

Der nicht-genomische Effekt des Mineralokortikoids
Aldosteron auf die Transportsysteme der
Erythrozytenmembran

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Lyubomira Ivanova

2006
Saarbrücken

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichterstatter:

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	i
II Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Grundlagen	1
1.1 Biosynthese und Freisetzung von Aldosteron	1
1.1.1 Das Renin-Angiotensin System (RAS)	3
1.2 Der genomische Effekt von Aldosteron.....	4
1.3 Aldosteronregulierte Proteine	5
1.4 Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron	7
1.4.1 Die Mechanismen des nicht-genomischen Effekts	9
1.4.2 Nicht-genomischer Rezeptor von Aldosteron	10
1.4.3 Signaltransduktion der nicht-genomischen Funktion von Aldosteron	11
1.5 Erythrozyten	13
1.5.1 Allgemeines	13
1.5.2 Zellmembran der Erythrozyten	14
1.5.3 Membranpermeabilität und Ionentransport	16
1.5.4 Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten	28
2. Material und Methoden	31
2.1 Chemikalien und Lösungen	31
2.2 K ⁺ -Influx Messung	34
2.2.1 Flüssigkeitsszintillationsmessgerät	34
2.2.2 K ⁺ -Influx Versuchsablauf	35
2.2.3 Hämatokritwertbestimmung	37
2.2.4 Berechnung des K ⁺ -Influges	37
2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des intrazellulären pH-Werts und des Ca ²⁺ -Transports in Erythrozyten	39
2.3.1 Fluoreszenzspektrometer	39
2.3.2 Messung mit BCECF AM	40
2.3.3 Kalibrierung des Fluoreszenzsignals zum	

intrazellulären pH-Wert	40
2.3.4 Messung mit Fluo-4 AM	41
2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des intrazellulären pH-Wertes und des Ca ²⁺ -Transports in Erythrozyten	41
2.4.1 Mikroskop	41
2.4.2 Versuchsaufbau mit BCECF AM	42
2.4.3 Versuchsaufbau mit Fluo-4 AM	44
2.4.4 Farbstoffbeladung	44
2.4.5 Vorbereitung des Mikroskops	47
2.5 Li ⁺ -Transport	49
2.5.1 Atomabsorptionsspektrometer (AAS)	49
2.5.2 Methode zur Bestimmung des Li ⁺ -Effluxes	50
2.4.3 Methode zur Bestimmung des Li ⁺ -Influxes	51
2.6 Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und Oberflächen: Ca ²⁺ -Transport Untersuchung	52
a) Borosilikat-Glas mit PLL (Kontrolle)	52
b) Mikro-/Nano-stukrurierte Oberflächen GPTS04 und ETC03 (INM)	52
c) Mikro-/Nano-strukturierte Polymeroberflächen (Science Park, Barcelona)	53
d) Organische Polymere auf Glasoberflächen	53
3. Ergebnisse	56
3.1 K ⁺ -Influx	56
a) K ⁺ -Influx an Humanerythrozyten	56
b) K ⁺ -Influx an Hühnererythrozyten	59
c) K ⁺ -Influx an Erythrozyten aus Nabelschnurblut	62
3.2 Fluoeszenzspekroskopische Untersuchung des intrazelluläre pH-Wertes und Ca ²⁺ -Transport von Erythrozyten	62
3.2.1 Untersuchung des intrazellulären pH-Wertes in Erythrozyten mit BCECF AM	63
3.2.2 Ca ²⁺ -Transport an Humanerythrozyten	67
3.3 Mikroskopischen Untersuchungen des intrazellulären pH-Wertes und des Ca ²⁺ -Transports bei Erythrozyten	68
3.3.1 Intrazellulärer pH-Wert der Erythrozyten	68

a) Intrazellulärer pH-Wert der Humanerythrozyten	68
b) Intrazellulärer pH-Wert der Hühnererythrozyten	72
c) Intrazellulärer pH-Wert von Erythrozyten aus Nabelschnurblut	72
3.3.2 Ca ²⁺ -Transport	74
a) Ca ²⁺ -Transport der Humanerythrozyten	75
b) Ca ²⁺ -Transport bei Hühnererythrozyten	79
c) Ca ²⁺ -Transport an Erythrozyten aus Nabelschnurblut	80
3.4 Li ⁺ -Flux	81
a) Li ⁺ -Efflux	81
b) Li ⁺ -Influx	84
3.5 Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und Oberflächen:	
Untersuchung des Ca ²⁺ -Transports	85
a) Borosilikat-Glas mit Poly-L-Lysine	86
b) Mikro-/Nano-strukturierte Oberfläche	87
c) Mikro-/Nano-strukturierte Polymeroberfläche	90
d) Organische Polymere auf Glasoberflächen	92
4. Diskussion und Ausblick	94
4.1 Auswirkungen des Aldosterons auf die Erythrozyten	95
4.2 K ⁺ -Influx	96
4.3 Fluoreszenzuntersuchungen des intrazellulären pH-Wertes	99
4.4 Intrazelluläre Ca ²⁺ -Fluoreszenzuntersuchung	101
4.4.1 Humanerythrozyten	102
4.4.2 Hühnererythrozyten	104
4.4.3 Erythrozyten aus Nabelschnurblut	105
4.5 Li ⁺ -Transport	105
4.6 Erythrozyten und artifizielle Oberflächen	107
4.7 Zusammenfassungen zum nicht-genomischen Effekt von Aldosteron	108
5. Zusammenfassung / Summary	110
6. Literaturverzeichnis	113
Erklärung	130
Danksagung	131

II Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD2.....	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
AAC	Atomabsorptionspektrometer
ACE	Angiotensin-Enzym (Angiotensin Converting Enzym)
ACTH	Adrenokortikotropen-Hormon
AE	Anionentauscher
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein
cAMP	3', 5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CCD	Charged Coupled Devices
CHIF	Kortikosteroidhormon-induzierten Faktor
CYP	Enzyme der Superfamilie Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
DFG	2,3-Diphosphoglycerat
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'- disulfonic acid disodium salt hydrate
DOC	11-Deoxykortikosterone
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
ENaC	Epithelial Na ⁺ -Kanal
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
HIS	Lösung hoher Ionenstärke (high ionic strength)
IP ₃	Inositoltriphosphat
K _{ATP}	ATP-sensitiven K ⁺ -Kanäle
KI-RAS.....	Kristen Ras GTP-Bindungsprotein-2A
LIS	Lösung geringer Ionenstärke (low ionic strength)

MAPK.....	Mitogen-aktivierte Kinase (mitogen-activated protein kinase)
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
pH _i	Intrazelluläres pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase
PLL	Poly-L-Lysine
PMT	Photomultiplier
RBC	rote Blutzellen
StAR.....	Steroid-Biosynthese Protein (steroidogenic acute regulatory protein)
Sgk	Serum- und Glukokortikoid- induzierende Kinasen
VDNSCC.....	Spannungsabhängiger, nicht-selektiver Kationen-Kanal
VSMC.....	Die glatte Muskulatur (vascular smooth muscle cells)
ZG	Zona Glomerulosa

1. Grundlagen

1.1 Biosynthese und Freisetzung von Aldosteron

Aldosteron ist ein Steroidhormon, das zu den Mineralokortikoiden gehört und wird aus Cholesterol in der Zona Glomerulosa (ZG) in der Nebennierenrinde als Folge einer Kettenreaktion aus lokalen und spezifischen Enzymreaktionen synthetisiert (Abb.1.1). Cholesterol wird hauptsächlich aus im Blut zirkulierenden Lipoproteinen hergestellt, daneben gibt es auch die *de novo*-Synthese in der Nebennierenrinde wobei aus Acetyl-CoA Cholesterol entsteht. Der für die Aldosteron Synthese wichtige Transport von Cholesterol aus der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran wird durch ein kürzlich entdecktes Protein (StAR, steroidogenic acute regulatory protein) stimuliert. StAR Proteine sind in allen steroidproduzierenden Geweben lokalisiert (Stocco, 2001a) und daher wird ihnen eine Hauptrolle in der Steroidogenese zugewiesen. Ein Beweis dafür sind die Untersuchungen an Patienten mit angeborener Lipid-Adrenaler Hyperplasia, die durch eine Mutation des StAR-Gens gekennzeichnet ist. Diese Mutationen verhindern die Steroidproduktion sowie die Akkumulation von Cholesterol in der Nebennierenrinde (Lin *et al.*, 1995). Die StAR-Gen Expression wird nahezu von allen Wirkstoffen, die die Steroidogenese stimulieren, erhöht. Die Translokation des Cholesterols zu der inneren Mitochondrienmatrix wird als der limitierende Faktor für die Steroidbiosynthese angesehen (Stocco, 2001b).

In der nachfolgenden Transformation, die in den Mitochondrien stattfindet, wird Cholesterol zu Aldosteron umgewandelt. Bei dieser Umwandlung werden verschiedene enzymatische Reaktionen durchlaufen, die von Dehydrogenasen und multifunktionalen Oxidasen katalysiert werden. Die meisten dieser Enzyme

gehören zu den Cytochromen P450 (CYP), die wiederum der Superfamilie der Häm-Enzyme zugeordnet werden. Diese Enzyme benötigen Redoxpartner (Adrenodoxin / Adrenodoxin-Reduktase), die die Elektronen von NADPH auf das P450-Enzym übertragen, wo sie als Reduktionsäquivalent für die Hydroxylierung fungieren (Lambeth *et al.*, 1982).

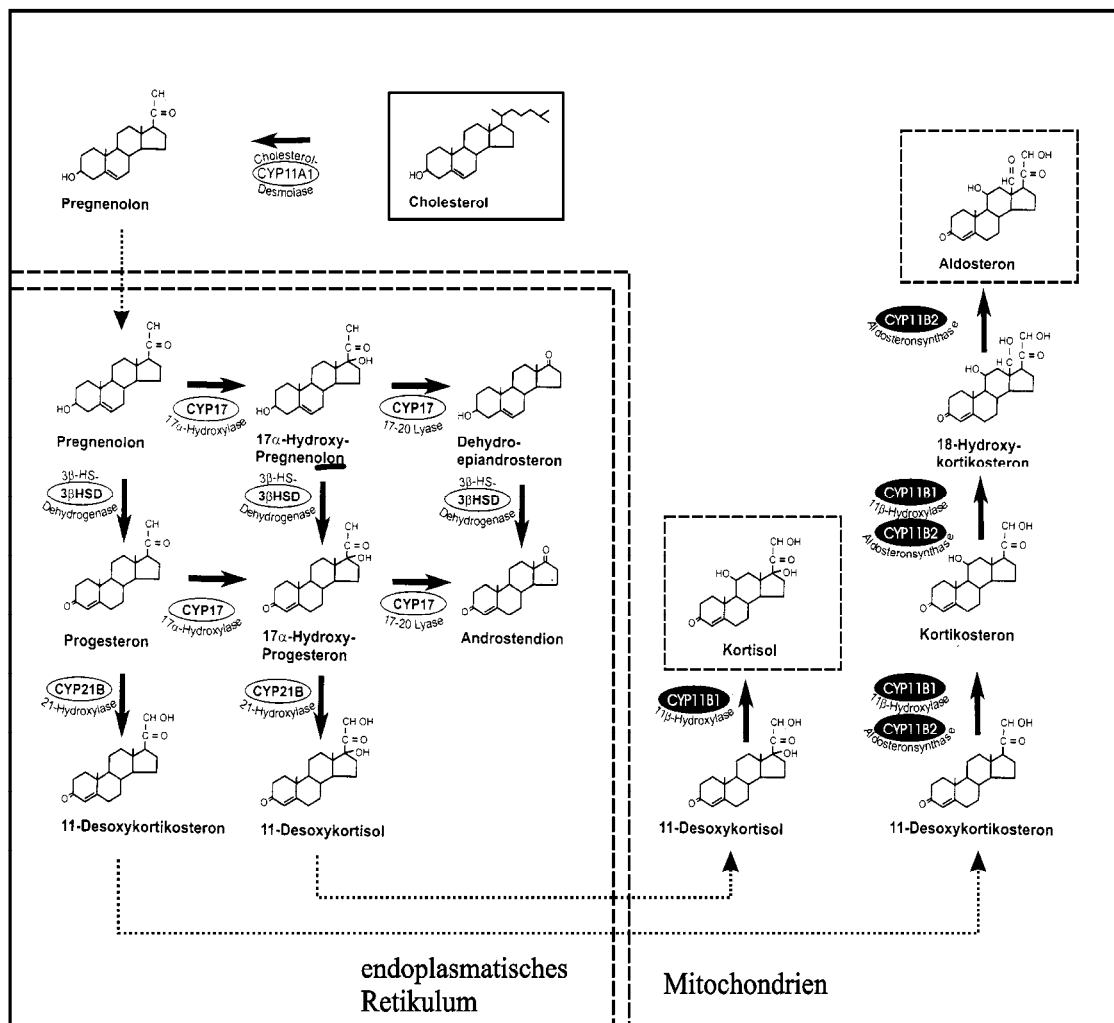


Abb. 1.1: Adrenale Steroidsynthese

Die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon erfolgt in drei Schritten: 20 α -Hydroxylierung, 22-Hydroxylierung, Abspaltung der Seitenkette zwischen C₂₀ und C₂₂. Diese Reaktionen werden im Mitochondrium von einem einzigen Cytochrom, dem Side-chain-cleavage-Enzym katalysiert. Pregnenolon wird ins Cytosol transportiert und kann dort zwei verschiedene Prozesse durchgehen: entweder wird es durch die mikrosomale 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Progesteron

dehydrogeniert und isomerisiert, oder aber durch die mikrosomale 17 α -Hydroxylase zu 17-Hydroxypregnenolon hydroxyliert (Connel *et al.*, 2005).

Progesteron wird durch die 21-Hydroxylation vom CYP21A Enzym des Endoplasmatischen Retikulums in 11-Desoxykortikosteron (DOC; Shinzawa *et al.*, 1988) umgewandelt. Die Konvertierung von DOC in Aldosteron schließt drei aufeinander folgende Reaktionen ein: 11 β -Hydroxylierung von DOC zu Kortikosteron, 18-Hydroxylierung zu 18-Hydroxykortikosteron und schließlich 18-Methyl-Oxidation zu Aldosteron. Die Reaktionen werden katalysiert von der Aldosteron-Synthase, die sich auf der inneren mitochondrialen Membran befindet und vom CYP11B2-Gen kodiert ist. Der charakteristische Syntheseschritt für Aldosteron ist die Oxidierung der Methylgruppe am C₁₈-Atom. Die Aldosteron-Synthase weist eine hohe Ähnlichkeit (ca. 93%) zu der 11 β -Hydroxylase, die die Umwandlung von 11-Deoxykortisol zu dem Glukokortikoid Kortisol katalysiert, auf.

Nach diätetischer Natrium-Verarmung bzw. vermehrter Kalium-Zufuhr erhöht sich sowohl die Anzahl der Glomerulosa-Zellschichten (Ogishima *et al.*, 1992) als auch der mRNA-Gehalt für die Aldosteron-Synthase (Tremblay *et al.*, 1992).

1.1.1 Das Renin-Angiotensin System (RAS)

Die Synthese des Mineralokortikoids Aldosteron wird im Gegensatz zur ACTH-abhängigen Sekretion der Glukokortikoide durch ein komplexes, multifunktionelles System reguliert, dem Renin-Angiotensin-System.

Renin, ein proteolytisches Enzym, wird auf folgende Stimuli aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere ins Blut freigesetzt: Natrium-Mangel, Hypovolämie, Blutdruckabfall und renale sympathische Reize. Zirkulierendes Angiotensinogen (Renin-Substrat) der Leber wird daraufhin durch Renin zu Angiotensin I, einem Dekapeptid, gespalten, das wiederum sehr schnell, vorwiegend in der Lunge, vom Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in ein Oktapeptid, das Angiotensin II, umgewandelt wird. Angiotensin II wirkt stark vasopressorisch und stimuliert über spezifische Membranrezeptoren in der ZG sowohl das Side-chain-cleavage-Enzym, als auch die Aldosteron-Synthase und somit die Biosynthese des Aldosterons. Seine Wirkung entfaltet das Angiotensin II nicht über eine Stimulation der Adenylatcyclase wie ACTH, sondern über die

Aktivierung der Phospholipase C und die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Bisphosphat mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da die Plasma-Renin-Konzentration der limitierende Faktor im RAS ist, unterliegt sie einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Die Freisetzung des Renins wird direkt durch Angiotensin II und Hypokalämie und indirekt über Aldosteron durch Steigerung der Na^+ -Rückresorption und Plasmavolumen-Expansion gehemmt. Dabei bewirkt Aldosteron in den distalen Tubuli und den Sammelrohren der Niere die passive Na^+ -Reabsorption über eine erhöhte Anzahl geöffneter Na^+ -Kanäle in der apikalen Membran der Epithelien. Gleichfalls wird die K^+ -Exkretion durch spezifische K^+ -Kanäle gesteigert. Aldosteron fördert auch die Synthese der Na^+/K^+ -ATPase in den basolateralen Zellmembranen und schafft somit den elektrochemischen Gradienten für die passive Diffusion dieser Ionen (White, 1994).

1.2 Der genomische Effekt von Aldosteron

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden eine Abnormität in der embryonalen Entwicklung und weitere Krankheiten mit Defekten in der Steroid- und Thyroidhormonbiosynthese in Verbindung gebracht (Gudernatsch, 1912). Die Analyse wurde dabei auf die zellulären und molekularen Mechanismen, die an den entsprechenden Steroidwirkungen der Zielgewebe beteiligt sind, fokussiert (Beato, 1989; Beato *et al.*, 1996; Beato und Klug, 2000).

Nach der allgemeinen Theorie von Steroidfunktionen diffundieren die Steroide entweder passiv über die Membran oder gelangen aktiv über einen Transporter in die Zelle. Ein intrazellulärer Rezeptor, lokalisiert im Cytosol, bindet die Steroide, dadurch entstehen Konformations-Umwandlungen. Die intrazellulären Rezeptoren gehören zu der Kern-Superfamilie und bestehen aus mehreren funktionalen Domänen: N-terminale Domänen, hoch-konservierte DNA-Bindungsdomänen und C-terminale Ligandbindungsdomänen (Arriza *et al.*, 1987). Die Konformations-Umwandlungen führen zu einer Dissoziation von Proteinen, wodurch die Rezeptoren in die aktive Form übergehen. Dabei steigt die DNA-Affinität der DNA-Bindungsdomäne an. Der dissoziierte Rezeptor-Steroid-Komplex wandert zum Zellkern, wo er die Transkription von Genen in mRNA auslöst. Zuletzt wird die

mRNA in ein Proteinmolekül umgewandelt, welches letztendlich eine biologische Funktion ausübt (Beato *et al.*, 1996; Beato und Klug, 2000). Aldosteron bindet an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR), der Mitglied der Kernrezeptor-Familie ist.

Der Rezeptor-Steroid-Komplex kann auch durch einen Prozess, bekannt als Transkriptionsinterferenz, oder Synergie wirken (Karin, 1998), wobei er mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert und sich selbst mit der DNA verbindet, um Transkriptionsaktivität auszulösen oder zu unterbinden. Das ermöglicht eine transkriptionale Modulation ohne direkte Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor-Steroid-Komplex mit der DNA. Die Funktion von Aldosteron im Epithel besteht aus frühen (1 – 6 h) und aus späten (> 6 h) Phasen (Abb. 1.2). Die frühe Phase ist durch Veränderungen in der Genexpression gekennzeichnet, die die Ionenkanäle und die Signalproteine aktivieren, welche dann ihrerseits Elektrolyttransportproteine induzieren. Die späte Phase resultiert sowohl aus den Primär-, als auch aus den Sekundäreffekten der Genexpression.

Die Funktion wurde „genomisch“ genannt, da es sich um eine Gen-Manipulation handelt, deren Folgen offensichtlich sind.

1.3 Aldosteronregulierte Proteine

Funktion der Serum- und Glukokortikoid-induzierenden Kinasen (Sgk)

Ein vor kurzem identifiziertes Aldosteron-induziertes Protein Sgk hat große Aufmerksamkeit erlangt (Naray-Ferjes-Toth *et al.*, 2000; Pearce, 2001). Sgk ist ein primär Aldosteron-induziertes Gen im Nierenepithel. Aldosteron erhöht das Niveau von Sgk innerhalb von 15 - 30 min, es erreicht einen Höchstwert nach 1 - 2 Stunden und fällt anschließend schnell auf den Ausgangswert zurück. Die Überexpression von Sgk in heterologen *Xenopus leavis* Oocyten führt zur Aktivierung von epithelialen Na⁺-Kanälen (ENaC, epithelial sodium channel). Das Sgk Protein scheint auch bei der Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase und des Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Kotransporters eine Rolle zu spielen.

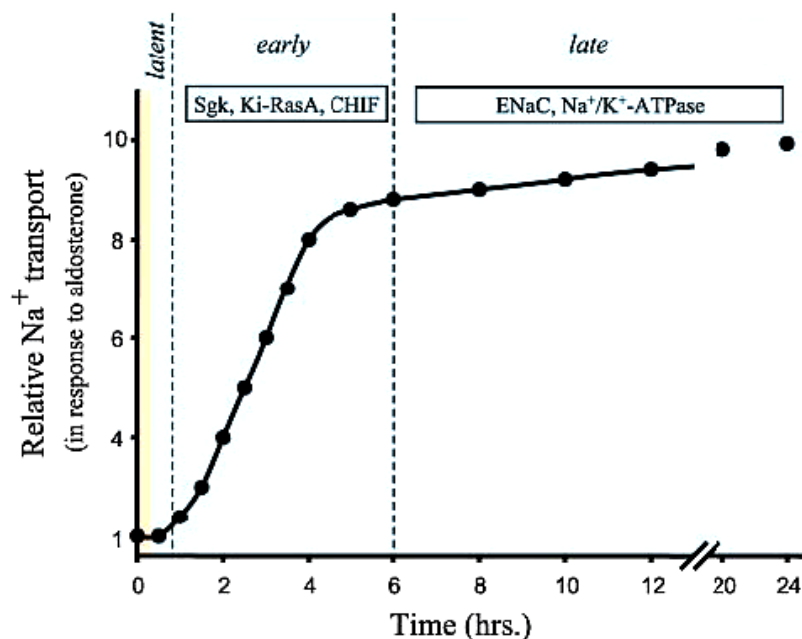


Abb. 1.2: Der genomische Effekt von Aldosteron in Epithelzellen (aus Stockard *et al.*, 2002).

Aktuelle Studien an gesunden Mäusen bestätigen, dass Aldosteron einen markanten Anstieg der Sgk-Expression im distalen Tubulus der Nieren auslöst. Die Bedeutung dieses Proteins für die Funktion von Aldosteron ist dokumentiert in einer Studie an einem transgenen Maus-Modell. In diesem Modell fehlen dem Sgk-Protein die funktionierenden Kinasen. Die Tiere zeigen einen milden Verlauf von Pseudohypoaldosteronismus. Eine Na⁺-Restriktion führt zu einem gesteigerten Na⁺-Verlust sowie Hyperkalemia in den Nierenzellen (Wulff *et al.*, 2001). Die genaue Funktion von Sgk ist allerdings noch nicht geklärt.

Funktion des Kristen Ras GTP-Bindungsproteins-2A (Ki-RasA)

Die Expression der kleinen, monomeren Ki-RasA wird während der frühen Wirkungsphase von Aldosteron induziert und ist für die Effekte von Aldosteron auf den Na⁺-Transport im Nierenepithel erforderlich. Die Ki-RasA übt scheinbar zwei entgegengesetzte Effekte auf den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) aus. Die Überexpression in *Xenopus leavis* Oocyten zeigt, dass Ki-RasA nicht nur die Kanäle offen hält, sondern auch die Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran reduziert (Mastroberardino *et al.*, 1998; Stockand, 2002; Stockand und Meszaro, 2003). Der Mechanismus, welcher die Modulation ausführt, ist noch unklar.

Funktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Es wird vermutet, dass die Lipid-Kinase, PI3K, eine Rolle in den Funktionen von Aldosteron, Insulin und Vasopressin spielt. Obwohl sie nicht als Aldosteron-induziertes Protein betrachtet wird, steigt ihre Aktivität in den Nieren in Anwesenheit von Aldosteron und Insulin an (Blazer-Yost *et al.*, 1998; Edinger *et al.*, 1999; Stockand, 2002). Die Inhibierung von PI3K reduziert die beiden genomischen Funktionsphasen von Aldosteron. Ähnliche Effekte wurden bei Insulin-induziertem Na^+ -Transport festgestellt. Eine Stimulierung des Na^+ -Transports in den Nieren durch antidiuretische Hormone ist teilweise von PI3K abhängig. Deshalb wird dieser Kinase eine zentrale Rolle bei den Signalwegen von Aldosteron, Insulin und Vasopressin zugeschrieben. Die Hormone üben eine gemeinsame Funktion auf ENaC und Na^+/K^+ -ATPase aus.

Funktion des Kortikosteroidhormon-induzierten Faktors (CHIF)

CHIF ist in der basolateralen Membran der Epithelzellen, im distalen Kolon und im Nephron exprimiert. Er gehört zu der FXYD-transmembranen Familie von sieben Proteinen, davon enthalten zwei das gleiche Motiv und drei andere Aminosäuren, die die Ionenkanäle und Transportproteine regulieren (die γ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase gehört ebenfalls zu dieser Familie) (Stockand, 2002, Geering *et al.*, 2003). Es ist noch unklar, ob Familienmitglieder untereinander funktional ersetzt werden können. Aldosteron stimuliert die CHIF-Expression, die entstehenden Proteine wirken mit den anderen, vorher genannten Aldosteron-regulierenden Proteinen zusammen, um den Transport zu stimulieren. Bei Untersuchungen an „knockout“ Mäusen wurde besonderes Augenmerk auf die Rolle von CHIF in der Elektrolytbilanz gelegt. Eine K^+ -Aufladung und eine gleichzeitige Furosemid-Zugabe führte zum Tode von CHIF-„knockout“ Mäusen, aber nicht von der „Wild-Typ“ Kontrolle (Aizman *et al.*, 2002).

1.4 Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron

Bereits 1941 wurde eine schnelle Steroidwirkung von Aldosteron nachgewiesen. Bei intravenöser bzw. intraperitonealer Verabreichung an der Ratte hat Selye einen anästhetischen Effekt der Steroide beobachtet (Selye, 1942). Klein und Henk

berichteten 1963 ebenfalls von einer schnellen Wirkung von Aldosteron. Sie notierten den Anstieg der peripheren Gefäßresistenz und des Blutdrucks, sowie die Abnahme des Herzzeitvolumens innerhalb von 5 Minuten nach intravenöser Zugabe von Aldosteron. Spach and Streeten (1964) haben einen verzögerten Na^+ -Austausch in Hundeerythrozyten innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von Aldosteron, in physiologischer Konzentration, demonstriert. Diese Experimente ließen erstmals vermuten, dass Aldosteron auch einen nicht-genomischen Effekt hat, da zum einen die durch Aldosteron verursachte Wirkung schnell eintritt und zum anderen auch kernlose Zellen beeinflusst werden. Der beobachtete Effekt an Erythrozyten kann nicht mit der Modulation der Transkription und der Translation erklärt werden (Abb.1.3).

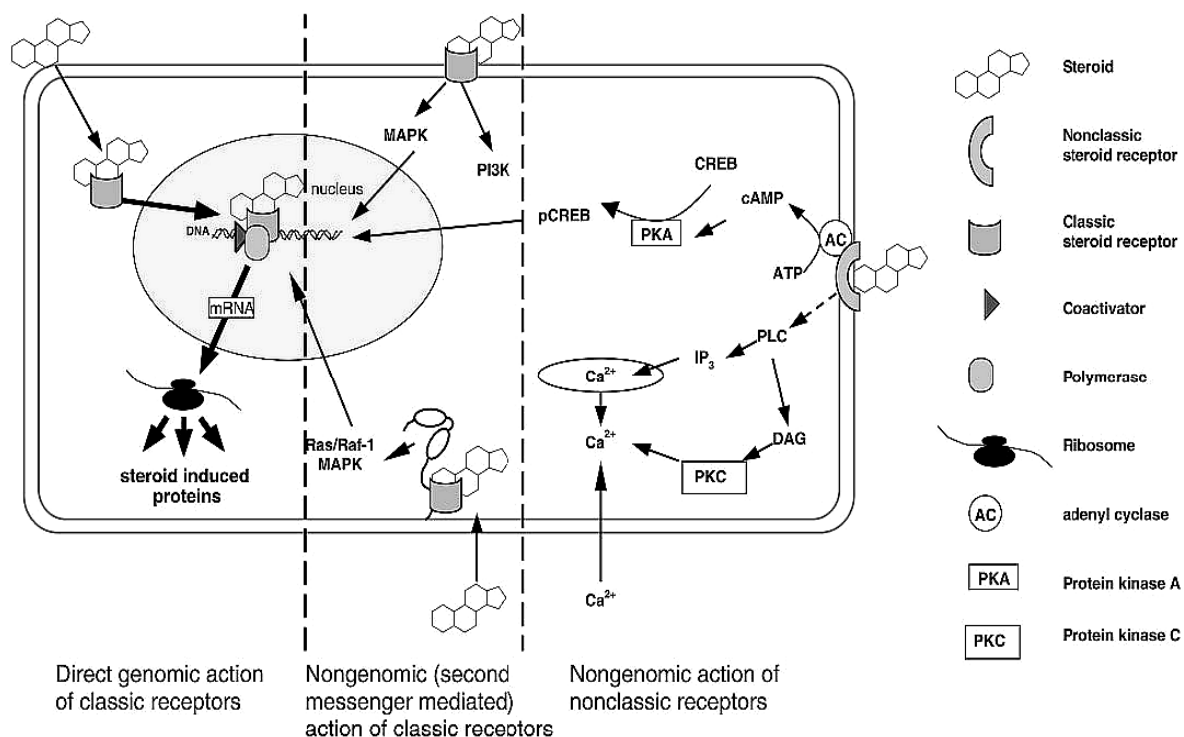


Abb. 1.3: „Cross-talk“ zwischen nicht-genomischem und genomischem Effekt für Steroide und steroidähnliche Moleküle wie 3,3,5-Triiodothyronin (T3) / Thyroxin (T4). Das vereinfachte Schema fasst einige Reaktionen zusammen, da es nicht generell auf alle Steroide und Zelltypen anwendbar ist (aus Lösel und Wehling, 2003).

Neue Untersuchungen zeigen, dass von Aldosteron mehrere Effekte induziert werden, die nicht in Verbindung mit dem Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) gebracht werden können (Christ und Wehling, 1999; Verrey, 1998; Wehling *et al.*, 1995; 1998). Diese Funktionen wurden als nicht-genomisch bezeichnet, um sie von dem genomischen Effekt zu unterscheiden. Der genomische Effekt resultiert aus einer Gentranskription nach Aktivierung des Kernrezeptors (siehe oben). In vielen Zelltypen induziert Aldosteron eine rapide (< 15 min) Steigerung von Inositoltriphosphat (IP_3) und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine Verminderung der Proteinkinase C Aktivität und eine Aktivierung der Na^+/K^+ -Pumpe. Diese Wirkungen wurden bei humanen, mononuklearen Leukozyten, glatter Muskulatur (VSMC, vascular smooth muscle cells) und Kardiomyozyten von Ratten beobachtet. Spezifische Antagonisten des MR's und die Hemmung der Transkription bzw. der Proteinsynthese haben diesen Effekt von Aldosteron nicht beeinflusst (Christ *et al.*, 1995, Christ und Wehling 1999, Wehling *et al.*, 1991).

Placebo-Kontrolluntersuchungen beim Menschen können weiterhin zeigen, dass bei einer intravenösen, überdosierten Gabe von Aldosteron signifikante Veränderungen der systemischen Gefäßresistenz und der Herzleistung auftreten. Diese Effekte sind transient, d.h. sie treten innerhalb von 3 Minuten auf und sind bereits nach 10 Minuten nicht mehr nachweisbar. Das Auftreten dieser Effekte ist zu schnell, um ihn mit dem genomischen Effekt erklären zu können (Schmidt *et al.*, 1999; Wehling *et al.*, 1998).

1.4.1 Die Mechanismen des nicht-genomischen Effekts

Der nicht-genomische Effekt wird durch Konzentrationsschwankungen und/oder die Aktivität des intrazellulären Second-Messenger-Systems ausgelöst. An diesem Prozess sind unter anderen Signaltransduktions-Kaskaden beteiligt (Abb. 1.3). cAMP erhöht die Wirkung von Aldosteron in VSMC und Darmzellen. Das Phosphatidylinositol Second-Messenger-System spielt in vielen Zelltypen eine wichtige Rolle als weiterleitendes Aldosteron Signal. Schnelle Anstiege der Diacylglycerol (DAG)- und IP_3 -Konzentrationen sind in VSMC, Skelettmuskelzellen, Lymphozyten, Endothelzellen und verschiedenen Nieren- und Darmzellen zu beobachten.

Gekle *et al.* (2001) und Krug *et al.* (2002) berichten über eine schnelle Aktivierung von weiteren Proteinkinasen (MAP-Kinase ERK 1/2; Src-Kinase; EGF (epidermal growth factor), Rezeptor-Tyrosinkinasen) durch Aldosteron in der Nierenzelllinie MDCK-C11 und ähnlichen Zelllinien in kortikalen Darmzellen. Alle Kinasen sorgen für eine rapide Signalübertragung auf andere Steroidhormone. MAP- und Src-Kinase übermitteln mehrere Signale, die Einfluss auf den Wachstumsfaktor, Cytokine und die Stress-Antwort haben.

Der EGF-Rezeptor reguliert in Verbindung mit dem Steroidhormon die Zellproliferation, die Differenzierung und den Ionentransport. Die von Aldosteron verursachte Aktivierung von MAP-, Src- und EGF-Rezeptor-Kinasen ist gegenseitig abhängig. Nach dem Model von Krug (2002) aktiviert Aldosteron zuerst die Src-Kinasen, die zusammen mit EGF die EGF-Rezeptor-Kinase koaktiviert. Darauf folgend wird die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert. Die Aldosteron-induzierte MAP-Kinase aktiviert ihrerseits den Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) in Kulturmodellen von Nierenzellen, wobei der genaue Zusammenhang noch nicht geklärt werden konnte. Gezeigt wurde, dass Inhibitoren der MAP-Kinase-Kaskade zur Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers führen (Gekle *et al.*, 2001).

1.4.2 Nicht-genomischer Rezeptor von Aldosteron

Aldosteron übt eine Doppelfunktion als Rezeptor-Ligand bzw. als Steroidhormon aus. Die nicht-genomische Wirkung kann eventuell als Folge der Aktivierung der klassischen Steroidrezeptoren (MR), oder der neu entdeckten Rezeptoren in der Phospholipidmembran interpretiert werden. Die meisten Studien bestätigen, dass die nicht-genomische Funktion von Aldosteron durch Membran-Rezeptoren vermittelt wird, die nicht sensitiv für die klassischen MR Inhibitoren, wie z. B. Spironolacton und Kaliumcanreonat sind (Falkenstein *et al.*, 2000; Ngarmukos und Grekin, 2001). Die überzeugendste Studie, die MR als Mediator für die nicht-genomische Funktion ausschließt, wurde an „knockout“ Mäusen durchgeführt, denen die MR Rezeptoren fehlen (Haseroth *et al.*, 1999). In den Fibroblasten dieser Mäuse haben die Konzentrationen von Ca²⁺ und cAMP innerhalb weniger Minuten (< 3 Min) nach Aldosteron-Zugabe zugenommen. In einem Kontroll-experiment mit Überexpression des MR in Zellen, denen normalerweise MR und

ein Aldosteron-Effekt fehlt, konnte keine nicht-genomische Antwort induziert werden (Falkenstein *et al.*, 2000).

Der nicht-genomische Rezeptor ist höchstwahrscheinlich ein membranständiges bzw. nahe der Membran assoziiertes Protein. Er hängt möglicherweise von MR ab, welcher sich in seiner nicht aktiven Form im Zytosol und in seiner aktiven Form im Kern befindet. Außerdem ist die Bindung von Aldosteron an den nicht-genomischen Rezeptor unterschiedlich zu der an MR.

Im Gegensatz zu Aldosteron sind Glukokortikoide, die in physiologischen Konzentrationen fähig sind, sich an den MR zu binden und die Mineralokortikoid-Reaktion in Anwesenheit von inhibiertem 11 β -HSD2 zu starten, scheinbar nicht in der Lage, eine nicht-genomische Funktion auszulösen. Ein 50 kDa großes Membranprotein, das sich mit Aldosteron verbindet, jedoch nicht mit Glukokortikoiden, wurde von Eisen *et al.* (1994) isoliert. Die Charakterisierung dieses isolierten, putativen nicht-genomischen Aldosteron-Rezeptors steht noch aus.

1.4.3 Signaltransduktion der nicht-genomischen Funktion von Aldosteron

Die nicht-genomische Funktion von Aldosteron wird von unzähligen Second-Messengern reguliert. In VSMC stieg durch Aldosteron schnell die Phosphoinositol-Hydrolyse, wodurch nachfolgend die DAG und IP₃ Konzentrationen erhöht wurden (Christ *et al.*, 1995). In diesen Zellen fördert Aldosteron schnell die Translokation der Proteinkinase (PKC), die sensitiv für DAG- und IP₃-abhängige Ca²⁺-Ausschüttungen ist. Des Weiteren blockieren die Inhibitoren der PKC die rapide Aktivierung des Na⁺/H⁺-Antiporters durch Aldosteron (Ebata *et al.*, 1999). Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass Aldosteron sehr schnell die PKC in Myozyten inhibiert (Sato *et al.*, 1997). Trotzdem spielt die PKC-Signalwirkung eine zentrale Rolle in der nicht-genomische Funktion des Aldosterons. Doolan *et al.* (1998) konnte zeigen, dass Aldosteron in Darmzellen PKC direkt und unabhängig von Second-Messengern (DAG- und IP₃) aktiviert. Die Autoren nehmen an, dass die PKC eventuell der nicht-genomische Rezeptor in diesem Zellentyp sein könnte.

Aldosteron erhöht schnell das cAMP-Niveau durch die Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration und des PKC-Signals im glatten Muskel. Normalerweise sind die Ca^{2+} - und PKC-Signale mit der Kontraktion im glatten Muskel assoziiert, wo das cAMP-Signal mit der Muskel-Relaxation verbunden ist. Diese scheinbare gegensätzliche Aldosteron-Funktion auf das Second-Messenger-System des glatten Muskels könnte ein Mechanismus sein, bei dem die Zellen auf schnelle Kontraktion/Relaxations-Zyklen vorbereitet werden. Tatsächlich wurde eine ähnliche Hypothese vorgeschlagen, um den scheinbar paradoxen Befund zu erklären, dass Aldosteron im Darmepithel schnell die ATP-sensitiven K^+ -Kanäle (K_{ATP}) aktiviert, aber die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle inhibiert (Maguire *et al.*, 1999).

Die Endeffektoren der nicht-genomischen Funktion des Aldosterons sind eine Isoform des Na^+/H^+ -Antiporters (NHE3), K^+ -Kanäle und Proteine, die an der zellulären Elektrolyt- und Fluidbalance sowie am Ca^{2+} -Stoffwechsel beteiligt sind (Falkenstein *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2001). Die physiologischen Konsequenzen dieser Effekte sind auf dem zellulären Niveau zu sehen; sie führen zu zeitabhängigen Veränderungen von zellulärem pH-Wert, sowie den Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Konsequenzen für physiologische Abläufe solcher kurzlebigen Regulationsprozesse sind allerdings noch unklar.

Aufkommende Hinweise deuten darauf hin, dass der nicht-genomische Effekt von Aldosteron wichtig für eine lokale Aldosteron-Produktion ist. Die Systeme für eine lokale Produktion von Aldosteron und die Auswirkung dieser Produktion sind noch unklar (Ngarmukos und Grekin, 2001). Neue Ergebnisse zeigen, dass Aldosteron auch im Herz synthetisiert wird und es extrarenales- und Darmgewebe schädigt. Diese Studien zeigen z. B., dass Aldosteron eine Herzfibrose bzw. ein Herzversagen bei Patienten mit erhöhtem Blutdruck erzeugt. Dieser Effekt wird möglicherweise vom Herz- und Gefäß-MR vermittelt und ist bei Herzversagen erhöht. Die Herz- und interstitielle Fibrose wird durch Aldosteron gesteigert und durch MR-Antagonisten blockiert. Diese Erkenntnisse führen dazu, dass das bisherige Verständnis von Aldosteron neu überdacht werden muss (Young und Funder, 2000). Aldosteron kann nachweislich auf verschiedene Zelltypen, z.B. Leukozyten, Neuronen, Herzfibroblasten, Myozyten, Gefäßepithelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, wie auch auf das Fettgewebe, wirken.

1.5 Erythrozyten

1.5.1 Allgemeines

Die Erythrozyten entstammen dem hämatopoetischen Gewebe, das sich beim Säugling in Leber und Milz und beim Erwachsenen im roten Mark der flachen Knochen befindet. Das hämatopoetische Gewebe enthält Stammzellen, aus denen sämtliche Blutzelltypen gebildet werden, d.h. Erythrozyten, alle Formen der Leukozyten sowie die Thrombozyten. Diese Stammzellen haben zwei herausragende Eigenschaften, die in dieser Kombination bei anderen Körperzellen nicht vorkommen: sie sind pluripotent, d.h. sie können sich zu den verschiedenen Formen der Blutzellen entwickeln, und sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, d.h. sie können identische Kopien von sich selbst herstellen.

Die jüngsten Erythrozyten-Typen, die das Knochenmark verlassen, sind die **Retikulozyten**. Durch geeignete Färbemethoden lassen sich im Blutaussstrich in den Retikulozyten eine netzartige Struktur, das Retikulum, nachweisen, die aus mRNA mit assoziierten Ribosomen besteht und 2 - 3 Tage nach der Ausstoßung des Kernes aus den Normoblasten nachweisbar ist. Der Anteil der Retikulozyten an der gesamten Erythrozytenzahl beträgt normalerweise 0,5 - 2%. Da jeder Erythrozyt das Knochenmark als Retikulozyt verlässt, ist die Bestimmung der Retikulozytenzahl im Blut ein Maß für die erythropoietische Leistung des Knochenmarks.

Die reifen roten Blutzellen (RBC) sind kernlose Zellsysteme ohne Organellen, die von einer Membran umschlossen sind. Die Erythrozyten enthalten den roten Blutfarbstoff Hämoglobin. Hämoglobin ist ein Chromoprotein, das aus Globin und vier Häm-Molekülen besteht, sein Anteil beträgt ca. 34% des Gesamtvolumens. Durch freie -COOH- und -NH₂- Gruppen des Hämoglobins in den Erythrozyten bleibt die Pufferung des Blut-pH-Wertes unverändert. Der Anteil des Hämoglobins an der Gesamtpufferkapazität des Blutes beträgt ca. 30%.

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Gastransport. Erythrozyten nehmen Sauerstoff in der Lunge auf, indem er an Hämoglobin gebunden wird. Der gebundene Sauerstoff wird zum Gewebe transportiert, wo der Gasaustausch erfolgt. Auf dem Rückweg zur Lunge ist Hämoglobin auch beim CO₂-Transport

beteiligt. Der Energiebedarf wird durch anaerobe Glykolyse gedeckt, da die Erythrozyten aufgrund ihrer Funktion keine Mitochondrien besitzen und somit nicht den von ihnen zu transportierenden Sauerstoff (O_2) verbrauchen.

Das Membranskelett (Zytoskelett) des Erythrozyten hat die Fähigkeit in den engen Gewebskapillaren die Form zu ändern und ist damit für die Mikrozirkulation von großer Bedeutung. Normalerweise sind die Erythrozyten kleine, bikonkave Scheiben, so genannte Diskozyten, die einen Durchmesser von 7,5 - 8 μm und eine mittlere Dicke von 1,5 - 2 μm haben. Die bikonkave Scheibenform der Erythrozyten bedingt ein hohes Oberflächen-/Volumenverhältnis, das einen besseren Gasaustausch ermöglicht. Die RBC können auch andere Formen annehmen, wie Echinozyten und Stomatozyten. Die Formveränderungen der Erythrozyten können durch Ausdehnung der inneren Membranhälfte in Relation zur äußeren Membranhälfte entstehen, die z. B. durch asymmetrische Einlagerung von Lipiden bzw. Detergenzien oder durch Konformationsänderungen von Membranproteinen erfolgen (Deuticke, 2003).

