

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

Akut- und Langzeiteffekte von Na^+/H^+ -Austauscher
Isoform 1 (NHE1) Inhibitoren auf die
Säuresekretionskapazität und das Überleben von
kultivierten Parietalzellen des Kaninchens

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
TIMO MARCEL RIEG
aus Schwäbisch Gmünd

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1.Berichterstatter: Professor Dr. U. Seidler
2.Berichterstatter: Privatdozent Dr. V. Vallon

Für
meinen Sohn Noel
und
meine Frau Sonja

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Säuresekretion der Parietalzelle	2
1.1.1	Rezeptoren der Parietalzellen	2
1.1.2	Basolateral gelegene Transportsysteme	3
1.2	Vorgänge bei Stimulation der Säuresekretion	3
1.2.1	Die H ⁺ /K ⁺ -ATPase	4
1.2.2	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Säuresekretion	4
1.2.3	Beteiligung von Cl ⁻ -Kanälen an der Säuresekretion	5
1.2.3.1	Der Cl ⁻ -Kanal CIC-2	5
1.3	Die Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher-Genfamilie	6
1.3.1	Isoformen	6
1.3.1.1	Expression und Funktion der einzelnen Isoformen	6
1.3.2	Die Situation im Magenepithel	9
1.3.3	Struktur und Kinetik	10
1.3.4	Spezifische Inhibitoren	12
1.3.5	Regulation	13
1.3.6	Die Regulation von NHE1	14
1.3.6.1	Regulation durch Phosphorylierung	14
1.3.6.2	Calmodulin	15
1.3.6.3	Rezeptor unabhängige Regulation	15
1.4	Mechanismen der Volumenregulation	16
1.4.1	Regulationsmöglichkeiten der Zelle	16
1.4.1.1	Mechanismen der Zellschrumpfung	16
1.4.1.2	Mechanismen der Zellschwellung	17
1.4.2	Intrazellulärer Signalweg der Volumenregulation	18
1.5	Volumenregulation der Parietalzelle	19
1.6	Experimentelles Modell	20
1.7	Fragestellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Flüssigchemikalien	22

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.2	Festchemikalien	22
2.1.3	Gase	24
2.1.4	Fertigarzneimittel	24
2.1.5	Tiere zur Zellpräparation	24
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.7	Geräte	25
2.1.8	Stammlösungen	26
2.2	Zellpräparation	27
2.2.1	Vorbereitung	27
2.2.1.1	Herstellung der Puffer	27
2.2.1.2	Herstellung der Nykodenz [®] -Gradienten	28
2.2.1.3	Matrigel [®]	29
2.2.1.4	Kulturschälchen	29
2.2.1.5	Medium	29
2.2.1.6	Elutriatorpflege	31
2.2.2	Operation des Kaninchens	31
2.2.3	Zelltrennung	32
2.2.3.1	Enzymatische Verdauung	32
2.2.3.2	Zelltrennung durch Gegenstromzentrifugation	33
2.2.3.3	Nykodenz [®] -Zentrifugation	34
2.2.4	Zellzählung	35
2.2.5	Beurteilung der Reinheit der einzelnen Zellfraktionen	35
2.2.6	Kultivierung	35
2.2.7	Mediumwechsel	35
2.3	Verwendete Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien	36
2.3.1	Lösungen	36
2.3.2	Stimulantien und Inhibitoren	37
2.4	Messung der Säuresekretion	41
2.4.1	Verwendete Lösungen und Stimulantien	42
2.4.2	Versuchsablauf	42
2.4.2.1	Präinkubation	42
2.4.2.2	Stimulation	43

2.4.2.3	Lyse der Zellen und Radioaktivitätsmessung	43
2.4.2.4	¹⁴ C-Aminopyrin-Aufnahme in frisch isolierten Zellen	43
2.5	Zellzählung	44
2.6	Messung des Zellvolumens und der Volumenänderung	45
2.6.1	Färbung	45
2.6.2	Messung	45
2.6.2.1	Messkammer	45
2.6.2.2	Montage der Messkammer	46
2.6.2.3	Auswahl der zu messenden Zellen	46
2.6.2.4	Messung des Fluoreszenzsignals	46
2.7	Auswertung der Messdaten und Statistik	47
2.7.1	Verarbeitung der Rohdaten des Laserscanmikroskops	47
2.7.2	Weiterbearbeitung und Zusammenfassung der Messdaten	47
2.7.3	Calceinkonzentrations-Änderung	48
2.7.4	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Parietalzellkultur	49
3.1.1	Parietalzellisolierung	49
3.1.1.1	Enzymatische Verdauung	49
3.1.1.2	Gegenstromzentrifugation	50
3.1.1.3	Dichtegradientenzentrifugation	50
3.1.2	Parietalzellkultur	50
3.1.3	Validierung der Kultur	51
3.2	Messung der Säuresekretion in stimulierten Parietalzellen	52
3.2.1	Bedeutung der Stimulierbarkeit der Säuresekretion	52
3.2.2	Kontrollgruppen	52
3.2.3	Stimulation mit Forskolin	52
3.2.4	Einfluss der NHE Inhibitoren auf frisch isolierte und kultivierte Parietalzellen	54
3.2.5	Langzeiteffekte der NHE Inhibitoren auf die Säuresekretion	58
3.3	Untersuchung der Zellzahl an Tag 3 der Parietalzellprimärkultur	63
3.3.1	Konzentration der NHE Inhibitoren	63

INHALTSVERZEICHNIS

3.4	Messung des Zellvolumens in stimulierten Parietalzellen	65
3.4.1	Kontrolle des Versuchaufbaus	65
3.4.2	Kontrollgruppe	65
3.5	Wirkung von NHE Inhibitoren auf Parietalzellschrumpfung und Volumenerholung	66
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
3.6.1	¹⁴ C-Aminopyrin-Aufnahme in frisch isolierten Parietalzellen	71
3.6.2	¹⁴ C-Aminopyrin-Aufnahme in kultivierten Parietalzellen	71
3.6.3	¹⁴ C-Aminopyrin-Aufnahme bei NHE Langzeithemmung (3 Tage)	72
3.6.4	Zellzahl an Tag 3 der Kultur	73
3.6.5	Maximale Volumenänderung	74
3.6.6	Calceinkonzentrations-Änderung	74
4	Diskussion	75
4.1	Diskussion des Versuchmodells	75
4.1.1	Isolierte Zellen und Membranvesikel	75
4.1.2	Magenepithel, DrüsenSchläuche, handdissezierte Magendrüsen	75
4.1.3	Primärkultur von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen	76
4.1.3.1	Abtrennung der Parietalzellen	76
4.1.3.2	Vermeidung der Kontamination mit Mikroorganismen	77
4.1.3.3	Beurteilung des gewählten Versuchsmodells	77
4.2	Messung des Zellvolumens mit dem Laserscanmikroskop	78
4.3	Messung der Säuresekretion	79
4.3.1	Effekt der NHE Inhibitoren auf die Säuresekretion	79
4.4	Einfluss der NHE Inhibitoren auf die Zellzahl	82
4.4.1	Mögliche Ursachen der verminderten Säuresekretion	83
4.5	Einfluss auf die Volumenregulation	84
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	87
6	Literaturverzeichnis	88
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

Der Magen produziert etwa 2 Liter Flüssigkeit pro Tag, welche hauptsächlich aus H^+ , Cl^- , K^+ und Wasser besteht. Die Säureproduktion erfolgt durch die eigens dafür spezialisierten Parietalzellen (syn. Belegzellen; engl. oxyntic cells). Die Parietalzellen des Magens machen einen prozentualen Anteil von 30-40% der gesamten Magenschleimhaut aus. Die Mukosaoberfläche ist mit Schleimzellen besetzt, während in den ins Magenlumen mündenden Drüsen mehrere Zelltypen vorkommen, darunter Parietalzellen, Hauptzellen, Schleimzellen, ECL-Zellen (Enterocromaffine like cells) und undifferenzierte Zellen. „Parietal“ beschreibt die vorstehende Position der Zellen in der Drüsenwand, welche auf die Zellgröße von bis zu 25 μm (2) zurückzuführen ist. Die Parietalzellen der Magenschleimhaut sezernieren einen Magensaft, dessen pH bei 0,8 liegt und dessen HCl-Konzentration bis zu 160 mM beträgt.

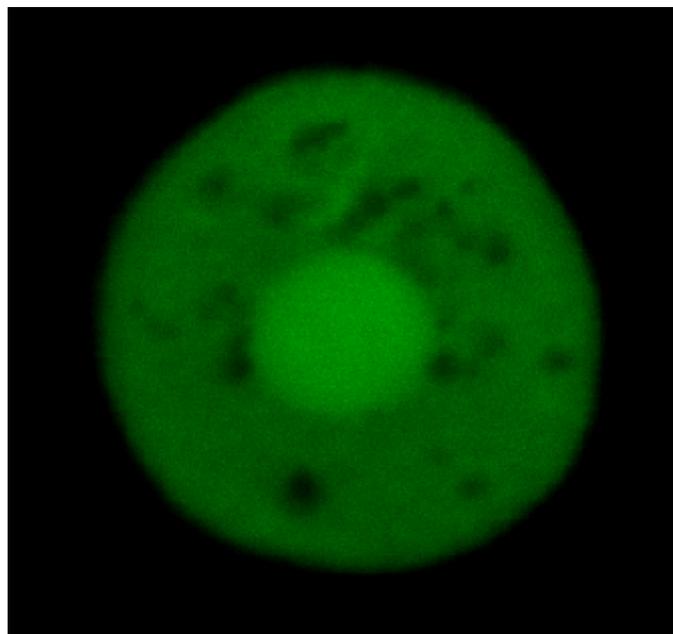


Abb. 1: Bild einer Parietalzelle nach Calceinfärbung am Konfokalen Laserscanmikroskop (Anatomisches Institut der Universität Tübingen, 2002)

Wesentlichen Beitrag dazu leistet die H^+/K^+ -ATPase, die in der apikalen Membran der Parietalzelle lokalisiert ist. Diese Protonenpumpe ist imstande, im Magenlumen eine mehr als 10^6 fach höhere H^+ -Ionenkonzentration als in der Mukosa zu erzeugen. Die Protonenpumpe kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden.

1.1 Säuresekretion der Parietalzelle

1.1.1 Rezeptoren der Parietalzellen

Die Parietalzelle verfügt über mindestens drei Arten aktivierender Rezeptoren, nämlich für Histamin (H_2), Acetylcholin (M_3) und Gastrin (CCK_B). Es gilt heutzutage als gesichert, dass der Großteil des Effekts von Acetylcholin und Gastrin über die Freisetzung von Histamin aus ECL-Zellen vermittelt wird (84). In der vorliegenden Arbeit wurde Forskolin zur Stimulation der Säuresekretion verwendet. Forskolin (34) ist ein Aktivator der Adenylatzyklase. Man nimmt an, dass der H_2 -Rezeptor an G_s gekoppelt ist, um die Adenylatzyklase, die zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt, zu aktivieren. Dadurch wird wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert (35; 37; 39; 41; 160).

Die M_3 - und die CCK_B -Rezeptoren aktivieren über G_q die Phospholipase C (PLC), welche Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol herstellt. Dabei setzt das Inositol-1,4,5-trisphosphat Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei und Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (28; 35; 39; 40). Die PKC- α Isoform ist die einzige Ca^{2+} -abhängige Kinase Isoform, welche in Parietalzellen des Kaninchens exprimiert wird. Michael Fähmann aus unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass cholinerge Stimulation über PKC- ϵ die Säuresekretion wahrscheinlich über die Freisetzung von intrazellulärem Calcium verstärkt, PKC- α hingegen über eine Downregulation der CaMKII Aktivität zu einer abgeschwächten Säuresekretion führt (65).

Im häufig verwendeten Versuchsmodell „Parietalzelle des Kaninchens“ scheint PKA der primäre aktivierende Faktor der Säuresekretion zu sein. Dies ist darauf zurück zu führen, dass maximale Stimulierung von isolierten Drüsenschläuchen

oder Zellen erreicht wurde, wenn der intrazelluläre cAMP-Gehalt maximal erhöht war, was anhand der ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme gemessen wurde (34). Der Protonengenerator für die H^+/K^+ -ATPase ist die Carboanhydrase, welche die Bildung von Kohlensäure (H_2CO_3) aus H_2O und CO_2 katalysiert. Die Kohlensäure dissoziiert spontan zu Protonen und Bicarbonat-Anionen, wobei letztere die basolaterale Zellmembran über einen Anionenaustauscher verlassen.

1.1.2 Basolateral gelegene Transportsysteme

Für den Export von Säureäquivalenten besitzen die Parietalzellen basolateral gelegene Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) (135; 149; 181) sowie einen elektrogenen Cl^- -unabhängigen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBC) (46; 166; 203; 229). Ebenso wurde ein DIDS-sensitiver Anionenaustauscher gefunden, der für die basolaterale Cl^- -Aufnahme und den Export von anfallenden Basenäquivalenten während der HCl-Sekretion verantwortlich ist (134; 141; 182; 193). Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher oder Anionenaustauscher (AE) kommt in Zellen von Wirbeltieren nahezu ubiquitär vor und ist eines der am besten erforschten Plasmamembranproteine (5; 6; 31; 105; 137), welches den elektroneutralen, reversiblen 1:1-Austausch von Cl^- und HCO_3^- vermittelt. Seine Aufgaben sind die Regulation von intrazellulärem pH (pH_i), Cl^- -Konzentration und Zellvolumen. Die Existenz eines $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporters in den Parietalzellen ist ebenfalls bekannt (130). Thorsten Sonntag aus unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass der $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporter in säuresezernierenden Parietalzellen weder eine Bedeutung bei der regulatorischen Volumenzunahme noch bei der initialen Schrumpfung hat (192).

1.2 Vorgänge bei Stimulation der Säuresekretion

Bei Säurestimulation der Parietalzelle verschmelzen intrazelluläre tubulovesikuläre Strukturen mit intrazellulären Kanalikuli. Dies führt zum Auftreten von verlängerten Mikrovilli in den Drüsenlumina. Die so entstandenen Mikrovilli entsprechen der apikalen Membran der Parietalzelle. Aktivierung der Säuresekretion wird durch zwei gleichzeitig auftretende funktionelle Veränderungen erreicht, nämlich durch Fusion der Tubulovesikel mit der

apikalen Membran (14; 62; 67), wodurch H^+/K^+ -ATPase-Moleküle an die Oberfläche gelangen (208), und durch Permeabilitätserhöhung der apikalen Membran für Kalium (116; 126).

1.2.1 Die H^+/K^+ -ATPase

Zentrales Enzym der Parietalzelle ist die, aus α - und β -Untereinheit (176) bestehende, apikal lokalisierte H^+/K^+ -ATPase, welche durch Immunhistochemie in intrazellulären Tubulovesikeln nachgewiesen wurde. Sie vermittelt den elektroneutralen Austausch von H^+ gegen K^+ und produziert so einen pH von unter 1 im Kanalikulus (160; 170). Ist die Parietalzelle im Ruhezustand, so liegt eine doppelte Restriktion der H^+/K^+ -ATPase vor. Dies liegt daran, dass sich das Enzym einerseits in zytoplasmatischen Tubulovesikeln befindet und andererseits, dass die Permeabilität der tubulovesikulären Membran für KCl so gering ist, dass trotz zur Verfügung stehendem ATP die Pumpe inaktiv ist.

Die H^+/K^+ -ATPase kann von verschiedenen Medikamenten gehemmt werden, von denen hier beispielhaft Omeprazol (99; 218) erwähnt sein soll, da es klinische Anwendung, als auch Anwendung in den durchgeführten Versuchen fand.

Die drei Substrate Mg^{2+} -ATP, H^+ und K^+ sind unbedingt nötig, um die Funktion der H^+/K^+ -ATPase aufrecht zu erhalten (171). Dabei scheint es so, dass die Konzentration von intrazellulärem Mg^{2+} -ATP und H^+ zu keinem Zeitpunkt der limitierende Faktor ist. Der limitierende Faktor der die Aktivität der H^+/K^+ -ATPase beeinflusst, ist das Vorhandensein von K^+ in den sekretorischen Kanälchen der apikalen Zellmembran (73). Damit letztendlich HCl auf der luminalen Seite entsteht, ist weiterhin eine Sekretion von Cl^- erforderlich.

1.2.2 Beteiligung von K^+ -Kanälen an der Säuresekretion

Die H^+/K^+ -ATPase verbindet die Abgabe von Protonen über die apikale Membran mit der Aufnahme von K^+ -Ionen. Für die Aufrechterhaltung und die Regulation der Protonenpumpe ist es deswegen elementar, dass das aufgenommene K^+ wieder über die apikale Membran abgegeben wird (208;

226). Die hierfür in Frage kommenden K^+ -Kanäle, sind der KCNQ1 (73) und Kir4.1. Die Tubulovesikel der Parietalzelle sind für K^+ undurchlässig, obwohl KCNQ1 dort kolokalisiert mit der H^+/K^+ -ATPase vorkommt. Wenn die Tubulovesikel während der Säuresekretion mit der apikalen Zellmembran verschmelzen, KCNQ1 zusammen mit KCNE3, der apikal lokalisiert ist, einen aktiven K^+ -Kanal bilden (85).

Des Weiteren sind an der Regulation der Säuresekretion und der Aufrechterhaltung des Membranpotentials basolaterale K^+ -Kanäle beteiligt

1.2.3 Beteiligung von Cl^- -Kanälen an der Säuresekretion

Die Sekretion von HCl über die apikale Membran der Parietalzelle fordert mindestens 3 Komponenten, die an der Säuresekretion und somit auch an der Regulation beteiligt sein müssen (Kap. 1.1.3). Dies sind im Einzelnen die schon beschriebene H^+/K^+ -ATPase (84; 208), die oben genannten K^+ -Kanäle (16; 80; 161) und ein Cl^- -Kanal (54; 57; 125; 155; 227). Es gibt Hinweise darauf, dass es sich hierbei um den CIC-2 handeln könnte.

1.2.3.1 Der Cl^- -Kanal CIC-2

Der Cl^- -Kanal CIC-2, ein Mitglied der CIC Cl^- -Kanalfamilie, konnte bereits aus der Magenschleimhaut der Ratte (93; 199), des Kaninchens (127) und des Menschen (44) kloniert werden. Er zeigt alle Eigenschaften, die ein Cl^- -Kanal haben muss, der für die Cl^- Sekretion über die apikale Membran der Parietalzelle im Magen verantwortlich ist. Dazu gehören Spannungsabhängigkeit (96), Aktivierbarkeit durch niederen, extrazellulären pH (51; 127; 179) und Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (127; 152; 186; 198).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der CIC-2 Kanal in der apikalen Membran der Parietalzelle vorkommt, dort eng mit der H^+/K^+ -ATPase verbunden ist und sie sogar zu regulieren scheint (186).

In HTC-Zellen der Ratte scheint der CIC-2 außerdem eine wesentliche Rolle bei der Volumenregulation auszuüben (165).

1.3 Die Na⁺/H⁺-Austauscher-Genfamilie

Zahlreiche biologische Vorgänge wie Zellwachstum und -differenzierung, biochemische Funktion und transepithelialer Transport sind nur in eng begrenztem pH-Optimum möglich. Um dies zu gewährleisten, muss die Zelle die im Metabolismus anfallenden überschüssigen Säureäquivalente adäquat entsorgen können. Hierfür fungiert der Na⁺/H⁺-Austauscher, der erstmals 1976 von Murer et al. (136) in Vesikeln der Bürstensaummembran von Niere und Dünndarm des Kaninchens nachgewiesen wurde und der heute eines der am besten charakterisierten Transportsysteme darstellt (7; 50; 76; 143; 146; 158; 216; 217; 231; 232), welches in nahezu allen Zellarten vorkommt und eine zentrale Rolle im pH_i-, Volumen-, Salz- und Wasserhaushalt der Zellen spielt, aber auch an Proliferation, Migration und möglicherweise Gentranskription beteiligt ist. Einen wesentlichen Regulationsfaktor stellt der pH_i dar, darüber hinaus wird der Na⁺/H⁺-Austauscher durch eine Reihe von Signalen wie Wachstumsfaktoren, Änderung der Osmolarität, und Zellwachstum reguliert (7; 76; 207; 232). Vier der bekannten NHE Isoformen werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert, und zwar zum Teil stärker als in anderen Organen. Die Bedeutung der NHE3 Isoform für die elektroneutrale Na⁺-Resorption im Darm ist inzwischen gesichert.

1.3.1 Isoformen

1989 gelang Sardet et al. (174) die Klonierung und Sequenzierung des humanen NHE1. Nachdem bereits eine NHE Genfamilie vorhergesagt worden war (45), wurden inzwischen neben NHE1 (117; 174; 196) weitere Isoformen kloniert und mit NHE2 (46; 204; 206), NHE3 (25), NHE4 (145), NHE5 (9; 11; 103), NHE6 (139), NHE7 (138) und NHE8 (72) bezeichnet. Die kodierenden Gene, liegen im Säuger genom verteilt vor.

1.3.1.1 Expression und Funktion der einzelnen Isoformen

NHE1 wird im Unterschied zu den anderen Isoformen, die gewebespezifischer auftreten, in nahezu allen Geweben, Zelltypen und Spezies exprimiert und hat am ehesten eine housekeeping-Funktion. Sie dient der Konstanthaltung von pH_i, Zellvolumen, bzw. reguliert die Proliferation. Neben der Aktivierung des

Na^+/H^+ -Austauschs durch intrazelluläre Säurebelastung wird er in vielen dahingehend untersuchten Zelltypen zusammen mit einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher durch Hyperosmolarität aktiviert, was zu NaCl Import führt und dies der Zelle zusammen mit anderen Mechanismen ermöglicht, ihr Ausgangsvolumen wieder anzunehmen. Trotz der vielfältigen Aufgaben wie pH_i - und Volumenregulation, welche besonders in epithelialen Geweben relevant sind, zeigt die NHE1 defiziente Maus keine groben Auffälligkeiten im Gastrointestinaltrakt, sondern erstaunlicherweise eine Epilepsie (53). Möglicherweise werden im Gastrointestinaltrakt die NHE1 Funktionen ganz oder teilweise durch andere Ionenporter, wie den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ - oder $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, kompensiert.

Die *NHE2* Isoform wird nur in wenigen Organen, vor allem im Gastrointestinaltrakt, exprimiert (22; 206; 221). Beim Kaninchen findet sich diese Isoform vorwiegend in Niere, Darm und Nebenniere sowie geringfügig in Skelettmuskel und Trachea (88; 206). Weder ist die subzelluläre Position endgültig geklärt – NHE2 wurde sowohl in der basolateralen (191) als auch in der apikalen Membran (88) beschrieben – noch ist man sich über die genaue Funktion einig. Transfiziert man diese Isoform in NHE defiziente Zelllinien, so übernimmt sie ähnliche Aufgaben wie NHE1 (97). Obwohl NHE2 besonders stark im proximalen Kolon und Duodenum, und dort möglicherweise apikal (88) exprimiert ist und deshalb im Zusammenhang mit der elektroneutralen NaCl Rückresorption diskutiert wird, haben NHE2 defiziente Mäuse weder Diarrhoe noch morphologische Veränderungen im Darm, sondern überraschenderweise ein fast vollständiges Fehlen von ausgereiften Parietal- und Hauptzellen im Magen (178).

Die *NHE3* Isoform ist für einen Großteil der epithelialen NaCl Resorption zuständig und wird in epithelialen Geweben von Darm, Niere und Gallenblase (20; 88; 190; 202) des Kaninchens (88; 204) und der Ratte und in geringeren Ausmaß im Rattenmagen (145), jedoch nicht im Kaninchenmagen exprimiert (180). Beim Menschen ist NHE3 vor allem in Niere und Dünndarm, aber auch in

vielen anderen Geweben zu finden (25). Inzwischen wurde eine NHE3 Knock-out Maus hergestellt, die eine systemische Azidose und eine Diarrhoe zeigt (178). Da die NHE2 Knock-out Maus keine Auffälligkeiten im Darm und keine Azidose zeigt, liegt es nahe, dass zumindest bei der Maus die NHE3 Isoform für die elektroneutrale Rückresorption von NaCl in Darm und Niere am wichtigsten ist.

NHE4 ist bei der Ratte (145) und beim Kaninchen sehr stark im Magen exprimiert, mittelstark im Dünndarm und Kolon und schwach in Niere, Gehirn, Herz, Uterus, Skelettmuskel und Leber (145; 157), und wurde immunhistochemisch auf der basolateralen Membran lokalisiert (157). Die Tatsache, dass NHE4 im hypertonen Nierenmark vorkommt und dass eine Na^+/H^+ -Austauschaktivität in NHE4 transfizierten Zellen von einer Arbeitsgruppe nur unter hyperosmolaren Bedingungen beobachtet wurde (23; 24), sprechen aber dafür, dass der NHE4 in bestimmten, besonders gegenüber Osmolaritätsschwankungen exponierten Geweben, an der Volumenregulation beteiligt sein könnte.

NHE5 ist sowohl in der Ratte als auch beim Mensch im Gehirn hoch exprimiert (9; 11), was auf eine spezialisierte Funktion in neuronalen Geweben schließen lässt.

Die *NHE6* Isoform ist nur in den Mitochondrien von metabolisch hoch aktivem Gewebe – wie Herz, Gehirn, und Skelettmuskel (139) – exprimiert und könnte dort an der pH_i^- , Volumen- und Elektrolytregulation beteiligt sein (139). Ebenfalls in den Zellorganellen ist die *NHE7* Isoform exprimiert. Sie kommt selektiv im Golgi-Netzwerk vor, und reguliert die Ionenhomöostase (138). *NHE8* wurde erst jüngst im proximalen Tubulus der Niere entdeckt, und ist dort am apikalen Elektrolyttransport beteiligt (72).

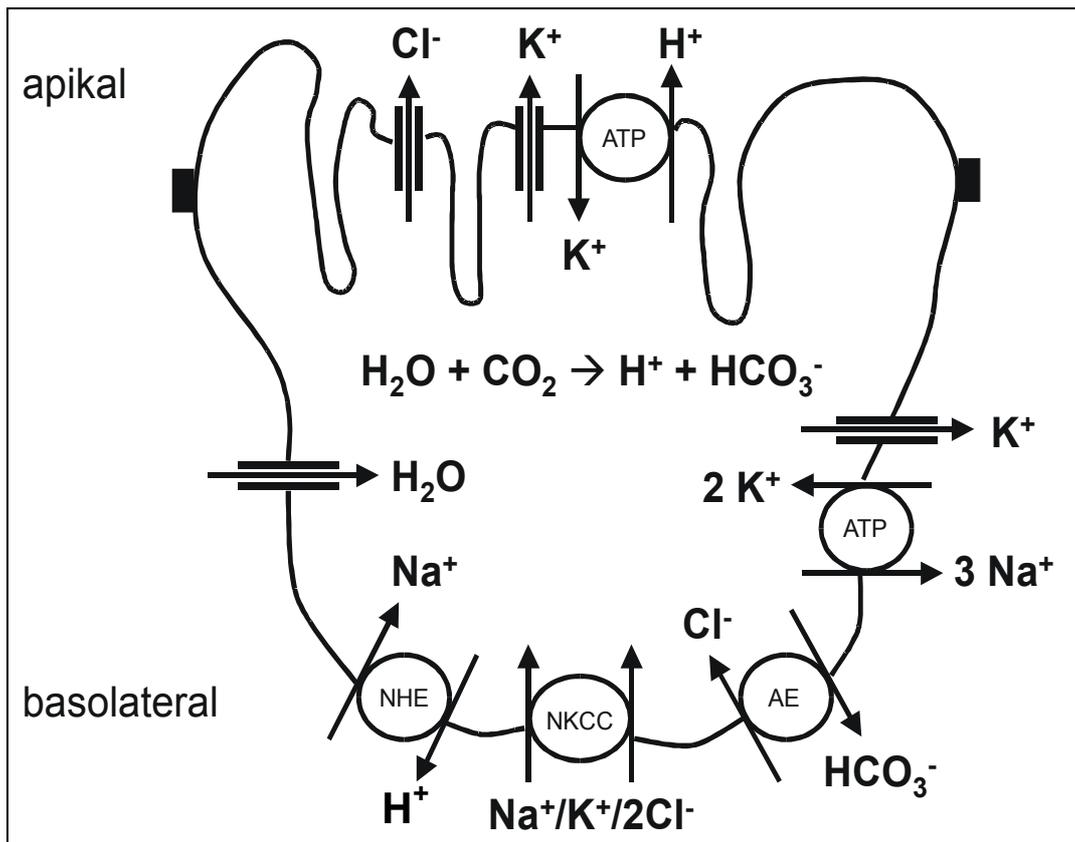


Abb. 2: Mutmaßliche Transportsysteme der Parietalzelle

1.3.2 Die Situation im Magenepithel

Es hat sich gezeigt, dass es auch innerhalb des Magenepithels Unterschiede im Expressionsniveau der verschiedenen NHE Isoformen gibt. Seidler et al. (180) fanden, dass die mRNA der NHE1, NHE2, und NHE4 Isoformen in allen drei Epithelzelltypen von Ratte und Kaninchen exprimiert wird, NHE3 hingegen nur in Präparietal- und Parietalzellen der Ratte. NHE3 kommt im Kaninchenmagen nicht vor (180). Pizzonia et al. konnten die NHE4 Isoform im Rattenmagen mittels Antikörper an der basolateralen Membran nachweisen. Rossmann et al. untersuchten die Expression der verschiedenen Zelltypen mit Hilfe einer semiquantitativen PCR. Es zeigte sich dabei, dass NHE1 und NHE2 vor allem in Schleimzellen, NHE4 dagegen stärker in Haupt- und Parietalzellen exprimiert wird (167; 180). NHE3 findet sich – wie schon erwähnt – nur in den Parietalzellen des Rattenmagens.

