

Einfluss von Botenstoffen auf die freie Calciumkonzentration  
in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Julia Kristina Laske-Ernst

|                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| Tag der mündl. Prüfung: | 29.07.2003          |
| Dekan:                  | Prof. Dr. H. Probst |
| 1. Berichterstatter:    | Prof. Dr. U. Quast  |
| 2. Berichterstatter:    | Prof. Dr. G. Drews  |

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen, all jenen zu danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast danke ich herzlich für die interessante, herausfordernde Aufgabenstellung und für die freundliche und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Gisela Drews gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und die Vertretung meiner Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie sowie ihre freundliche Unterstützung, Hilfs- und Gesprächsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Osswald möchte ich mich für seine freundliche und motivierende Unterstützung bedanken, die sehr zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen hat sowie seinen Ideenreichtum.

Herrn PD Dr. Ulrich Russ danke ich für die ausdauernde und tatkräftige Unterstützung, für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft sowie für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Volker Vallon möchte ich mich für die Überlassung der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor knock-out-Mäuse bedanken sowie für seine kompetente und freundliche Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Frau PD Dr. Albinus danke ich für ihre freundliche und stete Diskussionsbereitschaft sowie ihre Tipps und Ratschläge zu diesem Thema.

Meinem Kollegen und Mitstreiter Herrn Ulf Lange bin ich überaus dankbar für seine moralische Unterstützung und seinen Humor auch außerhalb des Labors.

Ebenso danke ich herzlich Frau Cornelia Walz für die nette Arbeitsatmosphäre, ihre unermüdliche Gesprächsbereitschaft sowie die vielen entspannenden Mittagessen.

Frau Anke Leichtle, Frau Anke Piehl, Frau Eva Stauss,, Herrn Holger Felsch, Herrn Alexander Klein, Herrn Jochen Lichtenberg, Herrn Alexander Stehle und Herrn Damian Stephan danke ich für ihre gute Zusammenarbeit und die humorvolle, angenehme und

freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Ulrich Rauch danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Methode.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, insbesondere Frau Kerstin Richter, Frau Dr. Simone Harsch, Frau Dr. Doris Kloor, Frau Ursel Delabar, Frau Dr. Annette Hambrock, Frau Claudia Müller und Frau Barbara Hartel für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit sowie Herrn Klaus Stiehler und Herrn Daniel Eberle für die technische Hilfestellung.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls beim Bundesministerium für Forschung und Technologie (Fö 01KS9602) und beim Interdisziplinären Zentrum für Klin Fo. Tübingen (IZKF), die die Finanzierung der Arbeit übernommen haben und bei der Firma Aventis für das kostenlose Überlassen der Substanz.

Frau Dr. Ingrid Albert und Frau Dr. Luzia Heil danke ich für ihr unermüdliches Korrekturlesen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für den uneingeschränkten Rückhalt und die Förderung während meines Werdeganges und ihr Verständnis gerade in den letzten Monaten.

Speziell möchte ich mich herzlich bei meinem Mann Wolfgang Ernst bedanken, der mich immer aufmuntert hat und mit mir durchgehalten hat. Seine motivierende Unterstützung und Zuversicht hat das Abschließen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Für meine Familie  
und  
Wolfgang

**I. Inhaltsverzeichnis**

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| I       | Inhaltsverzeichnis  | I   |
| II      | Verwendete Abkürzungen  | VII |
| 1       | Einleitung und Fragestellung                                      | 1   |
| 1.1     | Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)                    | 1   |
| 1.2     | Der juxtaglomeruläre Apparat: Lokalisation und Synthese von Renin | 3   |
| 1.3     | Regulation der Reninsekretion                                     | 6   |
| 1.3.1   | Die Reninsekretion auf zellulärer Ebene beeinflussende Faktoren   | 7   |
| 1.3.1.1 | Calcium   | 7   |
| 1.3.1.2 | Membranpotential  | 13  |
| 1.3.1.3 | cAMP  | 15  |
| 1.3.1.4 | cGMP und NO   | 18  |
| 1.3.1.5 | Osmolarität   | 19  |
| 1.3.1.6 | pH-Wert   | 20  |
| 1.3.2   | Die Reninsekretion beeinflussende extrazelluläre Botenstoffe      | 21  |
| 1.3.2.1 | Angiotensin II  | 21  |
| 1.3.2.2 | Adenosin  | 23  |
| 1.3.2.3 | Synergismus zwischen ANG II und Adenosin                          | 25  |
| 1.3.2.4 | Arachidonsäure  | 27  |
| 1.3.3   | Integrative Mechanismen bei der Regulation der Reninsekretion     | 28  |
| 1.3.3.1 | Renale sympathische Innervierung                                  | 28  |
| 1.3.3.2 | Macula Densa Mechanismus  | 29  |
| 1.3.3.3 | Barorezeptormechanismus   | 30  |
| 1.4     | Fragestellung   | 32  |
| 2       | Material und Methoden   | 34  |
| 2.1     | Material und Versuchstiere  | 34  |
| 2.1.1   | Substanzen  | 34  |
| 2.1.2   | Lösungen  | 36  |
| 2.1.2.1 | Lösungen zur Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration | 37  |
| 2.1.2.2 | Lösungen zur Messung des pH-Wertes                                | 40  |
| 2.1.2.3 | Lösungen zur Messung des Membranpotentials                        | 41  |
| 2.1.3   | Versuchstiere   | 42  |
| 2.2     | Methoden  | 43  |
| 2.2.1   | Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole     | 43  |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.2.2     | Isolierung langer Gefäße aus Rattennieren   | 44 |
| 2.2.3     | Fluoreszenzmessung mittels Fluoreszenzmikroskopie   | 44 |
| 2.2.3.1   | Messapparatur   | 44 |
| 2.2.3.2   | Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration   |    |
|           | $[\text{Ca}^{2+}]_i$  | 49 |
| 2.2.3.2.1 | Färbung der afferenten Arteriolen und Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration   | 49 |
| 2.2.3.2.2 | Zellfreie Kalibrierung des Systems  | 51 |
| 2.2.3.2.3 | Auswertung der $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten - Bestimmung der Peakgröße und Fläche  | 53 |
| 2.2.3.3   | Messung des intrazellulären pH-Wertes $[\text{pH}]_i$   | 54 |
| 2.2.3.3.1 | Färbung der afferenten Arteriole und Messung des $[\text{pH}]_i$  | 54 |
| 2.2.3.3.2 | Intrazelluläre Kalibrierung des Systems   | 55 |
| 2.2.3.3.3 | Auswertung der pH-Änderung - Bestimmung der pH-Differenz  | 56 |
| 2.2.3.4   | Messung des pH-Wertes in den reninhaltigen Vesikeln   | 57 |
| 2.2.3.5   | Messung des Membranpotentials   | 57 |
| 2.2.4     | Statistik   | 58 |
| 3         | Ergebnisse  | 59 |
| 3.1       | Einfluss von Angiotensin II auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Rattenniere | 59 |
| 3.2       | Einfluss von cAMP-erhöhenden Maßnahmen auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte                         | 62 |
| 3.2.1     | Pharmakologische Charakterisierung der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch cAMP-Stimulation   | 62 |
| 3.2.1.1   | Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Forskolin und/oder IBMX   | 62 |
| 3.2.1.2   | Einfluss der Stimulation von $\beta$ -Adrenozeptoren auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$   | 64 |
| 3.2.1.2.1 | Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Isoprenalin   | 64 |
| 3.2.1.2.2 | Einfluss einer Blockade der $\alpha$ - und $\beta$ -Rezeptoren auf die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Isoprenalin                                    | 67 |
| 3.2.1.3   | Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  |    |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | durch das membranpermeable cAMP-Analogon<br>Dibutyryl-cAMP .....   | 70 |
| 3.2.2     | Evidenz, dass der $[Ca^{2+}]_i$ erhöhende Effekt von cAMP auf die<br>afferente Arteriole mit reninsezernierenden Zellen beschränkt ist                             | 72 |
| 3.2.2.1   | Vergleich der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin<br>in afferenten Arteriolen von NaCl-arm und NaCl-<br>reich ernährten Ratten .....                      | 72 |
| 3.2.2.2   | Einfluss von Isoprenalin auf $[Ca^{2+}]_i$ in afferenten<br>Arteriolen oder größeren Arterien der Rattenniere  | 77 |
| 3.2.3     | Mechanistische Untersuchungen zur Signaltransduktion I: Protein-<br>kinase A und $Na^+ - K^+ - ATPase$ .....   | 79 |
| 3.2.3.1   | Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ nach PKA-Hemmung .....  | 79 |
| 3.2.3.2   | Einfluss des $Na^+ - K^+ - ATPase$ -Blockers Ouabain auf<br>die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin .....   | 81 |
| 3.2.3.3   | Änderung des Membranpotentials durch Isoprenalin<br>+ IBMX, Ouabain und ANG II .....   | 83 |
| 3.2.4     | Mechanistische Untersuchungen II: Beitrag des $Ca^{2+}$ -Einstroms<br>zur Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch cAMP .....  | 85 |
| 3.2.4.1   | Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration<br>durch Isoprenalin + IBMX und ANG II nach<br>Entfernung von extrazellulärem $Ca^{2+}$ .....                | 85 |
| 3.2.4.2   | Einfluss der Blockade spannungsaktivierter $Ca^{2+}$ -<br>Kanäle vom L-Typ mit Isradipin auf die Erhöhung<br>von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin + IBMX und ANG II | 90 |
| 3.2.4.3   | Einfluss einer Blockade der SOCCs ( $I_{CRAC}$ ) mit<br>2-APB und $Gd^{3+}$ auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$<br>durch Isoprenalin+IBMX und ANG II .....          | 92 |
| 3.2.5     | Mechanistische Untersuchungen III: Beitrag der Entleerung<br>intrazellulärer Speicher zur $Ca^{2+}$ -Erhöhung .....  | 95 |
| 3.2.5.1   | Einfluss der Blockade der sarkoplasmatischen $Ca^{2+}$ -<br>ATPase auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin<br>+ IBMX und ANG II .....                 | 95 |
| 3.2.5.1.1 | Verwendung des $Ca^{2+}$ -ATPase-Hemmstoffes<br>Thapsigargin .....   | 95 |
| 3.2.5.1.2 | Verwendung des $Ca^{2+}$ -ATPase-Hemmstoffes   |    |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
|           | CPA .....  | 98  |
| 3.2.5.1.3 | Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin +<br>IBMX bei erhöhter Ausgangs-<br>$Ca^{2+}$ -Konzentration .....  | 101 |
| 3.2.6     | Einfluss von cAMP auf $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen der<br>Maus .....  | 103 |
| 3.3       | Wirkung von Adenosin und Adenosin-Analogen auf die intrazelluläre<br>$Ca^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriolen                                | 106 |
| 3.3.1     | Effekte von exogenem Adenosin auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -<br>Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte .....  | 106 |
| 3.3.2     | Effekte von $N^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) auf die intrazelluläre<br>$Ca^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte und<br>Versuche zur Antwortverbesserung ..... | 107 |
| 3.3.2.1   | Effekt von CHA auf $[Ca^{2+}]_i$ unter Standardbe-<br>dingungen .....  | 107 |
| 3.3.2.2   | Überprüfung einer möglichen Verstärkung der<br>Antwort auf CHA durch schonendere Collagenase-<br>behandlung und Bicarbonatpuffer .....   | 110 |
| 3.3.2.3   | Effekte von $N^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) auf die<br>intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Blockade des<br>$A_{2a}$ -Rezeptors mit ZM 241385 .....                          | 112 |
| 3.3.3     | Einfluss von endogenem Adenosin auf basales $[Ca^{2+}]_i$ in<br>reninsezernierenden Zellen aus Nieren von Ratten .....   | 113 |
| 3.3.3.1   | Effekt von ADA auf basales $[Ca^{2+}]_i$ .....   | 114 |
| 3.3.3.2   | Effekt von DPCPX auf basales $[Ca^{2+}]_i$ .....   | 116 |
| 3.3.3.3   | Möglicher Einfluss von endogenem Adenosin auf die<br>Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration<br>durch CHA .....  | 117 |
| 3.4       | Untersuchungen zum möglichen Synergismus zwischen Adenosin- und<br>ANG II-Wirkung .....  | 118 |
| 3.4.1     | Effekte von CHA auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration nach<br>Vorstimulation mit Angiotensin .....   | 119 |
| 3.4.2     | Effekte von ANG auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration nach<br>Vorstimulation mit CHA .....   | 120 |
| 3.4.3     | Untersuchungen einer möglichen Synergie zwischen Adenosin $A_1$ -<br>und ANG II-Rezeptorstimulation : Gleichzeitige Gabe der beiden  |     |

---

|   |     |
|---|-----|
| Agonisten   | 123 |
| 3.4.3.1 Gleichzeitige Gabe von Adenosin (0,01 $\mu$ M) +<br>ANG II (3 nM)   | 123 |
| 3.4.3.2 Gleichzeitige Gabe von CHA + ANG II (3 nM)  | 125 |
| 3.4.4 ANG II und endogenes Adenosin   | 132 |
| 3.4.4.1 ANG II-Wirkung nach Entfernung von endogenem<br>Adenosin durch ADA  | 132 |
| 3.4.4.2 ANG II-Wirkung nach Blockade der Adenosin $A_1$ -<br>Rezeptoren mit DPCPX   | 133 |
| 3.5 Untersuchung an der afferenten Arteriole der Niere der Maus   | 134 |
| 3.5.1 Effekt von ANG II und CHA auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration<br>in der afferenten Arteriole der Niere der Maus   | 134 |
| 3.5.1.1 Wirkung von ANG II auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -<br>Konzentration  | 134 |
| 3.5.1.2 Wirkung des Adenosin-Analogons CHA auf die<br>intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration in der afferenten<br>Arteriole aus der Mausnieren   | 136 |
| 3.5.2 Untersuchungen einer möglichen Synergie zwischen ANG II und<br>endogenem Adenosin in der afferenten Arteriole der Maus  | 139 |
| 3.5.2.1 Vergleich der $Ca^{2+}$ -Antwort auf ANG II-Stimulation<br>in afferenten Arteriolen der Nieren von Adenosin $A_1$ -<br>Rezeptor-knock-out Mäusen mit der von Wildtyp<br>Mäusen. | 139 |
| 3.5.2.2 ANG II-Wirkung auf [die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -<br>Konzentration nach Blockade der Adenosin $A_1$ -<br>Rezeptoren mit DPCPX in der afferenten Arteriole<br>von CD1-Mäusen    | 142 |
| 3.6 Einfluss der Natrium-Protonen-Austauscher 1 und 2 (NHE1 und NHE2) auf<br>den pH-Wert in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der<br>Ratte                            | 144 |
| 3.6.1 Effekt des NHE2-Inhibitors „1522“ und des NHE1-Inhibitors<br>Cariporid auf den intrazellulären pH-Wert in Ruhe  | 144 |
| 3.6.1.1 Einfluss von „1522“ auf den pH-Wert in Ruhe   | 144 |
| 3.6.1.2 Auswirkungen des NHE1-Inhibitors Cariporid auf<br>den intrazellulären pH-Wert in Ruhe   | 147 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | 3.6.1.3 Vergleich der Effekte des NHE1-Blockers Cariporid<br>und des NHE2-Inhibitors „1522“ auf den<br>intrazellulären pH-Wert . . . . .                                  | 149 |
|       | 3.6.2 Einfluss des NHE2-Blockers „1522“ auf den pH-Wert nach<br>Ansäuerung . . . . .  | 151 |
|       | 3.6.3 Messung des pH-Wertes in den reninhaltigen Vesikeln . . . . .   | 153 |
| 4     | Diskussion . . . . .  | 154 |
| 4.1   | Allgemeine Vorbemerkungen . . . . .   | 154 |
| 4.1.1 | Absolute Werte der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .  | 154 |
| 4.1.2 | Charakterisierung der untersuchten Zellen . . . . .   | 155 |
| 4.2   | Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch ANG II . . . . .   | 156 |
| 4.3   | Einfluss von cAMP auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen . . . . .  | 162 |
| 4.3.1 | Effekt von cAMP auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen von<br>Ratten und Mäusen sowie in glatten Muskelzellen verschiedener<br>Gefäße der Ratte . . . . . | 162 |
| 4.3.2 | $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle des cAMP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten:<br>Speicherentleerung und $\text{Ca}^{2+}$ -Influx . . . . .                                 | 167 |
| 4.3.3 | Mögliche (physiologische) Bedeutung des cAMP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -<br>Transienten: Das Calciumparadox der Reninsekretion . . . . .                               | 174 |
| 4.4   | Einfluss von Adenosin auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .  | 176 |
| 4.4.1 | Effekte von Adenosin und CHA auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .   | 177 |
| 4.4.2 | Endogenes Adenosin und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .   | 178 |
| 4.4.3 | Afferente Arteriole der Maus . . . . .  | 179 |
| 4.5   | Synergistische Wirkungen zwischen ANG II und Adenosin? . . . . .  | 180 |
| 4.5.1 | ANG II und exogenes Adenosin und Adenosin $\text{A}_1$ -Rezeptor-<br>agonisten . . . . .  | 180 |
| 4.5.2 | Endogenes Adenosin . . . . .  | 181 |
| 4.6   | Einfluss einer Blockade der $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher auf den pH-Wert in<br>reninsezernierenden Zellen . . . . .  | 182 |
| 5     | Zusammenfassung . . . . .   | 185 |
| 6     | Literaturverzeichnis . . . . .  | 188 |

**II. Verwendete Abkürzungen**

|                        |   |
|------------------------|---|
| A. bidest              | bidestilliertes Wasser  |
| AC                     | Adenylatcyclase   |
| ACE                    | Angiotensin-Converting-Enzym  |
| 2-APB                  | 2-Aminoethoxydiphenylboran  |
| ADA                    | Adenosindesaminase  |
| ADO                    | Adenosin  |
| ANG I                  | Angiotensin I   |
| ANG II                 | Angiotensin II  |
| AUC                    | Area under curve = Fläche unter der Kurve   |
| BCECF                  | 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein   |
| $[Ca^{2+}]_i$          | intrazelluläre Calciumionenkonzentration  |
| $[Ca^{2+}]_o$          | extrazelluläre Calciumionenkonzentration  |
| $CaCl_2$               | Calciumchlorid  |
| cAMP                   | cyclisches Adenosinmonophosphat   |
| CHA                    | N <sup>6</sup> -Cyclohexyladenosin  |
| Collagenase            | Collagenase Typ A, Clostridium histolyticum   |
| COX                    | Cyclooxygenase  |
| CPA                    | Cyclopiazonsäure  |
| CRAC                   | Calcium release-activated calcium channel = Calcium-Kanal, der durch die Entleerung intrazellulärer Speicher aktiviert wird |
| DAG                    | Diacylglycerol  |
| db-cAMP                | dibutyryl-cAMP  |
| DiBAC <sub>(4)</sub> 3 | bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol   |
| DMSO                   | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                    | Desoxyribonukleinsäure  |
| DPCPX                  | 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (Adenosin - A <sub>1</sub> - Antagonist)  |
| EC <sub>50</sub>       | halbmaximale Wirkkonzentration (Aktivierung) eines Stoffes  |
| EGTA                   | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure  |
| EGM                    | Extraglomeruläres Mesangium   |

---

|                  |  |
|------------------|--|
| $E_m$            | Membranpotential   |
| Fura-2           | 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| $Gd^{3+}$        | Gadolinium   |
| H89              | N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide<br>Dihydrobromide = Proteinkinase A Inhibitor          |
| HCl              | Salzsäure  |
| HEPES            | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure  |
| HEPES-PS         | HEPES gepufferte physiologische Salzlösung   |
| HEPES-PS-B       | HEPES gepufferte physiologische Salzlösung mit Bicarbonat  |
| HEPES-PS-BA      | HEPES gepufferte physiologische Salzlösung mit Bicarbonat und Albumin  |
| IBMX             | 3-Isobutyl-1-methylxanthin   |
| $IC_{50}$        | Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt auftritt  |
| $IP_3$           | Inositol-1,4,5-triphosphat   |
| ISO              | Isoprenalin  |
| $[K^+]_o$        | extrazelluläre Kaliumionenkonzentration  |
| $K_{ATP}$ -Kanal | ATP-sensitiver $K^+$ -Kanal  |
| KCl              | Kaliumchlorid  |
| $KH_2PO_4$       | Kaliumdihydrogenphosphat   |
| $K_{ir}$         | (inwardly rectifying $K^+$ channel) einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal  |
| $K_m$            | Dissoziationskonstante   |
| LOS              | Losartan   |
| MD               | Macula Densa   |
| MES              | $\beta$ -Morpholino-ethansulfonsäure Hydrat  |
| min              | Minute(n)  |
| $MgCl_2$         | Magnesiumchlorid   |
| $MgSO_4$         | Magnesiumsulfat  |
| NaCl             | Natriumchlorid   |
| $Na_2HPO_4$      | Di-Natriumhydrogenphosphat   |

---

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Natrium-dihydrogenphosphat   |
| NaOH                             | Natriumhydroxid  |
| NHE                              | Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher   |
| NIH                              | National Institut of Health  |
| PCR                              | Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion   |
| PDE                              | Phosphodiesterase  |
| PG                               | Prostaglandin  |
| PKA                              | Proteinkinase A  |
| PKC                              | Proteinkinase C  |
| PLC                              | Phospholipase C  |
| RAAS                             | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System  |
| R <sub>min</sub>                 | F 340 / F 380 bei Calcium-freier Lösung  |
| R <sub>max</sub>                 | F 340 / F 380 bei sättigender Calciumkonzentration   |
| ROCCs                            | Rezeptor-operated calcium channel = Rezeptor-aktivierte Calciumkanäle  |
| ROI                              | Region of interest = Messfeld in mikrofluorimetrischen Experimenten  |
| RPB                              | Renin-positiver Bereich  |
| SEM                              | Standard error of the mean = Mittlerer Fehler des Mittelwertes   |
| SL                               | Stammlösung  |
| SOCCs                            | Store-operated calcium channels = Speicher-aktivierte Calciumkanäle  |
| SR                               | Sarkoplasmatisches Retikulum   |
| TGF                              | Tubuloglomerulärer Feedback  |
| TRIS                             | Tris[hydroxymethyl]aminomethane  |
| VOCCs                            | Voltage-operated calcium channels = Spannungsaktivierte Calciumkanäle  |
| WT                               | Wildtypmäuse   |
| ZM 241385                        | 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (A <sub>2a</sub> -Antagonist) |

## 1 Einleitung und Fragestellung

Herz-Kreislauf-erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Einer der häufigsten und wichtigsten Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-erkrankungen aller Art ist ein zu hoher Blutdruck, die Hypertonie. Der Organismus muss, wenn er überleben will, in der Lage sein, den Blutdruck sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt zu kontrollieren, einen Ausgleich zwischen dem Verlust von Wasser und Elektrolyten und deren Aufnahme zu schaffen, und somit Volumen und Osmolarität des Extrazellulärraumes konstant zu halten. Wichtig ist dabei auch, dass bei der notwendigen Ausscheidung von Stoffwechselprodukten der Wasserverlust nicht zu groß bzw. ausgeglichen wird.

Eine entscheidende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Volumens, der Elektrolyte und des Blutdrucks kommt dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zu, einem System, dessen entscheidender Schritt die Reninsekretion aus der Niere darstellt. Ein besseres Verständnis des Mechanismus der Reninsekretion könnte einen Eingriff in dieses System bereits auf Ebene des Renins erlauben. Dann würden innerhalb des RAAS, neben den AT<sub>1</sub>-Blockern (Blocker des ANG II AT<sub>1</sub>-Rezeptors) und ACE-Hemmern (Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms), weitere Therapeutika zur Blutdruckregulation und somit zur Vorbeugung der aus einer Hypertonie folgenden Herz-Kreislauf-erkrankungen zur Verfügung stehen. Im Folgenden soll das RAAS und insbesondere die komplexe Regulation und Modulation der Reninsekretion genauer erläutert werden.

### 1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das RAAS (Abb.1.1) spielt neben dem Sympathikus eine zentrale Rolle bei der Regulation von Blutdruck sowie Wasser- und Elektrolythaushalt (Hackenthal, 2001). Das RAAS wird vor allem aktiviert durch Blutdruckabfall, Abnahme des Plasmavolumens und Salzentzug. Eine Aktivierung des RAAS hat eine Zunahme des arteriellen Blutdrucks, des Herzminutenvolumens und der kardialen Vor- und Nachlast zur Folge.

Die aktive Form der Aspartylprotease Renin ist ein Glykoprotein aus 340 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 37 - 40 kDa. Es wird synthetisiert als Präprorenin, bestehend aus 406 Aminosäuren, das in das inaktive Prorenin umgewandelt wird. Prorenin wird durch Abspaltung von 43 Aminosäuren am N-terminalen Ende in die aktive Form der Protease

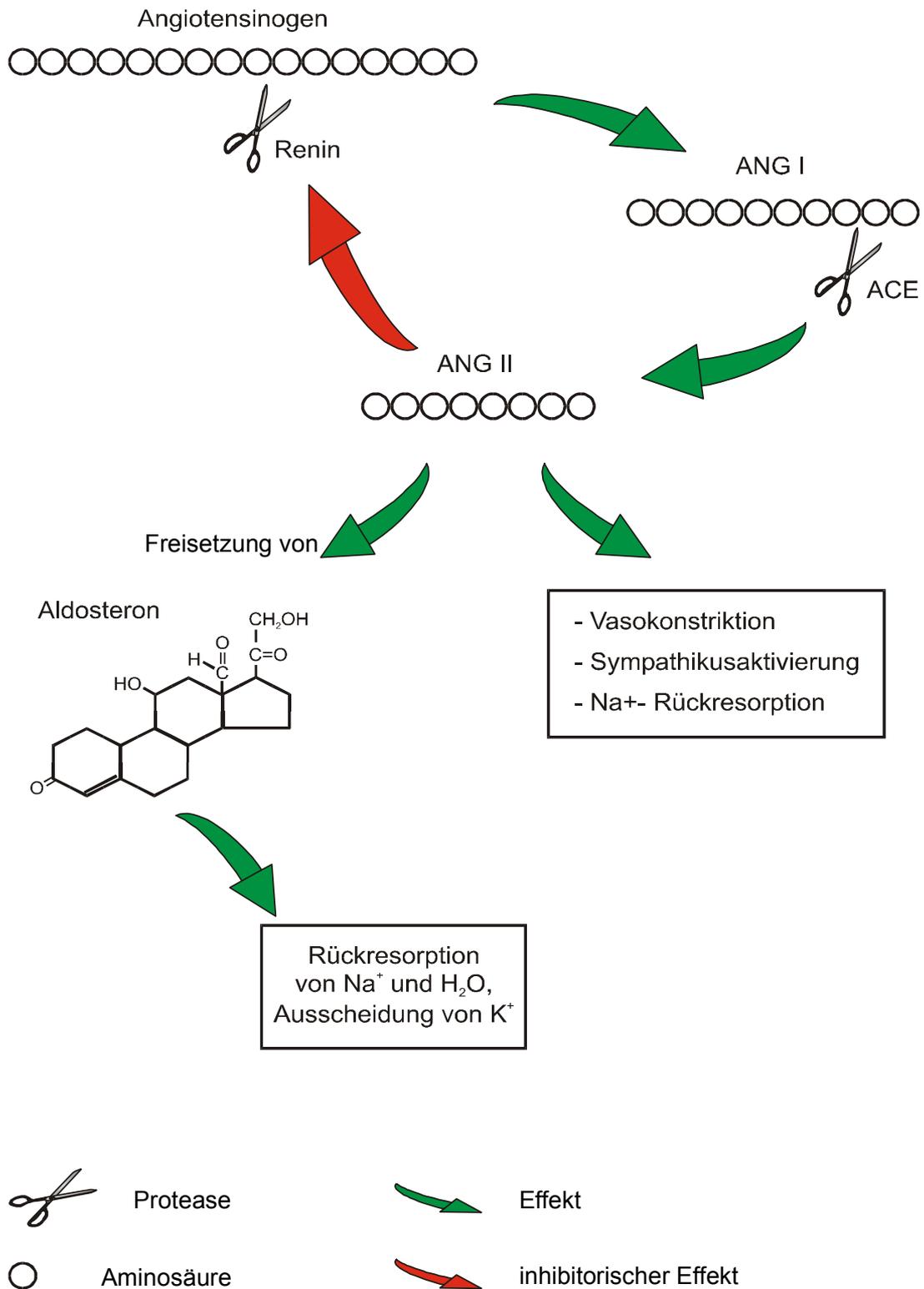


Abb. 1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (nach Rauch, 2000)

überführt. Renin spaltet mit hoher Substratspezifität von seinem einzigen bekannten Substrat, dem in der Leber gebildeten Glycoprotein Angiotensinogen, das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab, aus dem dann durch weitere Abspaltung eines Dipeptids mit Hilfe der Protease ACE das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) entsteht. In dieser Kette ist die durch Renin katalysierte Bildung von ANG I der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, was auf die zentrale Rolle des Renins hinweist.

Im RAAS ist ANG II das wichtigste Effektorpeptid. Es wirkt vasokonstriktorisch durch direkte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und erhöht die Aktivität des Sympathikus sowie die  $\text{Na}^+$ -Rückresorption in den Nierentubuli. Die Vasokonstriktion kann  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig über ein G-Protein der  $G_{q/11}$ -Familie (Phospholipase C (PLC)-Aktivierung) und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig über ein G-Protein der  $G_{12/13}$ -Familie via Rho und Rho-Kinasen erfolgen (Oberdisse, 2001). Ferner inhibiert ANG II die Reninsekretion, d. h. es gibt einen negativen Feed-Back-Mechanismus, und es stimuliert die Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde.

Aldosteron, ein Mineralokortikoid, führt letztendlich zur Erhöhung der  $\text{Na}^+$ - und Wasserrückresorption im distalen Nierentubulus; dies führt zur Zunahme des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und zu einer kompensatorischen  $\text{K}^+$ -Ausscheidung.

## 1.2 Der juxtaglomeruläre Apparat: Lokalisation und Synthese von Renin

Das morphologische und funktionelle Basiselement der Niere ist das Nephron. Von diesen Einheiten enthält jede menschliche Niere etwa 1-1,2 Millionen. Das Nephron besteht aus dem Glomerulum (Nierenkörperchen) und dem sich anschließenden Tubulusapparat, der sich aufgliedert in den proximalen Tubulus, die Henle'sche Schleife und den distalen Tubulus, welcher dann in ein Sammelrohr mündet. Die Blutversorgung erfolgt durch die Arteria renalis, die aus der Aorta entstammt und sich nach ihrem Eintritt in die Niere in die Arteriae interlobares, daraus in die Arteriae arcuatae und schließlich in die Arteriae interlobulares verzweigt. Aus dieser entspringen schließlich die afferenten Arteriolen (Vasa afferentia), die die einzelnen Nierenkörperchen versorgen, ein Kapillarnetz bilden und sich anschließend wieder in den efferenten Arteriolen vereinigen.

Die Reninsynthese findet hauptsächlich in den juxtaglomerulären (reninsezernierenden) Zellen statt, die metaplastisch umgewandelte glatte Muskelzellen (Abb.1.2) darstellen und

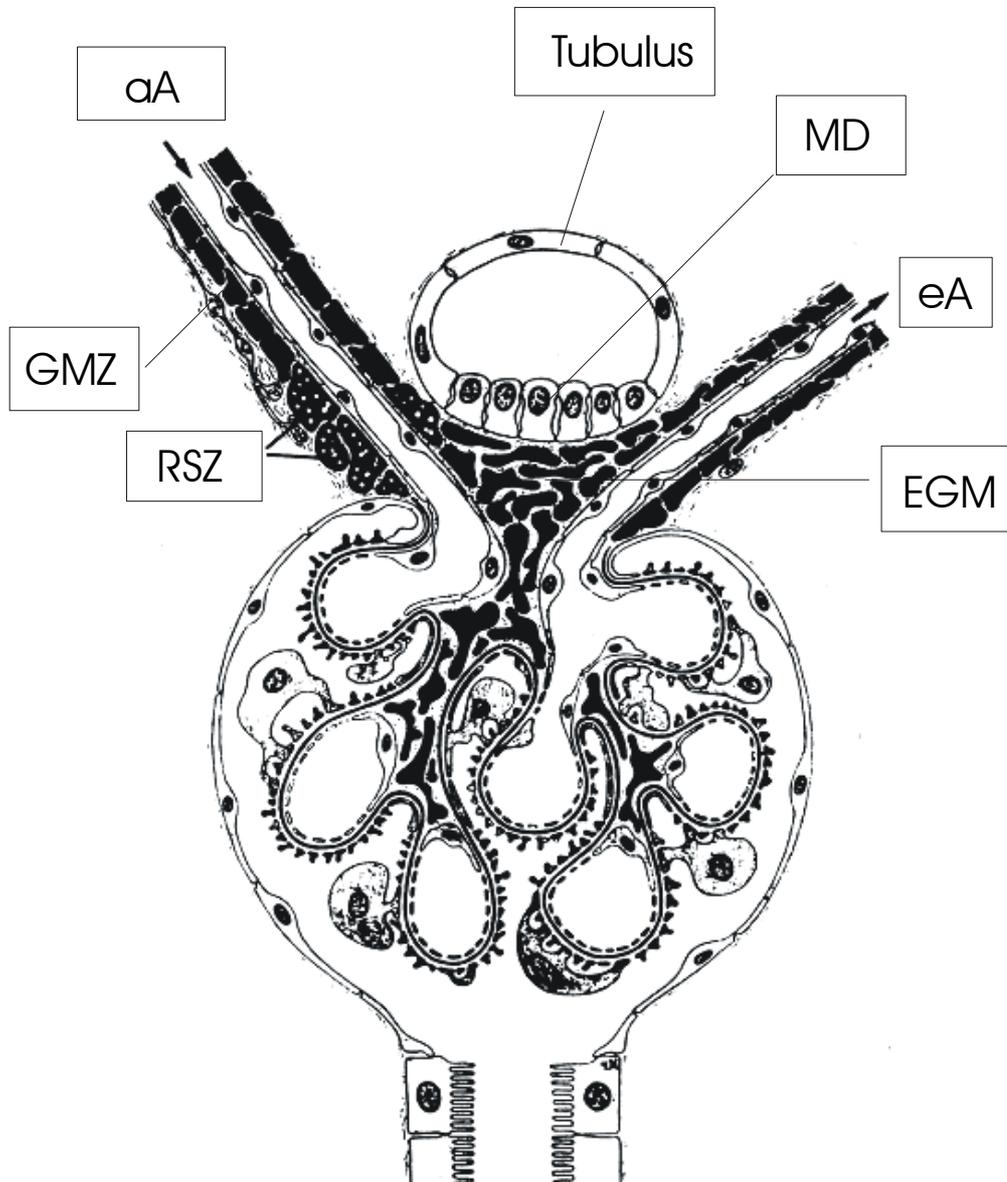


Abb. 1.2 Schematischer Querschnitt durch ein Glomerulum und den juxtaglomerulären Apparat  
Die granulierten reninsekretierenden Zellen (RSZ) sind in der Media der afferenten Arteriole (aA) lokalisiert. Ihnen benachbart liegen glatte Muskelzellen (GMZ), extraglomeruläre Mesangiumzellen (EMZ) sowie die Macula Densa Zellen (MD), welche am vaskulären Pol zwischen afferenter und efferenter Arteriole (eA) lokalisiert sind (nach Kriz, 1998).

die zum größten Teil in der Media der afferenten Arteriole, in geringem Maße auch in der efferenten Arteriole lokalisiert sind. Die Anzahl der postglomerulären reninsezernierenden Zellen ist jedoch klein (Taugner et al., 1982; Hackenthal et al., 1990). Die afferenten Arteriolen sind aus der Tunica intima (Endothelzellschicht + Elastinschicht), der einschichtigen Tunica media und der Tunica adventitia aufgebaut. Aufgrund der dort anzutreffenden Zellen können sie in einen proximalen und einen distalen Teil unterteilt werden. Im proximalen Abschnitt sind es ausschließlich glatte Muskelzellen, welche die Media bilden. Sie umgeben ringförmig den innenliegenden Endothelschlauch. Im distalen Abschnitt hingegen findet man neben den glatten Muskelzellen die reninsezernierenden Zellen, die in mehreren Lagen übereinander angeordnet sein können (Gattone et al., 1984). Den größten Teil reninsezernierender Zellen findet man am Pol der afferenten Arteriole nahe dem Eintritt in das Glomerulum, 10 - 40  $\mu\text{m}$  proximal lokalisiert. In einigen afferenten Arteriolen sind sie jedoch auch weiter proximal, bis zu 100  $\mu\text{m}$  vom Glomerulum entfernt nachweisbar (Bührle et al., 1984; Rauch, 2000), in anderen befinden sich gar keine reninsezernierenden Zellen.

Bezüglich der Länge des reninpositiven Bereiches der Arteriolen gibt es nicht nur Unterschiede zwischen Tieren verschiedener Arten oder Tieren einer Art, sondern auch zwischen den afferenten Arteriolen eines Tieres (Taugner et al., 1982; Bührle et al., 1984). Ebenfalls ist in einer afferenten Arteriole die Länge des reninpositiven Bereiches nicht konstant, sie kann sich an unterschiedliche physiologische Bedingungen neu anpassen. So verursacht eine salzarme Diät, dass auch weiter proximal gelegene glatte Muskelzellen in reninsezernierende Zellen umgewandelt werden (metaplastische Transformation, Cantin et al., 1977). Umgekehrt kann es aber auch zu einer Rückumwandlung von reninsezernierenden Zellen in glatte Muskelzellen kommen (metaplastische Retransformation, Hackenthal et al., 1990). Diese Möglichkeit der Transformation und Retransformation entsprechend den physiologischen Anforderungen bedeutet letztendlich, dass es zu jeder Zeit Zellen im Wandel gibt, so genannte intermediäre (teilweise umgewandelte) Zellen, die bezüglich ihrer Morphologie und Funktion zwischen glatten Muskelzellen und reninsezernierenden Zellen anzusiedeln sind (Hackenthal et al., 1990). Auch diese intermediären Zellen sind ringförmig um den Endothelschlauch angeordnet, besitzen Myofilamente und zusätzliche Reningranula. Die reninsezernierenden Zellen selbst sind relativ plumpe Zellen, die mit vielen Fortsätzen

versehen sind, kaum Myofilamente aufweisen und im Cytoplasma sehr viele Renin granula eingelagert haben (Hackenthal et al., 1990). Diese Renin granula, in denen das Renin gespeichert ist und aus denen es freigesetzt wird, sind wahrscheinlich lysosomaler Natur (Taugner und Hackenthal, 1989). Die unter 1.1 erwähnte Aktivierung von Prorenin zu Renin kann *in vitro* durch die Cathepsine B und D, lysosomale Enzyme, bei einem sauren pH-Wert katalysiert werden. Dieser saure pH-Wert (pH 5.5) herrscht auch in den Renin granula (Takahashi et al., 1982; Übersichten: Taugner und Hackenthal, 1989; Hackenthal et al., 1990). Cathepsin B und D sind in den Renin granula vorhanden (Taugner et al., 1985). Speziell Cathepsin B wird als Hauptkandidat für die Aktivierung von Renin angesehen.

### **1.3 Regulation der Reninsekretion**

Wichtig in der Kontrolle der Reninsekretion ist der juxtaglomeruläre Apparat, an dem spezialisierte Tubuluszellen der Macula Densa in engem Kontakt mit der afferenten Arteriole des zugehörigen Glomerulums stehen. Zwischen Macula Densa und vaskulärem Pol liegt das extraglomeruläre Mesangium (EGM) (Abb. 1.2). Die reninsezernierenden Zellen sind mit glatten Muskelzellen, Endothelzellen und extraglomerulären Mesangiumzellen über gap junctions verbunden (Forssman und Taugner, 1977, zitiert in Lorenz et al., 1993; Taugner et al., 1984). Einen weiteren Beweis für die Verbindung zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen über gap junctions lieferten Schuster et al. (2001).

Die physiologischen Mechanismen, die für die Kontrolle der Reninsekretion verantwortlich sind, lassen sich in drei Ebenen untergliedern, die physiologische bzw. den Gesamtorganismus betreffende Ebene, die Ebene der Botenstoffe und Mediatoren und die auf zellulärer Ebene wirksamen Faktoren, wobei die Übergänge zwischen der zweiten und dritten Ebene fließend sind (Übersichten: Osswald und Quast, 1995; Kurtz, 1989; Hackenthal et al., 1990).

Auf der ersten, der physiologischen Ebene, die den Gesamtorganismus betrachtet, gibt es wieder eine Unterteilung in drei wichtige Mechanismen:

- die renale sympathische Innervierung
- den Barorezeptormechanismus
- den Macula Densa-Mechanismus

In der darunter liegenden Ebene spielen folgende Botenstoffe und Mediatoren eine wichtige

Rolle:

- Angiotensin II
- Adenosin
- NO
- Arachidonsäure und ihre Metabolite

In der untersten Ebene lassen sich Faktoren zusammenfassen, die auf zellulärer Ebene wirken:

- $\text{Ca}^{2+}$
- Membranpotential
- cAMP
- cGMP
- Osmolarität
- pH

Im folgenden werden die drei Ebenen genauer beschrieben, wobei mit der letzten Ebene begonnen wird, da die in der Rangfolge weiter oben angesiedelten Mechanismen auf diese zellulären Faktoren zurückgehen.

### **1.3.1 Die Reninsekretion auf zellulärer Ebene beeinflussende Faktoren**

#### *1.3.1.1 Calcium*

Wie unter 1.2 beschrieben, stellen reninsezernierende Zellen umgewandelte glatte Muskelzellen dar. Aufgrund der Tatsache, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsmechanismen in reninsezernierenden Zellen noch nicht vollständig bekannt sind, werden im ersten Abschnitt (A) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsmechanismen in glatten Muskelzellen beschrieben. Im Abschnitt B wird der Zusammenhang zwischen der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und der Reninsekretion dargestellt.

#### **A: Elemente der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in glatten Muskelzellen**

Auch hier kann wieder eine Unterteilung der Regulationsmechanismen in verschiedene Faktoren vorgenommen werden:

- (a)  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle durch verschiedene Arten von Kanälen
- (b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen und Transporter
- (c)  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher

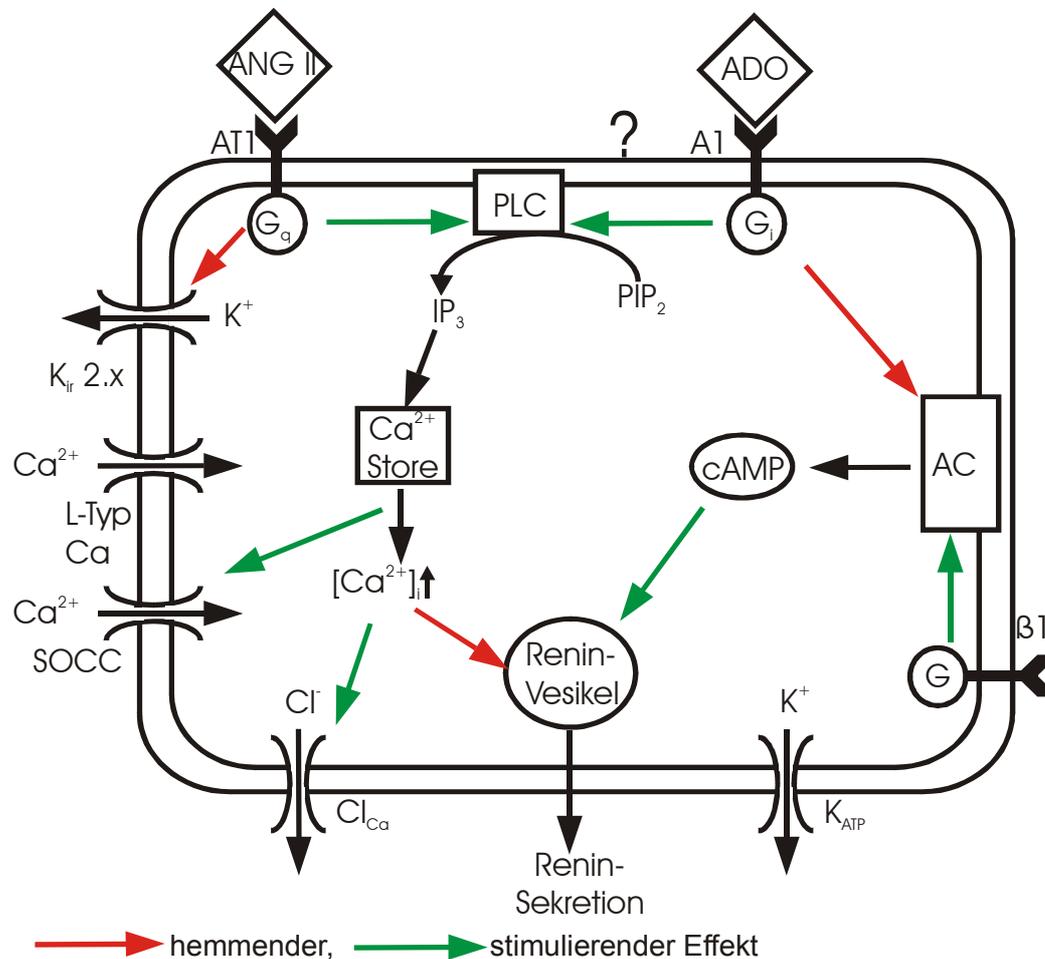


Abb.1.3 Signaltransduktion in reninsekretierenden Zellen

AC Adenylatcyclase, ADO Adenosin, A<sub>1</sub> Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor, ANG II Angiotensin II, AT<sub>1</sub> Angiotensin AT<sub>1</sub>-Rezeptor, β<sub>1</sub> β<sub>1</sub>-Adrenozeptor, SOCCs store operated Ca<sup>2+</sup> channels, L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal, PLC Phospholipase C, G<sub>i</sub> inhibitorisches G-Protein, G<sub>q</sub> G-Protein, das PLC aktiviert. Über Bindung an den G-Protein-gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor führt ANG II zur Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-triphosphat), welches Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern (Ca<sup>2+</sup>-Stores) freisetzt. Das Entleeren dieser Speicher bewirkt eine Aktivierung der SOCCs. Diese Vorgänge führen zu einer Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, die die Reninsekretion hemmt. ADO hat über den ADO A<sub>1</sub>-Rezeptor ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Reninsekretion. Aktivierung des Rezeptors hemmt die AC und senkt die cAMP-Konzentration; über den IP<sub>3</sub>-Weg erhöht der aktivierte Rezeptor, wie bei ANG II, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

### Aa) Ca<sup>2+</sup>-Kanäle:

Die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, durch die Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen kann, lassen sich untergliedern in spannungsaktivierte und nicht-spannungsaktivierte Kanäle (Abb. 1.3). Die spannungsaktivierten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels = VOCCs) stellen den am besten charakterisierten Eintrittsweg für Ca<sup>2+</sup> in die Zelle dar.

Auch hier gibt es verschiedene Typen, von denen wiederum der spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom L-Typ ( $\text{Ca}_v1.x$ ) der bekannteste und am meisten verbreitete ist (Übersicht Karaki et al., 1997). Die VOCCs werden durch Membrandepolarisation aktiviert und durch Membranhyperpolarisation inaktiviert. Spezielle L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker wie z. B. die Dihydropyridine blockieren diese Kanäle und verhindern den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Übersicht Hille, 1992). Neben diesen verbreiteten spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ gibt es in glatten Muskelzellen der Arorta und in der Niere noch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom P/Q-Typ ( $\text{Ca}_v2.1$ ), die am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beteiligt sind (Hansen et al., 2000).

Daneben sind vermutlich auch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom T-Typ ( $\text{Ca}_v3.x$ ) am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in glatte Muskelzellen beteiligt (Perez-Reyes, 2003). Diese Kanäle werden bei einem Membranpotential von -75 bis -60 mV, wie es in den meisten glatten Muskelzellen vorherrschend ist, inaktiviert, so dass ihre physiologische Bedeutung hier noch nicht eindeutig geklärt ist (Perez-Reyes, 2003). Es wird vermutet, dass sie an der Aufrechterhaltung der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt sind. Im Nierengewebe sind diese Kanäle ebenfalls nachgewiesen worden (Übersicht Perez-Reyes, 2003; Gordienko et al., 1994, zitiert in Hansen et al., 2000).

Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in glatte Muskelzellen kann auch durch nicht-spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgen. Diese lassen sich unterteilen in rezeptoraktivierte (receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels = ROCCs) und speicheraktivierte (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels = SOCCs)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Abb. 1.3). ROCCs sollten besser rezeptoraktivierte nichtselektive Kationenkanäle genannt werden. An der Kanalaktivierung sind hier nach Rezeptorbindung immer G-Proteine, wahrscheinlich aus der Familie der Pertussistoxin empfindlichen  $G_i/G_o$  Untergruppe beteiligt (Übersicht McFadzean und Gibson, 2002).

SOCCs sind speicherregulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die durch Entleeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktiviert werden. Die Idee für diesen kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wurde zunächst von Casteels und Drogmann (1981) vorgeschlagen und von Putney (1990) durch Untersuchungen an nicht erregbaren Zellen belegt und weiter verbessert. Die Grundidee ist, dass nicht das aus den Speichern freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle diese Kanäle aktiviert, sondern der leere Speicher aktiviert sie über ein bisher unbekanntes Signal; an diesem Prozess sind auch die Mitochondrien beteiligt (Übersichten: Parekh und Penner, 1997; McFadzean und Gibson, 2002; Parekh, 2003). Durch diese Kanäle strömt  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytoplasma. Es gibt verschiedene

Modelle, nach denen es entweder einen direkten Kontakt zwischen Speicher und Plasmamembran geben könnte (Irvine, 1990; Übersicht: Parekh und Penner, 1997) oder aber ein intermediäres Signal ausgelöst werden könnte, was wiederum direkt oder indirekt die Kanäle aktiviert (Parekh und Penner, 1997). Ma et al. (2000) gehen nach ihren Ergebnissen davon aus, dass für die Aktivierung von SOCCs eine physikalische Interaktion zwischen den Speichern und der Plasmamembran wichtig ist. Zum anderen stellt aber auch Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) einen wichtigen Mediator für die Kopplung zwischen leeren Speichern und Aktivierung von SOCCs dar (Ma et al., 2000). Nach Albert und Large (2002) hingegen werden SOCCs in glatten Muskelzellen auch unabhängig von einem Speichersignal durch den DAG-PKC-Weg (Diacylglycerol-Proteinkinase C-Weg) aktiviert. Sie schlagen vor, dass beide Mechanismen eine Rolle spielen könnten. Die molekulare Identität der SOCCs ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass sie zur Familie der TRP Proteine (**t**ransient **r**eceptor **p**otential) gehören (vielleicht liegt hier die Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse, nämlich dass in verschiedenen glatten Muskelzellen unterschiedliche SOCCs existieren, die ähnlich aber doch etwas unterschiedlich aktiviert werden). Auch wird inzwischen angenommen, dass SOCCs nicht nur an der Wiederauffüllung der Speicher beteiligt sind, sondern auch zur Kontraktion beitragen (Übersicht McFadzean und Gibson, 2002).

Fellner und Arendshorst (1999) fanden, dass in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Ratte das Entleeren der intrazellulären  $IP_3$ -sensitiven Speicher den Einstrom von  $Ca^{2+}$  über SOCCs aktiviert. An der isoliert perfundierten Rattenniere stellten Schweda et al. (2000) eine Hemmung der Reninsekretion durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch speicheraktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle fest. Dies kann als Hinweis auf die Anwesenheit solcher Kanäle in den reninsezernierenden Zellen aufgefasst werden; allerdings muss man auch die Kopplung der reninsezernierenden Zellen an die anderen Zellen des juxtaglomerulären Apparates durch die gap junctions beachten.

#### **Ab) $Ca^{2+}$ -Pumpen und Transporter:**

Konsequenterweise gibt es in den glatten Muskelzellen eine ganze Reihe von Mechanismen, die  $Ca^{2+}$  aus der Zelle heraus transportieren, also dafür verantwortlich sind, den  $Ca^{2+}$ -Spiegel in der Zelle gering zu halten. Hierzu gehören die  $Ca^{2+}$ -ATPasen und die  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher.  $Ca^{2+}$ -ATPasen sind sowohl in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums

(SR) als auch in der Plasmamembran (Wuytack et al., 1982; Übersicht Karaki et al., 1997) zu finden. Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher befindet sich nur in der Plasmamembran (Raeymaekers et al., 1985; Übersicht Karaki et al., 1997).

Unter physiologischen Bedingungen transportieren beide Systeme  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus. Unter bestimmten Bedingungen kann die Transportrichtung auch umgekehrt ( $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher) bzw. kann der Transport eingestellt werden ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). Dies bewirkt dann somit einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Übersicht Karaki et al., 1997).

### **Ac) $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher:**

Von großer Bedeutung für die Regulation von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den glatten Muskelzellen sind die intrazellulären Speicher, die sich ebenfalls in zwei Arten aufteilen lassen: es gibt zum einen das SR, daneben findet man die  $\text{Ca}^{2+}$ -speichernden Mitochondrien, denen aber wahrscheinlich im Gegensatz zum SR unter normalen Bedingungen keine so große Bedeutung zukommt. Beleg dafür ist der enorme Unterschied in der Größe der freisetzbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools des SR und der Mitochondrien (SR : M = 20 : 1; Karaki et al., 1997). Ein weiterer Hinweis dafür ist die höhere Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im SR gegenüber der Mitochondrienmembran (SR-Km: 0,91  $\mu\text{M}$ ; Mitochondrium-Km: 7,1  $\mu\text{M}$ ; Grover und Samson, 1986, zitiert in Karaki et al., 1997). Der wichtigste  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in den glatten Muskelzellen ist demzufolge das SR. Die hier lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen pumpen ständig  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR und sorgen somit, zusammen mit plasmalemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern für einen relativ niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Cytosol ( $\sim 100$  nM). Aus dem SR kann  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch zwei Mechanismen stimuliert werden: zum einen über Stimulation des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors auf dem SR, zum anderen über den Ryanodin-Rezeptor, der durch  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder cADP-Ribose stimuliert wird und ryanodin-, caffein- und ATP-empfindlich ist (Hermann-Frank et al., 1991). Bezüglich weiterer die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induzierender Mechanismen sowie hinsichtlich der Unterteilung des SR in verschiedene Kompartimente besteht zur Zeit noch Unklarheit, was auf gewebs- oder artspezifischen Unterschieden beruhen könnte (Übersicht Karaki et al., 1997).

### **B: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Reninsekretion**

In sezernierenden Zellen allgemein ist ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit einer Sekretionssteigerung verbunden und umgekehrt ( $\beta$ -Zellen im Pankreas, synaptisches Bläschen). In den

reninsezernierenden Zellen gibt es jedoch ein Phänomen, das als „Calciumparadox“ bezeichnet wird: ein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  hemmt die Reninsekretion, ein Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  stimuliert sie (Churchill, 1985, 1990; Abb. 1.3). Berücksichtigt man, dass Renin die ANG II-Konzentration erhöht, die wiederum zu einem Blutdruckanstieg und zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  führt, würde das „Calciumparadox“ als negativer Feed-Back-Mechanismus sinnvoll sein.

Die inverse Beziehung zwischen  $[Ca^{2+}]_i$  und der Reninsekretion wird unter anderem durch Messungen von Della Bruna et al. (1995) bestätigt, die bei Erhöhung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_o$ ) von 0 auf 3 mM über eine Stunde eine Inhibition der Reninsekretion beobachteten. Auch der  $Ca^{2+}$ -Kanalagonist BAY K 8644 bewirkt eine Hemmung der Reninsekretion (Churchill, 1987). Weiterhin gibt es Messungen von Sosath (1999), die in isolierten reninsezernierenden Zellen bei Reduktion von  $[Ca^{2+}]_o$  von 2 auf 0 mM (nominal  $Ca^{2+}$ -freie Lösung) einen signifikanten Anstieg der Reninsekretion feststellte. Schweda et al. (2000) fanden, dass Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und anschließendem  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum die Reninsekretion effektiv hemmt. Schricker et al. (1993) hingegen beobachteten zwar auch eine Hemmung der Reninsekretion aus isolierten reninsezernierenden Zellen bei Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$ , die jedoch nach 1-3 Stunden schwächer wurde und sich anschließend in eine Stimulation umkehrte. Die Autoren vermuten aufgrund dieser Ergebnisse, dass die Hemmung der Reninsekretion durch erhöhtes  $[Ca^{2+}]_i$  evtl. ein indirekter Effekt ist und einen darunterliegenden stimulatorischen Effekt überdeckt (Schricker et al., 1993). Allerdings konnten Kurtz et al. (1990) nach Depolarisation mit einer erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_o$ ) keine Hemmung der Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen der Maus und der Ratte als Antwort nachweisen; ebensowenig konnten sie eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  finden. In einer weiteren Arbeit konnten Kurtz et al. (2000) bei der Ratte die Hemmung der Reninsekretion durch  $K^+$ -Kanalblocker mit einem Blocker spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle nicht aufheben. Angesichts der Tatsache, dass die reninsezernierenden Zellen durch gap junctions an glatte Muskelzellen (die auf jeden Fall VOCCs besitzen) und extramesangiale Zellen gekoppelt sind, sind diese Befunde erstaunlich. Es gibt zwei Hypothesen, die die Wirkung des  $Ca^{2+}$  auf die Reninsekretion zu erklären versuchen. Ein Erklärungsansatz beruht darauf, dass in reninsezernierenden Zellen der Maus

ein  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom nachgewiesen ist (Kurtz und Penner, 1989) (Abb. 1.3), dessen Aktivierung (zusammen mit Kaliumkanälen) zur Abnahme der intrazellulären Osmolarität und damit zu einem Schrumpfen der Zelle führt. Änderungen des Zellvolumens werden mit Änderungen der Reninsekretion in Zusammenhang gebracht, wobei ein Schrumpfen der Zelle die Reninsekretion inhibiert, ein Schwellen die Reninsekretion stimuliert (Skott, 1988). Näheres zu dieser Wirkweise wird im Abschnitt „Osmolarität“ (Abschnitt 1.3.1.5) diskutiert.

Taugner et al. (1988) interpretieren das „Calciumparadox“ mit einer anderen Hypothese. Wie bereits beschrieben (Kap. 1.2), sind reninsezernierende Zellen umgewandelte glatte Muskelzellen. Diese Umwandlung ist je nach Stimulation oder Inhibition reversibel, was bedeutet, dass es immer intermediäre Zellen gibt, die hinsichtlich Morphologie und Verhalten Zwischenstufen einnehmen (Taugner et al., 1988). In den intermediären Zellen sind die Reningranula durch ein dichtes Myofilamentnetzwerk von der Zellmembran getrennt, welches möglicherweise bei Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kontrahiert, das Verschmelzen der Granula mit der Plasmamembran unterbindet und somit die Reninsekretion aus diesen Zellen inhibiert.

### *1.3.1.2 Membranpotential*

Im Zusammenhang mit  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kommt dem Membranpotential eine besondere Bedeutung in den reninsezernierenden Zellen zu. Das Membranpotential hat einen Einfluss auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (z. B. über  $\text{Ca}_v$ -Kanäle,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher), aber auch Veränderungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beeinflussen das Membranpotential. Über die Beeinflussung anderer spannungsabhängiger Kanäle und elektrogener Transporter kann das Membranpotential sehr viele andere Zelleigenschaften ändern, unter anderem auch das Volumen. So konnten Kurtz und Penner (1989) zeigen, dass eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die reninsezernierenden Zellen depolarisiert, indem einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanal aktiviert wird. Dies führt zum Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  aus dem Cytosol, da das  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotential positiver ist als das Membranpotential ( $E_{\text{Cl}}$  in glatten Muskelzellen zw. -30 und -6 mV, Aikin, 1990; Übersicht Large und Wang, 1996).

$E_m$  in reninsezernierenden Zellen:

|                        |                |
|------------------------|----------------|
| Fishman, 1976          | -35 und -70 mV |
| Bührle et al., 1984    | -55 mV         |
| Bührle et al., 1986    | -73 mV         |
| Kurtz und Penner, 1989 | -62 mV         |
| Russ et al., 1999      | -61 mV         |

Grundsätzlich kann das Membranpotential in reninsezernierenden Zellen in die hyperpolarisierende als auch in die depolarisierende Richtung verschoben werden.

Ein wichtiger Stimulus für die Membrandepolarisation ist die Erhöhung von  $[K^+]_o$ , was an reninsezernierenden Zellen der Maus gezeigt werden konnte (Fishman, 1976; Kurtz et al., 1990). Depolarisation mit Kalium bewirkt weiterhin eine Hemmung der Reninsekretion, wie in der isoliert perfundierten Rattenniere, an Nierenschnitten von Ratte, Hund, Schwein und Kaninchen sowie an isolierten Rattenglomeruli gezeigt werden konnte (Übersicht Churchill, 1995). Dieser hemmende Effekt auf die Reninsekretion durch Erhöhung von  $[K^+]_o$  und folgender Membrandepolarisation war begleitet von einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der durch Blockade der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle verhindert wurde (Übersicht Churchill, 1995). Diesen Ergebnissen stehen allerdings die neueren Arbeiten von Kurtz und Kollegen gegenüber, die in patch-clamp-Messungen keine spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle in reninsezernierenden Zellen nachweisen konnten (Kurtz und Penner, 1989); konsequenter Weise fanden sie nach Depolarisation mit erhöhtem  $[K^+]_o$  weder eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  noch eine Hemmung der Reninsekretion (Kurtz et al., 1990).

Auch ein mechanischer Reiz, der zur Dehnung führt, bewirkt über Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle eine Membrandepolarisation, die eine Hemmung der Reninsekretion nach sich zieht (Übersicht Kurtz, 1989). In diesem Zusammenhang konnten Jones-Dombi und Churchill (1993) zeigen, dass diese durch zunehmenden Perfusionsdruck ausgelöste Hemmung der Reninsekretion nach Blockade der spannungsaktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle mit spezifischen Blockern wie Nifedipin, Diltiazem und Verapamil aufgehoben wurde. Sie nehmen dies als Beweis für die Anwesenheit spannungsensitiver  $Ca^{2+}$ -Kanäle in den reninsezernierenden Zellen, die am  $Ca^{2+}$ -Einstrom in reninsezernierende Zellen nach Membrandepolarisation beteiligt sind (s. auch. Kap. 1.3.3.3).

Zur Depolarisation führt auch Stimulation mit vasoaktiven Substanzen, wie ANG II, Arginin-

Vasopressin (AVP) und Noradrenalin (Bührle et al., 1984, 1985, 1986; Kurtz und Penner, 1989), die gleichzeitig im Gegenzug die Reninsekretion hemmen (Bührle et al., 1986). Neben dem depolarisierenden Effekt und der Hemmung der Reninsekretion erhöhen diese vasokonstriktiven Substanzen  $[Ca^{2+}]_i$  (Kurtz und Penner, 1989, 1990; Gonzales et al., 1992). In erregbaren Zellen ist eine Membrandepolarisation immer mit einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  verbunden, so dass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob Membrandepolarisation einen direkten Einfluss auf die Reninsekretion ausübt oder ob nicht umgekehrt die Membrandepolarisation das Entscheidende ist und die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  eine untergeordnete Rolle spielt (dazu: Kurtz et al., 2000).

Umgekehrt gibt es gute Hinweise, dass eine Hyperpolarisation der Membran von reninsezernierenden Zellen die Reninsekretion hemmt.  $K_{ATP}$ -Kanalöffner bewirken eine Hyperpolarisation der Zellen (Ashcroft and Ashcroft, 1990; Quast, 1995 und 1996), was auch für afferente Arteriolen an isolierten Glomeruli der Ratte nachgewiesen wurde (Russ et al., 1999). Ferrier et al. (1989) konnten mit dem  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Cromakalim eine Stimulation der Reninsekretion in gesunden Probanden und an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte nachweisen, was von Jensen et al. (1998) und Vallon et al. (1998) bestätigt wurde. Umgekehrt hemmt Glibenclamid, der klassische Hemmstoff dieser Kanäle, die Reninsekretion *in vivo* (Richer et al., 1990; Pratz et al., 1991). Ob allerdings die Modulatoren des  $K_{ATP}$ -Kanal die Reninsekretion durch Änderung des Membranpotentials oder durch einen anderen Mechanismus beeinflussen, muss noch genauer untersucht werden.

Fishman (1976) fand, dass Adrenalin, welches die Reninsekretion bekanntermaßen stimuliert, eine leichte Hyperpolarisation bewirkte. Bührle et al. (1986) konnten dies jedoch nicht bestätigen. Sie fanden keinen Einfluss von  $\beta$ -adrenergen Substanzen, die die Reninsekretion nachgewiesenermaßen stimulieren, auf das Membranpotential.

Zusätzlich muss man beachten, dass die Zellen des juxtaglomerulären Apparates durch die gap junctions ein funktionelles Synzytium bilden (Forssman und Taugner, 1977, zitiert in Lorenz et al., 1993; Taugner et al., 1984; Schuster et al., 2001). Die Anwesenheit spannungsaktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle in reninsezernierenden Zellen, durch die eine Membrandepolarisation einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom bewirken würde, wird bislang noch kontrovers diskutiert (s.o.). In glatten Muskelzellen sind VOCCs aber auf jeden Fall vorhanden. Diese aus der Anwesenheit von gap junctions folgende elektrische Kopplung bedeutet, dass das Membranpotential

immer mit  $[Ca^{2+}]_i$  verbunden ist und man nicht eindeutig sagen kann, ob die in den reninsezernierenden Zellen beobachtete Reaktion direkt aus diesen kommt oder über die gap junctions aus den verbundenen Zellen übertragen wurde. Um das sicher nachzuweisen, müssten die Zellen durch Schließen der gap junctions entkoppelt werden.

### 1.3.1.3 cAMP

cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) ist in reninsezernierenden Zellen ein wichtiger second messenger für die Stimulation der Reninsekretion (Abb. 1.3). Mehrfach wurde nachgewiesen, dass membrangängiges dibutyryl-cAMP (db-cAMP) die Reninsekretion stimulieren kann (Übersicht Hackenthal et al., 1990). Die Synthese von cAMP aus ATP erfolgt unter Einfluss des Enzyms Adenylatcyclase (AC) und so konnte gezeigt werden, dass Aktivierung der AC mit Forskolin, und darüber Erhöhung von cAMP zu einer Stimulation der Reninsekretion an der isoliert perfundierten Rattenniere (Schwertschlag und Hackenthal, 1982; Fray und Park, 1985) und an isolierten reninsezernierenden Zellen (Della Bruna et al., 1991) führt. Ebenso bewirkt die Stimulation von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren über Bildung von cAMP eine signifikante Steigerung der Reninsekretion. Kurtz et al. (1984) haben durch Messungen der cAMP-Konzentration im Cytosol von isolierten juxtaglomerulären Zellen der Ratte bewiesen, dass diese Maßnahmen (Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren, Aktivierung der AC) tatsächlich zu erhöhten cAMP-Spiegeln führen.

Der Abbau von cAMP zu AMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert. Die Blockade von PDE führt somit auch zu einem Anstieg von cAMP im Cytosol und verstärkt den stimulierenden Effekt von cAMP auf die Reninsekretion. In reninsezernierenden Zellen sind PDE3A, PDE3B und PDE4C immunhistochemisch nachgewiesen (Friis et al., 2002). Wie aus pharmakologischen Versuchen hervorgeht, ist auch PDE5 in juxtaglomerulären Zellen vorhanden (Sayago und Beierwalters, 2001). So konnte Sosath (1999) eine signifikante Stimulation der Reninsekretion aus isolierten juxtaglomerulären Zellen der Ratte durch Stimulation mit Foscokolin in Kombination mit dem PDE-Inhibitor IBMX nachweisen. Unklarheit besteht jedoch noch immer, ob cAMP die Reninsekretion direkt oder indirekt über Abnahme von  $[Ca^{2+}]_i$  stimuliert. Für glatte Muskelzellen gibt es Hinweise, dass cAMP die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase stimuliert, was einen vermehrten Ausstrom von Natrium bewirkt. Durch die Erhöhung des  $Na^+$ -Gradienten würde der  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher vermehrt  $Ca^{2+}$  aus der Zelle

schleusen und so zur Abnahme von  $[Ca^{2+}]_i$  führen (Churchill 1995). Weiterhin wird durch cAMP möglicherweise die  $Ca^{2+}$ -ATPase aktiviert, was zu einem vermehrten  $Ca^{2+}$ -Ausstrom und zur  $Ca^{2+}$ -Rückverteilung in die intrazellulären Speicher führt und darüber ebenfalls eine Abnahme von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt (Churchill, 1995). Der vermutete Zusammenhang zwischen  $[Ca^{2+}]_i$  und Reninsekretionsrate wurde bereits auf S. 11 erklärt.

Zusätzlich ist zu bedenken, dass sich cAMP in vielen neurosekretorischen Systemen als ein exocytosestimulierender Faktor erwiesen hat. Dabei greift cAMP am exocytotischen Apparat an. Als Beispiel seien die Untersuchungen von Renström et al. (1997) an den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas der Maus erwähnt. Nach ihren Messungen gehen sie davon aus, dass cAMP auf einem noch unbekanntem Weg die Mobilisierung der Insulingranula in den  $\beta$ -Zellen stimuliert und evtl. noch zusätzlich die Verfügbarkeit der Granula erhöht, die durch Exocytose freigesetzt werden. Die exocytosestimulierende Wirkung ist nicht an eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  gekoppelt; sie findet auch statt, wenn  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem niedrigen Schwellenniveau konstant gehalten wird. Bei Unterschreitung dieser minimalen  $[Ca^{2+}]_i$  ist allerdings eine Exocytose unmöglich. Aufgrund dieser Tatsache schließen Renström et al. (1997), dass dieser cAMP-abhängige Schritt direkt vor dem  $Ca^{2+}$ -regulierten Schritt der Exocytose stattfindet. Untersuchungen zum exocytotischen Apparat der reninsezernierenden Zellen sind noch nicht gemacht, und man kann daher nur spekulieren ob dieser Mechanismus auch bei der cAMP-Stimulation der Reninsekretion eine Rolle spielt. Friis et al. (1999) zeigten an isolierten reninsezernierenden Zellen der Maus, dass Forskolin einen Einfluss auf die Exocytose, also auf die Reninsekretion hat. In ihren Messungen kommt es unter Einfluss von Forskolin zu einer Abnahme der Membrankapazität ( $C_m$ ), die ein Maß für die Membranfläche der Zellen darstellt. Eine Abnahme der  $C_m$  deutet auf einen endocytotischen Vorgang hin,  $C_m$ -Zunahme ist Anzeige für einen exocytotischen Vorgang. Zunächst stellen diese Ergebnisse also einen Widerspruch zu den oben genannten Ergebnissen dar, nach denen Forskolin über cAMP-Zunahme zur Steigerung der Reninsekretion führt. Jedoch deuten Friis et al. (1999) ihre Ergebnisse so, dass Endo- und Exocytose gleichzeitig ablaufen, und die Endocytose überwiegt. Nach dieser Interpretation könnte also trotz  $C_m$ -Abnahme eine gesteigerte Sekretion stattfinden, so dass der erwähnte Widerspruch zu Ergebnissen von Schwertschlag und Hackenthal (1982) sowie Della Bruna et al. (1991) ausgeräumt wäre.

#### 1.3.1.4 cGMP und NO

Da die Regulation der Reninsekretion durch NO über cGMP vermittelt wird, werden im folgenden beide Mediatoren gemeinsam besprochen.

NO kann, wie in vielen verschiedenen Präparaten gezeigt wurde, die Reninsekretion sowohl stimulierend als auch hemmend beeinflussen, wobei unter Normalbedingungen der überwiegende Effekt eine Stimulation ist (Kurtz und Wagner, 1998). NO fördert allerdings mehr eine bereits stimulierte Reninsekretion, als dass es die Rolle eines spezifischen Aktivators einnimmt (Kurtz und Wagner, 1998). Obwohl es auch Hinweise auf cGMP-unabhängige Effekte durch NO gibt, ist doch die bekannteste Wirkung von NO auf Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und darüber Stimulation der cGMP-Bildung zurückzuführen (Ignarro, 1989; Kurtz und Wagner, 1998). cGMP soll dann im Weiteren sowohl die Stimulation als auch die Hemmung der Reninsekretion vermitteln.

Die Hemmung der Reninsekretion erfolgt über eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Kinase (G-Kinase), die dann auf noch nicht bekanntem Weg die Reninsekretion hemmt (Kurtz und Wagner, 1998). Diese Hemmung, die von Della Bruna et al. (1991), Schrickler et al. (1993), Kurtz et al. (1998) und Kurtz und Wagner (1998) beschrieben wurde, wird möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen (z.B. erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$ ) beobachtet (Kurtz und Wagner, 1998). Kurtz et al. (1998) zeigten in diesem Zusammenhang, dass Inhibitoren der cGMP-abhängigen Kinase (G-Kinasen) wie Rp-8-pCPT-cGMPS den stimulatorischen Effekt von NO-Donatoren an der isoliert perfundierten Rattenniere verstärken.

Für die stimulierende Wirkung von NO über cGMP wird der folgende Weg vermutet: cGMP hemmt die cGMP-abhängige cAMP-Phosphodiesterase (= PDE3) (Beavo, 1995; Dousa, 1999; Friis et al., 2002), so dass durch den verringerten cAMP-Abbau die cAMP-Konzentration ansteigt. Wie unter 1.3.1.3 beschrieben, ist cAMP ein starker Stimulator der Reninsekretion. Dass PDE3 in renalen Gefäßen vorhanden ist, wurde von Reinhardt et al. (1995) nachgewiesen und von Friis et al. (2002) verfeinert. Sie konnten immunhistochemisch noch genauer zeigen, dass die PDE3A, PDE3B und PDE4C in den juxtaglomerulären Zellen exprimiert wird. Dieses Modell einer Signalkaskade der Erhöhung von cAMP durch cGMP über PDE3-Hemmung wird unterstützt durch Untersuchungen von Kurtz et al. (2000), die an der isoliert perfundierten Rattenniere zeigten, dass PDE3-Hemmung durch Milrinon und Trequinsin den gleichen Effekt auf den renalen Plasmafluss ausüben wie NO-Donoren.