1.5.2 Zellmembran der Erythrozyten

Die RBC haben eine Lebenserwartung von ca. 120 Tagen und legen in dieser Zeit eine Strecke von etwa 300 km zurück. Danach werden sie vom mononukleären Phagozytensystem der Milz und Leber aufgenommen und abgebaut. Die Erythrozyten müssen enge Kapillaren passieren, ohne ihre Membran zu beschädigen. Die Zellmembran der Erythrozyten ist aus Proteinen (52%) und Lipiden (41%) aufgebaut, ein kleiner Teil der Membran besteht aus Kohlenhydraten (7%) (Haest, 2003) (Abb. 1.4). Die Proteine sind vor allem für die katalytischen Leistungen wie Stofftransport, Elektronen- oder Ionentransport und die Verankerung des Zytoskeletts verantwortlich. Lipide bilden das Grundelement, die Matrix, der Membranstruktur. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft stellen sie einen elektrischen Isolator dar, der ohne Probleme elektrischen Feldstärken bis zu 10^5 V cm^{-1} standhält.

Membranlipide der Erythrozyten sind vorwiegend Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol. Die Lipide sind amphiphiler Natur, d.h. sie haben eine hydrophile Kopfgruppe und lange hydrophobe Kohlenwasserstoffketten (Fettsäuren). Die Fettsäure-Reste der Phospholipide machen etwa 2/3 der Gesamtlänge des

Moleküls aus. Die polaren Kopfgruppen weisen zur Wasser-Lipid-Grenzfläche, während sich die unpolaren Kohlenwasserstoffreste aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zueinander hin orientieren. Dadurch entsteht ein weitgehend wasserfreier, hydrophober Kern innerhalb der Membran. Die Lipidmoleküle bilden eine Art Doppelschicht, die mit dem Flüssig-Mosaik-Model (Singer und Nicolson, 1974) charakterisiert wird. Das Model beschreibt einen flüssig-kristallinen Zustand der Membran mit eingebetteten Proteinen. Die verschiedenen Lipide sind dabei nicht gleichmäßig über die Membran verteilt, es herrscht sowohl eine ungleiche Verteilung zwischen der inneren und äußeren Membranhälfte (transversales Ungleichgewicht) als auch innerhalb der Schichten durch Anhäufungen bestimmter Lipide (laterales Ungleichgewicht) vor.

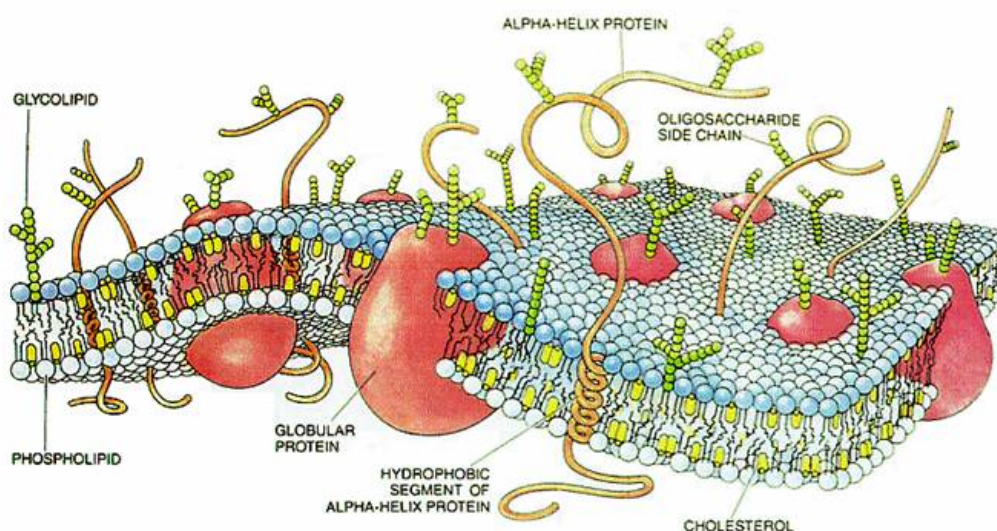


Abb. 1.4: Zellmembran des Erythrozyten

In der Membran menschlicher Erythrozyten befinden sich 15 Hauptproteine, von denen die wichtigsten das α - und β -Spektrin, das Glykophorin und das Bande-3-Protein sind. Sie machen mehr als 60 Gewichtsprozente der Membranproteine aus. Die Festigkeit und Elastizität der Plasmamembran von Erythrozyten beruht auf einem dichten Netzwerk von Aktinfilamenten, das der gesamten Innenseite der Plasmamembran anliegt.

Damit der Erythrozyt seine charakteristische Form behält, ist das Spektrin-Aktin-Zytoskelett über zwei periphere Membranproteine, das Ankyrin und das Bande-

4.1-Protein, fest mit der darüberliegenden Erythrozytenmembran verbunden. Jedes dieser Proteine verknüpft eine Stelle des Zytoskeletts mit einem spezifischen Membranprotein. Ankyrin verbindet die Mitte eines Spektrinfilaments mit dem als Anionentransporter fungierenden, integralen Bande-3-Protein, während sich das Bande-4.1-Protein als Komponente des Verbindungskomplexes an das integrale Membranprotein Glykophorin koppelt.

Die Kohlenhydrate (Oligosaccharide) der Zellmembran sind entweder mit Lipiden (Glykolipide) oder mit Proteinen (Glykoproteine, wie z.B. das Glykophorin) verknüpft und befinden sich auf der Außenseite der Zellmembran. Die sich daraus bildende äußere Schicht an der Membran, die Glykokalyx, ist für die negative Oberflächenladung der Erythrozyten verantwortlich, wodurch aufgrund gegenseitiger Abstoßung eine Aggregation der Erythrozyten verhindert wird. Ferner trägt sie einen Teil der Oberflächenantigene (was für die entsprechende Blutgruppe relevant ist) und spielt vermutlich auch eine Rolle bei der Erkennung und Beseitigung gealterter Erythrozyten.

1.5.3 Membranpermeabilität und Ionentransport

Wegen ihres unpolaren Innenbereichs sind Membranen für polare, wasserlösliche Moleküle nahezu undurchlässig. Nur sehr kleine, ungeladene Moleküle können die Zellmembran durch Diffusion durchdringen, darunter Wasser und gelöste Gase wie O_2 und CO_2 , aber auch kleine polare Moleküle wie Harnstoff und Ethanol. Für große Moleküle, wie z. B. Glukose und andere Zucker, sowie für Ionen ist die Membran praktisch unpassierbar. Der Transport von Molekülen, wie Wasser oder Harnstoff, wird allerdings häufig durch Transportproteine beschleunigt. Diese Transmembranproteine haben eine sehr hohe Spezifität für die jeweils zu transportierenden Substanzen.

ATP-getriebene Pumpen (Na^+/K^+ -Pumpe oder die Ca^{2+} -Pumpe), sind ATPasen, welche die Energie einer ATP-Hydrolyse ausnutzen, um Ionen gegen deren elektrochemische Gradienten durch eine Membran hindurchzuschleusen. Eine energetisch ungünstige Reaktion wird mit einer energieliefernden Reaktion gekoppelt, wie etwa der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat. Wird beim aktiven Transport die hierfür notwendige Energie durch Kopplung an die Hydrolyse von ATP aufgebracht, bezeichnet man das auch als primär aktiven Transport.

Wird ein Transport eines Ions oder einer Substanz gegen deren Konzentrationsgradienten an einen Kotransport mit einem anderen Ion bzw. einer anderen Substanz gekoppelt (Carriermechanismus, siehe unten), so bezeichnet man diesen manchmal auch als sekundär aktiver Transport.

Kanalproteine transportieren Wasser oder Ionen immer entlang ihres Konzentrationsgradienten bzw. Gradienten des elektrochemischen Potentials; solche Reaktionen sind energetisch günstig. Diese Proteine bilden einen Kanal in der Membran aus, durch den mehrere Wassermoleküle oder Ionen gleichzeitig transportiert werden können, einzelne von ihnen sogar mit einer außergewöhnlichen Geschwindigkeit von bis zu 10^8 Molekülen pro Sekunde. Da hierfür keine Stoffwechselenergie aufgewendet werden muss, spricht man von einem passiven Transport.

Der selektive Transport durch die Membran ist eine Leistung von integralen Membranproteinen. Transportproteine, die als Träger für einen passiven Transport von Molekülen fungieren, werden Carrier genannt. Carrier binden im Gegensatz zu Kanalproteinen immer nur jeweils ein oder wenige Substratmolekül(e). Nach der Bindung an das Substrat verändern die Proteine ihre Konformation derart, dass ausschließlich die gebundenen Moleküle die Membran passieren können. Da der Transport des Substrats immer mit einer Konformationsänderung des Carriers einhergeht, können nur etwa $10^2 - 10^4$ Moleküle pro Sekunde durch die Membran geschleust werden. Formal lassen sich drei Transportmechanismen unterscheiden:

- Uniporter transportieren jeweils nur ein Molekül entlang eines Konzentrationsgradienten und befördern beispielsweise Glukose oder Aminosäuren durch die Membran in die Zelle.
- Antiporter und Synporter verbinden dagegen einen Ionen- oder Molekültransport gegen den Gradienten des elektrochemischen Potentials (bzw. Konzentrationsgradienten) mit dem Transport eines anderen Ions oder Moleküls entlang seines Potentialgefälles. Damit koppeln Antiporter und Synporter eine energetisch ungünstige Reaktion mit einer energetisch günstigen. Da Synporter und Antiporter bestimmte Moleküle entgegen dem Konzentrationsgradienten transportieren, werden sie auch oft als „sekundär

aktive Transporter“ bezeichnet, wobei sie allerdings im Gegensatz zu Pumpen kein ATP oder andere energieliefernde Moleküle hydrolysieren. Der Terminus Kotransporter umschreibt die Funktion dieser Proteine jedoch besser, da er sich auf ihre Fähigkeit bezieht, zwei oder mehrere verschiedene Substrate gleichzeitig zu transportieren.

Die charakteristischen Eigenschaften der beteiligten Transportsysteme für K^+ und Na^+ in der Membran von Humanerythrozyten sind in den Arbeiten von Bernhardt *et al.* (1988) und Deuticke *et al.* (1990) beschrieben (Abb. 1.5).

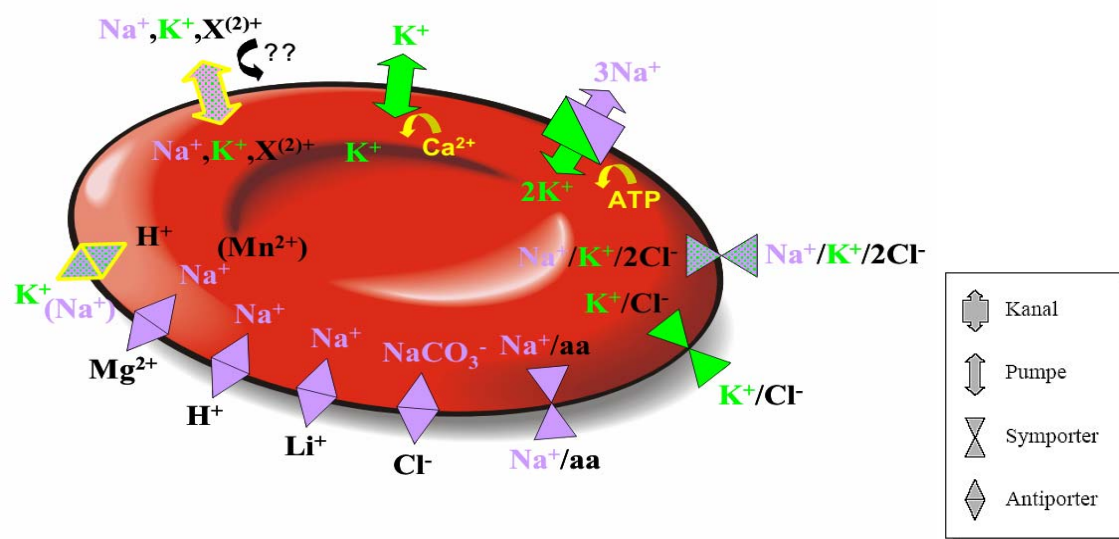


Abb. 1.5: Übersicht über die Transportsysteme für Na^+ und K^+ einer menschlichen roten Blutzelle (aus Bernhardt und Weiss, 2003).

Na^+/K^+ -Pumpe

In den Humanerythrozyten, sowie bei den meisten tierischen Zellen ist Na^+ im Inneren niedrig und K^+ hoch. Dagegen sind im extrazellulären Raum Na^+ hoch und K^+ niedrig. Dieser Konzentrationsgradient wird dadurch aufrechterhalten, dass permanent Na^+ durch ein Ionentransportsystem, die Na^+/K^+ -Pumpe, aktiv nach außen und K^+ dafür nach innen befördert wird (Tosteson und Hoffman, 1960). Das für den Transport verantwortliche Protein, eine ATPase, spaltet ATP zu ADP und anorganischem Phosphat und nutzt dabei einen Teil der freiwerdenden Energie zum Ionentransport. Pro Molekül ATP werden drei Na^+ -Ionen nach außen und zwei K^+ -Ionen nach innen befördert (Sen und Post, 1964; Whittam und Ager, 1965; Hoffman, 1986). Neben den Na^+ - und K^+ -Konzentrationen wirkt die

intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration auf die Transportrate ein (Bond und Hudgins, 1975; Whittam und Chipperfield, 1975). Das bekannte Reaktionsschema erlaubt unter bestimmten experimentellen Bedingungen auch Transportwege, die von dem oben beschriebenen 3:2 Austausch von Na^+ gegen K^+ abweichen. Die Na^+/K^+ -Pumpe kann z. B. einen Na^+/Na^+ -Austausch, einen K^+/K^+ -Austausch oder die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (bei umgekehrter Na^+ und K^+ Transportrichtung) bewirken (Garrahan und Glynn, 1967a, b; c; d; Simons, 1974; Glynn und Karlish, 1976). Als Hemmstoffe können Digitalisglykoside, wie Ouabain (0,1 mM) eingesetzt werden (Schatzmann, 1953).

$Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter

Dieser Carrier transportiert die monovalenten Kationen Na^+ , K^+ mit zwei Cl^- Anionen in eine Richtung über die Membran (Chipperfield, 1986; Lauf *et al.*, 1987; Duhm, 1987). Die Transportrichtung (Efflux oder Influx) ergibt sich aus der Gleichgewichtsbedingung aller drei Substrate. Auch bei diesem Transportsystem können abhängig von den experimentellen Bedingungen weitere Transportmodi, wie z. B. ein K^+/K^+ -Austausch oder Na^+/Na^+ -Austausch auftreten (McManus, 1987). Es kann Li^+ an die Stelle von Na^+ treten, was auch zu der Bezeichnung Li^+/K^+ -Kotransport führte (Canessa *et al.*, 1982). Als Hemmstoffe dienen Schleifen-diuretika wie Furosemid und Bumetanid (Wiley und Cooper, 1974).

$NaCO_3^-/Cl^-$ -Austauscher

Der Austausch von $NaCO_3^-$ gegen Cl^- wird an der Erythrozytenmembran von dem Bande-3-Protein katalysiert, welches für einen schnellen, elektroneutralen Austausch von verschiedenen Anionen verantwortlich ist (siehe detailliert unter 1.5.4) (Knauf, 1979; Fröhlich und Gunn, 1986; Passow, 1986; Jennings, 1989). Unter physiologischen Bedingungen ist der Austausch und Transport von HCO_3^- eine wichtige Zellfunktion von Erythrozyten. Neben dem eigentlichen Substrat HCO_3^- bilden sich beim Lösen von CO_2 in entsprechenden Salzlösungen auch die Substrate $LiCO_3^-$ und $NaCO_3^-$, welche von dem Anionentauscher (AE) ebenfalls transportiert werden. KCO_3^- andererseits hat eine wesentlich geringere Bildungswahrscheinlichkeit und stellt somit auch kein Substrat für den AE dar (Funder und Wieth, 1980). Für den AE wurde eine breite Palette von Inhibitoren beschrieben. Beispiele sind DIDS oder Dipyridamol. Nicht nur durch Carbonat,

sondern auch durch zweiwertige Anionen kann ein Austausch von Kationen vermittelt werden (Becker und Duhm, 1978).

Gardoš-Kanal

Der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal wurde von Gardoš (1958) entdeckt. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (1 - 5 μM) bewirkt in Erythrozyten die Aktivierung eines selektiven K^+ -Kanals (Schwarz und Passow, 1983). Durch die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase, welche bei intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von über 10 nM aktiviert wird, wird ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unter physiologischen Bedingungen normalerweise verhindert (Agre *et al.*, 1983). Der Kanal mit einer Leitfähigkeit von ca. 20 pS kommt bei Humanerythrozyten mit 15 - 200 Kopien pro Zelle vor (Alvarez und Garcia-Sancho, 1989). Bei sehr geringer intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ist der Kanal inaktiv, er kann aber auch durch Kanalblocker (z. B. Chinin, Chinidin, Clotrimazol, Charybdotoxin) inhibiert werden. Ferner existieren auch Verstärker (z. B. Propanolol, Phosphorylierungsreagenzien) für den K^+ -Efflux durch den Kanal (Maher und Kuchel, 2003). Auch Herzglykoside wie Ouabain, die als Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase bekannt sind, können den Gardoš-Kanal am Erythrozyten hemmen ($\text{IC}_{50} = 9 \text{ nM}$, (Hoffman *et al.*, 1980)).

Spannungsabhängiger, nicht-selektiver Kationenkanal (VDNSCC)

Der VDNSCC wurde erst durch die patch-clamp-Technik an inside-out Membranfragmenten von Humanerythrozyten entdeckt (Christophersen und Bennekou, 1991). Durch diesen Kanal werden Na^+ , K^+ , Rb^+ , NH_4^+ sowie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} transportiert. Seine Öffnungswahrscheinlichkeit hängt vom Transmembranpotential ab, er öffnet erst bei Potentialen $> +20 \text{ mV}$ (Kaestner *et al.*, 2000). Die Leitfähigkeit des Kanals wurde zu 21 pS für einwertige und zu 12 - 18 pS für zweiwertige Kationen bestimmt (Kaestner *et al.*, 2000). Die berechnete Häufigkeit des Kanals beträgt nur 0,25 pro Zelle, d.h. nur eine Subpopulation der Erythrozyten besitzt diesen Kanal. Es gibt mehrere Substanzen die den Kanal aktivieren (Carbachol, Prostaglandin E_2 (PGE_2), Clotrimazol) und hemmen (Ruthenium Rot, Lanthan, Iodoacetamid, N-ethyl-maleimid) können (Bennekou *et al.*, 2004).

Von Li *et al.* (1996) wurde gezeigt, dass PGE_2 in physiologischer Konzentration (10^{-10} M) zu einem signifikanten KCl-Verlust der Erythrozyten über den Gardoš-

Kanal führt. In neueren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass sich der VDNSCC in Anwesenheit von 10^{-10} M PGE_2 schon bei negativen Transmembranpotentialen öffnet und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei etwa 50% der Zellen signifikant ansteigt, was zu einem Öffnen des Gardoš-Kanals führt (Kaestner und Bernhardt, 2002; Kaestner *et al.*, 2004). Dem ausströmenden K^+ folgt passiv über den Anionenaustaucher Cl^- und durch diesen Salzverlust, respektive Wasserverlust, schrumpfen die Erythrozyten zusammen. Somit konnte erstmals eine aktive Beteiligung der Erythrozyten bei der Thrombus-Bildung gezeigt werden (Kaestner *et al.*, 2004).

KCl-Kotransport

Dieser Transportweg wurde erstmals bei Erythrozyten von Vögeln, Fischen und Schafen nachgewiesen (McManus, 1978; Lauf *et al.*, 1987). Bei Humanerythrozyten tritt der KCl-Kotransporter nur bei jungen Erythrozyten, den Retikulozyten, auf (Clinton *et al.*, 2004). Der KCl-Kotransporter kann auch durch hypoosmotische Schwellung der Zellen (Brugnara *et al.*, 1989) oder durch oxidierende, nichtgeladene Substanzen (SH-Gruppen) ausgelöst werden (Lauf, 1985). Bei der hypoosmotischen Schwellung spielt der Kotransporter eine Rolle für einen kompensatorischen KCl- oder Taurin-Verlust von geschwollenen Zellen (Dunham und Ellory, 1981). Bei oxidierenden, nichtgeladenen Substanzen ist der KCl-Kotransport sehr bedeutend bei pathophysiologisch erhöhtem K^+ -Efflux in verschiedenen Haemoglobinpathologien (Canessa *et al.*, 1986).

Bumetanid hemmt bei Konzentrationen von 50 - 100 μM den KCl-Kotransport. Intrazelluläres Mg^{2+} hemmt den Transporter ebenfalls (Godart und Ellory, 1996) und beeinflusst bei Erythrozyten von Enten gleichzeitig die Volumenregulation (Starke, 1989). Da für die Aktivierung sowohl ATP als auch die Aktivität von Phosphatasen notwendig sind, kann durch Phosphataseinhibitoren eine Aktivierung des KCl-Kotransportes verhindert werden (Jennings und Al-Rohil, 1990).

$\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher

Bei Humanerythrozyten, sowie bei Erythrozyten von Hühnern und Ratten wurde ein Antiportsystem beschrieben, das Na^+ (oder Mn^{2+}) gegen Mg^{2+} austauscht (Günther und Vormann, 1985; Féray und Garay, 1986; 1987; Lüdi und Schatzmann, 1987). ATP ist für die Aktivität erforderlich ohne das daraus Energie

benötigt wird. Der Transportvorgang erfordert ~ 3 kJ/mol um Mg^{2+} -Ionen aus der Zelle zu transportieren bzw. ~ 8 kJ/mol um Na^+ -Ionen in die Zelle aufzunehmen (der Konzentrationsgradient eines Ions dient dabei immer als Energielieferant). Als Inhibitoren des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers können Phloretin, Amilorid und Chinin verwendet werden (Féray und Garay, 1986; 1987; Lüdi und Schatzmann, 1987). Bestimmte Antidepressiva (Imipramine, Carpipramine) zeigen ebenfalls eine starke, selektive Hemmwirkung ($\text{IC}_{50} = 25 - 40 \mu\text{M}$) (Féray und Garay, 1988).

Na^+/Li^+ -Antiporter

Dieser Transportweg wurde erstmals in der Zellmembran von Humanerythrozyten von Duhm *et al.* (1976) beschrieben. Unter Normalbedingungen wird Li^+ aus der Zelle gegen seinen Konzentrationsgradienten transportiert. Der Li^+ -Transport wurde von Duhm und Becker (1977a; b) in einen Ouabain-sensitiven und Ouabain-insensitiven Transport unterteilt. Der Ouabain-sensitive Li^+ -Flux konnte (durch Hemmung der ATPase bzw. Verringerung der Na^+ - und K^+ -Konzentration) auf die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe zurückgeführt werden. Der Ouabain-insensitive Li^+ -Flux besteht aus einer linearen und einer sättigenden Komponente. Der lineare Anteil (sowohl beim In- als auch beim Efflux) ist pH-abhängig und die Steigerung seiner Transportrate durch Bikarbonat konnte vollständig durch Dipyridamol gehemmt werden. Der sättigende Anteil wird weder von einer ATP-Verarmung noch von der extrazellulären K^+ -Konzentration beeinflusst (Duhm und Becker, 1977a). Die Untersuchung des Transportmechanismus des Antiporters hat gezeigt, dass das Transportprotein die Ionen, ähnlich wie beim Anionenaustauscher, nacheinander befördert, d.h. nach dem Ping-Pong Modell arbeitet (Hannaert und Garay, 1986). Bekannte Inhibitoren des Na^+/Li^+ -Antiporters sind Phloretin (Becker und Duhm, 1978), Iodacetamid, Hg^{2+} sowie Thyroidhormone. Cholesterol und Inhibitin hemmen ebenfalls den Phloretin-sensitiven Li^+ -Transport.

Na^+/H^+ -Austauscher

Der Na^+/H^+ -Austauscher wird in nahezu allen tierischen Zellen in mindestens einer Isoform von bisher 9 bekannten exprimiert. Entsprechend vielfältig sind die physiologischen Funktionen, die dem Na^+/H^+ -Austauscher zugeschrieben werden (Grinstein und Wieczorek, 1994; Demaurex *et al.*, 1995). Vor allem sind hierbei die Homeostase des inneren pH-Wertes und die Volumenregulation zu nennen (Clark und Limbird, 1991). Durch das Zusammenwirken des Na^+/H^+ -Austauschers mit

dem an Erythrozyten vorhandenen Anionenaustauscher (Bande-3-Protein, siehe oben) entsteht ein Nettoeinstrom von NaCl (mit begleitender Wasser-Aufnahme) und somit eine Volumenvergrößerung der Zellen.

Bei Humanerythrozyten ist der Transporter aktiv, wenn die Gradienten für Na⁺ oder H⁺ eine treibende Kraft (durch den Konzentrationsgradienten) für das jeweils andere Ion hervorrufen. Intrazelluläres Ca²⁺ aktiviert den Na⁺/H⁺-Austausch, extrazelluläres H⁺ hemmt den Transport (Deuticke *et al.*, 1990). Der Na⁺/H⁺-Austauscher wird durch Amilorid sowie Amiloridderivate blockiert (Escobales und Canessa, 1986). An Erythrozyten verschiedener Spezies konnte gleichfalls ein Na⁺/Li⁺-Austauscher nachgewiesen werden (siehe oben). Für Hundeerythrozyten wurde von Parker (1986) postuliert, dass der Na⁺/Li⁺-Austauscher mit dem Na⁺/H⁺-Austauscher identisch ist und nur verschiedene Transportmodi desselben Transporters repräsentiert. Für Humanerythrozyten wird diese Hypothese von Chi *et al.* (1996) vertreten. Diese These ist allerdings umstritten (Siffert und Busch, 1996; Hardman und Lant, 1996).

K⁺/H⁺-Austauscher

Dieser Austauscher konnte an der Erythrozytenmembran bisher bei *Amphiuma* (Aalmolch) sowie bei *Salmo gairdneri* (Forelle) nachgewiesen werden (Cala, 1980; 1983; Adorante und Cala, 1987; Maldonado, 1992; Fievet *et al.*, 1993). Entsprechend den physiologischen Funktionen des Na⁺/H⁺-Austauschers wird auch dem K⁺/H⁺-Austauscher eine Rolle bei der pH-Regulation und K⁺-Homeostase zugeschrieben (Siebens und Kregenow, 1996; Bonanno, 1991). Im Gegensatz zum Na⁺/H⁺-Austauscher, der der Zellschrumpfung entgegen wirkt, wird der K⁺/H⁺-Austauscher bei *Amphiuma* nur bei geschwollenen Zellen aktiviert und führt zu einer Abnahme des Zellvolumens (Cala, 1983). Bei *Amphiuma* bewirkt erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ eine Aktivierung des K⁺/H⁺-Austauschers. Außerdem kann bei Zellen, die in einem Medium mit Amilorid, einem Inhibitor des Na⁺/H⁺-Austauschers, geschrumpft wurden, keine Aktivierung des K⁺/H⁺-Austauschers nach anschließender Schwellung der Zellen mehr erreicht werden. Nach Cala (1983) ist dies durch zwei alternative Transportmodi ein und desselben Transporters erklärbar. In Mitochondrien kann der K⁺/H⁺-Austauscher sowohl K⁺ als auch Na⁺ als Substrat akzeptieren. Des weiteren konnte in Mitochondrien eine zusätzliche Na⁺/H⁺-Austauschaktivität nachgewiesen werden, die durch Amilorid-

Analoga gehemmt werden kann (Nakashima und Garlid, 1982; Brierley *et al.*, 1994).

Ca²⁺-Pumpe

Bei reifen roten Blutzellen fehlen die Ca²⁺ akkumulierenden Organellen und eine Ca²⁺-Signalfunktion. Der gesamte Ca²⁺-Inhalt und die Ca²⁺-Permeabilität sind sehr gering. Diese Zellen haben eine minimale zytoplasmatische Ca²⁺-Pufferkapazität im Vergleich mit anderen Zelltypen. Eine Eigenschaft teilen die Erythrozyten mit allen eukariotischen und prokariotischen Zellen: im Zytoplasma liegt eine geringe Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$ vor). Die niedrige $[Ca^{2+}]_i$ resultiert aus der Balance zwischen passiven Ca²⁺-Influx und aktiver Ca²⁺-Extrusion. Der passive Ca²⁺-Influx erfolgt über Transportwege, die eine geringe Kapazität haben, jedoch Carrier-Eigenschaften aufweisen (Ferreira and Lew, 1977; Lew und Ferreira, 1978; Desai *et al.*, 1991). Der aktive Ca²⁺-Ausstrom ist ATP vermittelt und besitzt eine hohe Durchsatzrate. Die entsprechende Ca²⁺-Pumpe gehört zur Klasse der P-Typ ATPasen, die an Erythrozyten in den genomischen Varianten 1 und 4 expremiert werden (Schatzmann, 1966; 1982; Schatzmann und Vincenzi, 1969; Rega und Garrahan, 1986; Wang *et al.*, 1992; Carafoli, 1992; 1997). Die benötigte Energie zum auswärtsgerichteten Ca²⁺-Transport erhält die Ca²⁺-Pumpe durch Hydrolyse von ATP. Die Ca²⁺:ATP Stöchiometrie der Ca²⁺-Pumpe ist 1:1 (Schatzmann, 1973; Clark and Carafoli, 1983; Dagher and Lew, 1988), so dass RBC mit charakteristischen V_{max} -Werten von 15 oder 20 mmol/(l_{Zellen}*h), ATP genau mit der gleichen Rate hydrolysieren. Damit man die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration um 1 µM erhöhen kann (für gezielte Untersuchungen), muss die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration mindestens um den Faktor 1000 größer sein, d.h. im äußeren Milieu muss eine Konzentration von 1 - 2 mM vorliegen. Der hohe Konzentrationsgradient erlaubt dann einen passiven Ca²⁺-Influx.

Die Ca²⁺-Pumpe ist eine multi-regulierte Pumpe (Carafoli, 1992; Wang *et al.*, 1992), deren Aktivität und Eigenschaft sehr wahrscheinlich durch Dimerisation (Kosk-Kosicka und Bzdega, 1988; Kosk-Kosicka *et al.*, 1990) sowie von intrazellulären Faktoren wie Calmodulin und Calpain beeinflusst wird.

In der Zelle herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Ca²⁺. Gestützt durch viele Untersuchungen mit Ca²⁺-sensitiven Farbstoffen, Ca²⁺-Chelatoren (z. B. Benz2) und radioaktiven Ca²⁺ (⁴⁵Ca²⁺) wird der

freie intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf ~ 30 bis 60 nM (Lew *et al.*, 1982; Muallem *et al.*, 1985; Etzion *et al.*, 1993; Tiffert *et al.*, 1993) geschätzt. Die gesamte (totale) intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}_T]_i$) wurde mit dem Atom-Absorptionsspektrometer (AAS) gemessen. Dabei wurde ein kleines Volumen frischen Blutes mit einer Chelator behandelten Lösung gewaschen, um die gebundenen Ca^{2+} -Ionen auf der extrazellulären Membranoberfläche zu entfernen. Die Gesamtmenge an Ca^{2+} wurde damit von ca. $15 - 20 \mu\text{mol/l}_{\text{Zellen}}$ auf ca. $5 \mu\text{mol/l}_{\text{Zellen}}$ reduziert (Harrison und Long, 1968; Dunn, 1974; Bookchin und Lew, 1980). Eine Erhöhung des gesamten Ca^{2+} -Gehalts in RBC *in vivo* wurde nur unter spezifischen, pathologischen Bedingungen, z. B. bei Malaria, Sichelzell-Anämie und Thalassämie dokumentiert.

Die Ca^{2+} -Ionophore (A23187, Ionomycin) wurden in Kombination mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ verwendet, um das Ca^{2+} -Gleichgewicht zu analysieren. Dabei wurden drei Funktionen nachgewiesen. Erstens, die Ionophore kontrollieren die Ca^{2+} -Membranpermeabilität und induzieren die Permeabilitäten für alle in der Suspension vorhanden Zellen (Lew and Simonsen, 1980; Simonsen und Lew, 1980; Simonsen *et al.*, 1982). Zweitens, da der endogene Ca^{2+} -Gehalt ($[\text{Ca}_T]_i$) in RBC sehr gering ist, kann der gesamte Ca^{2+} -Gehalt über die spezifische Traceraktivität und den radioaktiven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in den Zellen genau berechnet werden. Drittens, das Zellvolumen, der pH-Wert, die intrazellulären Ionenkonzentrationen und das Membranpotential können dabei trotz der durch die Ionophore induzierten Ca^{2+} -Aufladung sehr leicht in ihren physiologischen Bereichen gehalten werden (Ferreira und Lew, 1976; Flatman und Lew, 1977; Lew und Brown, 1979; Lew und García-Sancho, 1989). A23187 transportiert neben Ca^{2+} auch andere bivalenten Kationen (Mg^{2+} , Co^{2+}) in demselben Wechselmodus - $\text{M}^{2+}:2\text{H}^+$ (Pressman, 1976).

Spezifische Inhibitoren für die Ca^{2+} -Pumpe sind noch nicht entdeckt. Es gibt jedoch drei Möglichkeiten die Ca^{2+} -Pumpe zu hemmen: ATP-Verarmung der Zelle, „Vergiftung“ mit Vanadat oder die Beladung der Zelle mit einem Ca^{2+} -Chelator, um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterhalb des Schwellenwertes zu halten. Eine rapide ATP-Verarmung wurde durch Inkubation mit Stoffwechsel-Inhibitoren (Iodoacetamid, Iodoacetische Säure, Formaldehyd) und Substraten (Inosin, Adenosin, Glucose) induziert (Lew, 1971). Ortho-Vanadat ist ein nicht-spezifischer ATPase-Inhibitor, der in einer

Konzentration von 1 mM mehr als 99% der Aktivität der Ca^{2+} -Pumpe hemmt (Tiffert und Lew, 2001).

Die Ca^{2+} -Dissoziationskonstante (K_D) von verschiedenen Farbstoffen sowie von Chelatoren ist ein Maß für die Affinität des Moleküls zu seinem Liganden. Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffe zeigen im Konzentrationsbereich ihres Liganden von $0,1 \times K_D$ bis $10 \times K_D$ eine geeignete Reaktion auf Änderungen, so dass ein Farbstoff mit seinem K_D -Wert im Bereich der zu erwartenden Konzentration des nachzuweisenden Ions liegen sollte. Die Dissoziationskonstante ist abhängig von: pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und Viskosität der Lösung, Vorhandensein von Mg^{2+} und anderer Ionen.

Der Resttransport von K^+ und Na^+ sowie der LIS-Effekt

Als Resttransport für K^+ und Na^+ bezeichnet man den Flux der noch vorhanden ist, wenn alle bisher bekannten Transportsysteme für diese Ionen (außer dem $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher und dem unspezifischen Kationenkanal, die erst kürzlich entdeckt wurden) gehemmt oder nicht aktiv sind. Experimentell ist der K^+ -Resttransport relativ einfach zu messen. Der Na^+ -Resttransport lässt sich dagegen schwieriger bestimmen, da eine Vielzahl von Systemen, die Na^+ transportieren, bekannt sind (Bernhardt *et al.*, 1988). Durch die Zugabe von Hemmstoffen (Ouabain, Bumetanid und EGTA), fehlenden Substraten bzw. Aktivatoren kann der K^+ -Resttransport an der Erythrozytenmembran untersucht werden.

Bereits von Davson (1939) wurde der passive Flux von K^+ an Humanerythrozyten, die in einem Medium geringer Ionenstärke, aber konstanter Osmolarität (Ausgleich durch Saccharose) vorliegen, untersucht. Es wurde ein deutlicher Anstieg des K^+ -Effluxes beobachtet. Dieser Anstieg in Lösungen geringer Ionenstärke (LIS) wurde später von einer Reihe weiterer Autoren, zuerst für die passiven, später auch für die Restfluxe für K^+ und Na^+ (jeweils Influxe und Effluxes) bestätigt (Wilbrandt, 1940; Wilbrandt und Schatzmann, 1960; LaCelle und Rothstein, 1969; Bernhardt *et al.*, 1982; Bernhardt und Glaser, 1982, Jones und Knauf, 1985).

Der passive Transport, später der Resttransport (auch als „leak“ bezeichnet), wurde lange Zeit als Elektrodifusion durch undichte Stellen in der Membran erklärt. Von Bernhardt *et al.* (1991) und Denner *et al.* (1993) konnte erstmalig für die Restfluxe für K^+ und Na^+ (jeweils Influxes und Effluxes), ein Anstieg in LIS-Lösung gezeigt werden. Dieser Effekt lässt sich durch verschiedene experimentelle

Bedingungen beeinflussen, z. B. durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks (Bernhardt *et al.*, 1991) und durch SH-Gruppen-Reagenzien (Ihrig *et al.*, 1991). In einer physiologischen Salzlösung beträgt das Transmembranpotential von Erythrozyten ca. -10 mV, während es in LIS-Lösung, die 250 mM Saccharose enthält, etwa +50 mV beträgt (Bernhardt und Weiss, 2003). Das Transmembranpotential hat keinen Einfluß auf den K^+ - und Na^+ -Restflux in LIS-Lösungen. Das konnte durch den Ersatz von Cl^- durch nichtpermeable Anionen nachgewiesen werden. Auf der Basis dieser Untersuchungen wurde ein K^+/Na^+ -Austauscher postuliert, der einen wesentlichen Beitrag zum Restflux leistet (Denner, 1993).

Der Effekt der Erhöhung der Fluxrate beruht auf der Erniedrigung der Ionenstärke der externen Lösung (Richter *et al.*, 1996; 1997). Da der K^+ - und Na^+ -Restflux vom pH-Wert abhängig ist, versuchten Richter *et al.* (1997) eine Erklärung des LIS-Effekts durch die Annahme eines $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauschers. Diese Annahme basiert hauptsächlich auf dem Nachweis, dass es eine 1:1 Stöchiometrie zwischen K^+ -Influx und H^+ -Efflux unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Ionenstärke der Lösung) gibt. Zum anderen wird der Einfluß des Oberflächenpotentials an der Zellmembran auf den Kationentransport berücksichtigt. Dabei wird die durch das Oberflächenpotential veränderte lokale Konzentration der beweglichen Ladungen, die wesentlich von der Ionenstärke der umgebenden Lösung abhängt, in die Betrachtung einbezogen. Dieser Einfluß des Oberflächenpotentials auf den K^+ -Resttransport ließ sich experimentell u. a. durch den Einfluss vergleichbarer aber negativ bzw. positiv geladener lipophiler Substanzen auf den Resttransport in Lösung geringer Ionenstärke nachweisen (Kummerow, 1999; Kummerow *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 1997).

Es wurden bereits einige Inhibitoren des $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauschers gefunden. In Lösung geringer Ionenstärke inhibiert Chinacrin den $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauscher am Humanerythrozyten zu 80% (Bernhardt *et al.*, 1999). Der $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauscher wird sowohl in HIS- sowie auch in LIS-Lösungen von HOE 694 und HOE 642 inhibiert (Weiss *et al.*, 2004).

Für Ca^{2+} -Ionen würde eine Zunahme des Einstroms unter LIS-Bedingungen bedeuten, dass zusätzlich zur Elektrodifusion (wenn überhaupt vorhanden) mindestens noch ein weiteres Transportsystem für Ca^{2+} existiert. In Frage käme hier der unselektive spannungsabhängige Kationenkanal, für den nachgewiesen

wurde, dass er für Ca^{2+} durchlässig ist (Kaestner et al., 2000). Unklar ist aber auch, ob Ca^{2+} über den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher transportiert werden kann.

1.5.4 Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der O_2 - und CO_2 -Transport, sowie die Pufferung von H^+ -Ionen durch das Hämoglobin. Das CO_2 diffundiert aus den Geweben in die Erythrozyten, wo es mit Hilfe eines Enzyms, der Carboanhydrase, hydriert wird, so dass H^+ und HCO_3^- gebildet werden. Die Protonen werden von Hämoglobin gepuffert, und das HCO_3^- verlässt die Zellen im Austausch gegen Cl^- . Der intrazelluläre pH-Wert verringert sich dabei, da durch den Anionenaustauscher insgesamt H_2CO_3 in den Zellen durch HCl ersetzt wird. Diese Ansäuerung der Zelle induziert dann die Freisetzung von O_2 aus Oxyhämoglobin und die Aufnahme von Protonen durch das Hämoglobin (HbH^+). Im Lungengewebe läuft der Prozess umgekehrt ab, das HCO_3^- im Plasma gelangt im Austausch gegen Cl^- in die Zellen hinein, wird zu CO_2 umgewandelt, welches hinaus diffundiert. Dabei verringert sich die freie H^+ -Konzentration in den Zellen. Dieser, auch als Jacob-Stewart-Zyklus bekannter Vorgang kann an zwei Stellen unterbrochen werden. Es kann entweder die Carboanhydrase oder der Anionenaustauscher (Bande-3-Protein) selbst gehemmt werden.

Intrazelluläre Pufferkapazität

Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) in Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen beträgt 7,2. Dies entspricht einer Protonenkonzentration in der Zelle von nur 63 nmol/l. Die niedrigere Konzentration der H^+ -Ionen ist von großer Bedeutung für viele Prozesse in der Zelle. Eine Ansäuerung des intrazellulären Milieus kann zum einen durch Transportprozesse und zum anderen durch intrazelluläre Vorgänge, wie z. B. die Glykolyse und die ATP-Hydrolyse, erfolgen. Die Fähigkeit der Zelle, Änderungen des intrazellulären pH-Wertes möglichst gering zu halten, beruht im Wesentlichen auf der intrazellulären Pufferung (Borton, 1989).

Das Hämoglobin liegt in hohen Konzentrationen ($\sim 7 \text{ mM}$) in der Zelle vor und macht etwa 90% der Zellinhaltsstoffe aus (Funder und Wieth, 1967). Ein weiteres Anion ist das 2,3-Diphosphoglycerat (DFG). Obwohl 2,3-DPG die Hälfte der negativen Ladung der impermeablen Ionen in roten Blutzellen ausmacht, ist

dennoch das Hämoglobin der hauptsächlichste interne Puffer, da sich die Ladung von 2,3-DPG wenig mit dem pH-Wert ändert (Hladky und Rink, 1977).

Die Pufferkapazität des Hämoglobins wurde von Dalmark (1975) mit 10 mmol/(mmol Hb·pH) bestimmt. Für hämolysierte rote Blutzellen liegt die Pufferkapazität bei 11 (Harris und Maizels, 1952) bzw. 8 - 12 Einheiten (Siggard-Anderson und Salling, 1971). Die Pufferkapazität von gereinigtem Oxyhämoglobin wurde mit 10 mmol/(mmol Hb·pH) angegeben (Gary-Bobo und Solomon, 1968). In der Umgebung des isoelektrischen Punktes bleibt die Pufferkapazität von menschlichen Erythrozyten über mindestens eine pH-Einheit konstant (Dalmark, 1975; Gary-Bobo und Solomon, 1968). Mit 13 Ladungen pro Molekül berechnete Pauling (1949) die Änderung der Nettoladung des Hämoglobins, wenn der pH-Wert um eine Einheit alterniert.

Anionenaustauscher (Bande-3)

Das Bande-3-Protein ist ein Anionenaustauscher und stellt 30% der gesamten Membranproteine der Erythrozyten dar (Fairbanks *et al.*, 1971). Seine Funktion ist die Aufrechterhaltung des HCO_3^- -Gleichgewichtes zwischen den Erythrozyten und der Umgebung in weniger als 1 s zu realisieren. In RBC liegen etwa 1 Million Kopien des Bande-3-Proteins vor. Es hat ein Molekulargewicht von 95 000 Dalton und seine Struktur ist relativ gut geklärt (Fairbanks *et al.*, 1971).

