

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

**pH-Regulation und Glukosestoffwechsel:
Wirkung von Glut1-Überexpression, Serum und
Dexamethason auf den zytosolischen pH**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Matthias M. Müller

aus Kiel

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	GLUKOSEMETABOLISMUS	2
1.2	INTRAZELLULÄRE PH-WERT REGULATION	5
1.3	DIABETISCHE NEPHROPATHIE	7
1.4	GLUKOKORTIKOIDE	8
1.5	FRAGESTELLUNG	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	12
2.1.1	<i>Chemische Substanzen</i>	12
2.1.2	<i>Perfusions-Lösungen</i>	14
2.2	GERÄTE UND SET-UP	22
2.2.1	<i>Eingesetzte Geräte</i>	22
2.2.2	<i>Perfusionssystem</i>	22
2.3	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	24
2.3.1	<i>Allgemeiner Überblick über die Fluoreszenzmikroskopie</i>	24
2.3.2	<i>Intrazelluläre H⁺-Ionen-Konzentrations-Messung</i>	25
2.3.3	<i>Ansäuerung der Zellen</i>	28
2.4	ZELLKULTUR	29
2.4.1	<i>Glut1-Zellen und LacZ-Zellen:</i>	29
2.4.2	<i>Jurkat-T-Lymphozyten</i>	29
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	PH _i -WERT IN GLUT1 UND LACZ-ZELLEN	32
3.2	NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION	36
3.3	NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION UNTER H ⁺ -ATPASE-HEMMUNG MIT BAFILOMYCIN	40
3.4	NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION	43
3.5	NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION UNTER NATRIUM-PROTONEN-AUSTAUSCHER- HEMMUNG MIT 5'(N-ETHYL-N-ISOPROPYL)AMILORID (EIPA)	49
3.6	PH _i -WERT-REGULATION IN ANWESENHEIT VON BIKARBONAT	54
3.7	LAKTAT-ABHÄNGIGE ZYTOSOLISCHE AZIDIFIZIERUNG	59
3.7.1	<i>Gekoppelter Laktat/Protonen-Transport in Glut1- und LacZ-Zellen</i>	59

3.7.2	<i>Kinetik und pharmakologische Hemmung des gekoppelten Laktat/Protonen-Transport</i>	63
3.8	pH_i -WERT-REGULATION IN JURKAT-T-LYMPHOZYTEN UNTER DEXAMETHASON	70
3.8.1	<i>Ausgangs-pH_i-Wert in Jurkat-T-Lymphozyten unter Dexamethason</i>	70
3.8.2	<i>Natrium-unabhängige pH_i-Wert-Regulation in Jurkat-Zellen</i>	71
3.8.3	<i>Natrium-abhängige pH_i-Wert-Regulation in Jurkat-Zellen</i>	75
4	DISKUSSION	77
4.1	GLUKOSETRANSPORTER	78
4.2	NATRIUM/PROTONEN-AUSTAUSCHER (NHE)	80
4.3	H^+ -ATPASEN	82
4.4	MONOCARBOXYLATTRANSPORTER	83
4.5	DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE	85
4.5.1	<i>Glut1- und LacZ-Zellen</i>	85
4.5.2	<i>Jurkat-T-Lyphozyten</i>	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	LITERATURVERZEICHNIS	90
7	DANKSAGUNG	100
8	LEBENS LAUF	101

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: GLUKOSEMETABOLISMUS	4
ABBILDUNG 2-1: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES INVERTFLUORESCENZMIKROSKOPS:	23
ABBILDUNG 2-2: EXCITATIONS-SPEKTRUM VON BCECF-AM	26
ABBILDUNG 2-3: STRUKTURFORMEL VON BCECF-AM (GEMISCH AUS DEN DREI ANGEGEBENEN VERBINDUNGEN)	27
ABBILDUNG 3-1: pH_i -AUSGANGSWERT IN GLUT1 UND LACZ-ZELLEN	34
ABBILDUNG 3-2: pH_i -WERT NACH 24H, 48H UND 72H	35
ABBILDUNG 3-3: ORIGINALAUFZEICHNUNG DER NATRIUM-UNABHÄNGIGEN pH_i -REGULATION NACH AMMONIUMCHLORID-PULS IN GLUT1 UND LACZ-ZELLEN	37
ABBILDUNG 3-4: NATRIUM-UNABHÄNGIGE pH_i -REGULATION	39
ABBILDUNG 3-5: H^+ -ATPASE-HEMMUNG MIT BAFILOMYCIN	41
ABBILDUNG 3-6: ORIGINALAUFZEICHNUNG DER NATRIUM-UNABHÄNGIGEN pH_i -REGULATION NACH BAFILOMYCIN-VORINKUBATION	42
ABBILDUNG 3-7: ORIGINALAUFZEICHNUNG DER NATRIUM-ABHÄNGIGEN pH_i -REGULATION IN GLUT1 UND LACZ OHNE AMMONIUMCHLORID-PULS	45
ABBILDUNG 3-8: ORIGINALAUFZEICHNUNG DER NATRIUM-ABHÄNGIGEN pH_i -REGULATION IN GLUT1 UND LACZ MIT AMMONIUMCHLORID-PULS	46
ABBILDUNG 3-9: NATRIUM-ABHÄNGIGE pH_i -REGULATION	47
ABBILDUNG 3-10: NATRIUM-ABHÄNGIGE pH_i -REGULATION NACH 24H, 48H UND 72H	48
ABBILDUNG 3-11: ORIGINALAUFZEICHNUNG DES Na^+/H^+ -AUSTAUSCHERS UNTER HEMMUNG MIT EIPA 2,0 μM IN GLUT1 UND LACZ	51
ABBILDUNG 3-12: NATRIUM-ABHÄNGIGE pH_i -WERT-REGULATION UNTER Na^+/H^+ -AUSTAUSCHER- HEMMUNG MIT EIPA 2,0 μM UND EIPA 0,1 μM	52
ABBILDUNG 3-13: Na^+/H^+ -AUSTAUSCHER-HEMMUNG MIT EIPA 2,0 μM UND EIPA 0,1 μM IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE (OHNE EIPA)	53
ABBILDUNG 3-14: NATRIUM-UNABHÄNGIGE pH_i -WERT-REGULATION IN ANWESENHEIT VON BIKARBONAT VERSUS HEPES	57
ABBILDUNG 3-15: NATRIUM-ABHÄNGIGE pH_i -WERT-REGULATION IN ANWESENHEIT VON BIKARBONAT ANSTATT HEPES	58
ABBILDUNG 3-16: ORIGINALAUFZEICHNUNG LAKTAT/PROTONEN-EINSTROM IN GLUT1 UND LACZ	61
ABBILDUNG 3-17: ZYTOSOLISCHE AZIDIFIZIERUNG DURCH NATRIUM-LAKTAT, NATRIUM-PYRUVAT UND TRIS-PYRUVAT	62
ABBILDUNG 3-18: DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG DES GEKOPPELTEN LAKTAT/PROTONEN- TRANSPORTSYSTEMS	67
ABBILDUNG 3-19: PHARMAKOLOGIE DER NATRIUM-LAKTAT-BEDINGTEN AZIDIFIZIERUNG IN GLUT1 UND LACZ	68

ABBILDUNG 3-20: WIRKUNG WEITERER SUBSTANZEN AUF DEN LAKTAT/PROTONEN-EINSTROM IN LACZ-ZELLEN.....	69
ABBILDUNG 3-21: AUSGANGS-PH _i -WERT IN JURKAT-T-LYMPHOZYTEN	73
ABBILDUNG 3-22: NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION IN JURKAT-ZELLEN.....	74
ABBILDUNG 3-23: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION IN JURKAT-ZELLEN.....	76

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2-1: LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNG VON SUBSTANZEN.....	12
TABELLE 2-2: LISTE DER VERWENDETEN SUBSTANZEN UND DEREN SUBSTANZGRUPPEN	13
TABELLE 2-3: STANDARD-LÖSUNG	16
TABELLE 2-4: AMMONIUMCHLORID/0-NATRIUM-LÖSUNG	16
TABELLE 2-5: NATRIUMFREIE LÖSUNG (0-NATRIUM).....	17
TABELLE 2-6: BIKARBONAT-GEPUFFERTE LÖSUNGEN	17
TABELLE 2-7: NATRIUM-LAKTAT STANDARDLÖSUNG.....	18
TABELLE 2-8: SACCHAROSE-LAKTAT-LSG, SORBITOL-LAKTAT-LSG, GLUKOSE-LAKTAT-LSG.....	18
TABELLE 2-9: 3-O-METHYLGLUCO-PYRANOSE-LAKTAT-LÖSUNG (O-M-GLUKOSE-LAKTAT), HARNSTOFF- LAKTAT-LÖSUNG.....	19
TABELLE 2-10: STANDARD-SACCHAROSE, STANDARD-SORBITOL, STANDARD-GLUKOSE.....	19
TABELLE 2-11: 3-O-METHYLGLUCO-PYRANOSE-STANDARD-LÖSUNG (O-M-GLUKOSE-STANDARD), HARNSTOFF –STANDARD-LÖSUNG.....	20
TABELLE 2-12: LAKTATKINETIK-LÖSUNGEN	20
TABELLE 2-13: PYRUVAT-LÖSUNG, TRIS-PYRUVAT-LÖSUNG.....	21
TABELLE 2-14: KALIUM-KALIBRIERUNGS-LÖSUNG:	21
TABELLE 3-1: AUSGANGS-PH _i -WERT, GESAMT	33
TABELLE 3-2: PH _i -WERT NACH 24H, 48H UND 72H	33
TABELLE 3-3: PH _i -WERT-VERÄNDERUNG DURCH AMMONIUMCHLORID-PULS.....	38
TABELLE 3-4: NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -REGULATION	38
TABELLE 3-5: H ⁺ -ATPASE-HEMMUNG MIT BAFILOMYCIN	40
TABELLE 3-6: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -REGULATION OHNE AMMONIUMCHLORID-PULS.....	44
TABELLE 3-7: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -REGULATION MIT AMMONIUMCHLORID-PULS	44
TABELLE 3-8 NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -REGULATION NACH 24H, 48H UND 72H	44
TABELLE 3-9: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION UNTER NA ⁺ /H ⁺ -AUSTAUSCHER-HEMMUNG MIT EIPA 2,0 μM UND EIPA 0,1 μM	50
TABELLE 3-10: NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -REGULATION IN ANWESENHEIT VON BIKARBONAT.....	55
TABELLE 3-11: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION IN ANWESENHEIT VON BIKARBONAT ...	56
TABELLE 3-12: NATRIUM-LAKTAT-EINSTROM IN GLUT1 UND LACZ	60
TABELLE 3-13: NA ⁺ -LAKTAT-, NA ⁺ -PYRUVAT- UND TRIS-PYRUVAT-INDUZIERT ZYTOSOLISCHE AZIDIFIZIERUNG IN LACZ-ZELLEN	60
TABELLE 3-14: AZIDIFIZIERUNGSGESCHWINDIGKEIT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER NATRIUM-LAKTAT- KONZENTRATION.....	65
TABELLE 3-15: PHARMAKOLOGIE DES LAKTAT/PROTONEN-TRANSPORTERS (SACCHAROSE, SORBITOL, HARNSTOFF) IN LACZ.....	65

TABELLE 3-16: PHARMAKOLOGIE DES LAKTAT/PROTONEN-TRANSPORTERS (GLUKOSE, O-M-GLUKOSE, 10 μ M PHLORETIN, 100 μ M PHLORETIN, P-CMBS) IN LACZ	66
TABELLE 3-17: PHARMAKOLOGIE DES LAKTAT/PROTONEN-TRANSPORTERS (KONTROLLE, SACCHAROSE, O-M-GLUKOSE, 100 μ M PHLORETIN, P-CMBS) IN GLUT1-ZELLEN	66
TABELLE 3-18: AUSGANGS-PH _i -WERT IN JURKAT-T-LYMPHOZYTEN	72
TABELLE 3-19: NATRIUM-UNABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION IN JURKAT-ZELLEN.....	72
TABELLE 3-20: NATRIUM-ABHÄNGIGE PH _i -WERT-REGULATION IN JURKAT-ZELLEN	75

1 Einleitung

1.1 Glukosemetabolismus

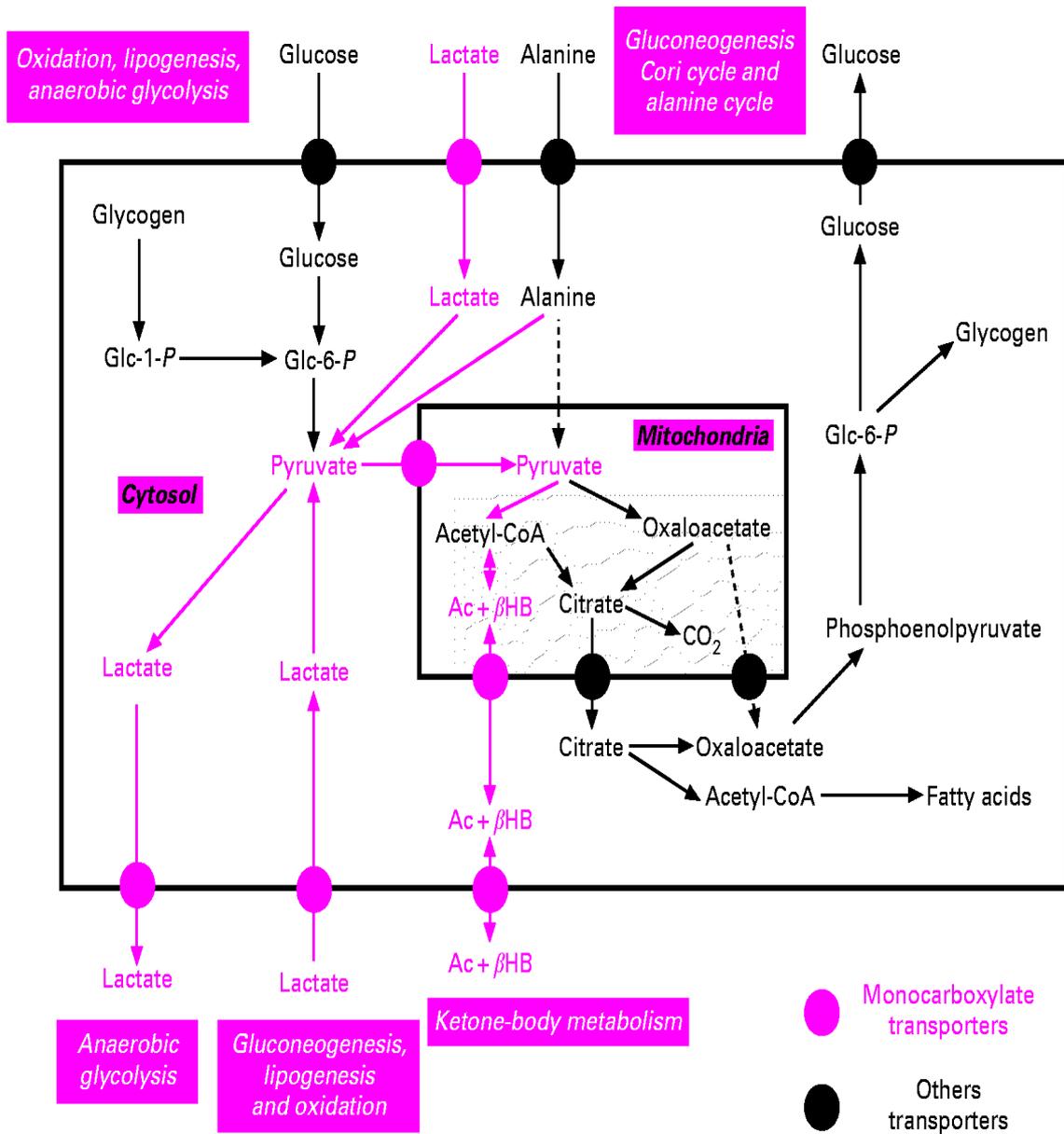
Die einzelne Zelle benötigt für die Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktionsbereitschaft eine bestimmte Energiemenge, die sie unter physiologischen Bedingungen durch den oxidativen Abbau von Nährstoffen gewinnt. Glukose stellt das wichtigste Substrat für die oxidative Energiegewinnung im Menschen dar. Durch Oxidation im Zitratzyklus entstehen neben GTP auch energiereiche Elektronen, deren Energie wiederum durch Enzyme der Atmungskette der Mitochondrien und oxidative Phosphorylierung zur Gewinnung von ATP verwendet werden kann. Der Energiegewinn pro Glukosemolekül ist dabei etwa 15-fach höher als bei der Glykolyse. Stoffwechselendprodukte dieser Oxidationsprozesse sind CO_2 , das abgeatmet werden kann und H_2O .

Im Zustand von Sauerstoffmangel (Hypoxie) oder Ischämie kommt es zur anaeroben Glykolyse. Die anaerobe Glykolyse führt zur Bildung von Laktat, einer Säure mit einem pK_a -Wert von 3,86, die daher bei physiologischem intrazellulären pH-Wert nahezu vollständig dissoziiert. Folglich führt die Produktion von Laktat im Verlauf der Glykolyse beiläufig zur Bildung von H^+ -Ionen. Laktat, als Endprodukt der Glykolyse, und andere Monocarboxylate spielen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel nahezu aller Zellen und Gewebearten. Einige Gewebearten (Nierenmark, weiße Skelettmuskulatur, Erythrozyten, Tumorzellen) nutzen die anaerobe Glykolyse physiologischerweise zur Produktion von ATP (Blomqvist *et al.*, 1994), andere Gewebe nur unter hypoxischen oder ischämischen Bedingungen. Glykolyse produziert zwei Laktatmoleküle aus je einem verbrauchten Glukosemolekül bei einem Nettoenergiegewinn von 2 ATP-Molekülen. Um hohe Glykolyseraten aufrecht erhalten zu können, benötigt die Zelle daher Mechanismen, mit denen sie die Stoffwechselendprodukte in den Extrazellulärraum transportieren kann, ohne dabei eine intrazelluläre Azidose zu bewirken. Zytosolische Azidose wiederum hemmt die Glykolyse über eine Hemmung der Phosphofruktokinase und würde ihrerseits eine Reduktion des möglichen Energiegewinns auf diesem Weg zur Folge haben (Abbildung 1-1). Weitere Gewebetypen (Gehirn,

Herzmuskel) verwenden Laktat zur Energiegewinnung via Glukoneogenese (Denton & Halestrap, 1979;Juel, 1997;Poole & Halestrap, 1993).

Die Anhäufung von H^+ -Ionen stellt eine bedeutende Herausforderung für die intrazelluläre pH-Wert Homöostase dar. Laktat kann, in seiner anionischen Form, die Zelle über unspezifische Anionenkanäle verlassen. Die zurückbleibenden H^+ -Ionen können eine intrazelluläre Azidose bewirken (Brown *et al.*, 1989a;Nilius *et al.*, 1998;Roy, 1995). Alternativ kann die Zelle Laktat im Kotransport mit H^+ -Ionen abgeben, wodurch beide Stoffwechselendprodukte im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 abgegeben werden können (Broer *et al.*, 1998;Carpenter & Halestrap, 1994;Dimmer *et al.*, 2000;Jackson & Halestrap, 1996;Pilegaard *et al.*, 1999). Die Transporter, die diesen Laktat/ H^+ -Ionen-Kotransport vermitteln sind die Monocarboxylattransporter der MCT-Familie (Halestrap & Price, 1999).

Abbildung 1-1: Glukosemetabolismus



1.2 Intrazelluläre pH-Wert Regulation

Die Struktur und Funktion fast aller Makromoleküle und Enzyme wird stark vom pH-Wert beeinflusst. Die meisten Proteine operieren bei einem ganz bestimmten pH-Wert optimal. Lysosomale Enzyme beispielsweise haben ihr Wirkoptimum bei einem niedrigen pH-Wert von etwa 5. Dagegen arbeiten die meisten zytosolischen Enzyme am besten bei einem eher neutralen pH von etwa 7,2 (wie er im Zytosol üblicherweise vorherrscht). Die Fähigkeit der Zelle, die eigene pH-Homöostase in Zytosol und Kompartimenten gewährleisten zu können, ist daher fundamental für das Überleben und Funktionieren der Zelle.

Im Zytosol kommt es ohne das Wirken von H^+ -Ionen-Transport-Mechanismen zu einer Azidose durch Einwärtsdiffusion oder Produktion von Protonen im Rahmen des Metabolismus der Zelle (siehe 1.1). In den meisten Zellen ist eine Vielzahl von Regulationsmechanismen in die pH-Regulation involviert. Zwei grundsätzliche Mechanismen sind existent. Einerseits der Auswärtstransport von Protonen, andererseits der Einwärtstransport von Bikarbonat zur Neutralisation von H^+ -Ionen im Zytosol (Soleimani & Burnham, 2001; Batlle *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1986; Hoffmann, 1982).

So verfügen nahezu alle Zellen über eine oder mehrere Isoformen des Natrium-getriebenen H^+ -Antiporters (Na^+/H^+ -Austauscher, NHE) in ihren Zellmembranen (Krapf, 1989; Bevensee *et al.*, 1999; Boyarsky *et al.*, 1990; Ganz *et al.*, 2000). Die Na^+/H^+ -Austauscher nutzen die Energie, die im Natriumkonzentrationsgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum gespeichert ist, für einen sekundär aktiven Auswärtstransport von H^+ -Ionen.

Ein weiterer Mechanismus ist der Natrium-abhängige HCO_3^-/Cl^- -Austauscher, bei dem Na^+ und HCO_3^- in die Zelle hinein (Energie resultiert wieder aus dem Natriumkonzentrationsgradienten) und H^+ und Cl^- aus der Zelle heraus transportiert werden (Boyarsky *et al.*, 1988a; Boyarsky *et al.*, 1988b). Dieser Anionen-Austauscher besitzt doppelte Effektivität, da einerseits H^+ -Ionen aus der Zelle sezerniert werden, andererseits HCO_3^- in die Zelle gelangt und somit ein weiteres Proton neutralisiert werden kann ($HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$). In Anwesenheit von Bikarbonat besitzt dieser Mechanismus ein große

Bedeutung in der pH-Regulation. Beide beschriebenen Antiporter werden durch den intrazellulären pH-Wert reguliert und steigern ihre Aktivität bei zunehmender Azidifizierung des Zytosols.

In manchen Zellen spielt ein dritter Na^+ -abhängiger Transporter eine Rolle in der pH-Regulation. Ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symport transportiert Natrium zusammen mit 2 oder mehr Bikarbonatmolekülen in die Zelle. Dieser Symporter ist im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen elektrogen, da mehr negative als positive Ladungen in die Zelle gelangen, daher ist dieser Transporter von der Membranspannung abhängig.

Außer den Natrium-abhängigen Transport-Proteinen existieren auch Natrium-unabhängige Mechanismen. Einerseits ein $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher, der Bikarbonat üblicherweise entlang des elektrochemischen Gradienten aus der Zelle hinaus transportiert (Boyarsky *et al.*, 1988a), wodurch eine Entgleisung des intrazellulären pH in alkalische Bereiche verhindert werden kann. Die Aktivität dieses Proteins wird durch Anstieg des pH_i gesteigert und kann so den pH-Wert wieder senken.

Andererseits existiert eine Natrium-unabhängige H^+ -ATPase, die überwiegend in den Membranen von Lysosomen und Endosomen zu finden ist. Sie pumpt unter ATP-Verbrauch H^+ -Ionen aus dem Zytosol in die genannten Kompartimente und bewirkt dabei den niedrigen pH-Wert in Lysosomen bei Erhaltung des zytosolischen pH.

Eine Differenzierung der einzelnen Regulationsmechanismen ermöglicht das Vorhandensein oder der Ersatz von Natrium durch NMDG. Zusätzlich existieren spezifische Inhibitoren. Für den Natrium/Protonen-Austauscher das 5'(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid (EIPA) (Abrahamse *et al.*, 1994;Watts, III & Good, 1994a), die Protonenpumpe kann mit Bafilomycin A1 spezifisch gehemmt werden (Bowman *et al.*, 1988;Umata *et al.*, 1990;Yoshimori *et al.*, 1991;Saurin *et al.*, 1996).

1.3 Diabetische Nephropathie

Alle Formen des Diabetes mellitus sind charakterisiert durch chronische Hyperglykämie und die Entwicklung von diabetes-spezifischen mikrovaskulären Komplikationen in Retina, Nierenglomerulum und peripheren Nerven. Häufige Konsequenz der Gefäßveränderungen sind diabetische Spätkomplikationen wie Blindheit, Nierenversagen oder Polyneuropathie. Diabetes mellitus ist außerdem mit der Atherosklerose großer Gefäße in Herz, Gehirn und Extremitäten assoziiert und steigert daher die Inzidenz von Herz- und Hirninfarkten sowie Gefäßverschlüssen in den Extremitäten (Wei *et al.*, 1998; Ebara *et al.*, 2000; Ginsberg, 2000). Die diabetische Nephropathie ist die häufigste Ursache einer Niereninsuffizienz. Pathophysiologische Ursache ist eine Hyperglykämie, die Abnormalitäten im Blutfluß und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität zur Folge haben. Quantitative und qualitative Veränderungen der extrazellulären Matrix sind an der Entstehung der gestörten Gefäßpermeabilität beteiligt. Gesteigerte Glukoseaufnahme und Glykolyse ist mit einer Vielzahl biochemischer Pathomechanismen, wie beispielsweise der Proliferation von Tumorzellen oder der Ausbildung und Entwicklung diabetischer Langzeitkomplikationen, verknüpft (Brownlee, 2001).

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß der Glukosetransporter1 (Glut1) und der Wachstumsfaktor TGF- β an der Entstehung von Gewebsschäden durch hyperglykämische Stoffwechsellage beteiligt sind (Mogyorosi & Ziyadeh, 1999). Es konnte beschrieben werden, daß hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen die Aktivität und die Expression des Glut1 in Mesangiumzellen induzieren und eine gesteigerte Glukoseaufnahme und Glykolyse ermöglichen (Heilig *et al.*, 1997b). Der gesteigerte Glukosemetabolismus der Zellen fördert die Entstehung der pathologischen Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie. Die Aktivität der Glukosetransporter in den Zellmembranen der Zielzellen stellt daher den Geschwindigkeits-bestimmenden Faktor für diese Veränderungen dar.

In vitro Studien an Zellkulturen konnten zeigen, daß die genetische Überexpression des Glut1 in Mesangiumzellen der Ratte den Phänotyp der

diabetischen Nephropathie imitieren konnte, ohne daß hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen nötig waren (Heilig *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse können auch das Auftreten von Spät komplikationen bei Patienten mit außerordentlich gut eingestelltem Serumblutzucker erklären.

Die meisten gegenwärtigen Therapieschemata von Diabetes mellitus versuchen, Spät komplikationen durch eine Normalisierung der Plasmaglukosekonzentration zu erreichen. Diese wird häufig auf Kosten eines gesteigerten Transportes in die Zellen erreicht. Die Verminderung des Transportes in die Zellen könnte hingegen ein Therapieansatz zur Reduktion von Spät komplikationen sein

1.4 Glukokortikoide

Glukokortikoide spielen eine bedeutende Rolle im Glukosestoffwechsel der Zellen. Durch Hemmung und Aktivierung verschiedener Stoffwechselwege nehmen haben sie gleichzeitig starken Einfluß auf die pH-Regulation der einzelnen Zelle sowie des Gesamtorganismus.

Dabei übt Dexamethason einerseits indirekte Effekte aus. So führt eine Hemmung der Glykolyse (Probst & Jungermann, 1983) zu einer Verminderung der Laktatproduktion in einigen Zelltypen. Die Stimulation der Glukoneogenese bewirkt zusätzlich einen Verbrauch des intrazellulären Laktats. Weiterhin wurde eine Verminderung der Glukoseaufnahme an Endothelzellen der Aorta sowie an Adipozyten der Ratte beschrieben (Roth & Livingston, 1976). In Skelettmuskelzellen wird der Glukosetransporter4 (Glut4) durch Glukokortikoidbehandlung indirekt gehemmt (Haber & Weinstein, 1992;Guillaume-Gentil *et al.*, 1993).

Andererseits nimmt Dexamethason auch direkten Einfluß auf die zelluläre pH-Regulation. So zeigt Dexamethason bei chronischer Gabe einen Anstieg der Bikarbonatresorption in isoliert perfundierten proximalen Tubuluskonvolut-Zellen (Baum *et al.*, 1994). In der gleichen Studie zeigt sich zusätzlich ein Anstieg der Aktivität des Natrium/Protonen-Austauschers in der Bürstenmembran. Dabei

steigert Dexamethasonbehandlung die NHE3-Isoform auch auf mRNA-Ebene, ohne allerdings einen Anstieg der NHE1 mRNA nachweisen zu können. Ein Anstieg des mRNA-Levels von NHE3 in Niere und Ilium unter Methylprednisolonbehandlung ohne gleichzeitigen Anstieg der NHE1-mRNA konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden (Yun *et al.*, 2002). Darin konnte gezeigt werden, daß die Stimulation der NHE-Expression die Anwesenheit eines Regulatorproteins (NHERF2) bei gleichzeitiger Aktivierung der Serum-Glukokortikoid-induzierten Proteinkinase1 (SGK1) erfordert.

