelldichte bestimmt, um die gewünschte Dichte an Zellen auf den Plättchen zu erreichen. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze 1 μL der Suspension an das auf der modifizierten Neubauer-Zählkammer angeheftete Deckplättchen pipettiert, so dass der Tropfen eingesaugt wurde (Abb. 2). Anschließend wurden vier der neun Felder ausgezählt und die Zelldichte nach folgender Gleichung berechnet:

$$(1) \text{ Zelldichte [Zellen/ml]} = \text{ausgezählte Anzahl an Zellen} \times 10^4 / 4.$$

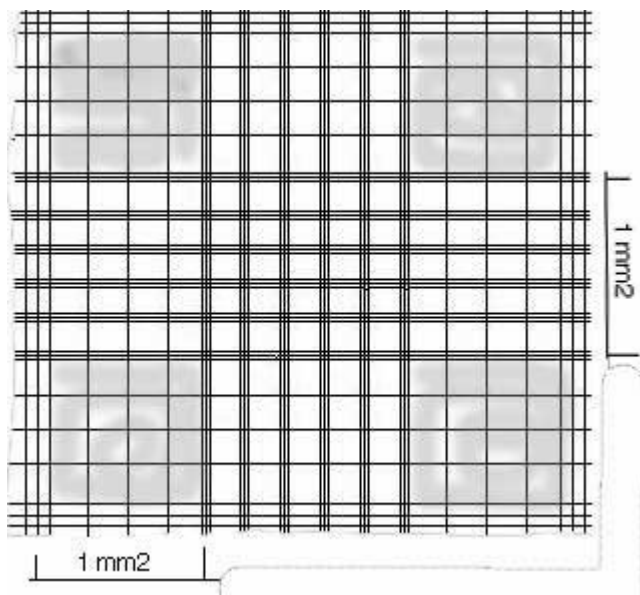


Abb. 2

Modifizierte Neubauer Zählkammer zur Bestimmung der Zelldichte in der Zellkultur. Die Abbildung wurde modifiziert nach Odobasic und Meyer (39).

2.2 Fluoreszenzphotometrie

2.2.1 Prinzip der pH-Wert-Registrierung mittels Fluoreszenzphotometrie

In unseren Versuchen wurde die Methode der Fluoreszenzphotometrie dazu genutzt, den intrazellulären pH-Wert von kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen über einen längeren Zeitraum von bis zu 2000 Sekunden zu registrieren.

Das Prinzip der Fluoreszenz besteht darin, dass der Fluoreszenzfarbstoff im Grundzustand durch Licht getroffen wird und Strahlung bestimmter Wellenlänge absorbiert. Dadurch gelangt er in den sog. angeregten Zustand. Durch die Rückkehr in den Ausgangszustand wiederum wird Energie in Form von Licht freigesetzt, was man als Fluoreszenz bezeichnet. Zur Registrierung des intrazellulären pH eignen sich zwei

2. Material und Methoden

etablierte Fluoreszenzfarbstoffe, die ihre Fluoreszenz in Abhängigkeit vom pH verändern: BCECF (siehe hierzu Kapitel 2.2.3.1) und SNARF. Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt sein charakteristisches Absorptions- und Emissions-Spektrum. Bei der Fluoreszenzphotometrie werden die mit dem Farbstoff beladenen Zellen mit Licht zweier Wellenlängen angeregt: erstens mit Licht einer Wellenlänge, die beim Extinktionsmaximum liegt, wo sich die Absorption also maximal in Abhängigkeit vom pH verändert; und zweitens mit Licht einer Wellenlänge, die dem isosbestischen Punkt entspricht, wo keine Abhängigkeit der Absorption vom pH vorliegt. Bildet man nun den Quotienten der Extinktionen dieser beiden Wellenlängen, erhält man eine sog. „Ratio“, die sich direkt proportional zum pH verhält.

2.2.2 Aufbau der Messapparatur

Die Zellen wurden auf kleinen Glasplättchen in eine Superfusionsapparatur eingespannt (wurde von den Technischen Werkstätten der Medizinischen Forschungseinheiten hergestellt). Diese wurde mittels Schwerkraft perfundiert. Es konnten insgesamt vier verschiedene Flüssigkeiten angeschlossen und ihr Zufluss über ein elektrisches Ventil gesteuert werden. Durch eine angeschlossene Wasserpumpe mit Heizfunktion wurde sowohl die Superfusionsapparatur als auch der Behälter mit der Superfusionsflüssigkeit auf eine Temperatur von 37° C erwärmt. Die Begasung der Superfusionsflüssigkeit erfolgt mittels dünner Schläuche, die an eine Gasflasche mit 5 Vol.-% CO₂ angeschlossen waren und in die Flüssigkeit eintauchten. Das Glasplättchen wurde in den Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops eingespannt. Die Lichtquelle, eine Xenon-Lampe, konnte durch die Computersoftware FeliX hinsichtlich der Dauer der Belichtung, der beiden Wellenlängen und der Frequenz des Wechsels zwischen den beiden Wellenlängen variabel gesteuert werden. Die Frequenz musste so gewählt werden, dass keine Interferenzen zwischen der Emission und der Absorption der beiden Wellenlängen bestanden, weil es ansonsten leicht zu Messfehlern durch die gegenseitige Beeinflussung der Wellenlängen kommen kann.

Material für die Fluoreszenzphotometrie

- Fluoreszenzphotometer: „PTI 170“ Photon-Counting Detection System
- Inverses Mikroskop Zeiss-Axiovert 135
- Objektiv: Fluor 442055 (40fache Vergrößerung)
- „Ratio Master“, Ratio Fluoreszenz Spektrometer
- Software „FeliX“ Version 1.1
- Immersionsöl, Zeiss 518 C (Brechungsindex $n_E = 1,518$ bei 23° C, PCB-frei)

2.2.3 Vorinkubation

2.2.3.1 Fluoreszenzfarbstoff BCECF

BCECF ist ein Fluoreszenzfarbstoff und steht für 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-)carboxyfluorescein (Fluoreszenz-Absorptions-Spektrum in Abb. 3). Abhängig vom intrazellulären pH verändert BCECF bei einer Wellenlänge von 495 nm seine Extinktion. Ein weiterer Vorteil von BCECF besteht darin, dass sein isosbestischer Punkt (439 nm) und der Punkt des Extinktionsmaximums (495 nm) relativ weit voneinander entfernt sind, so dass durch die Berechnung der Ratio der Extinktionen bei 495 nm und 439 nm Veränderungen des intrazellulären pH aufgezeichnet werden können. Oberhalb von 1,5 Millionen counts per second gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen Ratio und pH.

Die Carboxyl-Gruppen von BCECF sind zu einem Acetoxymethylester (BCECF-AM) verestert, damit das Molekül die Zellmembranen passieren kann. BCECF-AM kommt in drei verschiedenen Formen vor (Abb. 4), wobei die Formen II und III überwiegen. Intrazellulär werden sie alle durch Esterasen zu BCECF umgewandelt. Nur das BCECF selbst besitzt die fluoreszierenden Eigenschaften, so dass nicht in die Zellen aufgenommene Moleküle zu keiner Hintergrundfluoreszenz führen können.

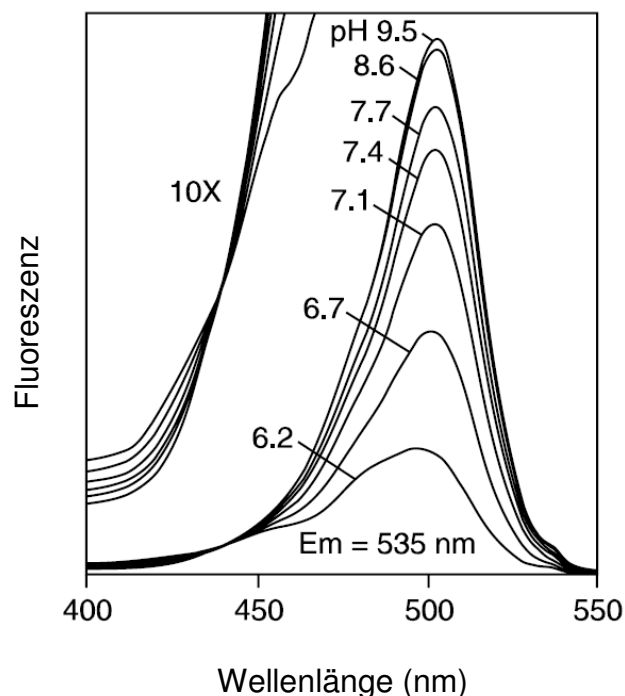


Abb. 3

Darstellung des pH-abhängigen Fluoreszenz-Absorptions-Spektrums von 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-)carboxyfluorescein (BCECF). Der isosbestische Punkt von BCECF liegt bei 439 nm, das Extinktionsmaximum bei 495 nm. Die Abbildung wurde modifiziert nach einer Produktinformation zu BCECF von Molecular Probes™.

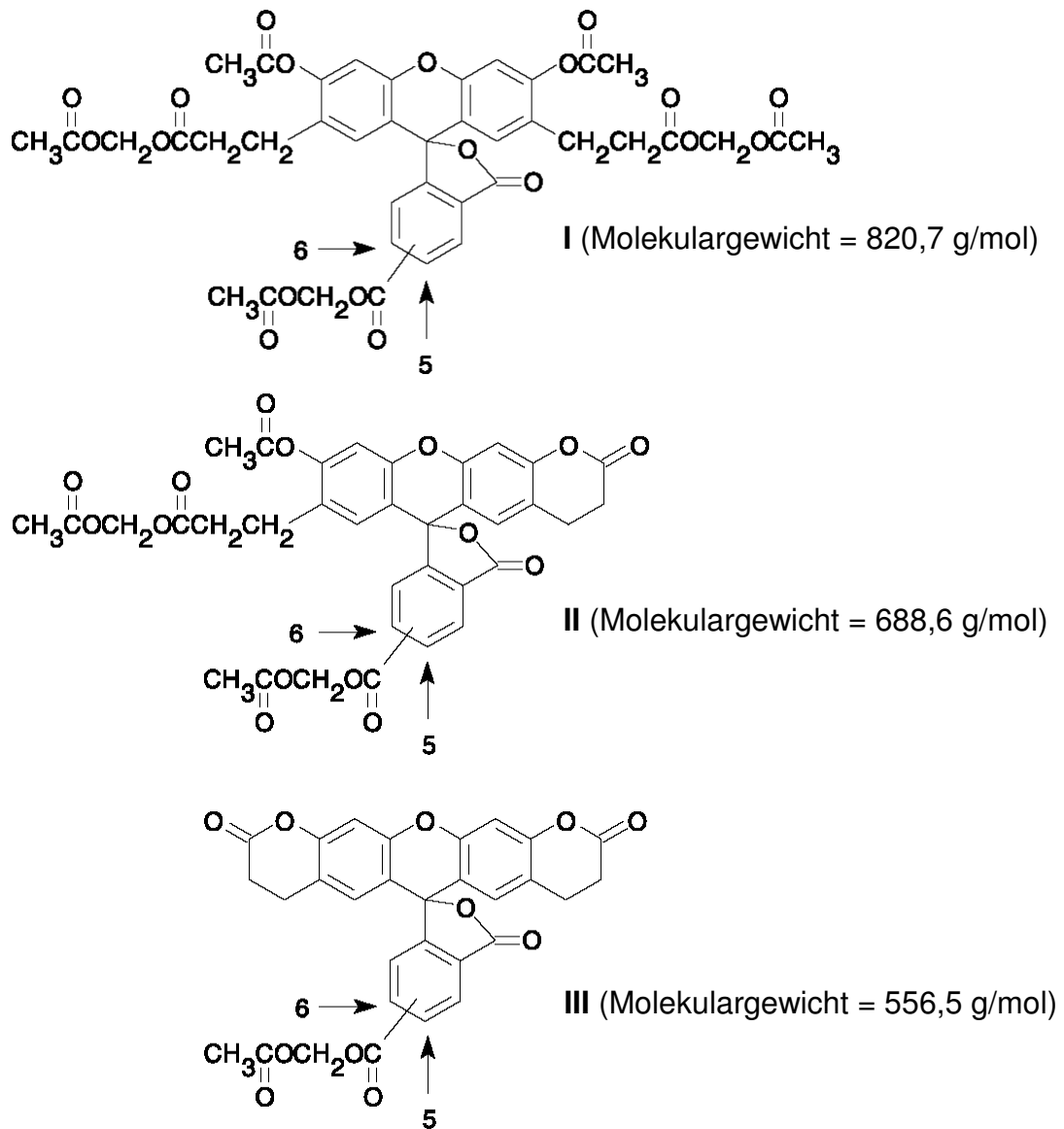


Abb. 4

Darstellung dreier verschiedener Molekülstrukturen von BCECF-AM mit unterschiedlichen Molekulargewichten, wobei die Formen II und III überwiegen. Intrazellulär kommt es durch Esterasen zu einer Umwandlung dieser Moleküle in BCECF. Die Abbildung wurde modifiziert nach Produktinformationen zu BCECF-AM von Molecular Probes™.

2. Material und Methoden

2.2.3.2 Ablauf der Vorinkubation

Zur Vorinkubation wurden zunächst 2 µl des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF-AM in 2 ml Krebs-Henseleit-Lösung (siehe hierzu Vorschrift in Kapitel 2.2.4.1) gelöst. Anschließend wurde 1 µl Pluronic hinzugefügt und gut geschüttelt. Mit einer Pinzette wurde vorsichtig ein Plättchen mit subkonfluenten Zellen aus der Petrischale herausgenommen und in ein Schälchen mit einem Durchmesser von 20 mm überführt. Anschließend wurde die vorbereitete Lösung mit BCECF-AM und Pluronic sowie ggf. einer zu untersuchenden Substanz hinzupipettiert. Es folgte eine ca. 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 Vol.-% CO₂.

Materialien für die Fluoreszenzphotometrie

Sigma

- DMSO (Dimethylsulfoxid)

Invitrogen – Molecular Probes

- Pluronic
- BCECF-AM

2.2.4 Superfusionslösungen

2.2.4.1 Krebs-Henseleit-Lösung

Für 1 l Lösung wurden zuerst 0,37 g Calciumchlorid (2,52 mmol/l) in 400 ml destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurden der Lösung 6,9 g Natriumchlorid (118 mmol/l), 0,35 g Kaliumchlorid (4,70 mmol/l), 0,4 g Magnesiumsulfat (1,64 mmol/l), 2,09 g Natriumbikarbonat (24,88 mmol/l), 0,16 g Kaliumdihydrogenphosphat (1,18 mmol/l) sowie 1,0 g Glucose (5,55 mmol/l) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf insgesamt 1 l Lösung aufgefüllt. Die pH-Einstellung erfolgte durch die Begasung mit 5 Vol.-% CO₂.

2.2.4.2 Acetat-Lösung

Bei der Herstellung der Acetat-Lösungen musste beachtet werden, dass im Vergleich zur Krebs-Henseleit-Lösung äquimolare Mengen von Natriumchlorid durch Natriumacetat ersetzt wurden. Für einen Liter einer 80 mM Acetat-Lösung wurden somit 0,37 g Calciumchlorid unter Rühren in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden der Lösung 2,22 g Natriumchlorid (38 mmol/l), 10,88 g Natriumacetat (80 mmol/l), 0,35 g Kaliumchlorid (4,70 mmol/l), 0,4 g Magnesiumsulfat (1,64 mmol/l), 2,09

2. Material und Methoden

g Natriumbikarbonat (24,88 mmol/l), 0,16 g Kaliumdihydrogenphosphat (1,18 mmol/l) sowie 1,0 g Glucose (5,55 mmol/l) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l Lösung aufgefüllt. Die pH-Einstellung erfolgte durch die Begasung mit 5 Vol.-% CO₂.

2.2.4.3 Ammoniumchlorid-Lösung

Zur Herstellung von einem Liter einer 5 mM Ammoniumchlorid-Lösung wurden 267,5 mg Ammoniumchlorid in fertiger Krebs-Henseleit-Lösung gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

2.2.5 pH-Registrierung

2.2.5.1 pH-Eichung

Da bei der Fluoreszenzmessung lediglich der Quotient der Fluoreszenz bei 495 nm und bei 439 nm, die sog. Ratio, bestimmt wird, ist es notwendig, im nächsten Schritt die Ratio-Werte in pH-Werte umzurechnen. Die Durchführung einer pH-Eichung mit Nigericin erlaubt es dann, einer Ratio einen intrazellulären pH-Wert zuzuordnen.

Nigericin ist ein Ionophor, das dazu führt, dass die Zellmembran für Protonen und Kalium-Ionen durchlässig wird. Setzt man Zellen Nigericin aus, kann also davon ausgegangen werden, dass sich die intrazellulären pH-Werte den extrazellulären pH-Werten angleichen. Aus wiederholten Messungen ergeben sich lineare Abhängigkeiten, woraus eine Eichgerade ermittelt wurde (siehe Abb. 5).

Um keine Störungen der nachfolgenden Messungen durch Nigericin zu bewirken ist es wichtig, nach einer erfolgten pH-Eichung mit Nigericin die gesamte Superfusionsapparatur sorgfältig zu reinigen.

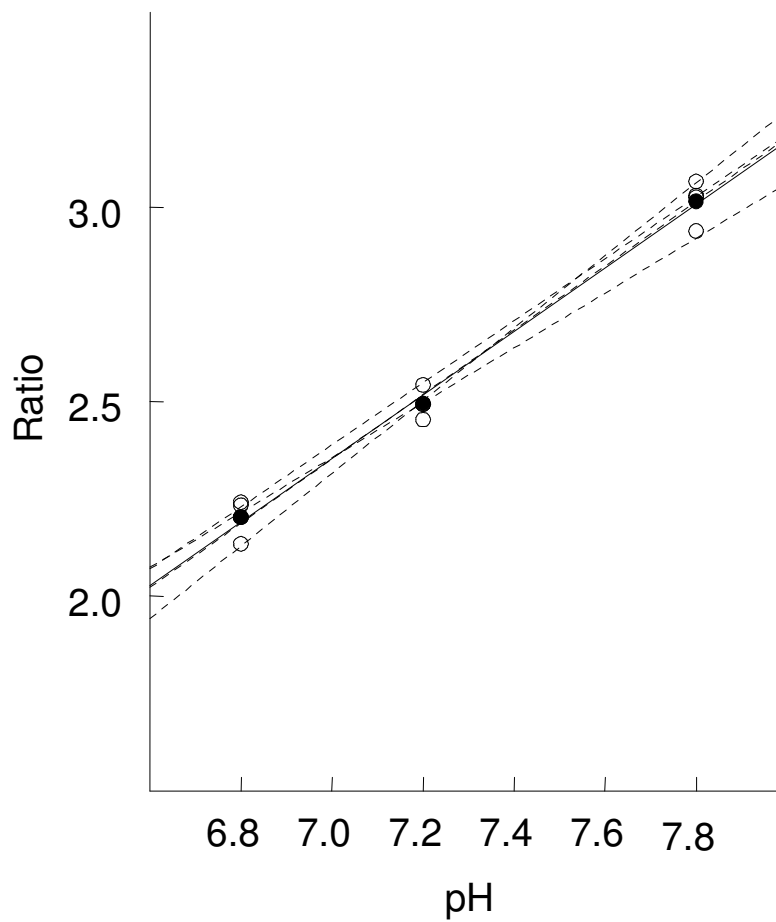


Abb. 5

Ergebnisse der pH-Kalibrierung mit Nigericin bei HeLa Zellen. Es erfolgten insgesamt vier unabhängige Kalibrierungs-Messungen. Darstellung der zugeordneten Werte (○) sowie der Mittelwerte (●) und der Ausgleichsgerade, deren Funktion mathematisch bestimmt wurde.

Die Gleichung lautete: $\text{Ratio} = 0,8156 \times \text{pH}_i - 3,3549$.

2. Material und Methoden

Die linearen Funktionen wurden für kardiale Fibroblasten (2) und HeLa Zellen (3) getrennt bestimmt und lauteten:

$$(2) \quad \text{Ratio} = 0,5178 \times \text{pH}_i - 1,6182 \\ \rightarrow \text{pH}_i = (1,6182 + \text{Ratio}) / 0,5178$$

$$(3) \quad \text{Ratio} = 0,8156 \times \text{pH}_i - 3,3549 \\ \rightarrow \text{pH}_i = (3,3549 + \text{Ratio}) / 0,8156.$$

2.2.5.1.1 Nigericin Lösungen

Die Nigericin Lösungen wurden am Tag der Messung gemäß Tab. 1 angefertigt. Die Titration der Lösungen erfolgte auf pH-Werte von 7,8 und 7,2 sowie 6,8 mit Hilfe von 0,1 mM NaOH bzw. 0,1 mM HCl. Als Kontroll-Lösung wurde die Krebs-Henseleit-Lösung gemäß der Vorschrift aus Kapitel 2.2.4.1 benutzt.

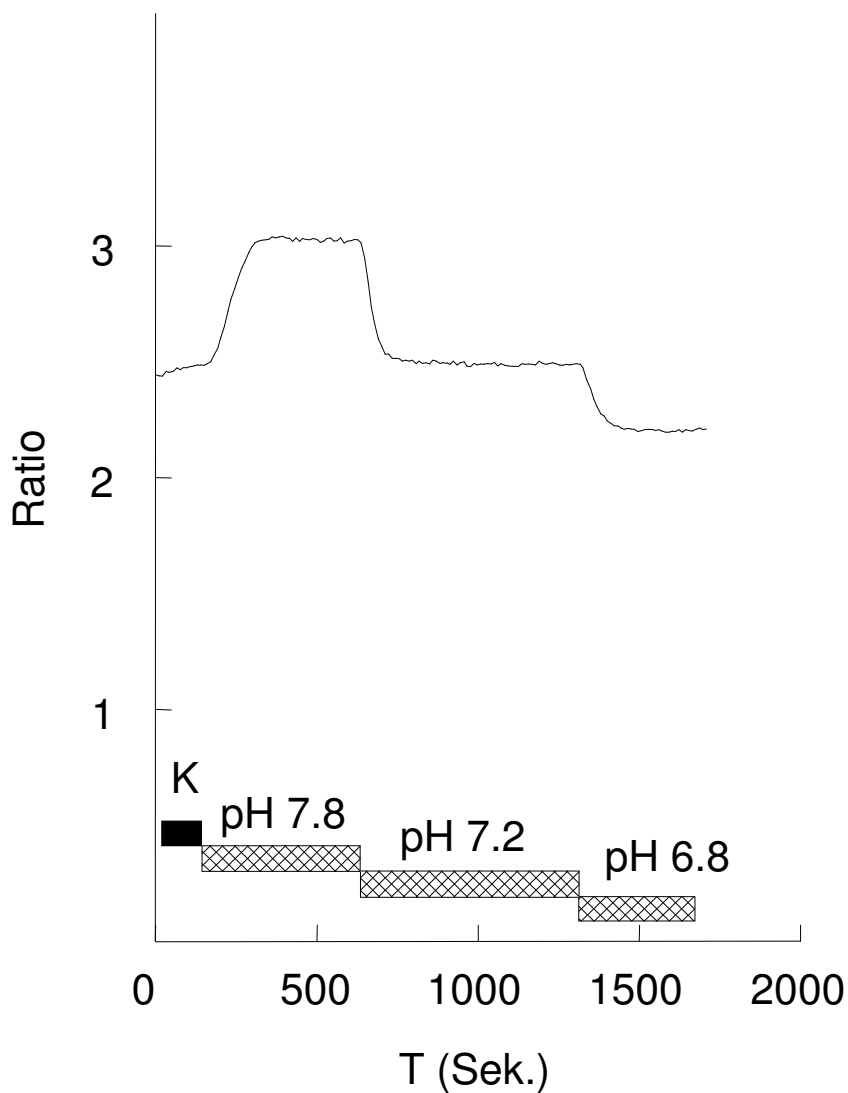
Substanz	Molekulargewicht (in g/mol)	Konzentration (in mmol/l)	Masse für 1 l Nigericin Lösung
KCl	74,56	120	8,947 g
MgSO ₄	246,5	1	246,5 mg
Cholinchlorid	139,6	10	1,396 g
KH ₂ PO ₄	136,09	2	272,2 mg
HEPES	238,31	20	4,766 g
Nigericin	747,0	0,0125	9,3 mg

Die Auflösung der Substanzen in destilliertem Wasser erfolgte unter Rühren.

Tab. 1 Anleitung zur Herstellung der Nigericin-Lösung.

2.2.5.1.2 Ablauf der pH-Eichung

Nach einer kurzen Superfusion der Zellen mit Krebs-Lösung erfolgte das Umschalten auf die vorbereiteten Lösungen mit pH-Werten von 7,8 und 7,2 sowie 6,8 (Abb. 6).

**Abb. 6**

Repräsentative Aufnahme einer pH-Kalibrierung mit Nigericin bei HeLa Zellen. Die Zellen wurden über 30 Minuten mit BCECF und Pluronic inkubiert. Nach dem Einspannen in die Superfusionsapparatur erfolgte die Superfusion zunächst mit Krebs-Henseleit-Lösung als Kontrolle (K). Anschließend wurde die Superfusion mit Nigericin bei definierten pH-Werten ohne Begasung mit CO₂ durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.2.5.2 Messung des basalen intrazellulären pH

Zur Messung des basalen intrazellulären pH wurden kardiale Fibroblasten und HeLa Zellen in der oben beschriebenen Weise auf Plättchen ausgesät. Die pharmakologische Behandlung, die Inkubation mit BCECF und die Superfusion erfolgten ebenfalls wie oben beschrieben. Zur Messung des pH wurde die Proportionalität von Ratio und intrazellulärem pH ausgenutzt. Dabei wurde auf einem Plättchen 5 bis 8mal jeweils 10 gut eingefärbte Zellen in einem Sichtfeld eingestellt und die Ratio gemessen. Anhand der oben dargestellten Formeln (2) und (3) konnte der basale intrazelluläre pH berechnet werden.

