

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald  
Abteilung: Molekularpharmakologie  
Leiter: Professor Dr. U. Quast

“Charakterisierung der Wirkung von Angiotensin II auf die  
elektrophysiologischen Eigenschaften  
reninsezernierender Zellen der Rattenniere”

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu  
Tübingen

vorgelegt von  
Alexander Linus Julius Stehle  
aus  
Stuttgart

-2006-

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Ruß

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Huber

für meine Eltern

# 1 Einleitung und Fragestellung

.....	<b>10</b>
1.1 Der Blutdruck und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	10
1.2 Die Anatomie der Niere .....	14
1.3 Die Reninsynthese in der afferenten Arteriole .....	18
1.4 Die Regulation der Reninsekretion .....	19
1.4.1 Die sympathische Innervierung der Niere .....	19
1.4.2 Der Barorezeptormechanismus .....	20
1.4.3 Der Macula Densa Mechanismus oder der tubuloglomerulären Feedback .....	22
1.4.4 Die negative Rückkopplung durch Angiotensin II .....	23
1.4.5 Die intrazelluläre Calciumkonzentration - das Calciumparadox .....	23
1.4.6 Das Membranpotenzial .....	25
1.5 Fragestellung .....	31

# 2 Material und Methoden .....

**33**

2.1 Material und Versuchstiere .....	33
2.1.1 Substanzen .....	33
2.1.2 Lösungen .....	34
2.1.2.1 Perfusionsbadlösungen .....	34
2.1.2.2 Pipettenlösung .....	36
2.1.2.3 Referenzbadlösung .....	36
2.1.2.4 Agarbrückenlösung .....	37
2.1.2.5 Deckglasbeschichtungslösung .....	37
2.1.3 Substanzen, deren Wirkung auf RSZ untersucht wurde: .....	37
2.1.3.1 ANGI: .....	37
2.1.3.2 DIDS: .....	37
2.1.3.3 NFA: .....	38

2.1.3.4	NPPB: .....	38
2.1.4	Geräte .....	38
2.1.5	Zubehör zum Elektrophysiologie Messplatz .....	39
2.1.5.1	Elektroden: .....	39
2.1.5.2	Pipettenhalter: .....	39
2.1.5.3	Perfusionsbad: .....	39
2.1.5.4	Perfusionssystem: .....	39
2.1.6	Versuchstiere .....	40
2.2	Methoden .....	41
2.2.1	Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenten Arteriole .....	41
2.2.2	Durchführung der Patch-Clamp-Experimente .....	42
2.2.2.1	Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes: .....	42
2.2.2.2	Pipetten: .....	45
2.2.2.3	Elektrophysiologische Methoden .....	47
2.2.3	Berechnung des Membranpotenzials: Nernst Gleichung .....	53
2.2.4	Berechnung der Membranfläche aus dem kapazitiven Strom ..	54
2.2.5	Auswertung und Statistik .....	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1	Abhängigkeit des Membranpotenzials und des Membranleitwertes RSZ von der extrazellulären Kaliumkonzentration .....	58
3.2	Wirkung von ANGII auf RSZ .....	63
3.2.1	Wirkung von ANGII (10 nM und 3 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM) .....	64
3.2.2	Wirkung von ANGII (3 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=6,5$ mM) .....	67
3.2.3	Wirkung von ANGII (10 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=10$ mM) .....	70
3.2.4	Wirkung von ANGII (1 nM) mit einer Applikationsdauer von 10 Minuten auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM) .....	73
3.2.5	Wirkung von ANGII (10 nM) auf RSZ in K <sup>+</sup> -HEPES PS ( $[K^+]_o=142$ mM) .....	76

3.3	Hemmung von Kir2.x Kanälen durch Ba <sup>2+</sup> .....	80
3.3.1	Wirkung von Ba <sup>2+</sup> (1 mM) auf RSZ mit 10 mM [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> .....	80
3.3.2	Wirkung von ANGII (10 nM) unter Ba <sup>2+</sup> (1 mM) auf RSZ in [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =2,8 mM .....	83
3.4	Rolle von Chloridionen bezüglich Ruhemembranpotenzial und ANGII- induzierter Depolarisation .....	86
3.4.1	Wirkung von DIDS (0,5 mM) und ANGII (10 nM) auf RSZ .....	86
3.4.2	Wirkung von NFA (100 µM) und ANGII (3 nM) auf RSZ .....	91
3.4.3	Wirkung von NPPB (100 µM) und ANGII (3 nM) auf RSZ .....	95
3.4.4	Wirkung von chloridarmer HEPES-gepufferter Salzlösung (Na- Gluconat-HEPES) und ANGII (10 nM) auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =2,8 mM) .....	101
3.5	Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-Cl- HEPES) und ANGII auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =6,5 mM) .....	105
3.6	Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung und ANGII auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =2,8 mM) .....	107
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	113
3.7.1	Das Membranpotenzial in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration .....	113
3.7.2	Das Membranpotenzial und der Membranleitwert in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration und von ANGII .	114
3.7.3	Das Membranpotenzial und der Membranleitwert unter Barium (1 mM) bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen von 2,8 und 10 mM .....	115
3.7.4	Das Membranpotenzial und der Membranleitwert unter Chloridkanalblockern .....	116
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
4.1	Material und Methoden, mögliche Fehlerquellen .....	117
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	120
4.2.1	Abhängigkeit des Membranpotenzials und des Membranleitwertes RSZ von der extrazellulären Kaliumkonzentration .....	120

4.2.2	Wirkung von ANGII auf RSZ	123
4.3	Hemmung von Kir2.x Kanälen durch Ba <sup>2+</sup>	126
4.4	Rolle von Chloridionen bezüglich Ruhemembranpotenzial und ANGII-induzierter Depolarisation	129
4.4.2	Die Wirkung der Chloridkanalblocker auf die ANGII induzierte Depolarisation	133
4.5	Berechnung der Zellmembranfläche aus den kapazitiven Strömen	135
4.6	Wirkung von chloridarmer HEPES-gepufferter Salzlösung (Na-Gluconat-HEPES) und ANGII auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =6,5 mM)	136
4.7	Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-Cl-HEPES) und ANGII auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =6,5 mM)	137
4.8	Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung und ANGII auf RSZ ([K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> =2,8 mM)	138
4.9	Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die Reninsekretion	139
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>142</b>
<b>6</b>	<b>Referenzen</b>	<b>146</b>

## II Verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANG	Angiotensin
ANGII	Angiotensin II
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	ANGII-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
Ba <sup>2+</sup>	Bariumion
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>o</sub>	extrazelluläre Calciumionenkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Chloridionenkonzentration
Cl <sub>Ca</sub>	calciumaktivierter Chloridkanal
DIDS	Diisothiocyanatostilben-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
K <sub>ATP</sub> -Kanal	Kaliumkanal, der sich durch ATP schließt
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton



K <sub>ir</sub> -Kanal	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
kPa	Kilopascal
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mA	Milliampere
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mV	Millivolt
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NFA	Nifluminsäure
nM	Nanomolar
NPPB	Nitro-phenylpropylaminobenzoessäure
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RSZ	reninsezernierende Zelle
TGF	tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus
VOCC	Spannungsaktivierter Calciumkanal (voltage-operated calcium channel)

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Der Blutdruck und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Ein erhöhter arterieller Blutdruck, die arterielle Hypertonie, ist in den Industrienationen der wichtigste Risikofaktor für Herz-Kreislauf-erkrankungen, welche die häufigsten Todesursachen darstellen. Der arterielle Bluthochdruck ersten Grades ist definiert als systolischer Blutdruck  $>140$  mmHg oder diastolischer Blutdruck  $>90$  mmHg ( $1 \text{ mmHg} = 0,133 \text{ kPa}$ ). Diese Referenzwerte basieren auf Berechnungen des abgeschätzten koronaren und kardiovaskulären Risikos für Patienten über einen kurzen Zeitraum, z. B. 5 oder 10 Jahre (Zanchetti et al., 2003, S.1013). Ein erhöhter Blutdruck macht typischerweise keine Symptome, ist einfach zu messen und ist in der Regel einfach zu senken.

Obwohl die Physiologie der Blutdruckregulation und die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie seit langem erforscht werden, bleiben bei 90 bis 95 % der Patienten die Ursachen der Erkrankung unklar (Harrison T. et al., 2002; Seite 1414). Die Diagnose lautet: primäre (idiopathische/essenzielle) arterielle Hypertonie.

Sie kommt familiär gehäuft vor (Korrelationskoeffizient: 0,2; Harrison T. et al., 2001; Seite 1415). Auch Faktoren wie erhöhte Salzzufuhr, Alkoholkonsum und Übergewicht erhöhen das Risiko an einer primären arteriellen Hypertonie zu erkranken.

Im Gegensatz zur primären Hypertonie lässt sich bei der sekundären arteriellen Hypertonie definitionsgemäß eine spezifische Ursache ausmachen. Renale Erkrankungen wie die Nierenarterienstenose oder endokrine Störungen wie der primäre Hyperaldosteronismus sind die häufigsten Ursachen.

Nicht nur ein zu hoher, sondern auch ein zu niedriger arterieller Blutdruck schadet dem Organismus. Er ist eingeschränkt bei der Bewältigung von Belastungssituationen (fight and flight) oder es kommt sogar zur Minderversorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff.

Der Organismus muss also in der Lage sein, den Blutdruck den Erfordernissen

anzupassen, das Extrazellulärvolumen konstant zu halten und dabei von äußeren Faktoren wie Flüssigkeits- oder Salzzufuhr möglichst unabhängig sein.

Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zu.

Es ist eines der phylogenetisch ältesten Hormonsysteme und spielt neben dem Sympathikus eine zentrale Rolle bei der Regulation von Blutdruck sowie Wasser- und Elektrolythaushalt. Das RAAS wird vor allem durch Blutdruckabfall und Salz- mangel aktiviert. Die Folge ist eine Zunahme des arteriellen Blutdrucks, des Herz- minutenvolumens, der kardialen Vor- und Nachlast und eine Steigerung der Wasser- und Natriumrückresorption in der Niere (Abb. 1).

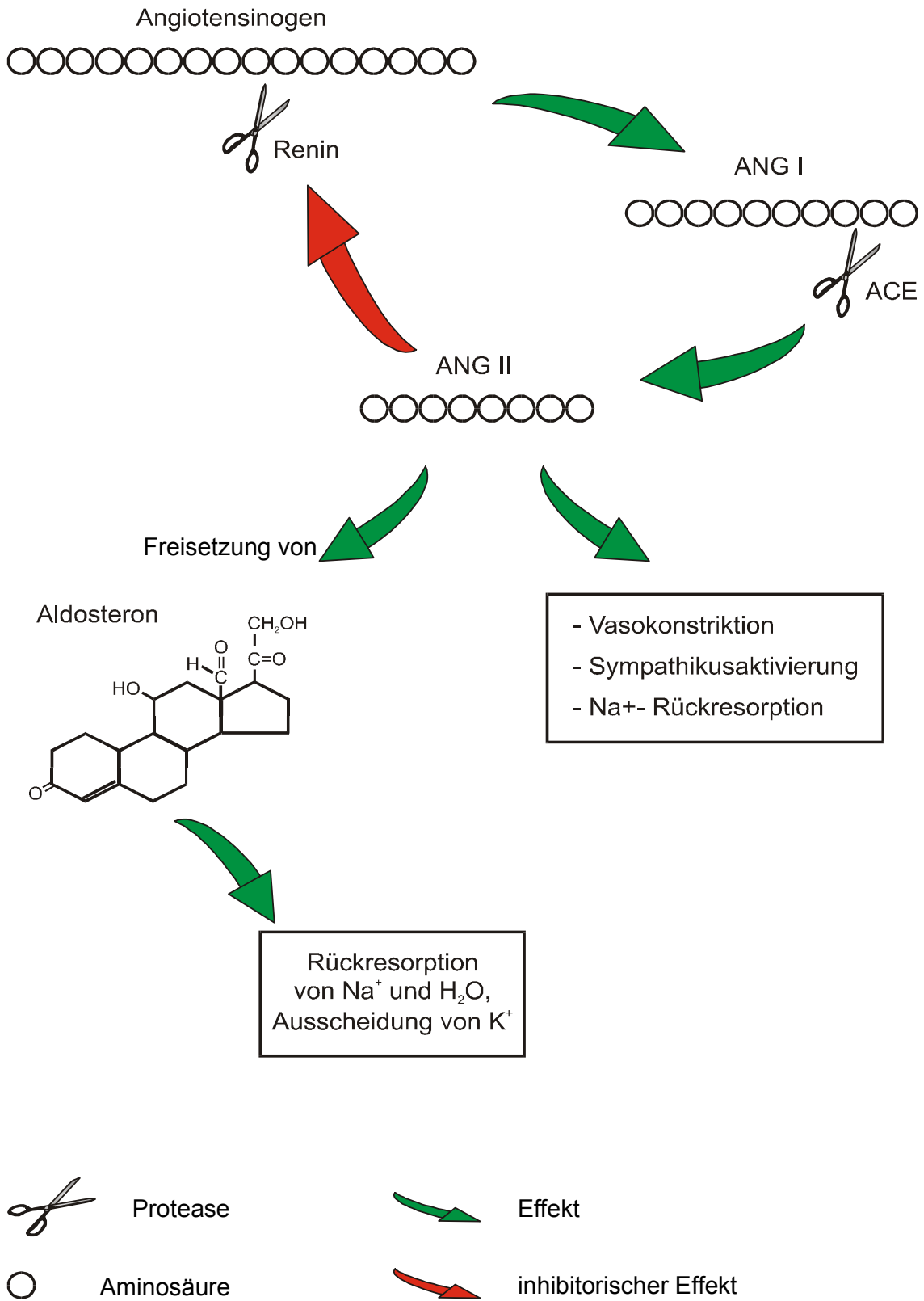
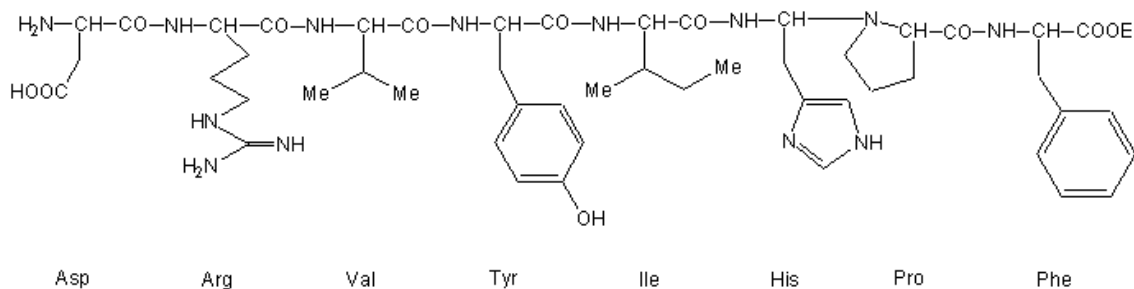


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (nach Rauch, 2000)

Im Folgenden soll das RAAS und insbesondere die Regulation der Reninsekretion genauer erläutert werden.

Die aktive Form der Aspartylprotease Renin ist ein Glykoprotein aus 340 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 37 - 40 kDa. Es wird hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen in der Niere als Präprorenin synthetisiert, bestehend aus 406 Aminosäuren, das in das inaktive Prorenin umgewandelt wird. Prorenin wird durch Abspaltung von 43 Aminosäuren am N-terminalen Ende in die aktive Form der Protease überführt. Renin spaltet mit hoher Substratspezifität von seinem einzigen bekannten Substrat, dem in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen, das Dekapeptid Angiotensin I (ANGI) ab, aus dem dann durch weitere Abspaltung eines Dipeptids mit Hilfe der Protease Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>; Angiotensin (1-8); ANGII) entsteht (Abb. 2).



**Abb. 2:** Angiotensin II

Das ACE wird in vielen Geweben synthetisiert und ist hauptsächlich auf dem Endothel von Lungengefäßen und im Plasma zu finden. Die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion im RAAS ist die durch Renin katalysierte Bildung von ANGI aus Angiotensinogen.

ANGII ist das wichtigste Effektorpeptid im RAAS. Es wirkt über G-Protein gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptoren in hohen Konzentrationen (>nM) vasokonstriktorisch auf die Gefäßmuskulatur ("Angiotensin"), führt zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, zum Wachstum von Herzmuskelzellen und zur Zellproliferation. Dieser Rezeptor kann durch Substanzen, die Sartane genannt werden, selektiv geblockt werden.

Aldosteron, ein Mineralokortikoid, führt letztendlich zur Erhöhung der Na<sup>+</sup>- und

Wasserrückresorption im distalen Nierentubulus, was eine Zunahme des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und eine  $K^+$ -Ausscheidung zur Folge hat.

Insgesamt führt also eine Aktivierung des RAAS zu einer Erhöhung des Blutdrucks und der Plasmanatriumkonzentration und einer Abnahme der Plasmakaliumkonzentration.

Eine überschießende Aktivierung des RAAS wird physiologischerweise kurzfristig verhindert durch die negative Rückkopplung, indem ANGII die Reninfreisetzung inhibiert. Langfristig wird die überschießende Aktivierung durch eine verminderte Freisetzung von Renin bei erhöhtem Blutdruck verhindert.

Im RAAS ist die Reninsekretion der Niere die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Ein besseres Verständnis dieses Mechanismus könnte einen therapeutischen Eingriff in dieses System bei Patienten mit (hochreninämischem) Bluthochdruck bereits spezifisch auf dieser Ebene erlauben. Dann würden zur Unterdrückung des RAAS neben den Sartanen ( $AT_1$ -Blockern = Blocker des ANGII-Rezeptor Typ 1), den ACE-Hemmern (Inhibitoren des Angiotensin I-Converting-Enzyms), den Aldosteronantagonisten und den  $\beta$ -Adrenozeptorblockern (Hemmung der Sympathikus vermittelten cAMP-Bildung und damit Verminderung der Reninfreisetzung) weitere Pharmaka zur Blutdrucksenkung zur Verfügung stehen.

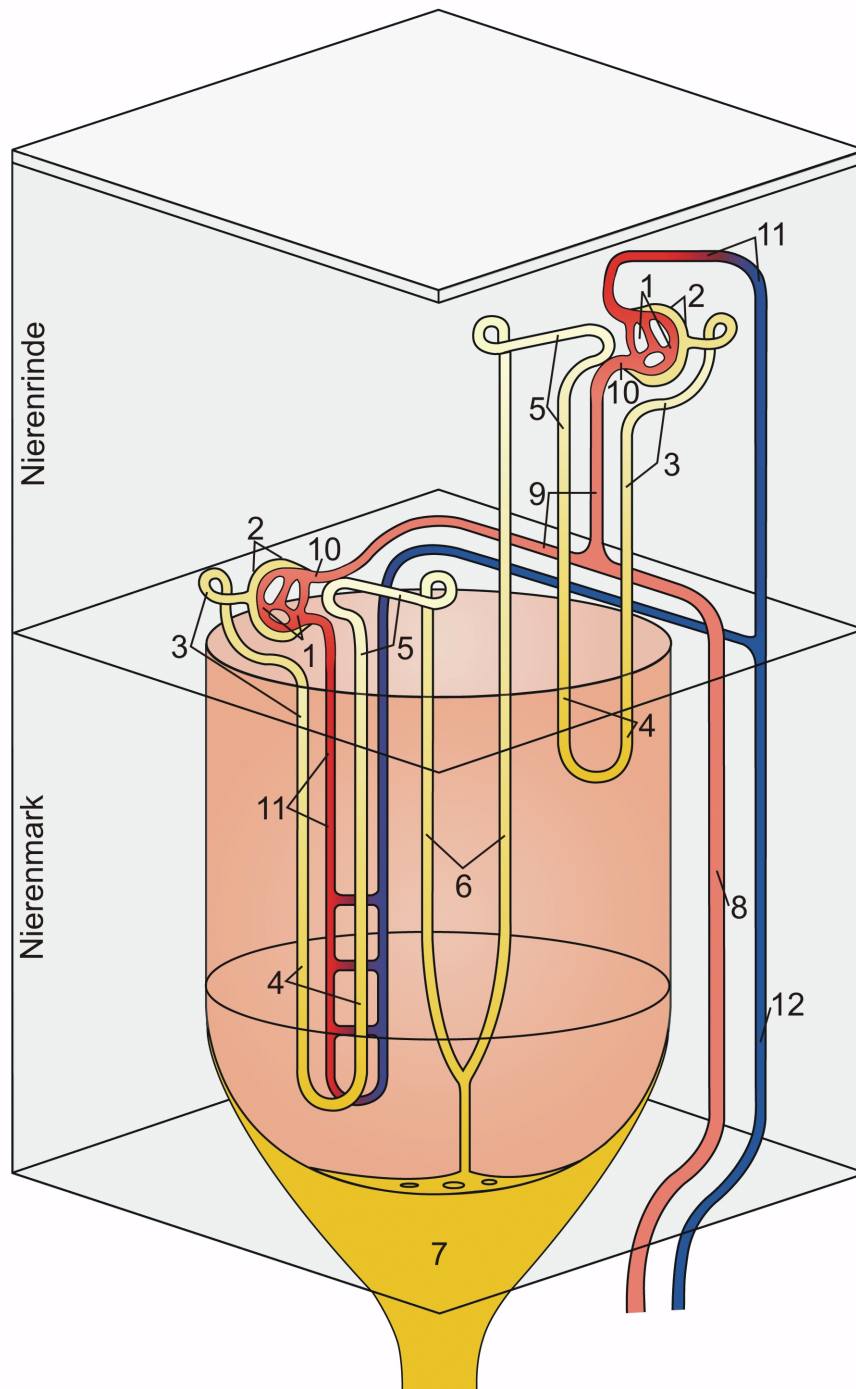
## 1.2 Die Anatomie der Niere

Die morphologische und funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Von diesen Einheiten enthält jede menschliche Niere etwa 1-1,2 Millionen. Jedes Nephron besteht aus dem Glomerulum (Nierenkörperchen; Abb. 3(1), 4), der Bowman-Kapsel (2), an der der proximale Tubulus (3) seinen Ursprung hat, der Henle-Schleife (4), dem distalen Tubulus (5) und dem Sammelrohr (6).

Die Hauptaufgabe der Nephronen besteht darin, das Blut zu filtrieren (Glomeruläre Filtrationsrate: 180 Liter Primärharn pro Tag), das Filtrat zu konzentrieren, dessen Zusammensetzung zu regulieren und den entstandenen Endharn (ca. 1,5 l/d) über die Nierenkelche (7) dem Harnleiter zuzuführen.

Die Blutversorgung der Niere erfolgt durch die Arteria renalis, die aus der Aorta

entspringt und sich nach ihrem Eintritt in die Niere über den Nierenhilus und das Nierenbecken in die Arteriae interlobares (8), daraus in die Arteriae arcuatae und schließlich in die Arteriae interlobulares (9) verzweigt. Aus diesen entspringen schließlich die afferenten Arteriolen (Vasa afferentia) (10), die sich zu Kapillarnetzen aufzweigen, welche die Nierenkörperchen bilden. In diesen Kapillarnetzen wird aus dem Plasma der Primärharn filtriert. Die Kapillaren vereinigen sich anschließend wieder zu den efferenten Arteriolen (11).

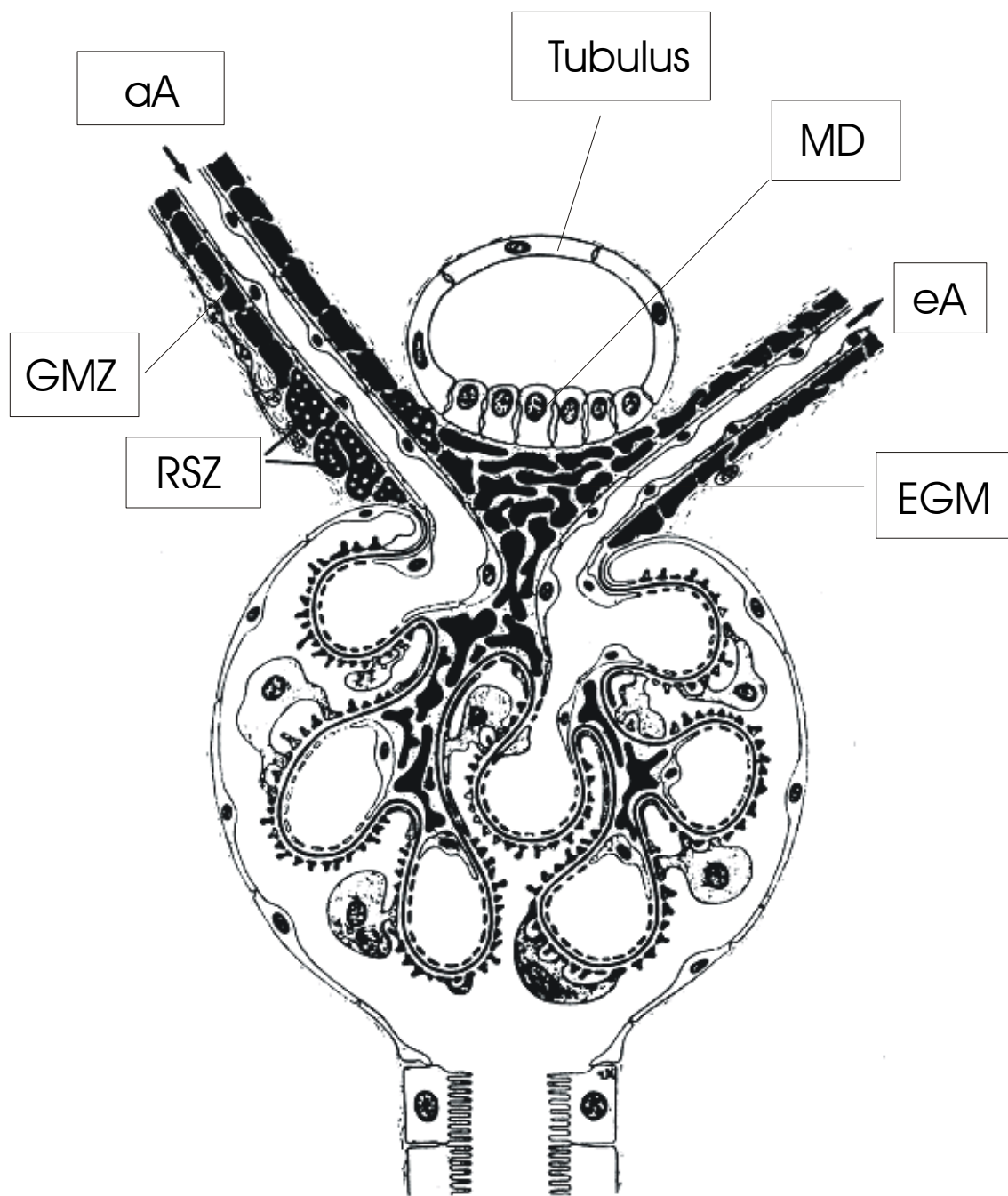


**Abb. 3:** Quaderförmiger Ausschnitt der Niere mit zwei Nephronen:

Jedes Nephron besteht aus dem Glomerulum (1), der Bowman-Kapsel (2), an der der proximale Tubulus (3) seinen Ursprung hat, der Henle-Schleife (4), dem distalen Tubulus (5) und dem Sammelrohr (6). Die Nephronen filtern das Blut, konzentrieren das Filtrat (Harn) und führen es über die Nierenkelche (7) dem Harnleiter zu.

Die Blutversorgung der Niere erfolgt über die Arteria renalis, die Arteria interlobaris (8) und die Arteriola interlobularis (9). Aus den Arteriolen interlobulares entspringen die Vasa afferentia (10), die sich zu den Glomerulumkapillaren aufspalten. Diese münden dann in die Vasa efferentia (11), die in die Vena interlobaris (12) münden. Grafik: Barbara Stehle.





**Abb. 4:** Schematischer Querschnitt durch ein Glomerulum und den juxtaglomerulären Apparat. Die granulierten reninsekretierenden Zellen (RSZ) sind in der Media der afferenten Arteriole (aA) lokalisiert. Proximal von ihnen liegen glatte Muskelzellen (GMZ). Extraglomeruläre Mesangiumzellen (EMZ) sowie die Macula densa Zellen (MD) sind am vaskulären Pol zwischen afferenter und efferenter Arteriole (eA) lokalisiert (nach Koushanpour und Kriz, 1986).

Der Primärharn wird in der Bowman-Kapsel aufgefangen und im proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus in seiner Zusammensetzung verändert. Der distale Tubulus steht über die Macula densa mit dem eigenen „Ursprungs“-Glomerulum am Gefäßpol in Kontakt (Abb. 4). An der Macula densa wird die NaCl Konzentration des Filtrates gemessen und die glomeruläre Filtrationsrate sowie die Reninsekretionsrate angepasst. Eine niedrige NaCl-Konzentration (<30 mM) an der Macula densa führt zur Erhöhung der GFR, eine hohe NaCl-Konzentration führt zur Senkung der GFR. Dieser Mechanismus wird auch als tubulo-glomerulärer Feedback bezeichnet.

Der Harn fließt dann vom distalen Tubulus in das Sammelrohr, wo die NaCl-Endharnkonzentration über Aldosteron reguliert wird.

### **1.3 Die Reninsynthese in der afferenten Arteriole**

Die Reninsynthese findet hauptsächlich in der Tunica media des distalen Teils der afferenten Arteriolen statt. Dort befinden sich 10 - 100 µm proximal des Eintritts in das Glomerulum, wie in geringem Maße auch in der efferenten Arteriole, die reninsezernierenden Zellen. Sie können sich in glatte Muskelzellen umwandeln (Sequeira Lopez et al., 2001), sind mit vielen Fortsätzen versehen, weisen kaum Myofilamente auf und haben im Zytoplasma sehr viele Renin granula eingelagert (Hackenthal et al., 1990).

In einer afferenten Arteriole ist die Länge des reninpositiven Bereiches über die Zeit nicht konstant, sie kann sich an unterschiedliche physiologische Bedingungen neu anpassen. So verursacht eine salzarme Diät, dass auch weiter proximal gelegene glatte Muskelzellen in reninsezernierende Zellen umgewandelt werden (metaplastische Transformation, Cantin et al., 1977). Umgekehrt kann es aber auch zu einer Umwandlung von reninsezernierenden Zellen in glatte Muskelzellen kommen (metaplastische Retransformation, Hackenthal et al., 1990). Das bedeutet, dass sich permanent Zellen im Wandel befinden, sogenannte intermediäre (teilweise umgewandelte) Zellen, die bezüglich ihrer Morphologie und Funktion zwischen glatten Muskelzellen und reninsezernierenden Zellen anzusiedeln sind (Hackenthal et al., 1990).

Außerhalb der Nieren wird Renin auch im Uterus, im Gehirn, in der Leber und vielen anderen Geweben synthetisiert. Dort wirkt es aber primär lokal, während das in der Niere gebildete Renin endokrine, d.h. systemische Wirkung besitzt. Eine beidseitige Nephrektomie (Entfernung der Nieren) führt folglich zu unmessbar geringen Reninkonzentrationen im Plasma.

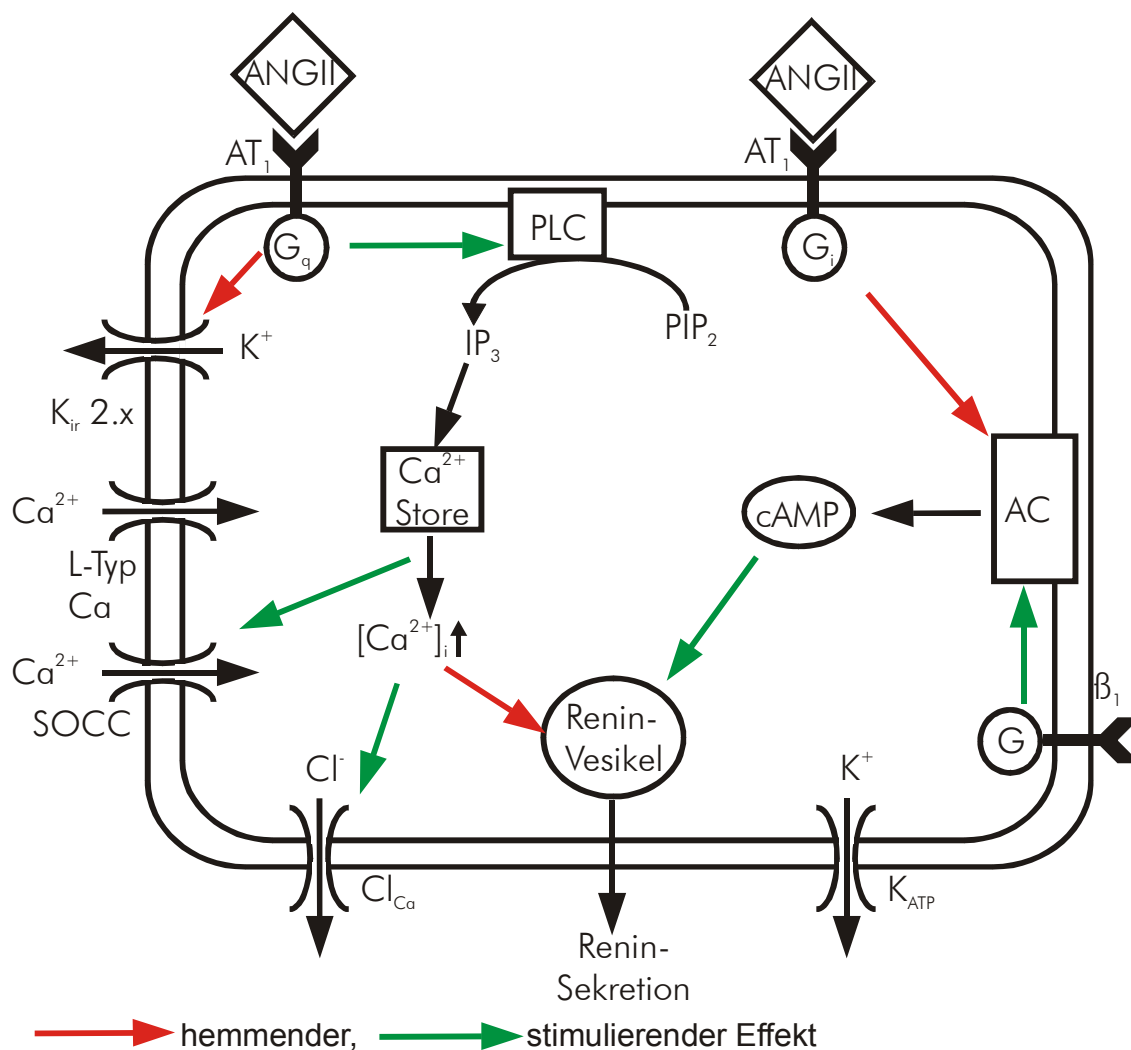
#### **1.4 Die Regulation der Reninsekretion**

Die physiologische Regulation der Reninsekretion lässt sich in vier Ebenen gliedern:

- die neuronale/nervale Ebene: die sympathische Innervierung der Niere
- die mechanische Ebene: den Barorezeptormechanismus
- die Ebene der Salzkonzentration im Tubulus: den Macula Densa-Mechanismus
- die humorale/endokrine Ebene: die negative Rückkopplung durch ANGII mit ihren Auswirkungen auf
  - die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration
  - und das Membranpotenzial

##### **1.4.1 Die sympathische Innervierung der Niere**

Die Aktivierung der sympathischen Nerven in der Niere führt über  $\beta_1$ -Adrenozeptoren zur Stimulation der Reninsekretion (Übersicht Hackenthal et al., 1990; Taher et al., 1976, zitiert in Kurtz, 1989). Die Aktivierung der  $\beta$ -Adrenozeptoren führt zur Stimulation der Adenylatcyclase (AC; Abb. 5), was einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirkt (Kurtz, 1984, zitiert in Kurtz, 1989). cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) stellt einen wichtigen Stimulator der Reninsekretion dar. Der Sympathikotonus hat somit einen starken Effekt auf die Reninfreisetzung. Er setzt schon bei einer geringeren Aktivität des Sympathikus ein als derjenigen, die für die Natriumretention oder die renale Vasokonstriktion nötig ist (DiBona und Kopp 1997 zitiert in Unger und Schölkens, 2004, Seite 9).



**Abb. 5:** Signaltransduktion in reninsezernierenden Zellen

AC, Adenylatcyclase; ANG II, Angiotensin II; AT<sub>1</sub>, Angiotensin II-Rezeptor Typ 1; β<sub>1</sub>, β<sub>1</sub>-Adrenorezeptor; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; Cl<sub>Ca</sub>, Chloridkanal, der durch Calcium geöffnet wird; G<sub>i</sub>, inhibitorisches G-Protein; G<sub>q</sub>, G-Protein, das PLC aktiviert; K<sub>ATP</sub>, Kaliumkanal, der durch ATP geschlossen wird; K<sub>ir</sub> 2.x, einwärtsgerichteter Kaliumkanal Typ 2.x; L-Typ Ca<sup>2+</sup>, spannungsabhängiger Calciumkanal; PLC, Phospholipase C; SOCC, store operated Ca<sup>2+</sup> channel. Über die Bindung von ANG II an den G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird der K<sub>ir</sub> 2.x inaktiviert (Folge: Membrandepolarisation) und die PLC aktiviert (Folge: Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-triphosphat) und Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern (Ca<sup>2+</sup>-Stores)). Über die Bindung von ANG II an den G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird die AC inaktiviert, was die Bildung von cAMP hemmt. (modifiziert aus Laske-Ernst J., 2003)

#### 1.4.2 Der Barorezeptormechanismus

Ein niedriger arteriellen Blutdrucks in der Niere führt zur Freisetzung von Renin, ein hoher arterieller Blutdruck hemmt die Freisetzung von Renin (Hackenthal et al., 1990). Dieser Mechanismus wird die Autoregulation der Niere genannt. Er sorgt dafür, dass der systemische Blutdruck so eingestellt wird, dass der Blut-

druck am Glomerulum und somit die glomeruläre Filtrationsrate weitgehend konstant bleibt. Der Barorezeptormechanismus ist unabhängig von der sympathischen Innervierung der Niere.

Die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole sind empfindlich für Dehnungsreize. Ein Anstieg des intravasalen Drucks erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration, was zur Kontraktion der Arteriole und zur Senkung der Reninfreisetzung führt (Unger und Schölkens, 2004; Seite 9).

Für die Signaltransduktion von mechanischen Reizen der Membran zur Regulation der Reninsekretion wird eine Änderung des Membranpotenzials angenommen (Fray und Lush, 1984, zitiert in Kurtz, 1989). Reninsezernierende Zellen können sich in glatte Muskelzellen umwandeln, und für glatte Muskelzellen wurde gezeigt, dass Dehnung durch die Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle eine Membrandepolarisation nach sich zieht (Übersicht Kurtz, 1989). Diese Depolarisation könnte einen direkten hemmenden Einfluß auf die Reninsekretion haben und/oder über einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch spannungsaktivierte L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VOCC) zum Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen. In diesem Zusammenhang konnten Jones-Dombi und Churchill (Jones-Dombi und Churchill, 1993) zeigen, dass diese durch zunehmenden Perfusionsdruck ausgelöste Hemmung der Reninsekretion nach Blockade der spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mit spezifischen Blockern wie Nifedipin, Diltiazem und Verapamil aufgehoben wurde. Sie nehmen dies als Beweis für die Anwesenheit spannungsaktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in den reninsezernierenden Zellen, die am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in reninsezernierende Zellen nach Membrandepolarisation beteiligt sind. Feng, Li und Navar (2003) konnten eine Dilatation perfundierter juxtamedullärer Vasa afferentia durch den L-Typ Calciumkanalblocker Diltiazem und den T-Typ Calciumkanalblocker Pimozide nachweisen. Sie schließen daraus, dass L- und T-Typ Calciumkanäle in Kooperation an der Regulation des Gefäßtonus im Vas afferens beteiligt sind.

Die Stimulation der Reninfreisetzung durch die Abnahme des Drucks in der afferenten Arteriole erklärt den Anstieg des systemischen arteriellen Blutdrucks bei Patienten mit einer Nierenarterienstenose (sekundäre arterielle Hypertonie).

### 1.4.3 Der Macula Densa Mechanismus oder der tubuloglomerulären Feedback

1937 bemerkte Goormaghtigh (Goormaghtigh, 1939) die enge Nachbarschaft zwischen den Macula Densa (MD)-Zellen (Siehe Abb. 4) und der afferenten und efferente Arteriole desselben Nephrons und vermutete daraufhin einen Zusammenhang zwischen der Elektrolytzusammensetzung der tubulären Flüssigkeit an der MD und der Reninsekretionsrate. Die MD-Zellen sind Tubuluszellen im aufsteigenden Ast der Henle Schleife direkt am Übergang zum distalen Tubulus. Sie stehen zwar in engem Kontakt mit der afferenten und der efferenten Arteriole, sind aber nicht direkt mit ihnen verbunden. Zwischen den MD-Zellen und der afferenten bzw. efferenten Arteriole befinden sich extraglomeruläre Mesangiumzellen, die jedoch alle untereinander aber auch mit den Zellen der afferenten Arteriolen über gap-junctions verbunden sind. MD-Zellen erfassen Veränderungen in der tubulären Elektrolytzusammensetzung.

Die NaCl-Konzentration an der MD ist wesentlich geringer (ca. 30 mM) als im Plasma. Bei Schwankungen des Salzhaushaltes im Körper kommt es zu Veränderungen der Natriumrückresorption im proximalen Tubulus, was wiederum zu Änderungen der tubulären NaCl-Konzentration an der Macula Densa führt.

Eine Zunahme der NaCl-Konzentration in diesem Bereich hat dann zwei Effekte: Zum einen kommt es zur Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, zum anderen zur Hemmung der Reninsekretion (Weihprecht et al., 1990).

Eine Abnahme der NaCl-Konzentration an der MD führt hingegen zu einer Abnahme der Konzentration von Mediatoren wie ATP, Adenosin und NO und zu einer Zunahme von Mediatoren wie Prostaglandin PGE<sub>2</sub>. Diese Veränderungen bewirken eine Dilatation der afferenten Arteriole und eine Stimulation der Reninfreisetzung. Dieser Mechanismus hält die GFR konstant (Unger und Schölkens, 2004, Seite 9). Man nennt ihn auch den tubuloglomerulären Feedback (TGF). Der genaue Mechanismus des TGF ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch starke Hinweise, dass das initiale Signal ein transepithelialer Ionentransport über den in der luminalen Membran der MD-Zellen lokalisierten Na<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup>-Cotransporter ist (Bell et al., 2003).

Insbesondere Adenosin in seiner Wirkung über Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren ist an der Signaltransduktion des TGF beteiligt (Osswald et al., 1978). In Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-knock-out Mäusen fällt nämlich auch bei hohen NaCl-Konzentrationen an der MD der TGF aus.

#### **1.4.4 Die negative Rückkopplung durch Angiotensin II**

Untersuchungen haben gezeigt, dass intravenös appliziertes ANGII die basale und die stimulierte Reninfreisetzung auch dann hemmt, wenn der arterielle Druck in der Niere konstant gehalten wird. ANG II übt also einen direkten Einfluss auf die Reninsekretion aus (Übersicht Hackenthal et al., 1990).

ANG II hemmt die Reninsekretion über Bindung an den  $AT_1$ -Rezeptor (Kakinuma et al., 1993; Chatziantoniou et al., 1994), der in der afferenten Arteriole immunhistochemisch und molekularbiologisch nachgewiesen wurde (Miyata et al., 2000). Der  $AT_1$ -Rezeptor (ANG II-Rezeptor Typ 1) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der zum einen über  $G_q/G_{11}$  die PLC aktiviert, was zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacetylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) führt. Zum anderen wird die Adenylatcyclase über  $G_i$  gehemmt, was durch eine Verminderung der cAMP Konzentration die Reninsekretion hemmt.

Die in der Therapie bei arterieller Hypertonie eingesetzten Sartane ( $AT_1$ -Blocker) hemmen zwar die Freisetzung von Aldosteron in der Nebennierenrinde, vermindern aber auch die negative Rückkopplung, die ANGII auf RSZ ausübt. Sartane führen daher zu einer Blutdrucksenkung trotz des Anstiegs der Plasmakonzentrationen von Renin, ANGI und ANGII (Unger und Schölkens, 2004, Seite 424; zitiert Azizi et al. (1999) und Mazzolai et al. (1999)).

#### **1.4.5 Die intrazelluläre Calciumkonzentration - das Calciumparadox**

$IP_3$  bewirkt die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, was einen transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Peak-Phase) zur Folge hat (Griendling et al., 1989, zitiert in Timmermans et al., 1993). Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1989, 1989) zeigten an reninsezernierenden Zellen der Maus, dass diesem  $Ca^{2+}$ -An-

stieg-Peak ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum folgt (Plateau-Phase). Normalerweise ist in sekretorisch aktiven Zellen ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit einer Sekretionssteigerung verbunden und umgekehrt (Transmitterfreisetzung an Synapsen, Insulinfreisetzung aus  $\beta$ -Zellen im Pankreas).

Bei reninsezernierenden Zellen gibt es jedoch ein Phänomen, das als „Calciumparadox“ bezeichnet wird: Ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hemmt die Reninsekretion, ein Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stimuliert sie (Churchill, 1985, 1990). Berücksichtigt man, dass Renin die ANGII-Konzentration erhöht, ANGII wiederum zu einem Blutdruckanstieg und zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führt, was die Reninsekretion wieder drosselt, ist das „Calciumparadox“ als negativer Feed-Back-Mechanismus sinnvoll.

In vielen Arbeiten zur Wirkung von ANGII wird nicht zwischen reninsezernierenden Zellen und weiter proximal liegenden glatten Muskelzellen unterschieden, wobei letztere wahrscheinlich überwiegen. Bei glatten Muskelzellen aus Arteriolen sind zwei Mechanismen für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu erwarten:

1. die Entleerung der Speicher über  $\text{IP}_3$  (Peak-Phase) und 2. über Membrandepolarisation (evtl. über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle), die zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ führt (Plateau-Phase).

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



beruht, aus einer schnellen und einer langsamen Komponente besteht, von denen die langsame, nicht aber die schnelle durch Nifedipin zu verhindern war (Takenaka et al., 2002).

Eine dritte Möglichkeit (3.), über die  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen einströmen und zum Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen könnte, sind die speicheraktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Sind die intrazellulären Calciumspeicher leer, werden die in der Plasmamembran liegenden speicheraktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch ein unbekanntes Signal aktiviert.

Es gibt drei Hypothesen über das Calciumparadox, also über die Hemmung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Reninsekretion.

1. Hypothese: In reninsezernierenden Zellen der Maus ein  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom nachgewiesen ist (Kurtz und Penner, 1989), der zusammen mit einem kompensatorischen Ausströmen von Kaliumionen (z. B. durch  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle) zur Abnahme der intrazellulären Osmolarität und damit zu einem Schrumpfen der Zelle führt. Ein Schrumpfen der Zelle inhibiert die Reninsekretion, ein Schwellen stimuliert die Reninsekretion (Skøtt, 1988).

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

3. Hypothese: Die Reninsekretionsrate ist hauptsächlich vom Membranpotenzial abhängig und der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration spielt eine untergeordnete Rolle (Kurtz et al., 2000).

#### **1.4.6 Das Membranpotenzial**

Wie in den meisten Zellen ergibt sich das Ruhemembranpotenzial auch bei RSZ aus dem elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran, der durch die Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) folgendermaßen aufrechterhalten wird.

Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  verbraucht 1 Mol ATP (Adenosintriphosphat), um 3 Mol Natriumionen aus der Zelle und 2 Mol Kaliumionen in die Zelle zu transportieren. Es entsteht ein elektrischer Gradient (intrazellulär negatives Potenzial), da mehr Kationen aus der Zelle als in die Zelle transportiert werden. Außerdem entsteht ein chemischer Gradient über die Zellmembran mit hohen Kaliumkonzentrationen intrazellulär und niedrigen Kaliumkonzentrationen extrazellulär. Dieser chemische Gradient gleicht sich über Kaliumionen, die die Zelle durch Kaliumkanäle verlassen, so lange aus, bis das intrazellulär negative Potenzial, also die „Anziehungskraft für Kationen“, so groß wird, dass netto kein Kaliumion mehr die Zelle verläßt.