Das Bande-3 Protein stellt ein Gleichgewicht zwischen dem $\text{H}^+(\text{OH}^-)$ -Gradienten und dem Cl^- -Gradienten her (Harris und Maizels, 1952; Wieth *et al.*, 1980). Die Zellmembran ist relativ undurchlässig für Kationen im Vergleich zu Cl^- , so dass die Kationenkonzentration in bestimmten Zeiträumen als konstant angesehen werden kann. In RBC sind die Anionen und Protonen passiv über die Membran nach dem Donnan-Gleichgewicht (1) verteilt:

$$\frac{c(\text{HCO}_3^-)_i}{c(\text{HCO}_3^-)_o} = \frac{c(\text{Cl}^-)_i}{c(\text{Cl}^-)_o} = \frac{c(\text{OH}^-)_i}{c(\text{OH}^-)_o} = \frac{c(\text{H}^+)_o}{c(\text{H}^+)_i} \quad (1)$$

Der Transport von Säure-Äquivalenten über die Zellmembran kann also durch den Transport von H^+ selbst in die eine Richtung, oder durch HCO_3^- und OH^- in die entgegengesetzte Richtung erfolgen. Die Verteilung von Cl^- führt unter physiologischen Bedingungen zu einem Transmembranpotential von etwa - 10 mV

(Hoffman und Laris, 1974). Unter Bedingungen jedoch, wo sich nahezu kein Cl^- in der Lösung befindet, wie z. B. in einer isotonen Saccharose-Lösung, ist die oben gemachte Annahme nicht mehr gültig, d.h. die Verteilung von H^+ und Cl^- weicht vom Donnan-Gleichgewicht ab (Funder und Wieth, 1966). Dementsprechend folgt das Transmembranpotential nicht mehr der Cl^- -Verteilung, was von Lassen (1977) an *Amphiuma*-Erythrozyten demonstriert wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aldosteron, LiCl, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
⁸⁶ Rubidium in Rubidiumchlorid, 185 MBq (⁸⁶ Rb)	AEA Technology QSA (Amersham), Braunschweig, Deutschland
Mycostatin (Nystatin), g-Strophanthin-octahydrat (Ouabain), Morpholinoethansulfonsäure (MES)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
D(+)-Saccharose, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), NaOH, Dimethylsulfoxid (DMSO),	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BCECF AM, Fluo-4 AM, Pluronic F-127 20% Lösung in DMSO	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Ortho-Vanadat	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , D(+)-Glukose, Poly-L-Lysin-Lösung 0,1% w/v in Wasser, Nigericin, Phloretin, Drabkin's-Reagenz, 4-Bromo-Calcium A23187, Triton X-100, Ethylenglykoltetraacetat (EGTA), Trichloroessigsäure (TCA), 3-butylamino-4-phenoxy-5-sulfamoyl-benzensäure (Bumetanid), Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Chemikalienlager, Uni Saarland
Baysilone-Paste	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Humanes Blut

- von der Universitätsklinik Homburg mit folgenden Antikoagulantien: Citrat 1:10 (10 ml Röhrchen), Lithium- Heparin (2,6 ml Röhrchen).
- von der Sportmedizin der Universität des Saarlandes mit folgendem Antikoagulans: Kalium- EGTA (7,5 ml Röhrchen).

Hühnerblut

- Privat-Schlachthof Illingen (Inhaber: Willi Presser) mit Antikoagulans Heparin (10 000 I.E.).

<u>Physiologische Lösung (HIS)</u>	145 mM	NaCl
	10 mM	Glucose
	7,5 mM	KCl
	10 mM	HEPES / Tris oder MES / Tris, pH Wert 7,4 bei 25°C

<u>Saccharose Lösung (LIS)</u>	250 mM	Saccharose
	10 mM	Glucose
	7,5 mM	KCl
	10 mM	HEPES / Tris oder MES / Tris, pH Wert 7,4 bei 25°C

Für Fluxmessungen wurden HIS- und LIS-Lösungen ohne KCl und mit einem pH Wert von 7,4 bei 37°C eingesetzt.

<u>BCECF-Kalibrierungslösung</u>	135 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	10 mM	Glucose
	10 mM	HEPES / Tris oder MES / Tris,

mit folgenden pH-Werten: 6,8; 7,1; 7,4; 7,8 bei 25°C.

<u>Li⁺-Waschlösung</u>	85 mM	Saccharose
	75 mM	MgCl ₂
	10 mM	Glukose

10 mM MOPS
pH-Wert 7,4 bei 25°C mit Tris (1 M) eingestellt.

Li⁺-Ladelösung (Li⁺-Efflux) 150 mM LiCl
10 mM Glukose
10 mM MOPS

pH-Wert 7,4 bei 25°C mit Tris (1 M) eingestellt.

Na⁺-Ladelösung (Li⁺-Influx) 150 mM NaCl
30 mM Saccharose
10 mM Glukose
10 mM MOPS

pH-Wert 7,4 bei 25°C mit Tris (1 M) eingestellt.

Tabelle 2: Fluxlösungen (Li⁺-Flux). Die Fluxlösungen wurden bei 25°C mit Tris (1 M) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Inhaltsstoff	Fluxlösung I, mM	Fluxlösung II, mM
KCl	142,5	7,5
NaCl	7,5	7,5
Saccharose	-	235
Glukose	10	10
MOPS	10	10

Rubidiumlösung ⁸⁶Rubidium (925 kBq) in 150 mM KCl

K⁺-Flux Waschlösung 106 mM MgCl₂
10 mM MOPS
pH-Wert 7,4 bei 4°C mit MES eingestellt

Detergenz 1% (v/v) Triton X 100 in deionisiertem H₂O
5% (w/v) TCA in deionisiertem H₂O

<u>Inhibitoren</u>	100 mM	EGTA (Na-Salz) in deionisiert. H ₂ O
	10 mM	Ouabain in deionisiertem H ₂ O
	10 mM	Bumetanid in 100 mM Tris und deionisiertem Wasser

Alle drei Inhibitoren wurden bis pH 7,4 mit NaOH oder HEPES bzw. MES titriert.

	250 mM	Phloretin in Ethanol
	10 mM	Nigericin in Ethanol
	5 mg/ml	Nystatin in DMSO

Farbstoffe

Die Farbstoffe 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF) und Fluo-4 wurden in Pluronic F-127-Lösung (20% in DMSO) gelöst. Die Stammkonzentration beträgt 800 μ M für BCECF AM und 1 M für Fluo-4 AM. Das Ionophor 4-Bromo-Calcium A23187 wurde in Ethanol (10 mM Stammkonzentration) gelöst.

Aldosteron ist in 99% Ethanol bei einer Stammkonzentration von 10 mM gelöst.

Der pH-Wert von allen Lösungen wurde mit einem pH-Meter (Fa. Toledo Mettler, Giessen, Deutschland) gemessen.

2.2 K⁺-Influx Messung

2.2.1 Flüssigkeitsszintillationsmessgerät (Tricarb 2900 TR, Fa. Pakard, Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

Mit dem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät können bereits kleine Aktivitäten von β -Strahlern nachgewiesen werden. Dazu wird die Photonenintensität von geeigneten Molekülen, die vom radioaktiv-markierten Analysat angeregt werden, unter lichtempfindlichen (dunklen) Bedingungen detektiert.

Diese Photonenintensität ist von mehreren Faktoren abhängig, wie z. B. dem Flüssigkeitsszintillationscocktail, dem radioaktiv-markierten Analysat und der maximalen Emissionsenergie der verwendeten Substanzen. Die durch die

nukleare und chemische Wechselwirkung ausgesendeten Photonen liegen im ultra-violetten Bereich des elektromagnetischen Spektrums.

Um die Signale der Detektionsereignisse zu verstärken, werden so genannte Photomultiplier eingesetzt (PMT). Das Flüssigkeitsszintillationsmessgerät Tri-Carb 2900 ist mit zwei PMT's ausgestattet. Die Umwandlung von analogen zu digitalen Impulsen wird durch einen Analog-Digitalkonverter realisiert, der die aufgenommene β -Partikelenergie in einem Spektral-Analysator (Spectralyzer™) speichert. Der Spectralyzer besitzt mehrere Speicherorte bzw. -kanäle, die Energien von 0 keV bis 2000 keV konvertieren können.

β -Partikel mit großer Energie, wie sie zum Beispiel von Rb^{86} freigesetzt werden können in einem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät direkt im Wasser gemessen werden. Dazu wird der Čerenkov-Effekt genutzt, der eintritt wenn die Geschwindigkeit eines Teilchens größer als die Lichtgeschwindigkeit in dem betreffenden Medium ist. (Dies ist kein Widerspruch zum Axiom, dass die maximale Geschwindigkeit die des Lichtes im Vakuum ist. Die Lichtgeschwindigkeit in einem Medium ist kleiner als die im Vakuum und in diesem Medium kann die Geschwindigkeit eines Teilchens daher größer als die Lichtgeschwindigkeit in diesem Medium sein.) Durch diese hohe Teilchengeschwindigkeit entstehen direkt Photonen, die mit dem Gerät detektiert werden können.

2.2.2 K^+ -Influx Versuchsablauf

Die im Folgenden beschriebenen Messmethode für den K^+ -Influx basiert auf der Veröffentlichung von Ellory and Young (1982). Das Human- bzw. Hühnerblut wurden vom Plasma durch Zentrifugation bei 25°C (2000 g, 5 min) getrennt. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, anschließend wurden die Zellen dreimal in physiologischer Lösung (HIS) gewaschen. Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal mit der für den Versuch vorgesehenen Fluxlösung gewaschen.

Zur Gewinnung von jungen RBC bzw. Retikulozyten wurden die Zellen nach der Trennung vom Blutplasma aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte separiert. (Junge Zellen haben eine geringere Dichte als RBC, die einige Tage alt sind bzw. alte Zellen, die die größte Dichte besitzen.) Die Erythrozytensuspension wurde

dazu für 1 h bei 2500 g zentrifugiert. Die oberste und unterste Schicht (oberste für junge Zellen, unterste für alte Zellen zum Vergleich, jeweils etwa 20%) wurde entnommen und separat nochmals 1 h bei 2500 g zentrifugiert. Anschließend wurde die gleiche Prozedur nochmals wiederholt (insgesamt 3 h Zentrifugation). Sowohl junge als auch alte Zellen wurden im Vergleich zu „normalen“ RBC für einige Fluxmessungen verwendet.

Die gewaschenen roten Blutzellen (0,3 ml) wurden in verschiedenen Lösungen (HIS bzw. LIS), die folgende Substanzen enthielten, mit einem Hämatokritwert von ca. 5% resuspendiert: 0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid, 0,1 mM EGTA, sowie (0,1 - 0,001 mM) Aldosteron oder Ethanol. Aus diesen Fluxansätzen wurden jeweils 3 x 0,95 ml entnommen und in Eppendorfgefäße gegeben. Nach einer Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C für 5 min erfolgte die Zugabe des $^{86}\text{RbCl}$ (^{86}Rb dient als Analogon für K^+). Der Flux wurde mit der Zugabe von jeweils 50 μl einer 150 mM KCl-Lösung (^{86}Rb markiert) zu den 0,95 ml in den Eppendorfgefäßen gestartet. Damit erhöht sich die KCl-Konzentration des Ansatzes im Vergleich zur eingesetzten Fluxlösung um 7,5 mM.

Nach einer Inkubation von 30 min (Fluxzeit) im Wasserbad bei 37°C wurde die ^{86}Rb -Aufnahme mit eiskalter Fluxwaschlösung gestoppt und nicht aufgenommenes ^{86}Rb abgewaschen. Dazu durchlaufen die roten Blutzellen einen sich viermal wiederholenden Prozess von Abzentrifugieren, Überstand abnehmen, Resuspension in Waschlösung und Vortexen. Nach dem letzten Waschzyklus wurden die Erythrozyten mit 0,5 ml einer 1% (v/v) Triton X 100-Lösung (Triton) hämolysiert. Eine Ausfallreaktion der Proteine wurde durch Zugabe von 0,5 ml einer 5% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) herbeigeführt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde der Überstand zu 2 ml deionisiertem H_2O gegeben. Daraus wurde mit dem Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät die Zählrate des radioaktiven Zerfalls bestimmt.

Jeder Messpunkt einer Messreihe wurde dreifach bestimmt. Um den K^+ -Influx der Proben zu berechnen, wurden noch Standard- und Leerwert vorbereitet. Für den Standard wurden 0,95 ml der Lösung (HIS oder LIS) mit 50 μl der Rubidiumlösung in einem Eppendorfgefäß vermischt und zentrifugiert. Aus dem Gefäß wurden wiederum 50 μl entnommen und mit 2 ml deionisiertem H_2O , 0,5 ml Triton und 0,5 ml TCA vermischt. Von diesem Gemisch bestimmte man die Zählrate des

radioaktiven Zerfalls. Der Leerwert bestand aus 2 ml deionisiertem H₂O, 0,5 ml Triton und 0,5 ml TCA.

2.2.3 Hämatokritwertbestimmung

Der Hämatokritwert wurde photometrisch bestimmt. 100 µl von jedem Fluxansatz wird zu 5 ml Drabkin's-Reagenz gegeben. Die roten Blutzellen hämolysierten im Drabkin's-Reagenz. Außerdem verdrängte im Reagenz enthaltenes Cyanid den Sauerstoff aus dem Hämoglobin. Nach 30 min erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm mit einem UV-Spektrometer (UV-Mini 1240, Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Bei dieser Wellenlänge hatte das desoxygenierte Hämoglobin ein breites Absorptionsmaximum. Ein Leerwert, der nur vom Drabkin's-Reagenz ermittelt wurde, wurde von den Messwerten abgezogen. Es wurde von jedem Fluxansatz eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Hämatokritwert Hk berechnete sich nach Ellory (1982) zu:

$$Hk = \frac{A \cdot f_{DRABKINs}}{CF} \quad (1)$$

Wobei A die Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von 540 nm, $f_{DRABKINs}$ der Verdünnungsfaktor der roten Blutzellen im Drabkin's-Reagenz und CF der Konversionsfaktor ist. CF beinhaltet die molare Masse des Hämoglobins, den molaren Extinktionskoeffizienten, den mittleren Hämoglobingehalt pro Volumeneinheit Erythrozyten und die Schichtdicke der Küvette. Für Humanerythrozyten unter Beachtung der verwendeten Küvetten betrug dieser Wert 247. Der Verdünnungsfaktor war durch die experimentellen Bedingungen festgelegt zu $f_{DRABKINs} = 51$. Somit war der Hämatokritwert nur noch von der Absorption abhängig.

2.2.4 Berechnung des K⁺-Influxes

Die Berechnung des Influxes erfolgte durch die Bestimmung der charakteristischen Aktivität der ins Zellinnere aufgenommenen ⁸⁶Rb-Menge. Dabei wurde vorausgesetzt, dass vor der Zugabe des Tracers keine messbare Radioaktivität in den roten Blutzellen vorhanden war und das mehrmalige Waschen nach der Inkubation alle ⁸⁶Rb-Reste von der Außenseite der Membran

entfernte. Da der Tracer in KCl gelöst war, musste beachtet werden, wieviel KCl im Fluxansatz vorhanden war. Nach Ellory (1982) berechnet sich die spezifische Aktivität c^* zu:

$$c^* = \frac{c_0 + c_{86Rb}}{f_{Std} \cdot cpm(Standard)} \quad (2)$$

c_0 und c_{86Rb} stehen für die KCl-Konzentration der Fluxlösung, respektive für die KCl-Konzentration der Rubidiumlösung ($c_{86Rb} = 7,5$ mM). f_{Std} und cpm repräsentieren Verdünnungsfaktoren und die Zählrate für ^{86}Rb des Standards (counts / min).

Es war darauf zu achten, dass gleiche Volumina des Tracers in der Probe und im Standard vorlagen und ausgemessen wurden. Bei der Variation der Fluxlösungen änderte sich c_0 . Die KCl-Konzentration der Rubidiumlösung blieb dagegen konstant und betrug 7,5 mM.

Mit Hilfe des Hämatokritwertes Hk und der spezifischen Aktivität c^* konnte der K^+ -Influx J ermittelt werden nach:

$$J = \frac{cpm(Probe) \cdot c^* \cdot 60}{V_{Flux} \cdot Hk \cdot t_{Flux}} \left[\frac{mmol}{l \text{ Zellen} \cdot h} \right] \quad (3)$$

Wobei cpm die Zählrate für ^{86}Rb der Probe (Counts / min), V_{Flux} das Fluxvolumen vor Tracerzugabe (0,95 ml) und t_{Flux} die Fluxzeit in (30 min) ist. Der Faktor 60 entstand durch die Umrechnung von min in h. Aus dieser Gleichung wurde unter Zugrundelegung der Messdaten der (Ouabain+Bumetanid+EGTA)-insensitive K^+ -Influx berechnet.

2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des intrazellulären pH-Werts und des Ca^{2+} -Transports in Erythrozyten

2.3.1 Fluoreszenzspektrometer (FluoroMax 2, Fa. Jobin Yvon, München, Deutschland GmbH)

Das Gerät besteht aus einer Lichtquelle, zwei Monochromatoren und einem Detektor. Das Anregungslicht wird von einer kontinuierlichen 150 W Xenon-Lampe ausgesendet. Über einen Monochromator kann monochromatisches Licht gewünschter Anregungswellenlänge erzeugt werden. Die präzise Steuerelektronik ermöglicht einen schnellen Wechsel der monochromatischen Wellenlängen. Der Anregungsstrahl trifft fokussiert auf die Probe. Die Küvette befindet sich in einer thermoregulierten und mit einem Rührer ausgestatteten Kammer (37°C). Die angeregte Fluoreszenzprobe sendet Licht aus, die den Emissionsmonochromator passiert. Dieses Licht wird von einem Photomultiplier registriert.

Für die Spektroskopie mit Fluoreszenzfarbstoffen finden sich generell zwei Arten von Spektren, Anregungsspektrum und Emissionsspektrum. Zur Bestimmung des pH_i von Erythrozyten mit BCECF wurde das Fluoreszenzsignal bei einer Emissionswellenlänge von 531 nm und die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei abwechselnder Anregung von 505 nm und 436 nm gemessen. Dabei ist das Signal bei der Anregung mit 505 nm direkt vom pH-Wert abhängig. Bei 436 nm liegt der sogenannte isosbestische Punkt von BCECF für das Anregungslicht. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei dieser Anregungswellenlänge ist unabhängig von dem pH-Wert der Umgebung des Farbstoffmoleküls. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale ermöglicht die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes, wobei mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Dazu gehören Messfehler, die durch Farbstoffänderungen, Ausbleichen, Interferenz mit Hemmstoffen in der Messlösung sowie Volumen- und Formveränderungen der Zellen entstehen würden (Tsien, 1981).

Die Bestimmung des Ca^{2+}_i von Erythrozyten mit Fluo-4 wurde bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm und die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei einer Anregung von 488 nm gemessen.

2.3.2 Messung mit BCECF AM

Die mit physiologischer Lösung gewaschenen roten Blutzellen (Hk 1%) wurden 45 min mit BCECF AM (6 μM) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten 3 - 4 mal mit HIS-Lösung gewaschen (16 000 g, 20 s) und bei einem Hämatokrit von 10% resuspendiert. Die Erythrozyten wurden zu 4 ml Medium, das 0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA enthielt, in die Küvette gegeben. Danach wurden die Fluoreszenzmessungen gestartet. Die Zellkonzentration in den verwendeten Medien hatte ein Hämatokrit von 0,015%. Diese Zelldichte war für die Bestimmung des pH-Wertes geeignet (separate Tests). Ein direkter Einfluss des Hämoglobins auf die pH_i -Bestimmung konnte durch eine Kalibrierung des Fluoreszenzsignals zum pH-Wert an intakten Zellen ausgeschlossen werden (Kummerow, 1999).

Für die Messung des Fluoreszenzlichtes von intrazellulärem BCECF wurde ein Bandpass von 2 nm für den Anregungsmonochromator und 3 nm für den Emissionsmonochromator verwendet.

2.3.3 Kalibrierung des Fluoreszenzsignals zum intrazellulären pH-Wert

Die Versuchsdurchführung zur Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde genau wie bei der Messung mit BCECF AM vorgenommen aber statt HIS-Lösung wurde BCECF-Kalibrierungslösung verwendet. Die Kalibrierung des intrazellulären pH_i erfolgte mit Hilfe von Nigericin (5 μM). Das Ionophor Nigericin ermöglichte einen K^+/H^+ -Austausch und stellte ein Gleichgewicht der Verteilungen beider Ionen ein, so dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration der extrazellulären entsprach und $\text{pH}_o = \text{pH}_i$ war:

$$\frac{c(\text{H}^+)_i}{c(\text{H}^+)_o} = \frac{c(\text{K}^+)_i}{c(\text{K}^+)_o} \quad \text{oder} \quad \frac{c(\text{H}^+)_i}{c(\text{K}^+)_i} = \frac{c(\text{H}^+)_o}{c(\text{K}^+)_o} \quad (4)$$

Für die Kalibrierung wurden vier Lösungen mit einem pH-Wert von: 6,8; 7,1; 7,4 und 7,8 eingesetzt. Zu der Kalibrierlösung mit den Inhibitoren wurde das Nigericin zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Messung des Fluoreszenzsignals gestartet. Aus den Messpunkten der jeweiligen Kurve wurde ein Mittelwert gebildet, der gegen den pH-Wert der jeweiligen Lösung aufgetragen

wurde. Von den Mittelwerten wurden Regressionsgeraden berechnet, mit deren Hilfe konnte dann das Verhältnis der Fluoreszenzsignale (505 nm / 436 nm) in einen pH-Wert umgewandelt werden.

2.3.4 Messung mit Fluo-4 AM

Mit physiologischer Lösung gewaschene roten Blutzellen (Hk 1%) wurden 15 min mit o-Vanadat (1 mM) und 45 min mit Fluo-4 AM (3,5 μ M) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten 3 - 4 mal mit HIS-Lösung gewaschen (16000 g, 20 s) und bei einem Hämatokrit von 10% resuspendiert. Die Erythrozyten wurden zu 4 ml Medium (HIS) in die Küvette gegeben und die Messung gestartet. Die Zellkonzentration in dem Medium hatte einen Hämatokritwert von 0,015%. Die Zellsuspension wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm über ein Spektrum von 495 nm bis 550 nm gemessen.

2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des intrazellulären pH-Werts und des Ca²⁺-Transports in Erythrozyten

2.4.1 Mikroskop (Eclipse TI 2000 E, Nikon, Düsseldorf, Deutschland und IX 50, Olympus, Hamburg, Deutschland)

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des intrazellulären pH-Werts und des Ca²⁺-Transports in Erythrozyten, wurden mit zwei inversen Mikroskopen, die eine Einzelzellenanalyse gestatten, durchgeführt. Das inverse Mikroskop mit dem vorhandenen Setup ermöglicht eine direkte Beobachtung von Zellen und anderen Präparaten, die von unten auf einem unbeweglichen Objektisch betrachtet werden. Mit Hilfe von Lichtquelle, Filter oder Monochromator, Photo-Detektor und einem Software-Programm erfolgte eine schnelle Registrierung der Fluoreszenzaufnahmen bzw. -filme. Als Lichtquelle diente eine bogenförmige Xenon-Lampe (UX L-75XE, USHIO), da das davon ausgesendete Licht gut fokussierbar ist und höhere Wirkungsgrade im Vergleich zu Halogen-Lampen besitzt. Das Spektrum von Xenon-Lampen verläuft zwischen 300 nm und 800 nm relativ konstant.

Der Filter oder der Monochromator (High Speed Polychromator System, VisiChrome und Polychrome 2, Till Photonics, Aschanberg, Deutschland) realisiert die gewünschte Wellenlänge. Eine Modulation der Wellenlänge ist auch während einer ratiometrischen Messung möglich. Der Monochromator erlaubt es, ein Wellenlängenband $\Delta\lambda$ mit einer mittleren Wellenlänge λ_m aus einem breiten Spektrum auszuwählen und zur Probe weiterzuleiten. Er besteht aus einem Reflexionsgitter, an dem auftreffendes weißes Licht reflektiert und gebeugt wird. Das weiße Licht wird am Reflexionsgitter in mehrere Spektren zerlegt, wodurch es durch eine leichte Drehung des Gitters um einen bestimmten Winkel möglich ist, die jeweils gewünschte Wellenlänge in den zum Mikroskop führenden Lichtleiter einzukoppeln.

Die Filter für die verschiedenen Wellenlängen sind im Mikroskop auf einem Filterrad montiert und werden zwischen den einzelnen Positionen hin- und herbewegt. Der Photo-Detektor (CCD 77, Visitron System, Puchheim, Deutschland und Imago, Till Photonics, Aschanberg, Deutschland) fängt das Fluoreszenzlicht ein und wandelt das Lichtsignal in ein digitales Signal um. Der CCDs (*charged coupled devices*) -Detektor ist als Chip in Kameras integriert, wodurch sowohl eine gute räumliche als auch zeitliche Auflösung erzielt wird. Ein CCD-Chip besteht aus vielen Pixeln, die es ermöglichen, subzelluläre Strukturen zu erkennen. Die auf einen einzelnen Pixel auftreffenden Photonen des Fluoreszenzlichts schlagen aus der photosensitiven Schicht des Chips Elektronen heraus, die im Pixel selbst gespeichert werden. Nach der Aufnahme werden die Pixel ausgelesen und als Bild dargestellt. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit einer CCD-Kamera wird durch die Belichtungszeit, sowie die ausgewählte Geschwindigkeit der Kamera beschränkt und liegt mittlerweile unter 1 ms (Deitmer und Schild, 2000). In Abb. 2.1 ist das inverse Mikroskop Eclipse TI 2000 E von Nikon dargestellt. Das Mikroskop wurde für die Untersuchungen des intrazellulären pH-Werts und Ca^{2+} -Transports in Erythrozyten verwendet.

2.4.2 Versuchsaufbau mit BCECF AM

Die mit physiologischer Lösung gewaschenen roten Blutzellen (Hk 1%) wurden 45 min mit BCECF AM (6 μM) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten 3 - 4 mal mit HIS-Lösung gewaschen (16 000 g, 20 s) und bei einem

Hämatokrit (Hk) von 0,5% resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μl in 900 μl HIS-Lösung gegeben, damit die Zellen einen Hämatokritwert von 0,05% in der Gebrauchslösung hatten. Ein Hämatokritwert von 0,05% ermöglichte eine Fluoreszenzaufnahme von gleichzeitig ca. 20 Zellen.

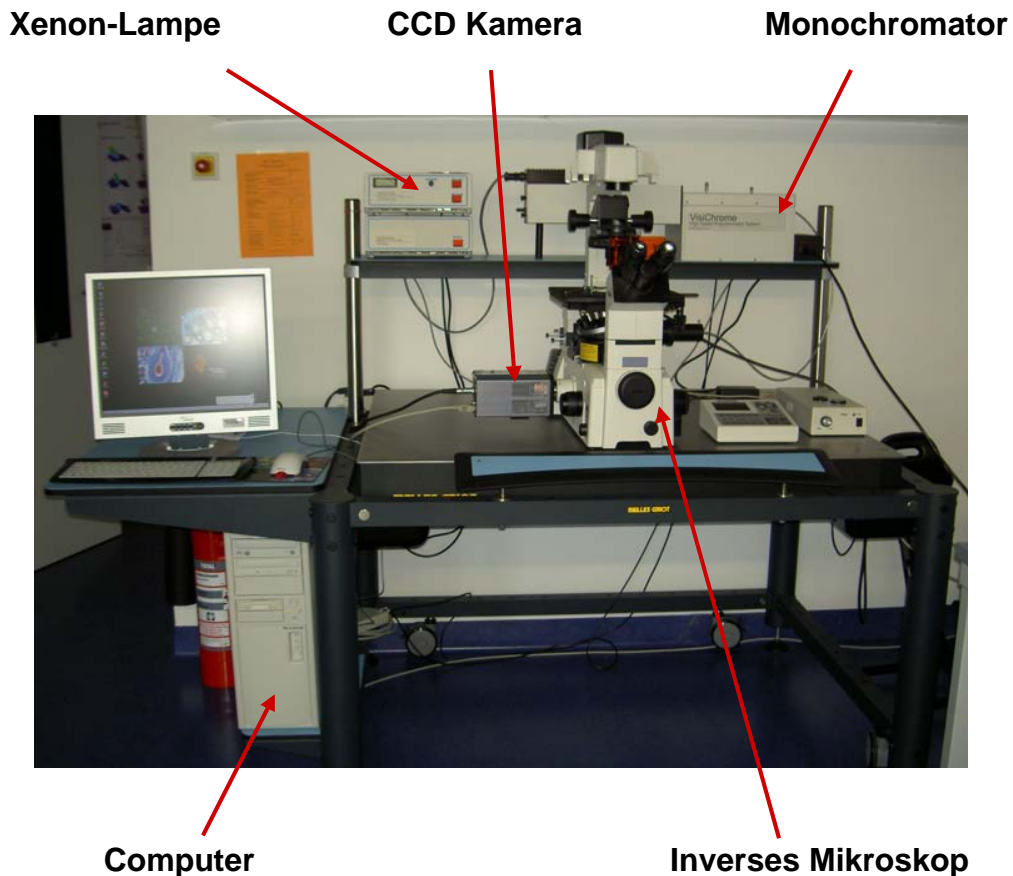


Abb. 2.1: Fluoreszenz-Mikroskopie-Setup der Arbeitsgruppe Biophysik, Universität des Saarlandes.

Bei den Messungen in LIS-Lösung wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung in dieser Lösung gewaschen. 5 Minuten vor dem Start der Messung wurde die Lösung auf die Deckgläser gegeben, damit die Zellen sedimentieren konnten. Die Messungen mit HIS-Lösung wurden gestartet, nachdem den Zellen 15 min Zeit gegeben wurde, um sich auf der Oberfläche des Objektträgers abzusetzen und die intrazellulären Farbstoffester zu spalten.

Aldosteron bzw. Ethanol wurde 10 min vor oder direkt nach dem Start der Kinetik der Fluoreszenzmessung in entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Die

Kalibrierung der BCECF AM Messung wurde wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, durchgeführt.

2.4.3 Versuchsaufbau mit Fluo-4 AM

Die mit physiologischer Lösung gewaschenen roten Blutzellen (Hk 1%) wurden 45 min mit Fluo-4 AM (3,5 μM) bei 37°C inkubiert. Bei Experimenten, in denen die Ca^{2+} -Pumpe gehemmt wurde, wurden die Zellen 15 min vor der Inkubation in der HIS-Lösung mit 1 mM o-Vanadat behandelt. Der HIS-Lösung beträgt 7,1 pH, wenn mit o-Vanadat Messung durchgeführt wurde. Nach Zugabe von o-Vanadat der pH-Wert steigt bis 7,4. Die Inkubationslösung (HIS mit Fluo-4 AM) enthielt 1 mM o-Vanadat, wenn im weiteren Versuchsverlauf o-Vanadat anwesend war. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten 3 - 4 mal mit HIS-Lösung (+/- o-Vanadat) gewaschen (16 000 g, 20 s) und bei einem Hämatokritwert (Hk) von 0,5% resuspendiert. Der Hämatokritwert der Versuchssuspension betrug 0,05%. Die weitere Vorbereitung der Messung erfolgte wie im Kapitel 2.3.4 beschrieben.

2.4.4 Farbstoffbeladung

Für die Fluoreszenzanalyse des intrazellulären pH-Wertes und des Ca^{2+} -Transportes wurden Messungen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Die Erythrozyten wurden 45 min bis 1 h mit dem jeweiligen AM Farbstoff aufgeladen. Die Verwendung von AM-Komponenten (um fettlösliche Stoffe in die RBC einzubringen) wurde von Tsien (1981) erstmals mit der Aufnahme von Ca^{2+} -Chelatoren beschrieben.

AM-Verbindungen sind stark hydrophob und wurden normalerweise in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Sie wurden der Zellsuspension aus einer konzentrierteren Stocklösung zugegeben. Die membranpermeablen AM-Ester (Abb. 2.2 und 2.4) können aufgrund der polaren Acetoxymethylreste die Zellmembran passieren. Im Cytosol werden die Esterbindungen von intrazellulären Esterasen gespalten, dabei entsteht Formaldehyd, Acetat und die membranimpermeable Säureform des sensitiven Farbstoffs.

Bei Beladung mit den AM-Formen sollte die Inkubationskonzentration des Farbstoffes möglichst klein sein, um die zellulären Esterasen nicht zu überlasten.

Eine solche Überlastung würde eine zu hohe Anreicherung der AM-Form in der Zelle bewirken. Dadurch könnte der nicht direkt gespaltene Ester auch in Zellkompartimente eindringen und diese anfärben bzw. später, während der Messung, gespalten werden, so dass die Menge des aktiven Farbstoffs nicht konstant wäre. Zur ausreichenden Inkubation genügen geringe Farbstoff-Konzentrationen im mikromolaren Bereich, da aufgrund der Esterspaltung in der Zelle ein permanenter Konzentrationsgradient für den AM-Ester vorliegt, so dass die Farbstoffkonzentration in der Zelle die Inkubationskonzentration um ein Vielfaches übersteigt.

Mit Hilfe des BCECF AM Fluoreszenzfarbstoff wurde der intrazelluläre pH-Wert bestimmt. Das spezifische Fluoreszenzspektrum ändert sich in Abhängigkeit von der Konzentration des gebundenen Liganden (H^+) in der Form, dass sich die Maxima der Spektren sukzessive zu anderen Wellenlängen hin verschieben. Der BCECF-Farbstoff ist ein ratiometrischer Farbstoff (Abb. 2.3). Das Messprinzip beruht dabei darauf, dass ein Verhältnis der bei zwei verschiedenen Wellenlängen ermittelten Fluoreszenzintensität gebildet wird. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde mit zwei Anregungswellenlängen, 440 nm und 490 nm, und für spektrometrische Untersuchung mit 436 nm und 505 nm gearbeitet. Die Absorptionswellenlänge lag in beiden Fällen bei 535 nm. Bei 440 nm liegt der isobestische Punkt von BCECF.

Dieser Farbstoff erlaubt eine genaue Konzentrationsbestimmung und eignet sich besonders gut, da unerwünschte, verfälschende Effekte, wie z. B. unterschiedliche Farbstoffbeladungen ausgeschlossen werden können.

Mit einem pK_a -Wert von 7,0 eignet sich der BCECF Farbstoff optimal für cytoplasmatische pH-Messungen. Die Anregungswellenlängen für spektrometrische- und mikroskopische Untersuchungen wurden unterschiedlich ausgewählt. Für die spektrometrischen Messungen wurden die Wellenlängen, wie von Kummerow (1999) optimiert, verwendet.

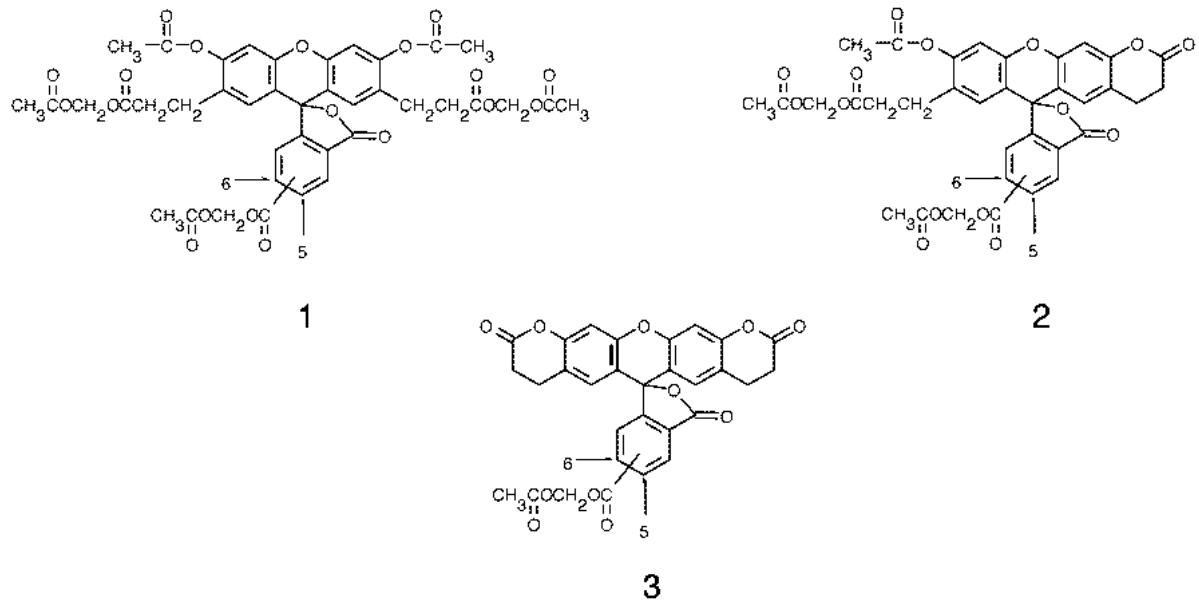


Abb. 2.2: Strukturformeln des AM-Esters des BCECF-Farbstoffs (3 verschiedene Formen, die in der Präparation vorhanden sein können; in der verwendeten Präparation von Molecular Probes sind überwiegend die 2. und 3. Variante enthalten).

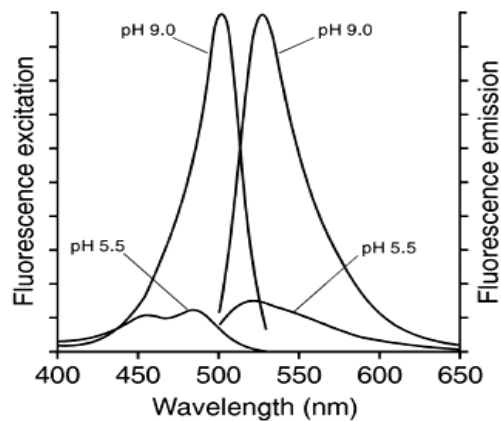


Abb. 2.3: Absorptionsspektrum (535 nm) und Emissionsspektrum (490 nm) des BCECF-Farbstoffs bei pH-Werten von 5,5 und 9,0.

Fluo-4 ist ein Farbstoffindikator für intrazelluläres Ca^{2+} . Die Fluoreszenzintensität ändert sich mit der Bindung von Ca^{2+} an den Farbstoff. Aufgrund dieser Eigenschaft sind nur qualitative Messungen möglich. Es kann nur ermittelt werden,

wie und mit welchem Verlauf sich die Konzentration des zu untersuchenden Ions (Ca^{2+}) ändert.

Die Ca^{2+} -Dissoziationskonstante (K_D) für Fluo-4 liegt bei 345 nm. Die Anregung von Fluo-4 erfolgt bei 488 nm, der Emissionspeak ist bei 520 nm (Abb. 2.5) zu sehen.

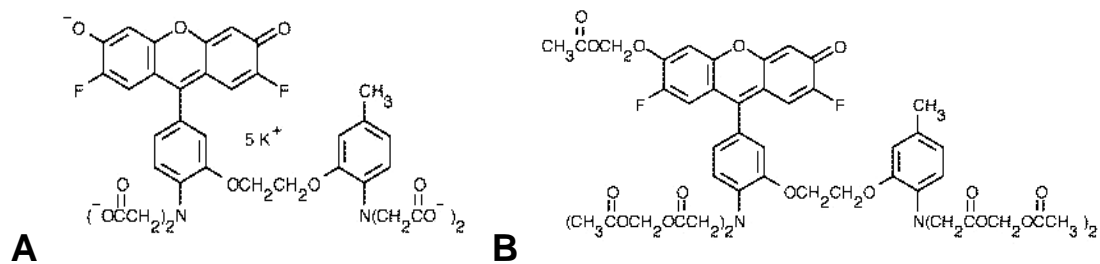


Abb. 2.4: Strukturformeln von Fluo-4 (**A**) und dem AM-Ester von Fluo-4 (**B**).

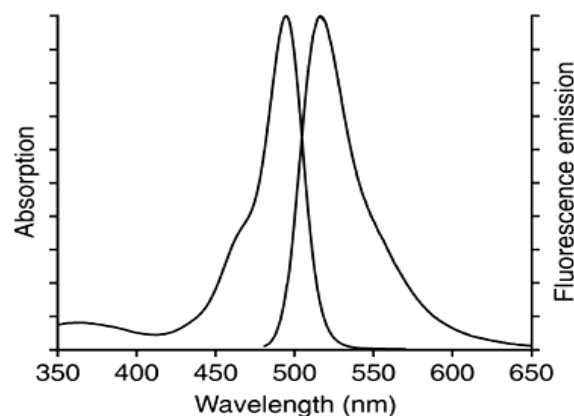


Abb. 2.5: Absorptionsspektrum (488 nm) und Emissionsspektrum (520 nm) von Fluo-4 AM.

2.4.5 Vorbereitung des Mikroskops

Während der Zellinkubation wurden die Deckgläser für 45 min mit 500 μl einer 0,001% Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Bevor die Zellsuspension auf dem Objektisch für die Untersuchung vorbereitet wurde, wurden die Deckgläser gründlich mit deionisiertem H_2O gespült. Die Deckgläser wurden durch hochviskose Baysilone-Paste vor dem Einschrauben in den Halter abgedichtet.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur und mit Ölimmersionsobjektiven mit 100facher Vergrößerung durchgeführt.

Die Belichtungszeit betrug 500 ms; das Intervall 20 s. Es wurden Fluoreszenzspektren einzelner Zellen aufgenommen. Die Dauer der Aufnahmen wurde auf 30 min begrenzt, um Effekte durch Poly-L-Lysin zu vermeiden. Mit Hilfe von Imaging-Programmen (MetaVue, Tillvision) wurden die Zellen sowie ein zellfreier Hintergrund durch eine „Region of Interest“ (ROI) markiert. Die innerhalb dieser Region befindliche Fluoreszenzintensität wurde gegen die Zeit aufgetragen, wodurch sich unkorrigierte Diagramme ergaben (Abb. 2.6). Die hintergrundkorrigierten Diagramme entstanden durch Abzug der zeitgleich gemessenen Hintergrundfluoreszenz von der Fluoreszenz jeder Zelle. In den Fällen, in denen ein normiertes Diagramm dargestellt wurde, wurden hierfür nach der Hintergrundkorrektur die ersten 10 Fluoreszenzmesswerte gemittelt und alle Messwerte durch diesen Wert dividiert. Dadurch besaß die Ausgangsfluoreszenz den Wert 1 und die Skala enthielt den Faktor, um den sich die Fluoreszenz im Zeitverlauf veränderte.

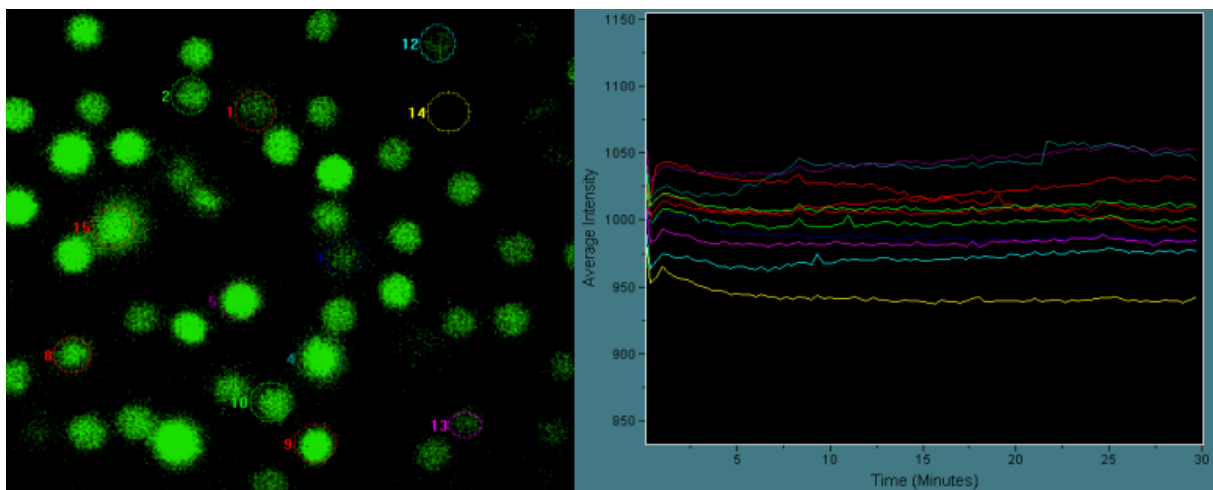


Abb. 2.6: Direkte Fluoreszenzaufnahme (links) mit markierten Erythrozyten und die entsprechende Kinetikaufnahme (rechts) des Farbstoffs Fluo-4 AM über einen Zeitraum von 30 min (in physiologischer Lösung mit 2 mM Ca^{2+}).