2.2.6 Ablauf eines Acetatpulses

2.2.6.1 Einfacher Acetatpuls

Hierzu wurde zunächst das Plättchen in die Superfusionsapparatur eingespannt, und es erfolgte die Superfusion mit der auf 37° C angewärmten Krebs-Henseleit-Lösung. Dabei wurde auf eine konstante Tropfgeschwindigkeit von 2 ml/min geachtet. Nach dem Einstellen der Zellen im Sichtfeld des Fluoreszenzmikroskops wurde die Messung begonnen. Zuerst wurde über mindestens zwei Minuten hinweg die Grundlinie aufgenommen, die allenfalls leicht abfallen durfte. Dies ist auf ein geringes Ausbleichen der zelleigenen fluoreszierenden Substanzen sowie des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF zurückzuführen. Anschließend wurde die Superfusion mit der 80 mM Acetat-Lösung begonnen. Nach initialer maximaler Ansäuerung erholten sich die Zellen wieder, so dass nach ca. 8 Minuten keine Veränderungen des intrazellulären pH mehr auftraten und wieder auf die Krebs-Henseleit-Lösung umgeschaltet werden konnte. Einer daraufhin erfolgenden maximalen Alkalinisierung folgte eine Erholung aus dem Alkalischen.

2.2.6.2 Doppelpuls

Hier wurden nicht nur einer, sondern zwei Acetatpulse hintereinander durchgeführt. Dabei musste jedoch zwischen den beiden Pulsen bisher unbelichtete Zellen im Sichtfeld eingestellt werden, da die Zellen ansonsten zu stark verblassten. Zum Ablauf der einzelnen Acetatpulse siehe Kapitel 2.2.6.1.

2.2.7 Ablauf eines Ammoniumchloridpulses

Die Ammoniumchloridpulse wurden analog den einfachen Acetatpulsen durchgeführt. Es wurde anstelle der Acetat-Lösung eine 5 mM Ammoniumchloridlösung verwendet. Die Veränderungen des intrazellulären pH waren genau entgegengesetzt den

2. Material und Methoden

Veränderungen bei den Acetatpulsen, d.h. zuerst erfolgte die Alkalinisierung und im Anschluss daran die Ansäuerung.

2.2.8 Pharmakologische Interventionen

2.2.8.1 Variation der FBS Konzentrationen

Am Tage der Messung wurden Krebs-Lösungen definierter FBS-Konzentrationen angesetzt, die entweder 0,4%, 5% oder 10% FBS betragen.

2.2.8.2 Behandlung mit Moxonidin

Zunächst wurde eine 1 mM Moxonidin-Stammlösung hergestellt, wozu 12 mg Moxonidin in 50 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. Anschließend wurde durch entsprechende Verdünnung eine Konzentration von 1 μ M hergestellt. Moxonidin wurde in den meisten Versuchen zur Vorinkubation, einmal auch zur Superfusion benutzt.

2.2.8.3 Behandlung mit HOE694

Von HOE694 wurde eine 10 μ M Stammlösung in DMSO hergestellt. Anschließend wurde durch entsprechende Verdünnung eine Konzentration von 1 μ M hergestellt. HOE694 wurde zur Superfusion der Krebs- bzw. der Acetat-Lösung hinzugefügt.

Pharmaka

- FBS von Gibco
- DMSO (Dimethylsulfoxid) von Sigma

Solvay (Hannover) stellte freundlicherweise Moxonidin zur Verfügung.

Aventis (Frankfurt) stellte freundlicherweise HOE694 zur Verfügung.

2.3 Bestimmung der Pufferkapazität

Die totale intrazelluläre Pufferkapazität wurde als Hilfsmittel zur späteren Berechnung des Säure- und Basen-Flusses über die Zellmembran J_H (vgl. hierzu Kapitel 2.4) experimentell bestimmt.

2.3.1 Prinzip

Die totale intrazelluläre Pufferkapazität β_{tot} setzt sich aus der intrinsischen Pufferkapazität β_i und der Bikarbonat-abhängigen Pufferkapazität β_{CO_2} zusammen, wobei die beiden Werte nach Gleichung (4) zu der totalen intrazellulären Pufferkapazität β_{tot} addiert werden dürfen:

2. Material und Methoden

$$(4) \beta_{\text{tot}} = \beta_i + \beta_{\text{CO}_2}.$$

Die Bikarbonat-abhängige Pufferkapazität β_{CO_2} ist direkt abhängig von der intrazellulären Bikarbonat-Konzentration $[\text{HCO}_3^-]_i$ und kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$(5) \beta_{\text{CO}_2} = 2,303 \times [\text{HCO}_3^-]_i.$$

Da die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration sich nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung nach Gleichung (6) als Funktion der extrazellulären Bikarbonat-Konzentration $[\text{HCO}_3^-]_a$ und des intrazellulären pH (pH_i) umformen lässt, kann die Bikarbonat-abhängige Pufferkapazität β_{CO_2} nach Gleichung (7) berechnet werden (vgl. Roos und Boron (43)). Der extrazelluläre pH-Wert (pH_a) wurde dabei auf den Wert 7,4 eingestellt:

$$(6) [\text{HCO}_3^-]_i = [\text{HCO}_3^-]_a \times 10^{(\text{pH}_i - \text{pH}_a)},$$

$$(7) \beta_{\text{CO}_2} = 2,303 \times [\text{HCO}_3^-]_i = 2,303 \times [\text{HCO}_3^-]_a \times 10^{(\text{pH}_i - \text{pH}_a)}.$$

Die intrinsische, d.h. nicht- CO_2 -abhängige Pufferkapazität β_i unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp, so dass sie experimentell bestimmt werden musste. Dazu wurden die Zellen Ammonium-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen unter Hemmung der Bikarbonat-abhängigen Puffer sowie der Ionentransporter ausgesetzt, und die intrazellulären pH-Werte registriert. Mit Hilfe von Gleichung (8) konnte daraus eine Formel für die intrinsische Pufferkapazität abgeleitet werden (siehe Gleichung (12) aus Kapitel 2.3.3):

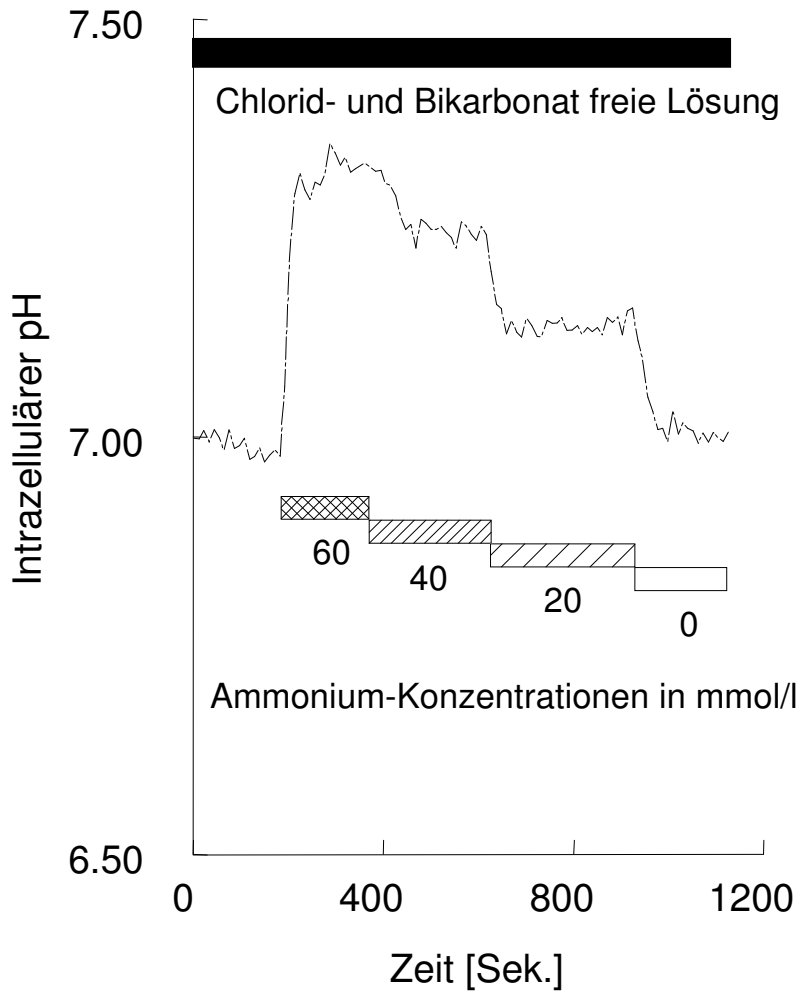
$$(8) \beta_i = \delta[\text{NH}_4^+]_i / \delta\text{pH}_i.$$

Ferner gilt es zu beachten, dass sich in kardialen Zellen hinsichtlich der Bikarbonat-abhängigen Puffersysteme nur langsam ein Gleichgewicht einstellt, wohingegen dies bei intrinsischen Puffern fast unmittelbar geschieht (vgl. Leem et al. (22)). Dies spielt insbesondere in der zweiten Phase eines Acetatpulses, also der Erholung aus dem Alkalischen eine Rolle. Daher sollte in dieser Phase die Erholung aus dem Alkalischen erst nach etwa drei Minuten gemessen werden, da sich das Gleichgewicht der CO_2 -abhängigen Puffer erst einstellen muss.

2.3.2 Protokoll zur Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität

Die intrinsische Pufferkapazität wurde nach der von Leem et al. (22) beschriebenen Methode bestimmt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf Glasplättchen ausgesät und in Quantum 333 Medium kultiviert. Am Tag der Messung erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Krebs-Henseleit-Lösung mit 1 μ l Pluronic und 2 μ l BCECF-AM. Nach dem Einspannen des mit Fibroblasten bewachsenen Deckgläschens in die Superfusionsapparatur wurden die Zellen mit einer Chlorid- und Bikarbonat-freien Lösung mit 10 μ M HOE694 superfundiert. Dies erfolgte bei 37° C ohne Begasung mit CO₂ bis zur Einstellung eines stabilen pH-Wertes. Der Entzug von Chlorid diente dazu, die Anionenaustauscher zu hemmen, wohingegen der Entzug von Bikarbonat die Bikarbonat-abhängigen Prozesse hemmen sollte. Der NHE wurde zusätzlich durch 10 μ M HOE694 gehemmt. Anschließend wurden die Zellen einer 60 mM Ammonium-Lösung ausgesetzt und erneut die Einstellung eines stabilen pH-Wertes abgewartet. Die Ammonium-Konzentration wurde im weiteren Verlauf in 20 mM-Schritten bis zum Erreichen einer Ammonium-freien Lösung herabgesetzt (siehe Abb. 7).

Intrinsische Pufferkapazität

**Abb. 7**

Versuch zur Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität kardialer Fibroblasten. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 30 Minuten mit 2 μl BCECF-AM und 1 μl Pluronic in Krebs-Lösung. Die Zellen wurden nach dem Einspannen des Deckgläschens in die Superfusionsapparatur mit Chlorid- und Bikarbonat-freien Lösungen bei 37° C und ohne Zugabe von CO₂ superfundiert. Zusätzlich wurde der Superfusionslösung 10 μM HOE694 zugefügt. Die Superfusion erfolgte mit abnehmenden Konzentrationen von Ammonium. Es handelt sich um eine repräsentative Aufnahme von vier Experimenten.

2. Material und Methoden

2.3.2.1 Ansatz der Lösungen

Zur Herstellung einer Chlorid- und Bikarbonat-freien Lösung wurden 140 mM Natriumgluconat, 4,5 mM Kaliumgluconat, 4 mM Calciumgluconat, 2 mM Magnesiumgluconat, 11 mM Glucose sowie 20 mM HEPES in destilliertem Wasser gelöst (siehe Tab. 2). Zur Herstellung der Ammonium-Lösungen wurden entsprechende Mengen Ammoniumsulfat sowie 10 μ M HOE694 hinzugefügt (siehe Tab. 3).

Substanz	Konzentration (in mmol/l)	Molekulargewicht (in g/mol)	Masse für 1 l Lösung (in g)
Natriumgluconat	140	218,1	30,534
Kaliumgluconat	4,5	234,2	1,054
Calciumgluconat	4	215,2	0,861
Magnesiumgluconat	2	207,3	0,415
Glucose	11	180,2	1,982
HEPES	20	238,3	4,766

Tab. 2 Protokoll zur Herstellung der Chlorid- und Bikarbonat-freien Lösung zur Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität.

Substanz	Gewünschte Ammonium- Konzentration (in mmol/l)	Molekulargewicht (in g/mol)	Masse für 1 l Lösung (in g)
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	60	132,14	3,964
	40		2,643
	20		1,321

Tab. 3 Protokoll zur Herstellung der Ammonium-Lösungen. Entsprechende Mengen an Ammoniumsulfat müssen zur Chlorid- und Bikarbonat-freien Lösung (nach Tab. 2) hinzugefügt und auf 1 l aufgefüllt werden.

2.3.3 Ermittlung einer Gleichung für die intrinsische Pufferkapazität

Nach dem oben beschriebenen Experiment ergibt sich nun die intrinsische Pufferkapazität β_i aus folgender Formel:

$$(8) \beta_i = \delta[\text{NH}_4^+]_i / \delta\text{pH}_i.$$

2. Material und Methoden

Zunächst wurden dazu in jedem einzelnen der vier Experimente den Ammoniumkonzentrationen die entsprechenden intrazellulären pH-Werte zugeordnet. Anschließend wurden die intrazellulären Ammoniumkonzentrationen nach Gleichung (9) sowie deren Differenzen berechnet. Dies gilt nur unter der Annahme gleicher pK-Werte für Ammonium im extra- und intrazellulären Kompartiment (vgl. Roos und Boron (43)):

$$(9) [\text{NH}_4^+]_i = [\text{NH}_4^+]_a \times 10^{\text{pH}_a - \text{pH}_i}.$$

Unter der Annahme, dass die Erhöhung der intrazellulären Säureäquivalente der berechneten Verminderung der intrazellulären Ammoniumkonzentrationen entspricht, konnte die intrinsische Pufferkapazität nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$(10) \beta_i = ([\text{NH}_4^+]_{i;\text{START}} - [\text{NH}_4^+]_{i;\text{END}}) / (\text{pH}_{i;\text{START}} - \text{pH}_{i;\text{END}}).$$

Diese Werte wurden den Mittelpunkten der intrazellulären pH-Werte jedes einzelnen Schrittes zugeordnet. Diese Mittelpunkte berechnen sich nach folgender Gleichung:

$$(11) \text{pH}_{i,\text{Mittel}} = \log ((10^{\text{pH}_{i;\text{START}}} + 10^{\text{pH}_{i;\text{END}}})/2).$$

Die Daten wurden nach „SlideWrite“ importiert, anschließend wurde mittels „Curve Fit“ folgende Gleichung zur Berechnung der intrinsischen Pufferkapazität in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert berechnet:

$$(12) \beta_i = -167,04 \times \text{pH}_i + 1293,73.$$

In Abb. 8 sind die Mittelwerte der intrinsischen Pufferkapazitäten von insgesamt vier Messungen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Die eingezeichnete Ausgleichsgerade entspricht der Gleichung (12).

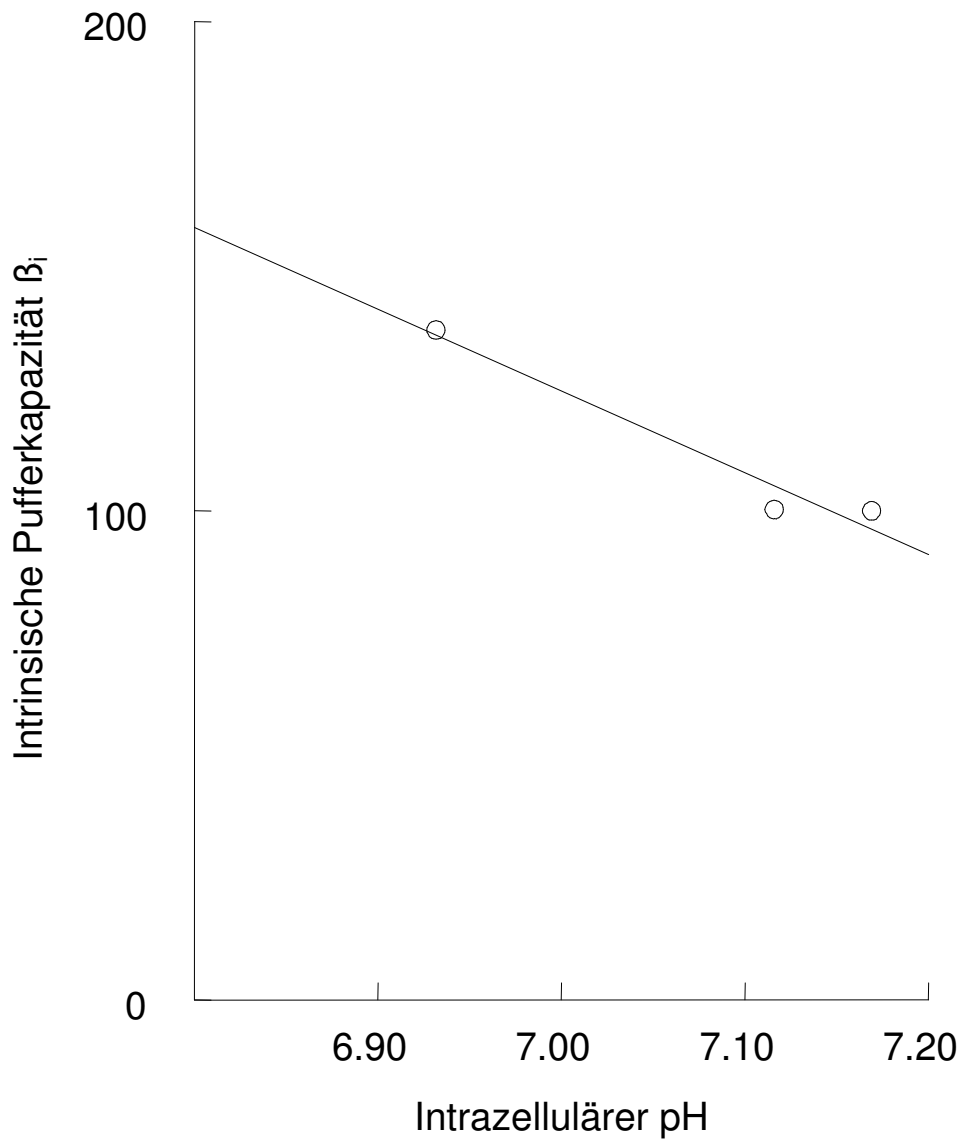


Abb. 8

Intrinsische Pufferkapazität bei kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit vom intrazellulären pH (pH_i). Die drei gezeigten Punkte (von links nach rechts) wurden bei Ammoniumkonzentrationen von 60, 40 und 20 mmol/l ermittelt. Jeder dieser Werte ist ein Mittelwert aus vier Messungen, bei denen β_i jeweils nach Gleichung (10) berechnet wurde. Die Ausgleichsgerade wurde mittels „SlideWrite“ ermittelt.

Deren Gleichung lautet: $\beta_i = -167,04 \times pH_i + 1293,73$.

2. Material und Methoden

2.4 Berechnung des Protonen-Flusses J_H

Der sog. Protonen-Fluss J_H (engl. „acid-flux“) berechnet sich aus dem Produkt von $\delta pH_i / \delta t$ und der totalen intrazellulären Pufferkapazität β_{tot} (vgl. hierzu Kapitel 2.3). Er gibt also die Netto-Rate der intrazellulären Beladung mit Säuren oder Basen an.

Handelt es sich um einen Netto-Säure-Einstrom (engl. „acid-influx“), wie bei der Erholung aus dem Alkalischen, hat der Fluss ein negatives Vorzeichen und Säure-Äquivalente strömen von außen nach innen. Handelt es sich jedoch um einen Netto-Säure-Ausstrom (engl. „acid-efflux“), wie bei der Erholung aus dem Sauren, hat der Fluss ein positives Vorzeichen und Säure-Äquivalente strömen von innen nach außen. Dabei entspricht bei dieser Berechnung der Ausstrom von Säure-Äquivalenten rechnerisch dem Einstrom von Basen-Äquivalenten.

Um bei den fluoreszenzmikroskopisch registrierten Veränderungen des intrazellulären pH lediglich die Transporter-Aktivitäten zu berechnen, ist es notwendig, die durch intrazelluläre Puffer verursachten pH-Veränderungen zu berücksichtigen. Der Protonen-Fluss J_H berechnet sich somit aus dem Produkt der Rate der Veränderung des pH_i und der totalen intrazellulären Pufferkapazität β_{tot} :

$$(13) J_H = \beta_{tot} \times \delta pH_i / \delta t.$$

Setzt man nun die Gleichungen (7) und (12) sowie die bekannte Konzentration von Bikarbonat (24 mmol/l) und den extrazellulären pH von 7,4 ein, erhält man für die gesamte Pufferkapazität β_{tot} :

$$(14) \beta_{tot} = -167,04 \times pH_i + 1293,73 + 2,303 \times 24 \times 10^{(pH_i - 7.4)}.$$

Aus den Originalregistrierungen wurde nun in „SlideWrite“ der Quotient aus δpH_i und δt bestimmt und anschließend zusammen mit den Werten von β_{tot} zur Berechnung von J_H in Gleichung (13) eingesetzt.

2.5 Proliferationsassay WST-1

2.5.1 Prinzip

Bei WST-1 (engl. „water soluble tetrazolium“) handelt es sich um ein Zell-Proliferations-Reagenz, mit dem das Zellwachstum in einer Zellkultur quantifiziert werden kann. In den Mitochondrien erfolgt die Reduktion des WST-1 zu seinem entsprechenden Formazan, was durch das endogene Succinat-Reduktase System katalysiert wird (Abb. 9). Durch das Zellwachstum steigt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und somit auch die Produktion von Formazan, das direkt mit der Anzahl aktiver Zellen in einer Zellkultur korreliert (Produktinformation WST-1). Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels ELISA.

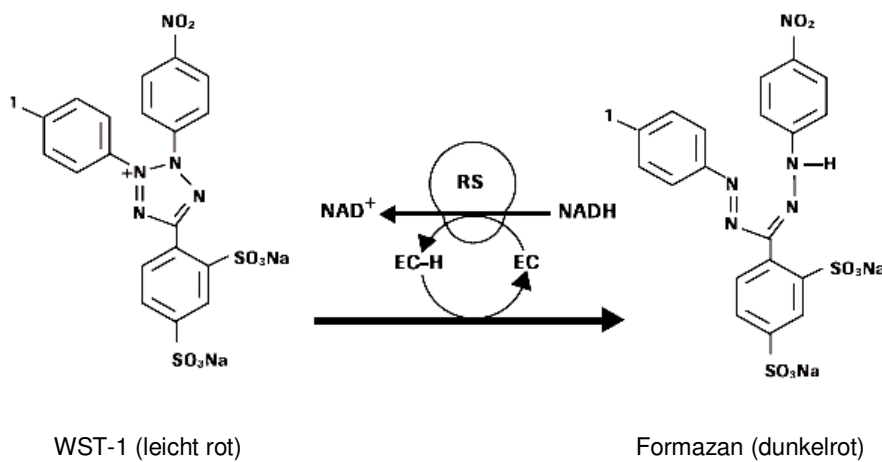


Abb. 9

Molekulare Struktur des WST-1 und des entsprechenden WST-1-Formazans. Die Reaktion wird katalysiert durch das endogene Succinat-Reduktase-System. Abbildung modifiziert nach der Produktinformation von WST-1 (Roche).

2.5.2 Durchführung

Zur Vorbereitung der WST-Proliferations-Messungen wurden die Zellen am Tag vor Beginn der Messungen in 96-well-Platten ausgesät. Bei HeLa Zellen wurden 750 Zellen pro Well ausgesät, bei kardialen Fibroblasten war eine höhere Zelldichte von 1500 Zellen pro Well nötig.

2. Material und Methoden

Bevor die Zugabe der Pharmaka erfolgen konnte, musste eine Messung zum Zeitpunkt "Null" erfolgen, um einen Ausgangswert zu haben. Dazu wurde das Medium abgesaugt und anschließend 50 µl einer Lösung aus Medium mit 10% WST-1 zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten im Brutschrank erfolgte die Messung der Absorption im ELISA-Reader bei 450 nm. Die Inkubationszeit und die Referenzmedien sollten bei allen Versuchen an den aufeinanderfolgenden Tagen identisch sein. Nach dieser initialen Messung zum Zeitpunkt „Null“ wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und Medium hinzugegeben, das die Pharmaka enthielt (siehe Tab. 4). Die weiteren Messungen erfolgten nach einem, zwei, drei und vier Tagen. Als Standardmedium zur Inkubation wurde DMEM mit den üblichen Zusätzen von 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Fungizone und 5% FBS angesetzt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank 0	Zeitpunkt: 0 Kontrolle		1. Tag Kontrolle		2. Tag Kontrolle		3. Tag Kontrolle		4. Tag Kontrolle		
B	Blank 1											
C	Blank 2	+ Pharmakon		+ Pharmakon		+ Pharmakon		+ Pharmakon		+ Pharmakon		
D	Blank 3											
E	Blank 4											
F												
G												
H												

Tab. 4 Pipettierschema für Messungen mit dem Proliferationsassay WST-1 auf einer 96-well-Platte.

2. Material und Methoden

2.5.3 Behandlungen mit HOE694 und Moxonidin

Die HeLa Zellen wurden wie oben beschrieben ausgesät und nach der Ausgangsmessung entweder nicht behandelt oder mit 10 µM HOE694 oder mit 10 µM HOE694 und 1 µM Moxonidin behandelt. Die weiteren Messungen erfolgten an den Tagen 1,2,3 und 4. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Ähnliche Messungen wurden auch mit kardialen Fibroblasten durchgeführt; sie unterschieden sich lediglich durch eine höhere Konzentration von FBS im Medium (10% bei kardialen Fibroblasten im Gegensatz zu 5% bei HeLa Zellen) und die höhere Ausgangszellichte von 1500 Zellen pro Well bei kardialen Fibroblasten im Gegensatz zu 750 Zellen pro Well bei HeLa Zellen.