Das durch die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aus der Zelle transportierte Natrium strömt zum Teil über den Natrium/Calcium-Austauscher wieder in die Zelle ein. Unter anderem dadurch erreicht die Zelle ihre niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration.

Grundsätzlich kann das Membranpotenzial intakter Zellen in die hyperpolarisierende (z.B. von -65 mV auf -80 mV) als auch in die depolarisierende Richtung ( z.B. von -65 mV auf -30 mV) verschoben werden. Das Membranpotenzial ist eine wichtige Determinante für die Sekretionsrate aller sekretorischen, so auch reninsezernierender Zellen und liegt bei diesen in Ruhe zwischen -55 und -73 mV, wie folgende Tabelle zeigt:

$E_m$  in reninsezernierenden Zellen:

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

Erhöht man die extrazelluläre Kaliumkonzentration, depolarisieren die Zellen gemäß dem Kalium-Gleichgewichtspotenzial (Siehe Kapitel 2.2.3). Die Zellmembran hat also eine hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen. Kurtz und Penner (1989) konnten durch Ganzzellmessungen zeigen, dass das Membranpotenzial

hauptsächlich von einwärts-gerichteten Kaliumkanälen abhängt, die in geöffnetem Zustand die Zellen auf ihrem Ruhemembranpotenzial stabilisieren. Das Membranpotenzial hat einen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$  (z. B. über VOCC,  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher), andererseits beeinflussen auch Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  das Membranpotenzial. So konnten Kurtz und Penner (1989) zeigen, dass eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf 200 nM reninsezernierende Zellen depolarisiert, indem ein  $Ca^{2+}$ -abhängiger  $Cl^-$ -Kanal aktiviert wird. Dies führt zum Ausstrom von  $Cl^-$  aus dem Zytosol, da das  $Cl^-$ -Gleichgewichtspotential weniger negativ ist als das Ruhemembranpotenzial ( $E_{Cl}$  in glatten Muskelzellen zw. -30 und -6 mV; Large und Wang, 1996).

Die Depolarisation mit Kalium bewirkt eine Hemmung der Reninsekretion, wie in der isoliert perfundierten Rattenniere, an Nierenschnitten sowie an isolierten Rattenglomerula gezeigt werden konnte (Churchill, 1995). Dieser hemmende Effekt auf die Reninsekretion durch Erhöhung von  $[K^+]_o$  und folgender Membrandepolarisation ist von einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom begleitet, der durch Blockade der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle mit Nifedipin verhindert wurde (Churchill, 1995).

Die Anwesenheit spannungsaktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle in reninsezernierenden Zellen, durch die eine Membrandepolarisation einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom bewirken würde, wird trotz der oben genannten Experimente mit Nifedipin bislang noch kontrovers diskutiert. In glatten Muskelzellen sind VOCCs aber auf jeden Fall vorhanden. Da RSZ mit glatten Muskelzellen über gap-junctions elektrisch gekoppelt sind, geht eine Depolarisation immer mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration einher. Um VOCC in RSZ funktionell sicher nachzuweisen, müssen die Zellen zunächst durch Schließen der gap-junctions elektrisch entkoppelt werden (Friis et al., 2003).

In erregbaren Zellen ist eine Membrandepolarisation immer mit einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  verbunden. Es bleibt die Frage, ob eine Depolarisation auch ohne eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zur Hemmung der Reninsekretion führt.

Eine Hyperpolarisation RSZ mit  $K_{ATP}$ -Kanalöffnern bewirkt eine Steigerung der Reninsekretion (Osswald und Quast, 1995). Diese Hyperpolarisation wurde auch

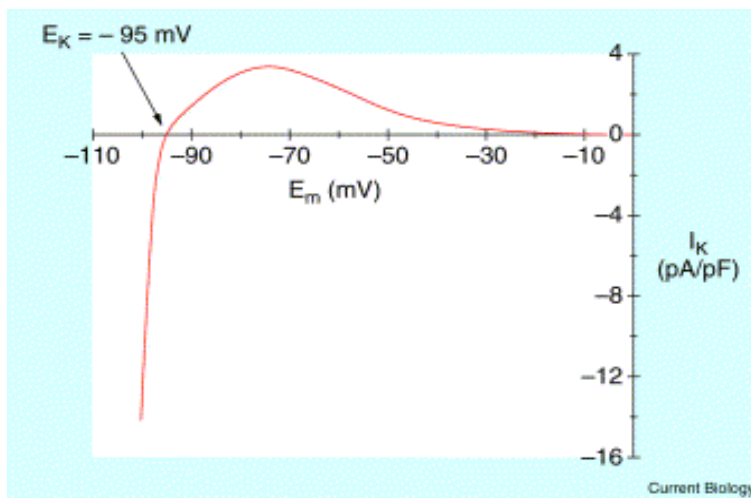
für afferente Arteriolen an isolierten Glomerula der Ratte nachgewiesen. Die  $[Ca^{2+}]_i$  änderte sich dabei nicht (Russ et al., 1999). Ferrier et al. (Ferrier et al., 1989) konnten mit dem  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Cromakalim eine Stimulation der Reninsekretion in gesunden Probanden und an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte nachweisen, was von Jensen et al. (Jensen et al., 1998) bestätigt wurde. Umgekehrt hemmt Glibenclamid, der klassische Hemmstoff dieser Kanäle, die Reninsekretion in vivo (Richer et al., 1990; Pratz et al., 1991). Ob allerdings die Modulatoren des  $K_{ATP}$ -Kanal die Reninsekretion durch Änderung des Membranpotenzials oder durch einen anderen Mechanismus beeinflussen, muss noch genauer untersucht werden.

### **Die Wirkung von ANGII auf das Membranpotenzial**

ANGII inhibiert die Freisetzung von Renin. Diese Inhibition geht mit einer Depolarisation RSZ einher.

Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1990) führen die depolarisierende Wirkung von ANGII auf folgende zwei Mechanismen zurück:

1. ANGII schließt  $K^+$ -Kanälen vom einwärts-gleichrichtenden Typ ( $K_{ir}$  2.x).  
„Gleichrichtend“ bedeutet, dass der  $K^+$ -Kanal, der ja als elektrischer Widerstand angesehen werden kann, keine lineare Strom-Spannungskurve besitzt, sondern je nach Membranpotenzial  $K^+$ -Ionen unterschiedlich gut leitet (Abb. 6).  
„Einwärts-gleichrichtend“ bedeutet definitionsgemäß, dass der Kanal  $K^+$ -Ionen (unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen) bei einem intrazellulär negativen Klemmpotenzial gut einwärts, bei einem intrazellulär positiven Klemmpotenzial schlecht oder gar nicht auswärts leitet.



**Abb. 6:** Strom-Spannungskurve des  $I_{K1}$  bei physiologischen Kaliumkonzentrationen

Unter physiologischen Ionenkonzentrationen stellt sich (auch in Abhängigkeit von anderen Ionenleitfähigkeiten als Kalium) bei RSZ ein intrazellulär negatives Potenzial von ca. -60 mV ein. Bei diesem Potenzial befinden sich die einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Kanälen nicht in ihrem besonders gut (und namensgebenden) einwärtsleitenden Zustand, sondern im schlecht auswärtsleitenden Zustand.

Sollte also ANGII RSZ depolarisieren, indem es diese Kanäle schließt, müssen in ANGII-freiem Medium permanent positiv geladene Kaliumionen durch diese Kanäle die Zellen verlassen und dadurch das Ruhemembranpotenzial in den Zellen stark negativ halten.

Für die depolarisierende Wirkung von ANGII ist also nicht die Hemmung des namensgebenden Einwärtsstromes der  $K_{ir}$ -Kanäle, sondern die Hemmung des Auswärtsstromes von Bedeutung.

Durch das Blockieren dieser Kanäle fehlt der hyperpolarisierende Kaliumstrom und die Zellen depolarisieren.

Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1989) wiesen diese einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle in RSZ nach, indem die Einwärtsströme verschwunden waren, als das intrazelluläre und extrazelluläre Kalium durch Caesium oder Tetraethylammonium also nicht membranpermeable Kationen mit kaliumkanalblockender Wirkung ersetzt wurde.

Diese einwärtsgleichrichtenden Ströme wurden auch durch 1  $\mu$ M ANGII inhibiert.

2. ANGII aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chloridkanäle (Chloridionen verlassen durch diese Kanäle die Zelle; das entspricht definitionsgemäß einem Einwärtsstrom). Kurtz und Penner wiesen diese  $\text{Cl}^-$ -Kanäle nach, indem sie die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Ionomycin auf über 200 nM erhöhten und dabei einen Einwärtsstrom gemessen haben. Dieser Einwärtsstrom war auch dann noch vorhanden, wenn Tetraethylammonium der intra- und extrazellulären Lösung zugesetzt wurde. Er trat jedoch nicht auf, wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration auf 150 nM gepuffert wurde. Das Umkehrpotenzial für diesen Strom, also das Klemmpotenzial, bei dem netto weder Ionen in die Zelle, noch aus der Zelle strömen, lag bei -43 mV. Dieser Wert entspricht ungefähr dem errechneten Nernstpotenzial (siehe Kapitel 2.2.3) für Chloridionen in glatten Muskelzellen ( $[\text{Cl}^-]_i = 40 \text{ mM}$ ).

In Voltage Clamp Experimenten konnten Kurtz und Penner den bei stark depolarisierten Klemmpotenzialen aufgetretenen Auswärtsstrom (Chloridioneneinstrom) durch diese Kanäle durch Austausch des extrazellulären Chlorid durch Isethionat aufheben. Und bewiesen dadurch indirekt, dass der durch Ionomycin induzierte Strom durch calciumaktivierte Chloridionenkanäle fließt.

Die durch 1  $\mu\text{M}$  ANGII erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führte zu den gleichen Chlorideinwärtsströmen (Chloridionen verlassen die Zelle).

Die ausströmenden negativ geladenen Chloridionen führen dazu, dass der Betrag des intrazellulär negativen Potenzials abnimmt und die Zellen depolarisieren.

ANGII verschiebt also die Hauptleitfähigkeit der Zellen von einer hyperpolarisierenden Kaliumleitfähigkeit zugunsten der depolarisierenden Chloridleitfähigkeit.

## 1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der reninsezernierenden Zellen (RSZ) bezüglich des Membranpotenzials und des Membranleitwertes in Ruhe und nach der Applikation von ANGII ist das Ziel dieser Arbeit.

Insbesondere die Wirkung von ANGII auf RSZ im Sinne der negativen Rückkopplung im RAAS steht im Fokus des Interesses.

Durch den Einsatz von Ionenkanalblockern, die Modulation der Salzkonzentrationen der Extrazellulärflüssigkeit und ANGII selbst soll die Leitfähigkeit und darüber die Ionenkanäle der Membran dieser Zellen charakterisiert werden.

Die Fragen lauten im Einzelnen:

1. Wie reagieren RSZ auf Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration? Einen großen Anteil am Ruhemembranleitwert haben Kaliumkanäle vom einwärtsgleichrichtenden Typ ( $K_{ir}$  2.x).

2. Wie reagieren RSZ auf verschiedene Konzentrationen und Applikationszeiten von ANGII? Wie sieht der zeitliche Ablauf der Membrandepolarisation aus? Untersuchungen haben gezeigt, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII von sich schließenden  $K_{ir}$  2.x und sich öffnenden  $Cl_{Ca}$ -Kanälen herrührt. Welche Leitwertänderungen führen also zur Depolarisation der Zellen und welche Abhängigkeit der Depolarisation von der extrazellulären Kaliumkonzentration besteht?

3. Wie reagieren RSZ auf Barium, einem spannungsabhängigen Blocker für  $K_{ir}$  Kanäle, und wie reagieren sie auf die Kombination von Barium mit ANGII? Welcher Unterschied besteht im Leitwertprofil der Zellen unter Barium und unter ANGII?

4. Welchen Anteil haben Chloridkanäle am Ruhemembranpotenzial und an der depolarisierenden Wirkung von ANGII? Sind sie für die depolarisierende Wirkung von ANGII essenziell?

5. Kapazitätsmessungen haben ergeben, dass RSZ elektrisch gekoppelt sind. Welche elektrophysiologischen Eigenschaften haben Zell-Zell Verbindungen an RSZ und wie viele Zellen sind elektrisch gekoppelt?

6. ANGII erhöht die intrazellulär Calciumkonzentration in RSZ. Ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration essenziell für die depolarisierende Wirkung von ANGII oder ist sie eine Folge der Depolarisation?

7. Ist die Reninsekretion direkt abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration oder bestimmt das Membranpotenzial die Sekretionsrate der RSZ?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Versuchstiere

#### 2.1.1 Substanzen

Adenosin	Sigma, Taufkirchen D
Agar	ICN Biomedicals, OH USA
Angiotensin II (ANGII)	Sigma D
BaCl <sub>2</sub>	Fluka, Buchs CH
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt D
N <sub>6</sub> -Cyclohexyladenosin	Sigma D
Collagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim D
D(+)-Glucose	Merck D
Diisothiocyanatostilben-disulfonsäure (DIDS)	Sigma D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck D
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma D
Ethanol pro analysi	Merck D
(Wasch)-Ethanol (99.9%)	Universitätsapotheke, Tübingen D
Furosemid	Sigma D
Guanosintriphosphat (GTP)	Fluka CH / Sigma D
HCl	Sigma D
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe D
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma D
Kalium-D-Gluconat	Fluka CH
KCl	Merck D
MgCl <sub>2</sub>	Merck D

N-Methy-D-Glucamin	Sigma D
NaCl	Merck D
Natrium-D-Gluconat	Fluka CH
NaOH	Merck D
Nifluminsäure (NFA)	Sigma D
Nitro-phenylpropylaminobenzoessäure (NPPB)	Sigma D

## 2.1.2 Lösungen

### 2.1.2.1 Perusionsbadlösungen

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

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

Die Substanzen wurden in 4500 ml A. dest. bei 37°C gelöst, der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit A. dest. auf 5000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4-8°C aufbewahrt und jeweils nicht länger als 10 Tage verwendet.

HEPES gepufferte Salzlösung mit 1 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM und 140 mM KCl

	<b>1mM KCl</b>	<b>5 mM KCl</b>	<b>10 mM KCl</b>	<b>20 mM KCl</b>	<b>140 mM KCl</b>
NaCl	141,8 mM	137,8 mM	132,8 mM	122,8 mM	2,8 mM
KCl	1 mM	5 mM	10 mM	20 mM	140 mM

Die Konzentrationen der übrigen Substanzen entsprachen denen in Na-HEPES-PS.

Chloridarme HEPES-gepufferte Salzlösung (Na-Gluconat-HEPES):

NaCl und KCl wurden durch Na-D-Gluconat und K-D-Gluconat ersetzt.

Na-D-Gluconat	140 mM
K-D-Gluconat	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM

Natriumfreie HEPES-gepufferte Salzlösung (NMDG-Cl-HEPES):

Da NMDG nur als freie Base erhältlich ist, wurde mit HCl NMDG-Cl Salz hergestellt.

NMDG	140 mM
HCl	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM

Der pH-Wert wurde nicht mit NaOH, sondern mit KOH eingestellt. Die benötigte Menge an KOH ergab eine Kaliumkonzentration von 6,5 mM. Aus diesem Grunde wurde kein KCl zusätzlich eingewogen.

Der entsprechende natriumhaltige Puffer wurde folgendermaßen angesetzt:

NaCl	136 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM

Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 7,4 eingestellt. Da dadurch die nötige Kaliumkonzentration von 6,5 mM noch nicht erreicht wurde, sondern nur 5,82 mM, mussten zusätzlich noch 0,68 mM KCl zugesetzt werden.

KCl	0,68 mM
-----	---------

Calciumfreie HEPES-gepufferte Salzlösung:

NaCl	132,5 mM*
KCl	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM
EGTA	5 mM

\*7,5 mM weniger NaCl als Ausgleich für die Zugabe von 5 mM EGTA und die folgende Einstellung des pH-Wertes auf 7,4.

#### 2.1.2.2 *Pipettenlösung*

K-Glutamat Pipettenlösung:

Die Substanzen wurden in 950 ml A. dest. bei 21 °C gelöst, der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,2 eingestellt und das Volumen mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde in 20 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

K-Glutamat	135 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
EGTA	1 mM
ATP	1 mM
GTP	0,3 mM

#### 2.1.2.3 *Referenzbadlösung*

Das Referenzbad wurde mit K-Glutamat Pipettenlösung befüllt und mit dem

Perfusionsbad über eine Agarbrücke verbunden.

#### 2.1.2.4 Agarbrückenlösung

KCl	200 mM
Agar	1,5 %

Zur Herstellung von Agarbrücken wurden Glaskapillaren (Kimble Products, Vineland, New Jersey USA) verwendet, die in der Bunsenbrennerflamme zu einem U gebogen wurden. Der 1,5 %ige Agar wurde in einer wässrigen 200 mM KCl Lösung klar gekocht und durch Kapillarkräfte in die gebogene Kapillare gesaugt. Die Agarbrücken wurden in 200 mM KCl Lösung bei 4-8°C gelagert.

#### 2.1.2.5 Deckglasbeschichtungslösung

Zur Beschichtung der Deckgläser wurden 10 µl Poly-D-Lysin Lösung (1 mg/ml A. dest.) und 200 µl A. dest. auf ein Deckglas pipettiert. Frühestens 5 Stunden später wurde die Poly-D-Lysinlösung abgesaugt. Die Beschichtung der Deckgläser wirkt wie eine Klebeschicht, auf der die Glomerula haften und somit vom Perfusionsfluss nicht weggespült werden.

### 2.1.3 Substanzen, deren Wirkung auf RSZ untersucht wurde:

#### 2.1.3.1 ANGI:

ANGII wurde in A. dest. gelöst und in Aliquots der Konzentration  $10^{-3}$  M bei -20 °C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde pro Versuchstag mit Na-HEPES-PS zunächst auf Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und mit der entsprechenden Perfusionsbadlösung auf die gewünschter Konzentration verdünnt.

#### 2.1.3.2 DIDS:

DIDS wurde in Na-HEPES-PS im Ultraschallbad in der Konzentration 0,5 mM gelöst und nur am selben Tag verwendet.

### 2.1.3.3 NFA:

Es wurde eine 200 mM NFA Lösung in DMSO hergestellt, die dann mit Na-HEPES-PS auf 100  $\mu$ M verdünnt wurde. Aliquots zu 50 ml wurden bei -20 °C aufbewahrt. Der Anteil von DMSO an der Lösung lag somit bei 0,5 ‰.

### 2.1.3.4 NPPB:

Es wurde eine 100 mM NPPB Lösung in DMSO hergestellt, die in 50  $\mu$ l Aliquots bei -20 °C aufbewahrt wurde. Die Aliquots wurden jeweils aufgetaut und mit Na-HEPES-PS auf 100  $\mu$ M verdünnt. Der Anteil von DMSO an der Lösung lag somit bei 1 ‰.

### 2.1.4 Geräte

Elektrodenziehgerät	DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg D
Elektrodenglas	GC 150-7.5, Clark Electromedical Instruments GB
Mikromanipulator	PatchMan, Eppendorf, Hamburg D
Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss, Stuttgart D
Filtersatz (für Fluoreszenzanregung)	Filtersatz 13, Zeiss Stuttgart D
Oszilloskop	MH 205-3, HAMEG GmbH, Frankfurt a. M. D
Software	Pulse (v8.53), HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz D Sigma Plot 2000, Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL U.S.A. Sigma Stat 2.03, Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL U.S.A.
Verstärker	EPC 9, HEKA Elektronik
AD-Wandler	ITC-16 (EPC 9), InstruTECH, Port Washington, NY USA

## **2.1.5 Zubehör zum Elektrophysiologie Messplatz**

### **2.1.5.1 Elektroden:**

Als Mess- und Referenzelektrode wurden chlorierte Silberdrähte verwendet (0,5 mm, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D). Die Mess- und die Referenzelektrode wurden mit Schmirgelpapier von der alten Silberchloridschicht befreit und mit Ethanol (70 %) gereinigt. Die Silberdrähte wurden mittels Elektrolyse in 3 M KCl 10 Minuten lang bei einer Stromstärke von 1 mA chloriert und im Anschluss mit A. dest. abgespült. Alle 3-5 Versuchstage wurde die Silberchloridschicht erneuert. Gut chlorierte Silberdrähte zeichnen sich durch ein geringes Offset-Potential aus (zwischen -20 und +10 mV).

### **2.1.5.2 Pipettenhalter:**

Es wurde der Standard Pipettenhalter von Heka verwendet, in den die Messelektrode gelötet wurde.

### **2.1.5.3 Perfusionsbad:**

Das Perfusionsbad besteht aus Plexiglas. Der Boden des Perfusionsbades besteht aus einem mit Poly-D-Lysin beschichteten runden Deckglas. Auf das Deckglas wurden die Glomerula pipettiert. Nach 2 Minuten ohne Perfusionsfluss waren die Glomerula auf die Poly-D-Lysinschicht abgesunken, und einige blieben an ihr haften. Dann wurden über ein Schlauchsystem Perfusionslösungen und Substanzen über eine gebogene geerdete Edelstahlkanüle in das Perfusionsbad eingeleitet und über eine Rampe am anderen Ende des Perfusionsbades über eine gebogene geerdete Edelstahlkanüle wieder abgesaugt.

### **2.1.5.4 Perfusionssystem:**

Das Perfusionssystem besteht aus einem Kunststoffgehäuse in das 8 Standard Luer-Lock Spritzen ohne Stempel mit einem Volumen von 50 ml eingesetzt wurden. Die Spritzen stehen auf eingeschraubten Luer-Verbindern, die mit jeweils einem Schlauch verbunden sind. Jeder der 8 Schläuche ist mit einem elektrischen Schlauchklemmventil versehen, das ferngesteuert werden kann. Alle 8 Schläuche

fließen in einer Tropfkammer zusammen. Die gemeinsame Endstrecke bildet ein Silikonschlauch, der in einem Wärmemantel erwärmt wird und in das Perfusionsbad mündet. Die Temperatur des Perfusionsbades liegt dann bei ca. 37°C.

Treibende Kraft für den Fluss ist die Gravitation. Die Flussrate wurde über eine Schlauchklemme am Silikonschlauch auf 30-60 Tropfen pro Minute eingestellt. Da das Perfusionsbad ca. 750 µl fasst, wurde die Perfusionsbadlösung ca. ein Mal pro Minute ausgetauscht, wenn man annimmt, dass ein Tropfen ein Volumen von 20 µl hat.

### **2.1.6 Versuchstiere**

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

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca 60 % und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser. 5 Tage nach Lieferung wurde allen Tieren Furosemid gespritzt (10 mg/kg i.p.). Nach der Furosemid-Applikation erhielten die Tiere für mindestens 14 Tage eine kochsalzarme Diät (Altromin C1036: 150 mg/kg Na<sup>+</sup>, 3 mg/kg Cl<sup>-</sup>).



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenten Arteriole**

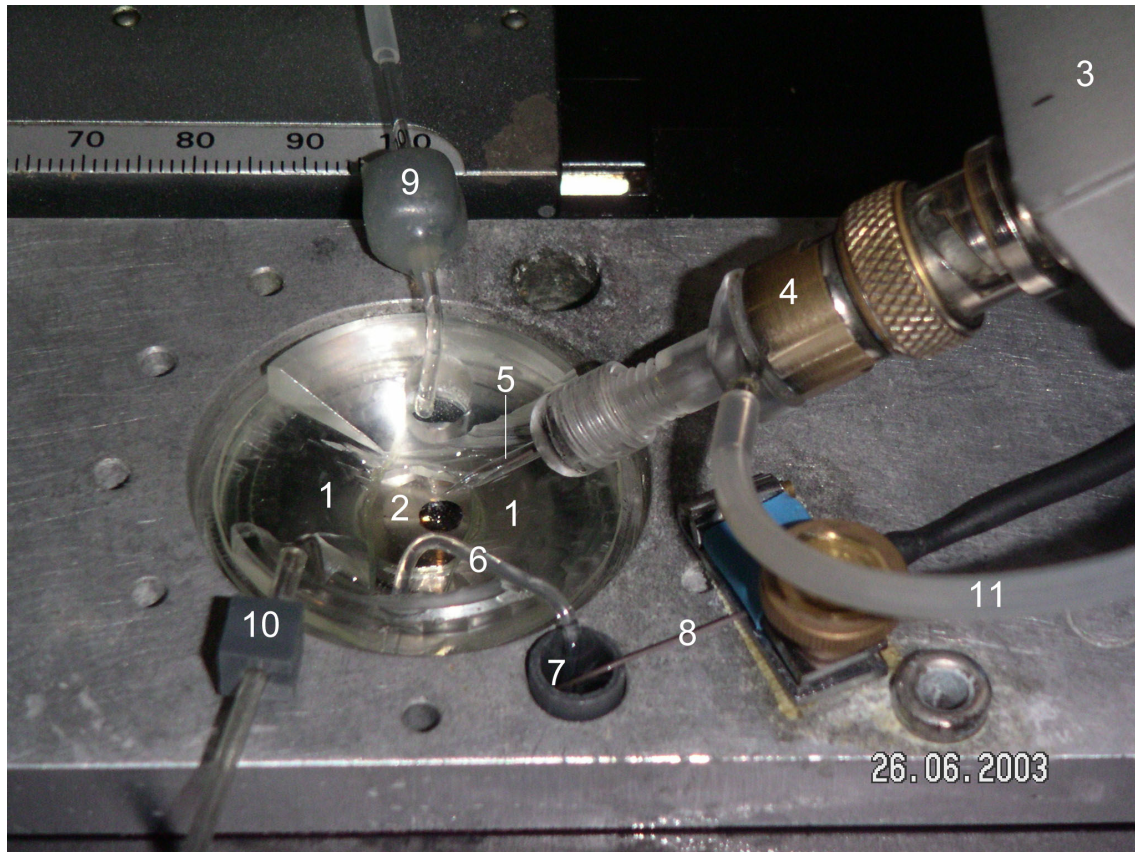
Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation und Dekapitation getötet. Nach dem Ausbluten der Tiere wurde ein medianer Bauchschnitt durchgeführt, der nach links und rechts entlang der Rippenbögen erweitert wurde. Die Bauchorgane wurden mit der Schere zur Seite gedrängt und die Nieren mit der Pinzette aus dem retroperitonealen Fettgewebe abgehoben. Die Nierengefäße und Nerven wurden direkt am Nierenhilus durchtrennt, die Nieren entnommen und in Na-HEPES-PS bei 37 °C aufbewahrt. Die Nieren wurden am selben Tag verwendet.

Zur Vermeidung von Infektionen und Kontaminationen des Präparats wurde mit Latexhandschuhen (Baxter Healthcare Corp., CA, USA) unter dem Abzug gearbeitet.

Zur Isolierung der Glomerula mit anhängender Arteriole wurde die enzymatische Präparation nach Kurtz und Penner (1989) bzw. Russ et al. (1999) verwendet. Die Nieren wurden mechanisch von der Nierenkapsel befreit und längs mit einer Rasierklinge halbiert. Das nichtbenötigte Gewebe (Nierenhilus, -becken und -kelch) wurde entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde mit einer Rasierklinge zerkleinert und in 20 ml Na-HEPES-PS mit 20 mg Collagenase A bei 37°C im Schüttelwasserbad für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die andgedauten Nierenfragmente über 2 Siebe mit einer Maschenweite von 200 µm und 125 µm gefiltert und die Glomerula in einem dritten Sieb mit einer Maschenweite von 63 µm aufgefangen. Die Glomerula wurden in Na-HEPES-PS überführt und bei Raumtemperatur nicht länger als 6 Stunden aufbewahrt.

## 2.2.2 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

### 2.2.2.1 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes:



**Abb. 7:**

Optisches System: Die Licht fällt von oben auf die Zellen, die am Boden des Perfusionsbades (1) liegen, und wird vom Objektiv (2) des Mikroskops aufgenommen.

Messsystem: Der Strom fließt vom Vorverstärker (3), an dem der Pipettenhalter (4) befestigt ist, zum Silberdraht, der sich in der Glaspipette (5) befindet und weiter über die Pipettenlösung durch die Pipettenspitze in die Zellen. Über Kanäle in der Zellmembran fließt der Strom durch das Perfusionsbad zur Agarbrücke (6) und von dort zum Referenzbad (7), um über die Referenzelektrode (8) zurück zum Vorverstärker zu fließen (Siehe auch Abb. 9).

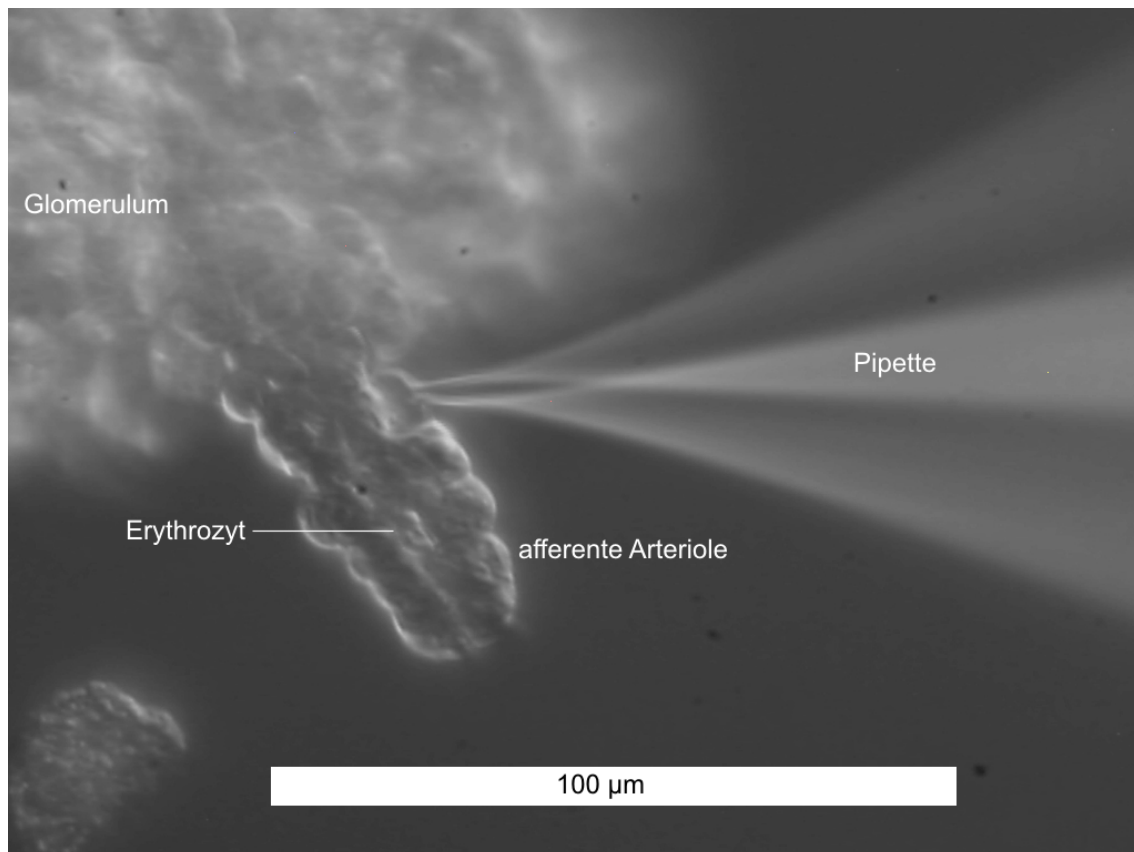
Perfusionssystem: Perfusionspuffer und die verwendeten Testsubstanzen fließen über den Zulauf (9) in das Perfusionsbad hinein und werden auf der gegenüberliegenden Seite des Perfusionsbades von der Absaugung (10) aus dem Bad entfernt.

System zum Ändern des Drucks in der Pipette: Der Silikonschlauch (11) steht mit dem Pipettenlumen in Verbindung. Durch Saugen am Schlauch kann somit ein Unterdruck auf die Pipette übertragen werden.

Optisches System:

Das inverse Mikroskop steht in einem Faradaykäfig auf einem pneumatisch betriebenen schwingungsgedämpften Tisch. Es ist mit Okularen mit 10facher und Objektiven mit 10- und 40facher Vergrößerung ausgestattet. Durch das 40fach-Objektiv erhält man mittels Differenzinterferenzkontrast ein pseudo-dreidimensiona-

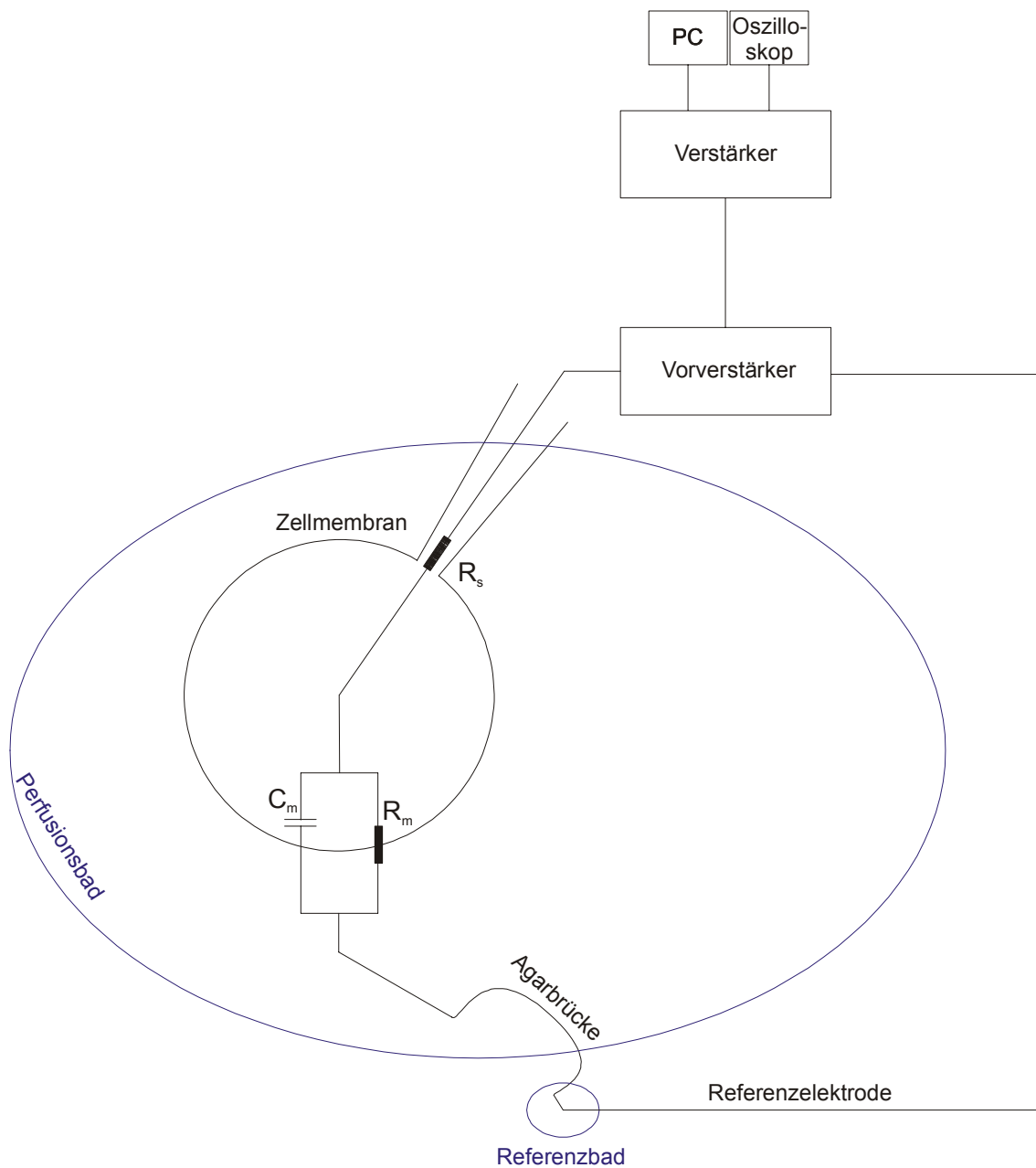
les Bild. Der Strahlengang des Mikroskops führt durch das Perfusionsbad, dessen Boden aus einem runden Deckglas besteht. Eine schwarz-weiß Videokamera mit Monitor ist an das Mikroskop angeschlossen, die Bilder wie dieses liefert (Abb. 8).



**Abb. 8:** Von der Mikroskopkamera aufgezeichnetes Bild eines Glomerulums mit anhängender afferenter Arteriole. Die Pipettenöffnung ist auf die zu untersuchende Zelle aufgesetzt.

Mess- und Speichersystem:

Auf der rechten Seite des Objektisches ist die Motoreinheit des Manipulators angebracht, der über einen Joystick gesteuert wird. Auf dem Manipulator ist der Vorverstärker befestigt, an dem der Pipettenhalter angebracht ist. Der Vorverstärker ist mit dem Verstärker verbunden und dieser gibt das Messsignal an einen PC weiter. Der PC speichert die Messwerte und gibt sie auf dem PC-Monitor aus. Während des Experiments taucht die Pipette in das Perfusionsbad, das über eine Agarbrücke mit dem Referenzbad elektrisch verbunden ist. Im Referenzbad taucht die Referenzelektrode, die wiederum mit dem Vorverstärker verbunden ist. Somit ist der Stromkreis geschlossen (Abb. 9).



**Abb. 9:** Schema des Messstromkreises in der whole cell-Konfiguration: Die Pipette sitzt auf der Zellmembran auf und der von der Pipettenöffnung umschlossene Membranfleck ist zerstört worden.

$R_s$ : Serienwiderstand (elektrischer Widerstand der Pipettenöffnung)

$R_m$ : Membranwiderstand

$C_m$ : elektrische Kapazität der Zellemembran

Perfusionssystem:

Auf der linken Seite ist das Perfusionssystem angebracht. Das Perfusionsbad wird mit ca. 30-60 Tropfen pro Minute durchspült. Auf der gegenüberliegenden Seite

des Perfusionsbades ist die Absaugung angebracht, die den Flüssigkeitspegel im Bad konstant hält.

System zum Ändern des Drucks in der Pipette:

Die Pipette wurde mit sterilgefilterter K-Glutamat-HEPES-PS befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt, so dass die Messelektrode in die K-Glutamat-HEPES-PS eintaucht. Der Pipettenhalter wurde dann am Vorverstärker befestigt. Um die für den Sealvorgang notwendigen saubere Pipettenspitze zu bewahren, muss ein Überdruck im Inneren der Pipette angelegt werden, während die Pipette in die Perfusionsbadlösung eintaucht. Zu diesem Zweck wurde der Pipettenhalter mit einem wassergefüllten U-Rohr über einen Schlauch verbunden. Der angelegte Druck (5 cmH<sub>2</sub>O) im U-Rohr übertrug sich somit auf das Pipetteninnere. Der Druck im Pipetteninneren führte zu einem Ausstrom von Flüssigkeit aus der Pipettenspitze und wurde so lange aufrechterhalten bis die Pipettenspitze auf die Zellmembran aufgesetzt wurde. Somit können keine Verunreinigungen aus dem Bad an die Öffnung der Pipette gelangen. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran wurde der Überdruck weggenommen und ein leichter Unterdruck im Pipetteninneren angelegt. Die Zellmembran wird leicht in die Pipette eingesaugt und tritt in Wechselwirkung mit dem Pipettenglas. Ein hoher elektrischer Abdichtwiderstand von  $> 1 \text{ G}\Omega$  wird erreicht - der Gigaseal. Während der Messung wurden die Zellen von der Perfusionslösung umspült. Alle Metallteile im Faradaykäfig wurden geerdet.

#### 2.2.2.2 *Pipetten:*

Die Bruchkanten der Glasrohlinge (Clark Borosilikat Glas-Kapillaren ohne Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm) wurden in der gelben Flamme des Bunsenbrenners geglättet, um die Silberchloridschicht der Messelektrode beim späteren Einsetzen der Pipette in den Halter nicht zu beschädigen. Danach wurden der Glasrohling mit Ethanol 70% gereinigt. Aus einem Rohling wurden mit Hilfe des Zeitz-Pullers zwei Pipetten gezogen und hitzepolieret. Nach dem Füllen der Pipetten mit

Pipettenlösung und dem Eintauchen in die Perfusionsbadlösung betrug der elektrische Widerstand der Pipette zwischen 3 und 5 MΩ. Aus dem gemessenen Widerstand läßt sich der Durchmesser (d) der Pipettenöffnung näherungsweise berechnen, wenn man für die Pipettenspitze vereinfachend eine zylindrische Form annimmt:

$$R_{\text{Pipette}} = \frac{\rho \cdot l}{\pi \cdot r^2}$$

$R_{\text{Pipette}}$ : gemessener Pipettenwiderstand in Ω.,  $4 \cdot 10^6$

$\rho$ : spezifischer Widerstand für 150 mM KCl-Lösung bei 25 °C:  $51 \Omega \cdot \text{cm}$  (Sakmann und Neher, 1995; S. 639 )

$l$ : Länge der Pipettenspitze (geschätzte Länge, die für den Widerstand relevant ist):  $6 \mu\text{m}$ .

$r$ : zu errechnender Radius der Pipettenöffnung.

Aufgelöst nach  $r^2$ :

$$r^2 = \frac{\rho \cdot l}{\pi \cdot R_{\text{Pipette}}}$$

Werte eingesetzt:

$$r^2 = \frac{51 \Omega \cdot \text{cm} \cdot 6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}}{\pi \cdot 4 \cdot 10^6 \Omega}$$

$$r^2 \approx 0,24 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$$

$$r \approx 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$$

$$d \approx 1 \mu\text{m}$$

Der Durchmesser (d) der Pipettenöffnung liegt bei ca. 1  $\mu\text{m}$ . Dieser Wert entspricht dem in Sakman (1995): Single-channel recording, S. 639. Dieser Abstand deckt sich gerade mit der maximalen Auflösung des verwendeten Mikroskops, was erklärt, dass die runde Pipettenöffnung nur unter optimalen optischen Bedingungen als runde Öffnung zu identifizieren ist.

Um die Pipettenwiderstände zu variieren, reichte es aus, den Wert der Hitze von Pull-Programm B (H(P(B))) zu verändern. Waren die Pipetten zu hochohmig, so wurden kleinere Werte für H (P(B)) eingegeben. Lag der Wert für den Pipettenwiderstand bei zu niedrigen Werten, so wurde der Wert der Hitze H P(B) erhöht. Für den Leitz Puller verwendetes Programm:

Pull A (P(A)): Heat H 600; Force Prim. Pull F(TH) 80; Distance threshold s(TH) 24; Delay heat stop t(H) 55; Distance heat stop s(H) 39; Adjust AD 120.

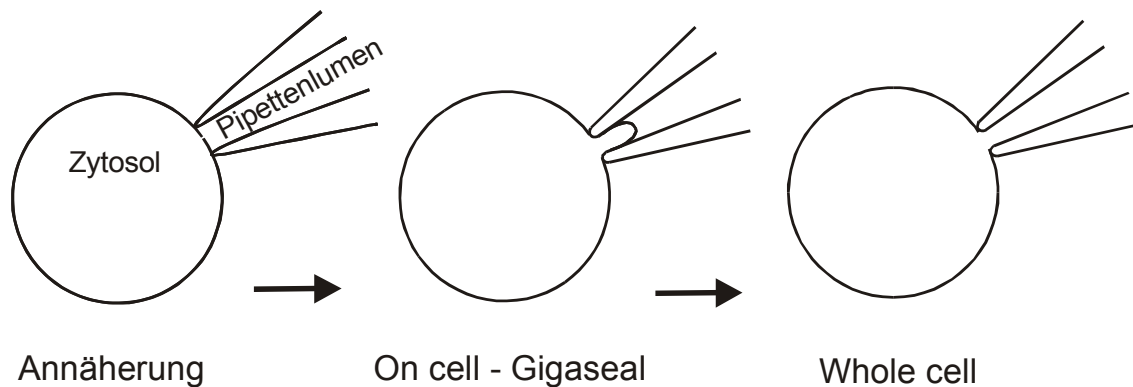
Pull B (P(B)): Heat ca. H 360; Force Prim. Pull F(TH) 040; Distance threshold s(TH) 17; Distance heat stop s(TH) 17; Delay heat stop t(H) 0; Distance heatstop s(H) 3; Delay (Pull1) t(F1) 0; Force Pull 1 F1 38; Distance Pull 2 s(F2) 4; Force Pull2 F2 40; Adjust AD 515.

### 2.2.2.3 *Elektrophysiologische Methoden:*

Befindet sich die Pipette im Bad wird die in den meisten Fällen bestehende Potenzialdifferenz gleich Null gesetzt. Der Verstärker wird also so eingestellt, dass keine Spannung zwischen Mess- und Referenzelektrode anliegt. Nach dem Einstellen des Nullpunktes wird ein Rechteckspannungspuls angelegt und der dafür benötigte Strom gemessen. Aus Spannung und Strom wird nach dem Ohmschen Gesetz der elektrische Widerstand der Pipettenöffnung automatisch ausgerechnet.

Mit dem Mikromanipulator wird nun die Pipette an die Zelle angenähert und auf die Zellmembran aufgesetzt. Nun wird ein leichter Unterdruck in der Pipette erzeugt und ein Zellmembranfleck an die Pipette angesaugt. Der Strom der für die

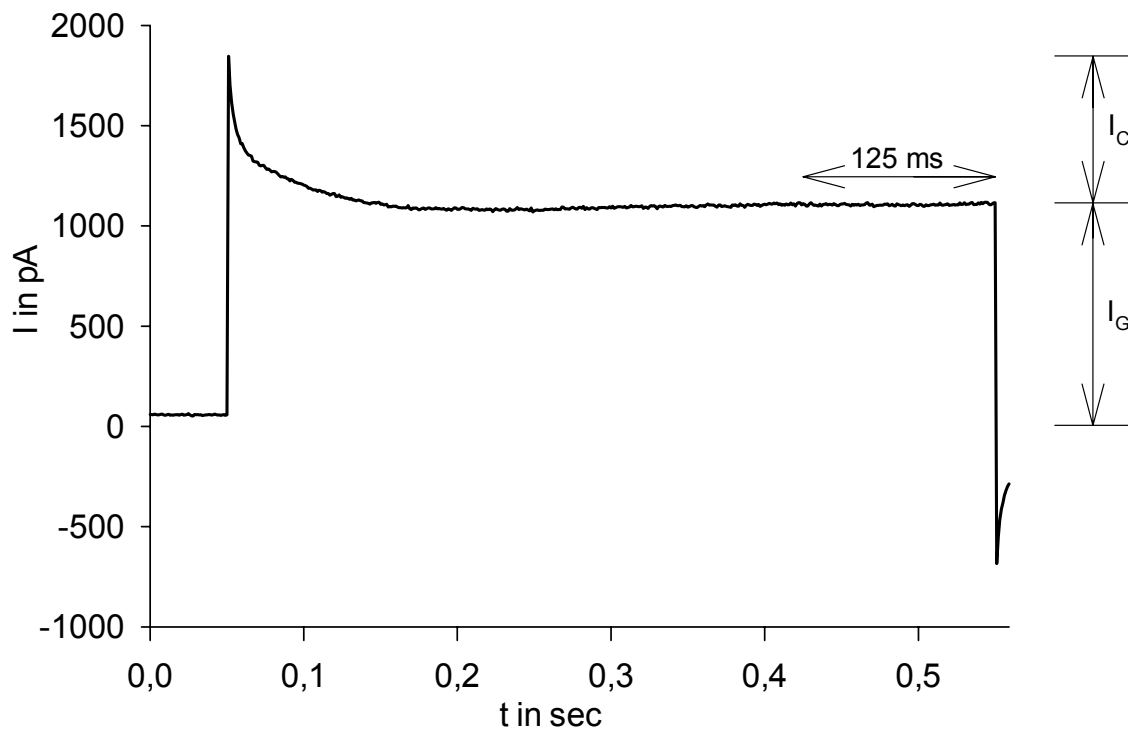
angelegte Spannung benötigt wird, wird dann immer kleiner, der Widerstand im Stromkreis wird größer und steigt auf über 1 G $\Omega$ . Die Pipettenöffnung hat einen kleinen Membranfleck elektrisch und mechanisch von der übrigen Zellmembran isoliert. Die Cell-attached-Konfiguration ist erreicht und der Gigaseal ist hergestellt. In dieser Konfiguration können nur Ionenströme durch den kleinen Membranfleck gemessen werden. Um Summenströme über die ganze Zelle oder das Membranpotenzial der Zelle messen zu können, muß der isolierte Membranfleck zerstört werden. Das geschieht entweder durch einen kurzen, starken Unterdruck in der Pipette oder durch einen hochamplitudigen Spannungspuls (800 mV für 300  $\mu$ s). Die Pipettenlösung ist dann mit dem Zytosol direkt verbunden (Abb.10).