1.3.3 Struktur und Kinetik

Ausgehend von der Primärstruktur kann für alle NHE Isoformen eine ähnliche Membrantopologie vermutet werden. NHE1 bis NHE5 sind in 34-60% ihrer Aminosäuresequenz homolog. Die NHE6 Isoform, ist die mit den größten Unterschieden in der Aminosäuresequenz, nur etwa 20% der Sequenz sind mit der anderer Isoformen identisch. In Säugetieren besteht NHE1 aus ~813 bis zu 822 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von ~91 kD. Die transmembranären Segmente werden durch 6 extrazelluläre Schleifen (EL) und 5 intrazelluläre Schleifen (IL) miteinander verbunden. NHE1 hat eine relativ kurze N-terminale Domäne und eine lange C-terminale Domäne.

Die 12 α -Helices der transmembranären Region (TM) von NHE1 (TM-1 bis TM-12) sind gemeinsam am Austausch von extrazellulärem Na^+ für intrazellulären H^+ , in einer elektroneutralen 1:1 Stöchiometrie, beteiligt. Untersuchungen von Wakabayashi et al. (215) zeigen die Beteiligung von TM-4, der intrazellulären Schleife 2 (IL-2) – welche TM-4 mit TM-5 verbindet – und TM-5 beim transepithelialen Na^+ - und H^+ -Transport.

Die N-terminale, transmembranäre Domäne von NHE1 scheint als pH_i -Sensor zu funktionieren und über die C-terminale Domäne den pH_i -Setpoint zu modulieren, was wiederum die Affinität der H^+ -modifier-site verändert (51; 214). Deletionsstudien haben gezeigt, dass innerhalb der transmembranären Domäne die Amilorid-Bindungsstelle (216), die Stelle für die allosterische Regulation der Transportgeschwindigkeit durch pH_i und bei NHE1 wahrscheinlich auch eine Bindungsdomäne für interagierende Proteine liegt. Innerhalb der zytoplasmatischen Regulationsdomäne liegen verschiedene Regionen für die Beeinflussung durch Zellschrumpfung, Scherkräfte, Proteinkinasen, die Stelle für den pH_i -Setpoint, Bindungsstellen für interagierende Proteine und Calmodulin (17). Bei der NHE3 Isoform existiert weiterhin eine Bindungsstelle für Proteinkinase A (115; 205; 214).

Die NHE Isoformen 1-3 besitzen eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik für extrazelluläres Na^+ (114; 142; 214; 230), somit ist eine einzige Bindungsstelle für extrazelluläres Na^+ wahrscheinlich. Im Unterschied hierzu zeigt sich im Falle von NHE4 eine sigmoidale Abhängigkeit von extrazellulärem Na^+ , wobei die

funktionelle Bedeutung noch unklar ist (23). Die Michaelis-Menten-Konstante für extrazelluläres Na^+ beträgt bei drei der klonierten Austauschern des Kaninchens 15-18 nM (114), bei der Ratte ergeben sich hingegen für NHE1 10 nM, für NHE2 50 mM und für NHE3 4,7 mM (142; 230). Der Austauschprozess wird auch von anderen Ionen beeinflusst; die Affinität zur extrazellulären Bindungsstelle ist für die entsprechenden Ionen $\text{H}^+ \gg \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ \geq \text{Na}^+ \gg \text{K}^+$. Im Gegensatz hierzu ist die Konzentrationsabhängigkeit für intrazelluläre Protonen mit einem Hill-Koeffizienten >2 viel steiler, was auf mehrere Bindungsstellen hinweist. Aronson et al. haben deshalb – wie oben erwähnt – eine H^+ -modifizierende vorgeschlagen (8), aufgrund der eine allosterische Aktivierung durch H^+_i erfolgt. Es herrscht Unklarheit darüber, ob die allosterische Aktivierung durch H^+_i anhand direkter Protonierung ionisierbarer Gruppen im Protein erreicht wird, oder ein Resultat zellspezifischer Regulatoren ist (213; 214). Die Aktivierung führt zu einem raschen Export von Protonen, sobald der pH_i unter einen Grenzwert fällt. Bei physiologischem pH_i sind NHE1 und NHE2 größtenteils inaktiv, werden aber bei Erniedrigung des pH_i schnell aktiviert (8; 150), während NHE3 hingegen eine höhere Affinität für H^+ besitzt und so bei neutralem pH_i aktiv ist. Die halbmaximale Aktivierung von NHE1 wird in Ratten bei einem pH_i von 6,75 (142), in Menschen bei pH_i 6,8 (195) und in Mäusen bei einem pH_i von 7,0 erreicht (196).

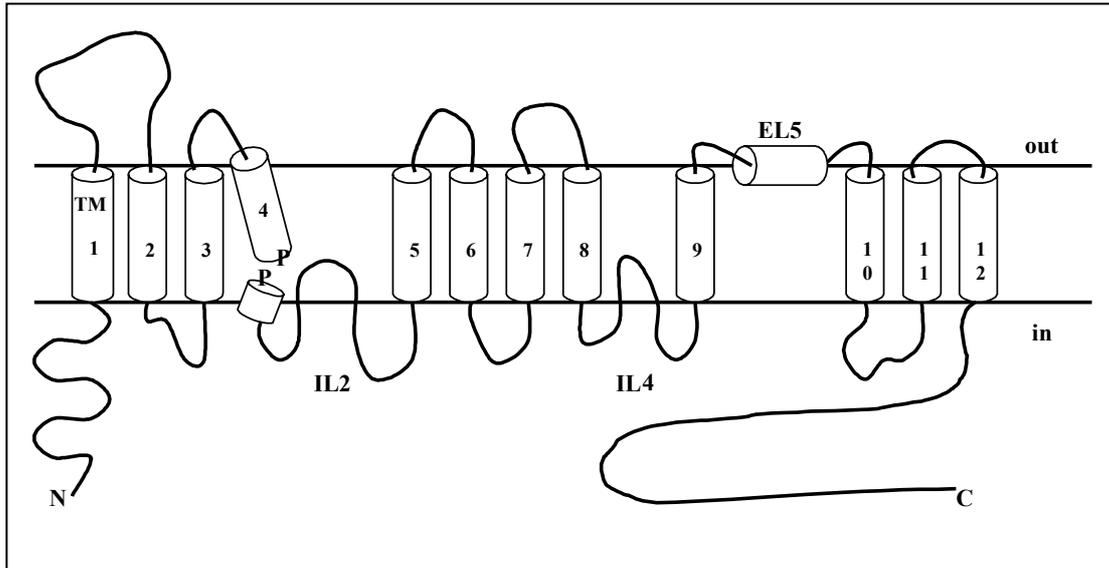


Abb. 3: Modell des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE1) nach Wakabayashi et al (215). C, C-Terminus; N, N-Terminus; TM, transmembranäre Domäne; EL, extrazelluläre Schleife; IL, intrazelluläre Schleife.

1.3.4 Spezifische Inhibitoren

Derzeit werden mehrere Substanzgruppen benutzt, um die Aktivität der Na^+/H^+ -Austauscher zu hemmen. Die erste Klasse umfasst Amilorid und seine Derivate (DMA), die zweite Acyl-Guanidin und seine Derivate wie HOE642 (177), EMD 87580, 96785, 125021, 392426 und eine ganz neue Substanzgruppe, das nicht-Acyl-Guanidin-Derivate EMD 434350 (120). Alle Klassen zeigen eine höhere Spezifität für NHE1 als für NHE3, mit Amilorid etwa 10^2 fach spezifischer, mit den HOE Präparaten etwa 10^3 - 10^5 fach spezifischer. Deshalb werden in Bezug auf ihre Fähigkeit NHE1 zu hemmen diese Präparate experimentell zur Behandlung nach ischämischer Schädigung eingesetzt, um eine weitere Schädigung durch Zellschwellung aufgrund intrazellulärer Azidifizierung mit Aktivierung der Na^+/H^+ -Austauscher zu verhindern.

Die Ordnung der Empfindlichkeit der NHE hemmenden Substanzen unter ähnlichen experimentellen Bedingungen lautet wie folgt: NHE1>NHE2>NHE5>NHE3. Obwohl die Sensitivität von NHE6 noch nicht untersucht wurde, scheint die mitochondriale NHE6 Isoform gegenüber Amilorid, nicht aber seinen Derivaten, resistent zu sein (26; 98; 175). Von den NHE1 Inhibitoren wird angenommen, dass sie kompetitiv die Na^+ -Bindung an

der extrazellulären Kationenbindungsstelle hemmen (52; 100; 123; 150). Für Amilorid und seine Derivate wurde eine nichtkompetitive Hemmung des Ionenaustauschs gezeigt, deshalb sind wahrscheinlich die Na^+ - und Amiloridbindungsstellen nicht identisch (89; 222). Obwohl unklar ist, ob NHE1 Inhibitoren und Na^+ um die gleiche Bindungsstelle wetteifern, haben unterschiedliche Untersuchungen die Bedeutung der Aminosäuresequenz für die Translokation und Amiloridbindung in TM4 (48; 49; 215) und TM9 (144; 215; 219) gezeigt. Auch neuere Untersuchungen konnten die pharmakologische Wirkweise der NHE1 Inhibitoren noch nicht vollständig aufklären.

1.3.5 Regulation

Die Funktion bzw. Struktur der NHE Isoformen sind Gegenstand derzeitiger Forschung. Am besten ist die NHE1 Isoform untersucht. Bei Stimulation wird eine Affinitätssteigerung der H^+ -modifier-site (75; 151) angenommen mit anschließender NHE1 Aktivierung. Wohingegen bei der NHE2 und NHE3 Isoform einer Änderung der V_{\max} -Werte beobachtet wurde.

Eine ausgeprägte Charakteristik von NHE1 ist, dass seine Aktivität durch verschiedene Typen von Zelloberflächenzellrezeptoren, wie Rezeptor-tyrosinkinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Integrinrezeptoren, geregelt wird. Die benutzten Signalmechanismen sind sehr gut untersucht, und durch Rezeptoren ausgelöste Signale laufen in wenigen mit NHE1 wechselwirkenden Proteinen zusammen, welche Modifikationen im zytoplasmatischen C-Terminus, der regulatorischen Domäne von NHE1, vornehmen. Modifizierungen wie Phosphorylierung, Bindung regulatorischer Proteine und Konformationsänderungen regulieren die Transportaktivität durch Affinitätsänderung der H^+ -Bindungsstelle. Wakabayashi et al. (214) zeigten, dass durch Entfernung der zytoplasmatischen, C-terminalen Domäne die pH_i -Sensitivität von NHE1 merklich geändert wurde. Die C-terminale Domäne funktioniert folglich als eine Art Sensor, welcher auf bisher unbekanntem Weg die eingehenden Signale diskriminiert und so die allosterische Aktivierung von NHE1 durch H^+_i moduliert. Im Gegensatz dazu führt die rezeptorabhängige Aktivierung der NHE3 Isoform zu Änderung der V_{\max} und Ein- bzw. Ausbau des Proteins aus der Zellmembran in die Endosomen und umgekehrt (55; 63).

Von der Gesamtheit der NHE1 Austauscher wird jedoch angenommen, dass NHE1 sich generell in der Plasmamembran befindet und keine Rekrutierung aus Membranspeichern erfolgt (55; 187).

1.3.6 Die Regulation von NHE1

1.3.6.1 Regulation durch Phosphorylierung

Sardet et al. (174) beschrieben zuerst, dass NHE1 ein phosphoryliertes Glykoprotein ist. Eine Phosphorylierungsdomäne am distalen C-Terminus (AS 656-815, humanes NHE1) beinhaltet eine Anzahl von Serinresten, welche konstitutionell in ruhenden Zellen phosphoryliert sind und bei Aktivierung der Austauschaktivität durch Wachstumsfaktoren stärker phosphoryliert werden (173). Drei Serin/Threonin Kinasen, ROCK (201), p90^{RSK} (18) und NIK (228) phosphorylieren NHE1 direkt. RhoA wird durch ROCK aktiviert, was durch Signale von Integrinen und G13 gekoppelten Rezeptoren vermittelt wird. Die p90^{RSK} phosphoryliert Serin 703 direkt, und nimmt eine Schlüsselrolle bei der NHE1 Aktivierung durch Serum ein. NIK ist die einzige, direkt mit dem C-Terminus assoziierte Kinase. Die NIK Bindungsstelle (AS 538-638) liegt oberhalb und getrennt von den Phosphorylierungsstellen (Serinreste distal von AS 638). Obwohl nur die Kinasedomäne von NIK ausreicht um in vitro NHE1 zu phosphorylieren, wird für die Phosphorylierung von NHE1 in vivo die NHE1 Bindungsstelle von NIK an NHE1 benötigt.

Die Bedeutung der Phosphorylierung für die Regulation der NHE1 Aktivität wird kontrovers diskutiert. Abtrennung der Phosphorylierungsdomäne im C-Terminus an Stelle der AS 636 bzw. die funktionelle Blockade durch spezifische Antikörper hemmte teilweise (213) oder komplett (225) die Aktivierbarkeit von NHE1. Die volle Aktivierung der Transportaktivität durch rezeptorvermittelte Signale, benötigt die Phosphorylierung von NHE1. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung von NHE1 durch osmotischen Stress, intrazelluläre Azidifizierung und damit Hemmung der Aktivität durch ATP Entzug, ohne messbare Änderung des Phosphorylierungszustandes. Zusammengefasst zeigen diese Erkenntnisse, dass Phosphorylierung ein Hauptfaktor der rezeptorabhängigen, jedoch nicht der rezeptorunabhängigen Aktivierung ist.

1.3.6.2 *Calmodulin*

Bertrand et al. (17) entdeckten als erstes zwei Calmodulin Bindungsstellen auf der zytoplasmatischen Domäne von NHE1 bei den AS 636-656 und 664-684 mit hoher (K_d etwa 20 nM) und niedriger (K_d etwa 350 nM) Bindungsaffinität. Die Stelle mit hoher Calmodulin Bindungsaffinität reguliert die NHE1 Aktivität infolge Ca^{2+} -vermittelten Signalmechanismen (212; 213). In ruhenden Zellen fungiert diese Stelle vielleicht als autoinhibitorische Domäne, indem sie durch Wechselwirkung mit der transmembranären Domäne den Ionenaustausch hemmt. Das von Wakabayashi et al. präsentierte Modell (212) schlägt vor, dass durch Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin eine Konformationsänderung auftritt, wodurch die Interaktion der autoinhibitorischen Domäne mit transmembranären Segmenten beendet wird. Dies könnte ein möglicher NHE1 aktivierender Mechanismus sein. Dieses Modell wird durch Beobachtungen unterstützt, in denen die Entfernung der Calmodulin Bindungsstelle zu ständiger Aktivierung des Transporters führte (212).

1.3.6.3 *Rezeptor unabhängige Regulation*

Eine rezeptorunabhängige Regulation von NHE1 wurde ebenfalls beschrieben. Der für NHE1 am besten charakterisierte rezeptorunabhängige Regulationsmechanismus ist die Aktivierung durch hyperosmotischen Stress. Der gesteigerten Transportaktivität durch Hyperosmolarität liegt die physiologische Aufgabe zugrunde, eine Zellschrumpfung auszugleichen. Übereinstimmend haben Krump et al. (106) gefunden, dass die hyperosmotische Aktivierung von NHE1 in neutrophilen Granulozyten eine Antwort auf reduzierte Zellgröße ist, und nicht auf Änderung der Osmolarität oder der Ionenkonzentration zurückzuführen sei. Wie jedoch registriert NHE1 die Änderung der Zellgröße? Hyperosmolarität scheint die Aktivität unabhängig vom NHE1 Phosphorylierungszustand (77), der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (56; 187) oder MAPK (133) zu erhöhen. Ein möglicher Mechanismus führt über die Aktivierung dynamischer Veränderungen des Aktinzytoskeletts (59).

1.4 Mechanismen der Volumenregulation

Abgesehen von wenigen Ausnahmen ist die Zellmembran aufgrund vorhandener Wasserkanäle für Wasser hochpermeabel. Vor allem ein osmotisches Ungleichgewicht zwischen dem Intrazellulär- und dem Extrazellulärraum zieht eine erhebliche Verschiebung von Wasser nach sich, was mit einer erheblichen Zellschwellung oder Zellschrumpfung einhergehen kann. Es ist deshalb von Nöten, dass Zellen eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung steht, mit denen sie ihr Volumen über die Zellmembran regulieren können.

1.4.1 Regulationsmöglichkeiten der Zelle

Nach der Zugabe von hypertonem Medium mit nachfolgender Schrumpfung der Zelle, können viele Zellen ihr Ausgangsvolumen durch Aktivierung von bestimmten Ionentransportmechanismen wieder erreichen. Die regulatorische Volumenzunahme (regulatory volume increase, **RVI**) beschreibt das Schwellen einer Zelle nach Schrumpfung, während das Schrumpfen einer Zelle nach vorangehendem Schwellen in hypotonem Medium regulatorische Volumenabnahme (regulatory volume decrease, **RVD**) genannt wird. Die meisten Zellen sind in der Lage ihr osmotisches Gleichgewicht innerhalb weniger Minuten wieder herzustellen.

1.4.1.1 Mechanismen der Zellschrumpfung

Die häufigste Gegenmaßnahme der Zelle gegen Zellschwellung besteht in der Aktivierung von K^+ - und Anionenkanälen. Die Anionenkanäle, die durch die Schwellung der Zelle aktiviert werden, erscheinen unselektiv und daher für Cl^- und für HCO_3^- (111), sowie für organische Ionen und neutrale organische Osmolyte durchgängig zu sein (32; 101).

Es wurden bisher einige K^+ -Kanäle gefunden, die für die RVD verantwortlich gemacht werden können. Dazu gehört der Kv1.3 (61), der Kv1.5 (66) und der minK Kanal (29). Die volumenregulierenden Cl^- -Kanäle beinhalten den ClC-2-Kanal (78; 90; 91; 199), BRI-VDAC (60), I_{Cl} (79) und das P-Glycoprotein (164).

Es scheint, dass I_{Cl} und P-Glycoprotein den volumenregulierenden Cl^- -Kanal steuern (164).

Abgesehen von diesen Kanälen ist an der Volumenregulation auch der elektroneutrale KCl-Kotransporter (113; 156) beteiligt. Dieser Transporter scheint vor allem bei einer isotonischen Zellschwellung aktiviert zu werden (69). Andere Zellen wiederum geben KCl durch das gleichzeitige Aktivieren eines H^+/K^+ - und eines Cl^-/HCO_3^- -Austauschers nach extrazellulär ab (21). Erythrozyten aktivieren nach ihrer Schwellung einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und gleichzeitig eine Ca^{2+} -ATPase (153), welche das aufgenommene Ca^{2+} wieder nach extrazellulär transportiert. Zellschwellung kann die Na^+/K^+ -ATPase aktivieren (209) oder inhibieren (224). Die H^+/K^+ -ATPase im Magen wird durch Schwellung der Zellen stimuliert (185).

Es gibt darüber hinaus noch unselektive Kationenkanäle, welche ihrerseits Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (43; 197) und die HCO_3^- Abgabe (68) aktivieren.

1.4.1.2 Mechanismen der Zellschwellung

Die bei vorausgegangener Zellschrumpfung am häufigsten aktivierten Ionentransportmechanismen der Zelle sind der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter (71) und der Na^+/H^+ -Austauscher (74; 207). Da der Na^+/H^+ -Austauscher, die Zelle alkalisiert, wird gleichzeitig der Cl^-/HCO_3^- -Austauscher aktiviert. Von den geklonten NHE Isoformen (97; 217) werden nach vorausgegangener Zellschrumpfung NHE1 (58), NHE2 (97) und NHE4 (23) stimuliert, wohingegen NHE3 (19) inhibiert wird (fehlt gänzlich im Kaninchenepithel). Außerdem scheint der Anionenaustauscher AE2, nicht hingegen AE1 an der RVI beteiligt zu sein (92).

In manchen Zellen wird die Ionenzunahme durch Aktivierung von Na^+ -Kanälen und/oder unselektiven Kationenkanälen (1; 30; 33) vermittelt. Durch den Na^+ Einstrom in die Zelle kommt es anschließend zu einem gleichgerichteten Cl^- Einstrom. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Zellen den Ausstrom von K^+ und Cl^- durch Inhibierung dieser Kanäle (110) unterbinden, und so der Volumenabnahme entgegenwirken (162).

1.4.2 Intrazellulärer Signalweg der Volumenregulation

Zellschwellung und Zellschrumpfung stellen große Anforderungen an die intrazellulären Signalwege. Das Wissen darüber ist noch sehr unvollständig und längst sind noch nicht alle Mechanismen verstanden. Die hier folgende Abhandlung hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie soll lediglich einen orientierenden Überblick geben.

Zellschwellung führt zur Verdünnung, Zellschrumpfung zur Konzentration der intrazellulär gelösten Substanzen. Die Konzentration dieser Substanzen, vor allem der intrazellulären Proteine, beeinflusst wesentlich die Funktion der Zelle (27; 70; 194). Volumenregulatorische Mechanismen können durch Veränderung der Proteinzusammensetzung aktiviert oder inhibiert werden. So wird in Erythrozyten beispielsweise der Na^+/H^+ -Austauscher (45) und der KCl-Symport (131) wesentlich hiervon reguliert.

Volumenänderungen führen ebenfalls zu Veränderung des Zytoskeletts. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Aktinfilamente und Mikrotubuli (47). Beide sind wesentlich an einer Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten beteiligt.

Aber nicht nur das Zytoskelett sondern auch die Zellmembran ist an der Volumenregulation beteiligt. Eine Vielzahl von Transportsystemen wird durch Dehnung der Zellmembran (172) und deren Potentialänderung reguliert. Die Aktivierung von K^+ -Kanälen und ein niederes Anfangsmembranpotential begünstigen eine Hyperpolarisation, hingegen begünstigt eine Aktivierung von Anionen und unselektiven Kationen zusammen mit einem hohen Anfangsmembranpotential eine Depolarisation. Hyperpolarisation oder Depolarisation führen, je nach Zelltyp, zu einer entsprechenden Änderung der Transportsysteme mit nachfolgender Zellschwellung oder Schrumpfung.

Durch Umverteilung der Ionen kann sich der pH_i ändern. Man hat beobachtet, dass Zellschwellung in der Regel zu einer intrazellulären Azidifizierung (118; 210) führt. Dies wird durch den Verlust von HCO_3^- über Anionenkanäle (223), durch Freisetzung von H^+ aus dem intrazellulären Verbund und durch Aktivierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers erklärt (119). Zellschrumpfung führt

dagegen normalerweise zu einer Alkalisierung, einen wesentlichen Beitrag dazu leistet der Na^+/H^+ -Austauscher.

Vielen intrazellulären Ionen kommt eine große Bedeutung bei Kontrolle des Zellvolumens zu. Die wichtigsten davon sind Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} .

Für Ca^{2+} konnte gezeigt werden, dass es K^+ -Kanäle aktiviert. Trotz allem konnte für Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle, welche sich durch Charybdotoxin inhibieren lassen, nicht gezeigt werden, dass sie die ursächlichen Kanäle für die Schwellung in Ehrlich-Zellen sind (94). Auch scheint die Aktivierung von K^+ -Kanälen durch Ca^{2+} nur einen geringen Beitrag zum RVD zu leisten (86). Im Gegensatz zu K^+ -Kanälen, scheinen in den meisten Geweben, volumenregulierende Cl^- -Kanäle unabhängig vom freien Ca^{2+} zu sein (81).

Nach Zellschwellung aktiviert Mg^{2+} den KCl -Kotransporter (RVD) (13), hingegen nach Zellschrumpfung den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (124) und den Na^+/H^+ -Austauscher (154).

Cl^- spielt eine wesentliche Rolle bei der Volumenregulation durch Wasser, nach osmotischer Schwellung bzw. Schrumpfung und bei der Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (87) und des Na^+/H^+ -Austauschers (163).

1.5 Volumenregulation der Parietalzelle

Über die volumenregulatorischen Mechanismen von Zellen gibt es, wie im vorausgegangenen Abschnitt dargelegt, viele Erkenntnisse. Hingegen ist über die Volumenregulation von Parietalzellen noch nicht viel bekannt.

Die apikale Membran von Parietalzellen scheint nur wenig permeabel für Wasser zu sein (159). Hingegen konnte mit Antikörpern der basolateral gelegene Aquaporin-4-Kanal nachgewiesen werden (121; 132). Aquaporin-4 Knock-out Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied zu normalen Mäusen, bei Vergleich der Morphologie, der Säuresekretionsrate und dem pH im Magen (220). Es wurde daraus geschlossen, dass die basolaterale Aufnahme von Wasser über den Aquaporin-4-Kanal nicht wesentlich für die Säuresekretion der Parietalzelle ist. Wie das Wasser schließlich über die apikale Membran kommt, ist derzeit noch nicht bekannt.

Dagegen ist schon lange bekannt, dass die apikale Membran der Parietalzelle Transportsysteme für K^+ , H^+ und Cl^- besitzt (227).

Stimulantien der Säuresekretion wie Forskolin und Carbachol führen zu einer raschen Schrumpfung der Zelle mit anschließender Erholung auf ihr Ausgangsvolumen (RVI) (192).

Barium, ein unspezifischer K^+ -Kanal Inhibitor führt zu einer Zellschwellung. Die Erholung auf den Ausgangswert wird so gedeutet, dass bariumsensitive basolaterale K^+ -Kanäle auch in der ruhenden Zelle offen sind.

Wie im Kapitel der NHE Austauscher Genfamilie beschrieben, spielen diese – auch in den Parietalzellen von Kaninchen – eine wesentliche Rolle bei der Volumenregulation.

Der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter, der durch Bumetanid gehemmt werden kann, scheint dagegen, weder zur Schrumpfung noch zur RVI einen wesentlichen Beitrag zu leisten (10; 192).

1.6 Experimentelles Modell

Seit vielen Jahren werden die regulatorischen Mechanismen im Rahmen der Säuresekretion und der Volumenregulation von Parietalzellen erforscht. Dabei kam eine Vielzahl experimenteller Modelle zur Anwendung. Beschrieben wurden Versuche am Froschmagen (64; 83; 104), an intakter Schleimhaut (102; 147), an enzymatisch isolierten (14; 34; 38; 39; 126; 160) oder handdissezierten Magendrüsen (211), an optisch isolierten Zellen (148), frisch isolierte Zellen (128; 135) und an Membranvesikeln (109).

Chew et al. stellten 1989 ein Modell zur Kultivierung von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen vor (36; 41). Eine Hochdruckperfusion in situ erleichterte es, die Schleimhaut von der Magenwand abzutrennen. Danach wurde sie mechanisch zerkleinert und enzymatisch zu Einzelzellen verdaut. Durch Gegenstromelutriation und eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation konnten die Parietalzellen nun auf 90-95% Reinheit angereichert werden. Die Kultivierung gelang durch Verwendung einer speziellen Matrix (Matrigel[®]), auf dem sich die Zellen anhefteten. Die Zellen konnten bis zu einer Woche in Kultur gehalten werden, reagierten auf histaminerge, cholinerge und gastrinerge Stimulation und enthielten immunoreaktive H^+/K^+ -ATPase (41).

Die Parietalzellkultur eignet sich hervorragend für eine Reihe verschiedener Messtechniken. Beispielsweise kann die sekretorische Aktivität indirekt über die Aufnahme der schwachen Base ^{14}C -Aminopyrin gemessen werden (14; 42). Weiterhin ist auch die konfokale Messung von Volumenänderungen (21; 188) eine gut etablierte Vorgehensweise.

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden der Effekt unterschiedlicher NHE1 und NHE2 Inhibitoren auf die Säuresekretion mit Hilfe der Parietalzellprimärkultur untersucht. Die Parietalzelle ist, wie oben dargelegt, einzigartig in Bezug auf die Fähigkeit, hochkonzentrierte Salzsäure zu sezernieren. Bei diesem Vorgang spielen verschiedene, sowohl apikal als auch basolateral gelegene Transportsysteme eine bedeutende Rolle.