Der wohl wichtigste cGMP-Rezeptor ist die G-Kinase (GK): cGMP aktiviert diese Kinase. Ein wichtiges Substrat dieser Kinase ist das Protein IRAG (IP<sub>3</sub>-Rezeptor assoziiertes GK-Substrat). Phosphorylierung des IRAG Proteins hemmt die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Schlossmann et al., 2000). Der Zusammenhang zwischen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und Reninsekretion wurde bereits ausführlich erläutert (S. 11) und so könnte auch auf diesem Weg eine die Reninsekretion fördernde Wirkung von NO / cGMP erklärt werden. Diese Signalkaskade wurde von Schlossmann et al. (2000) als möglicher Mechanismus zur Reduktion von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und des Tonus in glatten Muskelzellen vorgeschlagen und konnte an glatten Muskelzellen und transfizierten COS-Zellen nachgewiesen werden (Schlossmann et al., 2000).

#### *1.3.1.5 Osmolarität*

Weiterhin wird der Osmolarität der Extrazellulärflüssigkeit eine Bedeutung für die Reninsekretion zugeschrieben. Schon eine geringe Abnahme der Osmolarität stimuliert die Reninsekretion, während Hyperosmolarität sie inhibiert (Skott, 1988).

Eine hypoosmolare Extrazellulärflüssigkeit bewirkt ein Schwellen der Reningranula, worauf es zur Fusion benachbarter Granula und vor allem auch zur Fusion mit der Plasmamembran kommt und darüber zur gesteigerten Reninsekretion (Skott, 1988). Der Zusammenhang zwischen Schwellen von Granula und Exocytose ist in vielen verschiedenen Präparaten nachgewiesen worden (Skott, 1988). Jedoch ist nicht eindeutig geklärt, ob es zunächst zur Fusion der Granula mit der Plasmamembran kommt, die dann einen Einstrom von Extrazellulärflüssigkeit in die Granula ermöglicht und dieses Schwellen wichtig ist für die Ausschwemmung des Inhaltes der Granula oder ob das Schwellen der Granula eine Voraussetzung für die Fusion mit der Plasmamembran darstellt (Skott, 1988).

Dass eine hyperosmolare Extrazellulärflüssigkeit eine Hemmung der Reninsekretion nach sich zieht, konnten Jensen und Skott (1993) an Glomeruli der Ratte mit anhängenden juxtaglomerulären Zellen durch Applikation von 30 mM Sucrose sowie Schrickler und Kurtz (1995) an isolierten reninsezernierenden Zellen durch Applikation von 100 mM Sucrose nachweisen. Hier verursacht die hyperosmolare Lösung ein Schrumpfen der Zelle, was wiederum das Schwellen der Reningranula und somit die Fusion mit der Plasmamembran verhindert. Infolgedessen kommt es zur Hemmung der Reninsekretion (Skott, 1988).

### 1.3.1.6 pH-Wert

Der pH-Wert, der in den reninsezernierenden Zellen herrscht, übt einen Einfluss auf die Reninsekretion aus. Fray und Laurens (1981) zeigten, dass eine Erhöhung des pH-Wertes um 0,52 die Reninsekretion stark hemmt bis ein neuer steady-state-level erreicht wird, der 7 % des Kontrollwertes beträgt. Dazu passen auch *in vivo* Befunde, nach denen die Reninsekretion während einer Acidose enthemmt ist (Kurtz und Zehr, 1978). Fray und Laurens (1981) schlagen mehrere Erklärungsmöglichkeiten vor. Zum einen könnten Änderungen der extrazellulären Protonenkonzentration Änderungen der Ionenpermeabilität der juxtaglomerulären Zellen nach sich ziehen, wie dies in Nervenaxonen der Fall ist (Strickholm et al., 1969, zitiert in Fray und Laurens, 1981). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Protonen Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung in der Zelle und  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität in die Zelle bewirken, wie dies für den Skelettmuskel (Nakamaru und Schwartz, 1972, zitiert in Fray und Laurens, 1981) und das Myokard gilt (Poole-Wilson und Langer, 1979, zitiert in Fray und Laurens, 1981). Weiterhin könnte die Tatsache, dass kleinste Änderungen des pH-Wertes drastische Änderungen der Membranphospholipidkomponenten in einigen sekretorischen Zellen bewirken (Rothman, 1978, zitiert in Fray und Laurens, 1981), dafür sprechen, dass pH-Änderungen die Zusammensetzung der Membran der juxtaglomerulären Zellen verändern und so die Fähigkeit,  $\text{Ca}^{2+}$  zu transportieren verändern. Aus all diesen Mechanismen könnte ein Anstieg des cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  resultieren. Dass eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den renin-sezernierenden Zellen die Reninsekretion hemmen kann, wurde weiter oben bereits besprochen.

Im Einklang damit, dass ein saurer pH-Wert die Reninsekretion stimuliert, bewirkt auch in den Reningranula ein saurer pH-Wert eine verstärkte Aktivierung von Prorenin zu Renin. Das dazu benötigte Enzym Cathepsin B arbeitet verstärkt in einem sauren pH-Bereich. In den renin-haltigen Vesikeln herrscht ein pH-Wert von 5,5 (Hackenthal et al., 1990).

Ein wichtiges Element der pH-Homöostase in den Zellen sind die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (NHEs), die in jeder Plasmamembran von Säugerzellen vorhanden sind. Bislang sind die Isoformen 1 - 6 identifiziert (Noel und Pouyssegur, 1995; Orłowsky und Grinstein, 1997; zitiert in Peti-Peterdi, 2000). Sie werden durch verschiedene Signalwege (PKA-Weg oder PKC-Weg) stimuliert (Kandasamy et al., 1995). Der NHE1 ist in eukariotischen Zellen die wichtigste Isoform der NHEs zur Regulation von pH-Wert und Zellvolumen (Kandasamy et

al., 1995). Die Funktion des NHE2 ist weniger definiert, aber es gibt Hinweise für eine wichtige Rolle in der Zellvolumenregulation in renalen Tubuluszellen (Übersicht Praetorius et al., 2000).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Inhibition des NHE2 mit dem relativ spezifischen Inhibitor „1522“ eine dosisabhängige Hemmung der Reninsekretion nach sich zieht (PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung). Cariporid, ein spezifischer Inhibitor des NHE1, hingegen zeigt keine Hemmung der Reninsekretion.

### 1.3.2 Die Reninsekretion beeinflussende extrazelluläre Botenstoffe

#### 1.3.2.1 Angiotensin II

Vander und Geelhoed beobachteten 1965, dass beim anästhetisierten Hund intravenös appliziertes ANG II die basale und die stimulierte Reninfreisetzung hemmt, obwohl der renale arterielle Druck konstant gehalten wurde. Sie schlossen aus ihren Experimenten, dass ANG II einen direkten Einfluss auf die Reninsekretion ausübt. Die gleichen Ergebnisse erhielten Naftilan und Oparil (1978) an Nierenschnitten der Ratte sowie u.a. Scholz et al. (1991) aus Messungen an der isoliert perfundierten Rattenniere (Übersicht Hackenthal et al., 1990).

ANG II hemmt die Reninsekretion über Bindung an den  $AT_1$ -Rezeptor (Kakinuma et al., 1993; Chatziantoniou et al., 1994) (Abb. 1.3), der in der afferenten Arteriole immunhistochemisch und molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte (Miyata et al., 1999). Der ANG II  $AT_1$ -Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der über  $G_q/G_{11}$  die PLC aktiviert. Über anschließende Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) wird DAG und  $IP_3$  gebildet;  $IP_3$  bewirkt die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, was einen transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Peak-Phase) zur Folge hat (Griendling et al., 1989, zitiert in Timmermanns et al., 1993). Kurtz und Penner (1989) zeigten an reninsezernierenden Zellen der Maus, dass diesem transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum folgt (Plateau-Phase), der evtl. auch  $IP_3$  abhängig ist (vgl. Kap. 1.3.1.1). Dies konnte unter Verwendung von  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer gezeigt werden, da hier nur die Peak-Phase zu sehen war (Kurtz und Penner, 1989). Über welchen Weg jedoch  $Ca^{2+}$  in die reninsezernierenden Zellen einströmt, ist nicht abschließend geklärt. ANG

II führt nämlich auch durch Schließen von  $K^+$ -Kanälen vom einwärts-gleichrichtenden Typ (Kir) und durch Anschalten eines  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Auswärtsstroms zur Depolarisation der Zellen (Kurtz und Penner, 1989). Allerdings konnten Kurtz und Penner (1989) an den reninsezernierenden Zellen der Maus keine spannungsaktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle nachweisen und zogen eine unspezifische Kationenleitfähigkeit der Membran als Ursache für die Plateau-Phase in Betracht.

Es gibt viele Arbeiten zur Wirkung von ANG II, bei denen nicht zwischen reninsezernierenden Zellen und weiter proximal liegenden glatten Muskelzellen unterschieden wurde und letztere wahrscheinlich dominierten. Bei glatten Muskelzellen aus Arteriolen sind zwei Mechanismen für den  $Ca^{2+}$ -Anstieg zu erwarten: Zum einen die Entleerung der Speicher über  $IP_3$  und zum anderen über Membrandepolarisation (evtl. über  $Ca^{2+}$ -abhängige  $Cl^-$ -Kanäle), die zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch spannungsaktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ führt. An der isolierten perfundierten afferenten Arteriole des Kaninchens konnten Gonzales et al. (1992) eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II nachweisen. Zhu und Arendshorst (1996) zeigten einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf ANG II-Stimulation an isolierten glatten Muskelzellen aus präglomerulären Gefäßen, der durch den  $AT_1$ -Blocker Losartan verhindert wurde.

Loutzenhiser und Loutzenhiser (2000) zeigten, dass der in der afferenten Arteriole durch 10 nM ANG II ausgelöste langsame Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum mit Nifedipin, einem Blocker spannungsaktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle, blockiert wurde. Die transiente Komponente der  $Ca^{2+}$ -Antwort war jedoch verkleinert noch vorhanden. Auch in Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  war diese Peak-Phase noch zu sehen. Ebenso fanden Purdy and Arendshorst (2001) an isolierten glatten Muskelzellen aus präglomerulären Gefäßen, dass Nifedipin nahezu keinen Einfluss auf die durch ANG II-Stimulation ausgelöste Peak-Phase des  $Ca^{2+}$ -Anstiegs hat, jedoch die Plateau-Phase verhindert, was für Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ spricht. Im Einklang mit den genannten Ergebnissen fanden Takenaka et al. (2002), dass auch die durch ANG II ausgelöste Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, die auf Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  beruht, aus einer schnellen und einer langsamen Komponente besteht, von denen die langsame, nicht aber die schnelle durch Nifedipin zu verhindern war (Takenaka et al., 2002).

Messungen von Kornfeld et al. (1997) hingegen ergaben, dass an isolierten Glomeruli mit

anhängender afferenter Arteriole vom Kaninchen Nifedipin die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Stimulation mit 10 nM ANG II im reninpositiven Bereich verhindern konnte. Jedoch steht eine völlige Inhibierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges im Widerspruch zu oben genannten Ergebnissen, nach denen der durch  $\text{IP}_3$  hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg noch vorhanden sein müsste, da er nicht durch Nifedipin hemmbar ist (s. z. B. Seiler et al., 1987; Palade et al., 1989).

Die andere Möglichkeit, über die  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen einströmen und zum Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen könnte, sind die speicheraktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Hier kontrolliert der Füllungszustand der intrazellulären Speicher die Aktivität der in der Plasmamembran liegenden Kanäle, die durch Entleeren der Speicher durch ein unbekanntes Signal aktiviert werden. Diese Möglichkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zelle wurde bereits auf S. 9 beschrieben.

#### 1.3.2.2 Adenosin

In den Blutgefäßen der meisten Organe ruft der vasoaktive Metabolit Adenosin eine Dilatation hervor, die meist über Stimulation von Adenosin  $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren (Übersicht Ralevic und Burnstock, 1998) vermittelt wird. Die Niere stellt allerdings eine Besonderheit dar, da sie auf Adenosin mit einer Vasokonstriktion antwortet, die über Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren vermittelt wird (Übersicht Ralevic und Burnstock, 1998). Die glomeruläre Filtrationsrate wird gesenkt. Adenosin wird als Mediator des tubuloglomerulären Feedback (TGF) angesehen (s. Kap. 1.3.3.2) und ist an der Homöostaseregulation der Niere wesentlich beteiligt (Osswald et al., 1982).

Neben dieser Wirkung auf die Hämodynamik hat Adenosin noch eine weitere, davon unabhängige entscheidende Wirkung in der Niere: Adenosin hemmt die Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates (Abb. 1.3), was *in vivo* von Osswald et al. (1978) und Tagawa und Vander (Tagawa und Vander, 1970, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989) und kurz danach auch *in vitro* von Churchill und Churchill (1985) nachgewiesen werden konnte. Die Hemmung der Reninsekretion wurde in vielen weiteren Experimenten an verschiedenen Spezies *in vivo* und *in vitro* belegt, u. a. auch mit spezifischen Adenosin  $\text{A}_1$ -Agonisten (Kurtz et al., 1988; Lorenz et al., 1993; Protasoni et al., 1995; Churchill und Bidani, 1987; Skott et al., 1985).

In der Niere kommt Adenosin physiologischerweise in einer Konzentration von  $10^{-8}/10^{-7}$

mol/l vor. Es zirkuliert nicht systemisch und hat eine Plasmahalbwertszeit von nur wenigen Sekunden, weshalb es als Gewebshormon zu betrachten ist. Die Bildung von Adenosin erfolgt durch Hydrolyse aus S-Adenosylhomocystein und durch Dephosphorylierung aus 5'AMP. Adenosin kann sowohl intra- als auch extrazellulär entstehen und durch die Zellmembran aus dem Cytosol in das Interstitium permeieren. Aus dem Extrazellulärraum kann Adenosin durch einen durch Dipyridamol-hemmbareren bidirektionalen Transporter in die Zellen aufgenommen werden. Es wird dann sehr rasch durch Adenosindeaminasen desaminiert oder durch Adenosinkinasen zu 5'AMP phosphoryliert.

Adenosin entfaltet seine Wirkungen über purinerge (P1) Adenosinrezeptoren, von denen zur Zeit vier nachgewiesen sind: Adenosin  $A_{1-}$ ,  $A_{2A-}$ ,  $A_{2B-}$  und  $A_{3-}$  Rezeptoren (Übersicht Fredholm et al., 2001). Diese Rezeptoren sind gewebs- und speziesspezifisch verteilt. Die Adenosin  $A_{1-}$  und  $A_{2A-}$  Rezeptoren werden bereits durch nanomolare Mengen Adenosin stimuliert, zur Stimulation der Adenosin  $A_{2B-}$  und  $A_{3-}$  Rezeptoren sind mikromolare Mengen nötig. In den präglomerulären Gefäßen der Niere ist durch immunhistochemische und pharmakologische Studien sowie Bindungsstudien die Anwesenheit des Adenosin  $A_{1-}$  sowie des  $A_{2A-}$  Rezeptors nachgewiesen (Churchill und Churchill, 1985; Freismuth et al., 1987; Kurtz et al., 1988; Nishiyama et al., 2001; Jackson et al., 2002).

Adenosin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Alle können die AC modulieren: Adenosin  $A_{1-}$  und  $A_{3-}$  Rezeptoren üben über ein inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ) einen hemmenden Effekt auf die Adenylatcyclase aus,  $A_{2-}$  Rezeptoren stimulieren die Cyclase über Kopplung an  $G_s$  (Übersicht Fredholm et al., 2001).  $A_{1-}$  Rezeptoren können darüber hinaus an Ionenkanäle koppeln (über die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von  $G_i$ ) oder PLC aktivieren. In der Niere dominieren die  $A_{1-}$  Rezeptoren, deren verschiedene Signalwege jetzt erläutert werden.

Die Stimulation der in der Niere nachgewiesenen Adenosin  $A_{1-}$  Rezeptoren führt analog dem beschriebenen Signalweg für ANG II  $AT_{1-}$  Rezeptoren (S. 21) über die Hemmung der AC und somit der Bildung von cAMP (Olivera und Lopez-Novoa, 1992) zu einem transienten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  (Churchill 1990; Ralevic und Burnstock, 1998). Dieser Signalweg wurde sowohl für glatte Muskelzellen als auch für renale Zellen beschrieben (Gerwins und Fredholm, 1992 bzw. Weinberg et al., 1989; Übersicht Ralevic und Burnstock, 1998). Gutierrez et al. (1999) zeigten an der durch Microdissektion gewonnenen afferenten Arteriole

des Kaninchens einen biphasischen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf Stimulation mit Adenosin, dessen Plateau-Phase durch Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum bedingt war. Sowohl die Senkung von cAMP als auch die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hemmen die Reninsekretion (Abschnitte 1.3.1.1. und 1.3.1.3).

Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren hingegen stimulieren die AC über  $G_s$ -Proteine (Übersicht Fredholm et al., 2001) und erhöhen die Bildung von cAMP (Olivera und Lopez-Novoa, 1992). Die Stimulation der Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren in der Niere führt zur Stimulation der Reninsekretion und zur Vasodilatation (Churchill und Churchill, 1985; Nishiyama et al., 2001). Da jedoch die Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren im distalen Teil der afferenten Arteriole, in dem sich die reninsezernierenden Zellen befinden, dominieren (Jackson et al., 2002) und eine höhere Affinität für Adenosin besitzen (Übersicht Fredholm et al., 2001), überwiegt der durch den Adenosin  $A_1$ -Rezeptor vermittelte Effekt.

Der Adenosin  $A_3$ -Rezeptor ist in präglomerulären Gefäßen der Niere nur wenig exprimiert (Jackson et al., 2002) und scheint unter physiologischen Bedingung hier keine entscheidende Rolle zu spielen (Mozaffari et al., 1999).

Zur Untersuchung der Adenosin-Wirkungen wurde mehr und mehr dazu übergegangen, mit spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten für die einzelnen Adenosin-Rezeptoren zu arbeiten, da Adenosin in Abhängigkeit von der Konzentration gegenteilige Effekte auslösen kann und außerdem durch Enzyme (z. B. Adenosindesaminase) sehr schnell abgebaut wird.

### *1.3.2.3 Synergismus zwischen ANG II und Adenosin*

Dass ANG II über ANG II  $AT_1$ -Rezeptoren und Adenosin über  $A_1$ -Rezeptoren eine synergistische Wirkung auf die Vasokonstriktion ausüben, wurde in verschiedenen Untersuchungen belegt. So konnten Spielmann und Osswald (1979) am anästhetisierten Hund zeigen, dass die durch  $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  M Adenosin ausgelöste renale Vasokonstriktion durch eine hohe Konzentration eines  $AT_1$ -Antagonisten abgeschwächt wurde. Weihprecht et al. (1994) zeigten *in vivo* an der Ratte und *in vitro* an der afferenten Arteriole des Kaninchens, dass die mit ANG II ausgelöste Vasokonstriktion durch Blockade der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren hemmbar war und umgekehrt ebenso die durch Adenosin bzw. den Adenosin  $A_1$ -Agonisten  $N^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) ausgelöste Vasokonstriktion durch Blockade der ANG II  $AT_1$ -Rezeptoren zu verhindern war. Sie schlossen daraus, dass ANG II und Adenosin

synergistisch wirken und dass diese Abhängigkeit gegenseitig ist. Dietrich et al. (1991) hingegen folgerten aus ihren Experimenten, dass Adenosin zur Vasokonstriktion ANG II benötigt, umgekehrt aber ANG II auch ohne Adenosin in der Lage ist, eine Vasokonstriktion hervorzurufen. Bei *in vivo* Messungen der Vasokonstriktion und des glomerulären Blutflusses konnten sie die durch Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptorstimulation verursachte Vasokonstriktion und Reduktion des glomerulären Blutflusses durch Blockade der ANG II AT<sub>1</sub>-Rezeptoren verhindern, nicht jedoch umgekehrt die Antworten auf ANG II Stimulation durch Blockade der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren.

An ANG II AT<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen zeigte sich, dass der Effekt auf die Vasokonstriktion durch den Adenosin A<sub>1</sub>-Agonisten CHA wesentlich geringer war als in zugehörigen Wildtypmäusen (Traynor et al., 1998). An anästhetisierten Hunden wurde kürzlich gezeigt, dass die durch ANG II hervorgerufene Vasokonstriktion durch exogenes und endogenes Adenosin verstärkt werden und durch Entfernen von endogenem Adenosin abgeschwächt werden kann (Aki et al., 2002).

An kürzlich entwickelten Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen (Sun et al., 2001; Brown et al., 2001) bleibt zu klären, ob ANG II in der Lage ist, eine renale Vasokonstriktion hervorzurufen. Die TGF-Antwort in diesen Mäusen ist verhindert (Brown et al., 2001), die Macula Densa-Regulation der Reninsekretion ist offensichtlich intakt (Schweda et al., 2003). Bezüglich der Blutdrucksenkung durch den ANG II AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Candesartan konnte an Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen kein Synergismus nachgewiesen werden (Brown et al., 2001). Hier reduzierte der ANG II AT<sub>1</sub>-Inhibitor Candesartan den Blutdruck im selben Maße wie in zugehörigen Wildtypmäusen (ANG II vgl. Kap. 1.3.2.1). Brown et al. (2001) versuchen dieses Ergebnis durch die in Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen erhöhte Plasmareninaktivität zu erklären.

Der Verdacht liegt nahe, dass Angiotensin II und Adenosin auch auf die Reninsekretion einen synergistischen Effekt ausüben. In Versuchen an isolierten juxtaglomerulären Zellen jedenfalls hemmt ANG II nach Entfernen von endogenem Adenosin die Reninsekretion nicht mehr (PD Dr. Albinus, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung).

#### 1.3.2.4 Arachidonsäure

Die Stimulation der Reninsekretion durch Prostaglandine konnte erstmals Vander (1968) am anästhetisierten Hund nachweisen (Vander, 1968, zitiert in Hackenthal et al., 1990). Dieses Ergebnis wurde durch viele weitere *in vivo* und *in vitro* Studien gefestigt (Übersicht Hackenthal et al., 1990).

Infusion von Arachidonsäure *in vivo* und *in vitro* stimuliert ebenfalls die Reninsekretion (Hackenthal et al., 1990; Lorenz et al., 1993), und dieser Effekt wird durch Hemmung der Cyclooxygenase blockiert (Freeman et al., 1984; Hackenthal et al., 1990; Lorenz et al., 1993). Zur Synthese der Prostaglandine aus Arachidonsäure ist die Anwesenheit der Cyclooxygenase notwendig, von der inzwischen drei Isoformen nachgewiesen sind. Nach den bekannten Formen COX1 und COX2 ist in jüngster Zeit noch eine neue Form, COX3, entdeckt worden, die mit der COX1 verwandt ist und stark im ZNS exprimiert wird (Chandrasekharan et al., 2002). In der Niere kommen COX1 und 2 konstitutiv vor. COX1 konnte immunhistochemisch sowie durch direkte biochemische Analyse in extraglomerulären Mesangiumzellen, in Endothelzellen der renalen Arterien und Arteriolen und im Glomerulum nachgewiesen werden (Hackenthal et al., 1990; Smith und Bell, 1978, zitiert in Lorenz et al., 1993a). Die COX2-Expression ist beschränkt auf die Macula Densa Zellen und auf Zellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle'schen Schleife in der Nähe der Macula Densa (Harris et al., 1994, zitiert in Cheng et al., 2002).

Reduktion der luminalen NaCl-Konzentration führt zu einer Stimulation der Reninsekretion (Lorenz et al., 1990, Greenberg et al., 1993; Traynor et al., 1999; Wolf et al., 1999; Yang et al., 2000; Mann et al., 2001; Höcherl et al., 2002; Cheng et al., 2002), ebenso Blockade der ANG II-Bildung mit ACE-Hemmern (Cheng et al., 2001, zitiert in Cheng et al., 2002; Wolf et al., 1999; Castrop et al., 2001). Diese stimulierte Reninsekretion kann bei einigen Arbeitsgruppen abgeschwächt oder aufgehoben werden durch Hemmung von COX2 (Traynor et al., 1999; Yang et al., 2000; Cheng et al., 2001 und 2002), bei anderen Gruppen durch Blockade von COX1 (Höcherl et al., 2002). Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass zur Stimulation der Reninsekretion nach Abfall der NaCl-Konzentration an der Macula Densa ein intakter COX-Signalweg wichtig ist.

Die Stimulation der Reninsekretion durch Arachidonsäuremetabolite wird wahrscheinlich durch den Anstieg von cAMP verursacht (Jensen et al., 1996). Auch der vasodilatatorische

Effekt der Prostaglandine wird über die AC und folgenden Anstieg von cAMP vermittelt (Hackenthal et al., 1990).

### 1.3.3 Integrative Mechanismen bei der Regulation der Reninsekretion

#### 1.3.3.1 Renale sympathische Innervierung

Die sympathische Innervierung des juxtaglomerulären Apparates wurde bereits 1979 von Barajas nachgewiesen (Barajas, 1979, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989). Ebenso wurde die Lokalisation der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren im juxtaglomerulären Apparat gezeigt (Übersicht Hackenthal, 1990). Die Aktivierung der sympathischen Nerven in der Niere führt zur Stimulation der Reninsekretion (Davis and Freeman, 1976; Keeton and Campbell, 1981; Übersicht Hackenthal et al., 1990), die über die  $\beta_1$ -Adrenozeptoren vermittelt wird (Taher et al., 1976, zitiert in Kurtz, 1989) (Abb. 1.3).  $\beta$ -Adrenozeptorstimulation stimuliert die AC. Dementsprechend konnten Kurtz et al. (Kurtz, 1984, zitiert in Kurtz et al., 1989) in isolierten juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere nachweisen, dass Stimulation mit dem  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führte. Wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, stellt cAMP einen wichtigen Stimulator der Reninsekretion dar.

Die Rolle der  $\alpha$ -Adrenozeptoren in der Regulation der Reninsekretion ist nicht ganz klar, da überwiegend Hemmung aber gelegentlich auch Stimulation nach  $\alpha$ -Aktivierung beobachtet wurde (Hackenthal et al., 1990). Die Hemmung der Reninsekretion durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptorstimulation sollte über  $IP_3$ -Bildung und folgende Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern erfolgen (Churchill, 1990), woraufhin wahrscheinlich ein Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum folgt. Dieser Weg wäre konsistent mit der von Bührle et al. gefundenen Membrandepolarisation als Antwort auf  $\alpha_1$ -Stimulation (Bührle et al., 1984, 1986). Der in einigen Fällen beobachtete stimulierende Effekt ist wahrscheinlich indirekt über Prostaglandine, den Barorezeptormechanismus oder den renalen arteriellen Druck vermittelt (Übersicht Hackenthal et al., 1990). Bisher gibt es mehr Hinweise auf einen hemmenden  $\alpha$ -adrenozeptorabhängigen Weg in reninsezernierenden Zellen als für einen stimulierenden Effekt, allerdings steht der Beweis für die Anwesenheit von  $\alpha$ -Rezeptoren auf den reninsezernierenden Zellen noch aus (Hackenthal et al., 1990).

### 1.3.3.2 Macula Densa Mechanismus

1937 bemerkte Goormaghtigh die enge Nachbarschaft zwischen den Macula Densa (MD)-Zellen und der afferenten und efferente Arteriole desselben Nephrons und vermutete daraufhin eine funktionelle Beziehung zwischen der Elektrolytzusammensetzung der tubulären Flüssigkeit an der MD und der Reninsekretionsrate. Die MD-Zellen sind Tubuluszellen im aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife direkt am Übergang zum distalen Tubulus. Sie stehen in engem Kontakt mit der afferenten und der efferenten Arteriole, wenngleich sie nicht direkt mit ihnen verbunden sind. Zwischen den MD-Zellen und der afferenten bzw. efferenten Arteriole befinden sich extraglomeruläre Mesangiumzellen, die jedoch alle untereinander aber auch mit den Zellen der afferenten Arteriolen über gap junctions verbunden sind (Forsmann und Taugner, 1977, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989). Diese Lokalisation der MD-Zellen ist gut geeignet, Veränderungen in der tubulären Elektrolytzusammensetzung zu erfassen.

Vander und Miller (Vander und Miller, 1964, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989) stellten dann fest, dass die NaCl-Konzentration an der MD wesentlich geringer (ca. 30 mM) ist als im Plasma. Bei Schwankungen des Salzhaushaltes im Körper kommt es zu Veränderungen der Natriumrückresorption im proximalen Tubulus, was wiederum zu Änderungen der tubulären NaCl-Konzentration an der Macula Densa führt. Ein Anstieg der NaCl-Konzentration in diesem Bereich führt dann zu zwei Effekten: Zum einen kommt es zur Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, zum anderen zur Hemmung der Reninsekretion (Lorenz et al., 1990). Eine Abnahme der NaCl-Konzentration führt zur Zunahme der Reninsekretion (Skott und Briggs, 1987; Lorenz et al., 1990). Diesen Mechanismus, der die NaCl-Konzentration an der MD misst und den Widerstand der afferenten Arteriole sowie die Rate der Reninfreisetzung anpasst, nennt man tubuloglomerulären Feedback (TGF). Der genaue Mechanismus für den TGF ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch starke Hinweise, dass das initiale Signal zur Übermittlung des Effektes ein vermehrter transepithelialer Ionentransport über den in der luminalen Membran der MD-Zellen lokalisierten  $\text{Na}^+2\text{Cl}^- \text{K}^+$ -Cotransporter ist (Schnermann und Levine, 2003; Bell et al., 2003; Lorenz et al., 1993, Persson et al., 1991).

Die weitere Modulation der Reninsekretion und die vaskuläre Antwort auf das MD-Signal wird u.a. über Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren vermittelt. Adenosin könnte dementsprechend der

Mediator der TGF-Antwort sein (Osswald et al., 1978). In Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen wird auch bei sehr hoher NaCl-Konzentration an der Macula Densa die Antwort verhindert (Sun et al., 2001; Brown et al., 2001). Zum gleichen Schluss kamen Ren et al. (2002) nach Experimenten an der afferenten Arteriole mit anhängender MD des Kaninchens. Trotz dieser Ergebnisse haben Nishiyama und Navar (2002) Zweifel daran, dass Adenosin der Mediator ist. Sie halten ATP für den Mediator des TGF.

Über den genauen Ursprung dieses Adenosins kann bislang jedoch nur spekuliert werden. Steigt die Na<sup>+</sup>-Konzentration in der MD-Zelle an, so pumpt die in der basolateralen Membran gelegene Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase unter ATP-Verbrauch Na<sup>+</sup> aktiv in das Interstitium, wobei vermehrt Adenosin entsteht (Osswald et al., 1982; Thomson et al., 2000; Sun et al., 2001; Brown et al., 2001). Adenosin kann im Folgenden von den MD-Zellen freigesetzt werden, zur afferenten Arteriole gelangen und hier dann die Reninsekretion über Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren hemmen und eine Vasokonstriktion bewirken (siehe dazu S. 23).

### *1.3.3.3 Barorezeptormechanismus*

Die Reninsekretion wird durch einen weiteren intrarenalen Mechanismus kontrolliert, den Barorezeptormechanismus: Die Reninsekretion ist invers mit dem renalen Perfusionsdruck verknüpft (Vander 1967 und Davies und Freemann, 1976, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989; Keeton and Campbell, 1981). Die Lokalisation und Funktionsweise dieses Barorezeptors ist bis jetzt nicht genau identifiziert, jedoch scheint es sich nach bisherigen Experimenten und Überlegungen um einen „Stretch-“ oder auch „Dehnungs-“ Rezeptor zu handeln (Tobian et al., 1960, zitiert in Kurtz, 1989; Fray, 1980). Dieser Sensor misst die Wandspannung der afferenten Arteriole. Zwischen Nierenarteriendruck und Dehnungsgrad der afferenten Arteriole gibt es eine direkte Korrelation. Es wird aus Experimenten an reninsezernierenden Zellen, in denen diese auf zunehmende mechanische Reizung mit Hemmung der Reninsekretion reagieren, geschlossen, dass es sich bei dem Sensor um „Stretch-Rezeptoren“ auf den reninsezernierenden Zellen selber handeln könnte (Fray et al., 1984, zitiert in Kurtz, 1989).

Für die Signaltransduktion vom mechanischen Reiz der Membran zur Regulation der Reninsekretion wird eine Änderung des Membranpotentials angenommen (Fray und Lush, 1984, zitiert in Kurtz, 1989). Reninsezernierende Zellen sind umgewandelte glatte

Muskelzellen, und für glatte Muskelzellen wurde gezeigt, dass Dehnung durch die Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle eine Membrandepolarisation nach sich zieht (Übersicht Kurtz, 1989; Hamill und Martinac, 2001; Minke und Cook, 2001). Eine solche Depolarisation könnte einen direkten hemmenden Einfluß auf die Reninsekretion haben und /oder über einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zum Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen (vgl. Kap. 1.3.1.2). Alternativ könnte der mechanische Reiz auch direkt zu einer Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität der Zellmembran durch direkte Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen führen und so die Reninsekretion hemmen (Kirber et al., 1988, zitiert in Kurtz, 1989).

## 1.4 Fragestellung

Das Renin-Angiotensin-System ist, wie unter 1.3 beschrieben, neben dem sympathischen Einfluss das wichtigste Effektorsystem zur Regulation des Blutdrucks. Zusätzlich spielt es die entscheidende Rolle bei der Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts des Menschen. Die Aktivität des RAAS wird reguliert durch die Sekretionsrate des Renins, die von einer Vielzahl verschiedener Faktoren kontrolliert wird (Kap. 1.3). Die Reninsekretion stellt eine Besonderheit dar, weil hier, im Gegensatz zu anderen sekretorischen Systemen wie der  $\beta$ -Zelle oder dem synaptischen Bläschen, die Sekretion invers verknüpft ist mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, das sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Paradox (Churchill, 1990). Folglich ist  $\text{Ca}^{2+}$  hier ein entscheidender sekundärer Botenstoff. Über die Regulationsmechanismen von  $\text{Ca}^{2+}$  in den reninsezernierenden Zellen ist trotz intensiver Forschung noch Vieles unbekannt. So gibt es noch keine eindeutigen Erkenntnisse über wesentliche Elemente der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase dieser Zellen, insbesondere auch über den Eintrittsweg von  $\text{Ca}^{2+}$  in die reninsezernierenden Zellen nach Stimulation durch die verschiedenen Mediatoren.

Einen wichtigen sekundären Botenstoff in diesem System stellt das cAMP dar. Über das Zusammenspiel von cAMP und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bzw. darüber, welcher von beiden Botenstoffen der entscheidende sekundäre Botenstoff bezüglich der Hemmung und Stimulation der Reninsekretion ist, herrscht ebenfalls noch Unklarheit.

Eine wichtige Bedeutung in der Kontrolle der Reninsekretion kommt dem Adenosin zu, das als wesentlicher Vermittler der TGF-Antwort erkannt wurde und die Reninsekretion in physiologischen Konzentrationen hemmt. Der Mechanismus dieser Hemmung, die über Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren vermittelt wird, ist noch nicht abschließend geklärt. In Frage kämen eine Abnahme von cAMP, eine Steigerung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und vielleicht eine Änderung von Ionenleitfähigkeiten, die zu einer Depolarisation führen. Von besonderem Interesse hier war der Einfluss von Adenosin auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

In dieser Arbeit sollten weitere Erkenntnisse über die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen gewonnen werden. Dazu wurde an isolierten Glomeruli mit anhängender afferenter Arteriole  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Renin-positiven Bereich (RPB) der afferenten Arteriole fluorimetrisch bestimmt. Die Nieren wurden von Ratten und Mäusen gewonnen, die überwiegend salzarm ernährt waren, um den RPB zu vergrößern. Im einzelnen sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Beeinflusst eine cAMP-Erhöhung die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration? Nach den Befunden am glatten Muskel sollte cAMP  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  senken. Die Beantwortung dieser Frage war der Kernpunkt dieser Arbeit.
- 2.) Beeinflusst Adenosin die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und üben Adenosin und das wichtigste Effektorpeptid des Renin-Angiotensin-Systems, ANG II, eine synergistische Wirkung auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus?
- 3.) Verfügen reninsezernierende Zellen über Natrium-Protonen-Austauscher (NHE), insbesondere über den NHE2? *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass der NHE2-Inhibitor „1522“ (Aventis) eine Hemmung der Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen bewirkt. Nicht geklärt ist allerdings der Mechanismus, der zu dieser Hemmung führt. Durch fluorimetrische Messung des pH-Wertes in den reninsezernierenden Zellen sollte untersucht werden, ob diese Zellen NHE, insbesondere den NHE2 besitzen und ob dessen Blockade einen Einfluss auf den pH-Wert in der Zelle hat, der die Hemmung der Reninsekretion erklären würde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Versuchstiere

#### 2.1.1 Substanzen

|                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Adenosin                           | Sigma, Taufkirchen          |
| Adenosindesaminase                 | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Albumin                            | Sigma                       |
| ANG II                             | Sigma                       |
| 2-APB                              | Tocris, Köln                |
| BaCl <sub>2</sub>                  | Fluka, Taufkirchen          |
| BCECF (Acetoxymethylester)         | MoBiTec, Göttingen          |
| CaCl <sub>2</sub>                  | Merck, Darmstadt            |
| Cariporid                          | Aventis, Frankfurt          |
| N <sup>6</sup> -Cyclohexyladenosin | Sigma                       |
| Collagenase A                      | Roche Diagnostics           |
| Cyclopiazonsäure                   | Sigma                       |
| db-cAMP                            | Biolog, Bremen              |
| D(+)-Glucose                       | Merck                       |
| DiBAC <sub>4</sub> (3)             | MoBiTec                     |
| DMSO                               | Merck                       |
| DPCPX                              | Sigma                       |
| EGTA                               | Sigma                       |
| Ethanol (99,9%)                    | Uni-Apotheke, Tübingen      |
| Forskolin                          | Aventis                     |
| Furosemid                          | Sigma                       |
| Fura-2 (Azetoxymethylester)        | MoBiTec                     |
| Fura-2 (Kaliumsalz)                | MoBiTec                     |
| Gadolinium                         | Sigma                       |
| H89                                | Sigma                       |
| HCl                                | Fluka                       |
| HEPES                              | Roth, Karlsruhe             |
| IBMX                               | Sigma                       |

---

|                                  |                             |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Immersionsöl (ne23 1.518)        | Leica, Wetzlar              |
| Isoprenalin                      | Sigma                       |
| Isradipin                        | Novartis, Basel             |
| LysoSensor Green                 | MoBiTec                     |
| KCl                              | Merck                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Riedel de-Haen, Taufkirchen |
| MgCl <sub>2</sub>                | Merck                       |
| MgSO <sub>4</sub>                | Merck                       |
| NaCl                             | Merck                       |
| Na-Gluconat                      | Fluka                       |
| NaH-Austauscherblocker „1522“    | Aventis                     |
| NaHCO <sub>3</sub>               | Fluka                       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck                       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Merck                       |
| NaOH                             | Merck                       |
| Na-Pyruvat                       | Fluka                       |
| Nigericin                        | Sigma                       |
| Ouabain                          | Sigma                       |
| Pluronic-F127                    | Sigma                       |
| Thapsigargin                     | Alomone, München            |
| ZM 241385                        | Tocris                      |

### 2.1.2 Lösungen

HEPES gepufferte physiologische Salzlösung (Na-HEPES-PS):

|                   |        |
|-------------------|--------|
| NaCl              | 140 mM |
| KCl               | 2,8 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 1 mM   |
| CaCl <sub>2</sub> | 1 mM   |
| HEPES             | 10 mM  |
| D(+)-Glucose      | 11 mM  |

Die Substanzen wurden in 4500 ml A. bidest angesetzt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 5000 ml aufgefüllt.

HEPES gepufferte physiologische Salzlösung mit Bicarbonat und Albumin (HEPES-PS-BA):

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl                             | 85,2 mM   |
| KCl                              | 2,8 mM    |
| MgSO <sub>4</sub>                | 1 mM      |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1 mM      |
| HEPES                            | 5 mM      |
| D(+)-Glucose                     | 5 mM      |
| Na-Pyruvat                       | 2 mM      |
| Na-Gluconat                      | 19 mM     |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 24 mM     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2 mM      |
| Albumin                          | 1 mg / ml |

Die Substanzen wurden in 4500 ml A. bidest angesetzt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 5000 ml aufgefüllt.

Vor Gebrauch wurde 30 min mit Carbogen begast und anschließend der pH-Wert überprüft.

HEPES gepufferte physiologische Salzlösung mit Bicarbonat (HEPES-PS-B):

Wie HEPES-PS-BA ohne Albumin.

K-HEPES gepufferte physiologische Salzlösungen (K-HEPES-PS):

|      | 10 mM KCl | 60 mM KCl | 100 KCl | 140 KCl |
|------|-----------|-----------|---------|---------|
| NaCl | 132,8     | 82,8      | 42,8    | 2,8 mM  |
| KCl  | 10        | 60        | 100     | 140 mM  |

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprach der bei Na-HEPES-PS angegebenen.

Die Substanzen wurden in 230 ml A. bidest angesetzt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 2500 ml aufgefüllt.

#### Poly-L-Lysin-Lösung

Die Substanz wurde als Stammlösung (1 mg/1 ml A. bidest) bei 8 °C aufbewahrt und je nach Bedarf weiter verdünnt.

#### 2.1.2.1 Lösungen zur Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration

##### Fura-2-Färbelösung

Es wurden 40 µl einer 1 mM Fura-2-AM-Stammlösung (DMSO) mit 50 µl Pluronic (2 % in DMSO) gelöst und zu 1,91 ml HEPES-PS gegeben. Die Lösung wurde gemischt und für ca. 2 min mit Ultraschall behandelt. Zu dieser Lösung wurden 500 µl der Glomerula-Suspension (in der jeweils verwendeten HEPES-PS) gegeben.

#### HEPES-PS + EGTA / HEPES-PS + EGTA ohne Ca (Kalibrierlösung)

|                   | <b>HEPES-PS + EGTA</b> | <b>HEPES-PS + EGTA ohne Ca</b> |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|
| NaCl              | 20 mM                  | 20 mM                          |
| KCl               | 100 mM                 | 100 mM                         |
| MgCl <sub>2</sub> | 1 mM                   | 1 mM                           |
| CaCl <sub>2</sub> | 10 mM                  | 0 mM                           |
| HEPES             | 20 mM                  | 20 mM                          |
| EGTA              | 9 mM                   | 9 mM                           |
| Fura-2 (K-Salz)   | 5 µM                   | 5 µM                           |

Die Substanzen wurden in 15 ml A. bidest. angesetzt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt und mit A. bidest. auf 20 ml aufgefüllt.

20 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffer / 0 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffer / 0 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffer + 60 mM K<sup>+</sup>

|                   | <b>20 mM-Ca<sup>2+</sup>-Puffer</b> | <b>0 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffer</b> | <b>0 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffer<br/>+ 60 mM K<sup>+</sup></b> |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| NaCl              | 110 mM                              | 132,5 mM*                          | 75,3 mM**  |
| KCl               | 2,8 mM                              | 2,8 mM                             | 60 mM  |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mM                                | 2 mM                               | 2 mM   |
| CaCl <sub>2</sub> | 20 mM                               | 0 mM                               | 0 mM   |
| HEPES             | 10 mM                               | 10 mM                              | 10 mM  |
| D(+)-Glucose      | 11 mM                               | 11 mM                              | 11 mM  |
| EGTA              | 0 mM                                | 5 mM                               | 5 mM   |

\* 7,5 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 5 mM EGTA und die Titration mit NaOH.

\*\* 64,7 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 5 mM EGTA, die Titration mit NaOH und die Zugabe von 57,2 mM KCl.

Die Substanzen wurden in 230 ml A. bidest. angesetzt, der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 250 ml aufgefüllt.

#### Adenosin in HEPES-PS

Die in HEPES-PS hergestellte 0,1 mM Stammlösung wurde je nach verwendeter Konzentration mit der jeweiligen HEPES-PS verdünnt. Die Lösung wurde bei 8 °C aufbewahrt und maximal an zwei aufeinander folgenden Tagen verwendet.

#### Adenosindesaminase

Es wurde eine 5 mg/ml Stammlösung (Glycerin/H<sub>2</sub>O = 50 : 50 v/v) verwendet, die mit HEPES-PS auf die verwendete Konzentration verdünnt wurde. Die Stammlösung wurde bei 8 °C aufbewahrt.

#### Albumin in HEPES-PS

Es wurde eine 0,01 %ige (w/v) Stammlösung in HEPES-PS hergestellt, die nur einen Tag verwendet wurde.

#### ANG II in HEPES-PS

Es wurde eine 1 mM Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt, die je nach verwendeter

Konzentration mit der jeweiligen HEPES-PS verdünnt wurde.

#### 2-APB in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO) hergestellt.

#### N<sup>6</sup>-Cyclohexyladenosin in HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (EtOH) hergestellt, die zunächst mit EtOH auf 0,1 mM und dann je nach verwendeter Konzentration mit der jeweiligen HEPES-PS verdünnt wurde. Die fertige HEPES-PS wurde nur einen Tag benutzt, die 0,1 mM Lösung wurde bei 8 °C aufbewahrt und maximal 4 Tage verwendet.

#### Cyclopiazonsäure (CPA) in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt.

#### db-cAMP 1 mM

db-cAMP wurde direkt in Na-HEPES-PS eingewogen.

#### DPCPX 100 nM in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO) hergestellt. Diese wurde zunächst mit DMSO schrittweise auf 100 µM verdünnt. Der Verdünnungsschritt auf 10 µM erfolgte mit DMSO : Na-HEPES-PS = 1 : 1. Danach wurde mit Na-HEPES-PS auf 100 nM verdünnt.

#### Forskolin in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO) hergestellt.

#### Gadolinium in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (H<sub>2</sub>O) hergestellt.

#### H89 in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (MeOH) hergestellt.

**IBMX 100  $\mu$ M in Na-HEPES-PS**

IBMX wurde direkt in 10 ml Na-HEPES-PS eingewogen, für 3 min mit Ultraschall behandelt und anschließend auf 100 ml aufgefüllt.

**Isoprenalin in Na-HEPES-PS**

Es wurde eine 10 mM Isoprenalin-Stammlösung ( $H_2O$ ) hergestellt, die jeden Tag frisch zubereitet wurde.

 **$10^{-7}$  M Isradipin in Na-HEPES-PS**

Es wurde eine 1 mM Isradipin-Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt.

 **$10^{-3}$  M Ouabain**

Die Substanz wurde direkt in Na-HEPES-PS eingewogen und im Ultraschallbad gelöst.

**Thapsigargin in Na-HEPES-PS**

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt.

**ZM 241385**

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO) hergestellt.

**2.1.2.2 Lösungen zur Messung des pH-Wertes****Pufferlösung zur Kalibrierung (MES-Lösung / TRIS-Lösung)**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| NaCl                | 2,8 mM |
| KCl                 | 142 mM |
| MgCl <sub>2</sub>   | 1 mM   |
| CaCl <sub>2</sub>   | 1 mM   |
| Puffer (MES / TRIS) | 10 mM  |
| D(+)-Glucose        | 11 mM  |

Die Substanzen wurden in 400 ml A. bidest angesetzt, der pH-Wert mit NaOH eingestellt und mit A. bidest auf 500 ml aufgefüllt.

R<sub>min</sub>-Lösung = MES-Lösung: pH 5,1 mit MES-Puffer

R<sub>max</sub>-Lösung = TRIS-Lösung: pH 9,1 mit TRIS-Puffer

### BCECF - Färbelösung

10 µl einer 1 mM BCECF-Stammlösung (DMSO) wurden mit 50 µl Pluronic (2 % in DMSO) gelöst und zu 1,94 ml Na-HEPES-PS gegeben. Die Lösung wurde gemischt und für ca. 2 min mit Ultraschall behandelt. Zu dieser Lösung wurden 500 µl der Glomerula-Suspension (in der jeweils verwendeten Na-HEPES-PS) gegeben.

### Cariporid-Lösung

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (DMSO) hergestellt.

### „1522“- (NHE2-Inhibitor)-Lösung

Es wurden 10 µl einer 50 mM NHE2-Inhibitor-Stammlösung (DMSO) auf 100 ml Na-HEPES-PS verdünnt (Endkonzentration: 5 µM).

### DMSO-Kontrolllösung

10 µl DMSO auf 100 ml mit Na-HEPES-PS aufgefüllt.

### LysoSensor-Färbelösung

Es wurden 10 µl einer 1 M LysoSensor Green Stammlösung (DMSO) bei 37 °C zu 500 µl Glomerula-Suspension gegeben.

### NH<sub>4</sub>Cl-Lösung

In der Na-HEPES-PS wurden 10 mM NaCl gegen 10 mM NH<sub>4</sub>Cl ausgetauscht.

### *2.1.2.3 Lösungen zur Messung des Membranpotentials*

#### DiBAC<sub>4</sub>(3)-Färbelösung

Es wurden 25 µl einer 100 µM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung (DMSO/EtOH\*) mit 1,975 ml Na-HEPES-PS gemischt; zu dieser Lösung wurden 500 µl der Glomerula-Suspension (in Na-HEPES-PS) gegeben.

#### Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Es wurde eine 10 mM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt, die

entsprechende Menge wurde in Na-HEPES-PS gegeben.

Isoprenalin 1  $\mu\text{M}$  + 100  $\mu\text{M}$  IBMX in Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) 1  $\mu\text{M}$

Es wurde eine 10 mM Isoprenalin-Stammlösung (H<sub>2</sub>O) hergestellt, die jeden Tag frisch hergestellt wurde.

IBMX wurde direkt in 10 ml Na-HEPES-PS eingewogen, für 3 min mit Ultraschall behandelt und anschließend auf 100 ml aufgefüllt.

ANG II 3 nM in Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Es wurde eine 1 mM Stammlösung (DMSO/EtOH\*) hergestellt.

Ouabain 1 mM in Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Die Substanz wurde in Na-HEPES-PS eingewogen, im Ultraschallbad gelöst, mit Na-HEPES-PS auf 99,99 ml aufgefüllt und anschließend wurde 10  $\mu\text{l}$  einer 10 mM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung (DMSO/EtOH\*) zugegeben.

\* DMSO und EtOH wurden im Verhältnis 1 : 1 (v/v) verwendet.

### 2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH) mit einem Körpergewicht von 200 - 400 g.

Weiterhin wurden männliche CD-1 Mäuse, sowie männliche C57-Mäuse (beides Charles River Deutschland GmbH) mit einem Körpergewicht zwischen 20 - 35 g verwendet. Für eine weitere Versuchsreihe wurde mit Nieren weiblicher Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäuse (A<sub>1</sub>AR<sup>-/-</sup>) und Wildtypmäuse aus dem gleichen Wurf (A<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>) (Sun et al., 2001, überlassen von PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) mit einem Körpergewicht zwischen 18 - 26 g gearbeitet. Diese Tiere stammen aus einer Subkolonie des Originalstammes von Sun et al. (2001) am NIH. Die Tiere wurden durch heterozygote Kreuzung vermehrt, so dass der genetische Hintergrund immer eine Kombination aus 129Sv/J und C57BL/6 ist. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR von DNA aus dem Schwanz.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser. Sehr häufig wurde mit salzarm ernährten Tieren gearbeitet: Nach einer einmaligen Furosemid-Applikation (Ratte: 10 mg/kg, i.p., Maus: 25 mg/kg, i.p; die Applikation wurde zunächst von Frau PD Dr. med. M. Albinus, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, durchgeführt) erhielten die Tiere für mindestens zwei Wochen eine kochsalzarme Diät (Altromin C1036: 150 mg/kg Na<sup>+</sup>, 3 mg/kg Cl<sup>-</sup>). Kontrolltiere hatten Standarddiät (Altromin Standard C1324: 2,5 g/kg Na<sup>+</sup>, 3,6 g/kg Cl<sup>-</sup>), andere Tiere erhielten eine kochsalzreiche Diät (Altromin C1051).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole

Sowohl Ratten als auch Mäuse wurden durch cervicale Dislokation und Dekapitation getötet. Nach dem Ausbluten der Tiere wurden die Nieren nach einem medianen Bauchschnitt entnommen und in der jeweils verwendeten HEPES-PS bei 37 °C aufbewahrt. Bei den Mäusen wurden beide Nieren sofort verwendet, bei den Ratten wurde eine Niere sofort präpariert, die zweite in jeweiliger HEPES-PS bei 8 °C bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Ab dem 22.03.01 wurde dazu übergegangen, jeden Tag eine frische Niere zu verwenden, da die afferenten Arteriolen am zweiten Tag oft keine oder nur eine schwache Reaktion auf ANG II zeigten.

Zur Vermeidung von Kontaminationen des Präparates (z.B. Proteasen, Keime) sowie zur Vermeidung von Infektionen wurde mit Latex-Handschuhen (Baxter Healthcare Corp., CA, USA) und unter dem Abzug gearbeitet.

Zur Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole wurde die enzymatische Präparation nach Kurtz und Penner (1989) bzw. Russ et al. (1999) verwendet. Die Nieren wurden von der Kapsel befreit, längs mit einer scharfen Rasierklinge halbiert und das nichtbenötigte Gewebe (Calyx, Pelvis) entfernt. Anschließend wurden die Nierenhälften mit der Schnittfläche nach unten mit einer Rasierklinge zerkleinert und in die jeweilige auf 37 °C vorgewärmte HEPES-PS, die 1 mg/ml Collagenase A enthielt, überführt. Es folgte Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 55 min bei Nierenstücken einer frisch entnommenen Niere, für 30 min bei Nierenstücken einer bei 8 °C für einen Tag aufbewahrten

Niere sowie bei den Nieren von Mäusen. Das Gewebe der 24 h alten Niere, ebenso das Gewebe der Mausnieren besitzt nicht (mehr) die gleiche Festigkeit wie das einer frischen Rattenniere. Nach dieser Inkubation wurde die Suspension über Siebe der Maschenweiten 200  $\mu\text{m}$  und 125  $\mu\text{m}$  gefiltert. Die Glomerula der Ratte wurden dann auf einem Sieb der Maschenweite 63  $\mu\text{m}$  aufgefangen, die der Maus auf einem Sieb der Maschenweite 43  $\mu\text{m}$ , in die jeweilige HEPES-PS überführt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **2.2.2 Isolierung langer Gefäße aus Rattennieren**

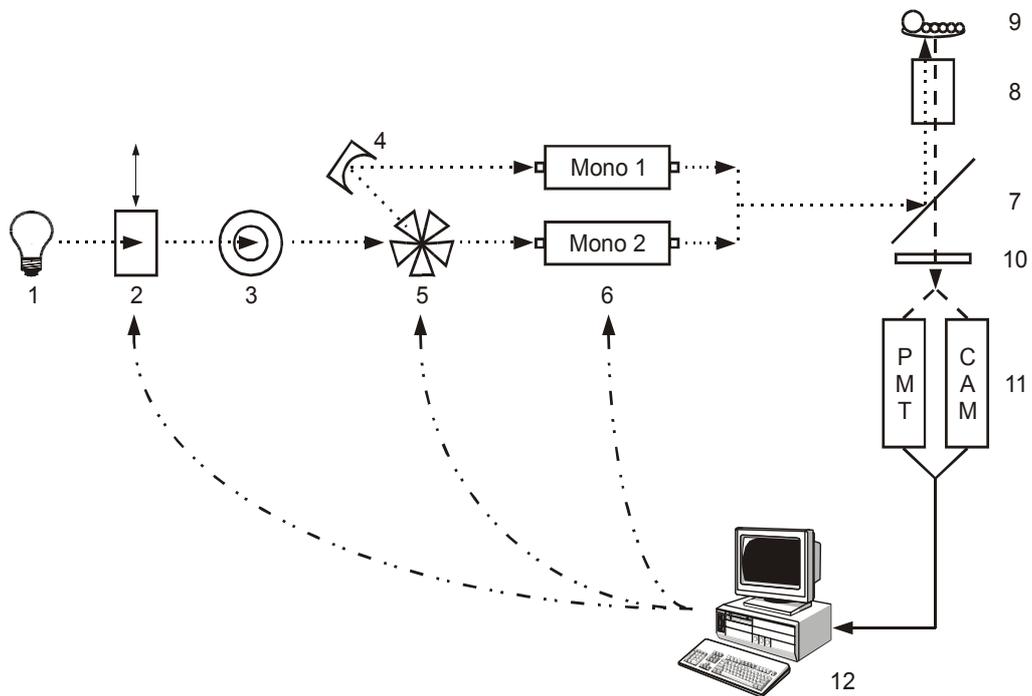
Die Präparation wurde durchgeführt wie in Kap. 2.2.1 beschrieben. Es wurde jedoch ein viertes Sieb (Maschenweite 43  $\mu\text{m}$ ) verwendet, auf dem die Gefäßstücke aufgefangen wurden

### **2.2.3 Fluoreszenzmessung mittels Fluoreszenzmikroskopie**

#### *2.2.3.1 Messapparatur*

Fluoreszenz ist ein Prozess, bei dem fluoreszierende Moleküle, sog. Fluorochrome, energiereiche Strahlung absorbieren (Absorptionsspektrum) und anschließend diese aufgenommene Energie in Form energieärmerer Strahlung bei längeren Wellenlängen emittieren (Emissionsspektrum). Dabei werden durch die zugeführte Lichtenergie Elektronen in höhere Energiezustände angehoben und beim Rücksprung, der in Stufen erfolgt, energieärmeres Licht emittiert (Stokes-Verschiebung); es resultiert ein Emissionsspektrum. Um Fluoreszenz auszunutzen, benötigt man eine Energiequelle zur Erzeugung von Anregungsstrahlung, ein Fluorochrom und einen Detektor zum Auffangen des Emissionslichtes. Zur Erzeugung der Anregungsstrahlung und zur Detektion des Emissionslichtes wurde eine von Photon Technology International (PTI, NJ, U.S.A) entwickelte Messapparatur verwendet.

Der Strahlengang ist in Abb. 2.1 dargestellt. Der Lichtstrahl der 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (1) (XBO 75W / 2 OFR, Osram, D), die in diesem System als Lichtquelle dient, kann durch einen Verschluss (2) unterbrochen und die Lichtmenge durch eine Ringblende (3) reguliert werden. Wurde die Anregung mit nur einer Wellenlänge benötigt (Messung des pH-Wertes in den Vesikeln mit LysoSensor Green, Membranpotentialmessung mit DiBAC<sub>4</sub>(3)), so fiel der Lichtstrahl bei geöffnetem Verschluss durch die Ringblende in einen Monochromator. War die Anregung auf zwei Wellenlängen erforderlich, wie bei der



- 1 Lichtquelle
  - 2 Verschluß
  - 3 Ringblende
  - 4 Spiegel
  - 5 Spiegelrad
  - 6 Monochromatoren (Mono 1 / 2)
  - 7 Dichroischer Spiegel
  - 8 Objektiv
  - 9 Präparat
  - 10 Sperrfilter
  - 11 Photomultiplier (PMT) / Kamera (CAM)
  - 12 Computer
- .....► Kurzwelliges Anregungslicht  
 - - - - ► Langwelliges Emissionslicht  
 ———► Elektrisches Signal  
 - · - · - ► Steuerung durch Computer

Abb. 2.1 Funktionsprinzip der Messapparatur (nach Rauch, 2000)

Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  und des intrazellulären pH-Wertes, so wurde das Licht abwechselnd mit Hilfe eines drehenden Spiegelrades (5) in die beiden Monochromatoren gelenkt. Das Spiegelrad lässt je nach Stellung den Lichtstrahl in einen Monochromator passieren oder reflektiert ihn in den anderen Monochromator. Verwendet wurden Gittermonochromatoren, die das auf das Beugungsgitter auftreffende Licht der Wellenlänge entsprechend auftrennen. Über die Software kann die Stellung des Gitters eingestellt und somit Licht der gewünschten Wellenlänge erzeugt werden. Sowohl die ein- als auch die austretende Lichtmenge kann über die Blenden an den Ein- und Ausgängen der Monochromatoren reguliert werden. Die Blenden waren so eingestellt, dass die Intensitäten der beiden Wellenlängen vergleichbar waren. An den Ausgängen waren die Blenden maximal geöffnet, um die gesamte Menge des Anregungslichtes für die Messung zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus kann an den Ein- und Ausgängen der Monochromatoren die Spaltbreite eingestellt werden, was zur Einstellung der Bandbreite des Lichtes dient. Eine Änderung der Spaltbreite um 1 mm bewirkt bei den hier verwendeten Monochromatoren eine Änderung der Bandbreite um 4 nm.

Von den Monochromatoren aus gelangt das Anregungslicht über einen Lichtleiter zu einem inversen Mikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan), in dem das kurzwellige Anregungslicht über einen dichroischen Spiegel (7) als Strahlteiler zu einem Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektiv (N.A.: 1.3, CF Fluor 40 x, Nikon / 1.3, Plan Fluor 100 x, Nikon) gelenkt wird, durch welches das Licht zum Präparat (9) gelangt. Das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Präparat wird durch das eintreffende Licht angeregt und emittiert einen Teil der Energie wieder als Emissionslicht. Dieses gelangt durch das Objektiv (8) zurück zum dichroischen Spiegel, durchdringt ihn und trifft auf einen nachgeschalteten Emissionsfilter, der das Licht auf ein enges Wellenlängenband einschränkt, so dass nur das emittierte Licht durchtritt. Dieses wird mit einer Restlichtkamera (IC-200, PTI) detektiert, welche die optischen Signale digitalisiert, verstärkt und an einen Computer weiterleitet. Der Computer dient zur Steuerung der Aufnahme, zur Datenspeicherung und -auswertung (Abb. 2.1).

Es wurden während des Experiments Bilder des gesamten Glomerulums inklusive afferenter Arteriole aufgenommen. Zur Auswertung wurde dann der Bereich der afferenten Arteriole direkt am Eintritt in das Glomerulum ausgewählt und als ROI (Region of interest) festgelegt (Abb. 2.2). Nur in diesem Bereich, der 4 - 6 Zellen umfasste, wurde die Änderung der

Fluoreszenzintensität gemessen. Zu Beginn jedes Experiments wurde ein Hellfeldbild vom Glomerulum aufgenommen, um anschließend die ROI besser festlegen zu können. Dabei wurden zur Reduktion der Lichtintensität drei Graufilter (ND 2A, ND 16A, ND 32, Nikon) in den Strahlengang eingeführt.

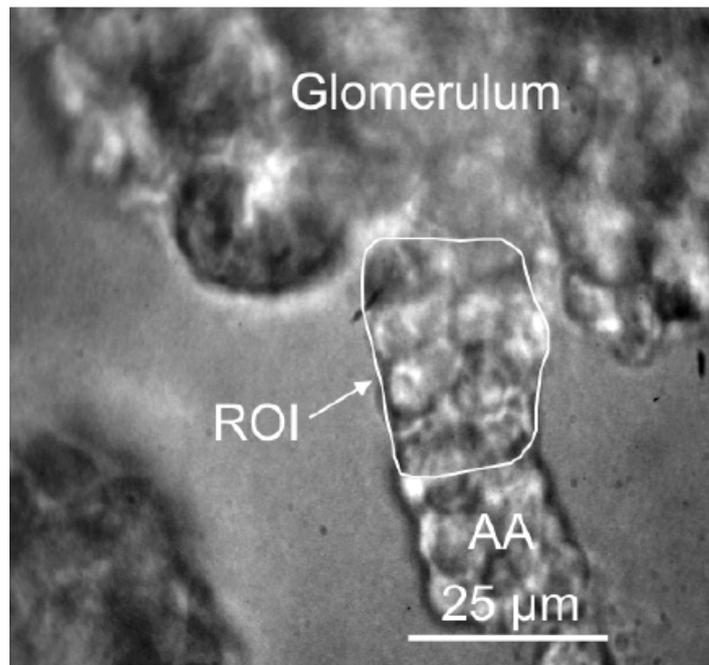


Abb. 2.2 Hellfeldbild eines isolierten Glomerulums mit anhängender afferenter Arteriole (AA) aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Im distalen Abschnitt, hier als ROI (Region of Interest) gekennzeichnet, sind die reninsezernierenden Zellen lokalisiert. In diesem Bereich, der variabel ausgewählt werden konnte, wurde das Fluoreszenzsignal gemittelt und in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Membranpotential, pH-Wert) umgerechnet. Die Aufnahme erfolgte mit einer Restlichtkamera (IC-200, PTI) unter Verwendung eines 100 x Ölimmersionsobjektivs (N.A.: 1.3, CF Fluor Plan, Nikon).

Für alle Fluoreszenzmessungen wurde eine speziell angefertigte Perfusionskammer aus Edelstahl (Abb. 2.3; Werkstatt des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) verwendet. In diese wurden Deckgläser (30 mm, Assistent, Sontheim) eingesetzt, die als Kammerboden dienten und zum besseren Haften der Zellen mit 120 µl einer mit A. bidest 1 : 6 verdünnten Poly-L-Lysin-Stammlösung (1 mg/ml) beschichtet waren. Der Zulauf in die Kammer erfolgte über ein Schlauchsystem, das am Ende in eine Injektionsnadel mündete. Die Vorratsgefäße waren über einen Schlauch mit anschließendem Tropf mit diesem Schlauchsystem verbunden. Nach dem Tropf, der einen blasenfreien konstanten Zulauf in die Kammer garantierte, führte der Zulaufschlauch durch eine 50 ml Perfusorspritze, die mit

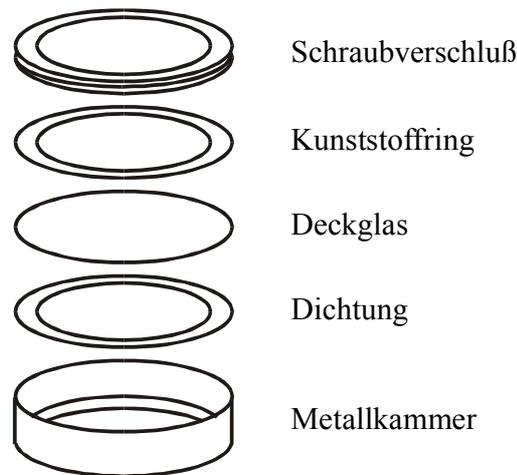


Abb. 2.3 Aufbau der Perfusionskammer (nach Rauch, 2000)

einem Wasserbad verbunden war und die Lösungen so auf 37 °C vorgewärmt werden konnten. Als Vorratsbehälter dienten ein 500 ml-Kunststoffgefäß für die Pufferlösung sowie sechs 50 ml Perfusorspritzen, die über Drei-Wege-Hähne miteinander verbunden waren. Über diese Hähne konnte der Zulauf der einzelnen Lösungen kontrolliert werden. Sie waren an einer

Metallstange befestigt und befanden sich 20 cm oberhalb der Perfusionskammer, so dass die Gravitation als treibende Kraft für den Lösungsfluss diente. Die Absaugung aus der Perfusionskammer bestand aus einer Injektionsnadel, die über einen dünnen Schlauch in ein Auffanggefäß mündete. Dieses war mit einer Membranluftpumpe verbunden, über die ein Unterdruck erzeugt wurde, der ein gleichmäßiges Absaugen der Badlösung garantierte (Abb. 2.4).

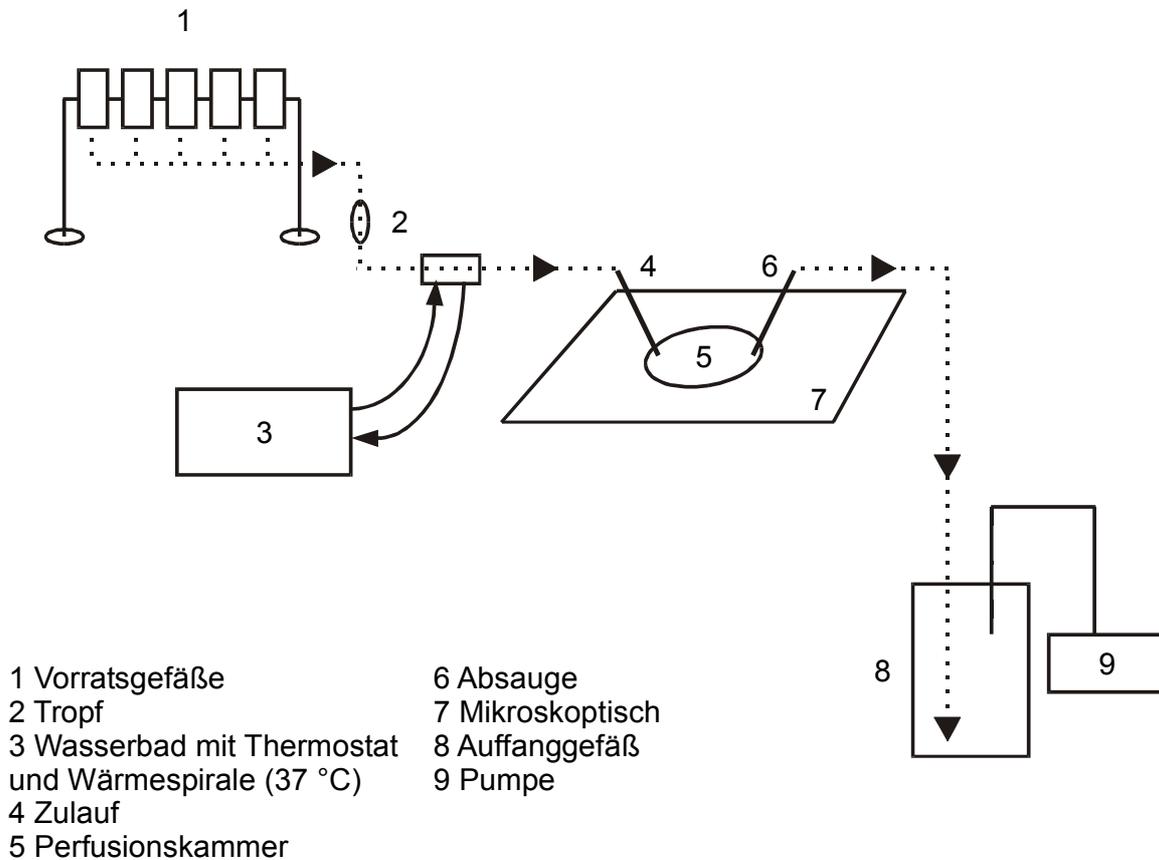


Abb. 2.4 Darstellung des Lösungsflusses

### 2.2.3.2 Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$

#### 2.2.3.2.1 Färbung der afferenten Arteriolen und Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Das Mikroskop wurde für die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit einem dichroischen Spiegel (430DCLPO2, Omega Optical, VT, U.S.A) und einem Interferenzsperrfilter (510WB40, Omega Optical) ausgestattet. Die Anregungswellenlängen betragen  $340 \pm 5$  nm und  $380 \pm 5$  nm; die Intensität des emittierten Lichtes wurde im Bereich von 490-530 nm gemessen.

Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), Molecular Probes; Abb. 2.5) gemessen. Fura-2 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, der  $\text{Ca}^{2+}$  mit vier Carboxylgruppen bindet. Die Substanz ist sehr selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber Magnesium und nahezu unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ist sehr günstig für physiologische Messungen, da die Dissozia-

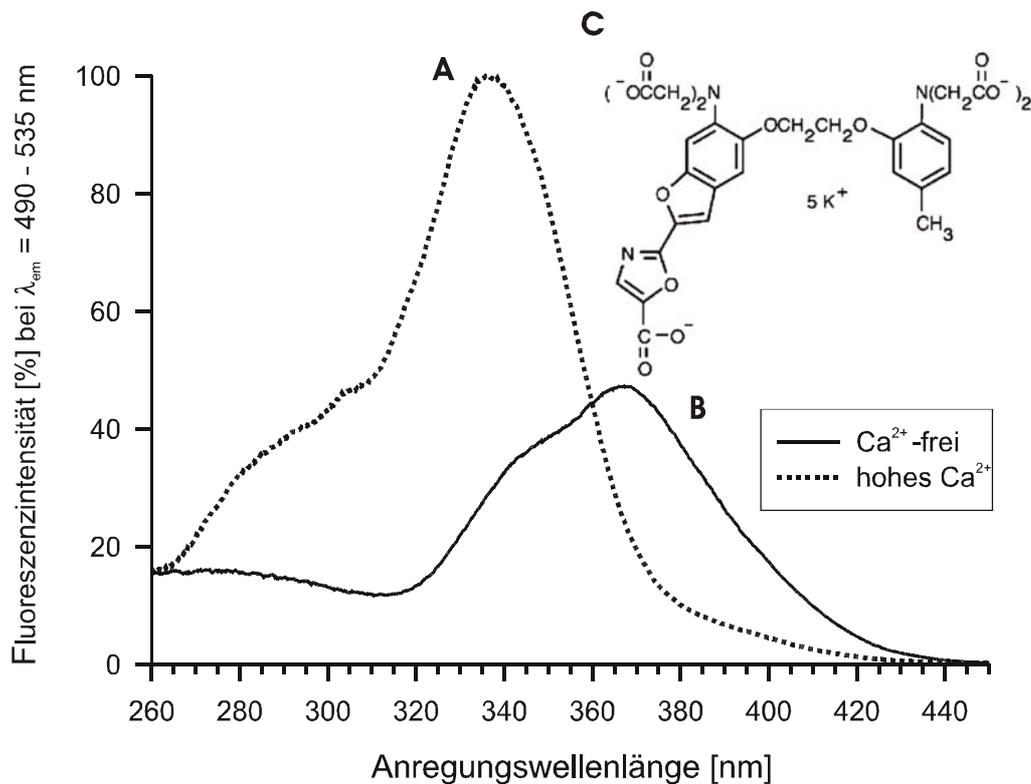


Abb. 2.5 Dargestellt ist das Anregungsspektrum von Fura-2 in Ca<sup>2+</sup>-gesättigter (A) und Ca<sup>2+</sup>-freier (B) Lösung bei pH 7,2, sowie die Strukturformel von Fura-2 (C).

Bei Bindung von Ca<sup>2+</sup> wird das Anregungsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen verschoben (vgl. Text).

Anregungsspektren gemessen bei:  $\lambda_{em} = 490 - 535 \text{ nm}$

tionskonstante etwa bei 0,14  $\mu\text{M}$  liegt, also in dem Bereich zellulärer Ca<sup>2+</sup>-Signale (0,1 - 1  $\mu\text{M}$ ). Fura-2 wird als Azetoxymethylester (Fura-2-AM) in ungeladener, lipophiler und somit membrangängiger Form in die Zelle durch Diffusion eingebracht. Im Cytosol kommt es dann zur Anreicherung des Farbstoffs, da der Azetoxymethylesterrest durch endogene, unspezifische Esterasen abgespalten wird und Fura-2 dann in der geladenen Form nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren kann.

Die Färbung der Glomerula-Suspension erfolgte mit 16  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM + 0,04 % des Detergens Pluronic F-127 in der jeweiligen HEPES-PS für 60 min bei Raumtemperatur. Nach dem Ende der Farbstoffbeladung wurde der Überstand der Färbelösung entfernt und die Glomerula wurden vor der Messung noch 30 min bei Raumtemperatur mit HEPES-PS gewaschen.