**Abb. 10:** Patchkonfigurationen: Nachdem die Pipettenöffnung auf die Zellmembran aufgesetzt ist, wird mittels Unterdruck ein Membranfleck angesaugt. Steigt der elektrische Abdichtwiderstand auf über 1 G $\Omega$ , ist die on-cell-Konfiguration erreicht. Wird durch einen kurzen starken Unterdruck oder durch einen kurzen Spannungspuls der angesaugte Membranfleck zerstört, ist die whole-cell-Konfiguration erreicht.

Das Erreichen der so genannten Ganzzellkonfiguration (im weiteren: whole-cell-Konfiguration) macht sich in einer Zunahme des für den Rechteckspannungspuls benötigten Strom bemerkbar, da zum einen der elektrische Widerstand an der Pipettenöffnung kleiner geworden ist und zum anderen jetzt nicht mehr der kleine Membranfleck elektrisch aufgeladen werden muß, sondern die gesamte Zellmembran und die Zellmembranen aller über gap junctions mit dieser verbundenen Zellen. Es sind also große kapazitive Ströme nötig (Abb. 11).





**Abb. 11:** Stromkurve für den Spannungssprung von -60 mV auf -10 mV im Voltage clamp. Die Zellen hat zum Zeitpunkt 0 ein Potenzial von -64 mV. Daher ist ein positiver Strom nötig, die Zellen auf -60 mV zu klemmen. Nach 0,05 Sekunden depolarisiert der Verstärker die Zellen auf -10 mV. Zunächst sind große kapazitive Ströme ( $I_C$ ) nötig, da alle Zellmembranen entladen werden müssen. Nach ca. 0,15 Sekunden ist der Entladevorgang abgeschlossen. Der Strom ( $I_G$ ), der jetzt noch konstant appliziert werden muß, ist proportional zum Leitwert der Membran. Für die Bestimmung des Membranleitwertes ist also das Ende der Kurve entscheidend. Aus diesem Grunde wurde auch nur der Strom während der letzten 125 ms der 500 ms dauernden Sprungpotenziale zur Berechnung des Membranleitwertes herangezogen.

Stromklemme (im Weiteren: Current clamp):

Beim Current clamp wird das Potenzial der Messelektrode gegen die geerdete Referenzelektrode gemessen. Die gemessene Spannung entspricht dem Membranpotenzial. Das Signal wurden mit 2900 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 500 Datenpunkten pro Sekunde von einen PC aufgezeichnet. Eine Current clamp-Episode dauerte 3,5 oder 5,5 Sekunden, wovon nur die letzten 2 bzw. 4 Sekunden aufgezeichnet und ausgewertet wurden.

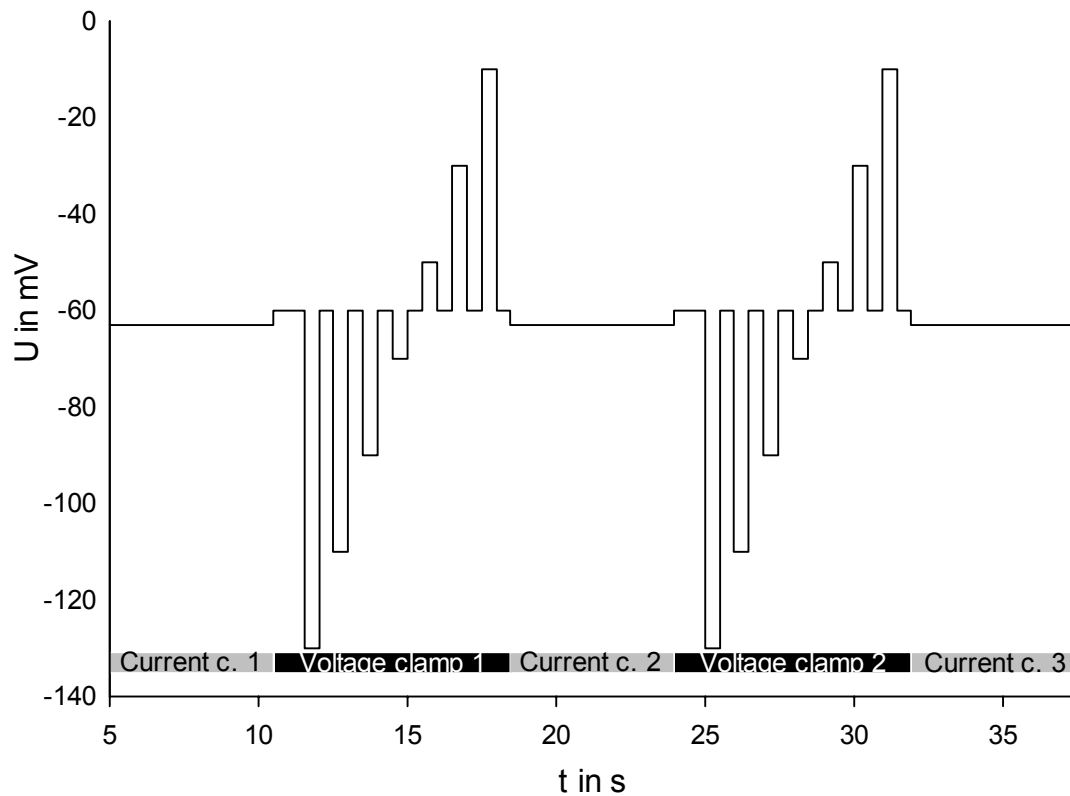
Spannungsklemme (im Weiteren: Voltage clamp):

Beim Voltage clamp wird das Membranpotenzial der Zelle vorgegeben, die Zelle auf dieses „geklemmt“ und der Strom, der gegebenenfalls appliziert werden muß, um dieses zu erreichen und zu halten, wird gemessen. Durch dieses Vorgehen ist es möglich, indirekt Ionenströme durch die Membran zu messen und daraus den Leitwert der Membran zu bestimmen.

Da sich beim Eintauchen der Pipette in des Perfusionsbad aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen geladener Teilchen ein Potenzial ausbildet, wurden alle Klemmpotentiale für ein Liquid-Junction Potenzial von 10 mV (Neher, 1992) korrigiert. Da die Kapazität der gekoppelten Zellen im Zellverband nicht immer kompensiert werden konnte, wurde die Serienwiderstandskompensation häufig ausgeschaltet (Russ et al., 1999)

Das Signal wurden mit 200 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 1000 Datenpunkten pro Sekunde von einen PC aufgezeichnet.

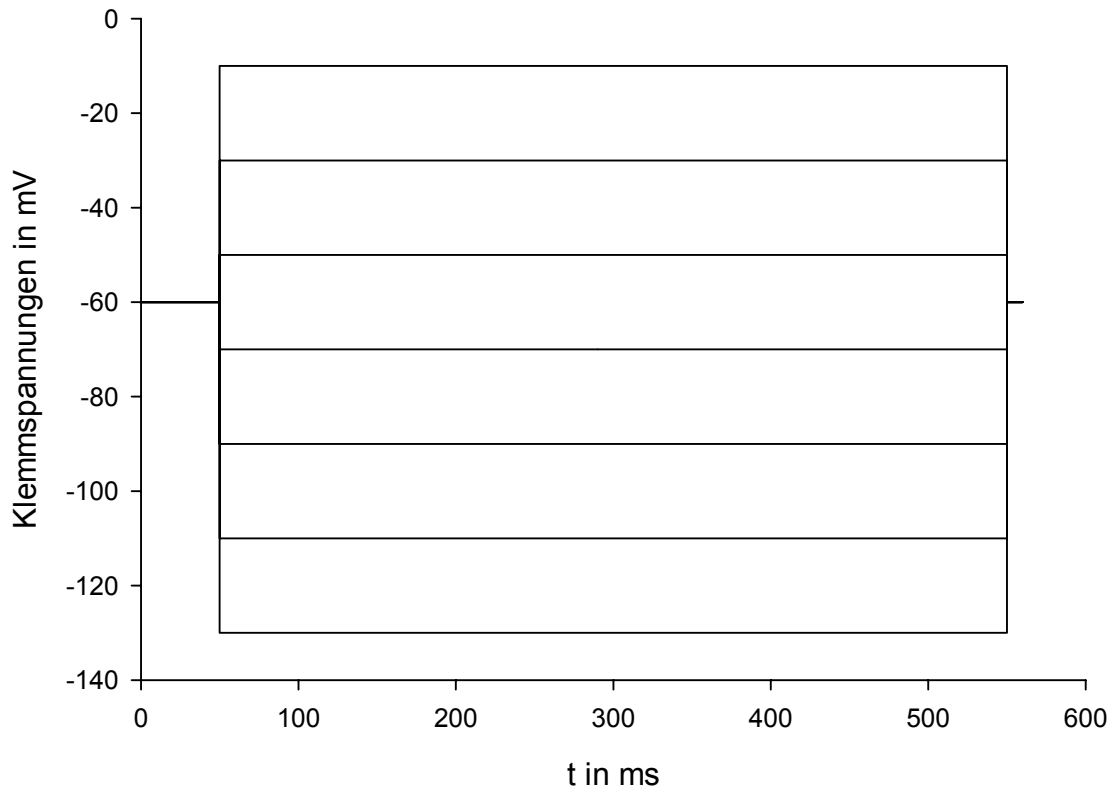
Der Voltage clamp beginnt, indem die Zellen 1 Sekunde lang auf -60 mV geklemmt werden. Im Anschluss werden nacheinander 7 Klemmpotentiale durchlaufen. Die Zellen werden zunächst für 50 ms auf -60 mV geklemmt. Dann für 500 ms zunächst auf das „negativste“ vorgegebene Klemmpotenzial (meistens -130 mV) und wieder für 450 ms auf -60 mV geklemmt. Auf diese Weise werden dann mit einem  $\Delta U$  von 20 mV bis zu 6 weitere Klemmpotentiale durchlaufen und der dafür benötigte Strom gemessen. Dann folgt die nächste Current clamp Episode usw.. Abbildung 12 zeigt das Membranpotenzial einer Zelle in den ersten Sekunden eines Beispielerperiments. Abbildung 13 zeigt die übliche Schemazeichnung für das Voltage clamp Protokoll.



**Abb. 12:** Spannungsprotokoll eines Beispielsperiments:

Dargestellt sind die ersten beiden Current clamp und Voltage clamp Episoden sowie der Anfang der dritten Current clamp Episode eines Experiments.

Zunächst wird im Current clamp für 4 Sekunden das Membranpotenzial gemessen (hier: -63 mV). Der Voltage clamp beginnt, indem die Zellen für 1 Sekunde auf -60 mV geklemmt werden. Dann durchlaufen die Zellen 7 Klemmpotenziale. Die Zellen werden dafür 50 ms auf -60 mV geklemmt, um dann für 500 ms auf das jeweilige Potenzial geklemmt zu werden (hier: -130 mV, -110 mV... bis -10 mV). Nach jedem Klemmpotenzial werden die Zellen für 450 ms wieder auf -60 mV geklemmt. Auf das siebte Klemmpotenzial (-10 mV) folgt die Current clamp Episode 2 usw..



**Abb. 13:** Voltage Clamp Protokoll:

Im Voltage clamp werden die Zelle zunächst für 50 ms auf -60 mV geklemmt. Dann für 500 ms zunächst auf das negativste vorgegebene Klemmpotenzial (meistens -130 mV) und wieder für 10 ms auf -60 mV geklemmt. Auf diese Weise werden dann mit  $\Delta U = 20$  mV bis zu 6 weiter Klemmpotenziale durchlaufen. Im Anschluss an das letzte Klemmpotenzial (meist -10 mV) folgt der Current clamp.

Das Signal wurde mit 2900 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 1000 Datenpunkten pro Sekunde von einem PC aufgezeichnet.

In weiteren Experimenten wurden 500 ms dauernde Spannungsrampen von -130 mV bis +10 mV (0,28 mV/ms) durchgeführt.

Die Glomerula wurden während des Experiment kontinuierlich mit Perfusionsbadlösung umspült. Gab man der Perfusionsbadlösung eine Substanz zu, die Ionenkanäle in der Zellmembran öffnet oder schließt, veränderte sich der Membranleitwert und damit der Betrag des zu applizierenden Stroms.

### 2.2.3 Berechnung des Membranpotenzials: Nernst Gleichung

Mit Hilfe der Nernst Gleichung (Nernst 1888) lässt sich das Membranpotenzial berechnen, das eine hypothetische Zelle einstellt, wenn sie nur für ein bestimmtes Ion, z.B. Kalium, permeabel ist.

$$\text{Nernst Gleichung: } E_{K^+} = \frac{R \cdot T}{Q_{K^+} \cdot F} \cdot \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

$$\text{oder: } E_{K^+} = 2,303 \frac{R \cdot T}{Q_{K^+} \cdot F} \cdot \log_{10} \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

$E_{K^+}$ : Gleichgewichtspotenzial für Kalium (Potenzial bei dem netto kein (Kalium)Ion die Zellmembran passiert)

R: Gaskonstante:  $8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T: absolute Temperatur in Kelvin (K)

$Q_{K^+}$ : Wertigkeit (Ladung) des Kaliumions: 1

F: Faraday-Konstante:  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$

$[K^+]_{o/i}$ : extrazelluläre/intrazelluläre Kaliumkonzentration

Für  $37^\circ\text{C}$  und für das einwertige Kaliumion gilt für den Quotienten:

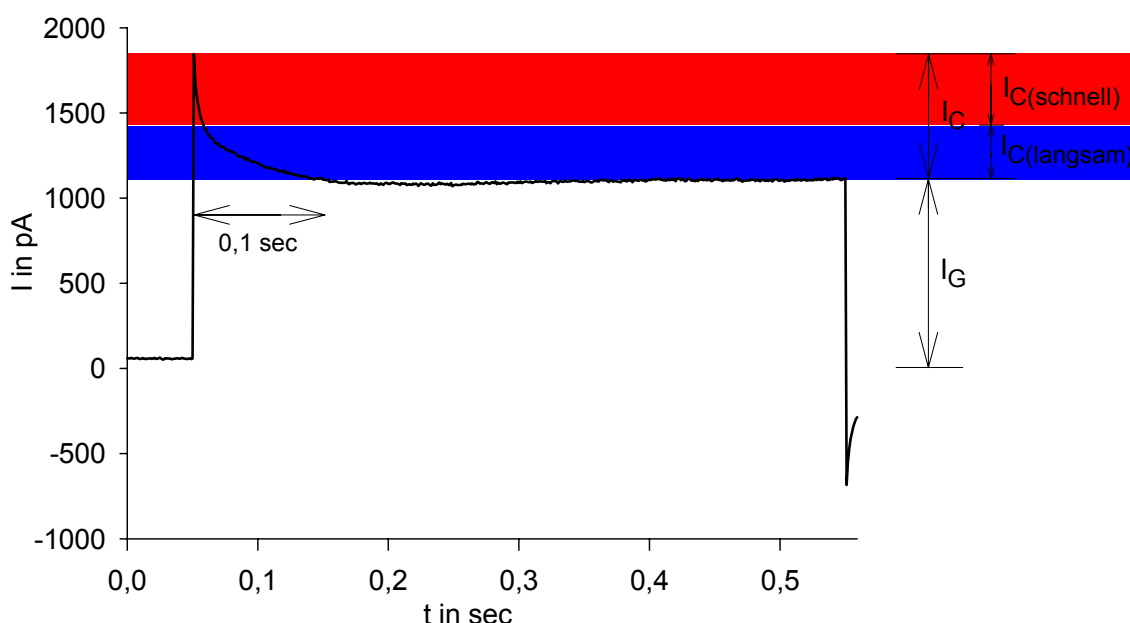
$$2,303 \frac{R \cdot T}{Q_{K^+} \cdot F} = \frac{8,3145 \text{ J} \cdot 310,15 \text{ K} \cdot \text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{K} \cdot 1 \cdot 96485 \text{ C}} = 0,06154 \frac{\text{J}}{\text{C}} = 61,54 \text{ mV}$$

Für eine extrazelluläre Kaliumkonzentration von 2,8 mM und eine angenommene intrazelluläre Kaliumkonzentration von 135 mM ergibt sich ein Kaliumgleichgewichtspotenzial von:

$$E_{K^+} = 61,54 \cdot \log_{10} \frac{[2,8 \text{ mM}]_o}{[135 \text{ mM}]_i} \approx -103,6 \text{ mV}$$

## 2.2.4 Berechnung der Membranfläche aus dem kapazitiven Strom

Abb. 15 zeigt ein Beispiel für die Stromkurve für den Spannungssprung von -60 mV auf -10 mV im Voltage clamp.



**Abb. 15:** Stromkurve für den Spannungssprung von -60 mV auf -10 mV im Voltage clamp. Die Zellen haben zum Zeitpunkt 0 ein Potenzial von -64 mV. Daher ist ein positiver Strom nötig, die Zellen auf -60 mV zu klemmen. Nach 0,05 Sekunden depolarisiert der Verstärker die Zellen auf -10 mV. Zunächst sind große kapazitive Ströme ( $I_C$ ) nötig, da alle Zellmembranen entladen werden müssen. Nach ca. 0,15 Sekunden ist der Entladevorgang abgeschlossen. Der Strom ( $I_G$ ), der jetzt noch konstant appliziert werden muß, ist proportional zum Leitwert der Membran. Für die Berechnung der Membrankapazität ist der Anfang der Kurve von 0,05 bis 0,15 Sekunden entscheidend. Aus diesem Grunde wurde auch nur der kapazitive Strom während dieser 0,1 Sekunden zur Berechnung der Membrankapazität herangezogen. Die Kondensatorentladungskurve kann über zwei Komponenten gefittet werden.  $I_{C(\text{schnell})}$  (rot) ist der kapazitive Strom der Entladungskurve mit der schnellen Zeitkonstante.  $I_{C(\text{langsam})}$  ist der Anteil des kapazitiven Stroms der Entladungskurve mit der langsamen Zeitkonstante (blau).

Die Kondensatorentladungskurve kann über zwei Komponenten gefittet werden. Aus den daraus errechneten beiden Zeitkonstanten ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ), den Werten für die

Klemmspannungsdifferenzen ( $\Delta U$ ) und dem jeweils applizierten Strom ( $I_{C(\text{schnell})}$  und  $I_{C(\text{langsam})}$ ) kann nach folgender Formel die elektrische Kapazität ( $C_{\text{ges}}$ ) des Membrankondensators ausgerechnet werden:

$$C_1 = \frac{\tau_1 \cdot I_{C(\text{schnell})}}{\Delta U} = \frac{\tau_1}{R_1};$$

$$C_2 = \frac{\tau_2 \cdot I_{C(\text{langsam})}}{\Delta U} = \frac{\tau_2}{R_2};$$

$$C_{\text{ges}} = C_1 + C_2$$

Da biologische Membranen von 1 cm<sup>2</sup> Fläche eine Kapazität von 1 µF haben (Hille, 1992; Seite 13), läßt sich aus der elektrischen Kapazität die Membranfläche ausrechnen.

### 2.2.5 Auswertung und Statistik

Alle Messwerte wurden mit dem Programm Pulse analysiert: Jede Current clamp-Episode wurde zweigeteilt, und der Mittelwert der ersten und zweiten Hälfte einer Episode (d.h.: der Mittelwert über die erste Sekunde bzw. die zweiten Sekunde) in das Programm Sigma Plot exportiert. In jeder Voltage clamp-Episode wurde pro Klemmpotenzial der Mittelwert nur aus den Messwerten der letzten 125 ms gebildet, in denen kaum kapazitive Ströme auftraten (Abb. 11). Auch diese Daten wurden nach Sigma Plot exportiert.

Aus allen Mittelwerten des Current clamps wurde in Sigma Plot ein Graph erstellt, in dem das Membranpotenzial der Zelle gegen die Zeit aufgetragen ist. Aus allen Mittelwerten des Voltage clamp wurden ein Graph erstellt, in dem der für das Erreichen des jeweiligen Klemmpotenzials benötigte Strom gegen die Zeit aufgetragen ist.

Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes wurde der Membranwiderstand ausgerechnet:

$$R = \frac{U}{I}$$

R: Der Membranwiderstand ( $\Omega$ ), soll berechnet werden.

U: Die Spannung (mV), ergibt sich aus der Differenz der Klemmpotenziale (hier:  $\Delta U = 20$  mV)

I: Die Stromstärke (pA), ergibt sich aus der Differenz der Ströme, die für das Erreichen der entsprechenden Klemmpotenziale nötig ist.

Aus dem Membranwiderstand lässt sich nach folgender Formel der Membranleitwert (G) berechnen:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U}$$

Da der Betrag der Klemmströme von Experiment zu Experiment Schwankungen unterworfen war, wurden relative Stromveränderungen untersucht und daraus relative Leitwertveränderungen errechnet.

Um die relativen Veränderungen des Membranleitwertes zwischen zwei Zeitpunkten zu ermitteln, wurden die Strommesswerte aus 6 aufeinander folgenden Voltage clamp Episoden im steady state nach Substanzgabe gemittelt, und durch den Mittelwert von 6 Episoden vor Substanzgabe (Referenz) geteilt.

Es wurde also aus dem Messwert für  $\Delta I_{\text{nachher}}$  und dem Messwert für  $\Delta I_{\text{vorher}}$  ein Quotient gebildet. Da  $\Delta U$  ja immer 20 mV beträgt, sind  $\Delta I$  und G proportional. Es gilt also:

$$I = \frac{U}{R} = G \cdot U$$

$$\Delta I = \Delta G \cdot \Delta U$$

$$\frac{\Delta I_{\text{Substanz}}}{\Delta I_{\text{Kontrolle}}} = \frac{\Delta G_{\text{Substanz}} \cdot \Delta U_{\text{Substanz}}}{\Delta G_{\text{Kontrolle}} \cdot \Delta U_{\text{Kontrolle}}} = \frac{G_{\text{Substanz}}}{G_{\text{Kontrolle}}}; \text{ da } \Delta U_{\text{Kontrolle}} = \Delta U_{\text{Substanz}} = 20 \text{ mV}$$



Ist dieser Quotient größer als 1, ist  $\Delta I$  also größer geworden, sprich: entfernen sich die Stromkurven in den folgenden Voltage clamp Schaubildern voneinander, dann ist der Membranleitwert größer geworden (Es sind z. B. Kanäle in der Membran aufgegangen oder die Leitfähigkeit des einzelnen Kanals hat zugenommen etc.).

Ist der Quotient jedoch kleiner als 1, ist  $\Delta I$  also kleiner geworden, dann hat der Leitwert der Membran abgenommen.

Alle Daten in den folgenden Schaubildern sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Stichproben wurden auf das Vorliegen der Normalverteilung geprüft.

Aus den relativen Leitwertänderungen wurde der Mittelwert gebildet und die Konfidenzintervalle berechnet, indem die Signifikanzschranken aus der Tabelle für die Signifikanzschranken der Student-Verteilung (Fisher und Yates, 1963 p. 46, Table III) für die jeweils gewünschte Irrtumswahrscheinlichkeit für den zweiseitigen Test und für die entsprechende n-Zahl entnommen wurde. Diese Signifikanzschranke wurde mit dem SEM multipliziert und das Ergebnis zum Mittelwert der relativen Leitwertänderung addiert (relativer Leitwert $<1$ ) bzw. vom Mittelwert der relativen Leitwertänderung subtrahiert (relativer Leitwert $>1$ ).

Geprüft wurde dann für welche Irrtumswahrscheinlichkeit der Wert 1 nicht enthalten war.

Die Sternchen über den Standardfehlerbalken geben das Signifikanzniveau an. Ein Sternchen (\*) bedeutet „signifikant“ (95% Konfidenzintervall), zwei Sternchen (\*\*) bedeutet „hoch signifikant“ (99% Konfidenzintervall) und drei Sternchen (\*\*\*) bedeutet „höchst signifikant“ (99,9 % Konfidenzintervall).

Die Anzahl der durchgeführten Experimente wird mit „n“ angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Abhängigkeit des Membranpotenzials und des Membranleitwertes RSZ von der extrazellulären Kaliumkonzentration

Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle für das Ruhemembranpotenzial, für die depolarisierende Wirkung von ANGII und die Repolarisation der Zellen nach depolarisierenden Stimuli. Daher sollte sich bei hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen das Membranpotenzial dem errechneten Nernstpotenzial für  $K^+$  annähern (Siehe Kapitel 2.2.3). Zunächst wurde der direkte Effekt von Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration auf reninsezernierende Zellen (RSZ) untersucht.

Die gemessenen Parameter sind das Membranpotenzial und der für die 7 Klemmpotenziale (-130 mV; -110 mV... -10 mV) benötigte Strom bzw. die daraus errechneten relativen Leitwertänderungen.

Abb. 16 zeigt ein Beispielexperiment für die Wirkung von Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Membranpotenzial und auf die Ströme, die für das Erreichen der Klemmpotenziale nötig sind.

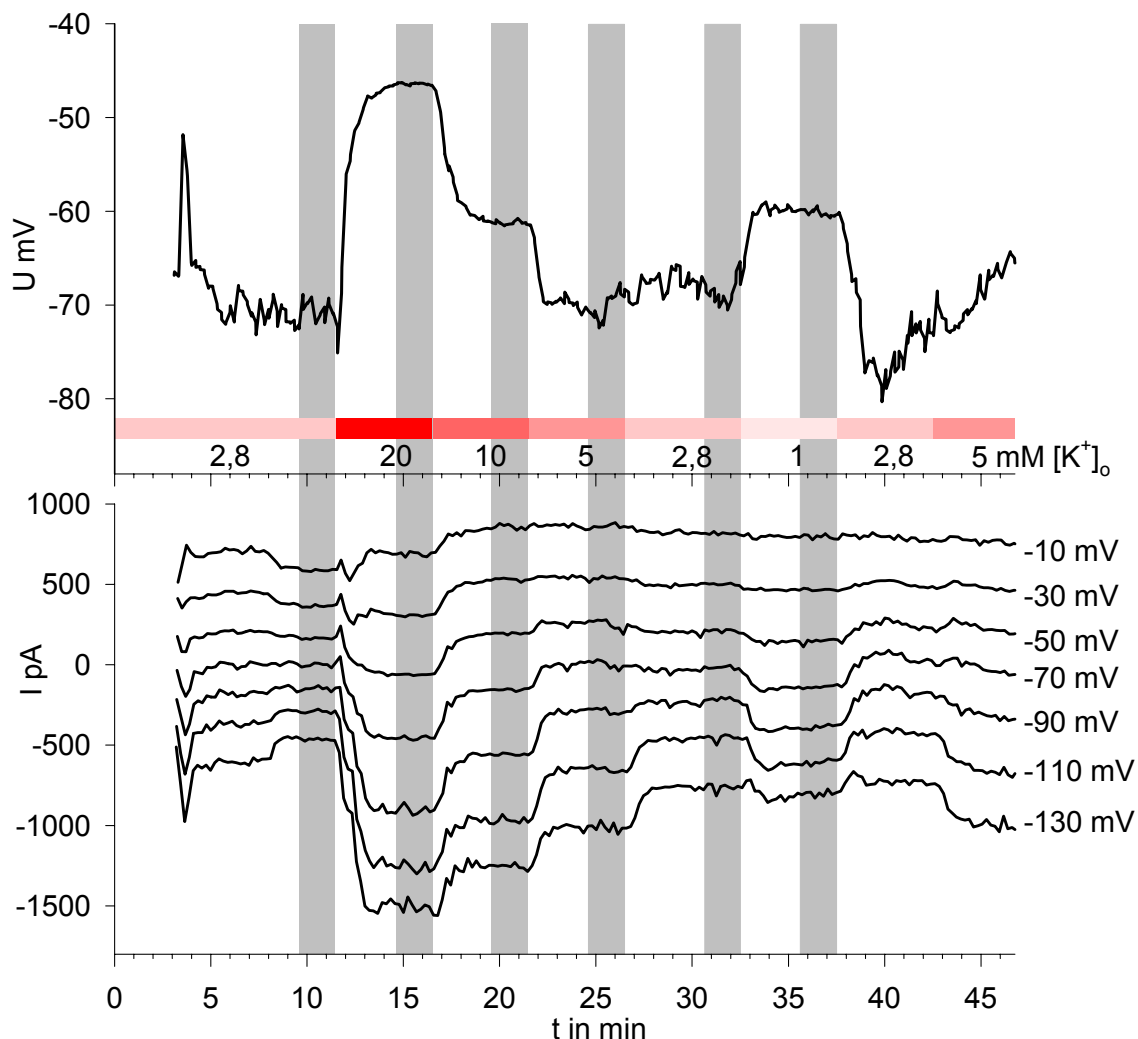
Bei RSZ, die mit HEPES gepufferte Salzlösung mit 20; 10; 5; 2,8 und 1 mM Kalium behandelt werden, wird im Current clamp-Modus folgendes beobachtet.

Membranpotenzial Kontrolle (2,8 mM  $[K^+]_o$ ):  $-60,6 \pm 2,2$  mV (n=16).

Membranpotenzial bei 20 mM  $[K^+]_o$ : Depolarisation um  $16,4 \pm 1,6$  mV auf  $-44,1 \pm 0,7$  mV (n=8)

Weitere Werte siehe Tabelle:

Änderung der $[K^+]_o$	damit verbundene Änderung des Potenzials	
2,8 mM auf 20 mM	von $-60,6 \pm 2,2$ mV (n=16)	auf $-44,1 \pm 0,7$ mV (n=8)
20 mM auf 10 mM	von $-44,1 \pm 0,7$ mV (n=8)	auf $-55,7 \pm 1,5$ mV (n=8)
10 mM auf 5 mM	von $-55,7 \pm 1,5$ mV (n=8)	auf $-61,3 \pm 2,5$ mV (n=6)
2,8 mM auf 1 mM	von $-61,1 \pm 2,8$ mV (n=6)	auf $-55,7 \pm 1,9$ mV (n=6)

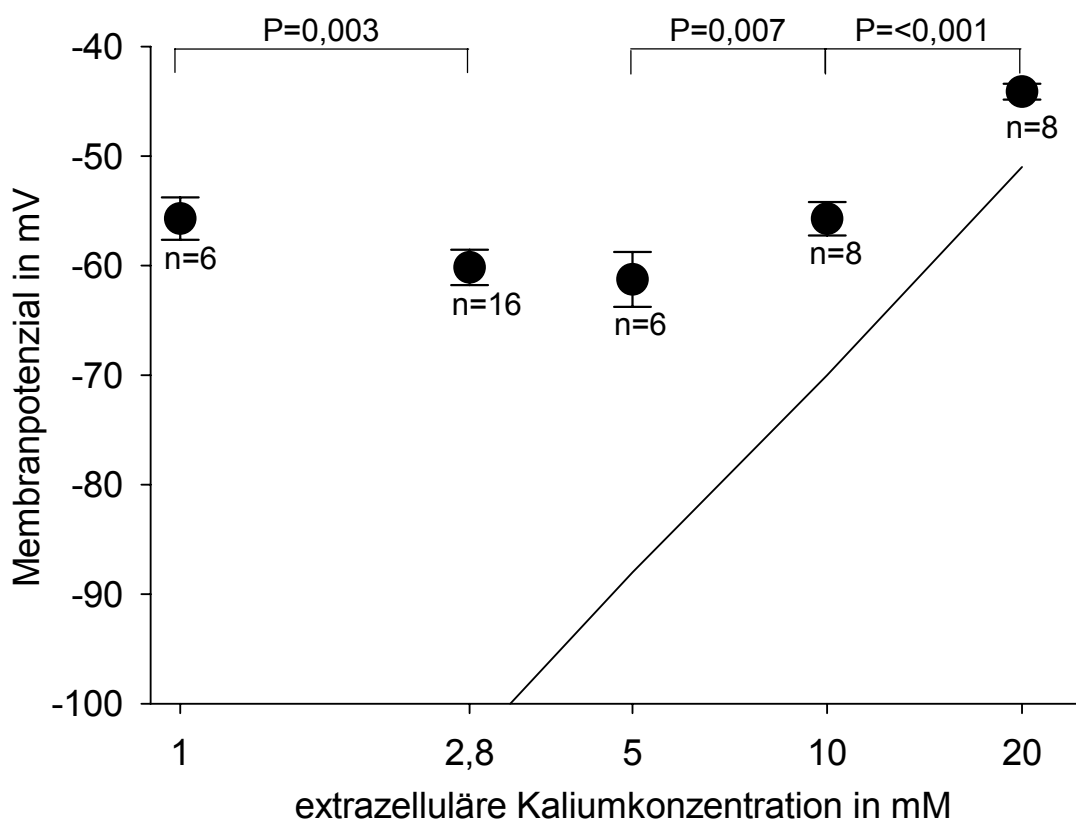


**Abb. 16:** Beispielexperiment: Abhängigkeit des Membranpotenzials und des Membranleitwertes von der extrazellulären Kaliumkonzentration.

Current clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen: Die Superfusion der Zellen mit Kalium (20 mM) bewirkt eine reversible Depolarisation von ca. -70 mV auf ca. -46 mV. Der Referenzauswertungsbereich ( $[K^+]_o = 2,8$  mM) reicht in diesem Beispiel vom Zeitpunkt 9,6 Minuten bis 11,4 Minuten (grauer Balken). Der Auswertungsbereich für Messwerte bei  $[K^+]_o = 20$  mM reicht von 14,7 bis 16,5 Minuten. Die Superfusion der Zellen mit HEPES gepufferter Salzlösung mit 10 mM Kalium (Zeitpunkt: 19,6 bis 21,4 Minuten), 5 mM Kalium (Zeitpunkt: 24,7 bis 26,5 min.) und 2,8 mM Kalium (Zeitpunkt: 30,7 bis 32,5 min.) führt zu einer Repolarisation auf -69 mV. Das Absenken der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 1 mM (Zeitpunkt: 35,6 bis 37,4 min.) führt zu einer Depolarisation.

Voltage clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Der Leitwert der Zellmembran nimmt bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 2,8 auf 20 mM zu. Bei abnehmender extrazellulärer Kaliumkonzentration nimmt der Leitwert wieder ab. Die Superfusion der Zellen mit 1 mM Kalium führt jedoch zu einer Zunahme des Membranleitwertes bei den Klemmpotenzialen zwischen -90 und -50 mV bezogen auf die zweite Applikation von 2,8 mM Kalium.

Abbildung 17 stellt die Mittelwerte der gemessenen Membranpotenziale im Vergleich zu den nach der Nernstgleichung errechneten Werten dar (Siehe Kapitel 2.2.3). Abbildung 56 zeigt sowohl die Messergebnisse aus diesem Kapitel, als auch die Referenzwerte des Membranpotenzials unter Ruhebedingungen aller ANGI-Experimente.

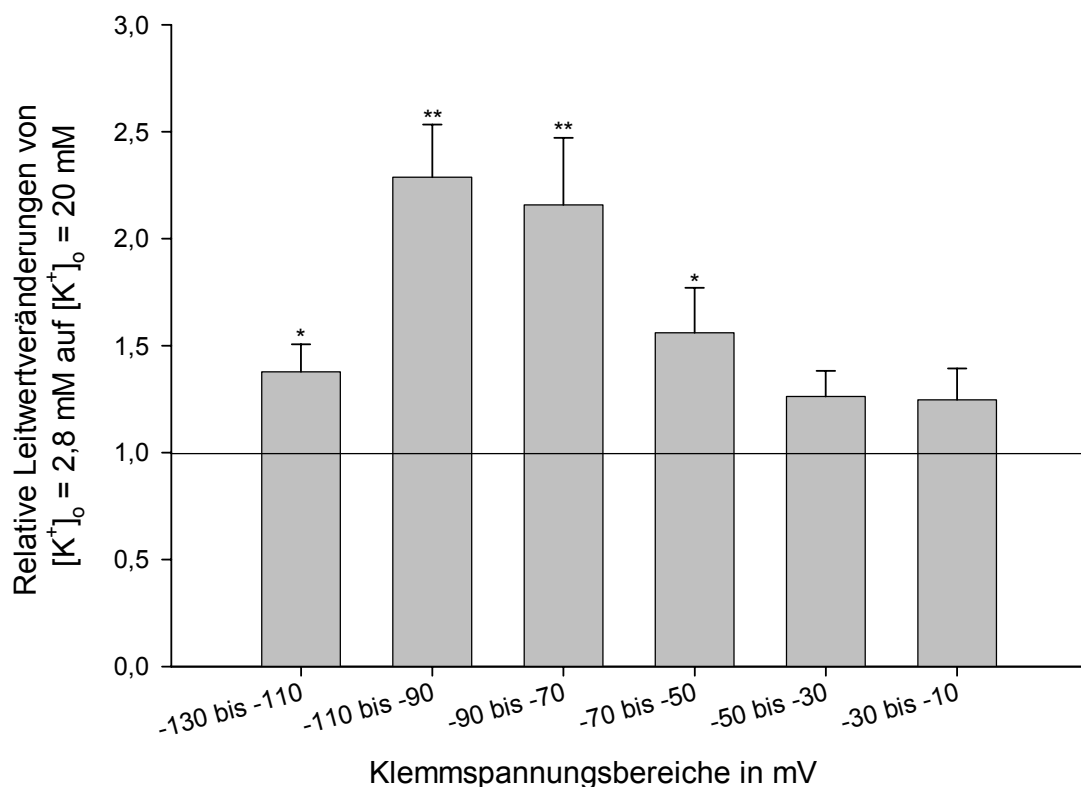


**Abb. 17:** Membranpotential bei Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration. Es zeigt sich, dass die Zellen bei 5 mM  $[K^+]_o$  am stärksten polar sind und der SEM groß ist. Bei 20 mM  $[K^+]_o$  ist der SEM am geringsten (Mittelwerte mit SEM). Die P-Werte ergeben sich aus gepaarten t-Tests. Die n-Zahlen für die t-Tests ergeben sich aus der kleineren der beiden angegebenen. Die durchgezogene Linie gibt die errechneten Potenziale nach der Nernstgleichung an (für 37°C und einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 142 mM).

Bei erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen ( $[K^+]_o > 10$  mM) nähert sich die gedachte Kurve durch die Mittelwerte der errechneten Nernst-Geraden an. Im Bereich von  $[K^+]_o = 5$  mM erreicht das Potenzial sein Minimum. Bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen, die kleiner als ca. 3 mM sind, depolarisieren die Zellen. Das Membranpotential weicht also nicht nur vom errechneten Wert ab, sondern

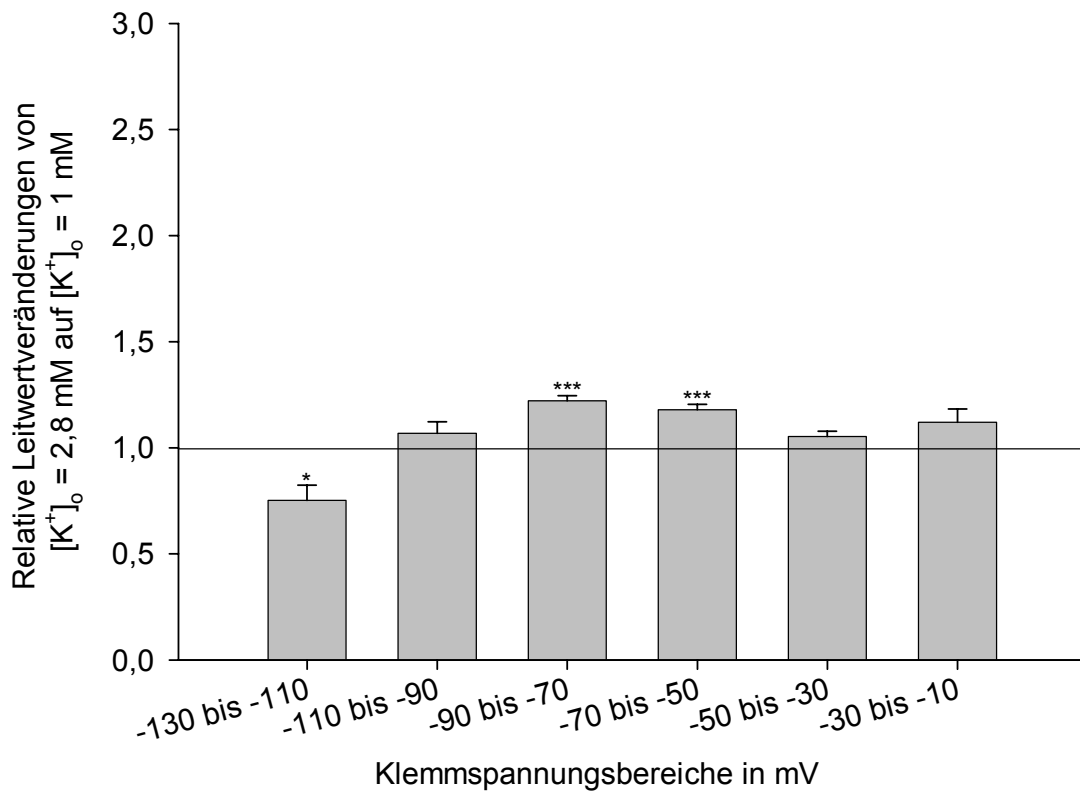
wird sogar weniger negativ.

Im Voltage clamp-Modus zeigt sich bei der Superfusion der Zellen mit HEPES gepufferter Salzlösung mit 20 mM Kalium eine Zunahme des Membranleitwertes (Abb. 16; 18). Die Superfusion mit 10; 5 und 2,8 mM Kalium führt jeweils zu einer Leitwertverminderung in allen Klemmbereichen bezogen auf die Bedingungen bei 20 mM Kalium.



**Abb. 18:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit Kalium (20 mM) bezogen auf 2,8 mM  $[K^+]_o$ . Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV ( $n=6$ ). Die anderen Leitwertveränderungen sind nicht signifikant.

Bei einer Kaliumkonzentration von 1 mM steigt der Leitwert im Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV bezogen auf 2,8 mM  $[K^+]_o$  an, im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV nimmt der Leitwert signifikant ab ( $n=6$ ) (Abb. 16; 19).



**Abb. 19:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit Kalium (1 mM) bezogen auf 2,8 mM  $[K^+]_o$ . Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV. Des Weiteren zeigt sich eine höchstsignifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV (n=6). Die verbleibenden Leitwertveränderungen sind nicht signifikant.

Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- das Membranpotenzial der Zellen am stärksten negativ ist bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen zwischen 2,8 und 5 mM.
- eine Erhöhung und eine Verminderung der  $[K^+]_o$  bezogen auf 2,8 mM  $[K^+]_o$  den Membranleitwert im für das Membranpotenzial relevanten Klemmbereich erhöht.

### 3.2 Wirkung von ANGII auf RSZ

Das Hormon ANGII inhibiert die Freisetzung von Renin aus RSZ und vermittelt damit einen negativen Rückkopplungsmechanismus im RAAS. Um die Effekte dieses Hormons auf Ionenkanäle in der Plasmamembran von RSZ zu untersuchen, wurde die Wirkung von ANGII auf das Membranpotenzial und den Membranleitwert dieser Zellen gemessen.

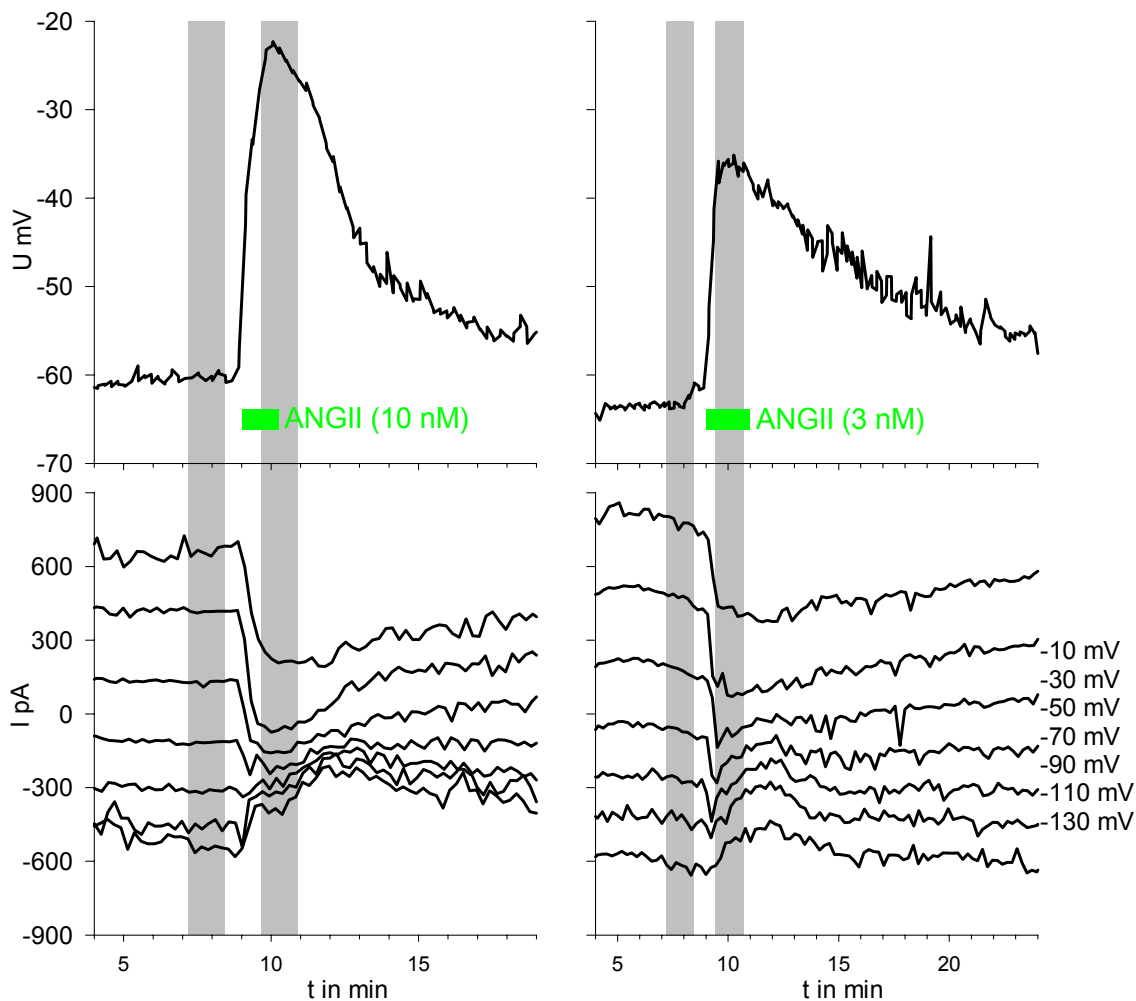
Die unabhängigen Variablen in den weiteren Experimenten dieses Kapitels sind die Konzentrationen von ANGII (1; 3; 10 nM), die extrazellulären Kaliumkonzentrationen (2,8; 6,5; 10 oder 142 mM), um den Beitrag der Einwärtsgleichrichter im Verhältnis zu anderen Leitfähigkeiten zu erhöhen (6,5; 10 mM) und um den Effekt von sich schließenden Kaliumkanälen zu verringern (142 mM entspricht der  $[K^+]_i$ ), d.h., den elektrochemischen Gradienten für Kaliumionen über die Zellmembran zu minimieren

und die Applikationsdauer, um einen vermuteten Zeittrend zu untersuchen.

Die gemessenen Parameter sind das Membranpotenzial und der für die 7 Klemmpotenziale benötigte Strom bzw. die daraus errechneten relativen Leitwertänderungen.

### 3.2.1 Wirkung von ANGII (10 nM und 3 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM)

Abbildung 20 zeigt ein Beispiexperiment für die Wirkung von 10 nM ANGII und 3 nM ANGII jeweils appliziert für 1,25 bzw. 2 Minuten in  $[K^+]_o=2,8$  mM.



**Abb. 20:** Beispiexperimente: Wirkung von ANGII 10 nM und 3 nM ( $[K^+]_o=2,8$  mM):  
Current clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen: Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM (links)) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -60 mV auf ca. -23 mV (Referenz (graue Balken)): Zeitpunkt 7,2 bis 8,4 min.; ANGII: 9,7 bis 10,9 min.). Die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM (rechts)) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -63 mV auf ca. -36 mV (Referenz: Zeitpunkt 7,2 bis 8,4 min.; ANGII: 9,4 bis 10,7 min.).  
Voltage clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII 10nM/3 nM führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV und zu einer Zunahme des Leitwertes im Bereich zwischen -30 und -10 mV.