Konkret wurden folgende Fragen untersucht:

- Welchen Akuteffekt haben die verschiedenen NHE1 und NHE2 selektiven Inhibitoren auf die Forskolin-stimulierte Säuresekretionskapazität?
- Welchen Langzeiteffekt haben sie auf die Forskolin-stimulierte Säuresekretionskapazität bei 3 tägiger Kultivierung der Parietalzellen?
- Führen die Inhibitoren bei NHE Langzeithemmung zu einer gesteigerten Parietalzell-Apoptose?
- Haben die NHE Inhibitoren Einfluss auf die Volumenregulation?
- Welche Auswirkung hat die Zugehörigkeit der Hemmstoffe zu verschiedenen Substanzklassen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die folgenden Tabellen enthalten die verwendeten Chemikalien und Geräte, deren im Text verwendeten Abkürzungen und ihre Bezugsquellen. Alle Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

2.1.1 Flüssigchemikalien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
¹⁴ C-Aminopyrin	¹⁴ C-AP	Amersham
Dimethyl-Sulfoxid	DMSO	Sigma
Ethanol 100 %		Apotheke
Ethanol 70 %		Apotheke
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol	Triton X-100	Sigma
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Merck

2.1.2 Festchemikalien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	BSA	Paesel&Lorei
Kalzium-Natrium-EDTA		Sigma
di-Kalium-Hydrogen-Phosphat	K ₂ HPO ₄	Merck
Dithiotreit	DTT	Merck
Epidermaler Wachstumsfaktor	EGF	Sigma
Fötales Kälberserum	FCS	Gibco
Forskolin	F	Sigma
Gentamicin		Sigma
Humanalbumin		Curasan
Hydrocortison		Sigma
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure	HEPES	Sigma
Insulin-Transferrin-Selenit	ITS	Sigma
Kaliumchlorid	KCl	Sigma

MATERIAL UND METHODEN

Kalium-di-Hydrogen-Phosphat	KH_2PO_4	Merck
Kaliumglukonat	K-Glc	Merck
Kalziumgluconat		Sigma
Kalzium-Natrium-EDTA		Sigma
Kollagenase Worthington Typ CLS II		Biochrom
Magnesiumsulfat	MgSO_4	Merck
Mannitol		Sigma
Matrigel [®]		BD
Minimum Essential Medium	MEM	Sigma
Natriumchlorid	NaCl	Sigma
Natriumglukonat	Na-Glc	Merck
Natriumpyruvat		Sigma
Nykodenz [®]		Nykomed
Penicillin/Streptomycin	PenStrep	Sigma
Pronase E		Merck
Ranitidin	R	Sigma
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	STI	Sigma
Terg-A-Zyme		Merck
Tetramethyl-Ammoniumchlorid	TMA-Cl	Sigma
Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan	TRIS	Sigma
Trypsin/EDTA 1x		Gibco

2.1.3 Gase

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
100% Sauerstoff, medizinischer Grad	O ₂	Mast
Carbogen	5%CO ₂ / 95%O ₂	Linde

2.1.4 Fertigarzneimittel

Substanz	Handelsname	Bezugsquelle
5,6 Dihydro-2(2,6 xylidino) 4 H-1,3-Thiazinhydrochlorid 23,32 mg/ml	Rompun	Bayer
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	Atropin	Hameln
Heparin-Natrium 25000 IE/ml	Thrombophob	Nordmark
Ketaminhydrochlorid 50mg/ml	Ketanest	Parke-Davis

2.1.5 Tiere zur Zellpräparation

Zur Herstellung der Parietalzellkultur wurden männliche New-Zealand White Rabbits mit einem Gewicht von ~2,5 kg von der Firma Charles River bezogen.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Typ	Bezugsquelle
Deckgläschen	18x18 mm	Menzel
Deckgläschen	Ø22 mm, rund	Menzel
Einmalspritzen	2,5, 10 und 20 ml	Inject
Kanülen	20 G 1 ¹ / ₂ , 0,9x40 mm	Microlance
Kanülen	20 G 1 ¹ / ₂ , 0,9x70 mm	Terumo
Makroplatten	12 Vertiefungen, Ø35mm	Greiner
Objektträger	76x26 mm	Menzel
Pasteurpipetten	150 und 230 mm	Hirschmann
Petrischalen	Ø 35 mm, Plastik, steril	Greiner
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	5 ml	Roth

Reagenzgläser	Durchsichtig, 12 ml, PS	Greiner
Reaktionsgefäß	1,5 ml, steril	Eppendorf
Skalpell	Nr.21	Feather
Sterilfilter	SP20 plus	Sartorius
Sterilfilter	Minisart NML 165 34K	Sartorius
Zählkammer	MD Kova Raster	Madaus
Zentrifugenröhrchen	50 ml, PP, steril	Falcon

2.1.7 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 500 E/V	H+P Labortechnik GmbH
Digital gesteuerte Pumpe	Digi-Staltic	Cole Parmer Instruments
Elutriationssystem	JE-5.0	Beckmann
Elutriationszentrifuge	J6-MC	Beckmann
Feinwaage	HT 20	Mettler
Handzähler		NeoLab
Laserscanmikroskop	LSM 410 inverted	Zeiss Jena
Scintillation Counter	1219 Rackbeta	LKB Wallac
Magnetrührer	Combimag RCO	IKA
Mikroskop	PIM No. 35234	WPI Inc
Mikroskop	Diaphot	Nikon
Osmometer	Osmomat 010	Gonotec
pH-Meter	pH91, pH96	WTW
Pumpe	Vario-Pumpensystem	Ismatec Sa
Rollenpumpen		Masterflex
Sterilbank		Heraeus
Zellcounter	CASY [®] 1	Schärfe Systems
Zentrifuge	Megafuge	Heraeus
Zentrifuge	Laborzentrifuge	Hettich

2.1.8 Stammlösungen

Um die Herstellung der Präparations- und Messpuffer zu rationalisieren, wurden insgesamt zwei Stammlösungen verwendet:

- Stammlösung mit den Puffersubstanzen 14 mM HEPES und 7mM TRIS und den beiden Kaliumphosphatsalzen (3 mM KH_2PO_4 und 2 mM K_2HPO_4), pH_i
- Stammlösung mit 1,2 mM Kalziumglukonat und 1,2 mM Magnesiumsulfat, Cl^-/B

Diese beiden Stammlösungen wurden 1:10 verdünnt verwendet.

2.2 Zellpräparation

Die Parietalzellkultivierung erfolgte nach der von Chew, Ljungstrom, Smolka und Brown beschriebenen Methode (36; 41).

2.2.1 Vorbereitung

2.2.1.1 Herstellung der Puffer

Für eine Zellpräparation wurden 3 l Perfusionspuffer und 3 l Präparationspuffer verwendet. Beide Puffer wurden bei Raumtemperatur mit 1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt und vor Verwendung mindestens 30 Minuten lang mit O₂ begast.

Perfusionspuffer

120 mM	NaCl
12 mM	HEPES
8 mM	TRIS

Präparationspuffer

120 mM	NaCl
14 mM	HEPES
7 mM	TRIS
3 mM	K ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
1,2 mM	Ca-Glukonat
1,2 mM	MgSO ₄
20 mM	Glucose

Elutriationspuffer

Für die Herstellung des Elutriationspuffers wurden 2,5 l des Präparationspuffers mit 1 g/l BSA und 0,5 mM DTT versetzt und danach erneut mit 1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

2.2.1.2 Herstellung der Nykodenz[®]-Gradienten

<u>Herstellung der Nykodenz[®]-Lösung</u>		<u>Herstellung der Verdünnungslösung</u>	
H ₂ O		H ₂ O	
Nykodenz (27,6%)	138 g/500 ml	NaCl (0,75%)	3,75 g/500 ml
TRIS	5 mM	TRIS	5 mM
KCl	3 mM	KCl	3 mM
CaNa ₂ EDTA	0,3 mM	CaNa ₂ EDTA	0,3 mM
MgSO ₄	1,2 mM	MgSO ₄	1,2 mM
DTT	0,5 mM	DTT	0,5 mM
BSA	10 g/500 ml	BSA	10 g/500 ml

Für die Gradientenherstellung wurden 500 ml Nykodenz[®]-Lösung und 500 ml Verdünnungslösung hergestellt. Die Nykodenz[®]-Lösung wurde mit 0,1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, wobei etwa 20 ml benötigt wurden. Höher konzentrierte TRIS-Lösungen sollten nicht verwendet werden, da sie zu einer falschen Enddichte führen. Die Verdünnungslösung wurde mit 1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Für eine Gradientenherstellung wurden die gleichen Mengen an Nykodenz[®]-Lösung und Verdünnungslösung benötigt.

Herstellung der drei Verdünnungen	Dichte (g/cm ³ , 25°C)
2:1-Lösung (2 Teile Nykodenz [®] -Lösung, 1 Teil Verdünnungs-Lösung)	1,098
1:1-Lösung (1 Teil Nykodenz [®] -Lösung, 1 Teil Verdünnungs-Lösung)	1,075
1:2-Lösung (1 Teil Nykodenz [®] -Lösung, 2 Teile Verdünnungs-Lösung)	1,050

Die verschiedenen Verdünnungslösungen wurden anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0,2 µm filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

Für eine Präparation wurden in sechs sterilen Reagenzgläsern unter der Sterilbank jeweils 2 ml 2:1, 3 ml 1:1 und 2 ml 1:2 Lösung vorsichtig übereinander geschichtet. Die fertig geschichteten Gradienten wurden bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.3 *Matrigel[®]*

Für die Herstellung der Matrigel[®]-Lösung, welche tiefgefroren bei -18°C gelagert werden muss, wurden 10 ml Matrigel[®] im Kühlschrank aufgetaut. Das aufgetaute Matrigel[®] wurde, auf Eis, unter der Sterilbank mit 60 ml eiskaltem, sterilem Wasser 1:7 verdünnt, anschließend gemischt und in kleine Portionen bei -18°C eingefroren.

2.2.1.4 *Kulturschälchen*

35 mm Kulturschälchen wurden gemeinsam mit einem runden 22 mm Deckglas sterilisiert. Die Matrigel[®]-Lösung wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Auf die Deckgläschen wurden in der Sterilbank jeweils 50 µM der 1:7 verdünnten Matrigel[®]-Lösung möglichst großflächig aufgetragen. Der Matrigel[®]-Fleck auf den Deckgläschen trocknete vor Gebrauch der Kulturschälchen, bei halbgeöffnetem Deckel, unter der Sterilbank ein. Für die ¹⁴C-Aminopyrin Aufnahme Versuche wurden Kulturplatten mit 12 Vertiefungen (12 Wells) ohne Deckglas mit einem Matrigel[®]-Fleck versehen.

2.2.1.5 *Medium*

Für die Herstellung des Grundmediums wurde bicarbonatfreies DMEM/HAM F-12 1:1 Medium aus Pulver angerührt. Der pH wurde bei 37°C mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde dann durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert, mit 0,5 Vol.% 20%igem Humanalbumin versetzt und im Kühlschrank gelagert.

Herstellung der Supplementlösungen

- EGF:** 100 µg EGF wurden in 2 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 µl Portionen bei -20°C eingefroren
- Hydrocortison** 1 mg Hydrocortison wurde in 27.6 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert, in 1 ml-Portionen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.
- ITS:** Insulin, 25 mg Transferrin und 25 µg Selenit wurde in 5 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 µl Portionen bei -20°C eingefroren.
- Novobiocin:** 100 mg wurden abgewogen, in 2 ml Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 µl Portionen bei -20°C eingefroren.
- Penicillin/
Streptomycin:** 100 ml wurden in 1 ml Portionen bei -20°C eingefroren.

Herstellung des Komplettmediums

Zur Herstellung des Komplettmediums wurde am Kulturtag zu 100 ml Grundmedium folgendes hinzugegeben:

100 µl	EGF-Lösung
100 µl	Gentamycin-Lösung
10 µl	Hydrocortison-Lösung
100 µl	ITS-Lösung
100 µl	Novobiocin-Lösung
1 ml	Penicillin/Streptomycin

2.2.1.6 Elutriatorpflege

Unmittelbar vor der Elutriation wurde der Elutriator montiert und der Rotor und das Schlauchsystem mit 6% H₂O₂ über eine halbe Stunde desinfiziert. Anschließend wurde mit 1 l Millipore-Wasser gespült. Die tatsächliche Flussrate der Masterflex-Rollenpumpe beim Fluss durch den laufenden Elutriator wurde bei 100 ml/min mittels eines Standzylinders kontrolliert und die Pumpe gegebenenfalls abgeglichen.

Nach Gebrauch wurde der Elutriator inklusive des Schlauchsystems kurz mit Millipore-Wasser gespült und dann mit hitzeaktiviertem Terg-A-Zyme gefüllt und eine halbe Stunde gereinigt. Danach wurde erneut mit Millipore-Wasser und anschließend mit 70%igem Ethanol gespült. Anschließend wurde der Elutriator entleert und demontiert.

2.2.2 Operation des Kaninchens

Für die Versuche wurden männliche New Zealand White Rabbits (2,5 -3,5 kg) von der Firma Charles River bezogen. Die Kaninchen wurden im Tierstall mit einem 12 stündigen Tag/Nacht-Rhythmus, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Am Tag der Operation erhielten sie als Prämedikation eine intramuskuläre Injektion mit einer Kombination aus 0,5 mg Atropin, 1,5 ml Ketamin und 1,1 ml Rompun. Nachdem eine ausreichende Sedierung eingetreten war, wurde eine Ohrvene kanüliert. Es erfolgte die i.v. Injektion von 10000 IE Heparin-Na, um bei der späteren in-situ-Perfusion eine Thrombembolie der Magengefäße mit daraus folgender ungenügender Perfusion vorzubeugen. Dann wurde mittels i.v.-Applikation einer größeren, verdünnten Menge der oben genannten Kombination, eine ausreichend tiefe Narkose erzeugt. Während der Operation wurde mit dem Kornealreflex die Narkosetiefe beobachtet, und bei Bedarf die Narkose vertieft.

Das Abdomen wurde von Processus xiphoideus bis zum Skrotum in der Mittellinie eröffnet und der gesamte Dick- und Dünndarm nach rechts aus dem Abdomen verlagert. Anschließend wurde die Aorta kaudal der Nierenarterien über eine Strecke von etwa 2 cm aus dem Retroperitoneum freipräpariert. Nach

Beendigung der Präparation wurde das Tier durch eine Überdosis der beschriebenen Narkotikakombination getötet. Die Aorta wurde distal ligiert. Unmittelbar proximal der distalen Ligatur wurde über eine kleine Inzision eine 14G Verweilkanüle eingelegt und durch eine Ligatur fixiert. Der gesamte Darm inklusive des Mesenteriums wurde abgebunden und der kraniale Abfluss der Perfusionslösung supradiaphragmal – durch eine Klemme über Aorta thoracalis und Vena cava inferior – verhindert. Mit dieser Anordnung wurden nun der Magen, die Milz und die Leber unter möglichst hohem Druck mit etwa 2 l Perfusionspuffer perfundiert, wobei ein Abblassen der Magenschleimhaut und der übrigen perfundierten Organe zu erkennen war. Anschließend wurde die Leber mehrfach eingeschnitten, um Blutreste aus dem Gefäßsystem auszuspülen. Omentum majus und Omentum minus wurden vom Magen getrennt und der Magen an Ösophagus und Pylorus abgesetzt.

Nach Eröffnung des Magens entlang der großen Kurvatur wurde die Mukosa zunächst unter fließendem Wasser grob von Schleim und Futterresten gereinigt und anschließend mit Kompressen und Puffer vollkommen gesäubert. Die Magenschleimhaut wurde daraufhin stumpf von der darunterliegenden Lamina muscularis mucosae abgeschabt, mit zwei Skalpellern zerkleinert und in 50 ml DMEM/HAM-F12 aufgenommen.

2.2.3 Zelltrennung

2.2.3.1 Enzymatische Verdauung

Nach der Präparation ließ man die Schleimhautstücke absinken, und verwarf den überstehenden Puffer, so dass circa 20 ml Puffer und die Schleimhautstücke blieben. Diese wurden erneut mit frischem, vorgewärmtem DMEM/HAM-F12 auf 50 ml aufgefüllt und 50 mg BSA und 25 mg Pronase zugegeben. Anschließend wurde das Material in ein doppelwandiges, auf 37°C beheiztes Inkubationsgefäß umgefüllt, und der pH-Wert unter ständiger Begasung mit O₂ unter ständigem Rühren mit 1 M TRIS-Lösung, bzw. 1 M HEPES auf pH 7,4 eingestellt. Dieser erste enzymatische Verdauungsschritt dauerte 20 Minuten. Während dieser Zeit erfolgten ständige pH-Kontrollen.

Nach 20 Minuten wurde mit Präparationspuffer auf 200 ml aufgefüllt, in vier Fraktionen aufgeteilt und danach bei 173 g (1000 rpm) 5 Minuten zentrifugiert. Im zweiten Verdauungsschritt wurden die Schleimhautstücke in 50 ml DMEM/HAM-F12 suspendiert und zusammen mit 7300 Units Kollagenase und 20 mg STI in das Inkubationsgefäß gegeben. Auch dieser Verdauungsschritt erfolgte unter Konstanthaltung des pH-Wertes auf 7,4 und unter ständiger Begasung mit O₂. Die Verdauung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle bis zum weitgehenden Zerfall zu Einzelzellen, was zwischen 8 und 12 Minuten in Anspruch nahm. Die Zellsuspension wurde rasch durch ein grobes Sieb und durch ein Sieb mit einer Porengröße 40 µm gegeben. Zur Verminderung der Enzymaktivität wurde die Suspension mit Präparationspuffer auf 200 ml aufgefüllt, in 4 Fraktionen aufgeteilt und erneut bei 173g (1000 rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Die Fraktionen wurden nachfolgend jeweils in 50 ml Elutriationspuffer mit zusätzlich 1% BSA resuspendiert.

2.2.3.2 Zelltrennung durch Gegenstromzentrifugation

Durch den Elutriationsvorgang werden Zellen nach Größe und Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt. Die Gegenstromelutriation erfolgte bei einer konstanten Rotorgeschwindigkeit von 1780 rpm. Vorbereitend wurden das gesamte Schlauchsystem, sowie die Kammer mit Elutriationspuffer gefüllt und entlüftet. Wenn der Rotor die Zielgeschwindigkeit erreicht hatte, wurden der Druck im System und das Fördervolumen der Pumpe bei verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten überprüft. Die Zellen wurden in 5 ml Präparationspuffer mit 1g/100 ml BSA resuspendiert. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 20 ml/min wurden die Zellen in die im Rotor befindliche Kammer gespült und ordneten sich dort entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit und je nach Puffergegenstrom an. Bei konstanter Flussrate stand die durch Zentrifugalkraft bedingte Sedimentation der Zellen mit dem Puffergegenstrom im Gleichgewicht. Wurde die Pumpengeschwindigkeit erhöht, so wurden unterschiedliche Zellfraktionen, hauptsächlich in der Reihenfolge ihrer Größe, aus der Kammer elutriert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden für jede Fraktion durchgeführt. Kleinere Zellen wie Schleimzellen und Bakterien wurden von den Parietalzellen durch

Abnahme einer 50 ml Fraktion bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 ml/min und einer 100 ml Fraktion bei 35 ml/min getrennt. Danach wurden die Parietalzellen bei 70 ml/min in zwei sterile Falcon-Röhrchen (2x50 ml) abgenommen. Der Rotor wurde gestoppt, um größere Zellkonglomerate am Boden der Kammer zu entfernen, und nachfolgend wieder gestartet. Währenddessen wurde die nächste Zellfraktion, wie oben beschrieben für die Elutriation vorbereitet.

2.2.3.3 *Nykodenz[®]-Zentrifugation*

Da ab diesem Punkt eine gewisse Abtrennung der vorher vorhandenen Mikroorganismen angenommen wurde, erfolgten alle nun folgende Schritte unter der Sterilbank und in steriler Arbeitsweise, um einer Kontamination entgegenzuwirken.

Die durch die Elutriation gewonnenen Zellsuspensionen wurden bei 600 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend in 30 ml Elutriationspuffer mit 1 g/100 ml BSA suspendiert und langsam – jeweils 5 ml – mit einer sterilen 10 ml Pipette auf die vorbereiteten Nykodenz[®]-Gradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 835g (entspricht bei der o.g. Laborzentrifuge 2200 rpm) über 8 Minuten. Der Rotor wurde ungebremst zum Stillstand gebracht, um eine Vermischung der Banden durch zu abruptes Abbremsen zu verhindern. Von den drei Hauptbanden, die sich nach der Zentrifugation abgrenzen ließen, besteht die oberste Bande hauptsächlich aus Schleimzellen und Zelldetritus und die mittlere Bande aus Parietalzellen. Diese Bande wurde mittels einer Spritze mit einer aufgesetzten 0,4 mm Kanüle abgesaugt und zusammen mit Komplettmedium auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Komplettmedium, welchem Amphotericin B zugesetzt war, 20 min in einer mit Fötalem Kälber Serum beschichteten Gewebekulturflasche im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min wurde zur Abschätzung der Gesamtzellzahl eine Zählkammer beschickt und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 600 rpm über 5min.

2.2.4 Zellzählung

Da die Aussaat zu vieler oder zu weniger Zellen das Kulturergebnis ungünstig beeinflusst, wurde die Zellzahl bei jeder Präparation mit einer Zählkammer ermittelt. Unter der Kenntnis des Volumens über einem Eckquadrat der Zählkammer, wurde nun, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Gesamtzellzahl für die aktuelle Präparation ermittelt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand der Formel: gezählte Zellen x 33,3.

2.2.5 Beurteilung der Reinheit der einzelnen Zellfraktionen

Bei jeder Präparation erfolgte eine lichtmikroskopisch orientierende Beurteilung der Reinheit der Parietalzellfraktion. Mikroskopische Kontrollen erfolgten während des Verbaus, beim Auszählen, nach dem Bestücken der Kulturschälchen und jeden Tag nach der Präparation. Um eine ausreichend stabile Kultur zu gewährleisten wurde darauf geachtet, dass die Parietalzellfraktion überwiegend aus Parietalzellen bestand und keine Bakterien vorhanden waren.

2.2.6 Kultivierung

Die vorbereiteten Kulturschälchen (12 wells) wurden mit 1 ml Komplettmedium/well bestückt. Es erwies sich als günstig, in jedes Kulturschälchen $2.5 \cdot 10^6$ – $3 \cdot 10^6$ Zellen in 50 μ l Medium zu setzen. Die Zellen wurden in der errechneten Mediumsmenge suspendiert und wölkchenförmig, über dem aufgebracht Matrigel[®] (15 μ l/well) auf den Deckgläsern und in den Kulturschälchen aufgebracht. Den Zellen wurden 30 Minuten Zeit gelassen um abzusinken und auf dem Matrigel[®] festzuwachsen. Danach wurden die Kulturschälchen vorsichtig von der Sterilbank in den Brutschrank gehoben. Die Kultivierung erfolgte in befeuchteter Raumluft-Atmosphäre mit leichtem Überdruck bei 37°C.

2.2.7 Mediumwechsel

Das Medium wurde jeden Tag erneuert. Hierzu wurden die Kulturschälchen leicht geneigt, gleichzeitig der Deckel abgenommen, und das alte Medium mit

einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Nachfolgend wurde 1 ml frisches Komplettmedium in die Schälchen pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Tropfen nicht direkt auf den Parietalzelleck fielen. Über die gesamte Kulturdauer hin wurden lichtmikroskopische Kontrollen hinsichtlich Zellzahl, Überwucherung mit Fibroblasten und Kontamination mit Mikroorganismen vorgenommen. Starkes Wachstum von Bakterien und Pilzen wurde durch Verfärbung des pH-Indikators im Medium und Trübwerden des Mediums sichtbar.

2.3 Verwendete Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien

Die folgenden Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, für alle Versuche in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt und bei Bedarf nur noch verdünnt.

2.3.1 Lösungen

Alle verwendeten Messpuffer enthielten die folgenden Substanzen:

14 mM	HEPES
7 mM	TRIS
3 mM	K ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
1,2 mM	Ca ²⁺ -Glukonat
1,2 mM	MgSO ₄

Zum Anrühren der Messlösungen wurden zwei 10 fach konzentrierte Stammlösungen verwendet, von denen die eine HEPES/TRIS und die Kaliumphosphatsalze, die andere das Kalziumglukonat und das Magnesiumsulfat enthielten (siehe oben).

Zusätzlich enthielten die entsprechenden Lösungen:

NaCl Puffer (HEPES Puffer, STH)

120 mM	NaCl
20 mM	Glucose

NaCl Puffer mit 5% CO₂/HCO₃⁻

100 mM	NaCl
20 mM	NaHCO ₃ ⁻
20 mM	Glucose

Alle Lösungen wurden immer entsprechend ihrer Pufferung nach dem Anrühren mit O₂ bzw. CO₂ begast und auf 37°C erwärmt. Der pH wurde auf den physiologischen Wert 7,4 eingestellt und die Osmolarität geprüft (Zielwert: 290-310 mOsm).

2.3.2 Stimulantien und Inhibitoren

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Form von Stammlösungen, 1000:1 bezogen auf die Endkonzentration, angerührt und sofern möglich, bei -18°C gelagert. Ansonsten erfolgte die Zubereitung der Suspension unmittelbar vor Versuchsbeginn.

Substanz	Messkonzentrationen (M)	Lösungsmittel
EMD 87580	1·10 ⁻⁴ -1·10 ⁻⁸	H ₂ O
EMD 96785	1·10 ⁻⁵ -1·10 ⁻⁹	H ₂ O
EMD 125021	1·10 ⁻⁶ -1·10 ⁻¹⁰	H ₂ O
EMD 392426	1·10 ⁻⁶ -1·10 ⁻¹⁰	H ₂ O
EMD 434350	1·10 ⁻⁶ -1·10 ⁻¹⁰	H ₂ O
Forskolin	1·10 ⁻⁵	DMSO
Omeprazol	1·10 ⁻⁵	H ₂ O
Ranitidin	1·10 ⁻⁴	H ₂ O

Chemische Namen und Strukturformeln der Inhibitoren

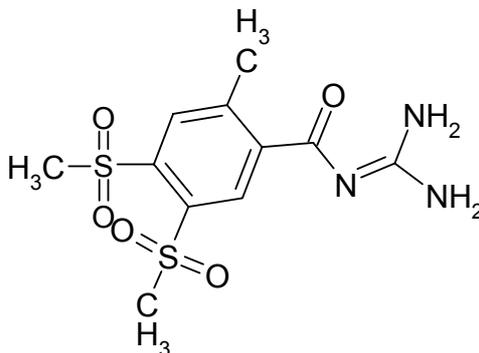
Die angegebenen Namen, Strukturformeln und IC₅₀-Werte sind den Datenblättern von Merck entnommen. Die IC₅₀-Werte für EMD 434350 stammen von Lorrain et al. (120).

EMD 87580:

N-(4,5-Bis-methansulfonyl-2-methyl-benzoyl)-guanidin

NHE1 IC₅₀: 113 nM

NHE2 IC₅₀: 5,8 µM

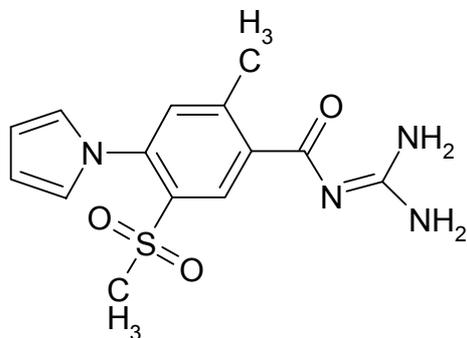


EMD 96785 (*Eniporid*):

(2-Methyl-5-(methylsulfonyl-4-pyrrolobenzoyl)-guanidin

NHE1 IC₅₀: 9 nM

NHE2 IC₅₀: 300 nM

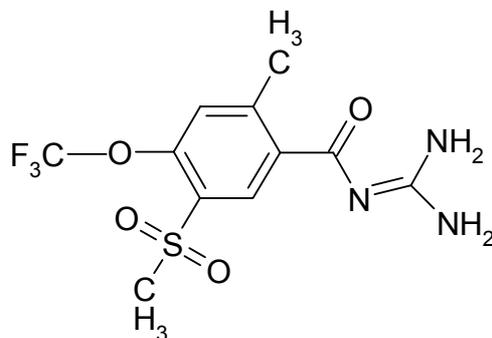


EMD 125021:

(2-Methyl-5-(methylsulfonyl)-4-trifluoromethoxybenzoyl)-guanidin

NHE1 IC₅₀: 6 nM

NHE2 IC₅₀: 122 nM

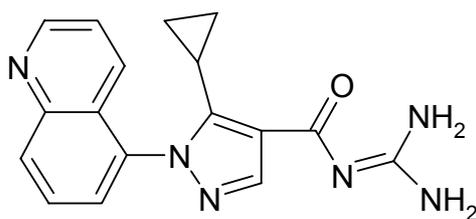


EMD 392426 (*Zoniporid*):

N-[1-(5-Cyclopropyl-1-quinolon-5-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-methanoyl]-guanidin

NHE1 IC₅₀: 7,5 nM

NHE2 IC₅₀: 770 nM



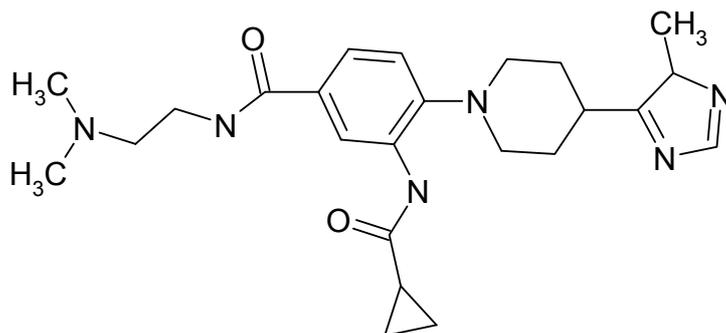
MATERIAL UND METHODEN

EMD 434350 (SL 59.1227):

3-[(1-Cyclopropyl-methanoyl)-amino]-N-(2-dimethylamino-ethyl)-4-[4-[5-methyl-1H-imidazol-4-yl]-piperidin-1-yl]-benzamidin

NHE1 IC₅₀: 3,3 nM

NHE2 IC₅₀: 2,3 μM



2.4 Messung der Säuresekretion

Beim Versuch der direkten Messung der Säuresekretion in kultivierten Parietalzellen stößt man auf das Problem, dass die Zellen keine Monolayer ausbilden und es somit nicht möglich ist, basolaterale und apikale Transportaktivitäten zu trennen. Zudem geht man davon aus, dass die Zellen wohl wegen des fehlenden Kontakts zu Nachbarzellen, ihre apikale Membran internalisieren, und deswegen die produzierte Säure in intrazellulären Vakuolen angesammelt wird. Da ohnehin pro apikal sezerniertem HCl Molekül basolateral ein HCO_3^- abgegeben würde, käme es nicht zu einer Azidifizierung des Mediums, die als Maß für die Säuresekretion dienen könnte.