Als weitere Glukokortikoidwirkung konnte eine gesteigerte Expression der mRNA des Natrium/Bikarbonat-Kotransporters (NBC1) in der basolateralen Membran von Nierenepithelzellen des proximalen Tubulus gezeigt werden (Ali *et al.*, 2000). Die Stimulation der Expression war dabei auch mit einer gesteigerten Aktivität assoziiert. Die gesteigerte Aktivität des Natrium/Bikarbonat-Kotransporters bewirkt eine vermehrte Rückresorption von Bikarbonat im proximalen Tubulus und kann einen wichtigen Beitrag zur Erzeugung einer metabolischen Alkalose bei Glukokortikoid-Überproduktion leisten. Hierbei sollte allerdings auch die Mineralkortikoid-Wirkung am Sammelrohr erwähnt werden, die ihrerseits die Entstehung einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose durch die Rückresorption von Natrium im Austausch gegen Kalium oder Protonen, begünstigen kann (Quinkler *et al.*, 2001).

1.5 Fragestellung

Im Rahmen der beschriebenen Zusammenhänge ist es von Interesse, die Wechselwirkungen und Zusammenhänge zwischen Glykolyse und pH-Regulation zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Mesangium-Zellen der Ratte, die den Glukosetransporter1 (Glut1) überexprimieren, mit Kontroll-Zellen verglichen. Die Überexpression des Glut1 bewirkt dabei eine gesteigerte Glukoseaufnahme und –verstoffwechslung (Heilig *et al.*, 1997b).

Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen des gesteigerten Glukosemetabolismus auf die Regulation der zellulären pH-Homöostase.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurden an Jurkat-T-Lymphozyten die Auswirkungen von Dexamethasonbehandlung und damit verbundener Hemmung der Glykolyse auf die pH-Regulation untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen und Lösungen

2.1.1 Chemische Substanzen

Die verwendeten Substanzen wurden, soweit nicht anderweitig angegeben, von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.

Der Fluoreszenz-Farbstoff BCECF-AM wurde bei Molecular Probes (Eugene, OR, USA) bezogen.

Tabelle 2-1: Liste der verwendeten Abkürzung von Substanzen

BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester
Cholinbikarbonat	(2-Hydroxyethyl)trimethylammonium
Dexamethason	(9 α -Fluoro)-16 α -methylprednisolon
DMSO	Dimethyl-sulfoxide-ACS-Reagent
EIPA	5'(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)
o-M-Glukose	Ortho-MethylGluco-Pyranose
p-CMBS	p-chloromercuriphenyl-sulfonsäure
Phloretin	β -(4-Hydroxyphenyl)-2,4,6-trihydroxypropiophenon
Pyruvat	α -Ketopropionsäure
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminoethan

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Substanzen und deren Substanzgruppen

BCECF-AM	membrangängiger pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
Bafilomycin A1	H ⁺ -ATPase-Inhibitor
Cholin-Bikarbonat	Puffer
Dexamethason	Glukokortikoid
DMSO	Lösungsmittel
EIPA	Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitor
Harnstoff	Organisches Osmolyt
HEPES	Puffer
Nigericin	H ⁺ -Ionophor
o-M-Glukose	nicht metabolisierbare Glukose
p-CMBS	Monocarboxylattransporter-Inhibitor
Phloretin	Monocarboxylattransporter-Inhibitor
Poly-L-Lysine 0,01%	Glas-coating zur Unterstützung der Zelladhäsion
Saccharose	Organisches Osmolyt
Sorbitol	Organisches Osmolyt

2.1.2 Perfusions-Lösungen

Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und mit Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Folgende Lösungen wurden für die Superfusion der Zellen während der fluoreszenz-mikroskopischen Messungen verwendet.

1. Physiologische Ringer-Lösung als Standard-Lösung (Tabelle 2-3).
2. Die Ammoniumchlorid/0-Natrium-Lösung ($\text{NH}_4\text{Cl}/0\text{-Natrium}$) enthält 20 mM NH_4Cl als Ersatz für 20mM NaCl, verbleibendes Natrium wurde mit N-methyl-D-glucamine (NMDG) substituiert (Tabelle 2-4).
3. In der natriumfreien Lösung (0-Natrium) wurde Natrium durch NMDG (Fa. Sigma, Steinheim) zur Erhaltung der Osmolarität ersetzt (Tabelle 2-5). Die pH-Wert-Einstellung erfolgte wie bei allen anderen natriumfreien Lösungen mit Tris-Base.
4. Die Bikarbonat-gepufferten Lösungen enthalten 24 mM Bikarbonat anstatt HEPES als Puffer, zusätzlich 1 mM HCl. Diese Lösungen wurden kontinuierlich in einer Umgebung mit einem Gasgemisch aus 95% Luft und 5% CO_2 gehalten, so daß sich das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewicht bei einem pH-Wert von 7,4 einstellt (Tabelle 2-6).
5. Die Natrium-Laktat-Standardlösung enthält 40mM Na-Laktat im Austausch für NaCl (Tabelle 2-7). Die Saccharose-, Sorbitol-, Glukose-, 3-O-Methylgluco-Pyranose- sowie die Harnstoff-Laktatlösung enthalten jeweils 20mM der namensgebenden Substanz als Substitut für 10mM NaCl (Tabelle 2-8 und Tabelle 2-9). Die entsprechenden Standard-Lösungen enthalten kein Natrium-Laktat (Tabelle 2-10 und Tabelle 2-11).

6. In den Laktatkinetik-Lösungen ist NaCl in der jeweils angegebenen Konzentration durch Na⁺-Laktat ersetzt (Tabelle 2-12).
7. Die Natrium-Pyruvat- enthält 40 mM Natrium-Pyruvat, die Tris-Pyruvat-Lösung enthält 40 mM Tris-Pyruvat als Ersatz für 40 mM Natrium-Laktat (Tabelle 2-13).
8. Die Kalibrierungslösung ist wie in Tabelle 2-14 angegeben zusammengesetzt. Sie wurde jeweils zu Versuchsbeginn auf pH 6,5 sowie 7,5 titriert, sowie Nigericin in DMSO 10µM hinzugegeben.

Tabelle 2-3: Standard-Lösung

NaCl	125mM
KCl	5mM
MgSO ₄	1,2mM
HEPES	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM
Glukose	5mM
CaCl ₂	1

Tabelle 2-4: Ammoniumchlorid/0-Natrium-Lösung

NaCl	0
KCl	5mM
MgSO ₄	1,2mM
HEPES	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM
NH ₄ Cl	20mM
NMDG/HCL	105mM
Glukose	5mM
CaCl ₂	1mM

Tabelle 2-5: Natriumfreie Lösung (0-Natrium)

NaCl	0
KCl	5mM
MgSO ₄	1,2mM
HEPES	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	0
NMDG/HCL	125mM
Glukose	5mM
CaCl ₂	1mM

Tabelle 2-6: Bikarbonat-gepufferte Lösungen

	<i>Standard- Bikarbonat</i>	<i>0-Natrium- Bikarbonat</i>	<i>NH₄Cl/0-Natrium- Bikarbonat</i>
NaCl	125mM	0	0
KCl	5mM	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM	1,2mM
HEPES	0	0	0
Cholinbikarbonat	24mM	24mM	24 mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	0	0
NMDG/HCL	0	125 mM	105 mM
NH ₄ Cl	0	0	20 mM
Glukose	5 mM	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
HCl	1 mM	1 mM	1 mM

Tabelle 2-7: Natrium-Laktat Standardlösung

NaCl	85mM
KCl	5mM
MgSO ₄	1,2mM
HEPES	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM
Glucose	0
CaCl ₂	1mM
Na ⁺ -Laktat	40mM

Tabelle 2-8: Saccharose-Laktat-Lsg, Sorbitol-Laktat-Lsg, Glukose-Laktat-Lsg

	<i>Saccharose-Laktat</i>	<i>Sorbitol-Laktat</i>	<i>Glukose-Laktat</i>
NaCl	75mM	75mM	75mM
KCl	5mM	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM	2mM
Glucose	0	0	20mM
CaCl ₂	1mM	1mM	1mM
Na ⁺ -Laktat	40mM	40mM	40mM
Saccharose	20mM	0	0
Sorbitol	0	20mM	0

Tabelle 2-9: 3-o-Methylgluco-Pyranose-Laktat-Lösung (o-M-Glukose-Laktat), Harnstoff-Laktat-Lösung

	<i>o-M-Glukose-Laktat</i>	<i>Harnstoff-Laktat</i>
NaCl	75mM	75mM
KCl	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM
Glukose	0	0
CaCl ₂	1mM	1mM
Na ⁺ -Laktat	40mM	40mM
o-Methyl-Glukose	20mM	0
Harnstoff	0	20mM

Tabelle 2-10: Standard-Saccharose, Standard-Sorbitol, Standard-Glukose

	<i>Standard-Saccharose</i>	<i>Standard-Sorbitol</i>	<i>Standard-Glukose</i>
NaCl	115mM	115mM	115mM
KCl	5mM	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM	2mM
Glukose	0	0	20mM
CaCl ₂	1mM	1mM	1mM
Na ⁺ -Laktat	0	0	0
Saccharose	20mM	0	0
Sorbitol	0	20mM	0

Tabelle 2-11: 3-o-Methylgluco-Pyranose-Standard-Lösung (o-M-Glukose-Standard), Harnstoff –Standard-Lösung

	<i>o-M-Glukose-Standard</i>	<i>Harnstoff-Standard</i>
NaCl	115mM	115mM
KCl	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM
Glukose	0	0
CaCl ₂	1mM	1mM
Na ⁺ -Laktat	0	0
o-Methyl-Glukose	20mM	0
Harnstoff	0	20mM

Tabelle 2-12: Laktatkinetik-Lösungen

	<i>1mM Laktat</i>	<i>5mM Laktat</i>	<i>10mM Laktat</i>	<i>15mM Laktat</i>
NaCl	124mM	120mM	115mM	110mM
KCl	5mM	5mM	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM	2mM	2mM
Glukose	0	0	0	0
CaCl ₂	1mM	1mM	1mM	1mM
Na ⁺ -Laktat	1mM	5mM	10mM	15mM

Tabelle 2-13: Pyruvat-Lösung, Tris-Pyruvat-Lösung

	<i>Natrium-Pyruvat</i>	<i>Tris-Pyruvat</i>
NaCl	85mM	85mM
KCl	5mM	5mM
MgSO ₄	1,2mM	1,2mM
HEPES	32,2mM	32,2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM	0
Glukose	0	0
CaCl ₂	1mM	1mM
Na ⁺ -Pyruvat	40mM	0
Tris-Pyruvat	0	40mM

Tabelle 2-14: Kalium-Kalibrierungs-Lösung:

KCl	105mM
CaCl ₂	1mM
MgSO ₄	1,2mM
NMDG	32,8mM
HEPES	32,2mM
Nigericin	10μM

2.2 Geräte und Set-up

2.2.1 Eingesetzte Geräte

Für die fluoreszenz-optischen Messungen wurden folgende Geräte verwendet (Abbildung 2-1):

- Monochromatische Lichtquelle mit Xenonlampe, Diffraktionsgitter und schwenkbarem Spiegel (Fa. Uhl, München)
- Graufilter, nominale Transmission 1% (Fa. Oriel, Darmstadt)
- Dichroischer Spiegel, FT 515 nm und 430 nm (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA)
- Objektiv, Plan-Neofluar 40fach, Öl-immersions-Linse (Zeiss, Oberkochen)
- Axiovert 100, Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen)
- Videokamera HL5 EC (Proxitronic, Bensheim)
- Software für die Datenaufnahme und –bearbeitung (Imaging Workbench 4.0, Fa. Axon Instruments, Union City, CA, USA)

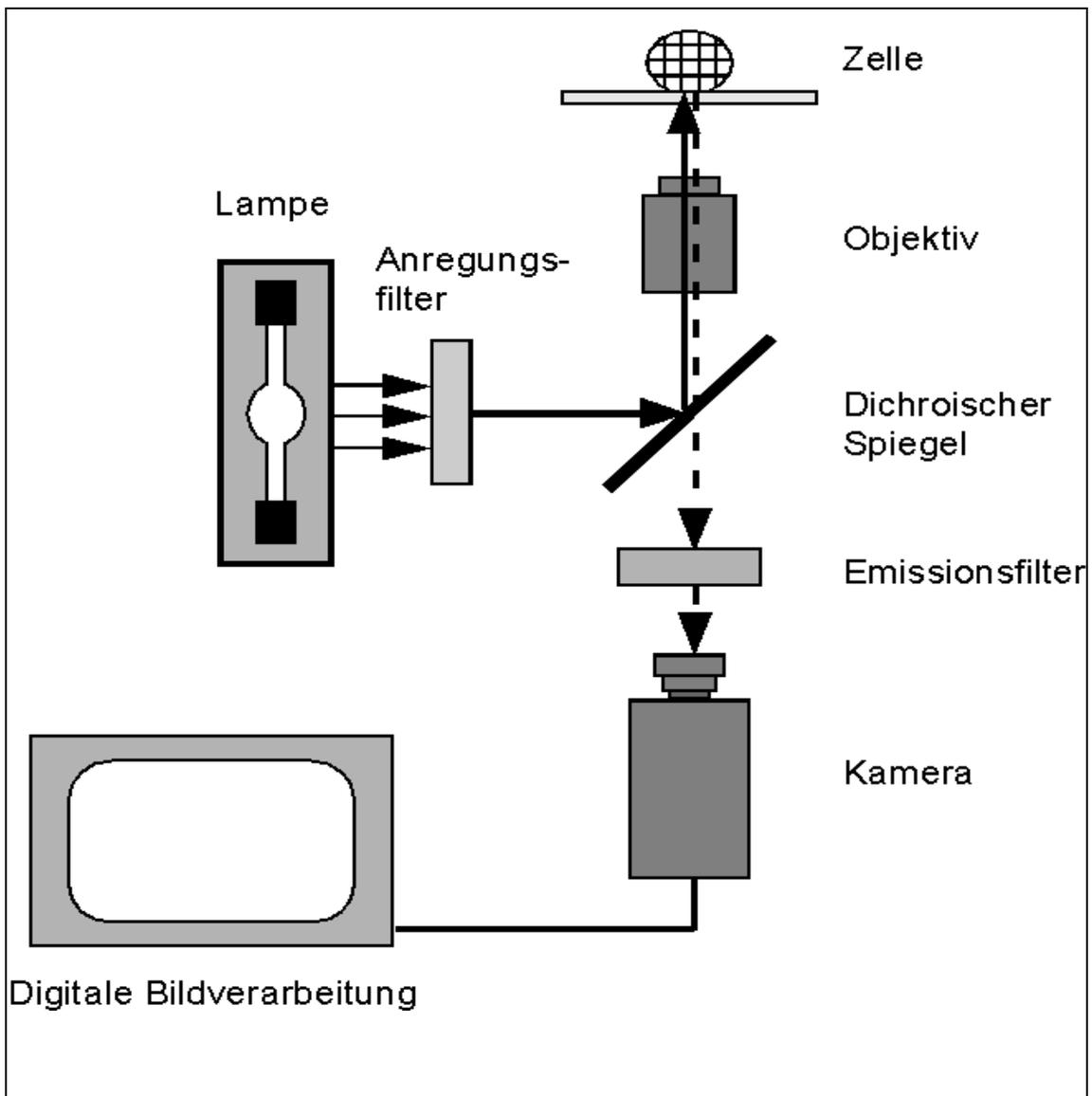
2.2.2 Perfusionssystem

Das Perfusionssystem besteht aus einer Perfusionskammer aus Plexiglas (Durchmesser 38 mm) mit einem Volumen von ca. 1 ml. Die Perfusionsschläuche wurden durch ein Wasserbad (37°C) in die Perfusionskammer geleitet, so daß alle Perfusionslösungen bis zum Zellkontakt eine Temperatur von 37°C erreichten. Die Perfusionslösungen wurden in Reservoirbehältern mit einem Volumen von 60 ml bewahrt, die höher als die Perfusionskammer montiert waren, wodurch eine Schwerkraft-getriebene Perfusion ermöglicht wurde. Ein Durchfluß-Regulator im Verlauf der Perfusionsschläuche diente der Steuerung der Fließgeschwindigkeit. Um den schnellen und vollständigen Austausch der Lösungen zu gewährleisten, wurde an der Gegenseite der Einflußmündung eine Vakuumpumpe installiert. Durch das permanente Absaugen der zugeführten Lösungen konnte der Wechsel

zwischen unterschiedlichen Perfusionslösungen ohne Unterbrechung des kontinuierlichen Flusses erreicht werden.

Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Invertfluoreszenzmikroskops:

Das Licht einer Xenonlampe wird in das Mikroskop eingekoppelt und mit einem Anregungsfilter eine bestimmte Wellenlänge herausgefiltert (für BCECF 440 nm und 485 nm). Ein dichroischer Spiegel reflektiert das Anregungslicht durch das Objektiv zur Zelle. Das von der Zelle emittierte Fluoreszenzlicht (hier 535 nm) kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird durch den Emissionsfilter gebündelt. Das Emissionslicht fällt in eine Kamera, die das Bild zur digitalen Verarbeitung weiterleitet.



2.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Allgemeiner Überblick über die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung von intrazellulären Calcium-Konzentrationsveränderungen, zytosolischem und lysosomalem pH-Wert sowie Veränderungen des Zellvolumens können fluoreszenz-optische Methoden verwendet werden.

Die eingesetzten Farbstoffe werden durch Veresterung an eine Acetoxymethyl-Gruppe gebunden, wodurch sie ihre hohe Membranpermeabilität erhalten. Intrazelluläre Spaltung der Esterverbindung durch unspezifische, zytosolische Esterase (Grynkiewicz *et al.*, 1985) bewirkt einen Verlust der lipophilen Eigenschaft, so daß der Farbstoff die Zelle im Verlauf der Messung nicht oder nur in geringem Ausmaß durch Diffusion verlassen kann. Die Hydrolyse der Esterbindung ist weiterhin entscheidend für die Bindungsfähigkeit des Farbstoffmoleküls an das Ziel-Ion.

Die Konzentration des Acetoxymethyl-Esters sollte bei der Farbstoffbeladung der Zellen so gering wie möglich gehalten werden ($< 10\mu\text{M}$), um das Risiko von Artefakten durch Überladung, unvollständige Spaltung der Esterbindung oder toxischen Effekten der Hydrolyse-Nebenprodukte (z. B. Formaldehyd) gering zu halten.

Die Anfärbung der Zellen erfolgt üblicherweise über eine Zeitdauer von 10 Minuten bis 1 Stunde und kann in einer für die Zelllinie optimalen Temperatur, im Brutschrank, durchgeführt werden. Um extrazelluläre Hydrolyse zu minimieren kann der Farbstoff in amin-freier Pufferlösung gelöst werden, wie beispielsweise PBS. Die Zellen sollten nach dem Beladen mit Farbstoff-freier Lösung gewaschen werden, um ungebundene Farbstoffmoleküle zu entfernen. Anregendes Licht aus einer monochromatischen Lichtquelle wird auf die Zellen gerichtet. Die Fluoreszenzmikroskopie bedient sich dabei der Eigenschaft der Farbstoffe, sogenannter Fluorochrome, bei Bestrahlung, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Absorptionsspektrum) und Licht einer längeren Wellenlänge abzustrahlen (Emissionsspektrum). Diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß durch die zugeführte Lichtenergie Elektronen in höhere

Energiezustände angehoben werden und beim Rücksprung, der in Stufen erfolgt, energieärmeres Licht emittieren (Gesetz nach Stoke). Das resultierende Emissionsspektrum kann sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Messung der zytosolischen H^+ -Ionen-Konzentration, des pH_i -Wertes verwendet. Dabei wurde der Fluoreszenz-Farbstoff BCECF-AM in die Zelle eingebracht.

2.3.2 Intrazelluläre H^+ -Ionen-Konzentrations-Messung

Die adhärennten Glut1- und LacZ-Zellen wurden auf gläsernen Deckgläschen mit 30 mm Durchmesser ausgesät und auf diesen im Brutschrank kultiviert. Die Messungen wurden 24h, 48h und 72h nach dem Aussäen durchgeführt. Dabei war nach 24h 30-50% der Kulturfläche und nach 48h 60-80% der Kulturfläche bedeckt. 72h nach dem Aussäen waren die Zellen konfluent.

Die nicht adhärennten Jurkat-Zellen wurden vor Versuchsbeginn auf Deckgläser, die zuvor mit Poly-L-Lysine 0,01 % vorbehandelt (gecoated) wurden, ausgebracht. Alle Zellen wurden bis unmittelbar vor Messbeginn im Brutschrank bei angefeuchteter Luft, 5 % CO_2 und 37°C gehalten. Die Beladung mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Abbildung 2-3) erfolgte in einer Konzentration von 10 μM in Kulturmedium gelöst über eine Zeitdauer von 10 Minuten ebenfalls im Brutschrank. Nach der Inkubationszeit konnten die Zellen in die Perfusionskammer transferiert werden und darin auf einem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen) plaziert werden. Die Perfusionskammer wurde daraufhin an das Perfusionssystem (2.2.2) angeschlossen. Die Zellen wurden zu Beginn der Messung fokussiert. Nach Entfernung der ungebundenen Farbstoffreste konnten die zu messenden Regionen mittels eines Computerprogramms (Workbench 4.0, Fa. Axon Instruments, Union City, CA, USA) ausgewählt werden. Die Lichtintensitäten der Regionen sowie die Bilder wurden gespeichert. Die Zellen wurden mit monochromatischem Licht der Wellenlängen 440 nm und 485 nm angeregt, das emittierte Licht besaß 535 nm Wellenlänge (Abbildung 2-2). Die Hintergrundfluoreszenz in Abwesenheit des

Farbstoffes betrug weniger als 1 % der mit Farbstoff aufgezeichneten Werte. Der Quotient der Emission von 485/440 nm (Fluoreszenz-Ratio) wurde zur Berechnung des zytosolischen pH-Wertes verwendet.

Die Eichung erfolgte mit der Kalium-Nigericin-Methode (Ganz *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1979). Die Zusammensetzung der Eichlösung ist in Tabelle 2-14 angegeben. Die Fluoreszenz-Ratio 485/440 nm war im Bereich zwischen pH 6,5 und 8,0 linear.

Abbildung 2-2: Excitations-Spektrum von BCECF-AM

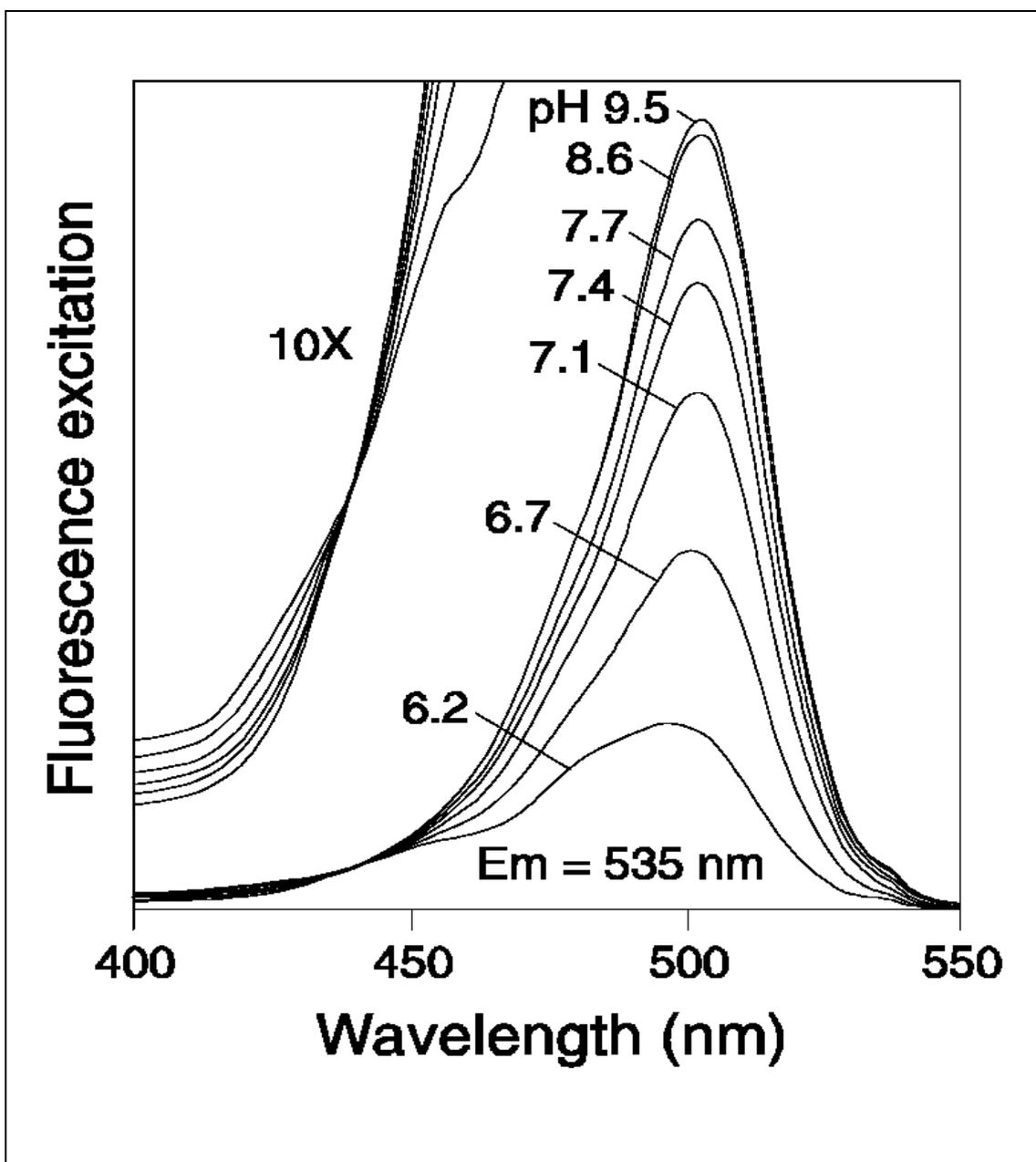
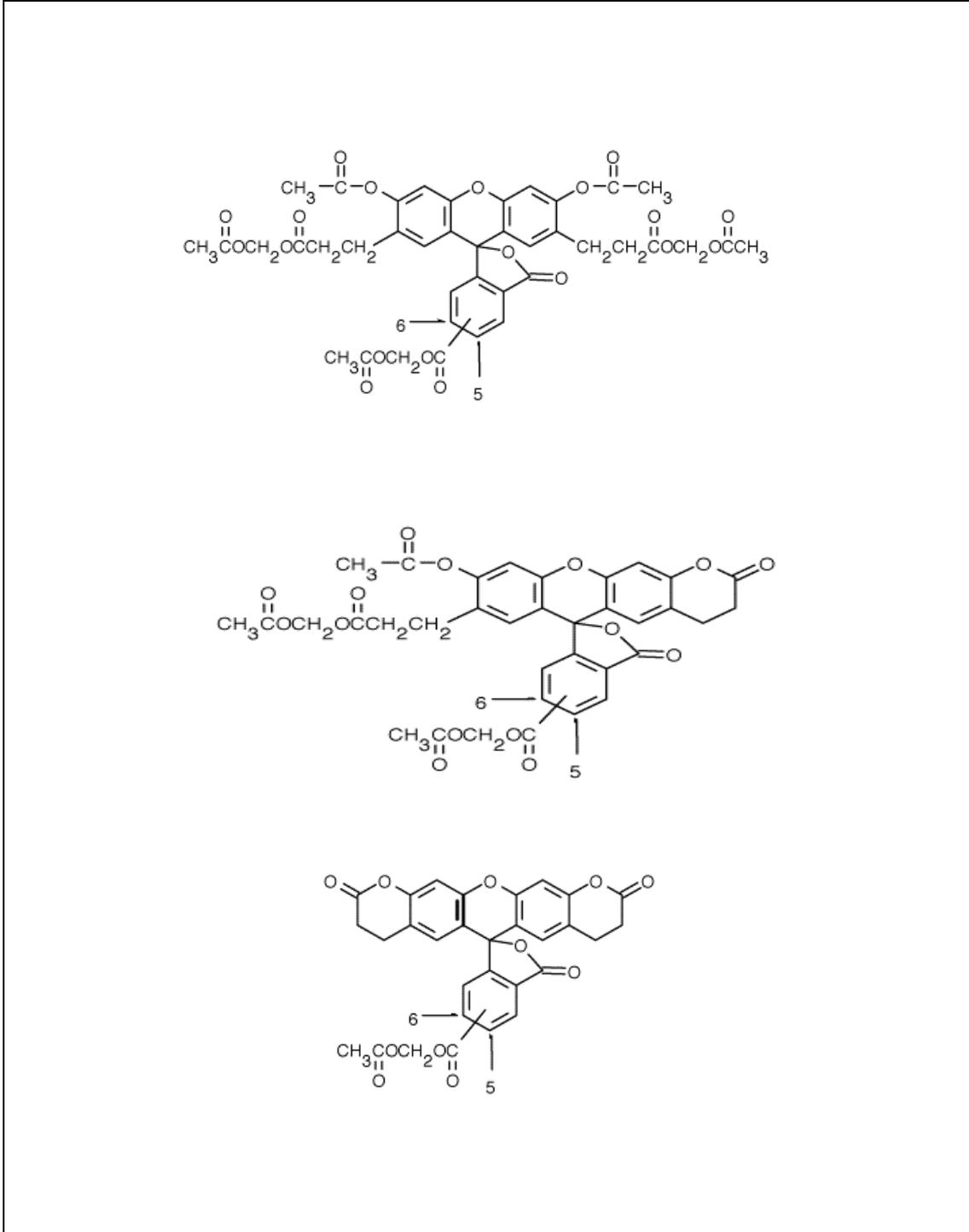


Abbildung 2-3: Strukturformel von BCECF-AM (Gemisch aus den drei angegebenen Verbindungen)



2.3.3 Ansäuerung der Zellen

Um die zytosolischen pH_i -Regulations-Mechanismen anzuregen, wurden die Zellen in einigen Versuchen angesäuert. Hierzu wurden sie während des Versuchsablaufs über eine Zeitdauer von 10 Minuten mit einer Ammoniumchlorid-Lösung perfundiert (Tabelle 2-4). Ammoniumchlorid liegt auf Grund des pK -Wertes von 9,2 bei pH 7,4 überwiegend dissoziiert vor. Bedingt durch schnelle Diffusion von NH_3 in die Zelle und intrazellulärer Bindung von H^+ -Ionen kommt es zunächst zu einer signifikanten Alkalinisierung der Zellen. Nach Gleichgewichtseinstellung wurde das Ammoniumchlorid entfernt. Die darauf folgende Diffusion von NH_3 aus der Zelle heraus führte durch eine Retention von H^+ -Ionen zu einer Azidifizierung des Zytosols (Watts, III & Good, 1994b). Die folgende Realkalinisierung war in hohem Maße von Natrium abhängig.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Glut1-Zellen und LacZ-Zellen:

Mesangium-Zellen der Ratte, die stabil mit dem humanen Glukosetransporter1-Gen (Glut1) bzw. bakterieller β -Galaktosidase als Kontroll-Zellen (LacZ) transfiziert wurden, wurden von Prof. C.W. Heilig, Rochester, NY, USA bezogen.

Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von 8 mM Glukose, 2 % Ultrosor, 2 mM Glutamin, 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin in einem Brutschrank (Fa. Heraeus, Osterode) bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten (Heilig *et al.*, 1995). Die adhärenenten Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Das Kulturmedium wurde mit einer sterilen Pipettenspitze abgesaugt und die Zellen mit PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin von ihrer Unterlage gelöst, und die Andauung durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und erneut in der gewünschten Zelldichte (150.000/ml Medium) ausgesät.

2.4.2 Jurkat-T-Lymphozyten

Jurkat-Zellen wurden von American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen. Sie wurden in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von bei 56 °C inaktiviertem 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES (pH 7,4) 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 mM nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol (alle Substanzen von Life Technologies, Eggstein) kultiviert. Gehalten wurden die Zellen in einem Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Passage der Zellen erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche.

2.5 *Statistische Auswertung*

Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Die Anzahl der in den Mittelwerten berücksichtigten jeweils unabhängigen Versuche ist gesondert angegeben. Statistische Analysen wurden mittels gepaartem oder ungepaartem T-Test durchgeführt. Signifikante Abweichung wurde bei $p < 0,05$, hoch signifikante Abweichung bei $p < 0,01$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 pH_i -Wert in *Glut1* und *LacZ*-Zellen

Obwohl *Glut1*-Zellen signifikant mehr Laktat und H^+ -Ionen bilden als *LacZ*-Zellen, ist der zytosolische pH-Ausgangswert in *Glut1* mit $7,50 \pm 0,06$ ($n=33$) hoch signifikant ($p<0,01$) alkalischer als in *LacZ* mit $7,22 \pm 0,05$ ($n=49$)(Abbildung 3-1 und Tabelle 3-1).

Die Zellen wurden 24h, 48h und 72h nach dem Aussäen in einer Konzentration von 300 000 Zellen/ml Kulturmedium gemessen. Nur beim Meßzeitpunkt nach 72h lag Konfluenz der Zellen vor. Bei den Messungen nach 24h und 48h befanden sich die Zellen in der Proliferations-Phase.

Es zeigt sich ein niedrigerer pH_i -Wert im Konfluenz-Stadium der Zellen als während der Proliferations-Phase. Es liegt allerdings für *Glut1* kein signifikanter pH_i -Wert-Abfall vor. Der durchschnittliche pH_i -Wert der *Glut1*-Zellen nach 24h betrug $7,62 \pm 0,15$ ($n=11$), nach 48h $7,56 \pm 0,06$ ($n=13$) und nach 72h $7,28 \pm 0,10$ ($n=9$).

Bei *LacZ* zeigt sich ebenfalls ein niedriger pH_i -Wert nach 72h. Es ergibt sich ein signifikanter pH_i -Abfall ($p<0,05$) im Vergleich zur 24h Messung. Der durchschnittliche pH_i -Wert der *LacZ* lag nach 24h $7,27 \pm 0,07$ ($n=21$), nach 48h $7,25 \pm 0,08$ ($n=21$) und nach 72h $7,00 \pm 0,08$ ($n=7$).

Eine Gegenüberstellung des pH_i -wertes zwischen *Glut1* und *LacZ* zum jeweiligen Meßzeitpunkt ergibt bei der Messung nach 24h und nach 72h signifikante Abweichung ($p<0,05$), bei der 48h-Messung einen hoch signifikant niedrigeren pH_i -Wert in *LacZ*-Zellen.

Aufstellung der Ergebnisse siehe Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2.

Tabelle 3-1: Ausgangs-pH_i-Wert, gesamt

	<i>Glut1</i>	<i>LacZ</i>
Mittelwert (pH)	7,50	7,22
Standardfehler	0,06	0,05
T-Test, <i>Glut1/LacZ</i> (p)		0,001
Versuchsanzahl (n)	33	49

Tabelle 3-2: pH_i-Wert nach 24h, 48h und 72h

	<i>Glut1</i>			<i>LacZ</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Mittelwert (pH)	7,62	7,56	7,28	7,27	7,25	7,00
Standardfehler	0,15	0,06	0,10	0,07	0,08	0,08
T-Test, <i>Glut1/LacZ</i> (p)				0,0499	0,0043	0,0447
T-Test, 24h/72h (p)		0,73	0,08		0,85	0,02
Versuchsanzahl (n)	11	13	9	21	21	7

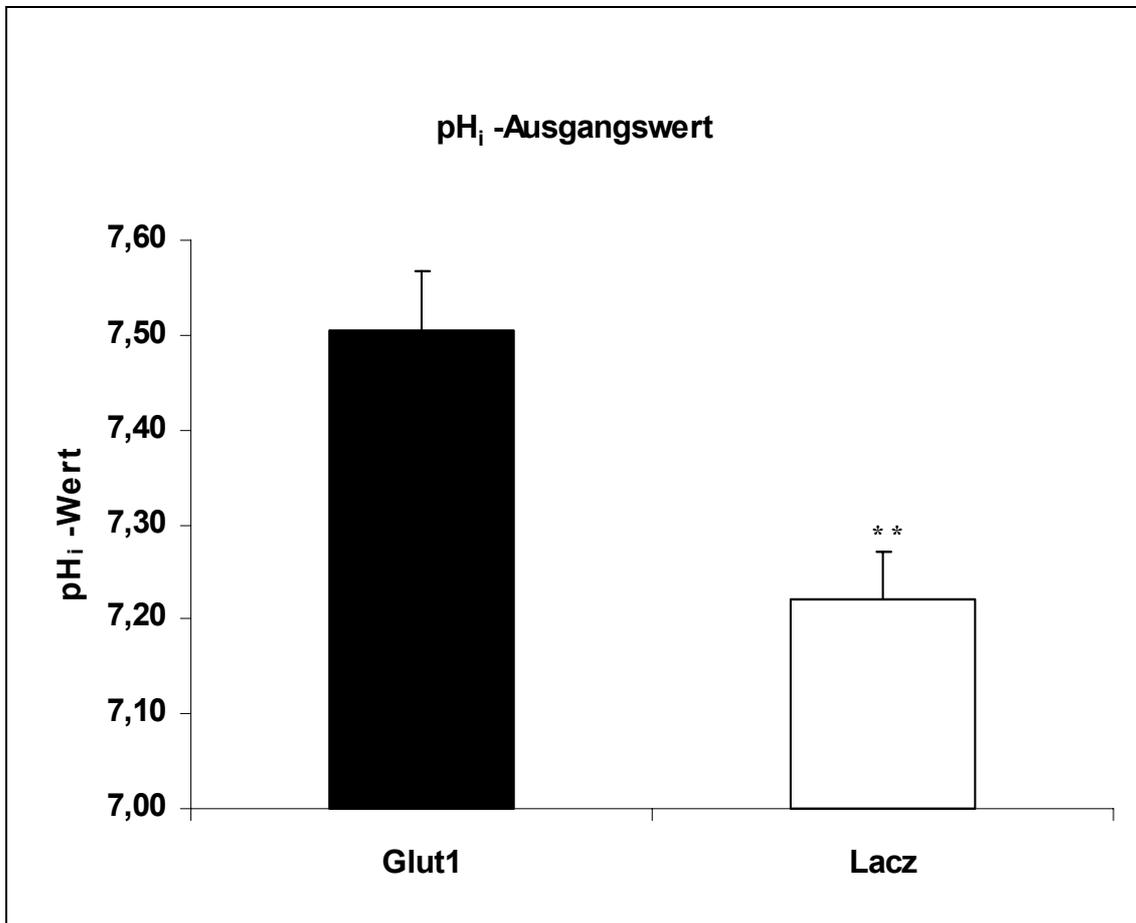
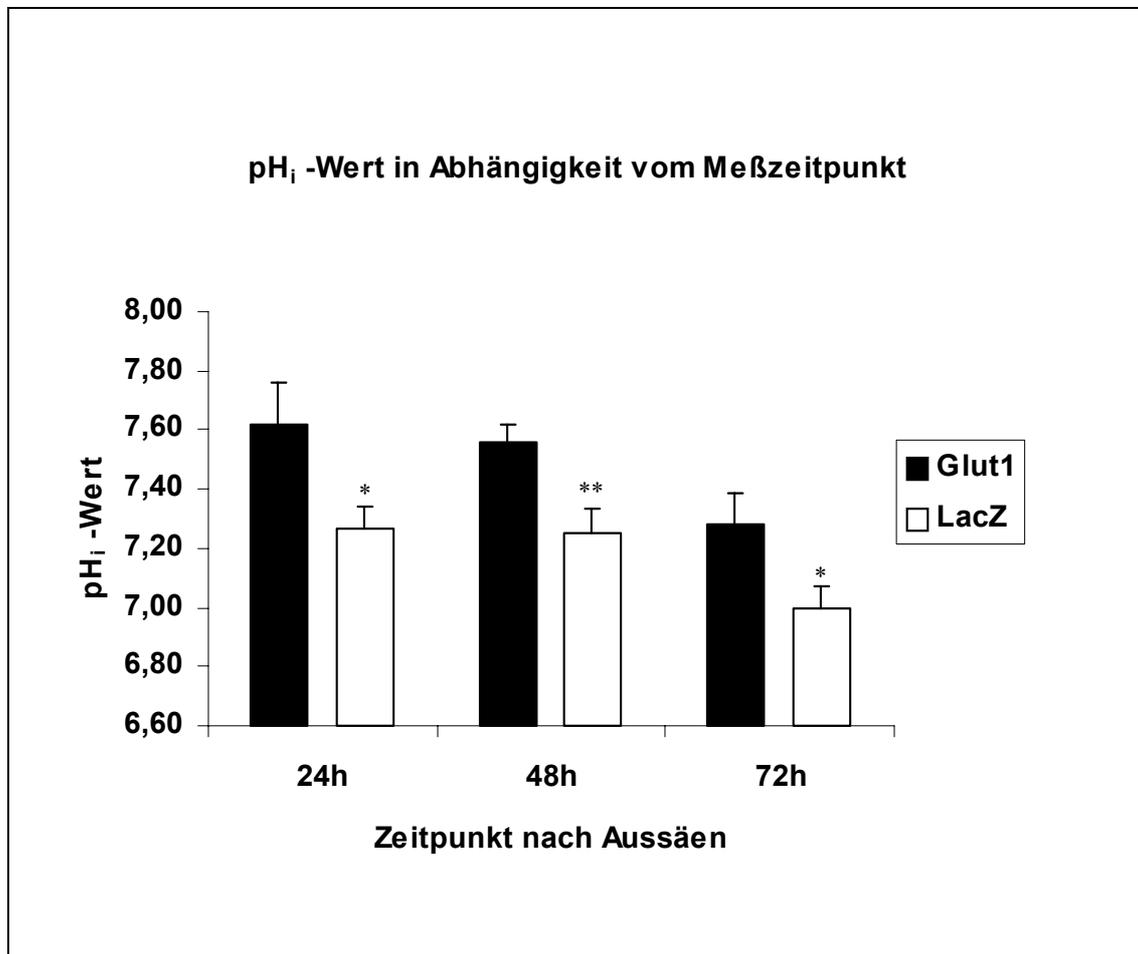
Abbildung 3-1: pH_i -Ausgangswert in Glut1 und LacZ-Zellen

Abbildung 3-2: pH_i -Wert nach 24h, 48h und 72h

3.2 Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation

Um die Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation abzuschätzen, wurde die Realkalinisierung nach Ansäuerung durch Ammoniumchlorid-Puls (siehe 2.3.3) in Abwesenheit von extrazellulärem Natrium beobachtet. Hierfür wurden natriumfreie Perfusionslösungen (siehe Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5) verwendet. Die Originalaufzeichnung je einer Messung an Glut1 und LacZ zeigt die Abbildung 3-3.

Der Ammoniumchlorid-Puls führte zu einem initialen Anstieg des pH_i -Wertes in Glut1 auf $7,83 \pm 0,09$ pH_i ($n=15$) und in LacZ auf $7,68 \pm 0,09$ pH_i , ($n=14$). Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ($p=0,23$). Die anschließende Entfernung des Ammoniumchlorids bei weiterhin bestehendem Ersatz von extrazellulärem NaCl gegen NMDG⁺ führte zu einem schnellem Abfall des pH_i -Wertes auf $6,34 \pm 0,03$ pH_i in Glut1 ($n=15$) und auf $6,33 \pm 0,03$ pH_i in LacZ-Zellen ($n=14$). Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,84$).

Unter natriumfreien Bedingungen kommt es zu einem langsamen Anstieg des pH_i -Wertes mit einer Geschwindigkeit von $0,076 \pm 0,008$ $\Delta pH/min$ ($n=9$) in Glut1 und $0,066 \pm 0,010$ $\Delta pH/min$ ($n=8$) in LacZ. Die Geschwindigkeit dieser pH_i -Wert-Regulation unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Zelllinien ($p= 0,45$).

Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tabelle 3-4.

Abbildung 3-3: Originalaufzeichnung der Natrium-unabhängigen pH_i -Regulation nach Ammoniumchlorid-Puls in Glut1 und LacZ-Zellen

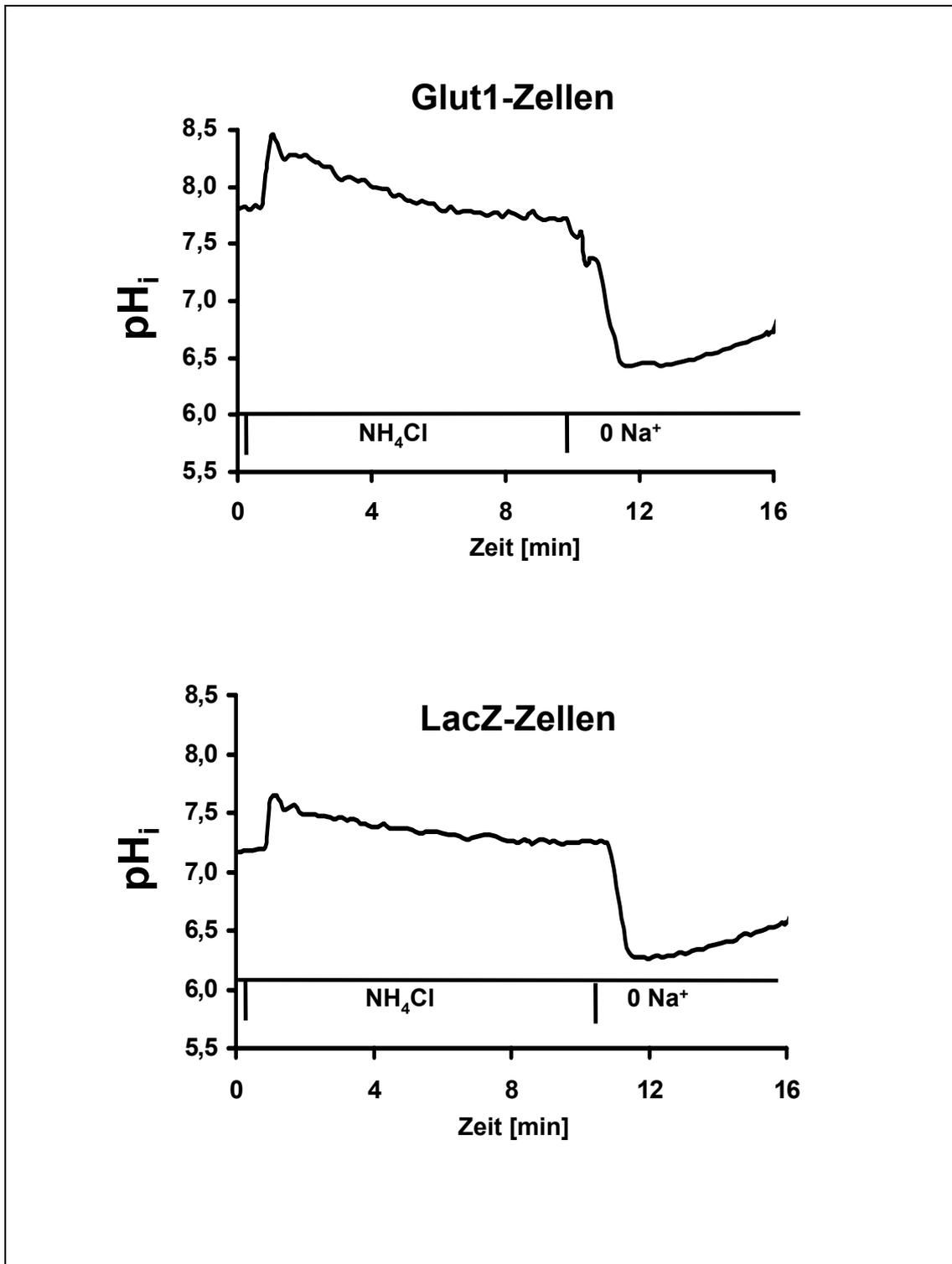
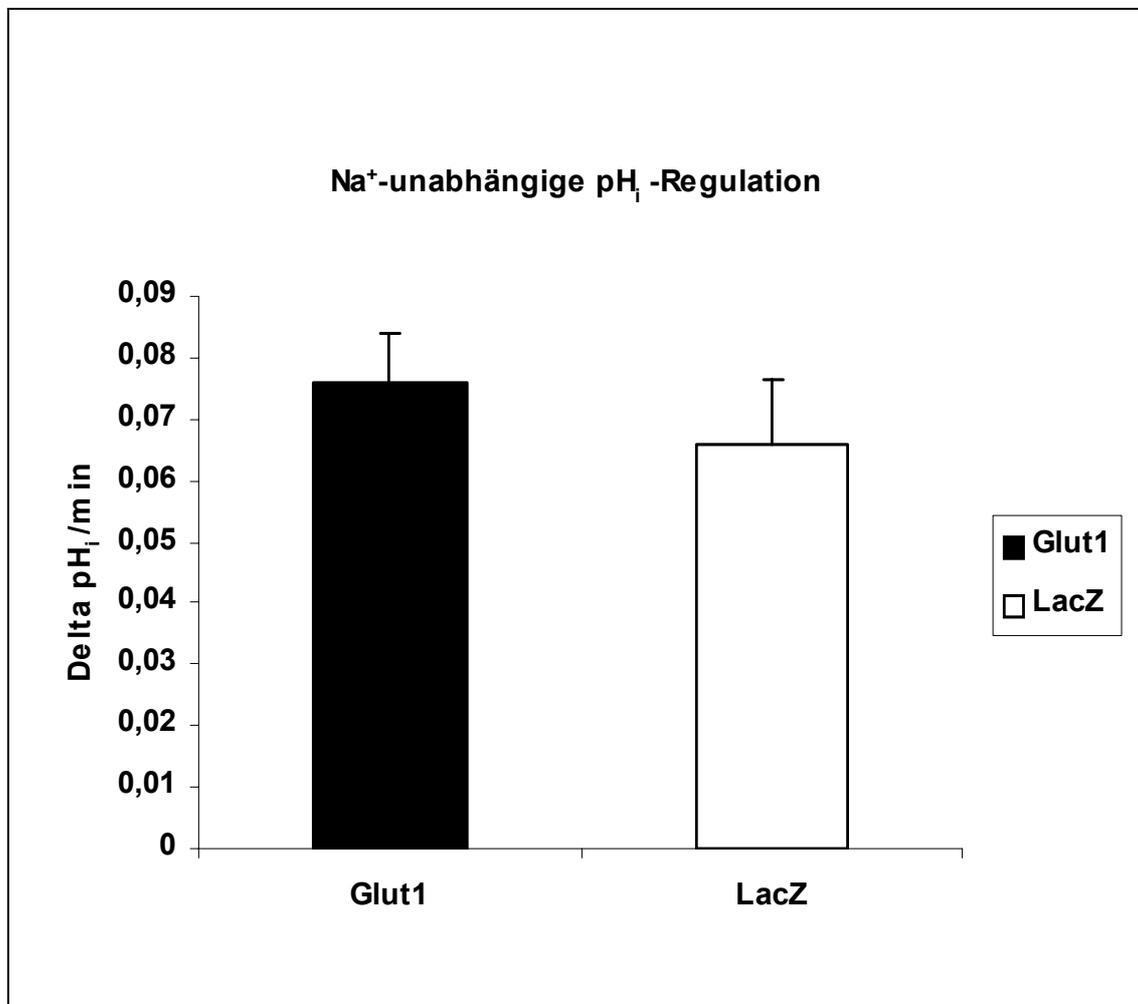


Tabelle 3-3: pH_i-Wert-Veränderung durch Ammoniumchlorid-Puls

	<i>Glut1</i>		<i>LacZ</i>	
	pH _i bei NH ₄ Cl	pH _i nach NH ₄ Cl	pH _i bei NH ₄ Cl	pH _i nach NH ₄ Cl
Mittelwert (pH)	7,83	6,34	7,68	6,33
Standardfehler	0,09	0,03	0,09	0,03
T-Test, Glut/LacZ (p)			0,23	0,84
Versuchsanzahl (n)	15	15	14	14

Tabelle 3-4: Natrium-unabhängige pH_i-Regulation

	<i>Glut1</i>	<i>LacZ</i>
Mittelwert (ΔpH _i /min)	0,0759	0,0658
Standardfehler	0,008	0,010
T-Test, Glut1/LacZ (p)		0,45
Versuchsanzahl (n)	9	8

Abbildung 3-4: Natrium-unabhängige pH_i -Regulation

3.3 Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation unter H^+ -ATPase-Hemmung mit Bafilomycin

Eine genauere Untersuchung der Natrium-unabhängigen pH_i -Wert-Regulation ermöglicht der Einsatz von Bafilomycin. Bafilomycin ist ein Hemmer der membranständigen H^+ -ATPase und somit ein geeignetes Mittel, um den Einfluß der H^+ -ATPase auf die Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation zu untersuchen.

Sowohl Glut1 als auch LacZ-Zellen wurden unmittelbar vor Messungsbeginn 15 Minuten mit Bafilomycin in 2mM Konzentration vorinkubiert.

Es zeigte sich eine hoch signifikante Verlangsamung der Natrium-unabhängigen Realkalinisierung nach Ammoniumchlorid-Puls im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bafilomycin-Vorbehandlung sowohl bei Glut1 $0,0061 \pm 0,0054 \Delta pH_i/\text{min}$ (n=4) als auch bei LacZ $0,0029 \pm 0,0012 \Delta pH_i/\text{min}$ (n=4). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien.