Bei RSZ, die mit ANGII (10 nM) in NaCl-HEPES gepufferter Salzlösung mit 2,8 mM K<sup>+</sup> behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-64,5 \pm 0,8$  mV auf  $-31,7 \pm 1,0$  mV (n=48) beobachtet (Abb. 20/links).

Zellen, die mit ANGII (3 nM) behandelt werden, depolarisieren von  $-63,9 \pm 0,9$  mV nur auf  $-36,6 \pm 1,5$  mV (n=33) (Abb.20/rechts). Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Applikation von 3 und 10 nM ANGII bezüglich des Betrags der Depolarisation (ANOVA: Daten sind normalverteilt, und haben ähnliche Varianzen: Tukey Test: P=0,006).

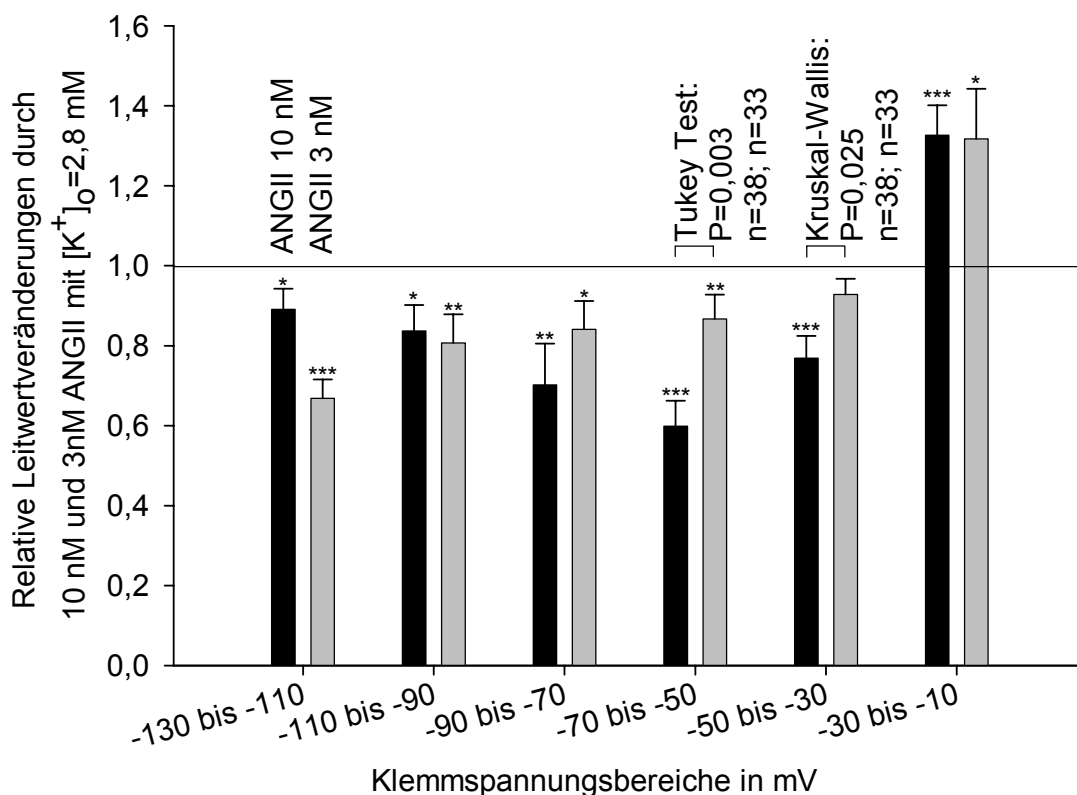
10 nM ANGII depolarisiert die Zellen um  $32,8 \pm 1,1$  mV (n=48).

3 nM ANG II depolarisiert die Zellen um  $27,3 \pm 1,8$  mV (n=33).

Im Voltage Clamp-Modus zeigt sich in den Klemmpotenzialen von -130 bis -50 mV eine signifikante Abnahme des Membranleitwerts und eine signifikante Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV (ANGII 10 nM: n=36 (12 Experimente sind nur im Current Clamp durchgeführt worden); ANGII 3 nM: n=33; Abb. 20, 21).

Eine gedachte Kurve über den Balken zeigt für 10 nM ANGII ein Minimum beim Klemmbereich zwischen -70 bis -50 mV (U-Form), während die Kurve für 3 nM ANGII über alle Klemmbereiche kontinuierlich ansteigt (parabolisch). Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Applikation von 3 und 10 nM bezüglich der relativen Leitwertänderungen im Klemmbereich zwischen -70 und -50 mV (ANOVA: Werte sind normalverteilt und haben ähnliche Varianzen. Tukey Test: P=0,003).

Auch im Klemmbereich zwischen -50 und -30 mV ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA: Werte sind normalverteilt, haben aber unterschiedliche Varianzen: Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks: P=0,025).



**Abb. 21:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit AngII 10 nM (schwarze Balken) und 3 nM (graue Balken) ( $[K^+]_o=2,8$  mM). Es zeigen sich Leitwertverminderungen im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV bzw. -50 mV und Zunahmen des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -10 und -30 mV (10 nM ANGII: n=36; 3 nM ANGII: n=33). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant von 1 verschieden.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass,

- ANGII 3 und 10 nM RSZ konzentrationsabhängig depolarisiert.
- die Depolarisation zwar weitgehend, aber nicht vollständig reversibel ist.
- die Depolarisation mit einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV (3 nM ANGII) und zwischen -130 und -30 mV (10 nM ANGII) und einer Leitwertzunahme im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV einhergeht.

### 3.2.2 Wirkung von ANGII (3 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=6,5$ mM)

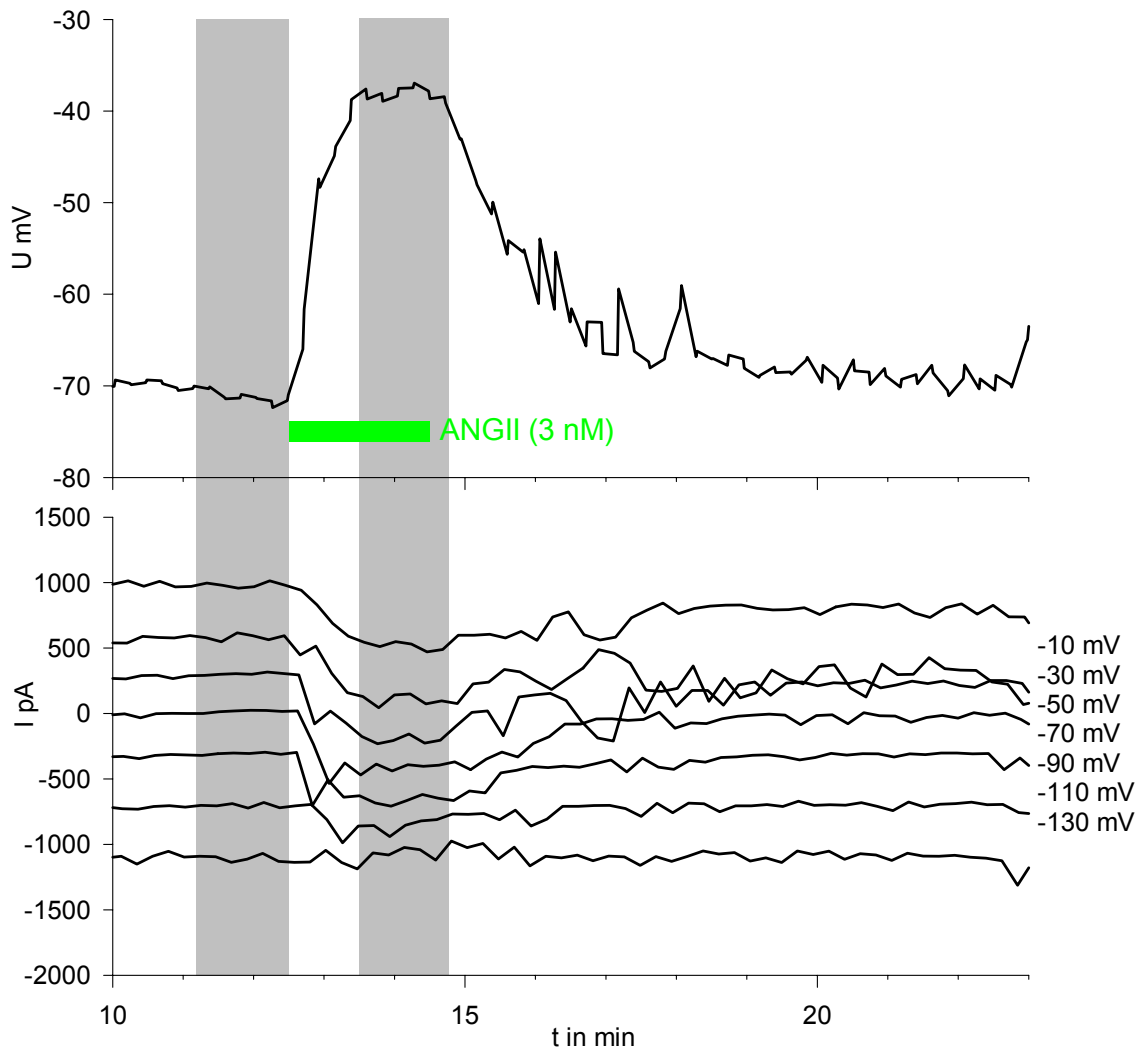
Da an der depolarisierenden Wirkung von ANGII das Schließen von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (Kir 2.x) beteiligt ist (Kurtz und Penner; 1989), wurde der Effekt einer leicht erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Wirkung von ANGII untersucht. Durch diese Erhöhung sollte sich der Anteil der am Ruhemembranpotenzial und an der Wirkung von ANGII beteiligten Ionenkanäle zugunsten der Kaliumkanäle verschieben.

Abbildungen 22 zeigen Beispieleexperimente u.a. für die Wirkung von 3 nM ANGII in  $[K^+]_o=6,5$  mM.

Bei RSZ, die mit ANGII (3 nM) in NaCl-HEPES gepufferter Salzlösung mit 6,5 mM  $K^+$  behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-67,7 \pm 1,6$  mV auf  $-33,9 \pm 3,9$  mV ( $n=7$ ) beobachtet (Abb. 22).

ANGII (3 nM; in  $[K^+]_o=6,5$  mM) depolarisiert die Zellen um  $33,9 \pm 3,4$  mV ( $n=7$ ). Der Betrag der Depolarisationsamplitude durch 3 nM ANGII in  $[K^+]_o=6,5$  mM ist statistisch nicht verschieden von 3 nM ANGII dem gemessen in  $[K^+]_o=2,8$  mM ( $27,3 \pm 1,8$  mV; t-Test:  $P=0,14$ ).

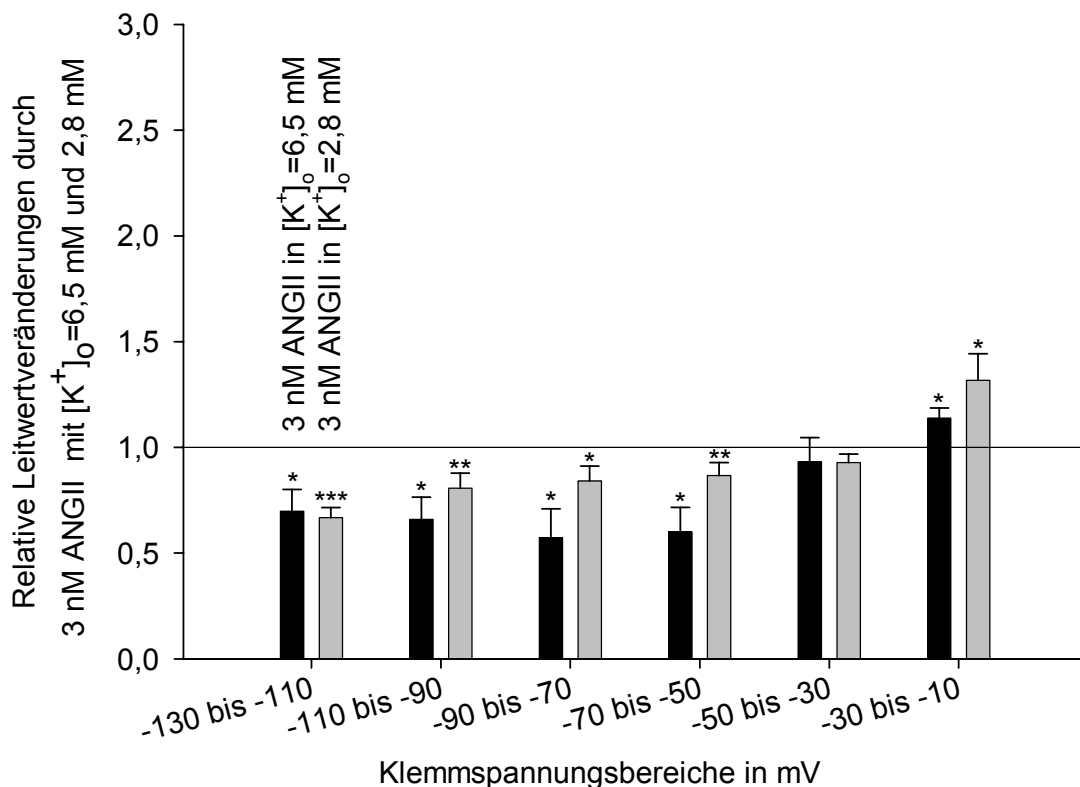
Im Voltage Clamp-Modus zeigt sich in den Klemmpotenzialen von -130 bis -50 mV eine signifikante Abnahme des Membranleitwerts (Abb. 22; 23). Die Zunahme des Membranleitwertes im Bereich von -30 bis -10 mV ist ebenfalls signifikant.



**Abb. 22:** Beispielexperiment: ANGII (3 nM;  $[K^+]_o = 6,5$  mM).

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM;  $[K^+]_o = 6,5$  mM) bewirkt eine reversible Depolarisation von ca. -71 mV auf ca. -38 mV. Die grauen Balken geben den Auswertungsbereich an.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII bewirkt eine reversible Leitwertverminderung in den Klemmbereich von -130 bis -50 mV und einer Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV.



**Abb. 23:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM;  $[K^+]_o = 6,5$  mM (schwarze Balken) im Vergleich zu  $[K^+]_o = 2,8$  mM (graue Balken; Daten aus Abb. 21). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV und eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV ( $[K^+]_o = 6,5$  mM: n=7;  $[K^+]_o = 2,8$  mM: n=33;). Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kaliumkonzentrationen bezüglich der Leitwertänderungen durch ANGII 3 nM. (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass ANGII 3nM in  $[K^+]_o = 6,5$  mM die Zellen tendenziell stärker depolarisiert als in  $[K^+]_o = 2,8$  mM. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Das Leitwertprofil ähnelt eher dem von 10nM ANGII in  $[K^+]_o = 2,8$  mM.

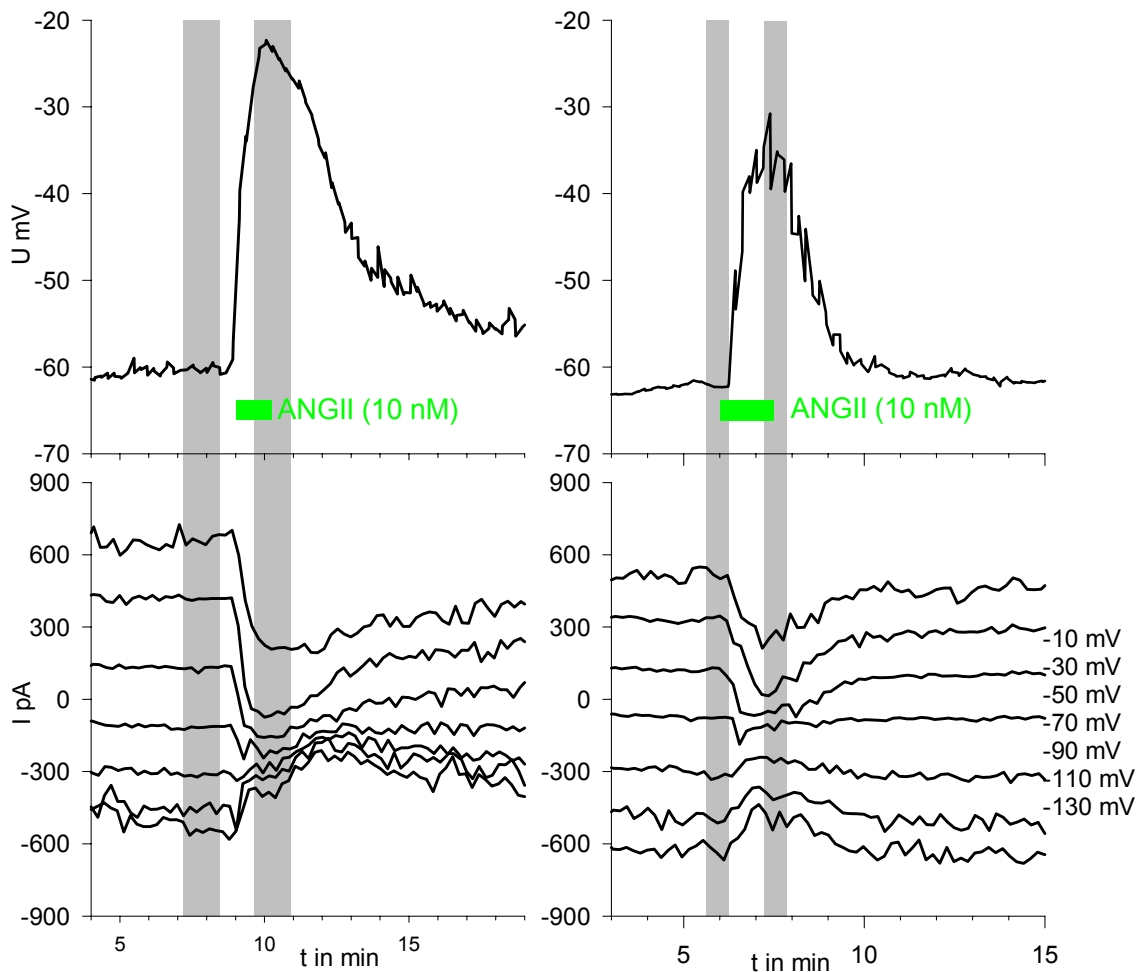
### 3.2.3 Wirkung von ANGII (10 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=10$ mM)

Da an der depolarisierenden Wirkung von ANGII das Schließen von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen ( $K_{ir}$  2.x) beteiligt ist, und sich bei einer  $[K^+]_o=6,5$  mM in der Wirkung von ANGII kein signifikanter Unterschied zur Wirkung in  $[K^+]_o=2,8$  mM ergab, wurde in den folgenden Experimenten die Kaliumkonzentration auf 10 mM erhöht. Durch diese Erhöhung sollte sich der Anteil der am Ruhemembranpotenzial und an der Wirkung von ANGII beteiligten Ionenkanäle noch weiter zugunsten der Kaliumkanäle verschieben.

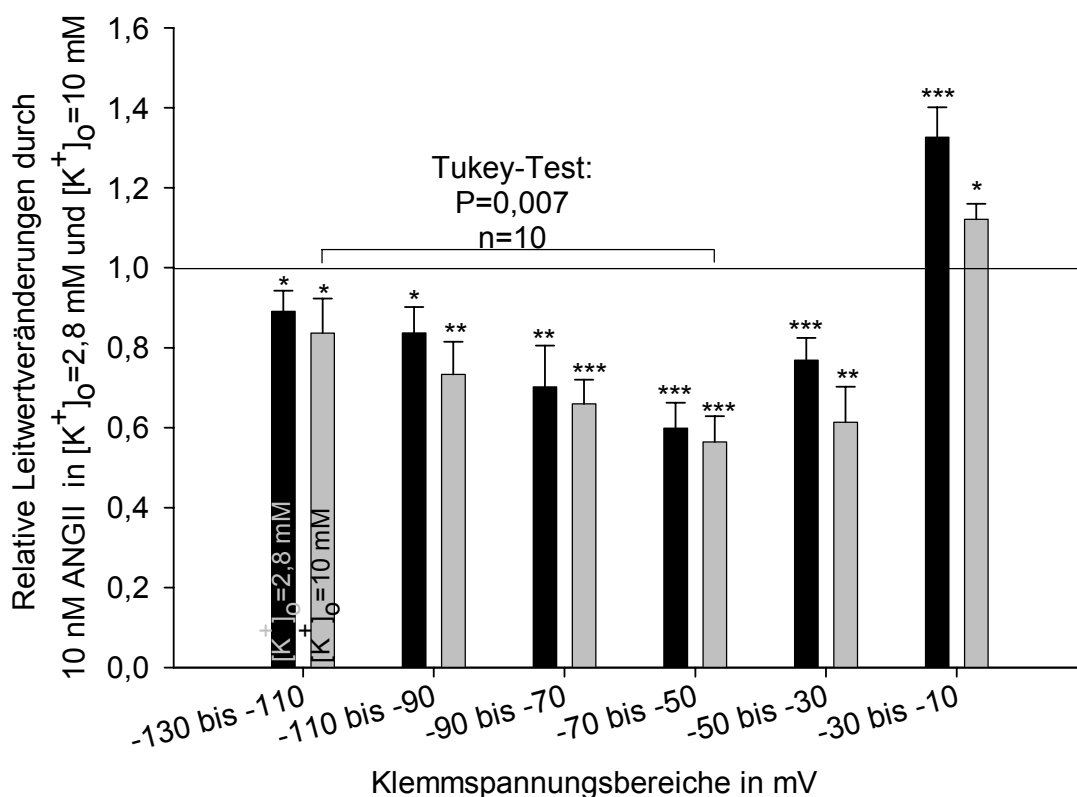
Abbildung 24 zeigt ein Beispielerperiment u.a. für die Wirkung von 10 nM ANGII in  $[K^+]_o=10$  mM.

Bei RSZ, die mit ANGII (10 nM) in NaCl-HEPES gepufferter Salzlösung mit 10 mM  $K^+$  behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-59,5 \pm 0,8$  mV um  $28,9 \pm 1,8$  mV auf  $-30,6 \pm 1,7$  mV ( $n=10$ ) beobachtet (Abb. 24).

Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmpotenzialen von -130 bis -30 mV eine signifikante Abnahme des Membranleitwertes. Im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV zeigte sich eine signifikante Zunahme des Leitwertes (Abb. 24; 25).



**Abb. 24:** Beispielerperimente: Wirkung von ANGII 10 nM in  $[K^+]_o=2,8$  mM und  $[K^+]_o=10$  mM:  
Current clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen: Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM in  $[K^+]_o=2,8$  mM (links)) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -60 mV auf ca. -23 mV. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM in  $[K^+]_o=10$  mM (rechts)) bewirkt eine reversible Depolarisation von ca. -62 mV auf ca. -31 mV.  
Voltage clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII 10nM führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV und zu einer Zunahme des Leitwertes im Bereich zwischen -30 und -10 mV in beiden extrazellulären Kaliumkonzentrationen.



**Abb. 25:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM in  $[K^+]_o=2,8$  mM und  $[K^+]_o=10$  mM).

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV. Die Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV ist ebenfalls signifikant ( $[K^+]_o=10$  mM:  $n=10$ ;  $[K^+]_o=2,8$  mM:  $n=36$ ; Daten aus Abb. 21). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leitwertveränderungen durch ANGII in den beiden extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Es besteht jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Leitwertänderungen im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV und denen im Klemmbereich zwischen -70 und -50 mV (U-Form).

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Wirkung von 10 nM ANGII zwischen einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 2,8 mM und einer von 10 mM sowohl bezüglich der Depolarisation und des Betrags der Depolarisationsamplitude als auch bezüglich der Leitwertveränderungen (95% Konfidenzintervall der Differenz der Mittelwerte enthält die 0).

Wohl aber zeigt sich mit 10 mM  $[K^+]_o$  ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Leitwertänderungen im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV und denen im Klemmbereich zwischen -70 und -50 mV (U-Form).



### 3.2.4 Wirkung von ANGII (1 nM) mit einer Applikationsdauer von 10 Minuten auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM)

ANGII (1 nM) wurde für 10 Minuten appliziert, um langsame Effekte von schnellen zu trennen und einen möglichen Zeittrend bezüglich des Leitwertes zu untersuchen, da variable, kurze Zunahmen des Membranleitwertes zu Beginn (nach ca. 2 bis 4 Minuten) der ANGII-induzierten Depolarisation beobachtet wurden, auf die eine Abnahme des Leitwertes folgte.

Abbildung 26 zeigt Beispielexperimente für die Wirkung von 1 nM ANGII (10 Minuten Applikationszeit) in  $[K^+]_o=2,8$  mM im Vergleich zu 10 (Applikationszeit 1,25 Minuten) und 3 nM ANGII (2 Minuten Applikationszeit).

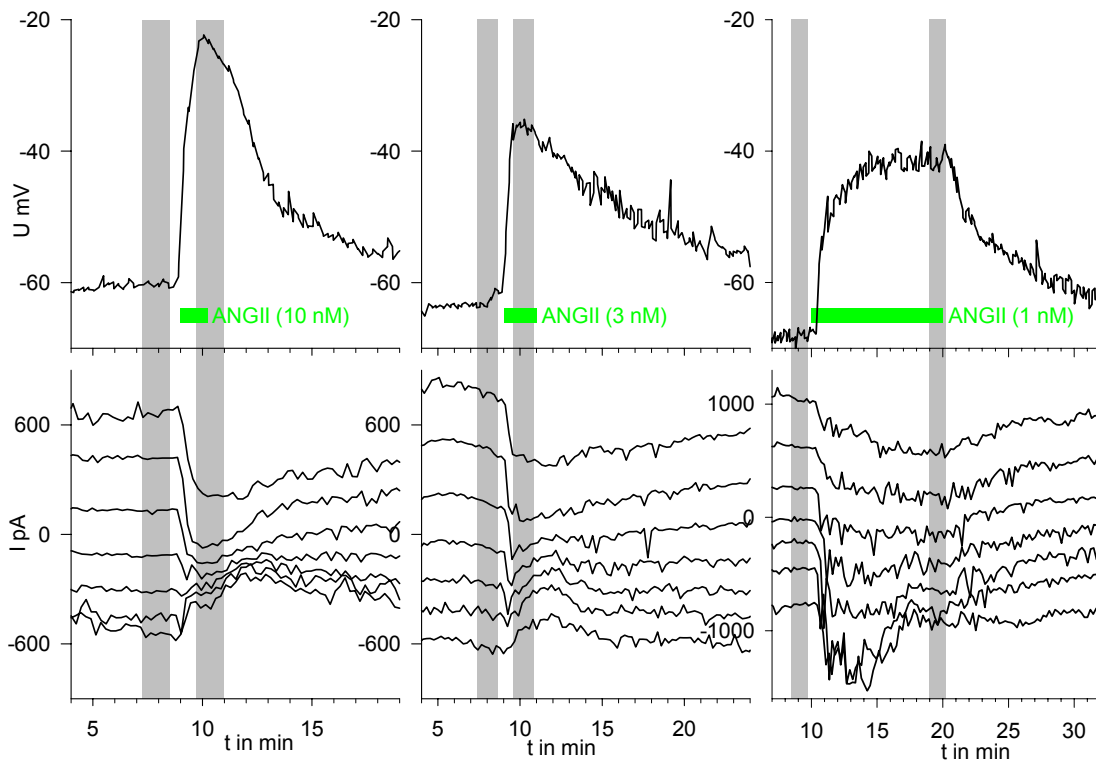
Bei RSZ, die mit 1 nM ANGII für 10 Minuten behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-66,9 \pm 0,9$  mV um  $23,0 \pm 2,4$  mV auf  $-43,9 \pm 2,4$  mV ( $n=10$ ) beobachtet.

Bei RSZ, die mit 1 nM ANGII für 3 Minuten behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-65,3 \pm 1,3$  mV um  $13,9 \pm 2,1$  mV auf  $-51,4 \pm 2,3$  mV ( $n=11$ ) beobachtet (Abb. 26).

3 nM ANGII depolarisieren RSZ nach 2 Minuten stärker als 1 nM ANGII nach 10 Minuten Applikation). Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA, Tukey-Test, t-Test:  $P=0,023$ )

Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmbereichen von -130 bis -90 mV und zwischen -70 und -30 mV eine signifikante Abnahme des Leitwertes durch 1 nM ANGII (10 minütige Applikation). Die tendenzielle Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich von -30 bis -10 ist nicht signifikant ( $n=10$ ).

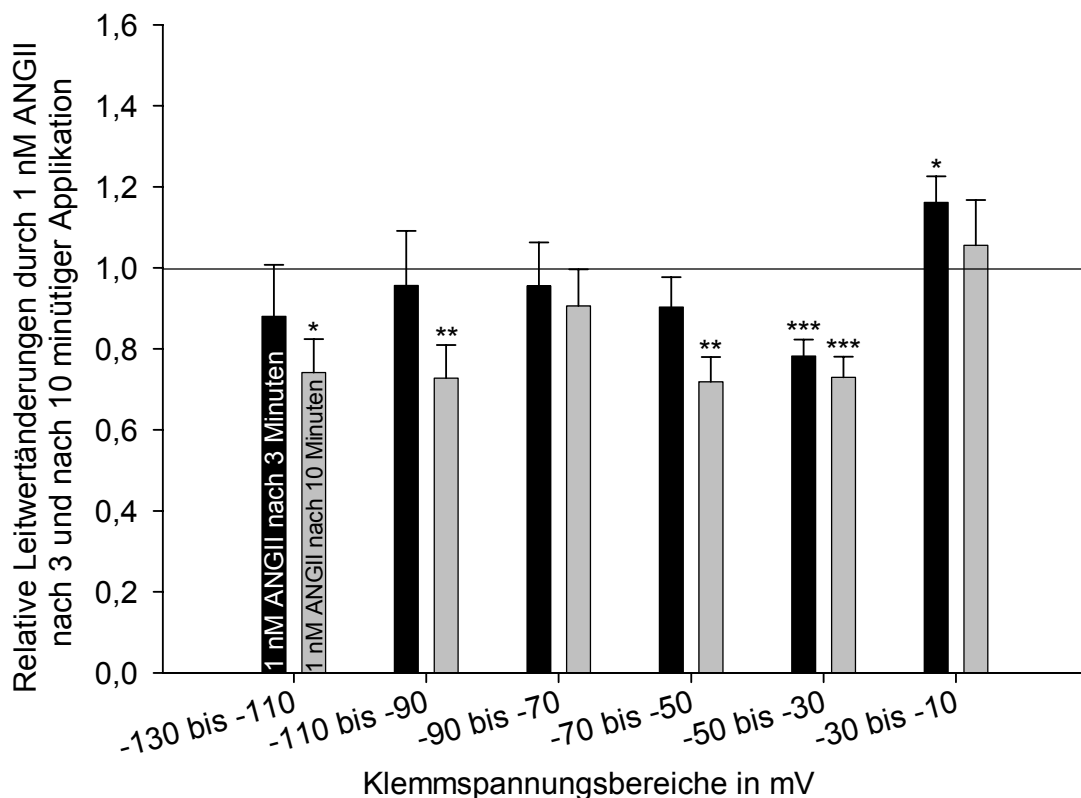
Nach 3 Minuten zeigt sich eine signifikante Abnahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -50 und 30 mV und eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV ( $n=11$ ; Abb. 26; 27).



**Abb. 26:** Beispielexperiment: Wirkung von ANGII (1 nM, 10 Minuten Applikationszeit;  $[K^+]_o = 2,8$  mM) im Vergleich zu 10 nM (1,25 Minuten) und 3 nM ANGII (2 Minuten).

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM (links)) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -60 mV auf ca. -23 mV (Referenz (graue Balken)), mit ANGII (3 nM (Mitte)) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -63 mV auf ca. -36 mV und mit ANGII (1 nM (rechts)) führt zu einer Depolarisation der Zellen von ca. -68 mV auf ca. -41 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII 10 nM/3 nM führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV und zu einer Zunahme des Leitwertes im Bereich zwischen -30 und -10 mV. ANGII (1 nM) erhöht den Leitwert der Membran zunächst. Die andauernde Applikation von ANGII senkt den Leitwert der Membran im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV. Der Leitwert bei zwischen -30 und -10 mV bleibt unverändert.



**Abb. 27:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch eine 3 und 10 minütige Superfusion der Zellen mit ANGII (1 nM) in  $[K^+]_o=2,8$  mM. Nach 3 Minuten zeigt sich eine signifikante Abnahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -50 und 30 mV und eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV (n=11). Nach 10 Minuten zeigt sich eine signifikante Abnahme im Klemmbereich zwischen -130 und -90 mV und zwischen -70 und -30 mV. (n=10). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- die depolarisierende Wirkung von ANGII 1; 3 und 10 nM konzentrationsabhängig ist und das Membranpotenzial ein Plateau erreicht.
- die Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -50 und -30 mV sowohl nach 3 als auch nach 10 Minuten vorhanden ist.
- es durch ANGII 1 nM bei 3 min. Applikationsdauer zu einer anfänglichen Stromzunahme im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV kommt, die nach 10 Minuten nicht mehr vorhanden ist.
- die Leitwertverminderung durch 1 nM ANGII im Klemmbereich zwischen -130 und -90 mV und zwischen -70 und -50 erst nach 10 Minuten und nicht schon nach 3 Minuten Applikationszeit auftritt.

### 3.2.5 Wirkung von ANGII (10 nM) auf RSZ in K<sup>+</sup>-HEPES PS ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>=142 mM)

Unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen ( $[K^+]_o=[K^+]_i$ ) ist  $E_K=0$  mV und eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit kann keine direkten Auswirkungen auf das Membranpotenzial haben.

Da RSZ durch  $[K^+]_o=142$  mM stark depolarisieren und es Hinweise gibt, dass spannungsgesteuerte Calciumkanäle in der Membran vorhanden sind, steigt die  $[Ca^{++}]_i$  an. Eine Applikation von ANGII in symmetrischen Kaliumkonzentrationen lässt die  $[Ca^{++}]_i$  aber noch deutlich weiter ansteigen (mdl. Mitteilung von Herrn PD. Dr. Ulrich Russ).

Falls an der depolarisierenden Wirkung von ANGII das Öffnen von calcium-abhängigen Chloridkanälen beteiligt ist, so sollte dieser Effekt, unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen teilweise zu isolieren sein.

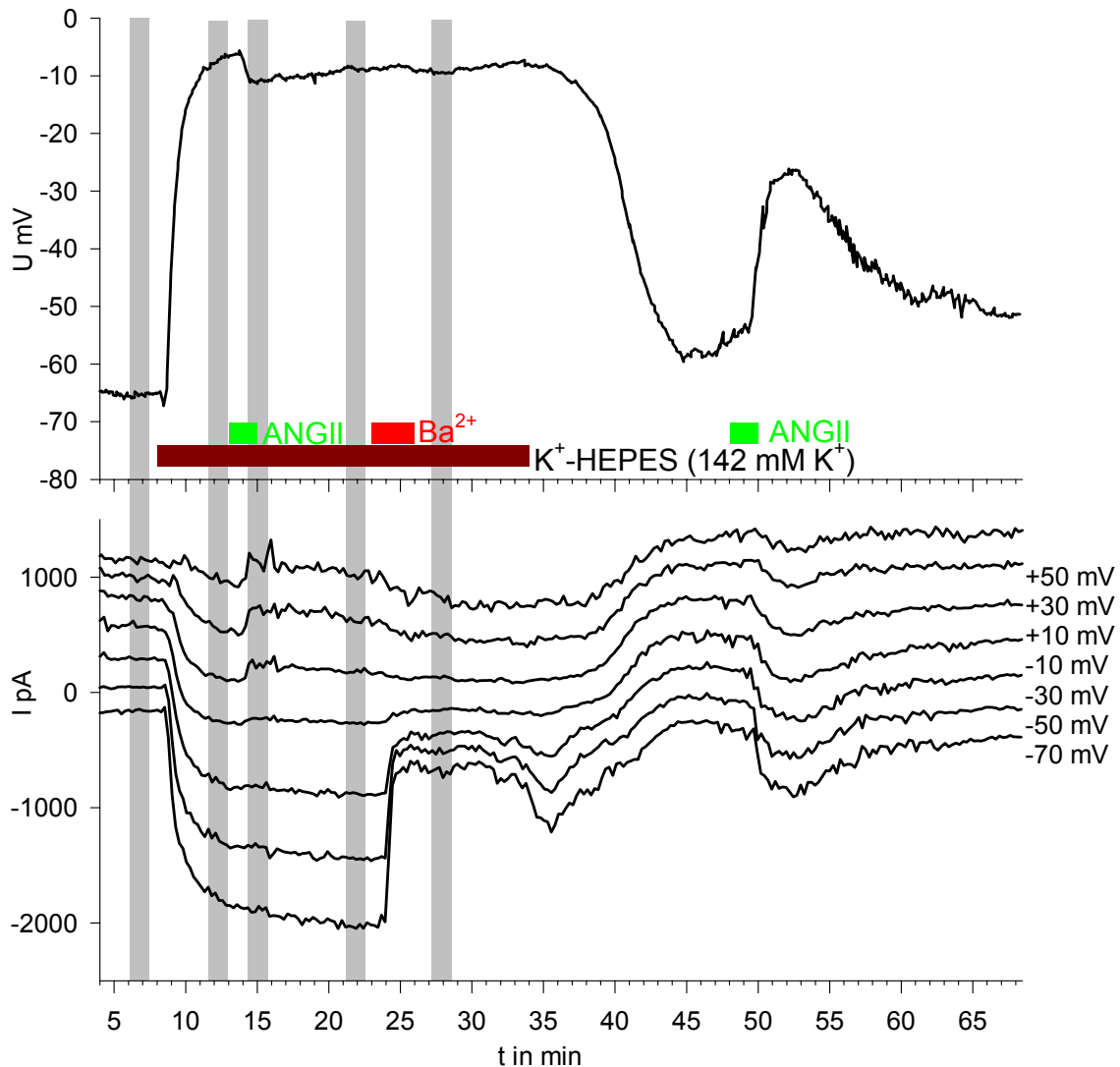
Da die Zellen unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen stark depolarisieren, wurden hier abweichend vom Voltage Clamp-Standardprotokoll in 5 Experimenten im VC Klemmpotenziale von -70 mV bis +50 mV vorgegeben.

Abbildung 28 zeigt ein Beispiexperiment für die Wirkung von 10 nM ANGII in  $[K^+]_o=142$  mM.

Bei RSZ, die mit K<sup>+</sup>-HEPES PS ( $[K^+]_o=142$  mM) behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-68,9 \pm 1,6$  mV auf  $-6,2 \pm 0,4$  mV (n=14) beobachtet (Abb. 28), die mit einer Zunahme des Leitwertes im gesamten Klemmbereich einhergeht (Abb. 28, 29)

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde ANGII (10 nM) in K<sup>+</sup>-HEPES-PS ( $[K^+]_o=142$  mM) appliziert und es zeigt sich im Current Clamp-Modus eine Hyperpolarisation von  $-6,3 \pm 0,4$  mV auf  $-10,5 \pm 0,5$  mV (n=13; Abb. 28).

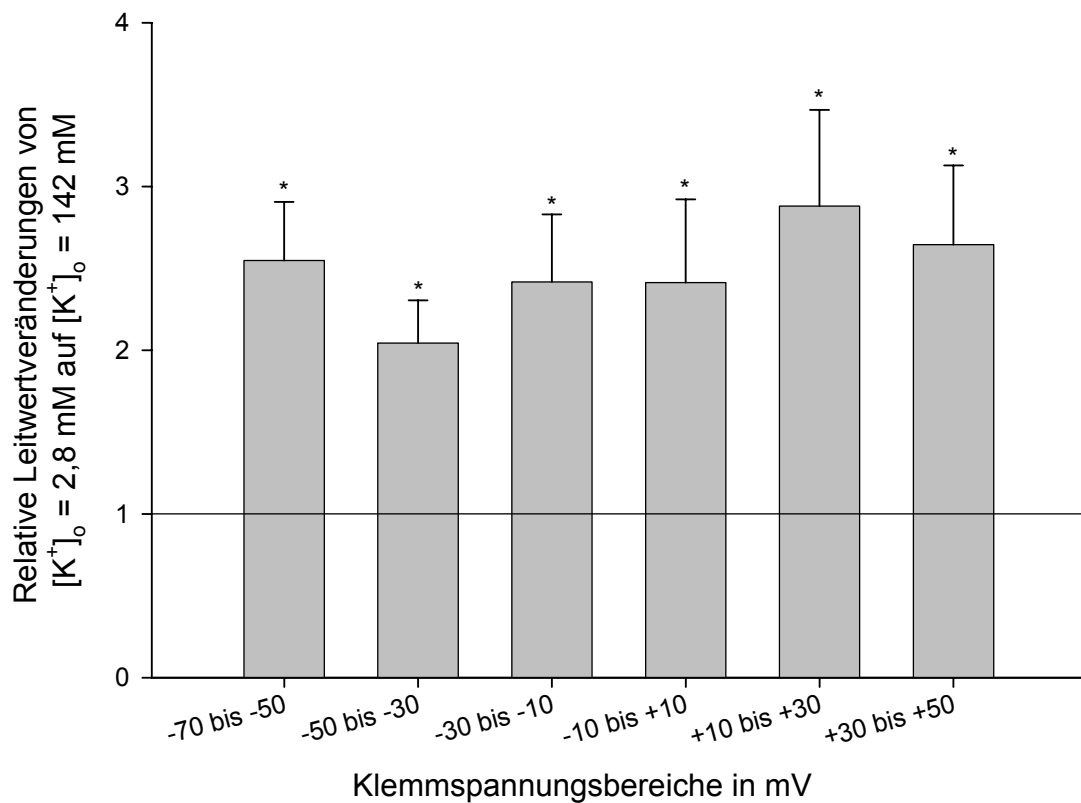
Im Voltage Clamp-Modus (7 Klemmpotenziale zwischen -70 und +50 mV) zeigte sich in den Klemmbereichen von -10 bis +50 mV eine Zunahme des Leitwertes durch ANGII (10 nM) (n=5, da 8 Experimente mit einem Klemmspannungsbereich von -130 bis -10 mV durchgeführt wurden; Abb. 28; 30).



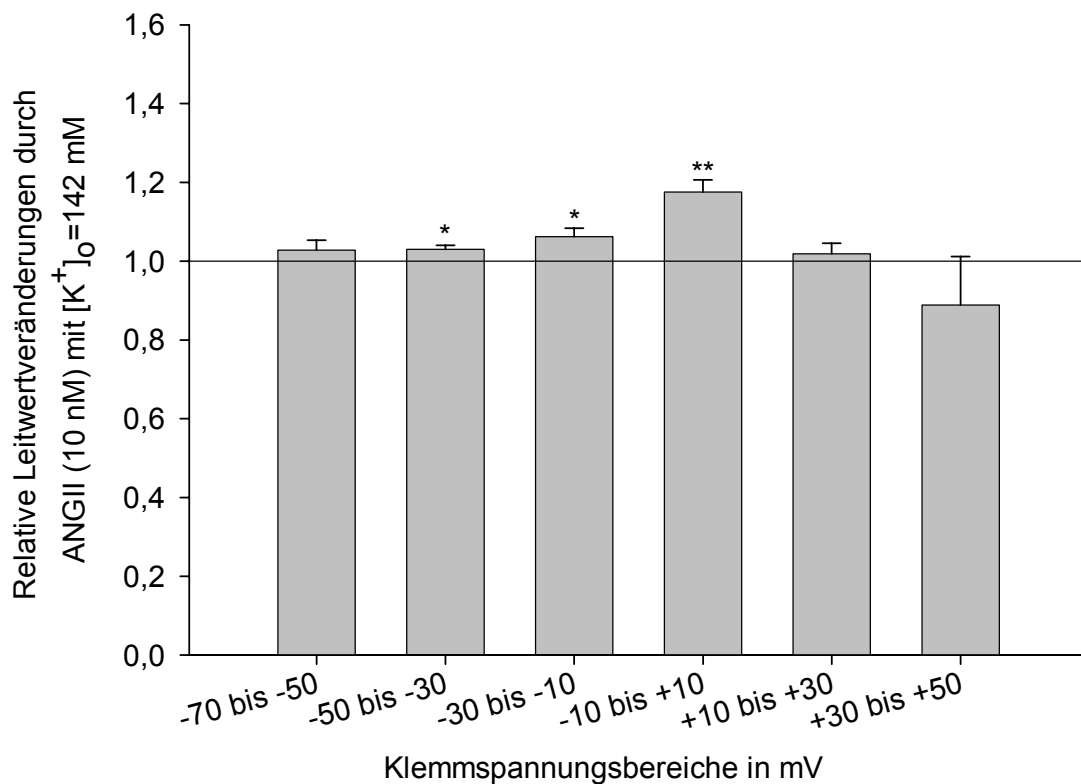
**Abb. 28:** Beispielerperiment: Wirkung von einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 142 mM und ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=142$  mM) im Vergleich zu Barium (1 mM):

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit  $K^+$ -HEPES (142 mM  $K^+$ ) führt zu einer weitgehend reversiblen Depolarisation der Zellen von ca. -66 mV auf ca. -7 mV. ANGII (10 nM) bewirkt unter  $K^+$ -HEPES eine reversible Polarisation von ca. -7 mV auf ca. -11 mV. Die Applikation von  $Ba^{2+}$  (1 mM) unter  $K^+$ -HEPES führt zu keiner Veränderung des Membranpotenzials. Eine weitere Applikation von ANGII in NaCl-HEPES PS ( $[K^+]_o=2,8$  mM) depolarisiert die Zellen weitgehend reversibel von ca. -60 mV auf ca. -26 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für 7 Klemmpotenziale zwischen -70 und +50 mV sind gegen die Zeit aufgetragen.  $K^+$ -HEPES führt zu einer Leitwertzunahme der Membran. ANGII unter  $K^+$ -HEPES bewirkt eine Leitwertzunahme in den Klemmbereich von -30 bis +30 mV.  $Ba^{2+}$  bewirkt unter  $K^+$ -HEPES eine Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -70 und +30 mV. Eine weitere Applikation von ANGII in NaCl-HEPES PS ( $[K^+]_o=2,8$  mM) führt zu einer Zunahme des Leitwertes der Membran.



**Abb. 29:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch eine Superfusion der Zellen mit K-HEPES. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im gesamten Klemmbereich (n=5). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.



**Abb. 30:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch eine Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM) in K-HEPES. Es zeigt sich eine hochsignifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -10 und +10 mV und eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV (n=5). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- RSZ in  $[K^+]_o=142$  mM depolarisieren.
- diese Depolarisation mit einer Leitwertzunahme im gesamten Klemmbereich einhergeht.
- ANGII unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen RSZ hyperpolarisiert.
- der Membranleitwert im Klemmbereich von -50 bis +10 mV durch ANGII zunimmt.