Berglinde et al. gelang es eine indirekte Methode zu entwickeln, die gute Ergebnisse liefert (16). Sie beruht darauf, dass ^{14}C -Aminopyrin, eine schwache Base mit einem pK von 5, nach Zugabe zum Medium in die Zellen diffundiert, jedoch nach Protonierung nicht in der Lage ist, die sauren Kompartimente zu verlassen. Somit kann die intrazelluläre Akkumulation von radioaktiv markiertem ^{14}C -Aminopyrin nach Absaugen des Mediums und Lysieren der Zellen mit einem β -Counter gemessen werden. Dabei ist die Anzahl der protonierten ^{14}C -Atome ein Maß für die Säuresekretion.

Es wurden mindestens 4 Schälchen pro Präparation, die zufällig ausgewählt wurden, gleich behandelt. Die Anzahl n in den Ergebnissen entspricht der Anzahl der Präparationen. Dies bedeutet, dass der Mittelwert einer bestimmten Konzentration (z.B. $n=4$) aus mindestens 16 Einzelwerten besteht.

2.4.1 Verwendete Lösungen und Stimulantien

Das für die ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme verwendete Grundmedium enthielt:

120 mM	NaCl
14 mM	HEPES
7 mM	TRIS
3 mM	KH_2PO_4
2 mM	K_2HPO_4
1,2 mM	MgSO_4
1,2 mM	Ca-Gluconat
20 mM	Glucose
1 mM	Na-Pyruvat
10 mg/l	Phenolrot

Zum Medium wurde am Versuchstag 2 g/l BSA zugegeben. Ein Teil des entstandenen Komplettmediums wurde mit 1,85 kBq ^{14}C -Aminopyrin/ml Medium versetzt (NRM).

Alle Inhibitoren und Stimulantien wurden so hergestellt, dass sie bei Anwendung 1:100 zu verdünnen waren.

2.4.2 Versuchsablauf

Für die ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme wurden Parietalzellen verwendet, die in Makroplatten mit 12 Vertiefungen ohne Deckgläschen auf Matrigel[®] kultiviert wurden.

2.4.2.1 Präinkubation

Das Medium wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, die Kulturen zweimal mit je 1 ml Komplettmedium gewaschen und pro Well 1 ml Medium zugesetzt. Den entsprechenden Kulturschälchen wurde Omeprazol bzw. Ranitidin hinzugefügt. Die Makroplatten wurden für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Das Medium wurde erneut abgesaugt und diesmal durch ^{14}C -Aminopyrin-haltiges Komplettmedium ersetzt. In die entsprechenden Schälchen

wurde erneut Omeprazol bzw. Ranitidin in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

2.4.2.2 *Stimulation*

Nach 5 Minuten erfolgte die Stimulation von Forskolin. Für die Zeit der Stimulation – 45 Minuten – wurden die Kulturen erneut in den Brutschrank gestellt.

2.4.2.3 *Lyse der Zellen und Radioaktivitätsmessung*

Das ^{14}C -Aminopyrin-haltige Komplettmedium wurde abgesaugt und in einem Radioaktivbehälter gesammelt. Die Schälchen wurden zweimal mit Medium gewaschen und anschließend leer gelassen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 3%igem Triton X-100/ 1% SDS – jeweils 550 μl pro Schälchen – eine Stunde lang lysiert und dabei kontinuierlich geschüttelt. Danach wurde aus jedem Schälchen 500 μl Flüssigkeit entnommen und in ein Szintillations-Röhrchen – mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit – pipettiert. Die Röhrchen wurden gut geschüttelt und in einem β -Counter gemessen.

2.4.2.4 *^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme in frisch isolierten Zellen*

Für die Experimente mit frisch isolierten Zellen wurde die nach der Isolierung gewonnene Zellsuspension auf Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellen wurden 2x mit einer Tischzentrifuge pelletiert und in NRM aufgenommen, beim zweiten Mal unter Zugabe von Ranitidin und Omeprazol in die entsprechenden Reaktionsgefäße. Nach 30 min Inkubation auf dem Rotationsschüttler bei 37°C wurden die entsprechenden Hemmstoffe, nach weiteren 5 min die Stimulantien zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei 37°C erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und anschließend die getrennte Radioaktivitätsmessung von Überstand und lysiertem Pellet im β -Counter.

2.5 Zellzählung

Bei diesem Versuchsaufbau wurden Makrotestplatten (12 well) benutzt, in deren 12 Vertiefungen jeweils 300.000 Zellen ausgesät wurden. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt und den entsprechenden Schälchen die jeweilige Testsubstanz zugegeben. Bei jedem Versuch wurden Kontrollen und behandelte Schälchen zufällig ausgewählt und mindestens 5 Schälchen gleich behandelt. Die Zellen wurden, an Tag 3 der Kultur, wie im Folgenden beschrieben abgelöst und gezählt:

1. Absaugen des Mediums aus jedem well
2. 2x Waschen jedes well mit 1 ml PBS
3. Inkubation mit 0,5 ml Trypsin-EDTA/well für 5 min im Inkubator bei 37° C
4. Lichtmikroskopische Kontrolle der Ablösung, bei Bedarf Klopfen der Platte gegen die Handkante
5. Zugabe von 1,5 ml PBS mit 10% FCS zur Abstopfung der Reaktion
6. sorgfältiges Resuspendieren der Zellen
7. weiteres Verdünnen der Suspension mit CASYTON zum Erreichen einer Zellkonzentration die im linearen Messbereich des Zellcounters liegt (im Fall der Parietalzellen 1:20)
8. Bestimmung der Zellzahl mit Zellcounter CASY[®]1 (Version 2.01; Schärfe Systems) in 3-fach Messungen pro Messröhrchen (d.h. pro well); daraus Berechnung des Mittelwerts
9. insgesamt wurde von mindestens 5 wells auf diese Weise der Mittelwert gebildet
10. bei der Zellzählung erfolgte eine ausschließliche Berücksichtigung von Zellen mit einem Durchmesser zwischen 12,97 und 40 µm, hierbei werden Parietalzellen berücksichtigt, jedoch Zelldebris und größere Zellaggregate aus der Zählung eliminiert.

Das Parietalzellmodell bietet die Möglichkeit, spezielle Fragestellungen gesondert zu betrachten. Es bestehen hinsichtlich der Ergebnisse einige Besonderheiten die erwähnt werden müssen, um entstehende Fragen zu minimieren. Da es sich bei der Parietalzellkultur um eine Primärkultur handelt, können Einflussfaktoren wie Dauer der enzymatischen Verdauung, Dauer der Präparation bis zum Aussähen der Zellen und tierindividuelle Unterschiede zu sehr differierenden Ergebnissen zwischen den Versuchen führen. So fanden auch Chew et al. eine Anheftungsrate der Parietalzellen zwischen 30 und 60% der ursprünglich kultivierten Menge (41). Deshalb werden die jeweiligen Versuche eines Tages miteinander verglichen, da somit diese Einflussfaktoren minimiert werden konnten.

2.6 Messung des Zellvolumens und der Volumenänderung

2.6.1 Färbung

Die Färbungs- und Waschschriffe erfolgten in CO₂ gepufferter Lösung. Das Medium wurde aus dem ausgewählten Kulturschälchen abgesaugt und durch 1 ml Puffer ersetzt. Nun wurde 1 µl der 3 mM Calcein/AM Stammlösung dazu pipettiert und mit einer 1000 µl Pipette gut durchmischt. Danach wurde das Kulturschälchen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min wurde das Calcein-haltige Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 ml Standard CO₂-Lösung gewaschen und erneut für 30 Minuten inkubiert. Dieser Waschschriff wurde ins Protokoll aufgenommen, weil er sich positiv auf die Stabilität des Anfangsvolumens auswirkt.

2.6.2 Messung

2.6.2.1 Messkammer

Die Messvorrichtung bestand aus einer selbstgefertigten, kreisrunden Kammer mit einer Öffnung in der Mitte, einem Bohrloch unten innen für den Zulauf- und einem Bohrloch innen oben für den Ablauf des Puffers. Dies stellte das eigentliche Perfusionssystem dar. Der Durchmesser der Kammer betrug 30 mm, die Höhe 8 mm. In der Mitte befand sich eine zentrale Bohrung – ein Schlitzloch – mit einem Durchmesser von 4x8 mm.

2.6.2.2 *Montage der Messkammer*

Das Deckgläschen wurde mit Hilfe einer Kanüle sorgfältig aus dem Kulturschälchen gehoben und auf der Rückseite sowie am Rand mit einem fusselfreien Tuch von Puffer gereinigt. Nun wurde die Kammer am Rand mit Silikon-Fett bestrichen und das Deckgläschen vorsichtig von unten dagegen gepresst, so dass keine Luftbläschen mehr zwischen Kammer und Deckgläschen zu sehen waren. Nach Anbringen des Deckgläschens an die Messkammer wurde die Messvorrichtung auf dem Stativ eines invertierten Laserscanmikroskops, Modell LSM 410 inverted (Carl-Zeiss, Oberkochen, Deutschland) befestigt. Es wurden dann die Zu- und Ablaufverbindungen angeschlossen, und mit der konstanten Perfusion – 5 ml/min – begonnen. Das 40 fach Objektiv (40x/1.3 NA, Wasser) wurde gewählt, und die Lichtquelle in die optimale Position gebracht. Die Temperatur aller Lösungen wurden sowohl in den Vorratsgefäßen, als auch auf dem Weg zur Messkammer und in der Kammer selbst auf 37°C konstant gehalten um das Messergebnis nicht durch Temperatursprünge zu verfälschen (129). Die vorgewärmten und ständig begasten Lösungen wurden mit einem Umschalter, der den raschen Pufferwechsel ohne Unterbrechung des Flusses ermöglichte, an die Kammer angeschlossen.

2.6.2.3 *Auswahl der zu messenden Zellen*

Es wurde eine Gruppe von 2-3 Zellen lichtmikroskopisch ausgewählt, um die Zellen möglichst groß auf dem Bildschirm darzustellen und um die intrazellulären Strukturen besser voneinander abgrenzen zu können. Es wurde darauf geachtet, dass es sich mikromorphologisch um Parietalzellen handelte, und dass die Zellen calceinbeladen waren. Dann wurde der Lichtweg vom Okular des Mikroskops auf den Photomultiplier umgeschaltet.

2.6.2.4 *Messung des Fluoreszenzsignals*

Die Zellen wurden mit dem Licht eines Argon Lasers der Wellenlänge 488 nm exzitert. Das von einer einzelnen ausgewählten Zellgruppe emittierte Licht wurde nach Durchlaufen eines Filters (Carl Zeiss, LP 515), was zu einer 1000 fachen Abschwächung führte, und einem Pinhole von 20 (Größe des

Laserdurchtritts) von einem Photomultiplier aufgenommen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde wiederholt gemessen und für vernachlässigbar befunden.

Es wurden Abtastungen in der z-Achse (orthogonal zum Deckglas), mit einer Schichtdicke von 1 μm durch die Mitte der 2-3 ausgewählten Parietalzellen durchgeführt. Gemessen wurde dabei, die Calcein-Konzentrationsänderung über die Zeit. Es wurde später aus einer Abnahme der Calcein-Konzentration bei konstanter Fläche auf eine Zellvolumenzunahme (Schwellung) und aus einer Zunahme der Calcein-Konzentration bei konstanter Fläche auf eine Zellvolumenabnahme (Schrumpfung), geschlossen.

Die Zellen wurden jeweils 8 Sekunden abgetastet. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Abtastungen betrug 2 Sekunden. Insgesamt wurden 120 Bildern gemacht. Die entstehenden Bilder wurden auf einem Datenträger gesichert. Mit Hilfe einer geeigneten Software wurde die Calcein-Konzentrationsänderung graphisch ausgewertet und linear dargestellt.

2.7 Auswertung der Messdaten und Statistik

2.7.1 Verarbeitung der Rohdaten des Laserscanmikroskops

Die Bilder, die das Laserscanmikroskop über die Zeit im Photomultiplier gewann, wurden im TIF-Format auf einem mobilen Datenträger gespeichert und mit Hilfe der Software Scion Image Beta 4.02 Win (Maryland, U.S.A.) in die Calcein-Konzentration in Prozent (ausgehend von 100%) umgerechnet. Es wurden dabei mehrere intrazelluläre Volumenanteile ausgewählt, statistisch gemittelt, und die Dichte der Calcein-Konzentration über die Zeit graphisch dargestellt. Dabei galt die Änderung der Calcein-Konzentration über die Zeit als Änderung des Zellvolumens. Relative Zunahme der intrazytoplasmatischen Calcein-Konzentration entspricht dabei einer Zellschrumpfung, relative Abnahme einer Zellschwellung.

2.7.2 Weiterbearbeitung und Zusammenfassung der Messdaten

Die mit der Scion Image Software gewonnenen Daten der Volumenmessungen, wurden mit Hilfe von selbstgefertigten Makros in Microsoft[®] Excel[®] (Microsoft[®]

Corporation) importiert und dort graphisch weiterverarbeitet. Daraufhin wurden jeweils die Versuche einer Gruppe interpoliert, um ein gleichförmiges Zeitprotokoll zu erhalten, und mit Angabe von Mittelwert und Standardfehler graphisch dargestellt.

Um dem Problem des Photobleachings bei den Volumenmessungen beizukommen, wurde am Anfang jedes Messtages und zwischen den Versuchen immer wieder eine Bleachkurve, das heißt der Verlauf der Calceinkonzentrations-Änderung über die Zeit ohne äußere Eingriffe aufgenommen, gemittelt, und jeweils von den Daten aus den Versuchen die am gleichen Versuchstag gewonnen wurden, subtrahiert. Es zeigte sich, dass das Photobleaching bei einem Zeitraum von 20 Minuten im Bereich von $20\pm 7\%$ lag. Dies konnte auch als ein Maß für die Reinheit der Zellen betrachtet werden, da kontaminierte Zellen eine deutlich erhöhtes Photobleaching, womöglich aufgrund einer für das Calcein permeablen Zellmembran zeigten und somit zum Abbruch des Versuches führten.

2.7.3 Calceinkonzentrations-Änderung

Die Kurvensteigung wurde im linearen Bereich der Kurve über eine Zeitdauer zwischen 60 und 120 s bestimmt und mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet.

2.7.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung kam der Student's t-Test zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $p=0,05$ gewählt. Die Anzahl n wurde als Anzahl der Versuche je Gruppe definiert. Sie betrug bei allen Versuchen 3-7. Die Werte in den Diagrammen sind immer \pm SEM ausgedrückt, eventuelle Änderungen sind der Legende zu entnehmen.

3 Ergebnisse

Es wird zunächst auf die Technik der Parietalzellkultivierung und die daraus resultierenden Ergebnisse näher eingegangen. Es folgen dann die Ergebnisse aus Messung der Säuresekretion bei Akut- und Langzeithemmung mit unterschiedlichen Hemmstoffen, Einfluss der Hemmstoffe auf die Zellzahl bei Langzeitkultivierung und die Volumenregulation.

3.1 Parietalzellkultur

3.1.1 Parietalzellisolierung

Mittels Gegenstromzentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation gelang es, die in der durch enzymatischen Verdau erhaltenen Mukosazellsuspension enthaltenen Parietalzellen auf $95\pm 3\%$ anzureichern. Es zeigte sich, dass die Reinheit der Kultur von der genauen Durchführung dieser Schritte abhängig war.

3.1.1.1 Enzymatische Verdauung

Um einen größtmöglichen Reinheitsgrad der Parietalzellen zu erreichen waren auch die anfänglichen Schritte der Zellisolierung von erheblicher Bedeutung. Obwohl das Zeitprotokoll für die Pronaseverdauung konstant gehalten wurde, lieferte die gewonnene Mukosazellsuspension, nicht jedes Mal die gleiche Anzahl an Drüsenschläuchen. Dieses war vermutlich auf die Variabilität der Zellen und die Güte der Präparation zurückzuführen. Deswegen war vor allem die sich anschließende Kollagenaseverdauung von immenser Wichtigkeit für die Reinheit der entstehenden Parietalzellkultur. Als Endpunkt der Kollagenaseverdauung wurde der weitgehende Zerfall der Drüsenschläuche zu Einzelzellen angesehen. Da dieser Zerfall nicht homogen und momentan erfolgte, spielte es eine große Rolle, ob noch mehr Drüsenschläuche oder schon hauptsächlich Einzelzellen vorhanden waren. Kürzere Verdauungszeiten führten zu Zellkonglomeraten in der Elutriationskammer und somit zu einer schlechteren Ausbeute. Zu lange Verdauung führte zu einer schlechteren Anheftung in den Kulturschälchen. Daher wurde es für höchst wichtig befunden,

den Verdauungszustand fortlaufend mikroskopisch zu kontrollieren und die Verdauung zum richtigen Zeitpunkt durch Verdünnung mit Präparationspuffer und nachfolgendes zentrifugieren abzubereiten.

3.1.1.2 Gegenstromzentrifugation

Was die Elutriation betraf, so stellte sich heraus, dass eine zu lange Elutriation zu einer deutlich gesteigerten Konglomeratneigung führte. Theoretisch sollte sich eine längere Elutriation positiv auf die Zellreinheit auswirken, praktisch zeigte sich jedoch erstens eine schwächere Ausbeute an Parietalzellen und zweitens paradoxerweise eine herabgesetzte Auftrennung durch entstehende Schleimzellquartette, die auch durch den folgenden Nycodenz[®]-Schritt nicht abzutrennen waren.

3.1.1.3 Dichtegradientenzentrifugation

Es zeigte sich, dass ein sorgfältiges Auflegen der Gradienten von großer Bedeutung für die Abgrenzbarkeit der Banden und somit auch für die Entnahme der Parietalzellen war. Unscharfe Banden führten zu einer verminderten Anreicherung und Reinheit der Parietalzellkultur.

3.1.2 Parietalzellkultur

Das Zellkulturmodell, an dem die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, beinhaltete die Kultivierung von terminal differenzierten Zellen. Die Absterberate betrug annähernd 10% pro Tag. Anfänglich war mit Problemen wie geringer Anheftung, Überwucherung der Kultur mit Fibroblasten oder Kontamination mit Mikroorganismen zu kämpfen. Dies machte eine ständige Optimierung der Kultivierungsmethode erforderlich. Was die Anheftung anging, so war die Reinheit der Parietalzellen ein maßgeblicher Faktor, und jegliche Art kontaminierender Zellen führte zu einer schlechteren Anheftung. Die darauf folgenden Versuche waren insofern beeinträchtigt, als dass keine in Gruppen beieinander liegenden, eindeutig identifizierbaren Parietalzellen mehr zu finden waren. Es wurde deswegen größter Wert auf eine saubere Trennung gelegt.

Die Kontamination mit Mikroorganismen ist bei der Kultivierung von Magenzellen schon deshalb ein wichtiger Aspekt, weil sich im Magen der Kaninchen außerordentlich viele Bakterien und Pilze befinden, zumal die Tiere Koprophagen sind. Insofern war der erste Schritt zur Freihaltung der Kultur von Mikroorganismen die äußerst sorgfältige Säuberung des Magens nach Entnahme. Bei allen folgenden Schritten wurde stets auf sauberes Arbeiten geachtet. Der Arbeitsschritt, ab dem der Trennungsvorgang als steril betrachtet wurde, war die Stapelung der elutrierten, in frischem hochkonzentriertem BSA-Puffer resuspendierten Parietalzellen auf die steril filtrierten Nykodenz[®]-Gradienten. Zusätzlich ins Protokoll aufgenommene Zentrifugations- und Resuspensionsschritte trugen merklich zur Keimreduktion bei. Initial wurde dem Kulturmedium eine Dreierkombination an Antibiotika nämlich Gentamicin, Novobiocin und Penicillin/Streptomycin zugesetzt, was die Infektionsrate ebenfalls verringerte.

3.1.3 Validierung der Kultur

Um die Kultur zu validieren wurde die Fähigkeit zur Säuresekretion nach Stimulation durch verschiedene Agonisten als Parameter der Kulturgüte herangezogen. Dabei zeigte sich eine aufgehobene Stimulierbarkeit bei Überwucherung mit Mikroorganismen. Es wurden an jedem Tag der Datenerhebungen Kontrollen zur Validierung gemessen und mit anderen Versuchstagen verglichen. Aufgrund der traumatisierenden Folgen der Präparation, wie Andau der Membranproteine, wurde darauf geachtet, dass zwischen Präparation und Datenerhebung mindesten 24 Stunden lagen um selektiv mit denjenigen Zellen arbeiten zu können, die diese Zeit vital in Kultur blieben.

3.2 Messung der Säuresekretion in stimulierten Parietalzellen

3.2.1 Bedeutung der Stimulierbarkeit der Säuresekretion

Die Säuresekretion stellt eine wichtige physiologische Funktion der Parietalzellen dar. Von größtem Interesse ist, dass die in Kultur genommenen Parietalzellen diese Fähigkeit initial besitzen und auch über Tage hinweg beibehalten.

3.2.2 Kontrollgruppen

Als Kontrollen wurden zwei Gruppen von Parietalzellkulturen verwendet. In einer wurde die sekretorische Aktivität der Parietalzellen vollständig durch Inkubation mit Omeprazol blockiert, um Messaktivität durch an der Matrix haftendes, unvollständig ausgewaschenes ^{14}C -Aminopyrin zu quantifizieren. Die andere Gruppe wurde mit Ranitidin behandelt, um die Wirkung von endogen sezerniertem Histamin zu blockieren. Im Unterschied zur Omeprazol-Gruppe ist hier die H^+/K^+ -ATPase aktiv und die entsprechend behandelten Zellen zeigen eine basale Säuresekretion, auf welche die nach Stimulation erhaltenen Werte bezogen wurden (Abb. 5).

3.2.3 Stimulation mit Forskolin

Zur Stimulation wurde Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, verwendet. Von allen Gruppen wurde nun der durch Inkubation mit Omeprazol erhaltene Wert subtrahiert. Die Steigerung der Säuresekretion durch Stimulation wurde relativ zur Ranitidin-Kontrolle ausgedrückt. In Abb. 4 ist die relative ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme bei Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin dargestellt. Bei der Stimulation mit Forskolin lies sich die Säuresekretion 4,5 fach stimulieren. Der Unterschied der ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahmewerte zwischen Zellen die mit Ranitidin behandelt wurden bzw. Zellen die überhaupt nicht behandelt wurden, war nicht signifikant, was auf keine nennenswerte Kontamination der Kultur mit histaminfreisetzenden Zellen hinweist.

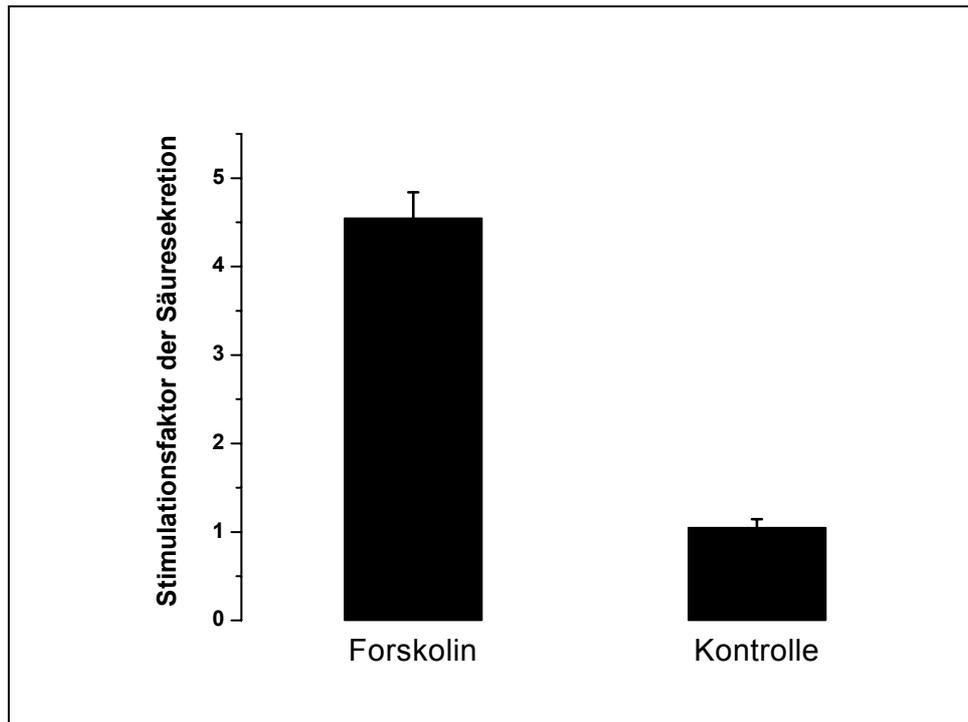


Abb. 4: Quantifizierung der Säuresekretion mittels ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme. Die Säuresekretion wird relativ zur Ranitidin-Kontrolle ausgedrückt; links nach Forskolin-Stimulation; rechts, Säuresekretion von nicht stimulierten Parietalzellen im Verhältnis zur Ranitidin-Kontrolle (jeweils $n=8$).

3.2.4 Einfluss der NHE Inhibitoren auf frisch isolierte und kultivierte Parietalzellen

Zu Beginn wurde der Effekt der NHE Inhibitoren in frisch isolierten und kultivierten Parietalzellen untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die Hemmstoffe für die Zeit der Forskolin-Stimulation (frisch isoliert 60 min, kultiviert 45 min) zugesetzt. Frisch isolierte Parietalzellen zeigen im Vergleich zu kultivierten Parietalzellen eine 4x stärkere Stimulierbarkeit, es fand sich eine ~17 fache Stimulation. Der Effekt von EMD 87580, 96785 und 125021 wurde in jeweils 5 Konzentrationen (zwei Logstufen unter und über der aus den Datenblättern von Merck entnommenen IC_{50}) auf die Forskolin-stimulierte Säureproduktion in frisch isolierten Parietalzellen untersucht. Es zeigte sich, dass kein Inhibitor die Forskolin-stimulierte Säuresekretion signifikant hemmen konnte (Abb. 6-8).

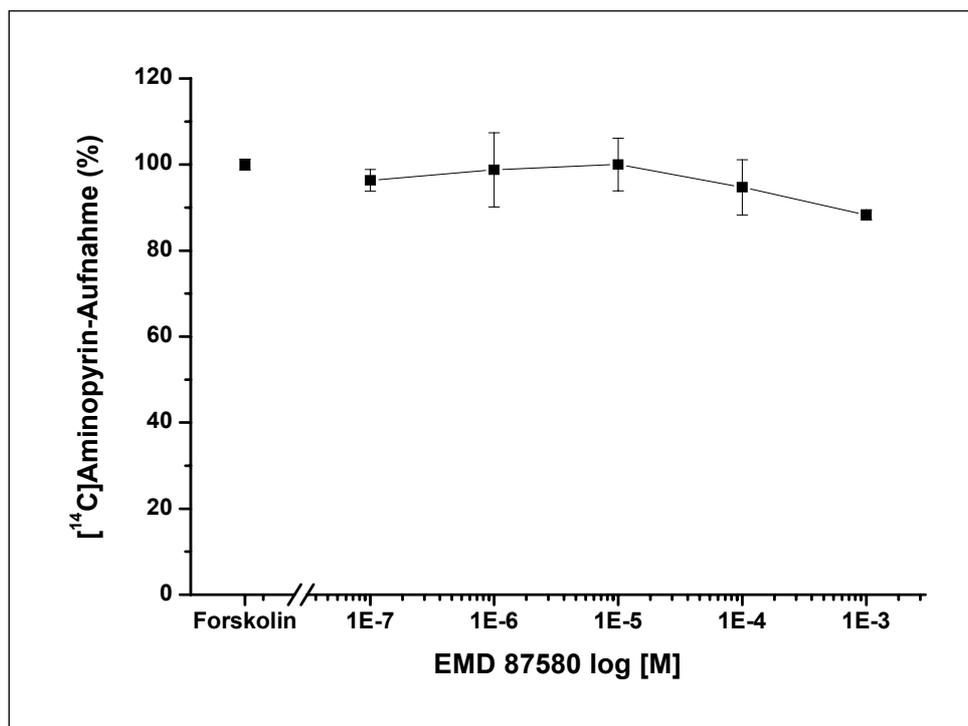


Abb. 5: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation in frisch isolierten Parietalzellen bei Hemmung mit EMD 87580 (n=3).

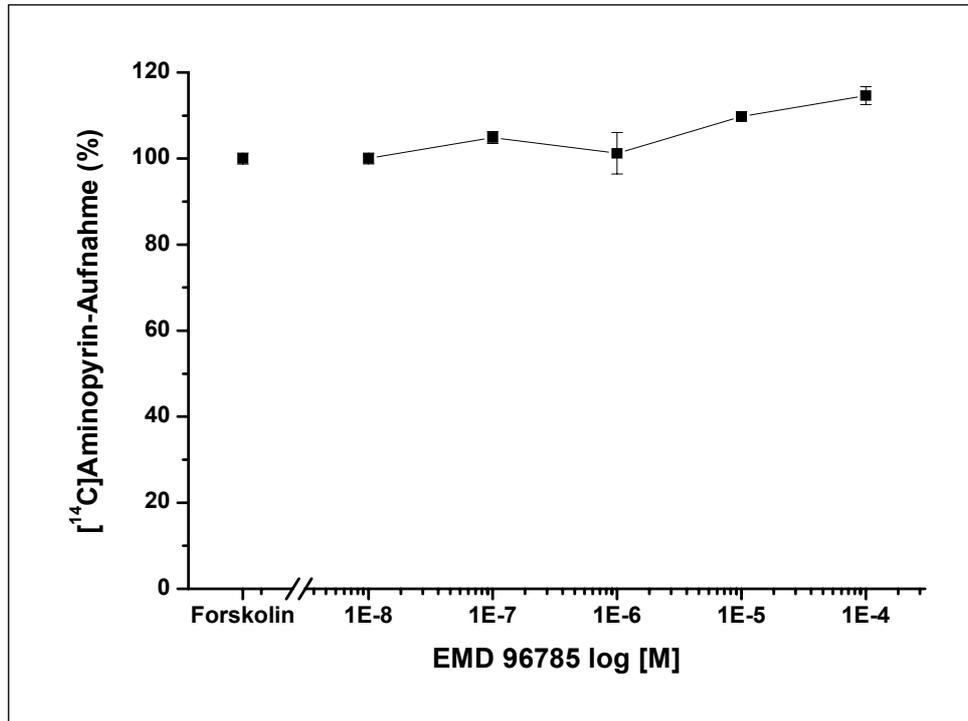


Abb. 6: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation in frisch isolierten Parietalzellen bei Hemmung mit EMD 96785 (n=3).