Tabelle 3-5: H^+ -ATPase-Hemmung mit Bafilomycin

	<i>Glut1</i>		<i>LacZ</i>	
	Kein Bafilomycin	Mit Bafilomycin	Kein Bafilomycin	Mit Bafilomycin
Mittelwert ($\Delta pH_i/\text{min}$)	0,0759	0,0061	0,0658	0,0029
Standardfehler	0,008	0,0054	0,010	0,0012
T-Test, kein/mit Bafilomycin (p)		<0,01		<0,01
Versuchszahl (n)	9	4	8	4

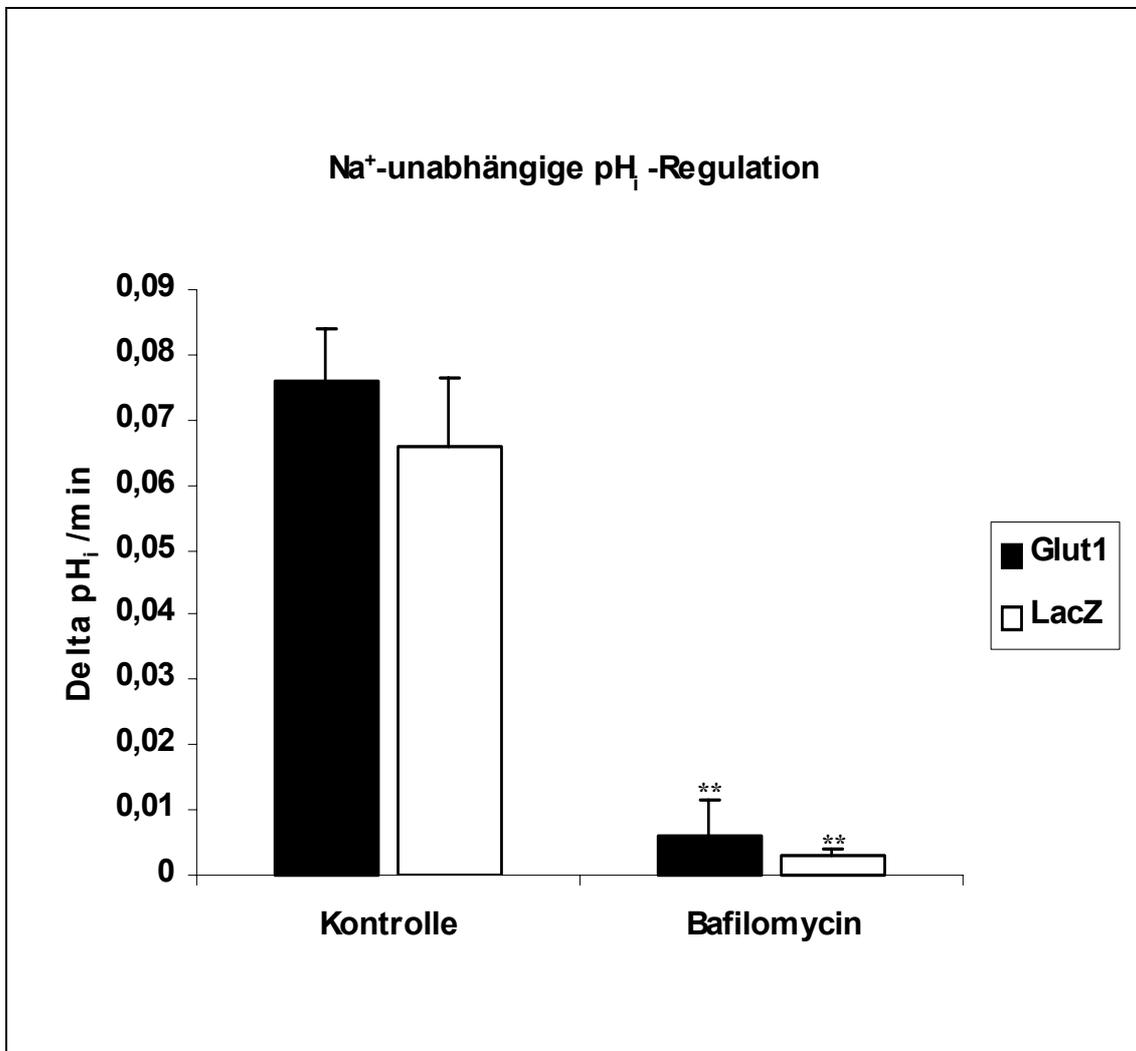
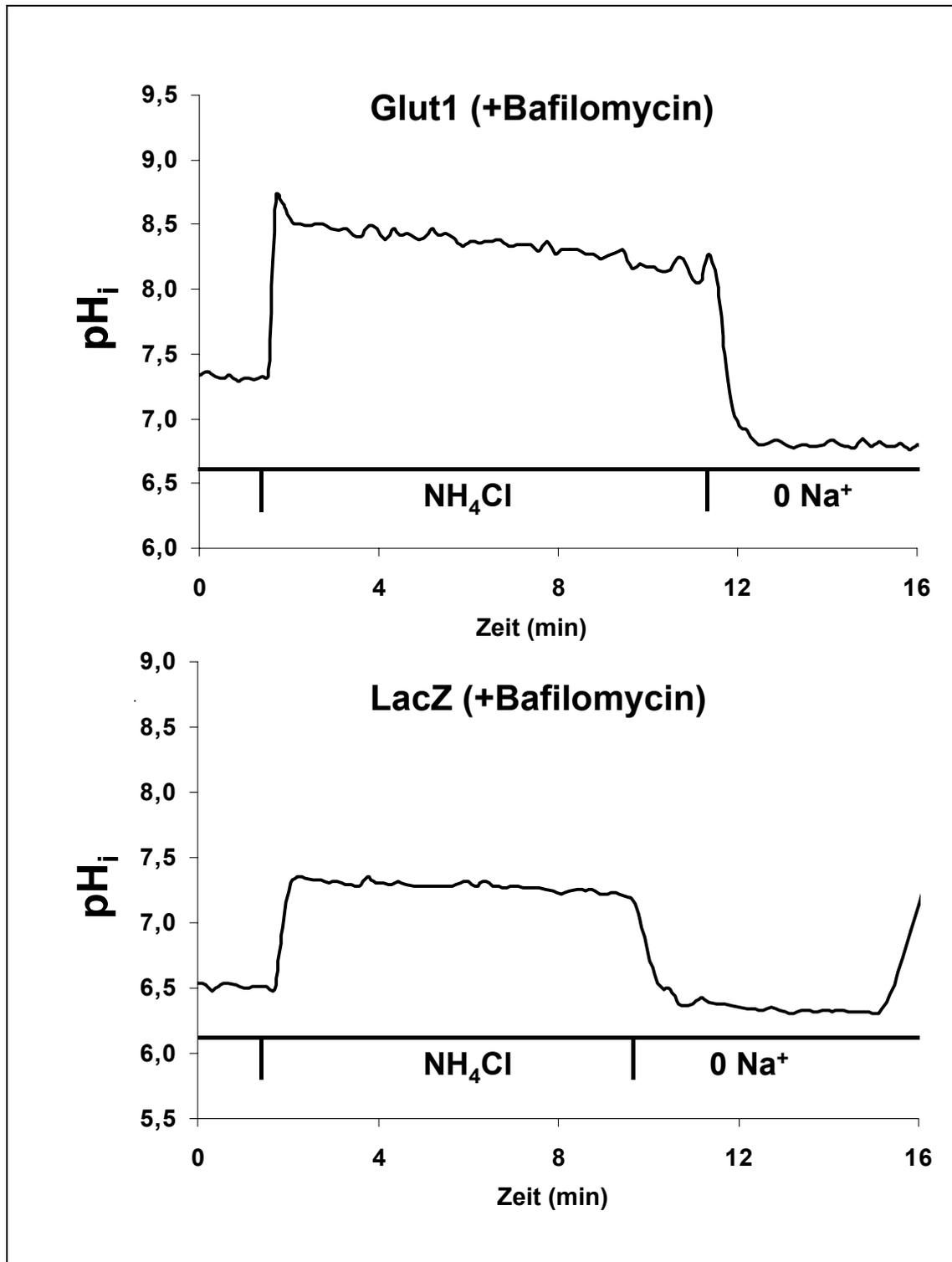
Abbildung 3-5: H⁺-ATPase-Hemmung mit Bafilomycin

Abbildung 3-6: Originalaufzeichnung der Natrium-unabhängigen pH_i -Regulation nach Bafilomycin-Vorinkubation



3.4 Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation

Die Bedeutung der Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation in Glut1 und LacZ wurde durch Wiedergabe von natriumhaltiger Perfusionslösung (Tabelle 2-3) nach vorübergehender natriumfreier Perfusionslösung untersucht (Tabelle 2-5). Nachdem durch Austausch des Natrium gegen NMDG⁺ eine deutliche und schnelle Absenkung des pH_i -Wertes bewirkt wurde (Abbildung 3-7), kam es in der anschließenden Reperfusionphase mit Standardlösung zu einer schnellen Realkalinisierung des Zytosols bei Glut1- und LacZ-Zellen. Dabei konnte für Glut1 eine Rate von $1,582 \pm 0,260 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=5$) für LacZ eine Rate von $0,982 \pm 0,159 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=5$) ermittelt werden. Die Realkalinisierung ist dabei in Glut1 signifikant schneller als in LacZ ($p<0,05$)

Weiterhin wurde die Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation nach intrazellulärer Ansäuerung mittels Ammoniumchlorid-Puls bestimmt (Abbildung 3-8). Die Geschwindigkeit des pH_i -Wert-Anstiegs betrug dabei in Glut1 $0,843 \pm 0,090 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=9$) und in LacZ $0,579 \pm 0,056 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=8$). Die T-Test-Berechnung ergibt einen signifikant schnelleren Anstieg des pH_i -Wertes in Glut1 als in LacZ ($p=0,018$). Diese können ein Hinweis auf eine Stimulation der Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation in Glut1-Zellen sein.

Die Betrachtung der Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation nach dem Meßzeitpunkt (24h, 48h und 72h nach dem Aussäen) ergibt die folgenden Ergebnisse (mit Ammoniumchlorid-Puls). In Glut1 24h $0,65 \pm 0,18 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=4$), nach 48h $1,13 \pm 0,19 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=4$), nach 72h $0,75 \pm 0,21 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=3$). In LacZ-Zellen konnten folgende Geschwindigkeiten gemessen werden: Zum Meßzeitpunkt 24h $0,86 \pm 0,19 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=4$), nach 48h $0,45 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=3$) und 72h nach dem Aussäen $0,49 \pm 0,12 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=3$). Nur nach 48h war der Unterschied zwischen den Zellen signifikant.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen die Tabelle 3-6, Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8.

Tabelle 3-6: Natrium-abhängige pH_i -Regulation ohne Ammoniumchlorid-Puls

	<i>Glut1</i>	<i>LacZ</i>
Mittelwert ($\Delta pH_i/\text{min}$)	1,582	0,982
Standardfehler	0,260	0,159
T-Test, <i>Glut1/LacZ</i> (p)		<0,05
Versuchsanzahl (n)	5	5

Tabelle 3-7: Natrium-abhängige pH_i -Regulation mit Ammoniumchlorid-Puls

	<i>Glut1</i>	<i>LacZ</i>
Mittelwert ($\Delta pH_i/\text{min}$)	0,0759	0,0658
Standardfehler	0,008	0,010
T-Test, <i>Glut1/LacZ</i> (p)		0,45
Versuchsanzahl (n)	9	8

Tabelle 3-8 Natrium-abhängige pH_i -Regulation nach 24h, 48h und 72h

	<i>Glut1</i>			<i>LacZ</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Mittelwert ($\Delta pH_i/\text{min}$)	0,65	1,13	0,75	0,86	0,45	0,49
Standardfehler	0,18	0,19	0,21	0,19	0,01	0,12
T-Test, <i>Glut1/ LacZ</i> (p)				0,45	0,03	0,34
T-Test, 24h/72h (p)		0,11	0,72		0,11	0,16
Versuchsanzahl (n)	4	4	3	4	3	3

Abbildung 3-7: Originalaufzeichnung der Natrium-abhängigen pH_i -Regulation in GLUT1 und LacZ ohne Ammoniumchlorid-Puls

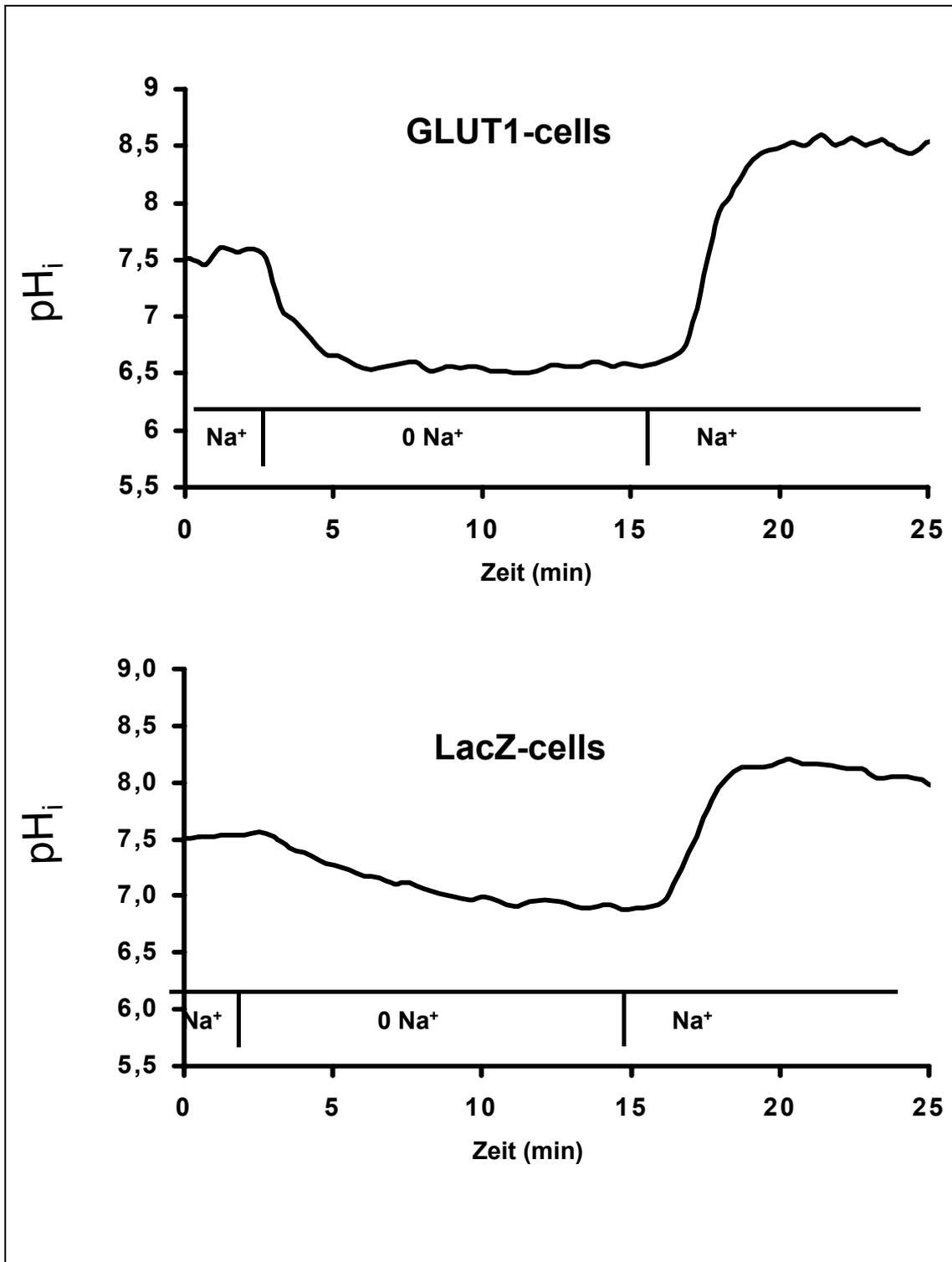


Abbildung 3-8: Originalaufzeichnung der Natrium-abhängigen pH_i -Regulation in GLUT1 und LacZ mit Ammoniumchlorid-Puls

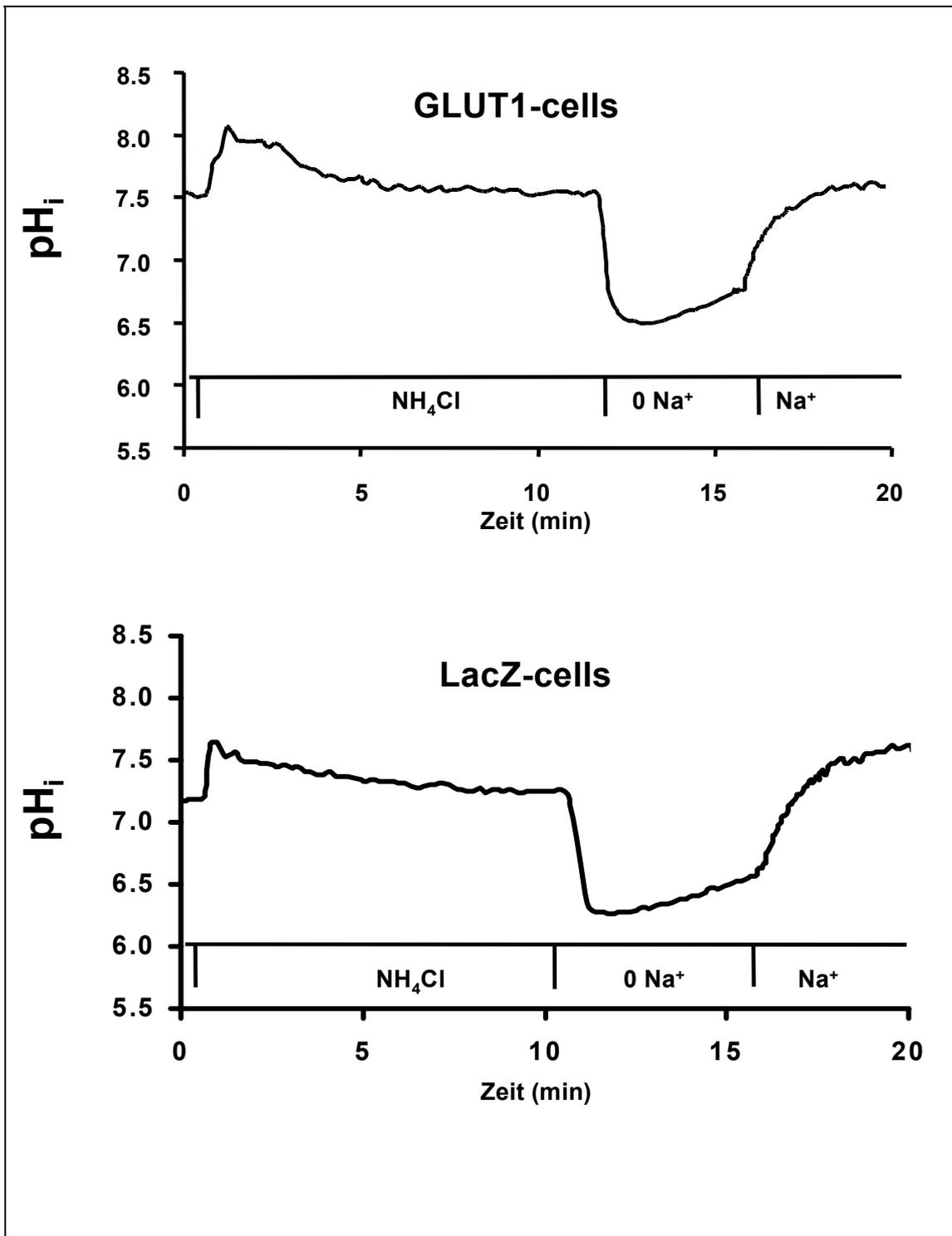


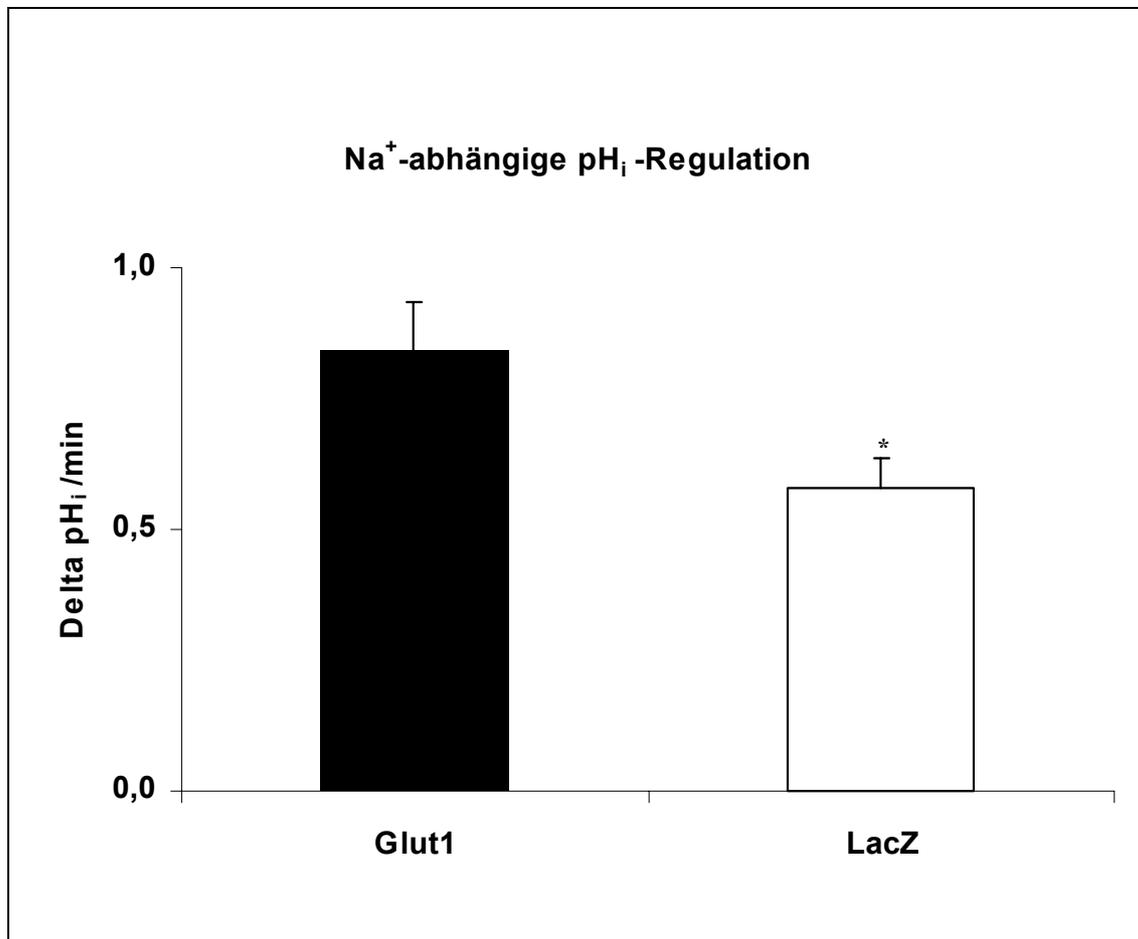
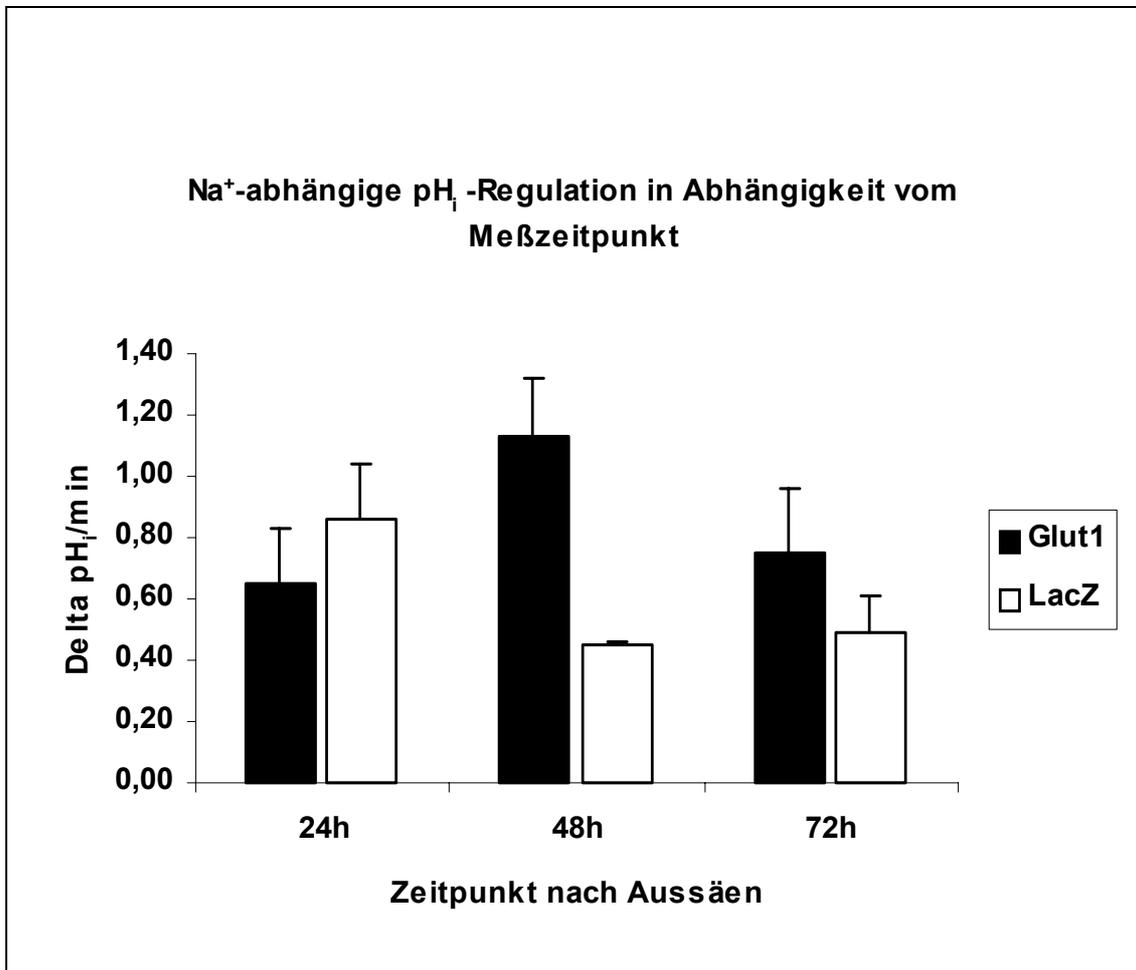
Abbildung 3-9: Natrium-abhängige pH_i -Regulation

Abbildung 3-10: Natrium-abhängige pH_i -Regulation nach 24h, 48h und 72h

3.5 Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation unter Natrium-Protonen-Austauscher-Hemmung mit 5'(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid (EIPA)

Der Einsatz des Natrium-Protonen-Austauscher-Hemmers (EIPA) ermöglicht eine weitergehende Differenzierung der Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation. EIPA ist ein spezifischer Hemmer des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE), der konzentrationsabhängig die drei unterschiedlichen Isoformen NHE1, NHE2 und NHE3 des Na^+/H^+ -Austauschers reversibel hemmen kann. Die drei Isoformen können anhand ihrer kinetischen Eigenschaften unterschieden werden. Dabei ist die Affinität von NHE1 für Na^+ 2fach niedriger als für NHE3. Eine Differenzierung der Isoformen kann auch aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität für EIPA vorgenommen werden (Orlowski & Kandasamy, 1996; Praetorius *et al.*, 2000). Üblicherweise wird für die Blockade des NHE3 mit 30 μM die höchste Wirkdosis benötigt, um eine Hemmung zu erreichen, zur Hemmung von NHE2 wird eine Konzentration von 2,0 μM verwendet, für die Inhibition des NHE1 benötigt man eine Konzentration von 0,1 μM (Yu *et al.*, 1993; Orlowski, 1993).

Bei den Messungen dieser Arbeit wurde den verwendeten Perfusionslösungen in einer Meßreihe EIPA in einer Konzentration von 2,0 μM in einer zweiten Meßreihe 0,1 μM EIPA zugesetzt. Bei der Versuchsdurchführung wurde zunächst, wie bei allen anderen Meßreihen auch, mit Standardlösung ohne EIPA-Zusatz, anschließend mit Ammoniumchlorid-Puls ebenfalls ohne EIPA perfundiert. Den darauf folgenden Perfusionslösungen (0-Natrium-Lösung und erneut Natrium-haltige Standardlösung) wurde EIPA in der jeweils angegebenen Konzentration zugefügt.

Es zeigte sich der Behandlung mit 2,0 μM EIPA eine hoch signifikante Abnahme der Natrium-abhängigen Realkalinisierung in Glut1 von $0,013 \pm 0,02 \Delta pH/min$ ($n=4$) (Glut1 ohne EIPA $0,843 \pm 0,090 \Delta pH/min$) und in LacZ von $0,012 \pm 0,001 \Delta pH/min$ ($n=4$) (LacZ ohne EIPA $0,579 \pm 0,056 \Delta pH/min$). Signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien konnten dabei nicht beobachten beobachtet werden.

Eine daraufhin durchgeführte Meßreihe mit der geringeren EIPA-Konzentration von 0,1 μM bei ansonsten identischem Versuchsprotokoll ergab die folgenden beschriebenen Werte. Auch bei 0,1 μM EIPA wurde eine im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikante Verlangsamung der Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation in *Glut1* von $0,040 \pm 0,012 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=4$) und in *LacZ* von $0,040 \pm 0,013 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=4$) beobachtet. Auch bei dieser Meßreihe ergab sich keine signifikante Abweichung zwischen den Zelllinien *Glut1* und *LacZ*. Weiterhin ergab sich kein Unterschied im Sinne einer Signifikanz zwischen der Meßreihe 2,0 μM EIPA und 0,1 μM EIPA.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit Gegenüberstellung der bereits oben beschriebenen Kontrollgruppe findet sich in Tabelle 3-9.