Bei der Messung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mit Fura-2 macht man sich zunutze, dass die Bindung von Ca<sup>2+</sup>

das Anregungsspektrum des Farbstoffs zu kürzeren Wellenlängen verschiebt. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung (freier Farbstoff) liegt das Absorptionsmaximum bei 365 nm, bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ -Fura-2-Komplex) verschiebt sich das Maximum auf 340 nm; der isosbestischen Punkt liegt bei 360 nm; hier ist die Fluoreszenz unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 2.5).

Angeregt wurde bei 340 und 380 nm; bei 340 nm fluoreszieren beide Spezies (wobei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fura-2-Komplex mehr beiträgt), bei 380 nm sieht man ganz überwiegend den freien Farbstoff (Abb. 2.5). Die sehr geringe Fluoreszenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Fura-2-Komplexes bei 380 nm wird in diesen Kurven (Quelle: MoBiTec, [www.mobitec.de](http://www.mobitec.de)) nicht so deutlich wie in anderen Darstellungen (vgl. z.B. Gryniewicz et al. 1985), aber auch die in unserer Apparatur ermittelten hohen  $R_{\max}$ -Werte (s.u.) bestätigen diese Charakteristik. Weiterhin wird die Fluoreszenzintensität bestimmt durch die Zelldicke (d), die Konzentration des Farbstoffs (c) und eine Konstante (K), die die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst, wobei jedoch d, c und K unbekannt sind. Wird aber in kurzer Zeitfolge die Intensität bei 340 und bei 380 nm gemessen, so kann man davon ausgehen, dass sich die unbekannt Parameter nicht unterscheiden. Es kann der Quotient (Ratio R) aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden Anregungswellenlängen F340 und F380 gebildet werden („Ratio“ Methode), der über die Gleichung nach Gryniewicz (Gryniewicz et al. 1985) mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verknüpft ist:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times (\text{Sf2} / \text{Sb2}) \quad (1)$$

|            |   |  |
|------------|---|--|
| $K_D$      | = | Dissoziationskonstante des Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes   |
| R          | = | F 340 / F 380  |
| $R_{\max}$ | = | F 340 / F 380 bei sättigender $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  |
| $R_{\min}$ | = | F 340 / F 380 bei $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung  |
| (Sf2/Sb2)  | = | Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm Anregung von $\text{Ca}^{2+}$ -freiem / $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Farbstoff |

#### 2.2.3.2.2 Zellfreie Kalibrierung des Systems

Wie von Carmines et al. (1993) durch Messungen an Arteriolen der Kaninchenniere und Rauch (2000, DA) durch Messungen an reninsezernierenden Zellen der Ratte beschrieben

wurde, ist eine intrazelluläre Kalibrierung des Fura-2-Signals in glatten Muskelzellen mit Problemen behaftet, weswegen eine zellfreie Kalibrierung nach der von Grynkiewicz et al. (1985) beschriebenen Methode durchgeführt wurde.

Der  $K_D$ -Wert von Fura-2 wurde von Rauch (2000) mit unserer Apparatur ermittelt. Der so ermittelte  $K_D$ -Wert von 192 nM, ein Wert der nahe am dem meist verwendeten Wert von 224 nm (Grynkiewicz et al. 1985) liegt, wurde allen Berechnungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zugrunde gelegt.

Bestimmung von  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) im Juni 2000

Objektiv 100x

$R_{min}$ : 0,51

$R_{max}$ : 12,50

(Sf2 / Sb2): 9,2

Diese Werte galten für folgende Experimente:

3.1.1, 3.3, 3.5

Erneute Bestimmung von  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) nach Aufstellen der Apparatur in einem anderen Labor im Mai 2001

Objektiv 100x

$R_{min}$ : 0,74

$R_{max}$ : 16,94

(Sf2 / Sb2): 8,63

Diese Werte galten für folgende Experimente:

3.2, 3.3.4, 3.5.4

Erneute Bestimmung von  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) nach erneutem Umzug mit der Apparatur im August 2001

Objektiv 100x

$R_{min}$ : 0,52

$R_{max}$ : 15,41

(Sf2 / Sb2): 10,32

Diese Werte galten für folgende Experimente:

3.1.2, 3.3.3, 3.4, 3.5.4.3, 3.5.5, 3.6, 3.7

### 2.2.3.2.3 Auswertung der $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten - Bestimmung der Peakgröße und Fläche

Bei den meisten Experimenten wurde mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet, bei dem zunächst mit einer Kontrollsubstanz stimuliert wurde. Nach einer Auswaschphase wurde mit der zu untersuchenden Substanz / Substanzgemisch stimuliert (Abb. 2.6).

Je nach Fragestellung erfolgte die Quantifizierung der Antwortgröße durch Bestimmung der Höhe („Peak“) oder der Fläche unter der Kurve („AUC“). Zur Erfassung der Höhe wurde zunächst die Differenz der Maximalwerte und der Basiswerte in nM bestimmt ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Peak (nM)}$ ). Die Antwort der Untersuchungssubstanz wurde in Prozent der Kontrollantwort angegeben ( $\text{Peak}_2 \times 100 / \text{Peak}_1 (\%) = \Delta[\text{Ca}^{2+}]_i (\%)$ ). Die Flächenbestimmung erfolgte nach der Wiegemethode. Dazu wurde die Basislinie extrapoliert, und der Bereich unter der Kurve (AUC, vom Beginn der Änderung der Antwort bis der Messwert wieder die Basislinie erreicht hatte) ausgeschnitten und gewogen. Auch hier wurde die Fläche der Antwort auf die zu untersuchenden Substanz in Bezug auf die Antwort auf die Kontrollsubstanz bestimmt  $\text{AUC}_2 (\text{Untersuchungssubstanz}) \times 100 / (\text{AUC}_1 (\text{Kontrollsubstanz}))$ . Dieser Wert wurde als  $\text{AUC}_2 (\%)$  bezeichnet.  $\text{AUC}_2 (\%)$  bzw.  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i (\%)$  wurden aus den Einzelwerten jedes Experiments ermittelt. Von allen Werten ( $\text{AUC}_1$ ,  $\text{AUC}_2$ ,  $\text{AUC}_2 (\%)$ ,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i 1$ ,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i 2$ ,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i (\%)$ ) wurden anschliessend die Mittelwerte und der S.E.M (standard error of the mean) berechnet und in einer Tabelle erfasst.

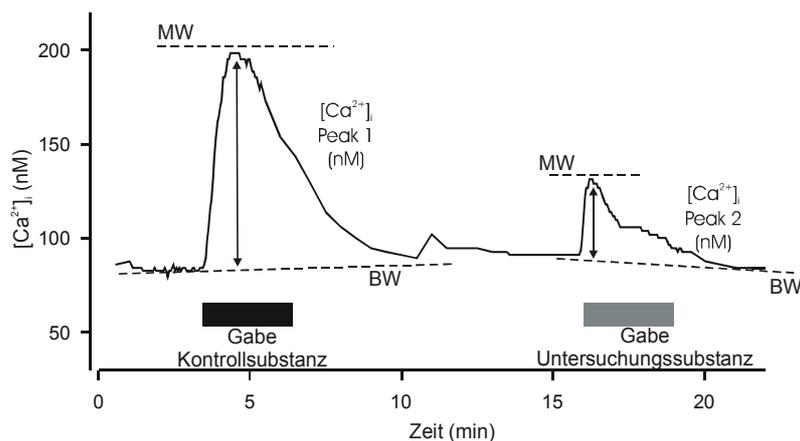


Abb. 2.6 Darstellung der Datenauswertung

Zunächst wurde für jeden Peak (= Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) eine individuelle Basislinie gezogen und so der Basiswert (BW) erfasst. Anschließend wurde der Maximalwert (MW) der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (nM) bestimmt. Bildet man die Differenz der beiden Messwerte (Maximalwert - Basiswert), so erhält man die Änderung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (nM), die als  $[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ Peak (nM)}$  bezeichnet wurde. Mit Hilfe der Wiegemethode (vgl. Text) wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt, also der Bereich zwischen der individuellen Basislinie und der Kurve.

### 2.2.3.3 Messung des intrazellulären pH-Wertes $[pH]_i$

#### 2.2.3.3.1 Färbung der afferenten Arteriole und Messung des $[pH]_i$

Um den  $[pH]_i$  mit dem Carboxyfluoreszein Derivat BCECF zu messen, wurde ein dichroischer Spiegel (DM 505, Nikon) und ein Langpassfilter (BA 520, Nikon) verwendet. Die durch die 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (XBO 75 W / 2 OFR, Osram, D) erzeugte Anregungsstrahlung wurde mittels zweier Monochromatoren, durch die das Licht abwechselnd geleitet wurde, in zwei Wellenlängen (450 nm und 490 nm) aufgespalten. Die Intensität des emittierten Lichtes wurde mit einer Restlichtkamera (Abb. 2.1) bei einer Wellenlänge von  $\sim 535$  nm gemessen.

Zur Bestimmung des  $[pH]_i$  wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, Molecular Probes; Abb. 2.7) verwendet. Wie Fura-2 wird BCECF als Azetoxymethylester durch Diffusion in die Zelle eingebracht und durch endogene Esterasen kommt es im Cytoplasma zum Abspalten der Estergruppen. Die so entstehenden vier bis fünf negativen Ladungen des BCECF werden bei pH 7 - 8 nicht oder nur teilweise protoniert (die für die Fluoreszenz relevante  $pK_a$  ist 6,98), so dass der Farbstoff als Anion vorliegt und, da er in dieser hydrophilen Form nicht mehr durch die Membran diffundieren kann, sich im Cytosol anreichert. Die Farbstoffbeladung erfolgte mit 4  $\mu$ M BCECF AM + 0,04 % des Detergens Pluronic F127 in Na-HEPES-PS für 60 min bei Raumtemperatur. Die Glomerula wurden nach der Farbstoffbeladung vor der Messung noch für 30 min in HEPES-PS bei Raumtemperatur gewaschen.

BCECF ist aufgrund seines  $pK_a$ -Wertes für die pH-Messungen im Cytosol geeignet. Der Farbstoff weist im Alkalischen in ionisierter Form andere Fluoreszenzeigenschaften auf als im Sauren in protonierter Form. Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 490 nm und wird mit zunehmender Protonierung hin zum längerwelligen Bereich verschoben (Abb. 2.7). Die Verschiebung des Anregungsspektrums ermöglicht auch hier eine Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 490 nm). Die bei 490 nm gemessene Intensität nimmt im Sauren ab, im Alkalischen zu; die bei 450 nm gemessene Intensität verändert sich kaum, d. h. beide Formen, protoniert und unprotoniert tragen ähnlich bei (Abb. 2.7). Der Quotient der Fluoreszenzintensitäten beider Anregungswellenlängen („Ratio-Methode“)  $R = F_{490} / F_{450}$  ist über die Gleichung nach Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) direkt mit der Protonenkonzentration ( $[H]_i$ ) verknüpft (vgl. Gl. 1)

$$[H]_i = K_D \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times (S_a/2 / S_b/2) \quad (1)$$

$(S_{\text{acidic}}/2 / S_{\text{basic}}/2)$  = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 490 nm Anregung von protoniertem / unprotoniertem Farbstoff. Die so erhaltenen Werte wurden von der Software (Imagemaster) in den pH-Wert umgerechnet.

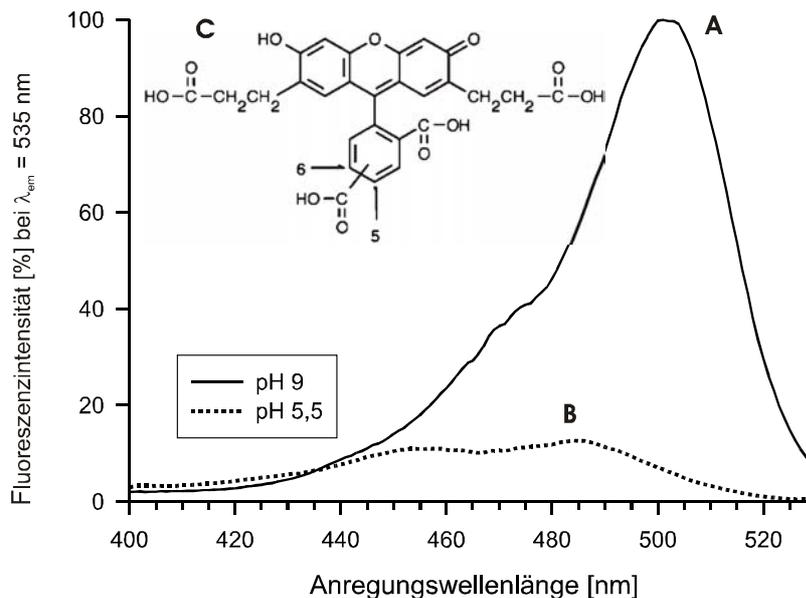


Abb. 2.7 Dargestellt ist das Anregungsspektrum von BCECF in saurem (pH 5,5; B) und alkalischem (pH 9; A) Medium sowie die Strukturformel von BCECF (C). Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 490 nm und wird mit zunehmender Protonierung im sauren Medium hin zum längerwelligen Bereich verschoben und die Fluoreszenzintensität nimmt ab (vgl. Text). Anregungsspektrum gemessen bei  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ .

### 2.2.3.3.2 Intrazelluläre Kalibrierung des Systems

Es wurde eine *in vivo* Kalibrierung des Systems mit Kalium (140 mM) / Nigericin (25  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Dazu wurden die reninhaltigen Zellen mit Nigericin, einem Ionophor für Kalium und Protonen, behandelt, so dass sie nicht mehr in der Lage waren, den  $[pH]_i$  zu regulieren. Werden die Zellen dann mit verschiedenen pH-Lösungen superfundiert, so kann man davon ausgehen, dass intrazellulär derselbe pH herrscht wie extrazellulär.

Zur Kalibrierung wird eine Lösung mit niedrigem pH-Wert (5,1) und eine mit hohem pH-Wert (9,1) verwendet; auf diese Weise erhält man das Fluoreszenzmaximum ( $R_{\max}$ ) und –minimum ( $R_{\min}$ ), sowie  $(S_a/2 / S_b/2)$ , mit dem man dann die pH-Werte berechnen kann (Kap. 2.2.3.3.1).

### 2.2.3.3.3 Auswertung der pH-Änderung - Bestimmung der pH-Differenz

Zur quantitativen Auswertung wurden die pH-Werte am Ende der primären Superfusion mit HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung und am Ende der Gabe der NHE-Inhibitoren bzw. der Lösungsmittelkontrollen herangezogen (Abb. 2.8). Bestimmt wurde der mittlere pH-Wert während der letzten Minute der Puffergabe und während der letzten Minute der Substanz-/Lösungsmittelgabe. Diese beiden pH-Werte wurden jeweils mit dem nicht-parametrischen U-Test von Mann-Whitney für gepaarte Messwerte auf signifikante Unterschiede überprüft. Weiterhin wurde die Differenz der beiden Werte gebildet und Substanz- und Lösungsmittelgabe miteinander verglichen (nicht-parametrischer U-Test von Mann-Whitney für nicht-gepaarte Messwerte).

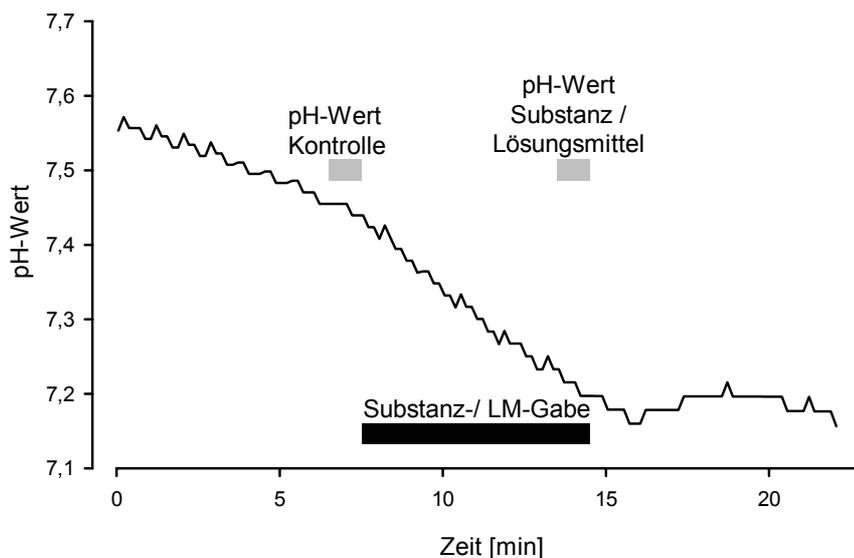


Abb. 2.8 Bestimmung des pH-Wertes und der pH-Differenz

Der Mittelwert des pH-Wertes der letzten Minute der Superfusion mit HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (pH-Wert-Kontrolle) und der letzten Minute der Superfusion mit der Substanz/Lösungsmittel (pH-Wert Substanz/Lösungsmittel) wurde bestimmt und auf signifikante Unterschiede getestet. Weiterhin wurden die Differenzen der pH-Wert-Paare gebildet (pH-Wert Kontrolle minus pH-Wert Substanz und pH-Wert Kontrolle minus pH-Wert Lösungsmittel) und auf signifikante Unterschiede verglichen.

Bei den  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Doppelpulsen wurde die Geschwindigkeit der Realkalisierung mit und ohne NHE2-Inhibitor „1522“ bestimmt. Bestimmt wurde dazu die Zeitkonstante der Realkalisierung durch Anpassung einer Exponentialfunktion jeweils von Anstiegsbeginn über

5 Minuten. Die jeweilige Präparation wurde durch einen erste  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puls standardisiert und dann die relative Realkalisierungsgeschwindigkeit des zweiten Pulses mit und ohne „1522“-Gabe bestimmt. Diese Verhältnisse mit und ohne „1522“ wurden auf signifikante Unterschiede überprüft (t-Test).

#### *2.2.3.4 Messung des pH-Wertes in den reninhaltigen Vesikeln*

Um den pH-Wert in den reninhaltigen Vesikeln zu messen, deren pH-Wert mit 5,5 unter dem im Cytosol vorherrschenden pH-Wert liegt, wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor Green DND-189 (MoBiTec, [www.mobitec.de](http://www.mobitec.de); Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals) verwendet. Sein  $\text{pK}_a$ -Wert liegt bei 5,2 und es können pH-Änderungen im Bereich von 4,5 - 6,0 gemessen werden. LysoSensor Green ist eine schwache Base und wird selektiv in sauren Zellorganellen angereichert. Im Sauren nimmt die Fluoreszenz dieses Farbstoffs zu und er zeigt nahezu keine Fluoreszenz außerhalb der sauren Zellorganellen.

Das Mikroskop wurde für diese Messungen mit einem dichroischen Spiegel (430DCLPO2, Omega Optical, VT, USA) und einem Interferenzbarrierefilter (510WB40, Omega Optical) ausgestattet. Die Anregungswellenlänge betrug 430 nm.

Die Färbung der Glomerula-Suspension erfolgte mit 750 nM LysoSensor Green für 30 min bei 37 °C. Die Färbung wurde durch Zugabe der HEPES-gepufferten physiologischen Salzlösung (HEPES-PS) gestoppt und die Glomerula wurden vor der Messung noch 30 min bei 37 °C mit HEPES-PS gewaschen. Sie wurden im Weiteren bei 37 °C aufbewahrt. Zur Auswertung wurde in diesem Fall die Steigung der Kurve herangezogen.

#### *2.2.3.5 Messung des Membranpotentials*

Das Membranpotential der reninsezernierenden Zellen wurde mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff  $\text{DiBAC}_4(3)$  (bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol, MoBiTec, Göttingen) in oben beschriebener Apparatur gemessen, die dazu mit dem dichroischen Spiegel DM 505 (Nikon) und dem Langpassfilter BA 520 (Nikon) ausgerüstet wurde. Die Anregungswellenlänge betrug hier  $488 \pm 4$  nm, das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von

520 nm gemessen.

Die Färbung der Glomerula-Suspension erfolgte mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{DiBAC}_4(3)$  in Na-HEPES-PS für 80 min. Jeder zur Messung verwendeten Lösung wurde 1  $\mu\text{M}$   $\text{DiBAC}_4(3)$  in Na-HEPES-PS

zugesetzt, so dass während der Messung die Glomerula-Suspension kontinuierlich mit DiBAC<sub>4</sub>(3) überspült wurde. So wurde das Auswaschen des Farbstoffes verhindert. Die Experimente wurden bei 37 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> durchgeführt. Wie Fura-2 gelangt auch DiBAC<sub>4</sub>(3) durch Diffusion in die Zelle (Waggoner, 1976, zitiert in Bräuner et al., 1984). Es enthält delokalisierte negative Ladungen. In der Zelle bindet es an hydrophobe Bestandteile von Proteinen und Membranen, wobei die Fluoreszenzintensität ansteigt (Bräuner et al., 1984; Epps et al., 1994). Der Depolarisationszustand der Zelle bestimmt den Umfang des Eindringens von DiBAC<sub>4</sub>(3) über die Plasmamembran in die Zelle; je depolarisierter die Zelle ist, desto leichter kann der Farbstoff eindringen. Demzufolge bewirkt Depolarisation einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, Hyperpolarisation eine Abnahme der Fluoreszenz, da der Farbstoff von der Zelle abgestoßen wird. Da frei vorliegender Farbstoff keine Fluoreszenz zeigt, hängt die Fluoreszenzintensität direkt von der Menge an intrazellulär gebundenem Farbstoff ab. Da diese Menge potentialabhängig ist, kann die Fluoreszenzintensität demzufolge als Maß für das Membranpotential verwendet werden (Bräuner et al., 1984; Epps et al., 1994).

#### 2.2.4 Statistik

Zur Datenauswertung wurde der Mittelwert ± S.E.M angegeben. Stichproben wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf das Vorliegen der Normalverteilung geprüft. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zweier Stichproben erfolgte bei normalverteilten Daten mit dem Student's t-Test, bei nicht-normalverteilten Daten wurde der nicht-parametrische U-Test von Mann-Whitney herangezogen. Die Untersuchung auf Signifikanz bei Antworthäufigkeiten (Kap. 3.2.2.1, 3.2.3.1) erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test.

Die Berechnungen wurden mit Sigma Plot 2000 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL, U.S.A.), mit InStat<sup>TM</sup>2.02 (GraphPad Software Inc., CA, U.S.A) oder mit Sigma-Stat 2.03 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL, U.S.A.) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### Allgemeine Vorbemerkungen

In den meisten Versuchen wurde mit Gefäßen aus Tieren gearbeitet, die nach einer einmaligen Applikation des Schleifendiuretikums Furosemid für mindestens 14 Tage eine kochsalzarme Diät erhalten hatten. Grund hierfür ist, dass Kochsalzrestriktion das RAAS stimuliert und eine vermehrte Umwandlung glatter Muskelzellen in reninsezernierende Zellen bewirkt. Der reninpositive Bereich wird zum einen weiter nach proximal ausgedehnt, zum anderen wird die Anzahl der reninpositiven Arteriolen vermehrt (Kap. 1.2). Da hier  $[Ca^{2+}]_i$  in renin-sezernierenden Zellen gemessen werden sollte, ist eine erhöhte Anzahl reninsezernierenden Zellen von großem Vorteil. Wenn nicht anders in den einzelnen Kapiteln erwähnt, wurden für die Experimente kochsalzarm ernährte Ratten und Mäuse verwendet.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde im distalen Teil der afferenten Arteriole gemessen, und zwar genau am Eintritt der Arteriole in das Glomerulum, wo die reninsezernierenden Zellen lokalisiert sind (Kap. 2.2.3.1).

#### 3.1 Einfluss von Angiotensin II auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration in den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Rattenniere

Angiotensin II (ANG II) wirkt vasokonstriktorisch und hemmt die Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole. ANG II entfaltet beide Wirkungen durch einen transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg, der über die  $IP_3$ -Kette vermittelt wird (Kap. 1.3.2). Dass dieser  $Ca^{2+}$ -Anstieg in isolierten glatten Muskelzellen aus präglomerulären Gefäßen durch den ANG II  $AT_1$ -Blocker Losartan gehemmt wird, konnten Zhu und Arendshorst (1996) zeigen. Die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II aus isolierten juxtaglomerulären Zellen wird signifikant durch Losartan (1  $\mu$ M) abgeschwächt (Sosath, 1999). Die hier beschriebenen Versuche dienten zur Charakterisierung der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II in dem hier verwendeten Präparat, wobei verschiedenen Konzentrationen verwendet wurden. Ziel war es, eine ANG II-Konzentration festzulegen, bei deren Applikation eine regelmäßige  $Ca^{2+}$ -Erhöhung erfolgt, die relativ schnell wieder abklingt. Eine Stimulation mit dieser Konzentration ANG II sollte in allen weiteren Experimenten als interner Standard dienen und auch zweimal hintereinander ohne Tachyphylaxie durchführbar sein.

Es wurden die Konzentrationen 0,03 , 0,1 und 3 nM ANG II gemessen; Abb 3.1 zeigt ein Experiment mit 3 nM. Die Messungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 3.1 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit ANG II (0,03, 0,1 und 3 nM)

| ANG II-<br>(nM) | Versuchszahl<br>n | Experimente mit An-<br>stieg der $[Ca^{2+}]_i$ | Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$<br>(nM)<br>nur Responder // alle |
|-----------------|-------------------|--|---|
| 0,03            | 8                 | 5  | $14 \pm 2$ // $9 \pm 3$                                     |
| 0,1             | 9                 | 7  | $31 \pm 6$ // $24 \pm 6$                                    |
| 3               | 78                | 78   | $48 \pm 4$ // $48 \pm 4$                                    |

In der Konzentration von 0,03 nM, appliziert für drei Minuten, rief ANG II in 5 von 8 Versuchen einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor (63 % Antworthäufigkeit). Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  betrug  $14 \pm 2$  nM (bei Einbeziehung nur der Responder) bzw.  $9 \pm 3$  nM (bei Einbeziehung aller Experimente). Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  betrug hier  $115 \pm 5$  nM (Responder) bzw.  $105 \pm 8$  nM (alle Experimente). Zur quantitativen Auswertung wurde die Peakhöhe herangezogen. Es wurde die Höhe vom Beginn des Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  bis zum Mittelwert der maximalen  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen.

In der Konzentration von 0,1 nM rief ANG II in 78 % der Fälle (7 von 9 Experimenten) eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor. Der Anstieg betrug  $31 \pm 6$  nM bei einer durchschnittlichen basalen  $[Ca^{2+}]_i$  von  $134 \pm 13$  nM, wenn nur die Experimente gewertet werden, bei denen ANG II eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  hervorrief. Bezieht man alle Experimente in die Berechnung mit ein, so betrug der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$   $24 \pm 6$  nM bei einem durchschnittlichen Ruhe- $Ca^{2+}$ -Wert von  $129 \pm 11$  nM. Die  $Ca^{2+}$ -Erhöhung war signifikant größer als bei der Konzentration von 0,03 nM (alle Experimente und responder:  $p < 0,05$ ).

Wurde das Präparat über eine Minute mit einer Konzentration von 3 nM ANG II superfundiert (Abb. 3.1) , bewirkte diese regelmäßig einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , der im Mittel  $48 \pm 4$  nM ( $n = 78$ ) bei einer durchschnittlichen basalen  $[Ca^{2+}]_i$  von  $63 \pm 3$  nM betrug. Daraufhin wurde als Standardapplikation ein ANG II-Konzentration von 3 nM festgelegt. Mit dieser Konzentration ANG II wurde für eine Minute perfundiert. Nach einer Auswaschphase von mind. 11 Minuten ist mit 3 nM ANG II mehrfach hintereinander eine gleichmäßige Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  möglich (Abb. 3.1).

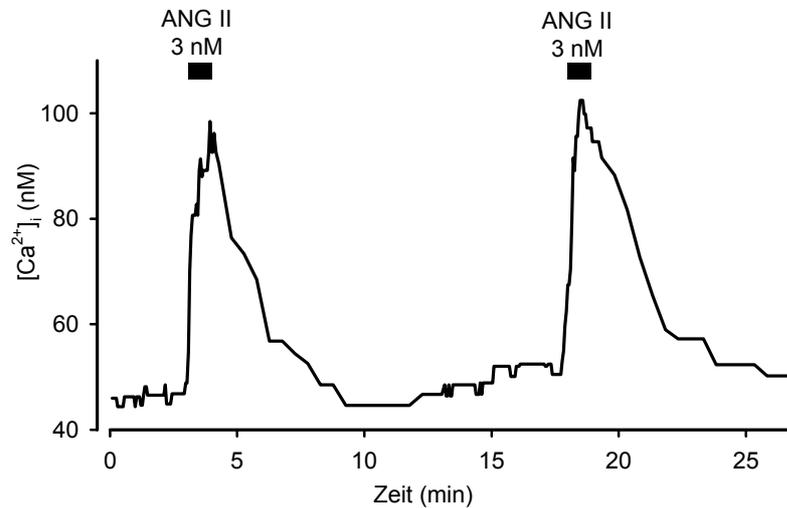


Abb. 3.1 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) in renninsezernierenden Zellen der Ratte. Stimulation mit ANG II (3 nM) für eine Minute rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor. Nach einer Auswaschzeit von mind. 11 min war eine zweite Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit ANG II in der gleichen Effektgröße möglich.

### **3.2 Einfluss von cAMP-erhöhenden Maßnahmen auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte**

cAMP ist ein sehr starker Stimulator der Reninsekretion (Keeton et al. 1981; Churchill, 1985). In verschiedenen Präparaten konnte immer wieder belegt werden, dass der Adenylatcyclaseaktivator Forskolin die Reninsekretion erheblich stimuliert. Sowohl in der isoliert perfundierten Niere (Fray et al. 1985), als auch an isolierten juxtaglomerulären Zellen in Suspension, wie sie in der AG von PD Albinus (Albinus et al. 1998; Sosath, 1999) verwendet werden, stimuliert Forskolin die Reninsekretion (Kap. 1.3.1.3). Wie in Kap. 1.3.1.1 beschrieben, verhalten sich Reninsekretion und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  invers („Calciumparadox“).

In glatten Muskelzellen führt cAMP-Erhöhung zu einer Relaxation, die auf einer Senkung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch verstärktes Pumpen von  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazelluläre Organellen und aus der Zelle sowie auf der Abnahme der Kontraktilität beruht (Karaki et al., 1997). An der afferenten Arteriole des Kaninchens bewirkt Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren in Ruhe keine Änderung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kornfeld et al., 2000). Es war deshalb von Interesse, den Einfluss einer cAMP-Erhöhung auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in dem hier verwendeten Präparat zu überprüfen. Wenn nicht anders beschrieben wurden Vasa afferentia aus Nieren von salzarm ernährten Ratten verwandt.

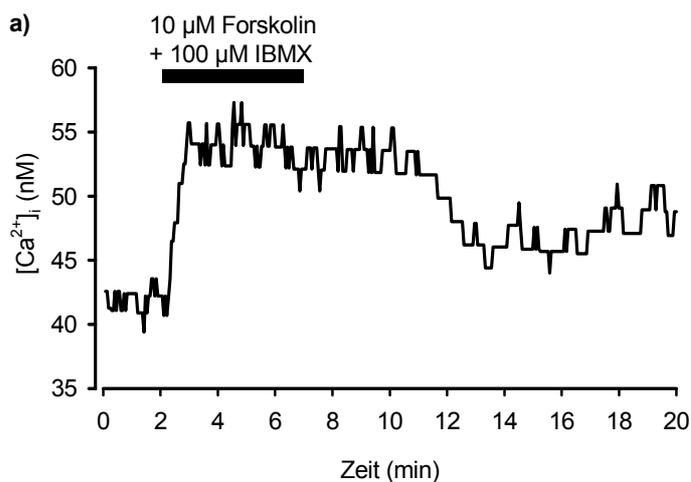
#### **3.2.1 Pharmakologische Charakterisierung der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch cAMP-Stimulation**

##### *3.2.1.1 Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Forskolin und/oder IBMX*

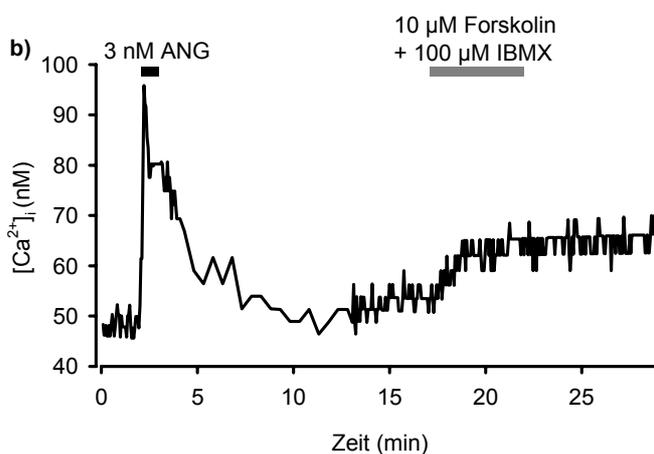
Es wurden verschiedene Konzentrationen des Adenylatcyclaseaktivators Forskolin getestet (10  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$ ). Häufig wurde der Phosphodiesteraseinhibitor IBMX in der Konzentration 100  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Das Versuchsprotokoll wurde in Bezug auf die Forskolin-Applikationszeit mehrfach variiert, um die Bedingungen zu optimieren. Sowohl Forskolin als auch IBMX wurden auch alleine gegeben. Da die Bedingungen erst optimiert werden mussten, sind verschiedene Protokolle verwendet worden, so dass für jede Bedingung nur eine eher kleine n-Zahl vorhanden ist. Einheitlich zeigt aber Forskolin / IBMX eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Die Ergebnisse dieser ersten orientierenden Experimente sind in Tab. 3.2 zusammengefasst, Einzelexperimente sind in Abb. 3.2 gezeigt. Es werden wieder Responder/Non-Responder getrennt aufgeführt.

Tab. 3.2 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Forskolin / IBMX

| Forskolin ( $\mu$ M) | IBMX ( $\mu$ M) | Appl.-zeit (min) | Versuchsanzahl n | Responder | basales $[Ca^{2+}]_i$ (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (nM) alle / resp | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (% basales $[Ca^{2+}]_i$ ) alle / resp |
|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------------|---|
| 10                   | 0               | 5                | 1                | 1         | 58                         | 14                                    | 24  |
| 0                    | 100             | 5                | 4                | 1         | $36 \pm 5$                 | $3 \pm 3$ / $13 \pm 0$                | $14 \pm 14$ / $57 \pm 0$                                    |
| 10                   | 100             | 10               | 4                | 4         | $41 \pm 4$                 | $10 \pm 2$                            | $25 \pm 8$  |
| 10                   | 100             | 5                | 2                | 2         | $47 \pm 5$                 | $10 \pm 4$                            | $22 \pm 10$   |
| 10                   | 100             | 3                | 1                | 1         | 50                         | 15                                    | 30  |
| 10                   | 100             | 5                | 2                | 2         | $47 \pm 5$                 | $10 \pm 4$                            | $22 \pm 10$   |
| 3                    | 100             | 5                | 2                | 2         | $50 \pm 21$                | $7 \pm 0$                             | $18 \pm 8$  |

Abb. 3.2 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Forskolin 10  $\mu$ M + IBMX 100  $\mu$ M

a) Stimulation mit Forskolin + IBMX erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  zügig nachdem die Substanzen das Bad erreichten und sie hielt an, solange die Substanzen anwesend waren.



b) Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Forskolin + IBMX im Vergleich zum ANG II (3 nM)-Peak. Die Steigerung von  $[Ca^{2+}]_i$  war geringer als die durch ANG II (3 nM) ausgelöste  $[Ca^{2+}]_i$ -Steigerung und war auch durch Auswaschen nicht reversibel.

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  lag in dieser Versuchsreihe, alle Experimente zusammengefasst ( $n = 19$ ), bei  $45 \pm 3$  nM.

Forskolin (10  $\mu$ M) und IBMX (100  $\mu$ M) allein konnten eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung bewirken; diese wurde für IBMX allein allerdings selten (25 %) gemessen. In der Kombination Forskolin (10  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) wurde der Einfluss der Stimulationszeit auf die Häufigkeit der Antwort und ihre Größe untersucht. Eine starke Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde nahezu sofort angehoben, wenn Forskolin / IBMX die Superfusionskammer erreichten (Abb. 3.2a). Der Effekt schien solange anzuhalten, wie sich die Substanzen im Bad befanden. In einigen Fällen klang er jedoch in der Auswaschphase nicht ab (Abb. 3.2b). Forskolin (3  $\mu$ M) in Kombination mit IBMX (100  $\mu$ M) erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  ebenfalls. Bei Lösungsmittelkontrollen (DMSO/Ethanol = 1 : 1; 0,1 %) zeigte sich nie eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung.

Diese orientierenden Versuche zeigen, dass Forskolin sowohl allein als auch in Kombination mit IBMX  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht. Der Effekt ist nicht sehr groß. Da Forskolin neben seiner cAMP-erhöhenden Wirkung auch noch andere Effekte wie die Blockade verschiedener  $K^+$ -Kanäle hervorruft (Laurenza et al., 1989; Kessler et al., 1997), ging es in den folgenden Versuchen darum, ob andere cAMP-erhöhende Maßnahmen wie  $\beta$ -Adrenozeptorstimulation oder auch membrangängige cAMP-Analoga ebenfalls  $[Ca^{2+}]_i$  erhöhen. Ferner sollte der Effekt genauer quantifiziert und seine Abhängigkeit von der Intensität des Stimulus untersucht werden.

### 3.2.1.2 Einfluss der Stimulation von $\beta$ -Adrenozeptoren auf die $[Ca^{2+}]_i$

#### 3.2.1.2.1 Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin

In diesen Versuchen wurde der  $\beta$ -Rezeptoragonist Isoprenalin (ISO) in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne den Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100  $\mu$ M) gegeben. Als interne Kontrolle und zur Quantifizierung des Effektes wurde dasselbe Präparat auch mit ANG II (3 nM) stimuliert. Abb. 3.3 zeigt als Beispiel nach vorausgehender Stimulation mit ANG II den Effekt von Isoprenalin (1  $\mu$ M) in Kombination mit IBMX (100 ).

Im einzelnen wurden folgende Protokolle verwendet:

- a) Min 1 - 2    ANG II (3 nM);            Min 15 - 18    ISO (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M)
- b) Min 1 - 2    ANG II (3 nM);            Min 15 - 18    ISO (100 nM) + IBMX (100  $\mu$ M)
- c) Min 2 - 5    ISO (100 nM) + IBMX (100  $\mu$ M)

- d) Min 1 - 2 ANG II (3 nM); Min 15 - 18 ISO (100 nM)  
 e) Min 2 - 5 ISO (100 nM)  
 f) Min 2 - 5 IBMX (100  $\mu$ M)  
 g) Min 1 - 2 ANG II (3 nM); Min 15 - 18 IBMX (100  $\mu$ M)  
 h) Min 1 - 2 ANG II (3 nM); Min 15 - 18 ISO (1  $\mu$ M)

Tab. 3.3 Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) durch Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren

| Stimulation  | Protokoll | Versuchs-<br>anzahl n | basales<br>$[Ca^{2+}]_i$ 1<br>(nM) | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 1<br>(nM) | basales<br>$[Ca^{2+}]_i$<br>2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 2<br>(nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$<br>(%) |
|--|-----------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1) ANG II 3 nM<br>2) ISO 1 $\mu$ M /<br>IBMX 100 $\mu$ M | a         | alle: 13<br>resp.: 11 | 46 $\pm$ 3<br>49 $\pm$ 3           | 42 $\pm$ 6<br>35 $\pm$ 4        | 49 $\pm$ 4<br>52 $\pm$ 4           | 11 $\pm$ 2<br>13 $\pm$ 2        | 36 $\pm$ 9<br>43 $\pm$ 9    |
| 1) ANG II 3 nM<br>2) ISO 100 nM /<br>IBMX 100 $\mu$ M    | b         | alle: 2<br>resp.: 1   | 45 $\pm$ 0,5<br>44                 | 40 $\pm$ 5<br>44                | 50 $\pm$ 4<br>46                   | 7                               | 16                          |
| ISO 100 nM /<br>IBMX 100 $\mu$ M                         | c         | alle: 5<br>resp.: 3   | 34 $\pm$ 6<br>31 $\pm$ 8           | 6 $\pm$ 3<br>10 $\pm$ 1         |                                    |                                 |                             |
| 1) ANG II 3 nM<br>2) ISO 100 nM                          | d         | alle: 6<br>resp.: 3   | 43 $\pm$ 3<br>45 $\pm$ 5           | 28 $\pm$ 3<br>27 $\pm$ 5        | 44 $\pm$ 3<br>46 $\pm$ 5           | 6 $\pm$ 4<br>11 $\pm$ 6         | 23 $\pm$ 15<br>46 $\pm$ 26  |
| ISO 100 nM   | e         | alle: 7<br>resp.: 4   | 37 $\pm$ 6<br>43 $\pm$ 8           | 7 $\pm$ 3<br>12 $\pm$ 3         |                                    |                                 |                             |
| IBMX 100 $\mu$ M   | f         | alle: 3<br>resp.: 1   | 35 $\pm$ 7<br>23                   | 13                              |                                    |                                 |                             |
| 1) ANG II 3 nM<br>2) IBMX 100 $\mu$ M                    | g         | alle: 8<br>resp.: 4   | 55 $\pm$ 5<br>64 $\pm$ 7           | 24 $\pm$ 3<br>23 $\pm$ 5        | 58 $\pm$ 6<br>70 $\pm$ 8           | 5 $\pm$ 2<br>10 $\pm$ 1         | 25 $\pm$ 11<br>49 $\pm$ 12  |
| 1) ANG II 3 nM<br>2) ISO 1 $\mu$ M                       | h         | alle.: 11<br>resp.: 8 | 47 $\pm$ 4<br>45 $\pm$ 4           | 36 $\pm$ 6<br>31 $\pm$ 4        | 49 $\pm$ 5<br>46 $\pm$ 3           | 8 $\pm$ 2<br>11 $\pm$ 1         | 29 $\pm$ 8<br>39 $\pm$ 7    |

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  in dieser Experimentreihe lag, alle Experimente zusammen gezählt (n = 57), bei 45  $\pm$  2 nM.

Auf Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) haben im distal vermessenen Bereich 85 % der afferenten Arteriolen mit einer  $Ca^{2+}$ -Erhöhung reagiert (n = 13, 2 non-responder; Tab. 3.3, Protokoll a, Abb. 3.3a).

Auf Isoprenalin (100 nM) + IBMX (100  $\mu$ M) haben 60 % der vermessenen Gefäße mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  geantwortet (n = 5, 2 non-responder); Zusammenfassung der beiden Reihen b und c ergab eine Antworthäufigkeit von 57 % (n = 7, 3 non-responder).

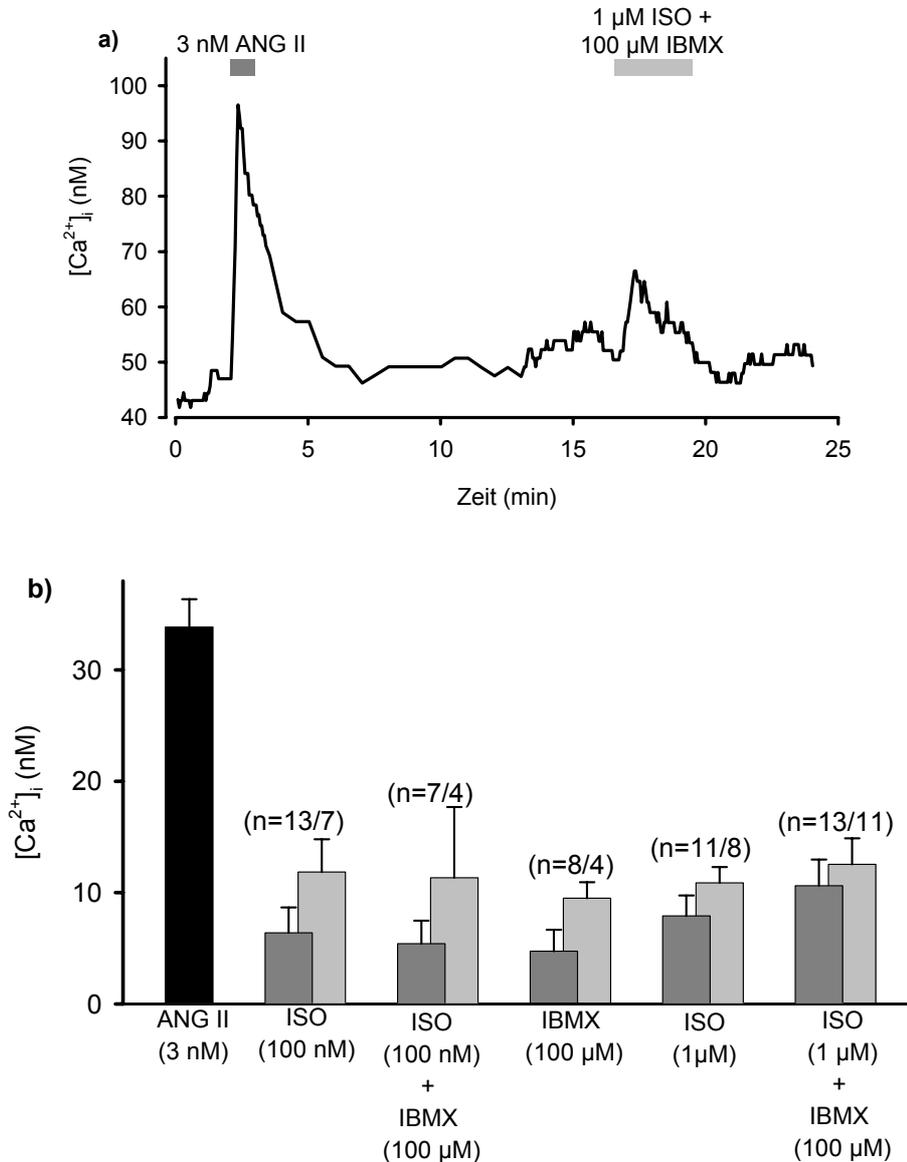


Abb. 3.3 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) (ISO) + IBMX (100  $\mu$ M) in verschiedenen Konzentrationen, sowohl in Kombination als auch alleine gegeben, im Vergleich zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM)-Standardstimulation.

a) Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX waren in der Lage,  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen. Die Erhöhung war kleiner als die durch ANG II (3 nM) ausgelöste.

b) Dargestellt ist die Größe der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (ISO) und / oder IBMX im Vergleich zur Standard-ANG II-Stimulation

Im Vordergrund (dunkelgrau) dargestellt ist die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen auf alle Experimente, im Hintergrund (hellgrau) nur auf die Responder. Die Anzahl der Experimente (n) und der antwortenden Gefäße ist über den Balken angegeben (vgl. Text).

Die Antwortgröße lag immer zwischen 6 - 15 nM (vgl. Text), wobei ISO (1  $\mu$ M) eine etwas größere  $Ca^{2+}$ -Antwort auslöste als ISO (100 nM) bzw. IBMX (100  $\mu$ M) alleine.

Nach einer ANG II-Kontrollstimulation haben auf Isoprenalin (100 nM) bei  $n = 6$  drei Gefäße mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  geantwortet, was 50 % entspricht; ohne vorherige ANG II-Kontrollgabe erhöht Isoprenalin bei  $n = 7$  in 57 % der Versuche  $[Ca^{2+}]_i$  (3 non-responder).

Auch die Isoprenalin-Konzentration von 1  $\mu$ M wurde alleine gegeben, was eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in 73 % (8 von 11) der vermessenen Gefäßen zur Folge hatte.

Alleinige IBMX-Gabe (100  $\mu$ M) nach vorheriger ANG II-Stimulation bewirkte eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in vier von acht Experimenten, was einer Antworthäufigkeit von 50 % entspricht.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb 3.3b dargestellt.

Es zeigte sich, dass

(a) mit zunehmender Stärke des Stimulus die Antworthäufigkeit zunahm, der Effekt, wenn er auftrat, aber immer ungefähr gleich groß war.

(b) die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$   $\sim 13$  nM betrug; die Steigerung von  $[Ca^{2+}]_i$  entsprach ungefähr 40 - 50 % (nur Responder berücksichtigt) der zuvor durch ANG II (3 nM) ausgelösten  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung (Abb. 3.30).

(c) die Antwort auf cAMP-Stimulation unabhängig von einer vorherigen Stimulation mit ANG II (3 nM) ist.

Um für folgende Versuche verlässliche Antworten zu bekommen, wurde in allen weiteren Experimenten mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) stimuliert.

#### 3.2.1.2.2 Einfluss einer Blockade der $\alpha$ - und $\beta$ -Rezeptoren auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin

Bei einer Isoprenalin Konzentration von 1  $\mu$ M könnten auch  $\alpha$ -Adrenozeptoren aktiviert werden. Um sicher zu stellen, dass die  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch Stimulation des  $\beta$ -Rezeptors ausgelöst wurde und nicht durch Stimulation des  $\alpha$ -Rezeptors, wurde vor und während der Stimulation mit Isoprenalin + IBMX das Gefäß mit dem  $\beta$ -Adrenozeptorblocker Propranolol (1  $\mu$ M), als auch mit dem  $\alpha$ -Adrenozeptorantagonisten Prazosin (100 nM) superfundiert.

Gearbeitet wurde in HEPES-gepuffertes physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS). Es wurde das Doppelstimulationsprotokoll verwendet, bei dem zur Minute 1 - 2 ANG II (3 nM) gegeben wurde, und zu Minute 21 - 24 Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M). Der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Blocker wurde von Minute 16 - 24 gegeben (Abb. 3.4a).

Tab. 3.4 Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (ISO; 1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) nach Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren mit Prazosin (100 nM) und der  $\beta$ -Rezeptoren mit Propranolol (1  $\mu$ M)

| Stimulation                     | Versuchsanzahl n    | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| a) ANG II / Prazosin ISO + IBMX | 8 (1 non-responder) | 40 $\pm$ 3                   | 28 $\pm$ 4                | 43 $\pm$ 2                   | 11 $\pm$ 3                | 47 $\pm$ 15              |
| b) ANG II / ISO + IBMX          | 6                   | 47 $\pm$ 4                   | 28 $\pm$ 5                | 50 $\pm$ 4                   | 18 $\pm$ 3                | 68 $\pm$ 13              |
| c) ANG II / Propra ISO + IBMX   | 5                   | 48 $\pm$ 4                   | 24 $\pm$ 4                | 52 $\pm$ 5                   | 0                         | 0                        |
| d) ANG II / ISO + IBMX          | 4                   | 50 $\pm$ 8                   | 22 $\pm$ 3                | 51 $\pm$ 8                   | 15 $\pm$ 4                | 70 $\pm$ 18              |

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  lag in dieser Versuchsreihe, alle Experimente zusammengenommen (n = 23) bei 45  $\pm$  2 nM. Die ANG II-Kontrollstimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  um 26  $\pm$  2 nM hervor (alle Experimente zusammengefasst).

Isoprenalin erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  über Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren (Tab. 3.4). Wurden die  $\beta$ -Adrenozeptoren mit Propranolol in der Konzentration 1  $\mu$ M blockiert, bewirkte Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) keine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung (c, n = 5, basales  $[Ca^{2+}]_i$  48  $\pm$  4 nM) mehr. Demgegenüber hatte die Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren mit Prazosin in der Konzentration von 100 nM keinen Einfluss auf die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Isoprenalin (a, n = 8, basales  $[Ca^{2+}]_i$  40  $\pm$  3 nM; in einem Fall kam es jedoch nicht zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , was aber wahrscheinlich die natürliche Ausfallquote der Isoprenalin + IBMX-Antwort war; Abb. 3.4a). Auch die Größe der  $Ca^{2+}$ -Erhöhung wies keinen Unterschied auf (t-Test: p > 0,05; Abb. 3.4b).

Bei den durchgeführten Kontrollen mit Isoprenalin ohne  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Rezeptorantagonist erfolgte regelmäßig eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Tab. 3.4).

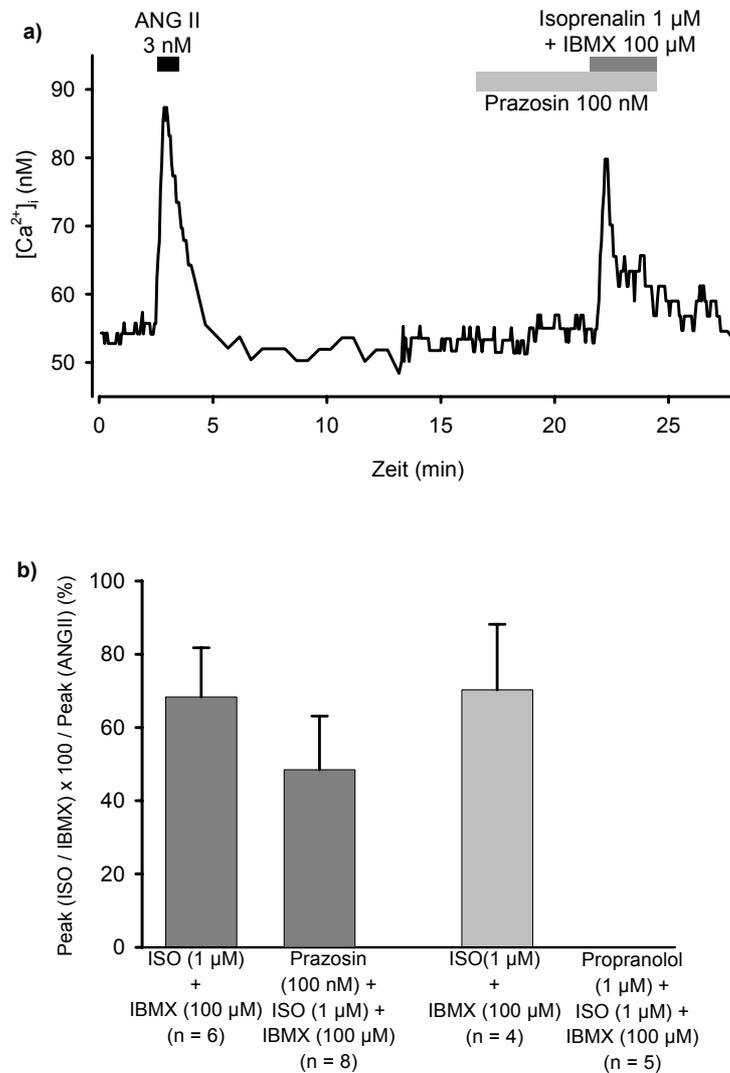


Abb. 3.4 Einfluss von Isoprenalin auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren

a) Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) (ISO) + IBMX (100  $\mu$ M) nach Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren mit Prazosin (100 nM).

b) Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO + IBMX mit / ohne Vorbehandlung mit Propranolol / Prazosin in % bezogen auf den ANG II (3 nM) Standardpeak.

Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) wurde nicht signifikant beeinflusst durch Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren mit Prazosin (100 nM) (n = 8, p > 0.05), jedoch völlig verhindert durch Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren mit Propranolol (1  $\mu$ M) (n = 5).

### 3.2.1.3 Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch das membranpermeable cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP

Da  $[Ca^{2+}]_i$  in den afferenten Arteriole der Rattenniere im vorliegenden Präparat durch Substanzen erhöht wurde, die bekanntermaßen cAMP erhöhen, sollte untersucht werden, ob auch Dibutyryl-cAMP, ein membrangängiges cAMP-Analogon,  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht. Verwendet wurde db-cAMP in einer Konzentration von 100  $\mu$ M, 1 mM, sowie 1 mM in Kombination mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX (100  $\mu$ M). Zum Vergleich der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch db-cAMP und Isoprenalin + IBMX wurde in den meisten Experimenten zunächst Isoprenalin + IBMX für zwei Minuten verabreicht, bevor dann nach Waschen für zwei Minuten mit db-cAMP entweder alleine oder in Kombination mit IBMX perfundiert wurde (Abb. 3.5a). Zeitkontrollen wurden durchgeführt, bei denen nur die erste Isoprenalin + IBMX-Gabe erfolgte und dann nur noch mit Pufferlösung über die gesamte Zeit superfundiert wurde.

Tab. 3.5 Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch membrangängiges cAMP (db-cAMP)

| Stimulation   | Versuchsanzahl n      | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%)  |
|---|-----------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| a) db-cAMP 100 $\mu$ M  | alle: 2<br>resp.: 1   | 78 $\pm$ 18<br>60            | 4 $\pm$ 4<br>8            |                              |                           |                           |
| b) db-cAMP 1 mM   | alle: 1<br>resp.: 1   | 91                           | 29                        |                              |                           |                           |
| c) 1) ISO 100 nM +<br>IBMX 100 $\mu$ M<br>2) db-cAMP 1 mM                       | alle: 3<br>resp.: 3   | 88 $\pm$ 19                  | 23 $\pm$ 0,3              | 67 $\pm$ 10                  | 11 $\pm$ 1                | 50 $\pm$ 4                |
| d) 1) ISO 100 nM +<br>IBMX 100 $\mu$ M<br>2) db-cAMP 1 mM +<br>IBMX 100 $\mu$ M | alle: 11<br>resp.: 10 | 56 $\pm$ 7<br>56 $\pm$ 7     | 21 $\pm$ 5<br>22 $\pm$ 6  | 58 $\pm$ 8<br>57 $\pm$ 9     | 16 $\pm$ 4<br>17 $\pm$ 4  | 72 $\pm$ 10<br>79 $\pm$ 8 |
| e) 1) ISO 100 nM +<br>IBMX 100 $\mu$ M<br>2) ISO 100 nM +<br>IBMX 100 $\mu$ M   | alle: 5<br>resp.: 5   | 55 $\pm$ 5                   | 19 $\pm$ 7                | 58 $\pm$ 6                   | 19 $\pm$ 8                | 102 $\pm$ 11              |

In dieser Experimentreihe lag die basale  $[Ca^{2+}]_i$  in den Gefäßen, alle Experimente zusammengefasst (n = 22), bei 61  $\pm$  4 nM. Zur Kontrolle wurde hier vorab mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) superfundiert, um nur Gefäße zu messen, die auf cAMP-Erhöhung mit

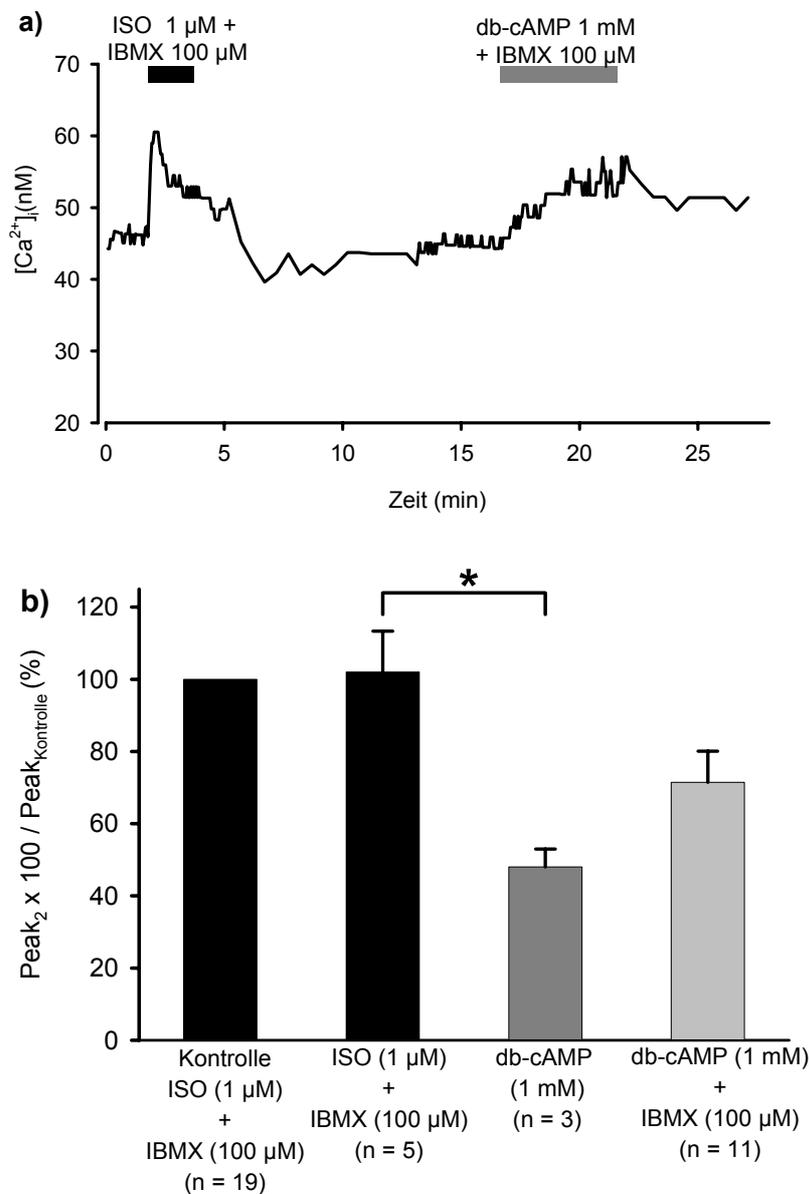


Abb. 3.5 Änderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) durch db-cAMP (1 mM) + IBMX (100  $\mu$ M) nach primärer Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) (n = 11, Antworthäufigkeit 91 %).

a)  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch db-cAMP + IBMX erfolgte langsamer als die durch Isoprenalin + IBMX hervorgerufene  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung, die sofort nach Stimulation erfolgte.

b) Eine zweite Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) (ISO) + IBMX (100  $\mu$ M) ließ sich immer auslösen (n = 5) und lag in der gleichen Größenordnung wie die erste ISO + IBMX-Stimulation (102 ± 11 %).

Die durch db-cAMP ausgelöste  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung war signifikant ( $p < 0,05$ ) geringer als eine durch zweite Stimulation mit ISO + IBMX ausgelöste  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung (n = 3; 50 ± 4 %). In Kombination mit IBMX löste db-cAMP eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  aus, die bei 72 ± 10 % bezogen auf die primäre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch ISO + IBMX lag (n = 11;  $p > 0,05$ ).

einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg antworteten; die durch db-cAMP ausgelöste  $[Ca^{2+}]_i$ -Steigerung wurde auf den Isoprenalin + IBMX-Peak bezogen.

Eine erste Isoprenalin + IBMX-Stimulation rief eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort hervor, die, alle Experimente zusammen gefasst ( $n = 19$ ), bei  $18 \pm 3$  nM lag. Bei einer basalen  $[Ca^{2+}]_i$  von  $55 \pm 5$  nM und einer ersten Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX von  $19 \pm 7$  nM steigerte eine zweite Isoprenalin + IBMX-Gabe  $[Ca^{2+}]_i$  um  $19 \pm 8$  nM, was, bezogen auf die erste  $Ca^{2+}$ -Steigerung,  $102 \pm 11$  % entspricht (Tab. 3.5e). Aus diesen Experimenten ging hervor, dass eine zweite cAMP-Steigerung durch Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren in Kombination mit IBMX ebenfalls eine zweite  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zur Folge hatte.

Auch membrangängiges cAMP (db-cAMP) erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.5a). Db-cAMP (100  $\mu$ M) wirkte schwach (Tab.3.5a;  $n = 2$ , 1 non-responder, Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  um 8 nM). In der db-cAMP-Konzentration von 1 mM, sowohl ohne den Zusatz von IBMX (Tab. 3.5b, c) als auch unter Zusatz des Phosphodiesterasehemmers IBMX (100  $\mu$ M; Tab. 3.5d) war die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  jedoch deutlich.

Die  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch db-cAMP (1 mM) betrug ohne Zusatz von IBMX im Durchschnitt  $11 \pm 1$  nM (Tab.3.5c,  $n = 3$ ). Bezogen auf die Erhöhung durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) sind das  $50 \pm 4$  %. Der  $Ca^{2+}$ -Anstieg durch db-cAMP (1 mM) + IBMX (100  $\mu$ M) betrug im Durchschnitt  $16 \pm 4$  nM (Tab. 3.5d,  $n = 11$ ), was bezogen auf die Erhöhung durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M)  $72 \pm 10$  % entspricht. Die Kombination aus db-cAMP + IBMX erhöhte hier demzufolge  $[Ca^{2+}]_i$  effektiver als db-cAMP alleine (Abb. 3.5b).

Die Zeitkontrollen zeigten, dass es über die Zeit nicht zu einem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration kam ( $n = 5$ ), so dass der gezeigte Effekt auf db-cAMP + IBMX zurückzuführen ist.

### **3.2.2 Evidenz, dass der $[Ca^{2+}]_i$ erhöhende Effekt von cAMP auf die afferente Arteriole mit reninsezernierenden Zellen beschränkt ist**

#### *3.2.2.1 Vergleich der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin in afferenten Arteriolen von NaCl-arm und NaCl-reich ernährten Ratten*

Es wurde hier der Frage nachgegangen, ob die Ursache für die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX, also Substanzen, die den cAMP-Spiegel in der Zelle erhöhen, in den reninsezernierenden Zellen zu suchen ist. Dazu wurden Gefäße aus NaCl-arm ernährten Ratten, bei denen das RAAS stark stimuliert ist, mit Gefäßen aus NaCl-reich ernährten

Ratten, bei denen das Reninsystem herunter reguliert ist, in ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin + IBMX verglichen. Dazu erhielten die Tiere für mindestens 14 Tage eine NaCl-reiche Diät (4 % NaCl über das Futter) und wurden im Wechsel mit gleichaltrigen Ratten (gleiche Lieferung), die eine kochsalzarme Diät erhalten hatten, untersucht. Es wurden möglichst lange Gefäße vermessen, bei denen auch ein Unterschied zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort weiter proximal und weiter distal gemacht wurde.

Die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde hier auch auf die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bezogen (Peakhöhe [%<sub>Ruhe</sub>]). Gearbeitet wurde in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS).

Verwendet wurde wieder ein Doppelstimulationsprotokoll, bei dem zu Minute 1 - 2 ANG II (3 nM) Stimulation erfolgte, nach Auswaschphase zu Minute 15 - 18 mit Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) perfundiert wurde.

Die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  war in Gefäßen aus NaCl-arm-ernährten Ratten nicht signifikant verschieden von der in Gefäßen aus NaCl-reich ernährten Ratten ( $p > 0,05$ ). Es war kein Unterschied in der basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zwischen proximalen und distalen Gefäßteilen vorhanden. Sie lag in allen Ansätzen zwischen 50 und 60 nM.

Tab. 3.6 Vergleich der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) (ISO) + IBMX (100  $\mu$ M) zwischen NaCl-reich und NaCl-arm ernährten Ratten, sowie Vergleich der proximalen und distalen  $Ca^{2+}$ -Antwort

|                                 | n  | basales $[Ca^{2+}]_i$ , 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak ANG II (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak ANG II (% Ruhe1) | basales $[Ca^{2+}]_i$ , 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak ISO+ IBMX (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak ISO+ IBMX (% Ruhe2) | $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (% $_{ANG}$ ) |
|---------------------------------|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| NaCl-reich distal alle respond. | 23 | 55 $\pm$ 3                     | 28 $\pm$ 2                     | 52 $\pm$ 4                          | 55 $\pm$ 3                     | 11 $\pm$ 2                        | 19 $\pm$ 3                             | 41 $\pm$ 6                        |
|                                 | 16 | 54 $\pm$ 3                     | 26 $\pm$ 2                     | 48 $\pm$ 5                          | 55 $\pm$ 3                     | 15 $\pm$ 1                        | 27 $\pm$ 2                             | 58 $\pm$ 7                        |
| NaCl-reich prox. alle respond.  | 20 | 54 $\pm$ 5                     | 23 $\pm$ 3                     | 47 $\pm$ 6                          | 56 $\pm$ 5                     | 9 $\pm$ 2                         | 16 $\pm$ 3                             | 38 $\pm$ 9                        |
|                                 | 13 | 55 $\pm$ 6                     | 22 $\pm$ 3                     | 44 $\pm$ 8                          | 57 $\pm$ 6                     | 11 $\pm$ 2                        | 21 $\pm$ 4                             | 58 $\pm$ 10                       |
| NaCl-arm dist alle respond.     | 26 | 59 $\pm$ 3                     | 35 $\pm$ 3                     | 59 $\pm$ 4                          | 62 $\pm$ 3                     | 14 $\pm$ 2                        | 24 $\pm$ 2                             | 43 $\pm$ 5                        |
|                                 | 23 | 58 $\pm$ 3                     | 37 $\pm$ 3                     | 63 $\pm$ 4                          | 61 $\pm$ 4                     | 16 $\pm$ 1                        | 27 $\pm$ 2                             | 48 $\pm$ 5                        |
| NaCl-arm prox alle respond.     | 17 | 52 $\pm$ 5                     | 33 $\pm$ 3                     | 69 $\pm$ 8                          | 58 $\pm$ 7                     | 18 $\pm$ 3                        | 31 $\pm$ 5                             | 57 $\pm$ 8                        |
|                                 | 15 | 55 $\pm$ 5                     | 35 $\pm$ 4                     | 64 $\pm$ 6                          | 61 $\pm$ 7                     | 21 $\pm$ 3                        | 35 $\pm$ 5                             | 64 $\pm$ 8                        |

### $Ca^{2+}$ -Peaks

Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die eine Stimulation mit ANG II (3 nM) (Standard-Kontrollpeak) auslöste, war bei den NaCl-reich ernährten Ratten signifikant geringer gegenüber der Erhöhung in NaCl-arm ernährten Ratten, wenn die Werte in nM zugrunde gelegt wurden.

NaCl-reich distal alle Experimente (n = 23) 28  $\pm$  2 nM

NaCl-arm distal alle Experimente (n = 26) 35  $\pm$  3 nM

$p < 0,05$  (t-Test) /  $p < 0,05$  (nicht-parametrisch)

Wurde die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  verglichen, die ANG II auslöst, in Prozent des Ruhe- $Ca^{2+}$ -Wertes, so war kein Unterschied mehr vorhanden.

NaCl-reich distal alle Experimente (n = 23) 52  $\pm$  4 %

NaCl-arm distal alle Experimente (n = 26) 59  $\pm$  4 %

$p > 0,05$  (t-Test) /  $p > 0,05$  (nicht-parametrisch)

Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die eine Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) auslöste, war zwischen Gefäßen NaCl-reich und NaCl-arm ernährter Ratten nicht signifikant verschieden, weder bei Einbeziehung aller Experimente (NaCl-arm:  $14 \pm 2$  nM; NaCl-reich:  $11 \pm 2$  nM;  $p > 0,05$ ) noch bei Einbeziehung nur der Responder (NaCl-arm:  $16 \pm 1$  nM; NaCl-reich:  $15 \pm 1$  nM;  $p \geq 0,05$ ). Wurde die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX bezogen auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (Peak ISO x 100 / Peak ANG II), und wurden dann diese Prozentwerte zwischen den NaCl-armen und NaCl-reichen Ratten im distalen Bereich verglichen, so war weder bei Einbeziehung aller Werte ( $p > 0,05$ ) noch bei Einbeziehung nur der Responder ( $p > 0,05$ ) ein signifikanter Unterschied feststellbar (Abb. 3.6a und b). Auch im proximalen Bereich ist kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p > 0,05$ ).

### **Antworthäufigkeit**

Auf Isoprenalin + IBMX haben 23 von 26 **distal** vermessenen Gefäßen NaCl-arm ernährter Ratten mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  reagiert (88 %), **proximal** haben 15 von 17 Gefäßen reagiert (88 %).

Bei den Gefäßen NaCl-reich ernährter Ratten haben 16 von 23 Gefäßen mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  reagiert (70 %) bzw. 13 von 20 Gefäßen (65 %) (Abb. 3.6c).

Zur statistischen Auswertung wurde der Chi-Quadrat-Test herangezogen. Dieser ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied der Antwortfrequenzen zwischen Gefäßen NaCl-arm ernährter Ratten gegenüber NaCl-reich ernährten Ratten ( $p > 0,05$ ).

Bei den Gefäßen NaCl-reich ernährter Ratten wurde bei 3 von 20 Gefäßen distal ein Antwort auf Isoprenalin + IBMX gemessen, die nicht mehr im proximalen Teil messbar war. In einem Gefäß schien die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im proximalen Teil sogar wieder abzusinken. Bei den Gefäßen NaCl-arm ernährter Ratten war bei einem von 17 distal eine Antwort messbar, die proximal nicht auftrat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass, obwohl keine signifikanten Unterschiede erkennbar sind, eine Tendenz in die Richtung zu erkennen ist, dass Gefäße NaCl-arm ernährter Ratten häufiger auf cAMP-Stimulation mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  reagieren.

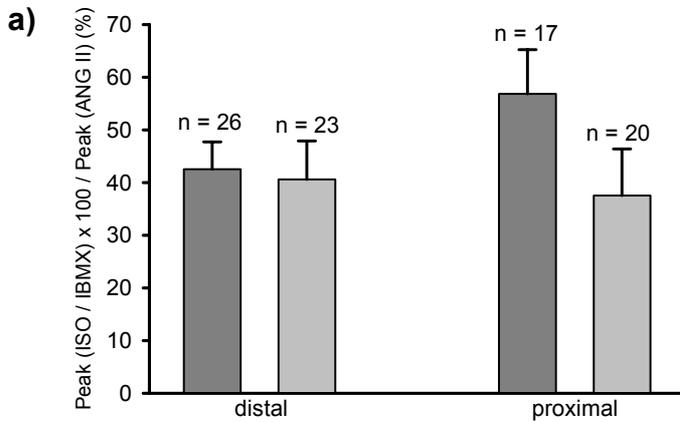


Abb. 3.6 Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX in Abhängigkeit von der Kochsalzdiät

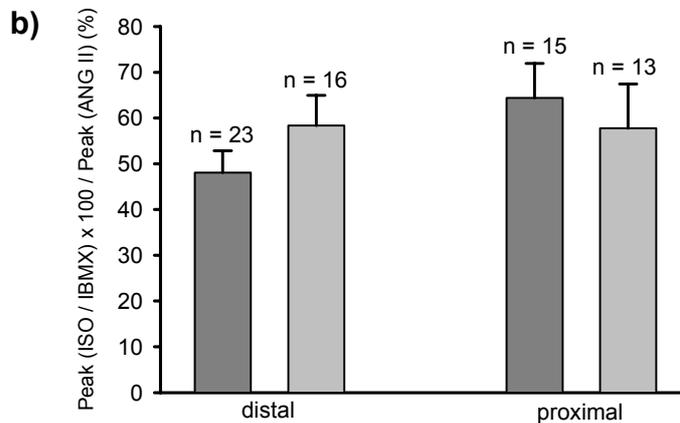
Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) in NaCl-arm ernährten Ratten

(dunkelgrau) gegen NaCl-reich ernährte Ratten (hellgrau) distal am Eintritt in das Glomerulum

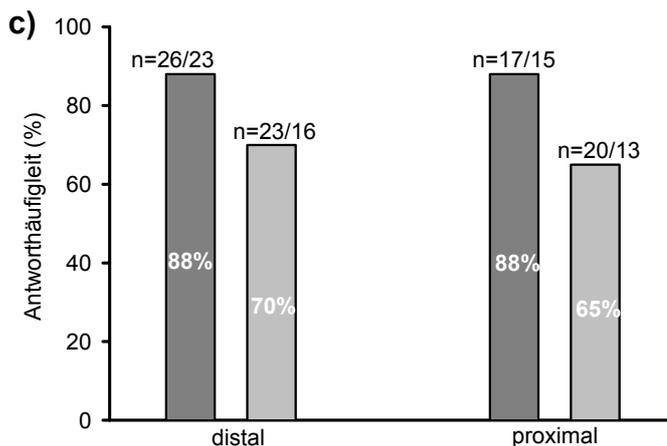
und weiter proximal.