2.5.4 Behandlungen mit HOE694 und Moxonidin bei unterschiedlichen pH-Werten

Hier erfolgte neben der Zugabe von HOE694 und Moxonidin noch eine Einstellung unterschiedlicher pH-Werte von 6,8 bzw. 7,4 durch Zugabe von NaOH bzw. HCl. Anschließend wurden die Lösungen steril filtriert. Dem Medium wurde zur Verbesserung der Puffer-Eigenschaften des Mediums 25 mM HEPES hinzugefügt.

Das Grundmedium bestand aus DMEM, dem 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Fungizone, 5% FBS und 25 mM HEPES hinzugefügt wurden (Tab. 5). Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde täglich das Medium gewechselt.

Gruppe	pH	HOE694	Moxonidin
1	6,8	X	
2	7,4		
3	7,4	X	
4	7,4		X
5	7,4	X	X

Tab. 5 Herstellung von Lösungen verschiedener pH-Werte und Zufügen unterschiedlicher Kombinationen von HOE694 und Moxonidin.

Materialien für die WST-1-Proliferationsmessungen

Roche

- Cell Proliferation Reagent WST-1

2. Material und Methoden

Gibco

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- FBS
- L-Glutamin
- Penicillin/ Streptomycin
- Fungizone (Amphotericin B, 250 µg/ml)
- HEPES-Puffer 1 M

Solvay (Hannover) stellte freundlicherweise Moxonidin zur Verfügung.

Aventis (Frankfurt) stellte freundlicherweise HOE694 zur Verfügung.

Sarstedt

- Tissue Culture Plate 96-Well, Flat Bottom with Lid

Eppendorf

- Combitips biopur (5 ml)

Dynatech Laboratories, Billingshurst, Großbritannien

- ELISA: MRX Microplate Reader

2.6 Statistische Analysen

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit folgenden Programmen:

- (1) Statistica 6.0
- (2) SlideWrite 6.0
- (3) Microsoft® Excel 2002
- (4) Graph Pad InStat.

Im Einzelnen wurden Varianzanalysen nach Brown-Forsythe („Statistica 6.0“) durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica 6.0“) und ggf. mit dem ungepaarten t-Test mit der Welch-Korrektur für ungleiche Varianzen („Graph Pad InStat“) ermittelt.

3. Ergebnisse

Untersuchungen zur Regulation des intrazellulären pH-Wertes wurden an kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen durchgeführt. Durch Variation der Konzentrationen von FBS im Medium und Behandlung mit Moxonidin und HOE694 wurde der basale intrazelluläre pH und die Antwort auf Acetat- bzw. Ammoniumchloridpulse mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt.

3.1 Basaler intrazellulärer pH bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen

Es zeigte sich, dass kardiale Fibroblasten unter niedrigen FBS-Konzentrationen, d.h. einem sog. Minimalmedium mit einer Konzentration von 0,4% FBS, einen relativ sauren pH von 6,29 haben (Abb. 10). Durch eine 30-minütige Inkubation in einem Medium mit 10% FBS erhöhte sich der intrazelluläre pH auf einen Wert von 7,49. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit 10% FBS blieb der intrazelluläre pH ungefähr auf dem Niveau der 30-minütigen Inkubation (intrazellulärer pH von 7,25). Die Anwesenheit von 1 μM Moxonidin während der Inkubation führte zu keinen signifikanten Veränderungen des basalen intrazellulären pH.

Im Vergleich zu kardialen Fibroblasten zeigten HeLa Zellen unter Minimalmedium einen höheren intrazellulären pH von durchschnittlich 7,09 (Abb. 11). Die 30-minütige Inkubation mit 10% FBS führte wie bei kardialen Fibroblasten zu einer signifikanten Alkalinisierung auf einen intrazellulären pH von durchschnittlich 7,49. Die Anwesenheit von 1 μM Moxonidin führte zu keinen signifikanten pH-Veränderungen. Wie bei kardialen Fibroblasten kam es auch bei HeLa Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10% FBS zu keinen weiteren Veränderungen des basalen intrazellulären pH (Abb. 12).

In einem weiteren Versuch mit HeLa Zellen wurde die langanhaltende Wirkung von Moxonidin und HOE694 bei gleichbleibenden FBS-Konzentrationen untersucht. Über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen bei FBS-Konzentrationen von 5% mit oder ohne 1 μM Moxonidin und 10 μM HOE694 inkubiert und anschließend der intrazelluläre pH bestimmt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die pH-Werte bewegten sich im Bereich von 7,56 bis 7,86 (Abb. 13), was ungefähr den Werten nach 30-minütiger Inkubation mit 10% FBS entsprach.

3. Ergebnisse

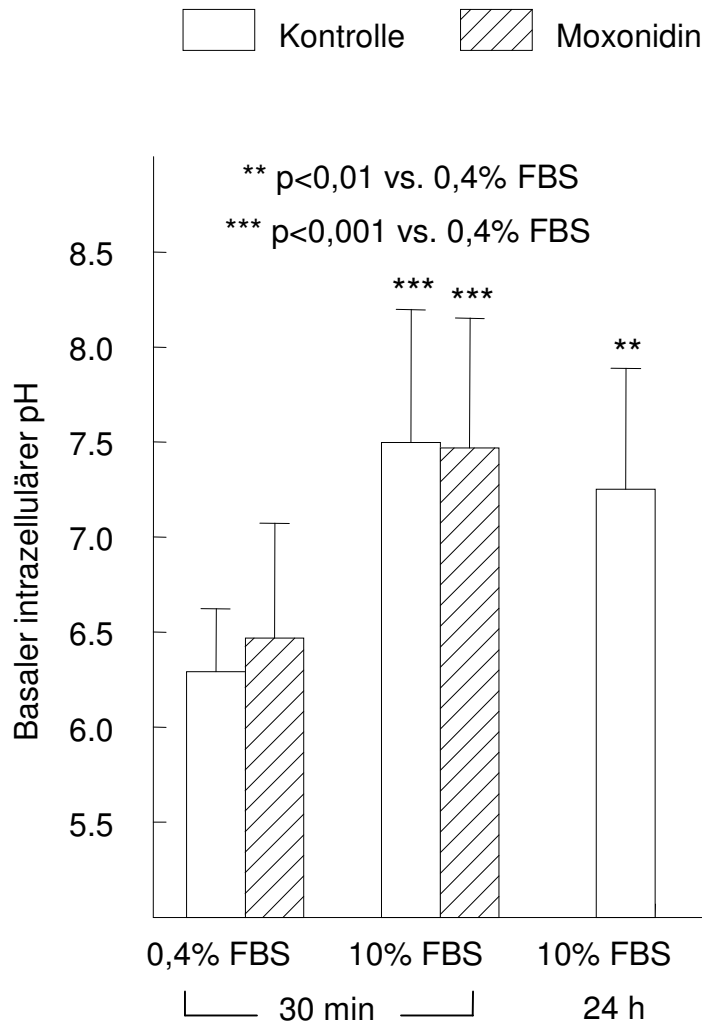


Abb. 10

Basaler intrazellulärer pH von kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubation mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen und der Inkubation mit Moxonidin. Die Kultivierung der kardialen Fibroblasten erfolgte 24 Stunden vor Beginn der Messungen mit 0,4% FBS in DMEM. Anschließend erfolgte entweder eine 30-minütige Inkubation mit 0,4% FBS ohne/mit Moxonidin, eine 30-minütige Inkubation mit 10% FBS ohne/mit Moxonidin oder eine 24-stündige Inkubation mit 10% FBS (Säulen von links nach rechts; weiße Balken ohne Moxonidin; gestreifte Balken mit Moxonidin). Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 bis 12 Messungen ($n=12, 10, 8, 7, 6$; Säulen von links nach rechts) 10 ± 2 subkonfluenten Zellen. Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan’s New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

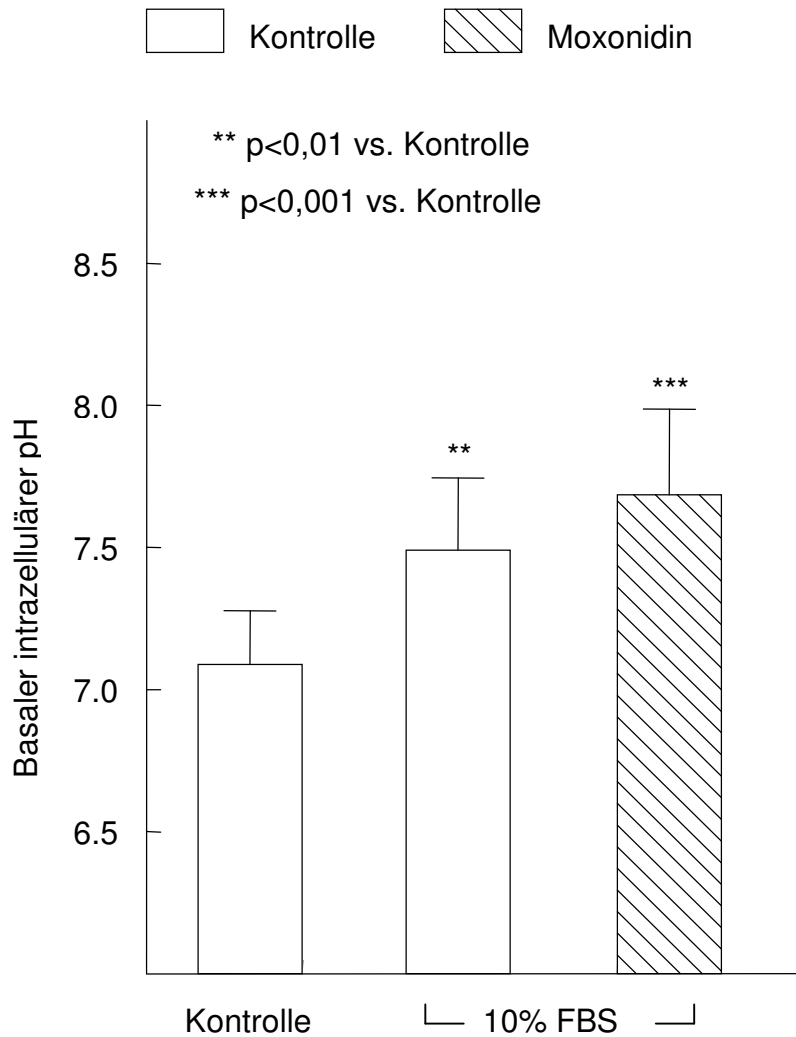


Abb. 11

Basaler intrazellulärer pH von HeLa Zellen in Abhängigkeit von der Inkubation mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen und Moxonidin. Die Kultivierung der HeLa Zellen erfolgte 24 Stunden vor Beginn der Messungen mit 0,4% FBS in DMEM. Anschließend erfolgte entweder eine 30-minütige Inkubation mit 0,4% FBS oder eine 30-minütige Inkubation mit 10% FBS ohne/mit 1 μ M Moxonidin (Säulen von links nach rechts).

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 7 Messungen 10 subkonfluenter Zellen. Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan’s New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

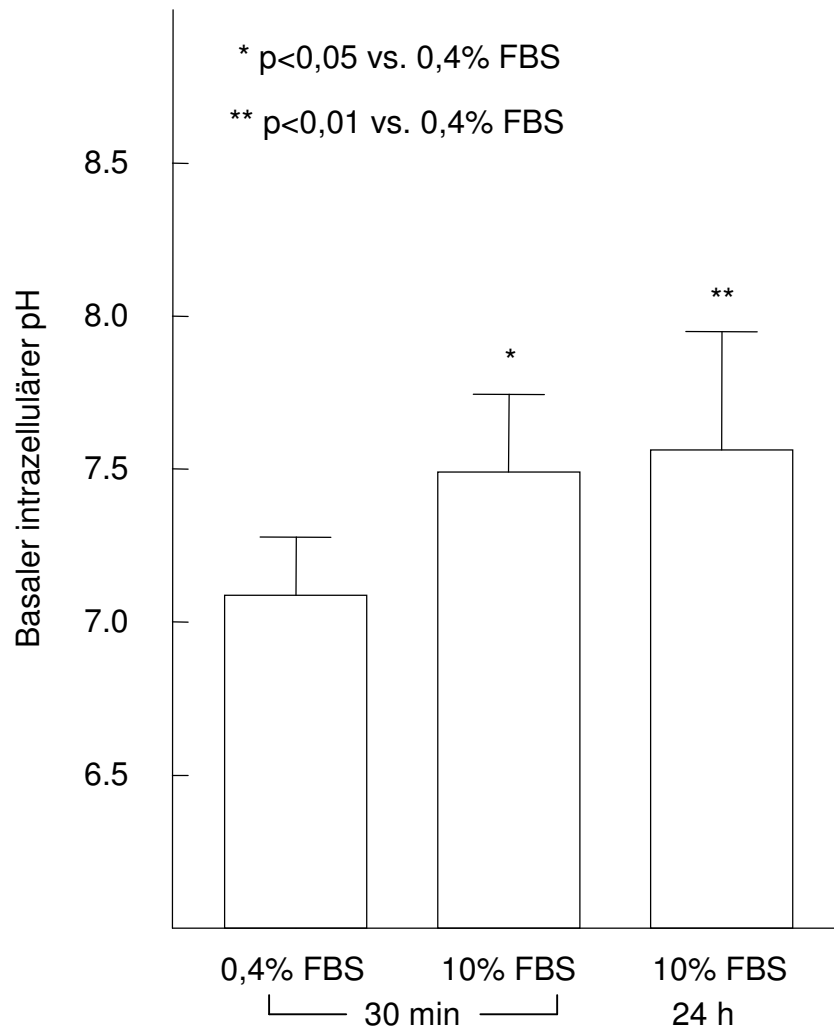


Abb. 12

Effekt der 30-minütigen bzw. 24-stündigen Inkubation mit 10% FBS auf den intrazellulären pH bei HeLa Zellen. Die Kultivierung der HeLa Zellen erfolgte 24 Stunden vor Beginn des Versuches mit 0,4% FBS in DMEM. Anschließend erfolgte entweder eine 30-minütige Inkubation mit 0,4% bzw. 10% FBS oder eine 24-stündige Inkubation mit 10% FBS.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 bzw. 45 Experimenten ($n = 7, 7, 45$; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

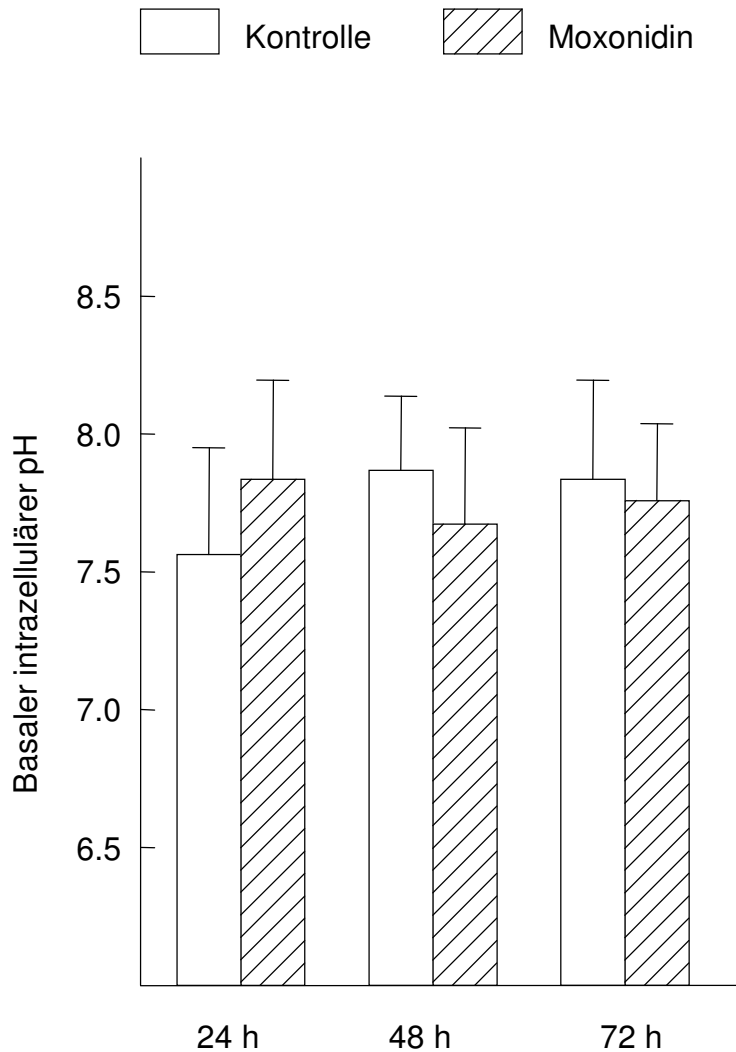


Abb. 13

Intrazellulärer pH von HeLa Zellen in Abhängigkeit von der mehrtägigen Behandlung mit HOE694 und Moxonidin. In der Kontrollgruppe wurden die HeLa Zellen mit 5% FBS in DMEM kultiviert. In der Vergleichsgruppe wurden die Zellen mit einem Zusatz von 10 μ M HOE694 und 1 μ M Moxonidin zum Medium behandelt. Die pH-Messungen erfolgten nach 24, 48 und 72 Stunden.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 23 bis 45 Versuchen jeweils 10 subkonfluenten Zellen ($n= 45, 38, 31, 32, 38, 23$; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3.2 Aktivität pH-regulierender Austauscher bei kardialen Fibroblasten

3.2.1 Acetatpulse

3.2.1.1 FBS

Kardiale Fibroblasten wurden vor Beginn der Fluoreszenzmessung über 24 Stunden auf Deckgläsern in einem Minimalmedium mit 0,4% FBS kultiviert. Vor der Messung erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen entweder mit 0,4% oder 10% FBS. Eine dritte Gruppe wurde über weitere 24 Stunden mit 10% FBS kultiviert. Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen auf dem Deckglas in der Superfusionskammer über 5 bis 8 Minuten einem 80 mM Acetatpuls ausgesetzt, worauf sie mit einer Ansäuerung reagierten (Abb. 14). Je nach Besetzung und Aktivität mit Ionenaustauschern erfolgte noch während des Acetatpulses ein Anstieg des intrazellulären pH-Wertes in Richtung des Ausgangswertes. Die Säurebeladung wurde in Prozent des Maximums nach jeweils einer und drei Minuten berechnet. Nach Umschalten auf eine Acetat-freie Superfusionslösung wurde der intrazelluläre pH-Wert vorübergehend alkalisch. Analog wurde die Alkalibeladung nach drei und fünf Minuten in Prozent der maximalen Alkalinisierung bestimmt.

Die Erholung aus dem Säuren kann auch mit der Methode des Protonen-Flusses dargestellt werden (Abb. 15). Es handelt sich dabei um eine vom aktuellen intrazellulären pH unabhängige Möglichkeit, die Erholung aus dem Säuren oder den Fluss von Protonen über die Zellmembran in einer Zeiteinheit zu berechnen. Im Vergleich dazu siehe Abb. 16 und Abb. 18, wo die gleichen Daten mit der konventionellen Berechnungsmethode der Erholung aus dem Säuren in Prozent der maximalen Ansäuerung dargestellt sind. Bei den Protonen-Flüssen entspricht ein positiver Wert einem Säure-Ausstrom, wohingegen ein negativer Wert einem Säure-Einstrom, z.B. bei der Erholung aus dem Alkalischen, entspricht.

Bei der Säurebeladung zeigte es sich, dass durch die 30-minütige Inkubation mit 10% FBS die Erholung aus dem Säuren signifikant beschleunigt wurde (Abb. 16). Dieser Effekt war jedoch nach 24-stündiger Behandlung mit 10% FBS wieder rückläufig. Die Erholung aus dem Alkalischen wurde durch die 30-minütige Inkubation mit 10% FBS signifikant verlängert (Abb. 17). Eine 24-stündige Inkubation mit 10% FBS führte ebenso zu einer signifikanten Verlängerung der Erholung aus dem Alkalischen.

3.2.1.2 Moxonidin und HOE694

Vergleichend wurde die Inkubation mit 1 μ M Moxonidin untersucht. Die Versuche wurden unter Hemmung des NHE mit 10 μ M HOE694 in der Superfusionslösung

3. Ergebnisse

durchgeführt. Bei der Erholung aus dem Sauern zeigte sich nach einer Minute eine signifikante Hemmung durch Moxonidin unter Bedingungen mit 10% FBS, nach drei Minuten waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten (Abb. 18). Bei der Alkalibeladung zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit 1 μM Moxonidin bei Anwesenheit des Minimalmediums (0,4% FBS) zu einer signifikanten Verlangsamung der Erholung aus dem Alkalischen führte. Bei Anwesenheit von 10% FBS hatte Moxonidin jedoch keinen signifikanten Effekt (Abb. 19). Zur genaueren Klärung der unterschiedlichen Wirkung von Moxonidin im Sauern (Hemmung nur bei 10% FBS) und im Alkalischen (Hemmung nur bei 0,4% FBS) wurden weiterführend Experimente mit Ammoniumchloridpulsen (vgl. Kapitel 3.2.3) durchgeführt.

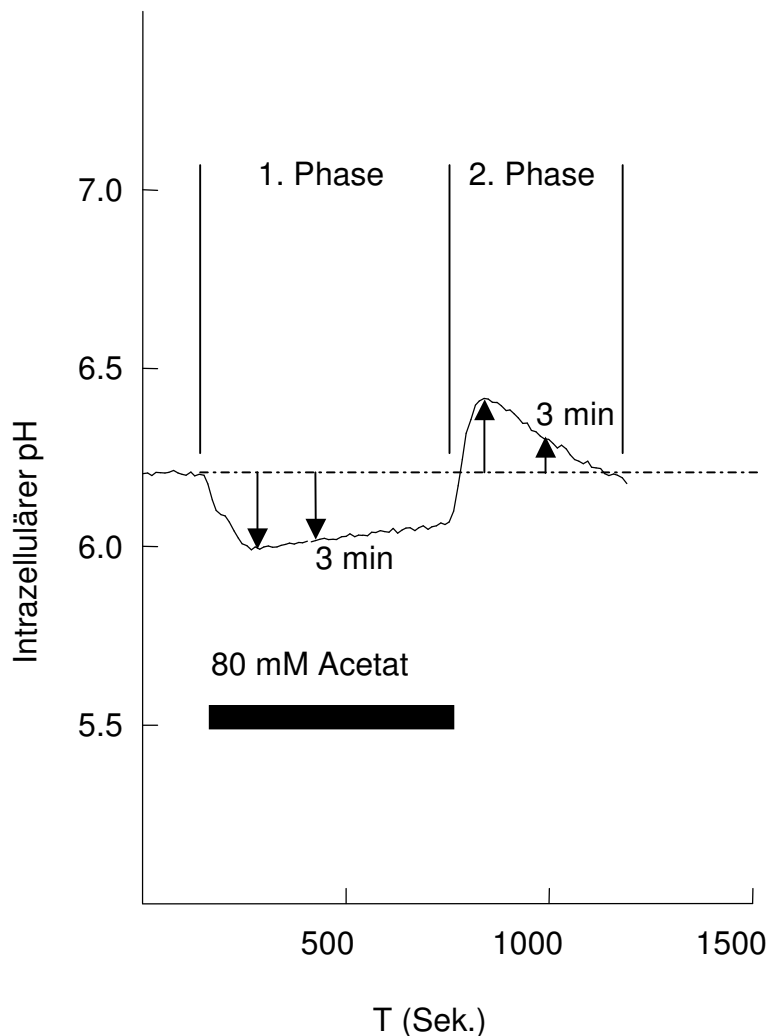


Abb. 14

Repräsentative Aufnahme eines Acetatpulses mit 80 mM Acetat bei kardialen Fibroblasten unter Anwesenheit von 10% FBS und 10 μM HOE694.