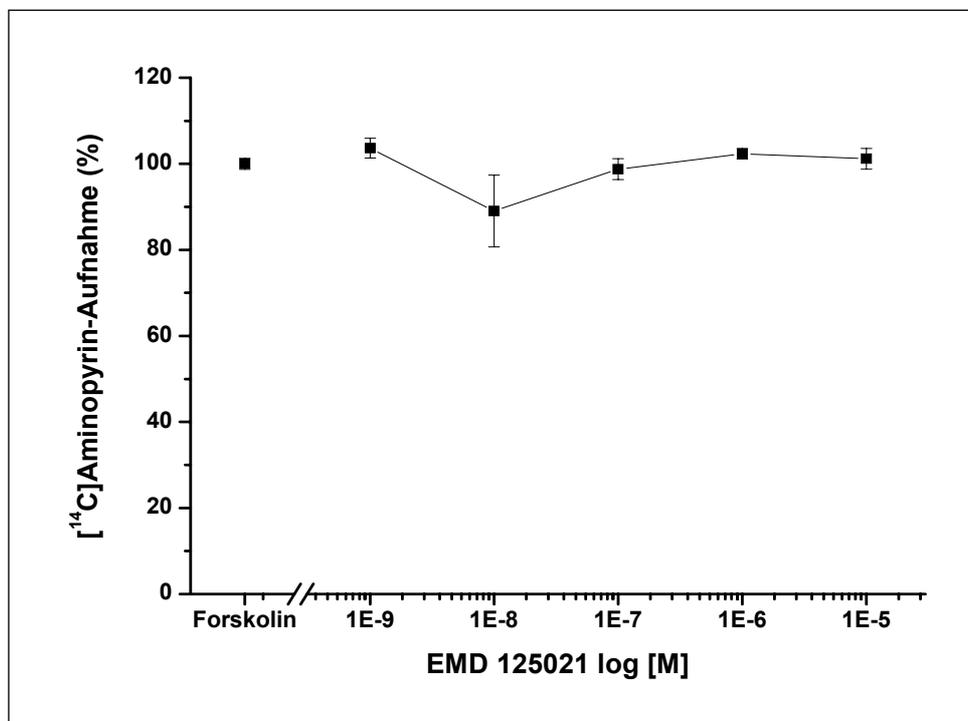


Abb. 7: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation in frisch isolierten Parietalzellen bei Hemmung mit EMD 125021 (n=3).

In kultivierten Parietalzellen wurde in 5 Konzentrationen der Effekt von EMD 87580 und 125021 auf die Forskolin-stimulierte Säuresekretion untersucht. Hier zeigten die beiden verwendeten Hemmstoffe keinen signifikanten Einfluss auf die Säuresekretion (Abb. 9 und 10).

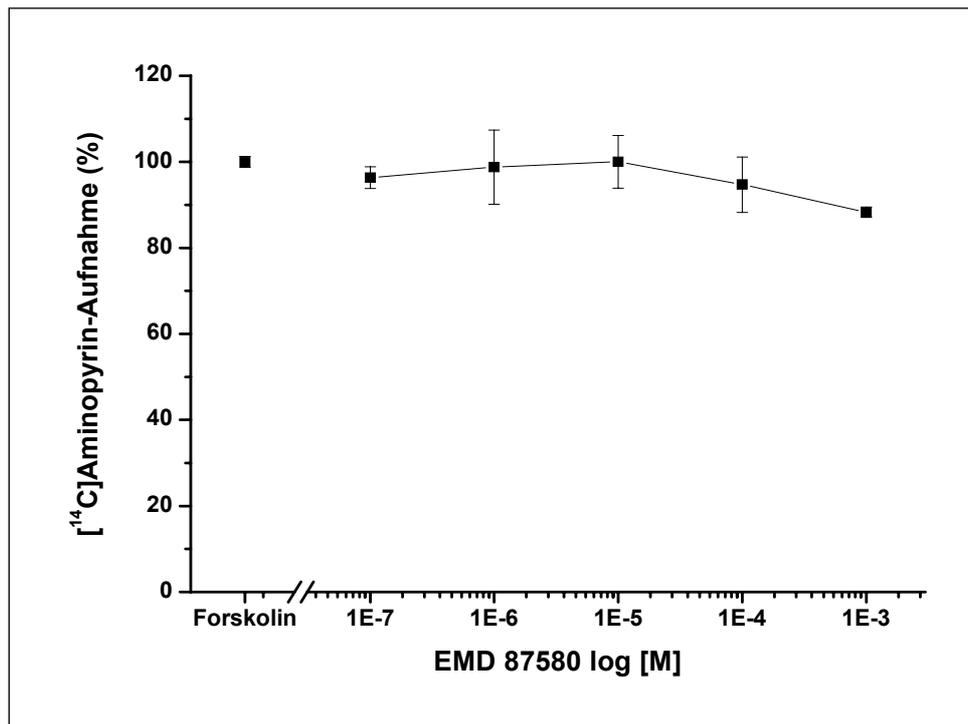


Abb. 8: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation in kultivierten Parietalzellen bei Hemmung mit EMD 87580 (n=3).

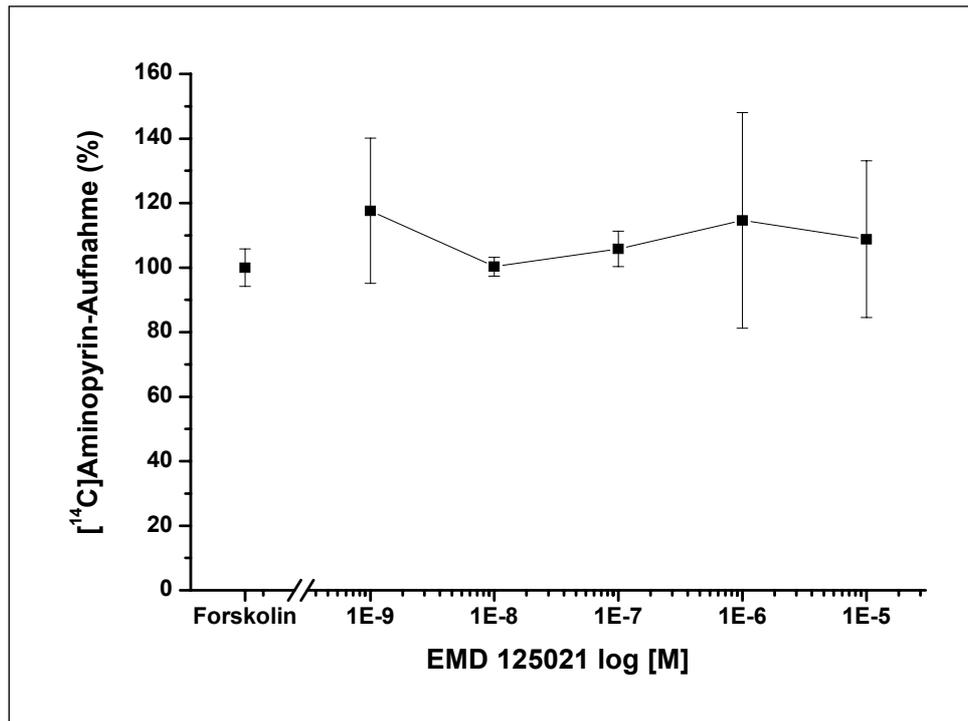


Abb. 9: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation in kultivierten Parietalzellen bei Hemmung mit EMD 125021 (n=3).

3.2.5 Langzeiteffekte der NHE Inhibitoren auf die Säuresekretion

Um die konzentrationsspezifische Wirkstärke der NHE Inhibitoren auf die Säuresekretion bei Langzeitinkubation zu untersuchen, wurden die Zellen über 3 Tage kultiviert und den an Tag 1 randomisiert ausgewählten Schälchen jeden Tag der entsprechende Inhibitor in der dafür vorgesehenen Konzentration zugesetzt. An Tag 3, dem Tag der ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme, wurde für die Zeit der Forskolin-Stimulation (45 min) keine der entsprechenden Substanzen zugesetzt. Alle NHE Inhibitoren wurden jeweils in 5 Konzentrationen (zwei Logstufen unter und über der aus den Datenblättern von Merck entnommenen IC₅₀, welche an Fibroblasten, Thrombozyten und Kaninchenerythrozyten ermittelt wurden) untersucht, bzw. wurden im Fall von EMD 434350 (SL 59.1227) auch die Konzentrationen von Lorrain et al. (120) berücksichtigt. Die jeweiligen IC₅₀-Werte sind den Diagrammen zu entnehmen.

Bei Konzentrationen, die niedriger waren als die aus den Datenblättern entnommenen IC₅₀-Werte für NHE1 (siehe Diagramme), zeigt keine Substanz eine Hemmwirkung auf die Säuresekretion. Die Säuresekretion konnte 10⁻⁵ M EMD 96785, auf 42% des Kontrollwertes, am stärksten reduzieren. Bei allen anderen Hemmstoffen lag die maximale Hemmung der Säuresekretion zwischen 63% und 73%. Bei einer Konzentration von 1 µM zeigen EMD 96785 56%, 125021 65% und 392426 64% eine ähnliche Hemmung der Säuresekretion. Die Konzentration von 100 nM zeigte nur bei vier der untersuchten Substanzen noch eine signifikante Hemmung der Säuresekretion (EMD 96785 55%, 125021 70%, 392426 75% und 434350 72%). Die niedrigste wirksame Konzentration war bei 10 nM EMD 96785. Hier war die Hemmung der Säuresekretion auf 77% reduziert. Die einzige Substanz, welche die Forskolin-induzierte Säuresekretion deutlich unter dem IC₅₀-Wert für NHE2 hemmen konnte, war EMD 434350 (IC₅₀ NHE1: 3,3 nM, IC₅₀ NHE2: 2,3 µM; signifikante Säuresekretionshemmung: 0,1 und 1 µM). Dieser Befund legt nahe, dass chronische NHE1-Blockade die Säuresekretion hemmt. Ferner kann man annehmen, dass für alle eingesetzten Substanzen die Konzentrationen zur effektiven NHE1-Hemmung etwas höher liegen als die in den Datenblättern von

Merck angegebenen IC_{50} -Werte für NHE1 (zur Diskussion der Ursache siehe Seite 81).

Wie die Hemmung der Säuresekretion für die einzelne Substanz aussieht, ist im Folgenden dargestellt (Abb. 10-14).

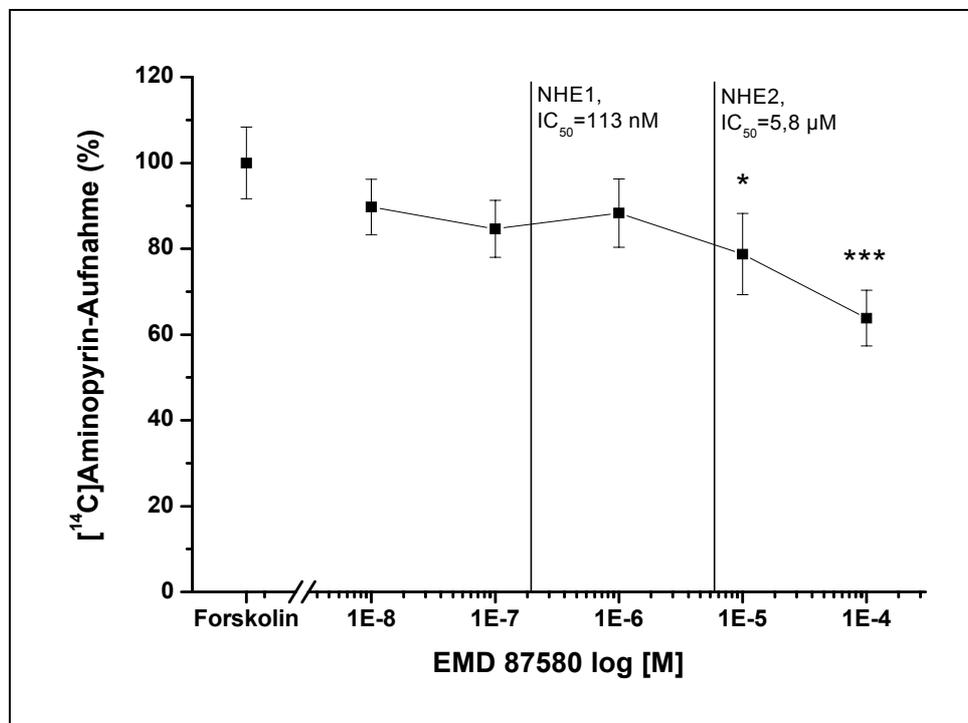


Abb. 10: Relative ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation und 3 tägiger Hemmung mit EMD 87580 (n=4).

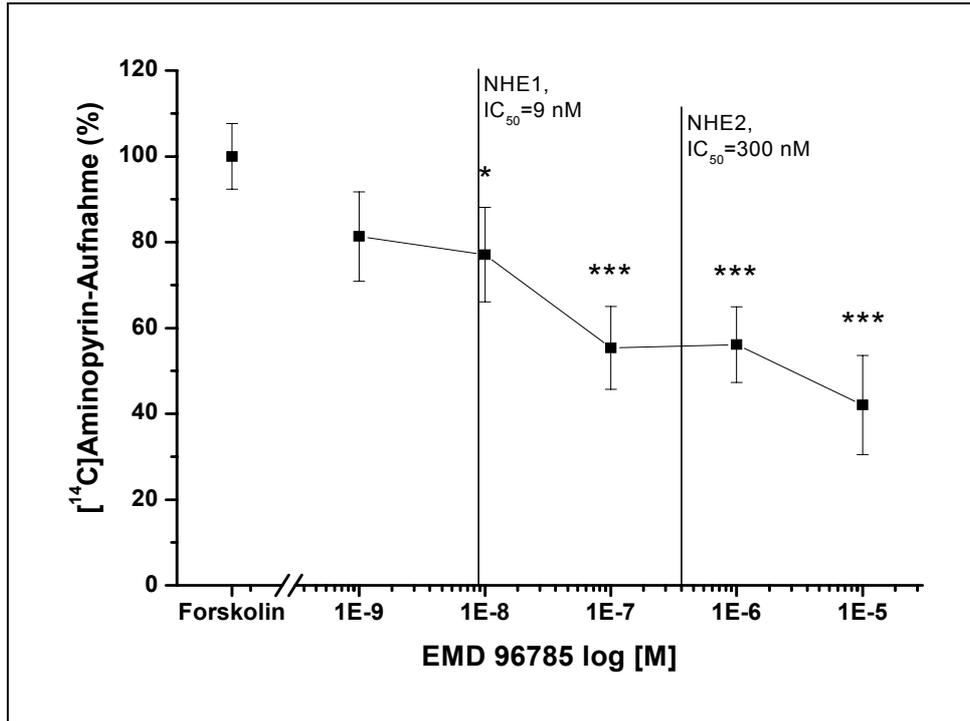


Abb. 11: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation und 3 tager Hemmung mit EMD 96785 (n=6).

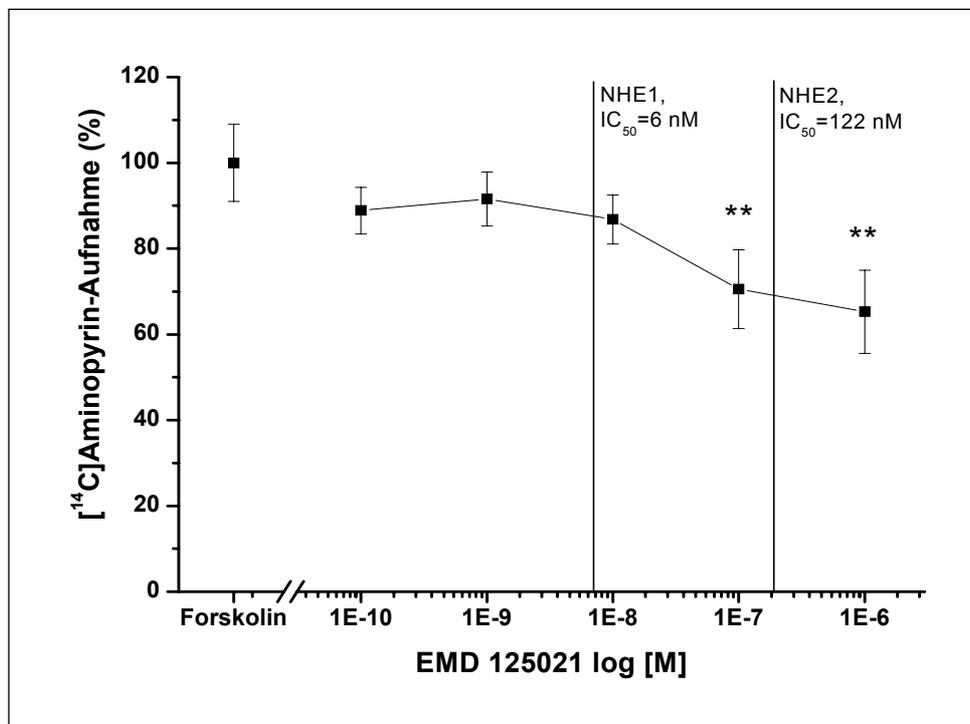


Abb. 12: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation und 3 tager Hemmung mit EMD 125021 (n=3).

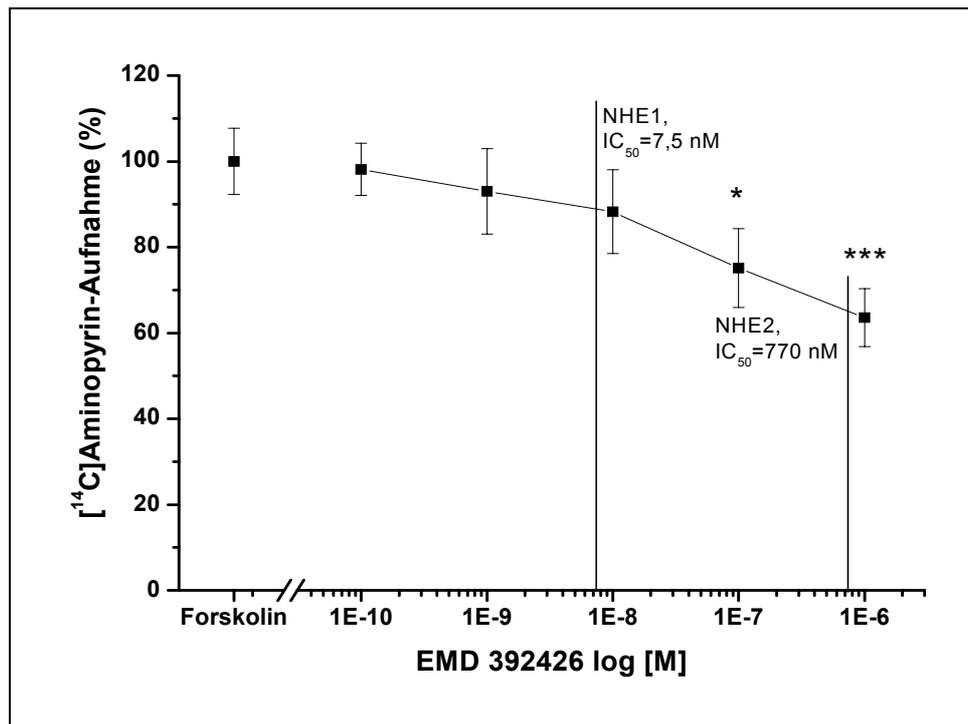


Abb. 13: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation und 3 tägiger Hemmung mit EMD 392426 (n=3).

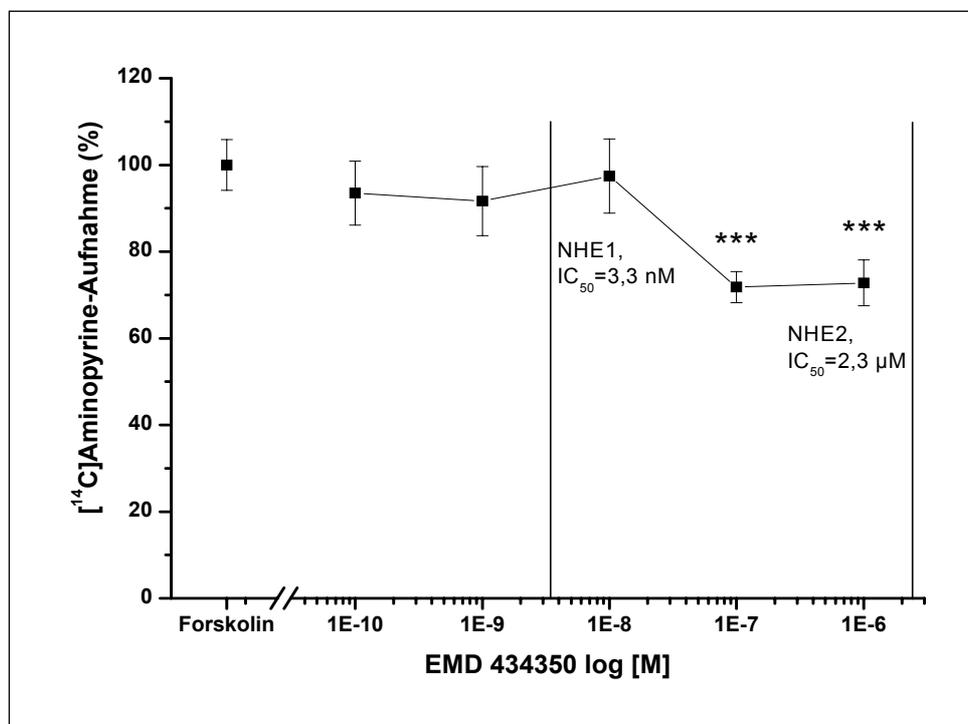


Abb. 14: Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme nach Forskolin-Stimulation und 3 tägiger Hemmung mit EMD 434350 (n=3).

ERGEBNISSE

Bei allen verwendeten Substanzen kann eine konzentrationsabhängige Hemmung der Säuresekretion der Parietalzellen beobachtet werden. Für alle untersuchten Substanzen war für die NHE1 Hemmung immer eine etwas höhere Konzentration notwendig, als aus den Datenblättern zu entnehmen war. Die stärkste Hemmung der Säuresekretion wird durch Eniporid verursacht.

3.3 Untersuchung der Zellzahl an Tag 3 der Parietalzellprimärkultur

3.3.1 Konzentration der NHE Inhibitoren

Um das Überleben der Zellen bei kontinuierlicher Hemmung der NHE Isoformen zu untersuchen, wurden die Inhibitoren in der höchsten bei der ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme verwendeten Konzentration den Kulturschälchen zugesetzt. Die ermittelte Zellzahl an Tag 3 wird im Vergleich zur Kontrolle ausgedrückt. Bei allen verwendeten Substanzen zeigte sich in den Einzelversuchen keine signifikante Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15). Das hier durchgeführte Experiment konnte auch zeigen, dass die mit steigender Konzentration gefundene Hemmung der ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme an Tag 3, nicht durch eine Abnahme der Zellzahl, d.h. durch Zytotoxizität zu erklären ist.

Verwendete Konzentrationen der Hemmsubstanzen:

Substanz	Konzentration
EMD 87580	10 ⁻⁴ M
EMD 96785 (Eniporid)	10 ⁻⁵ M
EMD 125021	10 ⁻⁶ M
EMD 392426 (Zoniporid)	10 ⁻⁶ M
EMD 434350 (SL 59.1227)	10 ⁻⁶ M

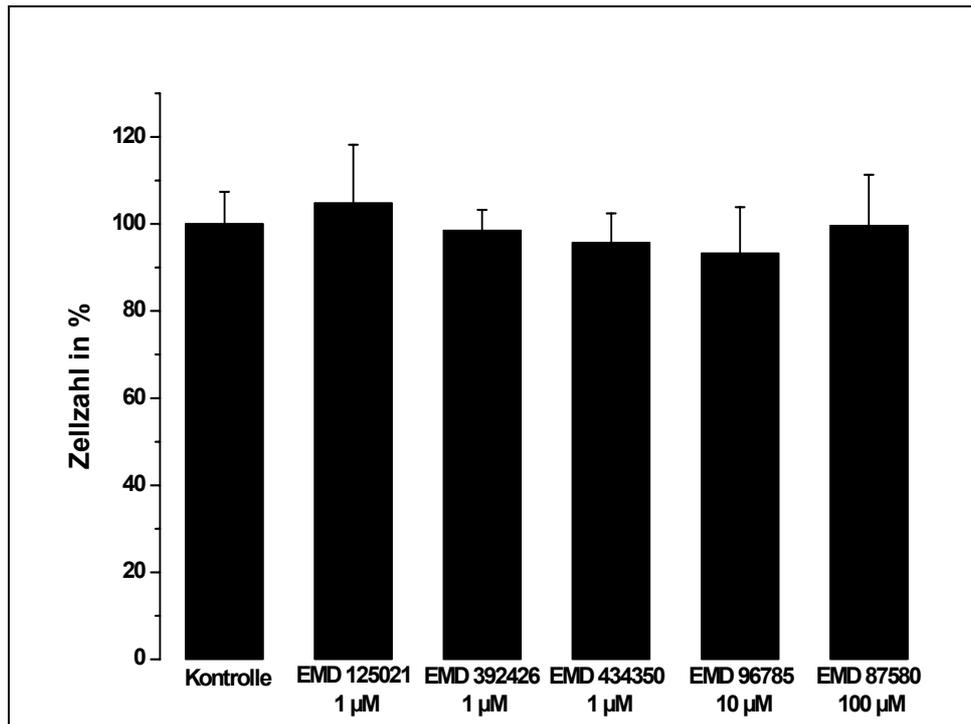


Abb. 15: Zellzahl an Tag 3 der Parietalzellkultur, Zellzahl in % im Vergleich zur Kontrolle (jeweils n=3), Fehlerbalken entsprechen SD.

3.4 Messung des Zellvolumens in stimulierten Parietalzellen

3.4.1 Kontrolle des Versuchsaufbaus

An jedem Versuchstag wurden mehrere Kontrollmessungen durchgeführt. Dies waren Kontrollen der Durchflussgeschwindigkeit, des Bleachverhaltens und 400 mOsm STH-Lösung zur Kontrolle des Versuchsaufbaus.

3.4.2 Kontrollgruppe

Beobachtet man die Volumenänderung von Parietalzellen bei Stimulation mit Forskolin, so findet man eine rasche Zellschrumpfung gefolgt von einer Volumenerholung, wie sie in Abb. 16 dargestellt ist. Die maximale Schrumpfung unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin betrug $12,5 \pm 1\%$ (Abb. 16). Die Volumenerholung wird zu einem erheblichen Teil durch Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers bewerkstelligt.

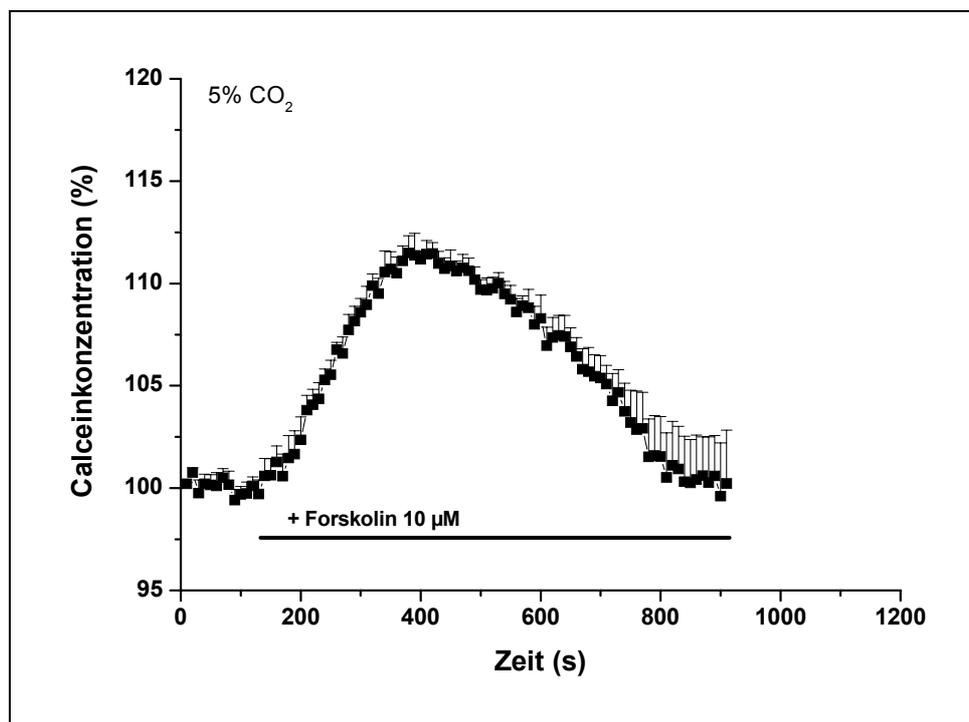


Abb. 16: Stimulation der Säuresekretion mit 10^{-5} M Forskolin, deutlich zu erkennen die initiale Schrumpfung gefolgt von einer Volumenerholung auf den Ausgangswert (n=5).