Tabelle 3-9: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation unter Na^+/H^+ -Austauscher-Hemmung mit EIPA 2,0 μM und EIPA 0,1 μM

	<i>Glut1</i>			<i>LacZ</i>		
	Kein EIPA	2,0 μM EIPA	0,1 μM EIPA	Kein EIPA	2,0 μM EIPA	0,1 μM EIPA
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	0,843	0,013	0,040	0,579	0,012	0,040
Standardfehler	0,090	0,002	0,012	0,056	0,001	0,013
T-Test, <i>Glut1</i> / <i>LacZ</i> (p)				0,018	0,58	0,97
Versuchszahl (n)	9	4	4	8	4	4

Abbildung 3-11: Originalaufzeichnung des Na^+/H^+ -Austauschers unter Hemmung mit EIPA $2,0 \mu\text{M}$ in Glut1 und LacZ

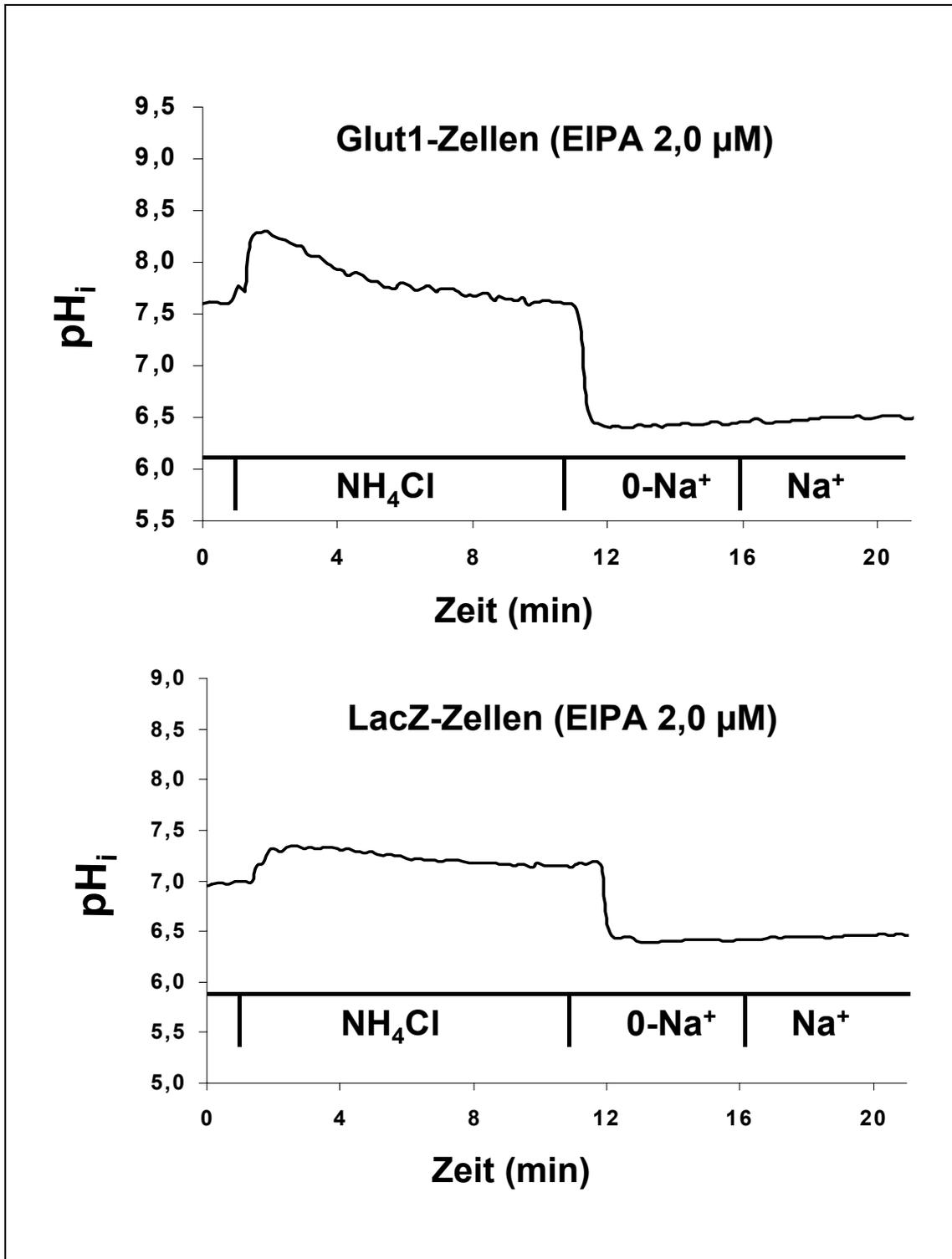


Abbildung 3-12: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation unter Na^+/H^+ -Austauscher-Hemmung mit EIPA 2,0 μM und EIPA 0,1 μM

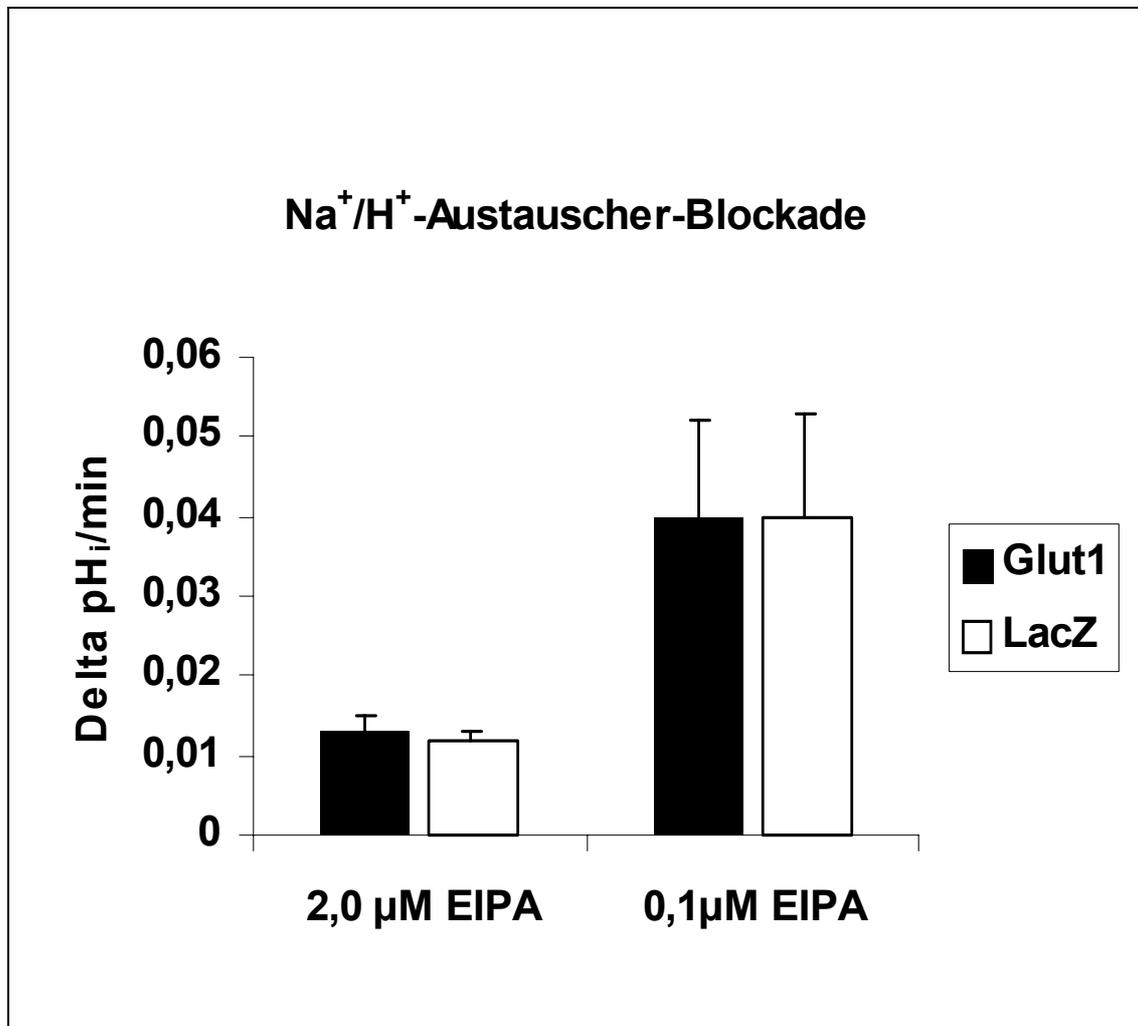
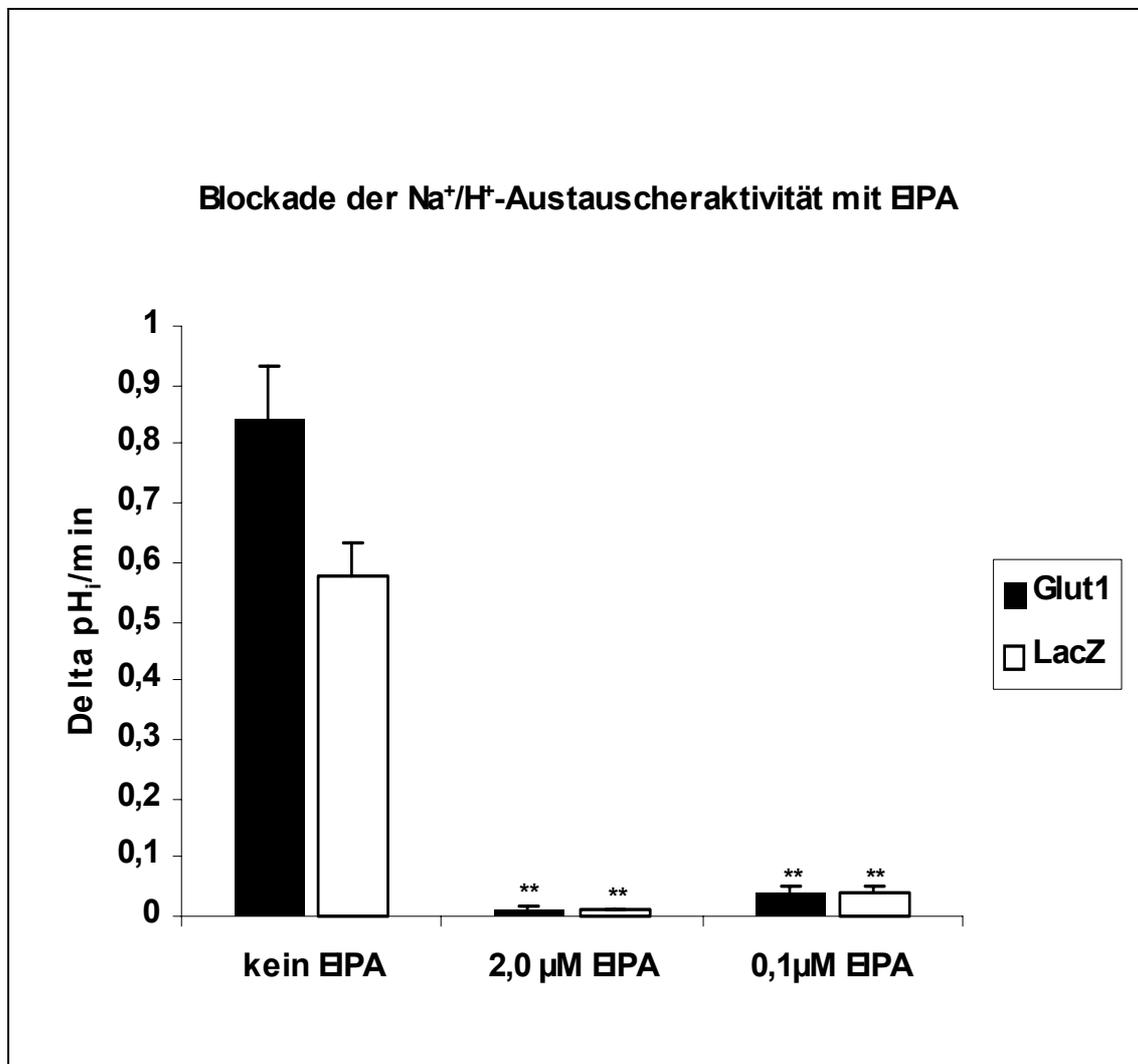


Abbildung 3-13: Na^+/H^+ -Austauscher-Hemmung mit EIPA 2,0 μM und EIPA 0,1 μM im Vergleich zur Kontrolle (ohne EIPA)



3.6 *pH_i-Wert-Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat*

Zur Untersuchung des Einflusses des Bikarbonat-Chlorid-Austauschers ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauschers) auf den zytosolischen pH wurden zusätzlich Messungen mit Bikarbonat-haltigen Perfusionslösungen durchgeführt. Die genannten Lösungen enthielten 24mM Cholin-Bikarbonat statt HEPES sowie 1 mM HCl. Es wurde kontinuierlich ein Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% Luft in die Lösungen eingeleitet. Unter den genannten Bedingungen stellte sich das $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Gleichgewicht bei einem pH-Wert von 7,4 ein. Das Versuchsprotokoll entspricht den verwendeten Protokollen der oben beschriebenen Messungen in Anwesenheit von HEPES. Die Reihenfolge der Perfusionslösungen war Standard-Bikarbonat, 0-Natrium-Bikarbonat, $\text{NH}_4\text{Cl}/0$ -Natrium-Bikarbonat und abschließend erneut Standard-Bikarbonat (Tabelle 2-6).

Die Natrium-unabhängige Realkalinisierung nach Ammoniumchlorid-Puls in Anwesenheit von Bikarbonat betrug in Glut1 $0,036 \pm 0,012 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=7$) (in Anwesenheit von HEPES $0,076 \pm 0,008 \Delta\text{pH}/\text{min}$) und in LacZ $0,014 \pm 0,003 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=7$) (die Kontrolle mit HEPES $0,066 \pm 0,010 \Delta\text{pH}/\text{min}$). Es ergibt sich kein signifikanter Geschwindigkeitsunterschied in Anwesenheit von Bikarbonat zwischen Glut1 und LacZ-Zellen ($p=0,13$). Der Vergleich der Ergebnisse in Glut1 zwischen Bikarbonat-Messung und HEPES-Messung ergibt eine signifikant niedrigere Realkalinisierungs-Geschwindigkeit in der Meßreihe mit Bikarbonat-haltigen Perfusionslösungen ($p=0,02$). Die Signifikanz-Berechnung für LacZ zeigt eine hoch signifikante Verlangsamung der Realkalinisierung in den Bikarbonat-gepufferten Experimenten ($p=0,001$).

Die Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation bei Reperfusion mit natriumhaltiger Standard-Bikarbonat-Lösung zeigt für Glut1 einen pH_i -Wert-Anstieg mit $1,08 \pm 0,15 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=7$) (bei HEPES-haltigen Perfusionslösungen $0,84 \pm 0,09 \Delta\text{pH}/\text{min}$), in LacZ einen pH_i -Wert-Anstieg von $0,89 \pm 0,10 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=7$) (Kontrolle mit HEPES $0,58 \pm 0,06 \Delta\text{pH}/\text{min}$). Es bestehen hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glut1 und LacZ-Zellen für die Natrium-

abhängige pH_i -Wert-Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat ($p=0,33$). Die Gegenüberstellung der Bikarbonat-Messungen mit den HEPES-Messungen ergibt für *Glut1* keine Signifikanz ($p=0,20$), für *LacZ* jedoch ergibt sich unter Bikarbonat-haltigen Perfusionslösungen eine signifikante Beschleunigung der Realkalinisierung bei Reperfusion mit Natrium ($p=0,02$).

Die Ergebnisse der Messungen mit Bikarbonat-Lösungen sind in Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11 zusammengefaßt.

Tabelle 3-10: Natrium-unabhängige pH_i -Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat

	<i>Glut1</i>		<i>LacZ</i>	
	HEPES- Puffer	Bikarbonat- Puffer	HEPES- Puffer	Bikarbonat- Puffer
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	0,076	0,036	0,066	0,014
Standardfehler	0,008	0,012	0,010	0,003
T-Test, <i>Glut1/LacZ</i> (p)				0,13
T-Test HEPES /Bikarbonat (p)		0,02		0,001
Versuchszahl (n)	9	7	8	7

Tabelle 3-11: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat

	<i>Glut1</i>		<i>LacZ</i>	
	HEPES- Puffer	Bikarbonat- Puffer	HEPES- Puffer	Bikarbonat- Puffer
Mittelwert (ΔpH_i /min)	0,84	1,08	0,58	0,89
Standardfehler	0,09	0,15	0,06	0,10
T-Test, Glut1/LacZ (p)				0,33
T-Test HEPES /Bikarbonat (p)		0,20		0,02
Versuchszahl (n)	9	7	8	7

Abbildung 3-14: Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat versus HEPES

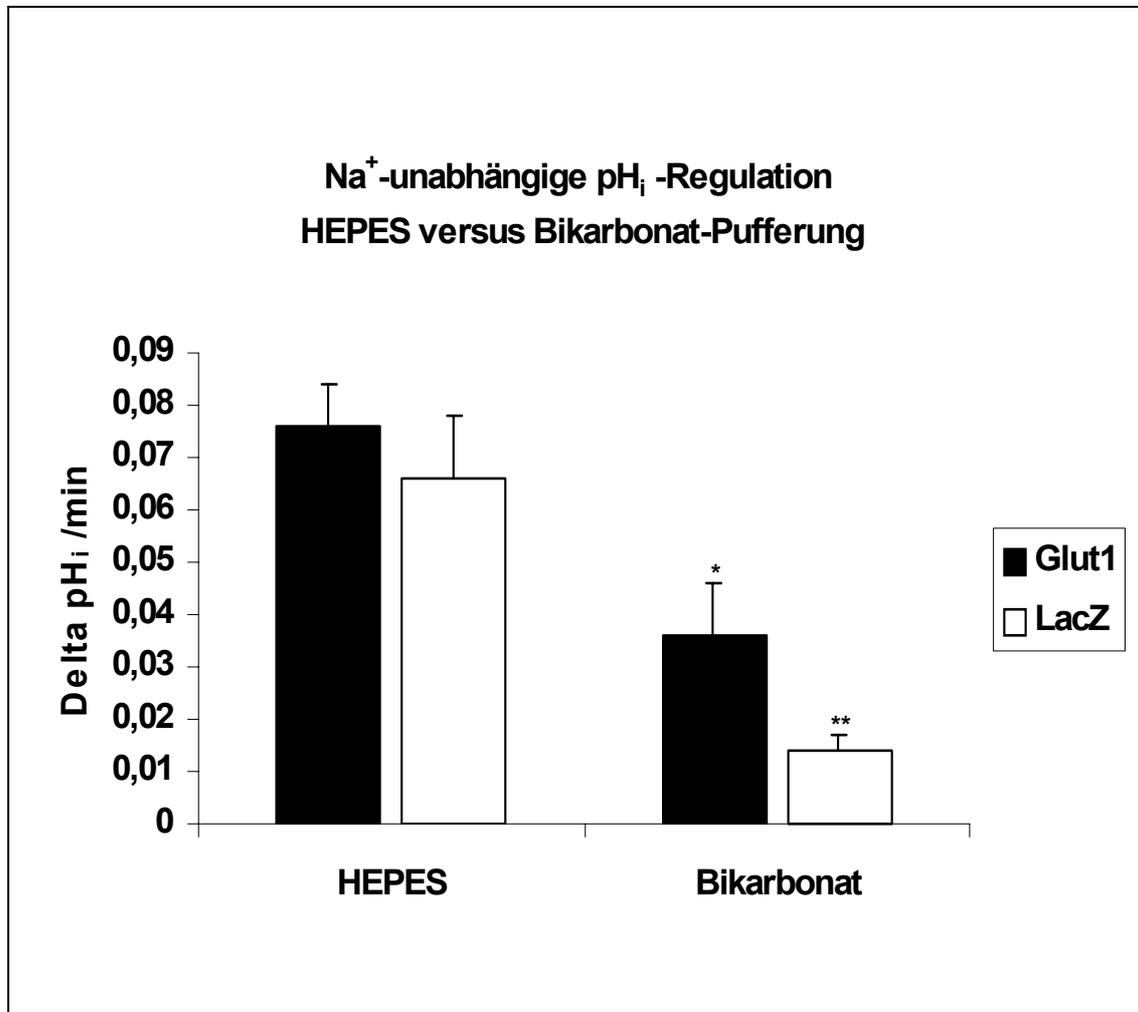
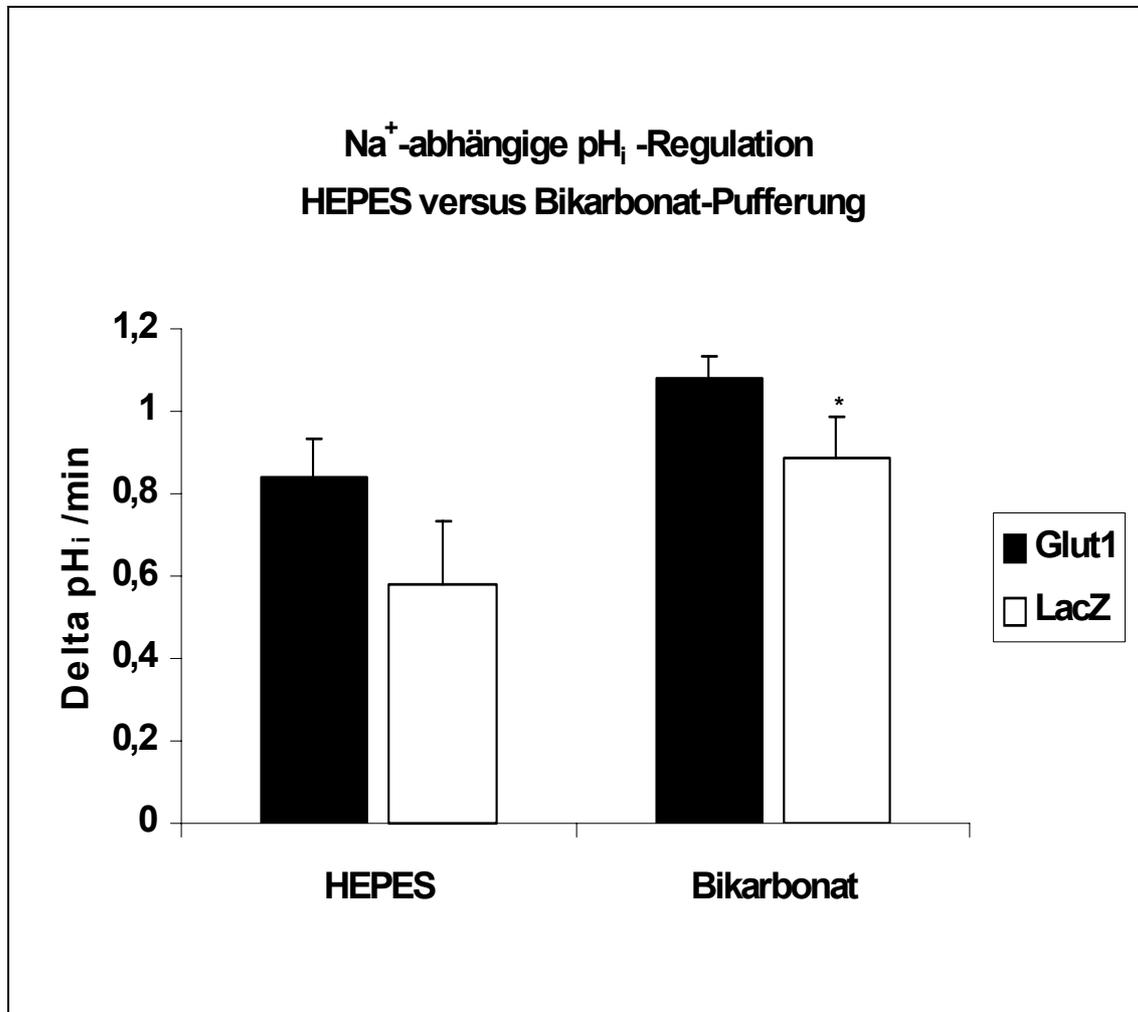


Abbildung 3-15: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation in Anwesenheit von Bikarbonat anstatt HEPES



3.7 Laktat-abhängige zytosolische Azidifizierung

3.7.1 Gekoppelter Laktat/Protonen-Transport in Glut1- und LacZ-Zellen

Um die Expression eines gekoppelten Laktat/Protonen-Transports zu untersuchen, wurden die Glut1- und LacZ-Zellen einer Laktat-Perfusionslösung mit 40 mM Natrium-Laktat im Austausch gegen 40 mM NaCl (Tabelle 2-7) ausgesetzt. Das Versuchsprotokoll startet mit Perfusion mit Standard-Lösung gefolgt von Perfusion mit Natrium-Laktat-Lösung. Die Perfusion mit Natrium-Laktat führt zu einem schnellen Abfall des pH_i -Wert (signalisiert durch negatives Vorzeichen) in Glut1 mit einer Geschwindigkeit von $-1,47 \pm 0,17 \Delta pH/min$ ($n=8$). In LacZ-Zellen kommt es zu einer Azidifizierung des Zytosols mit einer Geschwindigkeit von $-1,10 \pm 0,08 \Delta pH/min$ ($n=10$). Die Geschwindigkeit von Glut1 und LacZ ist dabei nicht signifikant unterschiedlich zueinander ($p=0,073$). Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabelle 3-12.

Zur weitergehenden Untersuchung dieses Laktat/Protonen-Transports hinsichtlich Substratspezifität und Natrium-Abhängigkeit wurden an LacZ-Zellen Messungen mit Natrium-Pyruvat-Perfusion und Tris-Pyruvat-Perfusion durchgeführt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle 2-13 angegeben.

Die Perfusion von LacZ mit Natrium-Pyruvat ergab einen pH_i -Wert-Abfall mit einer Rate von $-1,02 \pm 0,20 \Delta pH/min$ ($n=4$) (bei Natrium-Laktat $-1,10 \pm 0,08 \Delta pH/min$). Perfusion mit natriumfreier Tris-Pyruvat-Perfusionslösung zeigt eine Azidifizierungsgeschwindigkeit von $-1,13 \pm 0,62 \Delta pH/min$ ($n=3$). Es besteht weder für Natrium-Pyruvat- ($p=0,72$) noch für Tris-Pyruvat-Perfusion ($p=0,96$) eine signifikante Geschwindigkeitsveränderung. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-13 angegeben.

Tabelle 3-12: Natrium-Laktat-Einstrom in Glut1 und LacZ

	<i>Natrium-Laktat-Einstrom</i>	
	Glut1	LacZ
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	-1,47	-1,10
Standardfehler	0,17	0,08
T-Test, Glut1/LacZ (p)		0,073
Versuchsanzahl (n)	8	10

Tabelle 3-13: Na^+ -Laktat-, Na^+ -Pyruvat- und Tris-Pyruvat-induzierte zytosolische Azidifizierung in LacZ-Zellen

	<i>LacZ-Zellen</i>		
	Na^+ -Laktat	Na^+ -Pyruvat	Tris-Pyruvat
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	-1,10	-1,02	-1,13
Standardfehler	0,08	0,20	0,62
T-Test, Glut1/LacZ (p)		0,72	0,96
Versuchsanzahl (n)	8	4	3