3. Ergebnisse

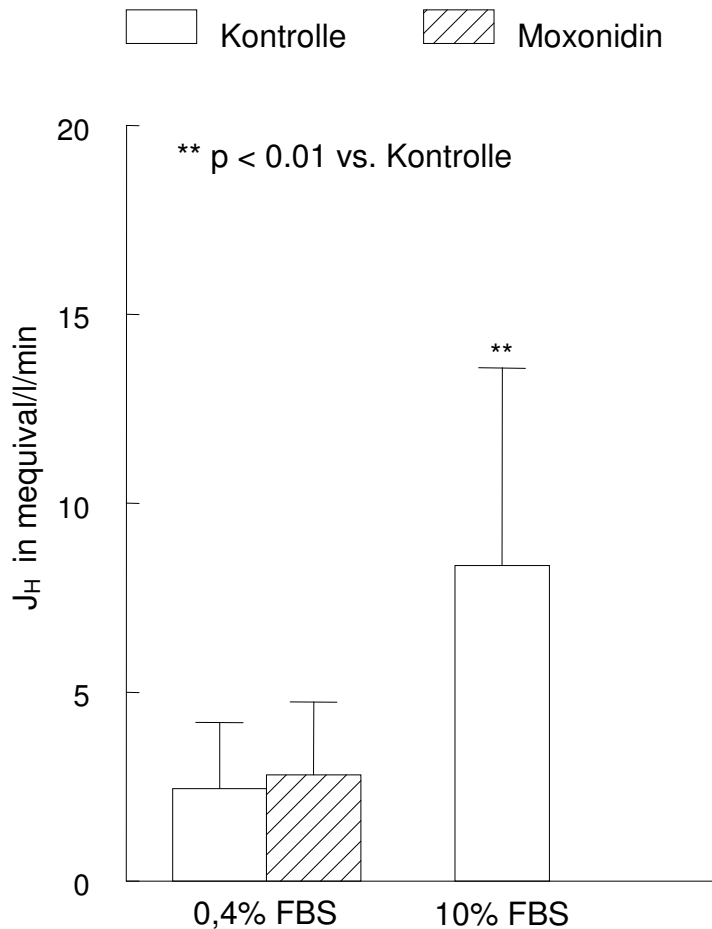


Abb. 15

Veränderung des sog. „Acid Efflux“ J_H (in mequiv//min) bei kardialen Fibroblasten in der ersten Phase eines Acetatpulses. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Die Inkubation erfolgte am Tag der Messung über 30 Minuten mit 0,4% FBS ohne und mit Moxonidin bzw. mit 10% FBS (Säulen von links nach rechts). Die Superfusion während der Messung erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils 7 Versuchen. Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

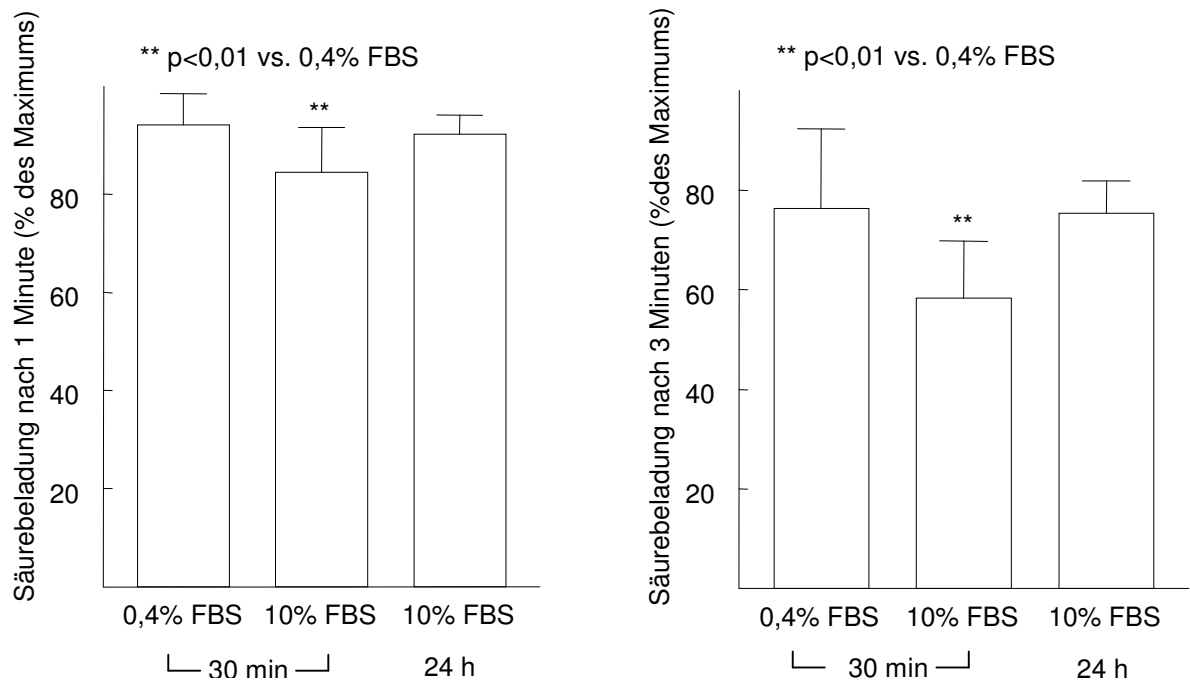


Abb. 16

Veränderung der Säurebelastung kardialer Fibroblasten in der ersten Phase des Acetatpulses. Die Säurebelastung wurde nach einer und drei Minuten in Prozent der maximalen Ansäuerung angegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Die Inkubation erfolgte entweder über 30 Minuten mit 0,4% bzw. 10% FBS oder über 24 Stunden mit 10% FBS. Die Superfusion während der Messung erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 bis 11 Versuchen ($n=11, 8, 8$; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

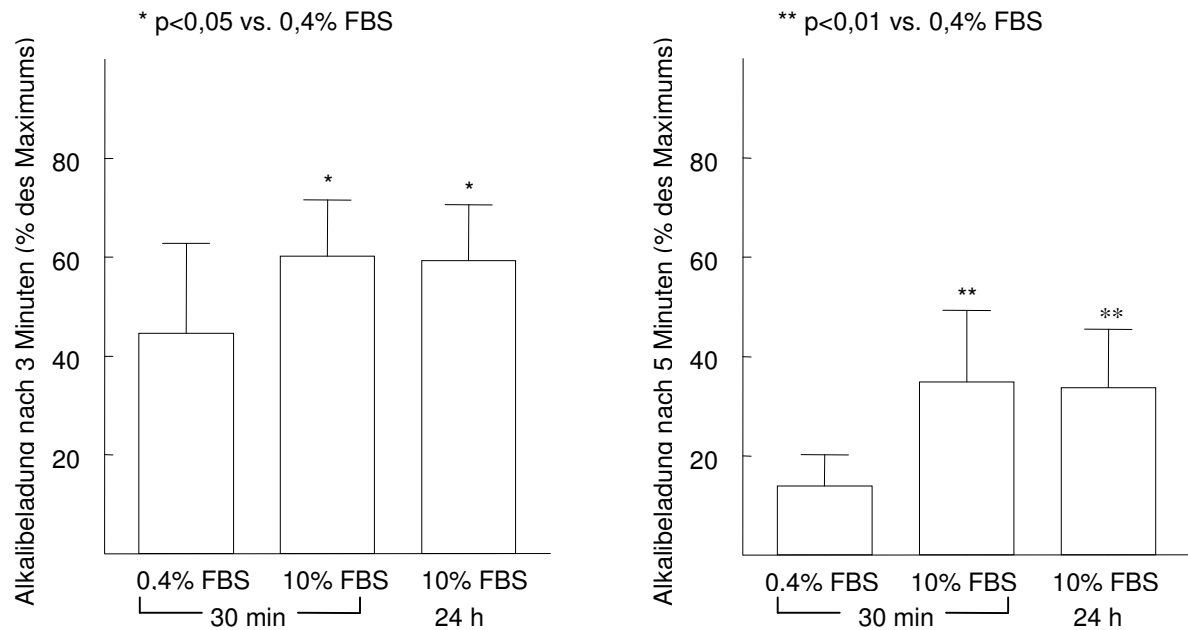


Abb. 17

Veränderung der Alkalibeladung kardialer Fibroblasten in der zweiten Phase des Acetatpulses. Die Alkalibeladung wurde nach drei und fünf Minuten in Prozent der maximalen Alkalinisierung angegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Die Inkubation erfolgte entweder über 30 Minuten mit 0,4% bzw. 10% FBS oder über 24 Stunden mit 10% FBS. Die Superfusion während der Messung erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 Versuchen. Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

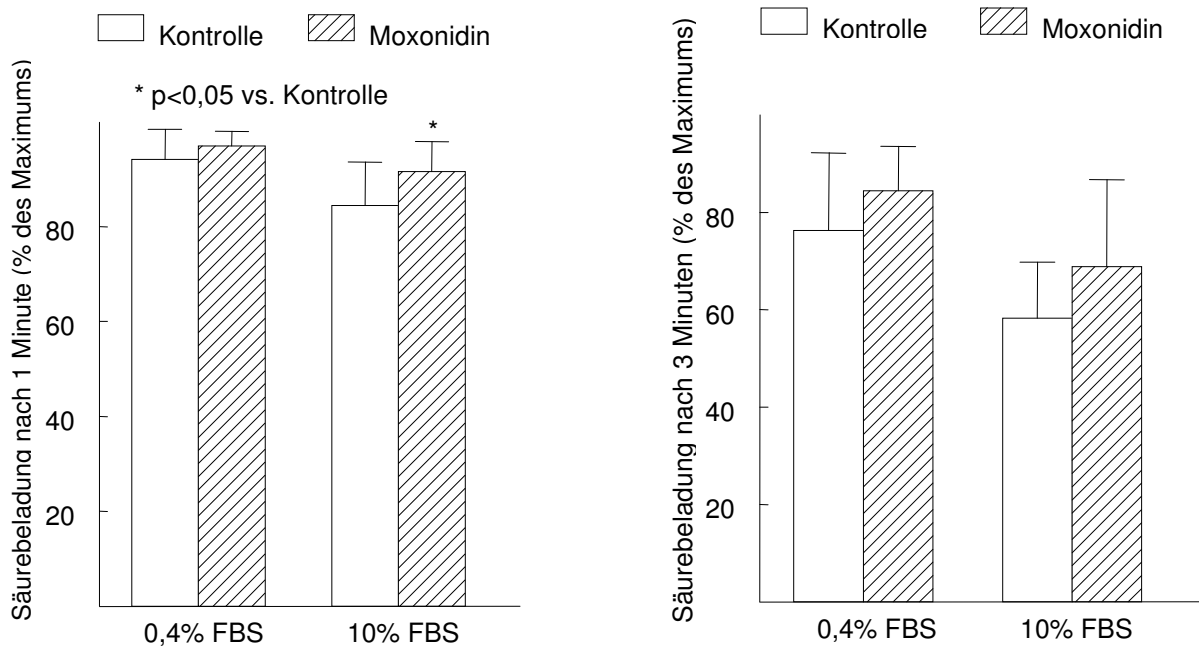


Abb. 18

Einfluss von Moxonidin auf die Erholung kardialer Fibroblasten aus dem Säuren während eines 80 mM Acetatpulses. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Die Inkubation erfolgte am Tag der Messung über 30 Minuten mit 0,4% bzw. 10% FBS, jeweils ohne und mit 1 μ M Moxonidin. Die Superfusion während der Messung erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS in Abwesenheit von Moxonidin in der Superfusionslösung. Die Säurebelastung wurde nach einer und drei Minuten in Prozent der maximalen Ansäuerung angegeben.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 7 bis 11 Versuchen (n= 11, 11, 8, 7; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan’s New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

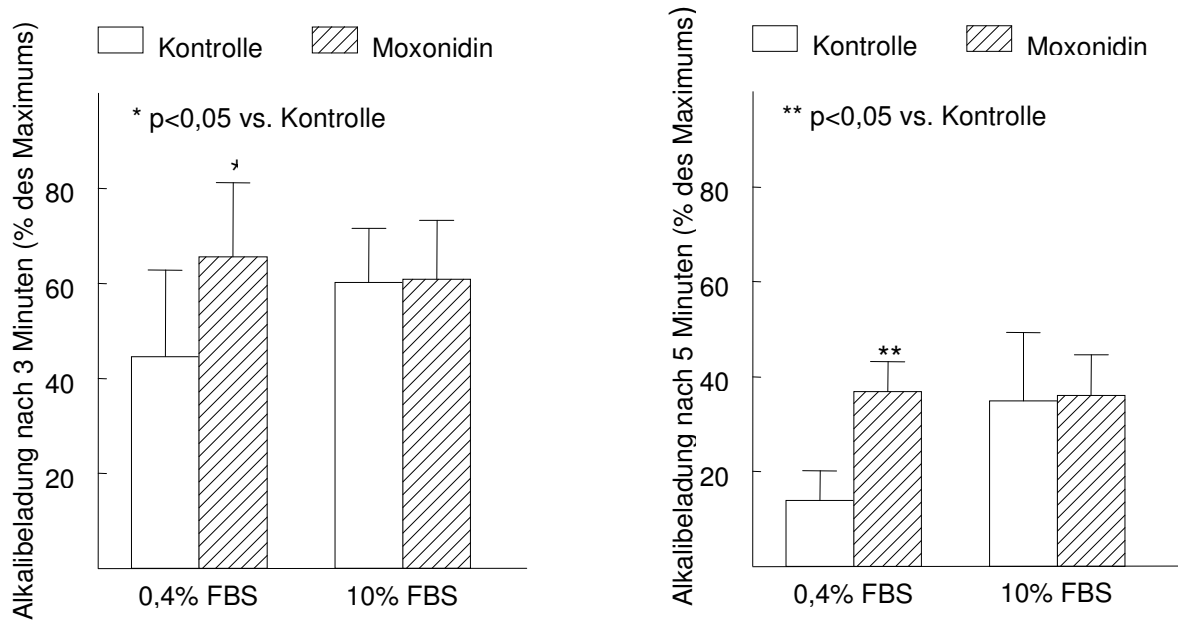


Abb. 19

Einfluss von Moxonidin auf die Erholung kardialer Fibroblasten aus der Alkalinisierung im Anschluss an einen 80 mM Acetatpuls. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Die Inkubation erfolgte am Tag der Messung über 30 Minuten mit 0,4% bzw. 10% FBS jeweils ohne und mit 1 μ M Moxonidin. Die Superfusion während der Messung erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS in Abwesenheit von Moxonidin in der Superfusionslösung. Die Alkalibeladung wurde nach drei und fünf Minuten in Prozent der maximalen Alkalinisierung angegeben.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 7 bis 8 Versuchen (n= 7, 8, 8, 7; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan’s New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

3.2.2 Doppelpulse

Zur Überprüfung, ob die gleichen Zellen auf einem Deckglas für mehrere aufeinanderfolgende Acetatpulse verwendet werden können, wurden zunächst zwei Acetatpulse nacheinander durchgeführt (Abb. 20). Mit diesem Ansatz konnte geprüft werden, ob schon nach einer 10-minütigen Einwirkung von FBS Veränderungen in der pH Regulation auftreten. Aufgrund der relativ langen Dauer der Acetatpulse und der entsprechend langen Belichtungszeiten mit den Folgen einer Ausbleichung mussten für den zweiten Puls bisher unbelichtete Zellen auf dem Deckgläschen eingestellt werden.

Die kardialen Fibroblasten wurden wie bei den vorherigen Versuchen 24 Stunden vor Beginn der Messungen mit einem Minimalmedium von 0,4% FBS kultiviert. Auch während der Inkubation mit BCECF wurde Minimalmedium verwendet. Nach einem ersten Acetatpuls, der ebenfalls unter Bedingungen eines Minimalmediums durchgeführt wurde, erfolgte anschließend ein zweiter Acetatpuls nach vorherigem 10-minütigem Einwirken von 10% FBS. Beim Vergleich der beiden Pulse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Erholung aus dem Sauren oder Alkalischen (Ergebnisse nicht dargestellt).

In weiteren Versuchen wurde die Folge der 40-minütigen Einwirkung von 10% FBS in Doppelpulsen untersucht. Nach einem ersten Acetatpuls unter Bedingungen mit 0,4% FBS wurde nach 40-minütiger Superfusion mit 10% FBS ein zweiter Acetatpuls durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Erholung aus dem Sauren (Abb. 21, links). Die Erholung aus dem Alkalischen wurde jedoch durch die 40-minütige Einwirkung von 10% FBS signifikant gehemmt (Abb. 21, rechts).

3. Ergebnisse

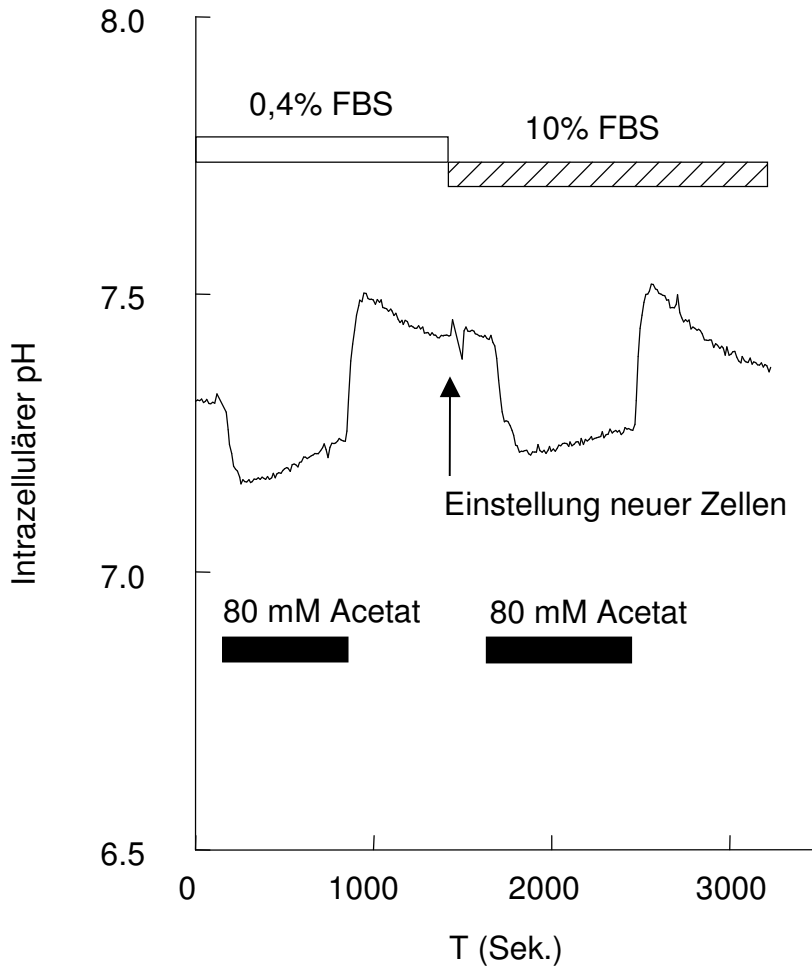


Abb. 20

Repräsentative Aufnahme eines sog. Doppelpulses mit 80 mM Acetat bei kardialen Fibroblasten: In dem ersten Puls erfolgte die Superfusion mit 0,4% FBS, anschließend wurden neue Zellen auf dem Deckglas eingestellt (Pfeil) und die Zellen mit 10% FBS superfundiert. Nach 10-minütiger Superfusion mit 10% FBS erfolgte ein weiterer Acetatpuls mit 80 mM Acetat.

3. Ergebnisse

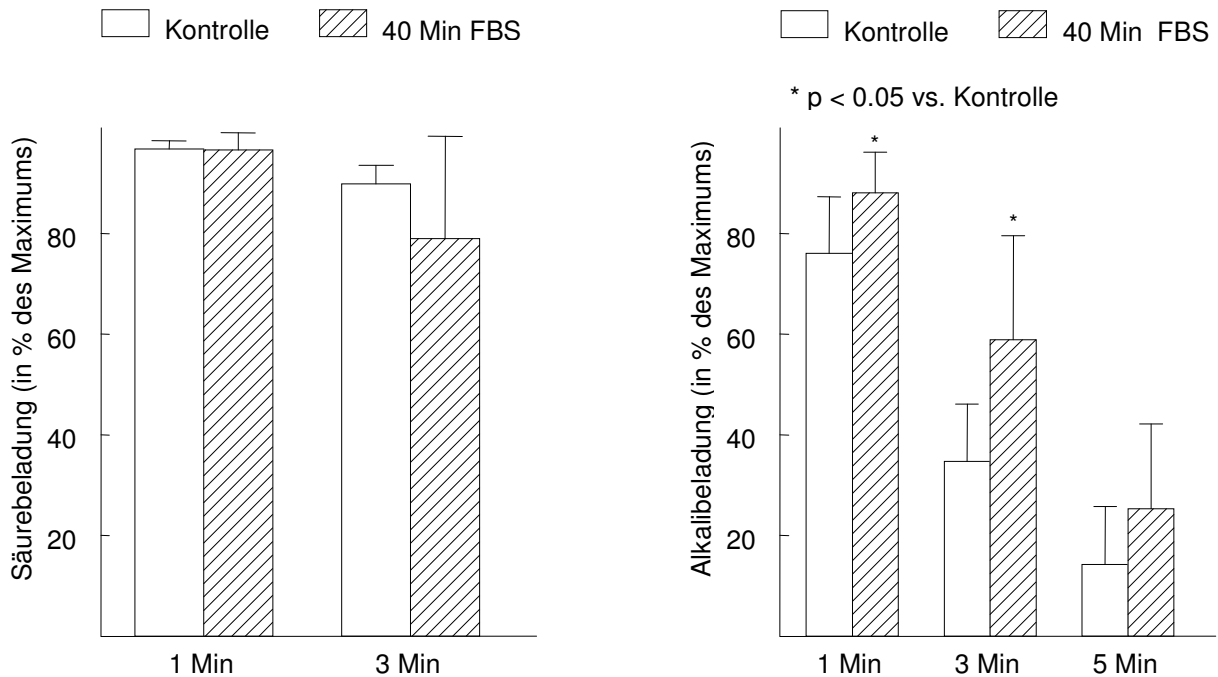


Abb. 21

Doppelpulse bei kardialen Fibroblasten: Zwei Acetatpulse wurden nacheinander durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 24 Stunden vor der Messung mit 0,4% FBS in DMEM. Auch während der Inkubation mit BCECF war ein Minimalmedium anwesend.

Zunächst wurden die Zellen mit 0,4% FBS superfundiert und ein Puls mit 80 mM Acetat durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Superfusion mit 10% FBS, woran sich ein zweiter Acetatpuls anschloss. Aufgrund der starken Belichtung der eingestellten Zellen mussten für den neuen Puls bisher unbelichtete Zellen eingestellt werden.

Erholung aus dem Sauren (linke Abbildung): *Im Vergleich zwischen dem ersten und zweiten Acetatpuls ergab sich kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Erholung aus dem Sauren. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 7 Messungen.*

Erholung aus dem Alkalischen (rechte Abbildung): *Bei der Erholung aus dem Alkalischen ergab sich nach einer und drei Minuten eine signifikante Verlangsamung der Erholung aus dem Alkalischen durch die 40-minütige Superfusion mit 10% FBS. Messungen sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 bis 8 Messungen (n= 8, 7, 8, 7, 8, 4; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit dem ungepaarten t-Test („Statistica“) überprüft.*

3. Ergebnisse

3.2.3 Ammoniumchloridpulse

Im Verlauf der Ammoniumchloridpulse erfolgen die Phasen der pH-Veränderungen in genau entgegengesetzter Richtung zu den Acetatpulsen (siehe Abb. 22 und vgl. damit den Acetatpuls in Abb. 14). Zuerst erfolgte eine Alkalinisierung, im Anschluss an den Entzug der Ammoniumchloridlösung eine Ansäuerung. Ein weiterer Unterschied bei diesen Versuchen war, dass die Kultivierung der Zellen nicht in FBS erfolgte, sondern in Quantum 333, einem Spezialmedium für Fibroblasten. Die 30-minütige Inkubation erfolgte mit bzw. ohne 1 μM Moxonidin, die Superfusion ohne FBS und HOE694. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Erholung aus dem Alkalischen durch 1 μM Moxonidin signifikant gehemmt wurde (Abb. 23, links). Die Erholung aus dem Sauren wurde durch Moxonidin nicht signifikant beeinflusst (Abb. 23, rechts).

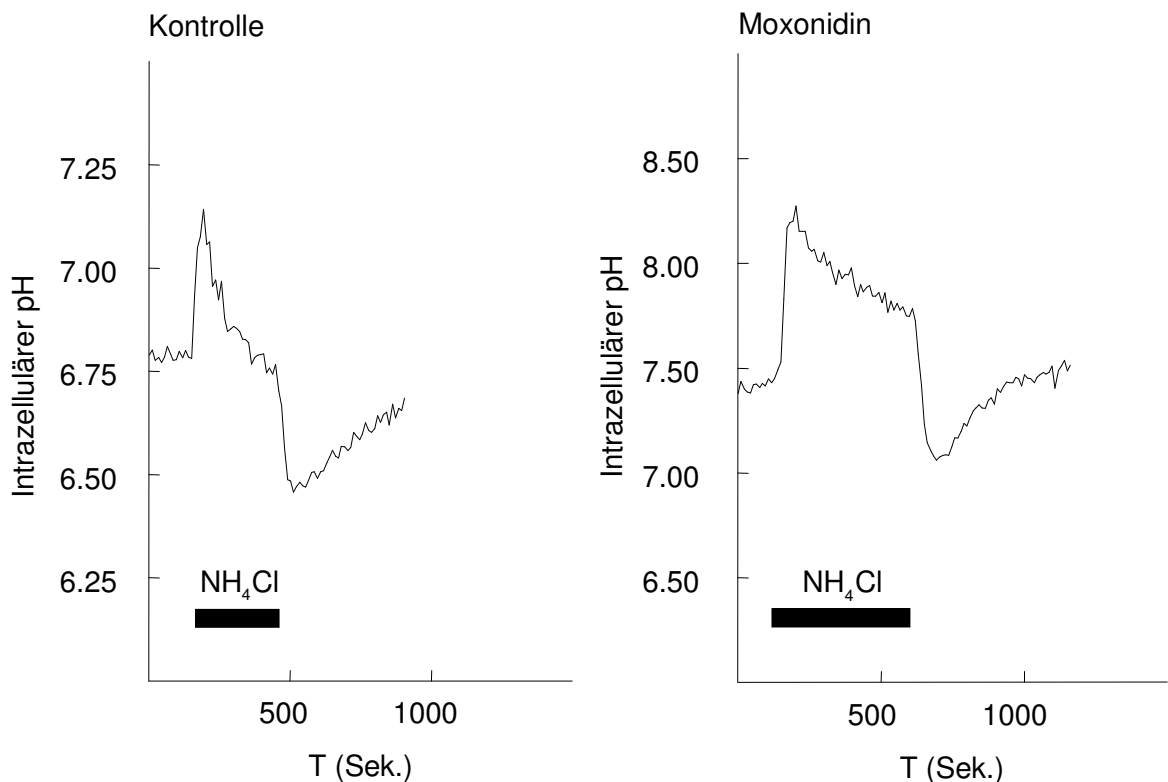


Abb. 22

Ammoniumchloridpulse bei kardialen Fibroblasten: Repräsentative Messungen der Erholung aus dem Alkalischen bzw. dem Sauren nach Superfusion einer 80 mM Ammoniumchloridlösung. Die Zellen wurden vor Beginn der Messung in Quantum 333 Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte ohne FBS mit bzw. ohne 1 μM Moxonidin. Die Superfusion erfolgte in Abwesenheit von FBS, HOE694 und Moxonidin (in Vorversuchen wurde gezeigt, dass Moxonidin eine langanhaltende Wirkung hat und es daher der Superfusionslösung nicht beigefügt werden musste).