### 3.3 Hemmung von $K_{ir}2.x$ Kanälen durch $Ba^{2+}$

#### 3.3.1 Wirkung von $Ba^{2+}$ (1 mM) auf RSZ mit 10 mM $[K^+]_o$ .

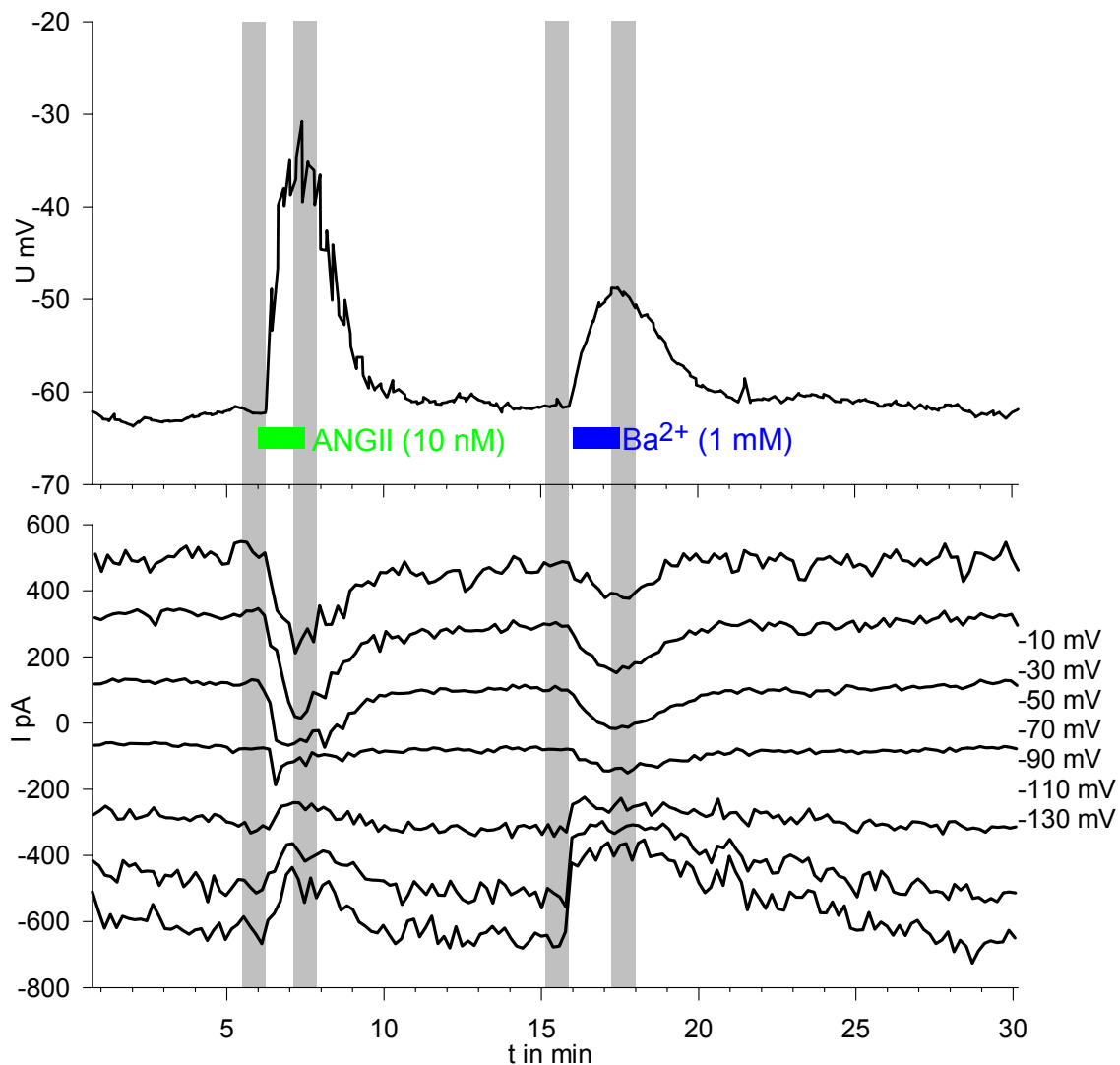
$Ba^{2+}$  ist ein relativ spezifischer Blocker von einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{ir}2.x$ ). Durch die Verwendung von  $Ba^{2+}$  kann also auf die Bedeutung von  $K_{ir}2.x$  Kanälen für das Ruhemembranpotenzial und den Ruhestrom von RSZ rückgeschlossen werden. Um den Anteil der Kaliumkanäle am Ruhemembranpotenzial zu erhöhen, wurden die Experimente mit einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 10 mM durchgeführt.

Abbildung 31 zeigt ein Beispiexperiment für die Wirkung von 1 mM Barium in  $[K^+]_o=10$  mM im Vergleich zu 10 nM ANGIIL.

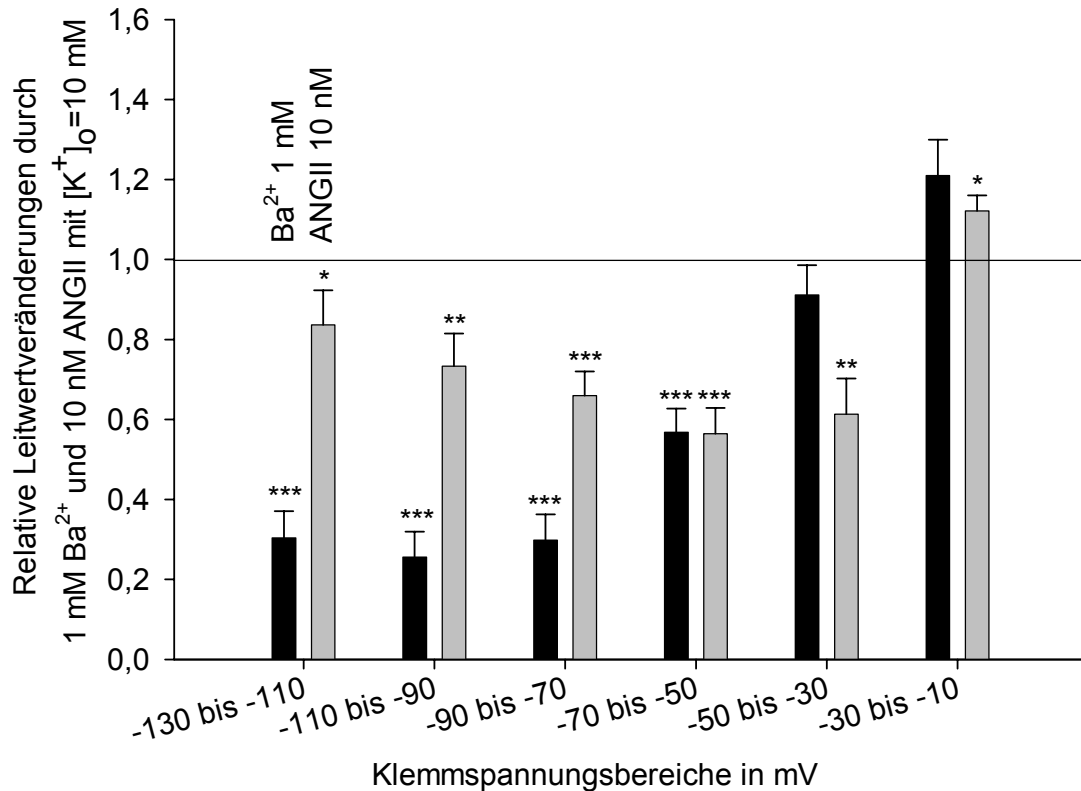
Bei RSZ, die mit Barium (1 mM) behandelt wurden, konnte im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-58,4 \pm 1,1$  mV ( $[K^+]_o=10$  mM) um  $13,3 \pm 0,8$  mV auf  $-45,1 \pm 1,3$  mV ( $n=8$ ) beobachtet werden (Abb. 31).

Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmpotenzialen von -130 bis -50 mV insgesamt eine deutliche Leitwertverminderung. Alle anderen Leitwertänderungen sind nicht signifikant (Abb. 31; 32).





**Abb. 31:** Beispielerperiment: Wirkung von ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=10$  mM) und Barium (1 mM)  
Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=10$  mM) bewirkt eine reversible Depolarisation von -62 mV auf ca. -32 mV. Die Superfusion mit Barium (1 mM) bewirkt eine reversible Depolarisation der Zellen von ca. -61 mV auf ca. -48 mV.  
Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII bewirkt eine Leitwertverminderung in den Klemmbereich von -130 bis -30 mV und eine Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV. Barium bewirkt eine Leitwertverminderung im Klemmbereich von -130 bis -50 mV und eine Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV.



**Abb. 32:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit Barium (1 mM;  $[K^+]_o=10$  mM, schwarze Balken) und ANGII 10 nM (graue Balken, Daten aus Abb. 25).

Barium 1 mM führt zu einer Abnahme des Membranleitwertes bei den hyperpolarisierenden Klemmpotenzialen. Die Leitwertveränderungen im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV sind nicht signifikant (n=8). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- 1 mM Barium die Zellen depolarisiert.
- diese Depolarisation mit einer deutlichen Abnahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -50 einhergeht im Sinne einer Hemmung des  $K_{ir}$  2.x.

### 3.3.2 Wirkung von ANGII (10 nM) unter $\text{Ba}^{2+}$ (1 mM) auf RSZ in $[\text{K}^+]_o=2,8 \text{ mM}$

Barium blockt Kir 2.x Kanäle und depolarisiert RSZ. Um einen Effekt von ANGII nachzuweisen, der über einen Kir-Block hinausgeht, wurden ANGII und  $\text{Ba}^{2+}$  gleichzeitig appliziert.

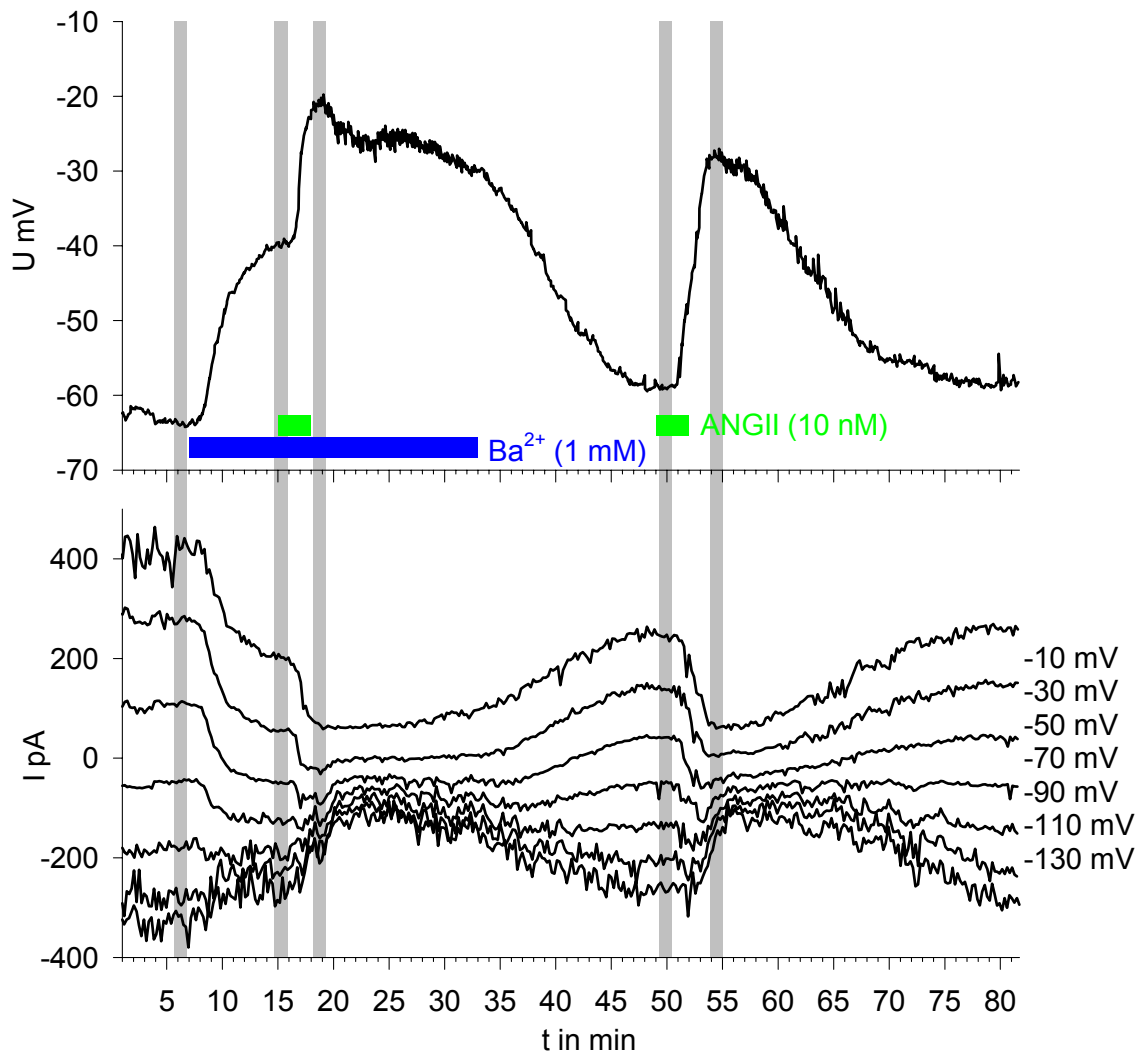
Abbildung 33 zeigt ein Beispielexperiment für die Wirkung von  $\text{Ba}^{2+}$  (1 mM) in Kombination mit ANGII (10 nM) und für die Wirkung von ANGII alleine.

$\text{Ba}^{2+}$  (1 mM) alleine depolarisiert die Zellen von  $-59,5 \pm 1,7 \text{ mV}$  um  $18,5 \pm 2,1 \text{ mV}$  auf  $-41,0 \pm 1,3 \text{ mV}$  ( $n=4$ ). Die Depolarisationsamplitude in  $[\text{K}^+]_o=2,8 \text{ mM}$  ist somit größer als in  $[\text{K}^+]_o=10 \text{ mM}$  (von  $-58,4 \pm 1,1 \text{ mV}$  um  $13,3 \pm 0,8 \text{ mV}$  auf  $-45,1 \pm 1,3 \text{ mV}$  ( $n=8$ )). (t-Test:  $P=0,016$ ).

Im Voltage Clamp-Modus zeigt sich im Klemmbereichen von  $-70$  bis  $-30 \text{ mV}$  eine signifikante Verminderung des Leitwertes durch  $1 \text{ mM Ba}^{2+}$  ( $n=4$ ; Abb. 34).

Wird ANGII (10 nM) zusätzlich appliziert, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-41,0 \pm 1,3 \text{ mV}$  um  $19,0 \pm 1,7 \text{ mV}$  auf  $-22,0 \pm 2,7 \text{ mV}$  ( $n=4$ ) beobachtet. ANGII (10 nM) alleine depolarisiert die Zellen von  $-64,5 \pm 0,8 \text{ mV}$  um  $32,8 \pm 1,1 \text{ mV}$  nur auf  $-31,7 \pm 1,0 \text{ mV}$  ( $n=48$ ) (Abb. 33). Für den Wert der maximalen Depolarisation ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test:  $P=0,009$ ).

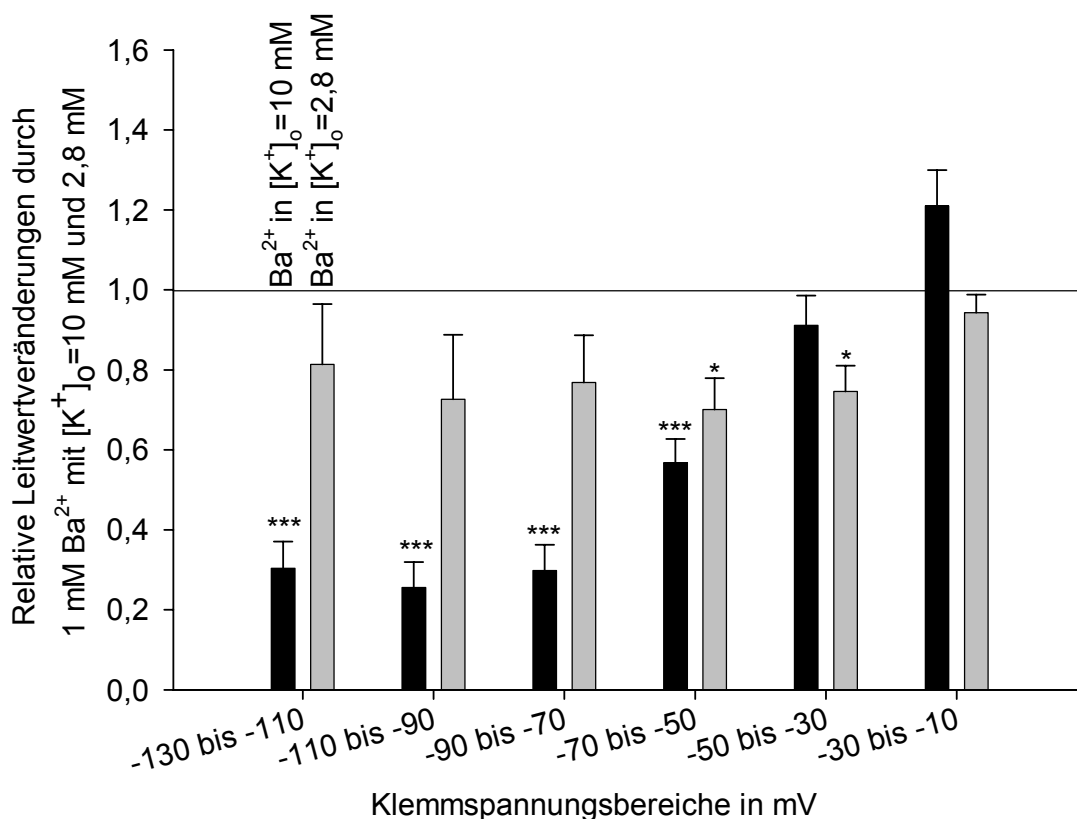
Die Leitwertveränderungen durch ANGII unter Barium sind aufgrund des komplizierten Experimentdesigns und der damit verbundenen kleinen Anzahl an Experimenten nicht signifikant.



**Abb. 33:** Beispielerperiment: Depolarisierende Wirkung von Barium (1 mM) und Barium + ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=2,8$  mM) und ANGII (10 nM) alleine.

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit  $Ba^{2+}$  führt zu einer Depolarisation der Zellen von -64 mV auf ca. -40 mV. ANGII (10 nM) bewirkt unter  $Ba^{2+}$  eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -40 mV auf ca. -20 mV (in diesem Beispiel: ungewöhnlich langsame Repolarisation nach dem Auswaschen von ANGII unter Barium). Eine weitere Applikation von ANGII in NaCl-HEPES-PS führt zu einer reversiblen Depolarisation von -59 mV auf -27 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen.  $Ba^{2+}$  führt zu einer Leitwertverminderung der Membran im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV. ANGII unter  $Ba^{2+}$  bewirkt eine Leitwertabnahme in den Klemmbereich von -110 bis -10 mV. Eine weitere Applikation von ANGII in NaCl-HEPES-PS (2,8 mM  $K^+$ ) führt zu einer Abnahme des Leitwertes der Membran in allen Klemmbereichen.



**Abb. 34:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit 1 mM Barium in  $[K^+]_o=10$  mM (schwarze Balken) und 2,8 mM (graue Balken). Barium 1 mM führt in  $[K^+]_o=10$  mM zu einer Abnahme des Membranleitwertes bei den hyperpolarisierenden Klemmpotenzialen. Die Leitwertveränderungen im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV sind nicht signifikant ( $n=8$ ). Barium 1 mM führt in  $[K^+]_o=2,8$  mM zu einer signifikanten Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -70 und -30 mV. Die verbleibenden Leitwertänderungen sind nicht signifikant ( $n=4$ ) (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

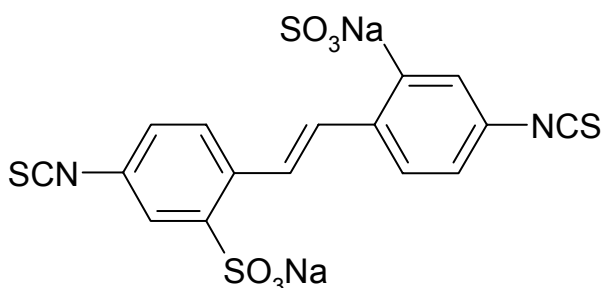
- Barium in  $[K^+]_o=2,8$  mM die Zellen stärker depolarisiert als in  $[K^+]_o=10$  mM.
- diese stärkere Depolarisation durch Barium in  $[K^+]_o=2,8$  mM mit einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -50 und -30 mV einhergeht., die in  $[K^+]_o=10$  mM nicht vorhanden ist.
- ANGII und Barium in Kombination die Zellen stärker depolarisieren.
- diese Kombination eine stärkere depolarisierende Wirkung hat als ANGII alleine.

### 3.4 Rolle von Chloridionen bezüglich Ruhemembranpotenzial und ANGII- induzierter Depolarisation

Untersuchungen haben ergeben, dass sich in der Zellmembran von RSZ Chloridkanäle befinden (Kurtz und Penner, 1989). Welchen Stellenwert diese Kanäle bezüglich des Ruhemembranpotenzials und der ANGII induzierten Depolarisation haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Da RSZ sich in glatte Muskelzellen umwandeln können und in diesen Zellen die Chloridionenkonzentration im Vergleich zu anderen Zellen hoch ist ( $E_{Cl^-}$  beträgt ca. zwischen -30 mV und -20 mV,  $[Cl^-]_o=140$  mM;  $[Cl^-]_i= 50$  mM; Nelson and Conway, 1997), könnte die depolarisierende Wirkung von ANGII durch eine Aktivierung dieser Kanäle erfolgen.

#### 3.4.1 Wirkung von DIDS (0,5 mM) und ANGII (10 nM) auf RSZ

DIDS (0,5 mM) (Abb.: 35) ist ein irreversibler und unselektiver Blocker von Chloridkanälen ( $Cl_{Vol}$ :  $IC_{50}$  zwischen 5  $\mu$ M und 100  $\mu$ M;  $Cl_{Ca}$ ,  $Cl_{IC}$ :  $IC_{50}$  zwischen 100  $\mu$ M und 2 mM; CFTR:  $IC_{50} > 2$  mM; Jentsch et al., 2002). Von der Wirkung von DIDS (0,5 mM) kann also auf die Bedeutung von Chloridkanälen für das Ruhemembranpotenzial und den Ruhestrom von RSZ rückgeschlossen werden.



**Abb. 35:** Diisothiocyantostilbendisulfonsäure (DIDS)

In den ersten Experimenten dieser Reihe wurde ANGII und DIDS gleichzeitig appliziert. Bei gleichzeitiger Applikation war die depolarisierende Wirkung von ANGII aufgehoben und es wurde vermutet, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII hauptsächlich auf einer Aktivierung von Chloridkanälen beruht. DIDS (und DIDS + ANGII) bewirkte sogar eine irreversible Hyperpolarisation.

Wurde ANGII erst nach dem Auswaschen von DIDS appliziert, ist die depolarisierende Wirkung von ANGII aber vorhanden.

Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass nicht der irreversible Block von Chloridkanälen durch DIDS die depolarisierende Wirkung von ANGII aufhebt, sondern DIDS mit ANGII direkt interagiert.

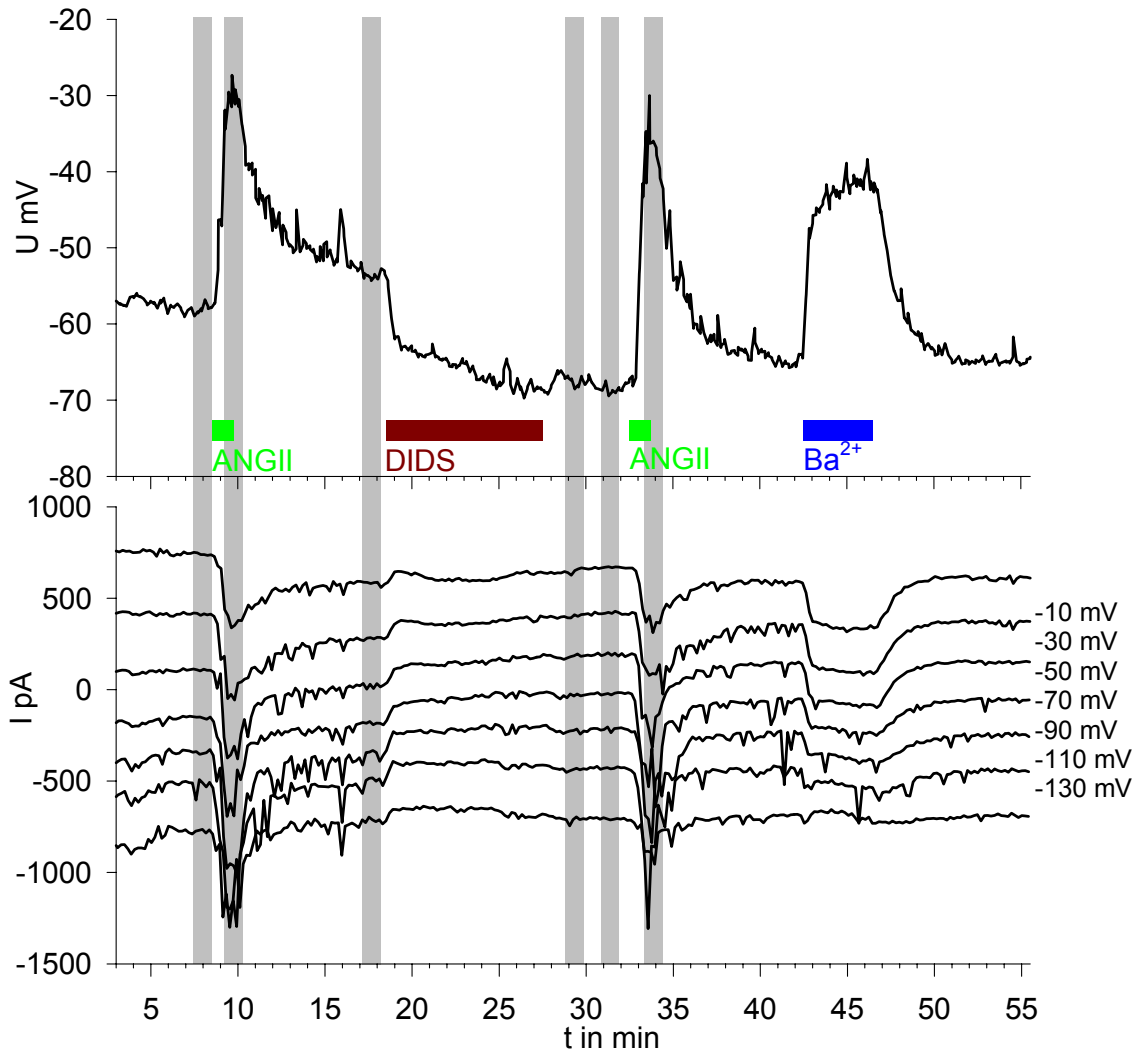
Abbildung 36 zeigt ein Beispiexperiment für die Wirkung von ANGII (10 nM) und DIDS (0,5 mM).

Bei RSZ, die mit DIDS (0,5 mM) behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine irreversible Hyperpolarisation von  $-60,3 \pm 1,6$  mV ( $[K^+]_o=2,8$  mM) um  $-16,8 \pm 2,6$  mV auf  $-77,1 \pm 1,7$  mV beobachtet (gepaarter t-Test:  $P=0,009$ ;  $n=10$ ).

Die Applikation von 10 nM ANGII nach dem Auswaschen von DIDS führt zu einer reversiblen Depolarisation von  $-72,0 \pm 4,0$  mV auf  $-30,0 \pm 0,6$  mV ( $n=3$ ; Abb. 36).

Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmpotenzialen von -130 bis -70 mV eine Leitwertzunahme durch DIDS. Im Klemmbereich von -30 bis -10 mV wird der Leitwert der Zellmembran vermindert, während sich im Klemmbereich von -70 bis -30 mV keine Veränderung feststellen lässt (Abb. 36; 37).

Aufgrund des komplizierten Experimentdesigns und der damit verbundenen geringen Anzahl an Experimenten lässt sich im Voltage Clamp-Modus nur eine signifikante Leitwertverminderung im Klemmbereich von -130 bis -110 mV feststellen. Die verbleibenden Leitwertänderungen sind nicht signifikant.

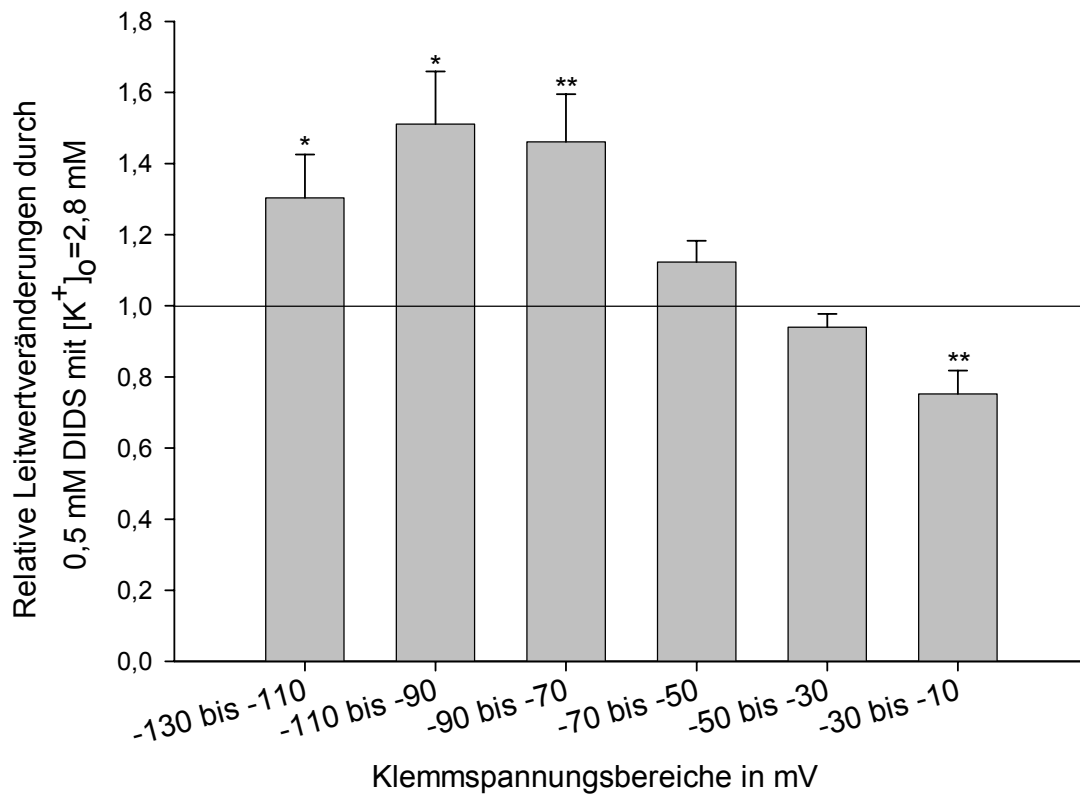


**Abb. 36:** Beispielerperiment: Wirkung von ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=2,8$  mM) alleine und nach der Applikation von DIDS (0,5 mM):

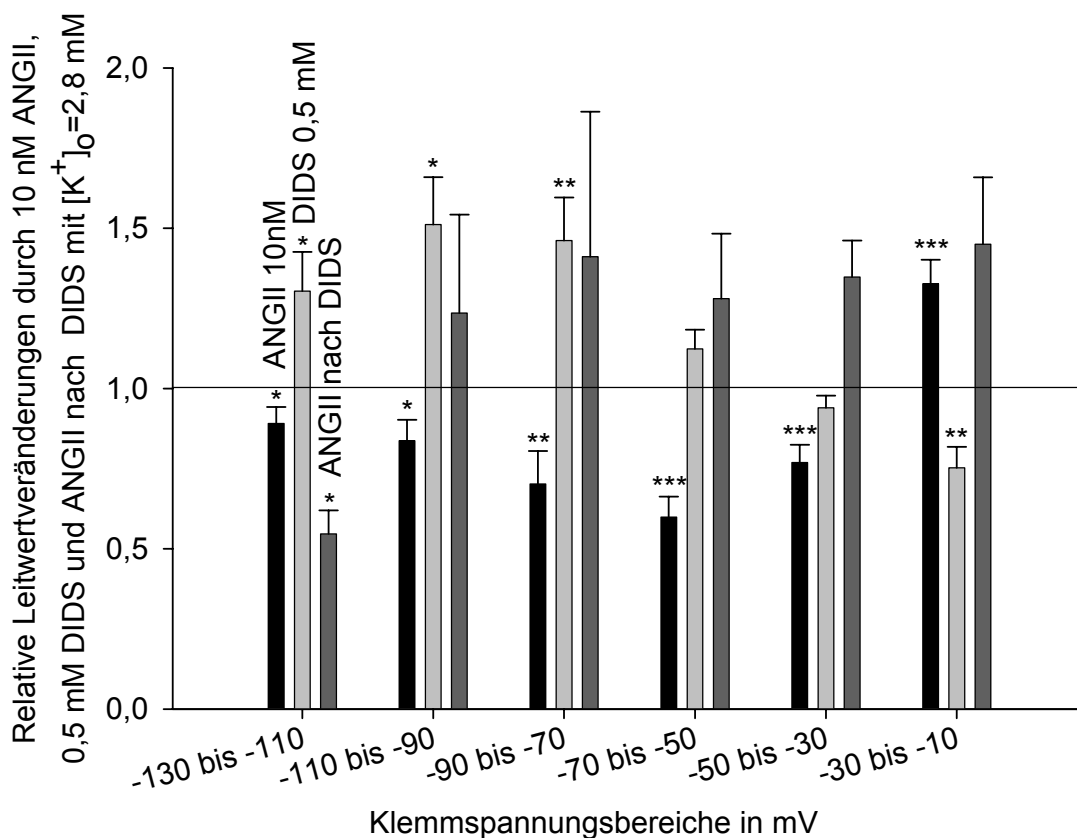
Current clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen: Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -58 mV auf ca. -28 mV. Die Superfusion mit DIDS (0,5 mM) bewirkt eine irreversible Hyperpolarisation von ca. -54 mV auf ca. -70 mV. Nach dem Auswaschen von DIDS führt eine weitere Applikation ANGII (10 nM) zu einer weitgehend reversiblen Depolarisation der Zellmembran von ca. -68 mV auf ca. -30 mV. Barium (1 mM) depolarisiert die Zellen reversibel von ca. -66 mV auf ca. -42 mV.

Voltage clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII führt zu uneinheitlichen Leitwertveränderungen. DIDS bewirkt eine Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV und eine Abnahme im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV.





**Abb. 37:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit DIDS (0,5 mM). Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV und eine Abnahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV (n=10).



**Abb. 38:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit 10 nM ANGII ( $[K^+]_o=2,8$  mM), 0,5 mM DIDS und ANGII 10 nM nach DIDS (Werte für ANGII (10 nM) aus Abb. 21, für DIDS aus Abb. 37). Die Reihenfolge der Balken entspricht der chronologischen Reihenfolge im Experiment.

Die Applikation von ANGII nach DIDS führt zu einer signifikanten Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV ( $n=3$ ). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

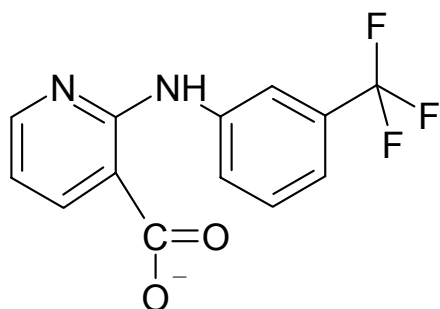
Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- DIDS (0,5 mM) eine irreversible Hyperpolarisation der Zellen hervorruft, die mit einer Verminderung des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV einhergeht. Zugleich aber auch einer Erhöhung des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV führt.
- die irreversiblen Veränderungen von Ionenkanälen durch DIDS die depolarisierende Wirkung von ANGII nicht inhibieren.
- ANGII nach DIDS zu einer signifikanten Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV führt.

### 3.4.2 Wirkung von NFA (100 $\mu\text{M}$ ) und ANGII (3 nM) auf RSZ

NFA (100  $\mu\text{M}$ ) (Abb. 39) ist ein Blocker vor allem von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chloridkanälen ( $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ :  $\text{IC}_{50}$  zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Cl}_{\text{C-1}}$ ,  $\text{Cl}_{\text{CFTR}}$ ,  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ :  $\text{IC}_{50}$  zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 2 mM; Jentsch et al., 2002). Von der Wirkung von NFA kann also auf die Bedeutung von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanälen für das Ruhemembranpotenzial und den Ruhestrom von RSZ rückgeschlossen werden.

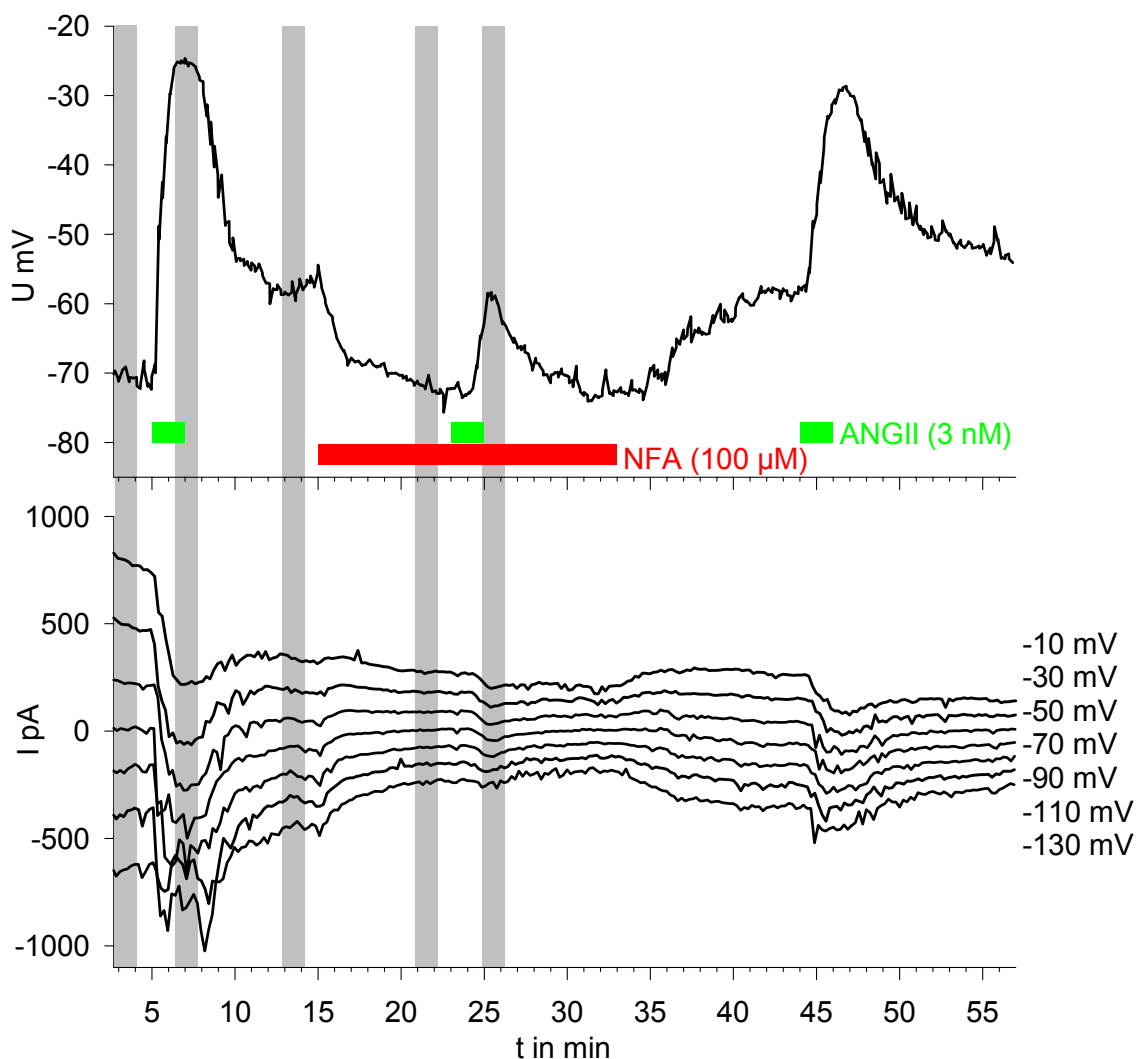


**Abb. 39:** Nifluminsäure (NFA)

Abbildung 40 zeigt ein Beispielexperiment für die Wirkung von ANGII (3 nM) und NFA (100  $\mu\text{M}$ ). Da die Wirkung von NFA reversibel ist, wurde ANGII und NFA gleichzeitig appliziert.

Bei RSZ, die mit NFA (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Hyperpolarisation von  $-59,7 \pm 1,5$  mV ( $[\text{K}^+]_o = 2,8$  mM) um  $-12,5 \pm 2,0$  mV auf  $-72,2 \pm 2,2$  mV ( $n=11$ ) beobachtet (Abb. 40). ANGII (3 nM) unter NFA depolarisiert die Zellen von  $-75,7 \pm 2,7$  mV um  $13,2 \pm 2,2$  mV auf  $-62,5 \pm 1,0$  mV ( $n=6$ ). ANGII (3 nM) depolarisiert die Zellen in dieser Versuchsreihe von  $-66,8 \pm 1,5$  mV um  $34,4 \pm 2,3$  mV auf  $-32,3 \pm 2,1$  mV ( $n=9$ ). Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Depolarisationsamplitude (Tukey-Test:  $P < 0,001$ ).

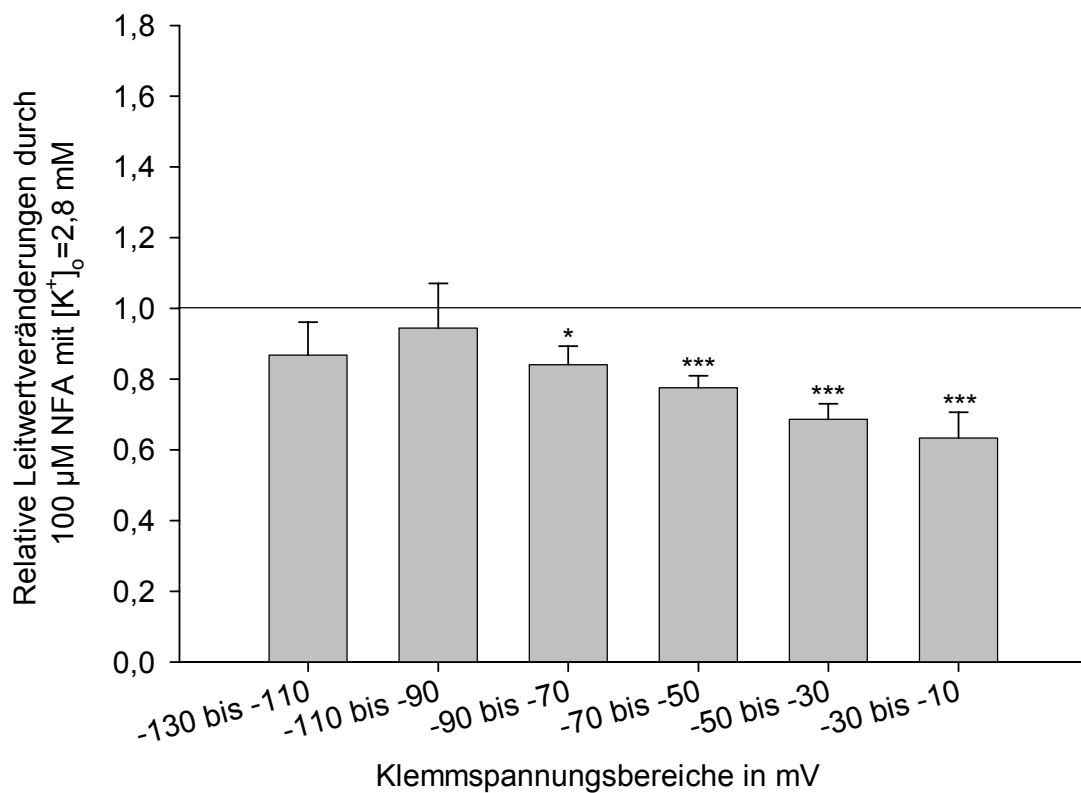
Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmpotenzialen von -90 bis -10 mV eine Leitwertverminderung durch NFA (100  $\mu\text{M}$ ). Im Klemmbereich von -130 bis -90 mV wird der Leitwert der Zellmembran durch NFA (100  $\mu\text{M}$ ) nicht signifikant verändert (Abb. 40; 41;  $n=11$ ). ANGII führt unter NFA zu keinen signifikant von 1 verschiedenen relativen Leitwertänderungen ( $n=6$ ).



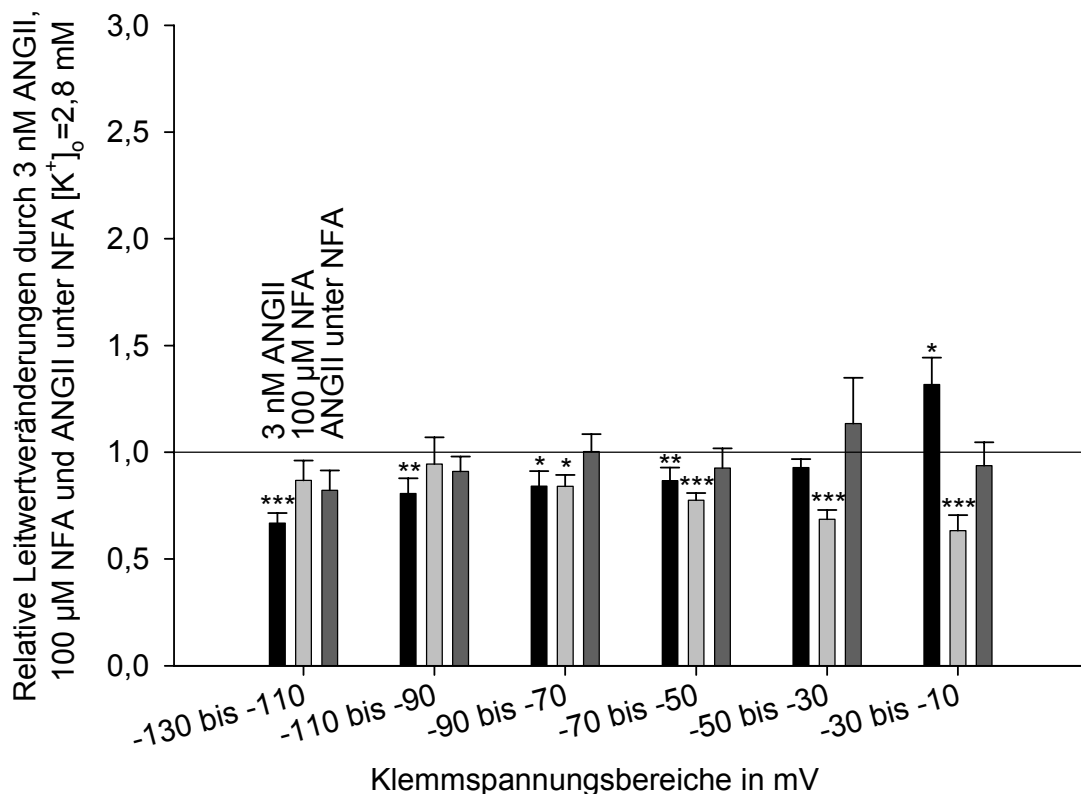
**Abb. 40:** Beispielerperiment: Wirkung von ANGII (3 nM;  $[K^+]_o=2,8$  mM) alleine und während der Applikation von NFA (100 μM):

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM) führt zu einer partiell reversiblen Depolarisation der Zellen von ca. -70 mV auf ca. -25 mV. NFA (100 μM) bewirkt eine reversible Hyperpolarisation auf ca. -72 mV. Die Applikation von ANGII (3 nM) unter NFA führt zu einer Depolarisation von ca. -72 mV auf ca. -59 mV. Nach dem Auswaschen von NFA, führt eine dritte Applikation von ANGII zu einer weitgehend reversiblen Depolarisation von ca. -59 mV auf ca. -28 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII bewirkt eine Leitwertverminderung in den Klemmbereich von -130 bis -30 mV. NFA bewirkt eine Leitwertverminderung im gesamten Klemmbereich. Die Applikation von ANGII unter NFA führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV.



**Abb. 41:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit NFA (100  $\mu$ M). Es zeigt sich eine Abnahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -90 und -10 mV (n=11). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.



**Abb. 42:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit 10 nM ANGII ( $[K^+]_o=2,8$  mM), 100  $\mu$ M NFA und ANGII 10 nM unter NFA (Werte für ANGII (3 nM) aus Abb. 21, Werte für NFA aus Abb. 41).

Die Reihenfolge der Balken entspricht der chronologischen Reihenfolge im Experiment).

Die Applikation von ANGII unter NFA führt zu keinen signifikant von 1 verschiedenen relativen Änderungen des Membranleitwertes (n=6). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

#### Zusammenfassung:

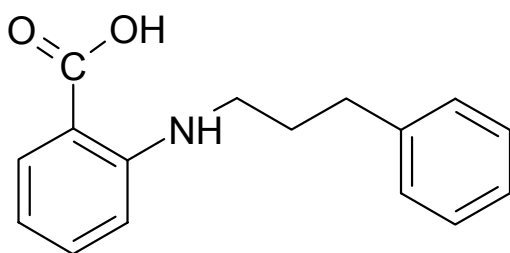
Es zeigt sich, dass

- NFA eine reversible Hyperpolarisation der Zellen hervorruft, die mit einer Leitwertverminderung im Klemmbereich von -70 bis -10 mV einhergeht.
- die depolarisierende Wirkung von ANGII durch NFA vermindert wird.
- ANGII unter NFA zu keiner relativen Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV führt.
- ANGII unter NFA zu keinem Anstieg des relativen Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV führt.