Dargestellt ist die Antwortgröße bezogen auf eine primäre ANG II (3 nM) Standardstimulation

a) bezogen auf alle Experimente



b) bezogen auf die Responder.



c) Antwortfrequenz der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$

Zwischen den NaCl-arm und NaCl-reich ernährten Tieren war bezüglich der Antworthäufigkeit kein signifikanter Unterschied nachweisbar

(Chi-Quadrat-Test,  $p > 0.05$ ).

### 3.2.2.2 Einfluss von Isoprenalin auf $[Ca^{2+}]_i$ in afferenten Arteriolen oder größeren Arterien der Rattenniere

Die bisher beschriebenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Tatsache, dass in glatten Muskelzellen cAMP-Erhöhung zu einer Senkung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Aktivierung der SERCA führt, auf jeden Fall nicht zu einem Anstieg. Reninsezernierende Zellen stellen umgewandelte glatte Muskelzellen dar, so dass jetzt untersucht werden sollte, ob andere, weiter proximal liegende Gefäßteile, die nur aus glatten Muskelzellen bestehen, auch auf cAMP-Steigerung mit Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  antworten. Zur Messung wurden nur Gefäßteile herangezogen, die lang waren, starke Wände hatten und Blutreste erkennen liessen (i.e. kleine Arterien proximal der afferenten Arterie). Es wurden auch Gefäße vermessen, die verzweigt waren und deren Verzweigung aufgrund der geringeren Wandstärke als zum Glomerulum hinlaufende afferente Arteriolen identifiziert wurden (Abb. 3.7a).

Die Präparation wurde durchgeführt und Gefäßteile wie in Kap. 2.2.2 beschrieben isoliert. Gearbeitet wurde in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na - HEPES-PS) und es wurde das übliche Doppelstimulationsprotokoll verwendet, bei dem zunächst (Minute 1 - 2) mit ANG II (3nM) zur Kontrolle stimuliert wurde. Es wurden nur Gefäße weiter vermessen, die auf diesen Kontrollpuls mit einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung antworteten; es gab auch Gefäßfragmente, die keine Reaktion mehr auf ANG II zeigten. Nach einer Auswaschphase (13 Minuten) wurde Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) für drei Minuten gegeben.

An 10 verschiedenen Ratten, die alle kochsalzarme Diät erhalten hatten, wurden 16 Gefäßteile untersucht, die wenn möglich (n = 11) auch in unterschiedlichen Regionen vermessen wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die weiter proximal liegenden Gefäße auf cAMP-Erhöhung nicht mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  antworten, sondern zum Teil sogar mit der erwarteten Absenkung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.7c,d).

Auch gibt es einen Unterschied zwischen den verschiedenen vermessenen Gefäßregionen eines Gefäßfragmentes. Bereiche, die aufgrund ihrer Dicke, sich verjüngenden Form oder durch Abzweigung wahrscheinlich Teil einer afferenten Arteriole darstellten, reagierten mit einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung (Abb. 3.7b), weiter proximal liegende Teile jedoch nicht. Die in Abb. 3.7 dargestellte Beobachtung, dass weiter distal gelegene Regionen mit Erniedrigung und Regionen der afferenten Arteriole mit Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  reagieren, konnte an zwei der 16 vermessenen Gefäßfragmente gemacht werden.

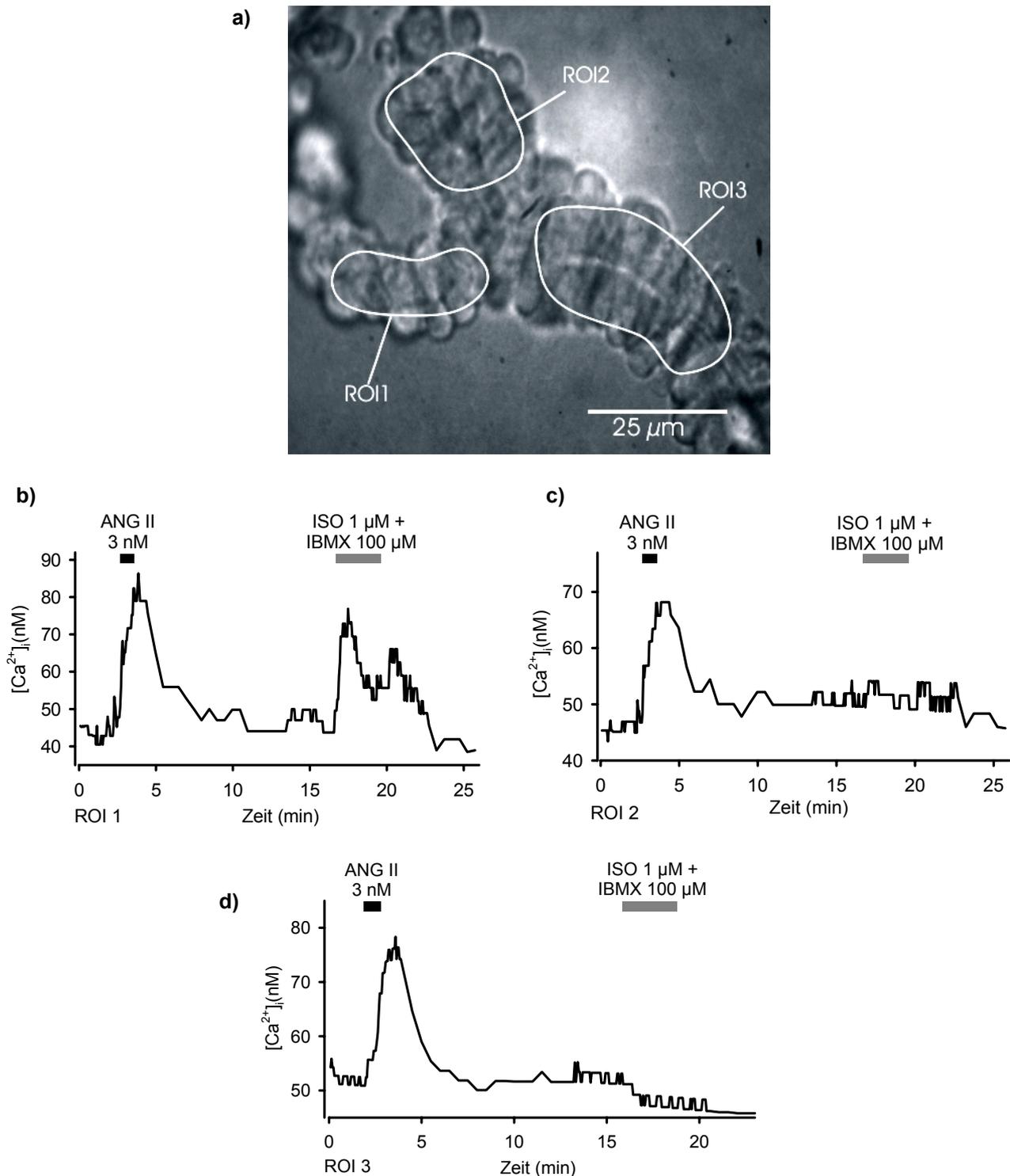


Abb. 3.7 a) Foto eines Gefäßfragmentes mit Verzweigung. Es wurde in jedem Verzweigungsteil die Antwort auf  $[Ca^{2+}]_i$  einzeln in den als ROI gekennzeichneten Bereichen untersucht.

Im Verzweigungsteil mit geringerer Wandstärke, der wahrscheinlich eine afferente Arteriole ist, bewirkte Isoprenalin ( $1 \mu M$ ) + IBMX ( $100 \mu M$ ) eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (b, ROI 1), in dem dickeren Gefäßteil jedoch nicht mehr (c, ROI 2).

(d) In diesem Gefäßteil (ROI 3) erfolgte nach primärer  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch ANG II ( $3 nM$ ) keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  mehr durch Isoprenalin ( $1 \mu M$ ) + IBMX ( $100 \mu M$ ), sondern eine ganz leichten Absenkung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.2.3 Mechanistische Untersuchungen zur Signaltransduktion I: Proteinkinase A und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

#### 3.2.3.1 Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach PKA-Hemmung

In den meisten Fällen vermittelt cAMP seine intrazellulären Wirkungen über die Proteinkinase A (PKA). Zur Untersuchung, ob der durch cAMP-Erhöhung ausgelöste Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ebenfalls über die PKA hervorgerufen wird, wurde die PKA mit H89 blockiert, einem selektiven und potenten Inhibitor cAMP-abhängiger Kinasen. H89 hemmt PKA kompetitiv gegen ATP, der K<sub>i</sub>-Wert liegt bei 48 ± 8 nM (Chijiwa et al., 1990).

Nach primärer Stimulation mit Isoprenalin (1 μM) + IBMX (100 μM) und anschließender Auswaschphase wurde mit H89 (10 μM) für 5 Minuten superfundiert. Im Anschluss wurde dieser Lösung für 3 Minuten Isoprenalin + IBMX zugesetzt (Abb. 3.8). Zeitkontrollen wurden durchgeführt, bei denen nach primärer Isoprenalin + IBMX-Gabe und Auswaschphase für den Rest der Zeit mit H89 (10 μM) superfundiert wurde.

Tab. 3.7 Isoprenalin (1 μM) (ISO) + IBMX (100 μM) / H89 / Isoprenalin (1 μM) (ISO) + IBMX (100 μM)

| Stimulation                   | basales [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 1 (nM) | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 1 (nM) | basales [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 2 (nM) | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 2 (nM) | Anstieg von [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> über die Zeit (nM) | Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (%) |
|-------------------------------|---|--|---|--|---|--|
| ISO + IBMX / H89 / ISO + IBMX | 47 ± 3  | 13 ± 1                                       | 49 ± 2  | 10 ± 2                                       | 20 ± 5  | 82 ± 11                                |

n = 6

Die basale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in dieser Experimentreihe betrug 47 ± 3 nM. Auch nach Hemmung der PKA mit H89 ließ sich eine Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regelmäßig auslösen (Abb. 3.8; Tab. 3.7). H89 bewirkte hier einen Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, wie auch in Zeitkontrollen gezeigt wurde. In den Zeitkontrollen kam es bei einer basalen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von 54 ± 5 nM (n = 3) durch H89 über eine Zeit von 10 Minuten zu einem Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von 14 ± 1 nM. Trotzdem konnte eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung durch Isoprenalin + IBMX erzielt werden. Um den Effekt zu quantifizieren, wurde die ansteigende Basislinie entlang des Anstiegs durch H89 extrapoliert und die Höhe des Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs bestimmt (vgl. Abb. 3.8). Der so für die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ermittelte Wert war mit 10 ± 2 nM etwas geringer als die primäre Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch

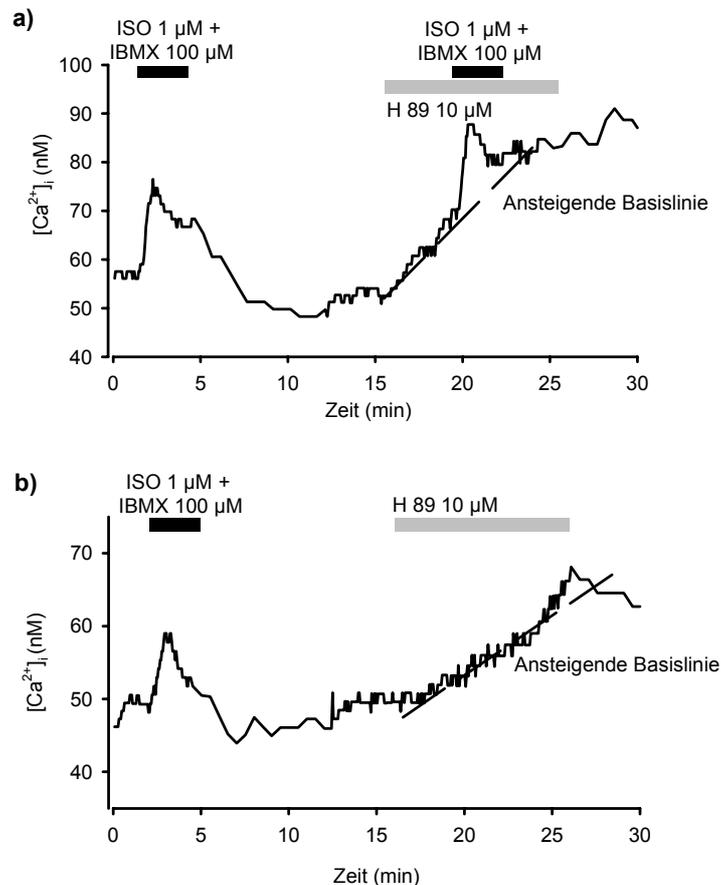


Abb. 3.8 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (ISO) + IBMX nach Gabe des PKA-Inhibitors H89. ISO + IBMX bewirkten auch weiterhin einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  (a;  $n = 6$ ), der in der gleichen Größenordnung lag wie die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch eine zweite unbehandelte ISO + IBMX Stimulation. Die Fläche des Peaks war jedoch stark verkleinert (vgl. Text). Zeitkontrollen zeigten, dass H89 über die Zeit einen gleichmäßigen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkte (b;  $n = 3$ ).

Isoprenalin + IBMX ( $13 \pm 1$  nM), was  $82 \pm 11$  % entspricht. In Kontrollen, in denen zweimal hintereinander Isoprenalin + IBMX gegeben wurde, betrug die Höhe des zweiten Peaks bezogen auf den ersten  $82 \pm 9$  %. Es gab demzufolge keinen Unterschied in der Höhe der  $Ca^{2+}$ -Antwort nach Vorbehandlung mit H89.

Die AUC-Bestimmung war aufgrund der ansteigenden Basislinie sehr schwierig, da die Extrapolation der Basislinie trotz der Zeitkontrollen mit H98 mit einer großen Willkür behaftet ist. Dennoch ist die AUC der  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Isoprenalin + IBMX-Stimulation nach Hemmung der PKA deutlich kleiner als nach einer zweiten Kontrollstimulation ohne PKA-Inhibition. Da der Effekt in Gegenwart von H89 bei einer deutlich erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration auftrat und dadurch der Zustand der Zelle verändert ist, ist eine

quantitative Diskussion schwierig. Die Messungen zeigen aber, dass auch in Gegenwart von H89 der Effekt von Isoprenalin + IBMX immer auftrat und der PKA-Inhibitor auch in der hier verwendeten sehr hohen Konzentration ihn nicht verhindern konnte. Man kann daher schließen, dass die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch cAMP-Stimulation nicht ausschließlich durch die PKA vermittelt wird. Durch die Eigenwirkung von H89 auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration sind die Experimente jedoch nicht eindeutig und daher sollte dieser zentrale Punkt noch durch weitere Experimente mit einem anderen Kinase A Inhibitor, etwa einem membran-gängigen Rp-cAMPs-Derivat, weiter erhärtet werden.

### *3.2.3.2 Einfluss des $Na^+$ - $K^+$ -ATPase-Blockers Ouabain auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin*

Die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase transportiert  $Na^+$  gegen das Konzentrationsgefälle aus der Zelle heraus,  $K^+$  in die Zelle hinein. Dies findet im Verhältnis 3  $Na^+$  gegen 2  $K^+$  statt, ist damit elektrogen und trägt zum negativen Membranpotential bei. In vielen Organen, u.a. auch im glatten Muskel, erhöht Phosphorylierung der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase durch PKA die Aktivität des Enzyms. Stimulation der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase durch Phosphorylierung würde dann die Zelle hyperpolarisieren und somit die Triebkraft für den  $Ca^{2+}$ -Eintritt in die Zelle erhöhen. Wenn diese Hypothese zutrifft, müsste Ouabain als  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase-Blocker einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  infolge von  $\beta$ -Stimulation mittels Isoprenalin und anschließender Erhöhung von cAMP verhindern. Nach den Versuchen mit dem PKA Inhibitor H89 konnte eine Mitbeteiligung der PKA am cAMP-Effekt nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Ouabain wurde in der bei Experimenten an Gefäßen der (für Ouabain unempfindlichen) Ratte (Repke et al., 1965 zitiert in Bahrmann and Greeff, 1981) üblichen Konzentration von 1 mM eingesetzt und 10 min vor Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) gegeben. Es wurde wieder das Doppelstimulationsprotokoll mit einer vorangehenden ANG II-Kontrollstimulation verwendet.

Tab. 3.8 Einfluss von Ouabain (1 mM) auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) (ISO) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ )

| Stimulation                | Versuchsanzahl n        | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ (%) |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| ANG II / OUA<br>ISO + IBMX | alle: 17<br>respond: 5  | 49 $\pm$ 4<br>43 $\pm$ 7            | 30 $\pm$ 3<br>30 $\pm$ 5         | 48 $\pm$ 4<br>42 $\pm$ 7            | 3 $\pm$ 1*<br>11 $\pm$ 3         | 13 $\pm$ 7*<br>44 $\pm$ 16      |
| ANG II /<br>ISO + IBMX     | alle: 13<br>respond: 10 | 51 $\pm$ 4<br>49 $\pm$ 5            | 36 $\pm$ 4<br>33 $\pm$ 2         | 53 $\pm$ 3<br>50 $\pm$ 4            | 10 $\pm$ 3*<br>14 $\pm$ 3        | 32 $\pm$ 8*<br>42 $\pm$ 8       |

Die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lag in dieser Versuchsreihe, alle Experimente zusammen genommen ( $n = 30$ ), bei  $50 \pm 3$  nM. Eine Kontroll-ANG II-Stimulation bewirkte eine Steigerung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $33 \pm 2$  nM.

Ouabain (1 mM) alleine hatte keinen Einfluss auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wenn es 10 min lang gegeben wurde ( $n = 18$ ). Es verringerte deutlich die Antworthäufigkeit (Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) auf Isoprenalin + IBMX ( $n = 17$ , 5 responder; 29 % Responderquote; Kontrollen:  $n = 13$ , 10 responder; 77 % Responderquote) (Abb. 3.9; Tab. 3.8). Dieser Unterschied in der Antworthäufigkeit war hochsignifikant ( $p = 0,01$ , Chiquadrat-Test). Wenn jedoch eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ausgelöst wurde, lag sie mit  $11 \pm 3$  nM in der gleichen Größenordnung wie durch Isoprenalin + IBMX ohne Ouabain-Vorbehandlung ( $14 \pm 3$  nM).

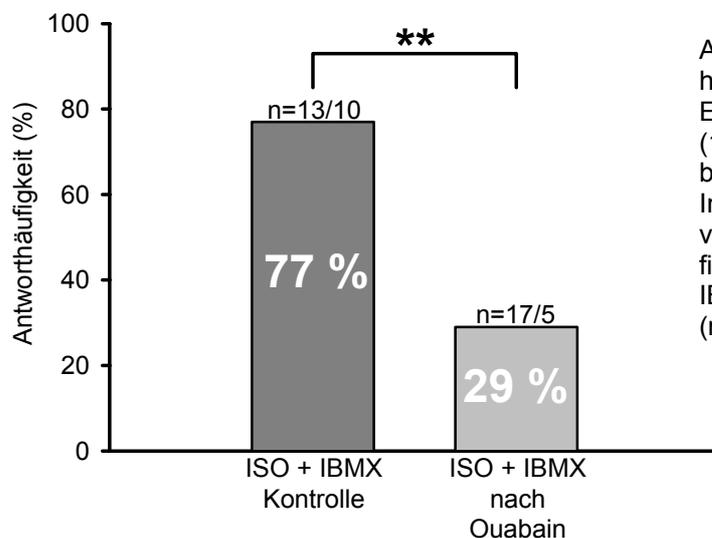


Abb. 3.9 Antworthäufigkeit der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) nach Vorbehandlung mit dem  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Inhibitor Ouabain (1 mM). Ouabain verhinderte signifikant die Antworthäufigkeit auf Stimulation mit Isoprenalin + IBMX ( $p < 0,01$ ). ( $n = \text{alle} / \text{Responder}$ )

Die Experimente zeigen, dass Ouabain die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) verhindern kann, d.h. eine aktive  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist wichtig für das Auftreten des Effektes. Andererseits ist zu bedenken, dass eine Blockade der ATPase die Zelle depolarisiert und damit die Triebkraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt in die Zelle schwächt.

### 3.2.3.3 Änderung des Membranpotentials durch Isoprenalin + IBMX, Ouabain und ANG II

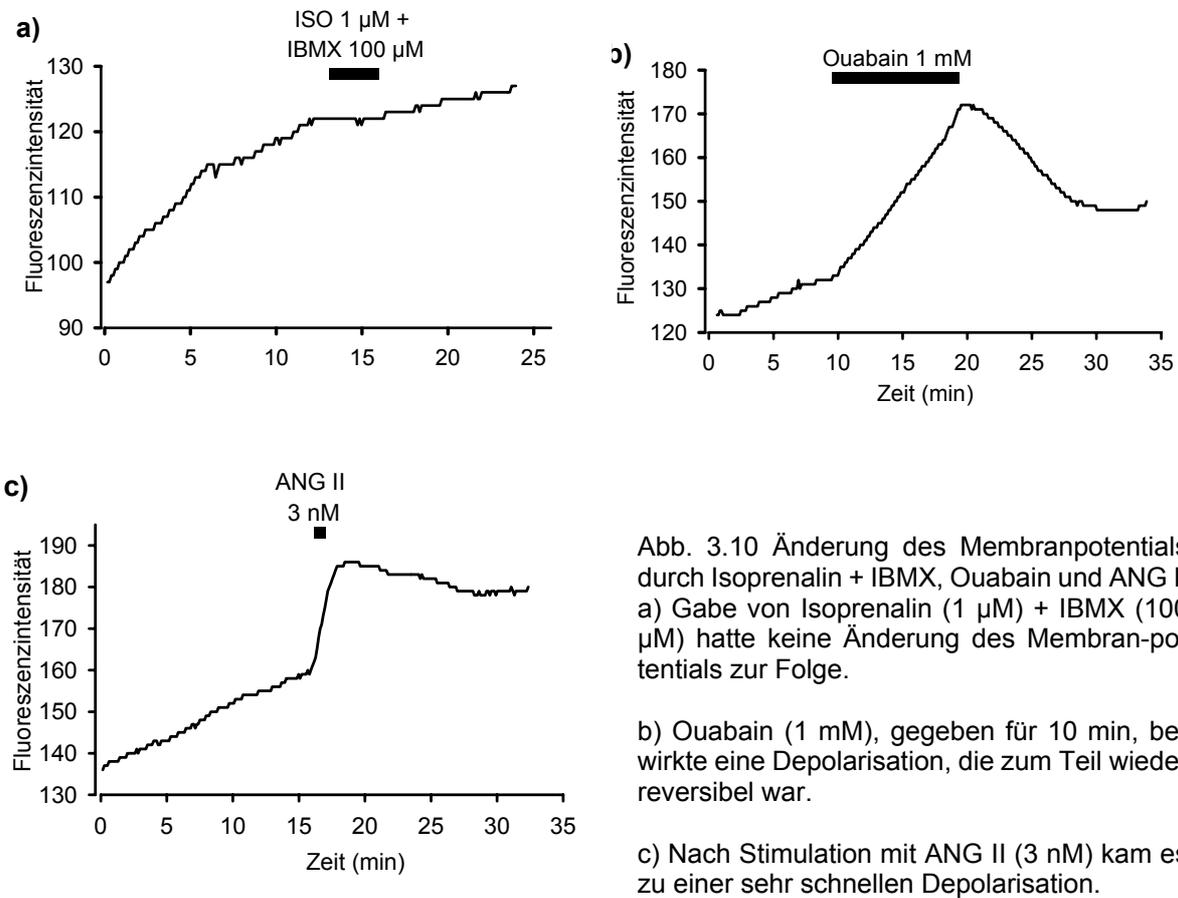
Die Ergebnisse mit dem  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Blocker Ouabain (Kap. 3.2.3.2) scheinen die Hypothese zu unterstützen, nach der cAMP (durch Phosphorylierung) die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aktiviert, was zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen und die elektrische Triebkraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt in die Zelle erhöhen sollte.

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3), der zur Messung des Membranpotential geeignet ist (Kap. 2.2.3.5), sollte in folgenden Versuchen untersucht werden, ob Isoprenalin + IBMX tatsächlich eine Hyperpolarisation der Zelle bewirkt. Ferner sollte untersucht werden, ob sich mit dieser Methode die depolarisierenden Effekte von Ouabain und ANG II sowie einer Erhöhung von  $[\text{K}^+]_o$  nachweisen lassen.

Vorversuche zeigten, dass mit DiBAC<sub>4</sub>(3) ein Doppelstimulationsprotokoll nur schwer möglich war und die Fluoreszenz über die Zeit anstieg (Abb. 3.10). Daher wurde in dieser Experimentreihe nur eine einzelne Stimulation untersucht. Zunächst wurde jeweils eine individuelle Vorlaufzeit gewählt, bis die Fluoreszenz bzw. das Membranpotential einen stabilen Wert erreichte. Diese Zeit, in der nur mit Na-HEPES-PS superfundiert wurde, lag zwischen 5 und 15 Minuten. Anschließend wurde für 3 Minuten mit Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX

( $100 \mu\text{M}$ ) superfundiert (Abb. 3.10a). Kontrollversuche wurden durchgeführt mit Ouabain ( $1 \text{mM}$  für 10 min; Abb. 3.10b), ANG II ( $3 \text{nM}$  für 1 min; Abb. 3.10c) und mit  $\text{K}^+$  ( $10$  und  $100 \text{mM}$ , 5 min). Diese Stimuli sollten die Zelle depolarisieren und so zum Fluoreszenzanstieg führen.

Da die Fluoreszenz über die Zeit immer weiter anstieg (Abb. 3.10), war eine Quantifizierung der Pulse nicht möglich, so dass auch eine Kalibrierung nicht durchgeführt wurde.



Tab. 3.9 Änderung des Membranpotentials

| Stimulus   | Versuchszahl | $\Delta$ Fluoreszenzintensität (relative Einheit) |
|--|--------------|---|
| ISO 1 $\mu\text{M}$ + IBMX 100 $\mu\text{M}$ 3 min | 10           | 0   |
| Ouabain 1 mM 10 min                                | 6            | $29 \pm 5$  |
| ANG II 3 nM 1 min                                  | 13           | $13 \pm 2$  |
| K <sup>+</sup> 10 mM                               | 4            | $18 \pm 3$  |
| K <sup>+</sup> 100 mM                              | 3            | $44 \pm 3$  |

Nach diesen Ergebnissen kann die qualitative Aussage getroffen werden, dass mit dieser Methode die Kombination aus Isoprenalin + IBMX keine Änderung des Membranpotentials der Zellen bewirkte; insbesondere war die erwartete Hyperpolarisation nicht nachweisbar. Klar ersichtlich war jedoch die Depolarisation durch die anderen Stimuli. Ouabain führte zu

einer fortschreitenden Depolarisation, solange sich die Substanz im Bad befand und nach Entfernen reversibel war (Abb. 3.10b). ANG II (3 nM) bewirkte bei  $n = 14$  jedes Mal eine Depolarisation, die sofort einsetzte, nachdem ANG II das Bad erreicht hatte.  $K^+$  depolarisierte die Zelle konzentrationsabhängig.

Mit dieser Methode kann man in dieser Präparation durchaus die durch den  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Levcromakalim hervorgerufene Hyperpolarisation nachweisen (Rauch, 2000), jedoch war eine Hyperpolarisation nach Stimulation durch Isoprenalin + IBMX nicht nachweisbar. Man muss also schließen, dass die Arbeitshypothese (cAMP erhöht die  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation der  $Na^+K^+$ -ATPase) falsch ist.

### **3.2.4 Mechanistische Untersuchungen II: Beitrag des $Ca^{2+}$ -Einstroms zur Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch cAMP**

Die  $Ca^{2+}$ -Erhöhung nach Stimulation durch ANG II und cAMP-Erhöhung kann auf  $Ca^{2+}$ -Einstrom und / oder durch Entleeren der in den reninsezernierenden Zellen vorhandenen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher beruhen. In den folgenden Kapiteln wird zunächst der Beitrag des  $Ca^{2+}$ -Influges charakterisiert.

#### *3.2.4.1 Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Isoprenalin + IBMX und ANG II nach Entfernung von extrazellulärem $Ca^{2+}$*

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, wie viel der  $Ca^{2+}$ -Influx zur  $Ca^{2+}$ -Erhöhung nach Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) und ANG II (3 nM) beiträgt. Dazu wurden die Stimuli in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium gegeben. Wenn noch immer eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung auftritt, muss  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern freigesetzt werden.

Zur Quantifizierung wurde wieder das Doppelstimulationsprotokoll angewandt. Dazu wurde zunächst mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) oder ANG II (3 nM) in  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer stimuliert. Danach wurde auf  $Ca^{2+}$ -freies Medium (0 nM  $Ca^{2+}$ , 5 mM EGTA) umgeschaltet und erneut stimuliert (Abb. 3.11). Desweiteren wurde eine Kontrolle durchgeführt, bei der die Zellen durch  $K^+$  (60 mM) depolarisiert wurden. Hier ist bekannt, dass die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (nahezu vollständig) durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum bewirkt wird.

Tab. 3.10 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX im  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer

| Stimulation  | basales $[Ca^{2+}]_i$ (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | AUC 1 (mg) | $Ca^{2+}$ -Abfall (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | AUC 2 (mg)           | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) | AUC (%)        |
|--|----------------------------|---------------------------|------------|------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| a) ANG / ISO + IBMX<br>0 Ca; n = 5                           | 41 ± 4                     | 27 ± 5                    | 34 ± 10    | 20 ± 2                 | 5 ± 0,5                   | 5 ± 1                | 22 ± 6                   | 25 ± 1         |
| b) ANG / ISO + IBMX<br>n = 3                                 | 49 ± 2                     | 20 ± 3                    | 17 ± 1     |                        | 22 ± 1                    | 38 ± 3               | 114 ± 18                 | 222 ± 18       |
| c) ISO + IBMX / ISO + IBMX<br>0 Ca; n = 9                    | 44 ± 3                     | 17 ± 2                    | 32 ± 6     | 15 ± 1                 | 6 ± 2                     | 2,4 ± 0,7            | 31 ± 9                   | 8 ± 2          |
| d) ISO + IBMX / ISO + IBMX<br>n = 4                          | 44 ± 5                     | 26 ± 4                    | 45 ± 9     |                        | 21 ± 4                    | 33 ± 4               | 82 ± 9                   | 81 ± 12        |
| e) ANG / ANG<br>0 Ca; n = 7                                  | 47 ± 4                     | 22 ± 3                    | 23 ± 5     | 23 ± 5                 | 12 ± 2                    | 8 ± 1                | 59 ± 8                   | 41 ± 6         |
| f) ANG / ANG<br>n = 5  | 39 ± 8                     | 37 ± 7                    | 32 ± 7     |                        | 32 ± 5                    | 30 ± 8               | 91 ± 6                   | 93 ± 5         |
| g) ANG / $K^+$ 60 mM;<br>0 Ca n = 3                          | 59 ± 15                    | 35 ± 5                    | 23 ± 6     | 33 ± 12                | 0                         | 0                    | 0                        | 0              |
| h) ANG / $K^+$ 60 mM; n = 3                                  | 42 ± 7                     | 47 ± 22                   | 31 ± 10    |                        | 63 ± 33                   | 65 ± 8               | 127 ± 116                | 256 ± 73       |
| i) $K^+$ 60 mM / $K^+$ 60 mM<br>0 Ca; n = 9<br>(3 Responder) | 36 ± 5                     | 49 ± 7                    | 67 ± 7     | 13 ± 3                 | 0,9 ± 0,5<br>2,6 ± 0,6    | 1 ± 0,6<br>3,2 ± 0,9 | 2,7 ± 1,7<br>8 ± 4       | 2 ± 1<br>6 ± 2 |
| j) $K^+$ 60 mM / $K^+$ 60 mM<br>n = 2                        | 14<br>44                   | 76<br>18                  | 67<br>31   |                        | 75<br>17                  | 70<br>37             | 97 ± 2                   | 111 ± 7        |

Alle Experimente zusammengefasst (n = 50) lag die basale  $[Ca^{2+}]_i$  in dieser Experimentreihe bei  $43 \pm 2$  nM. Die  $Ca^{2+}$ -freie Lösung (Na-HEPES ohne  $Ca^{2+}$  mit 5 mM EGTA) bewirkte ein Absinken der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle um  $19 \pm 2$  nM, d.h. die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den Zellen fiel auf eine  $[Ca^{2+}]_i$  von  $26 \pm 1$  nM ab.

In  $Ca^{2+}$ -haltiger Lösung erhöhte eine zweite Stimulation mit ANG II (3nM)  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen auf die erste ANG II (3nM)-Kontrollapplikation die Peakhöhe um  $91 \pm 6$  % und die Peakfläche um  $93 \pm 5$  %; die Erhöhung war demzufolge geringfügig kleiner (Abb. 3.11).

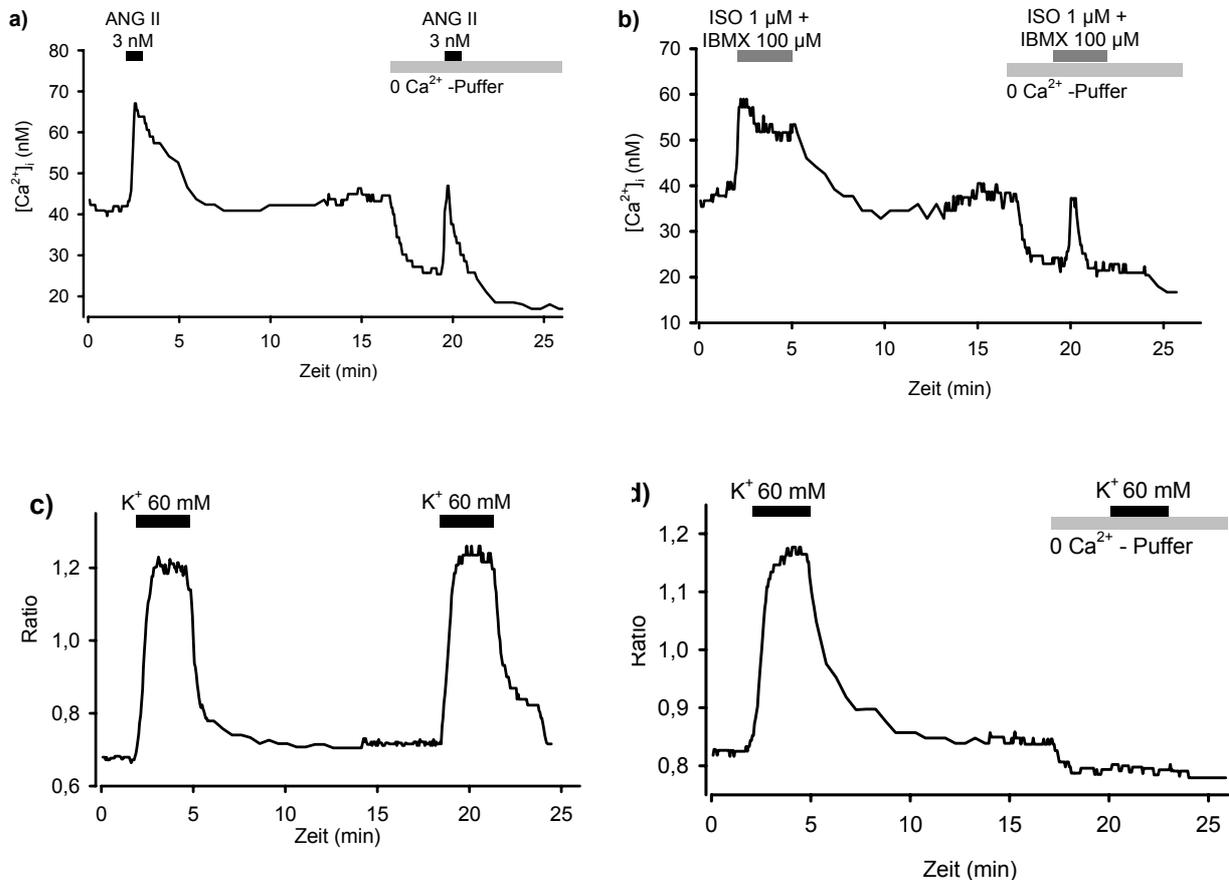


Abb. 3.11 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO + IBMX, ANG II und  $K^+$  in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium

a) Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) in  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer. Sofort nach dem Wechsel zur  $Ca^{2+}$ -freien Lösung fiel  $[Ca^{2+}]_i$  um ca. 20 mM ab. Die Antwort auf ANG II war verkleinert, die Plateau-Phase fehlte.

b) Isoprenalin + IBMX: Bezogen auf primären Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO + IBMX in  $Ca^{2+}$ -haltigem Medium war die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO + IBMX in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung stärker verkleinert als die ANG II-Antwort in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium.

c) Doppelstimulationen mit 60 mM  $K^+$  riefen annähernd gleiche Erhöhungen von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor.

d) Nach Entfernung von  $[Ca^{2+}]_o$  kam es in diesem Experiment nicht mehr zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (vgl. Text).

In  $Ca^{2+}$ -freier Lösung erhöhte ANG II (3nM)  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen auf die erste ANG II (3nM)-Stimulation um  $59 \pm 8 \%$ , wenn die Peakhöhe berücksichtigt wurde und um  $41 \pm 6 \%$  bei Berücksichtigung der Peakfläche. Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  war also in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung um rund 30 bzw. 50 Prozentpunkte kleiner als in  $Ca^{2+}$ -haltiger Lösung (Abb. 3.12).

Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) (3 min) nach primärer ANG II (3nM)-Stimulation bewirkte in dieser Experimentserie (n = 3) eine außergewöhnlich starke Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die bezogen auf den ersten ANG II-Puls wesentlich größer war: Bei der Peakhöhe betrug sie  $114 \pm 18 \%$ , bei der Peakfläche waren es  $222 \pm 18 \%$  (Abb. 3.12). In

Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung erhöhte die Kombination aus Isoprenalin + IBMX [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bezogen auf den ersten ANG II-Kontrollpuls, der in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung stattfand, um 22 ± 6 % (Peakhöhe) bzw. 25 ± 12 %. Hier war die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Isoprenalin + IBMX in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung wesentlich kleiner als in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung.

Sowohl die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch ANG II (3nM) als auch durch Isoprenalin + IBMX war in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung kleiner als in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung, jedoch war die Antwort auf Isoprenalin + IBMX deutlich stärker (etwa um einen Faktor 2) verkleinert. Dies konnte aus den Isoprenalin + IBMX-Doppelstimulationsversuchen direkt und quantitativ geklärt werden. Stimulation mit Isoprenalin (1 μM) + IBMX (100 μM) (3 min) nach primärem Isoprenalin (1 μM) + IBMX (100 μM) (3 min) Puls bewirkte in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung eine Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung, die bezogen auf die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch primäre Isoprenalin + IBMX-Applikation geringfügig kleiner war: bei Berücksichtigung der Peakhöhe betrug sie 82 ± 9 %, bei Berücksichtigung der Peakfläche waren es 81 ± 12 %. In Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung erhöhte die Kombination aus Isoprenalin (1 μM) + IBMX (100 μM) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bezogen auf den ersten Isoprenalin + IBMX-Kontrollpuls in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung um 31 ± 9 % (Peakhöhe) bzw. 8 ± 2 % (AUC) (Abb. 3.12). Hier war die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Isoprenalin + IBMX wesentlich kleiner in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung als in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung. Die Peakhöhe war weniger stark reduziert als die Peakfläche. Auch die Antworthäufigkeit war reduziert: Bei der Doppelstimulation mit Isoprenalin + IBMX, bei denen die zweite Stimulation in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung stattfand, trat die zweite Antwort 7 von 9 mal auf, 2 x wurde keine Reaktion erhalten. Das entspricht einer Antworthäufigkeit von 78 %.

Vergleicht man die Fläche der Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, die eine zweite Isoprenalin + IBMX-Stimulation bezogen auf die durch erste Isoprenalin + IBMX-Stimulation ausgelöste mit der Fläche der Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, die eine zweite ANG II-Stimulation bezogen auf die erste ANG II-Stimulation auslöst, so erhält man in Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung mit Hilfe des t-Tests einen signifikanten Unterschied (8 ± 2 % vs. 41 ± 6 %: p < 0,001; Abb. 3.12), in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung sind die Flächen in Prozent bezogen auf den jeweils ersten Puls nicht signifikant verschieden (81 ± 12 % vs. 93 ± 5 %: p > 0,05). In Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung nimmt die Größe des zweiten Peaks bei Isoprenalin + IBMX-Stimulation demzufolge stärker ab als bei ANG II-Stimulation. Damit ist für die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Isoprenalin + IBMX der Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellulärraum wesentlich wichtiger als bei der Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

durch ANG II. Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX scheint demzufolge zu einem sehr geringen Anteil durch Entleerung der intrazellulären Speicher zu kommen, hauptsächlich aber durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom von außen.

Auch bei der Stimulation mit  $K^+$  (60 mM für 3 min) wurde wieder das Doppelstimulationsprotokoll angewandt. In der Gegenwart von  $Ca^{2+}$  war die Antwort auf den zweiten Stimulus sowohl in Peakhöhe ( $97 \pm 2 \%$ ) als auch in Peakfläche ( $111 \pm 7 \%$ ) annähernd gleich groß (Abb. 3.11c). Erfolgte die zweite Stimulation in Abwesenheit von  $[Ca^{2+}]_o$  (Abb. 3.11d), kam es in 3 von 9 Versuchen zu einer sehr geringen Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die bezogen auf die Peakhöhe  $2,7 \pm 1,7 \%$  (alle) /  $8 \pm 4 \%$  (responder) des ersten  $K^+$ -Pulses betrug; bezogen auf die Peakfläche waren es  $2 \pm 1 \%$  (alle) /  $6 \pm 2 \%$  (responder). Diese Reduktion war statistisch signifikant stärker als bei Isoprenalin + IBMX ( $2,7 \pm 1,7 \%$  vs.  $8 \pm 2 \%$ ;  $p < 0,05$ ). Dies zeigt noch einmal, dass an der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf cAMP-Erhöhung in einem geringen Maße auch die Entleerung intrazellulärer Speicher beteiligt ist.

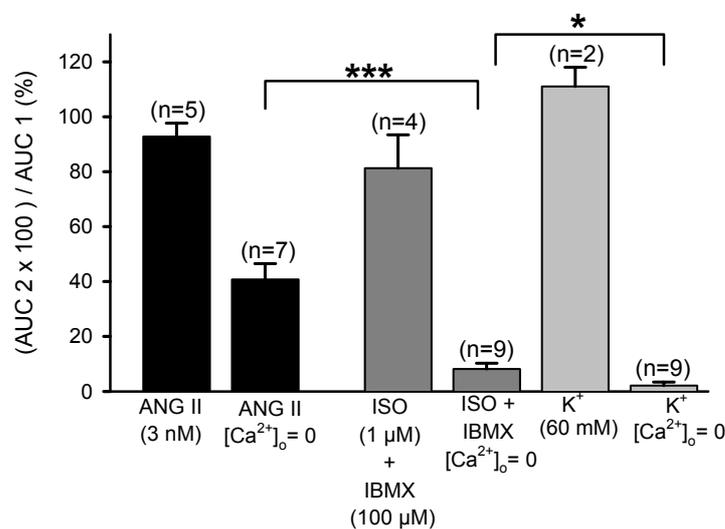


Abb. 3. 12 Erhöhung  $[Ca^{2+}]_i$  in  $Ca^{2+}$ -haltiger und  $Ca^{2+}$ -freier Lösung.

Gezeigt ist jeweils die 2. Stimulation als Prozent der ersten. Dargestellt ist hier die Auswertung der Peak-flächen.

In  $Ca^{2+}$ -freier Lösung war die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf ISO + IBMX wesentlich stärker reduziert als die auf ANG II

(3 nM) ( $p < 0,001$ , vgl. Text). Eine zweite  $K^+$  (60 mM)-Gabe in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium rief eine sehr kleine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in 3 von 9 Fällen hervor.

In  $Ca^{2+}$ -freier Lösung war die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf  $K^+$  wesentlich stärker reduziert als die auf ISO + IBMX ( $p < 0,05$ , vgl. Text).

#### *3.2.4.2 Einfluss der Blockade spannungsaktivierter $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ mit Isradipin auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin + IBMX und ANG II*

Nachdem gezeigt wurde, dass die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf Stimulation mit Isoprenalin + IBMX wesentlich durch einen  $Ca^{2+}$ -Influx zustande kommt, erhebt sich die Frage nach dem  $Ca^{2+}$ -Eintrittsweg. Eine Möglichkeit wäre ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch spannungsaktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ, die durch Dihydropyridine blockiert werden können. Die Existenz solcher Kanäle auf den reninsezernierenden Zellen ist umstritten (Kap. 1.3.1.2). Es sollte deshalb in diesem Ansatz untersucht werden, ob Blockade dieser Kanäle durch das Dihydropyridin Isradipin (100 nM) die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) verringert. Es war früher an dem gleichen Präparat und der gleichen Messapparatur gezeigt worden, dass der durch  $K^+$  (60 mM) induzierte  $Ca^{2+}$ -Anstieg durch Isradipin (100 nM) blockiert wird (Rauch, 2000).

Für die Experimente wurde das Doppelstimulationsprotokoll gewählt. Zunächst wurde Isoprenalin + IBMX für 3 Minuten gegeben. Nach einer Auswaschphase erfolgte Perfusion mit Isradipin in einer Konzentration von 100 nM für 5 min; dieser Lösung wurde dann für 3 Minuten Isoprenalin + IBMX zugesetzt (Abb. 3.13a). Für die Stimulation durch ANG II (3nM) wurde das gleiche Protokoll untersucht, da auch hier noch nicht klar ist, ob der Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum durch spannungsaktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle erfolgt (Abb. 3.13b). Zur Kontrolle wurde das Protokoll mit  $K^+$  (60 mM) untersucht. In einigen Experimenten (n = 8) wurde vor Stimulation mit Isoprenalin + IBMX bzw. ANG II mit  $K^+$  (60 mM) superfundiert, um sicher zu stellen, dass Isradipin aus vorherigen Versuchen vollständig aus der Apparatur ausgewaschen war.

Tab. 3.11 Einfluss von Isradipin (100 nM) auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) und ANG II (3 nM)

| Stimulation                                   | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | AUC 1 (mg) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | AUC 2 (mg) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) | AUC (%)      |
|---|------------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|---------------------------|------------|--------------------------|--------------|
| ISO + IBMX / Isradipin + ISO + IBMX<br>n = 11 | 48 $\pm$ 4                   | 19 $\pm$ 3                | 30 $\pm$ 7 | 49 $\pm$ 4                   | 15 $\pm$ 2                | 23 $\pm$ 5 | 81 $\pm$ 6               | 81 $\pm$ 7   |
| ANG / Isradipin + ANG<br>n = 10               | 43 $\pm$ 3                   | 30 $\pm$ 4                | 32 $\pm$ 7 | 49 $\pm$ 3                   | 27 $\pm$ 4                | 34 $\pm$ 7 | 93 $\pm$ 10              | 110 $\pm$ 11 |

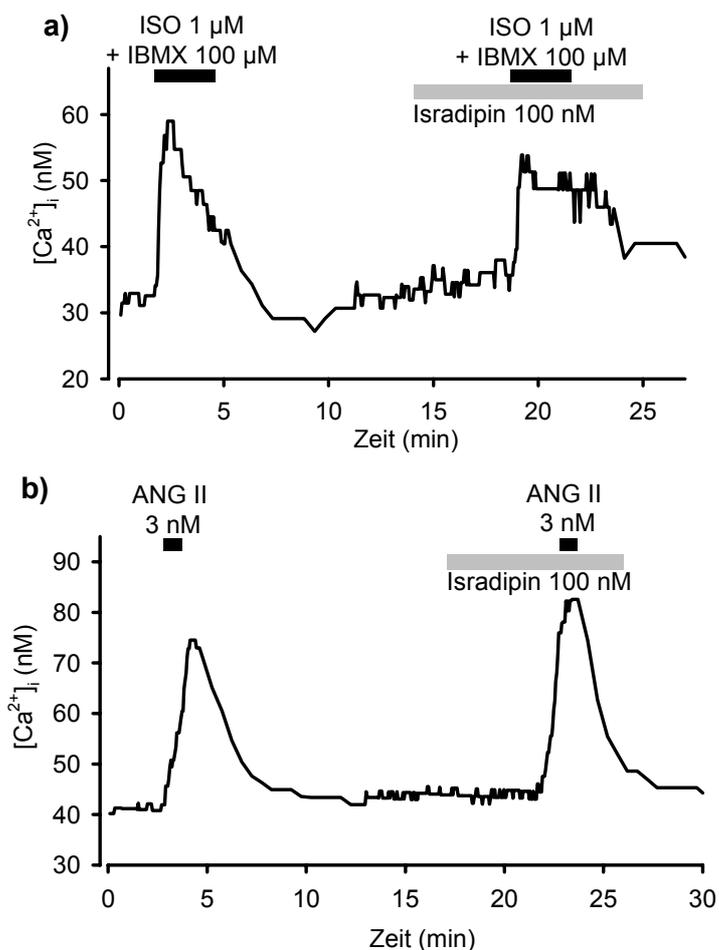


Abb. 3.13 Nach Blockade der spannungsaktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ mit Isradipin (100 nM) war die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  sowohl durch ANG II (3 nM) (a), als auch durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) (b) nicht verändert.

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  betrug in diesen Experimenten  $45 \pm 2$  nM ( $n = 25$ ).  $K^+$  (60 mM) bewirkt einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der durch Isradipin nahezu vollständig unterbunden wurde ( $n = 4$ ; Daten nicht gezeigt).

Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  um  $19 \pm 3$  nM (erster Peak). Nach Blockade der spannungsaktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $Ca_v1.x$ ) mit Isradipin erhöhten Isoprenalin + IBMX  $[Ca^{2+}]_i$  um  $15 \pm 2$  nM ( $n = 11$ ; Tab. 3.11). Bezogen auf den ersten Peak betrug die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Isradipin-Behandlung  $81 \pm 6$  % (Peakhöhe) bzw.  $81 \pm 7$  % (Peakfläche) (Tab. 3.11; Abb. 3.13a). Zum Vergleich werden Experimente aus einer anderen, zeitlich sehr nahen Versuchsreihe herangezogen (Tab. 3.10). Auch bei der unbehandelten Isoprenalin + IBMX-Stimulation ist die Größe der Antwort des zweiten Isoprenalin + IBMX-Peaks bezogen auf den ersten in einer Größenordnung von  $82 \pm 12$  % (Peakgröße) bzw.  $81 \pm 12$  % (Peakfläche). Isradipin (100 nM) hat also keinen Einfluß auf die durch Isoprenalin + IBMX hervorgerufene  $Ca^{2+}$ -Antwort.

Ebenso war eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3nM) nach Applikation von Isradipin möglich ( $n = 10$ ; Tab. 3.11; Abb. 3.13b). Die Größe des zweiten Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3nM) bezogen auf die erste betrug  $93 \pm 10$  % (Peakgröße) bzw.  $110 \pm 11$  % (Peakfläche). Vergleicht man diesen Anstieg mit dem, der durch eine zweite ANG II-Stimulation ohne Vorbehandlung möglich ist (Peakhöhe:  $91 \pm 6$  nM Peakfläche:  $93 \pm 5$  %), so ist auch hier kein Unterschied festzustellen.

Es bleibt festzustellen, dass Dihydropyridin-empfindliche VOCCs ( $Ca_v1.x$ ) in dieser Präparation nicht zur  $Ca^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin + IBMX und ANG II (3nM) beitragen, obwohl sie sehr wohl vorhanden sind, wie die Hemmung der Antwort auf  $K^+$ -Depolarisation durch Isradipin zeigt.

#### 3.2.4.3 Einfluss einer Blockade der SOCCs ( $I_{CRAC}$ ) mit 2-APB und $Gd^{3+}$ auf die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin+IBMX und ANG II

Eine weitere Möglichkeit des  $Ca^{2+}$ -Eintritts wäre der Einstrom durch speicheraktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle (store-operated Ca-channels, SOCCs), deren Anwesenheit in den reninsezernierenden Zellen diskutiert wird (Kap. 1.3.1.1). Daher wurde untersucht, ob Blockade dieser Kanäle durch  $Gd^{3+}$  (50  $\mu$ M) und 2-APB = 2-Aminoethoxydiphenylboran (30  $\mu$ M), zwei

bekannte SOCC-Blocker (Clapham et al., 2002) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Isoprenalin + IBMX oder ANG II beeinflusst.

Zunächst wurde wieder eine Kontrollstimulation mit Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) bzw. ANG II (3nM) durchgeführt. Nach Auswaschphase wurde mit  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) für 5 Minuten superfundiert. Dieser Lösung wurde dann Isoprenalin + IBMX (Abb. 3.14a und b) bzw. ANG II (Abb. 3.14c und d) zugesetzt.

Tab. 3.12 Einfluss von  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) und 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) auf die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) und ANG II (3 nM)

| Stimulation                                    | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | AUC 1 (mg) | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | AUC 2 (mg) | $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ (%) | AUC (%)     |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------------------|-------------|
| ISO +IBMX/ 2-APB +ISO+IBMX; n = 5              | 47 $\pm$ 4                          | 11 $\pm$ 3                       | -          | 47 $\pm$ 3                          | 0                                | 0          | 0                               | 0           |
| ISO +IBMX/ $\text{Gd}^{3+}$ + ISO +IBMX; n = 7 | 32 $\pm$ 6                          | 9 $\pm$ 2                        | -          | 31 $\pm$ 6                          | 0                                | 0          | 0                               | 0           |
| ANG II / 2-APB +ANG II; n = 4                  | 46 $\pm$ 6                          | 32 $\pm$ 3                       | 22 $\pm$ 3 | 41 $\pm$ 5                          | 22 $\pm$ 3                       | 17 $\pm$ 4 | 69 $\pm$ 7                      | 81 $\pm$ 18 |
| ANG II / $\text{Gd}^{3+}$ +ANG II; n = 6       | 33 $\pm$ 1                          | 21 $\pm$ 2                       | 21 $\pm$ 1 | 32 $\pm$ 2                          | 10 $\pm$ 1                       | 13 $\pm$ 1 | 47 $\pm$ 3                      | 62 $\pm$ 2  |
| ISO+IBMX / ISO+ IBMX; n = 4                    | 44 $\pm$ 5                          | 26 $\pm$ 4                       | 45 $\pm$ 9 | 43 $\pm$ 4                          | 21 $\pm$ 4                       | 33 $\pm$ 4 | 82 $\pm$ 9                      | 81 $\pm$ 12 |
| ANG II / ANG II n = 5                          | 39 $\pm$ 8                          | 37 $\pm$ 7                       | 32 $\pm$ 7 | 39 $\pm$ 6                          | 32 $\pm$ 5                       | 30 $\pm$ 8 | 91 $\pm$ 6                      | 93 $\pm$ 5  |

Blockade der SOCCs mit 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) (n = 5) und  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (n = 7) verhinderte den Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als Antwort auf Isoprenalin + IBMX (Abb. 3.14a und b) vollständig.

Der Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach ANG II (3nM) war nach Blockade der SOCCs abgeschwächt (Tab. 3.12). Unbehandelt löst eine zweite ANG II-Stimulation ein Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus, die bezogen auf den ersten Puls 91  $\pm$  6 % (Peakgröße) bzw. 93  $\pm$  5 % (Peakfläche) betrug; nach Blockade der SOCCs mit 2-APB waren es 69  $\pm$  7 % (Peakgröße) bzw. 81  $\pm$  18 % (Peakfläche) (Abb. 3.14c). Die Peakhöhe war damit signifikant verkleinert (p = 0,05), die Peakfläche zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied (p > 0,05). Nach Blockade der SOCCs mit  $\text{Gd}^{3+}$  war die Antwort mit 47  $\pm$  3 % (Peakgröße) bzw. 62  $\pm$  2 % (Peakfläche)

signifikant kleiner als durch unbehandeltes ANG II (Peakgröße und Fläche:  $p < 0,001$ ) (Abb. 3.14d). Der Unterschied in der Hemmung der Anstiege von  $[Ca^{2+}]_i$  nach den beiden Inhibitoren lässt auf nicht vollständige Kanalblockade und unterschiedliche Effektivität der beiden Inhibitoren schließen. Bemerkenswert ist, dass die beiden SOCCs-Blocker die Antwort auf einen cAMP Anstieg vollständig unterdrückten, obwohl in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung noch eine kleine Antwort bestehen blieb (Kap. 3.2.4.1).

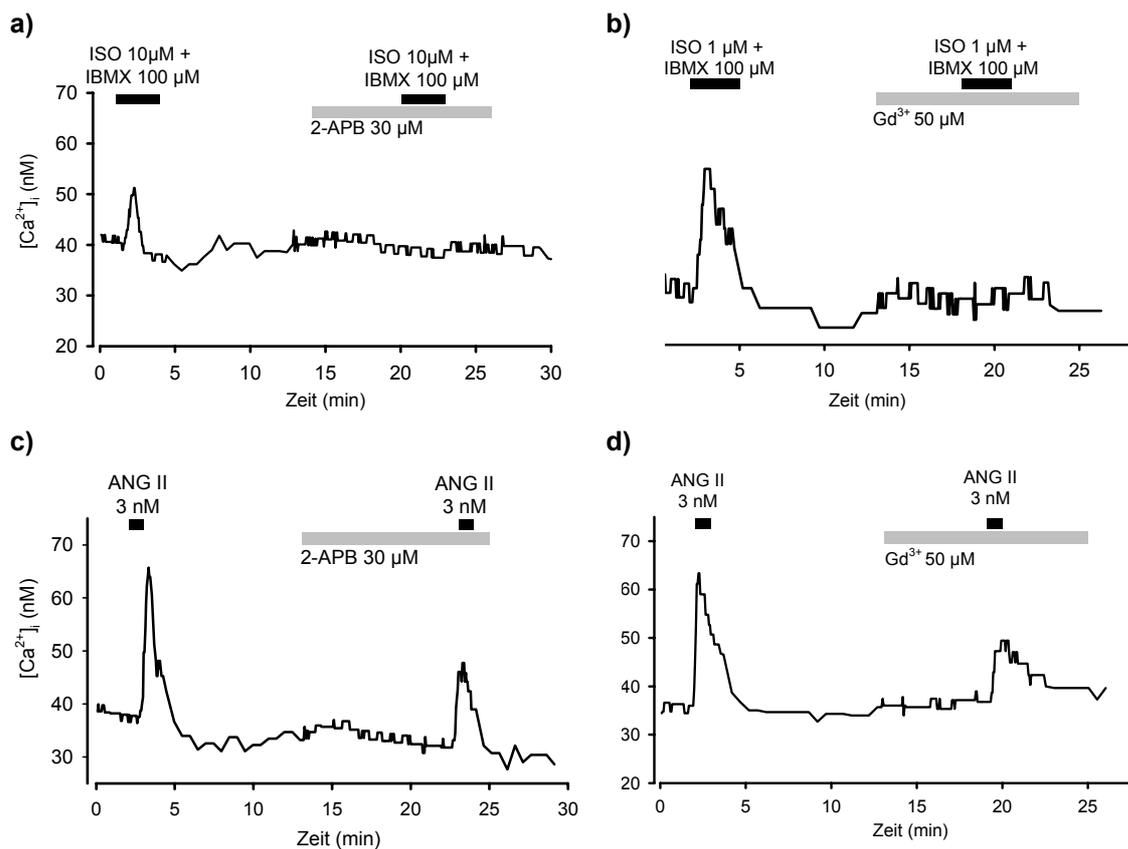


Abb. 3.14 Effekt von Isoprenalin + IBMX und ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$  nach Blockade der SOCCs. Blockade der SOCCs (speicheraktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle) mit 2-APB (30  $\mu$ M) verhinderte einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX (a;  $n = 5$ ), ebenso wie Blockade der SOCCs mit  $Gd^{3+}$  (50  $\mu$ M) (b;  $n = 7$ ). Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) war nach Blockade der SOCCs mit 2-APB (30  $\mu$ M) (c;  $n = 4$ ) und  $Gd^{3+}$  (50  $\mu$ M) (d;  $n = 6$ ) deutlich verringert.

### 3.2.5 Mechanistische Untersuchungen III: Beitrag der Entleerung intrazellulärer Speicher zur $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung

#### 3.2.5.1 Einfluss der Blockade der sarkoplasmatischen $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Isoprenalin + IBMX und ANG II

Die Experimente in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium (Kap. 3.2.4.1) haben gezeigt, dass Isoprenalin + IBMX auch unter diesen Bedingungen (kein extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ ) noch eine drastisch verminderte, aber regelmäßige Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirkt. Dies legt die Vermutung nahe, dass dieser Effekt auf einer partiellen Speicherentleerung durch cAMP beruht. In dieser Versuchsreihe sollte jetzt untersucht werden, ob Blockade der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Membran der intrazellulären Speicher einen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch Isoprenalin + IBMX (und ANG II) hat. Verwendet wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Blocker Cyclopiazonsäure (CPA) und Thapsigargin. Beide blockieren die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die  $\text{Ca}^{2+}$  in die Speicher zurück pumpt (Fellner und Arendshorst, 1999; Loutzenhiser und Loutzenhiser, 2000; Schweda et al., 2001). Dadurch werden die Speicher entleert und  $\text{Ca}^{2+}$  steigt in der Zelle an. Die leeren Speicher aktivieren dann SOCCs /  $I_{\text{CRAC}}$ -Kanäle (Kap. 1.3.1.1), so dass ein weitere Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erfolgt. Isoprenalin + IBMX wurde gegeben, wenn  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach CPA- oder Thapsigargin-Gabe stabil war (Erreichen eines Plateaus). Der wichtigste Unterschied in der Wirkung von Thapsigargin und CPA soll die Reversibilität (CPA; Badaoui et al., 1995) bzw. Irreversibilität (Thapsigargin; Treiman et al., 1998) der Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sein.

##### 3.2.5.1.1 Verwendung des $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Hemmstoffes Thapsigargin

Zu Beginn erfolgte wieder ein Kontrollpuls aus Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) für 3 Minuten. Nach der Auswaschphase wurde Thapsigargin zunächst für 7 Minuten in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gegeben, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase irreversibel zu hemmen. Anschließend wurde die Konzentration auf 100 nM abgesenkt; mit dieser niedrigeren Konzentration wurde nochmal für 4 Minuten superfundiert, bevor dann für 3 Minuten eine Stimulation mit Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von Thapsigargin erfolgte (Abb. 3.15a).

Dasselbe Protokoll wurde auch auf ANG II (3 nM) übertragen, jedoch betrug die ANG II-Stimulationszeit 1 Minute (Abb. 3.15b). Laut Literatur (Kap. 1.3.2.1) soll der schnellen

Komponente der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II eine Speicherentleerung zugrunde liegen und die sich anschließenden Plateau-Phase durch Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum verursacht werden. Die Konzentration von ANG II (3 nM) ist relativ gering, so dass hier der Peakphase eine größere Bedeutung zukommen sollte als der Plateauphase. Auch die kurze Andauer der ANG II-Superfusion sollte die Peakphase betonen. Aus diesem Grund wurde eine starke Abnahme der Antwortgröße erwartet.

Desweiteren wurden Zeitkontrollen durchgeführt, bei denen überprüft werden sollte, ob der Konzentrationswechsel des Thapsigargin Auswirkungen auf  $[Ca^{2+}]_i$  hatte.

Tab.3.13 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) nach Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPase mit Thapsigargin (Tha)

| Stimulation                                   | basales $[Ca^{2+}]_i$ (nM)   | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM)   | $Ca^{2+}$ -Anstieg (nM)  | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM)                                  | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%)                                    |
|---|--|---|--|--|---|
| a) ISO + IBMX /<br>Tha + ISO + IBMX<br>n = 10 | 56 $\pm$ 5   | 20 $\pm$ 2  | 100 $\pm$ 10   | -9 $\pm$ 3 (alle)<br>-11 $\pm$ 3 (resp.)                   |   |
| b) ISO + IBMX /<br>ISO + IBMX<br>n = 4        | 44 $\pm$ 5   | 26 $\pm$ 4  |  | 21 $\pm$ 4   | 82 $\pm$ 9  |
| c) ANG II /<br>Tha + ANG II<br>n = 12         | 54 $\pm$ 5<br>$\alpha$ ) 73 $\pm$ 11 <sup>*)</sup><br>$\beta$ ) 48 $\pm$ 4 <sup>*)</sup><br>$\gamma$ ) 46 $\pm$ 7 <sup>*)</sup><br>$\delta$ ) 49 $\pm$ 6 <sup>*)</sup> | 54 $\pm$ 10<br>29 $\pm$ 5<br>35 $\pm$ 6<br>48 $\pm$ 16<br>105 $\pm$ 8 | 69 $\pm$ 6<br>85 $\pm$ 3<br>79 $\pm$ 8<br>75 $\pm$ 7<br>36 $\pm$ 1 | 11 $\pm$ 8<br>0<br>-17 $\pm$ 5<br>11 $\pm$ 5<br>52 $\pm$ 4 | 5 $\pm$ 12<br>0<br>-52 $\pm$ 13<br>21 $\pm$ 6<br>50 $\pm$ 6 |
| d) ANG II / ANG II<br>n = 15                  | 39 $\pm$ 8   | 37 $\pm$ 7  |  | 32 $\pm$ 5   | 91 $\pm$ 6  |
| e) ANG II / Tha,<br>Zeitkontrolle             | 41 $\pm$ 2   | 39 $\pm$ 5  | 131 $\pm$ 21   |  |   |

<sup>\*)</sup> Versuche aufgeteilt nach Größe der primären Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II:  $\alpha$ ) n = 3;  $\beta$ ) n = 3;  $\gamma$ ) n = 3;  $\delta$ ) n = 3;

Hier lag die basale  $[Ca^{2+}]_i$  bei 56  $\pm$  5 nM (Tab. 3.13, a) bzw. 54  $\pm$  5 nM (Tab. 3.13, c) bzw. 41  $\pm$  2 nM (Zeitkontrolle). Thapsigargin erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  um 100  $\pm$  10 nM (Tab. 3.13, a), 69  $\pm$  6 nM (Tab. 3.13, c) bzw. 131  $\pm$  21 nM (Zeitkontrolle). Bezogen auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  zu Beginn sind dies Erhöhungen um 202  $\pm$  35 % (Tab. 3.13, a), 135  $\pm$  16 % (Tab. 3.13, c) bzw. 314  $\pm$  33 % (Zeitkontrolle). Wenn der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  schnell erfolgte, fiel  $[Ca^{2+}]_i$  nach Erreichen der Plateauphase wieder leicht ab. Aus den Zeitkontrollen geht hervor, dass nach

einem Plateau trotz weiterer Superfusion mit Thapsigargin  $[Ca^{2+}]_i$  langsam aber stetig abfiel. Außerdem fiel auf, dass Thapsigargin  $[Ca^{2+}]_i$  weitaus weniger ( $36 \pm 1$  nM) erhöhte, wenn der primäre  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg als Antwort auf ANG II ohne Vorbehandlung sehr groß war (Tab. 3.13 c,  $105 \pm 8$  nM); bei kleiner primärer  $[Ca^{2+}]_i$  Erhöhung (Tab. 3.13, MW aus a + c + d,  $37 \pm 6$  nM) betrug der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Thapsigargin jedoch  $69 \pm 6$  nM. Als wichtigstes Ergebnis kann man festhalten, dass nach Thapsigargingabe Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ )  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf eine Ausnahme nicht mehr erhöhte. Vielmehr kam es sogar in 7 von 10 Experimenten zu einem Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  in dem Gefäß, eine Reaktion, die nach cAMP-Erhöhung zu erwarten wäre. Der Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  betrug in diesen sieben Gefäßen im Mittel  $11 \pm 3$  nM (Abb. 3.15a).

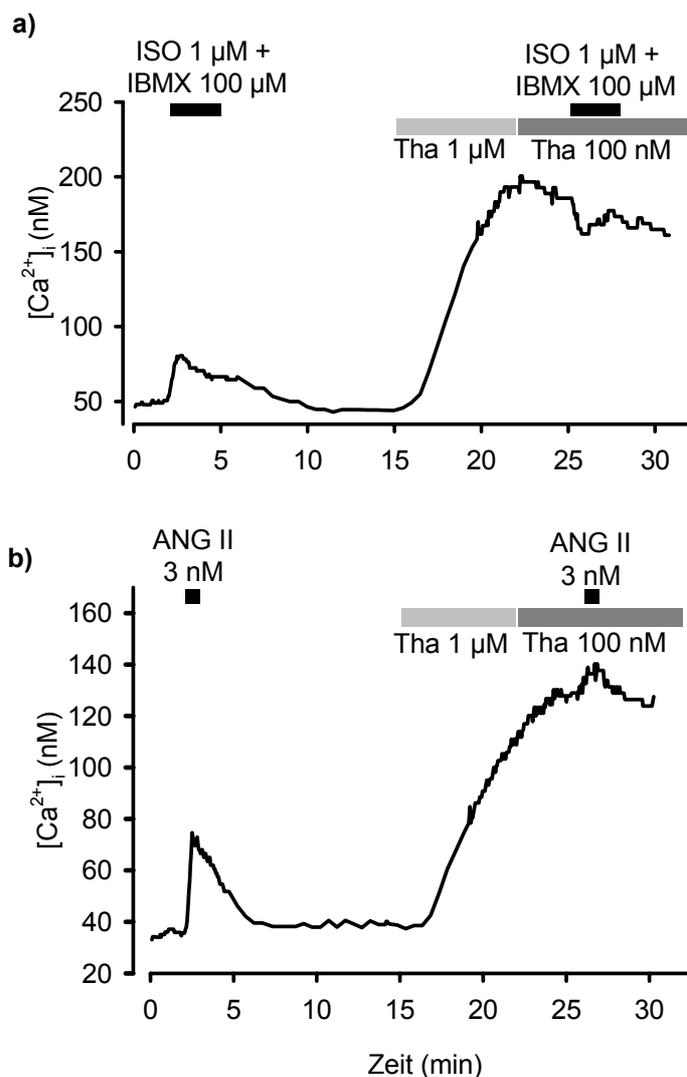


Abb. 3.15 Einfluss des  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibitors Thapsigargin (Tha) auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit ISO + IBMX (a) oder ANG II (b)

a) Thapsigargin bewirkte eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die bei 140 nM lag. Mit ISO + IBMX ließ sich anschließend keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  mehr erreichen, es war sogar ein leichter  $Ca^{2+}$ -Abfall zu erkennen.

b) Die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf ANG II nach Thapsigargingabe war uneinheitlich, in 12 Experimenten führte ANG II sechs Mal wie hier zu einem kleinen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Die Antworten auf ANG II (3nM) nach Thapsigargingabe war uneinheitlich (Tab. 3.13c): wenn der primäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak klein war ( $\alpha$ ), gab es nach Thapsigargin keinen Effekt mehr oder er war sogar negativ ( $\beta$ ); war die primäre Antwort mittel ( $\gamma$ ) oder sehr groß ( $\delta$ ), so blieb dies auch nach Thapsigargin der Fall.

Es bleibt festzuhalten, dass Inhibition der SERCA durch Thapsigargin die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung nach Isoprenalin + IBMX vollständig verhinderte. Dies ist ein erstaunliches Resultat, da SOCC-Blockade den Effekt ebenfalls verhindert (Kap. 3.2.4.3). Der Effekt von ANG II (3 nM) wird im Mittel sehr stark verkleinert, wobei die große Heterogenität der Hemmung auffällt.

#### 3.2.5.1.2 Verwendung des $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Hemmstoffes CPA

Als weiterer Hemmstoff der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde CPA in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verwendet.

Zunächst wurde für 3 Minuten mit Isoprenalin + IBMX stimuliert. Nach einer Auswaschphase wurde CPA für 7 Minuten gegeben. In dieser Zeit war ein stabiles Plateau erreicht. Anschließend wurde wieder für 3 Minuten mit Isoprenalin + IBMX im CPA-haltigen Medium superfundiert. Am Ende erfolgte eine Auswaschphase. Nachdem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder das Ausgangslevel erreicht hatte, wurde in 2 von 4 Fällen noch einmal mit Isoprenalin + IBMX für 3 Minuten superfundiert (Abb. 3.16a), um zu überprüfen, ob sich nach Entfernen der CPA eine weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung auslösen lässt. Analoge Versuche wurden auch mit ANG II (3nM) durchgeführt (Abb.3.16b).