2.5 Li⁺-Transport

2.5.1 Atomabsorptionsspektrometer (AAS)

Mit dem Atomabsorptionsspektrometer (Perkin-Elmer 2100, Fa. Perkin-Elmer) wurde der intrazelluläre Li⁺-Gehalt der Erythrozyten bestimmt. Die Atomisierung der Proben wird mit Hilfe einer Luft-Acetylen-Flamme, die besonders universell einsetzbar ist, durchgeführt. Die zu messende Probe wird durch einen Zerstäuber in die Flamme gesprüht, wobei sie in Atome dissoziiert. Die Elektronen der äußersten Elektronenhülle werden angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Von dort kann jedes Elektron von selbst wieder in ein niedrigeres Niveau, meist den Grundzustand, zurückspringen. Die Energie wird dabei durch Emission elektromagnetischer Strahlung abgegeben.

$$E_2 - E_1 = h \cdot \nu \quad (5)$$

wobei h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz bezeichnet. Beim Sprung eines Elektrons von einer Bahn zur anderen wird genau 1 Photon emittiert bzw. absorbiert. Ist der Abstand der Differenz der Niveaus größer, wird lediglich die Frequenz des Photons größer. Die Spektren der Atome sind Linienspektren, die sehr spezifisch für die einzelnen Atome sind. Dadurch kann man den Gehalt von bestimmten Ionen, wie z. B. Li⁺, in der Lösung bestimmen. Als Empfänger des Photonenstroms dient ein Photomultiplier, der das Signal in einen Elektronenstrom umwandelt.

Die Messung am AAS folgt dem Lambert-Beerschen-Gesetz, was bedeutet, dass eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion (A) und der Konzentration bzw. Masse der Atome besteht. Es ist ein Relativverfahren, d.h. die Beziehung zwischen Extinktion (A) und der Konzentration oder Masse eines Elementes lässt sich nur mit Hilfe von Bezugslösungen ermitteln, die bekannte Konzentrationen des zu untersuchenden Elementes erhalten. Die mathematische Beziehung zwischen dem Messwert A und dem zu bestimmenden Gehalt, z. B. der Massenkonzentration (β), dem Massenanteil (w) oder der Masse (m) ist gegeben durch:

$$A = f(\beta), A_0 = g(w) \text{ und } A = h(m) \quad (6)$$

Es wurde bei einer Abhängigkeit A von m , folgendes zugrunde gelegt:

$$\frac{\Delta A}{\Delta m} = \text{grad } \gamma \quad (7)$$

Der Wert *grad* γ stellt die Steigung der Anpassungsgeraden dar. Die von der Probe stammenden Atome lösen ein Messsignal aus, dessen Höhe proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Elementes ist. Die Konzentration der zu untersuchenden Ionen der Probe wurde in mg/l angegeben und wurde in mmol/l umgerechnet, indem man den gemessenen Messwert durch die Molmasse (für Li^+ 6,941 g/mol) dividierte (Naumer, 1990; Gerthsen, 1993).

2.5.2 Methode zur Bestimmung des Li^+ -Effluxes

16 μl Erythrozytenkonzentrat wurden in 40 ml Li^+ -Waschlösung suspendiert und zentrifugiert (2000 g, 4°C, 5 min). Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die so gewonnenen Blutzellen wurden mit Li^+ -Ladelösung 3 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Ladelösung wurde durch Abzentrifugieren (1250 g, 5 min, 4°C) entfernt. Danach wurden die Zellen in der Waschlösung dreimal und schließlich in der entsprechenden Fluxlösung, die Bumetanid (0,1 mM) und Ouabain (0,1 mM) enthielt, je einmal gewaschen, um einen vollständigen Lösungsaustausch zu gewährleisten.

Zu 5 ml abzentrifugierten Zellen wurden 21,5 ml Fluxlösungen (Tabelle 2) hinzugegeben. Den Fluxlösungen war je 0,1 mM Ouabain und 0,1 mM Bumetanid, sowie zusätzlich Phloretin (0,01 mM) oder Ethanol und Aldosteron (0,01 mM) oder Ethanol zugesetzt. Die Fluxlösung (37°C) wurde zu den Zellen gegeben. Die Suspension wurde durchmischt und innerhalb kürzester Zeit (< 1 min) wurde die erste Probe entnommen. Nachdem die Zellen in der Fluxlösung resuspendiert waren, wurde jeweils eine Probe von 1,8 ml in ein Eppendorfgefäß (2 ml) gefüllt und in der Tischzentrifuge (Zentrifuge 5415C, Fa. Eppendorf, Hamburg,) bei 16000 g, 30 s abzentrifugiert. Die Überstände von jeweils zwei entnommenen

Proben (nach jeweils 1, 30 und 60 min) wurden mit 50 µl konzentrierte HNO₃ angesäuert und anschließend zur Messung am AAS verwendet. Um die von den Erythrozyten während der Inkubation (Li⁺-Beladung) aufgenommenen Li⁺-Ionen zu quantifizieren, wurden zu Versuchsbeginn 1,8 ml Erythrozytensuspension aus jedem Fluxansatz zu 18 ml deionisiertem H₂O gegeben. Die Zellen lysierten dadurch und setzten das vorhandene Li⁺ frei (Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0). Dieser Wert wird zur Berechnung des Effluxes benötigt.

2.5.3 Methode zur Bestimmung des Li⁺-Influxes

Das Erythrozytenkonzentrat wurde mit der Li⁺-Waschlösung viermal gewaschen. Danach wurden 50 ml gepackte Zellen in der Na⁺-Ladelösung mit Nystatin (5 µg/ml) für 1 h bei 4°C inkubiert (Gesamtvolumen 50 ml). Nach der Inkubation wurde die Ladelösung mit Nystatin durch Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4°C) durch eine frische Ladelösung, die kein Nystatin mehr enthielt, ersetzt und die Zellen im Wasserbad für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Erythrozyten wurden dreimal mit Waschlösung und einmal mit Fluxlösung (in Anwesenheit der Transportinhibitoren) gewaschen. Zu Beginn wurden 1,5 ml Blutzellen in jedem Behälter mit 7,5 ml Fluxlösung I/II, die 7,5 mM Li⁺ enthielt, resuspendiert. Außerdem wurden je 0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid, 0,01 mM Phloretin oder Ethanol und 0,01 mM Aldosteron oder Ethanol zugegeben. Die ersten Proben wurden innerhalb < 1 min entnommen und für 30 s (16000 g) abzentrifugiert, anschließend wurden die Zellen mit Waschlösung (4°C) viermal gewaschen, um das außen vorhandene Li⁺ zu entfernen. Nach 30 min wurden die nächsten Proben entnommen, danach wiederholte sich der Ablauf wie beschrieben. Das Pellet von 0,5 ml wurde zu einer 1%igen Triton X-100 Lösung gegeben und die Zellsuspension gevortext, um die Zellen zu hämolysieren. Dazu wurde vorher noch 0,5 ml TCA (5% w/v) gegeben, um die Proteine durch Zentrifugation (5 min, 16000 g) zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und der Li⁺-Gehalt am AAS bestimmt. Die Hämatokritwertbestimmung wurde wie im Kapitel 2.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.6 Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und Oberflächen: Ca^{2+} -Transport Untersuchung

In Rahmen diese Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Oberflächen auf den Ca^{2+} -Transport an Erythrozyten untersucht. Die Wechselwirkung zwischen Erythrozyten und Oberflächen könnte einen Einfluss auf Ca^{2+} -Transportsysteme in der Membran haben und auf diese Weise den Zellzustand beeinflussen. Denkbar sind Reaktionen durch Ca^{2+} -Aufnahme, -Verlust oder aber keine Reaktion beim Kontakt mit den modifizierten bzw. strukturierten Oberflächen.

Die verwendeten Oberflächen:

a) Borosilikat-Glas mit PLL (Kontrolle)

Der Kontakt der Zellen mit der PLL-beschichteten Glasoberfläche wurde durch zwei Methoden untersucht: Einzelzell-Fluoreszenz-Mikroskopie und digitale Holographie-Mikroskopie. Die Fluoreszenz-Mikroskopie an Einzelzellen wurde in Kapitel 2.4 beschrieben. Die digitale Holographie-Mikroskopie ist eine neue Technologie, die 3D-Aufnahmen von Zellen während der Sedimentation gestattet. Dabei kann die Zelle immer im optischen Fokus gehalten werden. Die Humanerythrozyten wurden bei Anwendung dieser Methode in HIS-Lösung in An- oder Abwesenheit des Transportinhibitors DIDS während des Sedimentationsprozesses und nach direktem Kontakt mit der PLL-beschichteten Glasoberfläche beobachtet.

b) Mikro-/Nano-strukturierte Oberflächen GPTS04 und ETC03 (INM)

GPTS04 und ETC03 Glasoberflächen haben Mikro-Kontakt-Aufdrucke, deren Linienstrukturen Abstände von 1 bis 8 μm und Höhen von 200 bis 400 nm haben (Abb. 2.7). Die ETC03 Oberfläche wurde mit perfluorierten organischen Gruppen beschichtet. Dadurch soll eine antihaftende Eigenschaft der Oberflächen erreicht werden. Die GPTS04 Oberflächen bestehen aus Strukturen im Glas.

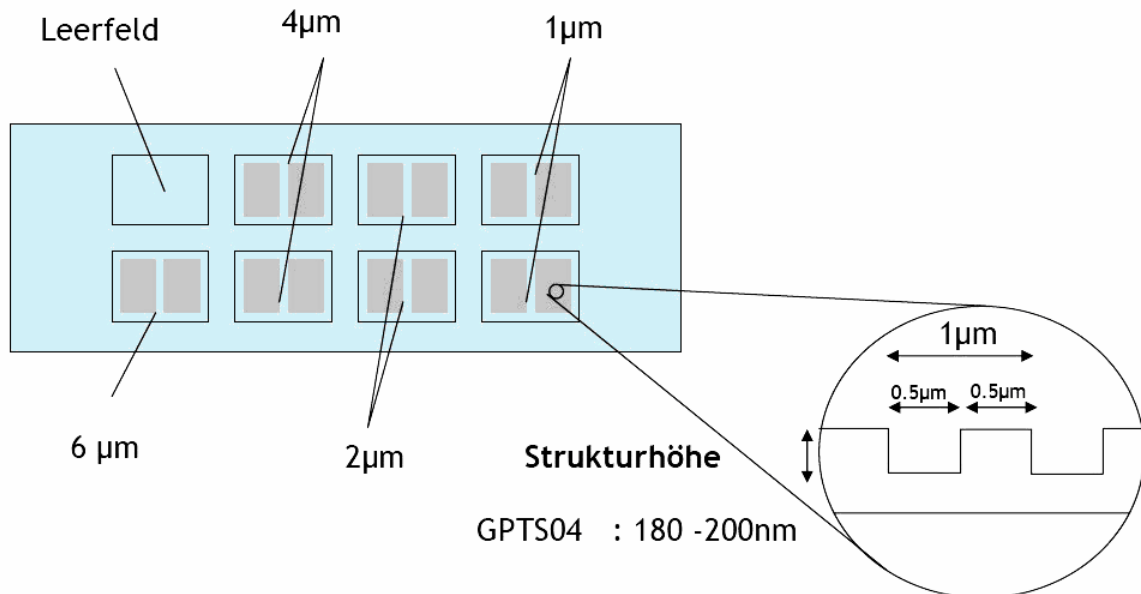


Abb. 2.7: Darstellung der Strukturen der GPTS04 Oberfläche, sowie die Mikro-Kontakt-Aufdrucke.

- c) Mikro-/Nano-strukturierte Polymeroberflächen (Science Park, Barcelona)

Die Polymeroberflächen bestehen aus Methylmethakrylat. Die Mikro-Strukturen wurden aus Silikonoxid und Silikonitrid als ein Bilayer auf die Oberfläche aufgedruckt (Abb. 2.8).

- d) Organische Polymere auf Glasoberflächen (Chemische Fakultät, Universität Sofia)

Die drei Polymere wurden in deionisiertem Wasser gelöst und auf den Glasoberflächen als eine dünne Schicht aufgetragen. Die Polymere I und II sind bipolar aufgeladen, das Polymer III hat eine negative Ladung (Abb. 2.9). Die getrockneten Oberflächen wurden für die mikroskopische Untersuchung verwendet (siehe oben 2.4.4).

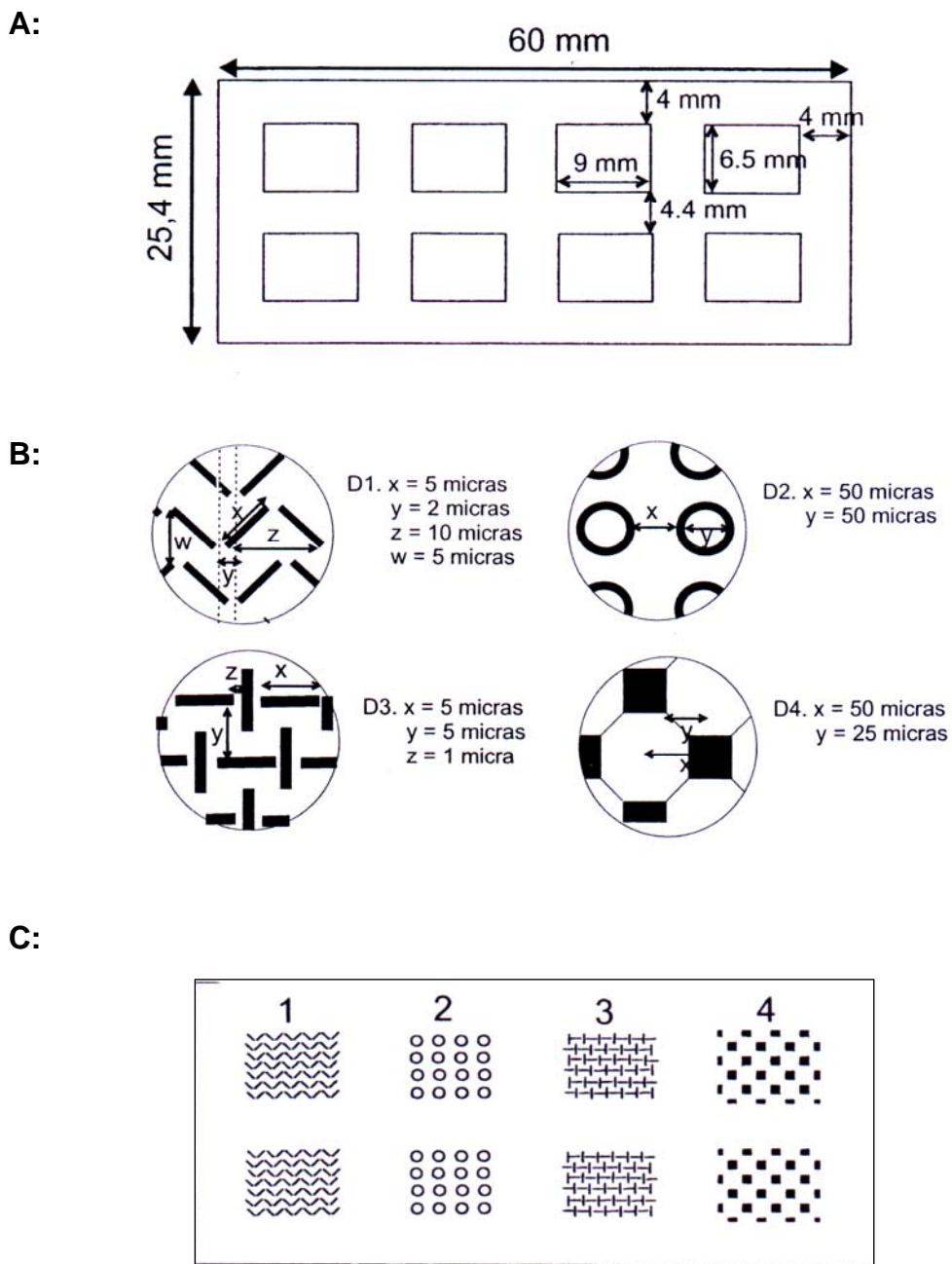


Abb. 2.8: Darstellung der Strukturen der Polymeroberflächen sowie die unterschiedlichen Mikro-Kontakt-Aufdrucke. **A:** Maße der Polymeroberfläche, **B:** Strukturen der Mikro-Kontakt-Aufdrucke (micras = μm), **C:** Eine Oberfläche mit acht unterschiedlichen Aufdrucken.

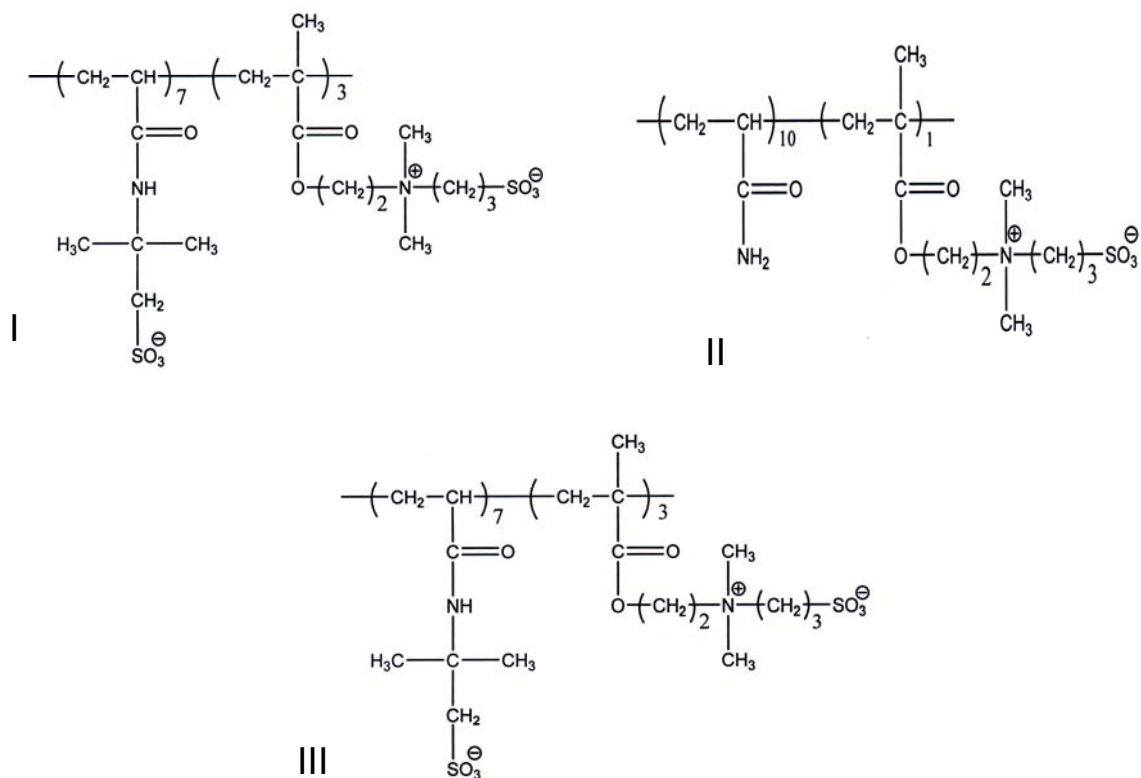


Abb. 2.9: Strukturformeln der verwendeten organischen Polymere (in abgekürzter Schreibweise) **I:** NVP / DMAEMPS = 6, **II:** AA_m / DMAEMPS = 10 / 1, **III:** AMPS / DMAEMPS = 7 / 3.

Die Abkürzungen in der Legende zu Abb. 2.8 bedeuten:

NVP / DMAEMPS = 6: Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-N,N'-dimethacryloyloxypropanesulfonate

AA_m / DMAEMPS = 10 / 1: Poly(acrylamide-co-N,N'-dimethylmethacryloylpropanesulfonate

AMPS / DMAEMPS = 7 / 3: Poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid-co-N,N'-dimethylmethacryloyl-oxyethylpropanesulfonate

3. Ergebnisse

3.1 K⁺-Influx

a) K⁺-Influx an Humanerythrozyten

Die Untersuchung des direkten Einfluss' von Aldosteron auf die Ionenfluxe wurde mit Hilfe der Tracerkinetik durchgeführt. Für die Untersuchung des K⁺-Transportes durch die Erythrozytenmembran wird ⁸⁶Rb als Analogon eingesetzt, da kein geeignetes K⁺-Isotop zur Verfügung steht. Mit diesem Isotop kann nicht nur der Gesamt-K⁺-Influx, sondern auch die Aktivität der Na⁺/K⁺-Pumpe, die durch Ouabain gehemmt werden kann, die Aktivität des Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporters, inaktivierbar durch Bumetanid und die Aktivität des K⁺(Na⁺)/H⁺-Antiporters, der für einen Teil des Ouabain- und Bumetanid-insensitiven Anteils des Gesamtfluges verantwortlich ist, ermittelt werden.

Um den Einfluss von Aldosteron auf die einzelnen Ionenfluxe zu untersuchen, wurden verschiedene Steroidkonzentrationen sowie Vorinkubationszeiten berücksichtigt (Abb. 3.1, 3.2). Die Vorinkubationszeiten der Erythrozyten mit Aldosteron betragen 5, 10, 30 und 60 min, bevor der K⁺ (⁸⁶Rb)-Influx über 30 min gemessen wurde (in Anwesenheit von Aldosteron). Die Konzentration von Aldosteron wurde zwischen 100 nM und 10 µM gewählt.

Die K⁺-Influx Messungen wurden an Humanenerythrozyten, Hühnererythrozyten und an Erythrozyten von Nabelschnurblut durchgeführt. Die Hühnererythrozyten haben im Vergleich zu Humanerythrozyten einen Kern und damit DNA. Der nicht-genomischen Effekt konnte somit auch an Zellen mit Genom überprüft werden. Die Nabelschnurblut-Erythrozyten bestehen aus einer deutlich erhöhten Zahl von jungen Erythrozyten (Retikulozyten), die noch RNA enthalten.

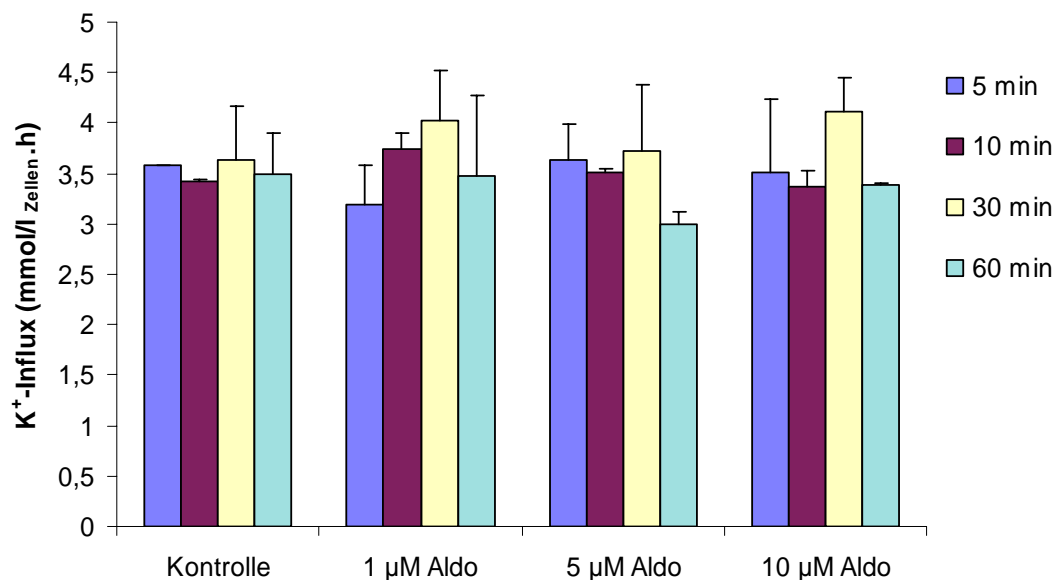


Abb. 3.1: Gesamt-K⁺-Influxe an Humanerythrozyten in HIS-Lösung bei unterschiedlichen Aldosteron-Konzentrationen und unterschiedlichen Vorinkubationszeiten (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 18 Messungen).

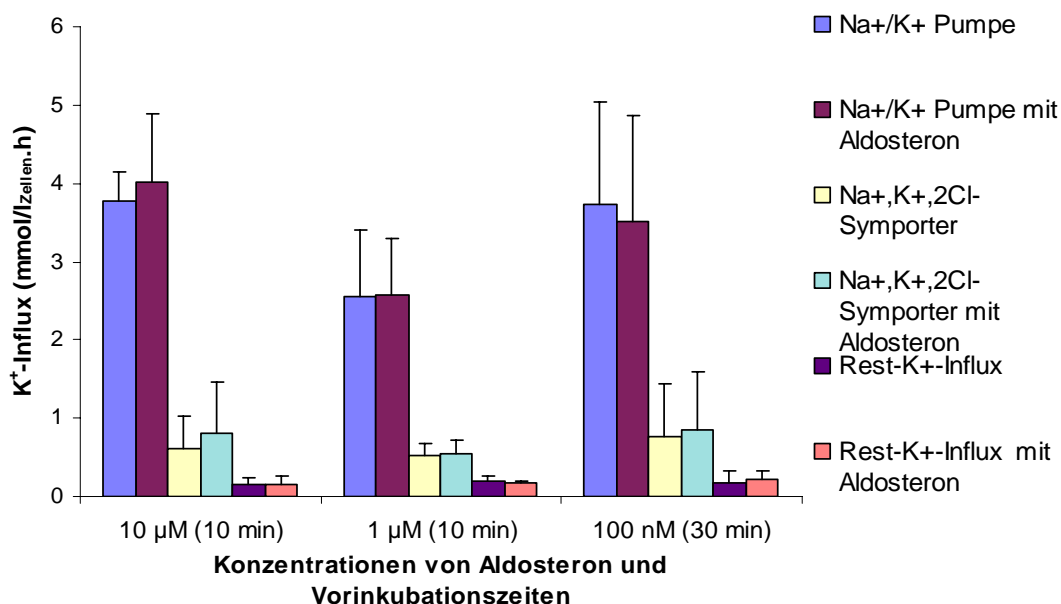


Abb. 3.2: Auswirkung der Aldosteron-Konzentration und der Inkubationszeiten auf den über die Na⁺/K⁺-Pumpe, den Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporter und den Rest-K⁺-Influx entfallenden Teil des K⁺-Influges an Humanerythrozyten in HIS-Lösung (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 13 Messungen).

Die Messungen wurden in Lösungen mit hoher (Abb. 3.1) bzw. niedriger Ionenstärke (Abb. 3.3) durchgeführt. Die niedrige Ionenstärke wurde verwendet, um den $K^+(Na^+)/H^+$ -Antiporter zu aktivieren (Bernhardt *et al.*, 2003).

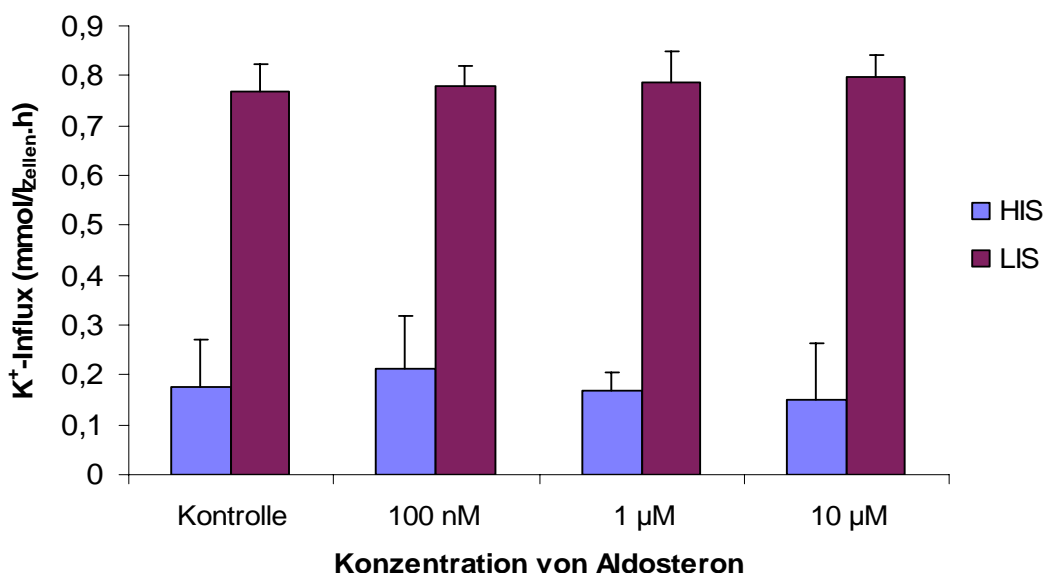


Abb. 3.3: Ouabain- und Bumetanid-resistenter K^+ -Influx an Humanerythrozyten in LIS-Lösung im Vergleich zur HIS-Lösung bei verschiedenen Aldosteron-Konzentrationen und einer Vorinkubationszeit von 10 Minuten (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 10 Messungen).

Die Versuche zum K^+ -Influx in HIS-Lösung mit verschiedenen Aldosteron-Konzentrationen und Vorinkubationszeiten zeigen keinen signifikanten Unterschied. In der LIS-Lösung wurde ebenfalls kein signifikanter Aldosteron-Einfluss auf den $K^+(Na^+)/H^+$ -Antiporter gefunden. Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche Versuche ($n > 10$) bestätigt.

Es wurden deshalb Retikulozyten in die Untersuchungen einbezogen. Es handelt sich dabei um junge, nicht reife Erythrozyten, die noch RNA enthalten. Es wird davon ausgegangen, dass die Retikulozyten die gleichen Ionentransportsysteme wie die reifen, adulten Erythrozyten besitzen. Die Methoden, mit denen man die Retikulozyten von "alten" Erythrozyten trennen kann, sind im Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse des resultierenden K^+ -Influges über die Na^+/K^+ -Pumpe und den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter mit und ohne Verwendung von Aldosteron dargestellt. Die Versuche wurden in physiologischer Lösung durchgeführt. Wie schon an reifen humanen Erythrozyten konnte auch an Retikulozyten kein signifikanter Effekt von Aldosteron auf die Na^+/K^+ -Pumpe beobachtet werden. Der über den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter vermittelte K^+ -Transport ist jedoch nach Aldosteron-Einwirkung signifikant verringert. Da die Fluxmessungen an Retikulozyten 10 min nach der Aldosteroninkubation stattfanden, kann ein möglicher Effekt des Aldosterons ausgeschlossen werden.

Tabelle 3

K^+ -Influx über die Na^+/K^+ -Pumpe und den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter in Retikulozyten in Anwesenheit (10 μM) und Abwesenheit von Aldosteron (Inkubationszeit 10 min).

Versuch No	Kontrolle		Aldosteron	
	Na^+/K^+ -Pumpe	$Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter	Na^+/K^+ -Pumpe	$Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter
1.	1,712	0,978	1,566	0,284
2.	1,526	1,837	2,109	0,486
3.	2,149	2,091	1,768	0,831
MW	1,7957	1,6353	1,8143	0,5337
SD	0,3198	0,5833	0,2744	0,2766

b) K^+ -Influx an Hühnererythrozyten

Der Einfluss von Aldosteron wurde auf den K^+ -Influx an Hühnererythrozyten in HIS-Lösungen untersucht. Wie bei Humanerythrozyten wurden unterschiedliche Steroidkonzentrationen und Vorinkubationszeiten berücksichtigt (Abb. 3.4). Die Konzentration von Aldosteron wurde zwischen 100 nM und 10 μM gewählt.

Die K^+ -Influx Messungen mit 100 nM und 1 μM zeigen höhere Werte als mit 10 μM , da die Ethanol Mengen (auch für gelöstes Aldosteron) bei beiden Versuchsreihen deutlich höher (10 μl) sind als bei einer 10 μM Aldosteron / Ethanol Messung (1 μl). Auch bei den Untersuchungen an Hühnererythrozyten konnten keine signifikanten Effekte einer Aldosteron-Wirkung festgestellt werden. Auch an Hühnererythrozyten, die DNA enthalten, ist kein nicht-genomischer Effekt des

Steroidhormons Aldosteron auf die Na^+/K^+ -Pumpe (Abb. 3.4), den $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporter (Abb. 3.4) sowie den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Antiporter (Abb. 3.5) nachweisbar.

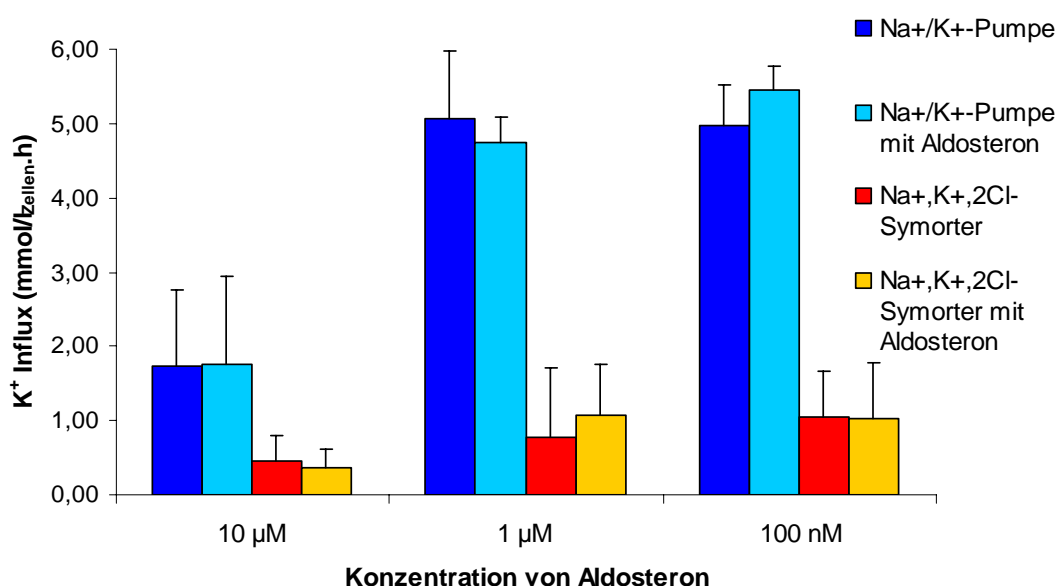


Abb. 3.4: K^+ -Influxe bei unterschiedlichen Aldosteron-Konzentrationen und Vorinkubationszeit von 5 min in HIS-Lösung an Hühnererythrozyten (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 6 Messungen von jeweils 6 Hühnern).

Der Ouabain- und Bumetanid-resistente K^+ -Influx bei verschiedenen Konzentrationen von Aldosteron in HIS- und LIS-Lösung an Hühnererythrozyten wurde bei 5 min und 30 min Vorinkubationszeit gemessen (Abb. 3.5, 3.6). Bei beiden Ionenstärken konnte kein Einfluss von Aldosteron auf den Restflux gefunden werden. Bei längerer Vorinkubationszeit sollte ein möglicher genomischer Effekt des Steroidhormons Aldosteron auf die Transkription bzw. Translation des Genoms erfolgen. Es ist jedoch ersichtlich, dass für den Ouabain- und Bumetanid-resistenten K^+ -Influx an Hühnererythrozyten in HIS- und LIS-Lösungen kein signifikanter nicht-genomischer Effekt von Aldosteron (10 μM) nach 5 min nachgewiesen werden kann. Nach 30 min Inkubation mit Aldosteron konnte ebenfalls kein genomischer Effekt des Steroidhormons auf den K^+ -Transport festgestellt werden.

Nach den durchgeführten Messungen mit Hühner- und Humanerythrozyten wurde ein deutlicher Unterschied in den K^+ -Restflux-Werten gefunden (Tabelle 4). Die

höheren Restfluxwerte bei Hühnererythrozyten zeigen, dass möglicherweise die Hühnererythrozyten noch zusätzliche (unbekannte) Transportsysteme haben oder die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren zu gering waren.

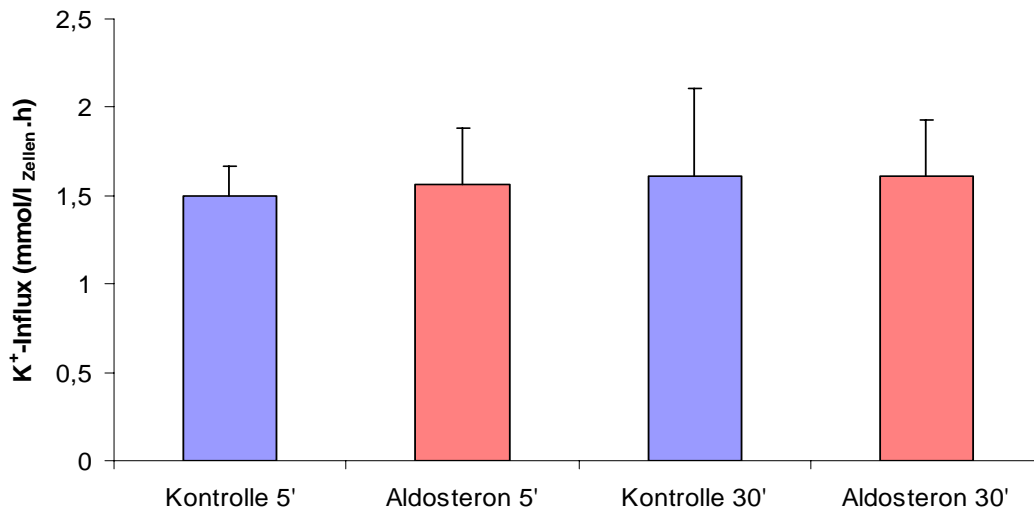


Abb. 3.5: Ouabain- und Bumetanid-resistenter K⁺-Influx an Hühnererythrozyten in HIS-Lösung in An- und Abwesenheit von 10 μ M Aldosteron bei einer Vorinkubation von 5 bzw. 30 min (n = 7 Messungen / 4 Hühnern).

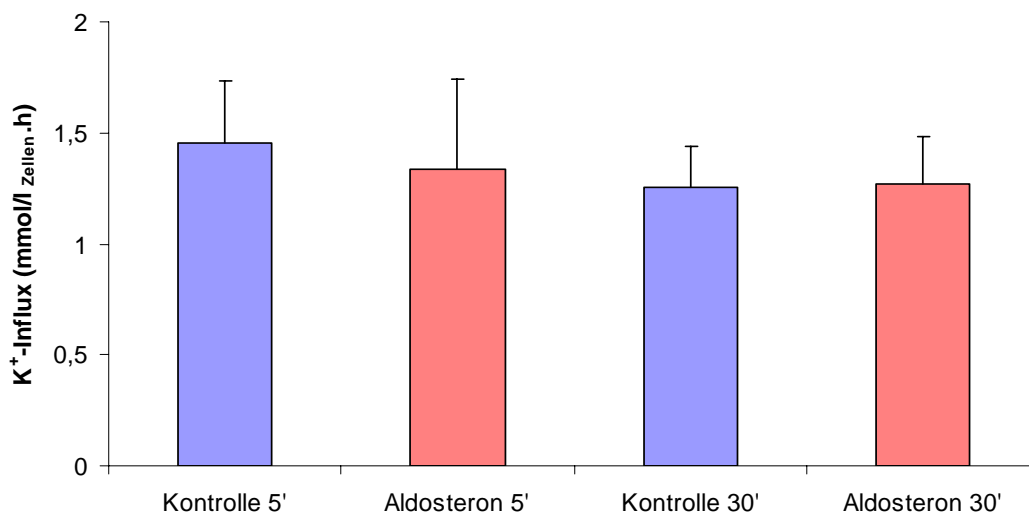


Abb. 3.6: Ouabain- und Bumetanid-resistenter K⁺-Influx an Hühnererythrozyten in LIS-Lösung in An- und Abwesenheit von 10 μ M Aldosteron bei einer Vorinkubation von 5 bzw. 30 min (n = 7 Messungen / 4 Hühnern).

Tabelle 4

Vergleich der Ouabain- und Bumetanid-resistenten K^+ -Influxe (in $\text{mmol}/l_{\text{zellen}}\text{h}$) von Hühner- und Humanerythrozyten in Abwesenheit und Anwesenheit von Aldosteron ($10 \mu\text{M}$) in HIS-Lösung bei Aldosteron-Inkubationszeiten von 5 und 30 min (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 3 Messungen).

	Kontrolle 5'	Aldosteron 5'	Kontrolle 30'	Aldosteron 30'
Hühnererythrozyten	1,260	1,298	1,380	1,373
SD	0,1740	0,3124	0,4950	0,3181
Humanerythrozyten	0,171	0,130	0,368	0,290
SD	0,014	0,025	0,029	0,021

c) K^+ -Influx an Erythrozyten aus Nabelschnurblut

Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron auf Erythrozyten von Nabelschnurblut wurde in HIS-Lösung untersucht (Abb. 3.7). Das Nabelschnurblut enthält einen hohen Prozentsatz an Retikulozyten. Bei den durchgeführten Messungen wurde erwartet, dass die Ergebnisse mit denen des K^+ -Influges von Retikulozyten, die durch die Dichtentrennung gewonnen wurden, vergleichbar sind. Die Messungen wurden insgesamt viermal durchgeführt. Interessanter Weise zeigten dabei drei von vier Messungen eine sehr geringe Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe auch bei den Werten von adulten Erythrozyten. Daher ist der Mittelwert auch relativ klein. Insgesamt wurde aber kein signifikanter Effekt von Aldosteron auf die Na^+/K^+ -Pumpe und den $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ -Symporter festgestellt.

3.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des intrazellulären pH-Wertes und des Ca^{2+} -Transports von Erythrozyten

Die spektroskopische Untersuchung des intrazellulären pH-Wertes und des Ca^{2+} -Transportes der Erythrozyten bietet die Möglichkeit über Fluoreszenzmessungen den Einfluss von Aldosteron auf die Ca^{2+} -Pumpe, den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher sowie auf den durch den Anionenaustauscher (Bande-3) vermittelten Transport zu bestimmen.

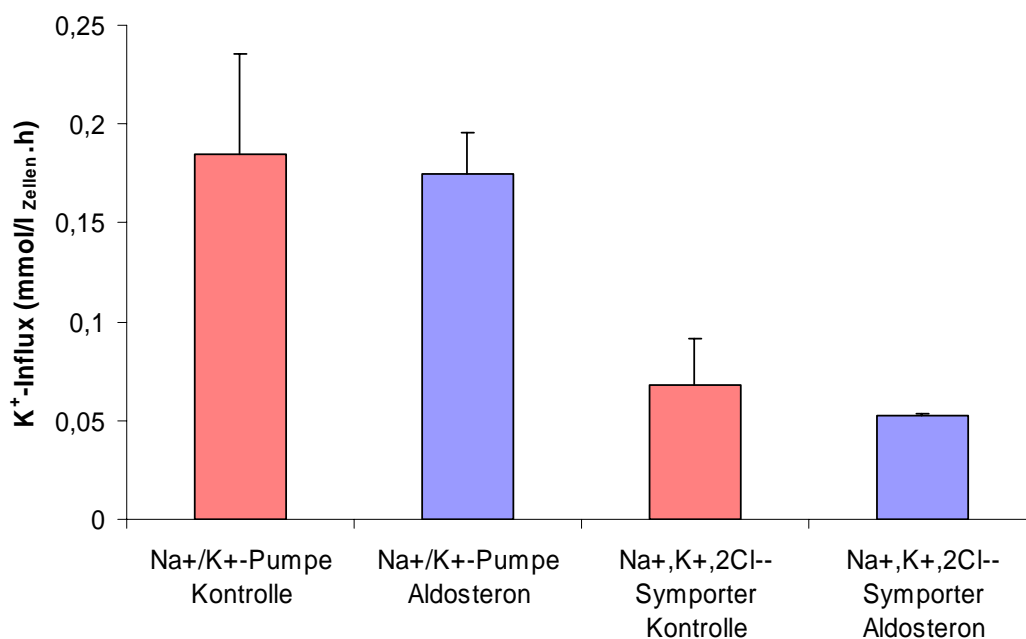


Abb. 3.7: K⁺-Influxe an Erythrozyten aus Nabelschnurblut in HIS-Lösung in An- und Abwesenheit von 10 µM Aldosteron (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 4 Messungen).

Im Unterschied zur mikroskopischen Untersuchung (siehe Kapitel 3.3) wurde die Fluoreszenz bei diesen Messungen in der Zellsuspension detektiert. Die Erythrozyten enthalten eine hohe Menge Hämoglobin, das vermutlich in der Lage ist, das Fluoreszenzsignal zu quenchen. Kummerow (1999) untersuchte die Blutzellen bezüglich des Quenchings indem die Spektren von beladenen Erythrozyten mit denen von BCECF in der Lösung verglichen wurden. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Daraus lässt sich schließen, dass das Hämoglobin bei der gewählten Anregungswellenlänge (505 nm und 439 nm) das BCECF-Signal nicht beeinflusst.