### 3.4.3 Wirkung von NPPB (100 $\mu\text{M}$ ) und ANGII (3 nM) auf RSZ

NPPB (100  $\mu\text{M}$ ) (Abb. 43) ist unter anderem ein Blocker von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chloridkanälen (CFTR,  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ ;  $\text{IC}_{50}$  zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ; Jentsch et al., 2002). Von der Wirkung von NPPB kann also auf die Bedeutung von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanälen für das Ruhemembranpotenzial und den Ruhestrom von RSZ rückgeschlossen werden.

Zudem schließt NPPB gap-junctions (Eskandari et al., 2002). Gap-junctions sind Kanäle zwischen benachbarten Zellen. Über solche Kanäle sind RSZ elektrisch leitend verbunden. Aus der Wirkung von NPPB auf RSZ können Rückschlüsse auf den Einfluß von Zell-Zell Verbindungen bezüglich des Ruhestroms und bezüglich der depolarisierende Wirkung von ANGII gezogen werden.

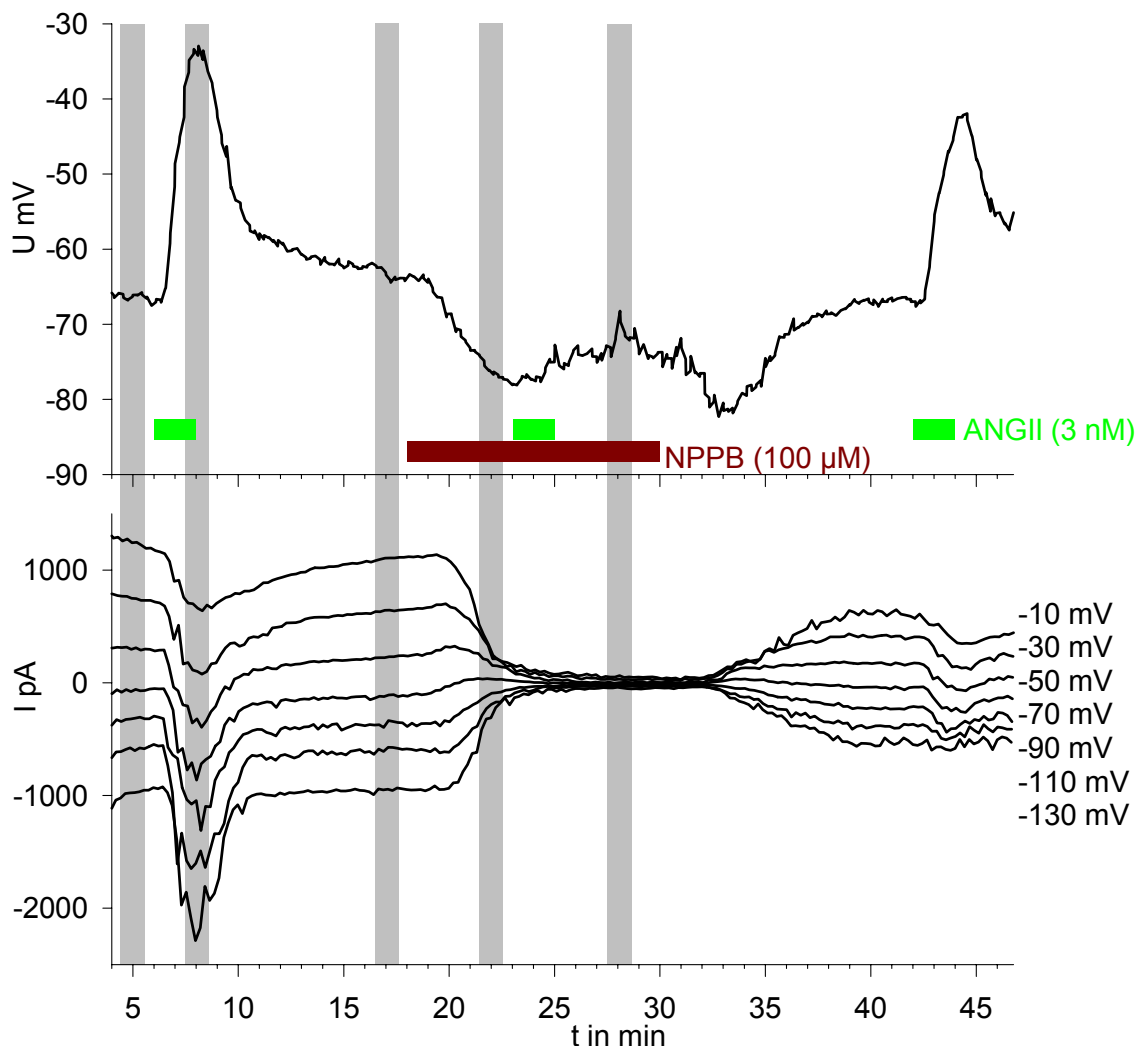


**Abb. 43:** Nitro-phenylpropylamino-benzoessäure (NPPB)

Abbildung 44 zeigt ein Beispiellexperiment für die Wirkung von ANGII (3 nM) und NPPB (100  $\mu\text{M}$ ). Da die Wirkung von NPPB auf das Membranpotenzial reversibel ist, wurde ANGII und NPPB gleichzeitig appliziert.

Bei RSZ, die mit NPPB (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Hyperpolarisation von  $-57,8 \pm 1,7$  mV ( $[\text{K}^+]_o = 2,8$  mM) um  $14,0 \pm 2,6$  mV auf  $-71,8 \pm 3,5$  mV ( $n=5$ ) beobachtet. ANGII (3 nM) unter NPPB depolarisiert die Zellen von  $-76$  mV auf  $-70$  mV ( $n=1$ ; Abb. 44).

Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in allen Klemmbereichen von  $-130$  bis  $-10$  mV eine extreme Leitwertverminderung ( $n=5$ ) durch die Applikation von NPPB (Abb. 44; 45).

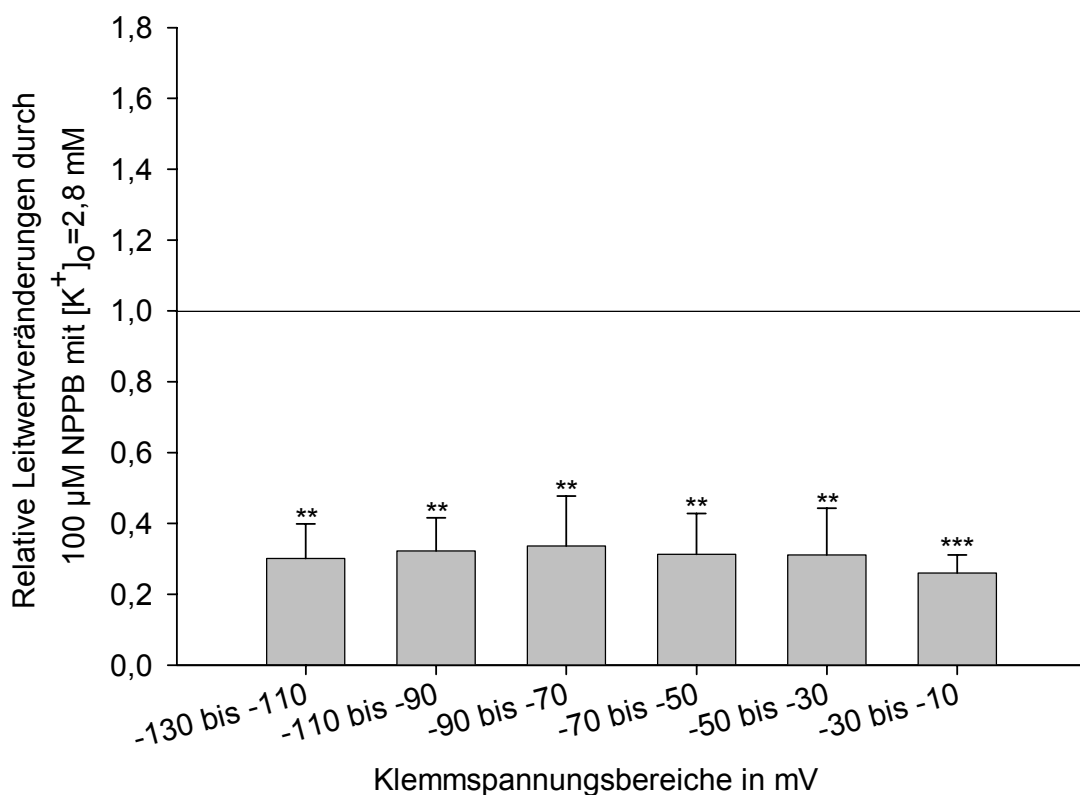


**Abb. 44:** Beispielerperiment: Wirkung von ANGII (3 nM;  $[K^+]_o = 2,8$  mM.) alleine und während der Applikation von NPPB (100  $\mu$ M):

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM) führt zu einer weitgehend reversiblen Depolarisation der Zellen von ca. -66 mV auf ca. -34 mV. NPPB (100  $\mu$ M) bewirkt eine reversible Hyperpolarisation von ca. -64 mV auf ca. -76 mV. Die erneute Applikation von ANGII (3 nM) unter NPPB führt zu einer Depolarisation von ca. -76 mV auf ca. -70 mV. Die dritte Applikation von ANGII depolarisiert die Zellen von ca. -67 mV auf ca. -42 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII bewirkt eine Leitwertzunahme im Klemmbereich von -110 bis -70 mV. NPPB bewirkt eine Leitwertverminderung im gesamten Klemmbereich. Die Applikation von ANGII unter NPPB führt zu einer Depolarisation von ca. -77 mV auf ca. -72 mV.





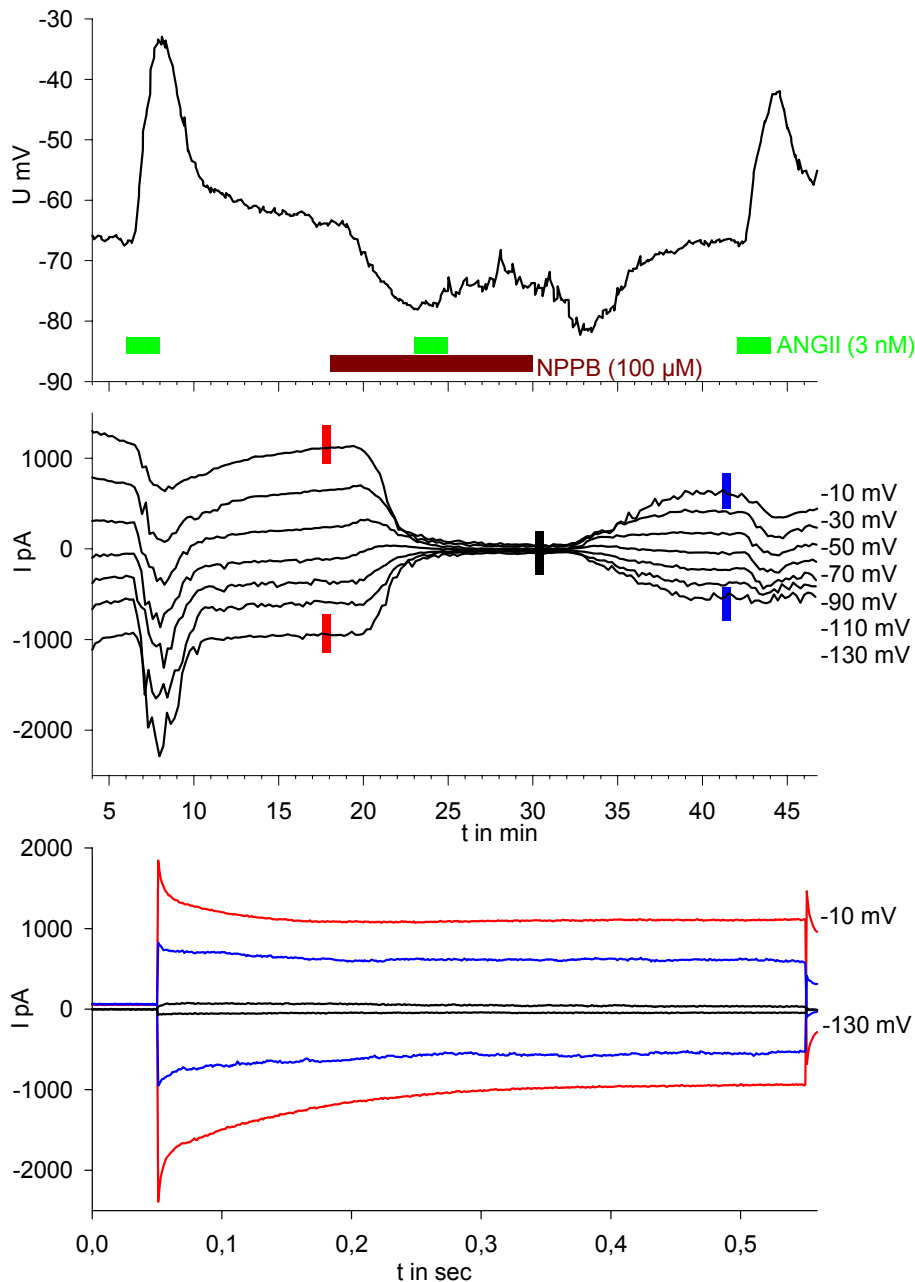
**Abb. 45:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit NPPB (100  $\mu$ M). Es zeigt sich eine hochsignifikante Abnahme des Membranleitwertes im gesamten Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV und eine höchstsignifikante Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen 30 und -10 mV (n=5). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.

Abbildung 46 zeigt das Experiment aus Abbildung 44 nochmals, um die Wirkung von 100  $\mu$ M NPPB auf die kapazitiven Ströme zu illustrieren.

Die roten Kurven in Abbildung 46 (unten) zeigen die Ströme, die für das Erreichen der Klemmpotenziale -10 mV bzw. -130 mV nötig sind. Zunächst sind große Ströme nötig (Ladeströme), die dann langsam abklingen bis ein basaler Strom übrig bleibt, um die Zelle auf gewünschtem Potenzial zu halten (Erhaltungstrom) (Siehe auch Kapitel 2.2.2.3).

Bei RSZ, die mit 100  $\mu$ M NPPB behandelt werden zeigt sich, dass die kapazitiven Ströme (Ladeströme) unter NPPB abnehmen (Abbildung 46 (unten) schwarze Kurven; n=5) und dass diese Reduktion der kapazitiven Ströme teilweise

reversibel ist (Abbildung 46 (unten) blaue Kurven;  $n=1$ , da die verbleibenden 4 Experimente nicht bis zum Ende durchgeführt werden konnten). In 4 von 5 Experimenten nehmen die kapazitiven Ströme unter NPPB so stark ab, dass kein sinnvoller Fit der Stromkurve mehr möglich ist. Im verbleibenden Experiment zeigt sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der kapazitiven Ströme.



**Abb. 46:** Beispielerperiment: Wirkung von 100 μM NPPB auf RSZ:

Current Clamp (oben): siehe Abb. 44.

Voltage Clamp (Mitte): Farblich markiert sind die Referenzbereiche für die Klemmströme vor (rot) und während (schwarz) der Applikation von NPPB. Die Referenzbereiche für die Klemmströme nach dem Auswaschen von NPPB sind blau markiert.

Stromkurven für die Klemmpotenziale -130 mV und -10 mV (unten): Die Ströme die für das Erreichen der Klemmpotenziale -130 und -10 mV vor und während der Applikation von NPPB sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurve nach dem Auswaschen von NPPB ist blau. Die kapazitiven Ströme nehmen durch die Applikation von NPPB teilweise reversibel ab.

Aus den kapazitiven Strömen läßt sich die Zellmembranfläche berechnen (Siehe Kapitel 2.2.4). Die folgende Tabelle zeigt die aus den kapazitiven Ströme für das Erreichen der Klemmpotenziale -130 und -10 mV, -110 und -30 mV, -90 und -50 mV errechneten Zellmembranflächen in  $\text{mm}^2$  vor der Applikation von NPPB (n=5).

Klemmpotenzial	-130 mV	-110 mV	-90 mV	-50 mV	-30 mV	-10 mV
Experiment 1	0,12	0,27	0,14	0,09	0,07	0,04
Experiment 2	0,03	0,07	0,10	0,13	0,07	0,04
Experiment 3	0,09	0,05	0,07	0,08	0,04	0,04
Experiment 4	0,04	0,03	0,06	0,03	0,20	0,02
Experiment 5	0,10	0,15	0,27	0,22	0,24	0,16

Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- NPPB eine reversible Hyperpolarisation der Zellen hervorruft, die mit einer Leitwertverminderung im gesamten Klemmbereich einhergeht.
- die depolarisierende Wirkung von ANGII durch NPPB vermindert wird.
- NPPB die kapazitiven Ströme reversibel vermindert.

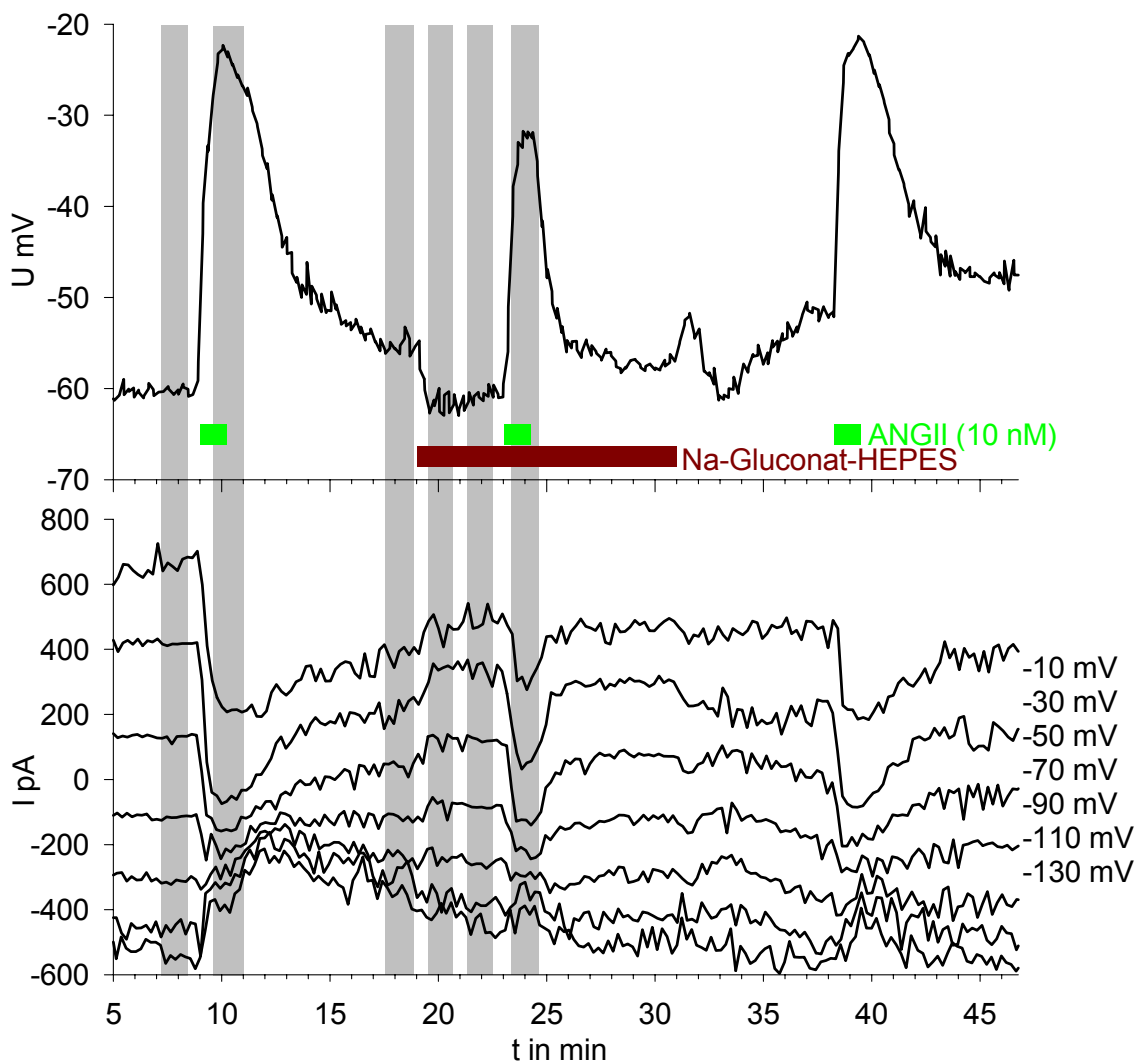
### 3.4.4 Wirkung von chloridarmer HEPES-gepufferter Salzlösung (Na-Gluconat-HEPES) und ANGII (10 nM) auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM)

In der Zellmembran von RSZ sind Chloridkanäle vorhanden (Siehe Einleitung zu Kap. 3.4). Ein vermuteter Chloridionenausstrom unter Ruhebedingungen sollte sich in chloridarmer Perfusionsbadlösung, d.h., nach Erhöhung des Konzentrationsgradienten für Chloridionen, verstärken. Die Zellen müssten demnach depolarisieren. Falls ANGII Chloridkanäle öffnet, sollte die depolarisierende Wirkung von ANGII in chloridarmem Puffer stärker sein.

Abbildung 40 zeigt ein Beispielexperiment u.a. für die Wirkung von ANGII in chloridhaltiger und chloridarmer Perfusionspufferlösung.

Bei RSZ, die mit Na-Gluconat-HEPES ( $[K^+]_o=2,8$  mM) behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine transiente Hyperpolarisation von  $-58,6 \pm 2,5$  mV um  $7,3 \pm 2,0$  mV auf  $-65,9 \pm 2,6$  mV ( $n=10$ ) beobachtet. Diese Hyperpolarisation geht in eine langsame Depolarisation über. ANGII (10 nM) depolarisiert die Zellen in chloridhaltigem Puffer in dieser Experimentreihe von  $-61,9 \pm 2,1$  mV um  $36,7 \pm 2,3$  mV auf  $-25,2 \pm 1,7$  mV ( $n=9$ ). Unter Na-Gluconat-HEPES von  $-60,7 \pm 2,3$  mV um  $29,3 \pm 2,2$  mV nur auf  $-31,4 \pm 3,3$  mV ( $n=7$ ) (Abb. 47). Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Depolarisationsamplitude (Tukey Test:  $P<0,04$ ).

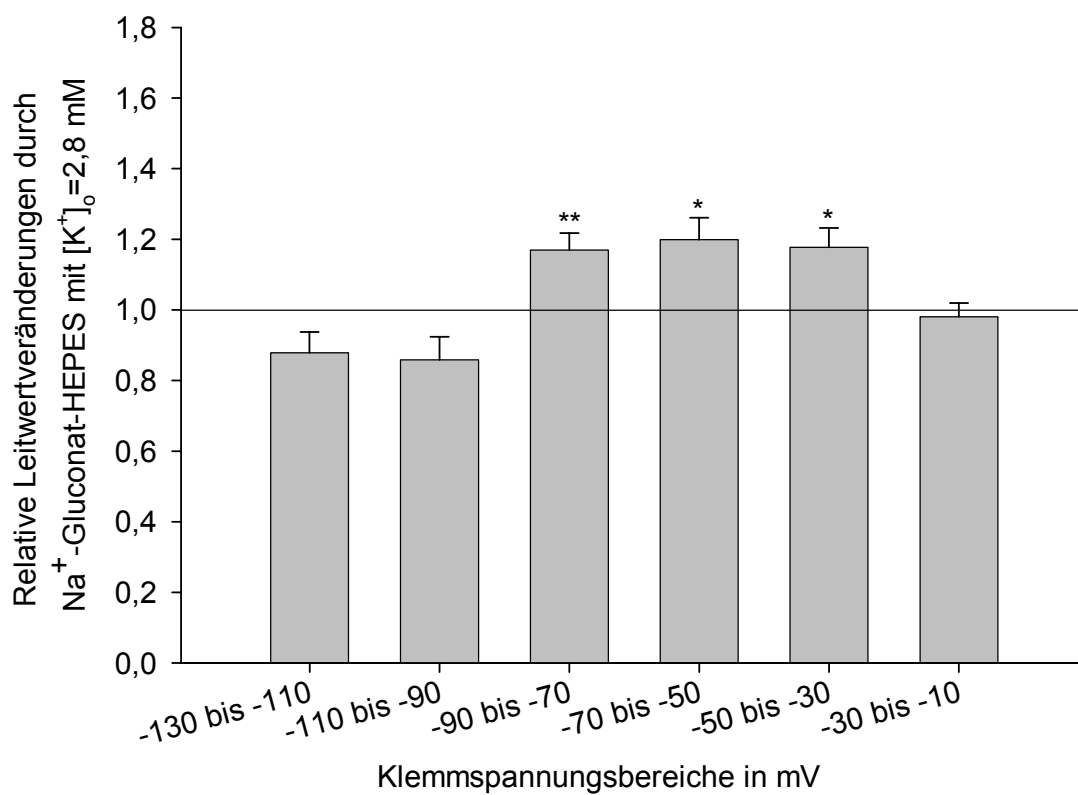
Im Voltage Clamp-Modus zeigte sich in den Klemmpotenzialen von  $-70$  bis  $-30$  mV eine Zunahme des Leitwerts durch Na-Gluconat-HEPES (Abb. 47; 48). ANGII (10 nM) führt unter Na-Gluconat-HEPES zu keinen signifikanten von 1 verschiedenen relativen Leitwertänderungen ( $n=7$ ). Jedoch zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 10 nM ANGII in chloridhaltigem und chloridarmem Perfusionspuffer im Klemmbereich zwischen  $-50$  und  $-30$  (Tukey Test:  $P=0,025$ ;  $n=9$ ; Abb.: 50)



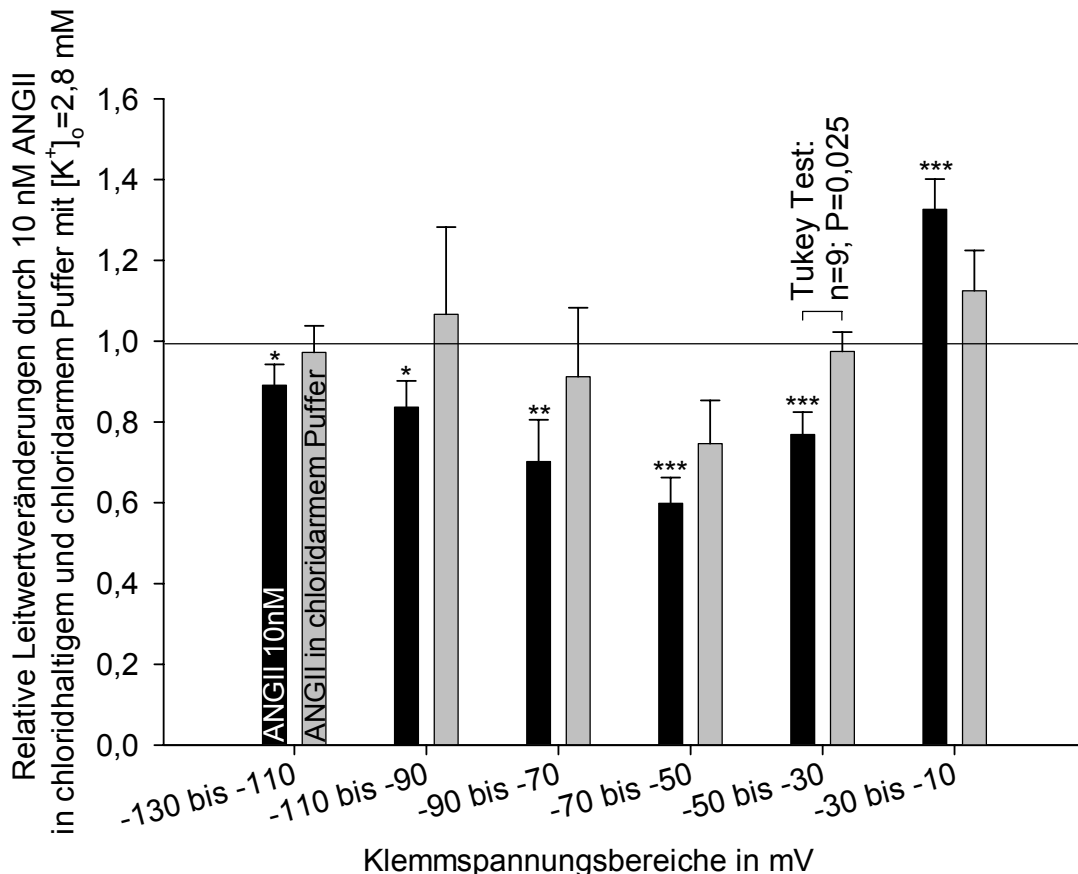
**Abb. 47:** Beispielexperiment: Wirkung von ANGII (10 nM;  $[K^+]_o=2,8$  mM) in chloridhaltiger (NaCl-HEPES-PS) und chloridarmer (Na-Gluconat-HEPES-PS) Perfusionspufferlösung:

Current clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen: Die Superfusion der Zellen mit ANGII (10 nM) bewirkt eine weitgehend reversible Depolarisation von ca. -60 mV auf ca. -23 mV. Die Superfusion mit chloridarmer Perfusionspufferlösung bewirkt initial eine Hyperpolarisation auf ca. -62 mV. Eine weitere Applikation von ANGII (10 nM) unter Na-Gluconat-HEPES-PS führt zu einer reversiblen Depolarisation der Zellmembran auf ca. -32 mV. Eine dritte Applikation von ANGII (10 nM) depolarisiert die Zellmembran von ca. -51 mV auf ca. -22 mV.

Voltage clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV und zu einer Zunahme des Leitwertes im Bereich zwischen -30 und -10 mV. Die chloridarme Perfusionspufferlösung bewirkt eine Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -70 und -30 mV. Die Applikation von ANGII in chloridarmer Perfusionspufferlösung führt zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV. Eine dritte Applikation von ANGII in chloridhaltigem Puffer führt zu den gleichen Leitwertänderungen wie zu Anfang des Experiments.



**Abb. 48:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit Na-Gluconat-HEPES. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -90 und -30 mV. Die verbleibenden Leitwertänderungen sind nicht signifikant (n=10).



**Abb. 49:** Relative Leitwertänderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit 10 nM ANGII in chloridhaltigem und chloridarmem Puffer. Es zeigen sich keine von 1 signifikant verschiedenen relativen Leitwertänderungen durch ANGII in chloridarmem Puffer. Jedoch zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 10 nM ANGII in chloridhaltigem und chloridarmem Perfusionspuffer im Klemmbereich zwischen -50 und -30 mV (Tukey Test:  $P=0,025$ ;  $n=9$ ).

#### Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

- chloridarme Perfusionspufferlösung den Membranleitwert im Klemmbereich zwischen -70 und -30 mV zwar erhöht, es aber zunächst zu einer Hyperpolarisation kommt, die in eine langsame Depolarisation übergeht.
- die depolarisierende Wirkung von ANGII in chloridarmem Perfusionspuffer vermindert ist. ANGII depolarisiert die Zellen in chloridhaltigem Puffer von  $-61,9 \pm 2,1$  mV um  $36,7 \pm 2,3$  mV auf  $-25,2 \pm 1,7$  mV. Unter Na-Gluconat-HEPES von  $-60,7 \pm 2,3$  mV um  $29,3 \pm 2,2$  mV nur auf  $-31,4 \pm 3,3$  mV.
- die höchstsignifikante Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV durch ANGII in chloridhaltigem Puffer, in chloridarmem Puffer nicht mehr vorhanden ist.



### 3.5 Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-CI-HEPES) und ANGII auf RSZ ( $[K^+]_o=6,5$ mM)

Da ein vermutetes Einströmen von Natriumionen unter Ruhebedingungen einen depolarisierenden Effekt hat, sollte die Superfusion der Zellen mit natriumfreiem Puffer zu einer Hyperpolarisation führen. Falls ANGII Natriumkanäle öffnet, sollte die depolarisierende Wirkung von ANGII in natriumfreiem Puffer abgeschwächt sein.

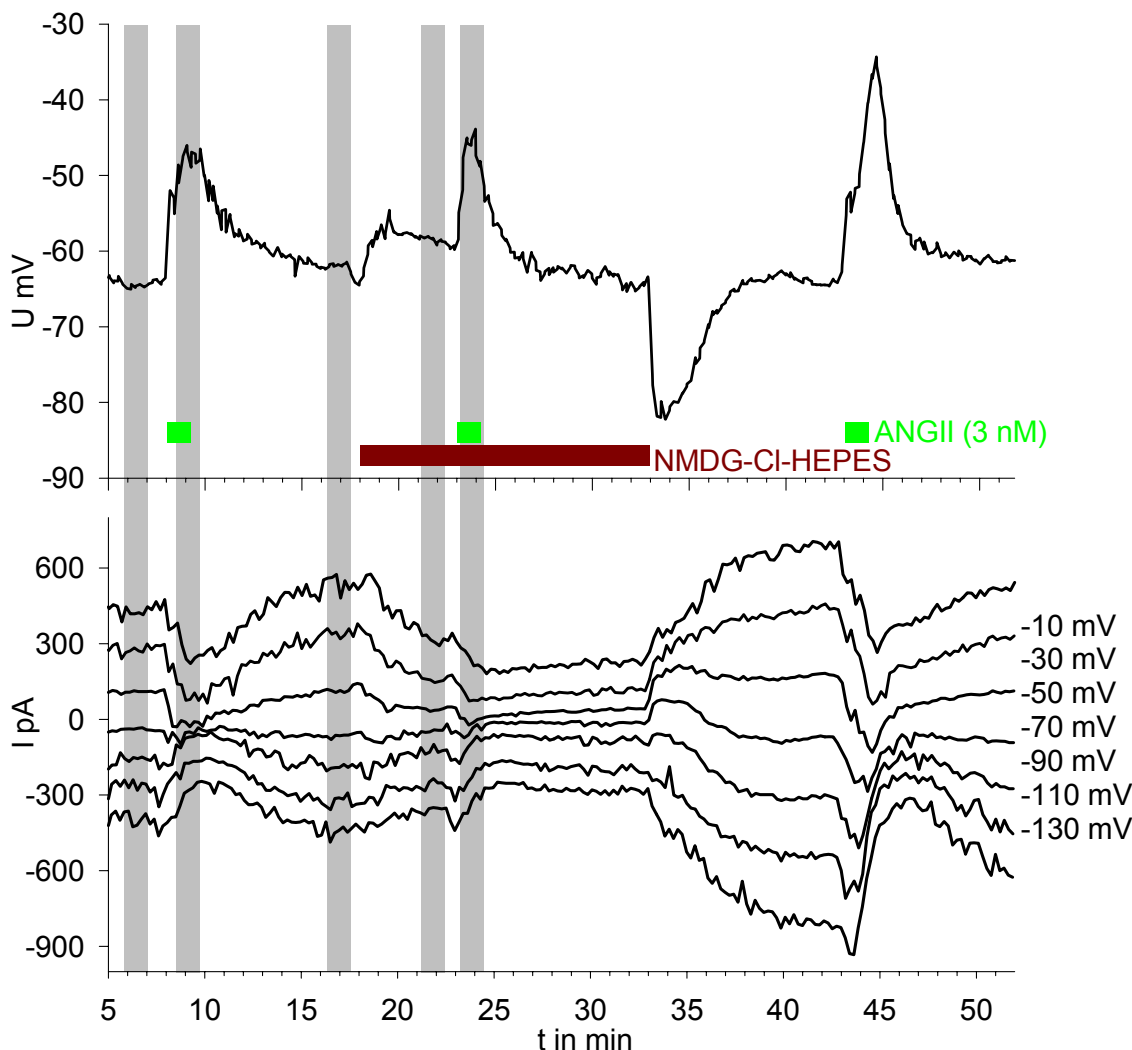
Abbildung 50 zeigt ein Beispiexperiment u.a. für die Wirkung von ANGII in natriumhaltiger und natriumfreier Perfusionspufferlösung

Bei RSZ, die mit natriumfreiem Perfusionspuffer behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus keine signifikante Potenzialänderung festgestellt.

In dieser Versuchsreihe depolarisiert ANGII (3 nM) in natriumhaltigem Puffer die Zellen von  $-66,1 \pm 2,1$  mV um  $34,0 \pm 3,0$  mV auf  $-32,1 \pm 3,8$  mV. In natriumfreier Perfusionspufferlösung depolarisiert ANGII die Zellen von  $-56,3 \pm 0,8$  mV nur um  $17,0 \pm 5,0$  mV auf  $-39,3 \pm 5,2$  mV. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Depolarisationsamplitude (Tukey Test:  $P=0,016$ ;  $n=8$ ,  $n=3$ ). Im Voltage Clamp-Modus lassen sich weder durch die Behandlung mit natriumfreiem Perfusionspuffer noch durch die Applikation von ANGII (3 nM) signifikante Leitwertänderungen feststellen ( $n=3$ ).

Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII in natriumfreiem Perfusionspuffer vermindert ist.



**Abb. 50:** Beispielerperiment: ANGII (3 nM;  $[K^+]_o=6,5$  mM) in natriumhaltiger (NaCl-HEPES\_PS) und natriumarmer Perfusionspufferlösung (NMDG-CI-Hepes):

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (3 nM;  $[K^+]_o=6,5$  mM) bewirkt eine reversible Depolarisation von ca. -64 mV auf ca. -45 mV (Referenz: 5,8 min. bis 7,0 min.; ANGII: 8,5 bis 9,7 min.). Die Superfusion mit natriumarmer Perfusionspufferlösung führt zunächst zu einer kurzen Depolarisation auf ca. -56 mV (Referenz: 16,3 bis 17,5 min.; Natriumarm: 21,2 bis 22,4 min.), die dann in eine Hyperpolarisation übergeht. ANGII bewirkt in natriumarmer Perfusionspufferlösung eine Depolarisation von ca. -60 mV auf -43 mV (Referenz: 21,2 bis 22,4 min.; AngII: 23,2 bis 24,4 min.). Die Applikation von natriumhaltiger Perfusionspufferlösung führt zu einer starken reversiblen Hyperpolarisation. Die dritte Applikation von ANGII in natriumhaltigem Puffer führt zu eine reversiblen Depolarisation von -65 mV auf ca. -38 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für die 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII bewirkt eine reversible Leitwertverminderung in den Klemmbereich von -130 bis -30 mV. NMDG führt zu einer reversiblen Leitwertverminderung in allen Klemmbereichen. Die Applikation von ANGII unter NMDG führt zu einer unspezifischen Erhöhung des Membranleitwertes. Die dritte Applikation von ANGII in natriumhaltigem Perfusionspuffer vermindert den Membranleitwert in allen Klemmbereichen.

### 3.6 Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung und ANGII auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM)

ANGII bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Laske-Ernst J., 2003) und depolarisiert RSZ (Kurtz und Penner, 1990). Falls die depolarisierende Wirkung von ANGII vom Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration abhängt, sollte der depolarisierende Effekt von ANGII in calciumfreier Perfusionspufferlösung geringer sein, insbesondere während der zweiten Applikation von ANGII, wenn intrazelluläre Calciumspeicher erschöpft sind.

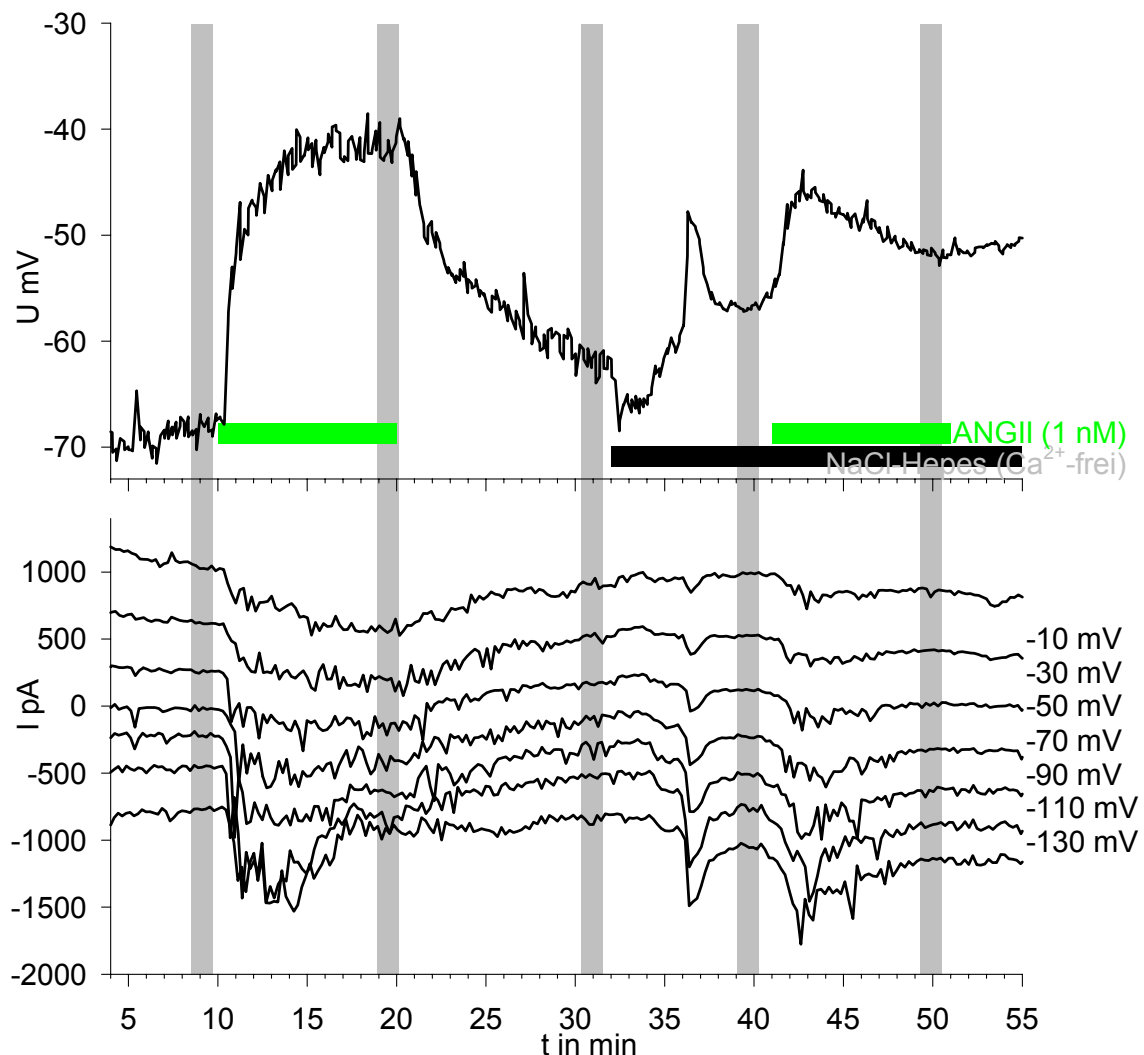
Die Abbildung 26 zeigt Beispielexperimente für die Wirkung von ANGII (1 und 3 nM) in calciumhaltiger, die Abbildungen 51 und 52 zeigen Beispielexperiment für die Wirkung von ANGII in calciumfreier Perfusionspufferlösung.

Bei RSZ, die mit calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung behandelt werden, wird im Current Clamp-Modus eine Depolarisation von  $-64,9 \pm 2,0$  mV auf  $-57,9 \pm 0,9$  mV ( $n=15$ ) beobachtet (Abb.: 51; 52). Zusätzlich treten kurze inkonstante Depolarisationen auf, die vermutlich auf kurze Leckströme zurückzuführen sind.

ANGII (1 nM, zehnminütige Applikation) in calciumfreier Perfusionspufferlösung depolarisiert die Zellen von  $-56,0 \pm 1,6$  mV nur auf  $-44,4 \pm 3,5$  mV (gepaarter t-Test: signifikant weniger als in calciumhaltiger Perfusionspufferlösung ( $P = 0,024$ ;  $n=5$ ; Abb.: 51)). In 4 von 5 Experimenten repolarisieren die Zellen trotz der Präsenz des Agonisten.

ANGII (3 nM) depolarisiert die Zellen von  $-57,7 \pm 1,0$  mV um  $21,7 \pm 4,1$  mV auf  $-36,0 \pm 2,4$  mV (statistisch kein Unterschied zu ANGII (3 nM) in calciumhaltigem Puffer;  $n=6$ ; Abb.52)

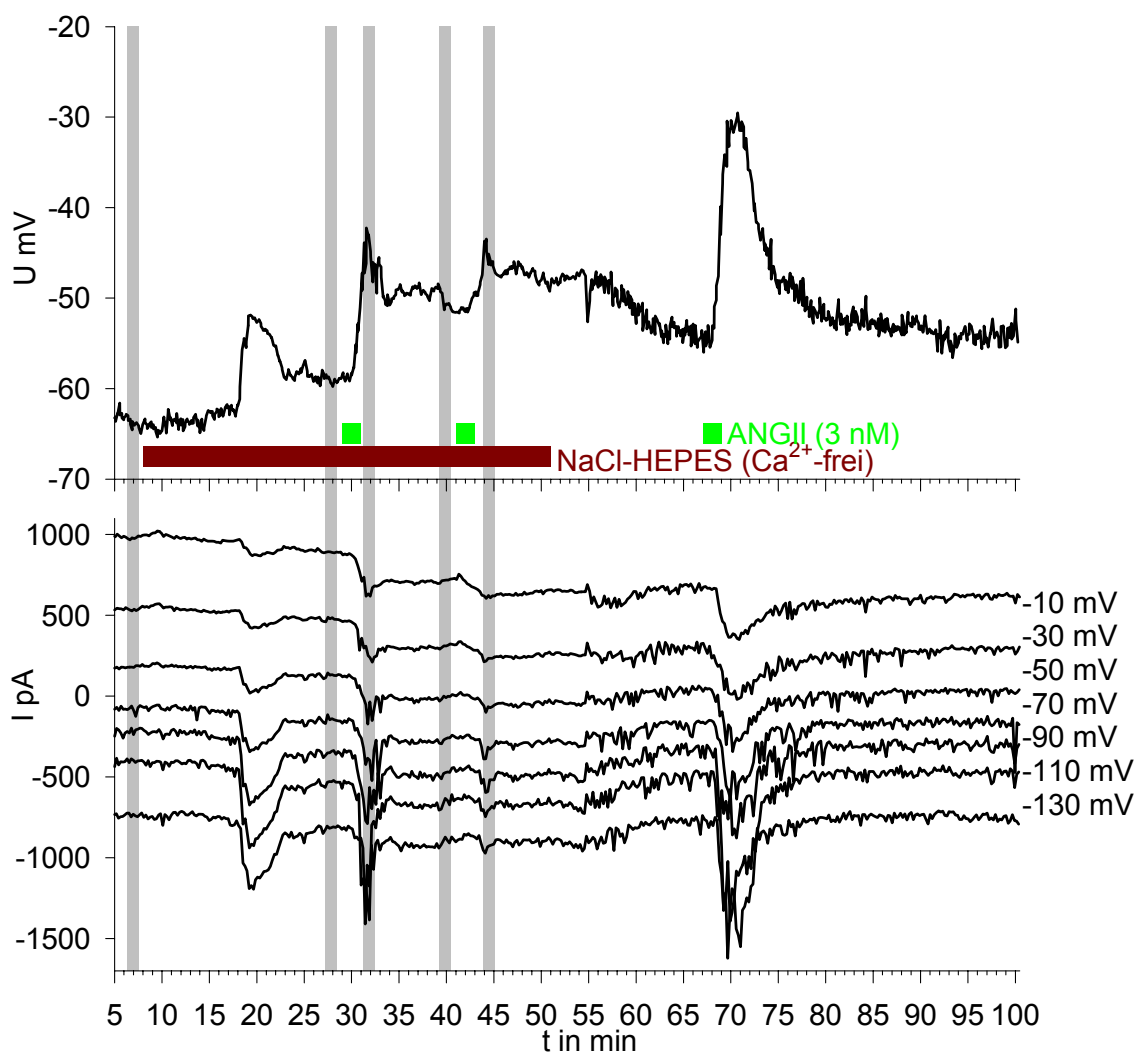
Eine zweite Applikation von ANGII (3 nM) in calciumfreier Perfusionspufferlösung depolarisiert die Zellen von  $-46,2 \pm 2,2$  mV auf nur  $-38,2 \pm 2,8$  mV ( $n=5$ ) (gepaarter t-Test: signifikant weniger als bei erster Applikation ( $P = 0,025$ ;  $n=5$ )).