Tab. 3.14 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPase mit CPA 10  $\mu$ M

| Stimulation                             | basales $[Ca^{2+}]_i$ (nM)                         | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM)                          | AUC 1 (mg)  | $Ca^{2+}$ -Anstieg (nM)                            | $Ca^{2+}$ -Abfall (nM)                          | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM)                         | AUC 2 (mg)  | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%)  | AUC (%)   |
|---|--|--|---|--|---|---|---|---|---|
| a)ISO + IBMX / CPA + ISO+ IBMX<br>n = 4 | 49 $\pm$ 8<br>45 <sup>b)</sup><br>50 <sup>b)</sup> | 21 $\pm$ 7<br>40 <sup>b)</sup><br>11 <sup>b)</sup> | 18 $\pm$ 6<br>22 <sup>b)</sup><br>9 <sup>b)</sup> | 74 $\pm$ 9<br>93 <sup>b)</sup><br>72 <sup>b)</sup> | 4 $\pm$ 2<br>8 <sup>b)</sup><br>9 <sup>b)</sup> | 5 $\pm$ 3*<br>8 <sup>b)</sup><br>10 <sup>b)</sup> | 3 $\pm$ 2 <sup>a)</sup><br>5 <sup>b)</sup><br>8 <sup>b)</sup> | 28 $\pm$ 22 <sup>a)</sup><br>20 <sup>b)</sup><br>91 <sup>b)</sup> | 26 $\pm$ 19 <sup>a)</sup><br>23 <sup>b)</sup><br>89 <sup>b)</sup> |
| b)ISO + IBMX / ISO+ IBMX<br>n = 4       | 44 $\pm$ 5   | 26 $\pm$ 4   | 45 $\pm$ 9  | -  | -   | 21 $\pm$ 4  | 33 $\pm$ 4  | 82 $\pm$ 9  | 81 $\pm$ 12   |
| c) ANG / CPA + ANG<br>n = 4             | 41 $\pm$ 7   | 28 $\pm$ 4   | 17 $\pm$ 3  | 46 $\pm$ 3   | 0   | 16 $\pm$ 2  | 11 $\pm$ 4  | 62 $\pm$ 24   | 62 $\pm$ 8  |
| d)ANG / ANG<br>n = 5                    | 39 $\pm$ 8   | 37 $\pm$ 7   | 32 $\pm$ 7  | -  | -   | 32 $\pm$ 5  | 30 $\pm$ 8  | 91 $\pm$ 6  | 93 $\pm$ 5  |

<sup>a)</sup> alle Experimente incl. der, die nach CPA-Gabe nicht mehr reagiert haben

<sup>b)</sup> von n = 4 haben nach CPA-Gabe zwei Gefäße noch auf Isoprenalin + IBMX reagiert; diese sind hier einzeln aufgeführt

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  lag in diesen Experimenten bei 49  $\pm$  8 nM (Tab. 3.14, a) bzw. 41  $\pm$  7 nM (Tab. 3.14, c).

CPA (10  $\mu$ M) erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  um 74  $\pm$  9 nM (a) bzw. 46  $\pm$  3 nM (Tab. 3.14, c). In einigen Fällen kam es sofort nach Erreichen des maximalen Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CPA zu einem leichten Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$ , nach sieben Minuten war aber ein stabiles Niveau erreicht. Bezogen auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  zu Versuchsbeginn war dies eine Erhöhung um 160  $\pm$  19 % (a) bzw. 119  $\pm$  9 % (Tab. 3.14c).

Nach Gabe von CPA war der Effekt von Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) deutlich in der Größe (Tab. 3.14) und der Anstieghäufigkeit verringert. Von vier Gefäßen reagierten noch zwei auf Stimulation mit Isoprenalin + IBMX. Nach Auswaschen der CPA konnte durch Isoprenalin + IBMX wieder ein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöst werden (Abb. 3.16a).

ANG II (3nM) erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe von CPA regelmäßig in jedem Experiment (n = 4). Bezogen auf den ersten Peak betrug diese Erhöhung 62  $\pm$  24 % (Peakgröße) bzw. 62  $\pm$  8 % (Peakfläche). Sogar eine zweite Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  mit ANG II (3nM) war möglich (n = 2) (Abb. 3.16b). Dennoch ist die Antwort kleiner als nach früheren ANG II-Doppelstimulationen erwartet.

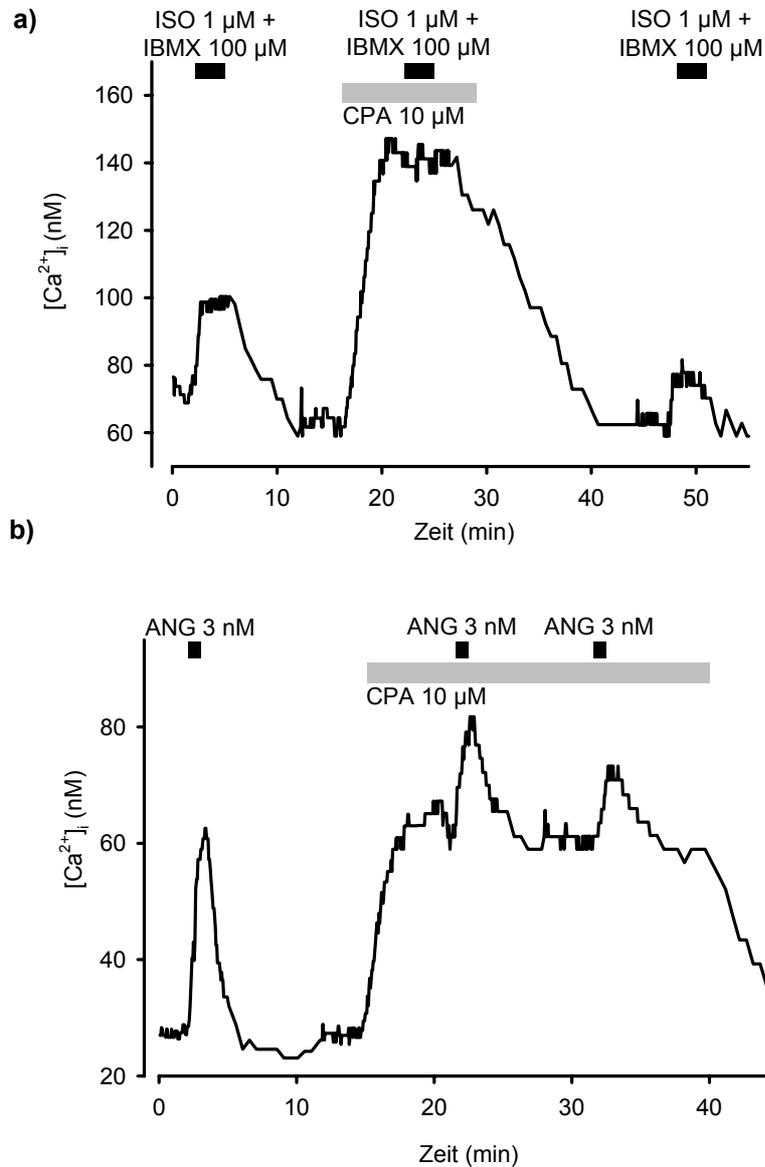


Abb. 3.16 Einfluss des  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibitors CPA auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit ISO + IBMX (a) oder ANG II (b)

a) CPA (10  $\mu$ M) erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  hier stark; ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ließ sich mit ISO (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) nicht mehr auslösen. Nach Auswaschen von CPA konnte wieder eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO + IBMX erzielt werden.

b) Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) nach CPA-Gabe war auch mehrfach hintereinander möglich, allerdings sind die Antworten hier kleiner.

Der absolute Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) ist durch Thapsigargin (1  $\mu$ M; 3 min + 100 nM; 4 min;  $96 \pm 6$  nM, n = 22; basales  $[Ca^{2+}]_i$   $54 \pm 4$  nM) signifikant stärker ( $p < 0,01$ ) als durch CPA (10  $\mu$ M; 7 min;  $60 \pm 7$  nM, n = 8; basales  $[Ca^{2+}]_i$   $44 \pm 5$  nM) (ohne Tab. 3.13, c: d, unverhältnismäßig großer primärer Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II).

Wird die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf die jeweils vorausgegangene basale  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen, so ist allerdings kein signifikanter Unterschied zu erkennen ( $p > 0,05$ ). CPA erhöht  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  um  $140 \pm 12 \%$  ( $n = 8$ ), Thapsigargin um  $198 \pm 21 \%$  ( $n = 22$ ).

Fazit dieser Versuche ist, dass nach Blockade der sarkoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -ATPase Isoprenalin + IBMX nur noch selten und stark abgeschwächt  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht. ANG II führt auch weiterhin regelmäßig zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , der jedoch ebenfalls abgeschwächt ist. Es bleibt festzustellen, dass die Wirkung der CPA schwächer ist als die von Thapsigargin; vermutlich bewirkt CPA in der verwendeten Konzentration nur eine partielle Inhibition der  $Ca^{2+}$ -ATPase.

### 3.2.5.1.3 Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin + IBMX bei erhöhter Ausgangs- $Ca^{2+}$ -Konzentration

Die Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPasen verhinderte oder reduzierte den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Isoprenalin + IBMX; sie erhöhte aber auch selbst  $[Ca^{2+}]_i$ , so dass die zweite Stimulation auf einer stark erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  als Ausgangslage erfolgte. Daher sollte hier die Frage beantwortet werden, ob eine hohe Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$  die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX verhindert oder sogar den Effekt umkehrt. Dazu wurde  $[Ca^{2+}]_i$  durch Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM erhöht.

Zunächst wurde wieder zur Kontrolle mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) für 3 Minuten stimuliert. Nach Auswaschphase erfolgte Superfusion mit 20 mM- $Ca^{2+}$ -haltigem Medium für 7 Minuten bis zum Erreichen eines stabilen  $[Ca^{2+}]_i$ -Niveaus, worauf dann mit Isoprenalin + IBMX für 3 Minuten superfundiert wurde (Abb. 3.17).

Tab. 3.15 Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) nach Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM

| Stimulation                              | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | AUC 1 (mg) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 | Anstieg $[Ca^{2+}]_o$ =20mM (nM) | $Ca^{2+}$ -Abfall (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | AUC 2 (mg)  | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) | AUC (%)     |
|--|-------------------------|---------------------------|------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| ISO+IBMX bei $[Ca^{2+}]_o$ = 20mM; n = 4 | 42 $\pm$ 6              | 25 $\pm$ 5                | 37 $\pm$ 9 | 41 $\pm$ 4              | 42 $\pm$ 2                       | 7 $\pm$ 2              | 21 $\pm$ 5                | 33 $\pm$ 11 | 81 $\pm$ 8               | 88 $\pm$ 10 |
| ISO+IBMX n = 4                           | 44 $\pm$ 5              | 26 $\pm$ 4                | 45 $\pm$ 9 | 45 $\pm$ 7              | 0                                | 0                      | 21 $\pm$ 4                | 33 $\pm$ 4  | 82 $\pm$ 9               | 81 $\pm$ 12 |

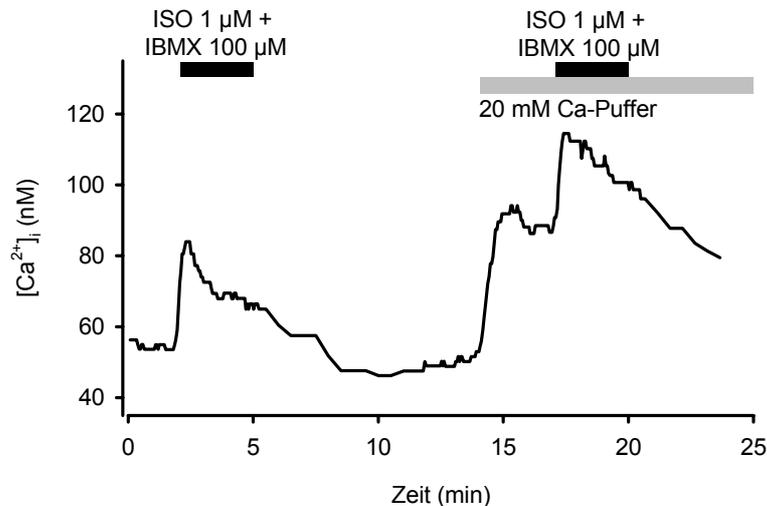


Abb. 3.17 Effekt einer cAMP-Stimulation auf  $[Ca^{2+}]_i$  bei erhöhter Ausgangs- $Ca^{2+}$ -Konzentration  
Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM bewirkte intrazellulär einen Anstieg um 40 nM. Anschließend war eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) weiterhin möglich und lag, bezogen auf den primären Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , in der gleichen Größenordnung wie eine zweite Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX in normaler HEPES-gepufferter physiologische Salzlösung.

Bei  $n = 4$  erhöhte Isoprenalin (1  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) auch in 20 mM  $Ca^{2+}$ -haltigem Medium weiterhin  $[Ca^{2+}]_i$ , der Effekt war unverändert.

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  lag hier bei  $42 \pm 6$  nM ( $n = 4$ ). Die erste Stimulation mit Isoprenalin + IBMX erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  um  $25 \pm 5$  nM. Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM bewirkte einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um  $41 \pm 2$  nM auf  $83 \pm 5$  nM, was bezogen auf die Ausgangs- $[Ca^{2+}]_i$  ungefähr 100 % entspricht. Isoprenalin + IBMX erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  auch weiterhin regelmäßig um  $21 \pm 5$  nM, was bezogen auf den ersten Peak  $81 \pm 8$  % entspricht (Abb. 3.17). Auch die Peakfläche des zweiten Peaks bezogen auf den ersten Peak lag mit  $88 \pm 10$  % in der gleichen Größenordnung. Aus Isoprenalin + IBMX-Doppelstimulationsversuchen in anderen Versuchsreihen geht hervor, dass auch bei unbehandelten Isoprenalin + IBMX Doppelstimulationen der zweite Puls bezogen auf den ersten  $81 \pm 9$  % (Peakgröße) bzw.  $81 \pm 12$  % (Peakfläche) betrug.

### 3.2.6 Einfluss von cAMP auf $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen der Maus

Die in 3.2 beschriebenen Ergebnisse an der Ratte stehen im Widerspruch zu den Messungen von Kornfeld et al. (2000), die an microdissezierten Glomerula mit langen afferenten und efferenten Arteriolen des Kaninchens keinen Einfluss einer  $\beta$ -Adrenozeptor-Stimulation auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Ruhe zeigen konnten, dafür jedoch eine Hemmung des durch Noradrenalin stimulierten Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin. Sie sind weiterhin nur schwer in Einklang zu bringen mit dem „Calciumparadox“ (Kap. 1.3.1.1), nach dem Reninsekretion und  $[Ca^{2+}]_i$  sich invers verhalten. Dass Forskolin, Isoprenalin und cAMP die Reninsekretion stimulieren, ist mehrfach beschrieben worden (Kap. 1.3.1.3).

Deshalb sollte in dem folgenden Versuchsansatz geklärt werden, ob dieser hier gezeigte Unterschied in der Reaktion artspezifisch ist. Dazu wurden zwei verschiedene Mausstämme untersucht; auch der Einfluss von zwei verschiedenen Kochsalzdiäten wurde überprüft.

cAMP wurde ebenfalls wie in den Versuchen an der Ratte durch Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren mit Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) in der afferenten Arteriole erhöht.

#### a) Standard-NaCl-Diät

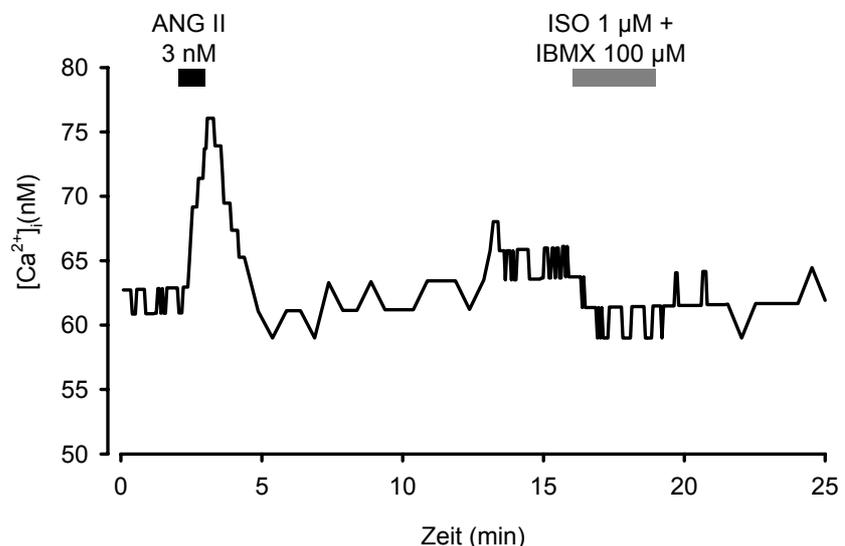
**CD-1 Mäuse:** Es wurden afferente Arteriolen aus Nieren von CD-1 Mäuse (Auszuchtstamm, wie Sprague-Dawley-Ratten) untersucht, die eine normale Kochsalzdiät erhalten hatten.

Gearbeitet wurde in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS). Verwendet wurde das Doppelstimulationsprotokoll, bei dem zur Minute 1 - 2 mit ANG II ( $3\text{nM}$ ) und zu Minute 15 - 18 mit Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) stimuliert wurde (Abb. 3.18).

Abb. 3.18 Einfluss einer cAMP-Stimulation auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Maus

ANG II ( $3 \text{ nM}$ ) löste in reninsezernierenden Zellen der Maus (CD-1 Mäuse, NaCl-Standard-Diät) eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  aus, Iso-prenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX

( $100 \mu\text{M}$ ) ( $n = 12$ ) hingegen nicht, bzw. kam es sogar zu einem leichten Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$ .



Tab. 3.16 Einfluss der Erhöhung von cAMP durch Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) in der afferenten Arteriole der CD1-Maus auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

| Stimulation         | Versuchsanzahl n | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ (%) |
|---------------------|------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| ANG II / ISO + IBMX | 12               | $68 \pm 6$                          | $21 \pm 3$                       | $76 \pm 6$                          | 0                                | 0                               |
| ANG II / ANG II     | 5                | $82 \pm 6$                          | $19 \pm 3$                       | $83 \pm 6$                          | $17 \pm 2$                       | $88 \pm 5$                      |

Das Doppelstimulationsprotokoll war in dieser Experimentreihe auch für die Messungen an den afferenten Arteriolen der Mausniere der CD-1 Mäuse möglich.

Bei basalem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $82 \pm 6$  nM (n = 5) erhöhte ANG II  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei einer ersten Stimulation um  $19 \pm 3$  nM. Eine zweite Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch ANG II ließ sich immer auslösen, sie betrug  $17 \pm 2$  nM, was bezogen auf die erste  $88 \pm 5$  % sind.

Isoprenalin + IBMX erhöhte die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im distalen Teil der afferenten Arteriole der Mausniere nicht. Bei einer basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $68 \pm 6$  nM erhöhte eine erste ANG II-Gabe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $21 \pm 3$  nM (n = 12, 5 verschiedene Tiere). Eine zweite dreiminütige Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) -Stimulation führte in keinem Fall zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (basales  $[\text{Ca}^{2+}]_i$   $76 \pm 6$  nM). In zwei Fällen sank  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sogar leicht ab (Abb. 3.18).

**C57 Mäuse:** Dasselbe Ergebnis wurde bei einem weiteren Mausstamm, dem Inzuchtstamm C57, unter Normalkochsalzdiät, gefunden (n = 2; Daten nicht gezeigt).

#### b) NaCl-arme Diät

**C57 Mäuse:** Da die Vergleichsexperimente an der Ratte an kochsalzarm-ernährten Tieren durchgeführt wurden, wurden im folgenden Versuche an C57 Mäusen durchgeführt, die nach Furosemid-Injektion (2,5mg / 100g) für mindestens zwei Wochen eine kochsalzarme Diät erhalten hatten. Grund dafür ist, wie unter 3.1 beschrieben, die Stimulation des RAAS unter NaCl-armer Diät.

Verwendet wurde wieder das Doppelpulsprotokoll, bei dem zu Minute 1 - 2 ANG II (3nM) gegeben wurde und nach einer Auswaschphase zu Minute 15 - 18 Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ). Zur Kontrolle erfolgte wieder eine ANG II-Doppelstimulation.

Tab. 3.17 Einfluss von Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in der afferenten Arteriole der C57-Maus, NaCl-arm ernährt

| Stimulation            | Versuchsanzahl n | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ (%) |
|------------------------|------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| a) ANG II / ISO + IBMX | 11               | $50 \pm 3$                          | $18 \pm 2$                       | $53 \pm 3$                          | 0                                | 0                               |
| b) ANG II / ANG II     | 11               | $63 \pm 6$                          | $24 \pm 4$                       | $64 \pm 6$                          | $20 \pm 3$                       | $88 \pm 10$                     |

Der Mittelwert von basalem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in allen an NaCl-arm-ernährten C57 Mäusen lag bei  $57 \pm 4$  nM (n = 22).

ANG II (3nM)-Stimulation bewirkte eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die bei  $18 \pm 2$  nM (Versuchsreihe a) bzw.  $24 \pm 4$  nM (Versuchsreihe b) lag. Eine zweite ANG II-Stimulation erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $20 \pm 3$  nM, was bezogen auf den ersten Peak  $88 \pm 10$  % entspricht (n = 11).

Wurde als zweites Isoprenalin (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) gegeben, was bei den Ratten regelmäßig zu einer Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führte, wurde in der afferenten Arteriole der C57-Maus keine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beobachtet (n = 11).

Die afferenten Arteriolen aus der Niere von Mäusen reagieren, unabhängig davon, aus welchem Stamm sie isoliert wurden (Inzuchtstamm C57 oder Auszuchtstamm CD1), nach diesen Experimenten nicht mit einer Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf Stimulation mit Isoproterenol (1  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ). Auch ist kein Unterschied zwischen NaCl-armer und Standard-Kochsalzdiät festzustellen.

### 3.3 Wirkung von Adenosin und Adenosin-Analogen auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole

Dem in der Niere als Vasokonstriktor wirkenden Adenosin kommt im RAAS eine wichtige Bedeutung zu: Es hemmt die Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates (Kap. 1.3.2, Osswald et al., 1978; Churchill und Churchill, 1985). Aus vielen *in vivo* und *in vitro* Studien geht hervor, dass die Hemmung der Reninsekretion über die Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren vermittelt wird (Kap. 1.3.2). Reninsekretion und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sind invers miteinander verknüpft („Calciumparadox“, Kap. 1.3.1.1), so dass die Frage besteht, ob die reninsekretionshemmende Wirkung von Adenosin über die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vermittelt wird. Gutierrez et al. (1999) konnten an der afferenten Arteriole des Kaninchens zeigen, dass Adenosin (100  $\mu\text{M}$ ) zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führt.

Hier sollte jetzt untersucht werden, ob Adenosin auch in den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole von Ratten und Mäusen einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirkt.

#### 3.3.1 Effekte von exogenem Adenosin auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte

Adenosin (ADO) wurde in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M bis  $10^{-5}$  M getestet. Zu Beginn wurde immer eine Stimulation mit ANG II in einer Konzentration 3 nM für eine Minute durchgeführt. Die Größe dieser durch ANG II (3 nM) ausgelösten primären Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (= Peak) diente bei der Auswertung als interner Standard. Wenn die Zellen reagierten, wurde nach einer genügenden Auswaschzeit (13 min) Adenosin gegeben, ebenfalls für 1 min (Abb. 3.19). Angegeben sind Peakhöhe und Fläche in % des Kontroll-Angiotensin II-Pulses ( $[\%]_{\text{ANG}}$ ) (vgl. Kap. 2.2.3.2c, Abb. 2.6).

Adenosin konnte in Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  keine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirken. Darüber reagierten von neun Gefäßen zwei auf Adenosin-Stimulation mit einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Tab. 3.18, Abb. 3.21). Bei diesem beobachteten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf Adenosin-Stimulation betrug die Peakfläche des Adenosinpeaks 21 % von der Fläche des ANG II-Peaks. Ebenso verhielt es sich mit der Peakhöhe.

Tab. 3.18 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit Adenosin

| Konz. (M) | Versuchsanzahl n | Ergebnis         | Höhe ADO-Puls ( $[\%]_{ANG}$ ) alle / Responder | Fläche ADO-Puls ( $[\%]_{ANG}$ ) alle / Responder |
|-----------|------------------|------------------|---|---|
| $10^{-8}$ | 4                | alle negativ     | 0 / 0   | 0 / 0   |
| $10^{-7}$ | 4                | alle negativ     | 0 / 0   | 0 / 0   |
| $10^{-6}$ | 3                | 2 x neg, 1 x pos | $17 \pm 17 / 52$                                | $7 \pm 7 / 21$                                    |
| $10^{-5}$ | 6                | 5 x neg, 1 x pos | $6 \pm 6 / 34$                                  | $4 \pm 4 / 21$                                    |

negativ = kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$

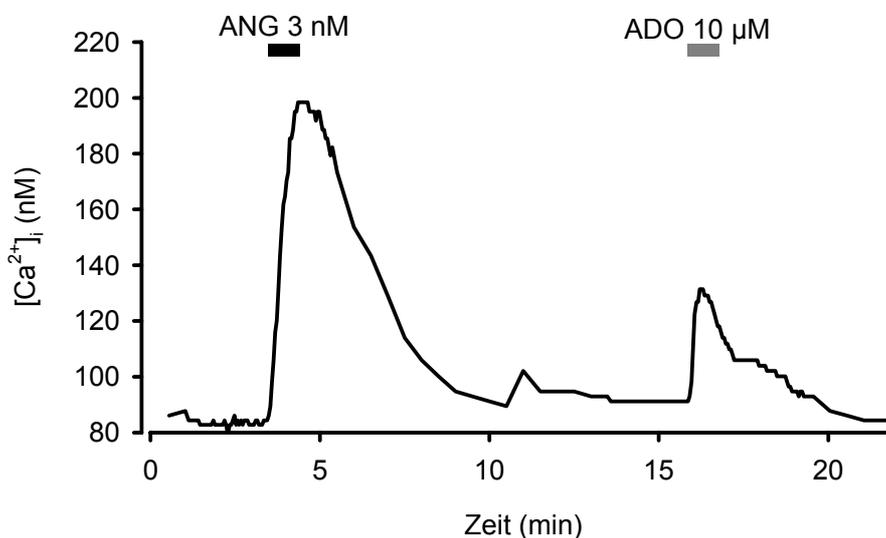


Abb. 3.19 Einfluss von Adenosin auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte. Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ADO ( $10 \mu M$ ) für eine Minute nach Standard-ANG II-Stimulation ( $3 \text{ nM}$ ,  $1 \text{ min}$ ). Bei  $n = 6$  erhöhte ADO jedoch nur in dem gezeigten Fall  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 3.3.2 Effekte von N<sup>6</sup>-Cyclohexyladenosin (CHA) auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in reninsezernierenden Zellen der Ratte und Versuche zur Antwortverbesserung

#### 3.3.2.1 Effekt von CHA auf $[Ca^{2+}]_i$ unter Standardbedingungen

Da Adenosin über  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptoren in Bezug auf die Reninsekretion gegenläufige Effekte bewirkt (Churchill und Churchill, 1984), in den reninsezernierenden Zellen aber der  $A_1$ -Rezeptor dominiert (Jackson et al., 2002), wurden die weiteren Versuche mit dem spezifischen Adenosin  $A_1$ -Agonisten N<sup>6</sup>-Cyclohexyladenosin (CHA) durchgeführt, das eine 500-fache Selektivität für den Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren hat (Collis und Hourani, 1993).

Versuchsdurchführung und qualitative Auswertung sind in Kap. 3.3.1 beschrieben. Gearbeitet wurde mit dem Doppelstimulationsprotokoll, bei dem zu Minute 2 - 3 die Standard-ANG II-Stimulation (3 nM) erfolgte, und nach Auswaschphase zu Minute 15 - 16 CHA gegeben wurde (Abb. 3.20). Zur Auswertung wurden hier nur die Peakflächen herangezogen, die konsistentere Ergebnisse lieferten. Beide Agonisten wurden für 1 Minute gegeben, so dass ein direkter Vergleich möglich war. Da  $[Ca^{2+}]_i$  zum Teil sehr schnell anstieg und ebenso schnell wieder abfiel, bestand die Gefahr, dass der Peak messtechnisch nicht gut erfasst wurde, so dass die Fläche einen genaueren Wert lieferte.

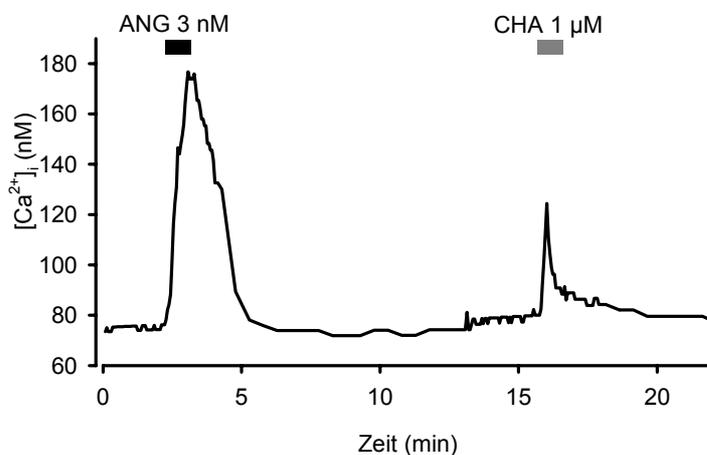


Abb. 3.20 Einfluss von CHA auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reinsezernierenden Zellen der Ratte  
Gabe von CHA (1  $\mu$ M) für 1 Minute nach Standard-ANG II -Stimulation (3 nM, 1 min) bewirkte in 50 % der Fälle eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (vgl. Tab. 3.19).

Tab. 3.19 Ergebnisse bei folgenden CHA-Konzentrationen:

| Konz. (M)   | Stimulationszeit (min) | Versuchs-anzahl n | Ergebnis            | Fläche CHA-Puls ( $[\%]_{ANG}$ ) alle / Responder |
|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|---|
| $10^{-8}$   | 1                      | 5                 | 4 x neg , 1 x pos   | $2,2 \pm 2,2 / 11$                                |
| $10^{-7}$   | 5                      | 4                 | 2 x neg , 2 x pos   | $39 \pm 25 / 78 \pm 27$                           |
| $10^{-7}$   | 1                      | 11                | 7 x neg , 4 x pos   | $6 \pm 3 / 16 \pm 3$                              |
| $10^{-6} *$ | 1                      | 3                 | 3 x pos             | $43 \pm 7 / 43 \pm 7$                             |
| $10^{-6}$   | 1                      | 22                | 11 x neg , 11 x pos | $20 \pm 6 / 40 \pm 11$                            |
| $10^{-5}$   | 1                      | 11                | 7 x neg , 4 x pos   | $7 \pm 4 / 18 \pm 9$                              |

negativ = keine Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$

\* Bei diesen Experimenten wurde CHA abweichend vom üblichen Protokoll als erstes gegeben, gefolgt vom ANG-Kontroll-Puls

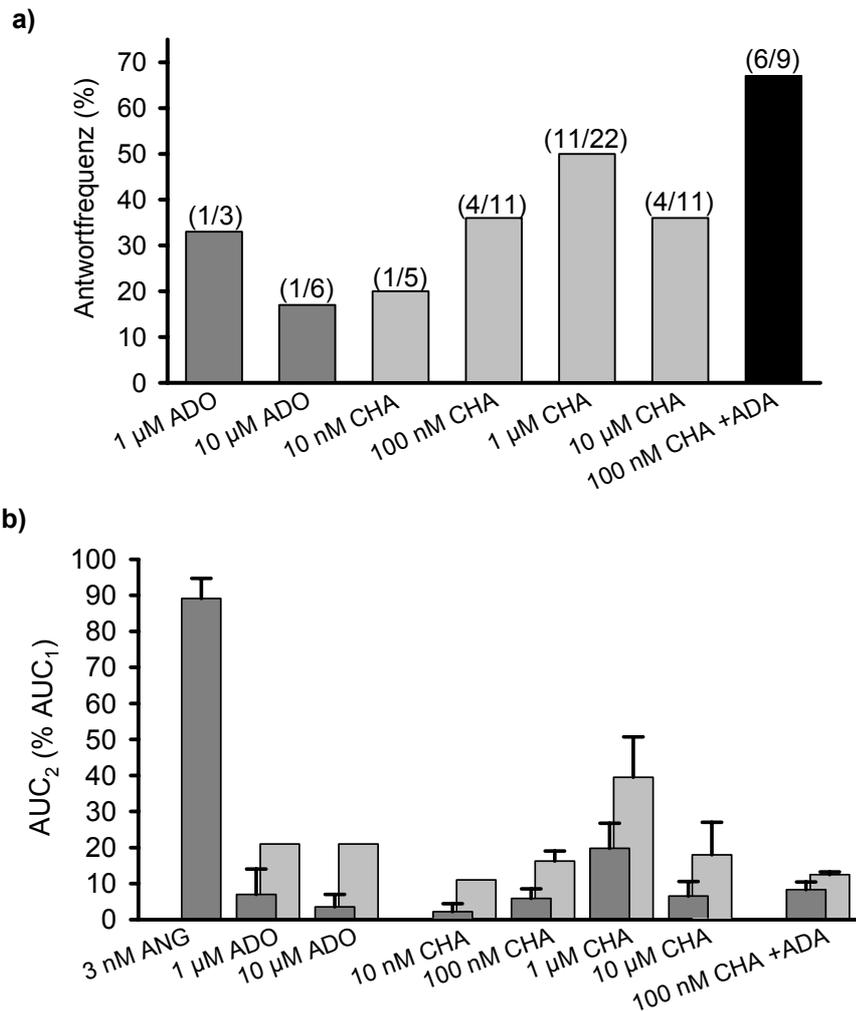


Abb. 3.21 Konzentrationsabhängigkeit der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ADO und den ADO  $A_1$ -Agonisten CHA

a) Von 10 nM - 1  $\mu$ M CHA stieg die Antwortfrequenz an, ab 10  $\mu$ M CHA reagierten wieder etwas weniger GefäÙe ( $p > 0,05$ ), ebenso bei ADO-Stimulation.

b) Auch die AntwortgröÙe (PeakfläÙe des behandelten Peaks bezogen auf ANG II (3 nM)-Peak) stieg bis 1  $\mu$ M an, danach kam es wieder zum Abfall (Vordergrund: alle Experimente, Hintergrund: nur Responder). Zum Vergleich ist die GröÙe der  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bei einer zweiten ANG II (3 nM)-Stimulation aufgetragen.

Die durch CHA bewirkte Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  war sehr uneinheitlich (Abb. 3.21). Nicht jedes GefäÙ reagiert auf Adenosin  $A_1$ -Rezeptorstimulation mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , weder mit Adenosin selbst (Kap.3.3.1) noch mit dem Adenosin  $A_1$ -Rezeptoragonisten CHA (Kap. 3.3.2). Bei steigender CHA-Konzentration (10 nM - 1  $\mu$ M) reagierten mehr GefäÙe mit einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung, oberhalb 1  $\mu$ M nahm die Responderquote leicht aber nicht signifikant wieder ab (Chi-Quadrat-Test,  $p > 0,5$ ) (Abb. 3.21a). Die gleiche Konzentrationsabhängigkeit zeigte auch die GröÙe der Antworten (Abb. 3.21b).

Die Peakfläche, die durch die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA erhalten wurde, betrug bei Einbeziehung aller Experimente  $6 \pm 3 \%$  ( $10^{-7} M$ ),  $20 \pm 11 \%$  ( $10^{-6} M$ , 2. Gabe),  $43 \pm 7 \%$  ( $10^{-6} M$ , 1. Appl.) und  $7 \pm 4 \%$  ( $10^{-5} M$ ) bezogen auf den ANG II-Kontrollpeak (Tab.3.19, Abb. 3.21b).

Allgemein war der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf Adenosin bzw.  $N^6$ -Cyclohexyladenosin sehr uneinheitlich. Viele Gefäße reagierten gar nicht und die Größe der Antwort schwankte von sehr kleinen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen bis zu Erhöhungen von  $[Ca^{2+}]_i$ , die größer war als die Antwort auf ANG II. Im Laufe der Arbeit fiel außerdem auf, dass die Antworthäufigkeit stark schwankte. Es gab Perioden, in denen überhaupt keine Antwort erhalten wurde, andererseits wieder Perioden, in denen die Antworthäufigkeit so verteilt war, wie in Abb. 3.21 dargestellt. Es konnte jedoch keine Korrelation zu den Jahreszeiten o. ä. festgestellt werden.

### 3.3.2.2 Überprüfung einer möglichen Verstärkung der Antwort auf CHA durch schonendere Collagenasebehandlung und Bicarbonatpuffer

Eine möglich Erklärung für die Variabilität der Antworten war, dass durch die lange Inkubation mit Collagenase (50 min) die Adenosinrezeptoren mehr oder weniger geschädigt würden. Die Inkubationszeit mit Collagenase wurde daher von bisher 50 Minuten auf 20 Minuten gesenkt. In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich überprüft, ob durch eine HEPES- gepufferte physiologische Salzlösung mit Bicarbonat (HEPES-PS-B, Kap. 2.1.2) ein verbessertes Antwortverhalten erreicht werden kann. Die Auswertung der Pulse erfolgte wie oben beschrieben.

Tab. 3.20 Ergebnisse der Stimulation durch CHA für 1 Minute:

| Konz. (M) | Versuchsanzahl n | Ergebnis          | Höhe CHA-Peak ( $[\%]_{ANG}$ ) alle / Responder | Fläche CHA-Peak ( $[\%]_{ANG}$ ) alle / Responder |
|-----------|------------------|-------------------|---|---|
| $10^{-6}$ | 12               | 6 x neg , 6 x pos | $10 \pm 4 / 19 \pm 5$                           | $3 \pm 1 / 6 \pm 2$                               |
| $10^{-5}$ | 7                | 4 x neg , 3 x pos | $8 \pm 4 / 19 \pm 5$                            | $2 \pm 1 / 5 \pm 2$                               |

negativ = kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$

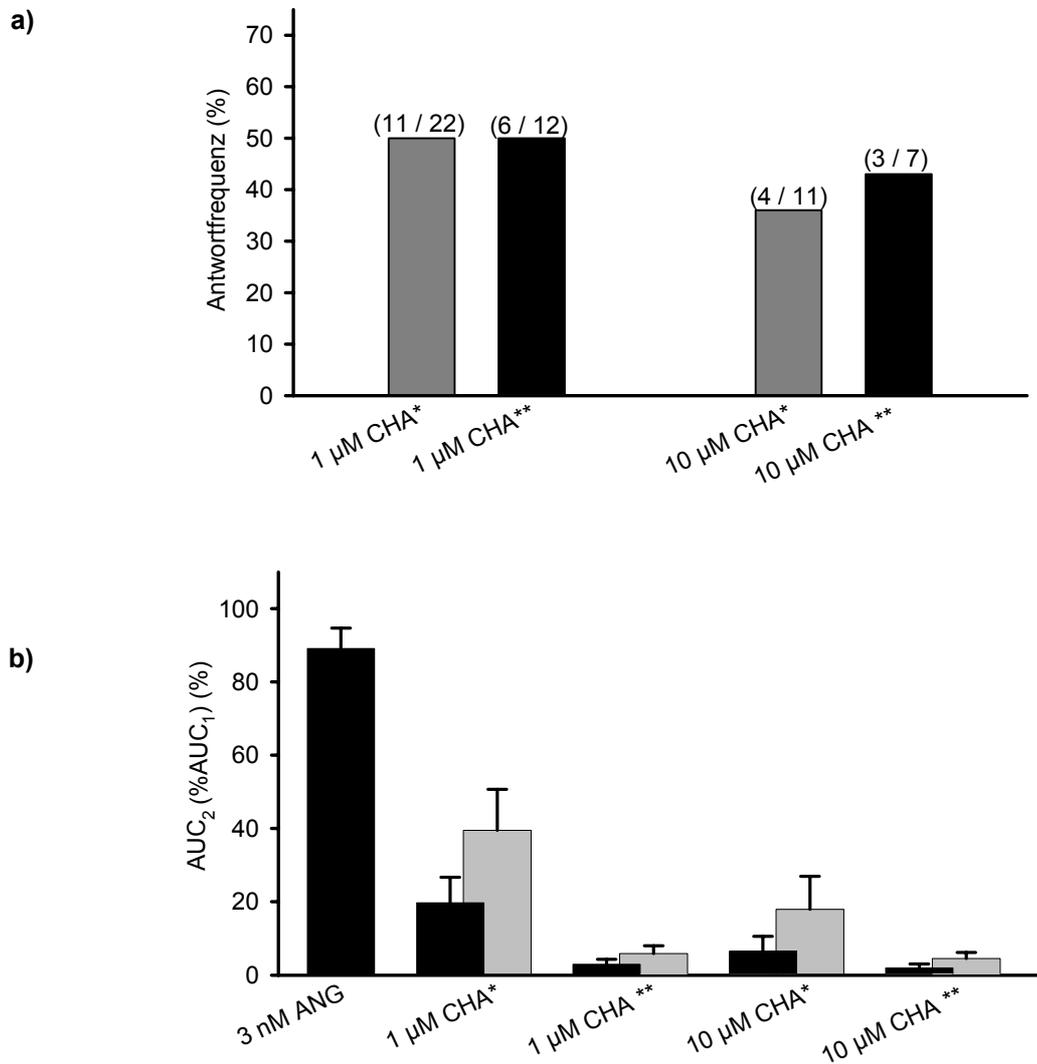


Abb. 3.22 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA in HEPES-gepufferter physiolog. Salzlösung (Na-HEPES-PS \*) bei einer Collagenasebehandlung von 50 min gegenüber der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Na-HEPES-PS + Bicarbonat \*\* und einer Collagenasebehandlung von 20 min.

a) Anzahl der Gefäße, die auf CHA mit  $[Ca^{2+}]_i$ -Steigerung reagieren

b) Größe der  $Ca^{2+}$ -Antwort bezogen auf ANG II (3 nM)-Kontrollpeak (schwarz: alle Experimente, grau: nur Responder) .

Die reduzierte Inkubationszeit mit Collagenase in Kombination mit der als physiologischer geltenden Pufferlösung (HEPES-PS-B, mit Bicarbonat) erbrachte keine Verbesserung (Abb. 3.22). Allerdings war in den positiven Fällen der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  mit  $6 \pm 2\%$  ( $10^{-6}$  M) bzw.  $5 \pm 2\%$  ( $10^{-5}$  M) in Bezug auf die Fläche bedeutend kleiner als bei den ursprünglichen Bedingungen (Tab.3.19, Abb. 3.21b). Es wurde daraufhin zurückgegangen zu den Ausgangsbedingungen:

-Collagenaseinkubation: 50 min

-HEPES-PS

Der Einfluss von CHA (0,1 mM für 5 min) auf  $[Ca^{2+}]_i$  wurde auch in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung mit Albumin (0,02 mg / ml) untersucht. Durch Zusatz von Albumin sollte eine Pufferlösung physiologischer sein, da das Gefäß im Verlauf des Versuchs weniger anschwillt. Hier kam es bei  $n = 9$  in keinem Fall zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , so dass im folgenden auch auf den Zusatz von Albumin verzichtet wurde.

### *3.3.2.3 Effekte von $N^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Blockade des $A_{2a}$ -Rezeptors mit ZM 241385*

Wie unter Kap. 3.3.2.1 beschrieben, ist CHA in geringen Konzentrationen ein selektiver Adenosin  $A_1$ -Rezeptoragonist. Es ist jedoch beschrieben, dass CHA biphasische Effekte hat (Churchill und Churchill, 1985). In der Konzentration von 10 nM bis 1  $\mu$ M hemmt CHA die Reninsekretion konzentrationsabhängig, bei höheren stimuliert es sie. In den unter Kap. 3.3.2.1 und 3.3.2.2 beschriebenen Experimenten wurden sehr schwankende Ergebnisse erhalten, die auf die Stimulation der Adenosin  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren durch CHA zurückzuführen sein könnten. Das Wirkungsmaximum der Adenosin  $A_1$ -Stimulation liegt bei 100 nM CHA, ab 1  $\mu$ M beginnt CHA den  $A_2$ -Rezeptor zu stimulieren (Churchill und Churchill, 1985). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Konzentrations-Wirkung-Kurve für die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ist demgegenüber um eine Zehnerpotenz nach rechts verschoben (Abb.3.21, Kap. 3.3.2.1).

Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren mit CHA (10  $\mu$ M) bei gleichzeitiger Blockade der Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren müsste dann zu einem starken  $A_1$ -rezeptorvermittelten Effekt führen. Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren werden eingeteilt in  $A_{2a}$ - und  $A_{2b}$ -Rezeptoren;  $A_{2a}$ -Rezeptoren vermitteln den entgegengesetzten Effekt zu  $A_1$ -Rezeptoren (Übersicht: Fredholm et al., 2001). In reninsezernierenden Zellen sind  $A_{2a}$ -Rezeptoren nachgewiesen (Jackson et al., 2002). Die Adenosin  $A_{2a}$ -Rezeptoren wurden hier mit dem potenten hochselektiven Adenosin  $A_{2a}$ -Rezeptorantagonisten ZM 241385 (Poucher et al., 1995; Klotz, 2000) blockiert.

Es wurde wieder das ANG II / CHA-Doppelstimulationsprotokoll verwendet, mit ZM 241385 wurde 3 min vor und während der zweiten Stimulation superfundiert.

Tab. 3.21 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren mit CHA (10  $\mu$ M) nach Blockade der Adenosin  $A_{2a}$ -Rezeptoren mit ZM 241385 (100 nM)

|   | Versuchs-<br>anzahl n | Ergebnis                 | Fläche CHA-Puls<br>( $[ \% ]_{ANG}$ )<br>alle Experimente | Fläche CHA-Puls<br>( $[ \% ]_{ANG}$ )<br>Responder |
|---|-----------------------|--------------------------|---|--|
| CHA 10 $\mu$ M +<br>ZM 241385 100<br>nM | 13                    | 10 x neg, 3 x pos (23 %) | $2,6 \pm 1,4$   | $11 \pm 2$   |
| CHA 10 $\mu$ M                          | 9                     | 7 x neg, 2 x pos (22 %)  | $3,2 \pm 2,2$   | $15 \pm 2$   |
| ANG II-Kontrolle                        | 6                     | 6 x pos                  | $108 \pm 11$  | $108 \pm 11$                                       |

negativ = kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$

Die Ergebnisse diese Experimente, dargestellt in Tab. 3.21, zeigen deutlich, dass ZM 241385 keine positive Wirkung bezüglich der Antwort auf CHA hat. ZM 241385 selbst hat in den Kontrollexperimenten keinen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$ . Basales  $[Ca^{2+}]_i$  lag in dieser Experimentreihe bei  $55 \pm 3$  nM (n = 28).

Aus den Kapiteln 3.3.2.1, 3.3.2.2 und 3.3.2.3 läßt sich zusammenfassend sagen, dass Adenosin in hohen Konzentrationen  $[Ca^{2+}]_i$  selten erhöht, in geringen Konzentrationen gar nicht. Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren mit CHA ist etwas regelmäßiger, allerdings wird bestenfalls eine Antwortfrequenz von 50 % erreicht. In verschiedenen Messreihen schwankte die Antworthäufigkeit sehr stark (vgl. Kap. 3.4.3.2). Bemühungen, die Variabilität der Antworten herabzusetzen (Kap. 3.3.2.2, 3.3.2.3) führten nicht zum Erfolg.

### 3.3.3 Einfluss von endogenem Adenosin auf basales $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen aus Nieren von Ratten

Unter physiologischen Bedingungen findet sich Adenosin im Nierengewebe in einer Konzentration von 10 - 100 nM. Adenosin hemmt über Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren die Renin-sekretion aus den reninsezernierenden Zellen (Kap. 1.3.2.2; Osswald et al., 1978; Churchill et al. 1985).

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren mit exogenem Adenosin (Kap. 3.3.1) und CHA (Kap. 3.3.2)  $[Ca^{2+}]_i$  erhöhen kann; jedoch tritt der Effekt unregelmässig auf.

Da der Adenosin  $A_1$ -Rezeptor schon durch nanomolare Mengen Adenosin stimuliert wird (Churchill und Churchill, 1985), könnte es sein, dass das endogene Adenosin die Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren stimuliert und so eine dauerhafte (tonische) Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt. Das verwendete Organ wird zwar permanent überströmt, so dass endogenes Adenosin weggespült werden sollte. Andererseits handelt es sich hier aber um ein komplexes System mit vielen Zellen, so dass endogenes Adenosin im Gewebe vorhanden sein könnte. Werden dann die Glomerula mit der afferenten Arteriole, und somit die reninsezernierenden Zellen, im Ruhezustand mit Adenosindesaminase (ADA) oder dem Adenosin  $A_1$ -Rezeptorantagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX) behandelt, sollte dies zu einem Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  führen.

Gearbeitet wurde hier an afferenten Arteriolen aus kochsalzarm ernährten Ratten in HEPES-gepufferter physiologischen Salzlösung (Na-HEPES-PS).

#### 3.3.3.1 Effekt von ADA auf basales $[Ca^{2+}]_i$

Zur Untersuchung des Einflusses von endogen vorhandenem Adenosin auf basales  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mit Adenosindesaminase (ADA; hochreine ADA, Roche Diagnostics, EC 3.5.4.4) in einer Konzentration von 4 U/ml von Minute 5 - 10 zur Entfernung von endogenem Adenosin perfundiert (A; Abb. 3.23a). Die Kontrolle (B) wurde mit der entsprechenden Menge Albumin (0,02 mg/ml) statt ADA durchgeführt zur Überprüfung, ob ein unspezifischer Eiweißeffekt vorliegt (Albinus et al., 1998). Da Adenosindesaminase in Glycerin (SL: 50 % Glycerin; Endkonzentration in Untersuchungslösung: 0,2 %) gelöst vorliegt, wurden Lösungsmittelkontrollen durchgeführt (Kontrolle (C) von Minute 5 - 10 Na-HEPES-PS mit Glycerin (0,2 %)).

Zur Auswertung der Experimente wurde  $[Ca^{2+}]_i$  in jeder Kurve über die Zeit von Minute 3 - 5 gemittelt und 100 % gesetzt. Dann wurden die Experimente der Gruppen (A, B, C) jeweils zusammengefasst und in je einer Kurve dargestellt (Abb. 3.23b).

Wie in Abb. 3.23b zu erkennen ist, kam es über die Zeit zu einem Anstieg von basalem  $[Ca^{2+}]_i$ . Vergleicht man dann die Mittelwerte von Minute 6 - 8 der Versuchsreihen A, B, C, war zwar eine Tendenz zu erahnen, die in die Richtung der oben aufgestellten Hypothese geht, aber die Unterschiede waren nicht signifikant (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Vergleicht man

hingegen (was nicht erlaubt ist) nur die ADA Kurve (A) mit der LM-Kontrolle (C), so wird der Effekt von ADA signifikant ( $p < 0.05$ ).

Tab. 3.22 Einfluss von Adenosindesaminase auf basales  $[Ca^{2+}]_i$

| Versuchsreihe     | Versuchsanzahl n | MW $\pm$ S.E.M. (%) |
|-------------------|------------------|---------------------|
| ADA               | 18               | 95 $\pm$ 2          |
| Albumin-Kontrolle | 16               | 99 $\pm$ 2          |
| Zeit-Kontrolle    | 10               | 103 $\pm$ 3         |

a)

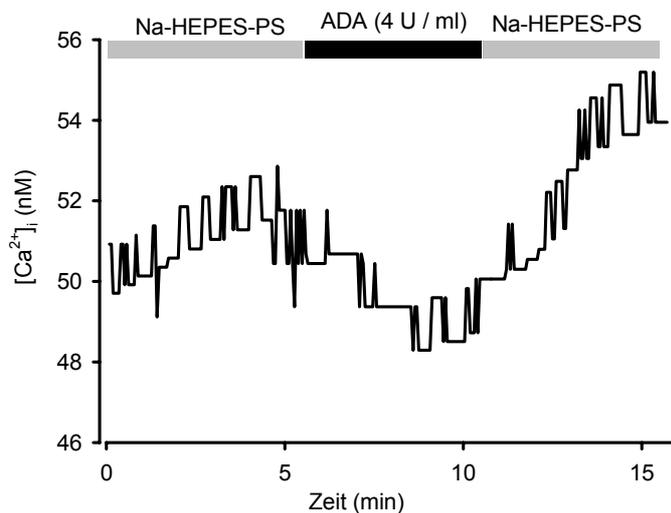
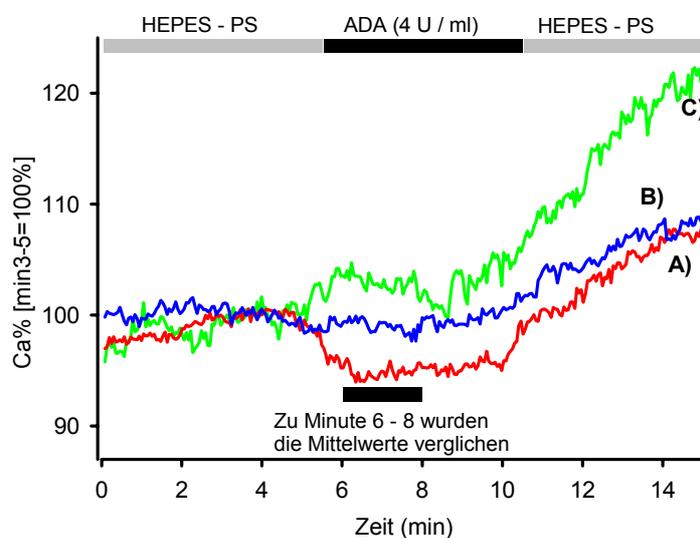


Abb. 3.23 Effekt von Adenosindesaminase zur Entfernung von endogenem Adenosin auf  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen

a) Durch Perfusion mit Adenosindesaminase (ADA) 4 U/ml für 5 Minuten wurde in diesem Experiment  $[Ca^{2+}]_i$  gesenkt.

b)



b) Die Spuren der Einzelerperimente wurden in Minute 3 - 5 auf 100 % normiert und gemittelt (vgl. Text);

A) ADA; n = 18;

B) Albumin; n = 16;

C) Lösungsmittelkontrollen; n = 10.

Vergleich der drei Mittelwerte zu Minute 6-8 ergab keinen signifikanten Unterschied (ANOVA  $p > 0,05$ ). Vergleich nur der Mittelwerte der ADA-Kurve (A) und der Zeitkontrolle (C) ergab einen signifikanten Unterschied (t-Test  $p < 0,05$ ).

### 3.3.3.2 Effekt von DPCPX auf basales $[Ca^{2+}]_i$

Eine weitere Möglichkeit, den endogenen Adenosin-Tonus nachzuweisen, besteht in der Blockade der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren. Hierzu wurde der Adenosin  $A_1$ -Antagonist DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin) in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Zu Minute 6 - 12 wurde mit DPCPX superfundiert (a). Als Zeit- und Lösungsmittelkontrolle (b) wurde von Minute 6 - 12 Na-HEPES-PS mit 0,5 % DMSO gegeben, da DPCPX in DMSO gelöst vorlag.

Zur Normierung der Experimente wurde  $[Ca^{2+}]_i$  jeweils von Minute 4 - 6 gemittelt und 100 % gesetzt. Die beiden Versuchsreihen (a, b) wurden dann getrennt gemittelt und als Kurven dargestellt (Abb. 3.24). Über die Zeit kam es auch hier zu einem Anstieg von basalem  $[Ca^{2+}]_i$ . Ein Absinken von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Adenosin  $A_1$ -Rezeptorhemmung ließ sich nicht nachweisen. Vergleicht man dann die Mittelwerte von Minute 8 - 12 der Versuchsreihen a und b, so war kein Unterschied zwischen Zeitkontrolle und DPCPX-Gabe erkennbar ( $p > 0,05$ ).

Tab. 3.23 Einfluss des Adenosin  $A_1$ -Rezeptorblockers DPCPX auf basales  $[Ca^{2+}]_i$

| Versuchsreihe | Anzahl der Versuche | MW $\pm$ S.E.M. (%) |
|---------------|---------------------|---------------------|
| DPCPX         | 11                  | 108 $\pm$ 2         |
| Kontrolle     | 12                  | 103 $\pm$ 2         |

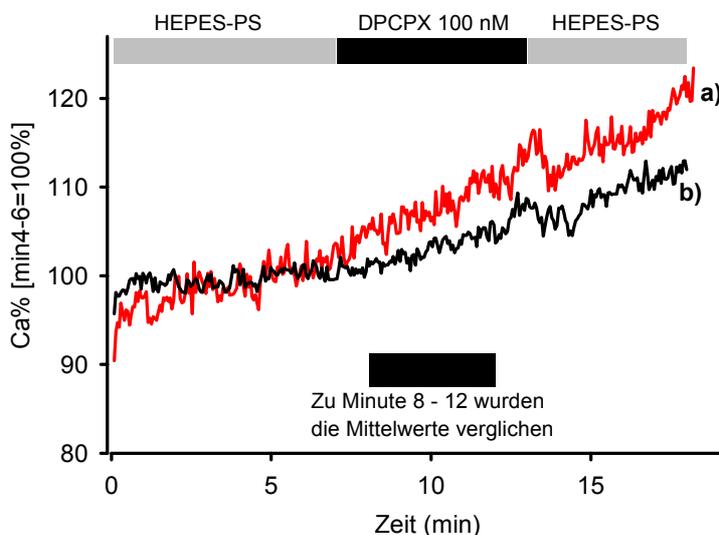


Abb. 3.24 Einfluß der Blockade der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren mit DPCPX auf  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen

Spuren der Einzelerperimente wurden in Minute 4-6 gemittelt und auf 100 % normiert; DPCPX (100 nM)  $n = 11$ ; b) Zeit-/ Lösungsmittelkontrolle (0,5 % DMSO, vgl. Text;  $n = 12$ ). Ein Absinken der  $[Ca^{2+}]_i$  durch DPCPX konnte nicht nachgewiesen werden.

Um eine Stimulation der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren völlig auszuschalten und so zu überprüfen, ob endogenes Adenosin einen Einfluss auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unter Ruhebedingungen hat, wurde auch Adenosindesaminase in Kombination mit DPCPX gegeben. Endogen vorhandenes Adenosin wird so gespalten und zusätzlich werden die Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren blockiert. Aber auch in dieser Kombination kam es nicht zu einem Absinken von basalem [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Als Fazit aus allen drei Versuchsansätzen kann also festgehalten werden, dass entweder endogenes Adenosin durch den permanenten Durchfluss weggespült wird oder aber, wenn es vorhanden ist, es keinen Einfluss auf die basale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den Zellen ausübt.

### 3.3.3.3 Möglicher Einfluss von endogenem Adenosin auf die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch CHA

In den bisherigen Experimenten (Kap. 3.3.3.1, 3.3.3.2) konnte nicht schlüssig gezeigt werden, dass der (vermutlich vorhandene) endogene Adenosin-Tonus [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Ruhe beeinflusst. In geringen Konzentrationen (10 - 100 nM) vorkommendes endogenes Adenosin könnte den Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor (der durch nanomolare Mengen Adenosin stimuliert wird) besetzen, so dass der A<sub>1</sub>-Agonist CHA nur eine abgeschwächte oder keine Wirkung haben könnte. Die Frage war also, ob durch den evtl. vorhandenen endogenen Adenosintonus das System bereits desensibilisiert ist. Hier sollte vor der Stimulation mit CHA (0,1 µM) endogenes Adenosin durch Zugabe von Adenosindesaminase (ADA) entfernt werden. In Kap. 3.3.3.1 wurde gezeigt, dass ADA (wenn überhaupt) nur einen vernachlässigbaren Effekt auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Ruhe hat.

Es wurde wieder mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet, bei dem zu Minute 1 - 2 die übliche ANG II (3 nM) Kontrollstimulation durchgeführt wurde. Nach einer Auswaschphase mit HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS) wurde ADA (2U/ml) zugesetzt, bevor dann zu Minute 19 - 20 mit CHA (100 nM) + ADA (2U/ml) perfundiert wurde.

|                |  |
|----------------|--|
| Minute 0 - 1   | HEPES                                    |
| Minute 1 - 2   | Angiotensin (3 x 10 <sup>-9</sup> )      |
| Minute 2 - 15  | HEPES                                    |
| Minute 15 - 19 | HEPES + Adenosindesaminase (ADA) (2U/ml) |
| Minute 19 - 20 | CHA (10 <sup>-7</sup> M) + ADA (2U/ml)   |
| Minute 20 - 24 | HEPES + ADA (2U/ml)                      |
| Minute 24 - 30 | HEPES                                    |

Tab. 3.24 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA nach Superfusion mit ADA (2U/ml; 4 min)

| Versuchsanzahl | Ergebnis          | Höhe CHA-Peak<br>( $[\%]_{ANG}$ ) | Fläche CHA-Peak<br>( $[\%]_{ANG}$ ) |
|----------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 9              | 3 x neg , 6 x pos | $16 \pm 4 / 25 \pm 2$             | $8 \pm 2 / 12 \pm 1$                |

negativ = kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$

Nach Vorbehandlung mit ADA scheint die Antworthäufigkeit auf CHA größer zu sein als in der früheren Serie (67 % vs. 36 %; Abb. 3.21a); die Größe der Antwort war jedoch ähnlich (bei basalem  $[Ca^{2+}]_i$  von  $50 \pm 10$  nM war die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA  $12 \pm 1$  % (Fläche;  $16 \pm 3$  % ohne ADA, vgl. Tab. 3.19) bzw.  $25 \pm 2$  % (Höhe) bezogen auf den ANG II-Kontrollpeak (Abb. 3.21b). Bezüglich der Antworthäufigkeit ist anzumerken, dass diese von Serie zu Serie schwankt. In dieser Versuchsreihe wurden keine Kontrollexperimente ohne ADA durchgeführt, so dass auf "historische" Kontrollen zurückgegriffen werden musste und eine sichere Schlussfolgerung nicht gezogen werden kann.

Angestrebt wurde mit diesen Experimenten eine Antwortfrequenz von 100 % zu erreichen. Dies gelang jedoch nicht. Aus diesem Grund wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt und es wurde auch nicht in allen weiteren Versuchen ADA zugesetzt.

### 3.4 Untersuchungen zum möglichen Synergismus zwischen Adenosin- und ANG II-Wirkung

ANG II (über den  $AT_1$ -Rezeptor) und Adenosin (über den  $A_1$ -Rezeptor) üben eine synergistische Wirkung auf die Konstriktion des Vas afferens aus (Kap. 1.3.2.3; Osswald und Spielmann, 1979; Weihprecht et al., 1994; Traynor et al., 1998). Bezüglich der Reninsekretion sind die Ergebnisse noch lückenhaft, obwohl auch hier ANG II seine reninsekretionshemmende Wirkung ohne die Anwesenheit von endogenem Adenosin nicht mehr zu entfalten scheint (PD Dr. Albinus, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, mündl. Mitteilung). Da über eine Synergie der beiden Agonisten bezüglich der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nichts bekannt ist, sollte dies hier untersucht werden.

Es ist klar, dass die Beantwortung dieser Frage durch die in Kap. 3.3.1 und 3.3.2 gezeigte Variabilität des Adenosin  $A_1$ -Rezeptorvermittelten Effektes schwierig ist. Daher wurden verschiedene Versuchsprotokolle angewandt, in denen entweder die Präparation durch Gabe

des ersten Agonisten für die Gabe des zweiten konditioniert wurde oder die beiden Agonisten ANG II + Adenosin oder CHA gleichzeitig geben wurden.

### 3.4.1 Effekte von CHA auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Vorstimulation mit Angiotensin

Die Konzentration des im System zirkulierenden ANG II liegt in der Größenordnung von  $\sim 0,1$  nM, und bei der Signalübertragung wirken Adenosin und ANG II zusammen. Daher wurde die Überlegung angestellt, ob eventuell ein regelmäßiger CHA-Effekt zu erzielen wäre, wenn die zu untersuchenden reninsezernierenden Zelle mit einer unterschwelligen Menge ANG II vorbehandelt werden. Für diese Hintergrundstimulation wurde ANG II in den Konzentrationen 0,03 nM und 0,1 nM eingesetzt.

Zunächst erfolgte eine Superfusion mit der geringen Konzentration ANG II, die bis zum Ende des Experiments beibehalten wurde. Auf dieser unterschwelligen ANG II-Konzentration wurde eine Doppelstimulation durchgeführt, bei der zunächst nach 3 Minuten eine primäre Stimulation mit ANG II (3 nM) für 1 Minute erfolgte; nach Auswaschen erfolgte die zweite Stimulation mit CHA (1  $\mu\text{M}$ ) bzw. als Kontrolle mit ANG II (3 nM; Abb. 3.25).

Tab. 3.25 Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch CHA nach vorheriger Stimulation mit unterschwelligen Mengen ANG II

| ANG II-Konz. (Hintergrund) (nM) | CHA-Konz. ( $\mu\text{M}$ ) | Versuchsanzahl n | Ergebnis          | Höhe CHA-Peak ( $[\%]_{\text{ANG}}$ ) | Fläche CHA-Peak ( $[\%]_{\text{ANG}}$ ) |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------------|---|
| 0,1                             | 10                          | 5                | 2 x neg , 3 x pos | 163/31/14                             | 97/9/6                                  |
| 0,03                            | 1                           | 5                | 2 x neg , 3 x pos | 20/24/253                             | 12/15/116                               |

negativ = keine Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  / positiv = Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Aufgrund der Heterogenität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf CHA-Stimulation sind hier die Einzelergebnisse der drei Gefäße, die eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zeigten, in Tab. 3.25 dargestellt. Eine zweite ANG II (3 nM)-Stimulation löste einen normalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aus, wie er auch ohne Hintergrundstimulation erhalten wurde.

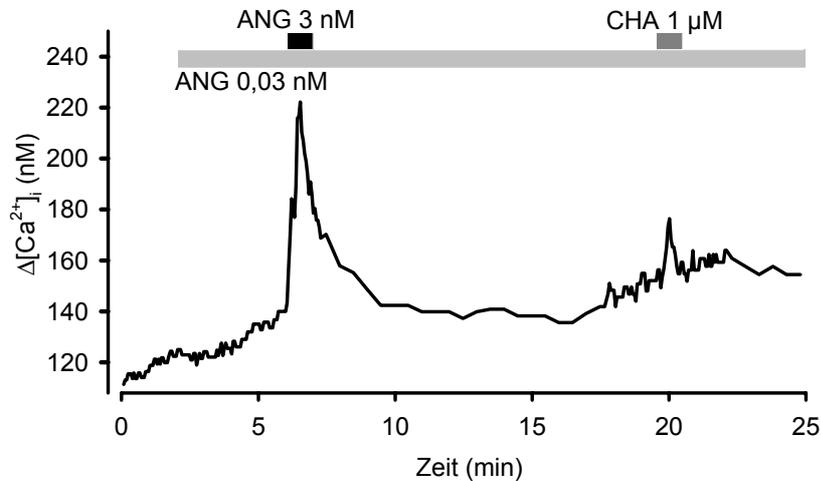


Abb. 3.25 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA (1  $\mu$ M) auf eine Hintergrundstimulation mit ANG II (0,03 nM) ( $n = 5$ ). Ein erster ANG II (3 nM)-Peak ließ sich in normaler Größe auf die Hintergrundstimulation auslösen. CHA (1  $\mu$ M) löste in diesem Fall eine kleine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  aus.

Die Hintergrundstimulation mit ANG II brachte keine wesentliche Verbesserung der CHA-Effekte (Abb. 3.25, Tab. 3.25). Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  schwankte auch unter diesen Bedingungen sehr stark. Der Effekt wurde hier zwar etwas häufiger beobachtet (Effekt in 60 % der Fälle bei  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M gegenüber 50 % bei  $10^{-6}$  M bzw. 36 % bei  $10^{-5}$  M ohne Hintergrundstimulation (Tab. 3.19); in dieser Experimentreihe wurde keine Stimulation mit CHA ohne Hintergrundstimulation durchgeführt, so dass auf historische Daten zurückgegriffen wurde), war aber ebenso wie unter den vorherigen Bedingungen nicht jedesmal vorhanden. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Dennoch kann man aus diesen Daten einen ersten Hinweis entnehmen, dass die konditionierende Stimulation mit kleinen ANG II-Konzentrationen die Antworthäufigkeit der Präparation auf CHA (1  $\mu$ M) verbessert, dass also eine Potenzierung vorliegen könnte.

### 3.4.2 Effekte von ANG auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Vorstimulation mit CHA

In dieser Serie wurde umgekehrt die Präparation nach einer ersten Stimulation mit ANG II für 1 min mit CHA (100 nM) für 4 Minuten vorstimuliert, bevor ANG II (3 nM) + CHA (100 nM) gemeinsam gegeben wurden (Abb. 3.26). Die qualitative Auswertung erfolgte wie oben bereits beschrieben. Auch hier wurden wieder Kontrollen mit CHA (100 nM) als zweite Gabe nach einer ersten Stimulation mit ANG II (3 nM) durchgeführt.

Tab. 3.26 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch gemeinsame Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (100 nM) nach vorheriger Stimulation mit CHA (100 nM)

| Stimulus                       | Peakhöhe<br>(relative Einheit)                     | Peakhöhe<br>([%] <sub>ANG</sub> )             | Fläche<br>(relative Einheit)                   | Fläche 2 <sup>A</sup><br>(relative Einheit) | Peakfläche<br>([%] <sub>ANG</sub> )            | Peakfläche 2 <sup>B</sup><br>([%] <sub>ANG</sub> ) |
|--------------------------------|--|---|--|---|--|--|
| ANG II (1. Appl.)              | 6,0 ± 0,3  |   | 53 ± 5   |   |  |  |
| ANG II (2. Appl.)              | 5,0 ± 0,3  | 84 ± 4  | 51 ± 6   |   | 94 ± 7   |  |
| n = 10                         |  |   |  |   |  |  |
| ANG II (1. Appl.)              | 5,3 ± 0,3  |   | 44 ± 2   |   |  |  |
| CHA (2. Appl.)                 | 1,2 <sup>1)</sup> /<br>0,3 ± 0,3 <sup>2)</sup>     | 26 <sup>1)</sup> /<br>7 ± 7 <sup>2)</sup>     | 8 <sup>1)</sup> /<br>2 ± 2 <sup>2)</sup>       |   | 16 <sup>1)</sup> /<br>4 ± 4 <sup>2)</sup>      |  |
| n = 4<br>1 Res.                |  |   |  |   |  |  |
| ANG II (1. Appl.)              | 5,3 ± 0,4  |   | 51 ± 5   |   |  |  |
| CHA (4 min vorab: 6 x Antwort) | 1 ± 0,2 <sup>1)</sup> /<br>0,4 ± 0,2 <sup>2)</sup> | 20 ± 7 <sup>1)</sup> /<br>8 ± 4 <sup>2)</sup> | 30 ± 9 <sup>1)</sup> /<br>12 ± 5 <sup>2)</sup> |   | 30 ± 7 <sup>1)</sup> /<br>11 ± 5 <sup>2)</sup> |  |
| Mix (2. Appl.)                 | 5,6 ± 0,3  | 111 ± 9                                       | 58 ± 5   | 52 ± 4                                      | 118 ± 7  | 107 ± 7  |
| n = 13                         |  |   |  |   |  |  |

Mix = ANG II ( $3 \times 10^{-9}$  M) + CHA ( $10^{-7}$  M)

<sup>A</sup> Fläche der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CHA (100 nM) + ANG II (3 nM) ohne CHA-Sockel; <sup>B</sup> Peakfläche der Kombination ohne CHA-Sockel bezogen auf Peakfläche ANG II

<sup>1)</sup> Responder (Res.); <sup>2)</sup> alle Experimente

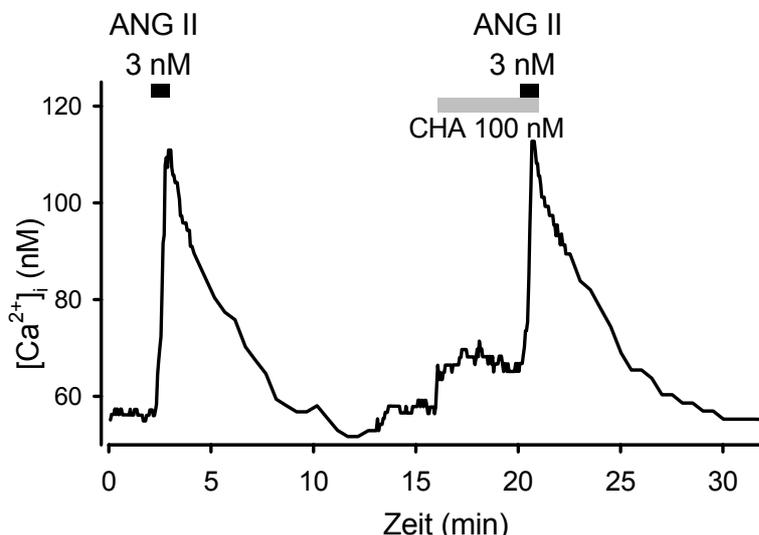


Abb. 3.26 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) auf eine Hintergrundstimulation mit CHA (100 nM) Nach primärer ANG II (3 nM)-Stimulation wurde für 4 min CHA (100 nM) alleine gegeben, bevor anschließend für 1 Minute mit ANG II (3 nM) + CHA (100 nM) stimuliert wurde (n = 13). Zur Auswertung wurden dann die durch CHA alleine verursachte  $Ca^{2+}$ -Erhöhung von dem Effekt der Kombination abgezogen (vgl. Text).

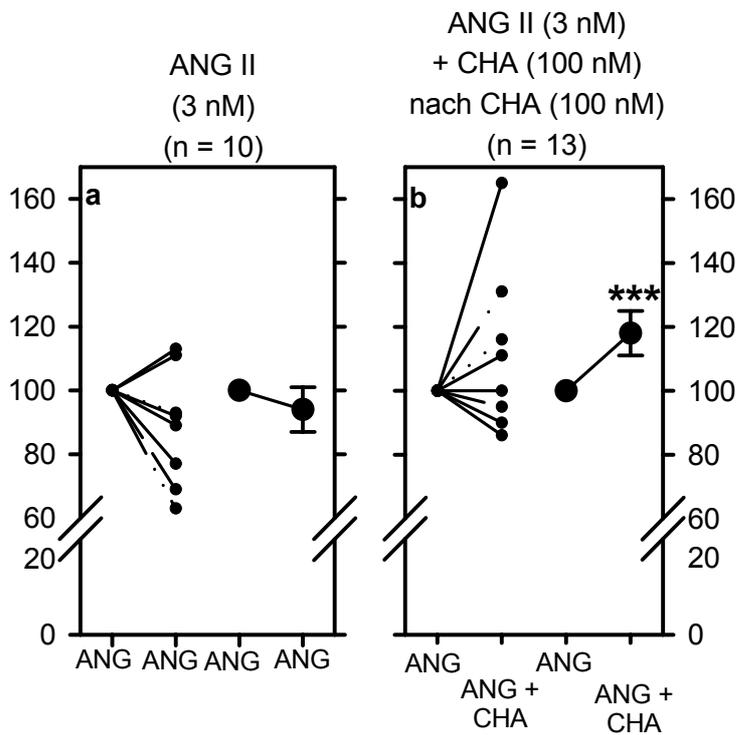


Abb. 3.27 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) kombiniert mit einer Hintergrundstimulation mit CHA (100 nM)

a) Eine zweite ANG II (3 nM) Stimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die leicht geringer war als der primäre ANG II-Peak ( $-6 \pm 7\%$ ;  $n = 10$ ). links: Einzelexperimente rechts: Mittelwerte

b) Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (100 nM) nach vorheriger CHA (100 nM)-Gabe und primärer ANG II-Stimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die signifikant größer war als die Kontrollstimulation (a) ( $+18 \pm 7\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 13$ ).