3. Ergebnisse

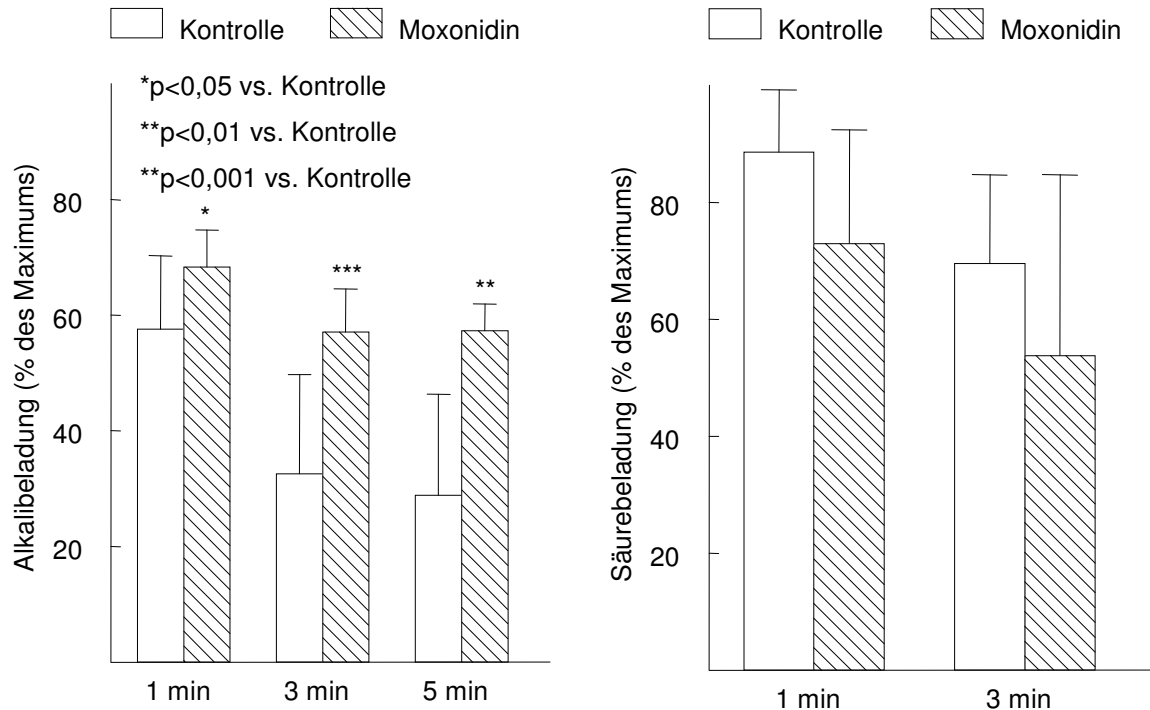


Abb. 23

Einfluss von Moxonidin auf die Erholung aus dem Alkalischen und Säuren nach einem Ammoniumchloridpuls. Die Zellen wurden vor der Messung in Quantum 333 Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte ohne FBS mit bzw. ohne 1 μ M Moxonidin. Während der Superfusion waren weder FBS noch Moxonidin oder HOE694 anwesend.

Alkalibeladung (linke Abbildung): *Veränderung der Alkalibeladung kardialer Fibroblasten während des Ammoniumchloridpulses. Die Alkalibeladung wurde nach einer, drei und fünf Minuten in Prozent der maximalen Alkalinisierung angegeben. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 bis 11 Versuchen ($n= 11, 9, 11, 9, 7, 7$; Säulen von links nach rechts). Aufgrund der Ungleichheit der Varianzen nach Brown-Forsythe („Statistica“) wurden die statistischen Signifikanzen mit dem ungepaarten t -Test mit der Welch-Korrektur für ungleiche Varianzen („Graph Pad InStat“) bestimmt.*

Säurebeladung (rechte Abbildung): *Veränderung der Säurebeladung kardialer Fibroblasten in Prozent der maximalen Ansäuerung nach einer und nach drei Minuten. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 bis 10 Versuchen ($n= 10, 6, 10, 6$; Säulen von links nach rechts). Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.*

3. Ergebnisse

3.3 Aktivität pH-regulierender Austauscher bei HeLa Zellen

Die Acetatpulse bei HeLa Zellen wurden analog den Acetatspulsen bei kardialen Fibroblasten durchgeführt (siehe hierzu Abb. 24 und vgl. damit den Acetatspuls bei kardialen Fibroblasten in Abb. 14). Es zeigte sich, dass sich HeLa Zellen im Vergleich zu kardialen Fibroblasten sehr schnell aus dem Alkalischen erholen.

Die Zellen wurden ebenfalls 24 Stunden vor Beginn der Messungen in einem Minimalmedium mit 0,4% FBS kultiviert. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,4% FBS, 10% FBS sowie mit 10% FBS und 1 μM Moxonidin. Bei der Durchführung der Acetatpulse mit 80 mM Acetat zeigte sich, dass durch die Vorbehandlung mit 10% FBS die Erholung aus dem Säuren signifikant beschleunigt wurde (Abb. 25). Die Behandlung mit 1 μM Moxonidin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Erholung aus dem Säuren. Bei der Erholung aus dem Alkalischen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abb. 26).

In einem zweiten Versuch wurde der längerdauernde Einfluss von Moxonidin und HOE694 auf HeLa Zellen untersucht. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden hinweg in einem Medium mit 5% FBS und 10 μM HOE694 kultiviert, jeweils mit und ohne 1 μM Moxonidin. Die Inkubation sowie die Superfusion der Zellen während der Acetatpulse erfolgte mit den jeweiligen Zusätzen. Innerhalb der Gruppen zeigte sich keine Abhängigkeit der Erholung aus dem Säuren von der Dauer der Behandlung mit den entsprechenden Substanzen (Abb. 27). Im Gegensatz zu den Versuchen mit kardialen Fibroblasten bewirkte Moxonidin bei HeLa Zellen nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden eine signifikante Beschleunigung der Erholung aus dem Säuren. Bei der Erholung aus der Alkalibeladung zeigte sich weder eine Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung noch ein Effekt der Behandlung mit 1 μM Moxonidin (Abb. 28).

3. Ergebnisse

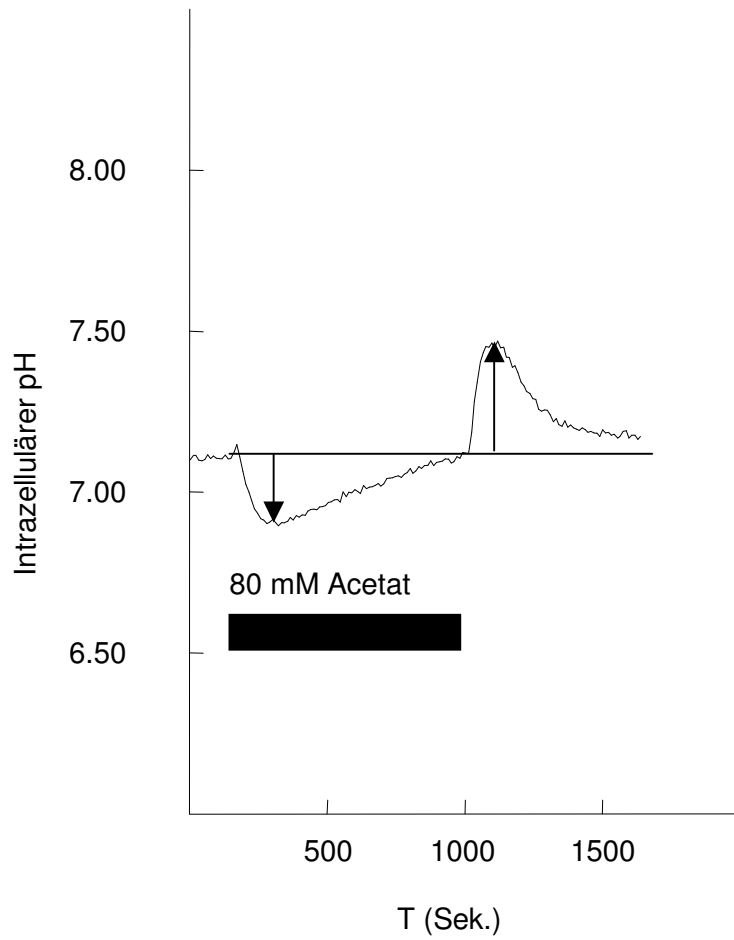


Abb. 24

Acetatpuls bei HeLa Zellen: Repräsentative Messungen der Erholung aus dem Sauren bzw. dem Alkalischen nach Applikation eines 80 mM Acetatpulses.

3. Ergebnisse

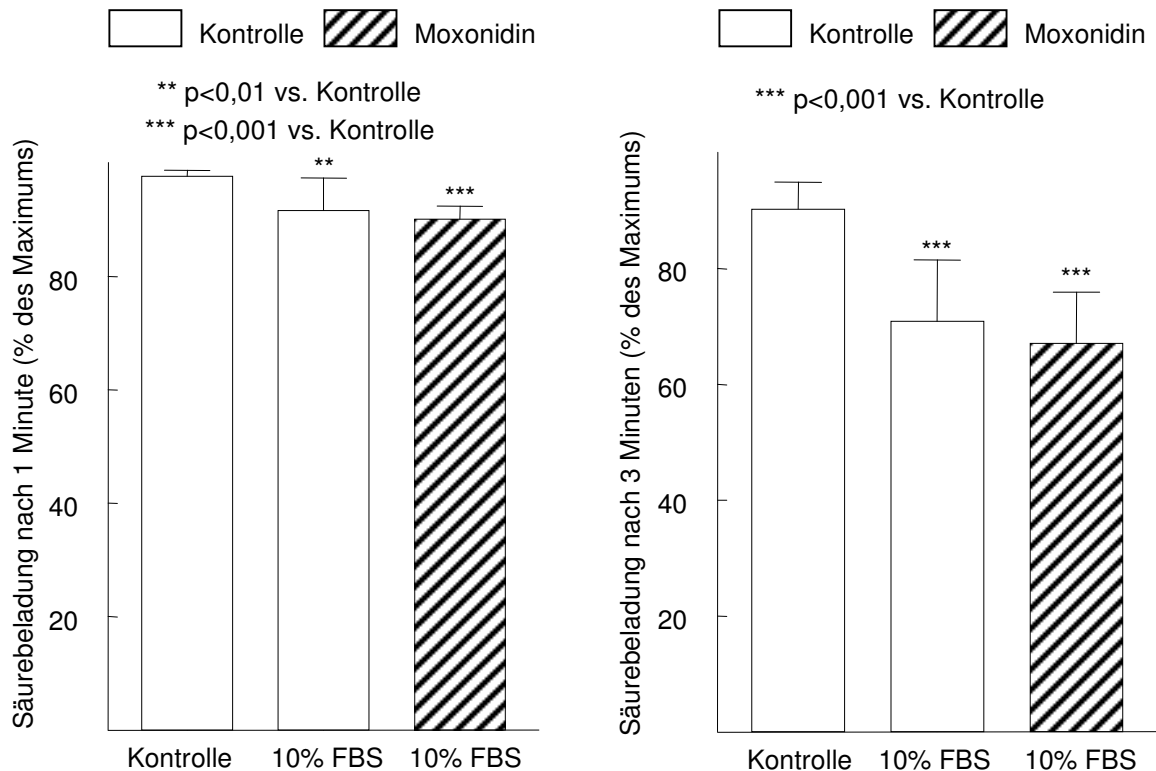


Abb. 25

Acetatpulse bei HeLa Zellen: Erholung aus der Säurebelastung nach einer und drei Minuten nach Erreichen des pH-Minimums.

Die HeLa Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Messungen in einem Minimalmedium von 0,4% FBS kultiviert. Die 30-minütige Inkubation erfolgte in der ersten Gruppe mit 0,4% FBS, in der zweiten Gruppe mit 10% FBS und in der dritten Gruppe mit 10% FBS und 1 μ M Moxonidin (Säulen von links nach rechts). Die Superfusion erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS.

Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 7 Versuchen. Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

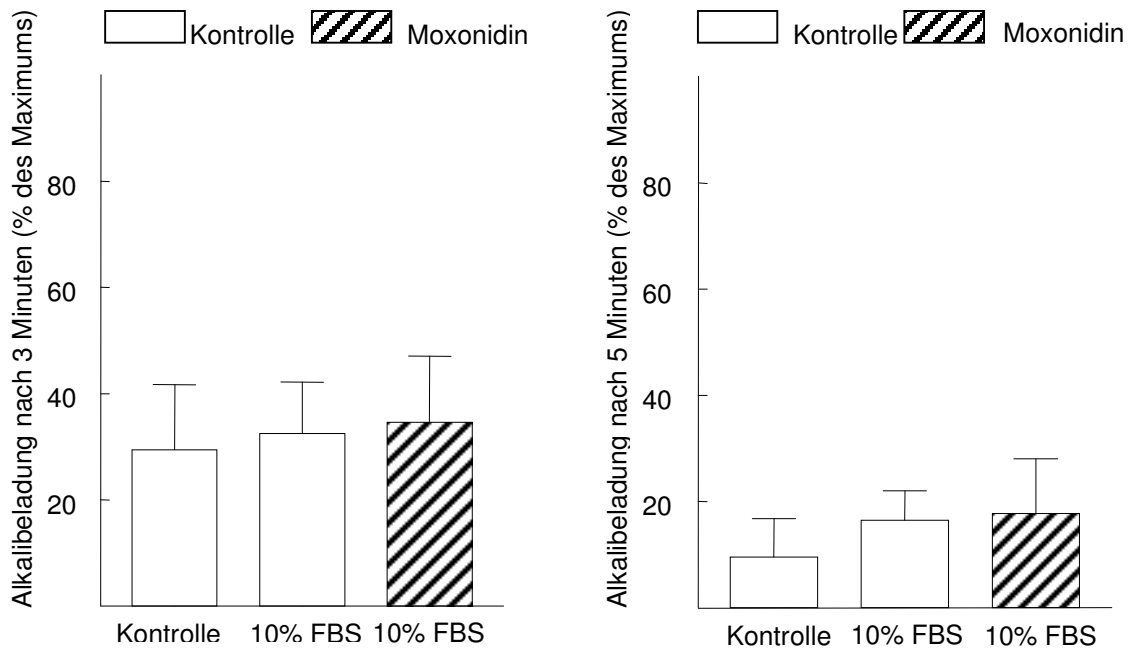


Abb. 26

Acetatpulse bei HeLa Zellen: Erholung aus der Alkalinisierung nach drei und fünf Minuten nach Erreichen des pH-Maximums.

Die HeLa Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Messungen in einem Minimalmedium von 0,4% FBS kultiviert. Die 30-minütige Inkubation erfolgte in der ersten Gruppe mit 0,4% FBS, in der zweiten Gruppe mit 10% FBS und in der dritten Gruppe mit 10% FBS und 1 μ M Moxonidin (Säulen von links nach rechts). Die Superfusion erfolgte je nach Gruppe mit 0,4% bzw. 10% FBS. Gleichheit der Varianzen wurde mithilfe der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“) überprüft, mit Duncan's New Multiple Range-Test („Statistica“) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

3. Ergebnisse

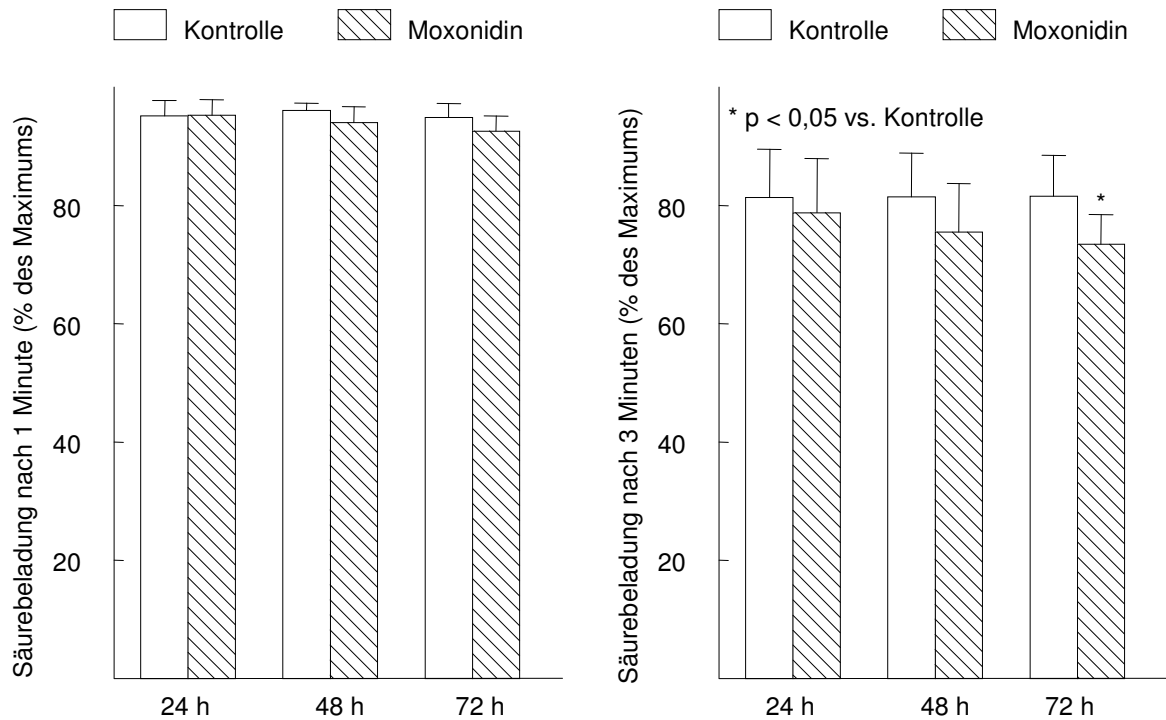


Abb. 27

Acetatpulse bei HeLa Zellen: Erholung aus der Ansäuerung nach einer und drei Minuten nach Erreichen des pH-Minimums.

Die HeLa Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit 5 % FBS und 10 μ M HOE694 bzw. mit 5% FBS und 10 μ M HOE694 und 1 μ M Moxonidin behandelt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in den jeweiligen Medien.

Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“), die statistischen Signifikanzen mit Duncan’s New Multiple Range-Test („Statistica“) überprüft.

3. Ergebnisse

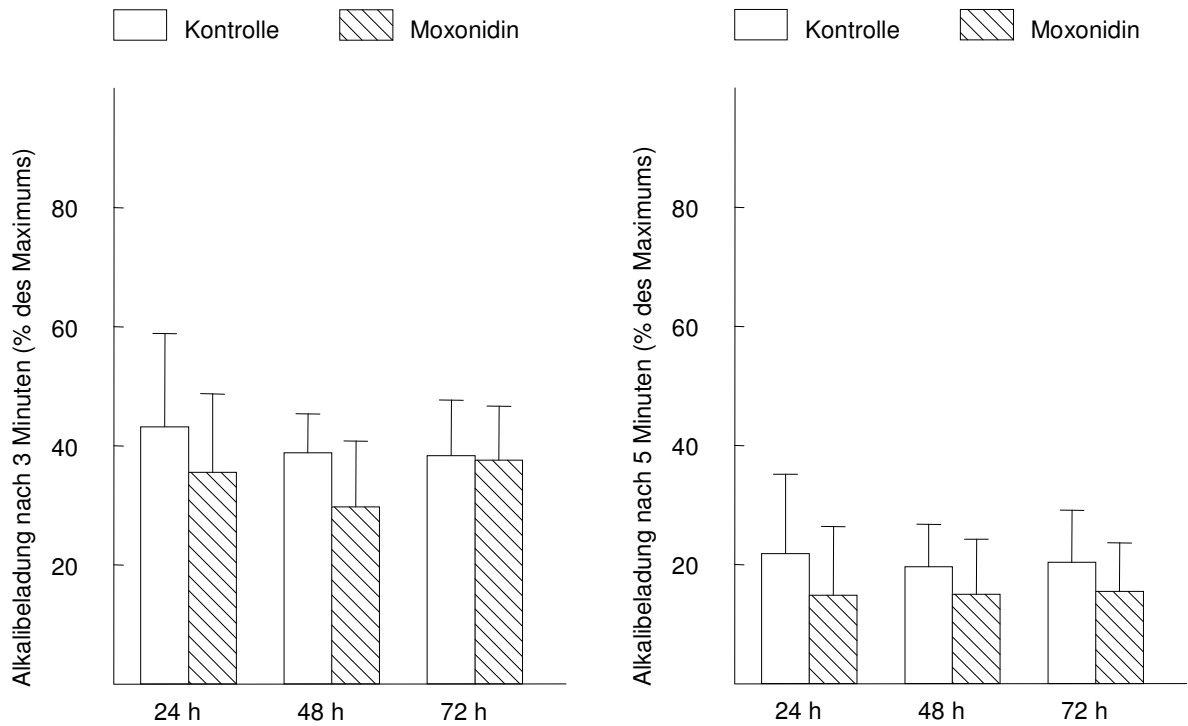


Abb. 28

Acetatpulse bei HeLa Zellen: Erholung aus der Alkalinisierung nach drei und fünf Minuten nach Erreichen des pH-Maximums.

Die HeLa Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit 5 % FBS und 10 μ M HOE694 bzw. mit 5% FBS und 10 μ M HOE694 und 1 μ M Moxonidin behandelt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in dem jeweiligen Medium.

Gleichheit der Varianzen wurde mit der Varianzanalyse nach Brown-Forsythe („Statistica“) überprüft, mit dem t-Test („Statistica“) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.4 Proliferation der kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen im Proliferationsassay WST-1

Mit Hilfe des WST-1-Proliferationsassays wurde die Proliferation von kardialen Fibroblasten im Verlauf von sieben Tagen und von HeLa Zellen im Verlauf von vier Tagen beobachtet. Dabei wurden die kardialen Fibroblasten in einem Medium mit 10% FBS, die HeLa Zellen mit 5% FBS kultiviert. Die HeLa Zellen erreichten bereits nach vier Tagen ein hohes Absorptionsniveau, das die kardialen Fibroblasten auch nach einer Dauer von sieben Tagen nicht erreichten (Abb. 29).

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des extrazellulären pH sowie der Einfluss von Moxonidin und HOE694 auf die Proliferation bei HeLa Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen durch die Einstellung eines pH von nur 6,8 im Medium eine Hemmung des Zellwachstums bewirkte. Die Anwesenheit von 10 μM HOE694 und 1 μM Moxonidin in Kombination konnte die Proliferation ebenfalls signifikant hemmen, jedoch nicht in demselben Ausmaß wie es die Absenkung des extrazellulären pH auf 6,8 bewirkte. Die alleinige Applikation von 10 μM HOE694 oder 1 μM Moxonidin hatte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation (Abb. 30).

3. Ergebnisse

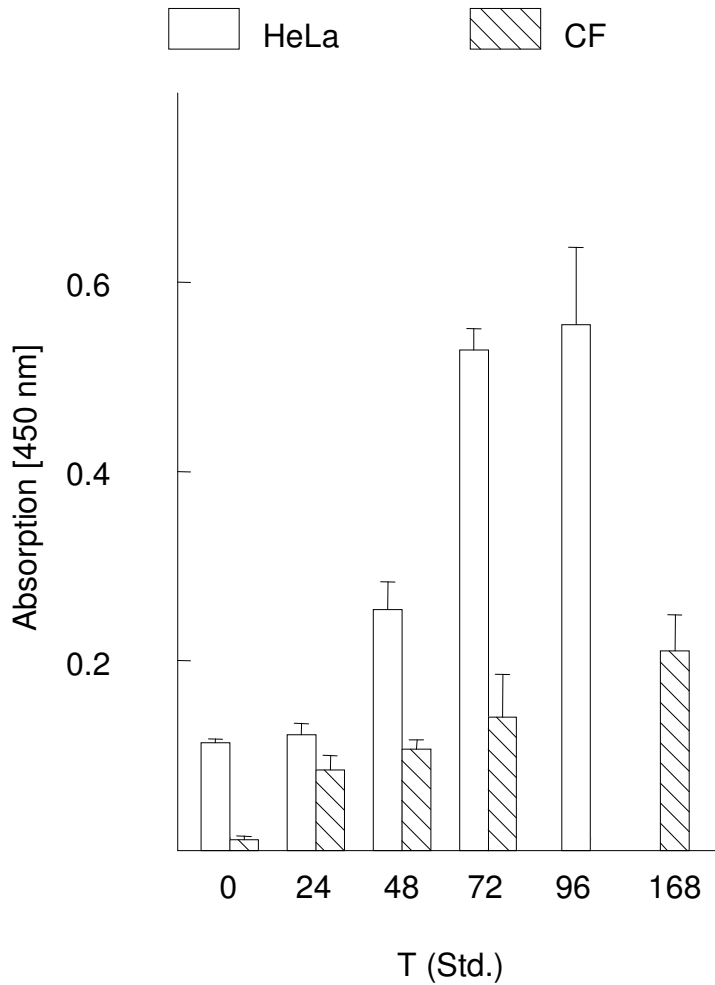


Abb. 29

Proliferation kardialer Fibroblasten und HeLa Zellen im WST-1-Proliferationsassay. Kultur der kardialen Fibroblasten über sieben Tage, der HeLa Zellen über vier Tage. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert und Standardabweichung von jeweils vier Messungen.