Abbildung 3-16: Originalaufzeichnung Laktat/Protonen-Einstrom in Glut1 und LacZ

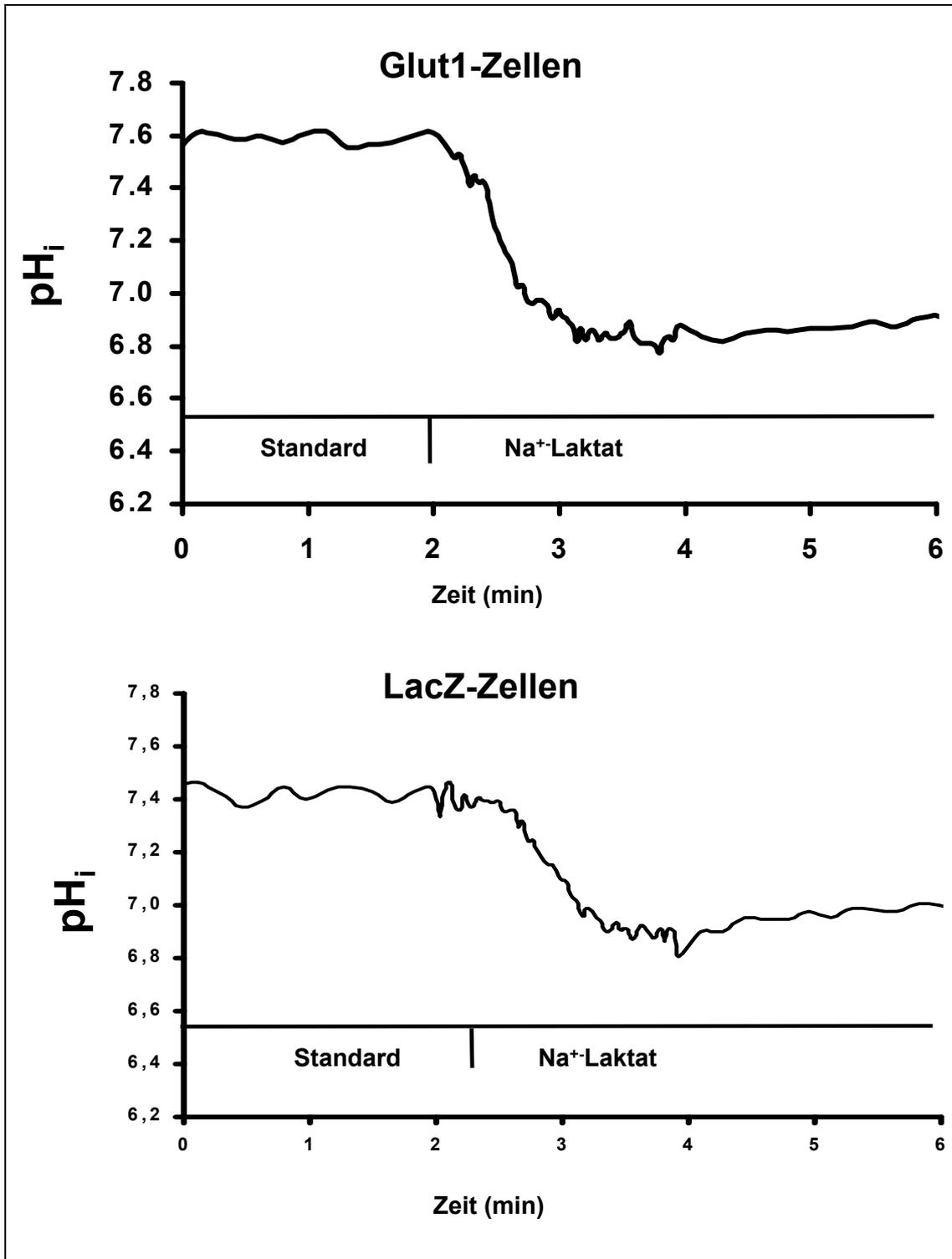
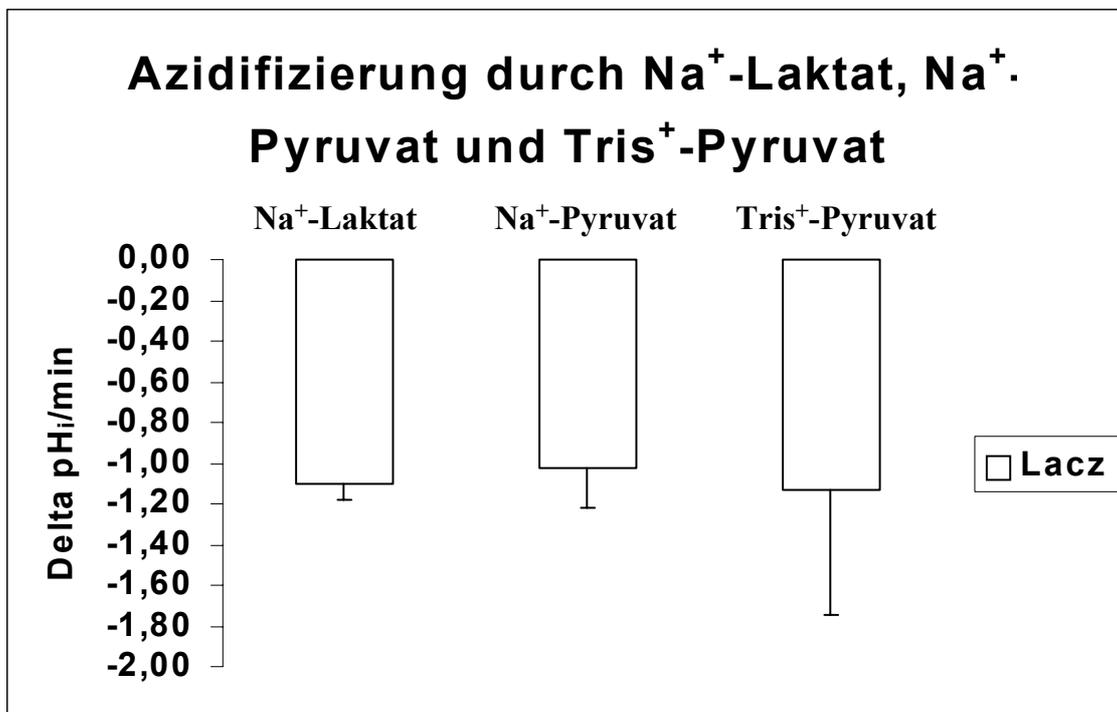
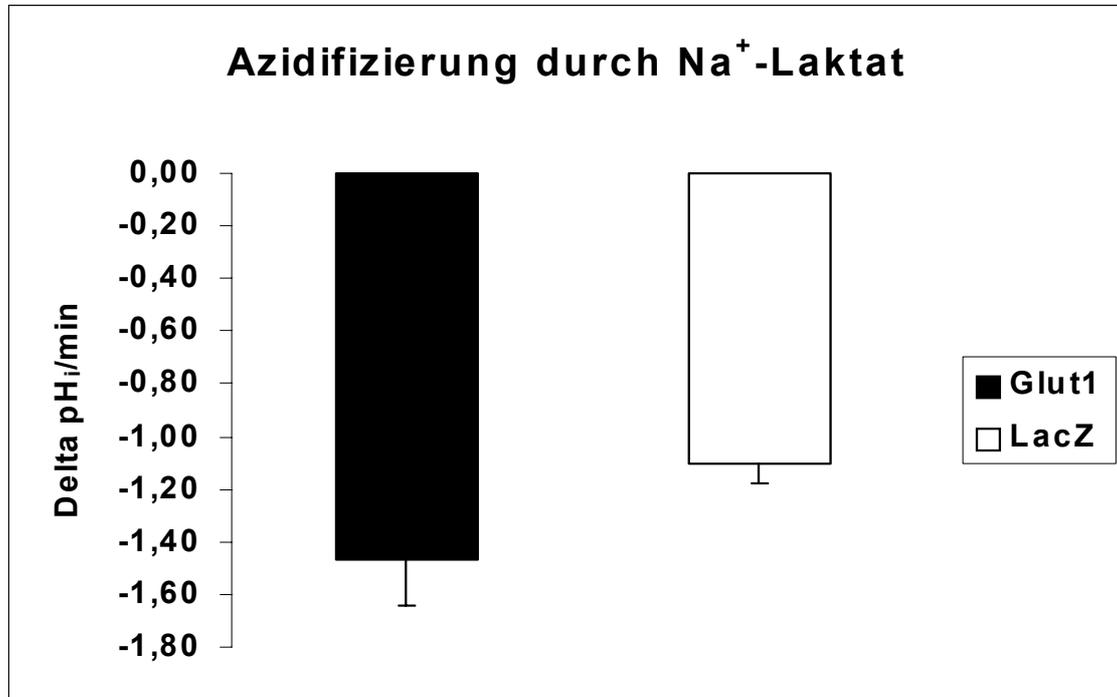


Abbildung 3-17: Zytoplasmatische Azidifizierung durch Natrium-Laktat, Natrium-Pyruvat und Tris-Pyruvat



3.7.2 Kinetik und pharmakologische Hemmung des gekoppelten Laktat/Protonen-Transport

Zusätzliche Experimente wurden durchgeführt, um die Identität des Laktat/Protonen-Transportsystems weiter zu charakterisieren. Durch Messungen mit ansteigenden Natrium-Laktat-Konzentrationen (Zusammensetzung der Laktatkinetik-Perfusionslösungen siehe Tabelle 2-12) konnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Azidifizierungsgeschwindigkeit und Natrium-Laktat-Konzentration erstellt werden. Es ergab sich dabei eine Sättigungskinetik mit einem K_m -Wert von $4,9 \pm 1,1$ mM ($n=3$). Dieses weist auf eine Monocarboxylattransporter-Isoform niedriger Affinität hin.

Die Ergebnisse bei den unterschiedlichen Natrium-Laktat-Konzentrationen sind in Tabelle 3-14 zusammengestellt.

Weitere Untersuchungen mit pharmakologischen Inhibitoren wurden durchgeführt, um die zytosolische Azidifizierung, der eine Isoform des Monocarboxylattransporters zu Grunde liegen kann, eingehender zu spezifizieren. An LacZ-Zellen wurde die Wirkung von 20 mM Saccharose ($-1,15 \pm 0,18$ $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$), 20 mM Sorbitol ($-1,08 \pm 0,14$ $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$), 20 mM Glukose ($-0,55 \pm 0,13$ $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$), 20 mM Ortho-MethylGluco-Pyranose (o-M-Glukose) ($-0,76 \pm 0,10$ $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) und 20 mM Harnstoff ($-1,71 \pm 0,16$ $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) geprüft, jeweils als Ersatz für 10 mM NaCl zur Konstanthaltung der Osmolarität der Perfusionslösungen (Zusammensetzung der Lösungen in Tabelle 2-8, Tabelle 2-9, Tabelle 2-10 und Tabelle 2-11). Alle Zellen wurden zunächst mit einer Standardlösung zuzüglich dem entsprechenden Zusatz perfundiert, nach Gleichgewichtseinstellung wurde dann eine Natrium-Laktat-haltige Lösung mit dem gleichen Zusatz in identischer Konzentration perfundiert. Die Signifikanz-Berechnung ergab keinen Unterschied für Saccharose ($p=0,82$) oder für Sorbitol ($p=0,90$). Der Zusatz von Glukose führte zu einer signifikanten Verlangsamung des pH_i -Wert-Abfalls ($p=0,011$), ebenso wie der Einsatz von o-M-Glukose ($p=0,03$). Verwendung von Harnstoff bewirkte eine signifikante Beschleunigung des pH_i -Wert-Abfalls ($p=0,02$).

Zusätzlich wurden an LacZ-Zellen Experimente mit dem Hemmstoff β -(4-Hydroxyphenyl)-2,4,6-trihydroxypropiophenon (Phloretin) in den Konzentrationen 10 μ M ($-1,02 \pm 0,09 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) und 100 μ M ($-0,16 \pm 0,01 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) als Zusatz zu den eingesetzten Lösungen durchgeführt. Weiterhin wurde eine 15-minütige Vorbehandlung mit dem Inhibitor p-chloromercuriphenyl-sulfonsäure (p-CMBS) in einer Konzentration von 1 mM ($-0,07 \pm 0,04 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) vorgenommen. Für Phloretin in einer Konzentration von 10 μ M ergab sich keine signifikante Veränderung der Ansäuerungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,49$). Bei einer Konzentration von 100 μ M Phloretin jedoch zeigte sich eine hoch signifikante Verlangsamung des pH_i -Wert-Abfalls ($p<0,001$). Ebenso hoch signifikant war die Verlangsamung nach einer Vorbehandlung mit 1 mM p-CMBS ($p<0,001$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist, in Tabelle 3-15 und Tabelle 3-16 zu sehen.

An Glut1-Zellen wurden zum Vergleich Untersuchungen mit 20 mM Saccharose ($-1,64 \pm 0,33 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=2$), 20 mM o-M-Glukose ($-0,60 \pm 0,11 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=2$), 100 μ M Phloretin ($-0,29 \pm 0,09 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) und 1 mM p-CMBS ($-0,22 \pm 0,04 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, $n=4$) durchgeführt. Dabei konnte für Saccharose ($p=0,71$) keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle in Glut1 ($-1,47 \pm 0,17 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$) festgestellt werden. Es ergaben sich jedoch hoch signifikante Verlangsamung des pH_i -Wert-Abfalls für o-M-Glukose ($p=0,004$), 100 μ M Phloretin ($p<0,001$) sowie p-CMBS 1 mM ($p<0,001$).

Die Ergebnisse sind als Übersicht zusätzlich in Tabelle 3-17 dargestellt.

Tabelle 3-14: Azidifizierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Natrium-Laktat-Konzentration

<i>Na⁺-Laktat-Konzentration</i>	<i>1 mM</i>	<i>5 mM</i>	<i>10 mM</i>	<i>15 mM</i>	<i>40 mM</i>
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	0,00	0,67	1,08	1,22	1,24
Standardfehler	0,00	0,32	0,22	0,09	0,15
Versuchsanzahl (n)	3	3	3	3	3

Tabelle 3-15: Pharmakologie des Laktat/Protonen-Transporters (Saccharose, Sorbitol, Harnstoff) in LacZ

	<i>Kontrolle</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Sorbitol</i>	<i>Harnstoff</i>
Mittelwert ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$)	-1,10	-1,15	-1,08	-1,71
Standardfehler	0,08	0,18	0,14	0,16
T-Test, gegen Kontrolle (p)		0,82	0,90	0,02
Versuchsanzahl (n)	10	4	4	4

Tabelle 3-16: Pharmakologie des Laktat/Protonen-Transporters (Glukose, o-M-Glukose, 10 μ M Phloretin, 100 μ M Phloretin, p-CMBS) in LacZ

	<i>Glukose</i>	<i>o-M-Glukose</i>	<i>Phloretin</i> 10 μ M	<i>Phloretin</i> 100 μ M	<i>p-CMBS</i>
Mittelwert (Δ pH _i /min)	-0,55	-0,76	-1,02	-0,16	-0,07
Standardfehler	0,13	0,10	0,09	0,01	0,04
T-Test, gegen Kontrolle (p)	0,011	0,03	0,49	<0,001	<0,001
Versuchsanzahl (n)	4	4	4	4	4

Tabelle 3-17: Pharmakologie des Laktat/Protonen-Transporters (Kontrolle, Saccharose, o-M-Glukose, 100 μ M Phloretin, p-CMBS) in Glut1-Zellen

	<i>Kontrolle</i>	<i>Saccharose</i>	<i>o-M-</i> <i>Glukose</i>	<i>Phloretin</i> 100 μ M	<i>p-CMBS</i>
Mittelwert (Δ pH _i /min)	-1,47	-1,64	-0,60	-0,29	-0,22
Standardfehler	0,17	0,33	0,11	0,09	0,04
T-Test, gegen Kontrolle (p)		0,71	0,004	<0,001	<0,001
Versuchsanzahl (n)	8	2	2	4	4

Abbildung 3-18: Dosis-Wirkungsbeziehung des gekoppelten Laktat/Protonen-Transportsystems

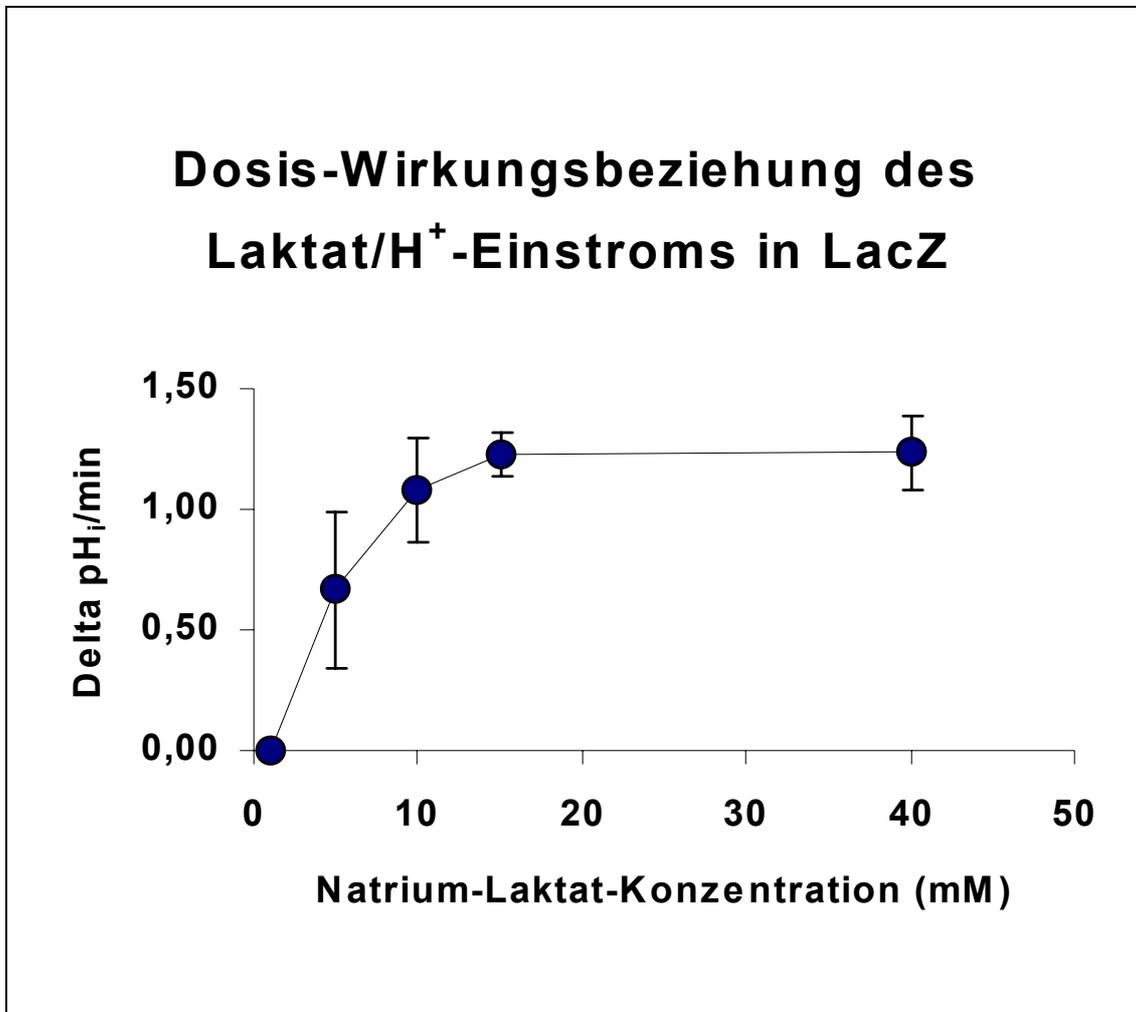


Abbildung 3-19: Pharmakologie der Natrium-Laktat-bedingten Azidifizierung in Glut1 und LacZ

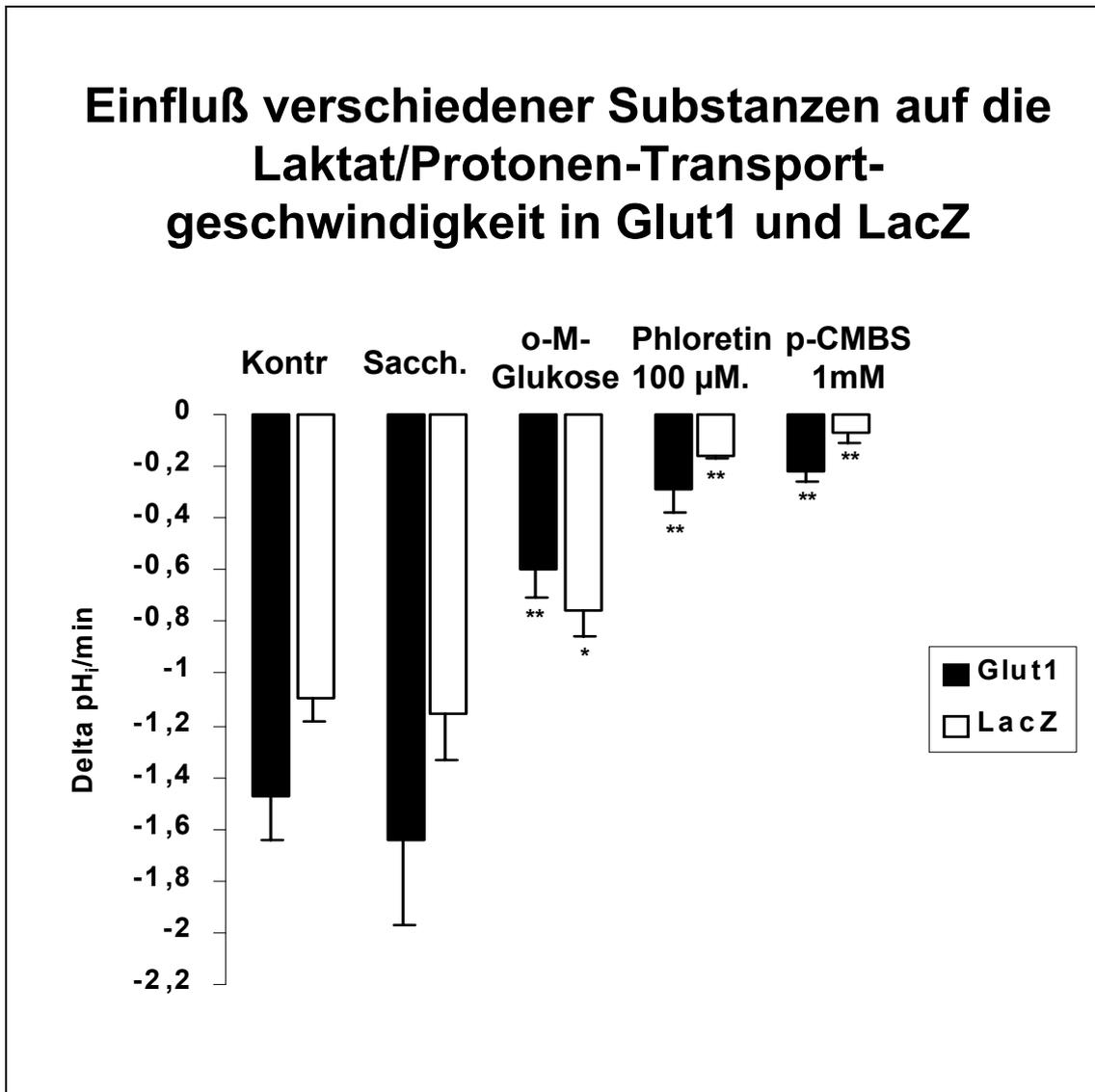
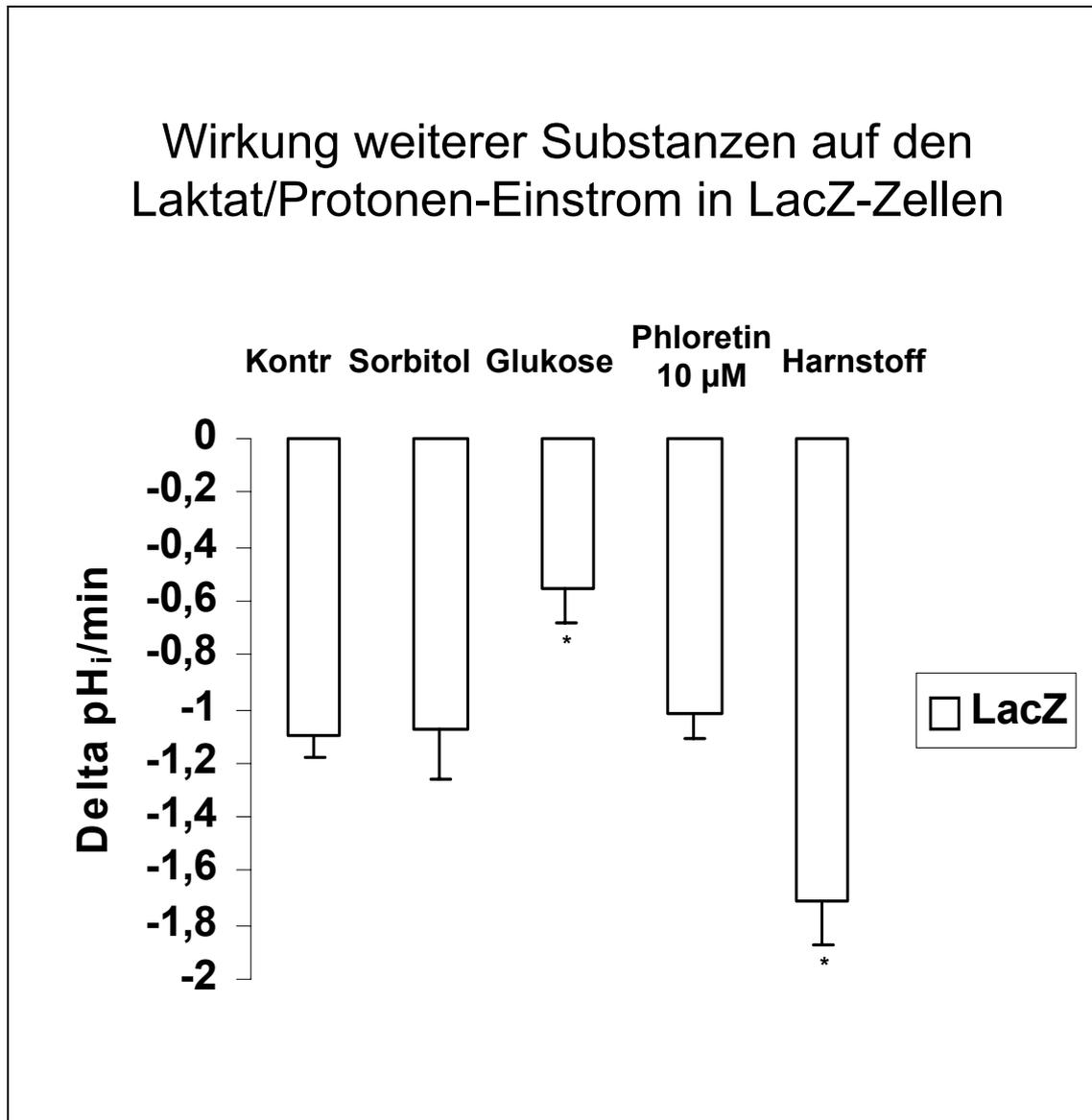


Abbildung 3-20: Wirkung weiterer Substanzen auf den Laktat/Protonen-Einstrom in LacZ-Zellen



3.8 pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-T-Lymphozyten unter Dexamethason

3.8.1 Ausgangs- pH_i -Wert in Jurkat-T-Lymphozyten unter Dexamethason

Um den Zusammenhang zwischen Glukose-Metabolismus und intrazellulärer pH_i -Wert-Regulation unter einer weiteren experimentellen Bedingung zu untersuchen, wurden pH_i -Wert-Messungen an Jurkat-T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) mit und ohne Vorbehandlung mit Dexamethason (1 μ M für 6h bzw. 24h) durchgeführt. Weitere Experimente wurden in An- und Abwesenheit von Serum durchgeführt.

Die Messungen des Ausgangs- pH_i -Wert ergaben für die unbehandelten Kontroll-Zellen einen pH_i -Wert von $7,54 \pm 0,06$ (n=10). Die über einen Zeitraum von 6h im Brutschrank mit einer Konzentration von 1 μ M Dexamethason (in Ethanol gelöst) vorbehandelten Jurkat-Zellen (Dex 6h) wiesen einen Ausgangs- pH_i -Wert von $7,48 \pm 0,08$ (n=10) auf. Vorbehandlung von Jurkat-Zellen mit 1 μ M Dexamethason über einen Zeitraum von 24h (Dex 24h) zeigte einen Ausgangs- pH_i -Wert von $7,10 \pm 0,06$ (n=6). Bei Jurkat-Zellen, die 6h vor der Messung in serumfreies Medium transferiert wurden (6h FCS-frei, fötales Rinderserum), konnte ein pH_i -Wert von $7,08 \pm 0,05$ (n=6) gemessen werden. Eine Serumdepletion bei gleichzeitiger Dexamethasonbehandlung über 6h (FCS-frei/Dex 6h) ergab einen pH_i -Wert von $7,38 \pm 0,08$ (n=6).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte für die Dex 6h-Gruppe (p=0,55) sowie die FCS-frei/Dex-6h-Gruppe (p=0,13) keine signifikante Veränderung des Ausgangs- pH_i -Wert festgestellt werden. Die FCS-frei-Gruppe wies einen hoch signifikant niedrigeren pH_i -Wert zu Beginn der Messung auf (p<0,0001). Bei der Dex 24h-Gruppe war der pH_i -Wert ebenfalls hoch signifikant niedriger (p=0,003).

Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 3-18, eine Darstellung die Abbildung 3-21.

3.8.2 Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

Entsprechend den Untersuchungen an Glut1 und LacZ-Zellen wurde auch an Jurkat-Zellen die Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation gemessen. Das Versuchsprotokoll entsprach dabei den oben beschriebenen Experimenten. Es wurde zunächst mit Standard-Lösung perfundiert (Tabelle 2-3), anschließend ein Ammoniumchlorid-Puls (Tabelle 2-4) zur Ansäuerung des Zytosols durchgeführt. Daraufhin wurde mit natriumfreier Perfusionslösung (Tabelle 2-5) perfundiert, so daß zunächst die Natrium-unabhängigen pH_i -Wert-Regulationsmechanismen untersucht werden konnten.

Dabei zeigte sich in der Kontrolle eine Realkalinisierungs-Geschwindigkeit von $0,035 \pm 0,005 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=10$). Die Realkalinisierungsrate in 6h Dex betrug $0,049 \pm 0,004 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=10$), von 24h Dex $0,036 \pm 0,005 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=6$). In der FCS-freien Gruppe zeigte sich ein pH_i -Wert-Anstieg mit einer Geschwindigkeit von $0,043 \pm 0,007 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=6$). Die FCS-frei/6h Dex-Gruppe regulierte den pH_i -Wert mit einer Rate von $0,029 \pm 0,003 \Delta\text{pH}/\text{min}$ ($n=6$).

Die Signifikanz-Berechnung ergab für 6h Dex eine signifikante Beschleunigung ($p=0,04$), für alle anderen Gruppen ließen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen. 24h Dex ($p=0,83$), FCS-frei ($p=0,35$) und FCS-frei/6h Dex ($p=0,31$).

Die Ergebnisaufstellung findet sich in Tabelle 3-19.