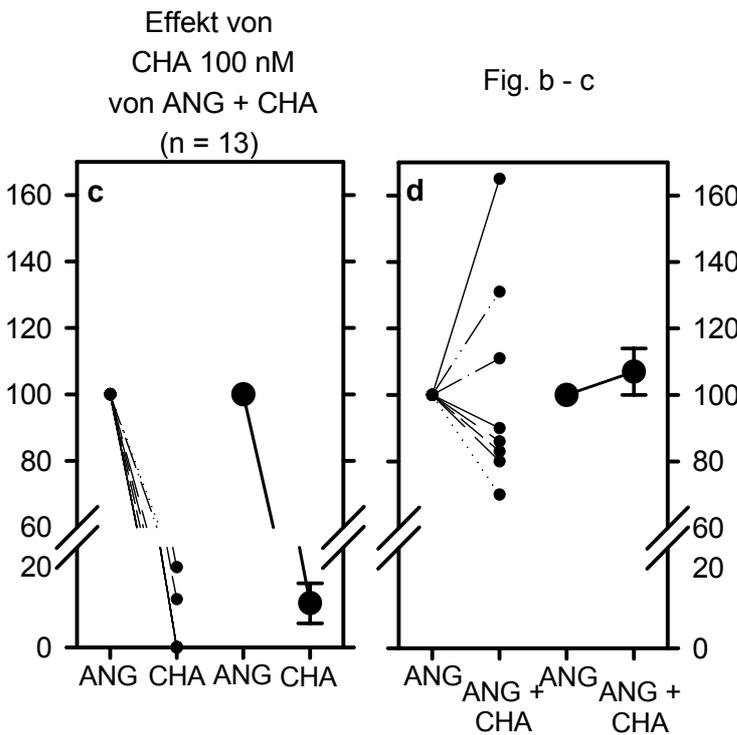


Fig. b - c

c) Die vorherige Stimulation mit CHA (100 nM) für 4 Minuten rief in 5 von 13 Experimenten eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die bei  $11 \pm 5\%$  lag.

d) Nach Abzug der  $Ca^{2+}$ -Erhöhung, die CHA (100 nM) während der Vorstimulation alleine hervorrief (c), von dem Wert der Kombination (b), war die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Kombination nicht mehr signifikant größer als die durch ANG II alleine hervorgerufene ( $107 \pm 7\%$ ,  $p > 0,05$ ).

Die Fläche der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , auf ANG II nach Konditionierung war um  $18 \pm 7\%$  größer als die der primären ANG II-Kontrollstimulation, während die Fläche des zweiten ANG II-Peaks bei den ANG II-Doppelstimulationen um  $6 \pm 7\%$  kleiner war (Tab.3.26, Abb. 3.27a und b). Zur Überprüfung der Signifikanz wurden die Peakflächen in Prozent des mit der Kombination behandelten Peaks und des zweiten ANG II-Peaks der ANG II-Doppelstimulationen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test für ungepaarte Werte verglichen. Beim Vergleich der Flächen ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ). Bei 46 % der Versuche (6 von 13 Versuchen) bewirkte CHA während der 4 minütigen Gabe eine leichte Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.27c). Wurde diese Fläche (CHA-Sockel) von der Peakfläche der Kombination abgezogen, so war der verbleibende Unterschied zwischen der ANG II-Doppelstimulationen und dem behandelten Peak nicht mehr signifikant ( $p > 0,5$ ) (Abb. 3.27d). CHA (100 nM) alleine für 1 Minute gegeben, bewirkte in dieser Versuchsreihe in einem von vier Versuchen eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Es bleibt festzustellen, dass sowohl die Experimenten unter Kap. 3.4.1 als auch unter Kap. 3.4.2 auf eine leichte Synergie hinzudeuten scheinen, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Es wurden im weiteren Protokolle gesucht, diese mögliche Synergie genauer zu untersuchen.

### **3.4.3 Untersuchungen einer möglichen Synergie zwischen Adenosin $A_1$ - und ANG II-Rezeptorstimulation : Gleichzeitige Gabe der beiden Agonisten**

#### *3.4.3.1 Gleichzeitige Gabe von Adenosin (0,01 $\mu$ M) + ANG II (3 nM)*

Bei der Präkonditionierung der Präparation durch eine längerdauernden Stimulation mit dem einen Agonisten besteht immer die Gefahr der Tachyphaxie, auch wenn das aus den  $Ca^{2+}$ -Antworten nicht direkt abzulesen war. Daher wurden in den folgenden Versuchsreihen die beiden Agonisten ANG II ( $3 \times 10^{-9}$  M) und Adenosin ( $10^{-8}$  M) vor (Abb. 3.28b) oder nach (Abb. 3.28c) primärer ANG II-Kontrollstimulation gleichzeitig gegeben. Kontrollen wurden mit zwei aufeinander folgenden ANG II ( $10^{-8}$  M)-Stimulationen durchgeführt (Abb. 3.28a), um einen Vergleich zu haben, wie sich die Fläche und die Höhe des zweiten Peaks im Vergleich zum ersten Peak verhält. Die Größe des mit der Kombination aus ANG II und Adenosin behandelten Peaks wurde in Prozent des ANG II-Kontrollpeaks angegeben und mit der Größe in Prozent des jeweiligen ANG-Kontrollpeaks aus den ANG II-Doppelstimulatio-

nen verglichen. Die Signifikanz von Unterschieden wurde mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Messwerte überprüft.

Zur Flächen- und Peakhöhenbestimmung siehe Kap. 2.2.3.2.c.

Adenosin alleine bewirkte keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Kap. 3.3.1).

Tab. 3.27 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch gemeinsame Gabe von ANG II (3 nM) + Adenosin (10 nM)

| Stimulation              | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 1<br>(relative Einheit) | AUC 1<br>(mg) | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 2<br>(relative Einheit) | AUC 2<br>(mg) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$<br>(%) | AUC<br>(%) |
|--------------------------|---|---------------|---|---------------|-----------------------------|------------|
| ANG II / ANG II<br>n = 7 | 5,0 ± 0,5                                     | 48 ± 7        | 4,8 ± 0,4                                     | 48 ± 11       | 98 ± 6                      | 99 ± 12    |
| ANG II / MIX<br>n = 8    | 6,0 ± 0,3                                     | 48 ± 6        | 5,0 ± 0,4                                     | 49 ± 8        | 83 ± 7                      | 100 ± 6    |
| MIX / ANG II<br>n = 6    | 7,1 ± 0,2                                     | 88 ± 6        | 5,5 ± 0,3                                     | 65 ± 9        | 122 ± 3                     | 126 ± 7    |

Mix = ANG II ( $3 \times 10^{-9}$  M) + Adenosin ( $10^{-8}$  M)

Die ANG II-Doppelstimulationen riefen Erhöhungen von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, bei denen die Größe des primären Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  ebenso gross war wie die Größe des Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  nach zweiter ANG II-Gabe (Tab.3.27).

Wurde die Kombination aus ANG II und Adenosin als zweites verabreicht, so war die Größe des Anstiegs von  $[Ca^{2+}]_i$  weder in Höhe noch in Fläche signifikant größer als der erste Peak ( $p > 0,5$ ). Wurde die Kombination ANG II + Adenosin als erstes gegeben, so war der so behandelte Peak um  $22 \pm 3$  % signifikant höher als der ANG II-Peak ( $p < 0,05$ ), jedoch war die Fläche nicht signifikant größer als die Fläche des ANG II-Peaks ( $p > 0,05$ ) (Tab.3.27).

Da die Peakhöhe jedoch größeren Schwankungen unterlag als die Fläche und diese keinen signifikanten Unterschied aufwies, konnte in diesem Versuchsansatz eine synergistische Wirkung von Adenosin und ANG II nicht als signifikant nachgewiesen werden, wenn auch eine Tendenz in Richtung eines synergistischen Effektes zu erkennen sein mag.

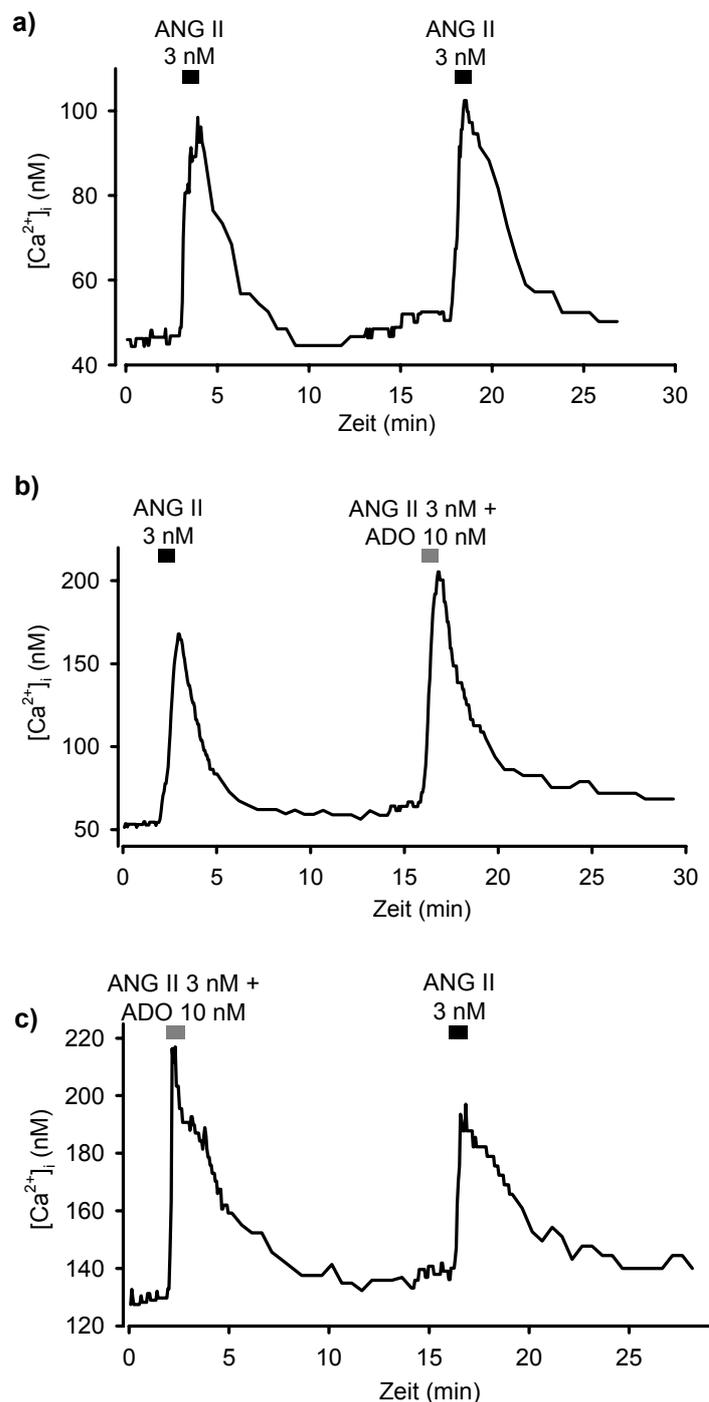


Abb. 3.28 Unterschwelliges Adenosin in Kombination mit ANG II

a) Zwei aufeinander folgende Stimulationen mit (ANG II 3 nM) bewirkten nahezu gleiche Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

b) Gabe der Kombination aus ANG II (3 nM) + ADO (10 nM) nach primärer ANG II (3 nM) Stimulation bewirkte hier eine etwas größere Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  als primäre ANG II- Stimulation.

c) Gabe der Kombination aus ANG II (3 nM) + ADO (10 nM) vor dem ANG II (3 nM)-Kontrollpuls bewirkte eine größere Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  als ANG II alleine.

#### 3.4.3.2 Gleichzeitige Gabe von CHA + ANG II (3 nM)

**CHA (1  $\mu$ M) + ANG II (3 nM):** Gleichzeitige Stimulation mit Adenosin (10 nM) und ANG II (3 nM) bewirkte keine signifikante stärkere Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  gegenüber Stimulation mit ANG II (3 nM) alleine (Kap. 3.4.3.1). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen die Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren durch Gabe von CHA in einer

Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (in Kombination mit ANG II (3 nM)) verstärkt. Auch eine Kombination aus CHA (0,1  $\mu\text{M}$ ) + ANG II (3 nM) wurde untersucht.

Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgten hier wie unter 3.4.2.1 beschrieben (Abb. 3.29). Als Kontrolle wurden neben den ANG II-Doppelstimulationen auch Experimente durchgeführt, bei denen mit CHA (1  $\mu\text{M}$  bzw. 0,1  $\mu\text{M}$ ) als zweites für eine Minute nach der ANG II -Kontrollgabe stimuliert wurde.

Tab. 3.28 Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch gemeinsame Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (1  $\mu\text{M}$ )

| Stimulation                          | $[\text{Ca}^{2+}]_i$<br>Peak 1<br>(relative<br>Einheit) | AUC 1<br>(mg)                                | $[\text{Ca}^{2+}]_i$<br>Peak 2<br>(relative<br>Einheit) | AUC 2<br>(mg)                                   | AUC 2<br>1) (mg) | $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$<br>(%) | AUC (%)   | AUC 1)<br>(%)              |
|--------------------------------------|---|--|---|---|------------------|------------------------------------|---|----------------------------|
| ANG II /<br>ANG II<br>n = 7          | 5,2 $\pm$ 0,4   | 46 $\pm$ 5                                   | 4,2 $\pm$ 0,4   | 38 $\pm$ 5                                      |                  | 74 $\pm$ 4                         | 83 $\pm$ 3                                      |                            |
| ANG II /<br>CHA<br>n = 7<br>(1 Res.) | 6 $\pm$ 0,2   | 51 <sup>A</sup> /<br>52 $\pm$ 6 <sup>B</sup> | 2,5   | 10 <sup>A</sup> /<br>1,2 $\pm$ 1,2 <sup>B</sup> |                  | 40                                 | 19 <sup>A</sup> /<br>2,7 $\pm$ 2,7 <sup>B</sup> |                            |
| ANG II /<br>MIX<br>n = 8             | 5,4 $\pm$ 0,4   | 43 $\pm$ 20                                  | 4,7 $\pm$ 0,4   | 49 $\pm$ 7                                      | 48 $\pm$ 5       | 88 $\pm$ 8                         | 116 $\pm$ 5 <sup>***</sup>                      | 112 $\pm$ 5 <sup>***</sup> |

Mix = ANG II (3 x 10<sup>-9</sup> M) + CHA (10<sup>-6</sup> M)

<sup>A</sup> Responder (Res.)

<sup>B</sup> alle Experimente

1) Fläche des Effektes der Mischung nach Abzug des Effektes, der durch CHA (10<sup>-6</sup> M) alleine bewirkt wird

Die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (AUC) nach Stimulation mit der Kombination war um 16  $\pm$  5 % größer als die des primären ANG II Peaks, während die Fläche des zweiten Peaks bei ANG II-Doppelstimulationen um 17  $\pm$  3 % kleiner war (Abb. 3.30a und b). Zur Überprüfung der Signifikanz wurde die Fläche der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die durch Gabe der Kombination hervorgerufen wurde gegen die durch eine zweite ANG II (3 nM)-Applikation ausgelöste Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test für ungepaarte Werte verglichen. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ).

Auch hier wurden Kontrollen durchgeführt, in denen nach einer primären ANG II (3 nM)-Applikation mit CHA (1  $\mu\text{M}$ ) stimuliert wurde. Interessanterweise bewirkte CHA (1  $\mu\text{M}$ )

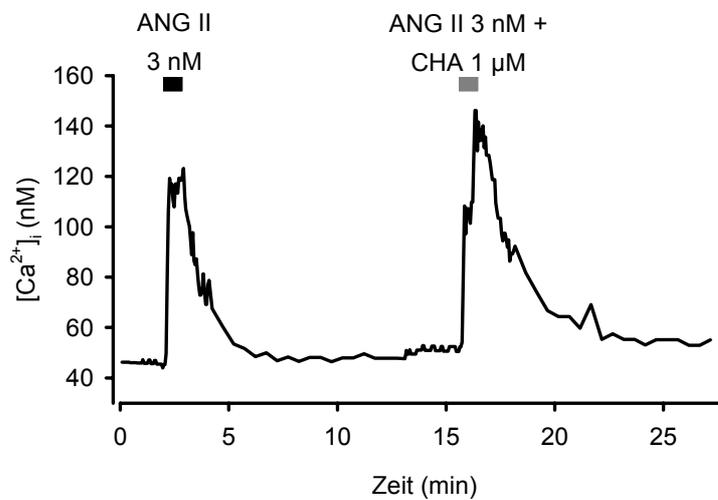


Abb. 3.29 Stimulation mit ANG II (3 nM) in Kombination mit CHA (1  $\mu$ M)  
Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) + CHA (1  $\mu$ M) nach primärer ANG II-Kontrollstimulation war größer als diese.

hier nur in einem von sieben Versuchen eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die 19 % (Einbeziehung aller Experimente:  $2,7 \% \pm 2,7$ ) der ANG II-Stimulation betrug (Abb. 3.30c). Wird dann dieser Eigeneffekt des CHA von dem Effekt der Kombination abgezogen, so ist der verbleibende Unterschied weiterhin signifikant ( $p < 0,001$ ) (Abb.3.30d). ANG II und der  $A_1$ -Agonist CHA in der Konzentration  $10^{-6}$  M wirken in diesen Versuchen auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  leicht synergistisch.

Es ist jedoch untypisch, dass CHA (1  $\mu$ M) alleine so selten eine Reaktion auslöste, so dass nur ein sehr kleiner Wert für die Fläche von dem Wert für die Fläche der Kombination abgezogen wurde. In anderen Versuchsreihen bewirkte CHA in dieser Konzentration in 50 % der Experimente eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Kap. 3.3.2); nimmt man an, dass eine Antwortfrequenz von 50 % korrekt ist, so ist bei  $n = 7$  immerhin mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,55 eine Antwortfrequenz von 14 % zu beobachten. Wäre also ein nach Kap. 3.3.2 in Antworthäufigkeit und Antwortgröße typischer Effekt für CHA (1  $\mu$ M) herausgekommen, so wäre die Synergie hier verlorengegangen. In diesem Fall würden CHA und ANG II nur noch additive Wirkung zeigen.

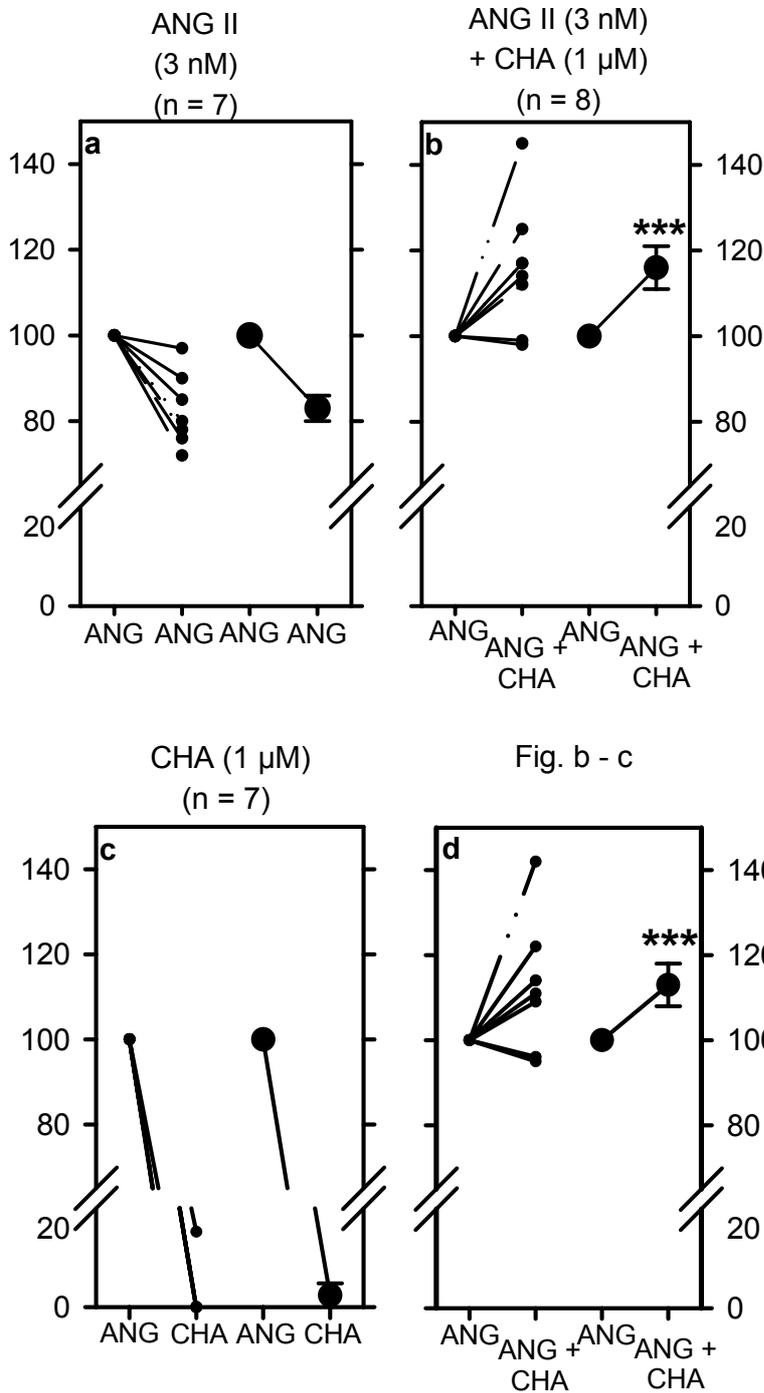


Abb. 3.30 Stimulation mit ANG II (3 nM) in Kombination mit CHA (1 μM)

a) Eine zweite ANG II (3 nM)-Stimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die leicht geringer war als die durch primäre ANG II-Stimulation ausgelöste Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ( $-17 \pm 3\%$ ;  $n = 7$ )

links: Einzelexperimente  
rechts: Mittelwerte.

b) Applikation von ANG II (3 nM) + CHA (1 μM) nach primärer ANG II-Stimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die signifikant größer war als ein zweiter ANG II (3 nM)-Peak ( $+16 \pm 5\%$  vs.  $-17 \pm 3\%$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 7$ ).

Fig. b - c

d) Nach Abzug der  $Ca^{2+}$ -Erhöhung, die CHA (1 μM) in einer dritten Experimentreihe alleine nach primärer ANG II (3 nM)-Gabe hervorrief (c,  $n = 7$ ), von dem Wert der Kombination, blieb die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Kombination weiterhin signifikant größer als die durch ANG II alleine hervorgerufene ( $12 \pm 5\%$  vs.  $-17 \pm 3\%$ ,  $p = 0,001$ ).

Weitere Versuche wurden auch mit einem physiologischeren Puffer, der Eiweiß (Albumin) und Bicarbonat enthielt, durchgeführt (HEPES-PS-BA, Kap. 2.1.2).

Tab. 3.29 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch gemeinsame Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (1  $\mu$ M) in Na-HEPES-PS-BA

| Stimulation           | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 1<br>(relative Einheit) | AUC 1<br>(mg) | $[Ca^{2+}]_i$<br>Peak 2<br>(relative Einheit) | AUC 2<br>(mg) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$<br>(%) | AUC<br>(%)   |
|-----------------------|---|---------------|---|---------------|-----------------------------|--------------|
| ANG /<br>ANG<br>n = 9 | 6,3 $\pm$ 0,3                                 | 76 $\pm$ 5    | 4,3 $\pm$ 0,4                                 | 67 $\pm$ 6    | 68 $\pm$ 6                  | 88 $\pm$ 6   |
| ANG /<br>MIX<br>n = 8 | 5,2 $\pm$ 0,4                                 | 63 $\pm$ 8    | 5,5 $\pm$ 0,1                                 | 77 $\pm$ 7    | 112 $\pm$ 11                | 135 $\pm$ 20 |

Mix = ANG II (3 x 10<sup>-9</sup> M) + CHA (10<sup>-6</sup> M)

Auch hier ergab sich, dass CHA in der Konzentration 1  $\mu$ M die Wirkung von ANG II auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  signifikant verstärkte ( $p < 0,05$ ). Bei den zur Kontrolle durchgeführten Doppelstimulationen mit ANG II war die Fläche des zweiten Peaks um 12  $\pm$  6 % kleiner als die der ersten. Durch gemeinsame Stimulation mit ANG II (3 nM) und CHA (1  $\mu$ M) wurde eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöst, deren Fläche um 35  $\pm$  20 % größer war.

CHA alleine wurde in dieser Versuchsserie nicht getestet, so dass zur Korrektur des Effektes der Kombination historische Daten von CHA (1  $\mu$ M) in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung mit Bicarbonat aber ohne Albumin verwendet wurden (Kap. 3.3.2.2). Nach Abzug der Fläche der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die durch alleinige Gabe von CHA bewirkt wurde, von dem Effekt durch Gabe der Mischung war der Unterschied hier weiterhin signifikant ( $p < 0,05$ ). Aufgrund der leicht verschiedenen Pufferlösungen müssen diese Daten jedoch mit Vorbehalt gesehen werden.

**CHA (0,1  $\mu$ M) + ANG II (3 nM):** In einer weiteren Serie von Versuchen wurde geprüft, ob die oben beschriebene leichte Synergie auch auftrat, wenn CHA (0,1  $\mu$ M) mit ANG II kombiniert wurde.

Tab. 3.30 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch gemeinsame Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (100 nM)

| Stimulation                    | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1<br>(relative Einheit)         | AUC 1<br>(mg)                                | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2<br>(relative Einheit)         | AUC 2<br>(mg)                                      | $\Delta [Ca^{2+}]_i$<br>(%)                  | AUC<br>(%)                                  |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|---|
| ANG II / ANG II<br>n = 9       | 4,9 ± 0,3  | 42 ± 5                                       | 4,5 ± 0,7  | 38 ± 3   | 92 ± 6                                       | 96 ± 5                                      |
| ANG II / CHA<br>n = 9 (4 Res.) | 6,4 ± 0,3 <sup>A</sup> /<br>5,8 ± 0,4 <sup>B</sup> | 57 ± 4 <sup>A</sup> /<br>52 ± 4 <sup>B</sup> | 1,4 ± 0,3 <sup>A</sup> /<br>0,6 ± 0,3 <sup>B</sup> | 9,1 ± 1,4 <sup>A</sup> /<br>4,0 ± 1,7 <sup>B</sup> | 22 ± 6 <sup>A</sup> /<br>10 ± 5 <sup>B</sup> | 16 ± 3 <sup>A</sup> /<br>7 ± 3 <sup>B</sup> |
| ANG II / MIX<br>n = 10         | 4,8 ± 0,5  | 36 ± 4                                       | 4,7 ± 0,5  | 42 ± 5   | 101 ± 10                                     | 120 ± 11<br>(113 ± 12 <sup>C</sup> )        |

Mix = ANG II ( $3 \times 10^{-9}$  M) + CHA ( $10^{-7}$  M)

Einbeziehung : <sup>A</sup> Responder (Res.)                      <sup>B</sup> alle Experimente

<sup>C</sup> Abzug der CHA-Reaktion

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.31 dargestellt. Wieder zeigen die Zahlen numerisch leicht höhere Antwort für die Kombination gegenüber ANG II allein ( $1 \pm 10$  % (Höhe) bzw.  $20 \pm 11$  % (Fläche)), jedoch wurde keine Signifikanz gegenüber der Größe in Prozent einer zweiten Kontroll-ANG II-Stimulation erreicht (Höhe und Fläche:  $p > 0,05$ ; nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test für ungepaarte Werte verglichen). ANG II und der  $A_1$ -Agonist CHA in der Konzentration  $10^{-7}$  M wirkten in diesen Versuchen auf die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nicht synergistisch.

Gabe von CHA ( $10^{-7}$  M) alleine rief in dieser Versuchserie in 44 % der Experimente eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor (n = 9, 4 Responder). Die Größe dieses zweiten Peaks betrug bezogen auf den ersten ANG-Kontrollpeak  $16 \pm 3$  % (Fläche) bzw.  $23 \pm 6$  % (Höhe). Wurde dieser Eigeneffekt berücksichtigt, blieb die Antwort auf die Kombination numerisch größer; der Unterschied war aber, wie zu erwarten, weiterhin nicht signifikant.

Aus den bisherigen Synergie-Versuchen in Kap. 3.4 kann das Fazit gezogen werden, dass es zwar Andeutungen für einen synergistischen Effekt zwischen Adenosin  $A_1$ - und ANG II-Rezeptorstimulation gibt, aber keine statistisch gesicherten Daten für eine Synergie festgestellt werden konnten. Ein wesentlicher Grund dafür könnte die Variabilität der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf Adenosin  $A_1$ -Rezeptorstimulation sein. Bislang weisen ANG II und Adenosin bezüglich der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nur additive Wirkungen auf.

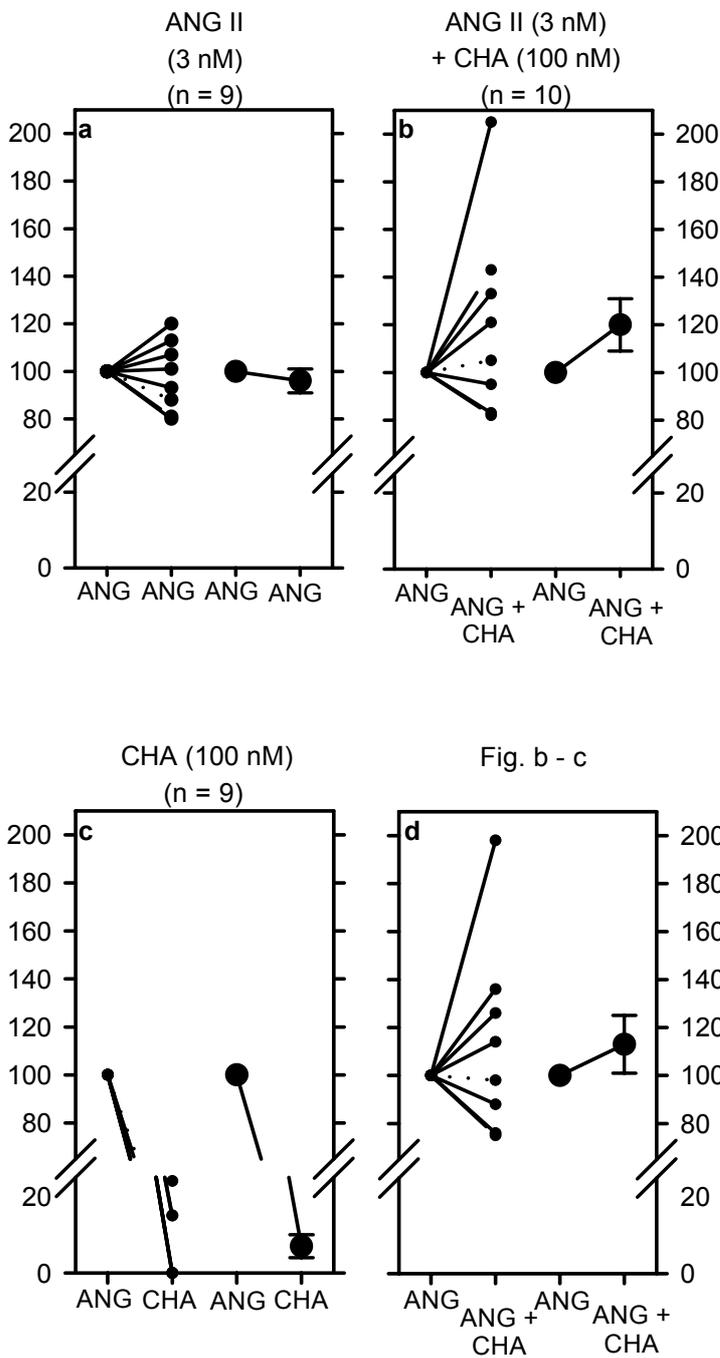


Abb. 3.31 Stimulation mit ANG II (3 nM) in Kombination mit CHA (100 nM)

a) Eine zweite ANG II (3 nM)-Stimulation rief eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in der gleichen Größenordnung wie die primäre ANG II-Stimulation hervor ( $-8 \pm 6\%$ ;  $n = 9$ ).  
links: Einzelexperimente  
rechts: Mittelwerte

b) Gabe von ANG II (3 nM) + CHA (100 nM) nach primärer ANG II-Stimulation bewirkte eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die aufgrund der Streuung nicht signifikant größer war als die durch primäre ANG II (3 nM)-Stimulation hervorgerufene ( $n = 10$ ).

d) Nach Abzug der  $Ca^{2+}$ -Erhöhung, die CHA (100 nM) in einer dritten Experimentreihe alleine nach primärer ANG II (3 nM)-Gabe hervorrief (c,  $n = 9$ ), von dem Wert der Kombination, blieb die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Kombination weiterhin leicht (nicht signifikant) größer als die durch ANG II alleine hervorgerufene.

### 3.4.4 ANG II und endogenes Adenosin

ANG II und Adenosin hemmen beide die Reninsekretion und es besteht die Hypothese, dass ANG II die Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen nur in Gegenwart von Adenosin hemmen kann. Dies wird bestätigt durch nicht veröffentlichte Daten von Frau PD Dr. Albinus (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen), nach denen ANG II die Reninsekretion in Anwesenheit von Adenosindesaminase (ADA) nicht mehr hemmt. Ein Ausbleiben des ANG II-Effektes in Anwesenheit von Adenosindesaminase oder dem Adenosin  $A_1$ -Rezeptorantagonisten DPCPX würde die These bestätigen, dass Adenosin und ANG II synergistisch wirken und ANG II ohne Adenosin keine Wirkung hat. Sowohl Adenosindesaminase über Abbau von endogenem Adenosin als auch DPCPX über Adenosin  $A_1$ -Rezeptorblockade sollten die Wirkung von endogenem Adenosin aufheben.

Bislang gibt es zu dieser Fragestellung nur unveröffentlichte Daten zur Reninsekretion (PD Dr. Albinus, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen). Daher stellte sich die Frage, ob auch die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II in Gegenwart von Adenosindesaminase oder DPCPX ausbleibt oder wenigstens signifikant verringert ist.

#### 3.4.4.1 ANG II-Wirkung nach Entfernung von endogenem Adenosin durch ADA

Zur Untersuchung, ob die Inaktivierung des endogenen Adenosin durch ADA die  $Ca^{2+}$ -erhöhende Wirkung von ANG II beeinflusst, wurde wieder das Doppelstimulationsprotokoll angewandt. Nach Perfusion mit ADA (4U/ml) für 3 Minuten wurde dieser Lösung für 1 Minute ANG II (3 nM) zugesetzt; nach einer Auswaschphase wurde mit ANG II (3 nM) alleine die Kontrollstimulation durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Größe des ersten Peaks in Bezug auf den zweiten Peak bestimmt. Als Kontrollen wurden wieder ANG II-Doppelstimulationen ohne ADA durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurde mit einer ADA-entsprechenden Menge Albumin superfundiert, um einen nicht-spezifischen Eiweißeffekt auszuschließen.

Tab. 3.31 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) nach Gabe von ADA (4 U/ml)

| Stimulation                             | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1<br>(relative Einheit) | AUC 1<br>(mg) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2<br>(relative Einheit) | AUC 2<br>(mg) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$<br>(%) | AUC<br>(%) |
|---|--|---------------|--|---------------|-----------------------------|------------|
| ANG II + ADA /<br>ANG II<br>n = 5       | 5,2 ± 0,4                                  | 44 ± 7        | 4,5 ± 0,3                                  | 48 ± 7        | 117 ± 9                     | 93 ± 5     |
| ANG II + Albu-<br>min / ANG II<br>n = 3 | 4,9 ± 0,6                                  | 47 ± 12       | 5,0 ± 0,2                                  | 47 ± 4        | 100 ± 15                    | 95 ± 19    |
| ANG II / ANG II<br>n = 4                | 5,6 ± 0,1                                  | 42 ± 5        | 4,8 ± 0,3                                  | 41 ± 6        | 119 ± 6                     | 103 ± 6    |

Die statistische Auswertung zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsansätzen bestanden. In diesen Versuchen wurde kein Absinken des basalen  $[Ca^{2+}]_i$  durch ADA beobachtet.

#### 3.4.4.2 ANG II-Wirkung nach Blockade der Adenosin $A_1$ -Rezeptoren mit DPCPX

In diesem Ansatz wurde die Wirkung von endogenem Adenosin durch Blockade der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren durch den Adenosin  $A_1$ -Rezeptorantagonisten DPCPX (100 nM) antagonisiert. Es wurde wieder zunächst mit ANG II (3 nM) zur Kontrolle stimuliert, bevor dann nach Auswaschphase die Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren durch Perfusion mit DPCPX (100 nM) blockiert wurden. Es sollte so vermieden werden, dass die Kontrollstimulation ANG II noch durch DPCPX beeinflusst wurde. Nach 4 Minuten wurde dieser Lösung für 1 Minute ANG II (3 nM) zugesetzt.

Zur Kontrolle wurden die üblichen ANG II-Doppelstimulationen untersucht. Berechnet wurde wieder die Fläche des behandelten Peaks zum unbehandelten ANG-Kontrollpeak. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.32 zusammengefasst; zur Kontrolle wurden hier nur zwei ANG II-Doppelstimulationen durchgeführt, die einzeln aufgeführt sind.

DPCPX bewirkte in diesen Experimenten keine Verkleinerung des Effektes von ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$  (n = 4). Wie in Kap. 3.3.3.2 führt es auch nicht zu einem Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$ , wie er durch die Blockade der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren hervorgerufen werden könnte (vgl. Kap. 3.3.3.2). Es war kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen erkennbar.

Tab. 3.32 Einfluss des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten DPCPC (100 nM) auf die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch ANG II (3 nM)

| Stimulation                         | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 1<br>(relative Einheit) | AUC 1<br>(mg) | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 2<br>(relative Einheit) | AUC 2<br>(mg) | Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub><br>(%) | AUC<br>(%)            |
|-------------------------------------|---|---------------|---|---------------|---|-----------------------|
| ANG II /<br>ANG II + DPCPX<br>n = 4 | 5,1 ± 0,3   | 43 ± 8        | 4,7 ± 0,4   | 40 ± 8        | 93 ± 8                                    | 92 ± 6                |
| ANG II / ANG II<br>n = 2            | 5,4<br>4,9  | 44,5<br>60,8  | 4,9<br>4,3  | 40,2<br>31,7  | 91<br>88                                  | 90<br>52 <sup>A</sup> |

Mix = ANG II (3 x 10<sup>-9</sup> M) + DPCPX (10<sup>-7</sup> M)

<sup>A</sup> untypischer Wert

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass die beiden Methoden, den endogenen Adenosintonus auszuschalten, nicht nur keinen Effekt auf basales [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hatten (vgl. auch Kap. 3.3.3.1 und 3.3.3.2), sondern dass auch die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Stimulation durch ANG II unverändert blieb. Die absolute Notwendigkeit von Adenosin für die reninsekretionshemmende Wirkung von ANG II (PD Dr. Albinus, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) ist also auf der Ebene der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nicht sichtbar.

### 3.5 Untersuchung an der afferenten Arteriole der Niere der Maus

#### 3.5.1 Effekt von ANG II und CHA auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der afferenten Arteriole der Niere der Maus

##### 3.5.1.1 Wirkung von ANG II auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Zunächst wurde an der afferenten Arteriole aus der Nieren der Maus die Reaktion auf eine ANG II-Stimulation gemessen und es wurde durch Experimente mit dem ANG II AT<sub>1</sub>-Blocker Losartan (LOS) (Hackenthal, 2001) überprüft, ob die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch ANG II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wird.

Gearbeitet wurde mit dem Doppelpulsprotokoll, bei dem zunächst von Minute 1 - 2 ANG II (3 nM) als Funktionskontrolle und als interner Standard gegeben wurde. Nach einer 16 minütigen Auswaschphase wurde zur Kontrolle ein zweites Mal mit ANG II (3 nM) stimuliert. In den Experimenten mit LOS wurde vor und während der zweiten ANG II-Gabe für 3 Minuten der ANG II AT<sub>1</sub>-Blocker in einer Konzentration von 1 μM zugegeben (Abb. 3.32).

Tab. 3.33 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) in Ab- und Anwesenheit von Losartan (1  $\mu$ M)

| Stimulation           | Versuchsanzahl n | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) |
|-----------------------|------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ANG II / LOS + ANG II | 5                | 68 $\pm$ 12                  | 39 $\pm$ 9                | 75 $\pm$ 16                  | 0                         | 0                        |
| ANG II / ANG II       | 5                | 57 $\pm$ 3                   | 32 $\pm$ 7                | 60 $\pm$ 10                  | 34 $\pm$ 10               | 102 $\pm$ 8              |

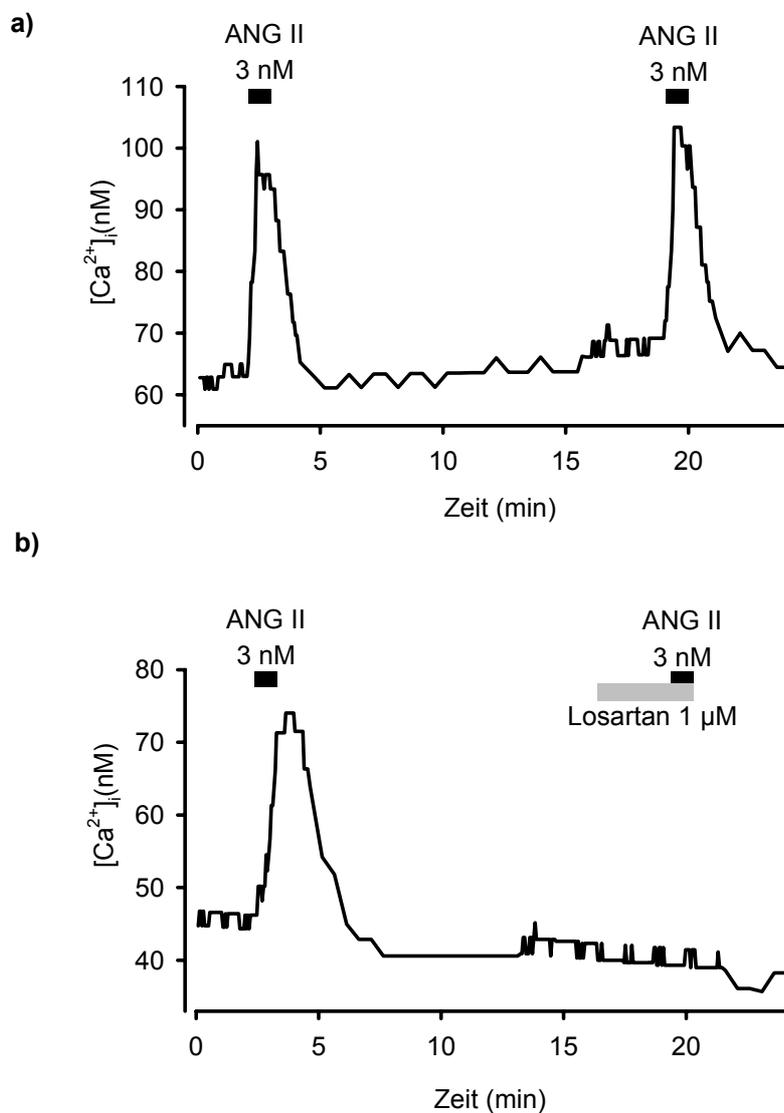


Abb. 3.32 Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Maus.

a) Zweimalige ANG II-Stimulation erhöhte zweimal  $[Ca^{2+}]_i$  in der gleichen Größenordnung.

b) Gabe des ANG II  $AT_1$ -Blockers Losartan (1  $\mu$ M) vor der zweiten ANG II-Stimulation verhinderte völlig die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (n = 5). Losartan alleine hatte keinen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

Die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lag hier, alle Experimente zusammengefasst ( $n = 10$ ), bei  $63 \pm 6$  nM. Ebenfalls alle Experimente zusammengefasst, erhöhte eine erste ANG II-Gabe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $36 \pm 6$  nM. In den fünf Kontrollexperimenten war eine zweite Anhebung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  möglich. Sie betrug, bezogen auf den ersten ANG II-Puls  $102 \pm 8$  %. Losartan selbst hatte keinen Einfluss auf die unter Ruhebedingungen herrschende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 3.32b), verhinderte hingegen völlig den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch ANG II (Tab. 3.33). Daher bestätigt diese Experimentreihe, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -steigernde Effekt von ANG II über den ANG II  $\text{AT}_1$ -Rezeptor vermittelt wird.

#### *3.5.1.2 Wirkung des Adenosin-Analogons CHA auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der afferenten Arteriole aus der Mausniere*

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Rattenniere auf Stimulation mit Adenosin und dem Adenosin  $\text{A}_1$ -Agonisten  $\text{N}^6$ -Cyclohexyl-adenosin (CHA) sehr unregelmäßig war, sollte hier überprüft werden, ob die afferenten Arteriolen im distalen Bereich der Mausniere eine regelmäßige  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Stimulation der Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren zeigen. Es wurde zwei Versuchsreihen durchgeführt, zum ersten an afferenten Arteriolen aus CD-1 Mäusen, die reguläres Futter erhalten hatten, zum zweiten aus kochsalzarm ernährten CD57 Mäusen.

**A) CD-1 Mäuse:** Der CD1-Stamm ist, wie der bislang untersuchte Rattenstamm Sprague-Dawley, ein Auszuchtstamm. Verwendet wurde analog zu bisherigen Versuchen HEPES-gepufferte physiologische Salzlösung (Na-HEPES-PS). Gearbeitet wurde ebenfalls mit dem Doppelstimulationsprotokoll, bei dem eine ANG II-Stimulation in einer Konzentration von 3 nM zur Funktionskontrolle gemacht und als interner Standard benutzt wurde. CHA wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 100 nM eingesetzt. In einigen Versuchen erfolgte Stimulation mit CHA zu erst, in einer anderen Versuchsreihe wurde CHA als zweiter Stimulus gegeben. Die jeweils andere Stimulation erfolgte standardmäßig mit ANG II (3 nM). Die Substanzen wurden immer zu Minute 1 - 2 gegeben, dann erfolgte eine 13 minütige Auswaschphase, an deren Anschluss dann nochmal für 1 Minute (Minute 15 - 16) die zweite Substanz gegeben wurde. Zur Kontrolle wurden ANG II (3 nM)-Doppelstimulationen durchgeführt.

Tab. 3.34 Effekt von CHA (100 nM / 1  $\mu$ M) auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen aus Nieren von standard-ernährten CD-1 Mäusen

| Stimulation            | Versuchsanzahl n | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) |
|------------------------|------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ANG II / ANG II        | 6                | 60 $\pm$ 5                   | 26 $\pm$ 3                | 62 $\pm$ 4                   | 24 $\pm$ 4                | 91 $\pm$ 5               |
| ANG II / CHA 1 $\mu$ M | 3                | 56 $\pm$ 11                  | 27 $\pm$ 3                | 60 $\pm$ 10                  | 0                         | 0                        |
| ANG II / CHA 100nM     | 4                | 75 $\pm$ 17                  | 36 $\pm$ 6                | 85 $\pm$ 19                  | 0                         | 0                        |
| CHA 1 $\mu$ M / ANG II | 2                | 51 $\pm$ 4                   | 0                         | 56 $\pm$ 4                   | 25 $\pm$ 4                | 0                        |
| CHA 100 nM / ANG II    | 2                | 47 $\pm$ 13                  | 0                         | 49 $\pm$ 13                  | 20 $\pm$ 6                | 0                        |

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  in den hier isolierten afferenten Arteriolen der CD-1 Mäuse lag bei 60  $\pm$  5 nM (n = 17).

ANG II (3 nM) wurde wie üblich als Standardkontrollpeak verwendet und rief regelmäßig eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die bei 29  $\pm$  3 nM lag (alle Experimente zusammengefasst, n = 13). Ein zweiter ANG II (3 nM)-Puls ließ sich wie bei den Gefäßen der Ratte auslösen. Bei einer basalen  $[Ca^{2+}]_i$  von 60  $\pm$  5 nM und einer ersten Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  von 26  $\pm$  3 nM lag er bei 24  $\pm$  4 nM. Das entspricht bezogen auf den ersten Peak 91  $\pm$  5 % und liegt damit, wie in den Experimenten an den reninsezernierenden Zellen der Ratte, in der gleichen Größenordnung wie der primäre ANG II (3 nM)-Peak.

Die Arteriolen der Mausniere reagierten in dieser Versuchsreihe nicht auf eine zweite, nach dem ANG II-Kontrollpeak gegebene CHA-Stimulation, weder in einer Konzentration von 100 nM noch in einer Konzentration von 1  $\mu$ M. Auch gab es keine Reaktion auf CHA, wenn es vor dem ANG II-Puls gegeben wurde (Tab. 3.34).

**B) C57 Mäuse:** Eine zweite Versuchsreihe wurde mit afferenten Arteriolen aus Nieren von NaCl-arm ernährten C57 Mäusen durchgeführt. Der Grund war folgender: männliche CD-1 Mäuse, die eine normale NaCl-Diät erhalten hatten, zeigten auf Stimulation mit dem Adenosin  $A_1$ -Agonisten CHA keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Da die zugehörigen Versuche an der Ratten an NaCl-arm ernährten Tieren durchgeführt wurden, sollte die Stimulation mit CHA auch an kochsalzarm ernährten Mäusen überprüft werden. Da die CD-1 Mäuse (Auszuchtstamm) relativ hohe Ausfallquoten hatten, d.h. sehr häufig Gefäße gar nicht mehr auf ANG II

reagierten, wurde ein weiterer Mausstamm untersucht. Ausgewählt wurde der C57 Stamm, der ein Inzuchtstamm ist.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben dargestellt; die Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 3.35 Effekt von CHA (100 nM / 1  $\mu$ M) auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der NaCl-arm ernährten C57 Mäuse

| Stimulation            | Versuchsanzahl n | basales $[Ca^{2+}]_i$ 1 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 1 (nM) | basales $[Ca^{2+}]_i$ 2 (nM) | $[Ca^{2+}]_i$ Peak 2 (nM) | $\Delta [Ca^{2+}]_i$ (%) |
|------------------------|------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ANG II / CHA 1 $\mu$ M | 10               | 56 $\pm$ 4                   | 24 $\pm$ 2                | 60 $\pm$ 5                   | 0,8 $\pm$ 0,6             | 3 $\pm$ 2                |
| ANG II / CHA 100 nM    | 5                | 52 $\pm$ 4                   | 14 $\pm$ 3                | 55 $\pm$ 3                   | 0                         | 0                        |
| ANG II / ANGI          | 11               | 63 $\pm$ 6                   | 24 $\pm$ 4                | 64 $\pm$ 6                   | 20 $\pm$ 3                | 88 $\pm$ 10              |

Basales  $[Ca^{2+}]_i$  in dieser Experimentreihe an den afferenten Arteriolen der kochsalzarm ernährten C57 Mäuse lag bei 58  $\pm$  3 nM (n = 26). Die Erhöhung  $[Ca^{2+}]_i$  auf die erste Stimulation durch ANG II lag, bei 22  $\pm$  2 nM (alle Experimente zusammengefasst, n = 26). Bei basalem  $[Ca^{2+}]_i$  von 63  $\pm$  6 nM und einem ersten ANG II (3 nM)-Peak von 24  $\pm$  4 nM, löste eine zweite ANG II (3 nM)-Stimulation eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung aus, die bei 20  $\pm$  3 nM lag, was bezogen auf den ersten ANG II-Peak 88  $\pm$  10 % entspricht.

Die afferenten Arteriolen dieser kochsalzarm ernährten C57 Mäuse reagierten in dieser Experimentreihe aber ebenfalls weder auf 1  $\mu$ M CHA (n = 10), noch auf 100 nM CHA (n = 5) mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass unabhängig vom Mausstamm und der Ernährung CHA auch in unterschiedlichen Versuchsprotokollen keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt. Die Maus reagiert also nicht besser auf Adenosin  $A_1$ -Rezeptorstimulation. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob in der afferenten Arteriole der Maus überhaupt ein  $Ca^{2+}$ -Signal nach Adenosin  $A_1$ -Rezeptorstimulation erhalten werden kann, da in 27 Gefäßen aus 8 verschiedenen Tieren CHA (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) nicht einmal eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung bewirkt hat. Diese Versuche wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten durchgeführt. Vergleichsversuche an der Ratte im selben Zeitraum gibt es nicht. Aber auch an der Ratte gab es Versuchs-

serien, bei denen es über viele Experimente hinweg keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptorstimulation gab.

### **3.5.2 Untersuchungen einer möglichen Synergie zwischen ANG II und endogenem Adenosin in der afferenten Arteriole der Maus**

In Kap. 3.4.4 wurde an isolierten afferenten Arteriolen der Ratte gezeigt, dass das Ausschalten des endogenen Adenosin-Tonus durch Vorbehandlung mit Adenosindesaminase oder Blockade der Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf ANG II-Stimulation nicht beeinflusste. Dies sollte an dem analogen Präparat der Maus noch einmal untersucht werden. Dazu wurde zum einen die Antwort auf ANG II-Stimulation in der afferenten Arteriole der Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptor-knock-out Maus ( $\text{A}_1\text{AR}^{-/-}$ ; Sun et al., 2001, überlassen von PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) mit der von zugehörigen Wildtyp Mäusen der gleichen Zucht ( $\text{A}_1\text{AR}^{+/+}$ ) verglichen, und zum anderen die Antwort auf ANG II-Stimulation mit und ohne Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptor Blockade untersucht.

#### *3.5.2.1 Vergleich der $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf ANG II-Stimulation in afferenten Arteriolen der Nieren von Adenosin $\text{A}_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen mit der von Wildtyp Mäusen.*

Gearbeitet wurde mit Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen ( $\text{A}_1\text{AR}^{-/-}$   $\text{A}_1$ -Rezeptor-k.o. Mäuse) und als Kontrolle mit Wildtyp Mäusen ( $\text{A}_1\text{AR}^{+/+}$ ; WT Mäuse) aus dem gleichen Wurf (Kap. 2.1.3).

Die Tiere erhielten eine normale Standard-Diät. Gearbeitet wurde in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS). Stimuliert wurde mit ANG II in der Konzentration von 0,3 nM bis 300 nM für jeweils 1 Minute (Abb. 3.33).  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde sehr weit distal am Eintritt der afferenten Arteriole in das Glomerulum gemessen. In diesem Bereich befinden sich die reninsezernierenden Zellen. Die Experimente sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tab. 3.36 Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II in der afferenten Arteriole der Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Maus und der Wildtyp Maus

| Konzentration ANG II (nM) | ADO $A_1$ -k.o. Maus<br>(MW $\pm$ S.E.M.) (nM)   | WT-Maus<br>(MW $\pm$ S.E.M.) (nM)              |
|---------------------------|--|--|
| 0,3                       | n = 8 / 7 $\pm$ 3<br>n = 6 / 10 $\pm$ 4 (resp.)  | n = 9 / 6 $\pm$ 2<br>n = 7 / 8 $\pm$ 1 (resp.) |
| 1                         | n = 8 / 17 $\pm$ 5<br>n = 6 / 23 $\pm$ 5 (resp.) | n = 5 / 18 $\pm$ 2                             |
| 3                         | n = 14 / 20 $\pm$ 2                              | n = 15 / 24 $\pm$ 5                            |
| 30                        | n = 22 / 37 $\pm$ 4                              | n = 18 / 43 $\pm$ 4                            |
| 300                       | n = 18 / 59 $\pm$ 8                              | n = 15 / 55 $\pm$ 7                            |

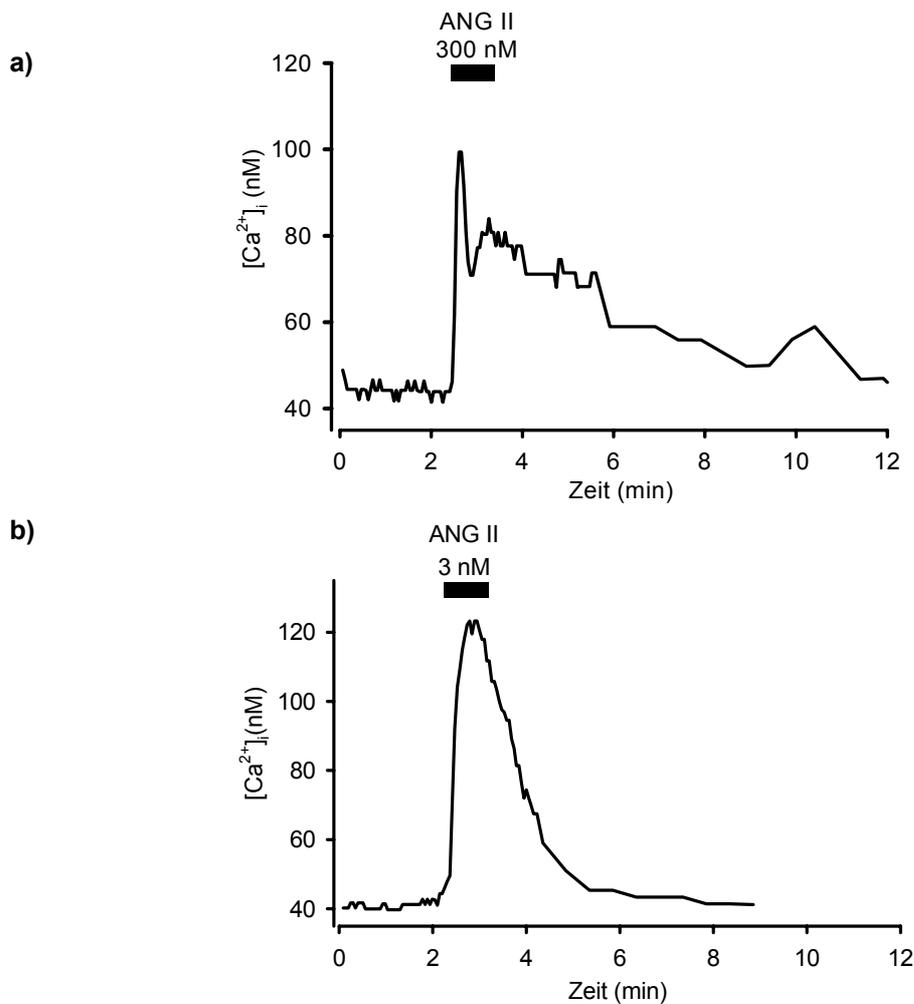


Abb. 3.33 Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf Stimulation mit ANG II (300 nM) (a) im Vergleich zur Stimulation mit ANG II (3 nM) (b) in der afferenten Arteriole der Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Maus.

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  lag in den Gefäßen der WT Mäuse bei  $58 \pm 2$  nM, in denen der  $A_1$ -Rezeptor-k.o. Mäuse bei  $62 \pm 2$  nM. Die afferenten Arteriolen von  $A_1$ -Rezeptor-k.o. Mäusen reagierten ebenso wie die der WT Mäuse auf Stimulation mit ANG II mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Bei allen Konzentrationen bestand kein Unterschied in der Peakgröße zwischen Gefäßen aus WT und  $A_1$ -Rezeptor-k.o. Mäusen ( $p > 0,05$ ) (Abb. 3.34).

Bestimmt wurde die  $EC_{50}$ , also die ANG II-Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt auftrat, mit Hilfe der Hill-Gleichung. Die Daten aus Tab. 3.36 wurden gegen die ANG II-Konzentration aufgetragen und die logarithmische Form der Hill-Gleichung an die Daten angepasst (Abb. 3.34). Die Gleichung lautet:

$$y = a * (1 + 10^{n(px - pk)})^{-1}$$

wobei:

- a = maximale Amplitude des Effektes
- n = Hill-Koeffizient
- px =  $-\log [ANG II]$
- x =  $[ANG II]$
- pk =  $-\log k$
- k =  $EC_{50}$  (ANG II-Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt auftrat)

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 3.37

|            | ADO $A_1$ -k.o.-Mäuse | WT-Mäuse        |
|------------|-----------------------|-----------------|
| a          | $65 \pm 15,3$         | $59,5 \pm 5,1$  |
| $pEC_{50}$ | $7,91 \pm 0,53$       | $8,24 \pm 0,19$ |
| $EC_{50}$  | 12 (1; 138)           | 5,8 (2,5; 13,7) |

Die  $EC_{50}$  für ANG II liegt für die Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäuse bei 12 nM, für die Wildtypmäuse bei 5,8 nM. Zwischen den Wildtypmäusen und den Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen besteht auch bezüglich der  $EC_{50}$  kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ). Die Antwort auf 300 nM ANG II (Abb. 3.33a) wurde genauer untersucht. Sie besteht deutlich aus einer Peak- und einer Plateau-Phase. Die Plateauphase wurde zu verschiedenen Zeiten

auf signifikante Unterschiede zwischen WT und A<sub>1</sub>-Rezeptor-k.o. Mäusen untersucht. Aber auch hier war kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p > 0,05$  bei 4 min und bei 5 min). Diese Versuche belegen, dass in der Maus die reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole des Nierenglomerulums auf Stimulation mit ANG II mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auch ohne den Einfluss von (endogenem) Adenosin über Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren antworten und dass die Antwort in den afferenten Arteriolen aus k.o.-Mäusen und WT-Mäusen quantitativ gleich ausfällt.

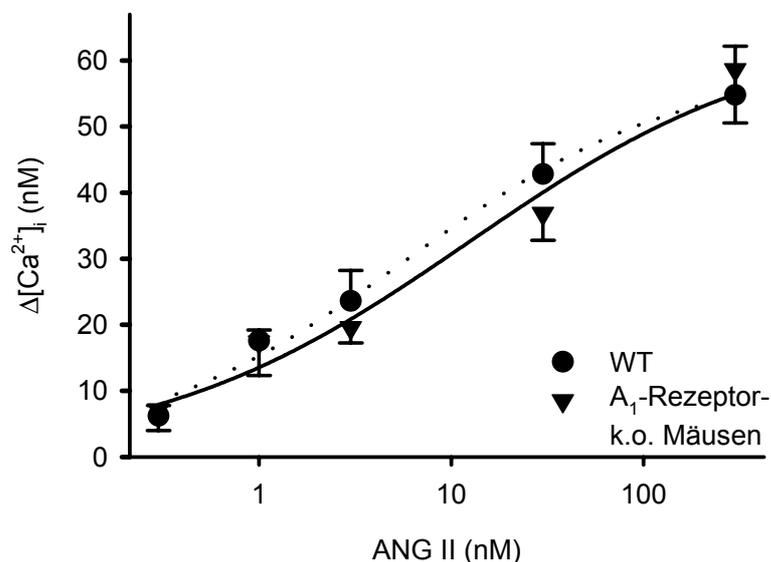


Abb. 3.34 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) auf Stimulation mit ANG II in Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor knock-out-Mäusen (ADO A<sub>1</sub>-k.o.) und Wildtypmäusen (WT) ist konzentrationsabhängig. Dargestellt ist jeweils MW  $\pm$  S.E.M aller Werte. Die Kurve zeigt den Hill-Fit über die Mittelwerte. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und ADO A<sub>1</sub>-k.o.-Mäusen (vgl. Tab. 3.36). Die EC<sub>50</sub> liegt bei 5,8 nM (WT Mäuse) bzw. bei 12 nM (A<sub>1</sub>-Rezeptor-k.o. Mäusen).

### 3.5.2.2 ANG II-Wirkung auf [die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach Blockade der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren mit DPCPX in der afferenten Arteriole von CD-1 Mäusen

Gearbeitet wurde in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (Na-HEPES-PS). Die verwendeten Tiere erhielten eine normale Kochsalzdiät. Das in Kap. 3.4.4.2 erklärte Doppelstimulationsprotokoll wurde verwendet. Getestet wurden ebenfalls zur Kontrolle ANG II-Doppelstimulationen (Minute 1 - 2 und 18 - 19). Vor und während der zweiten ANG II-Gabe

wurde wieder der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist DPCPX, diesmal in einer Konzentration von 1 µM, für 3 Minuten verabreicht.

Tab. 3.38 Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch ANG II (3 nM) nach Blockade der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren mit DPCPX (1 µM) in der afferenten Arteriole der Mausniere

| Stimulation             | Versuchsanzahl n | basales [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 1 (nM) | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 1 (nM) | basales [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 2 (nM) | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak 2 (nM) | Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (%) |
|-------------------------|------------------|---|--|---|--|--|
| ANG II / DPCPX + ANG II | 4                | 51 ± 10   | 33 ± 10                                      | 57 ± 8  | 30 ± 9                                       | 98 ± 7                                 |
| ANG II / ANG II         | 5                | 57 ± 3  | 32 ± 7                                       | 60 ± 10   | 34 ± 10                                      | 103 ± 9                                |

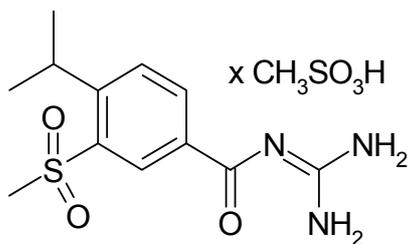
Die basale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> lag, alle Experimente zusammengefasst (n = 9), in dieser Experimentreihe bei 54 ± 4 nM. Ebenfalls alle Experimente zusammengefasst, erhöhte eine erste ANG II-Gabe [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> um 32 ± 6 nM. Die zweite Anhebung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> betrug, bezogen auf die durch erste ANG II-Applikation ausgelöste Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 103 ± 9 %. Nach Blockade des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptors durch DPCPX in einer Konzentration von 1 µM erfolgte durch ANG II eine unveränderte Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (n = 4). DPCPX hatte keinen Einfluss auf die basale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der beiden Versuchsansätze, sowohl dem Vergleich der Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch ANG II in Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen mit zugehörigen WT-Mäusen als auch durch Block des endogenen Adenosin-Tonus durch DPCPX, zeigen, dass die Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch ANG II nicht durch eventuell vorhandenes endogenes Adenosin beeinflusst wird.

### 3.6 Einfluss der Natrium-Protonen-Austauscher 1 und 2 (NHE1 und NHE2) auf den pH-Wert in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Ratte

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers 2 (NHE2) eine Hemmung der Reninsekretion nach sich zieht (PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung). Die Bedeutung des NHE1 sowie des NHE2 wurde in Kap. 1.3.1.6 erläutert. Wie in Kap. 1.3.1.6 besprochen, führt eine Ansäuerung der reninsezernierenden Zellen und der reninhaltigen Vesikeln zu einer Steigerung, eine Alkalisierung zu einer Hemmung der Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole. So war es von Interesse herauszufinden, welchen Einfluss die Blockade des NHE2 durch einen relativ spezifischen Blocker („1522“ von Aventis, Abb. 3.35b) hat. „1522“ hemmt den NHE2 mit 13 höherer Potenz als den NHE1 ( $\text{IC}_{50}$  0,4 vs. 5,2  $\mu\text{M}$ , Aventis, nicht veröffentlicht). Zum Vergleich wurde auch der spezifische NHE1-Blocker Cariporid (Abb. 3.35a) geprüft, der am NHE1 20 mal wirksamer ist als am NHE2 ( $\text{IC}_{50}$  0,08 vs. 1,6  $\mu\text{M}$ ; Scholz et al., 1995; Schwark et al., 1998). Die Substanzen wurden zunächst darauf untersucht, ob sie den pH-Wert in Ruhe beeinflussen.

a)



b)

Struktur von „1522“ wurde von Aventis nicht freigegeben.

Abb. 3.35 Strukturformeln der NHE-Inhibitoren

a) Cariporid (NHE1) und

b) „1522“ (NHE2)

#### 3.6.1 Effekt des NHE2-Inhibitors „1522“ und des NHE1-Inhibitors Cariporid auf den intrazellulären pH-Wert in Ruhe

##### 3.6.1.1 Einfluss von „1522“ auf den pH-Wert in Ruhe

Zunächst wurde der Effekt von „1522“ bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  (also 12x  $\text{IC}_{50}$  am NHE2,  $\sim\text{IC}_{50}$  am NHE1) auf den pH-Wert der reninsezernierenden Zellen in Ruhe untersucht.

Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole wurden aus den Nieren kochsalzarm ernährter Ratten isoliert wie in Kap. 2.2.1 beschrieben; die Färbung mit BCECF erfolgte wie in Kap. 2.2.3.3 ausgeführt. Die Glomerulasuspension wurde in der Superfusionskammer zunächst 7 Minuten mit der normalen HEPES-gepufferten physiologischen Kochsalzlösung (Na-HEPES-PS) superfundiert. Anschließend erfolgte Superfusion mit „1522“ (5  $\mu$ M) (Abb. 3.36a). Als Kontrolle wurde mit dem Lösungsmittel von „1522“, (0,01 % DMSO) durchströmt. Danach erfolgte eine Auswaschphase mit Na-HEPES-PS.

(     Minute 0 - 7             HEPES-Puffer  
       Minute 7 - 14          „1522“-Lösung  
       Minute 14 - 22         HEPES-Puffer             )

Tab. 3.39 Einfluss von „1522“ (5  $\mu$ M) auf den pH-Wert der Zelle unter Ruhebedingungen

|           |                                    | pH-Wert am Ende des Messintervalls    |
|-----------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Versuch   | Na - HEPES - PS                    | 7,38 $\pm$ 0,08 (18) <sup>1)</sup>    |
|           | Na - HEPES - PS + 5 $\mu$ M „1522“ | 7,28 $\pm$ 0,08 (18) <sup>1)***</sup> |
|           | Differenz                          | 0,10 $\pm$ 0,01 (18) <sup>2)***</sup> |
| Kontrolle | Na - HEPES - PS                    | 7,36 $\pm$ 0,07 (8)                   |
|           | Na - HEPES - PS + LM (0,01 % DMSO) | 7,34 $\pm$ 0,08 (8)                   |
|           | Differenz                          | 0,02 $\pm$ 0,01 (8) <sup>2)</sup>     |

<sup>1)</sup> Ausgangs-pH-Wert und pH nach „1522“-Gabe gegeneinander  $p = 0,0001$

<sup>2)</sup> pH-Differenzen gegeneinander aus Versuch und Kontrolle  $p < 0,001$

Die Messungen ergaben, dass 5  $\mu$ M „1522“ den intrazellulären pH-Wert um  $0,1 \pm 0,01$  von  $7,38 \pm 0,08$  auf  $7,28 \pm 0,08$  ( $n = 18$ ) senkte (Abb. 3.36b). Dieser Unterschied war hochsignifikant ( $p = 0,0001$ ; nicht parametrischer U-Test von Mann-Whitney für gepaarte Messwerte). Diese pH-Differenz war ebenfalls hochsignifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ( $p < 0,001$ ; nicht parametrischer U-Test von Mann-Whitney für nicht gepaarte Messwerte). Hier kam es zu einer nicht-signifikanten ( $p > 0,05$ ) pH-Erniedrigung von  $0,02 \pm 0,01$  pH-Einheiten von  $7,36 \pm 0,07$  auf  $7,34 \pm 0,08$  ( $n = 8$ ) (Abb. 3.36c).

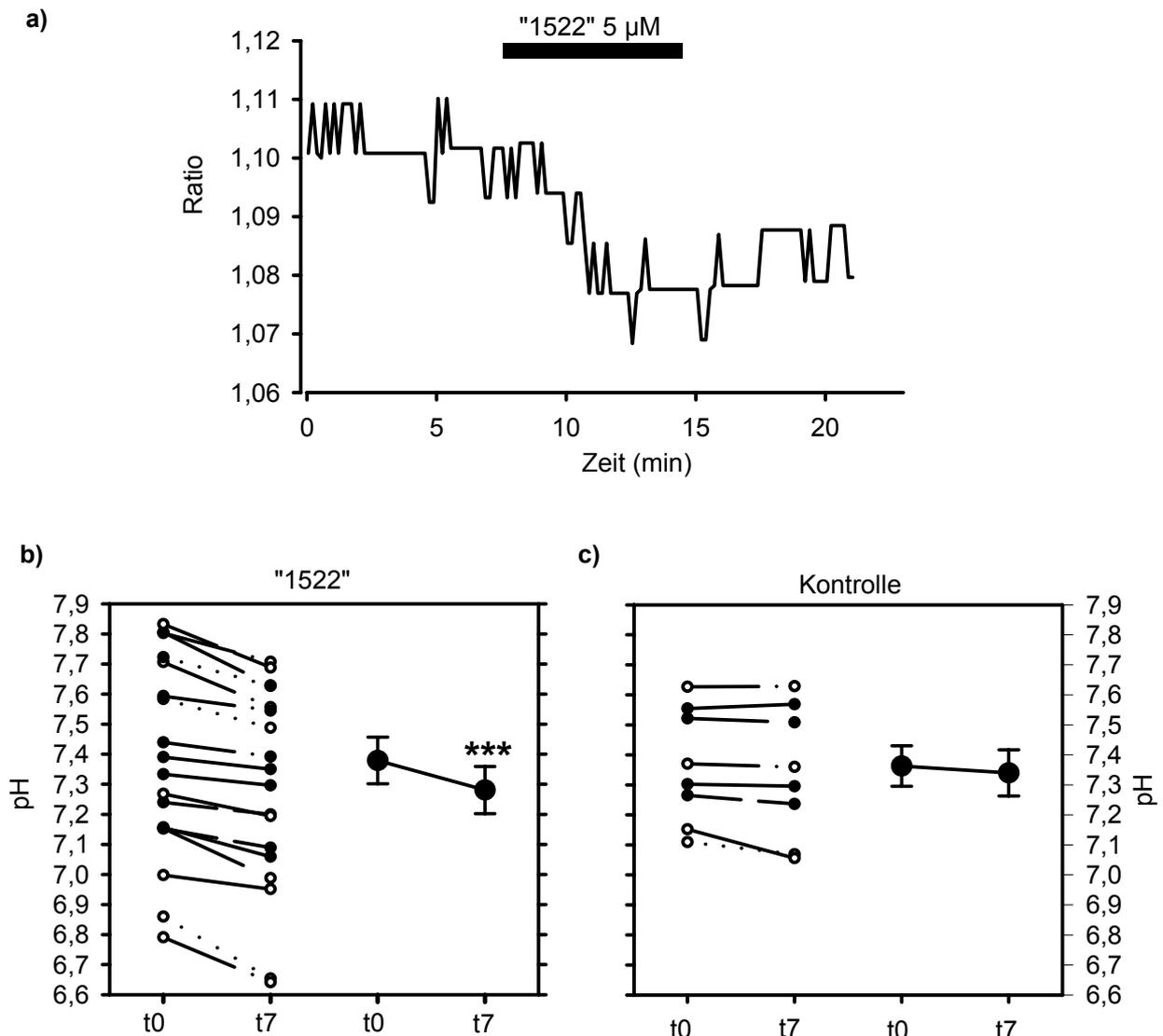


Abb. 3.36 Einfluss des NHE2-Inhibitors „1522“ auf den pH-Wert in reinsezernierenden Zellen  
 a) Während der Gabe des NHE2-Inhibitors „1522“ (5  $\mu$ M) ( $n = 18$ ) sank der pH-Wert in der Zelle. Bestimmt wurde die pH-Differenz zwischen dem mittleren pH-Wert der letzten Minute der Gabe der Na-HEPES-PS (Zeit  $t_0$ ) und dem mittleren pH-Wert während der letzten Minute der Gabe von „1522“ (Zeit  $t_7$ ).

b) Der pH-Wert während Gabe von „1522“ war hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) verschieden vom pH-Wert während der vorherigen Na-HEPES-PS-Superfusion.

c) Zur Kontrolle wurde mit einer entsprechenden Menge DMSO superfundiert (0,01 %;  $n = 8$ ), da „1522“ in DMSO gelöst vorlag. Der pH-Wert nahm auch hier geringfügig ab, der Unterschied zwischen dem pH-Wert während der DMSO-Superfusion war jedoch nicht signifikant verschieden von dem während Superfusion mit Pufferlösung ( $p > 0,05$ ).