3. Ergebnisse

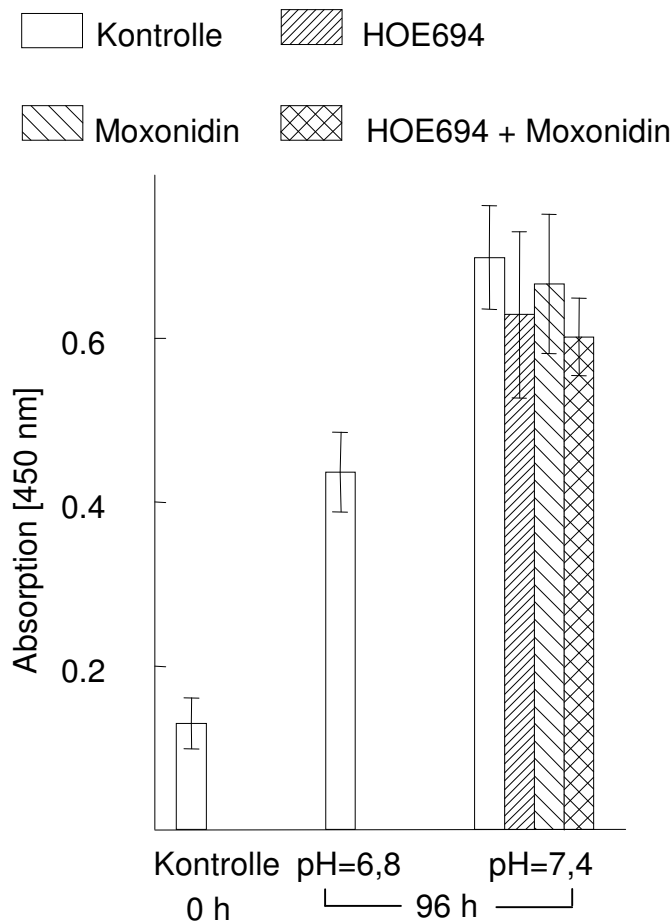


Abb. 30

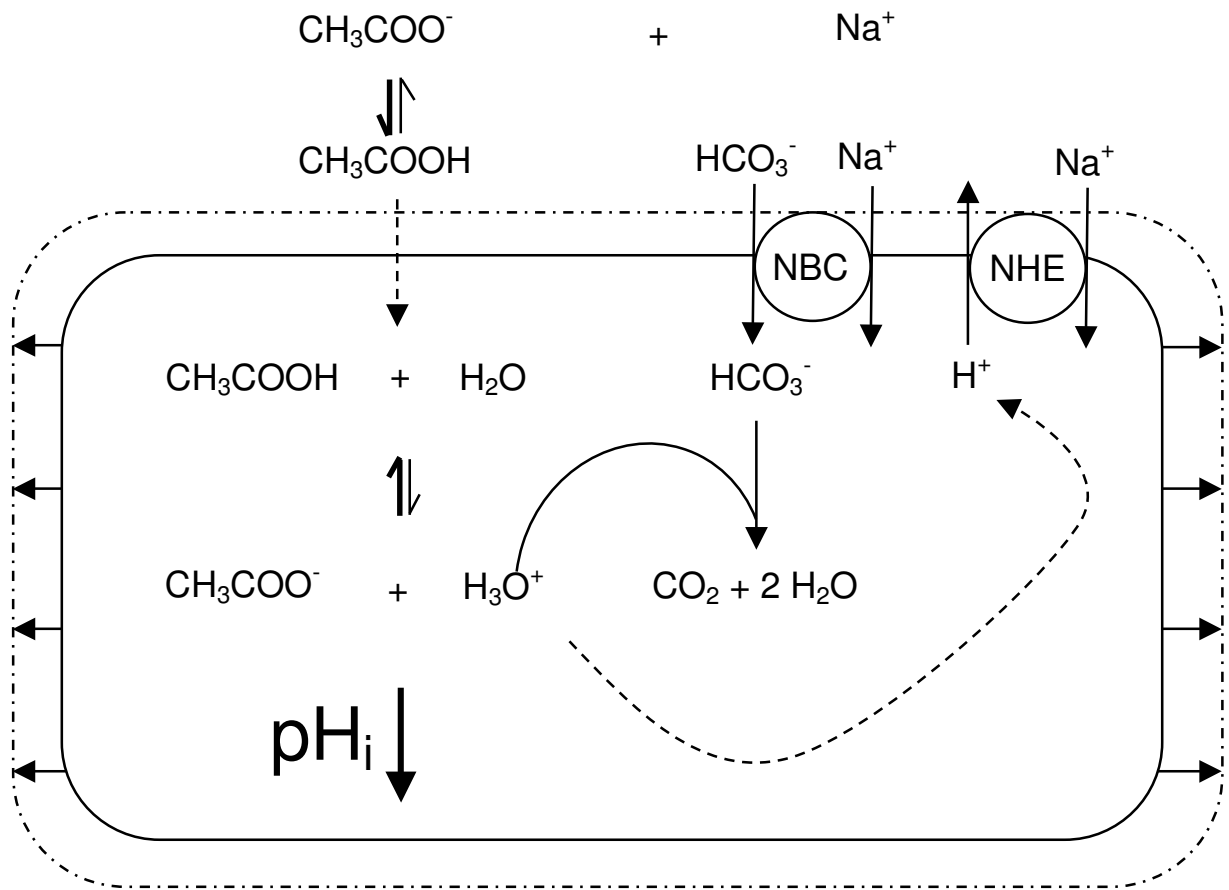
Proliferation von HeLa Zellen im WST-1-Proliferationsassay. Kultur der Zellen in Medium mit 5 % FBS und 25 mM HEPES-Puffer. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach Messung der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt „Null“ entweder ohne Zugabe, mit HOE694, mit Moxonidin oder mit der Kombination aus HOE694 und Moxonidin, bei denen ein pH von 7,4 eingestellt wurde. Im Vergleich dazu wurde bei einer weiteren Gruppe ein pH von 6,8 eingestellt. Die Absorptionmessung erfolgte nach 96 Stunden. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert und Standardabweichungen von jeweils 4 Messungen. Die Abbildung stellt einen repräsentativen Versuch dar. In einer Analyse von vier unabhängigen Versuchen (n= 48, 49, 50, 43; Säulen bei pH=7,4 von links nach rechts) mit dem gepaarten T-Test („Graph Pad InStat“) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Kombination HOE694 und Moxonidin ($p < 0,01$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Einzelsubstanzen.

4. Diskussion

4.1 Methoden zur Untersuchung der pH-Regulation

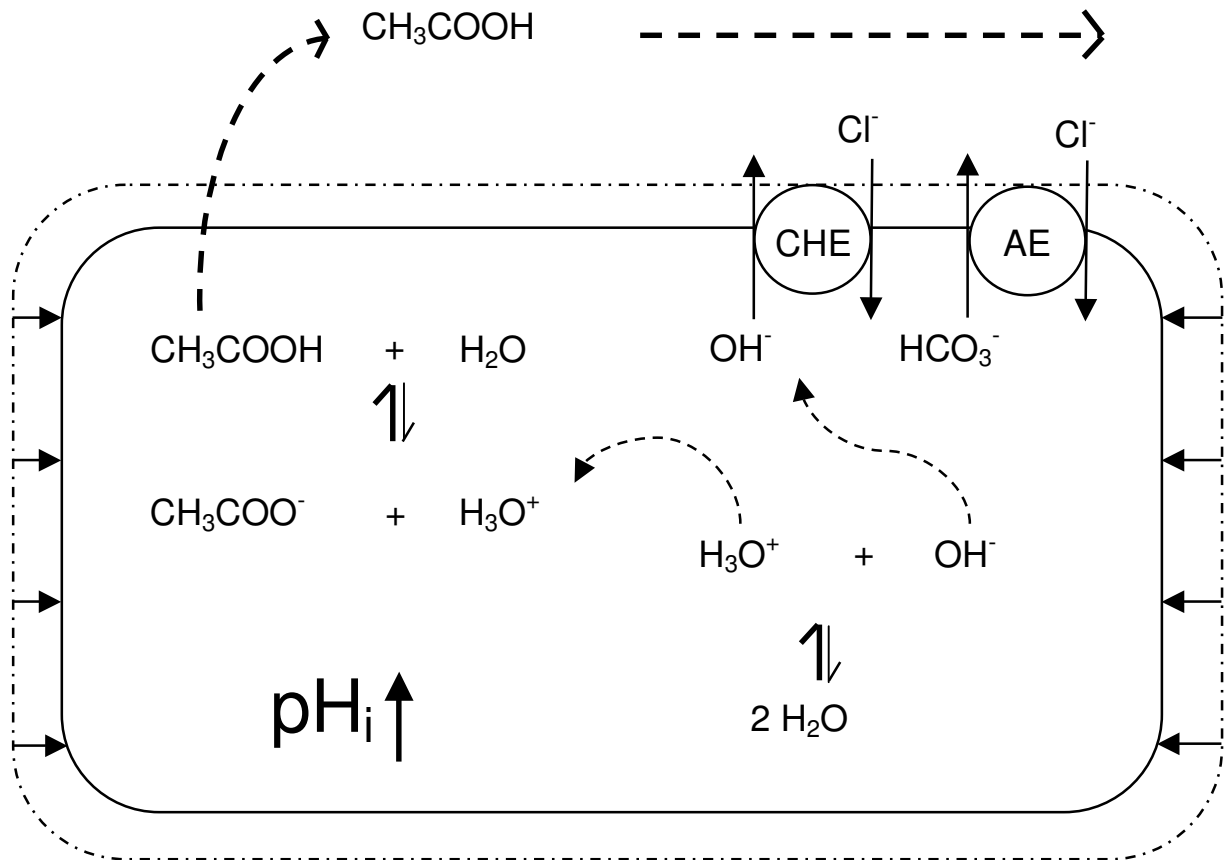
Zur Untersuchung der pH-Regulation von Zellen stehen zwei etablierte Methoden zur Verfügung: die Acetatpuls- und die Ammoniumchloridpuls-Technik.

Natriumacetat ist die konjugierte Base der Essigsäure, reagiert somit basisch. Im nicht-ionisierten Zustand kann das Molekül als CH_3COOH durch Zellmembranen diffundieren (siehe Abb. 31). Intrazellulär reagiert es mit H_2O zu Acetat und einem Proton; beide Moleküle können wiederum aufgrund ihrer Ladungen nicht durch Zellmembranen diffundieren, so dass ihre Konzentrationen intrazellulär ansteigen, solange ein Gradient zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Konzentration von Acetat besteht. Dadurch kommt es in der ersten Phase des Acetatpulses zu einer raschen intrazellulären Ansäuerung (22), auf die der NBC und der NHE reagieren. Der NHE wurde in unseren Versuchen durch den Hemmstoff HOE694 gehemmt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei dem NBC um ein Mitglied der vor wenigen Jahren charakterisierten Familie von Bikarbonat-Transportern (42). In kardialen Zellen ist insbesondere der NBC1, der nach der neuen Nomenklatur auch als SLC4A4 bezeichnet wird, exprimiert. Derselbe Kanal findet sich auch in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus in der Niere. Durch den Transport von Bikarbonat-Anionen nach intrazellulär erfolgt eine Erholung aus dem Säuren, da das Bikarbonat mit H_3O^+ zu $2 \text{H}_2\text{O}$ und CO_2 reagiert. Zum Ausgleich der intra- und extrazellulären Osmolalitäten diffundiert H_2O nach intrazellulär mit dem Resultat der Zellschwellung (in Abb. 31 angedeutet durch die Pfeile nach außen).

**Abb. 31**

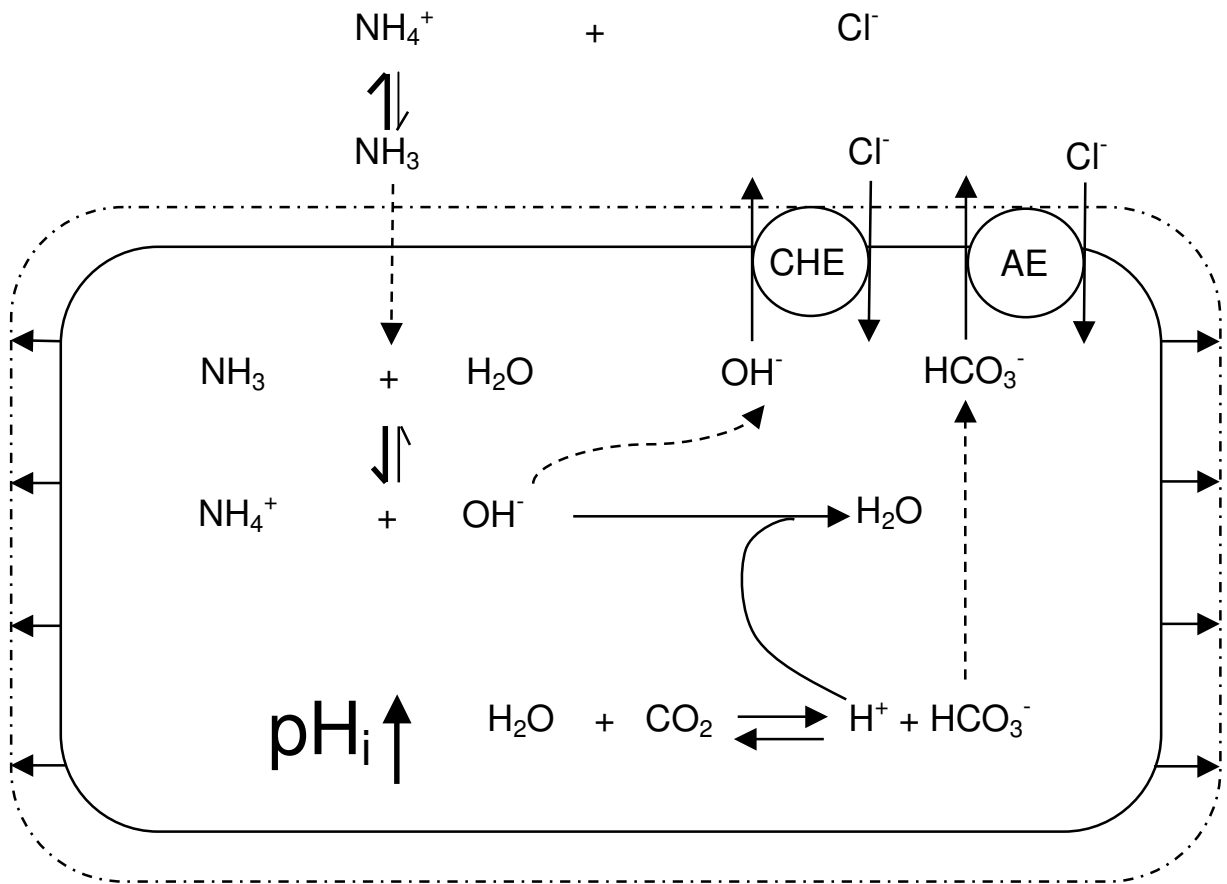
Erste Phase eines Acetatpulses. Die Zugabe von Natriumacetat führt zu einer intrazellulären Ansäuerung. Die nachfolgende Aktivierung des NBC und NHE bewirken eine Neutralisierung des intrazellulären pH.

Nach Umschalten auf Acetat-freies Perfusionsmedium kommt es zum Auswaschen des Natriumacetats in der zweiten Phase des Acetatpulses (siehe Abb. 32). Für Acetat besteht nun ein Gradient in Richtung extrazellulär, so dass Acetat im nicht-ionisierten Zustand nach extrazellulär diffundiert. Es kommt zu einer Umkehrung der o.g. Reaktion, d.h. H_3O^+ reagiert mit den ionisierten Acetat-Anionen zu H_2O und nicht-ionisiertem Acetat. Da durch den NBC und den NHE alkalische Äquivalente nach intrazellulär transportiert wurden, erfolgt eine intrazelluläre Alkalinisierung weit über den Ausgangs-pH-Wert hinaus. Durch zwei Austauschere – den AE sowie den Chlorid-Hydroxyl-Austauscher (CHE) – kommt es nun zu einer Erholung aus dem Alkalischen bis hin zum Erreichen des Ausgangs-pH-Wertes.

**Abb. 32**

Zweite Phase eines Acetatpulses. Das Auswaschen von Natriumacetat führt zu einer intrazellulären Alkalinisierung. Die nachfolgende Aktivierung des CHE und des AE bewirken eine Neutralisierung des intrazellulären pH.

Bei der Ammoniumchlorid-Technik erfolgen die intrazellulären pH-Veränderungen in umgekehrter Richtung. Durch die Superfusion mit Ammoniumchlorid kommt es zunächst zu einer intrazellulären Alkalinisierung (siehe Abb. 33). NH_4^+ steht im Gleichgewicht mit NH_3 , das durch die fehlende Polarität für die Zellmembranen permeabel ist. Intrazellulär reagiert es mit H_2O zu NH_4^+ und Hydroxylionen. Es kommt zu einer raschen intrazellulären Alkalinisierung. Durch den AE und den CHE erfolgt nun die Erholung aus dem Alkalischen.

**Abb. 33**

Erste Phase eines Ammoniumchloridpulses. Die Zugabe von Ammoniumchlorid führt zu einer intrazellulären Alkalinisierung. In der Folge bewirkt die Aktivierung des CHE und des AE eine Neutralisierung des intrazellulären pH.

Wird das extrazelluläre Ammonium ausgewaschen, entsteht ein Gradient des Ammoniums in Richtung extrazellulär. Dadurch diffundiert NH_3 nach extrazellulär und es entsteht H_3O^+ , so dass der intrazelluläre pH rasch abfällt (siehe Abb. 34). Durch die Aktivierung des NHE und des NBC erfolgt dann die Erholung aus dem Sauren bis hin zum Erreichen des Ausgangs-pH-Wertes.

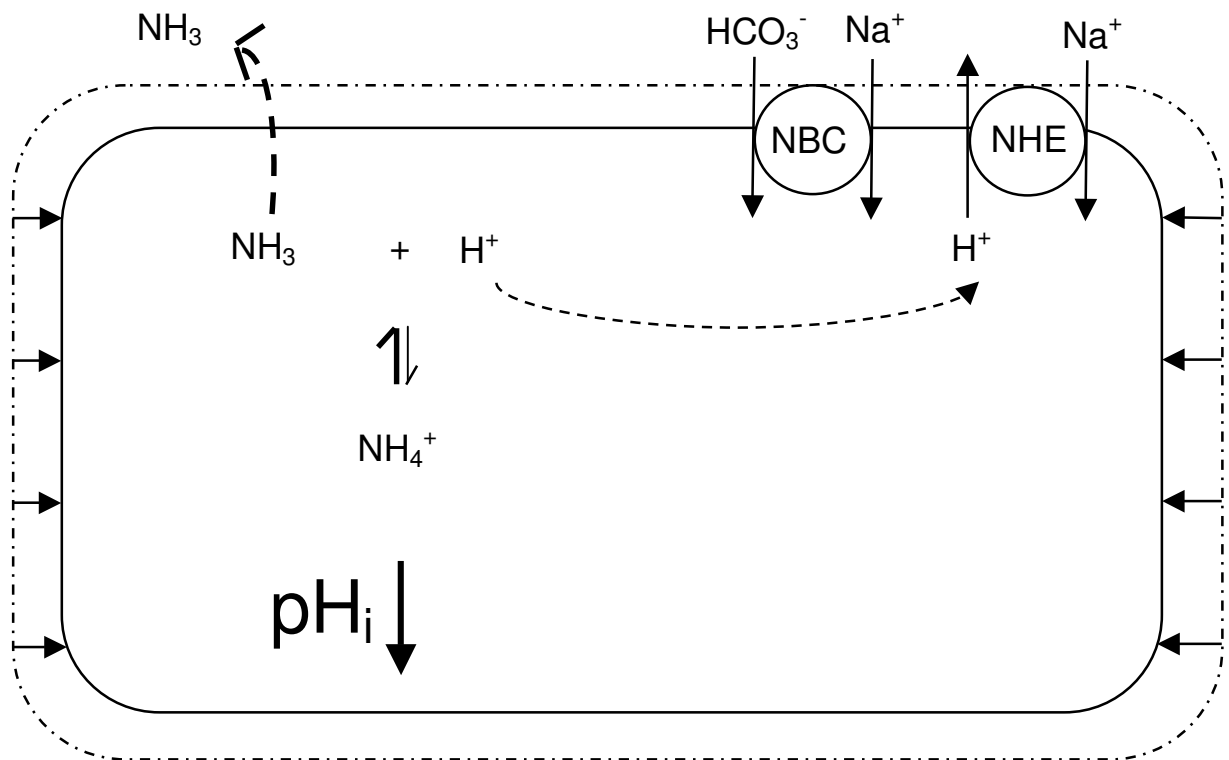


Abb. 34

Zweite Phase eines Ammoniumchloridpulses. Das Auswaschen von Ammoniumchlorid führt zu einer intrazellulären Ansäuerung. In der Folge bewirkt die Aktivierung des NHE und des NBC eine Neutralisierung des intrazellulären pH.

Im überwiegenden Teil der Versuche wurde die Acetatpuls-Technik zur Untersuchung der pH-Regulation angewandt, da diese im Vergleich zur Ammoniumchlorid-Technik weniger störanfällig ist. So wird in der Literatur beschrieben, dass ein Transport von Ammoniumionen möglicherweise auch durch Kalium-Kanäle erfolgen kann (5).

Bei der Auswertung der Versuche muss ferner beachtet werden, dass neben pH-regulierenden Transportern auch die intrazellulären Puffersysteme einen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert haben. Die gesamte Pufferkapazität (β_{tot}) setzt sich aus der intrinsischen Pufferkapazität (β_i), die im Wesentlichen durch Proteine zustande kommt, und der Bikarbonat-abhängigen Pufferkapazität (β_{CO_2}) zusammen, die algebraisch addiert werden dürfen (43). Dabei ist die intrinsische Pufferkapazität abhängig vom Zelltyp und muss daher experimentell als Funktion des intrazellulären pH-Wertes bestimmt werden. Die Bikarbonat-abhängige Pufferkapazität kann dahingegen bei bekanntem intra- und extrazellulären pH-Wert sowie bekannter extrazellulärer

4. Diskussion

Bikarbonat-Konzentration berechnet werden (siehe hierzu auch Kapitel 2.3). In kardialen Zellen stellt sich das Gleichgewicht der CO_2 -abhängigen Puffer langsam ein. Dies gilt insbesondere für die ersten zwei bis drei Minuten nach der maximalen Alkalinisierung bei Acetatpulsen (23). Daher wurde in diesen Fällen auf die Bestimmung der Erholung aus dem Alkalischen nach einer Minute verzichtet und die Erholung erst nach drei und fünf Minuten berechnet.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Ergebnisse der o.g. Acetat- und Ammoniumchloridpulse auszuwerten. Erstens kann aus den Ratio-Werten direkt die Erholung aus dem Sauren und dem Alkalischen in Prozent der maximalen Ansäuerung oder Alkalinisierung zu genau definierten Zeitpunkten berechnet werden. Hierbei können auch die Ratio-Werte in pH-Werte umgerechnet werden. Es kann aber nicht beantwortet werden, ob die pH-Veränderungen auf Änderungen der intrazellulären Puffersysteme oder Veränderungen in der Kinetik pH-regulierender Transporter zurückzuführen sind. Hierfür ist die Kenntnis von Protonen-Flüssen über die Zellmembran, dem sog. „acid and base flux“ (J_H) erforderlich. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Veränderungen des intrazellulären pH, die aufgrund von intrazellulären Puffersystemen auftreten, mitberücksichtigt werden. Die Flüsse werden berechnet als das Produkt der totalen Pufferkapazität β_{tot} und $\delta\text{pH}/\delta t$. Jedoch ließ sich nachweisen, dass bei unseren Experimenten die Auswertung der Versuche mittels Flux-Berechnungen denjenigen der Erholung aus dem Sauren bzw. dem Alkalischen in Prozent des Maximums entsprechen. Daher verzichteten wir in den weitergehenden Experimenten auf die Auswertungsmethode mittels Flux-Berechnungen zugunsten der Berechnung der Erholung aus dem Sauren und Alkalischen in Prozent des Maximums.

4.2 Die pH-Regulation bei kardialen Fibroblasten

4.2.1 Beeinflussung des basalen intrazellulären pH

Zunächst wurde die Alkalinisierung unter dem Einfluss von FBS für kardiale Fibroblasten näher charakterisiert. Der intrazelluläre pH wurde nach entsprechender Kalibrierung durch das Ionophor Nigericin mittels fluoreszenzphotometrischer Untersuchungen ermittelt. Es zeigte sich eine intrazelluläre Alkalinisierung nach 30-minütiger Inkubation mit FBS, die über mindestens 24 Stunden anhielt. Moxonidin hatte (in der üblichen Konzentration von 1 μM) bei diesen Versuchen keinen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert. Unsere Untersuchungen wurden im Vergleich zu den Arbeiten von Moolenaar et al. (34) unter Ausschaltung des NHE mittels HOE694 durchgeführt.

Es scheint also Mechanismen zu geben, die auch unabhängig vom NHE zu einer Alkalinisierung führen.

4.2.2 Erholung aus dem Säuren im Zusammenhang mit der ERK-Signaltransduktionskaskade

4.2.2.1 Erholung aus dem Säuren beschleunigt durch Inkubation mit FBS

Bei der Durchführung von Acetatpulsen bei kardialen Fibroblasten zeigte sich in unseren Versuchen eine signifikante Beschleunigung der Erholung aus dem Säuren durch eine 30-minütige Inkubation mit 10% FBS im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,4% FBS. Dieser Effekt war jedoch nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FBS rückläufig. Diese Ergebnisse ließen sich mittels Flux-Berechnungen bestätigen. So zeigten sich erhöhte Acid-Efflux-Werte in der Gruppe der 30-minütigen Inkubation mit 10% FBS, was einem erhöhten Netto-Protonen-Fluss in Richtung des extrazellulären Raumes entspricht.

Die Erholung aus dem Säuren wird im Wesentlichen von zwei pH-regulierenden Transportern bewirkt: dem NHE und dem NBC. Ersterer wurde jedoch während unserer Versuche durch die Zugabe von 10 μ M HOE694 inhibiert, so dass die Beschleunigung der Erholung aus dem Säuren bzw. die erhöhten Proton-Efflux-Raten auf die Aktivität des NBC zurückgeführt werden kann.

In der Literatur ergaben sich nun Hinweise dafür, dass ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung der o.g. Ionenaustauscher und der Signaltransduktionskaskade der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) bestehen könnte. So konnten Baetz et al. (3) zeigen, dass die Aktivität des NBC (u.a.) durch die ERK-Signaltransduktionskaskade reguliert wird (vgl. hierzu Kapitel 4.2.2.3). Allerdings beschränkten sich diese Analysen auf die Erholung aus dem Säuren und ließen die Erholung aus dem Alkalischen unbeachtet.

4.2.2.2 ERK-Signaltransduktionskaskade

ERK spielt in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose eine Schlüsselrolle. Zusammen mit der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der p38-Signaltransduktionskaskade gehört ERK zu der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (29). Mitogene Substanzen und Wachstumsfaktoren aktivieren die ERK-Signaltransduktionskaskade, wohingegen JNK und p38 überwiegend durch Stress und Inflammationsreaktionen aktiviert werden. Innerhalb der Familie besteht zwar eine gewisse Gleichartigkeit im Hinblick auf die Aktivierungsmodi, allerdings zeichnen sie sich gleichzeitig durch ihre hohe Spezifität aus. So sind Kinasen in der Regel umso spezifischer, je weiter „upstream“ sie sich in

4. Diskussion

der Signalkaskade befinden. Wichtige Substrate von ERK sind Transkriptionsfaktoren wie c-myc und RSK, Membranproteine, Phospholipasen, MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MK) und Proteine des Zytoskeletts (vgl. (45) und (36)).