3.5 Wirkung von NHE Inhibitoren auf Parietalzellschrumpfung und Volumenerholung

Die Volumenerholung nach Stimulation der Säuresekretion wird zu einem erheblichen Teil durch Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers getragen. Alexander Heinzmann und Thorsten Sonnentag aus unserer Arbeitsgruppe konnten am LSM anhand 500 μM Dimethylamylorid (DMA) und 1 μM HOE642 die Beteiligung von NHE1 und NHE4 beim Forskolin-induzierten Na^+/H^+ -Austausch zeigen (82; 192). In vielen Zelltypen ist der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter bei der Volumenregulation beteiligt, in der Parietalzelle konnte jedoch kein signifikanter Effekt auf die Forskolin-basierte Volumenänderung gezeigt werden (192).

Um zu untersuchen ob die verwendeten NHE Inhibitoren einen Effekt auf die an der Volumenregulation beteiligten Na^+/H^+ -Austauscher haben, wurde ihr Effekt auf die Forskolin induzierte Volumenänderung der Parietalzelle untersucht. Alle verwendeten Inhibitoren hatten Einfluss auf die Volumenregulation der Parietalzelle. Für 10^{-4} M EMD 87580 zeigte sich nach Forskolin-Stimulation eine Reduktion der Volumenerholung um $56,2 \pm 12\%$. Keine andere Substanz hemmte die Volumenerholung in dieser Größenordnung. Ansonsten lag die Reduktion der Volumenerholung bei EMD 125021 ($45,3 \pm 14\%$), 392426 ($43,9 \pm 15\%$) und 434350 ($39,8 \pm 9\%$) in einem ähnlichen Bereich, wobei die anderen Hemmstoffe mit einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt wurden. Die Reduktion der maximalen Zellschrumpfung lag bei EMD 87580 ($43,6 \pm 0,4\%$) ähnlich der von EMD 125021 ($45,5 \pm 0,2\%$) und 392426 ($42,9 \pm 0,6\%$). Eine Ausnahme bildet hier EMD 434350 mit $32,5 \pm 0,6\%$, er zeigt gleichzeitig den geringsten Effekt auf die maximale Schrumpfung als auch auf die Volumenerholung (Abb. 17-20).

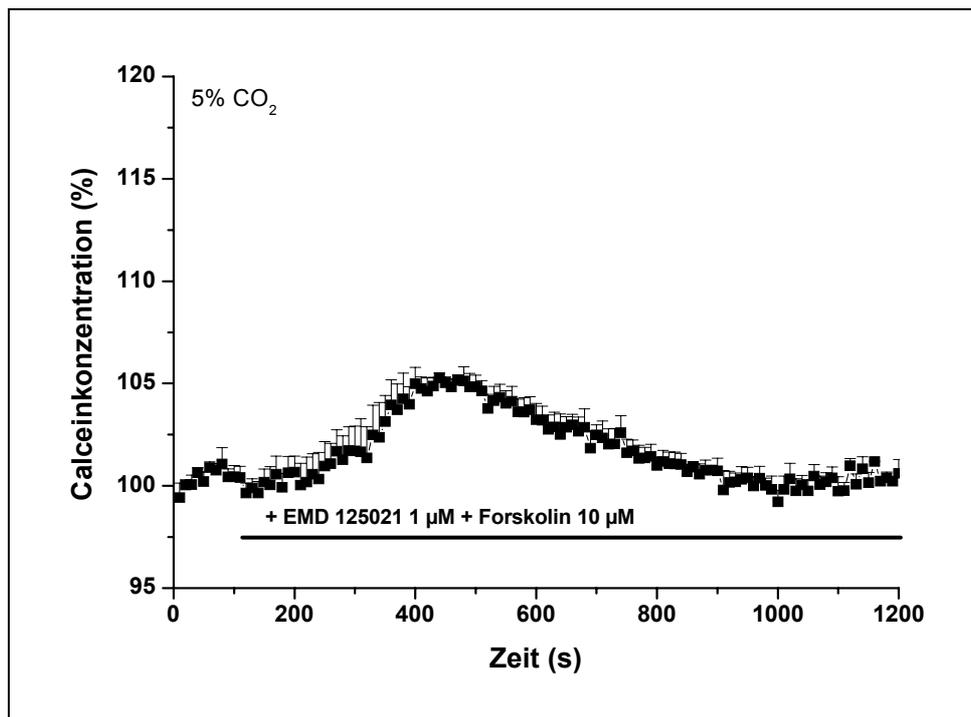
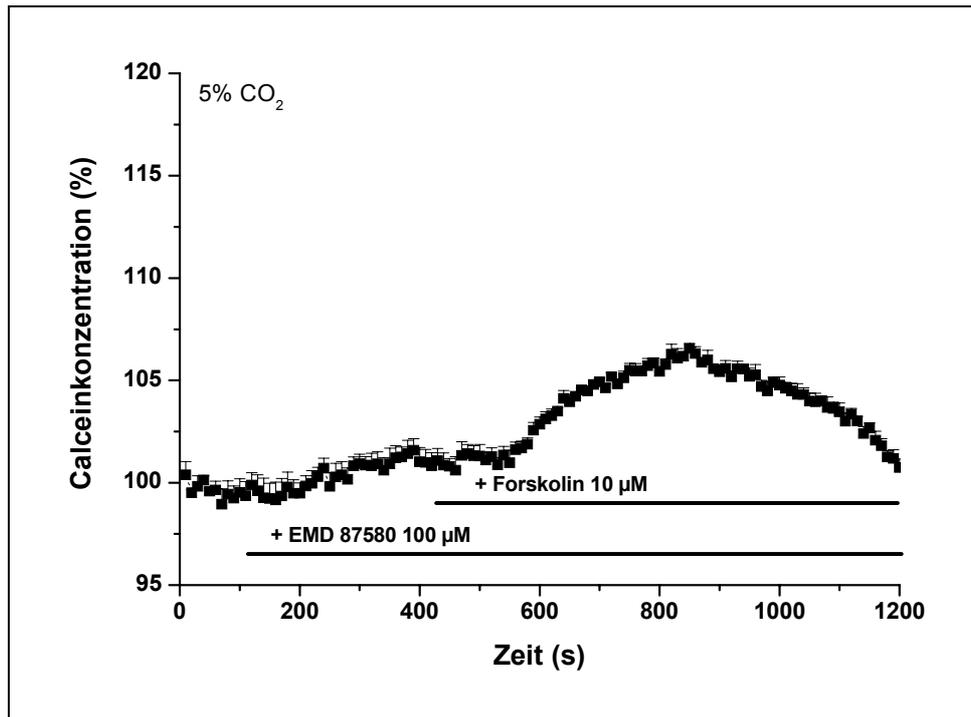


Abb. 17: Beobachtung des RVI bei Hemmung der NHE Isoformen nach Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin; oben Verwendung von 10^{-4} M EMD 87580 (n=5), unten 10^{-6} M EMD 125021 (n=5).

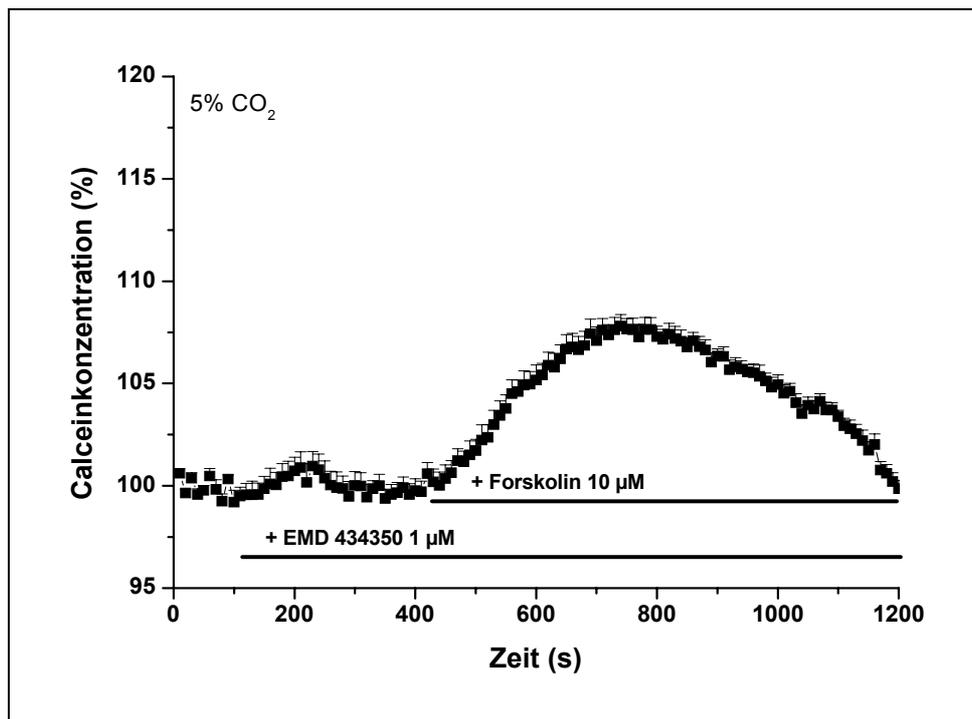
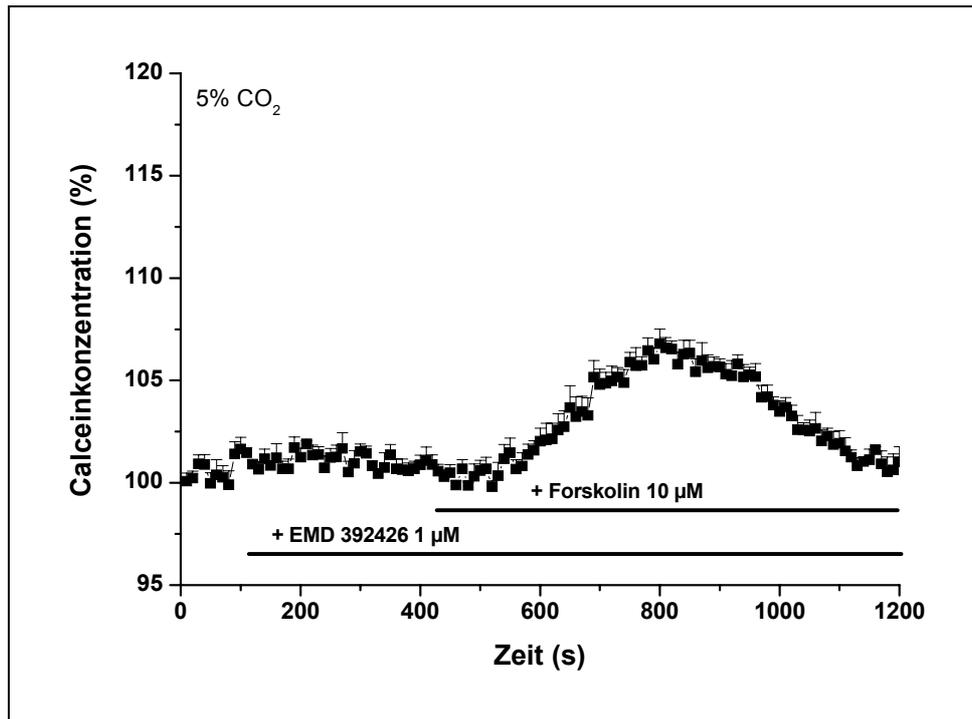


Abb. 18: Beobachtung des RVI bei Hemmung der NHE Isoformen nach Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin; oben Verwendung von 10^{-6} M EMD 392426 (n=4), unten 10^{-6} M EMD 434350 (n=7).

Für alle verwendeten NHE Inhibitoren zeigte die alleinige Applikation, vor Stimulation der Säuresekretion mit Forskolin, keinen Effekt auf die Volumenregulation der Parietalzelle. Allerdings reduzierten alle verwendeten Inhibitoren signifikant die maximale Parietalzellschrumpfung nach Forskolin-Stimulation als auch die Geschwindigkeit der Volumenerholung (Abb. 19 und 20).

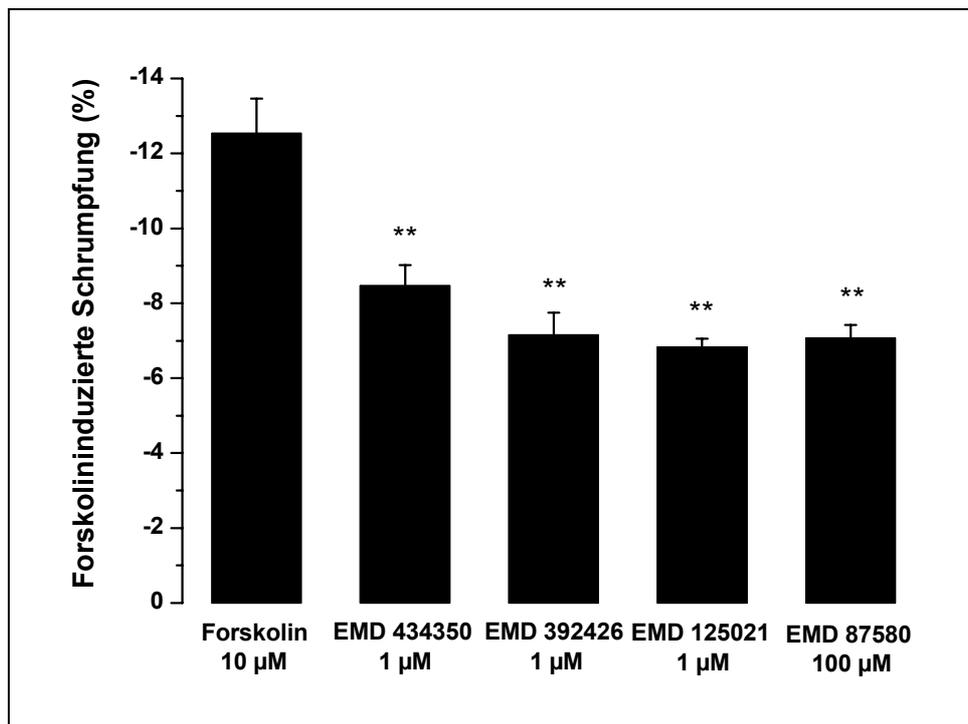


Abb. 19: Prozentuale Volumenänderung der Parietalzellen bei Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin. Bei Verwendung der NHE Inhibitoren zeigte sich eine deutlich erniedrigte maximale Schrumpfung (n=4-7).

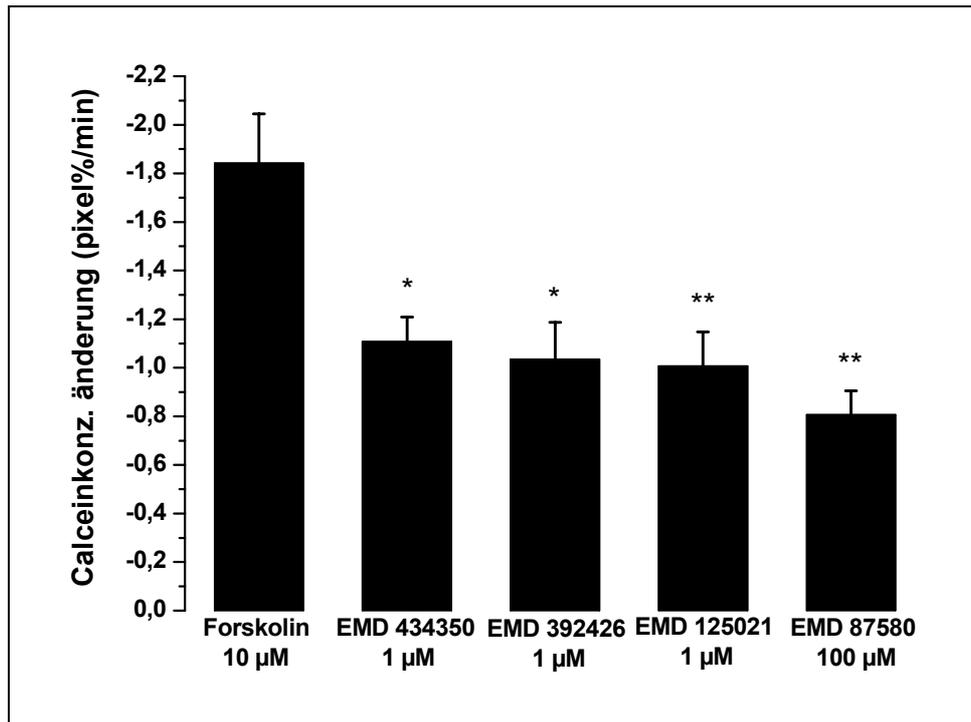


Abb. 20: Veränderung der Calceinkonzentration während des RVI bei Hemmung des Forskolin-induzierten Na^+/H^+ -Austauschs (n=4-7).

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die errechneten relativen ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahmen, die Calceinkonzentrations-Änderungsgeschwindigkeiten, die maximale Volumenänderung und die Zellzahl tabellarisch dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde im Vergleich zur Kontrolle errechnet, ns bedeutet nicht signifikant. Ergebnisse sind $\pm\text{SEM}$ wiedergegeben. Für alle Versuche gilt $n=3-7$.

3.6.1 ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme in frisch isolierten Parietalzellen

Verwendete Substanz	Konzentrationsbereich	Signifikanzniveau (ANOVA)
EMD 87580	10^{-7} - 10^{-3} M	ns, $p=0,93$
EMD 96785	10^{-8} - 10^{-4} M	ns, $p=0,2$
EMD 125021	10^{-9} - 10^{-5} M	ns, $p=0,26$

3.6.2 ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme in kultivierten Parietalzellen

Verwendete Substanz	Konzentrationsbereich	Signifikanzniveau (ANOVA)
EMD 87580	10^{-7} - 10^{-3} M	ns, $p=0,99$
EMD 125021	10^{-9} - 10^{-5} M	ns, $p=0,99$

3.6.3 ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme bei NHE Langzeithemmung (3 Tage)

Substanz und Konzentration	Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme (%)	Signifikanzniveau
Stimulation mit Forskolin	100%	
EMD 87580 10 nM	98,7±7%	ns
EMD 87580 100 nM	84,7±7%	ns
EMD 87580 1 µM	88,3±8%	ns
EMD 87580 10 µM	78,8±9%	p<0,05
EMD 87580 100 µM	63,8±6%	p<0,001
EMD 96785 1 nM	81,3±10%	ns
EMD 96785 10 nM	77,1±11%	p<0,05
EMD 96785 100 nM	55,4±10%	p<0,001
EMD 96785 1 µM	56,1±9%	p<0,001
EMD 96785 10 µM	42,0±12%	p<0,001
EMD 125021 100 pM	88,8±6%	ns
EMD 125021 1 nM	91,6±6%	ns
EMD 125021 10 nM	86,8±6%	ns
EMD 125021 100 nM	70,5±9%	p<0,01
EMD 125021 1 µM	65,3±10%	p<0,01

Substanz und Konzentration	Relative ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme (%)	Signifikanzniveau
Stimulation mit Forskolin	100%	
EMD 392426 100 pM	98,1±6	ns
EMD 392426 1 nM	93,0±10%	ns
EMD 392426 10 nM	88,3±10%	ns
EMD 392426 100 nM	75,1±9%	p<0,05
EMD 392426 1 µM	63,6±7%	p<0,001
EMD 434350 100 pM	93,5±7%	ns
EMD 434350 1 nM	91,7±8%	ns
EMD 434350 10 nM	97,4±8%	ns
EMD 434350 100 nM	71,8±4%	p<0,001
EMD 434350 1 µM	72,8±5%	p<0,001

3.6.4 Zellzahl an Tag 3 der Kultur

Substanz und Konzentration	Zellzahl (%)	Signifikanzniveau
Kontrolle	100%	
EMD 87580 100 µM	99,6±4%	ns
EMD 96785 10 µM	93,2±4%	ns
EMD 125021 1 µM	104,8±4%	ns
EMD 392426 1 µM	98,5±2%	ns
EMD 434350 1 µM	95,7±3%	ns

3.6.5 Maximale Volumenänderung

Substanz	Maximale Volumenänderung (%)	Signifikanzniveau
Stimulation mit Forskolin	12,5±1%	
EMD 87580 100 µM	7,1±0,3	p<0,01
EMD 125021 1 µM	6,8±0,2%	p<0,01
EMD 392426 1 µM	7,2±0,6%	p<0,01
EMD 434350 1 µM	8,5±0,6%	p<0,01

3.6.6 Calceinkonzentrations-Änderung

Substanz	Calceinkonzentrations-Änderung (pixel%/min)	Signifikanzniveau
Stimulation mit Forskolin	-1,84±0,2	
EMD 87580 100 µM	-0,81±0,1	p<0,01
EMD 125021 1 µM	-1,0±0,14	p<0,01
EMD 392426 1 µM	-1,03±0,15	p<0,05
EMD 434350 1 µM	-1,11±0,1	p<0,05

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt um zu untersuchen, inwieweit die verschiedenen NHE Isoformen der Kaninchenparietalzellen durch verschiedene NHE Inhibitoren hemmbar sind und welche Auswirkung die Inhibitoren auf Säuresekretion, Parietalzellzahl und Volumenänderung haben.

4.1 Diskussion des Versuchmodells

Die Untersuchungen der Ionenkanäle und Ionentransportprozesse im Magenepithel wurden an einer Reihe von verschiedenen Versuchsmodellen durchgeführt. Es gab Experimente mit dem Gesamtepithel (69), Drüsenschläuchen (148), isolierten Zellen (135) und Membranvesikeln (109).

4.1.1 Isolierte Zellen und Membranvesikel

Bei Modellen, die durch eine traumatisierende Präparation gewonnenes Material unmittelbar verwenden, wie dies bei frisch isolierten Zellen und Membranvesikeln der Fall ist, ist zu bedenken, dass sich die Verdauungsschritte nachteilig auf die Integrität der Membranproteine auswirken. Dadurch können Untersuchungen an Ionentransportern und Ionenkanälen negativ beeinflusst werden. Weiterhin besitzen frisch isolierte Zellen kaum die Möglichkeit, die während der Präparation zerstörten Proteine in der kurzen Zeit bis Versuchsbeginn neu zu synthetisieren. Man weiß inzwischen, dass das Zytoskelett bei vielen Vorgängen der Signaltransduktion eine Rolle spielt, und muss daher je nach Fragestellung prüfen, ob ein zytoskelettfreies System, wie Vesikel, oder eines, bei dem die Intaktheit des Zytoskeletts bezweifelt werden muss, wie frisch isolierte Zellen, geeignet ist. Dies gilt vor allem für die Untersuchung von Effekten, bei denen ein enger Zusammenhang zum Zytoskelett und zur Volumenregulation besteht (110).

4.1.2 Magenepithel, Drüsenschläuche, handdissezierte Magendrüsen

Versuchsmodelle, bei denen die Zellen in ihrem natürlichen Verband bleiben, stellen das intakte Magenepithel (102), isolierte Drüsenschläuche (16) und handdissezierte Magendrüsen (211) dar. Ein klarer Vorteil derartiger Modelle ist

die Tatsache, dass der epitheliale Charakter gewahrt wird, indem apikale und basolaterale Membran, ebenso der Kontakt zu Nachbarzellen und dem Zytoskelett erhalten bleiben. Will man sich ausschließlich auf einen bestimmten Zelltyp konzentrieren, so kann es jedoch schwierig sein, dass Messsignal anderer Zellarten abzutrennen. Weiterhin muss damit gerechnet werden, dass benachbarte Zellen, z.B. ECL-Zellen, Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter nehmen. Ein sehr gutes, wenn auch präparatorisch aufwendiges Modell stellen die handdissezierten Magendrüse dar (211).

4.1.3 Primärkultur von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen

Bei der vorliegenden Arbeit kam die Parietalzellkultur nach Chew et al. zur Anwendung (36; 41). Die Parietalzellkultivierung fand im Wesentlichen nach der von C. Chew beschriebenen Methode statt. Entscheidende Punkte sind hierbei der Erhalt einer möglichst reinen Parietalzellfraktion und die Vermeidung von mikrobieller Kontamination. Dabei scheinen die Verdauung und die beiden Zentrifugationsschritte ganz entscheidende Parameter zu sein.

4.1.3.1 Abtrennung der Parietalzellen

Mittels der von Chew et al. beschriebenen Methode gelang es, eine Parietalzellreinheit von $95\pm 3\%$ zu erreichen (Kap. 3.1.1). Dies ist wichtig, um nicht zu viele Fibroblasten mitzukultivieren, da die Kultur dadurch nach kurzer Zeit überwuchert wird und sich die Zellen von der Unterlage ablösen. Essentiell für die Zellreinheit und die Kulturgüte ist auch die Verdauungszeit, die durch mikroskopische Kontrolle bei jeder Präparation individuell bestimmt wurde. Zu kurze Zeiten führten dazu, dass unverdaute Drüsenschläuche beim Sieben verloren gingen. Wurde zu lange verdaut, so bildeten sich einerseits Zellkonglomerate, die zu großen Verlusten bei der Gegenstromzentrifugation führten und zum Teil mit in die Kultur gelangten, da ihre Größe derjenigen der Parietalzellen entspricht. Andererseits wurden die Zellen offensichtlich durch Membranandau so stark geschädigt, dass sie sich nicht auf der Matrix anhefteten. Weiterhin stellte sich heraus, dass es praktikabler und der Zellreinheit zuträglich war, im Unterschied zur Originalbeschreibung (41) die Gegenstromzentrifugation vor den Gradientenschritt zu stellen.

4.1.3.2 Vermeidung der Kontamination mit Mikroorganismen

Erster wichtiger Schritt auf dem Weg zur maximal möglichen Keimreduktion war die gründliche manuelle Reinigung des Magens nach Entnahme. Wurden sichtbare Schmutzpartikel mit in die weiteren Präparationsschritte genommen, so hatte man es zu einem späteren Zeitpunkt mit einer großen, nicht beherrschbaren Anzahl an Mikroorganismen zu tun. Im Gegensatz zur Originalbeschreibung (41) wurde zunächst die Elutriation, dann die Nykodenz[®]-Zentrifugation durchgeführt, da hierdurch auch die Sterilität besser zu kontrollieren war. Bei der Elutriation und der gesamten Kultivierung wurde darauf geachtet, dass Millipore[®] Wasser mit einem Widerstandswert von mindestens 18,2 MΩ verwendet wurde, da sich die Wasserqualität als besonders wichtiger Punkt bei der Vermeidung von Kontaminationen herausgestellt hatte (36).

Nach dem Gegenstromzentrifugationsschritt wurde eine weitgehende Keimfreiheit angenommen, und die Folgeschritte fanden unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank statt.

4.1.3.3 Beurteilung des gewählten Versuchsmodells

Stellt man im Vergleich zu den anderen Versuchsmodellen Vor- und Nachteile zusammen, so ergeben sich zunächst folgende Einschränkungen:

- Primärkulturen von Parietalzellen bilden keine Monolayer aus, so dass die direkte Messung der Säureproduktion nicht möglich ist. Die Säuresekretion lässt sich jedoch indirekt mit der ¹⁴C-Aminopyrin-Aufnahme messen, was seit langem verlässliche und stabile Ergebnisse liefert (15).
- Es wurde vermutet, die membranäre und zytoskeletale Polarisierung sei in kultivierten Parietalzellen vollständig aufgehoben; dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von Saccomani et al (169).
- Da es sich um eine Primärkultur ausdifferenzierter Zellen handelt die nicht mehr teilungsfähig sind, geht täglich ein gewisser Anteil der Parietalzellen zugrunde.

Die klaren Vorteile sind:

- Nach dem sicherlich traumatisierenden und möglicherweise zellschädigenden Isolierungsvorgang haben die kultivierten Zellen die Möglichkeit, in ihren ursprünglichen Zustand zurückzukehren.
- Die Viabilität der Zellen ist verbessert da nur Zellen gemessen werden können, die sich auch an der Matrix anheften.
- Im Unterschied zu kultivierten Zellen lassen sich längerfristige Versuche durchführen.
- Die Zellen sind leicht im Mikroskop zu untersuchen, da sie einzeln und überlagerungsfrei vorliegen.
- Die Verwendung adhärenter Primärzellen ermöglichen den leichten und schnellen Wechsel von Lösungen während der Experimente (184).
- Im Vergleich zu transformierten Zelllinien sind Primärkulturen phänotypisch stabil.

Im Vergleich stellt die Parietalzellprimärkultur somit ein geeignetes Modell dar, um das hier interessierende Thema zu bearbeiten. Sie ermöglicht eine gute Abtrennung der relevanten Zellen, eine Stabilisierung der regulatorischen Charakteristika durch Kultivierung, die Messung der Säuresekretion unter verschiedenen Bedingungen und das mikrofluorometrische Verfolgen von Veränderungen des Volumens und des pH_i in Echtzeit.

4.2 Messung des Zellvolumens mit dem Laserscanmikroskop

Auch am Laserscanmikroskop bestand das Problem des Photobleachings bzw. des leakage (aktives Auswerfen des Farbstoffs durch die Zellen). Um diesen Effekten entgegenzuwirken wurde am LSM-Messplatz das Licht des Argon-Lasers (488 nm) um das 1000 fache abgeschwächt. Es galt ein Optimum für die Zeit des Messvorgangs und der Zeit zwischen zwei Messintervallen zu finden. Als optimal stellten sich eine Messzeit von acht Sekunden und ein Intervall von zehn Sekunden heraus.

Der x-z-Scan wurde dem x-y-Scan vorgezogen. Es ist davon auszugehen, dass die Zelle, welche ja auf dem Deckgläschen am Matrigel anhaftet sich bei

Schrumpfungs- beziehungsweise Schwellungsprozessen mehr in der x-y-Richtung, also in Richtung zum Objektiv hin, bewegt, und es so bei dem x-y-Scan zu einer kompletten Schnittebenenverlagerung kommen kann. Dies ist beim x-z-Scan aufgrund der Lage der Ebene nicht der Fall.