**Abb. 51:** Beispielexperiment: Wirkung von ANGII (1 nM;  $[K^+]_o=2,8$  mM) in calciumhaltiger und calciumfreier Perfusionspufferlösung:

Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit ANGII (1 nM) führt zu einer reversiblen Depolarisation der Zellen von ca. -68 mV auf ca. -41 mV. Die Superfusion der Zellen mit NaCl-HEPES-PS ( $Ca^{2+}$ -frei) führt zu schnellen, inkonstanten Depolarisationen und einer Zunahme des Membranleitwertes. Die Applikation von ANGII (1 nM) in calciumfreiem Puffer führt zu einer Depolarisation der Zellen von ca. -56 mV auf ca. -45 mV. Die Zelle hyperpolarisiert unter andauernder ANGII Applikation auf -51 mV. Die Repolarisation ist nicht vollständig.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. ANGII (1 nM) erhöht den Leitwert der Membran zunächst. Die andauernde Applikation von ANGII senkt den Leitwert der Membran im Klemmbereich zwischen -130 und -30 mV. Die Superfusion der Zellen mit calciumfreiem Puffer erhöht den Leitwert der Membran. Die Applikation von ANGII (1 nM) in calciumfreiem Puffer führt zu keinen signifikanten Änderungen des Leitwertes.

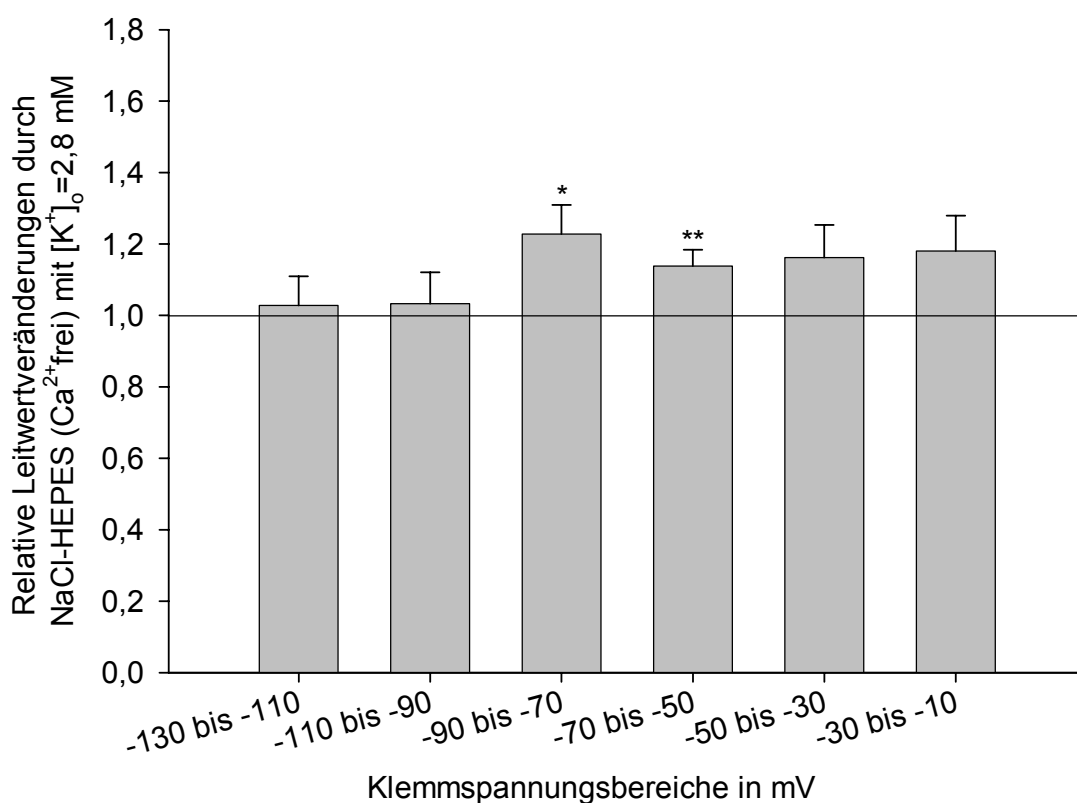


**Abb. 52:** Beispielexperiment: Wirkung von calciumfreier Perfusionspufferlösung und deren Auswirkung auf die Wirkung von ANGII (3 nM):

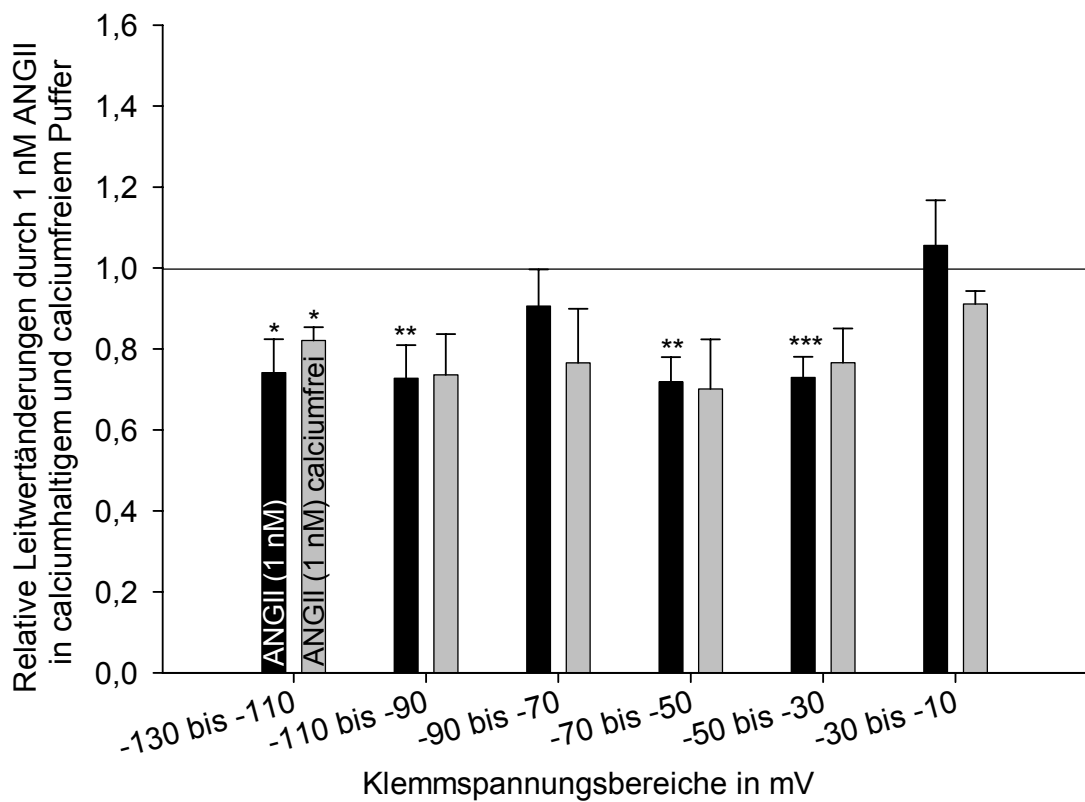
Current Clamp (oben): Das Membranpotenzial ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit NaCl-HEPES ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei) führt zu schnellen, inkonstanten Depolarisationen und einer Zunahme des Membranleitwertes. Die Applikation von calciumfreiem Puffer führt zu einer Depolarisation der Zellen von ca. -64 mV auf ca. -59 mV. Die Applikation von ANGII (3 nM) in calciumfreiem Puffer führt zu einer Depolarisation von ca. -59 mV auf ca. -43 mV. Die Repolarisation ist nicht vollständig. Eine zweite Applikation von ANGII in calciumfreiem Puffer führt zu einer Depolarisation von ca. -59 mV auf ca. -44 mV. Die Repolarisation ist nicht vollständig. Die Applikation von calciumhaltigem Puffer führt zur Repolarisation der Zellen. Eine dritte Applikation von ANGII in calciumhaltigem Puffer depolarisiert die Zellen reversibel von ca. -55 mV auf ca. -30 mV.

Voltage Clamp (unten): Die Klemmströme für 7 Klemmpotenziale sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Superfusion der Zellen mit NaCl-HEPES ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei) erhöht den Leitwert der Membran im Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV. Die Applikation von ANGII (3 nM) in calciumfreiem Puffer erhöht den Leitwert der Membran kurzzeitig. Eine weitere Applikation von ANGII (3 nM) führt zu einer geringeren Zunahme des Membranleitwertes. Eine dritte Applikation von ANGII in calciumhaltigem Puffer führt zu einer starken Erhöhung des Membranleitwertes.

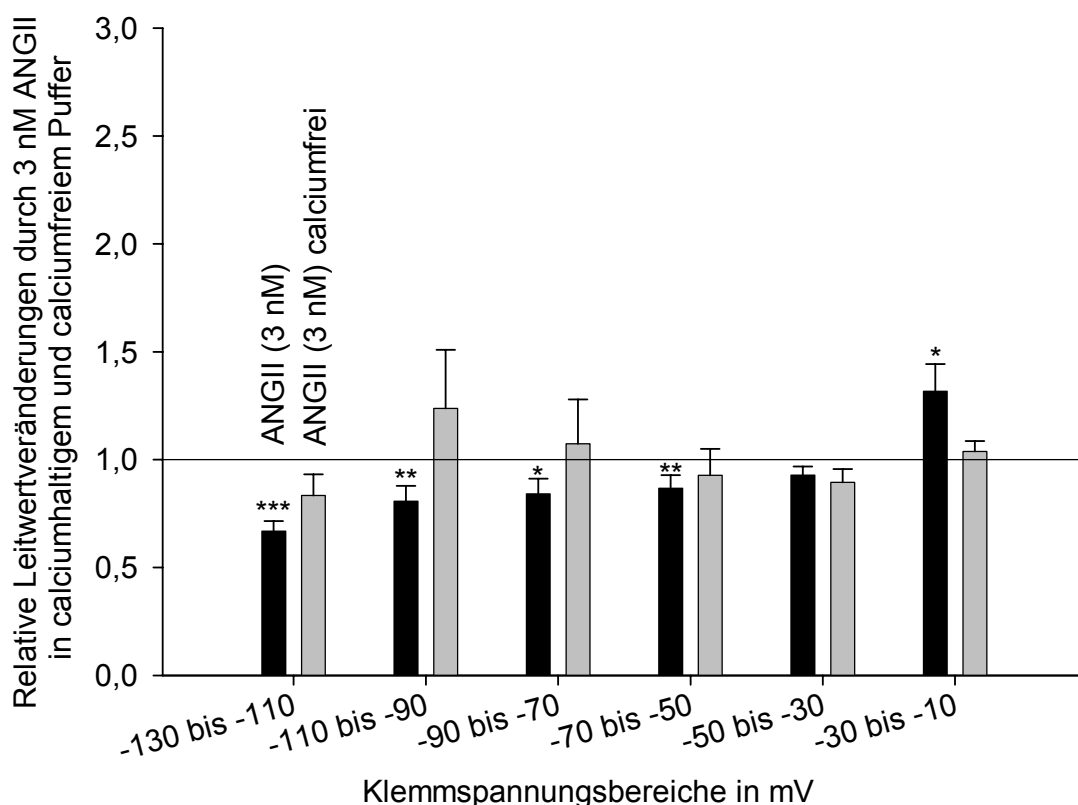
Im Voltage Clamp-Modus zeigt sich in den Klemmpotenzialen von -90 bis -50 mV eine signifikante Zunahme des Leitwerts hervorgerufen durch calciumfreie HEPES-gepufferte Salzlösung (Abb. 53). Zusätzlich treten kurze, inkonstante Leitwertzunahmen auf, die vermutlich auf Leckströme zurückzuführen sind. ANGII (1 nM) führt in calciumfreier Perfusionspufferlösung zu einer signifikanten Leitwertänderung im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV (Abb. 54). ANGII (3 nM) führt in calciumfreier Perfusionspufferlösung zu keinen signifikanten Leitwertänderungen (Abb. 55).



**Abb. 53:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit calciumfreier HEPES-gepuffertes Salzlösung. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Membranleitwertes im Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV (n=15). (Mittelwerte mit Standardfehler); \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant.



**Abb. 54:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die zehnminütige Superfusion der Zellen mit 1 nM ANGII in calciumhaltigem und calciumfreiem Puffer. ANGII (1 nM) führt in calciumfreiem Puffer zu einer signifikanten Leitwertminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV (n=5). Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leitwertänderung durch ANGII (1 nM) in calciumhaltigem und calciumfreiem Puffer.



**Abb. 55:** Relative Leitwertveränderungen der Membran erzeugt durch die Superfusion der Zellen mit 3 nM ANGII in calciumhaltigem und calciumfreiem Puffer. ANGII (3 nM) führt in calciumfreiem Puffer zu keinen von 1 signifikant verschiedenen relativen Leitwertänderungen (n=6). Es zeigen sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leitwertänderung durch ANGII (3 nM) in calciumhaltigem und calciumfreiem Puffer.

Zusammenfassung:

Es zeigt sich, dass

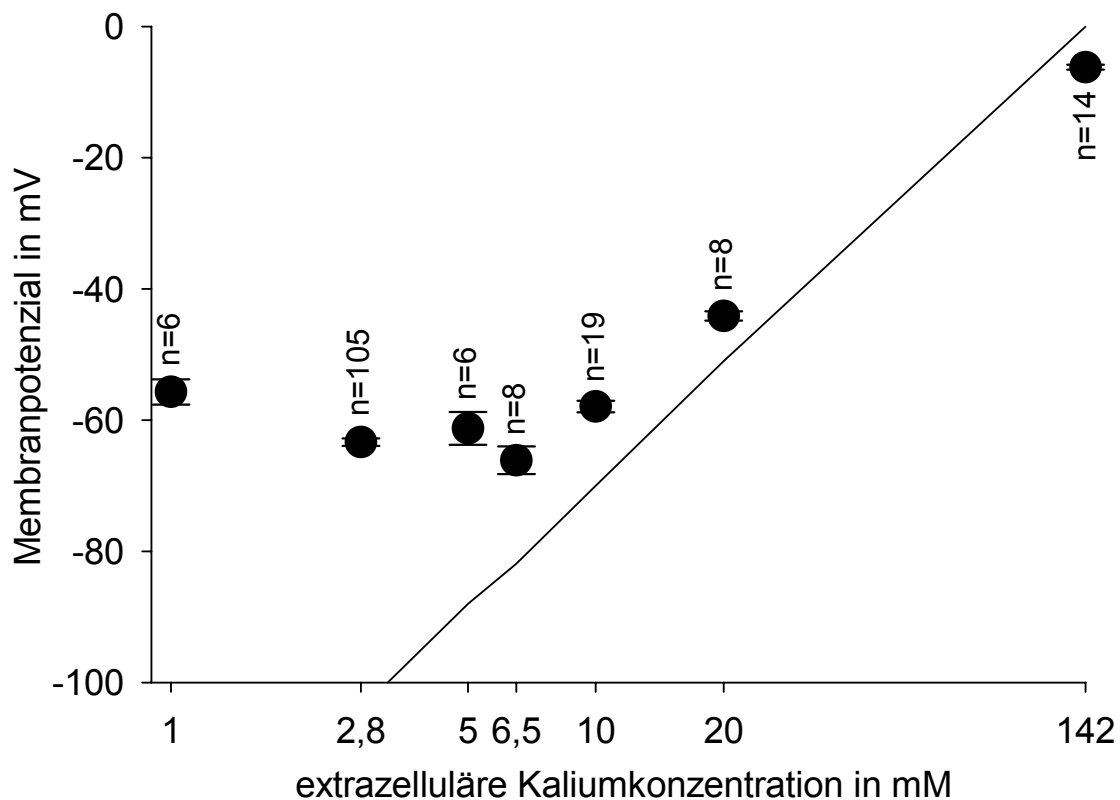
- calciumfreie Perfusionspufferlösung die Zellen unspezifisch depolarisiert und den Membranleitwert im Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV erhöht.
- ANGII in calciumfreiem Puffer die Zellen depolarisiert, bei einer zweiten Applikation (3 nM) in calciumfreiem Puffer jedoch weniger stark als beim ersten Mal. Bei zehnmütiger Applikation von 1 nM ANGII repolarisieren in 4 von 5 Experimenten die Zellen noch während der ANGII-Applikation.



### 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 3.7.1 Das Membranpotenzial in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration

Abbildung 56 zeigt das Membranpotenzial RSZ in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration. In dieses Schaubild gehen sowohl die Messergebnisse aus dem Kapitel 3.1 ein, als auch die Referenzwerte des Membranpotenzials unter Ruhebedingungen aller ANGII-Experimente ein.



**Abb. 56:** Membranpotenzial bei Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration. Es zeigt sich, dass die Zellen zwischen 2,8 und 6,5 mM  $[K^+]_o$  am stärksten polar sind. Die durchgezogene Linie gibt die errechneten Potenziale nach der Nernstgleichung an (für 37°C und einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 142 mM).

### 3.7.2 Das Membranpotenzial und der Membranleitwert in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration und von ANGII

[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> in mM	ANGII in nM	Mempot. in mV	ΔU in mV	Mempot. unter ANGII in mV	relative Leitwertänderungen									n
					-130 bis -110	-110 bis -90	-90 bis -70	-70 bis -50	-50 bis -30	-30 bis -10	-10 bis +10	+10 bis +30	+30 bis +50	
2,8	10	-64,5±0,8	32,8±1,1	-31,7±1,0	↓	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑				48
2,8	3	-63,9±0,9	27,3±1,8	-36,6±1,5	↓↓↓	↓↓	↓	↓↓	-	↑				33
2,8	1 <sup>a</sup>	-65,3±1,3	13,9±2,1	-51,4±2,3	-	-	-	-	↓↓↓	↑				11
2,8	1 <sup>b</sup>	-66,9±0,9	23,0±2,4	-43,9±2,4	↓	↓↓	-	↓↓	↓↓↓	-				10
6,5	3	-67,7±1,6	33,9±3,4	-33,9±3,9	↓	↓	↓	↓		↑				7
10	10	-59,5±0,8	28,9±1,8	-30,6±1,7	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↑				10
142	10	-6,3±0,4	-4,2±0,5	-10,5±0,5			-	-	↑	↑	↑↑	-	-	13

↑↑↑: höchstsignifikante relative Leitwerterhöhung

↓↓↓: höchstsignifikante relative Leitwertverminderung

-: Keine von 1 signifikant verschiedene relative Änderung des Leitwerts

a: Auswertung nach 3 Minuten

b: Auswertung nach 10 Minuten

### 3.7.3 Das Membranpotenzial und der Membranleitwert unter Barium (1 mM) bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen von 2,8 und 10 mM

[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> in mM	Barium in mM	Mempot. in mV	ΔU in mV	Mempot. unter Barium in mV	relative Leitwertänderungen									n
					-130 bis -110	-110 bis -90	-90 bis -70	-70 bis -50	-50 bis -30	-30 bis -10	-10 bis +10	+10 bis +30	+30 bis +50	
2,8	1	-59,5±1,7	18,5±2,1	-41,0±1,3	-	-	-	↓	↓	-				4
10	1	-58,4±1,1	13,3±0,8	-45,1±1,3	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	-	-				8

↑↑↑: höchstsignifikante relative Leitwerterhöhung

↓↓↓: höchstsignifikante relative Leitwertverminderung

-: Keine von 1 signifikant verschiedene relative Änderung des Leitwerts

### 3.7.4 Das Membranpotenzial und der Membranleitwert unter Chloridkanalblockern

[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> in mM	Chloridkanalblocker	Mempot. in mV	ΔU in mV	Mempot unter Chloridkanalblocker in mV	relative Leitwertänderungen									n
					-130 bis -110	-110 bis -90	-90 bis -70	-70 bis -50	-50 bis -30	-30 bis -10	-10 bis +10	+10 bis +30	+30 bis +50	
2,8	DIDS	-60,3±1,6	-16,8±2,6	-77,1±1,7	↑	↑	↑↑	-	-	↓↓				10
2,8	NFA	-59,7±1,5	-12,5±2,0	-72,2±2,2	-	-	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓				11
2,8	NPPB	-57,8±1,7	-14,0±2,6	-71,8±3,5	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓				5

DIDS (0,5 mM); NFA (100 μM); NPPB (100 μM);

↑↑↑: höchstsignifikante relative Leitwerterhöhung.

↓↓↓: höchstsignifikante relative Leitwertverminderung.

-: Keine signifikant von 1 verschiedene relative Änderung des Leitwerts

## 4 Diskussion

### 4.1 Material und Methoden, mögliche Fehlerquellen

Elektrophysiologische Experimente an nativen reninsezernierenden Zellen (RSZ) der afferenten Arteriole mit Hilfe der von Neher und Sackmann entwickelten Patch-Clamp Technik erfordern eine vorherige Präparation des zu untersuchenden Gewebes.

Die Membran der zu untersuchenden Zelle muß zugänglich und frei von Fasern der extrazellulären Matrix sein. Zudem müssen die Zellen während des Experiments vor Erschütterungen geschützt sein und von elektrischen Störungen abgeschirmt werden.

Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, müssen die Glomerula für die durchgeführten Experimente aus der Ratte und dem Nierengewebe isoliert werden (siehe Kapitel 2.2.1).

Durch die Präparation des Gewebes werden u. a. folgende Größen verändert:

- Der Blutkreislauf ist aufgehoben und der Blutdruck, der an RSZ in vivo anliegt, ist während der Experimente nicht mehr vorhanden. Ein Blutdruckabfall ist ein wichtiger Stimulus für RSZ, Renin freizusetzen. Es ist also davon auszugehen, dass die Zellen kurz vor Versuchsbeginn viel Renin sezerniert haben (Siehe Kapitel 1.4.2). Für die Signaltransduktion von mechanischen Reizen der Membran zur Regulation der Reninsekretion wird eine Änderung des Membranpotenzials angenommen (Fray und Lush, 1984, zitiert in Kurtz, 1989). Reninsezernierende Zellen wandeln sich in der Niere zu Zellen um, die die Eigenschaften und die Funktionen von glatten Muskelzellen haben, und umgekehrt (Sequeira Lopez et al., 2001). Für glatte Muskelzellen wurde gezeigt, dass Dehnung durch die Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle eine Membrandepolarisation nach sich zieht (Kurtz, 1989). Es ist also davon auszugehen, dass RSZ in vivo ein anderes Ruhemembranpotenzial haben als unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen. Loutzenhiser et. al. (Loutzenhiser et al., 1997) messen ein Membranpotenzial von  $-40 \pm 1$  mV an perfundierten Rattennieren.
- Auch die Durchtrennung sympathischer Nervenfasern während der Zellpräparation und das damit verbundene Fehlen eines Reizes für die Reninsekretion könnte die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen beeinflussen.

- Falls bei der Präparation trotz der Zerstörung der Tubuli, die Macula densa Zellen und deren Signaltransduktion zu RSZ intakt geblieben sind, könnte die hohe Perfusionspuffer-NaCl Konzentration, die jetzt an der Macula densa vorliegt, zu einer Reninsekretionshemmung und zur Depolarisation RSZ beitragen.
- Eine mögliche Hypoxie und Azidose mangels Blutkreislauf scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die meisten Zellen ein Ruhepotenzial zwischen -55 mV und -70 mV aufwiesen, das nach Depolarisation durch z.B. Angiotensin II (ANGII) wieder aufgebaut wird. Zellen die weniger polarisiert waren bzw. kein konstantes Ruhemembranpotenzial aufwiesen, wurden verworfen. Die Zellen wurden nur am Tag der Präparation verwendet.
- Die Blutgefäße wurden während des Experiments von Perfusionspufferlösung superfundiert, und nicht von Blutplasma, das viele Proteine enthält. Proteine sind im Perfusionspuffer nicht enthalten, insbesondere keine basale Konzentration an ANG II, was wiederum zu einer Freisetzung von Renin führen dürfte.
- Alle Experimente wurden im Ganzzellmodus (Whole-Cell Konfiguration) durchgeführt, um das Membranpotenzial und Summenströme über die Membran messen zu können. Um diese Konfiguration zu erreichen, muss der Membranfleck, der nach dem Aufsetzen der Glaspipette auf die Zelle von der Pipettenöffnung umschlossen wird, zerstört werden. Die Folge ist, dass sich die intrazelluläre Flüssigkeit, deren Zusammensetzung nicht genau bekannt ist, mit der Pipettenlösung mischt. Zu beachten ist, dass RSZ über gap-junctions mit den Nachbarzellen verbunden sind, es aber unwahrscheinlich ist, dass alle Zellen von der Pipettenlösung perfundiert werden. Um die Größe des Membranflecks und damit das unvermeidliche Vermischen der Pipettenlösung mit der Intrazellulärflüssigkeit über die Experimente konstant zu halten, wurde der elektrische Widerstand der Pipettenöffnung gemessen und nur Pipetten verwendet, die einen Widerstand zwischen 3 und 5 M $\Omega$  hatten.
- Um Veränderungen im Membranleitwert bei verschiedenen Potenzialen berechnen zu können, wurde der Voltage clamp Modus durchgeführt. Dabei werden die Ströme gemessen, die für das Hyperpolarisieren und Depolarisieren der Zellen vom Verstärker benötigt werden (Siehe Kapitel 2.2.2.3). Das mehrmalige Durch-

laufen dieser Klemmspannungen hatte keine Auswirkungen auf das Ruhemembranpotenzial.

- Auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen können sich weiterhin die Temperatur des Inkubators bei der Behandlung der Zellen mit Kollagenase, Schwankungen der Temperatur vor und während des Experiments, Unterschiede zwischen den Ratten, verschiedene Präparationen, die Größe, die Form und die Position der Zelle am Vas afferens (Reninpositiver Bereich von Gefäß zu Gefäß verschieden) sowie Schwankungen in der Zusammensetzung der Puffer und Lösungen auswirken.
- Auch die ursprüngliche anatomische Position des Glomerulums in der Niere könnte Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der RSZ haben. Glomerula unterscheiden sich nämlich nicht nur durch die Länge des reninpositiven Bereichs der afferenten Arteriole, sondern auch durch den Blutdruck, der an ihnen anliegt. Der Blutdruck am Ende der Arteriae arcuatae beträgt in Rattennieren ca. 96 mmHg. Der Druck, der am Glomerulum ankommt, hängt nun davon ab, wie weit das jeweilige Glomerulum von der Arteria arcuata entfernt ist, d.h. wie lang die jeweilige Arteria interlobularis ist. Marknahe (juxtamedulläre) Glomerula haben eine kurze Arteria interlobularis und entsprechend einen hohen Blutdruck (ca. 90 mmHg). Glomerula, die an der Nierenoberfläche liegen (kortikale Glomerula) haben einen niedrigen Blutdruck (ca. 67 mmHg) (Klinke und Silbermagl, 2000, S. 291; siehe auch Abb. 3). Ein weiterer Unterschied zwischen juxtamedullären und kortikalen Glomerula liegt im anatomischen Verlauf ihrer Vasa efferentia. Die Nierenrinde wird von den efferenten Arteriolen der kortikalen Glomerula, das Nierenmark, in dem sich keine Glomerula befinden, wird von den efferenten Arteriolen der juxtamedullären Glomerula mit Blut versorgt.

Für die Experimente wurden unter dem Mikroskop Zellen ausgewählt, die sich im distalen Teil der afferenten Arteriole kurz vor dem Eintritt in das Glomerulum befanden. Durch die kochsalzarme Ernährung der Ratten und der damit verbundenen Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems läßt sich der reninpositive Bereich in der afferenten Arteriole vergrößern (Rauch, 2000). Er konnte zeigen, dass 93,5 % aller afferenten

Arteriolen aus kochsalzarm ernährten Ratten reninsezernierende Zellen bis zu einer Entfernung von 20  $\mu\text{m}$  proximal des Gefäßpols und 21 % bis zu einer Entfernung von 30  $\mu\text{m}$  enthalten.

Es wurden bevorzugt solche Zellen ausgewählt, die die typische abgerundete, plumpe Form reninsezernierender Zellen aufwiesen.

Reninsezernierende Zellen stehen mit glatten Muskelzellen, Endothelzellen und extraglomerulären Mesangiumzellen über gap-junctions in Verbindung (Bührle et al., 1984). So dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften RSZ durch die genannten Zellen beeinflusst werden können.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Experimente auf einem Tisch durchgeführt, der sowohl von mechanischen als auch elektromagnetischen Schwingungen abgeschirmt wurde. Aufgrund der erwähnten Störgrößen wurden ausreichend viele Versuche mit Zellen von verschiedenen Rattennieren durchgeführt.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Abhängigkeit des Membranpotenzials und des Membranleitwertes RSZ von der extrazellulären Kaliumkonzentration**

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Änderungen der Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum deutliche Auswirkungen auf das Membranpotenzial haben. Unter Standardbedingungen (2,8 mM  $[\text{K}^+]_o$ ) stellen RSZ ein Membranpotenzial von ca. -64 mV ein. Wenn die Membran RSZ ausschließlich für Kaliumionen permeabel wäre, dann sollte sich nach der Nernstgleichung ein theoretisches Membranpotenzial von -104,9 mV einstellen (bei 37 °C und einer  $[\text{K}^+]_i$  von 142 mM; Siehe Kapitel 2.2.3).

Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration:

Die Depolarisation durch Erhöhung der  $[\text{K}^+]_o$  auf 10 mM und höher verhält sich in etwa gemäß der Nernstgleichung und zeigt, dass die Kaliumleitfähigkeit in RSZ überwiegt. Da



die gemessenen Potenziale immer weniger negativ sind als die nach dem Nernstpotenzial errechneten, muß es noch andere, depolarisierende Leitfähigkeiten geben. Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1989) zeigten, dass die Kaliumleitfähigkeit von einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{ir}$  2.x) getragen wird. Durch die Verminderung des chemischen Gradienten ist die Triebkraft für Kaliumionen, die Zelle zu verlassen, geringer, d.h., weniger  $K^+$ - Ionen verlassen die Zelle und bewirken so eine Depolarisation. Durch die Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 20 mM verschiebt sich die Strom-Spannungskurve des  $K_{ir}$  (Abb. 6) nach rechts (Hille, 1992, Seite 152). Dadurch steigt der Leitwert im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV (Siehe Abb. 18). Das steht im Einklang mit der gemessenen Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV. Aber auch die Auswärtsströme (Kaliumströme in die Zelle bei Klemmpotenzialen -50 bis -10 mV) nehmen zu, da mehr Ladungsträger (Kaliumionen) extrazellulär zur Verfügung stehen. Das schlägt sich in der tendenziellen Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV nieder.

Eine Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 142 mM (also auf die angenommene intrazelluläre Kaliumkonzentration) depolarisiert die Zellen auf  $-6,3 \pm 0,4$  mV. Nach der Nernstgleichung ergibt sich aber ein theoretisches Membranpotenzial von 0 mV.

Die Abweichung des Potenzials vom errechneten Wert kann folgendermaßen erklärt werden:

- Messfehler:

An den Grenzflächen zwischen dem chlorierten Silberdraht und der Pipettenlösung sowie zwischen Pipettenlösung und der Perfusionsbadlösung bilden sich sogenannte Offset Potenziale, die u. U. nicht korrekt kompensiert wurden.

- Auch die Standardkorrektur des Liquid junction Potenzials von -10 mV könnte falsch sein.

- Die intrazelluläre Kaliumkonzentration liegt höher als angenommen:

Die Zellen hätten womöglich bei einer  $[K^+]_o$  von über 142 mM ein Membranpotenzial von 0 mV erreicht hätten.

- ein Chloridioneneinstrom durch  $Cl_{Ca}$  hyperpolarisiert die Zellen:

Das Erhöhen der  $[K^+]_o$  auf 142 mM führt sowohl dazu, dass weniger Kaliumionen die

Zelle verlassen und dass die Zellen depolarisieren, als auch dazu, dass Calciumionen über spannungsaktivierte Calciumkanäle (VOCC) einströmen. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration könnte calciumabhängigen Chloridkanälen ( $Cl_{Ca}$ ) aktivieren. Da das Nernstpotenzial für Chloridionen in RSZ bei ca. -30 bis -20 mV liegt ( $E_{Cl}$  beträgt ca. zwischen -30 mV und -20 mV,  $[Cl^-]_o=140$  mM;  $[Cl^-]_i= 50$  mM; Aickin und Brading, 1985), erfolgt ein Einstrom von Chloridionen, der die Zellen hyperpolarisiert.

Die Hypothese, dass durch die Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 142 mM die intrazelluläre Calciumkonzentration so weit ansteigt, dass  $Cl_{Ca}$  aktiviert werden, wird durch die Tatsache untermauert, dass die Depolarisation mit einer Leitwerterhöhung im gesamten Klemmbereich zwischen -70 und +50 mV einhergeht.

Verminderung der Extrazellulären Kaliumkonzentration:

Wird die extrazelluläre Kaliumkonzentration von 2,8 mM auf 1 mM gesenkt, weicht das Membranpotenzial nicht nur von den mit Hilfe der Nernstgleichung berechneten Werten ab, es wird sogar weniger negativ.

Diese Depolarisation geht mit einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -110 mV einher, die auf eine Verminderung der Leitfähigkeit von Kir-Kanälen zurückzuführen ist, da ja die Leitfähigkeit der  $K_i$ -Kanäle nicht zuletzt von der Ionenkonzentration im Innern des Kanals abhängt.

Sie geht aber auch mit einer Leitwerterhöhung im physiologisch relevanten Klemmbereich zwischen -90 und -50 mV einher.

Folgender Mechanismus könnten zu dieser Leitwerterhöhung beitragen:

Die Natrium-Kalium-ATPase muss bei verminderter extrazellulärer Kaliumkonzentration einen größeren Gradienten überwinden und sie ist mit Kaliumionen weniger gesättigt. Der elektrogene, hyperpolarisierende Effekt der Natrium-Kalium-ATPase wird dadurch geringer. Im Gegenzug werden auch weniger Natriumionen aus der Zelle transportiert. Durch den Anstieg der intrazellulären Natriumionenkonzentration können weniger Calciumionen aus der Zelle transportiert werden, da der Na-Ca-Austauscher nun einen geringeren Natriumgradienten zur Verfügung hat. Es gibt viele indirekte Beweise dafür, dass ein Na-Ca-Austauscher in RSZ vorhanden ist (Churchill, 1985). Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert  $Cl_{Ca}$ -Kanäle. Das steht im Einklang mit der

signifikanten Leitwerterhöhung im Klemmbereich -90 bis -50 mV und der tendenziellen Zunahme im Klemmbereich zwischen -50 und -10 mV.

#### 4.2.2 Wirkung von ANGII auf RSZ

Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von ANGII:

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Membranpotenzialmessungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zeigen, dass ANGII RSZ konzentrationsabhängig und weitgehend reversibel depolarisiert (Kap. 3.2.4). Die Depolarisation der Zellen durch 10 nM ANGII ist nach Auswaschen des Agonisten und damit verbundener Repolarisation am selben Präparat mehrfach wiederholbar.

Die Depolarisation der Zellen durch ANGII (3 und 10 nM) geht mit einer Verminderung des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -130 und -50 (bei 10 nM ANGII bis -30 mV) einher.

Messungen von Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1989) haben ergeben, dass RSZ einwärtsgerichtete Kaliumkanäle besitzen. Eine Verminderung des Leitwertes durch ANGII in diesem Klemmbereich, deutet darauf hin, dass ein Teil der depolarisierenden Wirkung von ANGII auf einen Block dieser Kanäle zurückzuführen ist. Dabei ist zu beachten, dass nicht der Block der namensgebenden Einwärtsströme (Spannungsbereich negativ von ca. -104,9 mV) eine Depolarisation hervorruft, sondern die Verminderung der Auswärtsströme (Spannungsbereich positiv von -104,9 mV) (Siehe auch Abb. 6; dort beträgt das  $E_K$  -95 mV). Dadurch wird der hyperpolarisierende Kaliumionenausstrom vermindert, was zur Depolarisation der Zelle führt.

Bemerkenswert ist, dass das Leitwertprofil unter Applikation von 10 nM ANGII eine signifikant stärkere Verminderung des Leitwertes als unter 3 nM ANGII gerade im Spannungsbereich der Auswärtsströme zeigt (U-Form des Leitwertprofils; Kap. 3.2.3), also präferenziell die Leitfähigkeit vermindert wird, die für die depolarisierende Wirkung von ANGII entscheidend ist.

Die Depolarisation der Zellen durch ANGII (3 und 10 nM) geht aber auch mit einer Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV einher. Kurtz und

Penner (Kurtz und Penner, 1989) konnten zeigen, dass ANGII zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Um die Effekte von ANGII, die durch die erhöhte Calciumkonzentration auftraten, von denen auf Kaliumkanäle zu trennen, imitierten sie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit Ionomycin, einem Calciumionophor. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf über 400 nM durch Ionomycin (5 µg/ml) ging mit einem Einwärtsstrom einher. D.h.: Es mussten ca. -800 pA Strom in die Zelle appliziert werden, um sie auf -60 mV zu halten. Dieser Einwärtsstrom trat nicht auf, wenn die intrazelluläre Calciumionenkonzentration auf ca. 50 nM oder ca. 150 nM gepuffert wurde. Er war jedoch weiterhin vorhanden, wenn intrazelluläres Kalium durch den Kaliumkanalblocker Caesium ersetzt oder Tetraethylammonium der intra- und extrazellulären Lösung zugesetzt wurde. In Voltage Clamp Experimenten konnten Kurtz und Penner den bei stark depolarisierten Klemmpotenzialen aufgetretenen Auswärtsstrom (Chloridioneneinstrom) durch die Ionomycin aktivierten Chloridkanäle durch Austausch des extrazellulären Chlorid durch Isethionat aufheben. Sie bewiesen dadurch indirekt, dass der durch Ionomycin induzierte Strom durch calcium-aktivierte Chloridionenkanäle fließt. Sie schlossen daher, dass auch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch ANGII zu einem solchen Einwärtsstrom (Chloridionenausstrom) führen müsste.

Die Hauptleitfähigkeit RSZ verschiebt sich durch ANGII also von einer auswärtsgerichteten, hyperpolarisierenden Kaliumleitfähigkeit zugunsten einer depolarisierenden Chloridleitfähigkeit. Es stellt sich ein Membranpotenzial ein, das nahezu dem Gleichgewichtspotenzial für Chloridionen entspricht. Die intrazelluläre Chloridionenkonzentration in RSZ beträgt ca. 50 mM und die extrazelluläre Chloridionenkonzentration etwa 140 mM. Es ergibt sich ein Nernstpotenzial für Chloridionen von ca. -30 bis -20 mV (Nelson et al., 1997).

Dass sich bezüglich der Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 3 und 10 nM ANGII ergibt, wohl aber bezüglich der Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -70 und -30 mV, legt nahe, dass 10 nM ANGII die Zellen auf Grund der stärkeren Hemmung des  $K_{ir}$  stärker depolarisieren (Siehe Abb. 21).

Kapitel 3.2.4 beschreibt die Wirkung von 1 nM ANGII appliziert für 10 Minuten. Es zeigt sich, dass schon nach dreiminütiger Applikation von 1 nM ANGII eine Depolarisation um  $13,9 \pm 2,1$  mV stattfindet, die mit einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -50 und -30 und einer Leitwertzunahme im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV einhergeht. Nach 10 Minuten Applikation von 1 nM ANGII zeigt sich, dass die Leitwertverminderung weiterhin vorhanden ist und es auch zu einer signifikanten Leitwertverminderung im einwärtsrektifizierenden Bereich des Kir kommt. Der Leitwert im Klemmbereich von -30 bis -10 mV ist trotz weiter bestehender Depolarisation nicht mehr signifikant erhöht. Das gibt Hinweise über den zeitlichen Ablauf der depolarisierenden Wirkung von ANGII. Die Aktivierung der  $Cl_{Ca}$  tritt früher auf, und klingt noch während der Applikation des Agonisten ab, während der Block des Kir später auftritt und mit der Dauer der Applikation des Agonisten zunimmt (Siehe Abb. 27).

Die Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 zeigen, dass eine leichte Erhöhungen der extrazellulären Kaliumkonzentration (6,5 und 10 mM) keinen signifikanten Effekt auf die depolarisierende Wirkung von ANGII (3 und 10 nM) hat.

Die Zunahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 ist tendenziell weniger stark ausgeprägt als in 2,8 mM  $[K^+]_o$ .

Eine mögliche Erklärung dafür ergibt sich aus einer effizienteren Senkung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die durch ANGII angestiegen ist. Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 10 mM erhöht den Umsatz der Na-K-ATPase mit der Folge, dass die intrazelluläre Natriumkonzentration sinkt. Dem Na-Ca-Austauscher steht damit ein höherer Natriumgradient über die Membran zur Verfügung, um die intrazelluläre Calciumkonzentration zu senken bzw. niedrig zu halten.

Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Verschiebung der Strom-Spannungskurve des  $K_{ir}$  nach rechts durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration. Dadurch verschiebt sich auch die gemessene Leitwertverminderung nach rechts, bzw. in den Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV hinein.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf Werte, die der intrazellulären entsprechen (142 mM), führt zur Depolarisation der Zellen, die mit einer Zunahme des

Leitwertes im Klemmbereich zwischen -70 und +50 mV einhergeht. ANGII (10 nM) führt unter diesen Bedingungen zu einer Hyperpolarisation der Zellen von  $-6,3 \pm 0,4$  mV auf  $-10,5 \pm 0,5$  mV (n=13). Diese zunächst erstaunliche Wirkung lässt sich folgendermaßen erklären:

Trotz der schon erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration durch die Depolarisation und dadurch aktivierten VOCC, kommt es zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch 10 nM ANGII (mdl. Mitteilung von Herrn Marc Chmielnicki). Diese zusätzliche Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht die Offenwahrscheinlichkeit von  $Cl_{Ca}$ , was das Membranpotenzial in Richtung  $E_{Cl}$  (ca. -30 bis -20 mV) verschiebt. Es kommt also unter diesen Bedingungen zu einem Chloridioneneinstrom durch  $Cl_{Ca}$ . Diese Hypothese wird untermauert durch die Tatsache, dass die Hyperpolarisation mit einer signifikanten Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -50 und +10 mV einhergeht.

### 4.3 Hemmung von Kir2.x Kanälen durch $Ba^{2+}$

$Ba^{2+}$  ist ein relativ spezifischer Blocker von einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{ir}$ ). Da in RSZ der  $K_{ir}$  Typ 2.x vorherrschend ist (Leichtle et al., 2004), kann durch die Verwendung von  $Ba^{2+}$  auf die Bedeutung von  $K_{ir}2.x$  Kanälen für das Ruhemembranpotenzial und den Ruhestrom von RSZ rückgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass 1 mM Barium RSZ depolarisiert und dass diese Depolarisation mit einer deutlichen Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV einhergeht (Siehe Abb. 32). Das ist ein weiterer Beweis, dass das Ruhemembranpotenzial RSZ stark von offenen Kaliumkanälen vom  $K_{ir}2.x$  Typ abhängt. Es zeigt sich keine signifikante Leitwerterhöhung in den depolarisierenden Klemmpotenzialen durch die Applikation von 1 mM Barium. Die Depolarisation durch Barium reicht also nicht aus, um die intrazelluläre Calciumkonzentration so stark ansteigen zu lassen, dass calciumabhängige Chloridkanäle aktiviert werden.

Zudem zeigt sich, dass eine Leitwertverminderung durch Kir-Block durch Barium nur bei Potenzialen negativ von ca. -40 mV stattfindet. Das lässt sich folgendermaßen erklären:

- Der Kir-Block durch Barium nimmt mit steigendem Membranpotenzial immer mehr ab.

Er ist also spannungsabhängig (Leichtle et al., 2004).

- Die Leitfähigkeit des Kir für Kaliumionen ist ab einem Potenzial von -30 mV und positiver gering. An einem nahezu vollständig geschlossenen Kanal ist der Kir-Block durch Barium über eine Leitwertverminderung schlecht nachweisbar.

ANGII hingegen zeigt im Vergleich mit 1 mM Barium trotz einer stärkeren Depolarisation, eine deutlich schwächere Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV (Siehe Kap. 3.3.1 Abb. 32). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ANGII ganz besonders die Auswärtsströme des Kir hemmt und weniger effektiv die Einwärtsströme. Ficker et al. (Ficker et al., 1994) und Lopatin et al. (Lopatin et al., 1994) konnten zeigen, dass der Auswärtsstrom durch  $K_{ir}2.1$  Kanäle durch intrazelluläre Polyamine wie Spermin geblockt wird, ohne dass die Einwärtsströme beeinflusst werden. Es ist daher möglich, dass die starke depolarisierende Wirkung von ANGII (10 nM) im Gegensatz zu Barium durch eine G-Protein vermittelte Verstärkung der Wirkung von Spermin erfolgt oder durch einen Abbau von  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat), das für die Aktivität von  $K_{ir}$ -Kanälen entscheidend ist (Du et al., 2004; Rohács et al., 1999)

Der erhoffte Beweis für eine Aktivierung von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen durch ANGII lässt sich aber durch den Vergleich der Wirkungen von ANGII und Barium aufgrund des immer schwächer werdenden Bariumblocks bei depolarisierten Potenzialen nicht führen.

Abhängigkeit des  $K_{ir}$ -Blocks durch Barium von der  $[K^+]_o$ :

Die Ergebnisse zeigen, dass 1 mM Barium in 2,8 mM  $[K^+]_o$  RSZ stärker depolarisiert (Depolarisationsamplitude ist größer) als in 10 mM  $[K^+]_o$  (Kap. 3.3.2).

Das lässt sich folgendermaßen erklären:

- Das Ruhemembranpotenzial ist bei einer  $[K^+]_o$  von 10 mM schon leicht depolarisiert, so dass bei ähnlichem absoluten Betrag der Depolarisation (Siehe Kap. 3.7.2) die Depolarisationsamplitude kleiner ist, weil bei 10 mM  $[K^+]_o$  die Triebkraft für Kaliumionen, die Zelle zu verlassen geringer ist als bei 2,8 mM  $[K^+]_o$ , was sich in einer Depolarisation äußert.
- Gegen diesen Befund spricht folgende Überlegung:

Das Leitwertprofil zeigt, dass der spannungsabhängige Kir Block durch Barium in 2,8 mM  $[K^+]_o$  auch zu einer Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -50 und -30 mV

führt. In diesem Klemmbereich, der ja dem tatsächlichen Membranpotenzial entspricht, ist der  $K_{ir}$ -Block durch Barium in 10 mM  $[K^+]_o$  tendenziell schwächer. Diese Ergebnisse stehen im Einklang damit, dass Barium in 2,8 mM  $[K^+]_o$  die Zellen stärker depolarisiert.

Interaktion von Barium und ANGII (Siehe Kap. 3.3.2):

Die Ergebnisse zeigen, dass die Depolarisation hervorgerufen durch 1 mM Barium durch zusätzliche Applikation von ANGII verstärkt wird. Da 10 nM ANGII alleine eine stärkere depolarisierende Wirkung hat als 1 mM Barium entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen.

Die Kombination von ANGII (10 nM) und Barium (1 mM) depolarisiert die Zellen aber stärker als ANGII alleine. Das läßt auf einen  $K_{ir}$  Block durch Barium auch bei diesen stark depolarisierten Potenzialen schließen. Zumal Barium in hoher Konzentration eingesetzt wurde (1 mM) und die  $IC_{50}$  bei -30 mV Membranpotenzial bei 14,5  $\mu$ M liegt (Leichtle et al., 2004). Es ist aber auch ein weiterer Hinweis darauf, dass an der depolarisierenden Wirkung von ANGII neben der Verminderung der Kaliumleitfähigkeit noch andere Leitfähigkeiten eine Rolle spielen.

Die sich gegenseitig verstärkende Wirkung von ANGII (300 pM) und Kaliumkanalblockern zeigten auch Kurtz, Hamann und Götz (Kurtz et al., 2000) im Hinblick auf die Inhibition der durch Isoproterenol stimulierten Reninsekretion an perfundierten isolierten Rattennieren.