Im Folgenden einige Anmerkungen zur Nomenklatur der ERK-Signaltransduktionskaskade: ERK ist im phosphorylierten Zustand aktiv, im dephosphorylierten Zustand inaktiv. Eine Phosphorylierung entspricht demzufolge einer Aktivierung, eine Dephosphorylierung einer Inaktivierung von ERK. Diejenigen Kinasen, die ERK aktivieren, werden als MAPK Kinasen bezeichnet. Da ERK jedoch zwei Phosphorylierungsstellen besitzt, werden sie MAPK Kinase 1, 2 und 1/2 bezeichnet, je nachdem, ob sie die erste, die zweite oder beide ERK-Phosphorylierungsstellen phosphorylieren. Eine andere Bezeichnung für die MAPK Kinase lautet MEK und steht für Mitogen-aktivierte Proteinkinase/ERK-Kinase. Die Phosphatasen, die ERK inaktivieren oder dephosphorylieren, werden als MKP bezeichnet. Dabei steht MKP für Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Phosphatase.

4.2.2.3 Zusammenhang zwischen der ERK-Signaltransduktionskaskade und der Aktivität des NBC

In den Versuchen von Baetz et al. (3) wurden etablierte Hemmstoffe der ERK-Phosphorylierung verwendet: u.a. U-0126, ein unselektiver MEK 1/2 Inhibitor, sowie PD-98059, ein selektiver MEK 1 Inhibitor. Es zeigte sich, dass U-0126 in der zweiten Phase eines Ammoniumchloridpulses den Acid-Efflux signifikant verminderte. Zusätzlich konnte mittels Western Blot Analysen gezeigt werden, dass die ERK-Phosphorylierung nach einer intrazellulären Ansäuerung bis auf das Doppelte gesteigert wurde und nach einem Maximum bei etwa drei Minuten wieder auf das Ausgangsniveau abfiel. Schließlich wurde die Bedeutung von ATII in diesem Zusammenhang untersucht. Es zeigte sich eine Erhöhung des Acid-Efflux durch ATII, was durch die gleichzeitige Applikation von U-0126 vollständig verhindert werden konnte. Ferner konnte ATII in Western Blot Analysen eine Erhöhung der ERK-Phosphorylierung hervorrufen.

Aus diesen Befunden ergibt sich eine mögliche Erklärung für die transiente Erhöhung des Acid-Efflux durch eine 30-minütige Inkubation mit 10% FBS, die sich in unseren Versuchen zeigte und nach 24-stündiger Inkubation rückläufig war. Zunächst könnte durch eine ERK-Phosphorylierung vermittelt der NBC aktiviert werden. Anschließend könnten, mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, ERK-Phosphatasen eine

4. Diskussion

Dephosphorylierung verursachen, so dass die NBC-Aktivität wieder die Ausgangswerte erreicht (siehe Abb. 35).

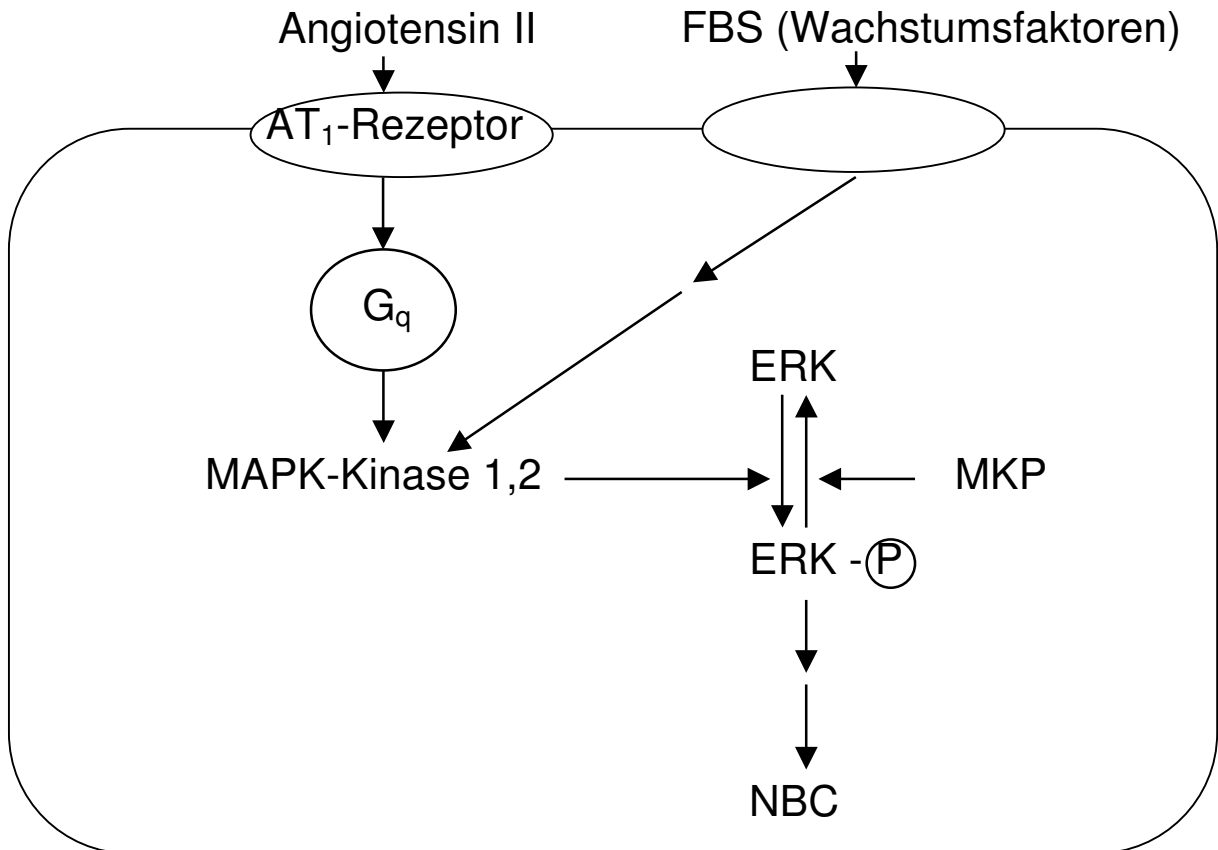


Abb. 35

Signaltransduktionskaskade von ATII und die Wirkung auf den NBC ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten sowie die mögliche Wirkung der in FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren (nach Baetz et al. (3)). Abkürzungen: FBS: Fetales Kälberserum; AT₁-Rezeptor: Angiotensin II – Rezeptor Typ 1; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ERK: Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase; MKP: MAPK – Phosphatase, NBC: Natrium-Bikarbonat-Kotransporter.

4. Diskussion

Neben der o.g. Theorie gibt es noch eine andere Erklärung, warum die Erholung aus dem Sauren nach 24-stündiger Inkubation mit FBS nicht mehr beschleunigt ist. In einer Arbeit von Rapizzi et al. (40) wurde eine Liganden-induzierte Desensibilisierung des S1P-Rezeptors beschrieben. Als ein bekanntes Beispiel für diesen Mechanismus der Desensibilisierung ist die Down-Regulation der β -Adrenozeptoren bei Herzinsuffizienz durch dauerhaft erhöhte Katecholamin-Plasmaspiegel zu nennen.

4.2.3 Erholung aus dem Alkalischen und der Einfluss von Hormonen

4.2.3.1 FBS hemmt die Erholung aus dem Alkalischen

In der zweiten Phase der Acetatpulse zeigte sich in unseren Versuchen eine Hemmung der Erholung aus dem Alkalischen durch 10% FBS, was einem verminderten Acid-Influx entspricht. Dieser Effekt war auch nach 24-stündiger Inkubation mit 10% FBS zu beobachten und konnte auch anhand sog. Doppelpulse bestätigt werden. Die Doppelpulse wurden in der Vorstellung durchgeführt, den Effekt von FBS im gleichen Experiment zu beobachten. Nach der Applikation eines ersten Acetatpulses unter Standardbedingungen wurden die Zellen über 10 bzw. 40 Minuten hinweg mit 10% FBS behandelt. Anschließend erfolgte ein zweiter Acetatpuls, um die direkten Auswirkungen zu beobachten. Es ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Hemmung der Erholung aus dem Alkalischen durch eine 40-minütige Applikation von FBS. Eine 10-minütige Applikation hatte keinen signifikanten Effekt auf die Erholung aus dem Alkalischen.

4.2.3.2 Die Familie der SLC (engl. „solute carriers“)

In kardialen Zellen wird die Erholung aus dem Alkalischen überwiegend durch Anionenaustauscher bewirkt. Nachdem die Gene dieser Anionenaustauscher kloniert werden konnten, wurde eine neue Nomenklatur eingeführt: die Einteilung in SLC. Hinsichtlich der Nomenklatur der SLC-Familien sei angemerkt, dass sich *SLC* immer auf die humanen Gene und *S/c* auf die entsprechenden Nagetier-Gene bezieht. Die im Herzen funktionell bedeutsamen Anionenaustauscher gehören einerseits zur Familie der Bikarbonat-Austauscher und -Kotransporter (SLC4 Familie, siehe Tab. 6) (42) und andererseits zur Familie der multifunktionalen Anionenaustauscher (SLC26 Familie, siehe Tab. 7) (35). Ebenso wie in der SCL4 Familie können Transporter der SCL26 Familie durch DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbendisulfonat) und andere Stilben-Derivate gehemmt werden. DIDS ist ein etablierter Inhibitor für Anionen-Austauscher-Funktionen (49), die in der Untersuchung von Anionenaustauschern regelmäßig eingesetzt werden.

4. Diskussion

In kardialen Zellen konnten die Isoformen SLC4A1 (AE-1 nach der alten Nomenklatur), SLCA2 (AE-2 nach der alten Nomenklatur) und SLC4A3 (AE-3 nach der alten Nomenklatur) sowie die Isoformen SLC26A3 und SLC26A6 nachgewiesen werden (2). Der SLC26A6 wurde als erstes Mitglied der SLC26 Familie identifiziert; er wird in vielen verschiedenen Organen exprimiert, u.a. in den Nieren, im Pankreas, im Gastrointestinaltrakt, im Herzen, in der Muskulatur und in der Plazenta. Der SLC26A6 fungiert dabei sowohl als Chlorid-Bikarbonat- als auch als Chlorid-Hydroxyl-Austauscher und liegt in adulten Herzen in signifikant höherer mRNA-Expression vor als alle anderen Anionenaustauscher (vgl. Alvarez et al. (2)).

Mittels Real-Time-PCR wurden im Molekular-Kardiologischen Labor der Universitätsklinik Marburg die Besetzung der auch in dieser Arbeit kultivierten kardialen Fibroblasten von Ratten nachgewiesen (Daten bislang nicht publiziert): die kardialen Fibroblasten exprimierten aus der SLC4 Familie der Bikarbonattransporter den Slc4a3 (AE3c) sowie den Slc4a7 (NBCn1) und aus der Slc26 Familie der multifunktionalen Anionenaustauscher den Slc26a6, was mit den bereits publizierten Verteilungsmustern der Transporter (siehe hierzu Tab. 6 und Tab. 7) weitgehend übereinstimmt.

Charakteristika der SLC4 Familie der Bikarbonattransporter

Symbol für das humane Gen	Protein Name	Substrate	Verteilung im Gewebe und zelluläre/ subzelluläre Expression	Sequenz Accession ID
SLC4A1	AE1	Chlorid, Bikarbonat	Erythrozyten, renales Sammelrohr, Herz und Kolon	NM_000342
SLC4A2	AE2	Chlorid, Bikarbonat	weit verbreitet ; basolateral in den meisten epithelialen Zellen	NM_003040
SLC4A3	AE3c AE3fl	Chlorid, Bikarbonat	Gehirn, Retina, Herz , Glattmuskelzellen; epitheliale Zellen der Niere und des Gastrointestinaltraktes	NM_005070
SLC4A4	NBCe1	Natrium, Bikarbonat (und/oder Karbonat)	NBCe1-A: renaler proximaler Tubulus NBCe1-B: weit verbreitet , Pankreas, Herz, Auge NBCe1-C: Gehirn	NM_003759
SLC4A5	NBCe2	Natrium, Bikarbonat (und/oder Karbonat)	Leber, Testes, Milz	NM_133478
SLC4A6	(nicht gebraucht)	-	-	-
SLC4A7	NBCn1	Natrium, Bikarbonat	weit verbreitet , Milz, Testes, Gehirn, Herz , Lunge, Leber, Niere; nicht im Skelettmuskel	NM_003615
SLC4A8	NDCBE	Natrium, Bikarbonat	Gehirn, Testes, Niere, Ovarien	NM_004858

Tab. 6

Charakteristika der SLC4 Familie modifiziert nach Romero et al. (42). Abkürzungen: SLC: engl. „solute carriers“; AE: Anionenaustauscher; NBC: Natrium-Bikarbonat-Kotransporter; n: neutral; e: elektrogen, NDCBE: engl. „Na²⁺-driven-chloride-bicarbonate-exchanger“.

Charakteristika der SLC26 Familie der multifunktionalen Anionenaustauscher

Symbol für das humane Gen	Substrate	Verteilung im Gewebe und zelluläre/ subzelluläre Expression	Sequenz Accession ID
SLC26A1	Sulfat, Oxalat	Leber, Niere	AF297659
SLC26A2	Sulfat, Chlorid	weit verbreitet	NM_000112
SLC26A3	Sulfat, Chlorid, Bikarbonat, Hydroxylionen	Gastrointestinaltrakt, Schweißdrüsen, Pankreas, Prostata, und Herz (2)	NM_000111
SLC26A4	Chlorid, Bikarbonat, Iodid, Format	Innenohr, Nieren, Schilddrüse	NM_000441
SLC26A5	unbekannt	Innenohr	AY289133
SLC26A6	Sulfat, Chlorid, Bikarbonat, Hydroxylionen, Oxalat, Format	weit verbreitet und Herz (2)	AF416721 (- A6a) AF279265 (- A6b)
SLC26A7	Sulfat, Chlorid, Oxalat	Nieren	AF331521
SLC26A8	Sulfat, Chlorid, Oxalat	Sperma, Gehirn	AF314959
SLC26A9	Sulfat, Chlorid, Oxalat	Lunge	AF314958

Tab. 7

Charakteristika der SLC26 Familie der multifunktionalen Anionenaustauscher modifiziert nach Mount et al. (35) und Alvarez et al. (2).

Abkürzungen: SLC26: engl. „solute carriers“ der Familie 26.

4. Diskussion

4.2.3.3 Beeinflussung der Anionenaustauscher SLC4A3 und SLC26A6 durch Hormone und Second Messenger

In einer Arbeit von Alvarez et al. (2) wurde an transfizierten HEK293 Zellen nachgewiesen, dass Phenylephrin, ein α_1 -Adrenozeptoragonist, die Aktivität des SLC26A6 um 60% vermindert. PMA-Phorbol-Ester, ein spezifischer Aktivator der Proteinkinase C (PKC), konnte eine Reduktion der Aktivität des SLC26A6 um 42% hervorrufen, was bei gleichzeitiger Applikation eines PKC-Inhibitors reversibel war. Daraus wurde gefolgert, dass die PKC den durch SLC26a6 vermittelten Bikarbonat-Transport vermindert. Dies könnte auf die PKC-vermittelte Dissoziation der Karboanhydrase II vom Bikarbonat-Transport-Metabolon vermittelt werden. Von der Arbeitsgruppe Cingolani et al. wurde in einer früheren Arbeit gezeigt, dass die PKC auf den SLC4A3 (früher AE3) eine entgegengesetzte Wirkung besitzt, diesen also stimuliert (siehe Abb. 36).

In einer Arbeit von Camilion de Hurtado et al. (8) wurde gezeigt, dass ATII den SLC4A3 in linksventrikulären Papillarmuskeln von Katzen aktiviert. Unter Superfusion der Zellen mit einer Bikarbonat-freien Lösung zeigte sich ca. 12 Minuten nach Applikation eines 500 nM ATII-Pulses eine intrazelluläre Alkalinisierung der Papillarmuskelzellen. Dieser Effekt wurde unter gleichzeitiger Applikation von EIPA, einem spezifischen Hemmstoff des NHE, nicht mehr beobachtet. Daraus konnte gefolgert werden, dass der Effekt der von ATII ausgelösten Alkalinisierung auf die Stimulierung des NHE bei gleichzeitiger Hemmung des SLC4A3 durch die Bikarbonat-freie Lösung zurückzuführen war. In Bikarbonat-haltiger Lösung zeigte sich hingegen kein alkalinisierender Effekt von ATII. Daraus wurde gefolgert, dass unter physiologischen Bedingungen die Aktivitäten des SLC4A3 und des NHE gleichermaßen durch ATII stimuliert werden, so dass es zu keiner Änderung des basalen intrazellulären pH kommt.

ATII kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden, den AT_1 -Rezeptor und den AT_2 -Rezeptor. Die Vasokonstriktion und die Stimulation der Kollagensynthese als Hauptwirkungen von ATII werden über den AT_1 -Rezeptor vermittelt. Die Signaltransduktion von ATII über den AT_1 -Rezeptor ist weitgehend bekannt: Es findet eine G-Protein-gekoppelte Stimulation der Phospholipase A statt, wodurch Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) freigesetzt werden, die wiederum eine Aktivierung der PKC bewirken. Am der N-terminalen Domäne des SLC4A3 befindet sich hierfür eine potentielle PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstelle (1).

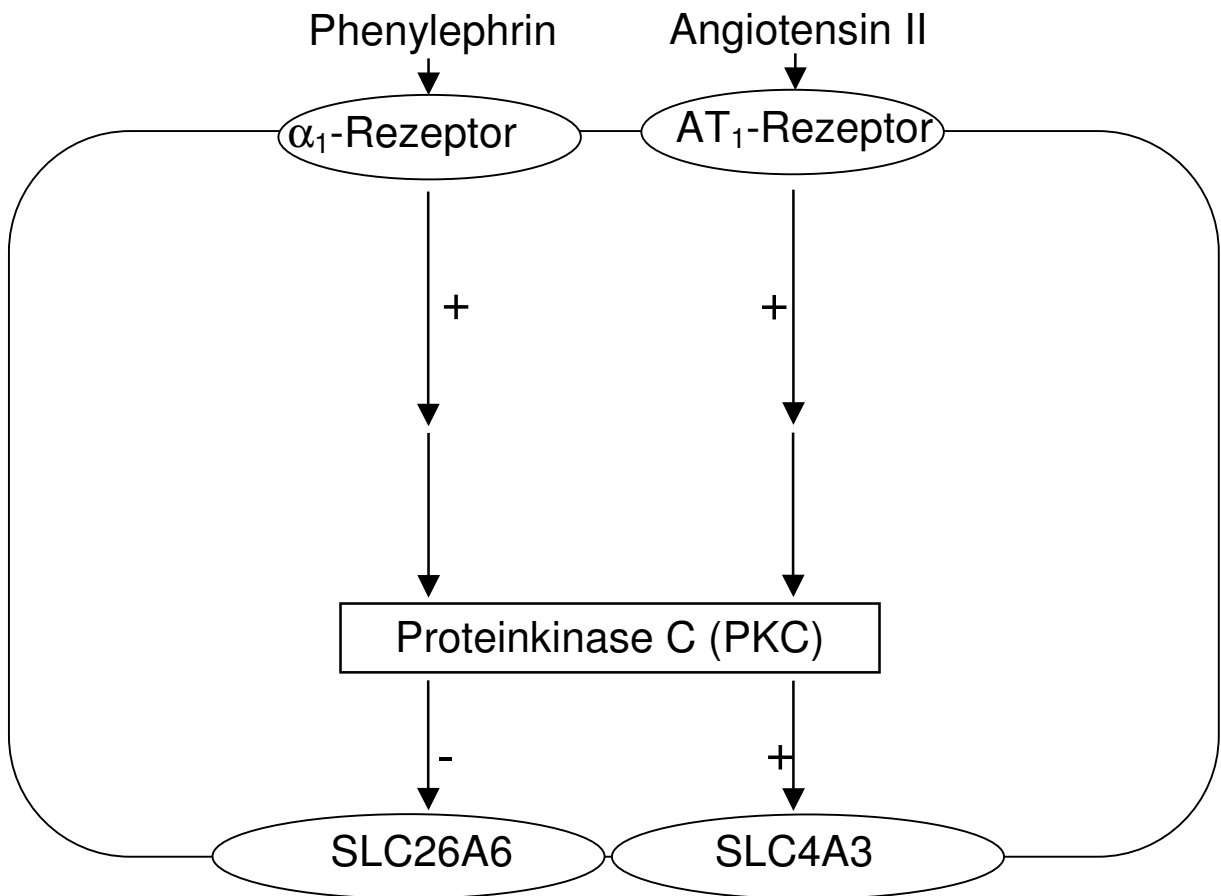


Abb. 36

Die Beeinflussung der Aktivität von Anionenaustauschern der SLC26-Familie und der SLC4-Familie durch Bindung von Phenylephrin an den α_1 -Adrenozeptor und ATII an den Angiotensin II – Rezeptor Typ 1 (AT_1 -Rezeptor). Dabei entspricht der SLC4A3 dem AE3 nach der alten Klassifikation. Nach Alvarez et al. (2) sowie Camilion de Hurtado et al. (8).

Die Aktivität von Anionenaustauschern wird also offenbar direkt durch die PKC vermittelt. Durch die PKC kann einerseits die Aktivität des SLC26A6 vermindert werden, was entsprechend zu einer verminderten Erholung aus dem Alkalischen bzw. einer Alkalinisierung führen würde. Andererseits kann die Aktivität des SLC4A3 gesteigert werden, was entsprechend zu einer gesteigerten Erholung aus dem Alkalischen führen würde. Bei simultaner Aktivierung des SLC4A3 und Hemmung des SLC26A6 ist auch denkbar, dass sich beide Effekte ausgleichen. Darüber hinaus hängt die Wirkung der PKC wahrscheinlich von der Besetzung der Zellen mit Anionenaustauschern ab.

4. Diskussion

In den in unseren Versuchen kultivierten kardialen Fibroblasten von Ratten wurden sowohl der Slc4a3 als auch der Slc26a6 exprimiert (vgl. dazu Kapitel 4.2.3.2). Durch unsere Ergebnisse wird daher nahegelegt, dass die Anionenaustauscher durch die Inkubation mit Wachstumsfaktoren, wie sie in FBS enthalten sind, inhibiert werden können.

4.2.4 pH-Regulation bei kardialen Fibroblasten unter Einfluss von Wachstumsfaktoren

Insgesamt kann nun eine Theorie aufgestellt werden, wie kardiale Fibroblasten unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren einen alkalischen basalen intrazellulären pH-Wert erreichen und aufrechterhalten: Erstens kann durch die Aktivierung Basen-beladender Transporter (NBC und NHE) sowohl die Erholung aus dem Säuren beschleunigt als auch der Acid-Efflux erhöht werden. Unsere Versuche wurden unter Hemmung des NHE durchgeführt, so dass die beobachteten Effekte vermutlich auf der Aktivierung des NBC beruhen. Unter der Voraussetzung, dass der NBC auch bei alkalischen pH-Werten aktiviert werden kann, könnte eine weitere Aktivierung des NBC zu einer Erhöhung des pH-Wertes über den basalen pH-Wert hinaus erfolgen. Zweitens kann durch die Hemmung Säure-beladender Transporter (Slc4a3 und Slc26a6) die Erholung aus dem Alkalischen verlangsamt und der Acid-Influx gehemmt werden.

Tatsächlich führte die Behandlung mit FBS dazu, dass sich erstens ein alkalischer pH einstellte, zweitens die Erholung aus dem Säuren beschleunigt wurde (vermutlich durch eine Aktivierung des NBC) und drittens die Erholung aus dem Alkalischen gehemmt wurde (vermutlich durch eine Hemmung des Slc26a6 und/oder Slc4a3).

4.2.5 Einfluss von Moxonidin

In unseren Versuchen mit Acetatpulsen wurde der Einfluss von Moxonidin auf die Erholung aus dem Säuren bei verschiedenen FBS-Konzentrationen (10% vs. 0,4%) miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit Moxonidin die Erholung aus dem Säuren unter Bedingungen mit 10% FBS hemmen konnte, jedoch nicht bei gleichzeitiger Inkubation mit 0,4% FBS. Bei der Erholung aus dem Alkalischen hingegen zeigte sich eine Hemmung durch Moxonidin unter Bedingungen mit 0,4% FBS, wohingegen die gleichzeitige Inkubation mit 10% FBS nicht zu einer Hemmung führte.

Bei Ammoniumchlorid-Pulsen, wo die alkalische und die saure Phase in umgekehrter Reihenfolge wie bei Acetatpulsen erfolgen (vgl. Kapitel 4.1), konnte Moxonidin die Erholung aus dem Alkalischen hemmen. Die Zellen wurden allerdings bis kurz vor

4. Diskussion

Beginn der Messungen mit Quantum 333, einem speziellen Nährmedium für Fibroblasten, kultiviert. Die Versuche selbst wurden ohne FBS durchgeführt. Trotzdem zeigte sich eine Hemmung der Erholung aus dem Alkalischen, was auf einen protrahierten Effekt von Quantum 333 zurück zu führen sein könnte. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob die Reihenfolge von Alkalinisierung und Ansäuerung (wie bei Acetat- und Ammoniumchlorid-Pulsen) einen Einfluss auf die Aktivierung von Ionentransportern hat.