4.3 Messung der Säuresekretion

Die Säuresekretion nach Stimulation mit Forskolin wurde mittels ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahmetechnik quantifiziert (Kapitel 2.5). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse waren den aus unserer Arbeitsgruppe bekannten Werten durchaus vergleichbar (10; 82). Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen werden als Variationen betrachtet, die auf die genetische Variabilität der Versuchstiere und die Präparation der Parietalzellen zurückzuführen sind. Die Fähigkeit der Stimulation weist u. a. auf die Kultivierung intakter und stimulierbarer Parietalzellen hin.

4.3.1 Effekt der NHE Inhibitoren auf die Säuresekretion

In den Abbildungen 5-14 sind die Experimente dargestellt, die den Einfluss der NHE Inhibitoren auf die Forskolin-stimulierte Säuresekretion untersuchen. Die Hemmwirkung der Inhibitoren beruht normalerweise auf deren chemischen Struktur und pK_a -Wert. Die Struktur, die kompetitiv mit der Na^+ -Bindungsstelle des Austauschers konkurriert, ist das protonierte und mit 3 H_2O Molekülen hydrierte Guanidinium-Ion (3; 52). Der pK_a -Wert der Inhibitoren spielt für die Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschs eine wichtige Rolle. Daraus lässt sich ableiten, dass der Hemmeffekt der NHE Inhibitoren pH abhängig ist. Bei HOE 642 (pK_a 6,2) und EMD 96785 (pK_a 6,0) sind bei pH 7,4 weniger protonierte Guanidinium-Ionen vorhanden als beispielsweise bei pH 6,5 (108), und der Hemmeffekt dementsprechend geringer.

Während die Bedeutung der Na^+/H^+ -Austauscher bei der Säuresekretion bereits seit langem bekannt ist, wird die genaue Funktion der Antiporter kontrovers diskutiert (10; 65; 167; 180; 192). Nach Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist der Na^+/H^+ -Austausch ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung des

Zellvolumens während der Säuresekretion (10; 192). Die Hypothese anderer Arbeitsgruppen (134; 135), dass der Na^+/H^+ -Austausch über einen Anstieg von $[\text{K}^+]_i$ und $[\text{Cl}^-]_i$ zur intrazellulären Alkalisierung beiträgt und diese Veränderungen Signalmechanismen für die Säuresekretion sind, konnte durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden (10; 168; 183). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an frisch isolierten und kultivierten Parietalzellen zeigen, dass es bei Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschs mit den Inhibitoren, in allen Konzentrationen, zu keiner verminderten Säuresekretion kommt (Abbildung 5-9). Diese Beobachtung wurde auch mit HOE 642 gemacht, dass in Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000 μM ebenfalls keinen Einfluss auf die Säuresekretion zeigt (unveröffentlichte Ergebnisse). Da EMD 87580, 96785 und 125021 strukturell mit HOE 642 verwandt sind (Acyl-Guanidin Derivate), scheint sich die akute NHE1 Hemmung dieser Substanzklasse nicht negativ auf die Säuresekretion auszuwirken.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Analyse der Säuresekretion in Parietalzellen deuten darauf hin, dass die sekretorischen Mechanismen, die zum Erreichen der maximalen Säuresekretion benötigt werden, durch akute NHE1 Hemmung nicht beeinflusst werden. Oliver Bachmann konnte die Aktivierung der Na^+/H^+ -Austauscher durch unterschiedliche Sekretagoga nachweisen, jedoch scheint die akute Hemmung der Na^+/H^+ -Austauscher nicht limitierend für die Forskolin-stimulierte Säuresekretion zu sein (10).

Bei dreitägiger Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschs zeigen die Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen NHE Inhibitoren eine signifikante Reduktion der maximalen, durch Forskolin-stimulierten Säuresekretionskapazität. Keine Substanz zeigte bei Konzentrationen kleiner den NHE1 IC_{50} -Werten (Merck, Produktinformation) eine signifikante Hemmung der Säuresekretion. Somit waren zur kompletten Hemmung der NHE-Isoformen höhere Konzentrationen Voraussetzung. Ursächlich kommt hier die Bestimmungsmethode der IC_{50} -Werte in Frage. Merck verwendet dafür unterschiedliche Modelle wie die $^{22}\text{Na}^+$ -

Aufnahmehemmung in Kaninchenerythrozyten, $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahmehemmung in NHE transfizierten Mausfibroblasten (NHE1 Mensch, NHE2 Kaninchen, NHE3 Ratte) und einen Plättchenschwellungstest mit menschlichen Thrombozyten.

Lorrain et al. verwendeten für die Bestimmung der IC_{50} -Werte von EMD 434350 Hamsterfibroblasten, die mit NHE1 und NHE2 transfiziert waren. Die IC_{50} -Werte wurden anhand der Ammonium-prepuls Technik untersucht. Hierbei wird, in Anwesenheit des Hemmstoffs, die pH_i -Erholung nach intrazellulärer Säurebelastung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF gemessen (120). Unterschiedliche Testbedingungen könnten erklären, dass die in Kaninchenparitalzellen gefundenen wirksamen Konzentrationen etwas höher lagen als die bisher berichteten IC_{50} -Werte für NHE1.

Bei Hemmstoffkonzentrationen die nur NHE1 hemmen, kommt es zu einer schwächeren Hemmung der maximalen Säuresekretionskapazität als bei kombinierter NHE1 und NHE2 Hemmung. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass EMD 434350 die Forskolin-stimulierte Säuresekretion deutlich unter dem IC_{50} -Wert für NHE2 hemmen konnte. Da hier alle 5 untersuchten EMD Substanzen einen hemmenden Effekt auf die Forskolin-stimulierte Säuresekretion zeigen, ist die chronische Hemmung der Säuresekretion auf einen NHE vermittelten Prozess zurückzuführen. Dieser Zusammenhang konnte durch Verwendung von Inhibitoren, die zu unterschiedlichen Substanzklassen gehören, gezeigt werden, und scheint daher nicht das Spezifikum einer Substanzklasse zu sein (EMD 434350 gehört nicht zur Substanzklasse der Acyl-Guanidin). EMD 434350 ist ein Imidazolypiperidine Derivat und die erste Substanz deren Wirkung nicht, wie die der Guanidin Derivate, auf dem hydrierten Guanidinium-Ion beruht. Da die Imidazol-Gruppe funktionell der Guanidin-Gruppe gleicht, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion mit Na^+/H^+ -Austauschern auf dem gleichen Wege erfolgt (120).

Die chronische Hemmung der Säuresekretion durch NHE Inhibitoren (Abb. 10-14) scheint auf einen durch Na^+/H^+ -Austausch vermittelten Prozess

zurückzuführen zu sein, und nicht auf eine akute Störung der sekretorischen Mechanismen.

Um zu klären, ob die gefundene Säuresekretionshemmung auf einer Abnahme der Parietalzellzahl und somit Toxizität der Hemmstoffe basiert, wurde in einem neuen Versuchsansatz, nach dreitägiger Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschs, die Zellzahl bestimmt.

4.4 Einfluss der NHE Inhibitoren auf die Zellzahl

Das Vorhandensein verschiedener Knock-out Mausmodelle bietet die Möglichkeit, etwas über die Funktion der NHE Isoformen zu erfahren. Bei NHE1 Knock-out Mäusen wurden histologische Auffälligkeiten im Sinne atrophischer Veränderungen der Magenmukosa und Erweiterungen des Interstitiums zwischen den Magendrüsen gefunden. Die phänotypische Beeinträchtigung dieser Maus beschränkt sich auf eine slow-wave Epilepsie (12). Die NHE2 Knock-out Maus zeigt im Magen ausgeprägtere Veränderungen als die NHE1 Knock-out Maus. Bei ihr wurden eine schwerwiegende Atrophie der Magenmukosa mit einem deutlich reduzierten Anteil an Parietal- und Hauptzellen gefunden. Zwar waren einige Parietalzellen intakt, jedoch die meisten davon degenerativ verändert. Die Säureproduktion ist bei NHE2 defizienten Jungtieren leicht reduziert und kommt bei erwachsenen Tieren praktisch vollständig zum Erliegen (178). Dies lässt vermuten, dass die NHE2 Isoform für die Säuresekretion nicht unbedingt erforderlich ist, sie aber das Langzeitüberleben der Parietalzellen entscheidend beeinflusst. Weiterhin beobachteten Mitarbeiter der Firma Merck, dass es bei Gabe von NHE1 Inhibitoren zu Veränderungen im Magenepithel kommt (persönliche Mitteilungen).

Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass NHE1 in Zellen eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine Hemmung der Apoptose bewirkt. Zeichen der Apoptose sind intrazelluläre Azidifizierung und reduziertes Zellvolumen. Deshalb könnte die intrazelluläre Alkalisierung und die regulatorische Volumenzunahme – verursacht durch NHE1 – ein antiapoptotisches Signal vermitteln, welches die Zellen vor Apoptose schützt (112).

Unabhängig von der Substanzklasse zeigte sich, bei allen verwendeten Inhibitoren in der höchsten Konzentration, kein signifikantes Absterben der Parietalzellen (Abb. 15). Die beobachtete Abnahme der Säuresekretionskapazität bei 3 tägiger NHE1 Hemmung ist deshalb auf andere Mechanismen zurückzuführen. Die Hemmstoffe scheinen somit nicht parietalzelltoxisch zu sein oder die NHE1 Hemmung führt nicht zu gesteigerter Apoptose. Darüber hinaus könnte der Effekt der NHE1 Hemmung durch andere Isoformen kompensiert werden.

4.4.1 Mögliche Ursachen der verminderten Säuresekretion

Die Arbeitsgruppe von Chew et al. untersuchte den Effekt von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) auf Parietalzellen. Sie fanden heraus, dass bei akuter Zugabe von EGF die Säuresekretionskapazität auf Carbachol- und Histaminstimulation gehemmt wird, während die längerfristige Zugabe von EGF ins Zellkulturmedium die stimulatorische Wirkung von Carbachol, Gastrin und Histamin zusätzlich erhöht (42). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass EGF die Expression und Transkription der H^+/K^+ -ATPase α -Untereinheit steigert, und dieser Effekt über eine Aktivierung von MAP-Kinasen und der Serin/Threonin-Kinase Akt vermittelt wird (95; 107; 200). Ebenfalls bekannt ist die EGF vermittelte Aktivierung von NHE1 (173; 174). Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe kamen zu dem Schluss, dass EGF den Na^+/H^+ -Austausch in Parietalzellen stimuliert, nicht aber – bei Akutzugabe – die Säuresekretion (4; 189). Kristian Siegel konnte dann mit HOE 642 zeigen, dass die EGF vermittelte Zunahme des Na^+/H^+ -Austauschs, und somit der Säuresekretionskapazität, nicht über eine Beeinflussung des pH_i erfolgt (189). Wie in der Einleitung beschrieben sind NHE's an der Volumenregulation beteiligt. Versuche, die eine EGF/NHE1 mediierte Zellschwellung begünstigen bzw. verhindern sollten, kamen zu dem Ergebnis, dass sich der Effekt von EGF auf die Zunahme der Säuresekretionskapazität in hypertonem Medium nicht mehr vorhanden war. Deshalb wäre es denkbar, dass die Volumenregulation der Parietalzelle die EGF bedingte Genexpression modulieren kann. Um zu untersuchen, ob die neuen NHE Inhibitoren Einfluss auf die Volumenregulation

haben, wurden weitere Experimente mit Calcein gefärbten Parietalzellen am Konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt.

4.5 Einfluss auf die Volumenregulation

Aus Untersuchungen von Thorsten Sonntag und Alexander Heinzmann ist bekannt, dass Parietalzellen bei Stimulation der Säuresekretion mit Forskolin eine rasche Zellschrumpfung zeigen, gefolgt von anschließender Volumenerholung (RVI) auf den Ausgangswert (82; 192). Die initiale akute Zellschrumpfung kommt dadurch zustande, dass Forskolin die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöht, was zu Folge hat, dass die luminalen Leitfähigkeit für K^+ und Cl^- zunimmt und diese Elektrolyte ausströmen. Sichtbar wird diese Zellschrumpfung an einer Zunahme der Calceinfluoreszenz. Der Verlust an Elektrolyten aus dem Zytosol kann durch die gleichzeitige Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschs und des Cl^-/HCO_3^- -Austauschs kompensiert werden (82; 192), da durch die Aktivität beider Ionenaustauscher netto Na^+ und Cl^- in die Zelle einströmen.

In den vorliegenden Versuchen konnte die Volumenänderung der Parietalzelle nach Forskolin-Stimulation gut reproduziert werden (Abb. 16). Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, haben alle verwendeten NHE Inhibitoren, unabhängig ihrer Substanzklasse, einen hemmenden Einfluss auf die Zellschrumpfung und die Volumenerholung, die nach Forskolin-Stimulation beobachtet wird. Bei der Vorinkubationsphase ohne Forskolin-Stimulation zeigt keiner der NHE Inhibitoren einen Effekt auf das Zellvolumen. Dies bedeutet, dass an der Aufrechterhaltung des „steady-state“ Volumens im Ruhezustand in CO_2/HCO_3^- -gepufferter Lösung, die Na^+/H^+ -Austauscher nur minimal beteiligt sind (8; 140; 150). Dies lässt auf eine sekretagog-abhängige Aktivierung der Na^+/H^+ -Austauscher schließen, was bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (10; 82; 192).

Die verwendeten NHE Inhibitoren haben unterschiedliche Affinität zu den NHE1 und NHE2 Isoformen (siehe 2.3.2). In dieser Arbeit wurde jedoch nur eine Konzentration des jeweiligen Hemmstoffs bei den Volumenexperimenten verwendet. Die Substanzen haben in Konzentrationen, die sowohl NHE1 als

auch NHE2 hemmen können, einen signifikanten Einfluss auf die Volumenregulation. So können hier nur eingeschränkt Aussagen über eine alleinige NHE1, NHE2 oder kombinierte NHE1/NHE2 Hemmung bei der Volumenregulation gemacht werden. Der selektive NHE1 Inhibitor EMD 434350 zeigt zwar den geringsten Einfluss auf die Forskolin-induzierte Schrumpfung und Volumenerholung, aber die verwendete Konzentration liegt nahe dem NHE2 IC_{50} -Wert, weshalb hier nicht auf eine alleinige Beteiligung von NHE1 geschlossen werden kann. Es lässt sich die Aussage treffen, dass entweder NHE1, NHE2 oder beide Isoformen an der Forskolin-induzierten Schrumpfung und Volumenerholung beteiligt sind.

Wodurch lässt sich aber die Hemmung der Parietalzellschrumpfung nach Forskolin-Stimulation erklären?

Wie MacLeod et al. feststellten (122), wird in isolierten Enterozyten für die initiale Zellschrumpfung eine durch NHE1 vermittelte transiente intrazelluläre Alkalisierung benötigt. Diese transiente intrazelluläre Alkalisierung könnte ein Signal für die Öffnung von K^+ -Kanälen, die an der Parietalzellschrumpfung beteiligt sind, sein. Werden die Na^+/H^+ -Austauscher gehemmt, könnte diese kurzzeitige Alkalisierung ausbleiben, was die Öffnungswahrscheinlichkeit der K^+ -Kanäle reduziert, und konsekutiv zu geringerer sekretagog vermittelter Parietalzellschrumpfung führt.

Wie weiter oben beschrieben gibt es Ergebnisse aus unserer, wie auch aus anderen Arbeitsgruppen die zeigen, dass die Na^+/H^+ -Austauscher in Parietalzellen eine wichtige Rolle spielen. Dies könnte u. a. daran liegen, dass sie ihr Volumen nicht durch den NKCC regulieren, und deshalb besonders auf die Funktionstüchtigkeit der NHE Isoformen angewiesen sind. Da die Inhibitoren die Volumenregulation hemmen, könnte bei NHE Langzeithemmung die EGF-vermittelte Zellschwellung verhindert sein, und so der Säuresekretions-stimulierende Langzeiteffekt von EGF herabgesetzt sein.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) sind ubiquitär exprimierte Proteine mit wichtigen zellulären Aufgaben bei der Regulation von pH_i -, Volumen-, Salz- und Wasserhaushalt. Im Magenepithel ist Na^+/H^+ Austausch mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Schutzes der Mukosa vor der hohen luminalen Säurekonzentration, wird aber auch bei der Säuresekretion aktiviert und ist bei der Volumenregulation der Parietalzellen wesentlich beteiligt. Im Magenepithel werden vier verschiedenen NHE Isoformen exprimiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob NHE Hemmstoffe unterschiedlicher Substanzklassen Einfluss auf die Säuresekretion haben. Keine Substanz inhibierte akut die als ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme gemessene, Forskolin-stimulierte Säuresekretion. Eine NHE Hemmung über den Zeitraum von 3 Tagen konnte jedoch eine Reduktion der maximalen Säuresekretion bewirken. Dieser Effekt war bei NHE1 und NHE2 Hemmung stärker ausgeprägt als bei alleiniger NHE1 Hemmung. Um zu klären, ob die Abnahme der Säuresekretion auf Zytotoxizität der Hemmstoffe und ein daraus resultierendes Absterben der Parietalzellen zurückzuführen ist, wurde die Zellzahl bei 3 tägiger NHE Hemmung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Apoptoserate der Parietalzellen nicht gesteigert war. Parietalzellen zeigen nach Forskolin-Stimulation eine rasche Zellschrumpfung, gefolgt von anschließender Volumenerholung. Da die Volumenregulation durch Na^+/H^+ Austausch mediiert wird, wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die Volumenregulation untersucht. Dabei fand sich, dass alle Substanzen die Volumenregulation hemmen. Die hierbei verwendeten Konzentrationen lassen die Aussage zu, dass nach Forskolin-Stimulation der Parietalzellen entweder NHE1, NHE2 oder beide Isoformen an der Volumenregulation beteiligt sind. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass eine Hemmung der Na^+/H^+ Austauscher Isoformen NHE1/NHE2 keinen akuten Effekt auf die Säurebildung von kultivierten Parietalzellen hat, aber die Fähigkeit zur Volumenregulation einschränkt. Dies könnte eine Erklärung für die Langzeiteffekte der NHE Inhibitoren auf die maximale Säuresekretionskapazität von kultivierten Parietalzellen sein, sowie für die Veränderungen der Magenepithelstruktur in NHE1 und NHE2 defizienten Mäusen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A and Kurtz I.** Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 273: 17689-17695, 1998.
2. **Agnew BJ, Duman JG, Watson CL, Coling DE and Forte JG.** Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J Cell Sci* 112: 2639-2646, 1999.
3. **Aihara K, Hisa H, Sato T, Yoneyama F, Sasamori J, Yamaguchi F, Yoneyama S, Mizuno Y, Takahashi A, Nagai A, Kimura T, Kogi K and Satoh S.** Cardioprotective effect of TY-12533, a novel Na^+/H^+ exchange inhibitor, on ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 404: 221-229, 2000.
4. **Albert M, Gaillinger H, Lamprecht G, Classen M, Gregor M and Seidler U.** Signal transduction in EGF-mediated activation of the parietal cell Na^+/H^+ exchanger and stimulation of acid production. *Gastroenterology* 1998.
5. **Alper SL.** The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 53: 549-564, 1991.
6. **Alper SL, Kopito RR and Lodish HF.** A molecular biological approach to the study of anion transport. *Kidney Int Suppl* 23: S117-33, 1987.
7. **Alpern RJ, Yamaji Y, Cano A, Horie S, Miller RT, Moe OW and Preisig PA.** Chronic regulation of the Na^+/H^+ antiporter. *J Lab Clin Med* 122: 137-140, 1993.
8. **Aronson PS, Nee J and Suhm MA.** Modifier role of internal H^+ in activating the Na^+/H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299: 161-163, 1982.
9. **Attapitaya S, Park K and Melvin JE.** Molecular cloning and functional expression of a rat Na^+/H^+ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* 274: 4383-4388, 1999.
10. **Bachmann O, Sonnentag T, Siegel W-K, Lamprecht G, Weichert A, Gregor M and Seidler U.** Different acid secretagogues activate different Na^+/H^+ exchanger isoforms in rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 275: G1085-G1093, 1998.
11. **Baird NR, Orłowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG and Shull GE.** Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na^+/H^+ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* 274: 4377-4382, 1999.
12. **Bell SM, Schreiner CM, Schultheis PJ, Miller ML, Evans RL, Vorhees CV, Shull GE and Scott WJ.** Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol* 276: C788-C795, 1999.
13. **Bergh C, Kelley SJ and Dunham PB.** KCl cotransport in LK sheep erythrocytes: kinetics of stimulation by cell swelling. *J Membr Biol* 117: 177-188, 1990.
14. **Berglinth T, Dibona DR, Ito S and Sachs G.** Probes of parietal cell function. *Am J Physiol* 238: G165-76, 1980.

15. **Berglindh T, Helander HF and Obrink KJ.** Effects of secretagogues on oxygen consumption, aminopyrine accumulation and morphology in isolated gastric glands. *Acta Physiol Scand* 97: 401-414, 1976.
16. **Berglindh T and Obrink KJ.** A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa. *Acta Physiol Scand* 96: 150-159, 1976.
17. **Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J and Shigekawa M.** The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* 269: 13703-13709, 1994.
18. **Bianchini L, L'Allemain G and Pouyssegur J.** The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* 272: 271-279, 1997.
19. **Bianchini L and Pouyssegur J.** Molecular structure and regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *J Exp Biol* 196: 337-345, 1994.
20. **Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu AA, Exner M, Reilly R, Igarashi P and Aronson PS.** NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 265: F736-F742, 1993.
21. **Bonanno JA.** K⁺/H⁺ exchange, a fundamental cell acidifier in corneal epithelium. *Am J Physiol* 260: C618-C625, 1991.
22. **Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC and Chang EB.** Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest* 93: 106-113, 1994.
23. **Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Rabenau K, Villereal M, Rao MC and Chang EB.** Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am J Physiol* 271: C1629-38, 1996.
24. **Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Villereal M, Rao MC and Chang EB.** A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *J Biol Chem* 269: 29704-29709, 1994.
25. **Brant SR, Yun CH, Donowitz M and Tse CM.** Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol* 269: C198-206, 1995.
26. **Brierley GP, Davis MH, Cragoe EJ, Jr. and Jung DW.** Kinetic properties of the Na⁺/H⁺ antiport of heart mitochondria. *Biochemistry* 28: 4347-4354, 1989.
27. **Brown GC.** Total cell protein concentration as an evolutionary constraint on the metabolic control distribution in cells. *J Theor Biol* 153: 195-203, 1991.
28. **Brown MR and Chew CS.** Carbachol-induced protein phosphorylation in parietal cells: regulation by [Ca²⁺]_i. *Am J Physiol* 257: G99-110, 1989.
29. **Busch AE, Varnum M, Adelman JP and North RA.** Hypotonic solution increases the slowly activating potassium current I_{sK} expressed in xenopus oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 804-810, 1992.
30. **Cabado AG, Vieytes MR and Botana LM.** Effect of ion composition on the changes in membrane potential induced with several stimuli in rat mast cells. *J Cell Physiol* 158: 309-316, 1994.

31. **Chaillet JR, Amsler K and Boron WF.** Optical measurements of intracellular pH in single LLC-PK1 cells: demonstration of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 522-526, 1986.
32. **Chan HC, Fu WO, Chung YW, Huang SJ, Zhou TS and Wong PY.** Characterization of a swelling-induced chloride conductance in cultured rat epididymal cells. *Am J Physiol* 265: C997-1005, 1993.
33. **Chan HC and Nelson DJ.** Chloride-dependent cation conductance activated during cellular shrinkage. *Science* 257: 669-671, 1992.
34. **Chew CS.** Forskolin stimulation of acid and pepsinogen secretion in isolated gastric glands. *Am J Physiol* 245: C371-80, 1983.
35. **Chew CS.** Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine, and forskolin increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in gastric glands. *Am J Physiol* 250: G814-G823, 1986.
36. **Chew CS.** Parietal cell culture: new models and directions. *Annu Rev Physiol* 56: 445-461, 1994.
37. **Chew CS and Brown MR.** Histamine increases phosphorylation of 27- and 40-kDa parietal cell proteins. *Am J Physiol* 253: G823-G829, 1987.
38. **Chew CS and Hersey SJ.** Gastrin stimulation of isolated gastric glands. *Am J Physiol* 242: G504-G512, 1982.
39. **Chew CS, Hersey SJ, Sachs G and Berglindh T.** Histamine responsiveness of isolated gastric glands. *Am J Physiol* 238: G312-20, 1980.
40. **Chew CS and Ljungstrom M.** HCl secretion and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cultured parietal cells. *J Intern Med Suppl* 732: 9-15, 1990.
41. **Chew CS, Ljungstrom M, Smolka A and Brown MR.** Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa. *Am J Physiol* 256: G254-63, 1989.
42. **Chew CS, Nakamura K and Petropoulos AC.** Multiple actions of epidermal growth factor and TGF- α on rabbit gastric parietal cell function. *Am J Physiol* 267: G818-26, 1994.
43. **Christensen O.** Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 330: 66-68, 1987.
44. **Cid LP, Montrose-Rafizadeh C, Smith DI, Guggino WB and Cutting GR.** Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (ClC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* 4: 407-413, 1995.
45. **Clark JD and Limbird LE.** Na^+/H^+ exchanger subtypes: a predictive review. *Am J Physiol* 261: C945-53, 1991.
46. **Collins JF, Honda T, Knobel S, Bulus NM, Conary J, DuBois R and Ghishan FK.** Molecular cloning, sequencing, tissue distribution, and functional expression of a Na^+/H^+ exchanger (NHE-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3938-3942, 1993.
47. **Cornet M, Delpire E and Gilles R.** Relations between cell volume control, microfilaments and microtubules networks in T2 and PC12 cultured cells. *J Physiol (Paris)* 83: 43-49, 1988.
48. **Counillon L, Franchi A and Pouyssegur J.** A point mutation of the Na^+/H^+ exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4508-4512, 1993.

49. **Counillon L, Noel J, Reithmeier RA and Pouyssegur J.** Random mutagenesis reveals a novel site involved in inhibitor interaction within the fourth transmembrane segment of the Na⁺/H⁺ exchanger-1. *Biochemistry* 36: 2951-2959, 1997.
50. **Counillon L and Pouyssegur J.** Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovasc Res* 29: 147-154, 1995.
51. **Counillon L and Pouyssegur J.** The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 275: 1-4, 2000.
52. **Counillon L, Scholz W, Lang HJ and Pouyssegur J.** Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol* 44: 1041-1045, 1993.
53. **Cox GA, Lutz CM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, Fu A, Aronson PS, Noebels JL and Frankel WN.** Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell* 91: 139-148, 1997.
54. **Cuppoletti J and Sachs G.** Regulation of gastric acid secretion via modulation of a chloride conductance. *J Biol Chem* 259: 14952-14959, 1984.
55. **D'Souza S, Garcia CA, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orlowski J and Grinstein S.** The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem* 273: 2035-2043, 1998.
56. **Dascalu A, Nevo Z and Korenstein R.** Hyperosmotic activation of the Na⁺/H⁺ exchanger in a rat bone cell line: temperature dependence and activation pathways. *J Physiol* 456: 503-518, 1992.
57. **Demarest JR, Loo DD and Sachs G.** Activation of apical chloride channels in the gastric oxyntic cell. *Science* 245: 402-404, 1989.
58. **Demaurex N and Grinstein S.** Na⁺/H⁺ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *J Exp Biol* 196: 389-404, 1994.
59. **Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H and Barber DL.** Direct binding of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell* 6: 1425-1436, 2000.
60. **Dermietzel R, Hwang TK, Buettner R, Hofer A, Dotzler E, Kremer M, Deutzmann R, Thinnes FP, Fishman GI, Spray DC and .** Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 499-503, 1994.
61. **Deutsch C and Chen LQ.** Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10036-10040, 1993.
62. **Dibona DR, Ito S, Berglindh T and Sachs G.** Cellular site of gastric acid secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6689-6693, 1979.
63. **Donowitz M, Janecki A, Akhter S, Cavet ME, Sanchez F, Lamprecht G, Zizak M, Kwon WL, Khurana S, Yun CH and Tse CM.** Short-term regulation of NHE3 by EGF and protein kinase C but not protein kinase A

- involves vesicle trafficking in epithelial cells and fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 915: 30-42, 2000.
64. **Ekblad EB**. Increase of intracellular pH in secreting frog gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 632: 375-385, 1980.
65. **Fahrman M, Kaufhold M, Rieg T and Seidler U**. Different actions of protein kinase C isoforms α and ϵ on gastric acid secretion. *Br J Pharmacol* 136: 938-946, 2002.
66. **Felipe A, Snyders DJ, Deal KK and Tamkun MM**. Influence of cloned voltage-gated K^+ channel expression on alanine transport, Rb^+ uptake, and cell volume. *Am J Physiol* 265: C1230-C1238, 1993.
67. **Forte JG, Hanzel DK, Okamoto C, Chow D and Urushidani T**. Membrane and protein recycling associated with gastric HCl secretion. *J Intern Med Suppl* 732: 17-26, 1990.
68. **Freeman CJ, Bookchin RM, Ortiz OE and Lew VL**. K-permeabilized human red cells lose an alkaline, hypertonic fluid containing excess K over diffusible anions. *J Membr Biol* 96: 235-241, 1987.
69. **Garcia-Romeu F, Borgese F, Guizouarn H, Fievet B and Motais R**. A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 42: 985-994, 1996.
70. **Garner MM and Burg MB**. Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am J Physiol* 266: C877-C892, 1994.
71. **Geck P and Pfeiffer B**. $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransport in animal cells--its role in volume regulation. *Ann N Y Acad Sci* 456: 166-182, 1985.
72. **Goyal S, Vanden Heuvel G and Aronson PS**. Renal expression of novel Na^+/H^+ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol* 284: F467-F473, 2003.
73. **Grahammer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Graff A, Wittekindt OH, Nitschke R, Bleich M, Barhanin J and Warth R**. The cardiac K^+ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* 120: 1363-1371, 2001.
74. **Grinstein S, Clarke CA and Rothstein A**. Activation of Na^+/H^+ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J Gen Physiol* 82: 619-638, 1983.
75. **Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, Rothstein A and Gelfand EW**. Characterization of the activation of Na^+/H^+ exchange in lymphocytes by phorbol esters: change in cytoplasmic pH dependence of the antiport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1429-1433, 1985.
76. **Grinstein S and Rothstein A**. Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol* 90: 1-12, 1986.
77. **Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J and Rotin D**. Activation of the Na^+/H^+ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* 267: 23823-23828, 1992.
78. **Grunder S, Thiemann A, Pusch M and Jentsch TJ**. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360: 759-762, 1992.

79. **Gschwentner M, Nagl UO, SchmarDA A, Woll E, Ritter M, Waitz W, Deetjen P and Paulmichl M.** Structure-function relation of a cloned epithelial chloride channel. *Ren Physiol Biochem* 17: 148-152, 1994.
80. **Hagen SJ, Wu H and Morrison SW.** NH₄Cl inhibition of acid secretion: possible involvement of an apical K⁺ channel in bullfrog oxyntic cells. *Am J Physiol* 279: G400-G410, 2000.
81. **Hazama A and Okada Y.** Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol* 402: 687-702, 1988.
82. **Heinzmann A.** Untersuchung der Ionentransportmechanismen, die für die Volumenveränderung kultivierter Parietalzellen bei Stimulation der Säuresekretion verantwortlich sind (Dissertation). Medizinische Klinik Abt. I, Universitätsklinik Tübingen, 2002.
83. **Hersey SJ.** Intracellular pH measurements in gastric mucosa. *Am J Physiol* 237: E82-9, 1979.
84. **Hersey SJ and Sachs G.** Gastric acid secretion. *Physiol Rev* 75: 155-189, 1995.
85. **Hirst BH.** K⁺ recycling and gastric acid secretion. *J Physiol (Lond)* 540: 1, 2002.
86. **Hoffmann EK and Dunham PB.** Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161: 173-262, 1995.
87. **Hoffmann EK, Sjöholm C and Simonsen LO.** Na⁺Cl⁻ cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J Membr Biol* 76: 269-280, 1983.
88. **Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyt O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM and Donowitz M.** NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol* 270: G29-41, 1996.
89. **Ives HE, Yee VJ and Warnock DG.** Mixed type inhibition of the renal Na⁺/H⁺ antiporter by Li⁺ and amiloride. Evidence for a modifier site. *J Biol Chem* 258: 9710-9716, 1983.
90. **Jentsch TJ.** Molecular physiology of anion channels. *Curr Opin Cell Biol* 6: 600-606, 1994.
91. **Jentsch TJ.** Chloride channels: a molecular perspective. *Curr Opin Neurobiol* 6: 303-310, 1996.
92. **Jiang L, Chernova MN and Alper SL.** Secondary regulatory volume increase conferred on *Xenopus* oocytes by expression of AE2 anion exchanger. *Am J Physiol* 272: C191-202, 1997.
93. **Jordt SE and Jentsch TJ.** Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J* 16: 1582-1592, 1997.
94. **Jorgensen NK, Christensen S, Harbak H, Brown AM, Lambert IH, Hoffmann EK and Simonsen LO.** On the role of calcium in the regulatory volume decrease (RVD) response in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *J Membr Biol* 157: 281-299, 1997.
95. **Kaise M, Muraoka A, Yamada J and Yamada T.** Epidermal growth factor induces H⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit gene expression through an

- element homologous to the 3' half-site of the c-fos serum response element. *J Biol Chem* 270: 18637-18642, 1995.
96. **Kajita H, Omori K and Matsuda H.** The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl⁻ conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J Physiol* 523 Pt 2: 313-324, 2000.
97. **Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R and Orłowski J.** Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *J Biol Chem* 269: 23544-23552, 1994.
98. **Kapus A, Lukacs GL, Cragoe EJ, Jr., Ligeti E and Fonyo A.** Characterization of the mitochondrial Na⁺/H⁺ exchange. The effect of amiloride analogues. *Biochim Biophys Acta* 944: 383-390, 1988.
99. **Karam SM and Forte JG.** Inhibiting gastric H⁺/K⁺-ATPase activity by omeprazole promotes degeneration and production of parietal cells. *Am J Physiol* 266: G745-G758, 1994.
100. **Kinsella JL and Aronson PS.** Amiloride inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 241: F374-F379, 1981.
101. **Kirk K, Ellory JC and Young JD.** Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J Biol Chem* 267: 23475-23478, 1992.
102. **Kiviluoto T, Mustonen H, Salo J and Kivilaakso E.** Regulation of intracellular pH in isolated Necturus gastric mucosa during short-term exposure to luminal acid. *Gastroenterology* 108: 999-1004, 1995.
103. **Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M and et al.** Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 25: 615-622, 1995.
104. **Komatsu H, Mieno H, Tamaki K, Inoue M, Kajiyama G and Seyama I.** Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by Mg²⁺ and ATP in frog oocyte cells. *Pflugers Arch* 431: 494-503, 1996.
105. **Kopito RR.** Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int Rev Cytol* 123: 177-199, 1990.
106. **Krump E, Nikitas K and Grinstein S.** Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J Biol Chem* 272: 17303-17311, 1997.
107. **Kusayanagi S, Takeuchi Y, Todisco A and Mitamura K.** Extracellular signal-regulated protein kinases mediate H⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1289-1294, 2002.
108. **Kusumoto K, Igata H, Abe A, Ikeda S, Tsuboi A, Imamiya E, Fukumoto S, Shiraishi M and Watanabe T.** In vitro and in vivo pharmacology of a structurally novel Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, T-162559. *Br J Pharmacol* 135: 1995-2003, 2002.
109. **Lamprecht G, Seidler U and Classen M.** Intracellular pH-regulating ion transport mechanisms in parietal cell basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 265: G903-10, 1993.

110. **Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E and Haussinger D.** Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306, 1998.
111. **Lang F and Paulmichl M.** Properties and regulation of ion channels in MDCK cells. *Kidney Int* 48: 1200-1205, 1995.
112. **Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I and Gulbins E.** Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem* 10: 417-428, 2000.
113. **Lauf PK and Adragna NC.** K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem* 10: 341-354, 2000.
114. **Levine SA, Montrose MH, Tse CM and Donowitz M.** Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J Biol Chem* 268: 25527-25535, 1993.
115. **Levine SA, Nath SK, Yun CH, Yip JW, Montrose M, Donowitz M and Tse CM.** Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J Biol Chem* 270: 13716-13725, 1995.
116. **Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A and Low PS.** Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J Biol Chem* 271: 18651-18656, 1996.
117. **Lifton RP, Sardet C, Pouyssegur J and Lalouel JM.** Cloning of the human genomic amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiporter gene, identification of genetic polymorphisms, and localization on the genetic map of chromosome 1p. *Genomics* 7: 131-135, 1990.
118. **Livne A and Hoffmann EK.** Cytoplasmic acidification and activation of Na⁺/H⁺ exchange during regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol* 114: 153-157, 1990.
119. **Lohrmann E, Burhoff I, Nitschke RB, Lang HJ, Mania D, Englert HC, Hropot M, Warth R, Rohm W, Bleich M and .** A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl⁻ secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K⁺ conductance. *Pflugers Arch* 429: 517-530, 1995.
120. **Lorrain J, Briand V, Favennec E, Duval N, Grosset A, Janiak P, Hoornaert C, Cremer G, Latham C and O'Connor SE.** Pharmacological profile of SL 59.1227, a novel inhibitor of the sodium/hydrogen exchanger. *Br J Pharmacol* 131: 1188-1194, 2000.
121. **Ma T and Verkman AS.** Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 517 (Pt 2): 317-326, 1999.
122. **MacLeod RJ and Hamilton JR.** Activation of Na⁺/H⁺ exchange is required for regulatory volume decrease after modest "physiological" volume increases in jejunal villus epithelial cells. *J Biol Chem* 271: 23138-23145, 1996.
123. **Mahnensmith RL and Aronson PS.** Interrelationships among quinidine, amiloride, and lithium as inhibitors of the renal Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* 260: 12586-12592, 1985.
124. **Mairbaur H and Hoffman JF.** Internal magnesium, 2,3-diphosphoglycerate, and the regulation of the steady-state volume of

- human red blood cells by the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport system. *J Gen Physiol* 99: 721-746, 1992.
125. **Malinowska DH.** Cl^- channel blockers inhibit acid secretion in rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 259: G536-G543, 1990.
126. **Malinowska DH, Cuppoletti J and Sachs G.** Cl^- requirement of acid secretion in isolated gastric glands. *Am J Physiol* 245: G573-G581, 1983.
127. **Malinowska DH, Kupert EY, Bahinski A, Sherry AM and Cuppoletti J.** Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl^- channel. *Am J Physiol* 268: C191-C200, 1995.
128. **Malinowska DH, Sachs G and Cuppoletti J.** Gastric H^+ secretion: histamine (cAMP-mediated) activation of protein phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 972: 95-109, 1988.
129. **Marjanovic M, Elliott AC and Dawson MJ.** The temperature dependence of intracellular pH in isolated frog skeletal muscle: lessons concerning the Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol* 161: 215-225, 1998.
130. **McDaniel N and Lytle C.** Parietal cells express high levels of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter on migrating into the gastric gland neck. *Am J Physiol* 276: G1273-G1278, 1999.
131. **Minton AP, Colclasure GC and Parker JC.** Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10504-10506, 1992.
132. **Misaka T, Abe K, Iwabuchi K, Kusakabe Y, Ichinose M, Miki K, Emori Y and Arai S.** A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Lett* 381: 208-212, 1996.
133. **Moor AN and Fliegel L.** Protein kinase-mediated regulation of the Na^+/H^+ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 274: 22985-22992, 1999.
134. **Muallem S, Blissard D, Cragoe EJ, Jr. and Sachs G.** Activation of the Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by stimulation of acid secretion in the parietal cell. *J Biol Chem* 263: 14703-14711, 1988.
135. **Muallem S, Burnham C, Blissard D, Berglinde T and Sachs G.** Electrolyte transport across the basolateral membrane of the parietal cells. *J Biol Chem* 260: 6641-6653, 1985.
136. **Murer H, Hopfer U and Kinne R.** Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 154: 597-604, 1976.
137. **Nader M, Lamprecht G, Classen M and Seidler U.** Different regulation by pHi and osmolarity of the rabbit ileum brush-border and parietal cell basolateral anion exchanger. *J Physiol Lond* 481: 605-615, 1994.
138. **Numata M and Orlowski J.** Molecular cloning and characterization of a novel $\text{Na}^+,\text{K}^+/\text{H}^+$ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 276: 17387-17394, 2001.
139. **Numata M, Petrecca K, Lake N and Orlowski J.** Identification of a mitochondrial Na^+/H^+ exchanger. *J Biol Chem* 273: 6951-6959, 1998.
140. **O'Neill WC.** Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol* 276: C995-C1011, 1999.

141. **Olender EJ, Fromm D, Furukawa T and Kolis M.** H⁺ disposal by rabbit gastric mucosal surface cells. *Gastroenterology* 86: 698-705, 1984.
142. **Orlowski J.** Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem* 268: 16369-16377, 1993.
143. **Orlowski J and Grinstein S.** Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 22373-22376, 1997.
144. **Orlowski J and Kandasamy RA.** Delineation of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J Biol Chem* 271: 19922-19927, 1996.
145. **Orlowski J, Kandasamy RA and Shull GE.** Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 267: 9331-9339, 1992.
146. **Paillard M.** Na⁺/H⁺ exchanger subtypes in the renal tubule: function and regulation in physiology and disease. *Exp Nephrol* 5: 277-284, 1997.
147. **Paimela H, Kiviluoto T, Mustonen H and Kivilaakso E.** Intracellular pH in isolated Necturus duodenal mucosa exposed to luminal acid. *Gastroenterology* 102: 862-867, 1992.
148. **Paradiso AM, Townsley MC, Wenzl E and Machen TE.** Regulation of intracellular pH in resting and in stimulated parietal cells. *Am J Physiol* 257: C554-61, 1989.
149. **Paradiso AM, Tsien RY and Machen TE.** Digital image processing of intracellular pH in gastric oxyntic and chief cells. *Nature* 325: 447-450, 1987.
150. **Paris S and Pouyssegur J.** Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 258: 3503-3508, 1983.
151. **Paris S and Pouyssegur J.** Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺. *J Biol Chem* 259: 10989-10994, 1984.
152. **Park K, Begenisich T and Melvin JE.** Protein kinase A activation phosphorylates the rat CIC-2 Cl⁻ channel but does not change activity. *J Membr Biol* 182: 31-37, 2001.
153. **Parker JC.** Sodium and calcium movements in dog red blood cells. *J Gen Physiol* 71: 1-17, 1978.
154. **Parker JC, McManus TJ, Starke LC and Gitelman HJ.** Coordinated regulation of Na⁺/H⁺ exchange and [KCl] cotransport in dog red cells. *J Gen Physiol* 96: 1141-1152, 1990.
155. **Perez A, Blissard D, Sachs G and Hersey SJ.** Evidence for a chloride conductance in secretory membrane of parietal cells. *Am J Physiol* 256: G299-G305, 1989.
156. **Perry PB and O'Neill WC.** Swelling-activated K⁺ fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via KCl cotransport and K⁺ channels. *Am J Physiol* 265: C763-C769, 1993.

157. **Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu AA, Wu MS, Exner M, Isenring P, Igarashi P and Aronson PS.** Immunochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4. *Am J Physiol* 275: F510-F517, 1998.
158. **Pouyssegur J, Franchi A, L'Allemain G, Magnaldo I, Paris S and Sardet C.** Genetic approach to structure, function, and regulation of the Na⁺/H⁺ antiporter. *Kidney Int Suppl* 23: S144-55, 1987.
159. **Priver NA, Rabon EC and Zeidel ML.** Apical membrane of the gastric parietal cell: water, proton, and nonelectrolyte permeabilities. *Biochemistry* 32: 2459-2468, 1993.
160. **Rabon E, Cuppoletti J, Malinowska D, Smolka A, Helander HF, Mendlein J and Sachs G.** Proton secretion by the gastric parietal cell. *J Exp Biol* 106: 119-133, 1983.
161. **Reenstra WW and Forte JG.** Characterization of K⁺ and Cl⁻ conductances in apical membrane vesicles from stimulated rabbit oxyntic cells. *Am J Physiol* 259: G850-G858, 1990.
162. **Ribeiro R, Heinke B and Diener M.** Cell volume-induced changes in K⁺ transport across the rat colon. *Acta Physiol Scand* 171: 445-458, 2001.
163. **Robertson MA and Foskett JK.** Na⁺ transport pathways in secretory acinar cells: membrane cross talk mediated by [Cl⁻]_i. *Am J Physiol* 267: C146-C156, 1994.
164. **Roepe PD, Weisburg JH, Luz JG, Hoffman MM and Wei LY.** Novel Cl⁻-dependent intracellular pH regulation in murine MDR 1 transfectants and potential implications. *Biochemistry* 33: 11008-11015, 1994.
165. **Roman RM, Smith RL, Feranchak AP, Clayton GH, Doctor RB and Fitz JG.** ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol* 280: G344-G353, 2001.
166. **Rossmann H, Bachmann O, Vieillard-Baron D, Gregor M and Seidler U.** Na⁺/HCO₃⁻ Cotransport and Expression of NBC1 and NBC2 in Rabbit Gastric Parietal and Mucus Cells. *Gastroenterology* 116: 1389-1398, 1999.
167. **Rossmann H, Sonnentag T, Bachmann O, Siegel W-K, Vieillard-Baron D, Gregor M and Seidler U.** Differential Activation by pH and Hyperosmolarity of NHE1, 2 and 4 in Rabbit Parietal and Mucous Cells. *Pflugers Arch* 1999.
168. **Rossmann H, Sonnentag T, Heinzmann A, Seidler B, Bachmann O, Vieillard-Baron D, Gregor M and Seidler U.** Differential expression and regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in rabbit parietal and mucous cells. *Am J Physiol* 281: G447-G458, 2001.
169. **Saccomani G, Psarras CG, Smith PR, Kirk KL and Shoemaker RL.** Histamine-induced chloride channels in apical membrane of isolated rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 260: C1000-C1011, 1991.
170. **Sachs G.** The parietal cell as a therapeutic target. *Scand J Gastroenterol Suppl* 118: 1-10, 1986.
171. **Sachs G, Carlsson E, Lindberg P and Wallmark B.** Gastric H⁺/K⁺-ATPase as therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 269-284, 1988.
172. **Sackin H.** Stretch-activated ion channels. *Kidney Int* 48: 1134-1147, 1995.

173. **Sardet C, Fafournoux P and Pouyssegur J.** Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na^+/H^+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 266: 19166-19171, 1991.
174. **Sardet C, Franchi A and Pouyssegur J.** Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell* 56: 271-280, 1989.
175. **Sastrasinh M, Young P, Cragoe EJ, Jr. and Sastrasinh S.** The Na^+/H^+ antiport in renal mitochondria. *Am J Physiol* 268: C1227-C1234, 1995.
176. **Scarff KL, Judd LM, Toh BH, Gleeson PA and van Driel IR.** Gastric H^+/K^+ -adenosine triphosphatase beta subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. *Gastroenterology* 117: 605-618, 1999.
177. **Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A and Scholkens BA.** Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 29: 260-268, 1995.
178. **Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Harline M, Boivin GP, Stemmermann G, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML and Shull GE.** Targeted disruption of the murine Na^+/H^+ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* 101: 1243-1253, 1998.
179. **Schwiebert EM, Cid-Soto LP, Stafford D, Carter M, Blaisdell CJ, Zeitlin PL, Guggino WB and Cutting GR.** Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3879-3884, 1998.
180. **Seidler B, Rossmann H, Murray A, Orlowski J, Tse CM, Donowitz M, Shull GE, Gregor M and Seidler U.** Expression of the Na^+/H^+ exchanger isoform NHE1-4 mRNA in the different epithelial cell types of rat and rabbit gastric mucosa. *1997 Digestive Disease Week Abstract Book* 1997.
181. **Seidler U, Carter K, Ito S and Silen W.** Effect of CO_2 on pHi in rabbit parietal, chief, and surface cells. *Am J Physiol* 256: G466-75, 1989.
182. **Seidler U, Roithmaier S, Classen M and Silen W.** Influence of acid secretory state on Cl^- -base and Na^+/H^+ exchange and pHi in isolated rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 262: G81-91, 1992.
183. **Seidler U, Roithmaier S, Hubner M, Lamprecht G, Römer S, Siegel W-K, Albert M, Gaillinger H and Classen M.** Säureproduktion und Regulation des intrazellulären pH in der Parietalzelle. *Z Gastroenterol* 32: 22-26, 1994.
184. **Seidler U, Stumpf P and Classen M.** Interstitial buffer capacity influences Na^+/H^+ exchange kinetics and oxyntic cell pHi in intact frog gastric mucosa. *Am J Physiol* 268: G496-G504, 1995.
185. **Sernka TJ.** Direct hyposmotic stimulation of gastric acid secretion. *Membr Biochem* 9: 1-7, 1990.
186. **Sherry AM, Stroffekova K, Knapp LM, Kupert EY, Cuppoletti J and Malinowska DH.** Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G(2 α) Cl^- channel. *Am J Physiol* 273: C384-C393, 1997.

187. **Shrode LD, Gan BS, D'Souza SJ, Orlowski J and Grinstein S.** Topological analysis of NHE1, the ubiquitous Na⁺/H⁺ exchanger using chymotryptic cleavage. *Am J Physiol* 275: C431-C439, 1998.
188. **Sieck GC, Mantilla CB and Prakash YS.** Volume measurements in confocal microscopy. *Methods Enzymol* 307: 296-315, 1999.
189. **Siegel W-K, Lamprecht G, Bachmann O, Albert M, Weichert A, Gregor M and Seidler U.** Activation of Na⁺/H⁺ exchange by EGF in cultured rabbit parietal cells is mediated by the NHE1 isoform and is necessary for the EGF-induced long-term increase of the acid secretory capacity. *1997 Digestive Disease Week Abstract Book* 1997.
190. **Silviani V, Colombani V, Heyries L, Gerolami A, Cartouzou G and Marteau C.** Role of the NHE3 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger in sodium absorption by the rabbit gallbladder. *Pflugers Arch* 432: 791-796, 1996.
191. **Soleimani M, Singh G, Bizal GL, Gullans SR and McAteer JA.** Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. Expression, functional localization, and differential regulation. *J Biol Chem* 269: 27973-27978, 1994.
192. **Sonnentag T, Siegel WK, Bachmann O, Rossmann H, Mack A, Wagner HJ, Gregor M and Seidler U.** Agonist-induced cytoplasmic volume changes in cultured rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 279: G40-G48, 2000.
193. **Starlinger M, Paradiso AM and Machen TE.** Steady state regulation of intracellular pH in isolated rabbit gastric glands. Roles for Na⁺/H⁺ and Cl⁻/OH⁻ (HCO₃⁻) exchange. *Gastroenterology* 92: 957-965, 1987.
194. **Summers JC, Trais L, Lajvardi R, Hergan D, Buechler R, Chang H, Pena-Rasgado C and Rasgado-Flores H.** Role of concentration and size of intracellular macromolecules in cell volume regulation. *Am J Physiol* 273: C360-C370, 1997.
195. **Takaichi K, Balkovetz DF, Van Meir E and Warnock DG.** Cytosolic pH sensitivity of an expressed human NHE-1 Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol* 264: C944-C950, 1993.
196. **Takaichi K, Wang D, Balkovetz DF and Warnock DG.** Cloning, sequencing, and expression of Na⁺/H⁺ antiporter cDNAs from human tissues. *Am J Physiol* 262: C1069-C1076, 1992.
197. **Taniguchi J and Guggino WB.** Membrane stretch: a physiological stimulator of Ca²⁺-activated K⁺ channels in thick ascending limb. *Am J Physiol* 257: F347-F352, 1989.
198. **Tewari KP, Malinowska DH, Sherry AM and Cuppoletti J.** PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *Am J Physiol* 279: C40-C50, 2000.
199. **Thiemann A, Grunder S, Pusch M and Jentsch TJ.** A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356: 57-60, 1992.
200. **Todisco A, Pausawasdi N, Ramamoorthy S, Del Valle J, Van Dyke RW and Askari FK.** Functional role of protein kinase B/Akt in gastric acid secretion. *J Biol Chem* 276: 46436-46444, 2001.

201. **Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S and Barber DL.** p160ROCK mediates RhoA activation of Na^+/H^+ exchange. *EMBO J* 17: 4712-4722, 1998.
202. **Torres RJ, Altenberg GA, Copello JA, Zampighi G and Reuss L.** Preservation of structural and functional polarity in isolated epithelial cells. *Am J Physiol* 270: C1864-C1874, 1996.
203. **Townsley MC and Machen TE.** $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in rabbit parietal cells. *Am J Physiol* 257: G350-6, 1989.
204. **Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J and Donowitz M.** Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na^+/H^+ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* 267: 9340-9346, 1992.
205. **Tse CM, Levine SA, Yun CH, Brant SR, Pouyssegur J, Montrose MH and Donowitz M.** Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9110-9114, 1993.
206. **Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J and Donowitz M.** Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum- activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na^+/H^+ exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem* 268: 11917-11924, 1993.
207. **Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J and Donowitz M.** Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family. *J Membr Biol* 135: 93-108, 1993.
208. **Urushidani T and Forte JG.** Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *J Membr Biol* 159: 99-111, 1997.
209. **Venosa RA.** Hypo-osmotic stimulation of active Na^+ transport in frog muscle: apparent upregulation of Na^+ pumps. *J Membr Biol* 120: 97-104, 1991.
210. **Volkl H, Busch GL, Haussinger D and Lang F.** Alkalinization of acidic cellular compartments following cell swelling. *FEBS Lett* 338: 27-30, 1994.
211. **Waisbren SJ, Geibel J, Boron WF and Modlin IM.** Luminal perfusion of isolated gastric glands. *Am J Physiol* 266: C1013-27, 1994.
212. **Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J and Shigekawa M.** Mutation of calmodulin-binding site renders Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+ -sensitive and Ca^{2+} regulation defective. *J Biol Chem* 269: 13710-13715, 1994.
213. **Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fafournoux P and Pouyssegur J.** Growth factor activation and " H^+ -sensing" of the Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 5583-5588, 1994.
214. **Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C and Pouyssegur J.** The Na^+/H^+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls " H^+ -sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2424-2428, 1992.

215. **Wakabayashi S, Pang T, Su X and Shigekawa M.** A Novel Topology Model of the Human Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1. *J Biol Chem* 275: 7942-7949, 2000.
216. **Wakabayashi S, Sardet C, Fafournoux P, Counillon L, Meloche S, Pages G and Pouyssegur J.** Structure function of the growth factor-activatable Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 119: 157-186, 1992.
217. **Wakabayashi S, Shigekawa M and Pouyssegur J.** Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 77: 51-74, 1997.
218. **Wallmark B.** Mechanism of action of omeprazole. *Scand J Gastroenterol Suppl* 118: 11-17, 1986.
219. **Wang D, Balkovetz DF and Warnock DG.** Mutational analysis of transmembrane histidines in the amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol* 269: C392-C402, 1995.
220. **Wang KS, Komar AR, Ma T, Filiz F, McLeroy J, Hoda K, Verkman AS and Bastidas JA.** Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol* 279: G448-G453, 2000.
221. **Wang Z, Orlowski J and Shull GE.** Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* 268: 11925-11928, 1993.
222. **Warnock DG, Yang WC, Huang ZQ and Cragoe EJ, Jr.** Interactions of chloride and amiloride with the renal Na⁺/H⁺ antiporter. *J Biol Chem* 263: 7216-7221, 1988.
223. **Weiss H and Lang F.** Ion channels activated by swelling of Madin Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Membr Biol* 126: 109-114, 1992.
224. **Whalley DW, Hool LC, Ten Eick RE and Rasmussen HH.** Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na⁺/K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol* 265: C1201-C1210, 1993.
225. **Winkel GK, Sardet C, Pouyssegur J and Ives HE.** Role of cytoplasmic domain of the Na⁺/H⁺ exchanger in hormonal activation. *J Biol Chem* 268: 3396-3400, 1993.
226. **Wolosin JM and Forte JG.** Kinetic properties of the KCl transport at the secreting apical membrane of the oxyntic cell. *J Membr Biol* 71: 195-207, 1983.
227. **Wolosin JM and Forte JG.** K⁺ and Cl⁻ conductances in the apical membrane from secreting oxyntic cells are concurrently inhibited by divalent cations. *J Membr Biol* 83: 261-272, 1985.
228. **Yan W, Nehrke K, Choi J and Barber DL.** The Nck-interacting kinase (NIK) phosphorylates the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 and regulates NHE1 activation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 276: 31349-31356, 2001.
229. **Yanaka A, Carter KJ, Goddard PJ and Silen W.** Effect of luminal acid on intracellular pH in oxynticopeptic cells in intact frog gastric mucosa. *Gastroenterology* 100: 606-618, 1991.
230. **Yu FH, Shull GE and Orlowski J.** Functional properties of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-2 isoform expressed in Na⁺/H⁺ exchanger-

- deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 268: 25536-25541, 1993.
231. **Yun CH, Tse CM, Nath S, Levine SL and Donowitz M.**
Structure/function studies of mammalian Na⁺/H⁺ exchangers--an update.
J Physiol Lond 482: 1S-6S, 1995.
232. **Yun CH, Tse CM, Nath SK, Levine SA, Brant SR and Donowitz M.**
Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am J Physiol* 269: G1-11, 1995.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Gregor für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Ich danke Frau PD Dr. U. Seidler für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. O. Bachmann und Alexander Heinzmann für die Einführung in die experimentellen Methoden, sowie für die konstruktive und motivierende Unterstützung und Beratung in allen methodischen und thematischen Aspekten.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Heike Runge bedanken für Ihre Unterstützung bei allgemeinen Fragen zur Zellkultur und für die Erarbeitung eines Protokolls für die Zählung der Parietalzellen.

Frau Dr. H. Rossmann und Frau Dr. B. Riederer danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre wissenschaftliche Kritik.

Danken möchte ich auch Herrn Markus Rapedius der immer mitgeholfen hat, wenn technische Probleme zu lösen waren.

Schließlich gilt mein Dank noch der ganzen, hier nicht namentlich erwähnten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und den kollegialen Umgang.

Lebenslauf**Persönliche Angaben:**

Name: Timo Marcel Rieg
Geburtsdatum: 26. November 1973
Geburtsort: Mutlangen (Ostalbkreis)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

1980 – 1984 Grundschole, Schwäbisch Gmünd
1984 – 1991 Schiller-Realschole, Schwäbisch Gmünd
1991 – 1994 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium der
Agnes von Hohenstaufen Schule
Schwäbisch Gmünd

Zivildienst:

1994 – 1995 Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz in
Schwäbisch Gmünd

Studium:

1995 – 1998 Universität Ulm, Studiengang Humanmedizin
1997 Ärztliche Vorprüfung
1998 – 2001 Eberhard Karls Universität Tübingen
Fortsetzung des Medizinstudiums
1998 I. Staatsexamen
2000 II. Staatsexamen
2001 III. Staatsexamen (Gesamtnote: 1,3)
12/2001 – 7/2002 AIP, Universitätsklinik Tübingen, Medizinische Klinik
Abteilung I
Seit 8/2002 Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universitätsklinik Tübingen