#### 4.4 Rolle von Chloridionen bezüglich Ruhemembranpotenzial und ANGII-induzierter Depolarisation

RSZ können sich in glatte Muskelzellen umwandeln und unterscheiden sich durch eine hohe intrazelluläre Chloridionenkonzentration von anderen Zellen ( $E_{Cl}$  beträgt ca. zwischen -30 mV und -20 mV,  $[Cl^-]_o=140$  mM;  $[Cl^-]_i= 50$  mM; Nelson et al., 1997).

Um den Einfluß von Chloridkanälen auf das Ruhemembranpotenzial und die ANGII-induzierte Depolarisation zu untersuchen wurde der unselektive Chloridkanalblocker DIDS und die relativ selektiven  $Cl_{Ca}$ -Blocker (NFA und NPPB) appliziert.

##### 4.4.1 Die Wirkung der Chloridkanalblocker auf das Ruhemembranpotenzial und auf den Ruheleitwert:

DIDS zeigt eine irreversible, NFA und NPPB zeigen eine reversible Hyperpolarisation der Zellen (Siehe Abb. 36, 40, 44).

Die Tatsache, dass alle drei Chloridkanalblocker eine deutliche Hyperpolarisation auslösen, ist ein Hinweis darauf, dass RSZ in Ruhe eine depolarisierende Chloridleitfähigkeit besitzen.

Diese Hyperpolarisation geht bei allen 3 Substanzen mit einer signifikanten Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -30 bis -10 mV einher.

Die Wirkung aller drei Chloridkanalblocker wurde nur in jeweils einer Konzentration gemessen; Experimente zur Konzentration-Wirkungsbeziehung stehen noch aus.

Die Wirkung der Chloridkanalblocker auf das Ruhemembranpotenzial und den Ruheleitwert unterscheidet sich wie folgt:

DIDS (Siehe Kapitel 3.4.1):

DIDS ist laut Jentsch (Jentsch et al., 2002) ein potenter irreversibler Blocker von  $Cl_{Vol}$  ( $IC_{50}$  zwischen 5  $\mu$ M und 100  $\mu$ M). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde DIDS in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt, sodass möglicherweise auch  $Cl_{Ca}$ , CLIC und CLIC-2 Kanäle geblockt wurden, für die DIDS eine  $IC_{50}$  zwischen 100  $\mu$ M und 2 mM besitzt.

DIDS zeigt die stärkste Hyperpolarisation aller drei verwendeten Chloridkanalblocker. Die

Hyperpolarisation geht nicht nur mit einer signifikanten Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV einher, sondern auch mit einer signifikanten Erhöhung im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV.

Die Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV ist mit dem Block von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen vereinbar. Die Ströme durch diese Kanäle zeigen typischerweise eine Auswärtsrektifizierung und die Offenwahrscheinlichkeit ist hoch bei depolarisierten Potenzialen (Jentsch et al., 2002).

Die Leitwertzunahme im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV, die mit einer Hyperpolarisation einhergeht, kann durch eine Aktivierung von Kaliumkanälen bedingt sein.

Furukawa (Furukawa et al., 1993) beschreibt einen Block von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch DIDS, sodass dieser Effekt an in RSZ elektrophysiologisch (Russ et al., 1999) und immunhistochemisch (Leichtle et al., 2004) nachgewiesenen Kanälen nicht für die hyperpolarisierende Wirkung von DIDS in Frage kommt.

Eine Aktivierung von  $K_{i2.x}$  Kanälen durch DIDS ist in der Literatur nicht beschrieben. In Frage kommt eine Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch DIDS (Lange et al., 2003).

In der Membran RSZ sind auch  $BK_{Ca}$ -Kanäle in cell-attached Patch Clamp Messungen nachgewiesen (Leichtle et al., 2004; Friis et al., 2003). Da die Applikation von DIDS (100  $\mu$ M) zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Cruickshank et al., 2003), könnte die durch DIDS induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration diese Kanäle aktivieren. Diese Aktivierung kann aber nicht die Hyperpolarisation und die Leitwerterhöhung erklären, da  $BK_{Ca}$ -Kanäle bei hyperpolarisierten Potenzialen nur geringe Leitfähigkeit besitzen.

NFA (Siehe Kapitel 3.4.2):

NFA ist laut Jentsch (Jentsch et al., 2002) ein potenter Blocker für  $Cl_{Ca}$  ( $IC_{50}$  zwischen 5  $\mu$ M und 100  $\mu$ M). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde NFA in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt, sodass auch CIC-1, CFTR und  $Cl_{Vol}$  Kanäle (sofern vorhanden) teilweise geblockt worden sind., für die NFA eine  $IC_{50}$  zwischen 100  $\mu$ M und 2 mM besitzt.

In den hier vorgestellten Experimenten führt NFA zu einer reversiblen Hyperpolarisation, die mit einer signifikanten Leitwertverminderung im Klemmbereich zwischen -90 und

-10 mV einhergeht.

Diese Leitwertverminderung läßt auf einen Block von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen schließen, da NFA der für  $Cl_{Ca}$ -Kanäle selektivste unter den eingesetzten Chloridkanalblockern ist.

Cruickshank et al. (Cruickshank et al., 2003) konnten auch eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration in isolierten glatten Muskelzellen der Lungenarterie durch NFA (50  $\mu$ M) nachweisen. NFA setzt dabei Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum frei. Steendahl et al. (Steendahl et al., 2004) hingegen konnten einen kleinen, im gepaarten t-Test aber signifikanten Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration in intakten isolierten präglomerulären Gefäßen durch NFA (50  $\mu$ M) nachweisen.

Die gemessenen Leitwertveränderungen geben keinen Hinweis auf eine mögliche Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen ( $BK_{Ca}$ ) durch eine mögliche NFA-induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration.

NPPB (Siehe Kapitel 3.4.3):

NPPB ist laut Jentsch (Jentsch et al., 2002) ein potenter Blocker für  $Cl_{Ca}$ -, CFTR- und  $Cl_{Vol}$ - Kanäle ( $IC_{50}$  zwischen 5  $\mu$ M und 100  $\mu$ M). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde NPPB in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt.

In den hier vorgestellten Ergebnissen führt NPPB zu einer reversiblen Hyperpolarisation, die mit einer signifikanten Leitwertverminderung im gesamten Klemmbereich zwischen -130 und -10 mV einhergeht.

Diese Leitwertverminderung unterscheidet sich von denen durch DIDS und NFA hervorgerufenen durch ihren größeren Betrag und ihre Gleichförmigkeit über alle Klemmbereiche. Sie ist daher nicht ausschließlich auf einen Block von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen zurückzuführen. Die Analyse der Ströme, die für das Erreichen der Klemmpotenziale vom Verstärker appliziert werden mussten, zeigt, dass sich durch die Applikation von 100  $\mu$ M NPPB nicht nur der Betrag der Klemmströme stark verringert, sondern auch die kapazitiven Ströme (Ladeströme) unter NPPB abnehmen. Die Leitwertverminderung ist also nicht nur auf die Inaktivierung von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen zurückzuführen, sondern auch auf ein elektrisches Entkoppeln der durch gap junctions verbundenen Zellen. Dass RSZ elektrisch leitend verbunden sind, beschreiben Kurtz und Penner (Kurtz und Penner, 1989).

Ihnen fiel eine elektrische Kopplung juxtaglomerulärer Zellen der Maus auf, da trotz eines kleinen Durchmessers dieser Zellen (5 bis 10  $\mu\text{M}$ ) relativ große kapazitive Ströme auftraten (10-20 pF). Biologische Membranen wirken wie ein elektrischer Kondensator und haben eine Kapazität von 1  $\mu\text{F}$  pro 1  $\text{cm}^2$  Fläche (Hille, 1992, Seite 13)

In 4 von 5 der für die vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente nehmen die kapazitiven Ströme durch NPPB so stark ab, dass kein sinnvoller Fit der Stromkurve mehr möglich ist. Im verbleibenden Experiment zeigt sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der kapazitiven Ströme (Siehe Abb. 46).

Die Kurve der kapazitiven Ströme unter NPPB kann nicht sinnvoll gefittet werden, da möglicherweise nur noch der kapazitive Strom für die Zelle appliziert werden muß, auf die die Pipette aufgesetzt ist. Diese Kapazität hat eine so kurze Zeitkonstante, dass sie aufgrund der niedrigen Samplerate (1000 Hz) in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten nicht erfasst wurde. Das ergibt sich aus folgender Berechnung:

Die Zeitkonstante ( $\tau$ ) für die Entladung einer einzelnen 10  $\mu\text{m}$  großen Zelle mit einer Zelloberfläche von ca. 314  $\mu\text{m}^2$  und einer Membrankapazität (C) von ca. 3,14 pF läßt sich nach der Formel  $\tau = C \cdot R$  ausrechnen, wenn man einen Entladewiderstand (Whole cell Widerstand, R) von 12  $\text{M}\Omega$  annimmt (Siehe Kapitel 2.2.4). Die Zeitkonstante beträgt ca. 36  $\mu\text{s}$ . Da nach der Dauer von 5 Zeitkonstanten ein Kondensator nahezu vollständig entladen ist (97% Entladung), sollte der Entladevorgang einer Einzelzelle nur ca. 0,15 ms dauern. Er ist also mit einer Samplerate von 1000 Hz, d. h. 1 Wert pro Millisekunde, nicht zu erfassen.

Cruickshank et al. (Cruickshank et al., 2003) konnten auch eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration in isolierten glatten Muskelzellen der Lungenarterie durch NPPB (10  $\mu\text{M}$ ) nachweisen. Die hier vorgestellten Leitwertveränderungen können keinen Hinweis auf eine mögliche Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) durch NPPB geben, da eine damit verbundenen Leitwertzunahme durch die starke Leitwertabnahme durch das Schließen von gap junction überlagert wird.

#### 4.4.2 Die Wirkung der Chloridkanalblocker auf die ANGII induzierte Depolarisation

DIDS:

In den ersten Experimenten dieser Reihe wurde ANGII und DIDS gleichzeitig appliziert. Bei gleichzeitiger Applikation war die depolarisierende Wirkung von ANGII nahezu vollständig aufgehoben (Ergebnisse nicht gezeigt) und es wurde vermutet, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII hauptsächlich auf einer Aktivierung von Chloridkanälen beruht. DIDS (und DIDS + ANGII) bewirkte sogar eine irreversible Hyperpolarisation.

Da die Wirkung von DIDS auf das Membranpotenzial und den Membranleitwert irreversibel ist, d.h., nach dem Auswaschen der Substanz aus dem Perfusionsbad weiter besteht, wurde ANGII in weiteren Experimenten nach dem Auswaschen von DIDS appliziert. Die depolarisierende Wirkung von ANGII ist dann vorhanden (Siehe Abb. 36).

Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass nicht die irreversiblen Membranpotenzial- und Leitwertveränderungen durch DIDS die depolarisierende Wirkung von ANGII aufhebt, sondern DIDS mit ANGII direkt reagiert. Dafür kommt eine Reaktion der Phenylisothiocyanatgruppe von DIDS mit der N-terminalen Aminogruppe des ANGII (wie beim Edman-Abbau) und/oder der Guanidinogruppe des Arginins in Position 2 des ANGII in Frage.

Weshalb aber die irreversiblen Leitwertveränderungen durch DIDS die depolarisierende Wirkung von ANGII nicht vermindert, bedarf weiterer Untersuchungen. Mögliche Ursachen sind:

- DIDS ist unter den verwendeten Chloridkanalblockern der „unselektivste“. Es ist möglich, dass der Block von  $Cl_{Ca}$ -Kanälen durch DIDS nicht ausreicht, um die Aktivierung dieser Kanäle durch einen ANGII induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu verhindern.

- Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass DIDS neben einer Leitwertverminderung auch zu einer Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -130 und -70 mV führt. Dieser Effekt könnte die Wirkung von ANGII begünstigen.

- DIDS ist kein aktiver Blocker, sondern erhöht nur die Geschlossenwahrscheinlichkeit eines geschlossenen Chloridkanals: In Ruhe gehen Chloridkanäle permanent vom geschlossenen in den offenen Zustand über und umgekehrt. Die Applikation von DIDS führt zu einer Hyperpolarisation, dadurch dass ein geschlossener Kanal im geschlossenen Zustand gehalten wird. Der Ausstrom von Chloridionen wird verhindert, die Zelle nähert sich

dem Kaliumgleichgewichtspotenzial und hyperpolarisiert. Die Applikation von ANGII öffnet nun, trotz des Blocks durch DIDS, eben diese Chloridkanäle. Die Zelle depolarisiert. Nach dem Auswaschen von ANGII erhöht sich die Geschlossenwahrscheinlichkeit der Chloridkanäle und DIDS kann diese weiter erhöhen.

#### NFA:

In den hier vorgestellten Experimenten zeigt sich, dass 100  $\mu\text{M}$  NFA die depolarisierende Wirkung von 3 nM ANGII signifikant vermindert. Die Leitwertzunahme durch ANGII im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV tritt unter NFA nicht mehr auf. Diese Ergebnisse geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanäle an der Wirkung von ANGII auf reninsezernierende Zellen beteiligt sind.

Eine Reaktion von ANGII mit NFA, die zu einer kovalenten Bindung wie bei DIDS führt, ist wenig wahrscheinlich, da weder die Carboxylgruppe, das sekundäre Amin noch die Trifluormethylgruppe des NFA spontan mit Peptiden reagiert.

Erstaunlicherweise ist auch die Leitwertverminderung durch ANGII im Klemmbereich zwischen -130 und -50 mV unter NFA nicht mehr signifikant.

Mögliche Interpretationen sind:

- Trotz der n-Zahl von 6 wurde durch die Streubreite der Einzelexperimente kein ausreichendes Signifikanzniveau erreicht, obwohl eine Reduktion des  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Stroms vorlag.
- Für die Inaktivierung von  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanälen durch ANGII ist die Aktivierung von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$  mit nachfolgender Depolarisation essenziell.
- NFA hat eine bisher nicht beschriebene aktivierende Wirkung auf  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle.

#### NPPB:

Aufgrund experimenteller Schwierigkeiten ist nur ein Experiment im Hinblick auf die Wirkung von NPPB auf die depolarisierende Wirkung von ANGII auswertbar. In diesem Experiment zeigt sich eine deutliche Verminderung der Depolarisation. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanäle an der depolarisierenden Wirkung von ANGII beteiligt sind. Die verbleibende leichte Depolarisation kann durch einen Block von  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanälen durch ANGII erfolgt sein.

Eine Reaktion von ANGII mit NPPB ist wenig wahrscheinlich, da weder die Carboxyl-

gruppe noch das sekundäre Amin des NPPB spontan mit Peptiden reagiert. Die mit diesem Effekt einhergehenden Leitwertveränderungen lassen sich nicht isolieren, da sie von der starken Leitwertverminderung durch das Schließen der gap junctions überlagert werden.

#### 4.5 Berechnung der Zellmembranfläche aus den kapazitiven Strömen

Biologische Membranen haben elektrische Eigenschaften wie ein Plattenkondensator (Abb. 15). Die Kapazität eines solchen biologischen Kondensators hängt dabei hauptsächlich von der Membranfläche ab.

Die Kondensator(ent-)ladungskurve für RSZ kann über zwei Komponenten gefittet werden. Aus den Werten der daraus erhaltenen Zeitkonstanten, den Werten für die Klemmspannungsdifferenzen ( $\Delta U$ ) und dem jeweils applizierten Strom ( $I_{C(\text{schnell})}$  und  $I_{C(\text{langsam})}$ ) kann die elektrische Kapazität ( $C_{\text{ges}}$ ) des Membrankondensators ausgerechnet werden (Siehe auch Abb. 15). Da biologische Membranen von  $1 \text{ cm}^2$  Fläche eine Kapazität von ca.  $1 \text{ }\mu\text{F}$  haben (Hille, 1992, Seite 13), läßt sich aus der elektrischen Kapazität die Membranfläche ausrechnen (Siehe Kapitel 2.2.4).

In den ausgewerteten Experimenten ergeben sich Membranflächen zwischen  $0,02$  und  $0,24 \text{ mm}^2$ . Da diese Streuung der Werte nicht nur durch Messungen an verschiedenen Glomerula auftritt, sondern auch innerhalb der Messungen an einem Glomerulum, ist die Aussagekraft der Werte begrenzt. Auch stimmen die Werte nicht mit denen von Kurtz und Penner an juxtaglomerulären Zellen der Maus gemessenen überein. Sie fanden Kapazitäten von  $10$  bis  $20 \text{ pF}$ , was einer Membranfläche von  $0,001$  bis  $0,002 \text{ mm}^2$  entspricht. Eine einzelne  $10 \text{ }\mu\text{m}$  große kugelförmige Zelle hat eine berechnete Membranoberfläche von  $314 \text{ }\mu\text{m}^2$  ( $= 0,000314 \text{ mm}^2$ , d.h. nur ein Drittel bis ein Sechstel der von Kurtz und Penner gemessenen Membranfläche). Es wird also in jedem Fall deutlich, dass es sich bei RSZ nicht um elektrisch isolierte Einzelzellen handeln kann.

#### 4.6 Wirkung von chloridarmer HEPES-gepufferter Salzlösung (Na-Gluconat-HEPES) und ANGII auf RSZ ( $[K^+]_o=6,5$ mM)

Untersuchungen haben ergeben, dass sich in der Zellmembran von RSZ Chloridkanäle befinden (Kurtz und Penner, 1989). Welchen Stellenwert diese Kanäle bezüglich des Ruhemembranpotenzials und der ANGII induzierten Depolarisation haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Chloridionenkonzentration in RSZ ist im Vergleich zu anderen Zellen hoch ( $E_{Cl}$  beträgt ca. zwischen -30 mV und -20 mV,  $[Cl^-]_o=140$  mM;  $[Cl^-]_i= 50$  mM; Nelson et al., 1997b)

Ein vermuteter Chloridionenausstrom unter Ruhebedingungen sollte sich in chloridarmer Perfusionsbadlösung, d.h., nach Erhöhung des Konzentrationsgradienten für Chloridionen, verstärken. Die Zellen müßten demnach depolarisieren.

Die durchaus signifikanten Ergebnisse lassen sich aufgrund vielseitiger Effekte, die durch den Ersatz von Ionen auftreten, nicht einem spezifischen Effekt zuordnen.

Wirkung von chloridarmer HEPES-gepufferter Salzlösung (Na-Gluconat-HEPES) auf die depolarisierende Wirkung von ANGII

Falls ANGII Chloridkanäle öffnet, sollte die depolarisierende Wirkung von ANGII in chloridarmem Puffer stärker sein.

Die signifikant schwächer depolarisierende Wirkung von ANGII in chloridarmer Perfusionspufferlösung lässt sich aufgrund vielseitiger, interagierender Effekte, die durch den Ersatz von Ionen auftreten, nicht einer spezifischen Wirkung zuordnen.



#### **4.7 Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-Cl-HEPES) und ANGII auf RSZ ( $[K^+]_o=6,5$ mM)**

Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-Cl-HEPES) auf das Ruhemembranpotenzial und den Ruheleitwert

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Potenzial und Leitwertänderungen durch die Applikation von natriumfreier Perfusionsbadlösung. Die erhofften ionenkanalspezifischen Effekte lassen sich durch Ionenersatzexperimente in diesem komplexen System nicht erzielen, da sie sich von einer Interaktion mit ionenspezifischen Transportern und unspezifischen Effekten nicht trennen lassen. Dass diese starken Veränderungen der extrazellulären Natriumkonzentrationen jedoch wenig Auswirkungen auf das Membranpotenzial haben, lässt die Vermutung zu, dass Natriumionen am Ruhemembranpotenzial eine untergeordnete Rolle spielen. Weshalb sich allerdings kein signifikanter Effekt durch den Ersatz von Natriumionen auf den Na-Ca-Austauscher und den damit verbundenen Auswirkungen auf  $[Ca^{2+}]_i$  zeigt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Wirkung von natriumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung (NMDG-Cl-HEPES) auf die depolarisierende Wirkung von ANGII

Weshalb die depolarisierende Wirkung von ANGII in natriumfreier Perfusionsbadlösung abgeschwächt ist, lässt sich aufgrund der vielen Effekte, die durch den Ersatz von Ionen auftreten, nicht mit Sicherheit einer spezifischen Wirkung zuordnen.

#### 4.8 Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung und ANGII auf RSZ ( $[K^+]_o=2,8$ mM)

Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung auf das Ruhemembranpotenzial und den Ruheleitwert

Die hier vorbestellten Ergebnisse zeigen, dass RSZ in calciumfreier Perfusionsbadlösung von  $-64,9 \pm 2,0$  mV auf  $-57,9 \pm 0,9$  mV depolarisieren. Diese Depolarisation tritt nicht unmittelbar und gleichförmig nach der Applikation der calciumfreien Lösung ein, sondern in unregelmäßig Abständen zum Beginn der Applikation und in kurzen unspezifischen teilweise reversiblen „Spikes“. Diese Depolarisationsspiques sind daher eher nicht auf eine spezifische Wirkung an Ionenkanälen zurückzuführen, sondern auf einen unspezifischen Leckstrom am Seal.

Wirkung von calciumfreier HEPES-gepufferter Salzlösung auf die depolarisierende Wirkung von ANGII

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine signifikante Verminderung der depolarisierenden Wirkung bei der 10 minütigen Applikation von ANGII (1 nM) in calciumfreier Perfusionsbadlösung. Bei der Applikation von 3 nM ANGII für 2 Minuten zeigt sich diese Verminderung erst bei der zweiten Applikation. Diese Ergebnisse zeigen, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängt, dass aber die intrazelluläre Calciumfreisetzung durch ANGII bei einmaliger Applikation ausreicht, um die depolarisierende Wirkung von ANGII zu vermitteln. Wenn die intrazellulären Calciumspeicher erschöpft sind, ist die depolarisierende Wirkung von ANGII signifikant vermindert. Das zeigt sich auch bei der 10 minütigen Applikation von ANGII, bei der in 4 von 5 Experimenten die Zellen nach anfänglicher Depolarisation trotz der Präsenz des Agonisten repolarisieren.

Das zeigt, dass eine intrazellulär hohe Calciumkonzentration für die depolarisierende Wirkung von ANGII, vermutlich über eine Aktivierung von  $Cl_{Ca}$ -Kanäle eine wichtige Rolle spielt.

#### 4.9 Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die Reninsekretion

Patch Clamp-Experimente und Messungen der Reninsekretionsrate sind am selben Präparat nur bedingt durchführbar. Die Ergebnisse aus den für die vorliegende Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Messungen an afferenten Arteriolen vereinzelter Glomerula sollen daher mit Reninsekretionsmessungen, die an isolierten perfundierten Nieren durchgeführt wurden, verglichen werden. An isolierten Rattennieren lässt sich die Reninsekretionsrate zuverlässig bestimmen. Da es aber nicht auszuschließen ist, dass sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der RSZ in isolierten perfundierten Nieren von denen in vereinzelter Glomerula unterscheiden, ist der Vergleich vorsichtig zu interpretieren.

Der Vergleich soll zeigen, dass eine Steigerung der Reninsekretionsrate mit einer Hyperpolarisation und eine Verminderung der Reninsekretionsrate mit einer Depolarisation einhergeht:

a) Die Depolarisation RSZ durch Kaliumkanalblocker geht mit einer Verminderung der Reninsekretion einher:

Kurtz et al. (Kurtz et al., 2000) berichten, dass die durch Isoprenalin (10 nM) stimulierte Reninsekretion durch Barium (100  $\mu$ M) vermindert wird. Ein Cocktail aus 3 Kaliumkanalblockern (1 mM 4 AP, 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub>, 2 mM TEA) verminderte die durch Isoproterenol (10 nM) stimulierte Reninsekretionsrate auch dann, wenn L-Typ Calciumkanäle durch Amlodipin (5  $\mu$ M) geblockt wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen eine wichtige Rolle bezüglich der Vasokonstriktion in afferenten Arteriolen spielen, nicht jedoch im Hinblick auf die Reninsekretion.

b) Kaliumkanalblocker und ANGII haben einen additiven Effekt sowohl bezüglich der Depolarisation als auch bezüglich der Reninsekretionshemmung:

In weiteren Experimenten konnten Kurtz et al. (Kurtz et al., 2000) zeigen, dass der Kaliumkanalblockercocktail einen additiven Effekt mit ANGII (300 pM) auf die Inhibition der Isoproterenol stimulierten Reninsekretion zeigt.

Die Ergebnisse der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente zeigen einen additiven depolarisierenden Effekt von Barium (1 mM) und ANGII (10 nM) auf das Membranpotenzial.

c)  $K_{ATP}$ -Kanalöffner hyperpolarisieren RSZ und steigern die Reninfreisetzung:

Eine Hyperpolarisation RSZ mit  $K_{ATP}$ -Kanalöffnern bewirkt eine Steigerung der Reninsekretion (Osswald und Quast, 1995). Diese Hyperpolarisation wurde auch für afferente Arteriolen an isolierten Glomerula der Ratte nachgewiesen. Die  $[Ca^{2+}]_i$  änderte sich dabei nicht (Russ et al., 1999). Ferrier et al. (Ferrier et al., 1989) konnten mit dem  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Cromakalim eine Stimulation der Reninsekretion in gesunden Probanden und an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte nachweisen, was von Jensen et al. (Jensen et al., 1998) und Vallon et al. (Vallon et al., 1998) bestätigt wurde. Umgekehrt hemmt Glibenclamid, der klassische Hemmstoff dieser Kanäle, die Reninsekretion in vivo (Richer et al., 1990; Pratz et al., 1991). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Reninsekretionsrate möglicherweise weniger von der intrazelluläre Calciumkonzentration als direkt vom Membranpotenzial abhängt.

d)  $Cl_{Ca}$ -Kanal-blockende Substanzen hyperpolarisieren RSZ und steigern die Reninfreisetzung:

Nifluminsäure (300  $\mu$ M) verdrei- bis vervierfacht die basale Reninsekretion an isolierten perfundierten Rattennieren (Nabel et al., 1999). Zudem vermindert Nifluminsäure die ANGII induzierte Inhibition der Reninsekretion. Auch DIDS (0,5 mM) führt zu einer Steigerung der Reninsekretionsrate (Jensen und Skøtt, 1996). Sowohl NFA (100  $\mu$ M) als auch DIDS (0,5 mM) als auch die dritte für die Experimente der vorliegenden Arbeit verwendete  $Cl_{Ca}$ -Kanal-blockende Substanz NPPB führt zu einer Hyperpolarisation der Zellen. Allerdings führt die Applikation jeder der drei Substanzen auch zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Cruickshank et al., 2003).

e) Erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen depolarisieren RSZ und vermindern die Reninfreisetzung:

Die Depolarisation RSZ mit Kalium bewirkt eine Hemmung der Reninsekretion, wie in der

isoliert perfundierten Rattenniere, an Nierenschnitten sowie an isolierten Rattenglomerula gezeigt werden konnte (Übersicht Churchill, 1995).

Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zu einer Depolarisation RSZ. Es sei angemerkt, dass eine Verminderung der extrazelluläre Kaliumkonzentration von 2,8 mM auf 1 mM in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten zu einer kleinen, aber signifikanten Depolarisation führt.

f) ANGII depolarisiert RSZ und vermindert die Reninfreisetzung:

Schweda und Kurtz (Schweda und Kurtz, 2004) konnten an isolierten perfundierten Rattennieren zeigen, dass zwar der ANGII (1 nM) induzierte Abfall des Perfusionsflusses durch den L-Typ Calciumkanalblocker Amlodipin (5  $\mu$ M) verhindert werden konnte, nicht jedoch die ANGII (1 nM) induzierte Reduktion der durch Isoproterenol (10 nM) stimulierten Reninsekretionsrate. Die Experimente, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, zeigen eine deutliche Depolarisation RSZ. Es zeigt sich, dass ANGII die Reninsekretion vermindert, auch wenn L-Typ Calciumkanäle blockiert sind.

Im Widerspruch dazu, dass die Reninsekretion direkt vom Membranpotenzial abhängt, könnten die Ergebnisse der Experimente stehen, die eine Depolarisation RSZ durch eine extrazelluläre Calciumkonzentration von 0 mM zeigen. Eine Verminderung der extrazellulären Calciumkonzentration führt nämlich zu einer Verminderung der intrazellulären Calciumkonzentration (Rauch, 2000), was die Reninsekretion steigert (Calcium-Paradox). Da aber diese Depolarisation mit einer unspezifischen Erhöhung des Membranleitwerts einhergeht, ist sie vermutlich nicht auf eine direkte Wirkung auf Ionenkanäle in der Membran zurückzuführen als vielmehr auf eine Erhöhung der Leckströme.

Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Messergebnissen zur Reninsekretion anderer Arbeitsgruppen liefert starke Hinweise darauf, dass das Membranpotenzial entscheidend für die Sekretionsrate reninsezernierender Zellen ist. Die intrazelluläre Calciumkonzentration, die in vielen anderen sekretorisch aktiven Zellen die Sekretionsrate bestimmt, ist eher als sekundärer Regulator anzusehen. Dieser Zusammenhang erklärt möglicherweise das Calcium-Paradox.

## 5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) ist ein in sich rückgekoppeltes Hormonsystem zur Aufrechterhaltung und Regulation von Plasmavolumen, Plasmaosmolarität und Blutdruck. Die Aspartylprotease Renin wird in reninsezernierenden Zellen (RSZ) der Vasa afferentia der Nieren gebildet, gespeichert und freigesetzt. Die Freisetzung von Renin ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion im RAAS. Die Sekretion wird gesteuert durch den Sympathikus, durch den Blutdruck in den Vasa afferentia, durch die NaCl-Konzentration an der Macula densa und durch zirkulierende Hormone, insbesondere Angiotensin II (ANGII). Diese Faktoren verändern sowohl die Konzentration intrazellulärer Signalstoffe wie Calcium und cAMP, als auch die electrophysiologischen Eigenschaften der RSZ wie den Membranleitwert und das Membranpotenzial.

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Glomerula der Rattenniere mit anhängender afferenter Arteriole zu current- und voltage-clamp Experimenten in Ganzzellkonfiguration (whole-cell) verwendet.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Membranleitwert und das Membranpotenzial der Zellen unter Standardbedingungen mit Werten verglichen, die sich ergaben nach

- der Modifikation der extrazellulären Kaliumkonzentration,
- der Applikation von Barium als Kaliumkanalblocker und
- der Applikation von DIDS, NFA und NPPB als Chloridkanalblocker.

Aus diesem Vergleich ließen sich Schlüsse auf die electrophysiologischen Eigenschaften reninsezernierender Zellen unter Ruhebedingungen ziehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von ANGI auf RSZ untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Experimente auch bei gleichzeitiger Applikation von ANGI in verschiedenen Konzentrationen (1; 3 und 10 nM) durchgeführt.

### 1. Teil: RSZ unter Standardbedingungen

Die Experimente zeigen, dass RSZ unter Standardbedingungen und bei dieser Präparation ein Ruhemembranpotenzial von -64 mV haben. Ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 10 mM und höher führt zu einer Leitwertzunahme und Depolarisation der Zellen gemäß dem Nernstpotenzial. Das zeigt, dass die Kaliumleitfähigkeit der

Zellmembran überwiegt. Die Applikation von 1 mM Barium, einem Blocker für Kaliumkanäle vom einwärtsrektifizierenden Typ ( $K_{ir}$ ), führt zur Leitwertabnahme im Klemmbereich negativ von -50 mV und zur Depolarisation.  $K_{ir}$ -Kanäle haben demnach eine entscheidende Rolle für das Ruhemembranpotenzial.

Da aber eine hypothetische Zelle, deren Membran ausschließlich für Kaliumionen permeabel ist, ein Nernstpotenzial von -104,9 mV einstellen sollte, müssen RSZ noch andere, depolarisierende Leitfähigkeiten haben.

Wird die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf 142 mM erhöht, was der intrazellulären Kaliumkonzentration entspricht, dann wird auch nicht das Nernstpotenzial von 0 mV erreicht, sondern es stellt sich ein Potenzial von -6,3 mV ein. Auch in diesen Experimenten zeigt sich, dass die Zellmembran nicht nur für Kalium permeabel ist, sondern dass es noch eine andere, hyperpolarisierende Leitfähigkeit gibt. Diesen Leitfähigkeiten liegen wahrscheinlich in beiden Fällen calciumabhängige Chloridkanäle ( $Cl_{Ca}$ ) zugrunde. Dass die Chloridleitfähigkeit im ersten Fall depolarisierende im zweiten hyperpolarisierende Wirkung hat, liegt daran, dass das Nernstpotenzial für Chlorid in RSZ bei ca. -30 bis -20 mV liegt ( $[Cl^-]_o=140$  mM;  $[Cl^-]_i \approx 50$  mM;).

In weiteren Experimenten wurden Chloridkanalblocker (DIDS, NFA und NPPB) eingesetzt. Die Bedeutung der Chloridkanäle für das Ruhemembranpotenzial zeigt sich am deutlichsten daran, dass alle drei verwendeten Chloridkanalblocker zu einer Hyperpolarisation und einer Abnahme des Leitwertes im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV führen. Dass wahrscheinlich dem  $Cl_{Ca}$  eine Bedeutung für das Ruhemembranpotenzial zukommt, lässt sich aus der deutlichen Hyperpolarisation und der Leitwertverminderung durch NFA ablesen, das ein potenter und relativ selektiver Blocker für  $Cl_{Ca}$  ist. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung muss Gegenstand weiterer Experimente sein.

## 2. Teil: Stimulation RSZ durch Angiotensin II (ANGII)

ANGII (1; 3 und 10 nM) führt zu einer konzentrationsabhängigen Depolarisation RSZ (auf -51,4 mV; -36,6 mV und -31,7 mV) und einer Leitwertverminderung im Klemmbereich negativ von -30 mV. Die depolarisierende Wirkung von ANGI (3 nM) ist stärker als die von Barium (1 mM), obwohl die Einwärtsströme durch ANGI weniger stark vermindert werden. ANGI reduziert also vornehmlich die Kaliumauswärtsströme, die für das

Membranpotenzial entscheidend sind, möglicherweise durch eine G-Protein vermittelte Verstärkung der Wirkung intrazellulärer Polyamine wie Spermin oder durch den Abbau von  $\text{PIP}_2$ .

ANGII führt aber auch zu einer Leitwertzunahme im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV. Die vorliegende Arbeit gibt deutliche Hinweise darauf, dass dieser Leitwertzunahme  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanäle zugrunde liegen, die durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration im Rahmen der ANGII-Depolarisation aktiviert werden könnten. Deutlich wird dies in Experimenten, die mit 142 mM  $[\text{K}^+]_o$  durchgeführt wurden, in denen ANGII zu einer Hyperpolarisation der Zellen führt. Trotz der schon erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration durch die Depolarisation durch 142 mM  $[\text{K}^+]_o$  und dadurch aktivierten L-Typ Calciumkanälen (spannungsaktivierten Calciumkanälen), kommt es zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch 10 nM ANGII. Diese zusätzliche Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  könnte die Offenwahrscheinlichkeit von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$  erhöhen, was das Membranpotenzial in Richtung  $E_{\text{Cl}}$  verschiebt. Es kommt also unter diesen Bedingungen zu einem Chloridioneneinstrom durch  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ . Diese Hypothese wird untermauert durch die Tatsache, dass die Hyperpolarisation mit einer signifikanten Leitwerterhöhung im Klemmbereich zwischen -50 und +10 mV einhergeht.

Die Bedeutung von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanälen für die depolarisierende Wirkung von ANGII zeigt sich dadurch, dass 100  $\mu\text{M}$  NFA die depolarisierende Wirkung von 3 nM ANGII signifikant vermindert. Die Leitwertzunahme durch ANGII im Klemmbereich zwischen -30 und -10 mV tritt unter NFA nicht mehr auf. Diese Ergebnisse geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass eine Aktivierung von  $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ -Kanälen an der depolarisierenden Wirkung von ANGII auf reninsezernierende Zellen beteiligt ist.

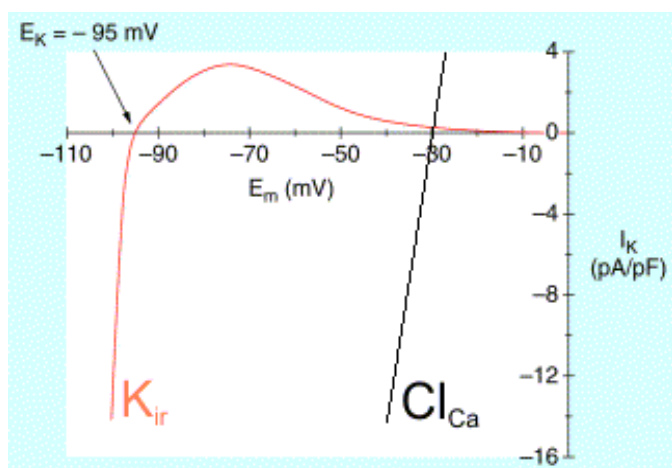
Ein weiterer Hinweis dafür ist, dass die Wirkung von ANGII in calciumfreier Perfusionspufferlösung abgeschwächt ist. Dieser Effekt tritt aber erst bei der zweiten Applikation von ANGII am selben Präparat auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die depolarisierende Wirkung von ANGII von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängt, dass aber die intrazelluläre Calciumfreisetzung durch ANGII bei einmaliger Applikation ausreicht, um die depolarisierende Wirkung von ANGII zu vermitteln. Wenn die intrazellulären Calciumspeicher erschöpft sind, ist die depolarisierende Wirkung von ANGII in calciumfreier Perfusionspufferlösung signifikant vermindert. Das zeigt sich auch bei längerer Applikation



von ANGII in calciumfreier Perfusionspufferlösung. In diesen Experimenten repolarisieren die Zellen noch während der Applikation von ANGII.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in reninsezernierende Zellen in Ruhe die Kaliumleitfähigkeit durch  $K_{ir}$  Kanäle überwiegt, zugleich aber calciumabhängige Chloridkanäle ( $Cl_{Ca}$ ) bei der Einstellung des Ruhemembranpotenzials beteiligt sind.

Die depolarisierende Wirkung von ANGII kommt dadurch zu Stande, dass ANGII die Hauptleitfähigkeit RSZ von einer auswärtsgerichteten, hyperpolarisierenden Kaliumleitfähigkeit zugunsten der depolarisierenden Chloridleitfähigkeit verschiebt. Es stellt sich ein Membranpotenzial ein, dass nahezu dem Nernstpotenzial für Chloridionen entspricht (Abb. 57).



**Abb. 57:** Strom-Spannungskurve des  $K_{ir}$  und des  $Cl_{Ca}$  bei physiologischen Kaliumkonzentrationen (nach)

## 6 Referenzen

Aickin CC und Brading AF (1985) Advances in the understanding of transmembrane ionic gradients and permeabilities in smooth muscle obtained by using ion-selective micro-electrodes. *Experientia* **41**:879-887.

Bell PD, Lapointe JY und Peti-Peterdi J (2003) Macula densa cell signaling. *Annu Rev Physiol* **65**:481-500.

Bührle CP, Nobiling R, Mannek E, Schneider D, Hackenthal E und Taugner R (1984) The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**:S383-S393.

Bührle CP, Scholz H, Hackenthal E, Nobiling R und Taugner R (1986) Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol Cell Endocrin* **45**:37-47.

Cantin M, Araujo-Nascimento M-F, Benchimol S und Desormeaux Y (1977) Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol* **87**:581-602.

Chatziantoniou C, Dussaule JC, Arendshorst WJ und Ardaillou R (1994) Angiotensin II receptors and renin release in rat glomerular afferent arterioles. *Kidney Int* **46**:1570-1573.

Churchill PC (1995) First and second messengers in renin secretion, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Laragh JH und Brenner BM eds) pp 1869-1885, Raven Press, New York.

Churchill PC (1985) Second messengers in renin secretion. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **249**:F175-F184.

Cruickshank SF, Baxter LM und Drummond RM (2003) The Cl<sup>-</sup> channel blocker niflumic acid releases Ca<sup>2+</sup> from an intracellular store in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **140**:1442-1450.

Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T und Logothetis DE (2004) Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* **279**:37271-37281.

Eskandari S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM und Loo DD (2002) Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membrane Biol* **185**:93-102.

Ferrier CP, Kurtz A, Lehner P, Shaw SG, Pusterla C, Saxenhofer H und Weidmann P (1989) Stimulation of renin secretion by potassium-channel activation with cromakalim. *Eur J Clin Pharmacol* **36**:443-447.

Ficker E, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM und Brown AM (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* **266** :1068-1072.

Fisher RA und Yates F (1963) *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, Oliver and Boyd Ltd, Edinburgh.

Fishman MC (1976) Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* **260**:542-544.

Friis UG, Jørgensen F, Andreasen D, Jensen BL und Skøtt O (2003) Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BK<sub>Ca</sub> potassium channels (ZERO variant) and L-type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. *Circ Res* **93**:213-220.

Furukawa T, Virág L, Sawanobori T und Hiraoka M (1993) Stilbene disulfonates block ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Membrane Biol* **136**:289-302.

Goormaghtigh N (1939) Une glande endocrine dans la paroi des arterioles renales. *Bruxelles Med* **19**: p 1541

Hackenthal E, Paul M, Ganten D und Taugner R (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* **70**:1067-1116.

Harrison T., Kasper D., Braunwald E. und Fauci A. (2001) *Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Edition*, McGraw-Hill Professional Publishing, Columbus, OH.

Hille B (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Jensen BL, Gambaryan S, Scholz H und Kurtz A (1998) K<sub>ATP</sub> channels are not essential for pressure-dependent control of renin secretion. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **435**:670-677.

Jensen BL und Skøtt O (1996) Blockade of chloride channels by DIDS stimulates renin release and inhibits contraction of afferent arterioles. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **270**:F718-F727.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F und Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**:503-568.

Jones-Dombi T und Churchill P (1993) The baroreceptor mechanism for controlling renin secretion: effect of calcium channel blockers. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:274-278.

Kakinuma Y, Fogo A, Inagami T und Ichikawa I (1993) Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* **43**:1229-1235.

Klinke R und Silbernagl S (2000) *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme, Stuttgart.

Koushanpour E und Kriz W (1986) *Renal physiology: principles, structure, and function*, Springer-Verlag, New York.

Kurtz A (1989) Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **113**:1-40.

Kurtz A, Hamann M und Götz K (2000) Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **440**:889-895.

Kurtz A und Penner R (1990) Effects of angiotensin II on intracellular calcium and electrical function of mouse renal juxtaglomerular cells. *Kidney Int* **38 Suppl. 30**:S-51-S-54.

Kurtz A und Penner R (1989) Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3423-3427.

Lange U, Gojkovic-Bukarica L, Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U und Ruß U (2003) The stilbene DIDS opens the Kir6.2/SUR2B channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**:R69.

Large WA und Wang Q (1996) Characteristics and physiological role of the Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> conductance in smooth muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **271**:C435-C454.

Laske-Ernst J. (2003) *Einfluss von Botenstoffen auf die freie Calciumkonzentration in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Doktorarbeit

Leichtle A, Rauch U, Albinus M, Benöhr P, Kalbacher H, Mack AF, Veh RW, Quast U und Russ U (2004) Electrophysiological and molecular characterization of the inward rectifier in juxtaglomerular cells from rat kidney. *J Physiol (Lond)* **560**:365-376.

Lopatin AN, Makhina EN und Nichols CG (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**:366-369.

Loutzenhiser K und Loutzenhiser R (2000) Angiotensin II-induced Ca<sup>2+</sup> influx in renal afferent and efferent arterioles: differing roles of voltage-gated and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Circ Res* **87**:551-557.

Loutzenhiser R, Chilton L und Trottier G (1997) Membrane potential measurements in renal afferent and efferent arterioles: actions of angiotensin II. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **273**:F307-F314.

Miyata Y, Muto S, Yanagiba S und Asano Y (2000) Extracellular Cl<sup>-</sup> modulates shrinkage-induced activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rat mesangial cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **278**:C1218-C1229.

Nabel C, Schweda F, Riegger GAJ, Krämer BK und Kurtz A (1999) Chloride channel blockers attenuate the inhibition of renin secretion by angiotensin II. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **438**:694-699.

Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in Enzymology - Ion Channels* **207**:123-131.

Nelson MT, Conway MA, Knot HJ und Brayden JE (1997) Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol (Lond)* **502**:259-264.

Osswald H, Schmitz HJ und Kemper R (1978) Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **303**:95-99.

Osswald H und Quast U (1995) Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells, in *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells* (Scherübl H und Hescheler J eds) pp 301-314, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Pratz J, Mondat S, Montier F und Caverio I (1991) Effects of the K<sup>+</sup> channel activators, RP 52891, cromakalim and diazoxide, on the plasma insulin level, plasma renin activity and blood pressure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **258**:216-222.

Purdy KE und Arendshorst WJ (2001) Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol* **12**:19-28.

Rauch U (2000) *Untersuchungen zu Lokalisation, intrazellulärer Calciumkonzentration, Membranpotential und sekretorischer Aktivität reninsezernierender Zelle in der afferenten Arteriole der Ratte*, Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Doktorarbeit

Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF und Caverio I (1990) Cardiovascular and biological effects of K<sup>+</sup> channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sci* **47**:1693-1705.

Rohács T, Chen J, Prestwich GD und Logothetis DE (1999) Distinct specificities of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* **274** :36065-36072.

Russ U, Rauch U und Quast U (1999) Pharmacological evidence for a K<sub>ATP</sub> channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J Physiol (Lond)* **517**:781-790.

Sakmann B und Neher E (1995) *Single-channel recording*, Plenum Press, New York.

Schweda F und Kurtz A (2004) Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* **181**:383-390.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR und Gomez RA (2001) Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **281**:F345-F356.

Skøtt O (1988) Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am J Physiol (Renal Physiol)* **255**:F1-F10.

Steendahl J, Holstein-Rathlou N-H, Sorensen CM und Salomonsson M (2004) Effects of chloride channel blockers on rat renal vascular responses to angiotensin II and norepinephrine. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **286**:F323-F330.

Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Inoue T, Kanno Y, Ozawa Y, Hayashi K und Saruta T (2002) Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: Actions of angiotensin II. *Kidney Int* **62**:558-565.

Taugner R, Nobiling R, Metz R, Taugner F, Bührle Ch und Hackenthal E (1988) Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res* **252**:687-690.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA und Smith RD (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* **45**:205-251.

Unger T und Schölkens B (2004) *Handbook of Experimental Pharmacology Vol 163/ Angiotensin Vol. I*, Springer, Berlin, Heidelberg.

Vallon V, Albinus M und Blach D (1998) Effect of  $K_{ATP}$  channel blocker U37883A on renal function in experimental diabetes mellitus in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:1215-1221.

Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skøtt O und Briggs JP (1990) Effect of adenosine<sub>1</sub>-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* **85**:1622-1628.

Zanchetti A, Cifkova R, Fagard R und Kjeldsen S (2003) 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* **21**:1011-1053.

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Ulrich Ruß für die Überlassung des Themas, seine Betreuung, die vielen Diskussionen und seine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Ulrich Quast für seine Unterstützung, seinen Ideenreichtum und seine Begeisterungsfähigkeit danken.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Ulf Lange, Herrn Damian Stephan, Herrn Jochen Lichtenberg, Herrn Marc Chmielnicki, Herrn Marcus Winkler und Frau Dr. Julia Laske-Ernst für die Zusammenarbeit im Labor

Ich danke meinen drei Geschwistern, insbesondere Barbara für die grafische Umsetzung der Abbildung 3.

Vielen Dank auch an meine Freundin Janna Fischer, die sich über jedes gelungene Experiment gefreut hat und an meine Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist.

**Lebenslauf**

04.01.1979	Als Sohn von Eva Stehle geb. Pap und Wolfram Stehle in Stuttgart geboren
1985-1989	Besuch der Römerschule, Stuttgart
1989-1998	Besuch des Karls-Gymnasiums Stuttgart und Abitur
1999	Zivildienst am Marienhospital Stuttgart, Pflegebereich
ab 1999	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
2001	Arztliche Vorprüfung, Tübingen
2002	Erstes Staatsexamen, Tübingen Beginn der Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie Abteilung Molekularpharmakologie (Prof. Dr. Quast) der Universität Tübingen bei PD Dr. Ulrich Ruß
17.11.2004	Geburt meines Sohnes Ludwig Leonard in Tübingen
2005	Zweites Staatsexamen, Tübingen
ab 2005	Praktisches Jahr am Klinikum Stuttgart, Wahlfach Pädiatrie
12.05.2006	Drittes Staatsexamen, Stuttgart