In einer Arbeit von Edwards und Ernsberger aus dem Jahre 2003 (12) wurden Versuche an einer Linie von PC12 Phäochromocytom Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen keine α_2 -Adrenozeptoren, aber den I_1R exprimieren. Der stärkste bekannte Stimulus für die ERK-Aktivierung in Phäochromocytom Zellen ist der NGF (engl. „nerve growth factor“), der in den Versuchen von Edwards und Ernsberger als Referenz für die ERK-Aktivierung betrachtet wurde. Die ERK-Phosphorylierung wurde mit Western Blot ermittelt. Es zeigte sich in einem ersten Versuch, dass sowohl eine 90-minütige Inkubation der PC 12 Zellen mit Moxonidin als auch die Inkubation mit NGF alleine zu einer starken ERK-Phosphorylierung führten. Der Effekt der ERK-Phosphorylierung durch Moxonidin war durch die Kombination mit Efaroxan, einem Imidazolin-Rezeptor-Antagonisten, vollständig reversibel. Dies deutet darauf hin, dass der Moxonidin-Effekt nicht durch α_2 -Adrenozeptoren, sondern durch Imidazolin-Rezeptoren ausgelöst wird. Die Kombination beider Substanzen hingegen führte zu einer geringeren Phosphorylierung als es unter der alleinigen Inkubation mit NGF oder Moxonidin der Fall war. Ferner wurde der Effekt von Moxonidin auf die MKP-2-Expression untersucht. Bei der MKP-2 handelt es sich um eine Phosphatase, die zu einer Inaktivierung von phosphoryliertem ERK führt. Im Zeitverlauf zeigte sich 90 Minuten nach Zugabe von Moxonidin eine maximale Expression von MKP-2, die nach etwa 240 Minuten auf den Ursprungswert abfiel.

An dieser Stelle möchte ich erneut auf Baetz et al. (3) verweisen. Diese Gruppe konnte zeigen, dass ATII über die ERK-Signaltransduktionskaskade eine Aktivierung des NBC bewirkt (vgl. Kapitel 4.2.2.3). Es könnte also gefolgert werden, dass Moxonidin nur dann zu einer Hemmung der Erholung aus dem Sauren führen kann, wenn es bereits durch Wachstumsfaktoren – z.B. wie die Wachstumsfaktoren in FBS, NGF oder ATII – über die Stimulierung der MAPK-Kinasen zu einer ERK-Phosphorylierung gekommen ist. Der hemmende Einfluss könnte in diesem Fall durch eine wie von Ernsberger et al. (12) beschriebene MKP-Expression herbeigeführt werden.

4. Diskussion

Die Erholung aus dem Alkalischen hingegen scheint weitgehend unabhängig vom ERK-Signaltransduktionsweg zu geschehen. Hier kann gefolgert werden, dass die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit 10% FBS alleine schon zu einer Hemmung der Erholung aus dem Alkalischen führt, so dass Moxonidin in diesem Fall keinen zusätzlichen Hemmeffekt mehr auszulösen vermag.

Im Bezug auf die im alkalischen aktiven Anionenaustauscher könnte dies bedeuten, dass sie durch die Inkubation mit dem Minimalmedium von 0,4% FBS nicht gehemmt werden (unter diesen Bedingungen zeigte sich jedenfalls ein vergleichsweise niedriger basaler intrazellulärer pH-Wert). Man könnte hier wiederum argumentieren, dass Moxonidin unter diesen Bedingungen eine hemmende Wirkung hat.

4.3 Die pH-Regulation bei HeLa Zellen

Analog zur den Versuchen bei kardialen Fibroblasten wurde auch bei HeLa Zellen die pH-Regulation untersucht, da insbesondere bei Tumorzellen der Zusammenhang zwischen pH-Regulation und Proliferation besonders wichtig erscheint (vgl. Harguindey et al. (17)).

Es zeigte sich auch bei HeLa eine intrazelluläre Alkalinisierung durch eine 30-minütige Inkubation mit FBS, die sogar bis zu 72 Stunden anhielt. Bemerkenswert erschien, dass die intrazelluläre Alkalinisierung bei HeLa Zellen über den bereits unter Kontrollbedingungen mit 0,4% FBS erhöhen basalen pH-Wert hinaus erfolgte. Moxonidin hatte, wie bei kardialen Fibroblasten, keinen Einfluss auf den basalen intrazellulären pH-Wert. Hinsichtlich der pH-Regulation zeigte sich ebenfalls eine beschleunigte Erholung aus dem Säuren, was auch bei HeLa Zellen für eine Aktivierung des NBC durch FBS spricht. Die Erholung aus dem Alkalischen hingegen konnte durch FBS nicht beeinflusst werden. Ein Effekt von Moxonidin konnte weder in der Erholung aus dem Säuren noch in der Erholung aus dem Alkalischen beobachtet werden.

Hier ließe sich in weiterführenden Experimenten klären, ob der Grund dafür eventuell in einer mangelnden Expression von S1P₁-Rezeptoren bei HeLa Zellen liegt. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass im Proliferationsassay WST-1 Moxonidin in der Kombination mit HOE694 eine Hemmung der Proliferationsrate bewirkte (vgl. hierzu Kapitel 4.4).

4.4 Die Proliferation von Zellen im Proliferationsassay WST-1

In einem ersten Versuch wurde das Wachstumsverhalten kardialer Fibroblasten im Vergleich zu HeLa Zellen untersucht. Dabei zeigten HeLa Zellen auch bei einem geringeren Aussaat-Verhältnis (750 Zellen pro Well bei HeLa Zellen und 1500 Zellen pro Well bei kardialen Fibroblasten) bereits in den ersten vier Tagen ein stärkeres Wachstum als Fibroblasten, so dass die weiteren Versuche an HeLa Zellen durchgeführt wurden.

Die HeLa Zellen wurden in Analogie zu Wong et al. (vgl. (62) und (63)) künstlich einem sauren Milieu ausgesetzt und das Wachstum im Vergleich zu einem pH von 7,4 untersucht. Es zeigte sich hier, dass HeLa Zellen bei diesem sauren Milieu im Vergleich zu einem normalen extrazellulären pH in ihrem Wachstum gehemmt wurden. In weiteren Versuchen wurde die Proliferation durch die kombinierte Inkubation der Zellen mit Moxonidin und HOE694 gehemmt, während die alleinige Inkubation mit HOE694 oder Moxonidin keinen signifikanten Effekt auf das Proliferationsverhalten hatte.

Da der NBC und der NHE zusammen die Erholung aus dem Säuren bewirken, könnte man sich vorstellen, dass nur die gleichzeitige Hemmung des NBC und des NHE zu einer Verminderung des pH führt und dadurch die Proliferation nicht mehr im vollen Ausmaß stattfinden kann.

4.5 Ausblick

Der Zusammenhang zwischen pH-Regulation und Proliferation von Zellen bedarf weiterführender Untersuchungen, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung antiproliferativ wirkender Substanzen. Dies spielt nicht nur in der Kardiologie, sondern auch in der Onkologie eine wichtige Rolle. So zeigt sich beispielsweise in der Umgebung solider Tumoren eine leichte Verminderung des pH-Wertes, wohingegen die meisten Tumorzellen selbst einen alkalischen intrazellulären pH aufweisen. Harguindey et al. (17) sehen in dieser Störung des Säure-Base-Haushaltes von Tumorzellen einen Angriffspunkt für neue Zytostatika, da sich dieses Ungleichgewicht anders als bei gesunden Geweben äußert und sich mit zunehmender Aggressivität der Tumoren verstärkt.

Reshkin et al. (41) zeigten, dass die Aktivierung des NHE-1 und die daraus resultierende intrazelluläre Alkalinisierung ein Schlüsselmechanismus in der malignen Transformation ist und durch spezifische Hemmstoffe des NHE-1, in diesem Fall

4. Diskussion

Dimethylamilorid (DMA), gehemmt werden kann. Von Wong et al. (62) und (63) wurde gezeigt, dass Inhibitoren des NHE und des Natrium-abhängigen Chlorid/Bikarbonat-Austauschers (NDCBE bzw. SLC4A8) einen selektiven zytostatischen Effekt auf das Zellwachstum von Tumor-Zell-Linien bei niedrigen extrazellulären pH-Werten besitzen. Wenn sie selbst sich auch nicht als eigenständige Zytostatika eignen, so könnten sie dennoch eine Tumor-selektive intrazelluläre Azidose auslösen und dadurch die Wirksamkeit von Zytostatika steigern.

Die Signaltransduktion vom I_1R ist Gegenstand weiterführender Forschung. Auch hier stellt sich die Frage, wie genau die intrazelluläre Signaltransduktion durch Medikamente beeinflussbar ist. Im Bereich von ERK1/2 wurde durch die Arbeitsgruppe Van Slambrouck et al. (57) eine neue Substanz untersucht: Tangeritin, ein Methoxyflavon, das aus Zitrusfrüchten gewonnen werden kann. Es hemmt u.a. das Wachstum menschlicher Brustkrebs-Zellen.

Es ergibt sich ferner die Frage, ob sich die mangelnde Hemmbarkeit der Erholung aus dem Sauren und Alkalischen durch Moxonidin bei HeLa Zellen darauf beruht, dass hier die S1P-Rezeptoren nicht exprimiert werden. Auch wäre es interessant, weitere Untersuchungen der endogenen Liganden des S1P-Rezeptors durchzuführen. Es wäre vorstellbar, analog zu unseren Messungen mit Moxonidin ähnliche Fluoreszenzmessungen unter Stimulation mit LPA oder S1P durchzuführen und die Wirkungen mit denen von Moxonidin zu vergleichen. Ferner wäre es möglich, Lysophospholipidsäure, Lysophosphatidylcholin u.a. in kardialen Fibroblasten mit HPLC nachzuweisen, um die Präsenz dieser endogenen Liganden der S1P-Rezeptoren abzuschätzen und neue Medikamente zur Behandlung der arteriellen Hypertonie bzw. der kardialen Fibrose zu finden.

Es wäre auch denkbar, Inhibitoren von Anionentransportern in weiteren Experimenten zu untersuchen. Dazu zählen z.B. S3705 (ein Hemmstoff des NDCBE), S20787 (ein Hemmstoff des AE) und Cariporide (ein Hemmstoff des NHE). Im Hinblick auf die klinische Anwendung dieser Substanzen bleibt allerdings weiterhin zu bedenken, dass es trotz der Hemmung des NBC bzw. des NHE zu einer Erholung aus dem Sauren kommt. Der NHE kann, falls er nicht durch spezifische Hemmstoffe zusätzlich gehemmt wird, die Aufgaben des NBC in ausreichendem Maße übernehmen (22). Dies spielt bei der kardialen Ischämie eine Rolle, bei der es zu einer intrazellulären Ansäuerung kommt. Während dieser Phase führt die Aktivierung des NHE und des NBC sehr wahrscheinlich zu einer intrazellulären Anreicherung von Natrium (55).

4. Diskussion

Durch den Natrium/Calcium-Austauscher kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Dies wiederum verursacht Störungen in der Calcium-Homöostase und der Kontraktilität, die sich klinisch u.a. in einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes und einer verlangsamten Relaxation äußern.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivität pH-regulierender Ionentransporter bei kardialen Fibroblasten und Tumorzellen unabhängig vom NHE zu untersuchen. Da in der Literatur die Bedeutung des NHE für die Alkalinisierung bei kardialen Fibroblasten und Tumorzellen bereits ausreichend beschrieben ist, wurden die meisten Versuche unter Hemmung des NHE mit HOE694 durchgeführt. Dabei ging es in erster Linie darum, den Einfluss verschiedener Substanzen (Wachstumsfaktoren in FBS und Moxonidin) auf die Aktivität der Ionentransporter näher zu charakterisieren.

Kürzlich wurde die Identität des I_1R aufgeklärt, an den Moxonidin bindet. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um einen $S1P_1$ -Rezeptor. Das Imidazolinderivat Moxonidin ist ein in der Klinik etabliertes Antihypertensivum, das im Vergleich zu Clonidin eine sehr hohe Affinität zum I_1R besitzt. Ferner senkt es den Sympathikotonus und steigert die Insulinsensitivität. Im Vordergrund der Arbeit stand die Frage, inwieweit die von Wachstumsfaktoren veränderte Aktivität von Ionenaustauschern durch Moxonidin beeinflusst werden kann. Da $S1P$ ebenfalls im FBS enthalten ist, wurde die Wirkung von Moxonidin auf die Aktivität von Ionentransportern in Abhängigkeit von der Stimulation mit FBS untersucht.

Erstens stellte sich heraus, dass die 30-minütige Inkubation kardialer Fibroblasten mit FBS eine Alkalinisierung hervorruft, die bei einer 24-stündigen Inkubation mit FBS bestehen bleibt. HeLa Zellen besaßen zwar einen höheren Ausgangs-pH-Wert als kardiale Fibroblasten. Jedoch hatte FBS bei HeLa Zellen eine ähnliche alkalinisierende Wirkung, die ebenfalls über 24 Stunden anhält.

Weiterhin untersuchten wir die Mechanismen, die zu dieser Alkalinisierung führten. So zeigte sich, dass FBS bei kardialen Fibroblasten einerseits eine Hemmung der Erholung aus dem Alkalischen bewirkte, was vermutlich auf der Hemmung von Anionenaustauschern durch FBS beruht. Andererseits bewirkte FBS eine Beschleunigung der Erholung aus dem Sauren, was bei der Hemmung des NHE mit HOE694 auf die Aktivierung des NBC zurückzuführen ist. Diese beiden Mechanismen scheinen daher hauptverantwortlich für die beobachtete Alkalinisierung durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu sein.

5. Zusammenfassung

Des Weiteren zeigte sich, dass sich HeLa Zellen und kardiale Fibroblasten in ihrer pH-Regulation voneinander unterscheiden. HeLa Zellen reagierten auf die Stimulation mit FBS zwar ebenfalls mit einer Alkalinisierung. Diese Alkalinisierung scheint jedoch vermehrt auf die Stimulation des NBC zurückzuführen zu sein, wohingegen FBS keinen Einfluss auf die Erholung aus dem Alkalischen hatte.

Moxonidin hemmte den AE unter der Voraussetzung, dass die kardialen Fibroblasten mit dem Minimalmedium mit nur 0,4% FBS inkubiert wurden. Unter bereits stimulierten Bedingungen mit 10% FBS zeigte sich bei Acetatpulsen keine signifikante Hemmung des AE durch Moxonidin. Dahingegen konnte Moxonidin den NBC nur dann hemmen, wenn dieser durch Inkubation mit FBS bereits stimuliert war, jedoch nicht unter den Bedingungen des Minimalmediums. Auf die pH-Regulation bei HeLa Zellen hatte Moxonidin in unseren Versuchen keinen Einfluss.

In Proliferationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der Zellen in einem sauren Milieu zu einer Hemmung des Zellwachstums führt. Moxonidin und HOE694 in Kombination führten bei HeLa Zellen zu einer Hemmung der Proliferation, wohingegen die Einzelsubstanzen keinen signifikanten Effekt hatten. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich die beiden Ionentransporter NHE und NBC auch bei HeLa Zellen gegenseitig ersetzen können. Außerdem bestätigen sich hiermit Experimente von Wong, Kleemann und Tannock (62), die in der pH-Regulation von Zellen durch die Beeinflussung von Ionentransportern einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung von Zytostatika sehen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Alvarez BV, Fujinaga J, Casey JR. Molecular basis for angiotensin II-induced increase of chloride/bicarbonate exchange in the myocardium. *Circ Res* 2001; 89(12):1246-1253.
- (2) Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR. Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol* 2004; 561(Pt 3):721-734.
- (3) Baetz D, Haworth RS, Avkiran M, Feuvray D. The ERK pathway regulates Na(+)-HCO₃(-) cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(5):H2102-H2109.
- (4) Birgbauer E, Chun J. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(23):2695-2701.
- (5) Boron WF, De Weer P. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 1976; 67(1):91-112.
- (6) Brilla CG, Rupp H, Maisch B. Effects of ACE inhibition versus non-ACE inhibitor antihypertensive treatment on myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. Retrospective analysis of 120 patients with left ventricular endomyocardial biopsies. *Herz* 2003; 28(8):744-753.
- (7) Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005; 65(1):40-51.
- (8) Camilion de Hurtado MC, Alvarez BV, Perez NG, Ennis IL, Cingolani HE. Angiotensin II activates Na⁺-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in ventricular myocardium. *Circ Res* 1998; 82(4):473-481.
- (9) Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 1992; 86(3):723-729.
- (10) Chazova I, Almazov VA, Shlyakhto E. Moxonidine improves glycaemic control in mildly hypertensive, overweight patients: a comparison with metformin. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8(4):456-465.

6. Literaturverzeichnis

- (11) Doyle B, Rihal CS, O'Sullivan CJ, Lennon RJ, Wiste HJ, Bell M et al. Outcomes of stent thrombosis and restenosis during extended follow-up of patients treated with bare-metal coronary stents. *Circulation* 2007; 116(21):2391-2398.
- (12) Edwards L, Ernsberger P. The I(1)-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells reverses NGF-induced ERK activation and induces MKP-2 phosphatase. *Brain Res* 2003; 980(1):71-79.
- (13) Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Sterbefälle (ab 1980). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, Nationalität, Todesursachen laut "Europäischer Kurzliste". Homepage: <http://www.gbe-bund.de/>. (14.12.2007).
- (14) Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321(19):1311-1316.
- (15) Gottdiener JS, McClelland RL, Marshall R, Shemanski L, Furberg CD, Kitzman DW et al. Outcome of congestive heart failure in elderly persons: influence of left ventricular systolic function. The Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med* 2002; 137(8):631-639.
- (16) Haenni A, Lithell H. Moxonidine improves insulin sensitivity in insulin-resistant hypertensives. *J Hypertens Suppl* 1999; 17(3):S29-S35.
- (17) Harguindey S, Orive G, Luis PJ, Paradiso A, Reshkin SJ. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756(1):1-24.
- (18) Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12(1):20-37.
- (19) Jin ZQ, Goetzl EJ, Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* 2004; 110(14):1980-1989.
- (20) Jin ZQ, Zhang J, Huang Y, Hoover HE, Vessey DA, Karliner JS. A sphingosine kinase 1 mutation sensitizes the myocardium to ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007; 76(1):41-50.

6. Literaturverzeichnis

- (21) Keul P, Sattler K, Levkau B. HDL and its sphingosine-1-phosphate content in cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007; 12(3-4):301-306.
- (22) 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):159-180.
- (23) Leem CH, Vaughan-Jones RD. Out-of-equilibrium pH transients in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1998; 509(Pt 2):471-485.
- (24) Lepran I, Papp JG. Effect of moxonidine on arrhythmias induced by coronary artery occlusion and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24 Suppl 1:S9-15.:S9-15.
- (25) Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347(18):1397-1402.
- (26) Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2002; 106(24):3068-3072.
- (27) Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage. 1998.
- (28) Mack CL. Serum cytokines as biomarkers of disease and clues to pathogenesis. *Hepatology* 2007; 46(1):6-8.
- (29) Mayor F, Jr., Jurado-Pueyo M, Campos PM, Murga C . Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 2007; 6(5):528-533.
- (30) Mazurais D, Robert P, Gout B, Berrebi-Bertrand I , Laville MP, Calmels T. Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(5):661-670.
- (31) McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000; 83(5):596-602.
- (32) Mitglieder der Ständigen Impfkommission (STIKO). Mitteilung der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut: Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren - Empfehlung und Begründung. *Epidemiologisches Bulletin* 2007; 12:97-103.

6. Literaturverzeichnis

- (33) Molderings GJ, Bonisch H, Bruss M, Wolf C, von K, I, Gothert M. S1P-receptors in PC12 and transfected HEK293 cells: molecular targets of hypotensive imidazoline I(1) receptor ligands. *Neurochem Int* 2007; 51(8):476-485.
- (34) Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, de Laat SW. Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 1983; 304(5927):645-648.
- (35) Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* 2004; 447(5):710-721.
- (36) Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS. Novel Molecular Mediators in the Pathway Connecting G-protein-coupled Receptors to MAP Kinase Cascades. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10(4):122-127.
- (37) National Cholesterol Education Program (NCEP). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25):3143-3421.
- (38) Nofer JR, van der GM, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck LK, Baba HA et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004; 113(4):569-581.
- (39) Odobasic S, Meyer M. Hämatologie-Zählkammern. Homepage: <http://www.mta-labor.info.de/>. (14.12.2007).
- (40) Rapizzi E, Donati C, Cencetti F, Pinton P, Rizzuto R, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate receptors modulate intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(2):268-274.
- (41) Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M et al. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14(14):2185-2197.
- (42) Romero MF, Fulton CM, Boron WF. The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch* 2004; 447(5):495-509.
- (43) Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev* 1981; 61(2):296-434.

6. Literaturverzeichnis

- (44) Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(7):560-570.
- (45) Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(2):320-344.
- (46) Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341(6):410-418.
- (47) Rupp H, Jacob R. Excess catecholamines and the metabolic syndrome: should central imidazoline receptors be a therapeutic target? *Med Hypotheses* 1995; 44(3):217-225.
- (48) Rupp H, Maisch B. Radiotelemetric characterization of overweight-associated rises in blood pressure and heart rate. *Am J Physiol* 1999; 277(4 Pt 2):H1540-H1545.
- (49) Salhany JM. Mechanism of competition between chloride and stilbenedisulfonates for binding to human erythrocyte band 3 (AE1). *Biochem Cell Biol* 1998; 76(5):715-722.
- (50) 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):53-59.
- (51) Schneider A, Schwarz TF, Hammerschmidt T, Siebert U. [Impact of vaccination against oncogenic human papillomavirus on the incidence and mortality of cervical cancer in Germany]. *Med Klin (Munich)* 2007; 102(7):515-523.
- (52) Sica DA. Centrally acting antihypertensive agents: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2007; 9(5):399-405.
- (53) Silber S, Borggrefe M, Böhm M, Hoffmeister H.M., Dietz R, Ertl G et al. Positionspapier der DGK zur Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamenten freisetzenden Stents (DES). *Der Kardiologe* 2007; 2:84-111.

6. Literaturverzeichnis

- (54) Sun Z, Chang CH, Ernsberger P. Identification of IRAS/Nischarin as an I1-imidazoline receptor in PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 2007; 101(1):99-108.
- (55) Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 1989; 65(4):1045-1056.
- (56) Touchard AG, Schwartz RS. Preclinical restenosis models: challenges and successes. *Toxicol Pathol* 2006; 34 (1):11-18.
- (57) Van Slambrouck S, Parmar VS, Sharma SK, De Bondt B, Fore F, Coopman P et al. Tangeretin inhibits extracellular-signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation. *FEBS Lett* 2005; 579(7):1665-1669.
- (58) Verma RP, Hansch C. Chemical Toxicity on HeLa Cells. *Curr Med Chem* 2006; 13(4):423-448.
- (59) Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13(7):1637-1652.
- (60) Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15(4):264-272.
- (61) Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 2004; 22(1):47-50.
- (62) Wong P, Kleemann HW, Tannock IF. Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *Br J Cancer* 2002; 87(2):238-245.
- (63) Wong P, Lee C, Tannock IF. Reduction of intracellular pH as a strategy to enhance the pH-dependent cytotoxic effects of melphalan for human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3553-3557.
- (64) Yusuf S, Pitt B. A lifetime of prevention: the case of heart failure . *Circulation* 2002; 106(24):2997-2998.

Lebenslauf

Persönliches

Name: Julie Anna Geraldine Mertens
Geburtsdatum: 26.01.1982
Geburtsort: Bielefeld
Familienstand: ledig
Adresse: Dörenbergstr. 3, 33699 Bielefeld

Schulbildung

1988 bis 1992 Grundschule Hillegossen, Bielefeld
1992 bis 2001 Ceciliengymnasium Bielefeld (Abitur 11. Juni 2001)

Studium

Sept. 2001 bis Nov. 2007 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Sept. 2003 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
Mai 2006 Annahme als Doktorandin
Aug. 2006 bis Juli 2007 Praktisches Jahr am Uniklinikum Marburg in den Fächern Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Unfallchirurgie, Anästhesie und Intensivmedizin sowie Innere Medizin (Schwerpunkte Nephrologie und Kardiologie)
Nov. 2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)
Nov. 2007 Approbation als Ärztin

Famulaturen

März 2004 Kardiologie, Uniklinikum Marburg
August 2004 Hausarztpraxis Dr. Hesse, Marburg
September 2004 Kardiologie, Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim
August 2005 Anästhesie und Intensivmedizin, Franziskus Hospital, Bielefeld
März 2006 Lungenheilkunde, Department of Respiriology and Sleep Disorders, University Health Network & Mount Sinai Hospital, University of Toronto

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren

Alter, Arnold, Aumüller, Baum, Basler, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Geks, Gemsa, Gerdes, Görg, Graf, Gress, Grimm, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hasilik, Hertl, Herzum, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Kanngiesser, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Lang, Langer, Löffler, Lohoff, Lutz, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rolfes, Röper, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schäfer, Schmidt, Schmitz, Schnabel, Seitz, Sommer, Steiniger, Suske, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Maisch (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie, Klinikum der Philipps-Universität Giessen und Marburg, Standort Marburg) danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit im Molekular-Kardiologischen Labor durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rupp (Leiter des Molekular-Kardiologischen Labors) als Betreuer dieser Arbeit. Durch die vielen Gespräche mit Ihnen habe ich wissenschaftliches Denken und Arbeiten gelernt und daran Freude gefunden. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass Sie immer ein offenes Ohr für Probleme hatten und mir dann mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau D. Wagner möchte ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Zellkultur - insbesondere im ersten Jahr der Arbeit - und die heitere Stimmung im Labor danken. Außerdem danke ich meinen Kollegen Herrn L. Klaening und Herrn T. Rupp für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Koch und Herrn Schüler aus den Technischen Werkstätten der Medizinischen Forschungseinheiten danke ich für ihre Hilfe bei technischen Problemen mit dem PC und dem Fluoreszenzmikroskop.

Nicht zuletzt danke ich meiner lieben Familie, die mich während des Studiums und der Zeit im Labor immer unterstützt hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Wachstumsfaktoren und Moxonidin auf den intrazellulären pH und die Proliferation bei kardialen Fibroblasten und HeLa Zellen“ im Med. Zentrum für Innere Medizin – Schwerpunkt Kardiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rupp ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfemittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 08. Januar 2008

Julie Anna Geraldine Mertens