In den weiter vom Gefäßpol entfernt gelegenen Regionen der afferenten Arteriole, in denen sich glatte Muskelzellen befinden, war diese Auswertung nur in wenigen Fällen möglich ( $n = 5$ ), da nur wenige Glomerula ein langes Gefäß auswiesen. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass es keinen Unterschied zwischen den reninhaltigen Zellen und den weiter oben gelegenen glatten Muskelzellen gibt. Der NHE2-Inhibitor schien in beiden Regionen gleich zu wirken.

### 3.6.1.2 Auswirkungen des NHE1-Inhibitors Cariporid auf den intrazellulären pH-Wert in Ruhe

Weiterhin war es von Interesse, auch die Auswirkungen des NHE1-Blockers Cariporid auf den intrazellulären pH-Wert zu untersuchen. Cariporid wurde in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die  $\text{IC}_{50}$  von Cariporid für die Hemmung des NHE1 liegt bei  $0,08 \mu\text{M}$  (für die Hemmung des NHE2 bei  $1,6$ ), so dass wie beim „1522“ mit ca. dem 10fachen der  $\text{IC}_{50}$  gearbeitet wurde. Es wurde wieder das unter Kap. 3.6.1.1 beschriebene Versuchsprotokoll verwendet (Abb. 3.37a),

( Minute 0 - 7            HEPES-Puffer  
 Minute 7 - 14        Cariporid-Lösung  
 Minute 14 - 22       HEPES-Puffer        );

auch die Auswertung erfolgte identisch zur „1522“-Messung, wie unter Kap. 3.6.1.1 beschrieben.

Tab. 3.40 Einfluss von Cariporid ( $1 \mu\text{M}$ ) auf den pH-Wert der Zelle unter Ruhebedingungen

|           |   | pH-Wert am Ende des Messintervalls    |
|-----------|---|---------------------------------------|
| Versuch   | Na - HEPES - PS                             | $7,42 \pm 0,07$ (17) <sup>1)</sup>    |
|           | Na - HEPES - PS + $1 \mu\text{M}$ Cariporid | $7,17 \pm 0,06$ (17) <sup>1)***</sup> |
|           | Differenz                                   | $0,25 \pm 0,02$ (17) <sup>2)***</sup> |
| Kontrolle | Na - HEPES - PS                             | $7,41 \pm 0,04$ (13)                  |
|           | Na - HEPES - PS + LM (DMSO, 0,01%)          | $7,31 \pm 0,04$ (13)                  |
|           | Differenz                                   | $0,10 \pm 0,02$ (13) <sup>2)</sup>    |

<sup>1)</sup> Ausgangs-pH-Wert und pH nach „1522“-Gabe gegeneinander  $p = 0,001$

<sup>2)</sup> pH-Differenzen gegeneinander aus Versuch und Kontrolle  $p < 0,001$

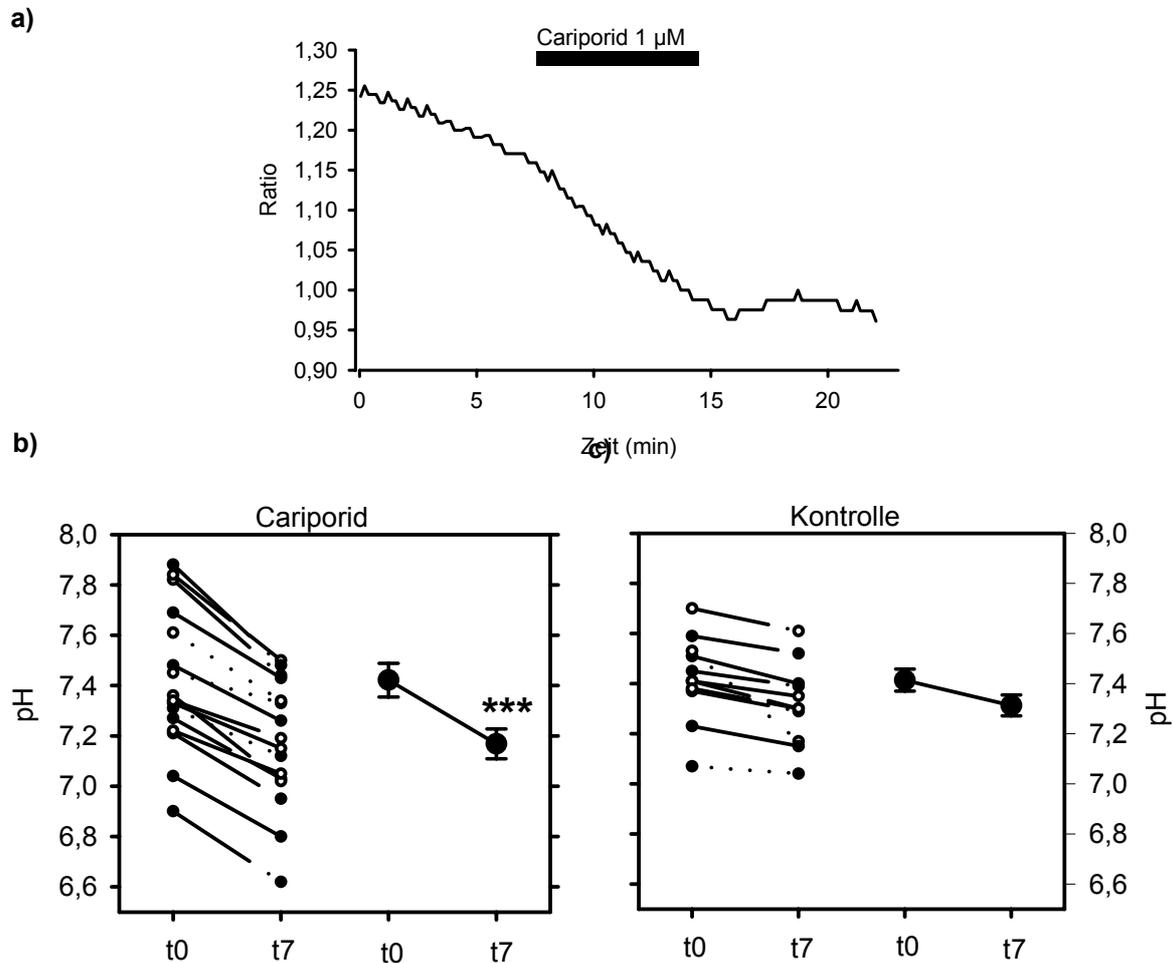


Abb. 3.37 Einfluss des NHE1-Inhibitors Cariporid auf den pH-Wert in reninsezernierenden Zellen  
 a) Während der Gabe von Cariporid (1  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 17$ ) sank der pH-Wert in der Zelle. Bestimmt wurde die pH-Differenz zwischen dem mittleren pH-Wert der letzten Minute der Gabe der Na-HEPES-PS (Zeit t0) und dem mittleren pH-Wert während der letzten Minute der Gabe von Cariporid (Zeit t7).  
 b) Der pH-Wert während Gabe von Cariporid war hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) verschieden vom pH-Wert während der vorherigen Na-HEPES-PS-Perfusion.  
 c) Zur Kontrolle wurde mit einer entsprechenden Menge DMSO superfundiert (0,01 %;  $n = 13$ ), da Cariporid in DMSO gelöst vorlag. Der pH-Wert nahm auch hier geringfügig ab, der Unterschied zwischen dem pH-Wert während der DMSO-Superfusion war jedoch nicht signifikant verschieden von dem während Superfusion mit Pufferlösung.

Auch 1  $\mu\text{M}$  Cariporid senkt den intrazellulären pH-Wert hochsignifikant ( $p < 0,001$ ; nicht parametrischer U-Test von Mann-Whitney für gepaarte Messwerte) um  $0,25 \pm 0,02$  pH-Einheiten von  $7,42 \pm 0,07$  auf  $7,17 \pm 0,06$  ( $n = 17$ ) ab (Abb. 3.37b).

Diese Erniedrigung des pH-Wertes ist genau wie beim „1522“ hochsignifikant gegenüber der pH-Erniedrigung in den Lösungsmittelkontrollen ( $p < 0,001$ ; nicht parametrischer U-Test von Mann-Whitney für nicht gepaarte Messwerte). Die nicht-signifikante ( $p > 0,05$ ) pH-Erniedrigung betrug hier  $0,10 \pm 0,02$  ( $n = 13$ ), von  $7,41 \pm 0,04$  auf  $7,31 \pm 0,04$  (Abb. 3.37c).

Die Ergebnisse scheinen zunächst auszusagen, dass beide NHEs zur Regulation des pH-Wertes der reninsezernierenden Zellen (unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen) beitragen. Betrachtet man jedoch die verwendeten Konzentrationen genauer, so lässt sich diese Schlussfolgerung nicht aufrecht erhalten. Die  $IC_{50}$  des Cariporid am NHE1 beträgt  $0,08 \mu\text{M}$ , am NHE2 beträgt sie  $1,6 \mu\text{M}$ . Bei der verwendeten Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  könnte auch der NHE2 gehemmt worden sein. Umgekehrt ist die  $IC_{50}$  von „1522“ am NHE2  $0,4 \mu\text{M}$ , am NHE1 ist sie  $5,2 \mu\text{M}$ . Auch hier könnte die verwendete Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  auch am NHE1 gewirkt haben. Aus diesen Gründen wurden weitere Experimente bei Konzentrationen durchgeführt, in denen die Hemmstoffe jeweils nur auf „ihren“ Transporter einwirken sollten.

### *3.6.1.3 Vergleich der Effekte des NHE1-Blockers Cariporid und des NHE2-Inhibitors „1522“ auf den intrazellulären pH-Wert*

In dieser Versuchsreihe wurde Cariporid in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  eingesetzt, „1522“ in einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$ . Diese Konzentrationen liegen im Bereich der jeweiligen  $IC_{50}$ . Damit sollte eine höhere Spezifität der Substanzen erreicht werden. Es wurde folgendes Protokoll verwendet (Abb. 3.38a):

|        |         |  |
|--------|---------|--|
| Minute | 0 – 7   | Na-HEPES-PS  |
| Minute | 7 – 14  | Cariporid $0,1 \mu\text{M}$ / „1522“ $0,5 \mu\text{M}$ |
| Minute | 14 – 19 | Na-HEPES-PS  |
| Minute | 19 – 26 | „1522“ $0,5 \mu\text{M}$ / Cariporid $0,1 \mu\text{M}$ |
| Minute | 26 – 32 | Na-HEPES-PS  |

Cariporid und „1522“ wurden im Wechsel als erstes oder zweites gegeben (jeweils  $n = 11$ ). Zur Auswertung wurden dann zu folgenden Zeiten immer die Messwerte einer Minute (6 Werte) gemittelt (Abb. 3.38b):

zur ersten Minute (Beginn)

zu Minute 6,5 - 7,5 (Kontrolle 1)

zu Minute 13,5 - 14,5 („1522“ / Cariporid 1)

zu Minute 18,5 - 19,5 (Kontrolle 2)

zu Minute 25,5 - 26,5 („1522“ / Cariporid 2)

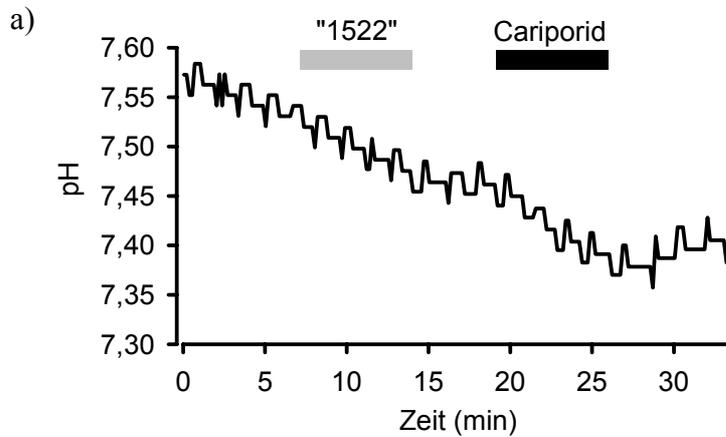
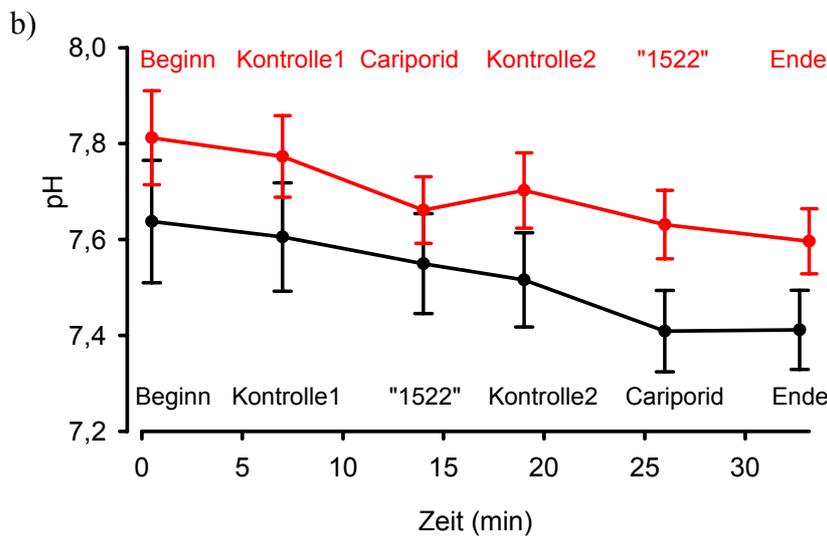
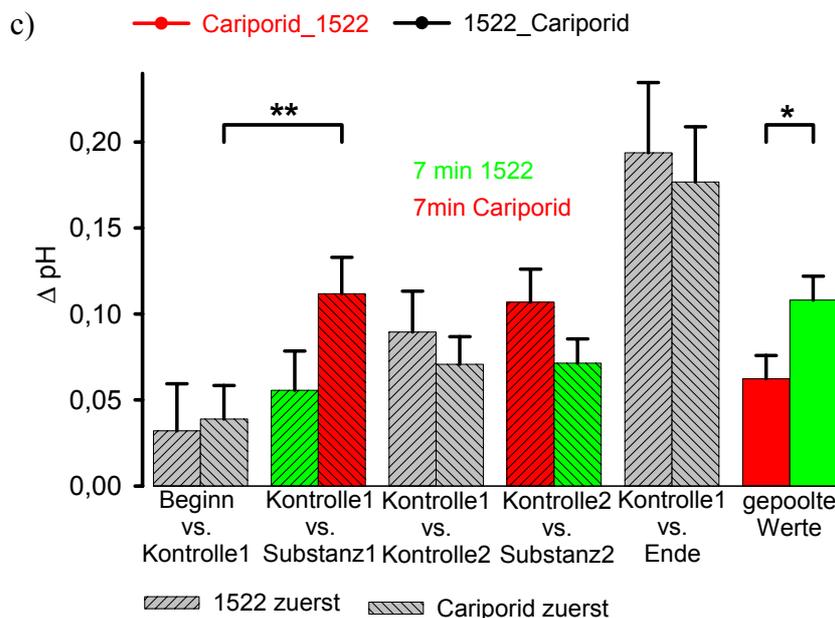


Abb. 3.38 Vergleich der Absenkung des intrazellulären pH-Wertes durch den NHE1 Blocker Cariporid im Vergleich zum NHE2-Blocker „1522“

a) Cariporid senkte den pH-Wert stärker ab als „1522“.



b, c) Die Messwerte einer Minute wurden zu bestimmten Zeiten gemittelt (vgl. Text). Cariporid senkte den pH-Wert stärker ab als „1522“ unabhängig davon, ob es als erstes oder als zweites gegeben wurde. 0,1  $\mu$ M Cariporid senkte den pH-Wert signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle ab ( $n = 11$ ), während 0,5  $\mu$ M „1522“ keine signifikante ( $p > 0,05$ ) Erniedrigung des pH-Wertes mehr bewirkte ( $n = 11$ ).



Werden die Daten der jeweiligen Substanz (Cariporid, „1522“) während der ersten und der zweiten Gabe gepoolt, so zeigt Cariporid mit  $0,11 \pm 0,01$  pH-Einheiten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) stärkere (schnellere) Absenkung des intrazellulären pH-Wertes als „1522“ mit  $0,06 \pm 0,01$  pH-Einheiten (Abb. 3.38c).

Stellt man nicht den Vergleich der beiden Substanzen in den Vordergrund sondern untersucht, ob beide Substanzen in dieser Konzentration überhaupt eine ansäuernde Wirkung haben, so ergibt sich, dass während der ersten Gabe der beiden Substanzen Cariporid den pH-Wert signifikant gegenüber dem ersten Kontrollwert absenkt ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.38c), „1522“ hingegen in dieser Konzentration keine signifikant ansäuernde Wirkung mehr aufweist ( $p > 0,05$ ).

Tab. 3.41 Vergleich der  $\text{pH}_i$ -Erniedrigung durch Cariporid ( $0,1 \mu\text{M}$ ) und „1522“ ( $0,5 \mu\text{M}$ )

|                 | Beginn         | Kontrolle 1                   | Cariporid 1 / „1522“            | Kontrolle 2    | Cariporid 2 / „1522“ | Ende            |
|-----------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------|----------------------|-----------------|
| Cariporid vorne | $7,81 \pm 0,1$ | $7,77 \pm 0,09$ <sup>1)</sup> | $7,66 \pm 0,07$ <sup>1)</sup> * | $7,7 \pm 0,08$ | $7,60 \pm 0,07$      | $7,59 \pm 0,07$ |
| „1522“ vorne    | $7,64 \pm 0,1$ | $7,60 \pm 0,1$                | $7,55 \pm 0,1$                  | $7,52 \pm 0,1$ | $7,41 \pm 0,09$      | $7,41 \pm 0,08$ |

<sup>1)</sup> Vergleich des ersten Kontrollwertes gegen den nach Gabe von Cariporid  $p < 0,05$

### 3.6.2 Einfluss des NHE2-Blockers „1522“ auf den pH-Wert nach Ansäuerung

In dieser Versuchsreihe wurde die Auswirkung des „1522“ auf die Erholung der Zelle nach vorheriger Ansäuerung untersucht. Dazu wurde die Zelle zunächst kurz mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  überströmt (Abb. 3.39). Dabei tritt zunächst  $\text{NH}_3$  in die Zelle ein und bindet dort Protonen um  $\text{NH}_4^+$  zu bilden, so dass die Zelle zunächst rasch stark alkalisch wurde. Nach der Entfernung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aus dem Superfusionsmedium verlässt  $\text{NH}_3$  die Zelle unter Zurücklassung von Protonen; die Zelle wird rasch überschießend sauer. Anschließend realkalisiert die Zelle langsam wieder auf den ursprünglichen pH-Wert zurück, der vor der Störung geherrscht hatte (Abb. 3.39). Hier sollte untersucht werden, ob diese Realkalisierung (= Relaxation) durch „1522“ ( $5 \mu\text{M}$ ) verzögert wurde oder abgeschwächt war.

Es wurde wieder ein Doppelstimulationsprotokoll verwendet (Abb. 3.39). Die Glomerulasuspension wurde vorab für die Basislinie 3 Minuten mit Na-HEPES-PS perfundiert. Dann erfolgte Superfusion mit einer  $10 \text{ mM}$  Lösung  $\text{NH}_4\text{Cl}$  für 1 Minute, anschließend wieder mit

Na-HEPES-PS (10 min), währenddessen die Relaxation unter Kontrollbedingungen stattfand (interner Standard). Darauf folgte eine wieder 1 minütige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Perfusion, nach der dann 6 Minuten die Lösung mit „1522“ (5  $\mu\text{M}$ ) gegeben wurde (Abb. 3.39). Kontrollen wurden wieder mit LM (0,01 % DMSO) durchgeführt.

Untersucht wurde die Geschwindigkeit der Realkalisierung mit und ohne „1522“. Bestimmt wurde dazu der exponentielle Anstieg der Realkalisierung über die Exponentialfunktion, und zwar vom Anstiegsbeginn über 5 Minuten (Abb. 3.39). Weiterhin wurde die Geschwindigkeit der Realkalisierung des zweiten Pulses auf den ersten bezogen (Puls 2 / Puls 1) und es wurde überprüft, ob es einen signifikanten Unterschied mit und ohne „1522“ gibt.

Tab. 3.42 Einfluss von „1522“ auf die Realkalisierungsgeschwindigkeit nach Ansäuerung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$

|  | Versuchsanzahl n | Realkalisierung Puls 1 (Anstiegs-geschwindigkeit) | Realkalisierung Puls 2 (Anstiegs-geschwindigkeit) | Puls 2 / Puls 1                   |
|--|------------------|---|---|-----------------------------------|
| $\text{NH}_4\text{Cl}$ / $\text{NH}_4\text{Cl}$ + „1522“ | 11               | $0,413 \pm 0,042$                                 | $0,273 \pm 0,054$ <sup>1)</sup> *                 | $0,638 \pm 0,088$ <sup>2)</sup> * |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$ / $\text{NH}_4\text{Cl}$          | 10               | $0,38 \pm 0,049$                                  | $0,451 \pm 0,062$ <sup>1)</sup> *                 | $1,314 \pm 0,253$ <sup>2)</sup>   |

<sup>1)</sup>  $p < 0,05$     <sup>2)</sup>  $p < 0,05$

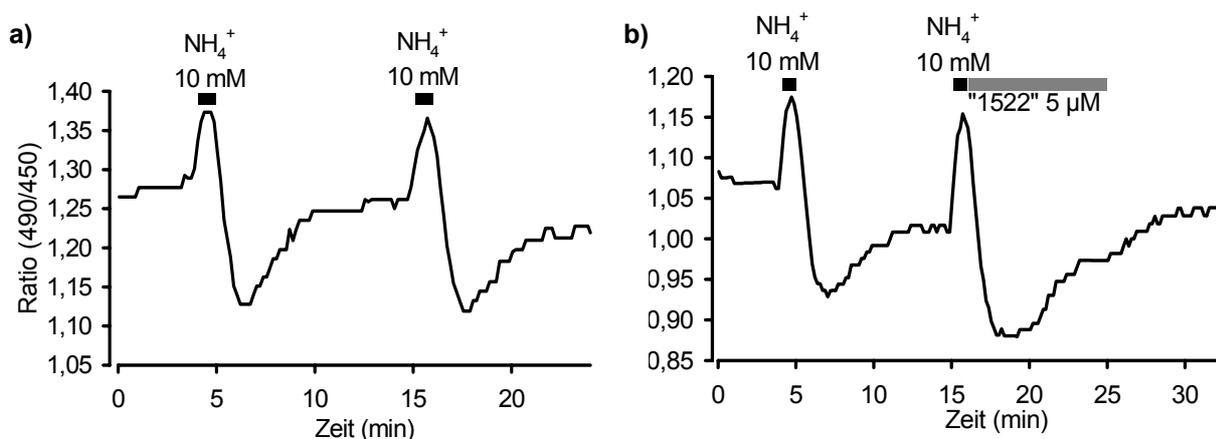


Abb. 3.39 a) Zwei aufeinanderfolgende Gaben  $\text{NH}_4^+$  bewirkten nach primärer Alkalisierung eine überschießende Ansäuerung, und anschließend realkalisierte die Zelle wieder.

b) Die Realkalisierung erfolgte nach Gabe von „1522“ signifikant verzögert.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die Realkalisierung nach zweiter Gabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  beschleunigt abläuft, während die Realkalisierung nach zweiter Gabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mit „1522“ verlangsamt abläuft (Tab. 3.42). Auch hier besteht ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied.

### 3.6.3 Messung des pH-Wertes in den reninhaltigen Vesikeln

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen pH-Wert senkenden Effekt des NHE2-Inhibitors hin, der allerdings wahrscheinlich nicht spezifisch für den NHE2 ist. Auch sollte eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes eher eine reninsekretions-stimulierende als eine hemmende Wirkung haben (Fray und Laurens, 1981). *In vivo* und *in vitro* hat „1522“ jedoch nachgewiesenermaßen eine reninsekretions-hemmende Wirkung (PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung). Wie unter Kap. 1.1 und Kap. 1.3.1.6 beschrieben, herrscht in den reninhaltigen Vesikeln mit einem pH-Wert von 5,5 ein stärker saurer pH-Wert als im Cytoplasma (pH 7,3). Man könnte spekulieren dass der NHE2, falls er in in der in der Membran der Reningranula lokalisiert ist, zur Aufrechterhaltung dieses pH-Unterschiedes beitragen könnte. Blockade des NHE2 könnte dann den pH-Wert in den Granula ändern und evtl. zu einer Alkalisierung des pH-Wertes in den Vesikeln führen. Damit ließe sich dann die beobachtete Hemmung der Reninsekretion durch „1522“ erklären. Um diese Hypothese zu testen, sollte in einem weiteren Ansatz der pH-Wert in den reninhaltigen Vesikeln mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor Green DND-189 gemessen werden (Kap. 2.2.3.4). Es wurde versucht, eine pH-Wert-Änderung nach Blockade des NHE2 unter Ruhebedingungen zu messen ( $n = 13$ ; Abb. 3.40). Allerdings konnte kein stabiles pH-Niveau erreicht und kein Einfluss von „1522“ auf den intravesikulären pH-Wert festgestellt werden.

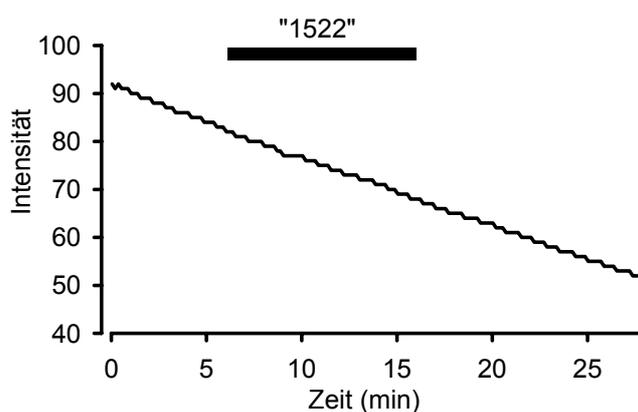


Abb. 3.40 Einfluss von „1522“ auf den pH-Wert in den reninhaltigen Vesikeln. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs LysoSensor Green, der Änderungen des pH-Wertes in sauren Kompartimenten anzeigt, konnte kein stabiles pH-Niveau und auch kein Einfluss des NHE2-Inhibitors „1522“ auf den pH-Wert in den reninhaltigen Vesikeln im distalen Teil der afferenten Arteriole festgestellt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

#### 4.1.1 Absolute Werte der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Werte für  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die unter Ruhebedingungen gemessen wurden, schwanken und sind in den verschiedenen Messreihen sehr unterschiedlich. Dies wird auf die Kalibrierung der Anlage zurückgeführt.

Im Einklang mit Ergebnissen von Carmines et al. (1993) an renalen Arteriolen des Kaninchens konnte Rauch (2000) zeigen, dass eine intrazelluläre Kalibrierung der Zellen nicht möglich ist. Für eine intrazelluläre Kalibrierung muss ein Austausch zwischen dem intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool stattfinden. Um dies zu erreichen, wurden Ionomycin ( $\text{Ca}^{2+}$ -Ionomphor), CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, Inhibitor der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme) und Rotenon (Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransports mit der Folge einer Hemmung des ATP-Transports) gleichzeitig auf die Zellen gegeben. Dadurch sollte zum einen eine stark erhöhte Permeabilität der Membran für  $\text{Ca}^{2+}$  und zum anderen eine stark gehemmte Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die intrazellulären Speicher erreicht werden, so dass der Austausch zwischen intra- und extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool erleichtert sein müsste. Aber auch bei dieser gleichzeitigen Anwendung der drei Substanzen sind die Zellen immer noch in der Lage,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu regulieren.

So ist eine intrazelluläre Kalibrierung für intakte Zellen aufgrund der Zelleigenschaften nahezu unmöglich und es muss eine zellfreie Kalibrierung durchgeführt werden, die den spezifischen Gegebenheiten in intakten Zellen (Kompartimentierung des  $\text{Ca}^{2+}$  in Zellorganellen usw.) nicht Rechnung trägt.

Hinzu kommt noch ein weitere Beobachtung. Sowohl die in Ruhe herrschende cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach ANG II-Stimulation (3 nM) nahm mit der Zeit ab. Zu Beginn meiner Arbeit (2000) lag das basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Durchschnitt bei 80 - 90 nM und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf ANG II-Stimulation betrug zwischen 60 - 70 nM. Später (im Jahr 2002) lag  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen bei 40 - 60 nM und die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch ANG II-Stimulation (3 nM) lag im Durchschnitt bei  $\sim$  40 - 50 nM. Rauch (2000) fand am selben Präparat basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte, die zwischen 90 - 130 nM lagen. In glatten Muskelzellen von präglomerulären Gefäßen der Ratte fanden Zhu und Arendshorst (1996) unter Ruhebedingungen eine cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von

50 nM, Fellner und Arendshorst (1999) fanden hier eine  $[Ca^{2+}]_i$  von 130 nM. Bei Carmines et al. (1993) lag  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen in Arteriolen des Kaninchens bei 155 - 188 nM, bei Gonzales et al. (1992) lag sie bei 170 nM (afferente Arteriole, Kaninchen). Die absoluten Werte für die basale  $[Ca^{2+}]_i$  und den Effekt für ANG II sind deshalb mit Vorbehalt zu betrachten.

#### 4.1.2 Charakterisierung der untersuchten Zellen

Wie in Kap. 2.2.3.1 und Abb. 2.2 ausführlich dargestellt, wurde die  $Ca^{2+}$ -Fluoreszenz im distalen Teil der afferenten Arteriole nahe dem Eintritt in das Glomerulum gemessen. Dieser als ROI in Abb. 2.2 dargestellte Bereich umfasste in proximaler Richtung gesehen 4 bis max. 6 Zellen. Es wurde in den meisten Fällen mit kochsalzarm ernährten Ratten gearbeitet, da aufgrund der kochsalzarmen Ernährung der Ratten das RAAS stark stimuliert (Kap. 1.2, 3) und der Renin-positive Bereich stark ausgedehnt ist (Kap. 1.2, Rauch 2000). Rauch (2000) konnte zeigen, dass 93,5 % aller afferenten Arteriolen aus kochsalzarm ernährten Ratten reninsezernierende Zellen bis zu einer Entfernung von 20  $\mu$ m proximal vom Gefäßpol und 21 % bis zu einer Entfernung von 30  $\mu$ m besitzen. In dem ausgewählten Messfenster sollten also bevorzugt reninsezernierende Zellen zu finden sein.

Weiterhin wurden bevorzugt solche Zellen ausgewählt, die sich aufgrund ihrer abgerundeten, plumpen Form, die für reninsezernierende Zellen typisch ist, sichtbar vom spindelförmigen Zelltyp glatter Muskelzellen unterschieden (Gattone et al., 1984; Bührle et al., 1985; Hackenthal et al., 1990; Kap. 1.2). Es ist zwar denkbar, dass die Methode der enzymatischen Präparation Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen hat, jedoch waren beide Zelltypen meistens deutlich von einander zu unterscheiden.

Die reninsezernierenden Zellen sind jedoch mit glatten Muskelzellen, Endothelzellen und extraglomerulären Mesangiumzellen über gap junctions verbunden (Forssman und Taugner, 1977, zitiert in Lorenz et al., 1993; Taugner et al., 1984), so dass auch nicht direkt in der ROI liegende Zellen das beobachtete Signal mit beeinflussen bzw. nicht RSZ innerhalb der ROI kein grundsätzlich abweichendes Verhalten in Bezug auf  $[Ca^{2+}]_i$  zeigen können.

Diese Dinge sind zu beachten, wenn in dieser Arbeit von RSZ gesprochen wird.

## 4.2 Erhöhung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch ANG II

Wie in Kap. 1.3.2.1 beschrieben, hemmt ANG II die Reninsekretion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Vander und Geelhoed, 1965; Naftilan und Oparil, 1978; Scholz et al., 1991; Übersicht: Hackenthal et al., 1990). Der ANG II  $\text{AT}_1$ -Rezeptor, über den ANG II seine reninsekretionshemmende Wirkung entfaltet (Kakinuma et al., 1993; Chatziantoniou et al., 1994), ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor aus der  $\text{G}_q/\text{G}_{11}$ -Familie. Über PLC und  $\text{IP}_3$  führt seine Aktivierung zu einem transienten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Peak-Phase) (Griendling et al., 1989, zitiert in Timmermanns et al., 1993), der aus der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus  $\text{IP}_3$ -sensitiven intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern resultiert. Dem transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg folgt ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum (Plateau-Phase) (Kurtz und Penner, 1989).

### Konzentrationsabhängigkeit des ANG II Effektes:

Die hier vorgestellten Ergebnisse aus Messungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 zeigten, dass sowohl in den reninsezernierenden Zellen im distalen Teil der afferenten Arteriole der Ratte (Kap. 3.1) als auch der Maus (Kap. 3.5) ANG II einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirkte. Da der Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei der Maus durch Losartan, einem ANG II  $\text{AT}_1$ -Antagonisten, zu hemmen war (Kap. 3.5.1.1), ist zumindest hier eindeutig belegt, dass dieser Anstieg durch ANG II  $\text{AT}_1$ -Rezeptoren vermittelt wird. Der mit ANG II (3 nM) erhaltene Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  war reversibel und ließ sich nach einer Ruhe-Phase mehrfach hintereinander auslösen (Kap. 3.1.1, 3.4.3.2.1).

Der durch ANG II hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg war, wie in Kap. 3.5.2.1 an der Maus gezeigt werden konnte, konzentrationsabhängig. Die ermittelte  $\text{EC}_{50}$  liegt bei 5,8 nM und steht damit im Einklang mit Werten aus der Literatur. So findet man Werte von 3 nM gemessen in Ratten-Podocyten (Henger et al., 1997), 18 nM gemessen in Monocyten aus der Pfortader der Ratte (Morel et al., 1996) und 11 nM in reninsezernierenden Zellen der Ratte (Rauch, 2000). Es sei noch darauf hingewiesen, dass zur Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs benutzt wurde. Die Höhe des Anstiegs gibt v.a. den Beitrag der Entleerung der intrazellulären Speicher wieder. Die Auswertung der AUC hätte sowohl den Beitrag der Entleerung der Speicher als auch des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx Rechnung getragen. Die AUC ist jedoch bei höheren ANG-Konzentrationen oft schwer zu bestimmen, da der Effekt häufig nur sehr langsam abfällt und die Basislinie (BL) wenn überhaupt erst spät wieder erreicht

wird (Abb. 3.35a). Die großen Unsicherheiten bei der Extrapolation der BL über lange Zeiten haben die Wahl der Peakhöhe in diesem Fall als besser bestimmbarer Parameter nahegelegt, obwohl sie in ihrer physiologischen Bedeutung eingeschränkter ist. Qualitativ deuten die vorhandenen Daten darauf hin, dass bei der Auswertung der AUC die Konzentrations-Wirkungskurve nach rechts verschoben ist.

### **Peak und Plateau vs. Speicherentleerung und $\text{Ca}^{2+}$ -Influx:**

Wie bei allen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Agonisten geht auch bei ANG II die beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung auf zwei Vorgänge zurück, die Entleerung der Speicher und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Diese beiden Prozesse spiegeln sich im wesentlichen jeweils in der Peak- und der Plateau-Phase des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transients wieder. Aufgrund der kurzen Stimulationsdauer (1 min) ist in unseren Versuchen bei ANG II-Konzentrationen von bis zu 10  $\mu\text{M}$  eine eigentliche Plateau-Phase häufig nicht zu erkennen (s. z. B. Abb. 3.2b bzw. 3.3a). allerdings kann man davon ausgehen, dass das verzögerte Abfallen des Transienten stark durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom geprägt wird (Abb. 3.35a). Die Experimente zum Erfassen der beiden Prozesse wurden bei einer ANG II-Konzentration von 3 nM durchgeführt, um das Doppelstimulationsprotokoll anwenden zu können (Kap 3.1; Abb. 3.1); bei höherer Agonistenkonzentration tritt Tachyphylaxie auf. Zum Trennen der beiden Prozesse (Speicherentleerung vs.  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom) wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt:

- a) Stimulation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung
- b) Stimulation nach Kanalblockade
- c) Stimulation nach Entleerung der Speicher durch SERCA-Inhibitoren.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1 zusammengefasst

#### **a) Stimulation in $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung**

Dem hierzu verwendeten 0 nM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer wurde nicht nur kein  $\text{Ca}^{2+}$  zugegeben, ihm ist auch 5 mM EGTA zugesetzt, welches Spuren von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hochaffin komplexiert. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient sollte dadurch nicht mehr einwärts gerichtet sein und folglich einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  verhindern. Wurden die Zellen mit diesem Puffer superfundiert, so kam es zu einem Abfall von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kap. 3.2.4.1, Abb. 3.12). Diese direkte Korrelation wurde bereits von Taniguchi et al. (1989) für Zellen der Sammelrohre und Tubuluszellen, von Kurtz und Penner

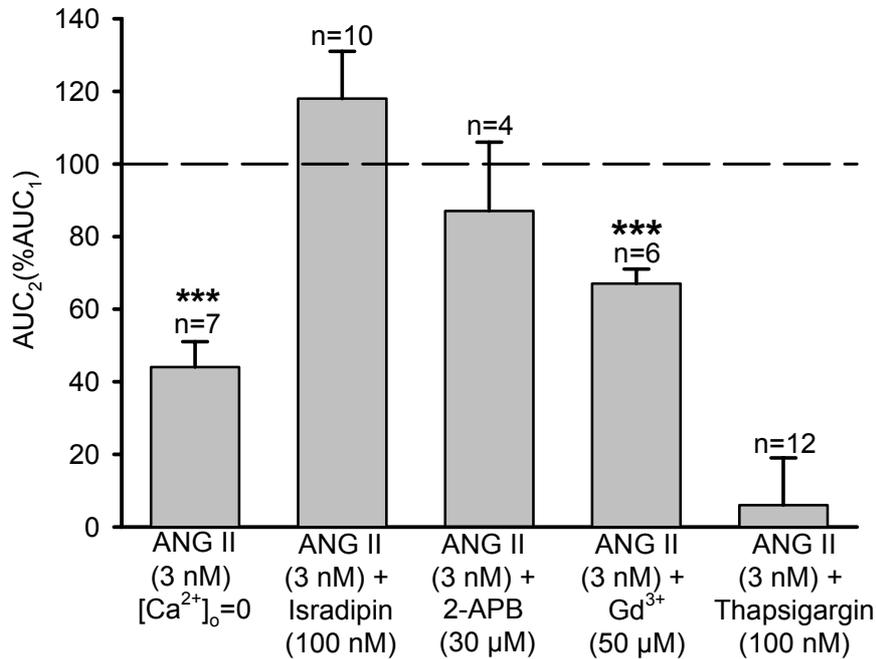


Abb. 4.1 Beitrag von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum und den intrazellulären Speichern zur ANG II (3 nM) induzierten Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Es wurde das Doppelstimulationsprotokoll mit ANG II (3 nM) angewandt. Vor der zweiten Stimulation wurden die Bedingungen geändert wie angegeben und die  $\text{AUC}_2$  auf die  $\text{AUC}_1$  bezogen. Die Daten sind korrigiert für die Verkleinerung der  $\text{AUC}_2$  unter Kontrollbedingungen ( $\text{AUC}_2$  (Kontrolle) =  $93 \pm 5\%$   $\text{AUC}_1$ ,  $n = 5$ ). Signifikanzen sind angegeben.

(1989) in juxtaglomerulären Zellen der Maus und von Salomonsson et al. (1991) für Macula Densa Zellen und Tubuluszellen der Henle'schen Schleife und von Rauch (2000) für reninsezierende Zellen der Ratte beschrieben. Das bedeutet, dass die auswärts  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität dieser Zellen in Ruhe hoch ist (vgl. auch Kap. 3.2.5.1.3 und 4.3.2c: Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ).

Eine anschließende Stimulation mit ANG II (3 nM) rief eine regelmäßige, aber stark verkleinerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort hervor. ANG II konnte eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern bewirken, die sog. Peak-Phase war also noch vorhanden. Die Antwortverkleinerung zeigt, dass der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern normalerweise ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum folgen würde, der in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium jedoch nicht erfolgen kann. Quantitativ (nach Tab. 3.10, AUC-Werte) beträgt die Größe des Peaks in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium bezogen auf einen zweiten Peak in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium  $44 \pm 7\%$  (AUC in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium:  $41 \pm 6\%$  vs. AUC in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium  $93 \pm 5\%$ ). Unter der Annahme, dass sich in der kurzen Überströmungszeit (3 min) mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier

Lösung die Speicher noch nicht wesentlich entleert haben, lässt sich folgern, dass bei Stimulation mit ANG II (3 nM) die Entleerung der Speicher 44 % und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom 56 % zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beitragen.

(Unter Berücksichtigung der Peakhöhe als Parameter hätte sich für den Beitrag der Speicher ein Wert von  $65 \pm 10$  % (Fläche in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium:  $59 \pm 8$  % vs. Fläche in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium  $91 \pm 6$  %) ergeben, was zeigt, dass die Peakhöhe den Beitrag der Speicher wahrscheinlich überschätzt.)

#### **b) Stimulation nach Kanalblockade**

Es wurden drei Kanalblocker untersucht, der  $\text{Ca}_v1.1$ -Blocker Isradipin (100 nM) und die SOCC-Inhibitoren 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

##### *Ca<sub>v</sub>1.1:*

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ , der durch  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II hervorgerufen wird, nicht durch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgt (Abb. 4.1). Die Blockade dieser Kanäle mit Isradipin, einem Antagonisten spannungsaktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ, hatte keinen Einfluss auf die durch ANG II ausgelöste Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kap. 3.2.4.2), obwohl ANG II in der hier verwendeten Konzentration von 3 nM zu einer Membrandepolarisation führt (Kap. 3.2.3.2). Für  $\text{K}^+$  ist nachgewiesen, dass Depolarisation glatter Muskelzellen mit  $\text{K}^+$  zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum führt (Somlyo und Himpens, 1989). Gleiches konnte Rauch (2000) für reninsezernierende Zellen der Ratte und Salomonsson et al. (1997) für die afferente Arteriole des Kaninchens zeigen. Am gleichen System konnte Rauch (2000) ebenfalls nachweisen, dass Isradipin die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die durch  $\text{K}^+$  ausgelöst wird, hemmt. Hier durchgeführte Kontrollexperimente mit  $\text{K}^+$  (60 mM) zeigen, dass die so ausgelöste Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Isradipin vollständig zu verhindern war. Diese Kontrollexperimente deuten darauf hin, dass der Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf jeden Fall mit Isradipin zu verhindern gewesen wäre, wenn er in dem untersuchten System auf spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen beruhen würde.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Kurtz und Penner (1989), die mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen keine spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (VOCCs,  $\text{Ca}_v1.x$ ) nachweisen konnten und daher vermuteten, dass der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über eine unspezifische Kationenleitfähigkeit erfolgt. Die Ergebnisse sind hingegen nicht im Einklang mit

Kornfeld et al. (1997), die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort von  $10^{-8}$  M ANG II durch Nifedipin, einem Antagonisten spannungsaktivierter L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im distalen Teil der afferenten Arteriole verhindern konnten. Auch Loutzenhiser und Loutzenhiser, die an der afferenten Arteriole mit einer ANG II-Konzentration von  $10^{-8}$  M arbeiteten (2000) und Purdy und Arendshorst, die ANG II in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M an isolierten glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole einsetzten (2001), konnten mit Nifedipin bei vorhandener, aber verkleinerter Peak-Phase die Plateau-Phase der ANG II-Antwort verhindern.

#### *SOCCs:*

In der vorliegenden Arbeit führte die Blockade speicheraktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch 2-APB (2-Aminoethoxyphenylborat, 30  $\mu\text{M}$ ) oder  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) zur Abnahme des Anstiegs von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) (Abb. 4.1, Kap. 3.2.4.3, Abb. 3.14c, d). Quantitativ beträgt hier die Größe der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für Blockade der SOCCs mit 2-APB  $87 \pm 19\%$  bezogen auf den zweiten unbehandelten Peak ( $81 \pm 18\%$  vs.  $93 \pm 5\%$ ). Mit  $\text{Gd}^{3+}$  kommt es zu einer Peakflächengröße von  $67 \pm 4\%$  ( $62 \pm 2\%$  vs.  $93 \pm 5\%$ ).

Man sieht, dass 2-APB die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nicht signifikant verkleinert,  $\text{Gd}^{3+}$  demgegenüber zu einer signifikanten Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Effektes führt. Beide Inhibitoren bewirken eine geringere Abnahme der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , als sie in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium erhalten wird. Das bedeutet, dass die beiden SOCCs-Inhibitoren unterschiedlich effektiv wirken und auch  $\text{Gd}^{3+}$  nur eine partielle Blockade bewirkt. Der deutlich geringere Effekt der SOCCs-Inhibitoren im Vergleich zu der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung könnte aber auch auf eine doch schon bedeutende Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in letzterem Fall hindeuten.

In den Abbildungen 3.14c, d in Kap. 3.2.4.3 und Tab. 3.12 sieht es so aus, als ob die Peak-Phase durch Blockade der SOCCs von einer Abnahme der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stärker betroffen ist als die Plateau-Phase (2-APB: Peakhöhe bezogen auf unbehandelten zweiten ANG-Peak:  $76 \pm 9\%$  vs. Peakfläche:  $87 \pm 19\%$ ;  $\text{Gd}^{3+}$ : Peak-Höhe:  $52 \pm 5\%$  vs. Peakfläche:  $67 \pm 4\%$ ).

Das wird jedoch darauf zurückgeführt, dass das verwendete System aus vielen Zellen besteht und in die vermeintliche Peak-Phase auch bereits die Plateau-Phase der Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit eingeht, bzw. umgekehrt in der Plateau-Phase noch die Peakphase zu finden ist. Einige Zellen reagieren schneller auf Stimulation mit ANG II als andere. Bei einigen erfolgt bereits

der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum, während bei anderen gerade  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt wird.

Nach der gefundenen partiellen Blockade der SOCCs mit 2-APB und  $\text{Gd}^{3+}$  ist dies nur noch begrenzt möglich, man hat nur noch eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die hauptsächlich auf Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR beruhen kann.

Aus den Literaturdaten, den Ergebnissen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium und mit Isradipin und der Tatsache, dass 2-APB und  $\text{Gd}^{3+}$  Inhibitoren der SOCCs sind, lässt sich aber der Schluss ziehen, dass der gefundene Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch ANG II nach Gabe von 2-APB und  $\text{Gd}^{3+}$  auf Speicherentleerung beruht und der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum vermindert ist.

Die Anwesenheit von SOCCs in reninsezernierenden Zellen wurde von Schweda et al. (2000) gezeigt (Kap. 1.3.1.1). Wie auch bei Fellner und Arendshorst (1999) beschrieben, führte Applikation von Inhibitoren der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase CPA (Cyclopiazonsäure) und Thapsigargin zur Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kap. 3.2.5), was ebenfalls auf Anwesenheit der SOCCs hindeutet. Bei den Experimenten von Fellner und Arendshorst (1999) war dieser Anstieg durch Entfernen von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  verkleinert, so dass nach ihren Messungen SOCCs in den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole vorhanden sind.

### **c) Stimulation nach Entleerung der Speicher durch SERCA-Inhibitoren**

Aus Versuchen mit den SERCA-Inhibitoren Thapsigargin ( $1\ \mu\text{M}/100\ \text{nM}$ ) und CPA ( $10\ \mu\text{M}$ ) geht hervor, dass auch nach Hemmung der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase weiterhin eine kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort erhalten werden kann. Allerdings war sie im Falle des Thapsigargin sehr gering und wurde auch nicht jedesmal beobachtet; sie hängt offensichtlich davon ab, wie vollständig die SERCA-Inhibition ist (Tab. 3.13). Thapsigargin und CPA erhöhen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , was zum einen auf der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern beruht und zum anderen auf dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch die SOCCs, die durch die Speicherentleerung aktiviert werden. Dies gilt auch an der afferenten Arteriole der Rattenniere (Fellner und Arendshorst, 1999).

Ist, wie bei den meisten Experimenten mit Thapsigargin, die Entleerung der Speicher vollständig und die SOCC-Aktivierung damit auch maximal, so kann ANG II, das bei einer Konzentration von  $3\ \text{nM}$  die beiden Prozesse nur partiell aktiviert, nichts mehr ausrichten; es

gibt kein Signal. Ist hingegen, wie bei einigen Thapsigargin- und allen CPA-Experimenten, die Entleerung der Speicher und die Aktivierung der SOCCs nur partiell, so kann ANG II (3 nM) die Speicher jetzt zusätzlich entleeren und die SOCCs weiter aktivieren und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient entsteht. Dies erklärt den Befund, dass je schwächer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nach SERCA-Hemmung (also je unvollständiger die Hemmung) desto größer die Antwort auf ANG II ist (Tab. 3.13).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

1. der durch ANG II (3 nM) hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient zu ~40 % auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Speichern und 60 % aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom besteht
2. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nicht durch Dihydropyridin-empfindliche spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelt wird und
3. dass die Kationenkanäle, durch die der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgt, höchstwahrscheinlich SOCCs sind, die kaum 2-APB und nur partiell  $\text{Gd}^{3+}$ -empfindlich sind.

Die Signalkette des ANG II-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs stellt sich damit folgendermaßen dar: Die Bindung von ANG II an den ANG II  $\text{AT}_1$ -Rezeptor aktiviert die PLC, was zur Bildung von  $\text{IP}_3$  führt und darüber zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Die Entleerung der Speicher bewirkt eine Aktivierung speicheraktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, durch die es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die reninsezernierenden Zellen und somit zu einer weiteren Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kommt. Auch könnte, wie von Ma et al. (2000) beschrieben,  $\text{IP}_3$  ebenfalls direkt an der Aktivierung der SOCCs beteiligt sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das bei der Spaltung von  $\text{PIP}_2$  in  $\text{IP}_3$  und DAG gebildete DAG die SOCCs zusätzlich aktiviert, wie es von Albert und Large (2002) für Noradrenalin vorgeschlagen wurde.

### **4.3 Einfluss von cAMP auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen**

#### **4.3.1 Effekt von cAMP auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen sowie in glatten Muskelzellen verschiedener Gefäße der Ratte**

##### **a) Pharmakologische Charakterisierung der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch cAMP**

cAMP stellt einen wichtigen stimulierenden sekundären Botenstoff für die Reninsekretion aus reninsezernierenden Zellen dar (Kap. 1.3.1.3; Übersichten: Keeton and Campbell, 1981; Churchill, 1985). Die Reninsekretion und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sind invers miteinander verknüpft („Calciumparadox“; Kapitel 1.3.1.1; Übersicht : Churchill, 1985). Man könnte daher spekulieren,

dass wie im glatten Muskel, cAMP-Erhöhung  $[Ca^{2+}]_i$  erniedrigt und über diesen Mechanismus die Reninsekretion fördert. Daher stellte die ursprüngliche Beobachtung, dass Perfusion mit Forskolin und IBMX, alleine und in Kombination, zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in reinsezernierenden Zellen der Ratte führt (Kap. 3.2.1.1, 3.2.1.2.1, Abb. 4.2), eine große Überraschung dar. Dieser Befund wurde zunächst pharmakologisch auf verschiedenen Wegen abgesichert.

Da Forskolin in der verwendeten Konzentration (10  $\mu$ M) auch für weitere Effekte verantwortlich ist, unter anderem einen blockierenden Einfluss auf verschiedene  $K^+$ -Kanäle ausübt (Laurenza et al., 1989; Kessler et al., 1997), wurde die cAMP-Konzentration durch Isoprenalin (0,1 - 1  $\mu$ M) allein und in Kombination mit IBMX (100  $\mu$ M) in der Zelle angehoben. Die in Kap. 3.2.1.2.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den reinsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der kochsalzarm ernährten Ratten, wie sie hier verwendet wurden, die Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren mit Isoprenalin zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  führte (Abb. 3.3). Da dieser Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch den Zusatz des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX gesteigert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass dieser durch  $\beta_1$ -Stimulation ausgelöste Effekt auf der Erhöhung der cAMP-Konzentration beruht. Isoprenalin ist in der relativ hohen Konzentration von 1  $\mu$ M in der Lage, auch  $\alpha$ -Rezeptoren zu aktivieren. Der hier durch Isoprenalinstimulation gezeigte  $Ca^{2+}$ -Effekt ist aber eindeutig auf  $\beta$ -Rezeptorstimulation zurückzuführen, da er mit dem  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten Propranolol zu verhindern war, nicht aber durch den Zusatz des  $\alpha$ -Adrenozeptorinhibitors Prazosin (Kap. 3.2.1.2.2).

Auch die Gabe von membrangängigem db-cAMP (dibutyryl-cAMP) führte zu einer Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Kap. 3.2.1.3; Abb. 4.2). Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe von Forskolin, IBMX und Isoprenalin tatsächlich durch die Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration vermittelt wird. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch db-cAMP erfolgt zwar wesentlich langsamer als durch Isoprenalin, was jedoch damit erklärt werden kann, dass db-cAMP erst durch die Membran treten muss. Isoprenalin übt demgegenüber einen membranrezeptorvermittelten Effekt aus.

Die durch alle vier verwendeten Substanzen ausgelöste Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  lag immer in der gleichen Größenordnung zwischen 10 und 20 nM (Abb. 4.2) und schwankte zwischen 30 bis 100 % der Antwort auf ANG II (3 nM). Eine Verstärkung des Stimulus bewirkte kaum

eine Vergrößerung der Antwort, erhöhte aber die Häufigkeit der Antwort. Nach der Stimulation mit cAMP-konzentrations-erhöhenden Substanzen reagierte nicht jedes untersuchte Gefäß mit einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , die Anwothhäufigkeit lag bei 50 - 100 %. Durch Konzentrationserhöhung der jeweiligen Stimulatoren konnte aber eine Verbesserung der Antwortfrequenz erreicht werden (Abb. 4.2), die bei der Standardstimulation (1  $\mu$ M Isoprenalin + 100  $\mu$ M IBMX für 3 min) bei 80 % lag.

Die cytosolische cAMP-Konzentration in Ruhe und nach Stimulation wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt; solche Messungen sind aber von anderen Gruppen durchgeführt worden. So fanden Kurtz et al. (1984) in isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte in Kultur, dass Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M, 2 min) die cAMP-Konzentration verdoppelt, Forskolin sie verzehnfacht. Friis et al. (2002) zeigten in derselben Präparation, dass Stimulation mit 1  $\mu$ M Forskolin allein für 10 min den cAMP-Gehalt der Zellen vervierfacht und Kombination mit Trequensin (spezifischer PDE3-Hemmstoff) verfünffacht. Man kann also davon ausgehen, dass die hier gewählte Standardstimulation den cAMP-Gehalt um das 2-5-fache steigert, also keine exzessive Steigerung hervorruft.

Der wichtigste cAMP-Rezeptor in der Zelle ist die PKA. So wird die Wirkung von cAMP meistens über Aktivierung der PKA vermittelt, die dann im Weiteren bestimmte Proteine phosphoryliert, sog. sekundäre Regulatoren, die anschließend die biologische Wirkung auslösen. In diesem Fall aber scheint die PKA nicht allein oder vielleicht sogar überhaupt nicht an der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch cAMP beteiligt zu sein. Eine Blockade der PKA mit dem spezifischen Inhibitor H89 (10  $\mu$ M) hatte keinen Einfluss auf die Höhe der durch cAMP-Erhöhung ausgelösten Steigerung von  $[Ca^{2+}]_i$ , jedoch ist die Fläche der Antwort stark verkleinert (Kap. 3.2.1.4). Allerdings bewirkte H89 selbst einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , von dem nicht klar ist, ob er auf der Hemmung der PKA beruht. Die Quantifizierung des folgenden Isoprenalin-Signals war daher relativ schwierig. Die Experimente zeigten aber eindeutig, dass die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auch nach PKA-Inhibition noch möglich war. Wäre die Aktivierung der PKA an dem cAMP-Effekt der alleinige Signalweg, müsste dieser Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch cAMP nach PKA-Hemmung vollständig verhindert sein. Um allerdings eine ganz sichere Aussage diesbezüglich zu treffen, müssen diese Ergebnisse mit H89 noch durch Untersuchungen mit weiteren PKA-Inhibitoren (Rp-8-Br-cAMPS + Rp-8-CPT-cAMPS oder Rp-8-Br-MB-cAMPS, Biolog-Katalog) belegt werden.

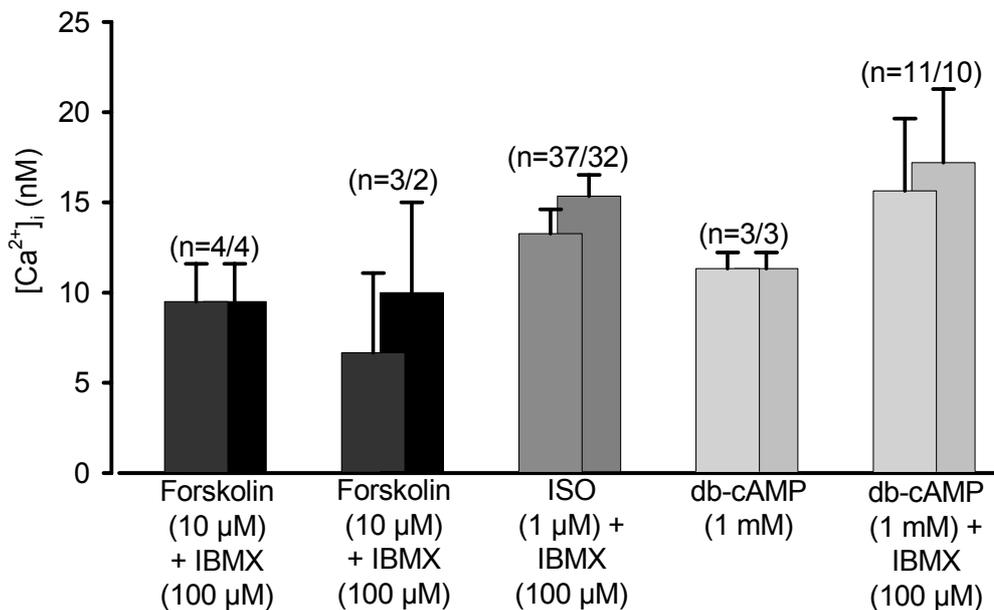


Abb. 4.2 Die Gabe von Forskolin, Isoprenalin (ISO), IBMX oder db-cAMP rief jeweils eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervor, die immer in der gleichen Größenordnung lag. Nicht jedes Gefäß antwortete mit einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  auf die cAMP-Erhöhung, woraus sich die zwei n-Zahlen ableiten: (alle vermessenen Gefäße/antwortende Gefäße). So sind im Vordergrund auch die Antwortgrößen bezogen auf alle Experimente dargestellt, im Hintergrund sind nur die Responder einbezogen. Dargestellt ist hier die Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  für die einzelnen Stimulationen.

#### b) Evidenz, dass der Effekt auf die afferente Arteriole der Rattenniere mit reninsezierenden Zellen beschränkt ist

##### *Verschiedene Gefäße der Rattenniere, Salzdiät:*

Interessante Unterschiede zeigten Untersuchungen von größeren, ebenfalls durch eine Siebpräparation gewonnenen Gefäßfragmenten der Ratte ohne Glomerulum. Diese bestanden ihrem Aussehen nach nur noch aus glatten Muskelzellen. Hier konnten zum Teil Gefäßfragmente isoliert werden, die eine Verzweigung aufwiesen, bei der ein Verzweigungsteil wesentlich stärker war als der andere, der wahrscheinlich die afferente Arteriole darstellt. In dem dickeren Ast, vermutlich der Arteriae interlobulares, bewirkte Isoprenalin keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , während gleichzeitig im als afferente Arteriole identifizierten Verzweigungsteil ein Anstieg von cytoplasmatischem  $Ca^{2+}$  auftrat (Kap. 3.2.2.2). Der durch cAMP-Anstieg gesehene Effekt scheint demzufolge auf die afferente Arteriole der Ratten beschränkt zu sein.

Hier allerdings konnte kein Unterschied zwischen weiter proximal und weiter distal liegenden Bereichen nachgewiesen werden (Kap. 3.2.2.1). Auch gab es keinen signifikanten

Unterschied bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf eine cAMP-Erhöhung zwischen kochsalz-reich und kochsalz-arm ernährten Ratten. Kochsalzrestriktion stimuliert das RAAS und bewirkt eine vermehrte Umwandlung glatter Muskelzellen in reninsezernierende Zellen. Der reninpositive Bereich wird zum einen weiter nach proximal ausgedehnt, zum anderen wird die Anzahl der reninpositiven Arteriolen vermehrt (Rauch, 2000; Hackenthal et al., 1987; Bührle et al., 1984).

Auf eine Stimulation mit Isoprenalin + IBMX schienen bei kochsalz-arm ernährten Ratten, in denen die Anzahl der reninsezernierenden Zellen erhöht ist, mehr Gefäße mit einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu reagieren, doch wurde hier die Signifikanz nach dem  $\chi^2$ -Test knapp verfehlt (signifikant auf dem 90 % Niveau aber nicht auf dem 95 % Niveau).

Aus den Ergebnissen, die an den Gefäßfragmenten (Kap. 3.2.2.2) erhalten wurden und denen, die mit unterschiedlicher Kochsalzdiäten ernährten Ratten erhalten wurden (Kap. 3.2.2.1), kann der Schluss gezogen werden, dass der auf cAMP-Erhöhung zurückzuführende  $\text{Ca}^{2+}$ -Effekt in der afferenten Arteriole zu suchen ist. Da im distalen und im proximalen Teil der afferenten Arteriole keine signifikanten Unterschiede bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf cAMP-Stimulation festzustellen waren und auch kein signifikanter Unterschied durch unterschiedliche Kochsalzdiät erhalten wurde, scheint diese Reaktion die gesamte afferente Arteriole zu betreffen. Wir vermuten weiterhin, dass die Ursache des Anstiegs von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach cAMP-Erhöhung auf die reninsezernierenden Zellen zurückzuführen ist. Zwei Punkte stützen diese Hypothese: Die oben erwähnten Experimenten an verzweigten Gefäßen (Abb. 3.9a) zeigten, dass nicht die A. lobularis, wohl aber das abzweigende Vas afferens reagierten. Die reninsezernierenden Zellen sind mit den glatten Muskelzellen über gap junctions verbunden (Taugner et al., 1984; Forssman und Taugner, 1977, zitiert in Lorenz et al., 1993; Russ et al., 1999), über die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort entlang der afferenten Arteriole weitergeleitet wird. Der zweite Punkt, der diese Hypothese stützt, betrifft die Anwohnhäufigkeit, die statistisch ~ 80 % war; dies liegt im Bereich der Wahrscheinlichkeit, in den 20  $\mu\text{m}$  distal vom Eintritt in das Glomerulum ein reninpositiver Bereich zu finden (93 % bei salzarmer Diät, 76 % bei Normaldiät; Rauch, 2000). Es scheint also, dass die reninsezernierenden Zellen, die wohl den auffälligsten grundsätzlichen Unterschied zwischen der afferenten Arteriole gegenüber anderen Arterien und Arteriolen darstellen, in Kombination mit den glatten Muskelzellen in der afferenten Arteriole diese veränderten Eigenschaften bewirken.

*Speziesunterschiede:*

Die mit 80 % nach Stimulation mit ISO + IBMX auftretende  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung in Vasa afferentia aus der Rattenniere steht in starkem Widerspruch zu den Experimenten an der afferenten Arteriole des Kaninchens. Kornfeld et al. (2000) zeigten, dass hier Isoprenalin und Forskolin keinen Einfluss auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Ruhe haben, Isoprenalin jedoch den durch Noradrenalin-stimulierten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hemmt. Sie sind weiterhin schwer mit der „normalen“ Reaktion einer Arteriole auf cAMP-Erhöhung vereinbar. In glatten Muskelzellen führt cAMP-Erhöhung zu einer Relaxation, die auf Senkung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (SERCA-Effekt) und Abnahme der Kontraktilität beruht, wobei auf die näheren Einzelheiten hier nicht eingegangen wird (siehe dazu Übersicht: Karaki et al., 1997).

Systematische Messfehler können sicher ausgeschlossen werden, da auch mit dieser Präparation, in Einklang mit der Literatur, kein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen der Maus nachzuweisen war (Kap. 3.2.6). Sowohl im distalen Teil der afferenten Arteriole von Mäusen des Auszuchtstamms CD1 als auch des Inzuchtstamms C57 konnte in 25 Versuchen an 11 verschiedenen Tieren keine Erhöhung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit Isoprenalin und IBMX beobachtet werden. Auch spielte die kochsalz-arme Ernährung der Ratten wahrscheinlich keine Rolle, da weder bei kochsalz-arm ernährten noch bei kochsalz-normal ernährten Mäusen eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu beobachten war (Kap. 3.2.6). Dies gewinnt dadurch an Bedeutung, dass die Mäuseversuche über eine lange Periode gelegentlich durchgeführt wurden und dass in gleichzeitigen Versuchen an Vasa afferentia der Ratte sehr wohl der cAMP-Effekt in seiner üblichen Form beobachtet wurde. Es handelt sich bei dem hier beschriebenen Effekt offensichtlich um ein speziesabhängiges Phänomen.

### **4.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle des cAMP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten: Speicherentleerung und $\text{Ca}^{2+}$ -Influx**

Wie unter Kap. 4.2 beschrieben, kann eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zum einen auf Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum beruhen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) und zum anderen auf Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern.

Zur Untersuchung, welcher der beiden Prozesse (Speicherentleerung vs.  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom) für die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch cAMP-Stimulation verantwortlich ist, wurden analog zu Kap. 4.2 drei experimentelle Ansätze verfolgt:

- Stimulation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung
- Stimulation nach Kanalblockade
- Stimulation nach Entleerung der Speicher durch SERCA-Inhibitoren.

Diese Ergebnisse sind in Abb. 4.3 zusammengefasst.

d) Zusätzlich wurde noch die Auswirkung einer Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain auf den cAMP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg untersucht.

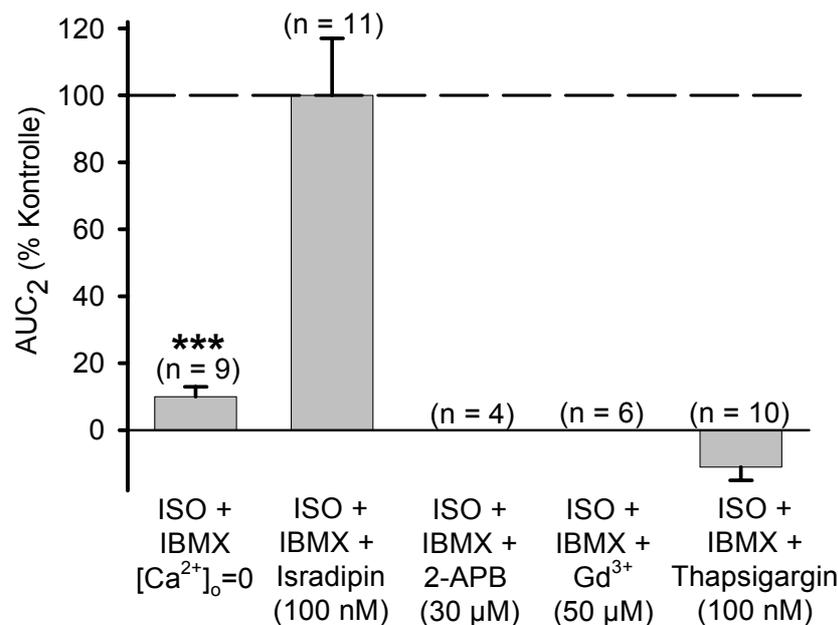


Abb. 4.3 Beitrag von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum und den intrazellulären Speichern zur Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) induzierten Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Es wurde das Doppelstimulationsprotokoll mit Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) + IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) angewandt. Vor der zweiten Stimulation wurden die Bedingungen wie angegeben geändert und die  $\text{AUC}_2$  auf die  $\text{AUC}_1$  bezogen. Die Daten sind korrigiert für die Verkleinerung der  $\text{AUC}_2$  unter Kontrollbedingungen ( $\text{AUC}_2$  (Kontrolle) =  $81 \pm 12 \% \text{AUC}_1$ ,  $n = 4$ ). Signifikanzen sind angegeben.

#### a) Stimulation in $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle, durch die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als Antwort auf cAMP-Stimulation erhöht wird, ist im wesentlichen im Extrazellulärraum zu suchen. Nach Entfernung von  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  ( $0 \text{ nM Ca}^{2+}$ -Puffer,  $5 \text{ mM EGTA}$ ) wurde der Effekt zwar noch regelmässig ausgelöst, er war aber auf

~ 10 % vermindert (Abb. 4.3). Dabei wurde bereits berücksichtigt, dass auch die zweite Antwort auf Isoprenalin + IBMX in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung um rund 20 % vermindert ist (Tab. 3.10). Dieser Resteffekt (10%) könnte überwiegend aus der Entleerung von Speichern kommen, möglicherweise aber auch aus einem Einstrom von „Rest- $\text{Ca}^{2+}$ “. Wie die Experimente mit  $\text{K}^+$  (60 mM) zeigen, war in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium durch  $\text{K}^+$  noch eine geringe, unregelmässig auftretende Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu beobachten (Kap. 3.2.4.1, Abb. 3.12).

#### **b) Stimulation nach Kanalblockade**

Wie in den Untersuchungen des ANG II-Effektes wurden wieder der  $\text{Ca}_v1.1$ -Blocker Isradipin (100 nM) sowie die SOCC-Blocker 2-APB (2-Amoniethoxyphenylborat; 30  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) untersucht (vgl. Kapitel 3.2.4.3, S. 91). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3 zusammengefasst.

Isradipin (100 nM) veränderte die Antwort auf Isoprenalin + IBMX nicht. Man muss also schließen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsaktivierte, Dihydropyridin-empfindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (VOCCs,  $\text{Ca}_v1.x$ ) für die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als Antwort auf cAMP-Erhöhung keine Bedeutung hat. Dazu passt auch der Befund, dass Isoprenalin + IBMX keine Änderung des Membranpotentials hervorruft (Kap. 3.2.3.2, Messung des Membranpotentials mit Hilfe des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3); bestätigt in Ganzzellklemmversuchen von A. Stehle, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen).

Im Gegensatz zu Isradipin verhinderten die SOCC-Blocker 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Stimulation mit Isoprenalin und IBMX vollständig (Abb. 4.3, Kap. 3.2.4.3, Abb. 3.14a, b). Demnach müsste das  $\text{Ca}^{2+}$  für den Effekt zu 100 % aus dem Extrazellulärraum kommen und ausschließlich durch SOCCs in die Zelle eintreten. Offensichtlich steht dieser Schluss im Gegensatz zu den Experimenten in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer, bei denen ja noch ein kleiner (~ 10 %) Effekt regelmäßig beobachtet wurde. Es wäre möglich, dass die hier verwendeten SOCCs-Blocker bei den gegebenen Konzentrationen auch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Speichern hemmen könnten.

### c) Stimulation nach Entleerung der Speicher durch SERCA-Inhibitoren

Ein weiterer Hinweis darauf, dass SOCCs an der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt sind, ist aus Experimenten mit den Inhibitoren der sarkoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA-Inhibitoren) Thapsigargin und CPA zu entnehmen (Kap. 3.2.5, Abb. 3.15a, 3.16a).

Die Vorbehandlung mit Thapsigargin verhinderte vollständig die  $Ca^{2+}$ -Erhöhung auf Stimulation mit Isoprenalin + IBMX, obwohl in diesem Signalweg, wie oben gezeigt, der Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum die entscheidende  $Ca^{2+}$ -Quelle ist. Nach  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibition sind jedoch die SOCCs schon vollständig aktiviert, so dass eine weitere Stimulation mit Isoprenalin keine Wirkung mehr haben kann. Nach Thapsigargingabe war zum Teil sogar ein Absinken von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit Isoprenalin + IBMX zu sehen. Der Grund dafür könnte darin zu suchen sein, dass durch Isoprenalinstimulation intrazellulär erhöhtes cAMP eventuell die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase aktiviert, was eine gesteigerte Aktivität des  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -Austauschers zur Folge haben könnte. Dieser würde dann zu einem Transport von  $Ca^{2+}$  aus der Zelle heraus führen, so dass es zu einem Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  käme. Dieser Effekt würde sonst durch die  $Ca^{2+}$ -erhöhenden Wirkung von cAMP überdeckt werden.

Bei Vorbehandlung mit CPA (100  $\mu$ M) war die Inhibition nur partiell, was wohl wieder durch die schwächere Inhibition der SERCA durch die Substanz bedingt ist.