3.2.1 Untersuchung des intrazellulären pH-Wertes in Erythrozyten mit BCECF AM

In dieser Arbeit wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen aus der Arbeit von Kummerov (1999) übernommen, um den nicht-genomischen Effekt von Aldosteron zu untersuchen. Das Emissionssignal des BCECF AM Farbstoffs

ändert sich bei unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiten (Weiß, 2001), daher wurden alle Versuche bei Raumtemperatur und einer Inkubationsdauer von 45 min durchgeführt. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen (505 nm und 439 nm) und einer Emissionswellenlänge (531 nm) wurde in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde, wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Der intrazelluläre pH-Wert wurde an intakten Erythrozyten mit 5 μM Nigericin in einer 135 mM KCl-Lösung gemessen (0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA waren außerdem anwesend). Bei dieser Kalibrierung entspricht der innere (pH_i) dem äußeren pH-Wert (pH_o). Nach der Equilibrierung der intra- und extrazellulären pH-Werte zeigte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten eine lineare Abhängigkeit von pH_o im Bereich von pH 6,8 bis pH 7,8 (Abb. 3.8). Es ist der Mittelwert von 3 Kalibrierungskurven dargestellt.

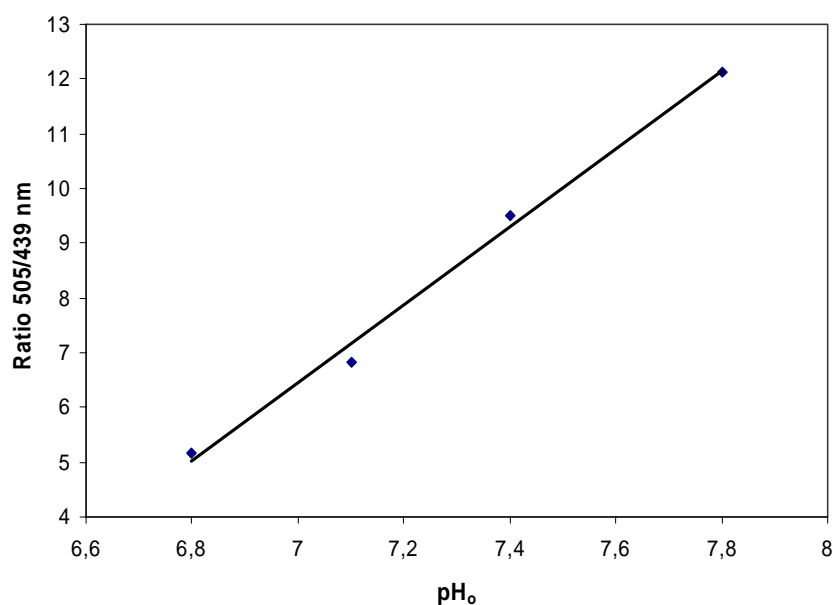


Abb. 3.8: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals von intrazellulärem BCECF in Humanerythrozyten. Korrelation des Verhältnisses der BCECF-Fluoreszenzintensität (505 / 439 nm) mit äußerem pH-Wert (pH_o).

Als Erstes wurde der Einfluss der Ionenstärke der Lösung auf den intrazellulären pH-Wert untersucht (Abb. 3.9). Die Messdaten basieren auf der bereits erwähnten Nigericin-Kalibrierung (Abb. 3.9). In physiologischer Lösung bleibt der intrazelluläre pH-Wert während der gesamten Messzeit von 30 min bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 relativ konstant. Der ermittelte Wert (7,2 – 7,3) stimmt gut mit dem von Kummerow (1999) unter vergleichbaren Bedingungen bestimmten pH-Wert an Humanenerythrozyten überein. In LIS-Lösung wurden die Humanerythrozyten gleich zu der Lösung mit den Inhibitoren (0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid, 0,1 mM EGTA) zugegeben und die Messung wurde innerhalb von 30 s gestartet. Die pH-Werte in LIS-Lösung sind am Anfang im Vergleich zur HIS Lösung stärker alkalisch. Mit zunehmender Zeit (gemessen über 30 min) fällt der pH_i ab.

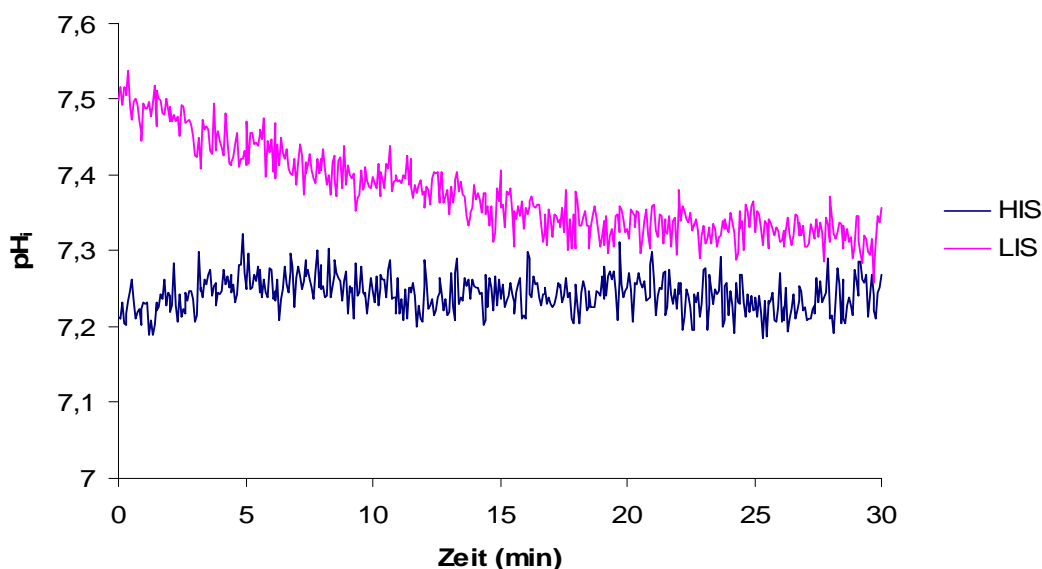


Abb. 3.9: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Humanerythrozyten in HIS- und LIS-Lösung. Die Lösungen enthalten 0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA (dargestellt ist der Mittelwert von 5 Messungen).

Der zeitabhängige pH_i -Wert der Humanerythrozyten wurde in An- und Abwesenheit von Aldosteron gemessen (Abb. 3.10). Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur und $\text{pH}_o=7,4$ in HIS-Lösung durchgeführt. Die pH-Werte von

1 μM und 10 μM Aldosteron sind minimal alkalischer (0,4 - 0,7 %) als bei 100 nM Aldosteron und bei der Kontrolle mit Ethanol, was aber nicht signifikant ist.

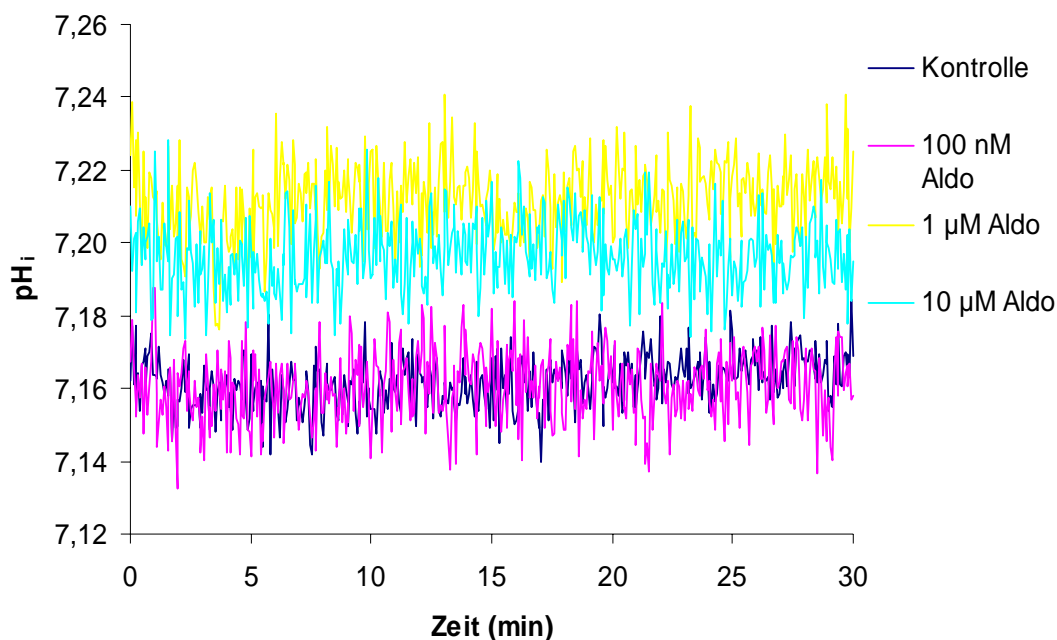


Abb. 3.10: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Humanerythrozyten in HIS-Lösung in An- und Abwesenheit von Aldosteron (verschiedene Konzentrationen). Die Lösungen enthalten 0,1 mM Ouabain, 0,1mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 6 Messungen).

Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron wurde auch an Hühnererythrozyten bei einer Aldosteron-Konzentration von 1 μM überprüft (Abb. 3.11). Für die Berechnung des H^+ -Influges wurde angenommen, dass die Pufferkapazität des Hämoglobins von Hühnererythrozyten derjenigen von menschlichem Hämoglobin entspricht. Der intrazelluläre pH-Wert an Hühnererythrozyten wurde ebenfalls nach einer Nigericin-Kalibrierung berechnet. Im Gegensatz zu Humanerythrozyten ist der pH-Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ in HIS-Lösung deutlich erhöht und nicht konstant, sondern fällt deutlich über die Messzeit (30 min) ab. Auch bei diesen Untersuchungen gibt es keinen signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf zwischen 1 μM Aldosteron und der Kontrolle (mit gleicher Menge von Ethanol).

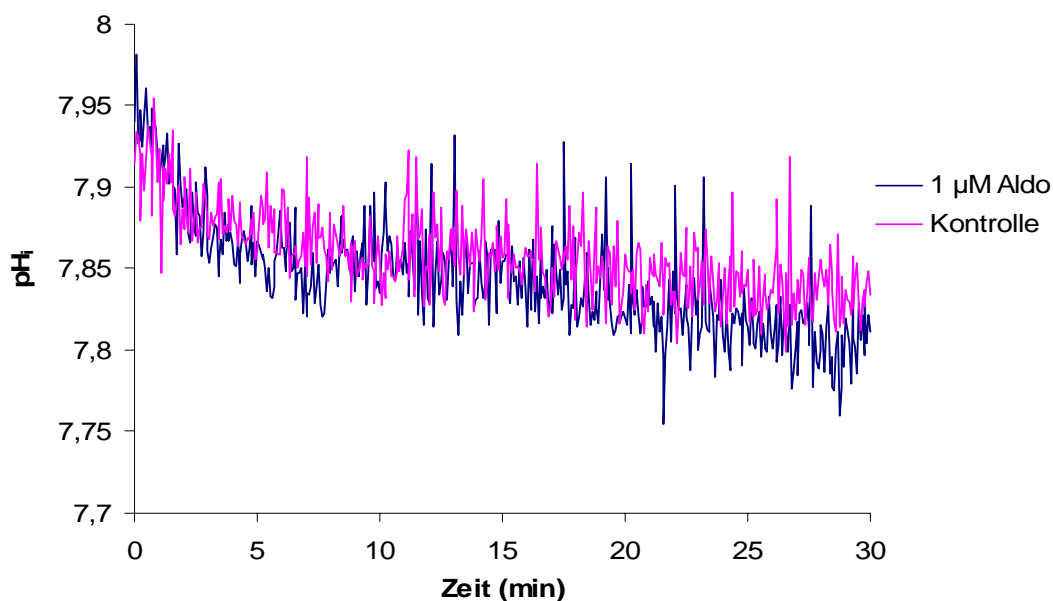


Abb. 3.11: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Hühnererythrozyten in HIS-Lösung in An- und Abwesenheit von Aldosteron (1 μM). Die Lösungen enthalten 0,1 mM Ouabain, 0,1mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 3 Messungen).

3.2.2 Ca^{2+} -Transport an Humanerythrozyten

Die Zellaufladung und Vorbereitung wurde bereits im Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Erythrozyten, die nicht mit o-Vanadat behandelt wurden, zeigten aufgrund des geringeren intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts eine verringerte Fluoreszenzemission im Vergleich zu den Messungen in Anwesenheit von o-Vanadat. Bevor die Messung begann, wurden die Erythrozyten 10 min mit Aldosteron (0,1 μM , 1 μM oder 10 μM) bzw. mit Ethanol inkubiert. Die Ergebnisse wurden dreifach bestimmt (Abb. 3.12). Es konnten keine Unterschiede im Vergleich der Spektren gefunden werden. Bei Versuchen unter Verwendung des Ca^{2+} -Inonophors A23187 und intakter Ca^{2+} -Pumpe (ohne o-Vanadat) hat Aldosteron ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle gezeigt (lediglich höhere Fluoreszenzintensitäten, bedingt durch die höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration).

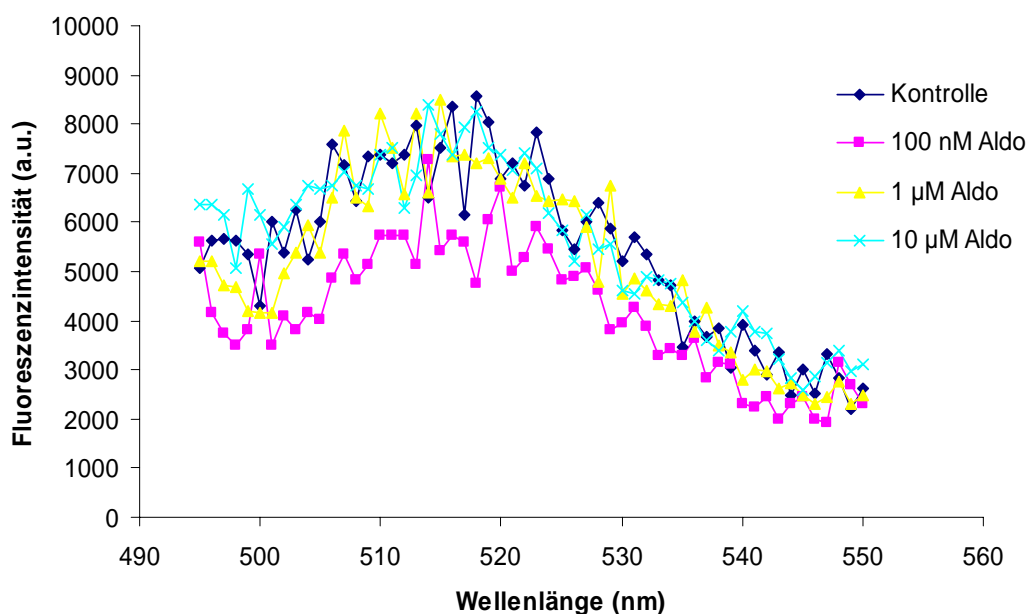


Abb. 3.12: Fluorimetrische Emissionssaufnahme von Erythrozyten (aufgeladen mit Fluo-4 AM) in einer Zellsuspension (HIS-Lösung) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Zellen sind mit 1 mM o-Vanadat behandelt. Die Messung erfolgte nach Zugabe von 2 mM Ca^{2+} und Aldosteron / Ethanol (dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 6 Messungen).

3.3 Mikroskopische Untersuchungen des intrazellulären pH-Wertes und des Ca^{2+} -Transports bei Erythrozyten

3.3.1 Intrazellulärer pH-Wert der Erythrozyten

a) Intrazellulärer pH-Wert der Humanerythrozyten

Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten wurde mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF gemessen. Die mit dem Farbstoff beladenen Zellen zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal, dessen Änderung leicht zu erkennen ist. In Abb. 3.13 sind die Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX 50 bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen sowie die Aufnahme des Verhältnisses (Ratio) der Intensität bei 450 und 490 nm dargestellt. Alle Messungen wurden in einem Intervall von 20 s über einen Zeitraum von 30 min durchgeführt.

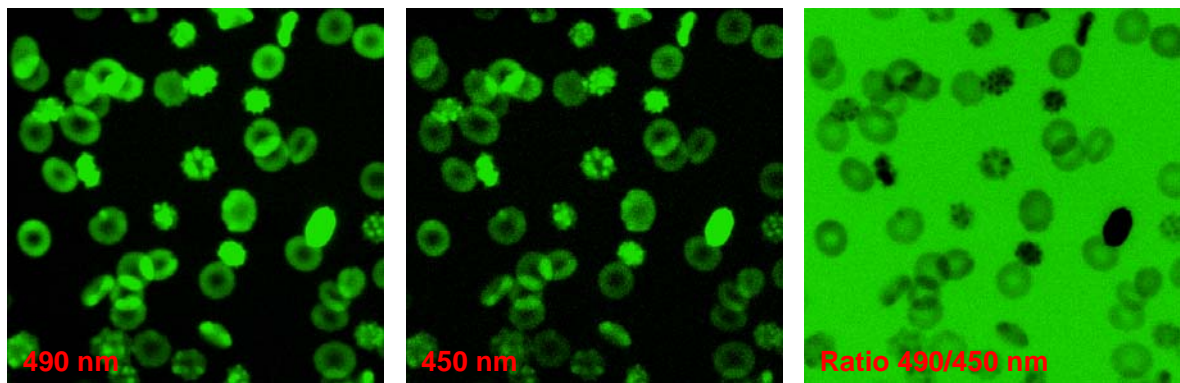


Abb. 3.13: Aufnahmen von BCECF-beladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösung bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (440 nm und 490 nm) und eine Ratio-Aufnahme dieser Wellenlängen.

Bevor der nicht-genomische Effekt von Aldosteron auf den pH_i getestet wurde, mussten Standardmessungen, wie Kalibrierung des Fluoreszenzsignals und der Einfluss der Ionenstärke der Lösung auf den pH_i intakter Erythrozyten vorgenommen werden. Die Kalibrierung und die Messungen an dem Mikroskop Olympus IX 50 wurden bei einer Ratioaufnahme 490 / 450 nm durchgeführt. Wurde das Nikon Mikroskop verwendet, konnte die Ratioaufnahme nicht im Verhältnis 490 / 450 nm durchgeführt werden. In diesem Fall wurde die Kalibrierung als auch die Versuche bei einer Ratio von 490 / 440 aufgenommen. Die Messdaten von beiden Mikroskopen sind dann identisch und reproduzierbar. Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde an intakten Erythrozyten mit 5 μM Nigericin in einer 135 mM KCl-Lösung durchgeführt (Abb. 3.14). Unter diesen Bedingungen entspricht der innere dem äußeren pH-Wert (pH_o). Der pH_o wurde mit einem pH-Meter gemessen.

Der intrazelluläre pH-Wert wurde in allen Fällen über die Kalibrierung (Abb. 3.14) ermittelt. Der Einfluss der Ionenstärke auf den intrazellulären pH-Wert von Erythrozyten (Einzelzelle) wurde über 35 Zellen gemittelt (Abb. 3.15). In der HIS-Lösung ist der intrazelluläre pH-Wert $7,2 \pm 0,08$. Der intrazelluläre pH-Wert der Zellen wurde nach Überführen in LIS-Lösung stark alkalisch ($\text{pH}_i \sim 7,8$). Mit der Zeit folgt eine langsame Ansäuerung der Zelle, die nach 30 min fast den pH-Wert in HIS-Lösung erreicht.

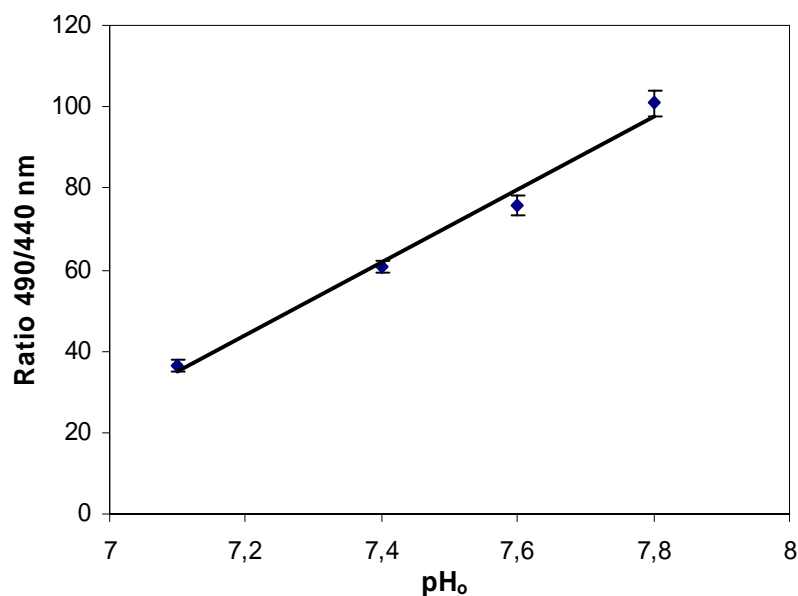


Abb. 3.14: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals von intrazellulärem BCECF (490 / 440 nm) entsprechend dem äußeren pH-Wert. Die Humanerythrozyten wurden mit 5 μ M Nigericin in 135 mM KCl-Lösung suspendiert. Die Kurven bilden den Mittelwert von 7 Kalibrierungskurven.

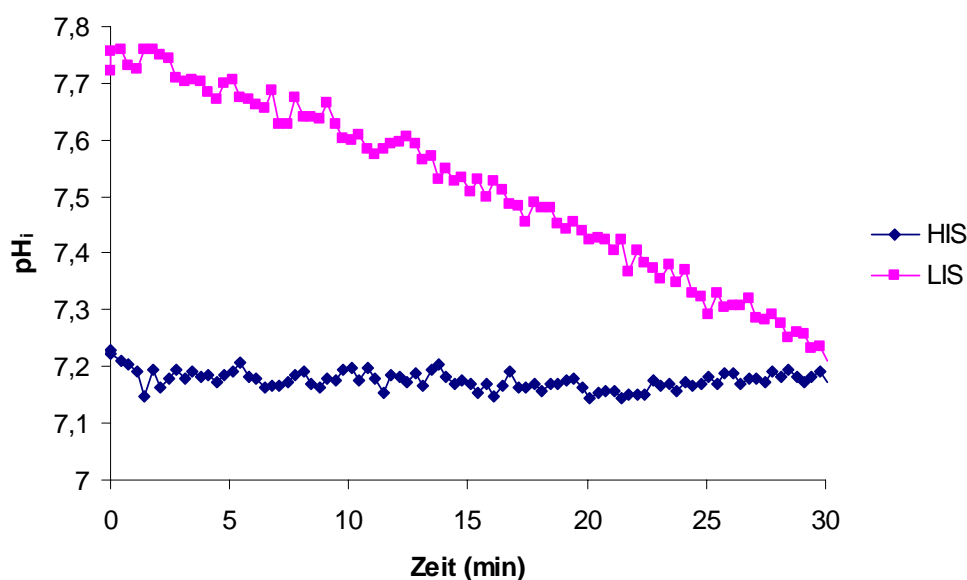


Abb. 3.15: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Humanerythrozyten in HIS- und LIS-Lösung. Die repräsentativen Kurven sind Mittelwerte von 35 Zellen (von 3 unterschiedlichen Blutspendern).

Der pH-Wert der Humanerythrozyten wurde auch in An- und Abwesenheit von Aldosteron gemessen (Abb. 3.16). Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur und $pH_o = 7,4$ in HIS-Lösung durchgeführt. Die Kurven der Abb. 3.16 sind ein Mittelwert von 45 Zellen von drei unterschiedlichen Blutspendern. Die durchgeführten Messungen an den Einzelzellen zeigen, dass Ethanol zu einer deutlichen Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes bereits zum Zeitpunkt des Beginns der Fluoreszenzmessungen führt (vgl. Abb. 3.15). Es kommt danach zu einem weiteren stetigen Anstieg des pH-Wertes in Anwesenheit von Ethanol. Wenn allerdings zusätzlich Aldosteron anwesend ist, kann in allen Fällen nach einem initialen Anstieg des pH-Wertes, ein deutlicher Abfall beobachtet werden. Somit lässt sich an Einzelzellen ein signifikanter Effekt von Aldosteron auf den zeitlichen Verlauf der Änderung des intrazellulären pH-Wertes über einen Zeitraum von 30 min nachweisen.

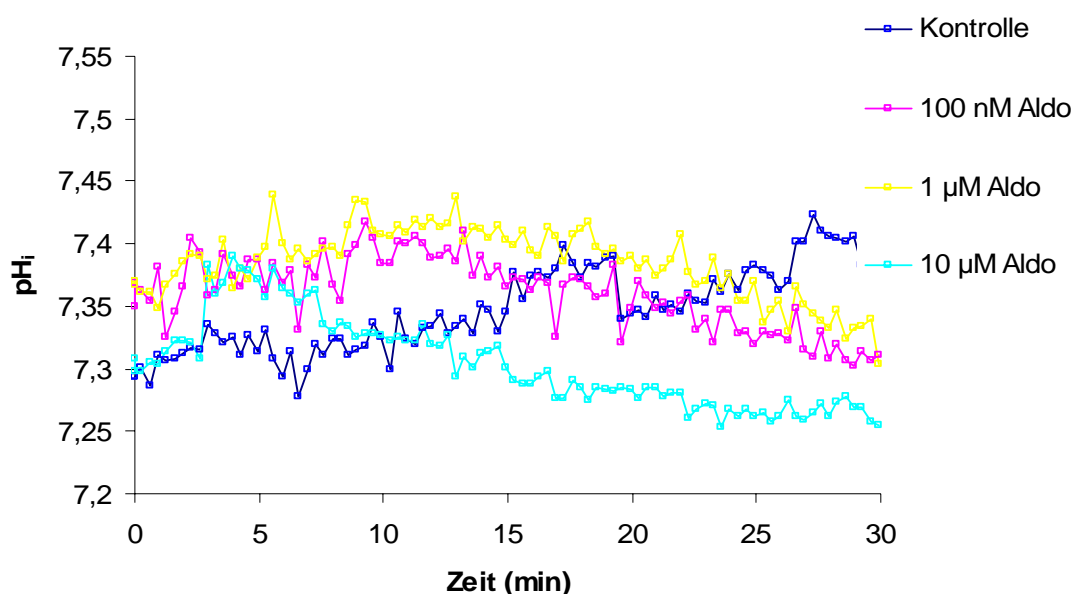


Abb. 3.16: Änderung des intrazellulärer pH-Wertes von Humanerythrozyten in HIS-Lösung in An- und Abwesenheit von Aldosteron. Aldosteron bzw. Ethanol wurden vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 45 Zellen (von 3 verschiedenen Blutspendern).

b) Intrazellulärer pH-Wert der Hühnererythrozyten

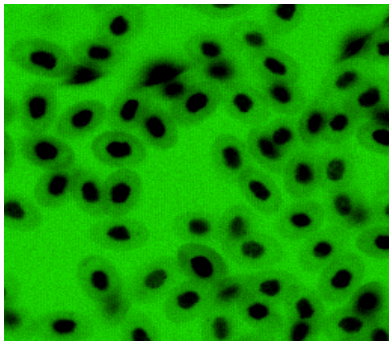


Abb. 3.17: Fluoreszenzbild von mit 6 μM BCECF AM aufgeladenen Hühnererythrozyten.

Der intrazelluläre pH-Wert von Hühnererythrozyten wurde ebenfalls mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF gemessen. Bevor der Einfluss von Aldosteron überprüft werden konnte, wurde eine Kalibrierung des Fluoreszenzsignals, wie schon für die Humanerythrozyten gezeigt, durchgeführt. Das BCECF AM-Fluoreszenzsignal in diesen Zellen ist sehr hoch. Wie anhand der Bilder (Abb. 3.17) zu erkennen ist, findet sich der Farbstoff weitgehend im Zellkern oder der pH-Wert im Zellkern ist deutlich niedriger als in Cytoplasma (dunkle Farbe = hohe Fluoreszenz, da Ratio der Intensität bei 2 verschiedenen Wellenlängen ermittelt wurde).

Die Kurven der Abb. 3.18 bilden den Mittelwert von jeweils 30 Zellen (von 2 Hühnern). Wie schon bei den Messungen an der Zellsuspension gezeigt (Abb. 3.11) kommt es zu einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes zu Beginn der Messung. Danach bleibt das Fluoreszenzsignal konstant und der pH_i hat einen Wert von $7,15 \pm 0,02$. Über einen Zeitraum von 30 min kann ein nicht-genomischer Effekt von Aldosteron nicht nachgewiesen werden.

c) Intrazellulärer pH-Wert von Erythrozyten aus Nabelschnurblut

Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten aus Nabelschnurblut wurde wie bei Human- und Hühnererythrozyten mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF gemessen. Bevor der nicht-genomische Effekt von Aldosteron überprüft wurde, wurde das Fluoreszenzsignal kalibriert (siehe oben). Die Kurven von der Kontrolle mit Ethanol zeigen eine Überlappung mit den Kurven in Anwesenheit von Aldosteron (100 nM, 1 μM und 10 μM). Der pH_i -Wert nimmt in allen Fällen im Zeitverlauf von 30 min leicht ab (Abb.3.19). Es wurden aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

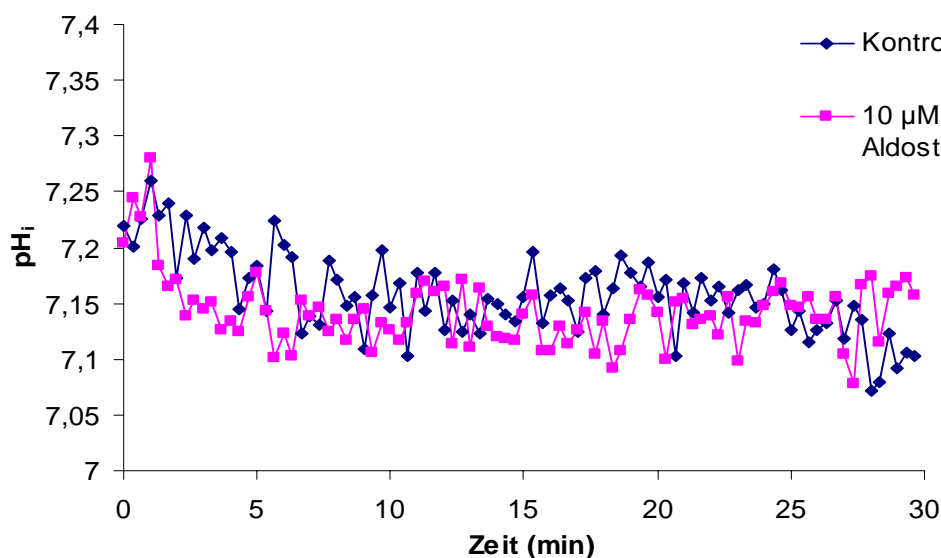


Abb. 3.18: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Hühnererythrozyten in HIS-Lösung. 10 μM Aldosteron und die Kontrolle mit Ethanol wurden kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 30 Zellen (von jeweils 2 Hühnern).

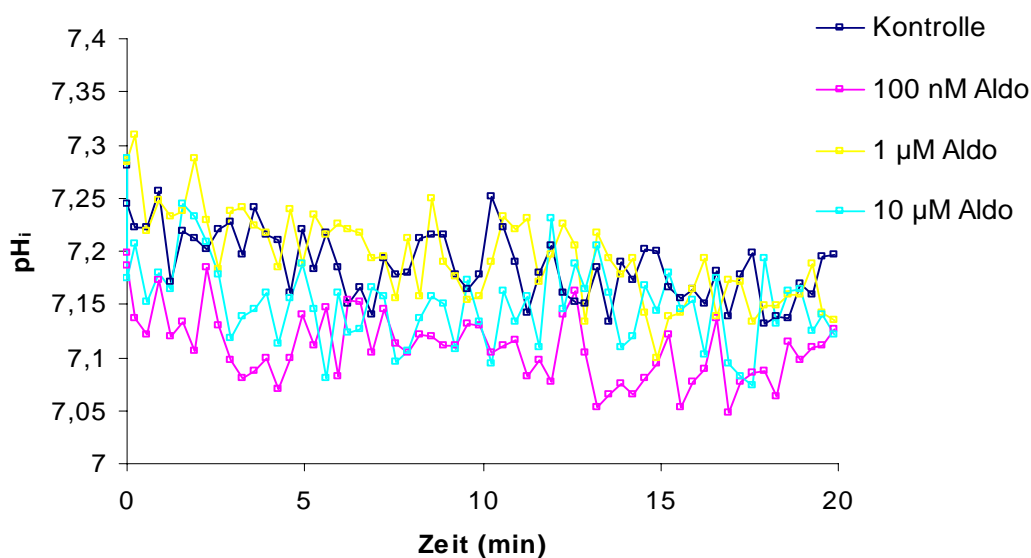


Abb. 3.19: Änderung des intrazellulären pH-Wertes von Erythrozyten aus Nabelschnurblut in HIS-Lösung bei An- und Abwesenheit von Aldosteron. Das Aldosteron bzw. Ethanol wurde vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 25 Zellen (von 3 verschiedenen Blutspendern).

3.3.2 Ca²⁺-Transport

Die mikroskopischen Untersuchungen an Einzelzellen wurden mit Hilfe der Farbstoffe Fluo-4 AM für die Bestimmung der Ca²⁺-Transport durchgeführt. In der Abb. 3.20 ist als Übersicht der Einfluss von Hämoglobin (c = 0,034 g/dl) bei verschiedenen Konzentrationen von Ca²⁺ auf die Emissionsspektren von Fluo-4 AM dargestellt. Obwohl die Erythrozyten hohe Mengen an Hämoglobin enthalten, das zum Quenchen des Fluoreszenzsignals führen kann, wird der Verlauf der Spektren der mit Fluo-4 AM beladenen Erythrozyten nicht von der Autofluoreszenz gestört, was auch von Kaestner *et al.* (2004) bestätigt wird.

Mit der relativ neuen Messmethode der Fluoreszenzmessung an Einzelzellen, wurde die Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit dem Fluo-4 AM Farbstoff bestimmt. Unter verschiedenen Bedingungen, z. B. der Änderung der Ionenstärke und/oder der Anwesenheit spezifischer Inhibitoren, können einzelne Ca²⁺-Transportwege ermittelt werden. So kann auch der nicht-genomische Effekt von Aldosteron auf diese Transportwege untersucht werden.

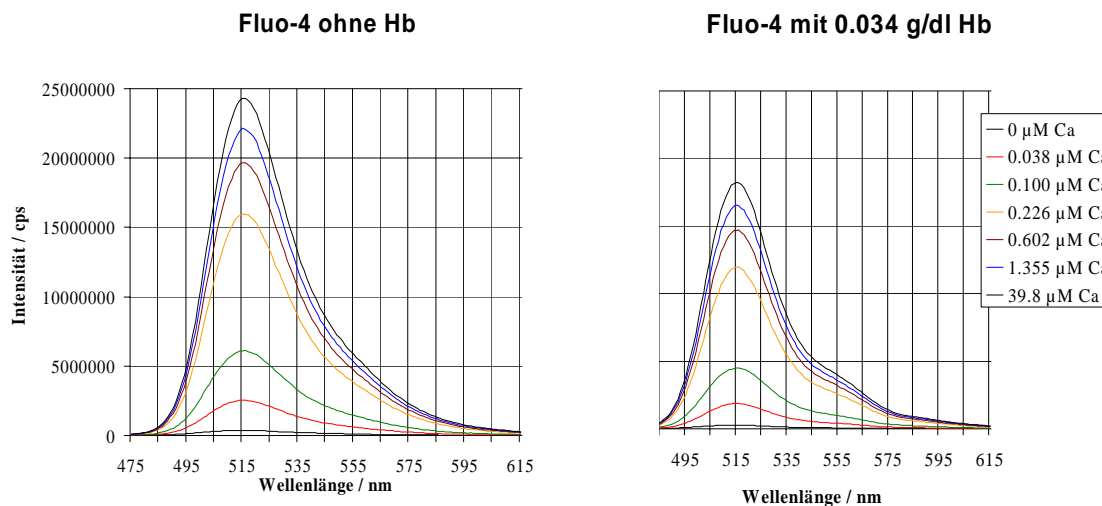


Abb. 3.20: Die Anregungsspektren von Fluo-4 AM ohne Hämoglobin und bei einer Hämoglobinkonzentration von 0,034 g/dl bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen.

a) Ca^{2+} -Transport der Humanerythrozyten

Die Messungen bei der Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm wurden in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt. Die Versuchsdauer wurde auf 30 min festgesetzt, um einen eventuellen Einfluss von Poly-L-Lysine (PLL) auf die Erythrozyten auszuschließen. Um unterhalb einer möglichen cytotoxischen Wirkung von PLL zu bleiben, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Es erwies sich dabei als optimal, beschichtete Objektträger (mit einer 0,001% PLL Verdünnung in Wasser) bei den anschließenden Versuchen zu verwenden.

Die Arbeit von Romero und Romero (2003) an roten Blutzellen zeigte, dass eine o-Vanadat-Konzentration größer als 0,5 mM die Ca^{2+} -Pumpe vom L- und P-Typ zu 99% inhibiert. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine o-Vanadat-Konzentration von 1 mM verwendet.

Der Gesamt- Ca^{2+} -Gehalt von roten Blutzellen unter physiologischen Bedingungen liegt im Bereich von 15 - 20 μM und konnte durch den Einsatz von Chelatoren bis auf 5 μM gesenkt werden. Die freie Ca^{2+} -Konzentration liegt bei 30 bis 60 nM (siehe Kapitel 1.5.3). Der Farbstoff Fluo-4 AM kann eine signifikante intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentrationsänderung nur dann detektieren, wenn die freie Ca^{2+} -Konzentration im μM -Bereich liegt.

Um den nicht-genomischen Effekt von Aldosteron zu untersuchen, wurde in allen Versuchen eine o-Vanadat-Lösung verwendet. Die Fluoreszenzintensität von Erythrozyten in Abwesenheit von o-Vanadat ist sehr gering im Vergleich zu o-Vanadat behandelten Zellen (Abb. 3.21 A, B). Bei einer intakten Ca^{2+} -Pumpe bleibt der Ca^{2+} -Gehalt in der Zelle über einen Zeitraum von 30 min konstant. In Anwesenheit von o-Vanadat steigt die Fluoreszenzintensität jedoch signifikant an (Abb. 3.22).

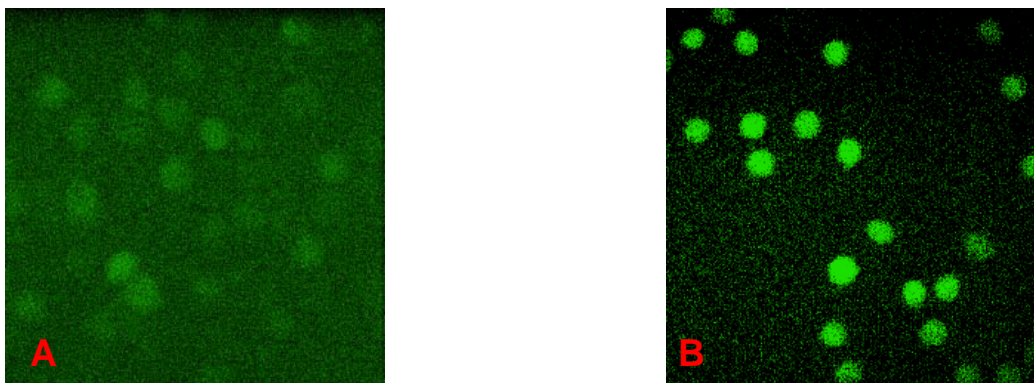


Abb. 3.21: Fluoreszenzaufnahmen von mit Fluo-4 AM aufgeladenen roten Blutzellen nach 30 min Inkubation mit 2 mM Ca^{2+} . **A:** Ohne o-Vanadat (die Erythrozyten haben eine intakte Ca^{2+} -Pumpe) **B:** Mit 1 mM o-Vanadat.

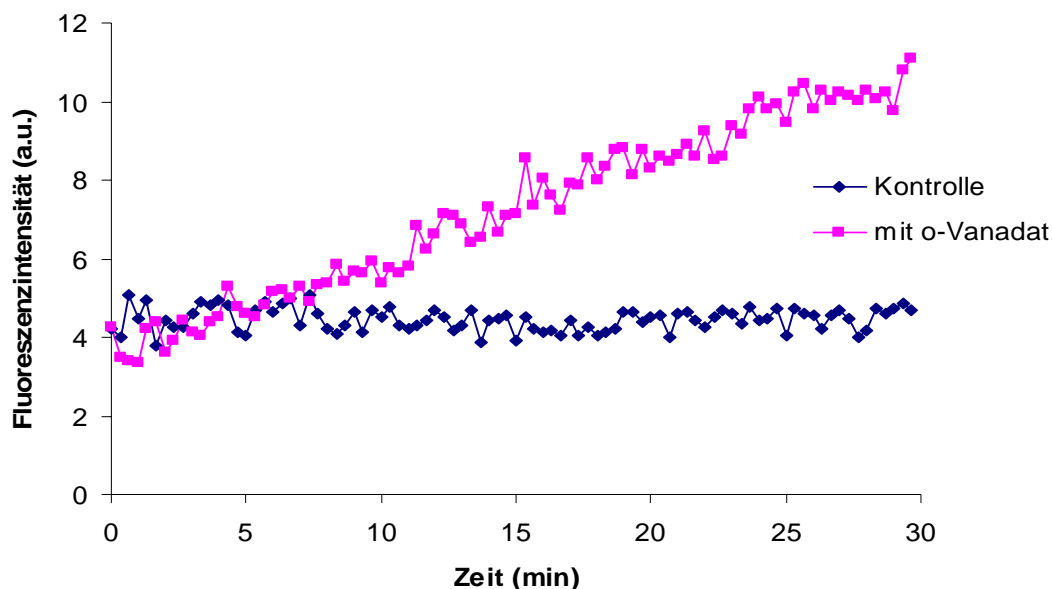


Abb. 3.22: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen humanen Erythrozyten in An- und Abwesenheit von 1 mM o-Vanadat in HIS-Lösung mit 2 mM Ca^{2+} im Zeitraum von 30 min. Die CaCl_2 -Lösung wurde kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 60 Zellen (von 5 verschiedenen Blutspendern).

Es wurden Messungen in HIS- und LIS-Lösung in Anwesenheit von o-Vanadat durchgeführt, um einen Einfluss der Ionenstärke auf die Ca^{2+} -Pumpe zu untersuchen. Der Ca^{2+} -Einstrom in Lösungen mit unterschiedlicher Ionenstärke

nach Serien von Experimenten zeigte eine unterschiedliche Ca^{2+} -Zunahme (Abb. 3.23). In LIS-Lösung ist eine deutlich höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur HIS-Lösung nachweisbar. In HIS-Lösung ist der Ca^{2+} -Einstrom über 30 min minimal im Vergleich zu LIS-Lösung. Während der Messung steigt der Ca^{2+} -Gehalt in LIS-Lösung sogar weiter an, bis nach dem Erreichen eines relativ hohen Wertes eine Zellyse eintritt (in Abb. 3.23 ist der Mittelwert von Zellen dargestellt, bei denen die Zellyse in 30 min nicht eintrat). Bei einem Teil der Erythrozyten tritt der Zelltod in LIS-Lösung jedoch schon nach 5 bis 15 min nach dem Start der Messung ein. Der Ca^{2+} -Gehalt bei den Erythrozyten in HIS- und LIS-Lösung ist interessanter Weise jeweils etwas unterschiedlich bei verschiedenen Blutspendern (nicht dargestellt).

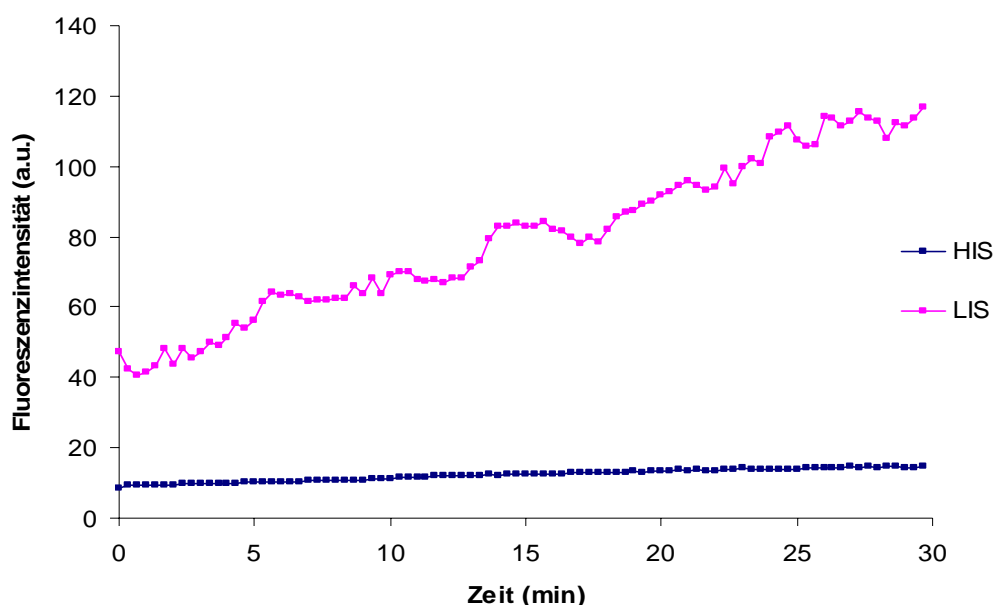
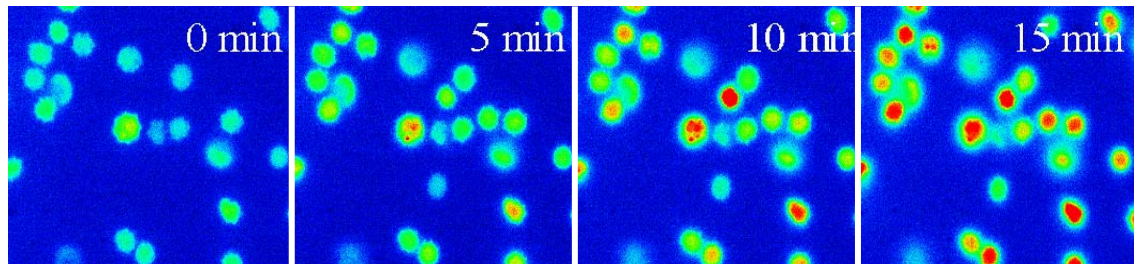


Abb. 3.23: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen humanen Erythrozyten in Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke (HIS und LIS) in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} und 1 mM o-Vanadat über einen Zeitraum von 30 min. Die CaCl_2 -Lösung wird kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 65 Zellen (von 5 verschiedenen Blutspendern).

In Abb. 3.24 sind die Messungen mit Aldosteron (1 μM und 10 μM) im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol dargestellt. Das Steroidhormon und Ethanol wurden direkt vor dem Start der Messung in jeweils gleichen Mengen zugegeben. Bei

allen Messungen wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet (vgl. Abb. 3.22 für die Kontrolle ohne Ethanol). Der Anstieg deutet wiederum auf eine langsame Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hin, die hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die Ca^{2+} -Pumpe durch o-Vanadat inhibiert ist.

A



B

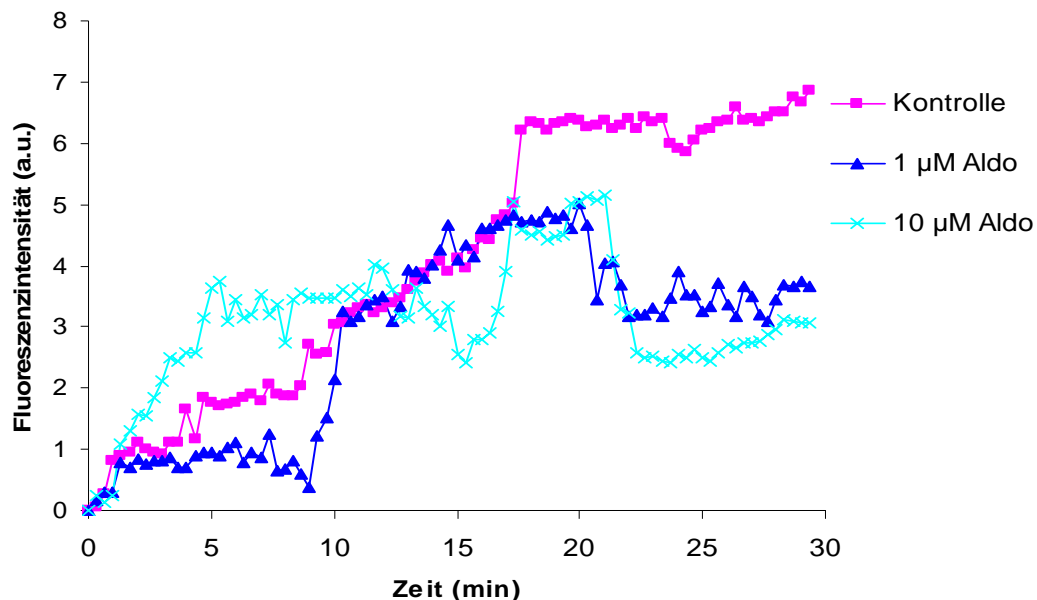


Abb. 3.24 Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM-aufgeladenen humanen Erythrozyten in HIS-Lösung in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} und 1 mM o-Vanadat über einen Zeitraum von 30 min. Die CaCl_2 -Lösung, Aldosteron (1 μM oder 10 μM) sowie Ethanol wurden kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 35 Zellen (von 3 verschiedenen Blutspendern). **A:** Die Fluoreszenzzunahme wurde alle 5 min dokumentiert. **B:** Kinetik über 30 min. Alle Kurven wurden auf eine Anfangsintensität von 0 normiert.

Da der Ca^{2+} -Gehalt aber nach 17 min in Anwesenheit von Aldosteron einen anderen Verlauf im Vergleich zur Kontrolle nimmt, muss ein Einfluss von Aldosteron auf den Ca^{2+} -Transport angenommen werden. Interessanterweise steigt der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt zu Beginn der Messung in Anwesenheit von 10 μM Aldosteron im Vergleich zu 1 μM Aldosteron oder der Kontrolle deutlich stärker an. Nur im zeitlich mittleren Kurvenverlauf wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben gefunden. Ein nicht-genomischer Effekt des Aldosterons auf den Ca^{2+} -Transport durch die Membran von Humanerythrozyten kann damit gezeigt werden.

b) Ca^{2+} -Transport bei Hühnererythrozyten

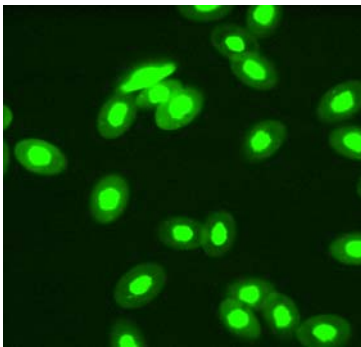


Abb 3.25: Fluoreszenzbild von mit 4 μM Fluo-4 AM und 2 mM Ca^{2+} aufgeladenen Hühnererythrozyten.

Die Hühnererythrozyten wurden wie Humanerythrozyten mit dem Farbstoff Fluo-4 AM aufgeladen und 1 mM o-Vanadat inkubiert und somit für die mikroskopischen Untersuchungen vorbereitet (Abb. 3.25). Die Fluoreszenzaufnahmen von Hühnererythrozyten zeigen, wie schon die Humanerythrozyten, eine deutlich höhere Intensität in Anwesenheit von o-Vanadat. Die Fluoreszenzintensität zum Startzeitpunkt ist jedoch deutlich größer als bei Humanerythrozyten. Die Kurven der Abb. 3.26 bilden den Mittelwert von jeweils 30 Zellen (von 2 Hühnern). Bei Hühnererythrozyten ist ein Effekt von Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol auf den Ca^{2+} -Transport nachweisbar. Während die Kontrollkurve einen stetigen Anstieg der Fluoreszenzintensität zeigt, kommt es in Anwesenheit von 10 μM Aldosteron zu einem stetigen Abfall.

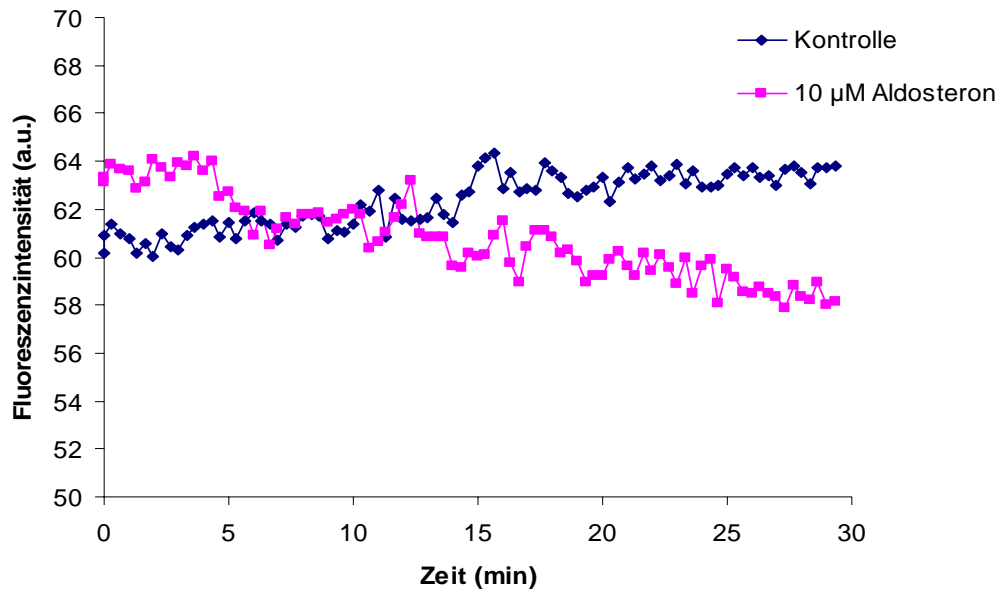


Abb. 3.26: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Hühnererythrozyten in HIS-Lösung in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} und 1 mM o-Vanadat über einen Zeitraum von 30 min. Die CaCl_2 -Lösung, Aldosteron (10 μM) sowie Ethanol wurden kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 30 Zellen (von jeweils 2 Hühnern).

c) Ca^{2+} -Transport an Erythrozyten aus Nabelschnurblut

Bei den Messungen mit Fluo-4 AM an Erythrozyten aus Nabelschnurblut war nur ein sehr geringes Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal erkennbar. Obwohl die Ca^{2+} -Pumpe mit o-Vanadat inhibiert wurde, war die Fluoreszenzintensität wesentlich geringer als bei „normalen“ Humanerythrozyten unter vergleichbaren Bedingungen. Ein nicht-genomischer Effekt von Aldosteron konnte jedoch an diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.27).

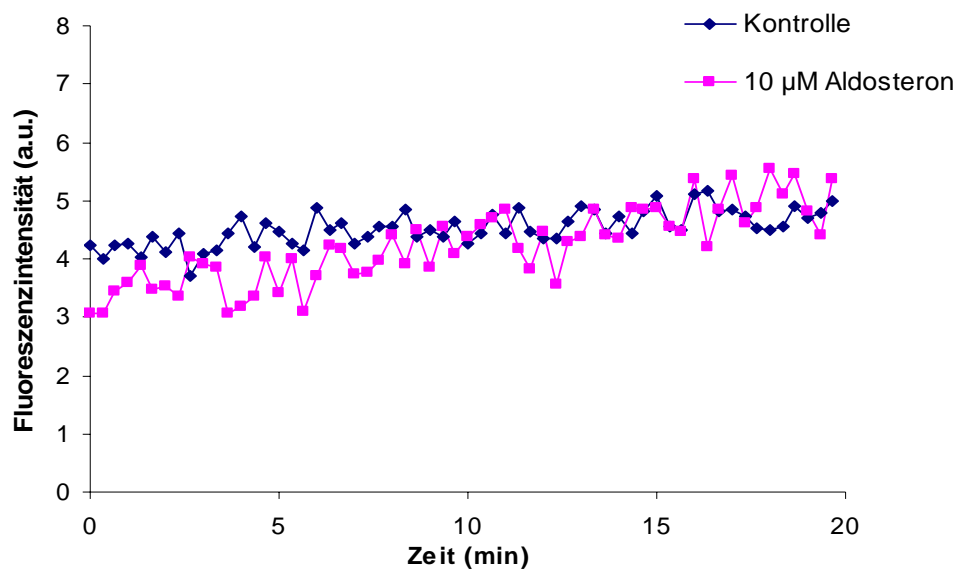


Abb. 3.27: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Erythrozyten aus Nabelschnurblut in HIS-Lösung in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} und 1 mM o-Vanadat über einen Zeitraum von 30 min. Die CaCl_2 -Lösung, Aldosteron (10 μM) sowie Ethanol wurden kurz vor dem Start der Messung zugegeben. Die Kurven bilden den Mittelwert von 35 Zellen (von 3 verschiedenen Blutspendern).

3.4 Li^+ -Flux

a) Li^+ -Efflux

Bei diesen Versuchen wurde der direkte Einfluss von Aldosteron auf den durch den Na^+/Li^+ -Antiporter vermittelten Li^+ -Transport mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie untersucht. Zur Messung des Ionentransports, der über den Na^+/Li^+ -Antiporter erfolgt, ist es erforderlich den Li^+ -Verlust (nach vorher erfolgter Li^+ -Aufladung durch geeignete Methoden, Kapitel 2.5) der Erythrozyten zu messen. Die Fluxe wurden in Ab- bzw. Anwesenheit von Phloretin (250 μM) gemessen, da der Na^+/Li^+ -Antiporter Phloretin-sensitiv ist. Durch eine gleichzeitige Anwesenheit (unter allen Bedingungen) der Hemmstoffe Ouabain (0,1 mM) und Bumetanid (0,1 mM), die die Na^+/K^+ -Pumpe und den $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporter blockieren, sollte ein möglicher Li^+ -Flux über diese Ionentransportwege ausgeschlossen werden.

Der Gehalt von Li^+ -Ionen in Erythrozyten, die mit Phloretin behandelt wurden, sollte nach einer gewissen Zeit deutlich höher als bei den Kontrollzellen (bei gleicher extrazellulärer Na^+ -Konzentration) bleiben. Dies ist schematisch in Abb. 3.28. dargestellt. Wenn in der extrazellulären Lösung allerdings kein NaCl , sondern dafür z. B. KCl vorhanden ist, kann kein Na^+/Li^+ -Austausch stattfinden und der Unterschied im intrazellulären Li^+ -Gehalt in An- und Abwesenheit von Phloretin sollte unwesentlich sein. Um einen Na^+/Li^+ -Austausch messen zu können, muss Na^+ in der Außenlösung vorhanden sein.

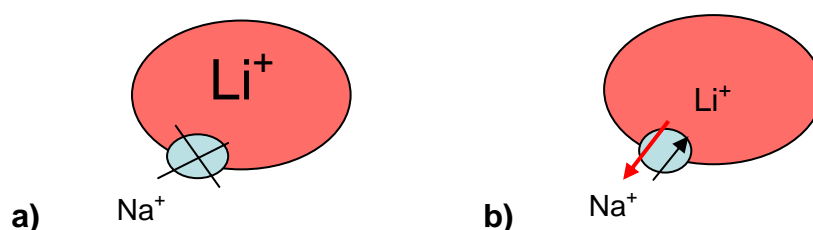


Abb. 3.28: Schematische Darstellung des Li^+ -Gehaltes einer Zelle, dessen Na^+/Li^+ -Antiporter (Blau dargestellt) mit Phloretin inhibiert ist (a) im Vergleich zu einer Kontrollzelle mit Ethanol (b), die einen Li^+ -Efflux aufweist.

Die Ergebnisse in der Abb. 3.29 zeigen, dass die Werte des Li^+ -Effluxes in Fluxlösung I (142,5 mM KCl + 7,5 mM NaCl) deutlich geringer sind, als in der Fluxlösung II (235 mM Saccharose + 7,5 mM NaCl). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch der Li^+ -Efflux, der nicht über den Na^+/Li^+ -Austauscher vermittelt wird, wie schon von Bernhardt et al. (1996) für der Ouabain- und Bumetanid-insensitiven Na^+ - und K^+ -Transport (Efflux und Influx) gezeigt, bei Verringerung der extrazellulären Ionenstärke signifikant ansteigt. Phloretin hemmt den Li^+ -Efflux bei geringer Ionenstärke etwas, bei physiologischer Ionenstärke dagegen kaum (Abb. 3.29).

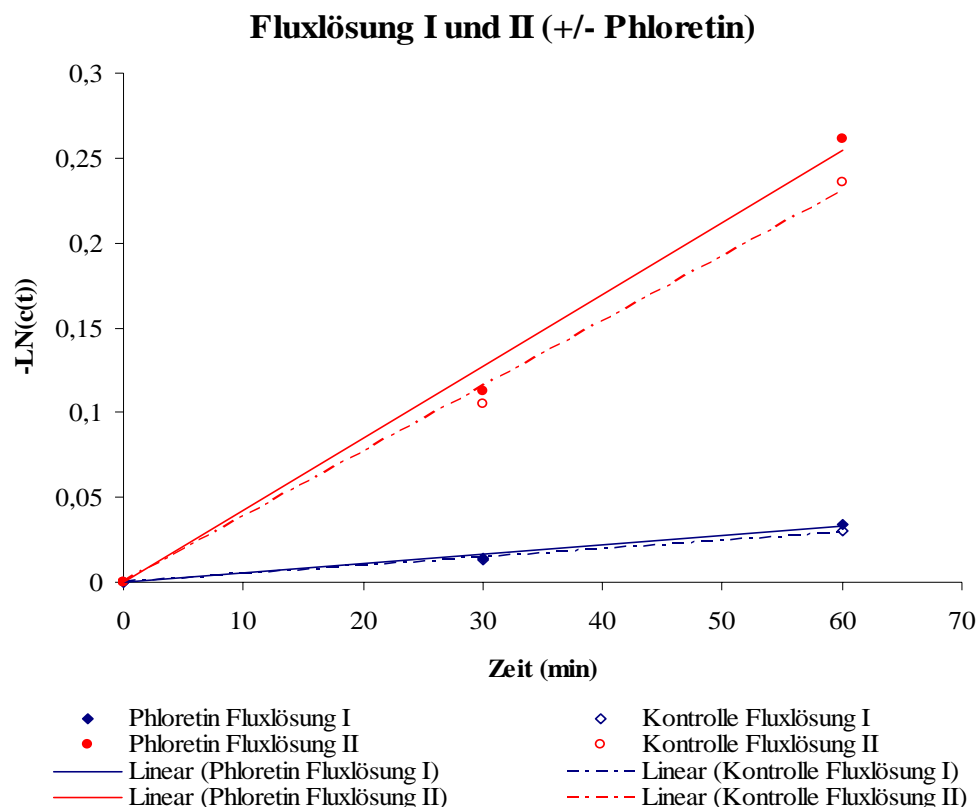


Abb. 3.29: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Li^+ -Effluxes in zwei unterschiedlichen Fluxlösungen mit und ohne 0,1 mM Phloretin. Fluxlösung I: hohe Ionenstärke, Fluxlösung II: geringe Ionenstärke. Bei allen Versuchen war 0,1 mM Ouabain und 0,1 mM Bumetanid anwesend, aus dem Anstieg der Geraden ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten der Fluxe. (von 3 verschiedenen Blutspendern).

Da der Na^+/Li^+ -Austauscher Phloretin-sensitiv ist, kann aus der Differenz der Li^+ -Effluxes in den Fluxlösungen mit Phloretin und den Fluxlösungen mit Ethanol der über den Na^+/Li^+ -Austauscher vermittelte Transport berechnet werden. Der Li^+ -Efflux wurde in ($\text{mmol}/l_{\text{Zellen}} \cdot \text{h}$) bestimmt, dazu war noch eine Hämatokritbestimmung erforderlich.

Bei den durchgeführten Versuchen mit Aldosteron wurden die Zellen mit Phloretin sowie Phloretin und Aldosteron zusammen inkubiert und gemessen. In der Abb. 3.30 sind die Li^+ -Effluxes der Kontrolle (mit Ethanol), mit Aldosteron, Phloretin sowie mit Phloretin und Aldosteron dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich der Fluxwert in Anwesenheit von Aldosteron nicht vom Kontrollwert unterscheidet. Die

Werte in Anwesenheit Phloretin sowie Phloretin und Aldosteron unterscheiden sich ebenfalls nicht voneinander, sind aber etwas geringer als die ermittelten Werte in Abwesenheit von Phloretin.

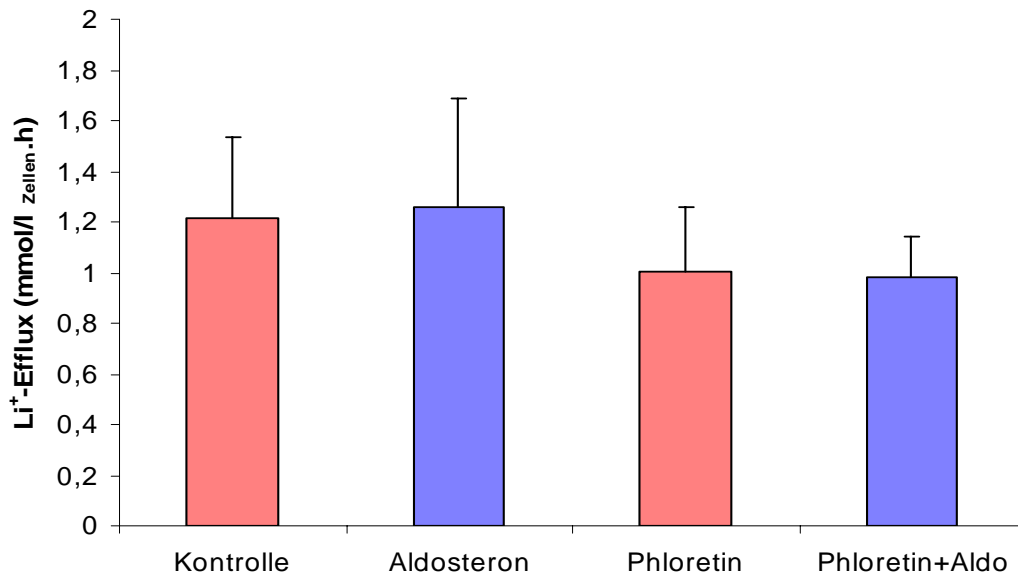


Abb. 3.30: Li⁺-Efflux von Humanerythrozyten in HIS-Lösung in Anwesenheit von Aldosteron, Phloretin bzw. Phloretin und Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (von 3 verschiedenen Blutspendern).

b) Li⁺-Influx

Um bei den Li⁺-Influx-Versuchen eine Aktivierung des Na⁺/Li⁺-Antiporters zu erreichen, wurden die Zellen vor den eigentlichen Untersuchungen mit Na⁺ aufgeladen (Nystatin-Technik) und anschließend die Li⁺-Aufnahme mit 145 mM NaCl, 145 mM KCl oder 200 mM Saccharose im Außenmedium gemessen. Mit der Na⁺-Aufladung wurde ein auswärtsgerichteter Na⁺-Gradient erzielt, der einen Li⁺-Einstrom fördert.

Der Li⁺-Influx wurde in Fluxlösungen verschiedener Ionenstärken gemessen (Abb. 3.31). In Zeitintervall von 30 min wurde der Hemmeffekt von 0,1 mM Phloretin untersucht und sowohl für NaCl- als auch für KCl-Lösungen (HIS) nachgewiesen. In Lösungen geringer Ionenstärke (LIS) ist, wie auch schon für den Li⁺-Efflux gezeigt (siehe Abb. 3.29), ein signifikanter Anstieg des Li⁺-Influses nachweisbar. Interessanterweise wurde in LIS-Lösung kein Hemmungseffekt von Phloretin gefunden.

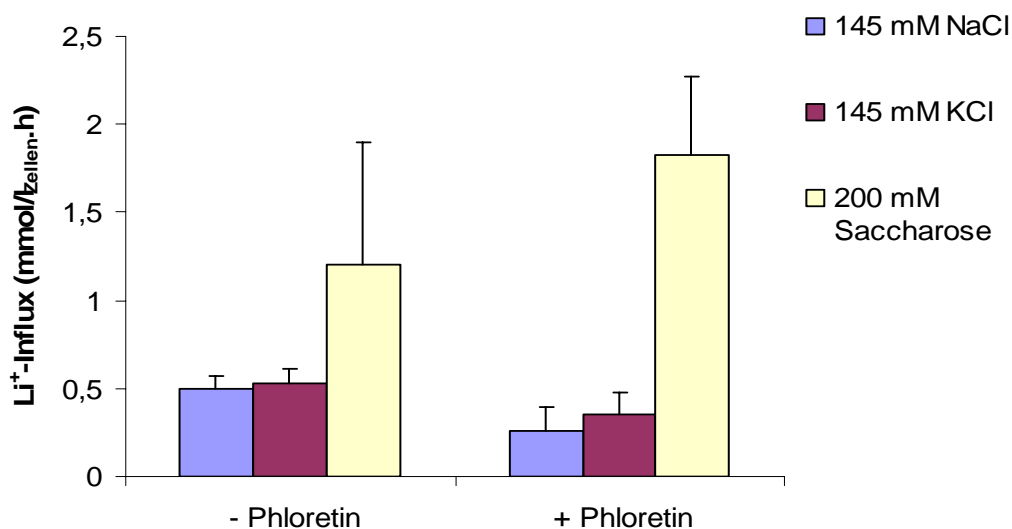


Abb. 3.31: Li^+ -Influx in Lösungen unterschiedlichen Ionenstärke mit und ohne Phloretin (0,1 mM, von 5 verschiedenen Blutspendern).

Alle zum Li^+ -Transport (sowohl Efflux als auch Influx) durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Phloretin-sensitive Na^+/Li^+ -Symport sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch in Medien geringer Ionenstärke nicht signifikant durch Aldosteron beeinflusst wird (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

Aus den ermittelten Li^+ -Fluxen in HIS- und LIS-Lösungen kann geschlossen werden, dass der $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Antiporter nicht nur K^+ und Na^+ sondern auch Li^+ transportieren kann. Diese Überlegung folgt aus der Tatsache, dass der über den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Antiporter vermittelte Transport wesentlicher Bestandteil des "Rest"-Transportes ist (Transport nach Blockierung aller bekannten spezifischen Ionentransportwege (Pumpen, Kanäle, Carrier) und dass der über diesen Weg laufende K^+ - und Na^+ -Transport in Medien geringer Ionenstärke deutlich erhöht ist.

3.5 Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und Oberflächen:

Untersuchung des Ca^{2+} -Transports

Die lokalen Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielen eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Oberflächen und Humanerythrozyten

analysiert. Es wurde der Einfluss von Oberflächen auf den Ca^{2+} -Transport von Humanerythrozyten untersucht, d.h. der intrazellulär Ca^{2+} -Gehalt wurde für 30 min auf einer modifizierten oder strukturierten Oberfläche detektiert. Die lokale Änderung des Ca^{2+} -Gehaltes wurde durch Einzelzell-Mikroskopie gemessen (siehe Methoden 2.4).

- a) Borosilikat-Glas mit Poly-L-Lysine (Digitale Holographie-Mikroskopie, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. von Bally (Universität Münster)

Durch Einzelzell-Fluoreszenz-Mikroskopie wurde der Ca^{2+} -Gehalt in der HIS-Lösung untersucht. Der Ca^{2+} -Gehalt bleibt dabei über einen Zeitraum von 30 min konstant (Abb. 3.32). Es wurde kein Einfluss der Glasoberfläche, die mit PLL beschichtet ist, auf den Ca^{2+} -Gehalt gefunden.

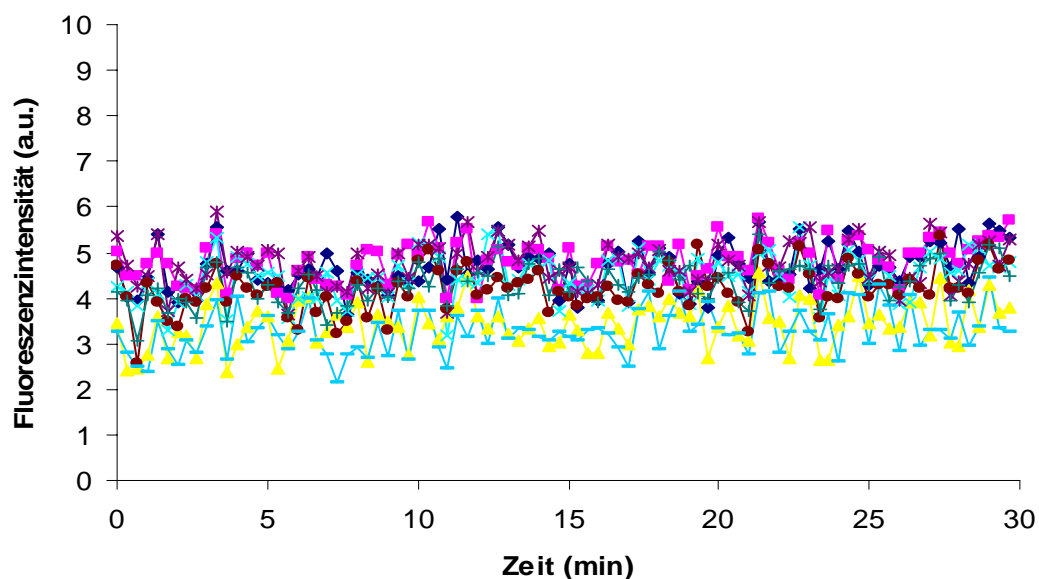


Abb. 3.32: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf einer mit PLL beschichteten Glasoberfläche in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} über einen Zeitraum von 30 min (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen, n=10).

Die digitale holographische Mikroskopie erlaubt eine Beobachtung der Sedimentation einer Zelle in der Lösung, bevor diese im Kontakt mit der Oberfläche kommt (Abb. 3.33). Unmittelbar nach Kontakt mit der PLL-beschichteten Oberfläche (innerhalb von 1 s) trat eine Veränderung der Zellform auf, die mit der erwähnten Methode gut beobachtet werden konnte (Abb. 3.34).

b) Mikro-/Nano-strukturierte Oberfläche (GPTS04 und ECT03, INM)

Bei diesen Oberflächen handelt es sich um einen Mikro-Kontakt-Aufdruck auf Glasoberflächen, die Linienstrukturen haben Abstände von 1 bis 8 μm und sind 200 bis 400 nm hoch. Die Die Mikro-Strukturen auf der Glasoberfläche GTPS04 haben keinen Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt gezeigt (Abb. 3.35). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bleibt über einen Zeitraum von 30 min konstant.

Auf der Glasoberfläche ECT03 ist eine Ca^{2+} -Fluktuation in den Erythrozyten zu sehen (Abb. 3.36). Für die Zellen war während des Kontaktes mit der Glasoberfläche eine zeitweilige deutliche Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes erkennbar. Im Zeitraum von 30 min änderte sich der Ca^{2+} -Gehalt bei 6 von 10 untersuchten Zellen. Die ETC03 Glasoberfläche hat somit einen Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt.

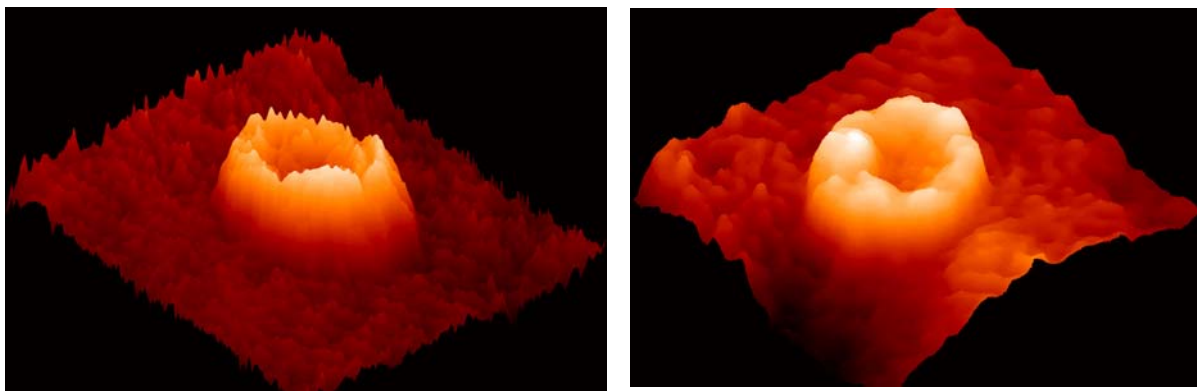


Abb. 3.33: Digital holographische Mikroskopie-Aufnahmen von Humanerythrozyten in HIS-Lösung mit und ohne DIDS (noch kein Kontakt mit der Oberfläche). Links: Diskozyt (ohne DIDS), rechts: Echinozyt (in Anwesenheit von 100 μM DIDS)

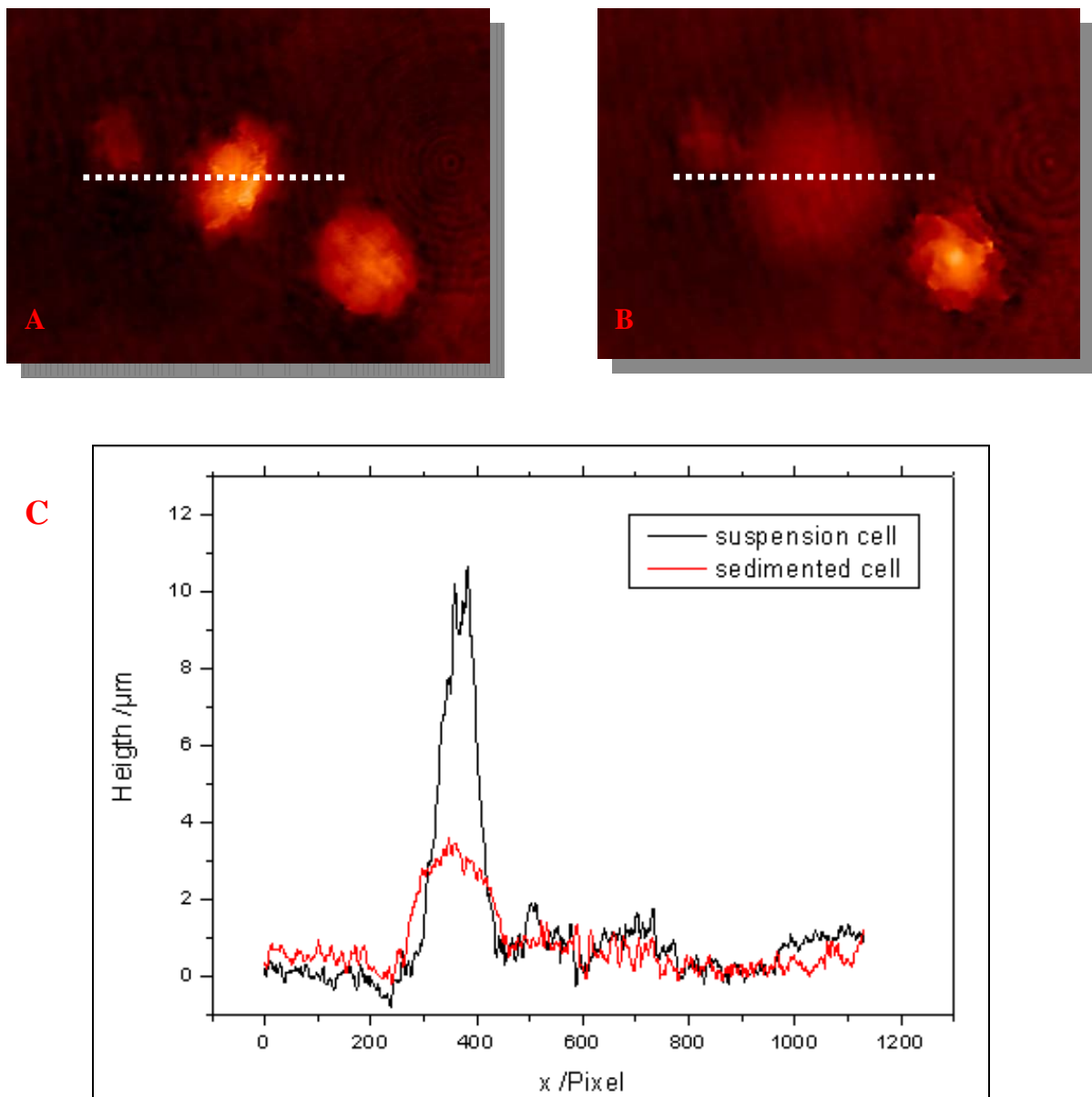


Abb. 3.34: Transformation der Form eines Humanerythrozyten nach Kontakt mit der PLL-beschichteten Oberfläche in HIS-Lösung (in Anwesenheit von 100 μM DIDS). **A:** Zelle vor Kontakt, **B:** Zelle nach Kontakt auf der Oberfläche, **C:** Änderung der Zellgröße (Höhe) nach Kontakt mit der Oberfläche (Vergleich A zu B, die zeitliche Differenz der Aufnahmen betrug 1 s).

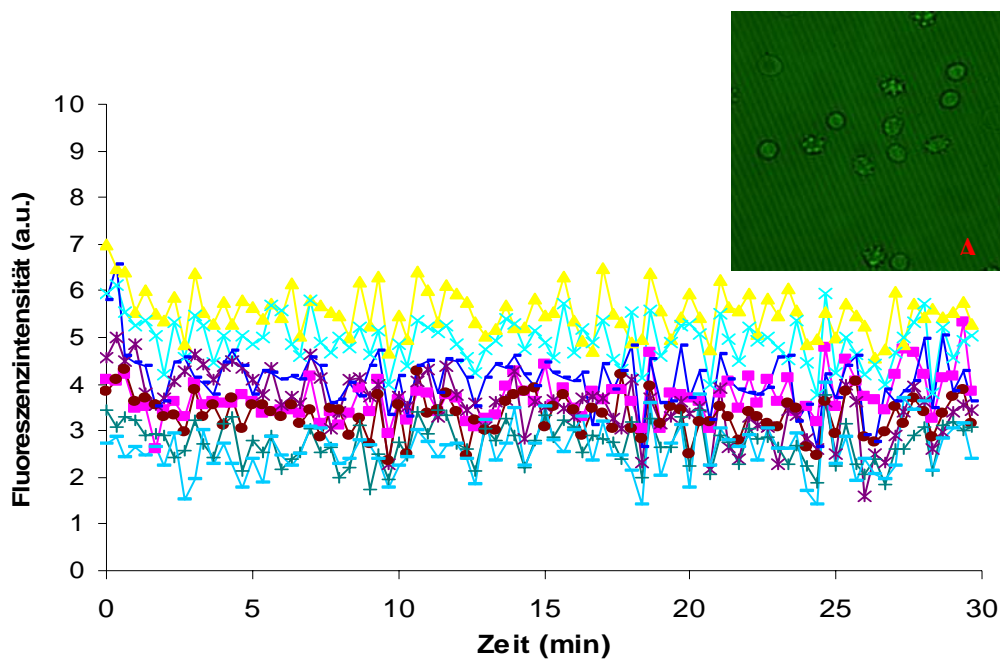


Abb. 3.35: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf der GTPS04 Glasoberfläche über einen Zeitraum von 30 min in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen (n=10), **A:** kombinierte Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf der GTPS04 Glasoberfläche.

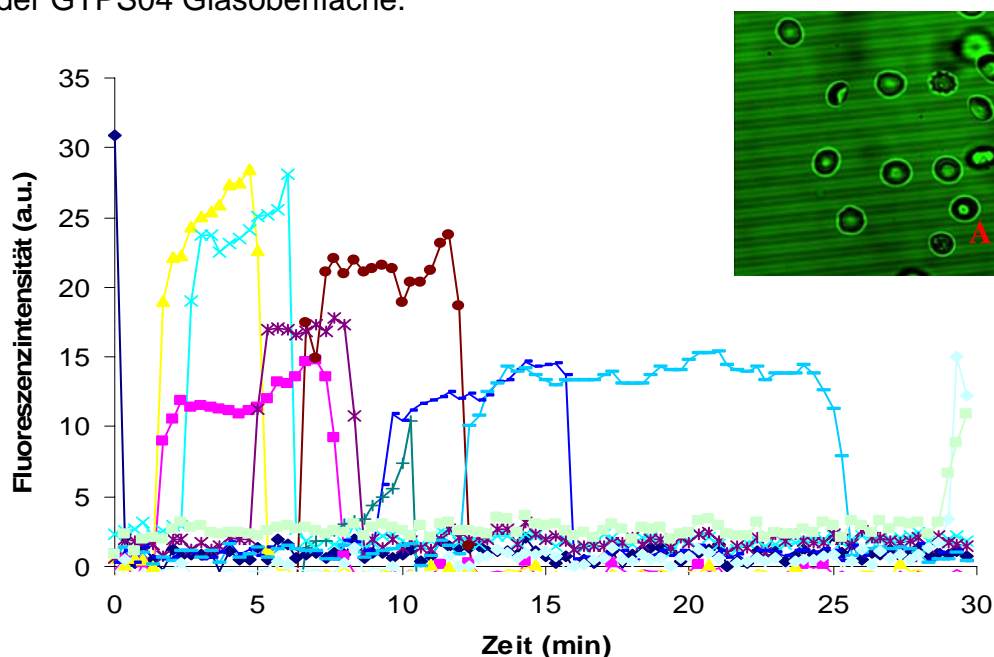


Abb. 3.36: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf der ECT03 Glasoberfläche in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen über einen Zeitraum von 30 min (n=10), **A:** kombinierte Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf der ECT03 Glasoberfläche.

c) Mikro-/Nano-strukturierte Polymeroberfläche (Science Park Barcelona)

Auf der Polymeroberfläche befindet sich einen Mikro-Kontakt Aufdruck mit 8 unterschiedlichen Formen. Als Erstes wurden der Ca^{2+} -Gehalt der Humanerythrozyten über einen Zeitraum von 30 min in HIS-Lösungen in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} im Außermedium auf einer nicht-strukturierten Polymeroberfläche (Kontrolle) untersucht (Abb. 3.37). Der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt zeigte leichte Änderungen (sowohl Zunahme, Abnahme als auch Fluktuationen) bei 10 von 14 Zellen.

Die Messungen der Fluoreszenzkinetik von Humanerythrozyten auf der Polymeroberfläche mit unterschiedlichen Strukturen zeigten ähnliche Fluktuationen des Ca^{2+} -Gehaltes wie die nicht-strukturierte Polymer-Kontrolle. Dargestellt sind 2 Beispiele von insgesamt 8 Strukturen (Abb. 3.38, 3.39).

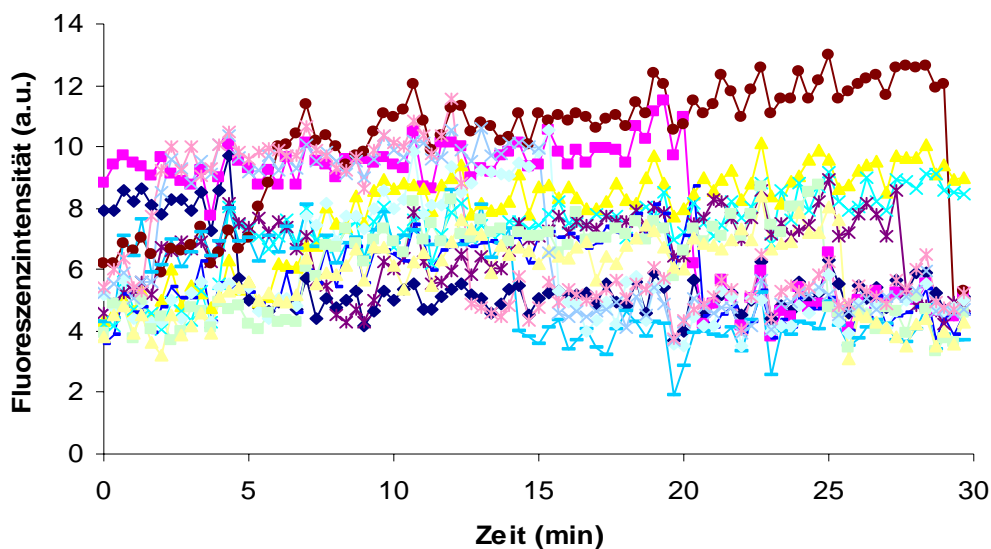


Abb. 3.37: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf der Polymeroberfläche über einen Zeitraum von 30 min in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen, $n=14$).

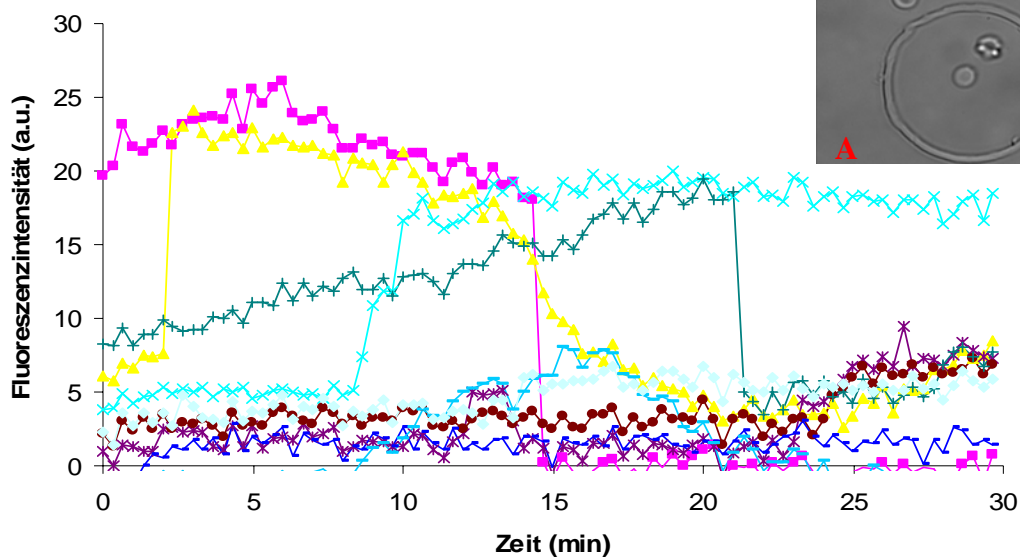


Abb. 3.38: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf der Polymeroberfläche in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} über einen Zeitraum von 30 min (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen, $n=10$), **A:** Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf einer strukturierten Polymeroberfläche.

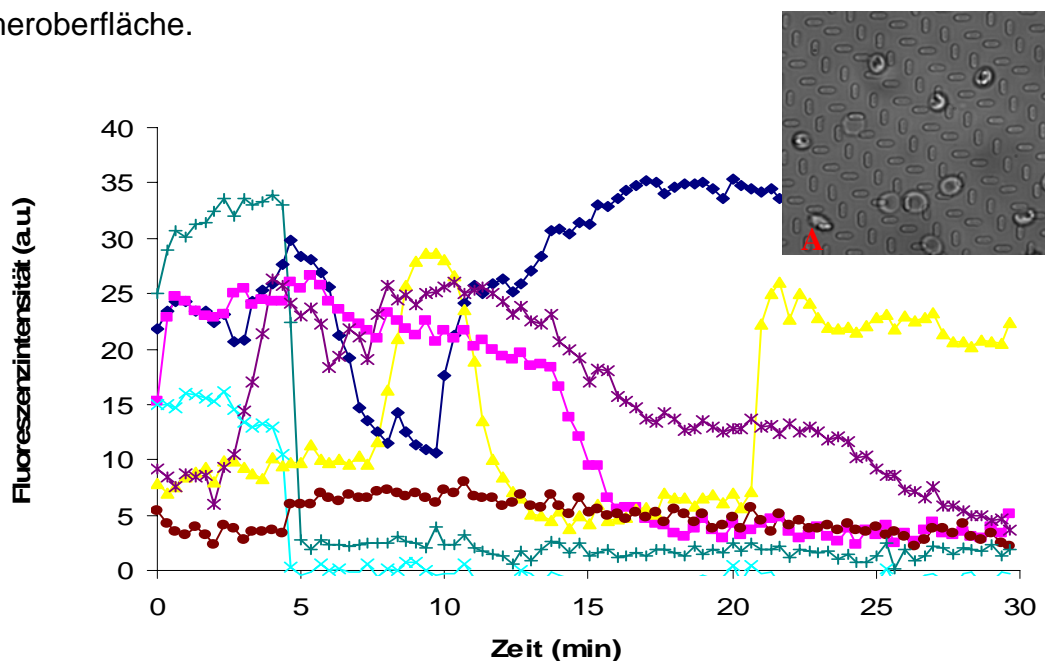


Abb. 3.39: Fluoreszenzkinetik von Fluo-4 AM aufgeladenen Humanerythrozyten in HIS-Lösungen auf einer Polymeroberfläche in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} über einen Zeitraum von 30 min (dargestellt sind die Messwerte für einzelne Zellen, $n=7$), **A:** Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf einer strukturierten Polymeroberfläche.

d) Organische Polymere auf Glasoberflächen (Chemische Fakultät,
Universität, Sofia)

Die Polymere I und II besitzen eine bipolare Ladung. Auch 1 h nach Zugabe der Erythrozyten kann kein Kontakt der Zellen mit den Oberflächen beobachtet werden (Abb. 3.40, 3.41). Deshalb konnten auch keine Fluoreszenzkinetiken aufgenommen werden. Die Durchlichtaufnahmen zu Beginn der Untersuchung sowie nach 30 min zeigen, dass die Zellen ihre Form ändern (es bilden sich Echinozyten) und eine Rollenbildung (Zusammenlagerung) eintritt. Das Polymer III besitzt eine negative Ladung. Nach anfänglicher Echinozytenbildung kann eine Lyse der Zellen beobachtet werden (Abb. 3.42).

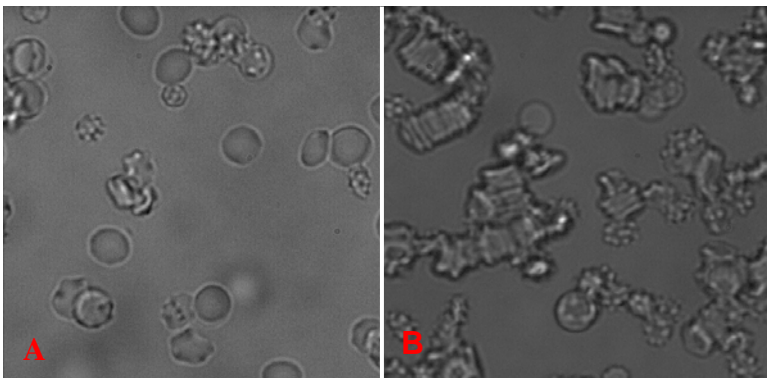


Abb. 3.40: Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf der Polymer I nach 5 min (A) und nach 30 min (B).

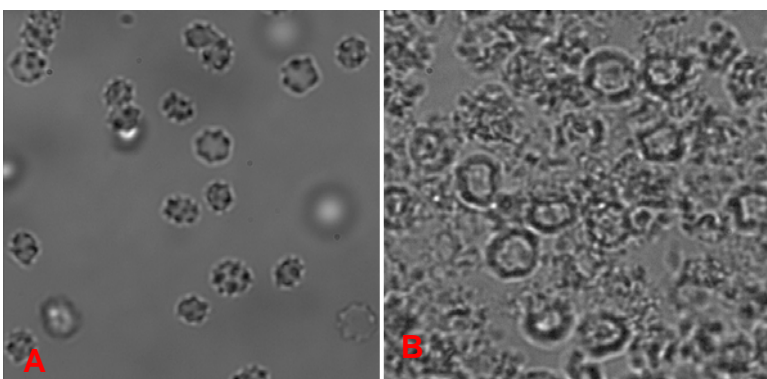


Abb. 3.41: Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf der Polymer II nach 5 min (A) und nach 30 min (B).

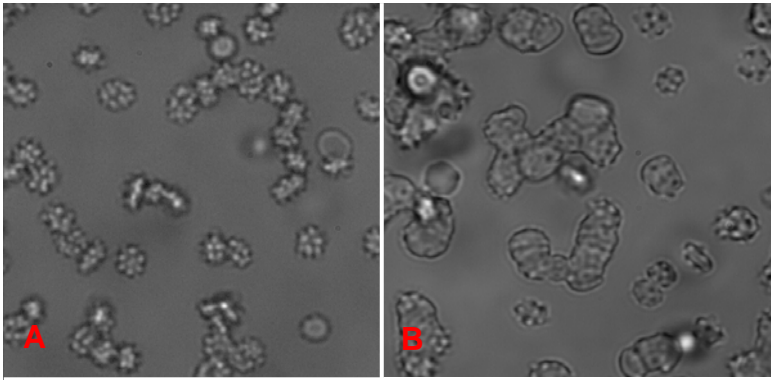


Abb. 3.42: Durchlicht-Aufnahme von Erythrozyten auf der Polymer III nach 5 min (A) und nach 30 min (B).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der nicht-genomische Effekt des Mineralokortikoidhormons Aldosteron auf eine mögliche Beeinflussung der Ionentransportsysteme in Erythrozyten untersucht. Die Wirkung von Aldosteron wurde lange Zeit ausschließlich mit der Regulierung der Na⁺- und K⁺-Homeostase durch MR-Aktivierung in Epithelzellen assoziiert. Seit etwa 15 Jahren wird der nicht-genomische Effekt von Aldosteron aber auch an Nichtepithelzellen erforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Aldosteron eine entscheidende physiologische und patho-physiologische Wirkung auf Herz-, Gefäß- und Gehirnzellen hat (Ngarmukos und Grekin, 2001; Young und Funder, 2000).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung von nicht-genomischen Wirkmechanismen von Aldosteron zu leisten und somit zur Identifizierung von neuen potentiellen Targets, insbesondere zur Behandlung des Herzinfarkts, beizutragen (Regulierung der Kardiovaskular-Homeostase). Die Untersuchungen erfolgten an Humanerythrozyten, da sie keine Zellorganellen, auch keinen Zellkern, besitzen und somit an diesen Zellen kein genomischer Effekt möglich ist. Des Weiteren wird an Erythrozyten die gesamte zur Verfügung stehende Energie für Transportsysteme in der Zellmembran aufgebracht. Die Ionentransportsysteme an Humanerythrozyten sind besser als an jeder anderen Zelle erforscht.

Es ist bekannt, dass Aldosteron den Ionenentransport durch die Membran von Endothel- und Nierenzellen beeinflusst und dadurch eine Volumenänderung dieser Zellen bewirkt (Oberleithner *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigen die

mikroskopischen Untersuchungen jedoch keine signifikanten Volumen- bzw. Formveränderungen der Erythrozyten nach Zugabe des Steroidhormons.

Die so genannte "schnelle Wirkung" von Aldosteron, die über den nicht-genomischen Effekt erzielt wird, aktiviert den Transport über Kanäle und Pumpen. So kann man an einigen Zellen eine transzelluläre Reabsorption von Na^+ bzw. eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachweisen (Wehling *et al.*, 1995; Ebata *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Aldosteron auf die Ionentransportsysteme nur über eine Dauer von 30 min untersucht. Dadurch kann ein eventuell auftretender genomischer Effekt, verursacht durch in den verwendeten Erythrozyten-Suspensionen vorkommenden Retikulozyten, ausgeschlossen werden.

4.1 Auswirkungen von Aldosteron auf Erythrozyten

Die Konzentration von Aldosteron im Blutplasma von erwachsenen Menschen liegt bei ca. 0,2 bis 2,0 $\mu\text{M/l}$. Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron wurde bei den Zielzellen bereits in geringen Konzentrationen (0,02 - 200 nM) beobachtet. Um die Aldosteron-Wirkung auf Erythrozyten zu untersuchen und einen möglichen Effekt zu erkennen, wurden die Konzentrationen von Aldosteron mit 100 nM, 1 μM und 10 μM gewählt.

Der Effekt von Aldosteron wurde bereits auf das Vorhandensein des MR zurückgeführt. Neuere Studien zeigen allerdings, dass auch Rezeptoren, die im klassischen Sinn nicht als Steroid-Rezeptor gelten, diesen schnellen Effekt auslösen können (Mannheim Klassifikation (Falkenstein *et al.*, 2000)). Bei den roten Blutzellen ist ein solcher Mechanismus jedoch noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass Aldosteron als lipophiles Hormon durch die Zellmembran diffundiert und so auf die Transportsysteme wirkt.

Die ersten Untersuchungen von Aldosteron an humanem Blut wurden von Friedman und Friedman (1958) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Na^+ - und K^+ -Plasmakonzentrationen und Hämatokritwerte nach Beifügen kleiner Mengen Aldosteron zu Blut nach 2-, 4-, 6- oder 24-stündiger Lagerung bei 4°C bzw. nach ½-, 1-, 2- 3-stündiger Kontrolllagerung (37°C) gemessen. Aldosteron verminderte die Plasma- Na^+ -Zuwachsrate bei 37°C und anscheinend auch die Plasma- Na^+ -

Verminderungsrate bei 4°C. Von den erzielten Ergebnissen der Versuche mit Vollblut können folgende Rückschlüsse gezogen werden:

- (i) Ein nicht-genomischer (schneller) Effekt ist unwahrscheinlich, die Zeitdauer der Experimente war deutlich länger als 30 min.
- (ii) Die beobachteten Effekte können eventuell auch durch andere Blutzellen (Leukozyten, Thrombozyten) verursacht worden sein.

Die Ergebnisse von Friedman und Friedman (1958) konnten von Glynn (1957) nicht reproduziert werden (die Publikation von Glynn erschien nach der Publikation von Friedman und Friedman). Er zeigte, dass Herzglykoside in geringen Konzentrationen den Na⁺- und K⁺-Transport durch die Membran der roten Blutzellen inhibieren. Diese Inhibierung beruht auf einer Hemmung des Transports über die Na⁺/K⁺-Pumpe. Glynn's These beruht darauf, dass Aldosteron mit Herzglykosiden chemisch verwandt ist und daher ähnliche funktionelle Effekte induzieren kann. Der einzige Unterschied zur Arbeit von Friedman und Friedman (1958) ist die Verwendung von Pufferlösungen anstelle von Blutplasma (Glynn, 1957).

Nachdem ein Einfluss von Aldosteron auf den Na⁺-Transport *in vitro* in der Blasenkröte (Oberleithner *et al.*, 1987) und ein direkter Stimulierungseffekt auf die Herzmuskelzellen-Kontraktionen (Wehling *et al.*, 1998) gefunden wurde, haben Sprach und Streeten (1964) den Einfluss von Aldosteron auf Hundeerythrozyten untersucht. Bei diesen Versuchen wurde der Na⁺-Austausch zwischen Erythrozyten und Plasma von Aldosteron in physiologischer Konzentration gehemmt. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse mit einer durch Aldosteron induzierten erhöhten Permeabilität für Na⁺-Ionen mit einhergehendem gesteigerten Na⁺-Efflux und Na⁺-Influx (Sprach und Streeten, 1964).

4.2 K⁺-Influx

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Tracerkinetik der nicht-genomische Effekt von Aldosteron auf die drei Transportsysteme: Na⁺/K⁺-Pumpe, Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporter und Rest-K⁺-Influx jeweils in HIS- und LIS-Lösung untersucht. Der nicht-genomische Effekt von Aldosteron wurde zuerst in Zeitintervallen von 5, 10,

30 und 60 min untersucht (Abb. 3.1). Nach diesen Kontrollmessungen wurden alle weiteren Versuche max. 30 min durchgeführt, um einen genomischen Effekt auszuschließen (durch das Vorhandensein von Retikulozyten möglich). Die Erythrozyten wurden mit Aldosteron (mit unterschiedlichen Konzentrationen) für die K^+ -Influx Messungen vorbereitet. Die unterschiedlichen Vorinkubationszeiten und Konzentrationen von Aldosteron zeigen keinen Effekt auf die Transportaktivität der Na^+/K^+ -Pumpe (Abb. 3.1). Als Nächstes wurde die Wirkung auf den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten und Aldosteron-Konzentrationen untersucht. Dabei zeigte Aldosteron in HIS-Lösung ebenfalls keinen Effekt auf den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter (Abb. 3.2).

In den Arbeiten der Arbeitsgruppe I. Bernhardt wurde gezeigt, dass der Rest- K^+ -Influx in Humanerythrozyten in HIS-Lösung nur 5% beträgt (siehe z. B. Weiss *et al.*, 2004). Die anderen 95% sind auf die beiden Transportsysteme Na^+/K^+ -Pumpe (ca. 70%) und $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter (ca. 25%) aufgeteilt. Die 5% Rest- K^+ -Influx in HIS-Lösung in Anwesenheit von unterschiedlichen Aldosteron-Konzentrationen haben keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle gezeigt (Abb. 3.2).

Der Effekt von Aldosteron auf die Na^+/K^+ -Pumpe *in vitro* wurde auch von Stern *et al.* (1983) untersucht. Die Humanerythrozyten wurden mit Aldosteron in einer physiologischen Konzentration von 2.7×10^{-10} mol/l inkubiert. Aldosteron hatte bei diesen Untersuchungen keinen signifikanten Effekt auf den über die Pumpe vermittelten K^+ -Influx.

In LIS-Lösung sind die K^+ -Influx-Werte deutlich höher (60 - 65%) als in HIS-Lösung (Abb. 3.3). Die Na^+/K^+ -Pumpe trägt 50% zum gesamten K^+ -Influx in der LIS-Lösung bei, der $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter ist in dieser Lösung nahezu inaktiv. Die restlichen 50% werden durch den Rest- K^+ -Influx ("leak") beigesteuert (Weiss *et al.*, 2004; Bernhardt und Ellory 2003, Bernhardt *et al.*, 1999). Aldosteron zeigte einen kleinen, aber nicht-signifikanten Effekt in LIS-Lösung. Mit steigender Aldosteron-Konzentration (100 nM - 1,2%, 1 μ M - 1,7% und 10 μ M - 3%) erhöhte sich die K^+ -Influxrate im Vergleich zur Kontrolle leicht.

Die Untersuchungen an jungen Humanerythrozyten, den Retikulozyten, haben einen signifikanten Effekt von Aldosteron auf den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter gezeigt (Tabelle 3). Aldosteron (10 μ M) hemmte den $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Symporter um 30% im

Vergleich zur Kontrolle. Der Effekt kann als nicht-genomisch betrachtet werden, da die Retikulozyten nur für kurze Zeit (10 min) mit Aldosteron inkubiert wurden. Auf die Na^+/K^+ -Pumpe der Retikulozyten ist allerdings kein Einfluss von Aldosteron nachweisbar (Tabelle 3).

Die Untersuchungen an Hühnererythrozyten, die im Gegensatz zu Humanerythrozyten einen Kern und damit DNA enthalten, haben keinen deutlichen Einfluss von Aldosteron auf die untersuchten Transportsysteme in HIS-Lösung gezeigt (Abb. 3.4). Der Ouabain- und Bumetanid-resistente K^+ -Influx wurde bei verschiedenen Konzentrationen von Aldosteron in HIS- und LIS-Lösung an Hühnererythrozyten nach einer Vorinkubationszeit von 5 min bzw. 30 min gemessen (Abb. 3.5, 3.6). An Hühnererythrozyten konnte in beiden Lösungen kein signifikanter nicht-genomischer Effekt von Aldosteron ($10 \mu\text{M}$) nach 5 min nachgewiesen werden. Nach 30 min Inkubation mit Aldosteron wurde ebenfalls kein Effekt des Steroidhormons auf den K^+ -Transport festgestellt. Nach den durchgeführten Messungen wurde jedoch ein deutlicher Unterschied in den K^+ -Restflux-Werten von Hühner- und Humanerythrozyten gefunden (Tabelle 4). Die höheren Restflux-Werte bei Hühnererythrozyten weisen darauf hin, dass an diesen Zellen möglicherweise noch weitere (bisher unbekannte bzw. nicht identifizierte) Transportsysteme vorhanden sind oder aber, dass die eingesetzten Konzentrationen der Transportinhibitoren zu gering waren.

Der K^+ -Influx wurde auch an Erythrozyten aus Nabelschnurblut in HIS-Lösung untersucht (Abb. 3.7). Drei von vier Messungen zeigen eine sehr geringe Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe und daher ist der Mittelwert auch relativ klein. Im Nabelschnurblut ist eine hohe Anzahl von Retikulozyten vorhanden. Trotzdem wurde kein signifikanter Effekt von Aldosteron auf die Na^+/K^+ -Pumpe und den $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ -Symporter festgestellt.

Die Untersuchungen der K^+ -Fluxe haben jedoch einen signifikanten nicht-genomischen Effekt an Retikulozyten, die durch unterschiedliche Dichte separiert wurden, auf den $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ -Symporter gezeigt (siehe oben). Wie genau Aldosteron zur Hemmung dieses Symporters führt, ist noch unklar. An Human- und Hühnererythrozyten, sowie Erythrozyten aus humanem Nabelschnurblut konnte für Aldosteron kein nicht-genomischer Effekt auf die Transportsysteme Na^+/K^+ -Pumpe, $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ -Symporter und Rest- K^+ -Influx festgestellt werden.

K⁺-Flux-Untersuchungen wurden in der Literatur an mehreren kernhaltigen Zellen wie z. B. von Rattenarterialgefäßen, VSMC, Myozyten und anderen Zelltypen durchgeführt. Die Zugabe von Aldosteron führte zu einer schnellen Aktivierung der Na⁺/K⁺-Pumpe und des Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporters an Rattenarterialgefäßen (Alzamora *et al.*, 2003). Die Messung des K⁺-Fluxes an VSMC zeigten keinen schnellen Effekt von Aldosteron auf den Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporter. Auf eine 3 und 7 Tage andauernde Behandlung mit Aldosteron reagierten die Aortazellen mit einer 29% bzw. 47% gesteigerten Aktivität des Na⁺,K⁺,2Cl⁻-Symporters (Jiang *et al.*, 2003).

4.3 Fluoreszenzuntersuchungen des intrazellulären pH-Wertes

In dieser Arbeit wurde der intrazelluläre pH-Wert in Zellsuspensionen und in Einzelzellen untersucht und auf dieser Basis der nicht-genomische Effekt von Aldosteron überprüft. Die Methode der Fluoreszenzmessung mit dem BCECF AM Farbstoff ist sehr gut zur Erfassung der Änderungen des intrazellulären pH-Wertes geeignet. Die von mir durchgeführten Messungen in Zellsuspensionen basieren auf den Erfahrungen von Kummerow (1999).

Die schnelle Aktivierung (< 2 min) des Na⁺/H⁺-Austauschers durch Aldosteron wurde in mehreren Zelltypen (VSMC, Zellen aus Gebärmutterarterien) durch BCECF-Spektroskopie und -Mikroskopie nachgewiesen (Wehling *et al.*, 1996; Ebata *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 2005). Aldosteron induziert eine schnelle Alkalisierung in diesen Zellen. Bei A6-Epithelzellen aktiviert Aldosteron in einer Konzentration von 10⁻⁷M innerhalb von 30 min den Na⁺/H⁺-Austauscher. In der Sammelröhre von Ratten mit Hyperaldosteronismus wurde diese schnelle Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers jedoch nicht beobachtet.

Die Kalibrierung der BCECF-Fluoreszenzintensität für einen pH_i-Wert erfolgte mit Nigericin (5 µM) in einer 135 mM KCL-Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten. Nigericin ist ein K⁺/H⁺-Austauscher. Dadurch stellt sich bei der Kalibrierung ein pH_i-Wert ein, der dem äußeren pH-Wert entspricht. Die Kalibrierungsmethode wurde auch mikroskopisch zur Einzelzellenuntersuchung eingeführt. Die Kalibrierungsdaten, die am Mikroskop und am Spektrometer ermittelt wurden,

wurden miteinander verglichen und lieferten die gleichen Werte für den intrazellulären pH-Wert der Humanerythrozyten.

In HIS-Lösung wurde zuerst der intrazelluläre pH-Wert bestimmt. Der pH_i beträgt $7,2 \pm 0,04$ und stimmt gut mit den Experimenten von Kummerow (2000) überein. Dieser Wert wurde sowohl für die Zellsuspension als auch für die Einzelzellen ermittelt. Größere Schwierigkeiten traten bei den spektrophotometrischen Untersuchungen (Abb. 3.15) im Vergleich zu mikroskopischen Untersuchungen an Einzelzellen (Abb. 3.9) in LIS-Lösung auf. Bei der spektrophotometrischen Analyse der Zellsuspension traten erhebliche Schwankungen auf, die nicht erklärt werden können. Wenn Erythrozyten aus physiologischer Lösung in LIS-Lösung (Abb. 3.9 und 3.15) überführt wurden, ist ein Anstieg des pH_i -Wertes bis $7,7 \pm 0,15$ (durch Spektrometer ermittelt) und $7,5 \pm 0,01$ (durch Mikroskopie an Einzelzellen ermittelt) innerhalb von Sekunden zu erkennen, danach folgt eine langsame Ansäuerung. Etwas schwieriger ist dieser Wert durch die Messungen am Spektrofluorimeter darzustellen. Die Überführung einer Zellsuspension aus einer physiologischen Lösung in eine Zuckerlösung dauert weniger als 1 min und nach einem initialen Anstieg sinkt der pH_i -Wert, vergleichbar mit den Messungen an Einzelzellen (Abb. 3.9). Die rapide Alkalisierung bei der Überführung der Zellen in HIS-Lösung ist an den Anionentransporter (Bande-3) gekoppelt. Die Abwesenheit von extrazellulärem Cl^- induziert einen nach auswärts gerichteten Gradienten, der über Bande-3 einen Cl^-/OH^- -Transport bewirkt, was zur Änderung des pH_i führt. Die langsame Ansäuerung lässt sich als Austausch monovalenter Kationen gegen Protonen über den $K^+(Na^+)/H^+$ -Austauscher beschreiben (Richter *et al.*, 1997).

Bei den spektroskopischen Untersuchungen von Humanerythrozyten in Anwesenheit von Aldosteron ist eine kleine pH_i -Alkalisierung ($pH_i = 7,21$) bei $1 \mu M$ und $10 \mu M$ Aldosteron im Vergleich zu Proben mit 100 nM Aldosteron und der Kontrolle (mit entsprechender Menge Ethanol) erkennbar ($pH_i = 7,16$, Abb. 3.10). Der pH_i der Proben mit $1 \mu M$ und $10 \mu M$ Aldosteron steigt um $0,03 - 0,05$ pH-Einheiten im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist jedoch noch kein deutlicher Hinweis für einen Einfluss von Aldosteron auf den pH_i -Wert. Bei vergleichbaren mikroskopischen Untersuchungen an Einzelzellen betrug der pH_i bei allen Proben zum Beginn der Messungen $\sim 7,3$ (Abb. 3.16). Im Unterschied zu den Messungen am Fluoreszenzspektrometer zeigen die Proben eine deutliche Änderung des

intrazellulären pH-Wertes über 30 min. In diesem Zeitraum änderte sich der pH_i jeder Probe um 0,2 - 0,8 pH-Einheiten. Bei der Kontrolle mit Ethanol wurde eine kleine Alkalisierung festgestellt, bei allen Proben mit unterschiedlichen Aldosteron-Konzentrationen erfolgt nach anfänglicher Alkalisierung nach etwa 5 - 10 min ein Abfall des pH_i -Wertes (Abb. 3.16). Die Kurvenverläufe in Anwesenheit von Aldosteron unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Bei Hühnererythrozyten unterscheiden sich die anfänglichen pH_i -Werte der mikroskopischen Untersuchung ($\text{pH}_i = 7,25$, Abb. 3.18) von den Messungen in der Zellsuspension ($\text{pH}_i = 7,92$, Abb. 3.11) deutlich. In beiden Fällen kommt es zu einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes zu Beginn der Messung, nach 30 min liegen die pH_i -Werte bei 7,15 bzw. 7,85. Der Grund für die unterschiedlichen Werte ist nicht ganz geklärt. Eine Möglichkeit könnte die Anwesenheit von Transportinhibitoren (0,1 mM Ouabain, 0,1 mM Bumetanid und 0,1 mM EGTA) bei der spektroskopischen Untersuchung sein (diese Inhibitoren wurden für die Einzelzelluntersuchungen nicht eingesetzt). Eine weitere Möglichkeit könnte eine H^+ -Akkumulation im Zellkern sein, die das Fluoreszenzsignal, d.h. den pH_i bei einer von beiden Messungen verfälscht. Obwohl die ermittelten pH_i -Werte der Hühnererythrozyten bei beiden verwendeten Methoden unterschiedlich waren, wurde kein signifikanter nicht-genomischer Effekt von Aldosteron über einen Zeitraum von 30 min gefunden. Die Aldosteron-Werte unterscheiden sich nicht von den jeweiligen Kontrollen.

Der pH_i an Erythrozyten aus Nabelschnurblut (mit einem hohen Prozentsatz an Retikulozyten) wurde nur mikroskopisch an Einzelzellen untersucht. Er beträgt im Mittel 7,2 (Abb. 3.19). Die Kurve der Kontrolle mit Ethanol zeigt eine Überlappung mit den Kurven in Anwesenheit von Aldosteron (100 nM, 1 μM und 10 μM). In allen Fällen nimmt der pH_i -Wert im Zeitverlauf von 30 min leicht ab (um 0,1 pH-Einheit, Abb.3.19). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

4.4 Intrazelluläre Ca^{2+} -Fluoreszenzuntersuchung

Der Einfluss von Aldosteron auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an kernhaltigen Zelltypen wurde in der Literatur mit Hilfe der Einzelzell-Mikroskopie mit dem Ca^{2+} -Farbstoffindikator Fura-2 untersucht (Gekle *et al.*, 1996; Koepfel *et*

al., 2003; Wehling *et al.*, 1995; Haseroth *et al.*, 1999). Messungen mit Fura-2 an Humanerythrozyten haben aber gezeigt, dass das Anregungsspektrum von Fura-2 überwiegend im Absorptionsbereich des Hämoglobins liegt. Bei den Anregungswellenlängen von Fura-2 (340 / 380 nm) besitzt Hämoglobin Regionen mit erhöhter Absorption, sodass die Anregungsspektren von Fura-2 an diesen Stellen verzerrt werden (Kaestner *et al.*, 2005). Die Erythrozyten wurden deshalb mit Fluo-4 AM aufgeladen, da dieser Farbstoff bei Anwesenheit von Hämoglobin eine höhere Fluoreszenzrestintensität im Vergleich zu Fura-2 und Indo-1 besitzt. Des Weiteren hat Fluo-4 AM nur eine Anregungswellenlänge, sodass der wellenlängenabhängige Hämoglobineinfluss, anders als bei ratiometrischen Messungen mit Fura-2, kein Problem darstellt. Allerdings ist mit Fluo-4 keine quantitative Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmung möglich. Kontrollexperimente mit intakten Erythrozyten und dem Farbstoff Fluo-4 AM zeigten, dass der Verlauf der Spektren der mit Fluo-4 AM beladenen Erythrozyten nicht von der Autofluoreszenz gestört wird (Abb.3.20).

4.4.1 Humanerythrozyten

Die Messungen an Humanerythrozyten wurden in Anwesenheit von o-Vanadat (1 mM) in der Zellsuspension durchgeführt (Abb. 3.12). In der Zellsuspension ergeben die Emissionsspektren der Proben mit Aldosteron (0,1 μM , 1 μM oder 10 μM) sowie die Kontrolle mit Ethanol keinen signifikanten Unterschied nach 15 min Inkubation. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen an Einzelzellen wurde die Zeitabhängigkeit des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ betrachtet. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt wurde an Humanerythrozyten, Hühnererythrozyten und an Erythrozyten aus Nabelschnurblut untersucht.

Zuerst wurden Ca^{2+} -Transportversuche bei verschiedenen extrazellulären Bedingungen (HIS- und LIS-Lösungen, ohne und mit o-Vanadat) in Abwesenheit von Aldosteron durchgeführt. Die intakten Erythrozyten, die mit 4 μM Fluo-4 AM aufgeladen wurden und anschließend in eine Lösung überführt wurden, die 2 mM Ca^{2+} enthielt, zeigten in HIS-Lösung ein sehr geringes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu o-Vanadat behandelten Zellen in dieser Lösung (Abb. 3.21 A, B). Die Ca^{2+} -Konzentration in der Lösung ist 1000fach höher als die intrazelluläre Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration und noch weitaus höher als die freie Ca^{2+} -

Konzentration in den Erythrozyten (30 - 60 nM, Lew *et al.*, 1982). Der Farbstoff Fluo-4 AM kann die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentrationsänderung nur dann detektieren, wenn sie im Bereich von einigen μM liegt (Abb. 3.21 A, B und Abb. 3.22). Bei intakten Zellen hält die Ca^{2+} -Pumpe die geringe intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} aufrecht. Es wurde bei einigen Zellen eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Diese beruht auf einer geänderten Permeabilität der Zellmembran für Ca^{2+} und/oder auf einer reduzierten Aktivität der Ca^{2+} -Pumpe. Häufig sind diese Signale transient und die Ca^{2+} -Konzentration verringert sich wieder, was vermutlich auf eine einsetzende oder gesteigerte Aktivität der Pumpe zurückzuführen ist. Bei Zellen, deren Ca^{2+} -Konzentration sehr hohe Werte erreicht, tritt häufig der Zelltod ein. Die Zellen, die eine hohe Ausgangsfluoreszenz aufweisen, reduzieren diese meist sehr langsam und kontinuierlich oder erleiden ebenfalls den Zelltod. Offensichtlich kann eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} , wenn sie nicht wieder reduziert werden kann, in Erythrozyten zu einer Hämolyse führen. Diese Zellen wurden bei der Ermittlung des Mittelwertes der Fluoreszenzintensität nicht berücksichtigt

In Experimenten mit Erythrozyten und dem Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-4 AM und einer intakten Ca^{2+} -Pumpe in HIS-Lösung konnte kein schneller Einfluss von Aldosteron auf die Ca^{2+} -Pumpe gefunden werden. Das Fluoreszenzsignal bei einer intakten Ca^{2+} -Pumpe ist möglicherweise zu gering, um ggf. einen Effekt von Aldosteron auf den Ca^{2+} -Transport nachzuweisen.

Die Untersuchungen in HIS-Lösung mit 2 mM Ca^{2+} ruft bei Anwesenheit von o-Vanadat einen langsamen kontinuierlichen Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor (Abb. 3.22). Dieser langsame Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen konnte sowohl in Anwesenheit von Aldosteron (1 μM und 10 μM), als auch bei der Kontrolle mit Ethanol beobachtet werden. Die Verläufe der Kurven unterscheiden sich allerdings (Abb. 3.24). Alle 3 Kurven zeigen innerhalb der ersten 5 min einen unterschiedlichen Ca^{2+} -Einstrom. Im mittleren Zeitbereich überlappen sich die Kurven und nach etwa 20 min sinkt die Fluoreszenzintensität der Proben mit Aldosteron, während bei der Kontrolle ein weiterer Anstieg beobachtet werden kann. Ein nicht-genomischer Effekt von Aldosteron auf den Ca^{2+} -Transport an Humanerythrozyten könnte hierfür von Bedeutung sein.

Bei anderen Zellen wie Nierenepithelzellen (Gekle *et al.*, 1996), *Xenopus leavis* Oozyten (Schäfer *et al.*, 2003) und glatten Muskelzellen (Wehling *et al.*, 1995) wurde ebenfalls ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einige Minuten nach der Aldosteron-Zugabe beobachtet.

Bei den Messungen in LIS-Lösung und intakter Ca^{2+} -Pumpe wurde ein starkes Fluoreszenzsignal im Vergleich zur HIS-Lösung gesehen. Die Ausgangsintensität ist deutlich höher als in HIS-Lösung und ein signifikanter Ca^{2+} -Influx in die Zelle kann beobachtet werden. Dieser ist viel deutlicher ausgeprägt als in HIS-Lösung. Bei etwa 50% der Zellen endet der Ca^{2+} -Einstrom bereits nach weniger Minuten mit einer Zelllyse (diese Zellen wurden nicht ausgewertet). Die Ca^{2+} -Ionen dringen wahrscheinlich durch den unselektiven, spannungs-abhängigen Kationenkanal ein, der unter LIS-Bedingungen normalerweise geöffnet ist. Man kann auch einen Transport von Ca^{2+} -Ionen über den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher nicht ganz auszuschließen. Die Verwendung von o-Vanadat in Ca^{2+} -haltiger LIS-Lösung führt sehr schnell zu einer Hämolyse eines Großteils der Zellen. Da in LIS-Lösung das Ca^{2+} des Außenmediums sehr schnell in die Zelle gelangt und dieser Prozess bei einer Hemmung der Ca^{2+} -Pumpe noch beschleunigt wird, kommt es wahrscheinlich zu einem schnellen Erreichen einer letalen Ca^{2+} -Konzentration. Kontrollmessungen mit EGTA zeigen (die Ergebnisse sind nicht dargestellt), dass nicht das o-Vanadat an sich in Lösung geringer Ionenstärke für den Zelltod verantwortlich ist, sondern das Ca^{2+} des Außenmediums. Die Messungen mit Aldosteron in der LIS-Lösung zeigten kein eindeutiges Ergebnis (die Ergebnisse sind nicht dargestellt). Bei der schnell steigenden Fluoreszenzintensität in der Zelle war unklar, ob das Aldosteron, Ethanol oder einfach das Ca^{2+} des Außenmediums einen Einfluss haben.

4.4.2 Hühnererythrozyten

Der Ca^{2+} -Transport an Hühnererythrozyten wurde nur in HIS-Lösung untersucht. Die Hühnererythrozyten haben ein größeres Volumen und respektive eine höhere Fluoreszenzintensität als Humanerythrozyten. Wie schon anhand der Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 3.25) zu erkennen ist, kommt das stärkste Fluoreszenzsignal aus dem Zellkern. Vermutlich akkumuliert der Fluoreszenzfarbstoff im Zellkern und nicht im Zytoplasma. Bei Hühnererythrozyten ist ein

Effekt von Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol auf den Ca^{2+} -Transport nachweisbar (Abb. 3.26). Während die Kontrollkurve einen stetigen Anstieg der Fluoreszenzintensität zeigt, kommt es in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Aldosteron zu einem stetigen Abfall. Es wurde eine Überlappung der Kurven, der Proben mit Aldosteron ($10 \mu\text{M}$) und der Kontrolle mit Ethanol nach 5 bis 15 min Versuchverlauf beobachtet. Mit diesen Ergebnissen wurde kein rapider, sondern ein langsamer Effekt von Aldosteron gefunden.

4.4.3 Erythrozyten aus Nabelschnurblut

Die Ca^{2+} -Pumpe wurde wiederum mit o-Vanadat inhibiert. Die Fluoreszenzintensität der Erythrozyten aus Nabelschnurblut war wesentlich geringer als bei „normalen“ Humanerythrozyten unter vergleichbaren Bedingungen. Die Fluoreszenzintensität von beiden Proben mit Aldosteron und Ethanol zeigt einen kleinen Anstieg und die Kurven, die Mittelwerte von 20 Zellen darstellen, überlappen sich (Abb. 3.27). Die mikroskopische Analyse des Ca^{2+} -Gehaltes zeigt in HIS-Lösung mit o-Vanadat und 2 mM Ca^{2+} keinen nicht-genomischen Effekt von Aldosteron. Vergleicht man die Kurven mit den Kurven für Humanerythrozyten in An- und Abwesenheit von o-Vanadat fällt auf, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität deutlich geringer als bei Humanerythrozyten mit o-Vanadat ausfällt (vgl. Abb. 3.22 und 3.27). Die Messwerte beider Proben der Erythrozyten aus Nabelschnurblut haben eine ähnliche Fluoreszenzintensität wie die Proben der Humanerythrozyten mit intakter Ca^{2+} -Pumpe und 2 mM Ca^{2+} im Außenmedium. Ohne o-Vanadat war das Fluoreszenzsignal derart gering, dass keine Messung durchgeführt werden konnte. Offenbar unterscheiden sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivität der Ca^{2+} -Pumpe an Erythrozyten aus Nabelschnurblut von denen in „normalen“ Erythrozyten. Dies bedarf allerdings einer weiteren Klärung.

4.5 Li^+ -Transport

Der Li^+ -Transport wurde sowohl für den Li^+ -Efflux als auch den Li^+ -Influx (unter Verwendung der Nystatin-Technik) untersucht. Der Inhibierungseffekt von Phloretin auf den Na^+/Li^+ -Austauscher-vermittelten Li^+ -Transport, sowie der

Einfluss von Aldosteron auf diesen Transporter wurde in Lösungen verschiedener Ionenstärke gemessen. Durch eine gleichzeitige Anwesenheit (unter allen Bedingungen) der Hemmstoffe Ouabain (0,1 mM) und Bumetanid (0,1 mM), die die Na^+/K^+ -Pumpe und den $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporter blockieren, sollte ein möglicher Li^+ -Flux über diese Ionentransportwege ausgeschlossen werden.

Bei der Untersuchung des Li^+ -Effluxes wurden die Erythrozyten 3 h in einer 150 mM Li^+ -Ladelösung aufgeladen. In der Lösung mit niedriger Ionenstärke steigt der Li^+ -Efflux sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Phloretin im Vergleich zur HIS-Lösung stark an (Abb. 3.29). Das deutet darauf hin, dass der Transport der Li^+ -Ionen nicht nur durch den Na^+/Li^+ -Austauscher vermittelt wird. Der Li^+ -Transport verhält sich in LIS-Lösung (im Vergleich zur HIS-Lösung) ähnlich wie der Ouabain- und Bumetanid-insensitive Na^+ - und K^+ -Transport (Efflux und Influx). Der starke Anstieg bei Verringerung der extrazellulären Ionenstärke wurde für den Na^+ - und K^+ -Transport bereits von Bernhardt et al. (1996) gezeigt. Bei einer Überführung der Zellen in die LIS-Lösung, steigt der pH_i stark an (wie bereits oben gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass der $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher nicht nur K^+ und Na^+ , sondern auch Li^+ gegen Protonen austauschen kann.

Phloretin hemmt den Li^+ -Efflux bei geringer Ionenstärke etwas, bei physiologischer Ionenstärke dagegen nur sehr wenig (Abb. 3.29, siehe auch Abb. 3.30). Der Na^+/Li^+ -Austauscher spielt offenbar in der physiologischen Lösung (bei inhibierter Na^+/K^+ -Pumpe und inhibiertem $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporter) eine untergeordnete Rolle und auch in LIS-Lösung werden die Li^+ -Ionen hauptsächlich über den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher transportiert. Der Hemmeffekt von Phloretin wurde bei diesen Untersuchungen über den Vergleich von Phloretin-insensitiven und Phloretin-sensitiven Fluxen bestimmt.

Zusätzlich wurde der Effekt von Aldosteron auf den Li^+ -Efflux in HIS-Lösung (in An- und Abwesenheit von Phloretin) gemessen (Abb. 3.30). Die Werte in Anwesenheit von Phloretin sind etwas geringer, was wie schon erwähnt auf eine Hemmung des Na^+/Li^+ -Austauscher hinweist. Aus den ermittelten Werten geht hervor, dass Aldosteron keinen signifikanten Einfluss auf den Li^+ -Transport hat. Ein nicht-genomischer Effekt auf den Li^+ -Transport, insbesondere auf den Na^+/Li^+ -Austauscher konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Bei der Messung des Li^+ -Influxe wurde die Nystatin-Technik eingesetzt (siehe Material und Methoden 2.5.3). Die Erythrozyten werden mit Na^+ -Ionen aufgeladen, was eine Aktivierung des Na^+/Li^+ -Austauschers zur Folge haben sollte. In HIS-Lösung kann sowohl ein Li^+ -Transport über den Na^+/Li^+ -Austauscher (Phloretin-sensitiver Anteil der gemessenen Fluxe = Differenz der Werte in Ab- und Anwesenheit von Phloretin) als wahrscheinlich auch ein über den $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher vermittelter Li^+ -Transport (Phloretin-insensitiv) ermittelt werden. Wie schon für den Li^+ -Efflux gezeigt, steigt der Li^+ -Influx in LIS-Lösung signifikant an (was wiederum auf eine Aktivierung des $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauschers zurückzuführen ist). Allerdings ist der Fluxwert in Anwesenheit von Phloretin höher (nicht signifikant) als in Abwesenheit. Denkbar ist, dass der Li^+ -Influx, der über den Na^+/Li^+ -Austauscher in LIS-Lösung realisiert wird nahe Null ist (Abb. 3.31).

4.6 Erythrozyten und artifizielle Oberflächen

Die Einzelzell-Mikroskopie und die Verwendung von Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen erlauben eine zeitliche Verfolgung der Änderung des Ca^{2+} -Gehaltes der Erythrozyten bei Kontakt mit unterschiedlichen Oberflächen. Eine mögliche Änderung des Ca^{2+} -Gehaltes soll dabei Rückschlüsse auf den Zellzustand bzw. auf eine Beeinflussung der Membrantransporter liefern. Die Oberflächen wurden mit verschiedenen Polymeren (Abb. 3.37, 3.38, 3.39, 3.40, 3.41, 3.42) oder mit perfluorierten organischen Gruppen (Abb. 3.36) beschichtet. Die erzielten Ergebnissen zeigen, dass bei allen chemisch-behandelten Oberflächen der Ca^{2+} -Gehalt der Erythrozyten beeinflusst wird. Auf PLL-beschichteten Glasoberflächen (Abb. 3.32) sowie auf strukturierten Oberflächen ohne Beschichtungen (Abb. 3.35) wurden keine signifikanten Änderungen der Zellform sowie des Ca^{2+} -Gehaltes innerhalb des Untersuchungszeitraums (30 min) gefunden.

Die Oberflächen mit einem Mikro-Kontakt-Aufdruck mit/ohne Beschichtungen sollen als eine Steuerung der Proliferation und der Differenzierung bestimmten Zelltypen eingesetzt werden. Diese Steuerung erfolgt durch die Wirkung von Botenstoffen und die dadurch bedingte Induktion von intrazellulären Signalen unter Verwendung sowohl der unbeschichteten Oberfläche GPTS04, als auch der beschichteten Oberfläche ECT03 vom INM (Wirth *et al.* 2006).

Zwei der drei organischen Polymere (Chemische Fakultät, Universität Sofia, siehe Kapitel 3.6d), die zur Beschichtung von Glasoberflächen verwendet wurden, besitzen eine bipolare Ladung. Bei allen dazu durchgeführten Messungen war erkennbar, dass ein Kontakt zwischen den Polymer-beschichteten Oberflächen und den Erythrozyten, die eine negative Oberflächenladung haben, verhindert wird. Diese Eigenschaft der Polymere könnte in Zukunft eine Anwendung als Beschichtungsmaterial in Medizin und Biotechnologie, z. B. bei Gelenk- und Knochenersatz, finden.

Die Mikro-/Nano-strukturierten Polymeroberflächen (vom Science Park, Barcelona) zeigen deutliche Fluktuationen des Ca^{2+} -Gehaltes der Erythrozyten. Die genaue Wirkung von Silikonoxid und Silikonitrid auf physiologische Parameter der Erythrozyten bzw. der Erythrozytenmembran ist jedoch noch unklar.

Eine neue Technik, die digitale holographische Mikroskopie, erlaubt eine Beobachtung der Sedimentation einer einzelnen Zelle in der Lösung, bevor diese in Kontakt mit der Oberfläche kommt (Abb. 3.33). Unmittelbar nach dem Kontakt mit der PLL-beschichteten Oberfläche (innerhalb von 1 s) tritt eine Veränderung der Zellform auf, die mit der erwähnten Methode gut beobachtet werden kann (Abb. 3.34). Die 3D-Aufnahmen der digitalen holographischen Mikroskopie werden in Zukunft bestimmt eine Anwendung in Biotechnologie und Medizin finden.

4.7 Zusammenfassungen zum nicht-genomischen Effekt von Aldosteron

Es wurden zahlreiche Methoden eingesetzt um einen möglichen nicht-genomischen Effekt von Aldosteron an Erythrozyten zu finden. Der größte Teil der Untersuchungen dazu war negativ. Es wurden allerdings folgende Hinweise auf einen Effekt von Aldosteron in einem Zeitraum von bis zu 30 min gefunden:

- **$\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Symporter in Retikulozyten:** Aldosteron (10 μM) hemmt den $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Symporter um 70% im Vergleich zur Kontrolle. Der Effekt kann als nicht-genomisch betrachtet werden, da die Retikulozyten nur für kurze Zeit (10 min vor Versuchsbeginn) mit Aldosteron inkubiert wurden (Tabelle 3).

- **Intrazellulärer pH-Wert bei Humanerythrozyten:** Bei den spektroskopischen Untersuchungen von Humanerythrozyten in Anwesenheit von Aldosteron ist eine kleine pH_i -Alkalisierung ($\text{pH}_i = 7,21$) bei $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ Aldosteron im Vergleich zu Proben mit 100 nM Aldosteron und der Kontrolle erkennbar ($\text{pH}_i = 7,16$, Abb. 3.10). Bei den Untersuchungen an Einzelzellen unterscheiden sich die Kurvenverläufe in Anwesenheit von Aldosteron signifikant von der Kontrolle (Anstieg des pH-Wertes bei der Kontrolle, Abnahme in Anwesenheit von Aldosteron, Abb. 3.16).
- **Ca^{2+} -Transport bei Human- und Hühnererythrozyten:** Die Verläufe der Messkurven zur Ca^{2+} -Aufnahme von Humanerythrozyten (in Anwesenheit von o-Vanadat) unterscheiden sich in einem Zeitraum von 30 min. Insbesondere nach 15 - 20 min vermindert sich die Ca^{2+} -Aufnahme in Anwesenheit von Aldosteron ($1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.24). Auch bei Hühnererythrozyten konnten Unterschiede beobachtet werden. Während die Kontrollkurve einen stetigen Anstieg der Fluoreszenzintensität zeigt, kommt es in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Aldosteron zu einem stetigen Abfall des Ca^{2+} -Gehaltes (Abb. 3.26).

Mit den erzielten Ergebnissen konnte ein Effekt von Aldosteron auf den $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Symporter in Retikulozyten, auf den intrazellulären pH-Wert von Humanerythrozyten und auf den Ca^{2+} -Transport bei Human- und Hühnererythrozyten gefunden werden.

5. Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Aldosteron spielt eine wichtige Rolle in der Elektrolyt- und Fluidhomeostase und reguliert darüber den Blutdruck. Die nicht-genomischen Wirkungen von Aldosteron sind unabhängig von Transkription und Translation. Die nicht-genomischen Effekte werden durch einen Rezeptor vermittelt, der insensitive für die Inhibitoren der klassischen Mineralokortikoid-Rezeptoren ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der nicht-genomische Effekt von Aldosteron auf die drei Transportsysteme: Na^+/K^+ -Pumpe, $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporter und $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher mit Hilfe der Tracerkinetik untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass Aldosteron keinen signifikanten Effekt auf diese Transportsysteme an normalen Erythrozyten hat. An Retikulozyten wurde jedoch eine signifikante Inhibierung des $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ -Symporters durch Aldosteron gefunden.

Die Untersuchungen wurden auch mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse an einzelnen Erythrozyten und in Zellsuspension von Human- und Hühnererythrozyten, sowie an Erythrozyten aus Nabelschnurblut durchgeführt. Der Einfluss von Aldosteron auf den Ca^{2+} -Gehalt wurde mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4 untersucht. Einige Effekte von Aldosteron (in unterschiedlicher Konzentration) auf den Ca^{2+} -Transport von Human- und Hühnererythrozyten konnten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der Einfluss von Aldosteron auf den Na^+/H^+ -Austauscher und den intrazellulären pH-Wert mit Hilfe des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes BCECF untersucht. Die Anwesenheit von Aldosteron resultierte in einem erhöhten intrazellulären pH-Wert.

Die Untersuchung des Na^+/Li^+ -Austauschers in Anwesenheit von Aldosteron mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie zeigten keinen Einfluss von Aldosteron auf diesen Transporter.

Einige Studien zum Ca^{2+} -Gehalt von Erythrozyten, die in Kontakt mit verschiedenen artifiziellen Oberflächen sind, wurden in die Untersuchungen einbezogen. Auf Oberflächen, die mit Polymeren oder mit perfluorierten Gruppen beschichtet sind, kommt es zu Fluktuationen des Ca^{2+} -Gehalts im Untersuchungszeitraum (30 min).

Summary

Aldosterone plays an essential role in electrolyte and fluid homeostasis and thus control of blood pressure. The nongenomic actions are rapid actions of aldosterone that are independent of transcription and translation. The nongenomic actions are mediated by a distinct receptor that is insensitive to inhibitors of the classical mineralocorticoid receptor.

Investigations of a direct influence of aldosterone on erythrocyte transport systems Na^+/K^+ pump, $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ symporter, and $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ exchanger have been carried out with tracer kinetic measurements. The investigations have shown that aldosterone does not have a significant effect on the mentioned transport systems in normal erythrocyte. However, in reticulocytes a significant inhibition of the $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ symporter by aldosterone has been found.

The investigations also include fluorescence measurements on single erythrocytes as well as in cell suspensions of human and chicken erythrocytes as well as of cord blood. The influence of aldosterone on the Ca^{2+} content has been investigated with fluo-4, a Ca^{2+} -sensitive dye. Some effects of Aldosterone (at different concentrations) on Ca^{2+} transport have been found in human and chicken erythrocytes. In addition, the influence of aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger and on the intracellular pH has been investigated using the pH-sensitive fluorescent dye BCECF. The presence of aldosterone resulted in a small increase of the intracellular pH.

The investigation of the Na^+/Li^+ exchanger in the presence of aldosterone using the method of atom absorption spectroscopy did not show any effect of aldosterone on this transporter.

Some studies of the Ca^{2+} content in red blood cells, which are in contact with different artificial surfaces, are included in the present investigations. On surfaces covered with polymers or with perfluorinated organic groups, the Ca^{2+} content fluctuates within the time period of the investigation (30 min).

6. Literaturverzeichnis

Adorante JS und Cala PM 1987 Activation of electroneutral K⁺ flux in *Amphiuma* red blood cells by N-ethylmaleimide distinction between K⁺/H⁺ exchange and KCl cotransport. *J Gen Physiol*, 90:209-227.

Agre P, Gardner K und Bennett V 1983 Association between human erythrocyte calmodulin and the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. *J Biol Chem*, 258:6258-6265.

Aizman R, Asher C, Fuzesi M, Latter H, Lonai P, Karilish SJD und Carty H 2002 Generation and phenotypic analysis of CHIF knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283:F569-F577.

Alvarez J und Garcia-Sancho J 1989 An estimate of the number of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the human red cell. *Biochim Biophys Acta*, 903:543-546.

Alzamora R, Marusic ET, Gonzalez M und Michea L 2003 Nongenomic effect of aldosterone on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrin*, 144(4):1266-1272.

Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE und Evans RM 1987 Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA; structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237:268-275.

Beato M 1989 Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56:335-344.

Beato M, Chavez S und Truss M 1996 Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61:240-251.

Beato M und Klug J 2000 Steroid hormone receptors: An update. *Hum. Reprod Update*, 6:225-236.

Becker BF und Duhm J 1978 Evidence for anionic cation transport of lithium, sodium and potassium across the human erythrocyte membrane induced by divalent anions. *J Physiol*, 282:149-168.

Bennekou P, Barksman TL, Kristensen BI, Jensen LR und Christophersen P 2004 Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel,

Part II: inactivation and blocking. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 32:356-361.

Bernhardt I, Bogdanova AY, Kummerow D, Kiessling K, Hamann J und Ellory JC 1999 Characterization of the $K^+(Na^+)/H^+$ monovalent cation exchanger in the human red blood cell membrane: effects of transport inhibitors. *Gen Physiol Biophys*, 18:119-137.

Bernhardt I, Borning M und Glaser R 1982 Investigations on the control of ion transport in human erythrocytes. I. Passive ^{86}Rb efflux and possibilities of its influence. *Acta biol med germ*, 41:531-539.

Bernhardt I, Donath E, und Glaser R 1984 Influence of surface charge and transmembrane potential on rubidium-86 efflux of human red blood cells. *J Membrane Biol*, 78:249-255.

Bernhardt I und Ellory JC (Eds.) 2003 *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Springer, Berlin, 173-195.

Bernhardt I und Glaser R 1982 Investigations on the control of ion transport in human erythrocytes. II. Influence of transmembrane potential, exterior surface potential and intracellular pH on the ^{23}Na efflux. *Acta biol med germ*, 41:541-547.

Bernhardt I, Hall AC, und Ellory JC 1991 Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport. *J Physiol*, 434:489-506.

Bernhardt I, Hall AC und Ellory JC 1988 Transport pathways for monovalent cations through erythrocyte membranes. *Studia biophysica*, 126:5-21.

Bernhardt I, Richter S, Denner K und Heinrich R 1996 Residual sodium and potassium fluxes through red blood cell membranes. In *Biochem Phys Horizons* (ed. Ghista D), Wiesbaden: Vieweg-Verlag.

Bernhardt I und Weiß E 2003 Passive membrane permeability for ions and membrane potential. In: *Red cell membrane transport in health and disease* (Bernhardt I, Ellory JC, Eds.), Springer Verlag.

Blazer-Yost BL, Liu X und Helman SI 1998 Hormonal regulation of ENaCs: insulin und aldosterone. *Is J Physiol Endocrin Metabol*, 274:1373-1379.

Bonanno JA 1991 K^+-H^+ exchange, a fundamental cell acidifier in corneal epithelium. *Am J Physiol*, 260:C618-C625.

Bond GH und Hudgins PM 1975 Inhibition of human red cell Na^+/K^+ -ATPase by magnesium and potassium. *Biochem Biophys Res Commun*, 66:645-650.

- Bookchin RM und Lew VL** 1980 Progressive inhibition of the Ca^{2+} pump and $\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ exchange in sickle red cells. *Nature*, 284:561-563.
- Boron WF** 1989 Cellular buffering and intracellular pH in the regulation of acid base balance, Herausgeber: D.W. Seldin und G. Giebisch. Raven Press, New York 33-56.
- Brierley GP, Baysal K und Jung DW** 1994 Cation transport systems in mitochondria: Na^+ and K^+ uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomem*, 26:519-526.
- Brugnara C, Ha TV und Tosteson CC** 1989 Role of chloride in potassium transport through a K-Cl cotransport system in human red blood cells. *Am J Physiol*, 256:C994-C1003.
- Cala PM** 1980 Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ionflux pathways. *J Gen Physiol*, 76:683-708.
- Cala PM** 1983 Cell volume regulation by *Amphiuma* red blood cells. The role of Ca^{2+} as a modulator of alkali metal/ H^+ exchange. *J Gen Physiol*, 82:761-784.
- Canessa M, Bize I, Adragna N und Tosteson DC** 1982 Cotransport of lithium and potassium in human red cells. *J Gen Physiol*, 80:149-168.
- Canessa M, Spalvins A und Nagel RL** 1986 Volume-dependent and NEM-Stimulated K^+ , Cl^- transport is elevated in oxygenated SS, SC, and CC human red cells. *FEBS Lett*, 200:197-202.
- Carafoli E** 1992 The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol Chem*, 267:2115-2118.
- Carafoli E** 1997 Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res Cardiol* 92, suppl 1:59-61.
- Chi Y, Mo S und Freitas DM** 1996 Na^+-H^+ and Na^+-Li^+ exchange are mediated by the same membrane transport protein in human red blood cells: An NMR investigation. *Biochemistry*, 35:12433-12442.
- Chipperfield A** 1986 The ($\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$) cotransport system. *Clin Sci*, 71:465-476.
- Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K und Wehling M** 1995 Rapid effect of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 25:117-123.
- Christ M und Wehling M** 1999 Rapid action of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids*, 64:35-41.

- Christophersen P und Bennekou P** 1991 Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1065:103-106.
- Clark A und Carafoli E** 1983 The stoichiometry of the Ca^{2+} pumping ATPase of erythrocytes. *Cell Calcium*, 4:83-88.
- Clark JD und Limbird LE** 1991 Na^+ - H^+ exchanger subtypes: a predictive review. *Am J Physiol*, 261:C945-C953.
- Clinton HJ, Rettig RK, Jiang M und Franco RS** 2004 KCl cotransport mediates abnormal, aulphydryl-dependent volume regulation in sickle reticulocytes. *Blood*, 104(9):2954-2960.
- Connel JMC und Davies E** 2005 The new biology of aldosterone. *J Endocrin*, 186:1-20.
- Dagher G und Lew VL** 1988 Maximal calcium extrusion capacity and stoichiometry of the human red cell calcium pump. *J Physiol*, 407:569-586.
- Dalmark M** 1975 Chloride and water distribution in human red cells. *J Physiol*, 250:65-84.
- Davson H** 1939 Studies on the permeability of erythrocytes. VI. The effect of reducing the salt content of the medium surrounding the cell. *Biochem J*, 33:389-401.
- Deitmer JW und Schild D** 2000 Ca^{2+} und pH. Spektrum Akademischer Verlag.
- Demaurex N, Orlowski J, Brisseau G, Woodside M und Grinstein S** 1995 The mammalian Na^+/H^+ antiporters NHE-1, NHE-2, and NHE-3 are electroneutral and voltage independent, but can couple to an H^+ conductance. *J Gen Physiol*, 106:85-111.
- Denner K** 1993 Untersuchungen zum Ouabain- und Furosemid-insensitiven Transport von Natrium- und Kaliumionen an Humanerythrozyten. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Denner K, Heinrich R und Bernhardt I** 1993 Carrier-mediated residual K^+ and Na^+ transport of human red blood cells. *J Membrane Biol*, 132:137-145.
- Desai SA, Schlesinger PH und Krogstad DJ** 1991 Physiologic rate of carrier-mediated Ca^{2+} entry matches active extrusion in human erythrocytes. *J Gen Physiol*, 98:349-364.

- Deuticke B** 2003 Membrane lipids and proteins as a basis of red cell shape and its alterations. In: Red cell membrane transport in health and disease (Bernhardt I, Ellory JC, Eds), Springer Verlag.
- Deuticke B, Grebe R und Haest CWM** 1990 Action of drugs on the erythrocyte membrane. In Blood Cell Biochemistry, Harris JR., Herausgeber, Erythroid cells, Vol. 1, p. 475-529, New York: Plenum Press.
- Doolan CM, O'Sullivan GC und Harvey BJ** 1998 Rapid effects of corticosteroids on cytosolic protein kinase C and intracellular calcium concentration in human distal colon. *Mol Cell Endocrinol*, 138:71-79.
- Duhm J** 1987 Furosemide-sensitive $K^+(Rb^+)$ transport in human erythrocytes: Modes of operation, dependence on extracellular Na^+ , kinetics, pH dependency and the effect of cell volume and N-ethylmaleimide. *J Membrane Biol*, 98:15-32.
- Duhm J und Becker BF** 1977a Studies on the lithium transport across the red cell membrane. II. Characterization of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive Li^+ transport. Effects of bicarbonate and dipyridamole. *Pflügers Arch*, 367:211-219.
- Duhm J und Becker BF** 1977b Studies on the lithium transport across the red cell membrane. III. Factors contributing to the intraindividual variability of the in vitro Li^+ distribution across the human red cell membrane. *Pflügers Arch*, 368:203-208.
- Duhm J, Eisenried F, Becker BF und Greil W** 1976 Studies on the lithium transport across the red cell membrane. I. Li^+ uphill transport by the Na^+ -dependent Li^+ counter-transport system of human erythrocytes. *Pflügers Arch*, 364:147-155.
- Dunham PB und Ellory JC** 1981 Passive potassium transport in low potassium sheep red cells: Dependence upon cell volume and chloride. *J Physiol*, 318:511-530.
- Dunn MJ** 1974 Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology. *Biochim Biophys Acta*, 352:97-116.
- Ebata S, Muto S, Okada K, Nemoto J, Amemiya M, Saito T und Asano Y** 1999 Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney International*, 56:1400-1412.
- Edinger RS, Rokaw MD und Johnson JP** 1999 Vasopressin stimulates sodium transport in A6 cells via a phosphatidylinositide3-kinase-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 277:F575-F579.

- Eisen C, Meyer C, Christ M, Theisen K und Wehling M** 1994 Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell Mol Biol*, 40:351-358.
- Ellery JC und Young JD** 1982 Red cell membranes a methodological approach, Academic press, London.
- Escobales N und Canessa M** 1986 Amiloride-sensitive Na⁺ transport in human red cells: Evidence for a Na⁺/H⁺ exchange system. *J Membrane Biol*, 90:21-28.
- Etzion Z, Tiffert T, Bookchin RM und Lew VL** 1993 Effects of deoxygenation on active and passive Ca²⁺ transport and on the cytoplasmic Ca²⁺ levels of sickle cell anemia red cells. *J Clin Invest*, 92:2489-2498.
- Fairbanks GL, Steck TL und Wallach DFH** 1971 Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10:2606-2617.
- Falkenstein E, Norman AJ und Wehling M** 2000 Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2072-2075.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M und Wehling M** 2000 Multiple action of steroid hormones - focused on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52:513- 556.
- Féray FC und Garay R** 1986 An Na⁺ stimulated Mg²⁺ transport system in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta*, 856:76-84.
- Féray FC und Garay R** 1987 A one-to-one Mg²⁺:Mn²⁺ exchange in rat erythrocytes. *J Biol Chem*, 262:5763-5768.
- Féray FC und Garay R** 1988. Demonstration of a Na⁺:Mg²⁺ exchange in human red cells by its sensitivity to tricyclic antidepressant drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 338:332-337.
- Ferreira HG und Lew VL** 1976 Use of ionophore A23187 to measure cytoplasmic Ca²⁺ buffering and activation of the Ca²⁺ pump by internal Ca²⁺. *Nature*, 259:47-49.
- Ferreira HG und Lew VL** 1977 Passive Ca²⁺ transport and cytoplasmic Ca²⁺ buffering in intact red cells. In: Ellory JC, Lew VL (eds) *Membrane transport in red cells*. Academic Press, London, 53-91.
- Fievet B, Guizouarn H, Pellissier B, Garcia-Romeu F und Motais R** 1993 Evidence for a K⁺-H⁺ exchange in trout red blood cells. *J Physiol*, 462:597-607.

- Flatman PW und Lew VL** 1977 Use of ionophore A23187 to measure and to control free and bound cytoplasmic Mg^{2+} in intact red cells. *Nature*, 267:360-362.
- Friedman SM und Friedman CL** 1958 Effect of aldosterone and hydrocortisone on sodium in red cells. *Experientia*, 14:452-455.
- Fröhlich O und Gunn RB** 1986 Erythrocyte anion transport: The kinetics of a single-site obligatory exchange system. *Biochim Biophys Acta*, 864:169-194.
- Funder J und Wieth JO** 1966 Chloride and hydrogen distribution between human red cells and plasma. *Acta Physiol Scand*, 68:234-245.
- Funder J und Wieth JO** 1967 Effect of Ouabain on glucose metabolism and fluxes of sodium and potassium of human blood cells. *Acta Physiol. Scand*, 71:113-124.
- Funder J und Wieth JO** 1980 Passive cation transport by ion pair formation. In *Membrane Transport in Erythrocytes* (eds. Lassen UV, Ussing HH und Wieth JO), pp. 520-527. Munksgaard, Copenhagen.
- Gardoš G** 1958 The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 30:653-654.
- Garrahan PJ und Glynn IM** 1967a The behavior of the sodium pump in red cells in the absence of external potassium. *J Physiol*, 192:159-174.
- Garrahan PJ und Glynn IM** 1967b The sensitivity of the sodium pump to external sodium. *J Physiol*, 192:175-188.
- Garrahan PJ und Glynn IM** 1967c Factors affecting the relative magnitudes of the sodium-potassium and sodium-sodium exchanges catalyzed by the sodium pump. *J Physiol*, 192:189-216.
- Garrahan PJ und Glynn IM** 1967d The stoichiometry of the sodium pump. *J Physiol*, 192:217-235.
- Gary-Bobo CM und Solomon AK** 1968 Properties of hemoglobin solutions in red cells. *J Gen Physiol*, 52:825-853.
- Geering K, Beguin P, Garty H, Karlisch SJ, Fuzesi M, Horisberger JD und Cramber G** 2003 FXFD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na, K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci*, 986:444-448.
- Gekle M, Freudinger R, Mildenerger R, Schenk, Marschitz I und Schramek H** 2001 Rapid activation of Na^+/H^+ exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinases ERK1/2. *Pflügers Archiv*, 441:781- 786.

- Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H und Silbernagl S** 1996 Rapid activation of Na^+/H^+ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. Proc Natl Acad Sci USA, 93:10500-10504.
- Gerthsen C und Vogel H** 1993 Physik. 17. Aufl, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Glynn IM** 1957 The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J Physiol, 136(1):148-73.
- Glynn IM und Karlish SJD** 1976 The sodium pump. Ann Rev Physiol, 37:13-55.
- Godart H und Ellory JC** 1996 KCl cotransport activation in human erythrocytes by high hydrostatic pressure. J Physiol, 491:423-434.
- Grinstein S und Wieczorek H** 1994 Cation antiports of animal plasma membranes. J Exp Biol, 196:307-318.
- Gudernatsch JG** 1912 Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. Arch Entwicklungsmech Org. 35, 457.
- Günther I und Vormann J** 1985 Mg^{2+} efflux is accomplished by an amiloride sensitive $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ antiport. Biochem Biophys Res Commun, 130:540-545.
- Haest CWM** 2003 Distribution and movement of membrane lipids. In: red cell membrane transport in health and disease (Bernhardt I, Ellory JC, Eds.), Springer Verlag.
- Hannaert PA und Garay RP** 1986 A kinetic analysis of Na-Li countertransport in human red blood cells. J Gen Physiol, 87:353-368.
- Hardman T und Lant A** 1996 Reply: Sodium-lithium countertransport: The dual modality hypothesis. J Hypertens, 14:1153-1154.
- Harris EJ und Maizels M** 1952 Distribution of ions in suspensions of human erythrocytes. J Physiol, 118:40-53.
- Harrison DG und Long C** 1968 The calcium content of human erythrocytes. J Physiol, 199:367-381.
- Harvey BJ, Condliffe S und Doolan CM** 2001 Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. New Physiology Science, 16:174-177.
- Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Gunther A, Herbst C, Christ M und Wehling M** 1999 Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralcorticoid-receptor-knockout mice. Biochem biophys Res Commun, 266: 257-261.

- Hladky SB und Rink TJ** 1977 pH equilibrium across the red cell membrane. In Membrane transport in red cells. Herausgeber: JC Ellory und VL Lew. Academic Press, New York, 115-135.
- Hoffman JF** 1986 Active transport of Na⁺ and K⁺ by red blood cells. In membrane transport disorders, (eds. Andreoli T, Hoffman JF, Schultz SG, Fanestil DD), pp. 221-234. Plenum Press, New York.
- Hoffman JF und Larris PC** 1974 Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of the fluorescent probe. J Physiol, 239:519-552.
- Hoffman JF, Yingst DR, Goldinger JM, Blum RM und Knauf PA** 1980 On the mechanism of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in human red blood cells. In membrane transport in erythrocytes, (eds. Lassen UV, Ussing HH und Wieth JO), pp. 520-527. Munksgaard, Copenhagen.
- Ihrig I, Hessel E, Seidler G, Erdmann A und Bernhardt I** 1991 Investigation of monovalent cation fluxes of diamide-treated human erythrocytes in solutions of different ionic strength. Biochem Biophys Acta, 1096:171-174.
- Jennings ML** 1989 Structure and function of the red blood cell anion transport protein. Ann Rev Biophys Biophys Chem, 18:397-430.
- Jennings ML und Al-Rohil N** 1990 Kinetics of activation and inactivation of swelling-stimulated K⁺/Cl⁻ transport. The volume-sensitive parameter is the rate constant for inactivation. J Gen Physiol, 95:1021.
- Jiang G, Cobbs S, Klein JD und O'Neill Ch** 2003 Aldosterone regulates the Na-K-2Cl Cotransporter in vascular smooth muscle. Hypertension, 41:1131-1135.
- Jones GS und Knauf PA** 1985 Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media. Involvement of the anion transport protein capnophorin. J Gen Physiol, 86:721-738.
- Kaestner L und Bernhardt I** 2002 Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. Bioelectrochem, 55:71-74.
- Kaestner L, Christophersen P, Bernhardt I und Bennekou P** 2000 The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: Reconciliation between two conflicting reports and further characterization. Bioelectrochem, 52:117-125.

- Kaestner L, Tabellion W, Lipp P und Bernhardt I** 2004 Prostaglandin E2 activates channel-activated calcium entry in human erythrocytes: An indicator for a blood clot formation process. *Thromb Haemost*, 92:1269-1272.
- Kaestner L, Tabellion W, Weiss E, Bernhardt I und Lipp P** 2006 Calcium imaging of individual erythrocytes: problems and approaches. *Cell Calcium*, 39:13-19.
- Karin M** 1998 New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell*, 93:487-490.
- Klein K und Henk W** 1963 Klinisch-experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Aldosteron auf Hämodynamik und Gerinnung. *Z Kreisf Forsch*, 52:40-53.
- Klingel K und Loffing J** 2002 Impaired renal Na⁺ retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest*, 110:1263-1268.
- Knauf PA** 1979 Erythrocyte anion exchange and the band 3 protein: Transport kinetics and molecular structure. *Current topics membrane transport*, 12:249-363.
- Koepfel H, Christ M, Yard BA, Baer PC, van der Woude FJ und Wehling M** 2003 Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3):1297-1302.
- Kosk-Kosicka D und Bzdega T** 1988 Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J Biol Chem*, 263:18184-18189.
- Kosk-Kosicka D, Bzdega T und Johnson JD** 1990 Fluorescence studies on calmodulin binding to erythrocyte Ca²⁺-ATPase in different oligomerization states. *Biochemistry*, 29:1875-1879.
- Krug AW, Schuster C, Gassner B, Freudinger R, Mildenerger S, Troppmair J, und Gekle M** 2002 Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling *J Biol Chem*, 277:45892- 45897.
- Kummerow D** 1999 Der experimentelle Nachweis eines K⁺(Na⁺)/H⁺-Austausches an der Membran von Humanerythrozyten. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kummerow D, Hamann J, Browning JA, Wilkins R, Ellory JC und Bernhardt I** 2000 Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K⁺(Na⁺)/H⁺ exchange under low ionic strength conditions. *J Membrane Biol*, 176:207-216.

- LaCelle PI und Rothstein A** 1966 The passive permeability of red blood cells to cations. *J Gen Physiol*, 50:171-188.
- Lambeth JD, Seybert DW, Lankaster JR Jr., Salerno JC & Kamin H** 1982 Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Molec Cell Biochem*, 45:13-31.
- Lassen UV** 1977 Electrical potential and conductance of the red cell membrane. In *Membrane transport in red cells*. Herausgeber: JC Ellory und VL Lew. Academic Press, New York, 137-172.
- Lauf PK** 1985 $K^+ : Cl^-$ cotransport: Sulfhydryls, divalent cations, and the mechanism of volume activation in a red cell. *J Membrane Biol*, 88:1-13.
- Lauf PK, McManus TJ, Haas M, Forbush B, Duhm J, Flatman PW, Saier HM und Russel JM** 1987 Physiology and biophysics of chloride and cation cotransport across cell membranes. *Fed Proc*, 46:2377-2394.
- Lew VL** 1971 On the ATP dependence of the Ca^{2+} -induced increase in K^+ permeability observed in human red cells. *Biochim Biophys Acta*, 233:827-830.
- Lew VL und Brown AM** 1979 Experimental control and assessment of free and bound calcium in the cytoplasm of intact mammalian red cells. In: Ashley CC, Campbell AK (eds) *Detection and measurement of free Ca in cells*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp 423-432.
- Lew VL und Ferreira HG** 1978 Calcium transport and the properties of a calcium-activated potassium channel in red cell membranes. In: Kleinzeller A, Bronner F (eds) *Current Topics in Membranes and Transport*, vol 10. Academic Press, New York, 217-277.
- Lew VL und García-Sancho J** 1989 Measurement and control of intracellular calcium in intact red cells. In: Fleischer S, Fleischer B (eds) *Methods in enzymology*, vol 173, Biomembranes, part T: Cellular and subcellular transport: Eukaryotic (nonepithelial) cells. Academic Press, San Diego, pp 100-112.
- Lew VL und Simonsen LO** 1980 Ionophore A23187-induced calcium permeability of intact human red blood cells. *J Physiol*, 308:60P.
- Lew VL, Tsien RY, Miner C und Bookchin RM** 1982 Physiological $[Ca^{2+}]_i$ level and pump-leak turnover in intact red cells measured using an incorporated Ca^{2+} chelator. *Nature*, 298:478-481.

- Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A und Low PS** 1996 Prostaglandin E2 stimulates a Ca^{2+} -dependent K^+ -channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J Biol Chem*, 271:18651-18656.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A und Miller WL** 1995 Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenic. *Science*, 267:1828-1831.
- Lösel R und Weling M** 2003 Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:46–56.
- Lüdi H und Schatzmann HJ** 1987 Some properties of a system for sodium-dependent outward movement of magnesium from metabolizing human red blood cells. *J Physiol*, 390:367-382.
- Maguire D, MacNamara B, Cuff JE, Winter D, Doolan CM, Urbach V, O'Sullivan GC und Harvey BJ** 1999 Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids*, 64:51-63.
- Maher AD und Kuchel PW** 2003 The Gardoš channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^+ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(8):1182-97.
- Maldonado HM** 1992 Na^+/H^+ and K^+/H^+ Exchangers in *Amphiuma* Erythrocyte. PHD-Thesis, University of California, Davis.
- Mastroberardino L, Spindeler B, Foster I, Loffing J, Assandri R, May A und Verrey F** 1998 Ras pathway activates epithelial Na^+ channel and decreases its surface expression in *Xenopus oocytes*. *Molec cell biochem*, 9:3417-3427.
- McManus TJ** 1978 Ion and co-ion transport in avian red cells. *Membrane Transp. Processes*, 1:79-106.
- McManus TJ** 1987 $\text{Na},\text{K},2\text{Cl}$ cotransport: kinetics and mechanism. *Fed Proc*, 46:2378.
- Miyata Y, Muto Sh und Kusano E** 2005 Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. *J Hypertension*, 23:2237-2250.
- Muallem S, Miner C und Seymour CA** 1985 The nature of the Ca^{2+} pump defect in the red blood cells of patients with cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 819:143-147.

- Nakashima RA und Garlid KD** 1982 Quinine inhibition of Na⁺ and K⁺ transport provides evidence for two cation / H⁺ exchangers in rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 257:9252-9254.
- Naray-Ferjes-Toth A und Fejes-Toth G** 2000 The *sgk*, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, results in the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 57:1290-1294.
- Naumer H und Heller W** 1990 *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. 2. Aufl, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ngarmukos C und Grekin RJ** 2001 Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Endocrin Metab*, 281:E1122-E1127.
- Oberleithner H, Schillers H, Pagel P und Schneider SW** 2000 Aldosterone and nuclear volume cycling. *Cell Phys Biochem*, 10:429-434.
- Oberleithner H, Weigt M, Westphale HJ und Wang W** 1987 Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange and raises cytoplasmic pH in target cells of the amphibian kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1464-1468.
- Ogishima T, Suzuki H, Hata J, Mitani F und Ishimura Y** 1992 Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology*, 130:2971-2977.
- Parker JC** 1986 Interactions of lithium and protons with the sodium-proton exchanger of dog red blood cells. *J Gen Physiol*, 87:189-200.
- Passow H** 1986 Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 103:61-203.
- Pauling L, Itano H, Singer S und Wells I** 1949 Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110:543-548.
- Pearce D** 2001 The Role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends endocrinol metab*, 12:341-347.
- Pressman BC** 1976 Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem*, 45: 501-530.
- Rega AF und Garrahan PJ** 1986 *The Ca²⁺ pump of plasma membranes*. CRC Press, Boca Raton.
- Richter S, Hamann J, Kummerow D und Bernhardt I** 1996 Modelling of "leak" cation fluxes across red blood cell membranes. *J Gen Physiol*, 108:16a.

- Richter S, Hamann J, Kummerow D und Bernhardt I** 1997 The monovalent cation "leak" transport in human erythrocytes: An electroneutral exchange process. *Biophys J*, 73:733-745.
- Sato A, Liu JP und Funder JW** 1997 Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology*, 138:3410-3416.
- Schaefer C, Shahin V, Albermann L, Schillers H, Hug MJ und Oberleithner** 2003 Intracellular Calcium: Aprerequisite for aldosterone action. *J Mem Biol*, 196:157-162.
- Schatzmann JJ** 1953 Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natrium-Transport durch die Erythrozytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 11:346.
- Schatzmann JJ** 1966 ATP-dependent Ca^{2+} -extrusion from human red cells. *Experientia*, 22:364-365.
- Schatzmann HJ** 1973 Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. *J Physiol*, 235:551-569.
- Schatzmann HJ** 1982 The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. In: Carafoli E (ed) *Membrane transport of calcium*. Academic Press, London, 41-108.
- Schatzmann HJ und Vincenzi FF** 1969 Calcium movements across the membrane of human red cells. *J Physiol*, 201:369-395.
- Schinzawa K, Ishibashi S, Murokoshi M, Watanabe K, Kominami S, Kawahara A und Takemori S** 1988 Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450 (P-450(17)alpha, lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. *J Endocrin*, 119:191-200.
- Schmidt BM, Montealegre A, Janson CP, Martin N, Stein-Kemmesies C, Scherhag A, Feuring M, Christ M und Wehling M** 1999 Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J Clin Endocrin Metabol*, 4:3528-3533.
- Schwarz W und Passow H** 1983 Ca^{2+} -activated K^+ channels in erythrocytes and excitable cells. *Ann Rev Physiol*, 45:359-374.
- Selye H** 1942 Correlations between the chemical structures and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology*, 30:437-453.

- Sen AK und Post RL** 1964 Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. *J Biol Chem*, 239:345-352.
- Siebens AW und Kregenow FM** 1996 Volume-regulatory responses of *Amphiuma* red cells in anisotonic media. The effect of amiloride. *J Gen Physiol*, 86:527-564.
- Siffert W und Busch S** 1996 Sodium-lithium countertransport. *J Hypertens*, 14:1153-1154.
- Siggaard-Anderson O und Salling M** 1971 Oxygen-linked hydrogen ion binding of human hemoglobin. Effects of carbon dioxide and 2,3-Diphosphoglycerate. *Scand J Clin Lab Invest*, 27:351-366.
- Simons TJB** 1974 Potassium:potassium exchange catalysed by the sodium pump in human red cells. *J Physiol*, 237:123-155.
- Simonsen LO, Gomme J und Lew VL** 1982 Uniform ionophore A23187 distribution and cytoplasmic calcium buffering in intact human red cells. *Biochim Biophys Acta*, 692:431-440
- Simonsen LO und Lew VL** 1980 The correlation between ionophore A23187 content and calcium permeability of ATP-depleted human red blood cells. In: Lassen UV, Ussing HH, Wieth JO (eds) *Membrane transport in erythrocytes*. Munksgaard, Copenhagen, pp 208-212.
- Singer SJ und Nicolson GL** 1974 The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720-731.
- Sprach C und Streeten DH** 1964 Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentration of aldosterone, *in vitro*. *J Clin Invest*, 43: 217-227.
- Starke LC** 1989 Regulation of Na/K/2Cl and KCl cotransport in Duck Red Cells. PHD-Thesis, Duke University, Durham; USA.
- Stern N, Beck F, Sowers J** 1983 Effect of aldosterone on the human erythrocyte sodium-potassium pump *in vitro*. *Clin Science*, 64:183-6.
- Stocco DM** 2001a StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiol*, 63:193-213.
- Stocco DM** 2001b Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Molec Endocrin*, 15:1245-1254.

- Stockand JD** 2002 New ideas about aldosterone signalling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282:F559-F576.
- Stockand JD, Booth RE und Johnson JP** 2002 Aldosterone. *Adv Physiol Edic*, 26(1-4):8-20.
- Stockand JD und Meszaros JD** 2003 Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activation Ki-RasA and MERK $\frac{1}{2}$ signalling. *Am J Physiol Heart and Circul Physiol*, 284:H176-H184.
- Tiffert T, Etzion Z, Bookchin RM und Lew VL** 1993 Effects of deoxygenation on active and passive Ca $^{2+}$ transport and cytoplasmic Ca $^{2+}$ buffering in normal human red cells. *J Physiol*, 464:529-544.
- Tiffert T und Lew VL** 2001 Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium*, 30:337-342.
- Tosteson DC und Hoffman JF** 1960 Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells, *J Gen Physiol*, 44:169-194.
- Tremblay A, Parker KL und Lehoux JG** 1992 Dietary potassium supplementation and sodium restriction stimulate aldosterone synthase but not 11 β -hydroxylase-P-450 messenger ribonucleic acid accumulation in rat adrenals and require angiotensin-II production. *Endocrinology*, 130:3152-3158.
- Tsien RY** 1981 A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290:527-528.
- Verrey F** 1998 Early aldosterone effects. *Exp Nephrol*, 6:294-301.
- Wang KKW, Villalobo A und Roufogalis BD** 1992 The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter. *Trends in Cell Biol*, 2:46-52.
- Wehling M, Bauer MM, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon CB und Christ M** 1996 Nongenomic effects of aldosterone on intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 223:181-186.
- Wehling M, Kasmayr J und Theisen K** 1991 Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 260:E719-E726.
- Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A und Funder JW** 1995 Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca $^{2+}$ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 76:973-979.

- Wehling M, Spes Ch, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K und Christ M** 1998 Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:3517-3522.
- Weiss E** 2001 Der Einfluss des Transmembranpotentials auf den K^+ -Rast-Transport an humanen Erythrozyten, Diplomarbeit Humboldt-Universität zu Berlin.
- Weiss E, Lang HJ und Bernhardt I** 2004 Inhibitors of the $K^+(Na^+)/H^+$ exchanger of human red blood cells. *Bioelectrochem*, 62:135-140.
- White PC** 1994 Disorders of aldosterone biosynthesis and action. Review article. *N Engl J Med*, 331:250-258.
- Whittam R und Ager ME** 1965 Vectorial aspects of adenosine-triphosphatase activity in erythrocyte membranes. *Biochem J*, 93(2):337-348.
- Whittam R und Chipperfield AR** 1975 The reaction mechanism of the sodium pump. *Biochim Biophys Acta*, 415:149-171.
- Wieth JO, Brahm J und Funder J** 1980 Transport and interactions of anions and protons in the red blood cell membrane. *Ann NY Acad Sci*, 341:394-418.
- Wilbrandt W** 1940 Die Ionenpermeabilität der Erythrozyten in Nichtleiterlösungen. *Pflügers Archiv*, 242:537-556.
- Wilbrandt W und Schatzmann HJ** 1960 Changes in the passive cation permeability of erythrocytes in low electrolyte media. Ciba Foundation Study Group, 5:34-52.
- Wiley JS und Cooper RA** 1974 A furosemide-sensitive cotransport of sodium plus potassium in the human red cell. *J Clin Invest*, 53:745-755.
- Wirth M, Piana C, Güll I, Gerbes S, Gerdes R, Mills C, Samitier J und Gabor F** 2006 Influence of nanostructured surfaces on vitality and differentiation of Caco-2 cells. To be submitted to *Biomaterials* after by the CellProm Consortium.
- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Young M und Funder JW** 2000 Aldosterone and the heart. *Trends Endocrin Metabol*, 11:224-226.
- Zhou ZH und Buben JK** 2001 Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281:C1118-C1130.

7. Danksagung

Ich möchte mich allen voran bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ingolf Bernhardt bedanken. Zunächst für die Überlassung des Themas, aber auch für seine Unterstützung. In Hinblick auf die Gestaltung des Themas konnte ich mit ihm zahlreiche anstrengende und gewinnbringende Diskussionen führen. In der Zeit, die er mir widmete, lernte ich besonders seine Motivations- und Begeisterungsfähigkeit, und auch seine Offenheit zu schätzen.

Herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Rolf W. Hartmann für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Thomas Betz für die zahlreiche Diskussionen und die fachspezifische Korrektur dieser Arbeit. Weiterhin danke ich auch meinem Kollegen Erwin Weiß und Aravind Pasula für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die hilfreiche Unterstützung während der praktischen Untersuchungen im Labor.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei dem ständigen Mitarbeiter des Labors, Herrn Jörg Riedel und den temporären Mitarbeiter des Lehrstuhls, Herr Michael R. Müller, Frau Olga Kofanova und Wiebke Tabellion.

Bei meiner Mutter Frau Dipl.-Ing. Nadya Ivanova und meinem Lebensgefährten Herrn Dipl.-Ing. (FH) Thomas Motsch bedanke ich mich für die moralische und materiale Unterstützung und Zuversicht, die mir das Selbstvertrauen gegeben hat und somit eine wichtige Lebenserfahrung ermöglicht.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt zu haben. Ich habe keine unerlaubten sowie unerwähnten Hilfen benutzt.

Saarbrücken, den 12.12.2006