Tabelle 3-18: Ausgangs-pH_i-Wert in Jurkat-T-Lymphozyten

	<i>Kontrolle</i>	<i>Dex 6h</i>	<i>Dex 24h</i>	<i>FCS-frei</i>	<i>FCS-frei/Dex 6h</i>
Mittelwert (pH)	7,54	7,48	7,10	7,08	7,38
Standardfehler	0,06	0,08	0,06	0,05	0,08
T-Test, gegen Kontrolle (p)		0,55	0,0003	<0,0001	0,13
Versuchszahl (n)	10	10	6	6	6

Tabelle 3-19: Natrium-unabhängige pH_i-Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

	<i>Kontrolle</i>	<i>Dex 6h</i>	<i>Dex 24h</i>	<i>FCS-frei</i>	<i>FCS-frei/Dex 6h</i>
Mittelwert (ΔpH/min)	0,035	0,049	0,036	0,043	0,029
Standardfehler	0,005	0,004	0,005	0,007	0,003
T-Test, gegen Kontrolle (p)		0,04	0,83	0,35	0,31
Versuchszahl (n)	10	10	6	6	6

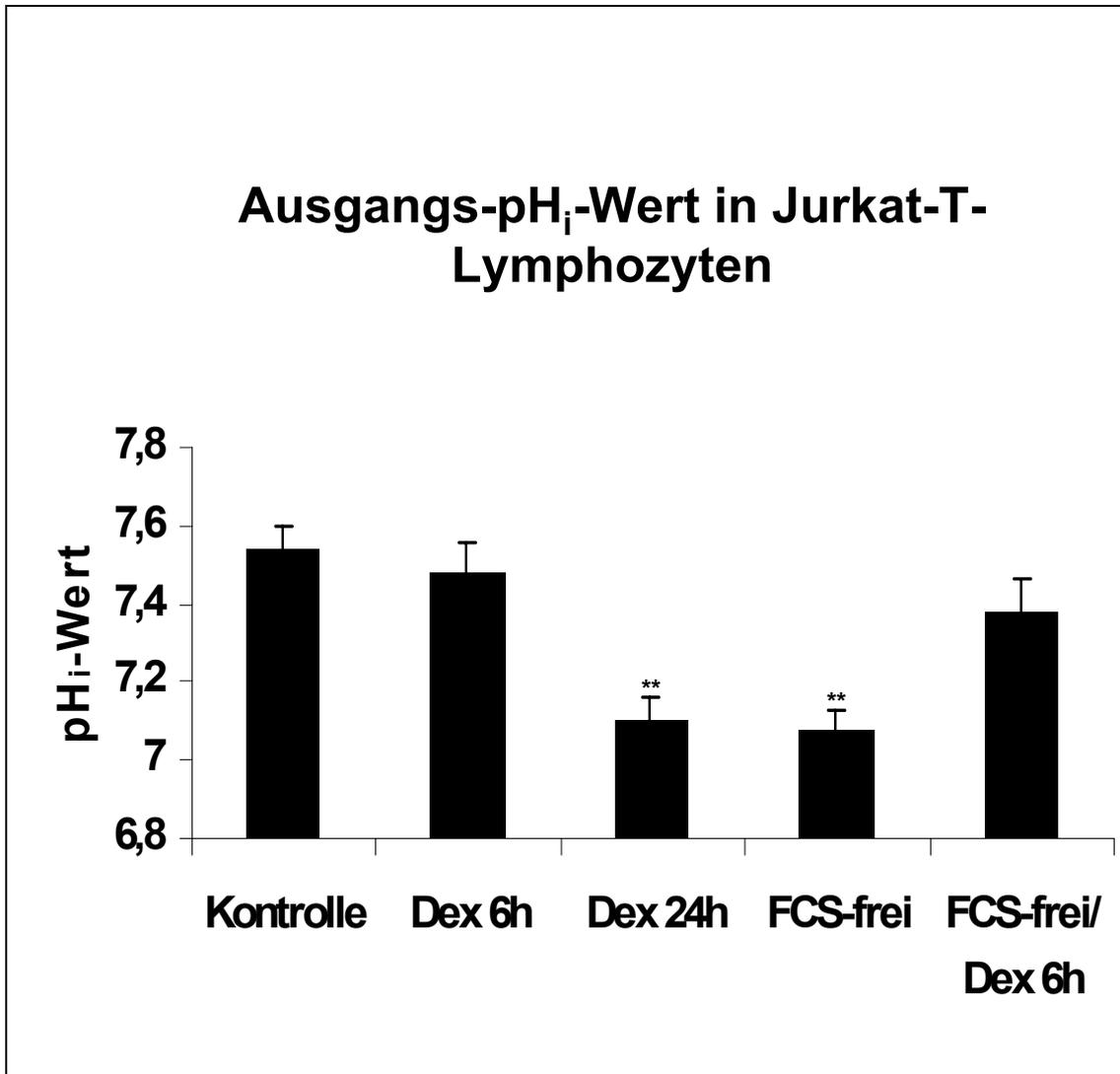
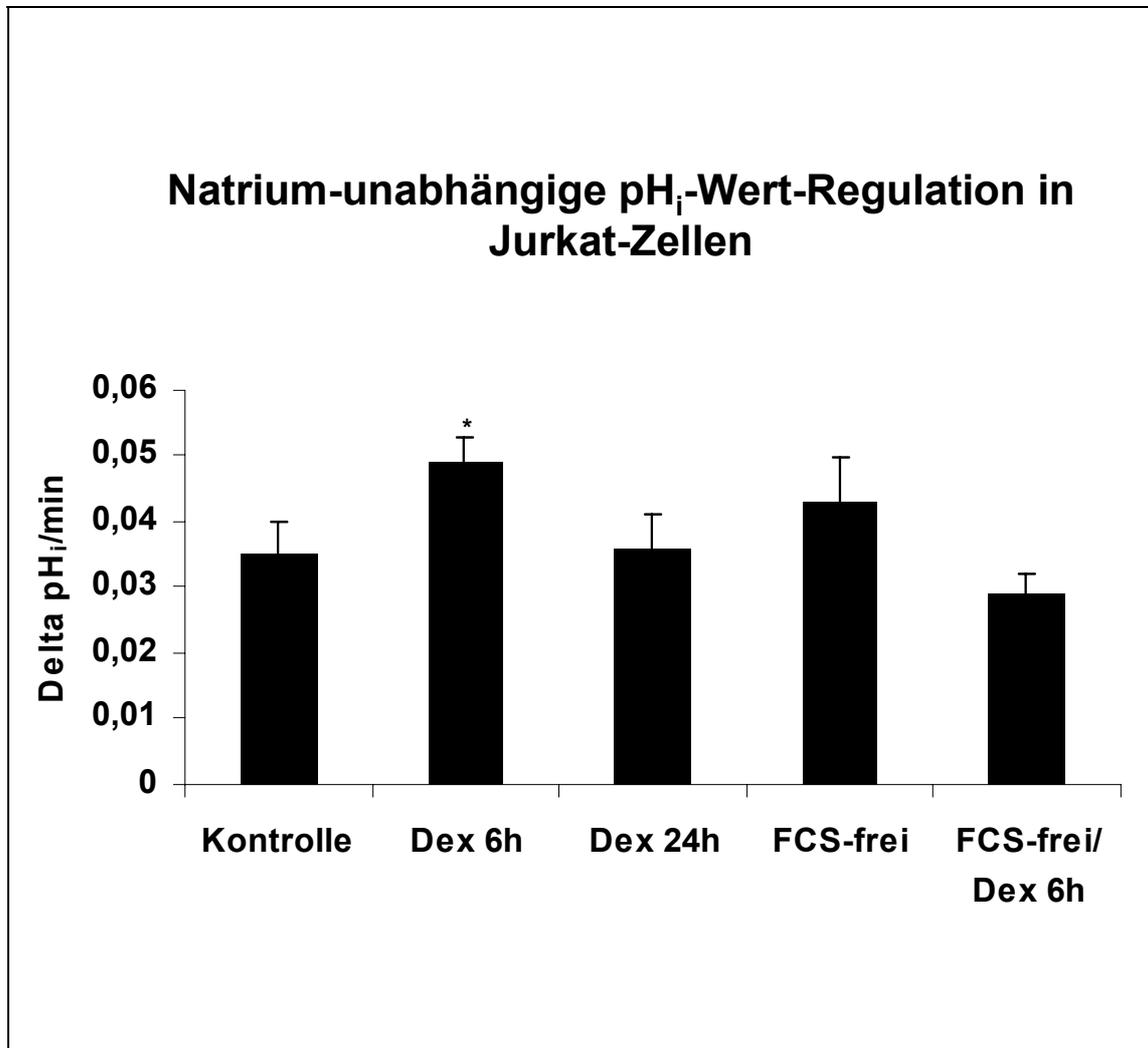
Abbildung 3-21: Ausgangs-pH_i-Wert in Jurkat-T-Lymphozyten

Abbildung 3-22: Natrium-unabhängige pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

3.8.3 Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

Die Untersuchungen zur Natrium-abhängigen pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen erfolgte entsprechend den Messungen in Glut1 und LacZ-Zellen. Das Versuchsprotokoll aus 3.8.2 wurde mit einer abschließenden Reperfusionphase mit natriumhaltiger Standard-Lösung erweitert.

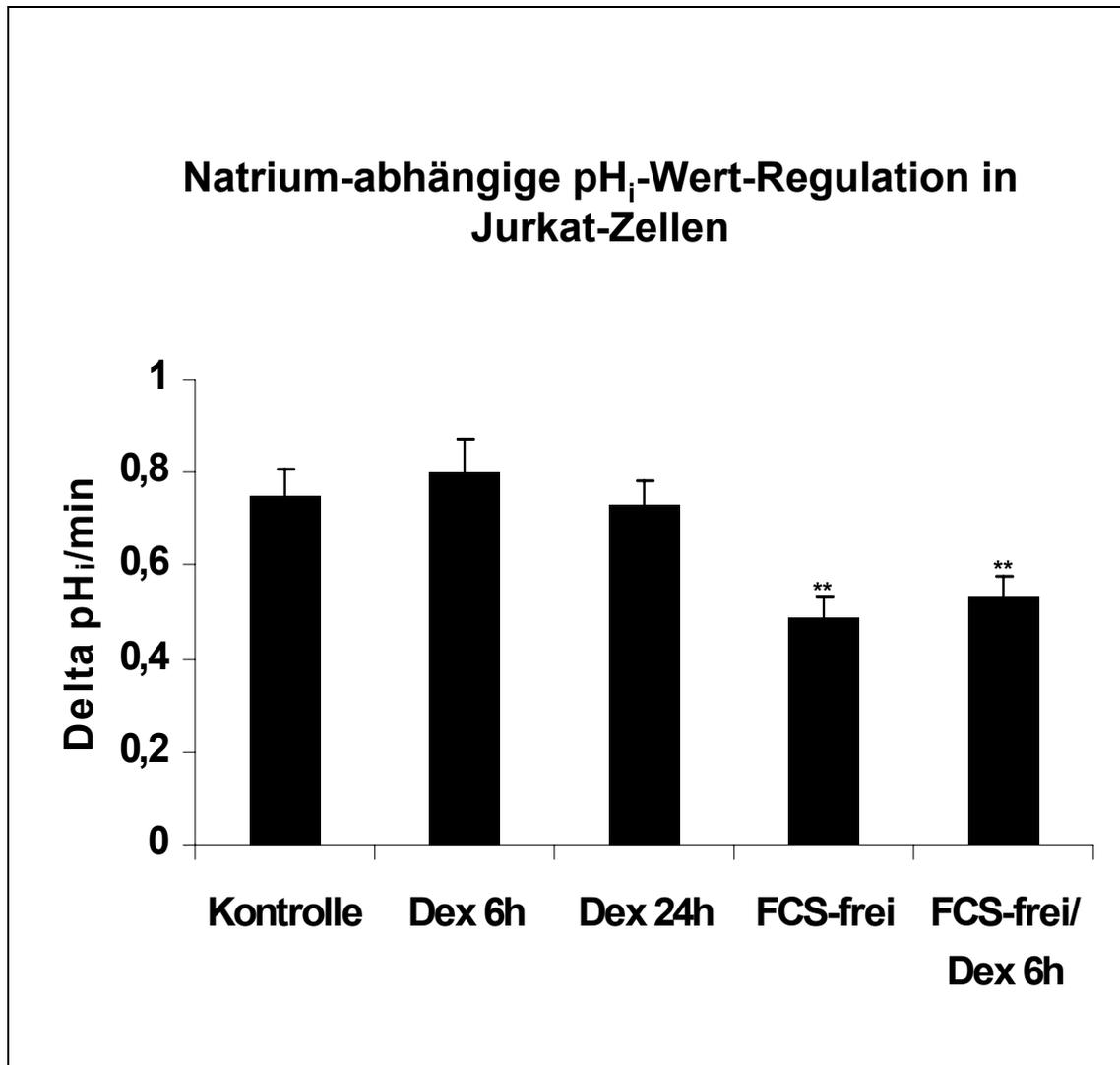
Die Kontroll-Gruppe ergab eine Realkalinisierungsrate von $0,75 \pm 0,06 \Delta pH/min$ ($n=10$). Die Anstiegsgeschwindigkeit des pH_i -Wert bei 6h Dex betrug $0,80 \pm 0,07 \Delta pH/min$ ($n=10$), bei 24h Dex $0,73 \pm 0,05 \Delta pH/min$ ($n=6$). In der FCS-freien Gruppe wurde ein Wert von $0,49 \pm 0,04 \Delta pH/min$ ($n=6$) bestimmt, der pH_i -Wert-Anstieg in der FCS-frei/6h Dex Gruppe lag bei $0,53 \pm 0,05 \Delta pH/min$ ($n=6$).

Der T-Test ergab für Dex 6h ($p=0,60$) und für 24h Dex ($0,87$) keine signifikant unterschiedlichen Aktivitäten. Hingegen wies die FCS-freie Gruppe ($p=0,003$) und die FCS-frei/6h Dex-Gruppe ($p=0,02$) hoch signifikant geringere Geschwindigkeiten in der Realkalinisierung auf.

Die Ergebniszusammenstellung findet sich in Tabelle 3-20.

Tabelle 3-20: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

	<i>Kontrolle</i>	<i>Dex 6h</i>	<i>Dex 24h</i>	<i>FCS-frei</i>	<i>FCS-frei/Dex 6h</i>
Mittelwert ($\Delta pH/min$)	0,75	0,80	0,73	0,49	0,53
Standardfehler	0,06	0,07	0,05	0,04	0,05
T-Test, gegen Kontrolle (p)		0,60	0,87	0,003	0,02
Versuchszahl (n)	10	10	6	6	6

Abbildung 3-23: Natrium-abhängige pH_i -Wert-Regulation in Jurkat-Zellen

4 Diskussion

4.1 Glukosetransporter

Es gibt zwei Mechanismen für Glukosetransport durch Zellmembranen. In Dünndarmepithel- und Nierentubulus-Zellen erfolgt der Transport als sekundär aktiver Transport gegen einen Konzentrationsgradienten durch Kotransport mit Natrium (SGLT). Nahezu alle anderen Zellen weisen einen Glukosetransporter der Glut-Familie auf, der eine erleichterte Diffusion als passiven Transport von Glukose in die Zelle ermöglicht (Brown, 2000). Derzeit sind 4 Glukosetransportproteine identifiziert. Die Isoform Glut1 ist in vielen Gewebetypen exprimiert, befindet sich allerdings vor allem in den Endothelzellen der Blutgefäße und der Blut-Hirn-Schranke. Glut1 ist ein Transporter mit hoher Affinität und einem Km-Wert von < 7 mM für 2-deoxyglukose. Glut2 wird überwiegend in der Leber dem Magen-Darm-Trakt und den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse gefunden. Glut 2 hat eine niedrige Affinität und einen hohen Km-Wert. Er dient als Transporter mit hoher Kapazität und ist zusätzlich an der Funktion des Glukose-Sensors im Pankreas beteiligt. Glut3 stellt die Glukoseversorgung von Neuronen sicher. Glut4 ist ein Insulin-regulierter Transporter, der in Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskulatur zu finden ist (Olson & Pessin, 1996; Mueckler, 1994)

Die Verknüpfung zwischen gesteigertem Glukosemetabolismus und Aktivierung von Stoffwechselwegen, die zu Organschäden bei Diabetes mellitus führt ist unklar. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, daß Mesangium-Zellen in einem Milieu mit hoher Glukosekonzentration eine gesteigerte Synthese extrazellulärer Matrix aufweisen (Ayo *et al.*, 1990; Fioretto *et al.*, 1995; Kreisberg & Kreisberg, 1995; Mauer *et al.*, 1992), wobei der Glukosetransport der Geschwindigkeit-begrenzende Schritt ist (Henry *et al.*, 1999). Die gesteigerte Bildung extrazellulärer Matrix führt in vivo zur Glomerulosklerose und Nierenversagen bei Diabetes mellitus (Ayo *et al.*, 1990). Neben der gesteigerten Matrixsynthese konnte auch eine veränderte Aktivität und Expression der Proteinkinase C gezeigt werden (Abrass *et al.*, 1988; Ayo *et al.*, 1991; Cosio, 1995). In anderen Untersuchungen wurden Veränderungen der Rezeptordichte, der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung und der

Glukosetransporter1-Aktivität beobachtet, die eine Bedeutung für das Diabetes mellitus-Modell haben (Ambuhl *et al.*, 1998; Mene *et al.*, 1997). Hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen (20 mM) können über einen positiven Feedback-Mechanismus die Expression des Glukosetransporters1 in Mesangium-Zellen stimulieren (Heilig *et al.*, 1997a; Heilig *et al.*, 1997b; Kaneko *et al.*, 1990). Andere Gewebearten, wie beispielsweise die Skelettmuskulatur und Fettgewebe, können in hyperglykämischer Umgebung die Aktivität der Glukosetransporter reduzieren. Diese Organe weisen üblicherweise keine diabetischen Spätkomplikationen auf (Kahn, 1994).

Die Überexpression des Glukosetransporters1 (Glut1) in Mesangium-Zellen der Ratte bewirkt einen erheblichen Anstieg der Glukoseutilisation sowie der Laktatproduktion (Publikation in Vorbereitung). Dabei scheint die maximale Glukoseaufnahme in die Zelle der die Geschwindigkeit begrenzende Schritt für den Glukose-Metabolismus und die Glykolyserate zu sein (Klip *et al.*, 1994). Bei der anaeroben Glykolyse entstehendes Laktat und Protonen stellen eine große Herausforderung für die intrazelluläre pH-Wert-Regulation dar.

4.2 Natrium/Protonen-Austauscher (NHE)

Der Natrium/Protonen-Austauscher spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase zahlreicher Systeme innerhalb der Zelle. Dazu zählen vor allem die Zellvolumen- und die pH-Wert-Regulation, die Grundbedingungen für die Funktion und das Überleben der Zelle darstellen (Ritter *et al.*, 2001). Der Na^+/H^+ -Austauscher bewirkt einen elektroneutralen Austausch von Na^+ - und H^+ -Ionen, der vom Konzentrationsgradienten des Natriums angetrieben wird. Die Aktivierung bewirkt einen Netto-Einstrom von Na^+ -Ionen, während die ausgeschiedenen H^+ -Ionen durch Protonen aus den intrazellulären Puffersystemen ersetzt werden. In vielen zellulären Systemen arbeitet der Na^+/H^+ -Austauscher in Kombination mit dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Die gemeinsame Aktivierung dieser beiden Austauscher hat eine Netto-Aufnahme von NaCl in die Zelle zur Folge. Wasser folgt dem osmotisch wirksamen NaCl in die Zelle nach. Dieser Zusammenhang verdeutlicht die Bedeutung des Na^+/H^+ -Austauscher für die Zellvolumenregulation.

Der Na^+/H^+ -Austauscher zählt zu den wichtigsten Transportern der zellulären pH-Wert-Regulation. Zusätzlich ist er mit einigen weiteren Funktionen und Proteinen verknüpft. Dazu zählen das Zytoskelett, epithelialer Transport, Sekretion, Stoffwechselregulation, Endo- und Exozytoserezeptor-Recycling, Hormon- und Transmitterfreisetzung, Erregbarkeit von Membranen, Kontraktion, Immunreaktionen, Zellproliferation und –Differenzierung, programmierter Zelltod und weitere (Ritter *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 1998).

Sechs Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE1-6) konnten bislang identifiziert werden. NHE1-5 sind in der Plasmamembran lokalisiert, dagegen befindet sich NHE6 in der mitochondrialen Membran. Die Isoformen NHE1 und NHE2 sind ubiquitär exprimiert. Die Verteilung der Isoformen NHE2-5 folgt einem gewebsspezifischen Muster, das einen Hinweis auf spezialisierte Funktionen darstellt (Counillon & Pouyssegur, 2000; Wakabayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1995). Der Na^+/H^+ -Austauscher verbraucht als sekundär aktiver Transporter nicht direkt metabolische Energie. Dennoch sind alle NHE-Isoformen von der Anwesenheit von ATP abhängig. ATP-Entzug führt zur

Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers (Levine *et al.*, 1993; Aharonovitz *et al.*, 2000). Die unterschiedlichen Isoformen können mit Amilorid und seinen Derivaten gehemmt werden. Dabei finden sich unterschiedliche Substanzaffinitäten und Hemmerprofile (Bookstein *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2000). Die Sättigungskinetik für die Isoformen NHE1-3 folgen einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik (Levine *et al.*, 1993). Das einfachste Modell für den Natriumtransport geht von einer einzelnen Bindungsstelle an der Membranaußenseite aus. Durch Translokation des Proteins kommt es zum Einwärtstransport von Natrium. Für die meisten Isoformen liegt der K_m -Wert der Bindungsstelle etwa 3-fach unter der physiologischen Serum-Natrium-Konzentration. Der Na^+/H^+ -Austauscher ist daher physiologischerweise fast vollständig gesättigt, so daß Schwankungen der Natriumkonzentration im Serum kaum Auswirkungen auf den Na^+/H^+ -Austauscher haben. Die extrazelluläre Na^+ -Bindungsstelle ist nicht spezifisch für Natrium. Auch andere kleinere Kationen wie Lithium- und H^+ -Ionen können daran binden, während Kalium-Ionen wegen ihrer Größe nicht binden können.

Für die kompetitive Hemmung wurde zunächst Amilorid verwendet. Die Unspezifität für die unterschiedlichen Isoformen und die Nebenwirkungen des Moleküls (Frelin *et al.*, 1988; Kleyman & Cragoe, Jr., 1988) führten zur Entwicklung weiterer Derivate des Amilorids. 5'(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid (EIPA) besitzt eine hohe Spezifität für NHE1. Die K_m -Werte für NHE2 und NHE3 sind 10-100-fach höher. Neuere Substanzen mit weiter gesteigerter Effizienz und geringem Nebenwirkungsprofil sind HOE694 und HOE642. (Counillon *et al.*, 1993)

4.3 H^+ -ATPasen

Viele Epithelien enthalten spezialisierte Zellen die Protonen- oder Bikarbonat-Ionen durch die Membran transportieren können, wie beispielsweise die Sammelrohre der Niere (Brown & Breton, 1996; Al Awqati, 1996). Diese Zellen werden als mitochondrienreich beschrieben und sie weisen charakteristischerweise die Carboanhydratase in einer hohen Konzentration im Zytosol auf. Schließlich ist die membranassoziierte vakuoläre H^+ -ATPase stark exprimiert. Es existieren drei ATPase-Formen, die einer Proteinfamilie zuzuordnen sind (Drose & Altendorf, 1997). Die P-Typ ATPase, die sich durch eine vorübergehende Phosphorylierung auszeichnet, eine F-Typ ATPase, die ihre Funktion vor allem im Rahmen der ATP-Synthese ausübt. Die V-Typ ATPase ähnelt dem F-Typ ist jedoch nicht an der ATP-Gewinnung beteiligt, sondern ist überwiegend in den Membranen der Vakuolen und Lysosomen lokalisiert. Dort bewirkt sie eine Azidifizierung des Vakuoleninneren bei gleichzeitiger Alkalinisierung des Zytosols. Die H^+ -ATPase vom V-Typ ist ein Transportprotein für Protonen, die unter ATP-Spaltung H^+ -Ionen in eine Zelle oder Vakuole hinein oder hinaus transportieren können. Es handelt sich dabei um einen primär aktiven Transport, der auch gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen kann. Eine genauere Betrachtung dieser Protonentransportproteine ist erst möglich geworden, nachdem spezifische Hemmstoffe gefunden wurden. Diese erlauben einerseits die Identifizierung unterschiedlicher ATPase-Formen der gleichen Proteinfamilie, andererseits ein Studium der jeweiligen Funktion im Zellstoffwechsel. Die gefundenen Hemmstoffe Concanamycin und Bafilomycin gehören der Substanzgruppe der Makrolid-Antibiotika an. Das Bafilomycin stellt einen Hemmstoff mit hoher Affinität für die V-Typ H^+ -ATPase dar (Bowman *et al.*, 1988). Die F-Typ ATPase ist resistent gegen diesen Hemmstoff. Für die Hemmung der P-Typ ATPase besitzt das Bafilomycin eine wesentlich niedrigere Affinität. Es werden mikromolare Konzentration benötigt, während beim V-Typ nanomolare Konzentrationen ausreichend sind (Drose & Altendorf, 1997). Ein Derivat des Bafilomycins ist das Bafilomycin A1, das in micromolaren Konzentrationen zur

Hemmung des V-Typs eingesetzt wird (Sharom *et al.*, 1995; Hunke *et al.*, 1995). Diese Substanz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

4.4 Monocarboxylattransporter

Monocarboxylate wie Laktat und Pyruvat spielen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel aller Zellen und in der Kommunikation zwischen Gewebearten. Wesentlich für die Erfüllung dieser Aufgaben ist die Möglichkeit des schnellen Transports durch die Zellmembranen. Dieser schnelle gekoppelte Monocarboxylat/Protonen-Transport wird von Proteinen der Monocarboxylattransporterfamilie (MCT) bewirkt. Bislang sind 9 Isoformen des MCT identifiziert, die jeweils ein charakteristisches Gewebeverteilungsmuster aufweisen. Ausführliche Untersuchungen bezüglich Substratkinetik und Hemmstoffkinetik wurden bislang vor allem an MCT1,2 und 4 durchgeführt. (Broer *et al.*, 1998; Broer *et al.*, 1999). MCT1 ist ubiquitär exprimiert, jedoch in besonders großer Dichte in den Membranen von Herz- und Skelettmuskel. In diesem Gewebe kommt es zu einer Stimulation der MCT1-Expression in der Folge von gesteigerter Muskelarbeit. Dieses verdeutlicht die Bedeutung des Laktat für die Energiegewinnung in einigen Zellen. Im Gegensatz dazu findet sich der MCT4 überwiegend in Zellen, die eine hohe Glykolyserate aufweisen (Tumorzellen, Leukozyten). In diesen Zellen wird der Laktat/Protonen-Ausstrom dominierend sein.

In Gewebearten mit hoher Glykolyserate haben die Transportproteine der MCT-Familie auch eine Bedeutung für die pH-Homöostase der Zelle, da sie den gleichzeitigen Auswärtstransport von Laktat und H⁺-Ionen bewirken. Im Gegensatz zu diesem Laktattransporter verfügen viele Zellen (Roy, 1995; Nilius *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1989a) über unspezifische Anionenkanäle, die ebenfalls einen Auswärtstransport schwacher organischer Säuren (Laktat, Propionat und Butyrat) ermöglichen. Infolge dieses Anionenausstroms kommt es zu einer zytosolischen Azidose, die sich am ehesten durch das Zurückbleiben der ebenfalls bei der Glykolyse entstehenden H⁺-Ionen erklären

läßt (Brown *et al.*, 1989b). An kultivierten Endothelzellen der Pulmonalarterie vom Rind wurde die Modulation eines durch Zellvolumen regulierten Anionenkanals beschrieben (Nilius *et al.*, 1998). Die Metabolite Laktat und HCO_3^- passieren diesen Anionenkanal, der bei intrazellulärer Azidifizierung eine Hochregulation erfährt. Der Ausstrom von Laktat durch die angegebenen Kanäle hätte eine Retention der H^+ -Ionen zur Folge und würde somit die Tätigkeit von Protonen-Transport Mechanismen erfordern, um den zytosolischen pH-Wert konstant zu halten.

Die Isoform MCT2 hat eine 10-fach höhere Substrataffinität als MCT1 und MCT4 und findet sich vor allem in Zellen, die eine schnelle Aufnahme bei niedrigen Konzentrationen benötigen, wie beispielsweise Zellen des proximalen Nierentubulus und Neuronen. MCT3 ist die einzige Isoform, die auch in der Retina exprimiert ist, eine weitere Charakterisierung steht noch aus (Halestrap & Price, 1999).

Bezüglich der Untersuchung des MCT sind folgende Umstände zu berücksichtigen: Es kann nur ein Laktat/Protonen-Einstrom gemessen werden, der sich möglicherweise von der Geschwindigkeit des Laktat/Protonen-Ausstroms unterscheidet. Die Messung des Ausstroms würde eine Vorbeladung mit markiertem Laktat und/oder Pyruvat erfordern, dennoch könnte die exakte intrazelluläre Laktatkonzentration nur abgeschätzt werden, da es von der Zelle metabolisiert werden kann. Schließlich können die Einstrom-Messungen die Bedingungen des Monocarboxylataustroms nicht vollständig simulieren, da die intrazelluläre Konzentration von Laktat oder Pyruvat physiologischerweise nicht 0 ist (Broer *et al.*, 1998).

4.5 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.5.1 Glut1- und LacZ-Zellen

Im Rahmen des gesteigerten Glukose-Metabolismus in Glut1-Zellen im Vergleich zu LacZ-Zellen kommt es zu einer hoch signifikanten Alkalinisierung des Zytosols – nicht zu einer Azidifizierung. Dabei fällt zusätzlich auf, daß die Zellen einen niedrigeren zytosolischen pH-Wert aufweisen, wenn sie sich bereits im konfluenten Stadium befinden, hingegen liegt der pH-Wert während der Proliferation sowohl in Glut1 als auch in LacZ-Zellen höher. Diese Werte entsprechen der Beobachtung, daß humane Lymphozyten, die zur Proliferation angeregt werden, mit einem Anstieg des mRNA-Level des Natrium/Protonen-Austauschers¹ reagieren (Vereninov *et al.*, 2001). Eine gesteigerte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers in der Proliferationsphase im Vergleich zum Konfluenz-Stadium zeigte sich in den hier dargestellten Messungen jedoch nicht.

Es wurde untersucht, ob die gesteigerte Glykolyse die pH-Wert-Regulation, vor allem die Protonen-Transport-Mechanismen, beeinflusst. Beide Zelllinien weisen einen Natrium-unabhängigen und einen Natrium-abhängigen H^+ -Transport-Mechanismus auf. Die H^+ -ATPase wurde bereits als ein Beispiel für den Natrium-unabhängigen H^+ -Transport beschrieben (Bidani & Heming, 1995; Dunbar & Caplan, 2000; Okamoto & Forte, 2001). Die Natrium-abhängige H^+ -Sekretion wird vor allem durch den Na^+/H^+ -Austauscher repräsentiert. Dieser ist ebenfalls ausführlich gezeigt worden (Noel & Pouyssegur, 1995; Putney *et al.*, 2002).

Der Na^+ -unabhängige H^+ -Transport bleibt von der gesteigerten Glykolyserate offenbar unbeeinflusst, Glut1 und LacZ weisen hier keine signifikanten Unterschiede auf. Die nahezu vollständige Hemmbarkeit des Na^+ -unabhängigen pH_i -Wert-Anstiegs durch Bafilomycin A1 (2,0 μM) zeigt, daß die beschriebene Realkalinisierung überwiegend auf die H^+ -ATPase vom V-Typ zurückzuführen ist (Heming *et al.*, 1995).

Der Na^+ -abhängige H^+ -Transport hingegen zeigt eine signifikante Hochregulation der Na^+/H^+ -Austauscher-Aktivität in Glut1 gegenüber LacZ.

Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Meßzeitpunkten ermittelt werden. Die Realkalinisierung in Folge von Na^+ -abhängigem H^+ -Transport konnte mit 5'(N-ethyl-N-isopropyl)amilorid (EIPA) konzentrationsabhängig mit 0,1 μM und 2,0 μM gehemmt werden. Diese Ergebnisse weist auf das Vorhandensein der Isoform 1 des Na^+/H^+ -Austauscher hin (Orlowski & Grinstein, 1997; Schulte *et al.*, 1999).

Der Bikarbonat/Chlorid-Anionen-Austauscher kann zusätzlich Einfluß auf die pH_i -Wert-Regulation nehmen (Ganz, 1991). Die Untersuchungen mit Bikarbonat-gepufferten Lösungen unter 5% CO_2 zeigen eine verminderte Aktivität der H^+ -ATPase in Glut1 und LacZ, jedoch eine gesteigerte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers.

Beide Zelllinien exprimieren zusätzlich einen Laktat/ H^+ -Kotransporter (MCT) der einen gekoppelten Transport von Laktat gemeinsam mit Protonen ermöglicht. Die Expression dieses Transportsystems verhindert die Ausbildung einer intrazellulären Azidose im Verlauf der gesteigerten Glykolyse. Es sind dabei keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität des MCT zwischen Glut1 und LacZ feststellbar. Es sollte jedoch mit in Erwägung gezogen werden, daß im Gewebe die Clearance des Laktat sowie der Protonen aus dem Extrazellulärraum mittels Blutfluß der die Geschwindigkeit begrenzende Mechanismus sein kann. Im Verlauf einer extrazellulären Azidose kann daher die Existenz eines weiteren aktiven H^+ -Transport-Mechanismus erforderlich sein, um den zytosolischen pH -Wert zu erhalten (Jennings & Reimer, 1991). In diesen Situationen gewinnt die gesteigerte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers in Glut1-Zellen eine entscheidende Bedeutung für die pH -Homöostase der Zellen. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Laktat/ H^+ -Kotransport, der zu der Monocarboxylattransporter-Familie (MCT-Familie) zu gehören scheint (Halestrap & Price, 1999) eingehender zu charakterisieren. Die einzelnen Isoformen der MCT-Familie können aufgrund ihrer Substratspezifität und -affinität, sowie anhand der Inhibitorensensitivität funktionell differenziert werden (Broer *et al.*, 1998; Broer *et al.*, 1999; Dimmer *et al.*, 2000). Es sind derzeit 9 Isoformen der MCT-Familie beschrieben. Die Isoform MCT1 ist in einer Vielzahl von Zellen und Gewebetypen vorhanden, findet sich jedoch vor

allem in der quergestreiften Skelettmuskulatur. Sie wird als unspezifisch beschrieben und weist einen höheren Km-Wert für Laktat als für Pyruvat auf. Isoform MCT2 zeigt eine 10fach höhere Affinität für Laktat und ist vor allem in Zellen ausgeprägt, die auf einen schnellen Einstrom von Laktat bei niedrigen Konzentrationen als Substrat zur Erhaltung des Energiemetabolismus angewiesen sein können, wie beispielsweise Neuronen.

In den vorgelegten Untersuchungen konnte eine unveränderte Aktivität des MCT für Na⁺-Pyruvat ebenso wie für Tris-Pyruvat in LacZ gezeigt werden. Es kann daraus gefolgert werden, daß der beschriebene Transportmechanismus nicht natriumabhängig ist und für Pyruvat und Laktat die gleiche Affinität besteht. Die Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung ergab für LacZ-Zellen einen Km-Wert von $4,9 \pm 1,1$ mM. Der Einstrom von Laktat und H⁺-Ionen ließ sich durch Vorinkubation mit p-CMBS beziehungsweise durch Zusatz von 100 µM Phloretin nahezu vollständig inhibieren. Diese Effekte ließen sich sowohl in Glut1 als auch in LacZ-Zellen zeigen. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse weist auf das Vorhandensein des MCT1 hin. Die Expression von MCT1 in Glut1 und LacZ konnte mit rt-PCR bestätigt werden (Publikation in Vorbereitung).

4.5.2 Jurkat-T-Lymphozyten

Die Untersuchungen an Jurkat-T-Lymphozyten zeigen einen Abfall des zytosolischen pH bei einer Behandlung mit Dexamethason nach 24h. Weiterhin konnte ein Abfall des pH-Wertes durch Serumdepletion beobachtet werden.

Die Untersuchung der Natrium-unabhängigen H⁺-ATPase zeigt in den beiden Gruppen jedoch keine signifikante Veränderung der Aktivität. Allerdings findet sich eine vorübergehende Aktivitätssteigerung der Protonenpumpe in den über 6h mit Dexamethason behandelten Zellen, die jedoch keine Auswirkung auf den intrazellulären pH-Wert zeigt.

Die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers ist nach Behandlung mit Dexamethason für 6h und 24h in unseren Messungen unverändert, obgleich eine Hemmung der NHE-Aktivität in humanen Lymphozyten durch kurzzeitige Behandlung (40 min) mit Dexamethason (1 µM), sowie ein Abfall des zytosolischen pH in der Literatur bereits beschrieben wurde (Tepel *et al.*, 1999). Die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers in der FCS-freien Gruppe, sowie der FCS-freien/Dex 6h-Gruppe ist hingegen hoch signifikant erniedrigt. Diese Beobachtung läßt gleichzeitig den Abfall des intrazellulären pH in der genannten Gruppe erklären. Serum bzw. im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren stimulieren den Na⁺/H⁺-Austauscher, eine Wirkung die für die Zellproliferation bedeutsam ist (Woll *et al.*, 1993).

5 Zusammenfassung

Die Überexpression von Glukosetransporter1 in Mesangiumzellen führt zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme und vermehrter anaerober Glykolyse. Die Glykolyse führt zur Bildung von Laktat und Protonen und stellt daher eine Herausforderung der pH-Regulation dar.

Es konnte gezeigt werden, daß die durch vermehrte Glukoseaufnahme bedingte Steigerung der Glykolyse signifikanten Einfluß auf die Regulation der pH-Wert-Homöostase hat. Das entstandene Laktat verläßt die Zelle über den gekoppelten Laktat/Protonen-Transporter MCT1, der zu der MCT-Familie gehört. Die Charakterisierung der MCT-Isoform1 erfolgte durch Messung der Sättigungskinetik, sowie der Sensitivität für die Hemmstoffe p-CMBS und 100 µM Phloretin. Der MCT1 weist eine hohe Transportkapazität auf, so daß es auch bei gesteigerter Glykolyse nicht zu einer zytosolischen Azidifizierung kommt. Vielmehr kommt es zu einer zytosolischen Alkalinisierung der Glut1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (LacZ-Zellen). Diese kann mit der gesteigerten Aktivität des sekundär aktiven Na^+/H^+ -Austauschers in Glut1-Zellen erklärt werden. Eine Veränderung des Natrium-unabhängigen Protonentransports fand sich nicht.

Dexamethason führt zu einem Abfall des zytosolischen pH-Wertes in Jurkat-T-Lymphozyten. Eine veränderte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) konnte dabei nicht festgestellt werden. Serumentzug senkte den zytosolischen pH, eine Wirkung, die durch Hemmung der NHE1-Aktivität erklärt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Reference List

Abrahamse, S. L., Vis, A., Bindels, R. J., & van Os, C. H. (1994). Regulation of intracellular pH in crypt cells from rabbit distal colon. *Am.J.Physiol* **267**, G409-G415.

Abrass, C. K., Peterson, C. V., & Raugi, G. J. (1988). Phenotypic expression of collagen types in mesangial matrix of diabetic and nondiabetic rats. *Diabetes* **37**, 1695-1702.

Aharonovitz, O., Zaun, H. C., Balla, T., York, J. D., Orłowski, J., & Grinstein, S. (2000). Intracellular pH regulation by Na(+)/H(+) exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J.Cell Biol.* **150**, 213-224.

Al Awqati, Q. (1996). Plasticity in epithelial polarity of renal intercalated cells: targeting of the H(+)-ATPase and band 3. *Am.J.Physiol* **270**, C1571-C1580.

Ali, R., Amlal, H., Burnham, C. E., & Soleimani, M. (2000). Glucocorticoids enhance the expression of the basolateral Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in renal proximal tubules. *Kidney Int.* **57**, 1063-1071.

Ambuhl, P., Amemiya, M., Preisig, P. A., Moe, O. W., & Alpern, R. J. (1998). Chronic hyperosmolality increases NHE3 activity in OKP cells. *J.Clin.Invest* **101**, 170-177.

Ayo, S. H., Radnik, R. A., Garoni, J. A., Glass, W. F., & Kreisberg, J. I. (1990). High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am.J.Pathol.* **136**, 1339-1348.

Ayo, S. H., Radnik, R. A., Glass, W. F., Garoni, J. A., Rampt, E. R., Appling, D. R., & Kreisberg, J. I. (1991). Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am.J.Physiol* **260**, F185-F191.

Battle, D., Redon, J., Gutterman, C., LaPointe, M., Saleh, A., Sharma, A., Rombola, G., Ye, M., Alsheikha, W., Gomez, L., & . (1994). Acid-base status

and intracellular pH regulation in lymphocytes from rats with genetic hypertension. *J.Am.Soc.Nephrol.* **5**, S12-S22.

Baum, M., Moe, O. W., Gentry, D. L., & Alpern, R. J. (1994). Effect of glucocorticoids on renal cortical NHE-3 and NHE-1 mRNA. *Am.J.Physiol* **267**, F437-F442.

Bevensee, M. O., Bashi, E., Schlue, W. R., Boyarsky, G., & Boron, W. F. (1999). Shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in rat renal mesangial cells. *Am.J.Physiol* **276**, C674-C683.

Bidani, A. & Heming, T. A. (1995). Kinetic analysis of cytosolic pH regulation in alveolar macrophages: V-ATPase-mediated responses to a weak acid. *Am.J.Physiol* **269**, L20-L29.

Blomqvist, G., Seitz, R. J., Sjogren, I., Halldin, C., Stone-Elander, S., Widen, L., Solin, O., & Haaparanta, M. (1994). Regional cerebral oxidative and total glucose consumption during rest and activation studied with positron emission tomography. *Acta Physiol Scand.* **151**, 29-43.

Bookstein, C., Musch, M. W., DePaoli, A., Xie, Y., Rabenau, K., Villereal, M., Rao, M. C., & Chang, E. B. (1996). Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am.J.Physiol* **271**, C1629-C1638.

Bowman, E. J., Siebers, A., & Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 7972-7976.

Boyarsky, G., Ganz, M. B., Cragoe, E. J., Jr., & Boron, W. F. (1990). Intracellular-pH dependence of Na-H exchange and acid loading in quiescent and arginine vasopressin-activated mesangial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 5921-5924.

Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., & Boron, W. F. (1988a). pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO₃⁻. *Am.J.Physiol* **255**, C844-C856.

Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., & Boron, W. F. (1988b). pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na⁺-dependent and -independent Cl⁻. *Am.J.Physiol* **255**, C857-C869.

Broer, S., Broer, A., Schneider, H. P., Stegen, C., Halestrap, A. P., & Deitmer, J. W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.J.* **341** (Pt 3), 529-535.

Broer, S., Schneider, H. P., Broer, A., Rahman, B., Hamprecht, B., & Deitmer, J. W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem.J.* **333** (Pt 1), 167-174.

Brown, D. & Breton, S. (1996). Mitochondria-rich, proton-secreting epithelial cells. *J.Exp.Biol.* **199** (Pt 11), 2345-2358.

Brown, G. K. (2000). Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J.Inherit.Metab Dis.* **23**, 237-246.

Brown, P. D., Elliott, A. C., & Lau, K. R. (1989b). Indirect evidence for the presence of non-specific anion channels in rabbit mandibular salivary gland acinar cells. *J.Physiol* **414**, 415-431.

Brown, P. D., Elliott, A. C., & Lau, K. R. (1989a). Indirect evidence for the presence of non-specific anion channels in rabbit mandibular salivary gland acinar cells. *J.Physiol* **414**, 415-431.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.

Carpenter, L. & Halestrap, A. P. (1994). The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem.J.* **304** (Pt 3), 751-760.

Cosio, F. G. (1995). Effects of high glucose concentrations on human mesangial cell proliferation. *J.Am.Soc.Nephrol.* **5**, 1600-1609.

Counillon, L. & Pouyssegur, J. (2000). The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *J.Biol.Chem.* **275**, 1-4.

Counillon, L., Scholz, W., Lang, H. J., & Pouyssegur, J. (1993). Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol.Pharmacol.* **44**, 1041-1045.

Denton, R. M. & Halestrap, A. P. (1979). Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues. *Essays Biochem.* **15**, 37-77.

Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., & Broer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem.J.* **350 Pt 1**, 219-227.

Drose, S. & Altendorf, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J.Exp.Biol.* **200 (Pt 1)**, 1-8.

Dunbar, L. A. & Caplan, M. J. (2000). The cell biology of ion pumps: sorting and regulation. *Eur.J.Cell Biol.* **79**, 557-563.

Ebara, T., Condeelis, K., Kako, Y., Liu, Y., Xu, Y., Ramakrishnan, R., Goldberg, I. J., & Shachter, N. S. (2000). Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J.Clin.Invest* **105**, 1807-1818.

Fioretto, P., Steffes, M. W., Sutherland, D. E., & Mauer, M. (1995). Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int.* **48**, 1929-1935.

Frelin, C., Barbry, P., Vigne, P., Chassande, O., Cragoe, E. J., Jr., & Lazdunski, M. (1988). Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie* **70**, 1285-1290.

Ganz, M. B. (1991). Regulation of intracellular pH in glomerular mesangial cells. *Semin.Nephrol.* **11**, 16-27.

Ganz, M. B., Boyarsky, G., Sterzel, R. B., & Boron, W. F. (1989). Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of. *Nature* **337**, 648-651.

Ganz, M. B., Hawkins, K., & Reilly, R. F. (2000). High glucose induces the activity and expression of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange in glomerular mesangial cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **278**, F91-F96.

Ginsberg, H. N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J.Clin.Invest* **106**, 453-458.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* **260**, 3440-3450.

Guillaume-Gentil, C., Assimacopoulos-Jeannet, F., & Jeanrenaud, B. (1993). Involvement of non-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. *Diabetologia* **36**, 899-906.

Haber, R. S. & Weinstein, S. P. (1992). Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone. *Diabetes* **41**, 728-735.

Halestrap, A. P. & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem.J.* **343 Pt 2**, 281-299.

Heilig, C. W., Brosius, F. C., III, & Henry, D. N. (1997a). Glucose transporters of the glomerulus and the implications for diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl* **60**, S91-S99.

Heilig, C. W., Concepcion, L. A., Riser, B. L., Freytag, S. O., Zhu, M., & Cortes, P. (1995). Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J.Clin.Invest* **96**, 1802-1814.

Heilig, C. W., Liu, Y., England, R. L., Freytag, S. O., Gilbert, J. D., Heilig, K. O., Zhu, M., Concepcion, L. A., & Brosius, F. C., III (1997b). D-glucose stimulates mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes* **46**, 1030-1039.

Heming, T. A., Traber, D. L., Hinder, F., & Bidani, A. (1995). Effects of bafilomycin A1 on cytosolic pH of sheep alveolar and peritoneal macrophages: evaluation of the pH-regulatory role of plasma membrane V-ATPases. *J.Exp.Biol.* **198 (Pt 8)**, 1711-1715.

Henry, D. N., Busik, J. V., Brosius, F. C., III, & Heilig, C. W. (1999). Glucose transporters control gene expression of aldose reductase, PKC α , and GLUT1 in mesangial cells in vitro. *Am.J.Physiol* **277**, F97-104.

Hoffmann, E. K. (1982). Anion exchange and anion-cation co-transport systems in mammalian cells. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **299**, 519-535.

Hoffmann, E. K., Schiodt, M., & Dunham, P. (1986). The number of chloride-cotransport sites on Ehrlich ascites cells measured with [3H]bumetanide. *Am.J.Physiol* **250**, C688-C693.

Hunke, S., Dose, S., & Schneider, E. (1995). Vanadate and bafilomycin A1 are potent inhibitors of the ATPase activity of the reconstituted bacterial ATP-binding cassette transporter for maltose (MalFGK2). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **216**, 589-594.

Jackson, V. N. & Halestrap, A. P. (1996). The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J.Biol.Chem.* **271**, 861-868.

Jennings, R. B. & Reimer, K. A. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu.Rev.Med.* **42**, 225-246.

Juel, C. (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev.* **77**, 321-358.

Kahn, B. B. (1994). Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J.Nutr.* **124**, 1289S-1295S.

Kaneko, M., Carper, D., Nishimura, C., Millen, J., Bock, M., & Hohman, T. C. (1990). Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and Chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions. *Exp.Cell Res.* **188**, 135-140.

Kleyman, T. R. & Cragoe, E. J., Jr. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J.Membr.Biol.* **105**, 1-21.

Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A., & Ortiz, P. A. (1994). Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J.* **8**, 43-53.

Krapf, R. (1989). Physiology and molecular biology of the renal Na/H antiporter. *Klin.Wochenschr.* **67**, 847-851.

Kreisberg, J. I. & Kreisberg, S. H. (1995). High glucose activates protein kinase C and stimulates fibronectin gene expression by enhancing a cAMP response element. *Kidney Int.Suppl* **51**, S3-11.

- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., & Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* **78**, 247-306.
- Levine, S. A., Montrose, M. H., Tse, C. M., & Donowitz, M. (1993). Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J.Biol.Chem.* **268**, 25527-25535.
- Mauer, S. M., Lane, P., Hattori, M., Fioretto, P., & Steffes, M. W. (1992). Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus and type I membranoproliferative glomerulonephritis in humans. *J.Am.Soc.Nephrol.* **2**, S181-S184.
- Mene, P., Pugliese, G., Pricci, F., Di Mario, U., Cinotti, G. A., & Pugliese, F. (1997). High glucose level inhibits capacitative Ca²⁺ influx in cultured rat mesangial cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *Diabetologia* **40**, 521-527.
- Mogyorosi, A. & Ziyadeh, F. N. (1999). GLUT1 and TGF-beta: the link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Nephrol.Dial.Transplant.* **14**, 2827-2829.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur.J.Biochem.* **219**, 713-725.
- Nilius, B., Prenen, J., & Droogmans, G. (1998). Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. *Pflugers Arch.* **436**, 742-748.
- Noel, J. & Pouyssegur, J. (1995). Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am.J.Physiol* **268**, C283-C296.
- Okamoto, C. T. & Forte, J. G. (2001). Vesicular trafficking machinery, the actin cytoskeleton, and H⁺-K⁺-ATPase recycling in the gastric parietal cell. *J.Physiol* **532**, 287-296.
- Olson, A. L. & Pessin, J. E. (1996). Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu.Rev.Nutr.* **16**, 235-256.

Orlowski, J. (1993). Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J.Biol.Chem.* **268**, 16369-16377.

Orlowski, J. & Grinstein, S. (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 22373-22376.

Orlowski, J. & Kandasamy, R. A. (1996). Delineation of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J.Biol.Chem.* **271**, 19922-19927.

Pilegaard, H., Domino, K., Noland, T., Juel, C., Hellsten, Y., Halestrap, A. P., & Bangsbo, J. (1999). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am.J.Physiol* **276**, E255-E261.

Poole, R. C. & Halestrap, A. P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am.J.Physiol* **264**, C761-C782.

Praetorius, J., Andreasen, D., Jensen, B. L., Ainsworth, M. A., Friis, U. G., & Johansen, T. (2000). NHE1, NHE2, and NHE3 contribute to regulation of intracellular pH in murine duodenal epithelial cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **278**, G197-G206.

Probst, I. & Jungermann, K. (1983). Short-term regulation of glycolysis by insulin and dexamethasone in cultured rat hepatocytes. *Eur.J.Biochem.* **135**, 151-156.

Putney, L. K., Denker, S. P., & Barber, D. L. (2002). The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **42**, 527-552.

Quinkler, M., Oelkers, W., & Diederich, S. (2001). Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *Eur.J.Endocrinol.* **144**, 87-97.

Ritter, M., Fuerst, J., Woll, E., Chwatal, S., Gschwentner, M., Lang, F., Deetjen, P., & Paulmichl, M. (2001). Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function. *Cell Physiol Biochem.* **11**, 1-18.

Roth, G. S. & Livingston, J. N. (1976). Reductions in glucocorticoid inhibition of glucose oxidation and presumptive glucocorticoid receptor content in rat adipocytes during aging. *Endocrinology* **99**, 831-839.

Roy, G. (1995). Amino acid current through anion channels in cultured human glial cells. *J.Membr.Biol.* **147**, 35-44.

Saurin, A. J., Hamlett, J., Clague, M. J., & Pennington, S. R. (1996). Inhibition of mitogen-induced DNA synthesis by bafilomycin A1 in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem.J.* **313 (Pt 1)**, 65-70.

Schulte, E. A., Hohendahl, A., Stegemann, H., Hirsch, J. R., Saleh, H., & Schlatter, E. (1999). Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem.* **9**, 310-322.

Sharom, F. J., Yu, X., Chu, J. W., & Doige, C. A. (1995). Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem.J.* **308 (Pt 2)**, 381-390.

Soleimani, M. & Burnham, C. E. (2001). Na⁺:HCO₃⁻ cotransporters (NBC): cloning and characterization. *J.Membr.Biol.* **183**, 71-84.

Szabo, E. Z., Numata, M., Shull, G. E., & Orłowski, J. (2000). Kinetic and pharmacological properties of human brain Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 6302-6307.

Tepel, M., Pytlik, M., van der, G. M., Schluter, H., Jankowski, J., & Zidek, W. (1999). Effect of dexamethasone on the lymphocytic Na⁺/H⁺ antiporter activity. *J.Hypertens.* **17**, 1553-1556.

Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N., Zimniak, A., & Racker, E. (1979). Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* **18**, 2210-2218.

Umata, T., Moriyama, Y., Futai, M., & Mekada, E. (1990). The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase. *J.Biol.Chem.* **265**, 21940-21945.

- Vereninov, A. A., Vassilieva, I. O., Yurinskaya, V. E., Matveev, V. V., Glushankova, L. N., Lang, F., & Matskevitch, J. A. (2001). Differential transcription of ion transporters, NHE1, ATP1B1, NKCC1 in human peripheral blood lymphocytes activated to proliferation. *Cell Physiol Biochem*. **11**, 19-26.
- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., & Pouyssegur, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev*. **77**, 51-74.
- Watts, B. A., III & Good, D. W. (1994a). Apical membrane Na⁺/H⁺ exchange in rat medullary thick ascending limb. pH-dependence and inhibition by hyperosmolality. *J.Biol.Chem*. **269**, 20250-20255.
- Watts, B. A., III & Good, D. W. (1994b). Effects of ammonium on intracellular pH in rat medullary thick ascending limb: mechanisms of apical membrane NH₄⁺ transport. *J.Gen.Physiol* **103**, 917-936.
- Wei, M., Gaskill, S. P., Haffner, S. M., & Stern, M. P. (1998). Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* **21**, 1167-1172.
- Woll, E., Ritter, M., Offner, F., Lang, H. J., Scholkens, B., Hussinger, D., & Lang, F. (1993). Effects of HOE 694--a novel inhibitor of Na⁺/H⁺ exchange--on NIH 3T3 fibroblasts expressing the RAS oncogene. *Eur.J.Pharmacol*. **246**, 269-273.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J.Biol.Chem*. **266**, 17707-17712.
- Yu, F. H., Shull, G. E., & Orlowski, J. (1993). Functional properties of the rat Na/H exchanger NHE-2 isoform expressed in Na/H exchanger-deficient Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem*. **268**, 25536-25541.
- Yun, C. C., Chen, Y., & Lang, F. (2002). Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J.Biol.Chem*. **277**, 7676-7683.
- Yun, C. H., Tse, C. M., Nath, S. K., Levine, S. A., Brant, S. R., & Donowitz, M. (1995). Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am.J.Physiol* **269**, G1-11.

7 Danksagung

Herrn Professor Dr. Florian Lang danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut. Darüber hinaus erinnere ich mich gern an seine stets spannende und begeisternde Darstellung von Forschung und Wissenschaft. Die „offene Tür“ seines Zimmers, die jederzeit zum wissenschaftlichen Diskurs einlud, hat mich nachhaltig beeindruckt.

Die Geschwindigkeit der Korrektur meines Manuskripts, die weit über das Gewöhnliche hinausging, erscheint mir ebenfalls bemerkenswert.

Ich danke Dr. Karl Lang für die Einführung in die Methodik der Fluoreszenzmikroskopie.

Efi Faber hat durch die Präparation der Zellen die Grundlage für meine Messungen geschaffen. Für ihre Bereitschaft und Zuverlässigkeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Tanja Loch, Marion Rabe und Lejla Subasic halfen in vielfältiger Form. Ihre ununterbrochene Unterstützung verhindert das Nennen von Einzelheiten und bleibt unvergessen.

Uwe Schüler, Peter Dürr und Jürgen Kalke waren immer zur Stelle, wenn technische Probleme an Setup oder Computer auftraten.

Liebe Eltern, ihr helft schon immer, wenn es etwas zu helfen gibt. Auch beim Erarbeiten dieser Dissertationschrift und der vorangegangenen Zeit des Experimentierens standet ihr motivierend und aufmunternd an meiner Seite. Ihr habt meine Ausbildung uneingeschränkt gefördert. Ich danke Euch herzlich dafür.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Matthias Michael Müller
Geburtsdatum	15. Dezember 1974
Geburtsort	Kiel
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med Walter Müller Gisela Müller, geb. Gamerdinger

Ausbildung

1981-1985	Grundschule Fahrdorf
1985-1994	Domschule Schleswig
Oktober 1994 - Mai 2001	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1996	Physikum
August 1997	1. Staatsexamen
April 2000	2. Staatsexamen
Mai 2001	3. Staatsexamen
seit September 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Famulaturen

März 1997	Innere Medizin, Krankenhaus im Friedrichshain, Berlin
März 1998	Pädiatrische Praxis Dr. G. Stoffels, Schleswig
März 1999	Emergency Room, Porter-Memorial-Hospital, Valparaiso, USA
September 1999	Internal Medicine, Ealing-Hospital, London, GB

Praktisches Jahr

1. Tertial	Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Tübingen
2. Tertial	General Surgery Department, Downtown-Hospital, New York, USA
3. Tertial	Medizinische Klinik der Universität Tübingen