Die Perfusion mit  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibitoren, die die sarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -ATPase blockieren, führt zur Entleerung der intrazellulären Speicher. Als Folge steigt  $[Ca^{2+}]_i$  zum einen durch das freigesetzte  $Ca^{2+}$  und zum anderen durch den Einstrom aus dem Extrazellulärraum an. Grund dafür ist die Aktivierung der speicheraktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch die entleerten Speicher (Kap. 1.3.1.1). Dies konnte von Fellner und Arendshorst (1999) an präglomerulären Gefäßen nachgewiesen werden. Mit den SERCA-Inhibitoren CPA und Thapsigargin in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium erhielten sie einen leichten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , der nach Zusatz von  $Ca^{2+}$  in das extrazelluläre Medium verstärkt werden konnte (Fellner und Arendshorst, 1999). Auch in dem hier untersuchten System führte das Entleeren der Speicher durch Blockade der sarkoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -ATPase mit den SERCA-Inhibitoren CPA und Thapsigargin zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ . In einigen Fällen kam es wieder zu einem leichten Absinken von  $[Ca^{2+}]_i$ , wenn der primäre Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  sehr schnell erfolgte und sehr stark war. Dieses Phänomen könnte darauf zurückgeführt werden, dass andere Pumpen und Transporter in der Zelle gegen die hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentration anarbeiten. In einigen Zellen arbeiten sie schneller,

hier erfolgt der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibitoren langsamer. In anderen Zellen sind sie weniger aktiv, so dass es hier zu einem schnellen starken Anstieg kommt, durch den diese Pumpen und Transporter dann aktiviert werden und als Folge  $Ca^{2+}$  wieder etwas abfällt. In dem in dieser Arbeit verwendeten System scheint CPA weniger potent zu sein als Thapsigargin (Kap. 3.2.5).

Das durch Thapsigargin und CPA verursachte erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  ist wahrscheinlich nicht der Grund dafür, dass durch Stimulation mit Isoprenalin keine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  mehr erreicht werden konnte. Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM führte zur Steigerung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Kap. 3.2.5.1.3). Wie oben bereits erwähnt, konnte diese direkte Korrelation bereits von Kurtz und Penner (1989) in juxtaglomerulären Zellen der Maus und von Russ et al. (1999) in der analogen Präparation aus der Rattenniere und von Salomonsson et al. (1991) für Macula Densa Zellen und Tubuluszellen der Henle'schen Schleife gezeigt werden. Trotz dieser erhöhten cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration war Isoprenalin + IBMX weiterhin in der Lage,  $[Ca^{2+}]_i$  unvermindert anzuheben. Die Erhöhung der cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch erhöhtes  $[Ca^{2+}]_o$  ist zwar im Mittel geringer als durch die Blockade der  $Ca^{2+}$ -ATPase; es gab jedoch auch Einzelexperimente, in denen die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch hohes  $[Ca^{2+}]_o$  stärker war als durch Blockade der  $Ca^{2+}$ -ATPase und auch hier kam es weiterhin zum Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf cAMP-Stimulation. Auch müsste, wenn erhöhtes  $[Ca^{2+}]_i$  für das Ausbleiben des Effektes von Isoprenalin verantwortlich sein sollte, wenigstens eine leichte Beeinflussung der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf die Isoprenalinstimulation zu sehen sein. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Isoprenalin + IBMX bei erhöhtem basalem  $[Ca^{2+}]_i$  war jedoch gleich wie der bei normalem  $[Ca^{2+}]_i$  (Tab. 3.15).

Auch diese Experimente sind neben ihrer Kontrollfunktion ein Zeichen dafür, dass dem Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum eine weitaus wichtigere Bedeutung zukommt als der Freisetzung aus den Speichern. Bei intakten Pumpen nimmt das SR bei erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$  mehr  $Ca^{2+}$  auf und kann auch mehr  $Ca^{2+}$  bei Stimulation freisetzen. Es ist anzunehmen, dass eine Stimulation mit ANG II bei erhöhter  $[Ca^{2+}]_o$  eine vergrößerte  $Ca^{2+}$ -Antwort zur Folge gehabt hätte. Dass dies bei Stimulation mit Isoprenalin + IBMX nicht der Fall war, ist darauf zurückzuführen, dass die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den Speichern nur eine minimale Rolle spielt.

#### **d) Ouabain**

Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mit Ouabain reduzierte die Anwohnhäufigkeit von Isoprenalin + IBMX signifikant ohne die Größe des Effektes, wenn er auftrat, abzuschwächen (Kap. 3.2.3.1). Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  pumpt gegen die bestehenden Konzentrationsgefälle und das Membranpotential 3  $\text{Na}^+$  aus der Zelle heraus und 2  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein. Es bestand die Überlegung, dass cAMP durch Phosphorylierung die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aktivieren könnte, wodurch die Zellen hyperpolarisieren und der Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die erhöhte elektrische Triebkraft erklärt werden könnte. Da allerdings mit DiBAC<sub>3</sub>(4) keine Hyperpolarisation nachgewiesen werden konnte und das gleiche Ergebnis mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen erhalten wurde (A. Stehle, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung), kann dies nicht der richtige Erklärungsansatz sein. Es bleibt daher zu klären, über welchen Weg der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Inhibitor Ouabain die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration beeinflusst.

Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass durch die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Zelle ansteigt, wodurch der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher vermehrt in Richtung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritts laufen würde. Die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytoplasma würde die SERCA aktivieren und es würde verstärkt  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR gepumpt. Die daraus folgende stärkere Füllung der Speicher könnte schließlich zu einer stärkeren Inaktivierung der SOCCs führen, so dass ein stärkerer Stimulus zur Aktivierung der SOCCs notwendig würde, bzw. die Schwelle zur Aktivierung erhöht würde. Ein zweiter Erklärungsansatz wäre, dass Blockade der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  zu einer Depolarisation der Zelle führt, wie sie in Kap. 3.2.3.3 nachgewiesen wurde, so dass die Triebkraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt in die Zelle abgeschwächt wäre. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die cAMP-empfindlichen SOCCs durch die Depolarisation gehemmt werden. Letzteres könnte durch Stimulation in erhöhtem KCl (60 mM) überprüft werden.

#### **Zusammenfassung und Vergleich ANG II-cAMP**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient nach cAMP Stimulation im wesentlichen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch SOCCs erfolgt. Diese Kanäle werden normalerweise durch den Füllungszustand der Speicher kontrolliert und durch deren Entleerung aktiviert. Ihre molekulare Identität ist noch nicht genau geklärt und sehr vielfältig. Es wird

jedoch vermutet, dass sie zur Familie der TRP Proteine (**t**ransient **r**eceptor **p**otential) gehören, die aus vier Untereinheiten aufgebaut sind (Übersicht McFadzean und Gibson, 2002). TRP Kanäle werden unterteilt in C, V und M. SOCCs sind wahrscheinlich in der TRPC Gruppe angesiedelt, die wiederum bislang in Untergruppen von 1 - 7 aufgegliedert ist. Zusätzlich zu den allgemeinen Unklarheiten bei der molekularen Zusammensetzung der SOCCs müssen auch spezie- und gewebeabhängige Unterschiede berücksichtigt werden (Übersicht McFadzean und Gibson, 2002).

Der hier für den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch cAMP verantwortliche Kanal wird vermutlich unter physiologischen Bedingungen durch Entleerung des Speichers und nicht durch cAMP aktiviert. Die hier eingesetzten Versuchsbedingungen führen zu einer partiellen Aktivierung des Kanals durch cAMP, das bei den verwendeten Konzentrationen von Forskolin und Isoprenalin in Kombination mit IBMX für 3 min in der Zelle bis in den micromolaren Bereich (Friis et al., 2002) angehoben wird. Eventuell moduliert cAMP den Kanal und verschiebt die Schwelle für die Kanalaktivierung nach unten, so dass in Anwesenheit von cAMP die Öffnung des Kanals erleichtert wird. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen ist cAMP so stark erhöht, dass es selbst die Kanalaktivierung bewirken kann. Das wiederum passt auch mit den Befunden und der angebotenen Erklärung aus den Ouabain-Versuchen zusammen, nach denen eine stärkere Füllung der Speicher die SOCCs verstärkt inaktiviert, so dass hier dann cAMP nicht mehr die Schwelle zur Aktivierung erreicht.

Dass cAMP direkt (d.h. ohne den PKA-Weg) SOCCs aktivieren kann, konnte auch an Astrocyten aus dem Rattehirn gezeigt werden (Wu et al., 1999). Auch wenn bei Wu et al. (1999) evtl. ein etwas anderer Kanal beteiligt ist, da die Erhöhung der cAMP-Konzentration einen Anstieg nur nach Speicherentleerung bewirkt, zeigen diese Ergebnisse doch, dass es andere Systeme gibt, in denen cAMP über direkte Aktivierung speicheraktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Lage ist, die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erhöhen. Auch hier könnte ein Schwellenphänomen beteiligt sein, so dass unter normalen Bedingungen cAMP den Kanal nicht selbst aktiviert, sondern nur die Schwelle zur Aktivierung herabsetzt, aber bei einer Vorstimulation den Kanal selbst weiter aktivieren kann.

Im Vergleich zu der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Stimulation mit ANG II (3 nM) hängt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient nach cAMP-Stimulation fast ausschließlich (90 %) vom  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom ab; bei ANG II

sind es 60 %. In beiden Fällen spielen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle keine Rolle. Im Falle von cAMP-Stimulation erweisen sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber den SOCC-Blockern 2-APB (30  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Gd}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) als typische SOCCs, die sich aber durch ihre Aktivierbarkeit durch cAMP auszeichnen. Im Falle von ANG II wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nur 20 bzw. 30 % durch die beiden Blocker gehemmt. Damit unterschieden sich die bei ANG II Stimulation rekrutierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle deutlich von den cAMP-aktivierten Kanälen.

### 4.3.3 Mögliche (physiologische) Bedeutung des cAMP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten:

#### Das „Calciumparadox“ der Reninsekretion

Es sei daran erinnert, dass die cAMP-induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung nur in afferenten Arteriolen der Rattenniere beobachtet wurde und vermutlich von den reninsezernierenden Zellen ausgeht (Kap. 4.3.1). Sollte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung in anderen Zellen entstehen, so kann man davon ausgehen, dass sie über die gap junctions die reninsezernierenden Zellen erreicht. Der Effekt tritt bei durchaus noch physiologischen cAMP-Erhöhungen auf und ist etwa in der Größenordnung des ANG II-Transienten. ANG II (3 nM) liegt knapp im Bereich der Konzentrationen, die die Reninsekretion *in vitro* hemmen (Naftilan und Oparil, 1978; Sosath, 1999); *in vivo* sind die Konzentrationen vermutlich geringer (Keeton and Campbell, 1981). Wenn das „Calciumparadox“ der Reninsekretion Gültigkeit hat, sollte man also erwarten, dass bei den hier gewählten Stimuli zu mindestens bei der Ratte die Reninsekretion wieder (etwas) gehemmt, d. h. die cAMP stimulierte Reninsekretion wieder (etwas) reduziert wird. Man würde also spekulieren, dass in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration die Reninsekretionsrate bei afferenten Arteriolen der Rattenniere eine glockenförmige Gestalt annimmt, während sie bei der Maus eine einfache Sättigungskurve darstellt.

Solche Messungen stehen noch aus; in der Literatur waren keine detaillierten Konzentrationsabhängigkeiten zu finden. Sosath (1999) konnte an isolierten juxtaglomerulären Zellen aus der afferenten Arteriole der Ratte, wie Albinus et al. (1999) sie verwenden, durch Stimulation mit der Kombination Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) + IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) Erhöhung der Reninsekretion um 50 - 100 % nachweisen. Allgemein ist cAMP-Erhöpfung ein anerkannter Stimulus für die Reninsekretion (Kap. 1.3.1.3; Übersicht: Kurtz, 1989). So gelten Forskolin (Schwertschlag und Hackenthal, 1982; Fray und Park, 1986; Übersicht: Hackenthal et al., 1990), ebenso IBMX und Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren (Übersicht: Kurtz, 1989) als bewährte Stimu-

lantien der Reninsekretion. Auch an kultivierten menschlichen Nephro-blastomzellen, die ein Modell für die menschliche Reninsekretion darstellen, zeigten Devlin und Leckie (1994) einen Anstieg von cAMP durch Isoprenalin und Forskolin und eine gleichzeitige Stimulation der Reninsekretion. Allerdings sollte auch in diesem System noch bestätigt werden, dass cAMP-Erhöhung zur Steigerung der Reninsekretion führt.

Eine durch cAMP stimulierte Reninsekretion wird durch ANG II gehemmt (Nabel et al., 1999: mit Isoproterenol (10 nM) auf das 10fache der Kontrolle stimulierte Reninsekretion wird durch ANG II (300 nM) nahezu vollständig geblockt; isoliert perfundierte Rattenniere; Sosath, 1999: Forskolin (10  $\mu$ M) + IBMX (100  $\mu$ M) stimulieren auf 150 % der Kontrolle; ANG II (100 nM) hemmt auf  $\sim$  80%; isolierte superfundierte juxtaglomeruläre Zellen). Die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II ist in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung abgeschwächt (Übersicht: Hackenthal et al., 1990). Auch der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch SOCCs nach SERCA-Inhibition hemmt die Reninsekretion aus den reninsezernierenden Zellen der Ratte (Schweda et al., 2000). Ebenso hemmt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonist BAY K 8644 die Reninsekretion in der Ratte (Churchill und Churchill, 1987). Dies sind alles Beweise dafür, dass die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Reninsekretion auch in der Ratte hemmen kann. Wahrscheinlich bewirkt cAMP in dem hier untersuchten System jedoch eine Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die zu klein ist, als dass sie die durch kräftige cAMP-Erhöhung stimulierte Reninsekretion wesentlich hemmen könnte.

Andererseits gibt es viele Studien, in denen eine positive Korrelation zwischen Reninsekretion und cytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefunden wurde (Taugner et al., 1988). So konnte eine intraarterielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Infusion die Reninsekretion in der Niere von Hunden steigern (Iwao et al., 1974, zitiert in Taugner et al., 1988) und auch Morimoto et al. und Michelakis (Morimoto et al., 1970 und Michelakis, 1971, zitiert in Taugner et al., 1988) haben eine gesteigerte Reninsekretion aus Nierenschnitten des Hundes durch eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium gefunden. Ähnliche Befunde wurden für Nierenschnitte der Ratte (Saruta und Matsuki, 1975, zitiert in Taugner et al., 1988) und der Katze (Ginesi et al., 1981, zitiert in Taugner et al., 1988) erhalten. Entgegen den Ergebnissen von Churchill und Churchill (1987) ist von May und Peart (1986) eine Stimulation der Reninsekretions durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Agonisten BAY K 8644 beobachtet worden (May und Peart, 1986, zitiert in Taugner et al., 1988). Ebenso gibt es zahlreiche Beispiele für eine Hemmung der Reninsekretion durch Entfernen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Medium (Chen und Poisner, 1976, Hinko et al., 1974, Lester und

Rubin, 1977 und Schwertschlag et al., 1978, Übersicht: Taugner et al., 1988). Diese ganzen Daten deuten darauf hin, dass das „Calciumparadox“ der Reninsekretion offensichtlich von den experimentellen Umständen abhängt und kein unumstrittenes Phänomen darstellt.

#### **4.4 Einfluss von Adenosin auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

##### *Physiologische Rolle von Adenosin in der Niere*

Wie bereits erwähnt (Kap. 1.3.2.2) zirkuliert Adenosin in der Niere in einer Konzentration von  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M und ist der zentrale Vermittler des tubulo-glomerulären Feedbacks (Schnermann und Levine, 2003; Osswald, Mühlbauer und Vallon, eingereicht). Dabei vermittelt Adenosin über Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren, die bereits durch nanomolare Mengen Adenosin stimuliert werden (Churchill und Churchill, 1985), eine Vasokonstriktion und Hemmung der Reninsekretion, was sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte (Kap. 1.3.2; Osswald et al., 1978; Tagawa und Vander, 1970, zitiert in Taugner und Hackenthal, 1989; Churchill und Churchill, 1985). Über die Adenosin  $A_{2A}$ -Rezeptoren bewirkt Adenosin dagegen eine Stimulation der Reninsekretion (Churchill und Churchill, 1985), die nach Protasoni et al. (1995) an eine intakte Innervierung der Niere gekoppelt ist.

Adenosin-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren koppeln über  $G_i$ -Proteine hemmend an die Adenylatcyclase und bewirken so eine Abnahme der cAMP Konzentration (Olivera und Lopez-Novoa, 1992; Übersicht: Fredholm et al., 2001); über  $G_q/G_{11}$  aktivieren sie die PLC, was über die Entstehung von  $\text{IP}_3$  zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (Churchill, 1990) und somit zum transienten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Ralevic und Burnstock, 1998) führt. Dieser Signalweg würde dem „Calciumparadox“ entsprechen, nach dem die Reninsekretion und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  invers miteinander verknüpft sind (Kap. 1.3.1.1; Churchill, 1985). Über beide Wege könnte Adenosin die Reninsekretion senken.

Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren sind an G-Proteine der  $G_s$ -Familie gekoppelt, die über Stimulation der Adenylatcyclase die cAMP-Konzentration in der Zelle erhöhen (Fredholm et al., 2001). Aktivierung dieser Rezeptoren stimuliert die Reninsekretion (Churchill, 1985).

#### 4.4.1 Effekte von Adenosin und CHA auf $[Ca^{2+}]_i$

In dieser Arbeit wurde auf verschiedenen Wegen versucht, den Einfluss von exogenem und endogenem Adenosin auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu erfassen. Die in Kap. 3.3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in dem hier verwendeten System Adenosin (10 nM - 10  $\mu$ M) nur bei hohen Konzentrationen und nur selten einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkte; sehr häufig wurde keine Antwort erhalten. Eine mögliche Erklärung ist, dass Adenosin (10  $\mu$ M) über Adenosin  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren gegenläufige Effekte ausüben könnte. Es sei aber darauf hingewiesen, dass Gutierrez et al. (1999) an der afferenten Arteriole des Kaninchens einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch Adenosin nachweisen konnten.

Der Adenosin  $A_1$ -Agonist  $N^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) zeigte konstantere Ergebnisse (Kap. 3.3.2; Abb. 3.22). Er erhöhte konzentrationsabhängig sowohl die Anstieghäufigkeit als auch die Antwortgröße (max. Häufigkeit:  $\sim 50$  %; max. Effekt 20 - 40 % des Effektes von ANG II (3 nM)). Bei höheren Konzentrationen ( $> 1$   $\mu$ M) fielen Anstieghäufigkeit und -größe wieder ab. Laut Literatur (Churchill und Churchill, 1985) bewirkt CHA bis zu einer Konzentration von 100 nM eine Hemmung der Reninsekretion, die sich ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M in eine Stimulation umwandelt. Die hier ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  ist im Vergleich mit der Hemmung der Reninsekretion um eine Zehnerpotenz nach rechts verschoben, was daran liegen könnte, dass die Hemmung der Reninsekretion durch CHA nicht nur auf dem  $Ca^{2+}$ -Anstieg, sondern auch auf der cAMP-Modulation beruhen kann. Es könnte aber auch sein, dass CHA im Perfusions-system aufgrund seiner Lipophilie von den Plastikschläuchen adsorbiert wird (Perfusions-system s. Kap. 2.2.3.1).

Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass diese Ergebnisse eine Momentaufnahme darstellen; es gab lange Perioden (Monate), in denen überhaupt keine Antwort erhalten werden konnte. Zur Verbesserung der Anstieghäufigkeit wurden die Versuchsbedingungen hin zu physiologischeren Bedingungen verändert. So wurde eine physiologische Salzlösung mit Albumin und  $CO_2$  verwendet und die Inkubationszeit mit Collagenase wurde verkürzt, um die Zellen weniger zu belasten und um mögliche Beeinträchtigungen der Rezeptoren durch die Enzymwirkung zu verringern. Aber auch diese Bedingungen verbesserten die Anstieghäufigkeit (Kap. 3.3.2.2, Abb. 3.22) nicht. Da auch CHA biphasische Effekte aufweist und in höheren Konzentrationen Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren stimuliert (Churchill und Chur-

chill, 1985), wurden diese mit dem spezifischen Adenosin  $A_{2A}$ -Rezeptorantagonist ZM 241385 (Poucher et al., 1995; Klotz, 2000) blockiert; die Anwohrhäufigkeit auf CHA-Stimulation wurde jedoch nicht verbessert (Kap. 3.3.2.3, Tab. 3.21).

#### 4.4.2 Endogenes Adenosin und $[Ca^{2+}]_i$

Eine weitere Quelle der Variabilität könnte ein endogener Adenosintonus sein, der durch laufend gebildetes Adenosin die Rezeptoren je nach Konzentration besetzt und desensibilisiert. Albinus et al. (1999) konnten durch Entfernen von Adenosin mit Adenosindesaminase (ADA) die spontane Reninsekretion steigern. Das gleiche Ergebnis erhielten sie mit dem Adenosin  $A_1$ -Rezeptorantagonisten 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin (DPCPX), wodurch gezeigt wurde, dass endogenes Adenosin eine tonische Inhibition der Reninsekretion bewirkt. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen, die eine erhöhte Plasmareninaktivität haben (Brown et al., 2001), da Adenosin über Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren keinen hemmenden Einfluss mehr auf die Reninsekretion ausüben kann.

Hier wurde der Ansatz mit ADA verfolgt: Nach Entfernung von endogenem Adenosin durch Adenosindesaminase in einer Konzentration von 4 U/ml wurde die Anwohrhäufigkeit leicht erhöht, jedoch hatte Adenosindesaminase keinen Einfluss auf die Größe der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (Kap. 3.3.3.3, Tab. 3.24). Allerdings enthält die Adenosindesaminase-Präparation Begleitproteine wie Albumin. Albinus et al. (1999) konnten zeigen, dass auch Albumin eine Stimulation der Reninsekretion hervorruft. Fuentes et al. (1997) haben in diesem Zusammenhang für humane Endothelzellen beobachtet, dass Albumin  $[Ca^{2+}]_i$  durch erhöhte  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in intrazelluläre Speicher reduziert. Außerdem ist Albumin in der Lage,  $Ca^{2+}$ -Ionen zu binden (Fray und Karuza, 1980; Fray und Laurens, 1981). Beide Mechanismen könnten einen durch CHA vermittelten und durch Entfernung von endogenem Adenosin durch Adenosindesaminase verstärkten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  maskiert haben. Es kann also nicht abschließend geklärt werden, ob die Entfernung von endogenem Adenosin die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf CHA verbessert.

Zur Frage, ob endogenes Adenosin die in Ruhe herrschende  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht, wurde der Effekt von ADA und DPCPX auf die basal vorherrschende cytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Konzentration untersucht. Wie in (Kap. 3.3.3.1) gezeigt, sank während der Superfusion mit Adenosindesaminase basales  $[Ca^{2+}]_i$  leicht ab, jedoch war der Effekt gegenüber einer Proteinkontrolle

nicht mehr signifikant. Der Adenosin  $A_1$ -Rezeptorantagonist DPCPX hatte keinen messbaren Einfluss auf basales  $[Ca^{2+}]_i$  (Kap. 3.3.3.2). Zusammenfassend muss man feststellen, dass die verfügbaren Daten gegen einen Einfluss des endogenen Adenosins auf in Ruhe herrschendes  $[Ca^{2+}]_i$  in dieser Präparation sprechen.

#### 4.4.3 Afferente Arteriole der Maus

In der Hoffnung, ein System mit zuverlässigeren Antworten auf CHA-Stimulation zu finden, wurde auch die afferente Arteriole der Maus untersucht. In Versuchen vom April 2002 - August 2002 wurden insgesamt 27 Gefäße von 8 verschiedenen Tieren mit CHA stimuliert (CD1 Maus, NaCl-Standarddiät und C57-Maus, NaCl-arme Diät) und keine  $Ca^{2+}$ -Antwort erhalten (Kap. 3.5.1.2). Leider wurden in dieser Zeit keine Rattenarterien mit CHA untersucht. Es bleibt also festzustellen, dass das Ausbleiben einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf Adenosin  $A_1$ -Rezeptorstimulation kein artspezifisches Phänomen der Ratte ist. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob Stimulation der Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren in afferenten Arteriolen der Mäuseniere überhaupt eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  hervorrufen kann.

#### Zusammenfassung

In afferenten Arteriolen der Ratte ruft Stimulation der  $A_1$ -Rezeptoren manchmal eine  $[Ca^{2+}]_i$  Erhöhung hervor. Ein solcher Effekt wurde schon an durch Mikrodissektion gewonnenen afferenten Arteriolen aus der Kaninchenniere beschrieben (Gutierrez et al., 1999). Es ist nicht gelungen, die Variabilität der Antwort zu reduzieren; in manchen Monaten konnte überhaupt keine Antwort erhalten werden, in anderen gab es Ergebnisse wie in Abb. 3.21 gezeigt. Zwei Ansätze, die eine (leichte) Verbesserung versprochen wurden nicht weiterverfolgt:

- a) Längere Vorbehandlung der Präparation mit ADA erhöhte die Antworthäufigkeit (Kap. 3.3.3.3, Abb. 3.21 ; n = 9)
- b) Konditionierung der Präparation mit ANG II (0,03 oder 0,1 nM) erhöhte die Antworthäufigkeit leicht (n = 5; Kapitel 3.4.1, Tab. 3.25; siehe auch Kapitel 4.4).

Die Kombination dieser beiden Ansätze wäre zu untersuchen.

Über die Ursachen der Variabilität der Antwort kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die reninsezernierenden Zellen während der Präparation geschädigt werden. Allerdings werden die von Albinus et al. (1998) verwendeten juxtaglomerulären

Zellen aus Glomerula in ähnlicher Weise wie das hier verwendete Präparat aufgereinigt. Diese Zellen reagieren nach Stimulation mit CHA jedoch regelmässig mit einer Hemmung der Reninsekretion (Sosath, 1999). Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass hier sehr viele reninsezernierende Zellen pro Experiment untersucht werden und dass die CHA-induzierte Hemmung vermehrt über eine cAMP-Erniedrigung als über eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  vermittelt werden kann. Eine weitere mögliche Ursache für die unregelmässige Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  könnte die Tatsache darstellen, dass die Gefäße nicht perfundiert werden, also der Druck fehlt, der eine wichtige Regelgröße für das RAAS darstellt. Experimente an anästhesierten Hunden (McKay und Kishimoto, 1969) und Ratten (Haas und Osswald, 1981) zeigten, dass die vasokonstringierende Wirkung von Adenosin am Vas afferens verlorengelht, wenn der Perfusionsdruck stark gesenkt wird. Andererseits arbeiteten aber Gutierrez et al. (1999) ohne Druck an der afferenten Arteriole des Kaninchens und erhielten offensichtlich konstante  $Ca^{2+}$ -Signale. Dennoch sollten die Arbeiten an perfundierten Gefäßen unter 50 - 80 mm Hg<sup>+</sup> fortgesetzt werden.

#### **4.5 Synergistische Wirkungen zwischen ANG II und Adenosin?**

##### **4.5.1 ANG II und exogenes Adenosin und Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten**

ANG II und Adenosin wirken synergistisch auf die Vasokonstriktion in präglomerulären Gefäßen (*in vivo*: Spielmann und Osswald, 1979; Weihprecht et al., 1994; Aki et al., 2002; *in vitro*: Weihprecht et al., 1994). Dabei bestehen unterschiedliche Meinungen bezüglich der Abhängigkeit. Weihprecht et al. (1994) schließen aus ihren Ergebnissen auf eine symmetrische Beziehung der beiden Agonisten, wohingegen Dietrich et al. (1991) gefunden haben, dass Adenosin zur Vasokonstriktion ANG II benötigt, ANG II jedoch auch ohne Adenosin wirken kann. Es sollte daher untersucht werden, ob beide Substanzen auch einen Synergismus bezüglich der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ausüben. Diese Frage wurde von verschiedenen Seiten angegangen z. B. durch Präkonditionierung der Präparation mit einer unterschwelligen Konzentrationen von ANG II für CHA und umgekehrt oder durch simultane Gaben der beiden Agonisten (Kap. 3.4)

Da die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf CHA sehr unregelmässig war und im Organismus ANG II unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von 0,1 nM zirkuliert, bestand die Überlegung, ob Adenosin bzw. CHA zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  zwingend

ANG II benötigt, das aber in dem verwendeten System bereits ausgespült worden war. Präkonditionierung mit unterschwelligem ANG II (0,03 / 0,1 nM) gab eine leichte Erhöhung der Anwohnhäufigkeit (Kap. 3.4.1). Der umgekehrte Versuch (Präkonditionierung mit CHA (100 nM)) zeigte jedoch nur eine additive Wirkung der beiden Substanzen und keine Potenzierung (Kap. 3.4.2). Simultane Gabe der beiden Agonisten wurde ebenfalls untersucht. Die gemeinsame Applikation von Adenosin (0,01  $\mu$ M) und ANG II (3 nM) (Kap. 3.4.3.1) zeigte keine Potenzierung: Bei simultaner Gabe von ANG II (3 nM) mit CHA (1  $\mu$ M) wurden dagegen Hinweise auf eine ganz leichte Potenzierung gefunden (Kap. 3.4.3.2, Abb. 3.30).

#### 4.5.2 Endogenes Adenosin

Eine weitere Komplexität ist durch das im System eventuell vorhandene "endogene Adenosin" (siehe auch Kap. 4.4) gegeben, das einen synergistischen Effekt zwischen ANG II und CHA verhindert, bzw. durch welches schon eine synergistische Wirkung auftritt, die nicht zu erkennen ist. Sollte eine Potenzierung der ANG II-Antwort durch endogenes Adenosin vorhanden sein, müsste diese durch Gabe von Adenosindesaminase oder den Adenosin  $A_1$ -Antagonisten DPCPX vor und während der Stimulation mit ANG II verhindert werden. Die Ergebnisse zeigten alle keine Abschwächung der Antwort auf ANG II (ADA: Kap. 3.4.4.1, kochsalzarm ernährte Ratte; DPCPX: Kap. 3.4.4.2, kochsalzarm ernährten Ratten; Kap. 3.5.2.2 normal ernährte Mäuse). Diese Ergebnisse zeigen, dass ANG II auch ohne Adenosin in der Lage ist,  $[Ca^{2+}]_i$  uneingeschränkt zu erhöhen. Diese Ergebnisse ließen sich durch Experimente mit Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen ( $A_1AR^{-/-}$ ) (Sun et al., 2001) bestätigen. Wie in Kap. 3.5.2 gezeigt, gab es keinen Unterschied zwischen dem ANG II-induzierten Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in homozygoten Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen ( $A_1AR^{-/-}$ ) und zugehörigen Wildtypmäusen ( $A_1R^{+/+}$ ) weder in der Peak- noch in der Plateau-Phase der  $Ca^{2+}$ -Antwort (Kap. 3.5.2.1), noch in der  $EC_{50}$  (Adenosin  $A_1$ -knock-out Mäuse 12 nM, zugehörige WT-Mäuse 5,8 nM) (Abb. 3.36).

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Dietrich et al. (1991) überein, wonach ANG II auch ohne Adenosin eine nicht abgeschwächte vasokonstriktive Wirkung auslösen kann; umgekehrt jedoch ist in ANG II  $AT_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen die vasokonstriktive Wirkung von CHA stark vermindert, was für einen synergistischen Effekt beider Substanzen spricht (Traynor et al. 1998). Bezüglich der Potenzierung der beiden Systeme bei der Hemmung der

Reninsekretion ist die Lage widersprüchlich. Messungen von PD Dr. Albinus (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung) zeigen, dass nach Entfernung von endogenem Adenosin keine Hemmung der Reninsekretion durch ANG II mehr möglich war. Hingegen ist bei Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen die Macula Densa-Regulation der Reninsekretion intakt (Schweda et al., 2003); auch reduzierte der ANG II AT<sub>1</sub>-Inhibitor Candesartan in diesen Mäusen den Blutdruck im selben Maße wie in zugehörigen Wildtypmäusen, was Brown et al. (2001) durch die in Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen erhöhte Plasmareninaktivität erklären.

Zusammenfassend muss man sagen, dass die Experimente in dieser Arbeit auf eine leichte Tendenz zu einer schwachen Potenzierung bezüglich der Ca<sup>2+</sup>-Antwort hinweisen. Angesichts der extremen Variabilität der CHA-Antwort, die v.a. bei der simultanen Stimulation die Auswertung trotz eingebauter Kontrollreihen unsicher macht, ist jedoch das Erreichen oder Verfehlen von Signifikanzen eher als zufällig anzusehen. Auf jeden Fall ist aber die ANG II-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung in der afferenten Arteriole der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-knock-out Mäusen gegenüber dem Wildtyp unverändert.

#### **4.6 Einfluss einer Blockade der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher auf den pH-Wert in reninsezernierenden Zellen**

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (NHEs) sind in jeder Plasmamembran von Säugerzellen vorhanden. Abhängig von Zelltyp und Membranlokalisation erfüllen sie verschiedene physiologische Funktionen wie die Regulation des pH<sub>i</sub>, die Kontrolle der Zellproliferation und die transepitheliale Na<sup>+</sup>-Reabsorption (Grinstein et al., 1989, zitiert in Kandasamy et al., 1995). In der Niere sind NHEs in den meisten Nephronsegmenten apikal oder basolateral lokalisiert, wie im proximalen Tubulus, dem auf- und absteigenden Ast der Henle'schen Schleife und den Sammelrohren (Peti-Peterdi et al., 2000). Bislang sind die Isoformen 1 - 6 identifiziert (Noel und Pouyssegur, 1995 und Orłowsky und Grinstein, 1997, zitiert in Peti-Peterdi et al., 2000), die durch verschiedene Signalwege (PKA-Weg oder PKC-Weg) stimuliert werden (Kandasamy et al., 1995).

Der NHE1 ist in eukariotischen Zellen die wichtigste Isoform zur Regulation von pH-Wert und Zellvolumen. Dies ist auch der Fall an der basolateralen Membran vieler Nephronsegmente. Die Funktion des NHE2 ist weniger definiert, aber es gibt Hinweise auf eine wichtige

Rolle in der Zellvolumenregulation in renalen Tubuluszellen (Soleimani et al., 1994, zitiert in Praetorius et al., 2000). Diese Isoform wurde bislang eindeutig an der apikalen Membran im distalen Nephronsegment, speziell von Macula Densa Zellen (Peti-Peterdi et al., 2000) lokalisiert. Auch in glomerulären Mesangialzellen sind NHEs an der Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes beteiligt. Sie heben den pH-Wert nach Ansäuerung wieder an, werden also stimuliert, wenn der pH-Wert niedrig ist (Boyarsky et al., 1988; Miyata et al., 2000). Cariporid (Kap. 1.3.1.6, 3.6, Abb. 3.35) ist ein relativ selektiver Inhibitor des NHE1, der aber auch den NHE2 mit 20-fach schwächerer Potenz hemmt ( $IC_{50}$  0,08  $\mu$ M vs. 1,6  $\mu$ M; Scholz et al., 1995; Schwark et al., 1998). Entsprechend umgekehrt verhält es sich mit „1522“ (Kap. 1.3.1.6, 3.6, Abb. 3.35), einem Inhibitor des NHE2 mit 13-facher Selektivität für NHE2 über NHE1 ( $IC_{50}$  0,4  $\mu$ M vs. 5,2  $\mu$ M; Aventis, nicht veröffentlicht). „1522“ hat eine kreislaufaktive Wirkung, die evtl. mit einer Hemmung der Reninsekretion zusammenhängt. Die Hemmung der Reninsekretion durch die Blockade des NHE2 mit „1522“ wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen (PD Dr. Vallon, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, mündl. Mitteilung). Daher war es von Interesse, den Einfluss dieses Inhibitors auf den pH-Wert in den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole zu untersuchen. „1522“ (5  $\mu$ M) und Cariporid (1  $\mu$ M) senkten beide signifikant den in Ruhe herrschenden pH-Wert in den Zellen der afferenten Arteriole (Kap. 3.6.1, 3.6.2). Zudem wurde die Erholung des pH-Wertes in den Zellen nach vorheriger Ansäuerung durch  $NH_4Cl$ -Gabe, also die Realkalisierung, untersucht (Kap. 3.6.2). „1522“ (5  $\mu$ M) verlangsamte die Realkalisierung signifikant. Da beide Substanzen jeweils bei Konzentrationen, die dem 12-fachen ihres  $IC_{50}$ -Wertes entsprachen, angewandt wurden, ist aufgrund der begrenzten Selektivität jeweils eine Mitwirkung über die Hemmung des „anderen“ NHEs nicht auszuschließen. Dies gilt insbesondere für die Experimente mit „1522“ aufgrund seiner etwas schwächeren Selektivität und der vermuteten Dominanz von NHE1. Tatsächlich war die pH-erniedrigende Wirkung von Cariporid (0,1  $\mu$ M) im Vergleich zu „1522“ (0,5  $\mu$ M) (also bei ihrem jeweiligen  $IC_{50}$  Wert eingesetzt) signifikant stärker (Kap. 3.6.1; Abb. 3.38).

Nach diesen Experimenten kann gesagt werden, dass in der afferenten Arteriole der Rattenniere der NHE1 vorhanden ist und den pH-Wert in den Zellen der afferenten Arteriole reguliert. Das stimmt mit der allgemeinen Überzeugung überein, dass der NHE1 ubiquitär in eukariotischen Zellen verteilt ist und eine seiner beiden Hauptaufgaben die Konstanthaltung

des  $\text{pH}_i$  darstellt (Wakabayashi et al., 1997 und Yun et al., 1995, zitiert in Praetorius et al., 2000). Allerdings ist auch die Existenz von NHE2 sehr wahrscheinlich. Die nachgewiesenen kreislaufspezifischen Wirkungen von „1522“ und seine hemmende Wirkung auf die Reninsekretion sind möglicherweise nicht über die Wirkung auf den plasmalemalen NHE2 in den reninsezernierenden Zellen zu erklären, da eine Ansäuerung des Cytoplasma eine Stimulation der Reninsekretion bewirkt (Fray und Laurens, 1981) (Kap. 1.3.1.6). Es sei noch darauf hingewiesen, dass bei den Experimenten mit „1522“ kein Unterschied zwischen weiter proximal gelegenen Gefäßregionen und den weiter distal gelegenen festgestellt werden konnte (Kap. 3.6.1.1). Es kann also nicht entschieden werden, ob die Ursache der pH-Wert-Änderung nach NHE2-Blockade in den reninsezernierenden Zellen oder den glatten Muskelzellen der weiter proximal gelegenen Arteriolenteile zu suchen ist. Wie weiter vorne bereits erwähnt, sind diese Zellen über gap junctions miteinander verbunden.

Eine weitere Möglichkeit für die Wirkung von „1522“ wäre eine Lokalisation des NHE2 in der Membran der reninhaltigen Vesikel, in denen ein saurer pH-Wert von 5,5 herrscht (Kap. 1.3.1; Taugner und Hackenthal, 1989). Die Cathepsine, die Prorenin in aktives Renin umwandeln, sind in saurem Medium aktiver als in alkalischem Medium. Falls eine Hemmung des NHE2 in der Membran der Reningranula stattfinden sollte, würde diese wahrscheinlich zu einer Alkalisierung der Vesikelflüssigkeit führen, was letztendlich eine verminderte Aktivierung von Renin und damit eine verminderte Reninsekretion nach sich zöge. Darüber könnte die beobachtete reninsekretionshemmende Wirkung von „1522“ erklärt werden.

In dieser Arbeit wurde auch versucht, den pH-Wert in den reninhaltigen Vesikeln zu bestimmen. Es konnte jedoch keine pH-Änderung durch „1522“ (5  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden (Kap. 3.6.3, Abb. 3.40). Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor Green ist allerdings nicht sehr empfindlich und die Messung in den reninhaltigen Vesikeln ist mit der hier verwendeten Anlage mit ihrer geringen räumlichen Auflösung (Abb. 2.2) relativ schwierig. Außerdem führt „1522“ (5  $\mu\text{M}$ ) zu einer Ansäuerung des cytosolischen pH-Wertes (Kap. 3.6.1), was einer hypothetischen Alkalisierung der Vesikel entgegengestanden hätte. Obwohl hier keine pH-Wert-Änderung mit „1522“ nachgewiesen werden konnte, kann man daraus nicht schließen, dass der NHE2 nicht auf der Membran der Granula vorhanden ist bzw. „1522“ keinen Einfluss auf den intravesikulären pH-Wert hat.

## 5. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System ist neben dem Sympathikotonus das wichtigste Effektorssystem zur Regulation von Blutdruck sowie Salz- und Wasserhaushalt des Menschen. Die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems wird gesteuert über die Sekretionsrate des Renins, die von verschiedenen Regulationsmechanismen und einer Vielzahl von Faktoren kontrolliert wird. Zwei entscheidende sekundäre Botenstoffe in diesem System sind das cAMP und das freie cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ . cAMP wirkt stimulatorisch,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibitorisch auf die Reninsekretion, und es ist unklar, welche der beiden Substanzen die zentrale Rolle innehat. Die inverse Verknüpfung zwischen der freien cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Reninsekretionsrate ist für ein sekretorisches System sehr ungewöhnlich („Calciumparadox“); typischerweise wie z.B. in der  $\beta$ -Zelle oder dem synaptischen Bläschen stimuliert  $\text{Ca}^{2+}$  die Exocytose.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung verschiedenen Stimuli (Angiotensin II, Adenosin und cAMP) auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht werden. Dazu wurde am Modell der isolierten Glomeruli mit anhängender afferenter Arteriole aus den Nieren von Ratten und Mäusen die Änderung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 gemessen. Im Allgemeinen wurden kochsalzarm ernährte Tiere verwendet, bei denen die Anzahl der reninsezernierenden Zellen im Vas afferens deutlich erhöht ist; im distalen Teil des Gefäßes am Eintritt in das Glomerulum ist die Wahrscheinlichkeit, reninsezernierende Zellen zu finden  $\sim 80\%$ . Diese Region stand im Fokus der Untersuchungen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Wirkungen von ANG II und cAMP auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht. ANG II, das wichtigste Effektorpeptid des RAAS, erhöhte über Stimulation der  $\text{AT}_1$ -Rezeptoren konzentrationsabhängig  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\text{EC}_{50} \sim 5 - 10 \text{ nM}$ ). Diese Konzentrationsabhängigkeit ist in Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen gleich. Die Erhöhung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann in Peak- und Plateauphase untergliedert werden, die auf die Entleerung intrazellulärer Speicher (Peak) und Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen sind. Bei ANG II (3 nM) zeigten die Experimente an afferenten Arteriolen der Ratte, dass  $\sim 45\%$  der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung auf einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beruhen, der überwiegend durch speicheraktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (SOCCs) erfolgt; spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle spielten keine Rolle.

cAMP-Erhöhung durch verschiedene Stimuli bewirkte (entgegen den Erwartungen) ebenfalls

eine Erhöhung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dieses Phänomen ist spezifisch für die afferente Arteriole der Rattenniere, da cAMP-Erhöhung in der afferenten Arteriole der Maus und in grösseren Gefäßen der Rattenniere die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nicht beeinflusste bzw. ein Absinken von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirkte. Verschiedene Beobachtungen stützen die Hypothese, dass dieser sehr spezielle Effekt von den reninsezernierenden Zellen ausgeht. Die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach cAMP-Stimulation beruht zu  $> 90\%$  auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen durch SOCCs, die sich aber von denen, die bei der Stimulation mit ANG II rekrutiert werden, unterscheiden; wieder spielen spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle keine Rolle. Der Proteinkinase A-Inhibitor H89 kann die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch cAMP nicht verhindern, was für eine direkte Interaktion von cAMP mit den SOCCs spricht.

Dieses Phänomen muss nicht unbedingt gegen das „Calciumparadox“ der Reninsekretion sprechen. Die beobachtete Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  war im Mittel kleiner als die, die durch ANG II (3 nM) hervorgerufen wird; zur Hemmung der Reninsekretion könnten stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nötig sein, bzw. kann es von der cAMP- und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abhängig sein, welcher der beiden Prozesse (Hemmung oder Stimulation der Reninsekretion) überwiegt.

Im zweiten Teil wurde die Wirkung von Adenosin auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht. Adenosin stellt über Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptoren einen wichtigen Inhibitor der Reninsekretion dar, wobei jedoch die weitere Signalkette dieser Inhibition noch nicht geklärt ist: Man könnte spekulieren, dass über die Phosphatidyl-Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ )-Kaskade  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht und /oder durch Hemmung der Adenylatcyclase die cAMP Konzentration herabgesetzt wird. In den hier vorgestellten Experimenten wurde im wesentlichen der Adenosin  $\text{A}_1$ -Rezeptor-selektive Agonist  $\text{N}^6$ -Cyclohexyladenosin (CHA) verwendet. Bei der optimalen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  rief CHA in ungefähr 50 % der Fälle einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen hervor, der 40 % der ANG II (3 nM) Antwort betrug. Trotz aller Anstrengung konnte die Variabilität des Effektes nicht vermindert werden; es gab lange Perioden, in denen überhaupt keine Antwort auf CHA zu erzielen war. Daher konnte dieser Effekt nicht genauer charakterisiert werden. Die Ergebnisse gaben keinen Hinweis darauf, dass ein endogener Adenosintonus  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen moduliert. Adenosin und ANG II wirken nachgewiesenerweise synergistisch auf die Konstriktion des Vas afferens und die Hemmung der Reninsekretion. Bezüglich  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zeigte sich in den Versuchen dieser Arbeit diese Synergie wenn überhaupt, dann nur sehr schwach; diese Versuche sind in ihrer Aus-

sagekraft durch die Variabilität des CHA-Effektes stark eingeschränkt. Ferner war, wie bereits oben erwähnt, die konzentrationsabhängige Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II in afferenten Arteriolen der Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Maus und der entsprechenden Wildtyp-Maus nicht voneinander verschieden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Wirkungen von zwei subtyp-selektiven Hemmern der  $Na^+/H^+$ -Austauscher verglichen. Cariporid (NHE1-selektiv) senkte den pH-Wert der renin-sezernierenden Zellen in Ruhe stärker als der neue NHE2-selektive Inhibitor „1522“ (Aventis); „1522“ verzögerte auch die Erholung des pH-Wertes nach Ansäuerung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse darauf hinweisen, dass Adenosin seine reninsekretionshemmende Wirkung nicht durch eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  erzielt; der Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  war schwach und sehr variabel. Hingegen steigerte der Sekretionsagonist cAMP die  $[Ca^{2+}]_i$  reproduzierbar. Damit geben diese Ergebnisse keinen Hinweis auf eine zentrale Rolle der freien cytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration für Wirkungen von Adenosin und  $\beta$ -adrenerger Stimulation auf die Reninsekretion.

## 6 Literatur

- Aki Y, Nishiyama A, Miyatake A, Kimura S, Kohno M, Abe Y (2002) Role of Adenosine A<sub>1</sub> receptor in Angiotensin II- and Norepinephrine-induced renal vasoconstriction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: pp 117-123.
- Albert AP, Large WA (2002) Activation of store-operated channels by Noradrenaline via protein kinase C in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol. Lond.* 544: pp 113-125.
- Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B, Osswald H (1998) Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 44: pp F991-F997.
- Ashcroft SJH, Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell. Signal.* 2: pp 197-214.
- Badaoui A, Huchet-Cadiou C, Léoty C (1995) Effects of Cyclopiazonic Acid on membrane currents, contraction and intracellular calcium transients in frog heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27(11): pp 2495-2505.
- Bahrman H, Greeff K (1981) Evaluation of cardiac glycosides in the intact animal. Springer.
- Barajas L (1979) Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol.* 237: pp F333-F343.
- Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75: pp 725-748.
- Bell P, Lapointe J, Peti-Peterdi J (2003) Macula Densa cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 65: pp 481-500.
- Boyarsky G, Ganz MB, Sterzel RB, Boron WF (1988) pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Am. J. Physiol.* 255: pp C844-C856.
- Bräuner T, Hülser DF, Strasser RJ (1984) Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim. Biophys. Acta* 771: pp 208-216.
- Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, Persson AEG (1992) Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in Adenosine A<sub>1</sub> receptor-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 281: pp R1362-R1367.

- Bührle CP, Nobiling R, Mannek E, Schneider D, Hackenthal E, Taugner R (1984) The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6(2) S383-93: pp 383-393.
- Bührle CP, Nobiling R, Taugner R (1985) Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am. J. Physiol.* 249: pp F272-F281.
- Bührle CP, Scholz H, Hackenthal E, Nobiling R, Taugner R (1986) Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45: pp 37-47.
- Cantin M, Araujo-Nascimento MD, Benchimol S, Desormeaux Y (1977) Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am. J. Pathol.* 87: pp 581-602.
- Carmines PK, Fowler BC, Bell PD (1993) Segmentally distinct effects of depolarization on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in renal arterioles. *Am. J. Physiol.* 265: pp F677-F685.
- Casteels R, Droogmans G (1981) Exchange characteristics of the Noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J. Physiol.* 317: pp 263-279.
- Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A (2001) Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: pp 867-874.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: pp 13926-13931.
- Chatziantoniou C, Dussaule JC, Arendshorst WJ, Ardaillou R (1994) Angiotensin II receptors and renin release in rat glomerular afferent arterioles. *Kidney Int.* 46: pp 1570-1573.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris R (2001) Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am. J. Physiol.* 280: pp F449-F456.
- Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC (2002) prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am. J. Physiol.* 283: pp R638-R646.

- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990) Inhibition of Forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic amp-dependent protein kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265: pp 5267-5272.
- Churchill PC (1985) Second Messengers in Renin Secretion. *Am. J. Physiol.* 249: pp F175-F184.
- Churchill PC, Churchill MC (1985) A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> Adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 232: pp 589-594.
- Churchill PC, Churchill MC (1987) BAY K8644, a calcium channel agonist, inhibits renin secretion in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 285, 87-97.
- Churchill PC, Bidani A (1987) Renal effects of selective Adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am. J. Physiol.* 252: pp F299-F303.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2002) Transient receptor potential channels. In: *The IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels* (Catterall WA, Chandy KG and Gutman GA eds) pp 207-235, IUPHAR Media, Leeds, UK.
- Collis MG, Hourani SMO (1993) Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: pp 360-366.
- Davis JO, Freeman RH (1976) Mechanisms regulating renin release. *Pharmacol. Rev.* 56: pp 1-56.
- Della-Bruna R, Pinet F, Corvol P, Kurtz A (1995) Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 47: pp 1266-1273.
- Devlin AM, Leckie BJ (1994) Second Messengers involved in the control of renin secretion in cultured human nephroblastoma cells. *Am. J. Physiol.* 266: pp F667-F673.
- Dietrich MS, Endlich K, Parekh N, Steinhausen M (1991) Interaction between Adenosine and Angiotensin II in renal microcirculation. *Microvasc Res.* 41: pp 275-288.
- Dousa TP (1999) Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55: pp 29-62.
- Fellner SK, Arendshorst WJ (1999) Capacitive calcium entry in smooth muscle cells from preglomerular vessels. *Am. J. Physiol.* 277: pp F533-F542.

- Ferrier CP, Kurtz A, Lehner P, Shaw S G, Pusterla C, Saxenhofer H, Weidmann P (1989) Stimulation of renin secretion by potassium-channel activation with cromakalim. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36: pp 443-447.
- Fishman MC (1976) Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* 260: pp 542-544.
- Forssmann WG, Taugner R (1977) Studies on the juxtaglomerular apparatus. V. The juxtaglomerular apparatus in tupaia with special reference to intracellular contacts. *Cell Tiss. Res.* 177: pp 291-305.
- Fray JC, Karuza AS (1980) Influence of raising albumin concentration on renin release in isolated perfused rat kidneys. *J. Physiol.* 299: pp 45-54.
- Fray JC, Laurens NJ (1981) Mechanism by which albumin stimulates renin secretion in isolated kidneys and juxtaglomerular cells. *J. Physiol.* 320: pp 31-39.
- Fray JC, Lush DJ (1984) Stretch receptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J. Hypertens.* 2: pp 19-23.
- Fray JC, Park CS (1986) Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. *J. Physiol.* 375: pp 361-375.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: pp 527-552.
- Freissmuth M, Hausleithner V, Tuisl E, Nanoff C, Schutz W (1987) Glomeruli and microvessels of the rabbit kidney contain both A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 335: pp 438-444.
- Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skott O (1999) Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ. Res.* 84: pp 929-936.
- Friis UG, Jensen B L, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skott O (2002) control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ. Res.* 90: pp 996-1003.
- Fuentes E, Nadal A, Jacob R, McNaughton P (1997) Actions of serum and plasma albumin on intracellular Ca<sup>2+</sup> in human endothelial cells. *J. Physiol.* 504: pp 315-326.
- Gattone VH, Luft FC, Evan AP (1984) Renal afferent and efferent arterioles of the rabbit. *Am. J. Physiol.* 247: pp F219-F228.

- Ginesi LM, Munday KA, Noble AR (1981) Active and inactive renin release by rabbit kidney cortex slices: effect of calcium and potassium. *J. Physiol. Lond.* 315: pp 41P-42P.
- Goormaghtigh N (1939) Une glande endocrine dans la paroi des arterioles renales. *Bruxelles Med.* 19: p 1541
- Gordienko DV, Clausen C, Goligorsky MS (1994) Ionic currents and endothelin signalling in smooth muscle cells from rat renal resistance arteries. *Am. J. Physiol.* 266: pp F325-F341.
- Greenberg SG, Lorenz JN, He XR, Schnermann JB, Briggs JP (1993) Effect of prostaglandin synthesis inhibition on Macula Densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol.* 265: pp F578-F583.
- Griendling KK, Tsuda T, Berk BC, Alexander RW (1989) Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Hypertens.* 2: pp 659-665.
- Grishtein S, Rotin D, Mason MJ (1989) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 988: pp 73-97.
- Groschner K, Schuhmann K, Baumgartner W, Pastushenko V, Grover A, Samson SE (1986) Pig coronary artery smooth muscle: substrate and pH dependence of the two calcium pumps. *Am. J. Physiol.* 251: pp C529-C534.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: pp 3440-3450.
- Gutierrez AM, Kornfeld M, Persson AEG (1999) Calcium response to Adenosine and ATP in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 166: pp 175-181.
- Haas J, Osswald H (1981) Adenosine induced fall in glomerular capillary pressure. Effect of ureteral obstruction and aortic constriction in the Munich-Wistar Rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317: pp 86-89.
- Hackenthal E, Metz R, Buhle CP, Taugner R (1987) Intrarenal and intracellular distribution of renin and Angiotensin. *Kidney. Int.* 20: pp S4-17.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990) Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.* 70: pp 1067-1116.
- Hamill OP, Martinac B (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 81: pp 685-740.

- Hansen PB, Jensen BL, Andreasen D, Friis UG, Skott O (2000) Vascular smooth muscle cells express the  $\alpha_{1a}$  subunit of a p-/q-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel, and it is functionally important in renal afferent arterioles. *Circ. Res.* 87: pp 896-902.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994) Cyclooxygenase II is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.* 94: pp 2504-2510.
- Henger A, Huber T, Fischer KG, Nitschke R, Mundel P, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstadt H (1997) Angiotensin II increases the cytosolic calcium activity in rat podocytes in culture. *Kidney Int.* 52: pp 687-693.
- Hoehlerl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, Kurtz A (2002) Role of prostanoids in regulation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system by salt intake. *Am. J. Physiol.* 283: pp F294-F301.
- Hofmann F, Biel M, Kaupp UB (2002) Cyclic nucleotide-modulated channels. In: Catterall WA, Chandy KG, Gutman GA (eds) *The IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels*. pp 191-206, IUPHAR Media, Leeds, UK.
- Iwao H, Abe Y, Yamamoto K (1974) Effect of intrarenal arterial infusion of calcium on renin release in dogs. *Jpn. J. Pharmacol.* 24: pp 482-484.
- Jackson EK, Zhu C and Tofovic SP (2002) Expression of Adenosine receptors in the glomerular microcirculation. *Am. J. Physiol.* 283: pp F41-F51.
- Jensen BL, Skott O (1993) Osmotically sensitive renin release from permeabilized juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 265: pp F87-F95.
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A (1996) Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 271: pp F659-F669.
- Jensen BL, Gambaryan S, Scholz H, Kurtz A (1998) K-ATP channels are not essential for pressure-dependent control of renin secretion. *Pflügers Arch.* 435: pp 670-677.
- Jones-Dombi T, Churchill PC (1993) The baroreceptor mechanism for controlling renin secretion: effect of calcium channel blockers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 274-278.
- Kakinuma Y, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I (1993) Intrarenal localization of Angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int.* 43: pp 1229-1235.
- Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orłowski J (1995) Plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J. Biol. Chem.* 270: pp 29209-29216.

- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K (1997) Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 49: pp 157-230.
- Keddie JR, Poucher SM, Shaw GR, Brooks R, Collis MG (1996) In vivo characterisation of ZM 241385, a selective Adenosine A<sub>2a</sub> receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 301: pp 107-113.
- Keeton TK, Campbell WB (1980) The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: pp 81-227.
- Kirber MT, Walsh JV, Singer J J (1988) Stretch activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the imitation of stretch-induced contraction. *Pflügers. Arch.* 421: pp 339-345.
- Klotz KN (2000) Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: pp 382-391.
- Kornfeld M, Gutierrez AM, Persson AE, Salomonsson M (1997) Angiotensin II induces a tachyphylactic calcium response in the rabbit afferent arteriole. *Acta Physiol. Scand.* 160: pp 165-173.
- Kornfeld M, Salomonsson M, Gutierrez A, Persson AEG (2000) The influence of beta-adrenergic activation on Noradrenergic alpha1 activation of rabbit afferent arterioles. *Pflügers Arch.* 441: pp 25-31.
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Bauer C (1984) Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: pp 359-366.
- Kurtz A, Della-Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C (1988) Role of cGMP as second messenger of Adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33: pp 798-803.
- Kurtz A (1989) Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113: pp 1-40.
- Kurtz A, Penner R (1989) Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: pp 3423-3427.
- Kurtz A, Skott O, Chegini S, Penner R (1990) Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch.* 416: pp 281-287.

- Kurtz A, Wagner C (1998) Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 44: pp F849-F862.
- Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, Wagner C (1998) Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am. J. Physiol.* 43: pp F709-F717.
- Kurtz A, Hamann M, Götz K (2000) Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflügers Arch.* 440: pp 889-895.
- Kurz KD, Zehr JE (1978) Mechanisms of enhanced renin secretion during CO<sub>2</sub> retention in dogs. *Am. J. Physiol.* 234: pp H573-H581.
- Large WA, Wang Q (1996) Characteristics and physiological role of the Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 271: pp C435-C454.
- Lorenz JN, Kotchen TA, Ott CE (1990) Effect of Na and Cl infusion on loop function and plasma renin activity in rats. *Am. J. Physiol.* 258: pp F1328-F1335.
- Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP (1990) Characterization of the Macula Densa stimulus for renin secretion. *Am. J. Physiol.* 259: pp F186-F193.
- Lorenz JN, Greenberg SG, Briggs JP (1993) The Macula Densa mechanism for control of renin secretion. *Semin. Nephrol.* 13: pp 531-542.
- Lorenz JN, Weihprecht H, He XR, Skott O, Briggs JP, Schnermann J (1993) Effects of Adenosine and Angiotensin on Macula Densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol.* 265: pp F187-F194.
- Loutzenhiser K, Loutzenhiser R (2000) Angiotensin II-induced Ca<sup>2+</sup> influx in renal afferent and efferent arterioles - differing roles of voltage-gated and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Circ. Res.* 87: pp 551-557.
- Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 287: pp 1647-1651.
- Mann B, Hartner A, Jensen BL, Kammerl M, Kramer BK, Kurtz A (2001) Furosemide stimulates Macula Densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int.* 59: pp 62-68.
- May CN, Peart WS (1986) Stimulation and suppression of renin release from incubations of rat renal cortex by factors affecting calcium influx. *Br. J. Pharmacol.* 89: pp 173-182.

- McFadzean I, Gibson A (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 135: pp 1-13.
- McKay J, Kishimoto T (1969) Association between autoregulation and pressure dependency of renal vascular responsiveness in dogs. *Circ. Res.* 27: pp 765-782.
- Michelakis AM (1971) The effect of Angiotensin on renin production and release in vitro. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 138: pp 1106-1108.
- Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* 82: pp 429-472.
- Miyata Y, Muto S, Yanagiba S, Asano Y (2000) Extracellular Cl<sup>-</sup> Modulates shrinkage-induced activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 278: pp C1218-C1229.
- Morel JL, Macrez-Lepretre N, Mironneau J (1996) Angiotensin II-activated Ca<sup>2+</sup> entry-induced release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in rat portal vein myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 118: pp 73-78.
- Morimoto S, Yamamoto K, Horiuchi K, Tanaka H, Ueda J (1970) A release of renin from dog kidney cortex slices. *Jpn. J. Pharmacol.* 20: pp 536-545.
- Mozaffari MS, Abebe W, Warren BK (2000) Renal Adenosine A<sub>3</sub> receptors in the rat: assessment of functional role. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 78: pp 428-432.
- Nabel C, Schweda F, Riegger GA, Krämer B, Kurtz A (1999) Chloride channel blockers attenuate the inhibition of renin secretion by Angiotensin II. *Pflügers Arch.* 438: pp 694-699.
- Naftilan AJ, Oparil S (1978) Inhibition of renin release from rat kidney slices by the Angiotensins. *Am. J. Physiol.* 235: pp F62-F68.
- Nakamura YA, Schwartz A (1972) The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 59: pp 22-32.
- Nishiyama A, Inscho EW, Navar LG (2001) Interactions of Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2a</sub> receptors on renal microvascular reactivity. *Am. J. Physiol.* 280: pp F406-F414.
- Nishiyama A, Navar LG (2002) ATP mediates tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol.* 283: pp R273-R275.
- Oberdisse, E (2001) Renin-Angiotensin-System. In: Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K *Pharmakologie und Toxikologie*, 3. Aufl. 2001, Springer.

- Olivera A, Lopez-Novoa JM (1992) Effect of Adenosine and Adenosine analogues on cyclic AMP accumulation in cultured mesangial cells and isolated glomeruli of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 107: pp 341-346.
- Orlowski J, Grisntein S (1997) Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: pp 22373-22376.
- Osswald H, Schmitz HJ, Kemper R (1978) Renal action of Adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303: pp 95-99.
- Osswald H, Quast U (1995) Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells. In: Scherübl H, Heschle J (eds): *The electrophysiology of neuroendocrine cells.* CRC press, Boca Raton, Florida: pp 301-313
- Osswald H, Mühlbauer B, Vallon V (2003). Adenosine and kidney function. *Physiol Rev.* In Press
- Palade P, Dettbarn C, Alderson B, Volpe P (1989) Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup>- or caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular membrane systems. *Mol. Pharmacol.* 36: pp 673-680.
- Parekh AB, Penner R (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77: pp 901-930.
- Parekh AB (2003) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J. Physiol. Lond.* 547: pp 333-348.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83: pp 117-161.
- Persson AEG, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, González E (1991) Macula Densa cell function. *Kidney Int.* 39: pp S39-S44.
- Peti-Peterdi J, Chambrey R, Bebok Z, Biemesderfer D, St John PL, Abrahamson DR, Warnock DG, Bell PD (2000) Macula Densa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms. *Am. J. Physiol.* 278: pp F452-F463.
- Poole-Wilson PA, Langer GA (1979) Effects of Acidosis on mechanical function and Ca<sup>2+</sup> exchange in rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.* 236: pp H525-H533.
- Praetorius J, Andreasen D, Jensen BL, Ainsworth MA, Friis UG, Johansen T (2000) NHE1, NHE2, and NHE3 Contribute to regulation of intracellular pH in murine duodenal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 278: pp G197-G206.

- Pratz J, Mondot S, Montier F, Cavero I (1991) Effects of the K<sup>+</sup> channel activators, RP 52891, cromakalim and diazoxide, on the plasma insulin level, plasma renin activity and blood pressure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: pp 216-222.
- Protasoni G, Castoldi G, Busca G, Panzacchi G, Genovesi S, Golin R, Stella A (1995) Effects of Adenosine-receptor agonists on renin release in anaesthetized rats. *J. Hypertens.* 13: pp 1753-1757.
- Purdy KE, Arendshorst WJ (2001) Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by Angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: pp 19-28.
- Putney JW (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: pp 611-624.
- Quast U, Glocker S (1995) Vascular pathology and the K<sub>ATP</sub> channel. In: Yellon DM, Gross GJ (eds) (1995) *Myocardial protection and the K<sub>ATP</sub> channel*. Kluver Verlag: pp 31-50.
- Quast U (1996) ATP-Sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: pp 213-225.
- Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R (1985) Subcellular fractionation of pig stomach smooth muscle. A study of the distribution of the (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity in plasmalemma and endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 815: pp 441-454.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50 : pp 413-492.
- Rauch U (2000) Untersuchungen zu Lokalisation, intrazellulärer Calciumkonzentration, Membranpotential und sekretorischer Aktivität reninsezernierender Zellen in der afferenten Arteriole der Ratte. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, Bondy CA (1995) Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Clin. Invest.* 95: pp 1528-1538.
- Renström E, Eliasson L, Rorsman P (1997) Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* 502: pp 105-118.
- Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF, Cavero I (1990) Cardiovascular and biological effects of K<sup>+</sup> channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sci.* 47: pp 1693-1705.

- Rothmann SS (1978) Chymotrypsinogen-inositol phosphatide complexes and the transport of digestive enzyme across membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 509: pp 374-383.
- Russ U, Rauch U, Quast U (1999) Pharmacological evidence for a K-ATP channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J. Physiol. Lond.* 517: pp 781-790.
- Salomonsson M, Gonzalez E, Westerlund P, Persson AE (1991) Intracellular cytosolic free calcium concentration in the Macula Densa and in ascending limb cells at different luminal concentrations of sodium chloride and with added Furosemide. *Acta Physiol. Scand.* 142: pp 283-290.
- Salomonsson M, Kornfeld M, Gutierrez AM, Magnusson M, Persson AEG (1997) Effects of stimulation and inhibition of protein kinase C on the cytosolic calcium concentration in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 161: pp 271-279.
- Saruta T, Matsuki S (1975) The effects of cyclic AMP, Theophylline, Angiotensin II and electrolytes upon renin release from rat kidney slices. *Endocrinol. Jpn.* 22: pp 137-140.
- Sayago CM, Beierwaltes WH (2001) Nitric oxide synthase and cGMP-mediated stimulation of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 281: pp R1146-R1151.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP<sub>3</sub> receptor and cGMP kinase I beta. *Nature* 404: pp 197-201.
- Schnermann J, Levine D (2003) Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: Adenosine, ATP, and Nitric Oxide. *Annu. Rev. Physiol.* 65: pp 501-529.
- Scholz H, Kaissling B, Inagami T, Kurtz A (1991) Differential response of renin secretion to vasoconstrictors in the isolated perfused rat kidney. *J. Physiol.* 441 : pp 453-468.
- Scholz W, Albus U, Counillon L, Goegelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Schoelkens BA (1995) Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 29(2): pp 260-268.
- Schricker K, Della-Bruna, Kurtz A (1993) Extracellular calcium exerts a dual effect on renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch* 423: pp 14-20.
- Schricker K, Kurtz A (1995) Role of membrane-permeable ions in renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 269: pp F64-F69.

- Schuster A, Oishi H, Beny JL, Stergiopoulos N, Meister JJ (1992) Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *Am. J. Physiol.* 280: pp H1088-H1096.
- Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK (2000) Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am. J. Physiol.* 279: pp F170-F176.
- Schweda F, Wagner C, Krämer B, Schnermann J, Kurtz A (2003) Preserved Macula Densa-dependent renin secretion in A<sub>1</sub> Adenosine receptor knockout mice. *Am. J. Physiol.* 284: pp F770-F777.
- Schwertschlag U, Hackenthal E (1982) Forskolin Stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 84: pp 111-113.
- Seiler SM, Arnold AJ, Stanton HC (1987) Inhibitors of inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from isolated platelet membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 36: pp 3331-3337.
- Skott O, Baumbach L (1985) Effects of Adenosine on renin release from isolated rat glomeruli and kidney slices. *Pflügers Arch.* 404: pp 232-237.
- Skott O (1988) Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am. J. Physiol.* 255: pp F1-10.
- Skott O, Briggs JP, Lorenz JN, Weihprecht H (1990) On the intrarenal regulation of renin release from the juxtaglomerular apparatus. *Kidney Int.* 30: pp S38-S42.
- Smith WL, Bell TG (1978) Immunohistochemical localisation of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am. J. Physiol.* 235: pp F451-F457.
- Soleimani M, Singh GL, Bizal GL, Gullans SR, McAteer JA (1994) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms NHE2 and NHE1 in inner medullary collecting duct cells. *J. Biol. Chem.* 269: pp 27973-27978.
- Somlyo AP, Himpens B (1989) Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 3: pp 2266-2276.
- Sosath, B. Untersuchungen zur Regulation der Reninsekretion an isolierten superfundierten juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. (1999). Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Spielman WS, Osswald H (1979) Blockade of postocclusive renal vasoconstriction by an Angiotensin II antagonists: evidence for an Angiotensin-Adenosine interaction. *Am. J. Physiol.* 237: pp F463-F467.
- Strickholm A, Wallin BG, Shrager P (1969) The pH dependence of relative ion permeabilities in the crayfish giant axon. *Biophys. J.* 9: pp 873-883.
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001) Mediation of tubuloglomerular feedback by Adenosine: evidence from mice lacking Adenosine A<sub>1</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: pp 9983-9988.
- Tagawer H, Vander AJ (1970) Effects of Adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ. Res.* 26: pp 327-338.
- Taher MS, McLain LG, McDonald KM, Schrier RW (1976) Effect of beta-adrenergic blockade on renin-response to renal nerve stimulation. *J. Clin. Invest.* 57: pp 459-465.
- Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Inoue T, Kanno Y, Ozawa Y, Hayashi K, Saruta T (2002) Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: actions of Angiotensin II. *Kidney Int.* 62: pp 558-565.
- Taniguchi S, Marchetti J, Morel F (1989) Cytosolic free calcium in single microdissected rat cortical collecting tubules. *Pflügers Arch.* 414: pp 125-133.
- Taugner R, Hackenthal E, Rix E, Nobiling R and Poulsen K (1982) Immunocytochemistry of the Renin-Angiotensin System: Renin, Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II, and Converting Enzyme in the kidneys of mice, rats, and tree shrews. *Kidney Int.* 12: pp S33-S43.
- Taugner R, Bührle CP, Nobiling R (1984) Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res.* 237: pp 459-472.
- Taugner R, Nobiling R, Metz R, Taugner F, Bührle C, Hackenthal E (1988) Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell. Tissue Res.* 252: pp 687-690.
- Thomson S, Bao D, Deng A, Vallon V (2000) Adenosine formed by 5'-Nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J. Clin. Invest.* 106: pp 289-298.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993) Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: pp 205-251.

- Tobian L (1960) Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension. *Pharmacol. Rev.* 40: pp 280-312.
- Traynor T, Yang T, Huang YG, Arend L, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP, Schnermann J (1998) Inhibition of Adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT<sub>1A</sub> receptor-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 275: pp F922-F927.
- Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J (1999) Inhibition of Macula Densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am. J. Physiol.* 277: pp F706-F710.
- Treiman M, Caspersen C and Christensen SB (1998) A tool coming of age: Thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Trends. Pharmacol. Sci.* 19: pp 131-135.
- Vallon V, Kirschenmann D, Brenner I, Albinus M and Osswald H (1998) Potassium diet as a determinant for the renal response to systemic potassium channel modulation in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: pp 245-252.
- Vander AJ and Miller R (1964) Control of renin secretion in anesthetized dog. *Am. J. Physiol.* 207: pp 537-546.
- Vander AJ, Geelhoed GW (1965) Inhibition of renin secretion by Angiotensin II. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 120: pp 399-403.
- Vander AJ (1967) Control of renin release. *Pharmacol. Rev.* 47: pp 359-382.
- Vander AJ (1968) Direct effects of prostaglandin on renal function and renin release in anesthetized dog. *Am. J. Physiol.* 214: pp 218-222.
- Wagner C, Kurtz A (1998) Regulation of renal renin release. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7: pp 437-441.
- Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J (1997) Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Physiol. Rev.* 77: pp 51-74.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J (1994) Synergistic effects of Angiotensin and Adenosine in the renal microvasculature. *Am. J. Physiol.* 266: pp F227-F239.
- Wolf K, Castrop H, Hartner A, Goppelt-Strube M, Hilgers KF, Kurtz A (1999) Inhibition of the Renin-Angiotensin System upregulates cyclooxygenase-2 expression in the Macula Densa. *Hypertension* 34: pp 503-507.

- Wu ML, Chen WH, Liu IH, Tseng CD, Wang SM (1999) A novel effect of cyclic AMP on capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in cultured rat cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 73: pp 1318-1328.
- Wuytack F, Raeymaekers L, De Schutter G, Casteels R (1982) Demonstration of the phosphorylated intermediates of the  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport ATPase in a microsomal fraction and in a ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-ATPase purified from smooth muscle by means of calmodulin affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 693: pp 45-52.
- Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, Schnermann J (2000) Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse Macula Densa cell line. *J. Biol. Chem.* 275: pp 37922-37929.
- Yun CH, Tse CM, Nath SK, Levine SR, Brant SR, Donowitz M (1995) Mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger gene family: structure and function studies. *Am. J. Physiol.* 269: pp G1-G11.
- Zhu Z, Arendshorst WJ (1996) Angiotensin II-receptor stimulation of cytosolic calcium concentration in cultured renal resistance arterioles. *Am. J. Physiol.* 271: pp F1239-F1247.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. R. Daniels

Prof. Dr. G. Drews

PD Dr. U. Eilert

Prof. Dr. K. Görlitzer

Prof. Dr. T. Hartmann

Prof. Dr. W. Kliegel

Prof. Dr. G. König

Prof. Dr. D. Moderhack

Prof. Dr. C. Müller-Goymann

Prof. Dr. U. Panten

Prof. Dr. U. Quast

Prof. Dr. Schüppel

PD. Dr. M. Schwanstecher

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Julia Kristina Laske-Ernst  
Geburtsdatum: 15.08.1973  
Geburtsort: Hannover

## Schulbildung

1980 - 1984            Grundschule Bad Sachsa  
1984 - 1993           Pädagogium Gymnasium Bad Sachsa  
1993                    Abitur

## Akademische Ausbildung

10/1993 - 05/1998   Pharmaziestudium an der TU Braunschweig  
09/1996                1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung  
05/1998                2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung  
06/1998 - 11/1998   Pharmaziepraktikum in der Rathausapotheke in Waiblingen  
12/1998 - 04/1999   Pharmaziepraktikum in der Apotheke der Uniklinik Freiburg  
07/1999                Pharmaziepraktikum in der Apothekerkammer Niedersachsen  
09/1999                3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung und Approbation

seit 05/2000            Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel „Einfluss von Botenstoffen auf die freie Calciumkonzentration in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast und Frau Prof. Dr. Gisela Drews am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen