

Aus dem Physiologischen Institut
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Ehmke

**Die pH-Wert Regulation in kultivierten MCF-7
Mammakarzinomzellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

Christian Warner
aus Hamburg

Hamburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 04. Januar 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. M. Vonderlage

Koreferent: Prof. Dr. J. R. Schwarz

FÜR STINE

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Der intrazelluläre pH-Wert (pH _i)	1
1.2.	Regulation des pH _i	1
1.3.	Besonderheiten der pH-Regulation in malignen Tumoren	9
1.3.1.	pH _e und pH _i in malignen Tumoren.	9
1.3.2.	pH _i und Apoptose	10
1.4.	Problemstellung	11
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Zellen	13
2.2.	Medien und Lösungen	13
2.3.	Geräte, Materialien und Chemikalien	15
2.3.1.	Geräte	15
2.3.2.	Materialien	16
2.3.3.	Chemikalien	16
2.4.	Kultivierung der Zellen	17
2.5.	Einfrieren und Auftauen	17
2.6.	Herstellen der Präparate	17
2.7.	Dynamische Messung des intrazellulären pH-Werts mit dem Fluoreszenzindikator BCECF an Monolayern aus MCF-7 Zellen	20
2.7.1.	Eichung der Ratiowerte	21
2.8.	Definition des Ruhezustands und „Natriumpropionat-Methode“	23
2.9.	Versuchsaufbau und Methode	23
2.9.1.	Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzindikator BCECF	24
2.9.2.	Messung in stehender und in perfundierter Lösung, methodische Ergebnisse	25
2.10.	Meßvorgang	27

2.10.1.	Zugabe von Substanzen	28
2.11.	Einfluß des osmotischen Drucks auf den pH_i	29
2.12.	Signalaufzeichnung und -auswertung, Berechnungen	30
2.13.	Proliferationszählung	33
2.13.1.	Versuchsaufbau	33
2.13.2.	Zählung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Verhalten des pH_i nach intrazellulärer Ansäuerung	35
3.1.1.	Effekte der pH_i -Senkung auf die Zellkultur	38
3.2.	Untersuchung der V-Typ H^+ -ATPase	39
3.2.1.	Bafilomycin A_1 -induzierte pH_i -Effekte	39
3.2.2.	Hemmung des pH_i -Wiederanstieg durch Bafilomycin A_1	40
3.3.	Untersuchung des Natrium-Wasserstoff-Austauschers	41
3.3.1.	Effekte von EIPA auf den Ruhe pH_i	41
3.3.2.	Hemmung des pH_i -Wiederanstiegs durch Gabe von EIPA	43
3.3.3.	Einfluß von Na^+ -freier PSS auf den Ruhe pH_i	43
3.3.4.	Hemmung des Wiederanstiegs durch Verwendung von Na^+ -freier PSS	45
3.3.5.	Stimulierung des NHE durch Verwendung von kaliumfreier PSS in Ruhe	46
3.3.6.	Stimulierung des Wiederanstiegs durch Verwendung von K^+ -freier PSS	47
3.3.7.	Blockade der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain	48
3.4.	Untersuchung des H^+/Lactat -Symports	50
3.4.1.	Lonidamininduzierte pH_i -Effekte	50
3.4.2.	Hemmung des pH_i -Wiederanstiegs durch Lonidamin	51
3.5.	Hemmung des NHE, des H^+/Lactat -Symports und der V-Typ H^+ -ATPase und Einfluß auf den Wiederanstieg des pH_i	52
3.6.	Einfluß der Temperatur auf die intrazelluläre pH -Regulation	57
3.6.1.	Einfluß auf den Ruhe- pH_i	58

3.7.	Verhalten der Zellen in Sauerstoffarmut	59
3.8.	Stimulation der MCF-7 Zellen mit Noradrenalin	59
3.8.1.	Noradrenalin induzierte pH_i -Änderungen	59
3.8.2.	Stimulierung des Wiederanstiegs durch Noradrenalin	60
3.9.	Stimulation der MCF-7 Zellen mit extrazellulärem ATP	61
3.9.1.	ATP induzierte pH_i -Änderungen	61
3.9.2.	Beschleunigung des Wiederanstiegs durch ATP	62
4.	Diskussion	64
4.1.	Messung des pH_i	64
4.2.	Natriumpropionatmethode zur Bestimmung der Transporteraktivität und Wirkung von Natriumpropionat auf den pH_i , Dosis Wirkungsbeziehung.	65
4.3.	Die Regulation des pH_i	67
4.4.	Einfluß der Temperatur auf den pH_i -Wiederanstieg	70
4.5.	Stimulierung der MCF-7 Zellen durch Noradrenalin	71
4.6.	Stimulierung der MCF-7 Zellen durch extrazelluläres ATP	72
5.	Zusammenfassung	73
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Danksagung	85
8.	Lebenslauf	86
9.	Erklärung	87

Abkürzungen und Definitionen

AIF	apoptosis inducing factor
AM	Azetoxy-Methylester
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAF	Bafilomycin A ₁
BCECF	2,7-Biscarboxyethyl-5,6-carboxyfluorescein
BCECF/AM	2,7-Biscarboxyethyl-5,6-carboxyfluorescein-pentaacetoxymethylester
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	cytosolische Calciumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _e	extrazelluläre Calciumionenkonzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
DIDS	Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate
ΔpH _{ausw}	Änderung des pH im Auswerteintervall
ΔpH _{end}	pH ₀ - pH _{end}
ΔpH _{wa}	Änderung des pH im Zeitraum t _{min} bis t _{end}
Δt _{ausw}	Auswerteintervall = 300 s ab t _{min}
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECR	Extrazellularraum
EIPA	N-ethyl-N-isopropylamilorid
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
[H ⁺] _i	intrazelluläre Protonenkonzentration
[H ⁺] _e	extrazelluläre Protonenkonzentration
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICR	Intrazellularraum
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K _d -Wert	apparente Dissoziationskonstante
LND	Lonidamin
m	Steigung (engl: slope), $m = \Delta\text{pH}_{\text{ausw}} / \Delta t_{\text{ausw}}$

MCT	protonengekoppelter Monocarboxylat Transporter, hier begrifflich mit dem Lactat-/H ⁺ -Symport gleichgesetzt
MDR	Multi Drug Resistance
n	Anzahl der durchgeführten Messungen in Bezug auf einen Versuch
Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	Natrium-/Kalium Adenosintriphosphatase
NHE	Natrium-/Wasserstoff-Austauscher (Na ⁺ -/H ⁺ -Exchanger)
pH	-log[H ⁺]
pH ₀	Ruhe pH vor Zugabe von Natriumpropionat
pH _e	-log[H ⁺] _e (extrazellulärer pH-Wert)
pH _{end}	pH _i zum Zeitpunkt t _{end}
pH _i	-log[H ⁺] _i (intrazellulärer pH-Wert)
pH _{min}	pH-Minimum nach Zugabe von Natriumpropionat
pK-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten eines Elektrolyten
PSS	physiological salt solution (Physiologische Nährlösung)
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
Ruhe-pH _i	intrazellulärer pH-Wert, der bei einer Temperatur von 37°C einem pH _e von 7,38 und dem Fehlen weiterer äußerer Einflüsse über mindestens 20 min stabil ist
t ₀	Zeitpunkt der Zugabe von Natriumpropionat
t _{min}	Zeitpunkt des pH-Minimums nach Ansäuerung mit Natriumpropionat
t _{end}	Ende der Messung

1. Einleitung

1.1. Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i)

Die Aufrechterhaltung des intrazellulären Ionenmilieus und damit auch die Homöostase der zytosolischen H⁺-Ionenkonzentration [H⁺]_i ist für nahezu alle Funktionen der Zelle von größter Bedeutung. Bereits im Jahre 1926 beschrieben NEEDHAM & NEEDHAM die auffallende Konstanz des intrazellulären pH-Wertes (pH_i).

Viele zelluläre Prozesse sind vom pH_i abhängig, so z.B. der Zellstoffwechsel (TANNOCK & ROTIN, 1989), die Ca²⁺-Homöostase (BUSA & NUCCITELLI, 1984), die Zellmotilität und -kontraktilität (BOYETT et al., 1988), Zell-Zell Kontakte (ORCHARD & KENTISH, 1990, TOMINAGA et al., 1998), die Genexpression (ISFORD et al., 1993) und der Zelltod (McCONKEY & ORRENIUS, 1996, THANGARAJU et al., 1999) (s.a. 1.3.2.).

Regulationsmechanismen, die den pH_i konstant halten und eventuelle Schwankungen ausgleichen können, sind daher für die Zelle und damit auch für das Individuum lebensnotwendig.

1.2. Regulation des pH_i

Die Anreicherung von Protonen im Intrazellularraum (ICR) ist auf die folgenden Mechanismen zurückzuführen:

- Durch passiven Einstrom aus dem Extrazellularraum (ECR) aufgrund eines elektrischen Gradienten gelangen Wasserstoffionen in den ICR.
- Als Stoffwechselprodukte werden, abhängig von der Zellaktivität, verschiedene Säuren gebildet.

Der pH_i in den meisten Säugetierzellen liegt im Ruhezustand zwischen 6,9 und 7,0, wobei durch Verwendung von bicarbonatfreien Lösungen in *in vitro*-Expe-

rimenten Werte zwischen 7,1 und 7,4 gemessen werden. Ginge man jedoch von einer Zelle aus, die von einem physiologischen extrazellulären Medium mit einem pH von 7,4 umspült würde und keine aktiven Transportmechanismen besäße, so ergäbe sich nach der Nernst'schen Gleichung (Ruhemembranpotential -80 mV bei 37°C) ein pH_i von 6,09. Zusätzlich wird der ICR, abhängig vom Aktivitätszustand der Zelle, durch entstehende Stoffwechselprodukte angesäuert. Vor allem sind dies CO_2 , Lactat, Salzsäure, Ketosäuren und Schwefelsäure. Auch bei der Hydrolyse von ATP zu ADP entstehen H^+ -Ionen. Beide Gegebenheiten würden einen pH_i herstellen, der mit vielen zellulären Vorgängen, die von pH-sensitiven Enzymen katalysiert werden, nicht vereinbar wäre (PUCÉAT, 1999). Es sind daher Mechanismen erforderlich, die der permanenten Säurebelastung entgegenwirken müssen und die $[\text{H}^+]_i$ reduzieren. Dies sind zum einen Protonenpumpen und zum anderen Protonenaustauschmechanismen, die in der Lage sind, H^+ -Ionen durch aktiven bzw. sekundär aktiven Transport aus dem ICR zu entfernen. Abbildung 1.1. zeigt schematisch die wichtigsten bekannten Regulatorproteine.

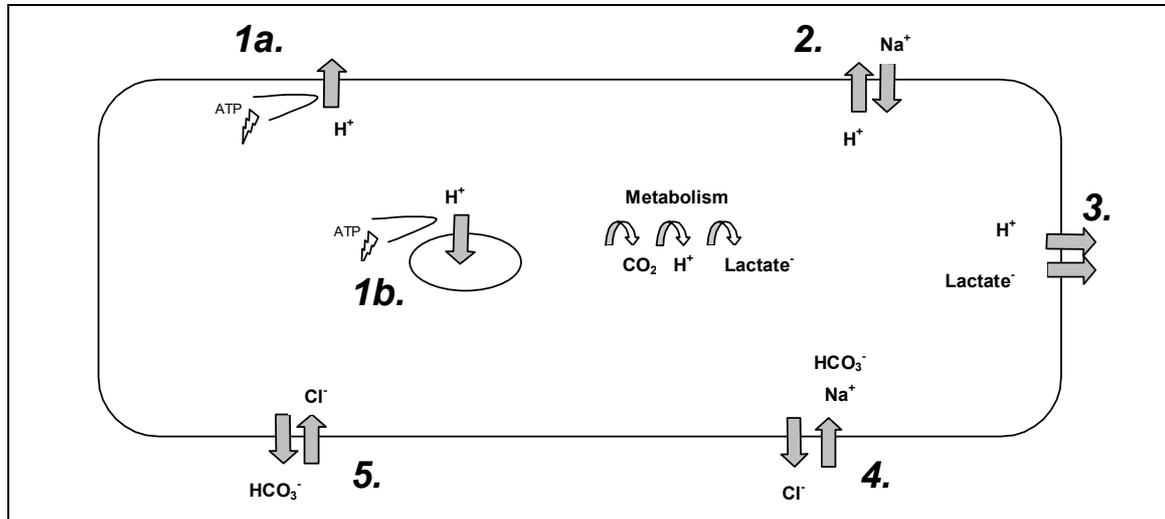


Abbildung 1.1.: Schema der wichtigsten Transportproteine in Zellen der Brustdrüse, die am Säure-/Basenaustausch beteiligt sind. 1a.: P-Typ H^+ -ATPase, zellmembranständig, 1b.: V-Typ- H^+ -ATPase mit Endomembranorganelle (primär aktive Transporter), 2.: Na^+ -/ H^+ -Austauscher, 3.: Lactat-/ H^+ -Symport, 4.: Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, 5.: Na^+ -unabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (sekundär aktive Transporter [modifiziertes Schema von PUCÉAT, 1999])

I. Die Protonenpumpen (H^+ -ATPasen) spielen eine wichtige Rolle in der pH-Regulation der Zelle. Sie zählen zu den aktiven Transportern. Durch Hydrolyse von ATP wird energieabhängig ein Proton aus dem Zytosol heraustransportiert. Es sind bereits mehrere verschiedene H^+ -ATPasen nachgewiesen worden. Neben der in der Magenschleimhaut vorkommenden elektroneutralen $H^+/-K^+$ -ATPase zur Produktion von Salzsäure in den Belegzellen sind weitere H^+ -ATPasen bekannt: 1982 wiesen GLUCK et al. eine Protonenpumpe in Tubuluszellen der Säugerniere nach. Die Beteiligung einer elektrogenen, sogenannten vakuolären (V-Typ)-Protonenpumpe (V-Typ H^+ -ATPase) und einer elektroneutralen, plasmamembranal (P-Typ)-Protonenpumpe (P-Typ $H^+/-K^+$ -ATPase, transportiert ein Proton im Austausch mit einem K^+ -Ion aus der Zelle) an der Regulation des pH_i in zahlreichen Zellen ist inzwischen weitgehend akzeptiert. Die V-Typ H^+ -ATPase wird an Endomembranen exprimiert und trägt zur Ansäuerung von Endovesikeln, Lysosomen und Golgikompartimenten bei (FORGAC, 1989). Da diese Vesikel an Endo- und Exozytose und damit auch am Membranrecycling teilnehmen, findet man in vielen Zellen (z.B. renale Tubuluszellen, Osteoklasten, Makrophagen) auch V-Typ Protonenpumpen an der Zelloberfläche. Auch hier tragen sie zur pH-Homöostase, zum transepithelialen Stofftransport und zur Ansäuerung extrazellulärer Räume bei (BIDANI & BROWN, 1990, MARTÍNEZ-ZAGUILÁN et al, 1993 & 1999). 1998 wurde von KARWATOWSKA-PROKOPCZUK et al. eine wichtige akzessorische Rolle der V-Typ H^+ -ATPasen bei der pH_i -Regulation in neonatalen Cardiomyozyten nachgewiesen. MARTÍNEZ-ZAGUILÁN et al. (1999) entdeckten, daß es in der Plasmamembran therapieresistenter MCF-7 Zellen eine V-Typ H^+ -ATPase gibt, in therapiesensitiven Zellen jedoch nicht und brachten die V-Typ H^+ -ATPase so mit dem Phänomen der Multi Drug Resistance (MDR) in Verbindung.

Die P-Typ $H^+/-K^+$ -ATPase wurde in den Plasmamembranen zahlreicher Zellen gefunden (u.a. Makrophagen [SWALLOW et al., 1990]). In MCF-7 Zellen konnten MARTÍNEZ-ZAGUILÁN et al. (1999) jedoch ein Vorkommen funktionell ausschließen.

Das Makrolidantibiotikum Bafilomycin A_1 (BAF) hemmt konzentrationsabhängig beide ATPasen. Im nanomolaren Konzentrationsbereich hemmt es spezifisch die V-Typ H^+ -ATPase. Im mikromolaren Bereich hingegen ist es ein spezifischer Hemmstoff der P-Typ $H^+/-K^+$ -ATPase (DRÖSE & ALTENDORF, 1997). Ein

weiterer spezifischer Hemmstoff der P-Typ $H^+/-K^+$ -ATPase ist das Schering-28080 (FERNANDEZ et al, 2000).

II. Der $Na^+/-H^+$ -Austauscher (NHE) spielt eine zentrale Rolle in der pH-Wert Regulation der Zelle (GORÉ et al., 1994). Er kommt ubiquitär in praktisch allen Säugetierzellen vor. Das Glycoprotein wurde erstmalig 1976 von MURER et al. in der Niere beschrieben. Das System basiert auf dem steilen Natriumgradienten über der Zellmembran, der durch die $Na^+/-K^+$ -ATPase energieabhängig aufgebaut wird. Der NHE katalysiert den Ausstrom von H^+ -Ionen im Austausch mit Na^+ -Ionen. Es handelt sich also um einen sekundär aktiven Transportmechanismus. Er kann, wie die anderen Regulatorproteine, durch allosterische Modifikation des Moleküls auf eine intrazelluläre Ansäuerung reagieren und vermehrt H^+ -Ionen aus der Zelle ausschleusen. Des Weiteren können eine Vielzahl von Transmittern wie Noradrenalin und ATP Aktivitätsänderungen des NHE bewirken. Sie können ihren Einfluß über unterschiedliche Signalkaskaden ins Zellinnere vermitteln (FRELIN et al., 1988): (a) über das Phosphoinositol (IP_3)-System (ANWER & ATKINSON, 1992) und/oder (b) über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels (MOULE & McGIVAN, 1990) (siehe Bindungsstellen in Abb. 1.2.)

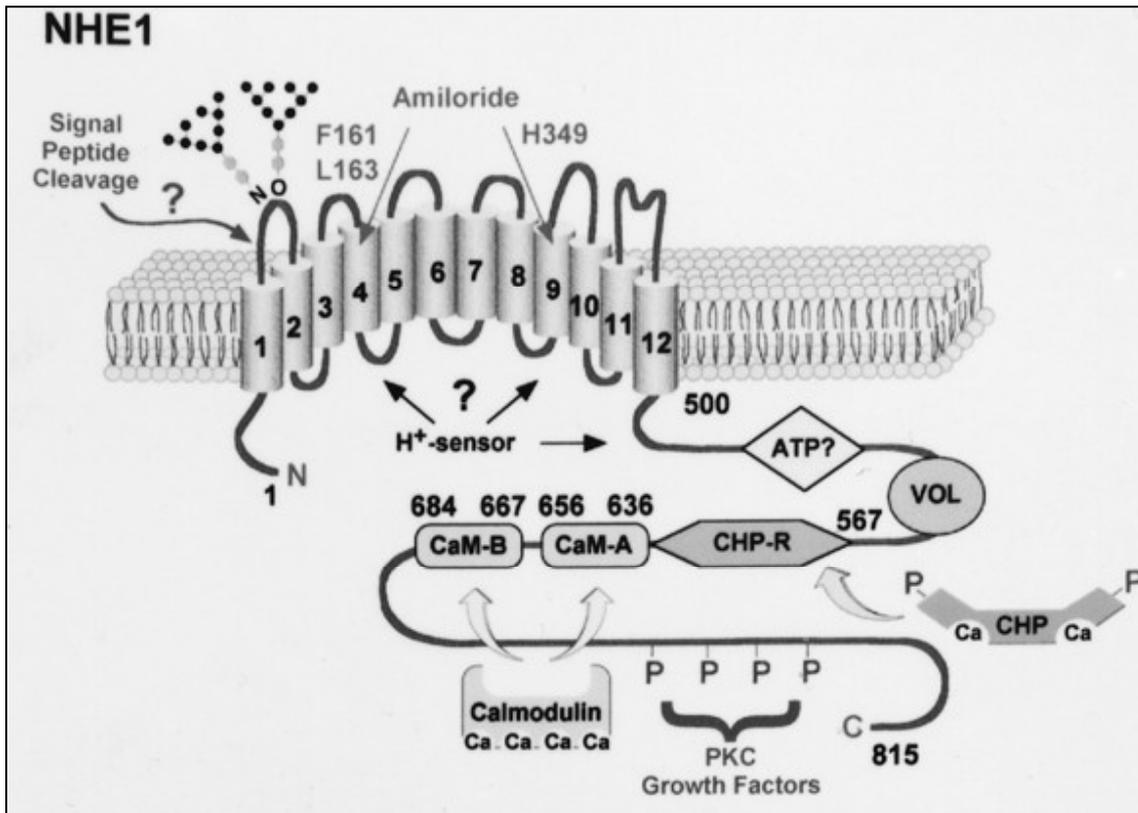


Abbildung 1.2.: Schematisierte Darstellung der NHE-1-Isoform des Na^+/H^+ -Austauschers. N-terminal befinden sich 12 Transmembrandomänen mit den intrazellulären H^+ -Bindungsstellen und den extrazellulären Bindungsstellen für Amilorid. Am C-terminalen Ende befinden sich eine mutmaßliche ATP-sensible Domäne (ATP?), eine volumensensible Domäne (VOL), eine CHP (calcineurin B homologue protein) Bindungsstelle (CHP-R) sowie Bindungsstellen für Ca^{2+} -Calmodulin (CaM-A und -B) und Phosphorylierungsstellen für die Phosphorylierung durch Wachstumsfaktoren und Proteinkinasen (A und C). (Aus: ORLOWSKI & GRINSTEIN, 1997)

Diese Beeinflussungsmöglichkeit ist insofern sinnvoll, als daß eine erhöhte Aktivität der Zelle durch die o.g. Transmitter vermittelt wird und der dadurch anfallenden vermehrten Säurelast gleichzeitig durch die Aktivierung der Transporter effektiver begegnet werden kann.

Inzwischen sind sechs verschiedene Isoformen der NHE-Familie isoliert worden, die sich durch ihre Lokalisation im Körper und v.a. durch ihre Beeinflussbarkeit durch verschiedene Stimulatoren und Inhibitoren unterscheiden (ORLOWSKI & GRINSTEIN, 1997). Hervorgehoben werden kann die Isoform NHE-1, die ubiquitär zu finden ist (DEMAUREX & GRINSTEIN, 1994, HARRIS & FLIEGEL, 1999) und in dieser Arbeit untersucht werden soll. Ein spezifischer Hemmstoff des NHE-1 ist das Amiloridanalogen N-ethyl-N-isopropylamilorid (EIPA).

III. Der Lactat-/H⁺-Symport stammt aus der Familie der protonengekoppelten Monocarboxylat-Transporter (MCT) und ist ein weiterer wichtiger sekundär aktiver Mechanismus der pH_i-Regulation (HALESTRAP & PRICE, 1999, WAHL et al., 2000). WEBB et al. (1999) vermuten in ihm unter aeroben Bedingungen sogar den aktivsten Austauscher für die Regulation des pH_i in Tumorzellen. Es gibt 9 verschiedene Isoformen des MCT, deren individuelle Besonderheiten jedoch noch nicht ausreichend geklärt sind. Er ist offenbar, wie der NHE, fast ubiquitär im Körper vorhanden (ROSENBERG et al., 1993, WANG et al., 1994, BEN-YOSEPH et al., 1998, HALESTRAP & PRICE, 1999). Lactat wird von der Zelle durch anaerobe Glycolyse produziert. Es entsteht also vermehrt in Phasen der Hypoxie der Zelle. Es wird, um Elektroneutralität zu wahren, zusammen mit Protonen aus der Zelle transportiert (SHRODE et al., 1997), so daß jeweils zwei saure Valenzen aus der Zelle transportiert werden. Der ECR wird dadurch angesäuert. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß dem Lactat-/H⁺-Symport auch eine Bedeutung in der Regulation des Zellvolumens zukommt (HAMANN et al., 2000). Das Indazol-3-carboxylsäurederivat Lonidamin, erstmals als antispermatogenes und embryotoxisches Agens vorgestellt, hemmt den Lactat-/H⁺-Symport (BEN-HORIN et al., 1995, MARDOR et al., 2000). Es wird als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie erfolgreich eingesetzt. Abbildung 1.3. zeigt die vermutete Membrantopologie des MCT-1.

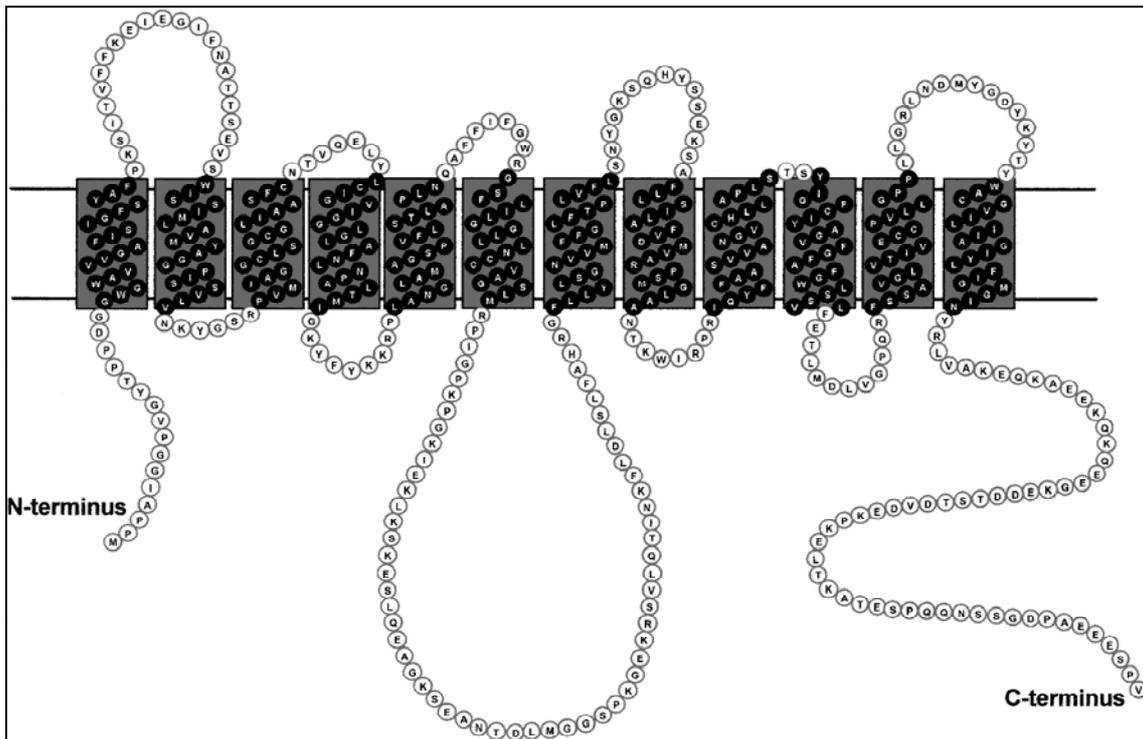


Abbildung 1.3.: Vermutete Membrantopologie und Sequenz des MCT-1 nach HALESTRAP & PRICE (1999)

IV. Die HCO_3^- -abhängigen Transportmechanismen beruhen auf einem Bicarbonat-Transportsystem und der hohen Membranpermeabilität für CO_2 . Auch bei ihnen handelt es sich um sekundär aktive Transporter. Um den intrazellulären pH-Wert nach beiden Seiten stabil halten zu können, exprimieren die meisten Zellen sowohl ansäuernde als auch alkalisierende HCO_3^- -Transporter. Die beiden wichtigsten sind der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und der Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher sorgt für einen Influx von HCO_3^- zusammen mit Na^+ und einen gleichzeitigen Efflux von Cl^- und wirkt damit alkalisierend auf den ICR. Der zweite Transporter säuert den ICR an, indem er HCO_3^- aus der Zelle transportiert und im Austausch Cl^- in die Zelle hinein befördert (VILARIÑO et al., 1998).

Aus der folgenden Gleichung geht hervor, daß sich bei einem Ausstrom von HCO_3^- aus der Zelle das Gleichgewicht nach links verschiebt und H^+ - Ionen in der Zelle angereichert werden. Bei einem Einstrom verschiebt sich das Gleichgewicht nach rechts und die $[\text{H}^+]_i$ sinkt:



Die Reaktion wird in beide Richtungen der Gleichung von dem Enzym Carboanhydrase katalysiert.

Beide o.g. HCO_3^- -Transporter können durch Stilbene-Disulfonat Derivate (z.B. DIDS) inhibiert werden.

V. Eine wichtige Voraussetzung für das Funktionieren der sekundär aktiven Transporter ist das Vorhandensein von aktiv aufrechterhaltenen Na^+ - und K^+ -Gradienten über der Zellmembran. Die Na^+/K^+ -Adenosintriphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) ist der wichtigste aktive Transportmechanismus der Zelle. Durch die Energie aus der Hydrolyse eines Moleküls ATP werden zwei K^+ -Ionen in das Zellinnere hinein und drei Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus transportiert. Die dadurch aufgebauten Na^+ - und K^+ -Gradienten sind der Antrieb für zahlreiche sekundäre Transportmechanismen, die neben pH- und Elektrolythomöostase (s.o.) auch die Konstanz des Zellvolumens sicherstellen und Grundlage für viele zelluläre Aktivitäten sind. Außerdem sorgt die Elektrogenität der Pumpe dafür, daß das Membranpotential um etwa 10 mV negativer wird. Die zentrale Rolle der Na^+/K^+ -ATPase wird deutlich an der Tatsache, daß für sie mehr als ein Drittel des Energieverbrauchs der Zelle aufgewendet wird, in einigen sehr stoffwechselaktiven Zellen sogar bis zu 70% (HODGKIN & KATZ, 1949). Die Na^+/K^+ -ATPase läßt sich durch das Glycosid Ouabain spezifisch hemmen.

Die meisten der o.g. Transporter sind abhängig von den Konzentrationsverhältnissen auch fähig, in die entgegengesetzte Richtung zu transportieren.

Zusätzlich zu den o.g. Proteinen bewirken auch die Puffersysteme des ECR und die Regulationsfunktion der Niere für den Säure-Basen-Haushalt eine Konstanzhaltung des pH_e . Dies verhindert, daß die zellulären Mechanismen überfordert werden. Wichtige Puffersysteme des ECR sind der Proteinpuffer, der Bicarbonatpuffer als offenes System ($\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$, $\text{pK}_a = 6,1$) und der Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, $\text{pK}_a = 6,8$).

1.3. Besonderheiten der pH-Regulation in malignen Tumoren

1.3.1. pH_e und pH_i in malignen Tumoren.

Als Untersuchungsobjekt dienten Kulturen von MCF-7 Mammakarzinomzellen. Das Hauptproblem in der Entwicklung von effektiven und potenten Therapeutika liegt in dem Mangel von klaren und beständigen biologischen und biochemischen Unterschieden zwischen Tumoren und normalen Geweben. Aus diesem Grunde ist es schwierig, Behandlungsstrategien zu entwickeln, die deutliche toxische Effekte auf die malignen Zellen haben, das gesunde Gewebe jedoch nicht oder nur wenig schädigen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen soliden Tumoren und dem umgebenden Normalgewebe besteht in der Versorgung mit Nährstoffen. Die funktionelle Vaskularisierung in Tumoren ist oft nicht ausreichend, um den schnell wachsenden Bedürfnissen der expandierenden Tumorzellpopulation zu entsprechen (TANNOCK & ROTIN, 1989). Dies führt zu einem Mangel an Sauerstoff und anderen Nährstoffen und zu einem vermehrten Anfall von sauren Valenzen, wie z.B. Kohlensäure oder das durch den anaeroben Glucosemetabolismus entstehende Lactat (NEWELL et al., 1993), der durch den mangelhaften Abtransport nicht bewältigt werden kann. Aus diesem Grunde ist das äußere Milieu in einem Tumor im allgemeinen saurer als in gesundem Gewebe (WIKE-HOOLEY et al., 1985, GERWECK & SEETHARAMAN, 1996). Untermuert wird dieses auch durch eine Untersuchung von MARTIN & JAIN (1994), in der nachgewiesen werden konnte, daß der interstitielle pH in Tumoren mit größerer Entfernung zu Blutgefäßen niedriger wird. Durch den O_2 -Mangel gehen zunächst apoptose- und nekrosefähige Zellen zugrunde, so daß sich im hypoxischen Tumoreal ein Kollektiv therapieresistenter Tumorzellen entwickeln kann (VAUPEL et al., 2002).

Obwohl der Verdacht nahe liegt, daß bei einem niedrigen pH_e auch ein niedriger pH_i vorherrscht, konnte dies in einer Vielzahl von Untersuchungen widerlegt werden: In normalem Gewebe liegt der pH_i zwischen 6,9 und 7,0 (pH_i -Werte größer 7,1 werden nur in bicarbonatfreien Medien *in vitro* erreicht) bei einem pH_e von 7,2 bis 7,6. In Tumoren liegt der pH_e zwischen 5,6 und 7,6 (GRIFFITHS, 1991), wobei es abhängig vom Tumortyp eine große Streubreite

gibt. Der pH-Wert in den Tumorzellen ist jedoch im allgemeinen nicht sauer (ROTIN et al., 1989, VAUPEL et al., 1989, BOYER & TANNOCK, 1992). Im Gegenteil ist er oftmals als alkalischer im Vergleich zu normalen Zellen beschrieben worden (STUBBS et al. 1992, GERWECK & SEETHARAMAN, 1996). Dies läßt die Vermutung zu, daß Tumorzellen effizientere Mechanismen haben müssen, Protonen aus ihrem Zytoplasma zu transportieren bzw. bei Bedarf die Herstellung von sauren Stoffwechselendprodukten zu bremsen, als normale Zellen. Aus diesem Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe ergeben sich therapeutische Ansätze. So wäre es denkbar, Therapien auf die Regulationsmechanismen des pH_i abzielen oder den K_d -Wert von Chemotherapeutika dahingehend zu verändern, daß ihr Dissoziationsverhalten optimal an den pH_e und den pH_i in Tumoren angepaßt ist.

1.3.2. pH_i und Apoptose

Der pH_i wird eng mit dem programmierten Zelltod in Verbindung gebracht (FURLONG et al., 1997 & 1998, WOLF & EASTMAN, 1999, MATSUYAMA et al., 2000, RICH et al., 2000). Diskutierte Mechanismen sind die Aktivierung der pH-abhängigen DNase II und konsekutive DNA-Fragmentierung (BARRY & EASTMAN, 1992, BARRY et al., 1993, PEREZ-SALA et al. 1995) sowie die Stimulierung von Cysteinproteasen wie der Interleukin 1 β -Converting-Enzym-like-Protease (FURLONG et al., 1997).

Der programmierte Zelltod oder Apoptose ist ein unentbehrlicher Prozeß in praktisch allen tierischen aber auch pflanzlichen Zellen. Er führt zu morphologischen Veränderungen der Zelle, sie schrumpft, der Kern und das Chromatin kondensieren, die DNA wird fragmentiert. Die Abbauprodukte werden ohne Integritätsverlust der Zellmembran in Membranvesikeln abgeschnürt und von den umliegenden Zellen aufgenommen und verdaut bzw. utilized.

In der Behandlung von malignen Tumoren ist der Zelluntergang durch Apoptose dem durch Nekrose aus verschiedenen Gründen vorzuziehen. Nekrose führt zum Platzen und Ausfließen des Zellinhaltes. Dadurch gelangen u.a. Makromoleküle in den ECR, die eine Entzündungsreaktion induzieren. Dies führt zu

einer zusätzlichen Anstrengung des ohnehin geschwächten Immunsystems onkologischer Patienten. In einer Zelle, die durch Apoptose zugrunde geht, laufen nach einer definierten Initiierung regelhaft intrazelluläre Signalkaskaden ab. Sie führen zum vollständigen Verschwinden der Zelle, ohne daß es zur Entzündungsreaktion oder anderen Spuren durch Zellreste oder Narbenbildung kommt (DECKER, 2000).

Auslöser der Apoptose können sowohl exogen (Wegbleiben von Wachstumsfaktoren, Aktivierung von sog. Todesrezeptoren wie TNF-R1 oder Fas) als auch endogen (p53-vermittelte Apoptoseinduktion aufgrund von irreparablen DNA-Schäden, oxidative Proteinschäden mit Ausschüttung von Caspase-Aktivator Cytochrom C aus den Mitochondrien) sein. Auch Hypoxie löst die Apoptose über den Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials aus, wobei die Freisetzung von Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor) als Vermittler dienen.

1.4. Problemstellung

Die Regulation des pH-Wertes ist in jeder Zelle von herausragender Bedeutung. In malignen Tumoren kommt ihr noch eine weitere Bedeutung als Ansatz für neue Therapien zu.

Der wichtigste aktive Transportmechanismus für die pH-Wertregulation ist die V-Typ H^+ -ATPase. Sie wurde in MCF-7 Zellen bereits nachgewiesen (MARTÍNEZ-ZAGUILÁN et al., 1999), jedoch noch nicht in Verbindung mit den beiden u.g. Transportern.

Ein wichtiger sekundär aktiver Mechanismus zur Regulation des pH_i ist der $Na^+/-H^+$ -Austauscher. Er trägt in unterschiedlichem Maße zur pH-Wertregulation bei und wird durch eine Vielzahl von Faktoren in seiner Aktivität beeinflusst.

Der Lactat/ H^+ -Symport ist der dritte wichtige Transporter für die pH-Homöostase. Auch er zählt zu den sekundär aktiven Transportern.

Außerdem an der pH-Wertregulation beteiligt sind die bicarbonat-abhängigen Transporter. Während REINERTSEN et al. (1988) den Na^+ -abhängigen $Cl^-/-HCO_3^-$ -Austauschers in MCF-7 Zellen nicht nachweisen konnten, fanden

THANGARAJU et al. (1999) eine geringe Aktivität. Da in bicarbonathaltigen Nährlösungen der pH_i jedoch auch über die Diffusion von CO_2 über die Zellmembran reguliert werden kann, ist es nicht möglich, in einer solchen Nährlösung kleine Aktivitätsänderungen der bicarbonat-unabhängigen Transportmechanismen zu erfassen. Die alleinige Untersuchung der bicarbonat-unabhängigen Transportmechanismen wurde deshalb in unseren Experimenten durch die Verwendung einer HEPES-gepufferten, bicarbonatfreien Lösung erreicht (FRELIN et al., 1988).

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe einer Dosis-/Wirkungsbeziehung das Antwortverhalten der Zelle auf unterschiedlich starke intrazelluläre Säurereize zu bestimmen. Um ihren jeweiligen Anteil an der pH-Wertregulation in MCF-7 Zellen zu bestimmen, sollte die V-Typ H^+ -ATPase, der Na^+ -/ H^+ -Austauscher und der Lactat-/ H^+ -Symport nachgewiesen und die Aktivierung bzw. Aktivität dieser Transportproteine nach verschiedenen externen Stimuli wie intrazellulärer Ansäuerung, Temperaturveränderungen, Hypoxie, ATP und Noradrenalin überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

Alle Untersuchungen wurden an der humanen Mamma-Carcinom Zellreihe MCF-7 durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Adenocarcinom epithelialer Herkunft. Die Zellen wurden von Herrn Prof. Hölzel aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.2. Medien und Lösungen

I. Nährmedium

Es wurde ein auf Earle's Salzen basierendes Nährmedium My/Gent mit essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren sowie Natriumhydrogencarbonat, Pyruvat, 2 mM Glutamin, 10% fetalem Kälberserum (FCS) und als Antibiotikum 0,065% Gentamycinsulfat (SIMON et al., 1984) verwendet.

II. Trypsin-/EDTA-Lösung

Na^+Cl^-	137	mmol/l
K^+Cl^-	2,68	mmol/l
$\text{K}^+\text{H}_2^+\text{PO}_4^-$	1,47	mmol/l
$\text{Na}_2^+\text{HPO}_4^-$	8,1	mmol/l
EDTA (Titriplex III)	4,98	mmol/l
Trypsin	3,6	U/mg

III. Ca²⁺-freie Spüllösung

Na ⁺ Cl ⁻	137	mmol/l
K ⁺ Cl ⁻	2,68	mmol/l
K ⁺ H ₂ ⁺ PO ₄ ⁻	1,47	mmol/l
Na ₂ ⁺ HPO ₄ ⁻	8,1	mmol/l
EDTA (Titriplex III)	4,98	mmol/l

IV. Physiologische Salzlösung (PSS – physiological salt solution)

Na ⁺ Cl ⁻	140	mmol/l
K ⁺ Cl ⁻	5	mmol/l
Ca ²⁺ Cl ₂ ⁻	1,5	mmol/l
Mg ²⁺ Cl ₂ ⁻	1,25	mmol/l
Glucose	5	mmol/l
HEPES-Puffer	10	mmol/l
EDTA (Titriplex III)	0,01	mmol/l

V. Na⁺-freie PSS

Verwendet wurde eine PSS, in der das Na⁺ vollständig durch Cholinchlorid ersetzt wurde. Die Osmolarität der Lösung blieb dadurch unbeeinflusst.

VI. K⁺-freie PSS

Verwendet wurde eine PSS, in der das K⁺ vollständig durch Na⁺ ersetzt wurde.

Die verschiedenen Meßlösungen (IV.,V.,VI.) wurden nach der Herstellung 15 min mit 100% O₂ begast und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Vor jeder Messung wurde ein Teil der kalten Lösung im Wasserbad auf 48°C erwärmt und anschließend 30 s mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Der O₂-Partialdruck betrug nach dem Entgasen im Mittel 30 mmHg.

Die PSS wurde bei 20°C auf einen pH-Wert von 7,50 eingestellt, bei Erwärmung auf 37°C ergab sich in der HEPES-gepufferten Lösung ein pH-Wert von 7,35.

In allen verwendeten Lösungen betrug bei 37°C der pH-Wert 7,35

2.3. Geräte, Materialien und Chemikalien

2.3.1. Geräte

Fluoreszenz-Spektrophotometer	F-2000, Hitachi, Japan F-4500, Hitachi, Japan
Computer	- F-2000 : Highscreen 386DX – 33MHz, Vobis, Hamburg - F-4500 : Highscreen 386DX – 50MHz, Vobis, Hamburg - Auswertung/Texte : UMAX 300T, Pentium 166MHz, Atelco, HH/ Intel Celeron 400MHz, Bitfactory, HH
Brutschrank	B5060 EKCO2, Haereus, Hannover
Steril-Werkbank	Lamin Air HB 2448, Haereus, Hannover
Wasserbad	Thermomix 1420, Braun, Melsungen
Magnetrührgerät	Cuv-o-Stir Modell 333, Hellma, Müllheim
pH-Meter	Calimatic 761, Knick,
Analysenwaage	Modell 870, Kern, Albstadt-Ebeling
Osmometer	Knauer, Berlin
Kühlzentrifuge	Sepatec Minifuge T, Haereus Hannover
Perfusor	Braun, Melsungen
Zählkammer	Neubauer, Wilke und Witzel, Hamburg
Zugabespritze	Hamilton 50 µl gastight 1750; 5,1 cm Länge, Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

2.3.2. Materialien

Zellkulturflaschen	Intermed Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten	Modell 3512, Costars, USA
Petrischalen	Intermed Nunc, Roskilde, Dänemark
Cryoröhrchen	Intermed Nunc, Roskilde, Dänemark
Quarzglasküvetten	Schichtdicke 10 mm, Hellma, Müllheim
Deckglashalter	Perkin Elmer L2250008 (modifiziert), Beaconsfield, England
Perfusorspritzen	50 ml, Braun, Melsungen
Perfusorleitungen	schwarz, Länge 1 m, Braun, Melsungen
Dreiwegehähne	blau, Braun, Melsungen

2.3.3. Chemikalien

Noradrenalin (Arterenol [®])	Hoechst AG, Frankfurt a.M.
ATP	Boehringer, Mannheim
Bafilomycin A ₁	Sigma Chemie, Taufkirchen
BCECF	Calbiochem, Frankfurt a.M.
BCECF/AM	Calbiochem, Frankfurt a.M.
Cholinchlorid	Sigma Chemie, Taufkirchen
DiOC	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
EIPA	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Lonidamin	Angelini Ricerche, S. Palomba-Pomezia, Italien, Sigma Chemie, Taufkirchen
Mannitol	Sigma Chemie, Taufkirchen
N-Methyl-D-Glucamin	Sigma Chemie, Taufkirchen
Natriumpropionat	Sigma Chemie, Taufkirchen
Nigericin	Sigma Chemie, Taufkirchen
Ouabain	Sigma Chemie, Taufkirchen

2.4. Kultivierung der Zellen

Zum Ansetzen einer Zellgeneration wurden 2 ml einer Zellsuspension zusammen mit 20 ml Nährmedium in eine Kulturflasche gegeben, so daß eine Zellkonzentration von 10^4 /ml entstand. Die Flaschen wurden bei 37°C in einer 95% Luft-/5% CO₂-Atmosphäre im befeuchteten Brutschrank aufbewahrt. Um eine ausreichende Begasung des im Nährmedium enthaltenen Bicarbonatpuffers zu gewährleisten, blieb der Schraubdeckel leicht geöffnet. Nach ca. fünf Tagen hatte sich in der Flasche ein dichter Zellrasen gebildet, der nun zum Herstellen der Präparate dienen konnte.

2.5. Einfrieren und Auftauen

Zur Aufbewahrung wurden regelmäßig frische Zellgenerationen eingefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in 2.6. beschrieben trypsinisiert und separiert. Zum Zellpellet wurden nun 4 ml warmes Nährmedium und 400 µl warmes Glycerin gegeben. Jeweils 2 ml der Zellsuspension wurden nun in ein 2 ml-Cryoröhrchen gegeben und dieses bei -80°C aufbewahrt.

Zum Auftauen wurde ein Röhrchen mit tiefgefrorenen Zellen bei Raumtemperatur gerade soweit erwärmt, daß noch ein wenig Eis zurückblieb. Dies sollte verhindern, daß die Zellen bereits in der konzentrierten Glycerinlösung wieder funktionsfähig wurden. Anschließend wurde die Suspension zusammen mit 20 ml warmem Nährmedium in eine sterile Zellkulturflasche gegeben und in den Brutschrank gestellt.

2.6. Herstellen der Präparate

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen (Monolayer) wurden in Zellkulturplatten mit je 12 Cups angelegt (s. Abb. 2.1.). Dazu wurden zunächst 12 Deckgläschen (0,08 - 0,12 mm Dicke) mit Ethanol gereinigt und unter UV-Licht über 2 Stunden sterilisiert. Danach wurde jedes Cup mit je einem 2 x 1 cm großen Deckgläschen bestückt (s. Abb. 2.1) und die Platte weitere vier Stunden unter UV-Licht in der Werkbank sterilisiert.

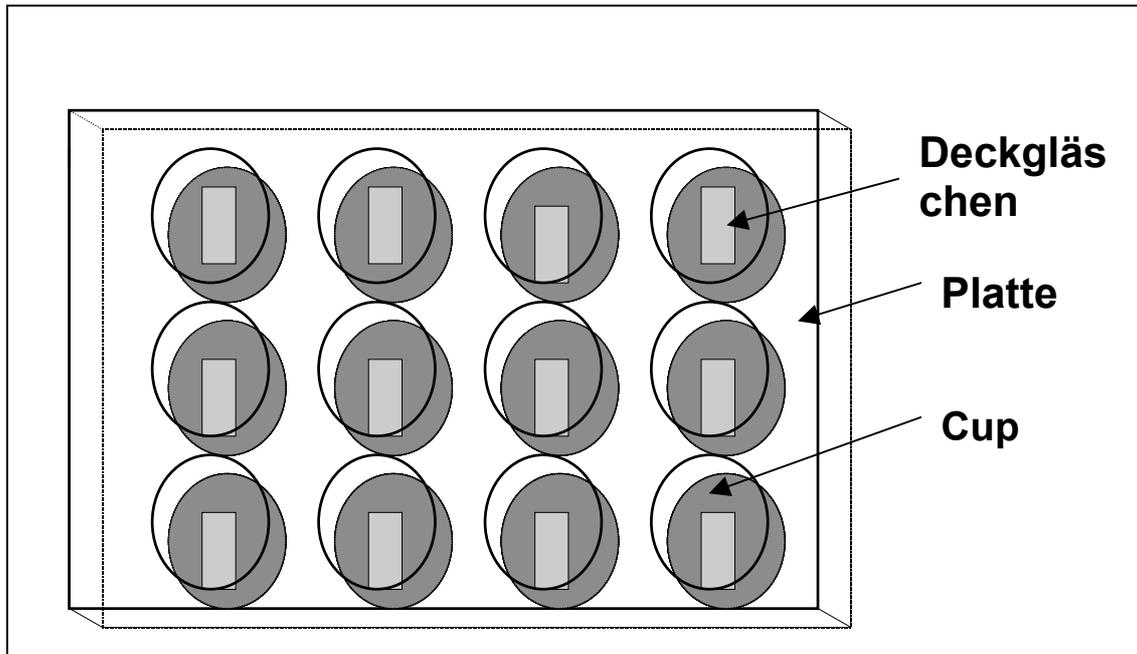


Abbildung 2.1.: Skizze einer Platte zum Herstellen von Zellpräparaten. Die Platte wurde mit einem Plastikdeckel luftdurchlässig abgedeckt.

Die in der Zellkulturflasche gewachsenen Zellen wurden nun, um verbliebenes Nährmedium auszuwaschen, mit 10 ml Ca^{2+} -freier EDTA-Lösung 2 min lang gespült. Anschließend wurden 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und die Flasche über 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 20 ml Nährmedium gestoppt und die gelösten Zellen durch eine $40\ \mu\text{m}$ Cellstrainer in ein steriles Reagenzglas umgefüllt. Dieses wurde 3 min lang bei 400 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand bis auf 5 ml dekantiert. Durch leichtes Aufschütteln des Niederschlags wurden die Zellen wieder in Suspension gebracht und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die konzentrierte Zellsuspension wurde nun mit Nährmedium auf die Sollkonzentration von 10^4 Zellen /ml verdünnt. Je 2 ml dieser Suspension wurden in jedes Cup pipettiert und die Platten in den Brutschrank gestellt. Der in der Kulturflasche verbliebene Rest von ca. 2 ml wurde mit 20 ml Nährmedium übergossen und diente dem Heranwachsen einer neuen Zellgeneration. Um zunächst ein ungestörtes Anwachsen der Zellen auf den Deckgläschen zu erreichen, erfolgte der erste Mediumwechsel erst nach zwei Tagen, danach wurde das Nährmedium täglich gewechselt. Dazu wurde das alte Nährmedium mit einer Pasteurpipettenspitze, die an eine Elektropumpe angeschlossen war, aus den Cups abgesaugt und anschließend je 2 ml des

vorher erwärmten, frischen Nährmediums aus einer Maßpipette auf die Zellen gegeben.

Für die Herstellung der Monolayer mit MCF-7 Zellen war eine sterile Arbeitsweise und eine hohe Konstanz in der Ausführung der Arbeitsschritte notwendig. Aus Zellkulturen, die durch Bakterien oder Pilze verunreinigt waren, gingen schon vor dem Erkennen der Kontamination falsche und nicht reproduzierbare Meßergebnisse hervor. Auch Monolayer, die aus Zellsuspensionen angesetzt wurden, die nicht exakt der festgelegten Zellkonzentration entsprachen, führten zu teilweise stark abweichenden Ergebnissen. Um das zu verhindern wurden alle Arbeitsschritte unter Wahrung größtmöglicher Sterilität sowie Konstanz durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Nährmedium das Antibiotikum Gentamycin zugesetzt, um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination zu verringern. Verworfen wurden Ergebnisse aus Messungen, die aus kontaminierten Zellen hervorgingen. Kontaminationen konnten makroskopisch schnell an einer Schimmelbildung bzw. einer Trübung des Nährmediums erkannt werden. Um diese kontaminierten Zellen auch noch nach der Messung identifizieren zu können, wurde von jeder Platte ein Cup im Brutschrank aufbewahrt und am Tag nach der Messung auf Kontamination untersucht.

2.7. Dynamische Messung des intrazellulären pH-Werts mit dem Fluoreszenzindikator BCECF an Monolayern aus MCF-7 Zellen

Das 1982 von RINK et al. vorgestellte 2,7-Biscarboxyethyl-5,6-carboxyfluorescein (BCECF) ist ein Fluoreszenzindikator zur Messung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) im Fluoreszenzspektrophotometer. Der Indikator wird zunächst als nicht fluoreszierender Pentaacetoxymethylester (BCECF/AM) zu den Zellen gegeben, überwindet als solcher die Plasmamembran und wird intrazellulär durch zelleigene, unspezifische Esterasen deesterifiziert, so daß die Säure BCECF entsteht. Da ein Molekül BCECF bei physiologischen pH-Werten vier bis fünf negative Ladungen besitzt, ist es nur sehr eingeschränkt membran-gängig und akkumuliert im Zytosol. Ein Indikatorverlust ist dennoch feststellbar, auf ihn wird in Abschnitt 2.9.2. bzw. in der Diskussion in Kapitel 4.1. eingegangen. BCECF hat *in vitro* und *in vivo* nahezu die gleichen spektralen Eigenschaften (Excitationsmaximum bei 500 nm *in vitro*, SCHREINER, 1989). Es besitzt bei 37°C einen pK_a von 7,0 und ist somit gut für Messungen des pH_i im physiologischen Bereich geeignet. Es liegt im Zytosol gleichmäßig verteilt vor und soll sich nicht in den Mitochondrien anreichern (RINK et al., 1982).

Der K_d -Wert des BCECF für die Bindung von Protonen liegt im intrazellulären Ionenmilieu bei 107 nmol/l. Zwischen den pH-Werten 6,5 und 7,5 nimmt die Fluoreszenz in nahezu linearer Weise zu (SELVAGGIO et al., 1986). BCECF besitzt im Emissionsspektrum je ein Maximum bei einer Excitation mit 503 nm und mit 278 nm. Der isosbestische Punkt des Indikators, bei dem die Fluoreszenzänderung keine Abhängigkeit von der $[\text{H}^+]_i$ zeigt, liegt bei 440 nm (RINK et al., 1982, MEYER-SCHILLHORN, 1999). Das Emissionsspektrum wurde durch Bildung der Differenz aus den Spektren vor und nach der Beladung darstellbar und hat sein Maximum bei 527 nm. Das Maximum in der Ratio von 503 nm und 440 nm lag bei 530 nm (MEYER-SCHILLHORN, 1999). Um unabhängig von Indikatorverlusten, Unterschieden in Beladung und Zelldichte und von Zugabeartefakten zu sein, wurde die Emission abwechselnd bei den Excitationswellenlängen 440 nm und 503 nm (Bandbreite 10 nm) gemessen und für jeden Zeitpunkt der Quotient R (Ratio) der beiden Emissionswerte ausgewertet. Für jeden einzelnen Meßwert erfolgte die Umrechnung nach:

$$\frac{E_{Exc503\text{ nm}}}{E_{Exc440\text{ nm}}} = \textit{Ratio}$$

($E_{Exc\ 503\text{ nm}}$ = Emission bei einer Excitationswellenlänge von 503 nm, $E_{Exc\ 440\text{ nm}}$ = Emission bei einer Excitationswellenlänge von 440 nm)

Diese Methode hat weiterhin den Vorteil, daß nicht für jeden Einzelversuch eine neue Eichung durchgeführt werden muß, da der Ratiowert unabhängig von der absoluten Höhe der Fluoreszenz ist. Außerdem ist das Grundrauschen vermindert, wodurch die Meßempfindlichkeit ansteigt.

2.7.1. Eichung der Ratiowerte

Die Eichung der Ratiowerte zur Umrechnung in pH-Einheiten kann zum einen durch eine *in vivo*-Eichung mit der Nigericin-Methode (THOMAS et al., 1979, SELLVAGIO et al., 1986) und zum anderen durch eine *in vitro*-Eichung erfolgen. Beide Methoden ergeben Eichgeraden, die sich in ihrer Steigung jedoch unterscheiden. Nach sorgfältiger Testung beider Methoden und eingehendem Studium der Literatur entschieden wir uns für die *in vitro*-Eichung. Auf die Gründe dafür wird in der Diskussion im Abschnitt 4.1. ausführlich eingegangen. Die *in vitro*-Eichung kann erfolgen, indem eine Küvette ohne Zellen mit 1,5 ml PSS gefüllt in das Fluorimeter gestellt und 3,84 $\mu\text{mol/l}$ der unveresterten Säure des BCECF gegeben wird. Die Konzentration des BCECF entspricht dann ungefähr der des intrazellulär akkumulierten BCECF nach Beladung der Zellen und Deesterifizierung vom AM. Nun kann zur Erstellung der Eichgeraden in drei Einzelschritten die Lösung mit jeweils 1,5 mmol/l HCl angesäuert werden und der sich einstellende pH-Wert (gemessen) mit dem Ratiowert aus den Wellenlängen 503 nm und 440 nm des Fluorimeters gleichgesetzt werden (s. Abb 2.2.). Aus den Werten wurde eine Regressionsgerade erstellt, aus der der pH_i für jeden Wert ermittelt werden konnte (s. Abb. 2.3.).

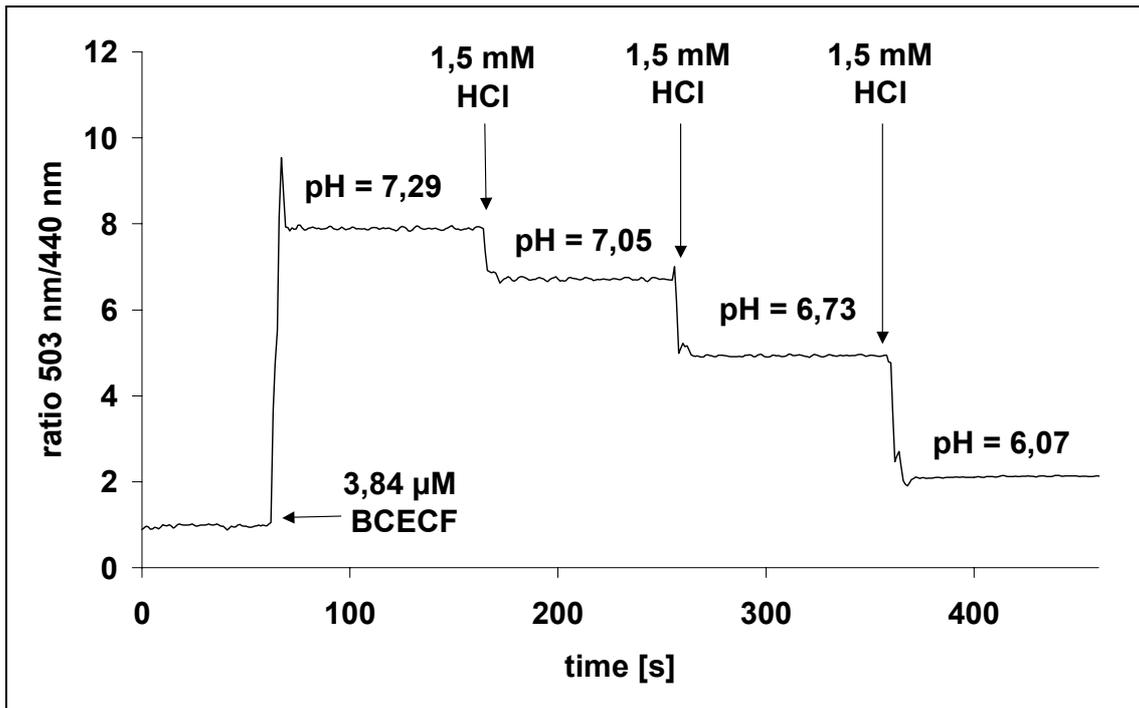


Abbildung 2.2.: Verlauf einer *in vitro*-Eichung mit Zugabe von BCECF und schrittweiser Ansäuerung mit HCl. Die eingetragenen pH-Werte der einzelnen Stufen wurden gemessen.

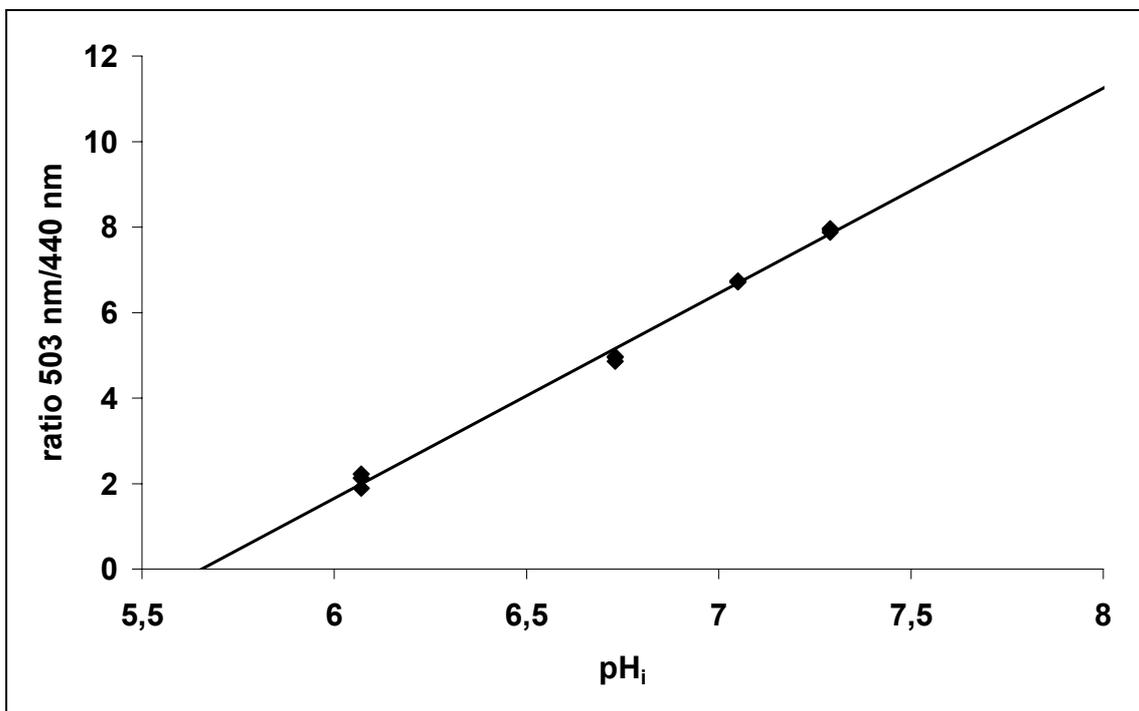


Abbildung 2.3.: Eichgerade aus der *in vitro*-Eichung. Auswertung von drei Messungen mit jeweils vier Meßpunkten, durch die eine Regressionsgerade gelegt wurde. Die Gerade wird durch $y = 4,7972x - 27,133$ beschrieben, der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,998

2.8. Definition des Ruhezustands und „Natriumpropionat-Methode“

Da anzunehmen ist, daß Zelle und Zellkern ständig aktiv sind, muß zu Vergleichszwecken ein Ausgangszustand (Ruhezustand) mit bestimmten Bedingungen definiert werden. Es wurde ein Zustand der Zelle gewählt, in dem bei 37°C (Ausnahme: Untersuchung des Temperatureinflusses), und einem pH_e von 7,38 der pH_i über mindestens 20 min stabil ist. Von diesem Zustand ausgehend wurden die verschiedenen Substanzen zugegeben und das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet.

Um die zelleigenen Mechanismen zur pH-Regulierung nach Säurebelastung zu untersuchen, wurde der Intracellularraum (ICR) angesäuert und der Wiederanstieg des pH_i beobachtet. Dazu wurde nach ROOS & BORON (1981) in PSS gelöstes Natriumpropionat zu den beladenen Monolayern gegeben. Das freie Propionsäureanion steht in der gepufferten PSS im Gleichgewicht mit der nicht dissoziierten Säure. Die nicht dissoziierte Säure ist im Gegensatz zum Propionsäureanion membrangängig, so daß sie in die Zelle diffundiert und wiederum in ein Proton und das Anion dissoziiert. Es bildet sich ein neues Gleichgewicht aus. Da aber durch die intrazelluläre Dissoziation das Konzentrationsgefälle für die nicht dissoziierte Säure weiterhin bestehen bleibt, reichern sich Propionsäureanionen und Protonen in der Zelle an und der pH_i sinkt ab.

Der pH-Wert der PSS (pH_e) ändert sich dabei in dem Konzentrationsbereich 0,002 - 2 mM Natriumpropionat nicht signifikant, erst ab einer Konzentration von 20 mM wird er leicht alkalisiert.

2.9. Versuchsaufbau und Methode

2 bis 3 Tage nach dem Aussähen der Zellen auf die Deckgläschen war der Zellrasen auf den Deckgläschen dicht genug, um Messungen durchführen zu können. Das mit Zellen bewachsene Deckglas (Monolayer) wurde vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus dem Cup genommen und zügig in eine kleine, mit warmer PSS gefüllte Petrischale gelegt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Aus der Petrischale wurde das Deckgläschen, ohne daß die Zellen dabei mit Luft in Berührung kamen (die gesamte Prozedur wurde in einer

größeren, mit PSS gefüllten Petrischale durchgeführt), auf einen Deckglashalter gespannt, so daß die unteren 2/3 des Deckgläschens frei in der Lösung standen (s. Abb. 2.4.).

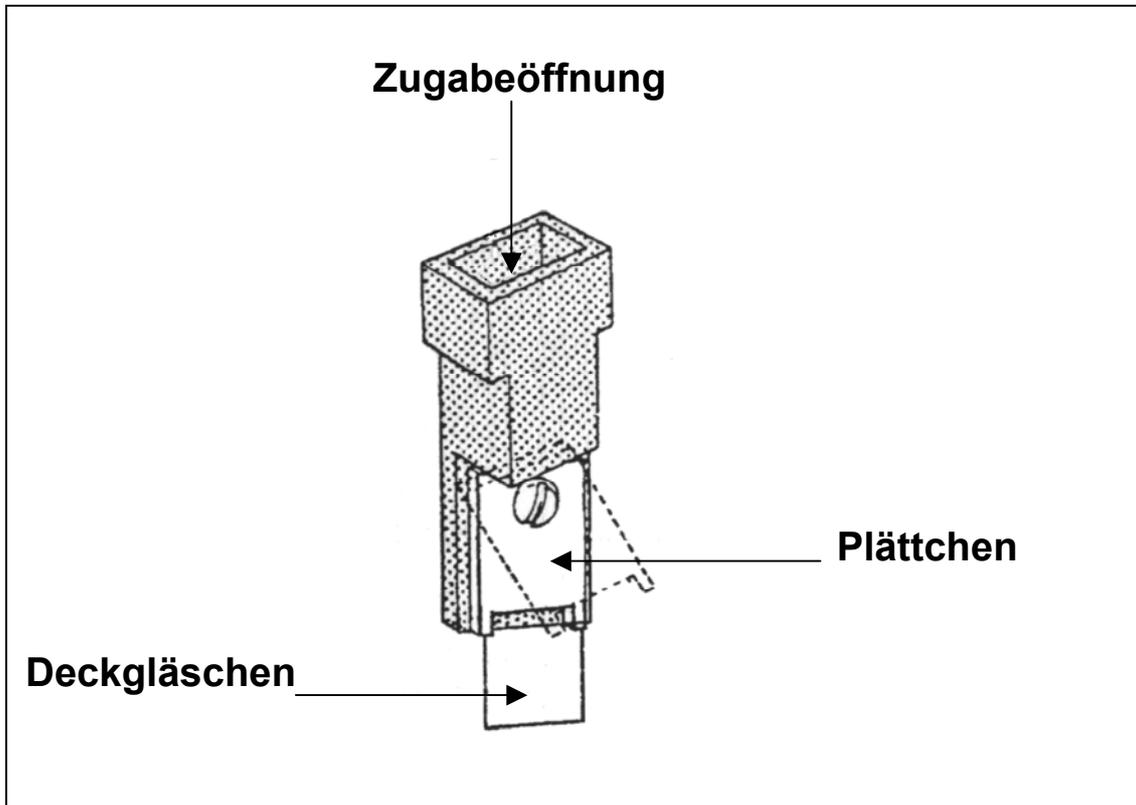


Abbildung 2.4.: Deckglashalter für die Monolayer. Neben der Zugabeöffnung befinden sich zusätzlich zwei Bohrlöcher für die Zugabe bzw. Absaugung der Perfusionslösung.

Der Deckglashalter wurde nun in eine mit einem Magnetrührer versehene Quarzglasküvette geschoben und die PSS bis auf 1,5 ml abgesaugt. Dazu wurden die Küvetten vorher an der 1,5 ml-Linie markiert.

2.9.1. Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzindikator BCECF

Nachdem die Zellen auf den Halter gespannt waren, wurden sie 10 min mit PSS perfundiert, anschließend wurde die Perfusion abgestellt und 4 μM BCECF/AM (Stammlösung: 0,5 mM in DMSO) mit einer 50 μl Hamilton-Glasspritze zu den Zellen gegeben. Unter Fluoreszenzmessung beluden die Zellen nun über ca. 5 - 7 min bis zu einem definierten und gleichbleibenden Höchstwert. Nach

Erreichen dieses Wertes wurde die Perfusion mit PSS wieder angestellt und über 20 min der überschüssige Indikator ausgewaschen. Nun konnte die eigentliche Messung beginnen (siehe Abb. 2.5.).

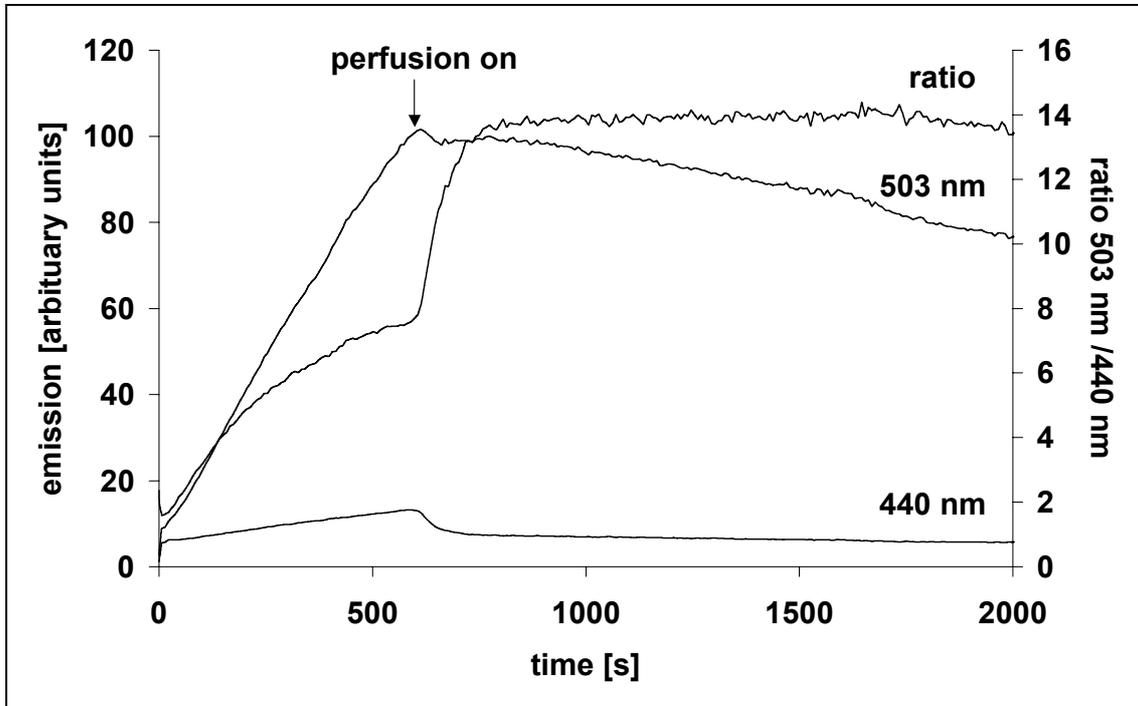


Abbildung 2.5.: Beladevorgang der MCF-7 Zellen mit BCECF. Zunächst steht die Lösung, beim festgelegten Maximum wird die Perfusion angestellt um den Indikator aus der Küvettenlösung zu waschen. Dargestellt sind die Emissionen aus den Excitationswellenlängen 440 nm und 503 nm und die Ratio aus diesen beiden Wellenlängen.

2.9.2. Messung in stehender und in perfundierter Lösung, methodische Ergebnisse

Messungen, die in stehender Lösung vorgenommen wurden, unterschieden sich deutlich von solchen, die in perfundierter Lösung stattfanden.

Nach der Beladung war in den MCF-7 Zellen ein signifikanter Indikatorverlust festzustellen, der sich nach Zugabe bestimmter Reagenzien noch verstärkte oder auch abgeschwächt wurde. Festzustellen war dies am Verlauf des 440 nm Signals. Die Fluoreszenzabnahme beruht offenbar auf einem aktiven, ATP-abhängigen Transportmechanismus für das BCECF aus der Zelle heraus (ALLEN et al., 1990).

Da der aus den Zellen ausgetretene Indikator in die extrazelluläre Lösung (PSS) gelangt (wo er auch meßbar ist), addiert er sich zu dem Signal des intrazellulären Indikators und verfälscht somit die Messung. In Abbildung 2.6. wird deutlich, daß nach einer einstündigen Messung des pH_i mit Zugabe von 20 mM Natriumpropionat das 440 nm Signal ohne Perfusion der Küvette von 7,7 auf einen Wert von 4,5 absinkt. Stellt man nun jedoch die Perfusion an, so fällt der Wert schlagartig um über 50% auf 1,9 und fällt dann langsamer weiter auf einen Wert von 1,8. Der entstehende Fehler in der darauf basierenden Berechnung des pH_i betrug 0,07 pH-Einheiten, wie aus Kurve 2 in Abbildung 2.6. hervorgeht.

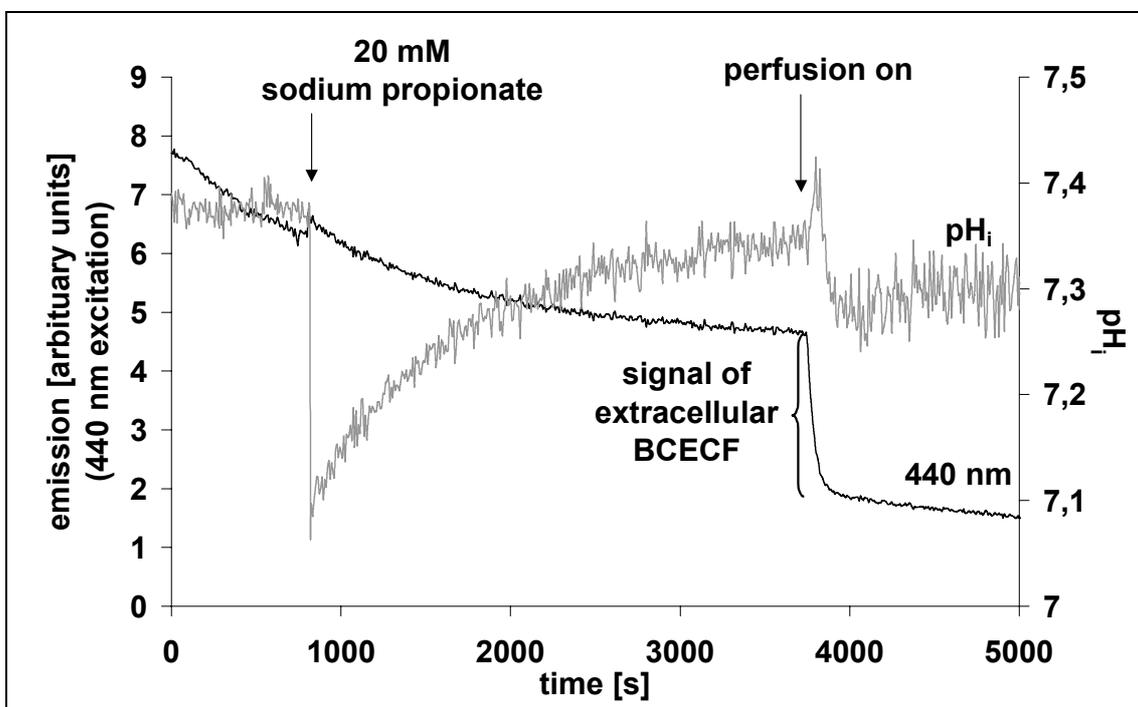


Abbildung 2.6.: Beeinflussung des intrazellulären Fluoreszenzsignals durch aus den Zellen ausgetretenen Indikator. Umschalten von stehender auf perfundierte Küvettenlösung. Kurve 1 (grau): Zeitverlauf des pH_i -Wertes. Zunächst ist der verfälschte pH_i gezeigt, nach Anstellen der Perfusion sieht man den realen pH_i . Kurve 2 (schwarz): Zeitverlauf des H^+ -Ionen-unabhängigen Signals, das die Indikatorkonzentration angibt, gemessen bei 440 nm Excitation. Nach dem Anstellen der Perfusion wird der Anteil des extrazellulär akkumulierten Indikators sichtbar. Messung nach Zugabe von 20 mM Natriumpropionat.

Aus diesem Grunde wurde ein spezielles Perfusionssystem entwickelt und für alle Messungen verwendet. Über eine Zugabeleitung wurde frische PSS angeboten. Die BCEFC-haltige Lösung wurde kontinuierlich abgesaugt, um den durch das austretende BCEFC entstehenden Fehler minimal zu halten.

Um eine gleichbleibende, kontinuierliche Perfusion der Zellen zu gewährleisten, wurden die Deckgläschen auf einen speziell präparierten Deckglashalter gespannt. Durch diesen waren von oben zwei Löcher gebohrt, durch die jeweils eine Kanüle in die Küvette geschoben werden konnte. Durch die Zugabekanüle konnten die Flüssigkeiten mittels zweier Perfusoren über Schläuche in die Küvette gepumpt werden. Die Zugabegeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Um Temperaturschwankungen entgegenzuwirken, wurden die Lösungen, kurz bevor sie die Küvette erreichten, durch einen Wärmetauscher geleitet.

Die Absaugkanüle wurde von oben bis zur 1,5 ml Marke in die Küvette vorgeschoben und an eine Absaugeinheit angeschlossen. Auf diese Weise wurde in der Küvette ein gleichbleibender Flüssigkeitsspiegel gehalten.

2.10. Meßvorgang

Nach dem Einspannen des Deckgläschens auf den Halter wurde die Küvette in die Meßkammer des Hitachi Spektral Fluoreszenzphotometers gestellt. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Küvette zu jeder Messung im gleichen Winkel in die Halterung gestellt wird, da Veränderungen des Winkels große Differenzen des Ratiowertes zur Folge hatten. Auch Sprünge im Deckglas und damit verbundene Änderungen des Einfallswinkels des Excitationslichts hatten bedeutenden Einfluß auf die Messung.

Die gleichbleibende Temperatur wurde durch eine mit warmem Wasser beheizbare Meßkammer im F-4500 gewährleistet, die durch Schläuche mit einer Umwälzpumpe verbunden war. Um die Zellen vor zu starker Lichteinstrahlung zu schützen, wurde der einfallende Excitationslichtstrahl durch eine 1 mm breite und 10 mm hohe Lochblende abgeschwächt. Um die Lichtintensität weiter zu vermindern, wurde das Deckgläschen mit den Zellen von hinten beleuchtet, so daß der einfallende Excitationslichtstrahl mit dem Deckgläschen einen Winkel von 30° und der Emissionslichtweg einen Winkel von 60° bildete (s. Abb. 2.7.).

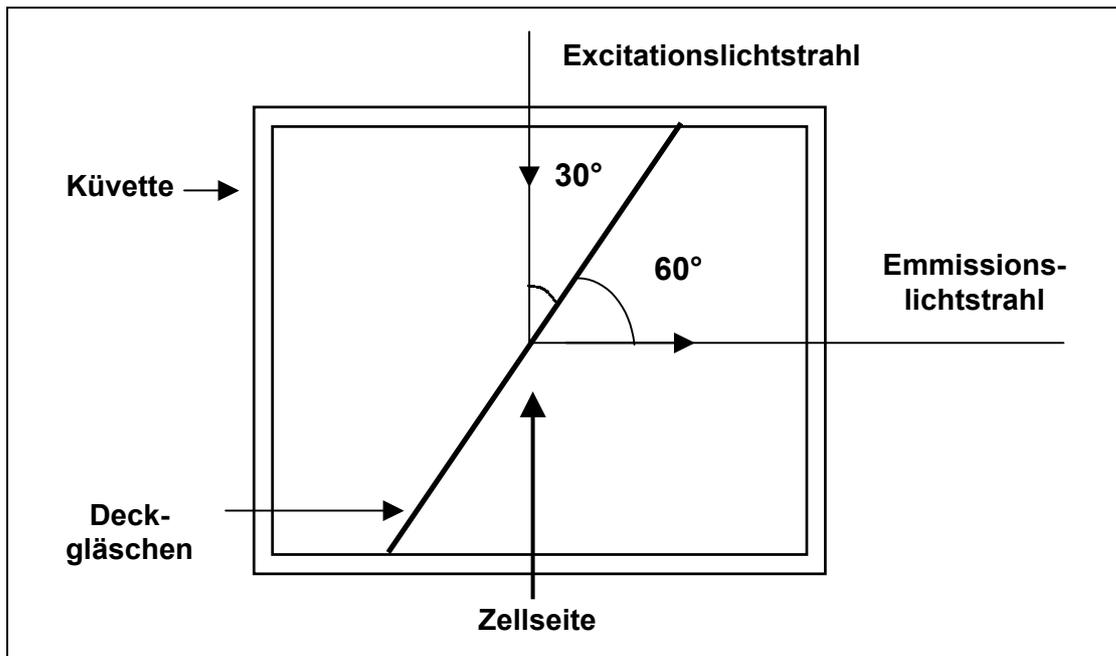


Abbildung 2.7.: Querschnitt durch das untere Drittel der Küvette, Anordnung des Deckgläschens im Lichtweg des Fluorimeters

2.10.1. Zugabe von Substanzen

In der perfundierten Lösung wurden Substanzen in der gewünschten Konzentration in PSS über einen Perfusor gleichmäßig zugegeben. Die parallelgeschaltete PSS-Perfusion wurde abgeschaltet. Durch den in der Küvette befindlichen Rührer wurde die zugegebene Substanz schnell in der Küvette verteilt.

Die Zugabe von Substanzen in stehende Lösungen (dies war v.a. bei der Zugabe von BCECF/AM der Fall) erfolgte durch eine Hamilton-Glasspritze über die Zugabeöffnung im Deckel des Deckglashalters.

Die verwendete Formulierung „Zugabe einer bestimmten Konzentration einer Substanz“ sei definiert als das Umschalten der Perfusion auf eine Lösung der angegebenen Konzentration. In stehender Lösung erfolgte die Zugabe einer Stammlösung, die die Küvettenlösung auf die angegebene Konzentration einstellte. Es wurden möglichst kleine Mengen Stammlösung in entsprechend hochkonzentrierter Form gegeben.

Für jede verwendete Substanz wurde getestet, ob ein signifikanter Einfluß auf die Hintergrundfluoreszenz bestand. Dies war bei keiner der zugegebenen Substanzen der Fall.

2.11. Einfluß des osmotischen Drucks auf den pH_i

Um Störungen und Fehler der Meßergebnisse durch den Einfluß von 20 mM Natriumpropionat auf die Osmolarität der Küvettenlösung auszuschließen, wurde eine entsprechende Erhöhung des osmotischen Drucks mit Hilfe des Zuckeralkohols Mannitol simuliert.

Die Osmolarität aller Elektrolyte im Blutplasma beträgt ca. 290 mosmol/l bei einer physiologischen Schwankung von ± 20 mosmol/l.

Die Osmolarität der verwendeten PSS beträgt 305 mosmol/l. Ein Natriumpropionatmolekül dissoziiert in Lösung zu je einem Natrium- und einem Propionsäureion. Die Zugabe von 20 mM Natriumpropionat bewirkt also eine Zunahme der Osmolarität um 40 mosmol/l, 50 mM erhöhen die Osmolarität dagegen um 95 mosmol/l. Die Differenz zu den sich rechnerisch ergebenden 100 mosmol/l. erklärt sich aus einer nicht vollständigen Dissoziation des Natriumpropionats.

Um den Einfluß des osmotischen Druckes auf den pH_i zu messen, wird der Zuckeralkohol Mannitol in zwei Konzentrationen in den ECR gegeben. Mannitol erhöht die Osmolarität entsprechend seiner Molarität, der osmotische Druck einer Lösung von 40 mM Mannitol entspricht also dem einer 20 mM Natriumpropionatlösung. Da Mannitol sehr schlecht membrangängig ist, bewirkt es praktisch ausschließlich eine extrazelluläre Druckerhöhung.

Der Einfluß kann in den verwendeten Konzentrationen als sehr gering angesehen werden, die 40 mM Mannitollösung zeigt keinerlei Wirkung auf den pH_i . Erst eine 80 mM Mannitollösung (entspricht der Osmolarität einer 40 mM Natriumpropionatlösung) senkt ihn signifikant um $0,24 \pm 0,02$ Einheiten (s. Abb. 2.8.)

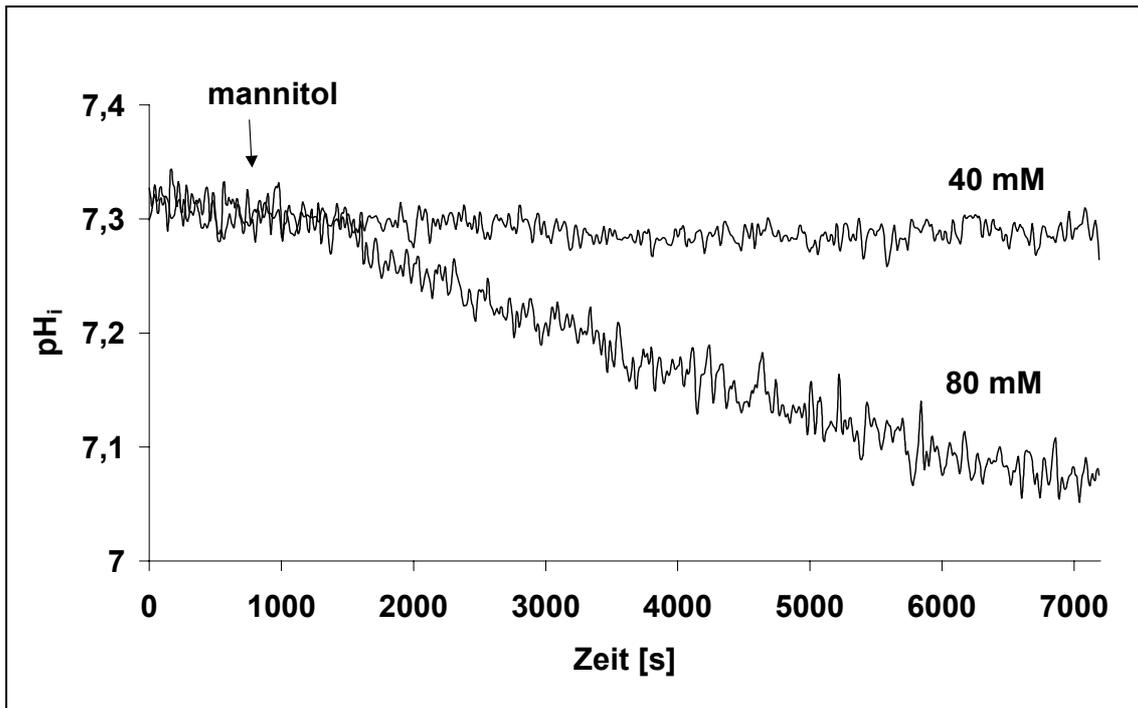


Abbildung 2.8.: Einfluß einer extrazellulären 40- bzw. 80 mosmol/l Mannitollösung auf den pH_i (gemittelte Kurven, für beide Konzentrationen ist jeweils $n = 4$)

Die Messungen des osmotischen Drucks erfolgten mit Hilfe der Messung der Gefrierpunkterniedrigung.

2.12. Signalaufzeichnung und -auswertung, Berechnungen

Die Digitalsignale des Photometers wurden über eine Schnittstelle zum Computer übertragen und dort gespeichert. Zur ersten Auswertung und Verwaltung der Daten diente das Meßprogramm für Windows des Fluoreszenzspektrophotometers (Hitachi®). Anschließend wurden alle Daten im .dif-Dateiformat abgespeichert, in MS Excel 97 (Microsoft®) konvertiert und dort bearbeitet. Für die Textverarbeitung diente MS Word 97 (Microsoft®).

Die beiden alternierenden Excitationswellenlängen (440 nm und 503 nm, siehe auch 2.8.) des Fluoreszenzspektrophotometers Hitachi F-4500 wechselten bei einer Meßdauer von 2 h in einem Abstand von 10 s. Daraus ergab sich ein Abstand der einzelnen Meßpunkte einer Wellenlänge von 20 s. Um eine bessere zeitliche Annäherung der beiden Wellenlängen zum Errechnen der Ratio zu erlangen, wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende 503 nm-Werte interpoliert,

so daß die 503 nm-Meßwerte näherungsweise zur gleichen Zeit wie die 440 nm-Meßwerte ermittelt wurden.

Die Geradengleichung ($y = mx+b$) der Eichgeraden (siehe Abb. 2.7.) lautete

$$y = 4,7972x - 27,133$$

wobei:

y : Ratiowert

$m = 4,7972$ (Steigung der Geraden)

x : pH-Wert

$b = 27,133$ (y-Achsenabschnitt).

Durch Auflösen nach x und Einsetzen der Ratiowerte läßt sich der pH-Wert nun wie folgt errechnen:

$$pH = \frac{27,133 + y}{4,7972}$$

Zur Darstellung der Messungen wurden, wenn angegeben, die pH-Kurven mehrerer Messungen gemittelt. Wenn in der Legende keine Angabe erfolgt, wurde eine repräsentative Einzelmessung zur Darstellung verwendet, in beiden Fällen ist die Anzahl n der individuellen Einzelexperimente im Text angegeben. Die einzelnen untersuchten Parameter des Wiederanstiegs wurden nach dem in Abbildung 2.9. dargestellten Schema ausgewertet.

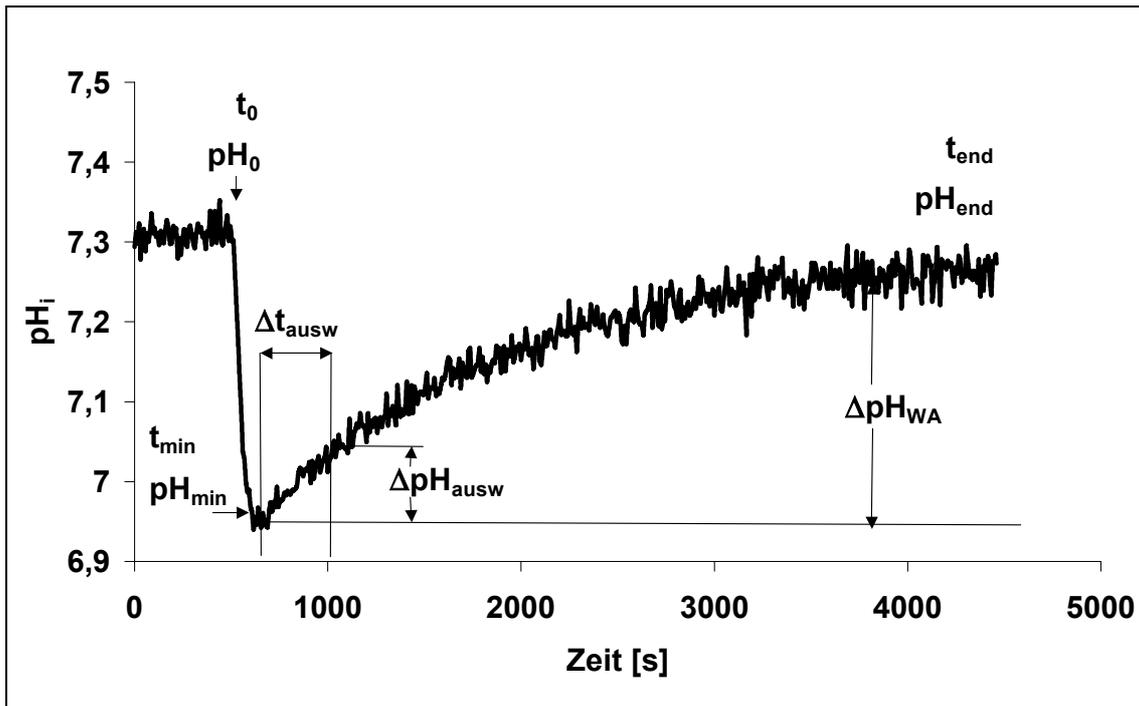


Abbildung 2.9.: Auswertung eines Wiederanstiegs des pH_i nach Zugabe von 20 mmol/l Natriumpropionat: t_0 : Zeitpunkt der Natriumpropionatzugabe; pH_0 : pH_i zum Zeitpunkt t_0 ; t_{end} : Ende der Messung, maximaler Wiederanstieg ist erreicht; pH_{end} : pH_i zum Zeitpunkt t_{end} ; t_{min} : Zeitpunkt des pH_i - Minimums; pH_{min} : pH_i zum Zeitpunkt t_{min} ; Δt_{ausw} : 300 s = Auswertintervall; $\Delta \text{pH}_{\text{ausw}}$: Änderung des pH im Auswertintervall; Steigung im Auswertintervall $m = \Delta \text{pH}_{\text{ausw}} / \Delta t_{\text{ausw}}$; $\Delta \text{pH}_{\text{WA}}$: Änderung des pH_i im Zeitraum t_{min} bis t_{end} .

Zunächst wurde das nach der Ansäuerung auftretende pH-Wert-Minimum pH_{min} zum Zeitpunkt t_{min} aufgesucht. Für das frühe Auswertintervall Δt_{ausw} wurde eine Zeit von $t = 300$ s festgelegt. Durch die Meßwerte in diesem Intervall wurde eine Regressionsgerade gelegt und deren Steigung m bestimmt (verwendet wurden ausschließlich Regressionsgeraden, die einen Regressionskoeffizienten b mit einer Standardabweichung $s < 1,5 \times 10^{-4}$ aufwiesen). Die Steigung der Regressionsgeraden der täglichen Kontrollmessung mit 20 mmol Natriumpropionat wurde als Kontrollwert des jeweiligen Tages festgelegt. Für alle weiteren Messungen einer Versuchsreihe wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert konnte nun im Verhältnis zum 100%-Kontrollwert des jeweiligen Tages angegeben werden. Anschließend wurden die Meßwerte unter Berücksichtigung ihrer Standardabweichung in jeweils geeigneten Diagrammen dargestellt und für jede Auswertung ein Student t-Test als Signifikanztest durchgeführt. Als signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Meßreihen bzw. zwischen einer Meßreihe und dem Kontrollwert galt ein p-Wert $< 0,05$. In die-

sem Fall wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen (MESSERER & RÜCKER, 1997, LANGE & BENDER, 2001, BENDER & LANGE, 2001).

2.13. Proliferationszählung

Um den langfristigen Einfluß einer Säurebelastung auf die Proliferation in der Zellkultur zu messen, wurde in $n = 4$ Zellkulturen die Proliferation der MCF 7 Zellen unter verschiedenen Natriumpropionatkonzentrationen ausgewertet.

2.13.1. Versuchsaufbau

Die Zellen wurden, wie oben bereits beschrieben, in der Kulturflasche trypsinisiert, mit Nährmedium versetzt und in der Zählkammer gezählt. Die Zelldichte wurde auf eine Konzentration von 10^4 / ml eingestellt und jeweils 3 ml der Suspension in eine kleine Petrischale pipettiert. Pro Versuchsreihe wurden jeweils ein Schälchen mit 0,2 mM bzw. 20 mM Natriumpropionat und ein Kontrollschälchen ohne Natriumpropionat für jeden Versuchstag angesetzt. Um zwischen einer Hemmung des Anwachsens der Zellen und einer Proliferationshemmung differenzieren zu können, wurde in einem Versuchsaufbau das Natriumpropionat sofort nach der Kultivierung in das Nährmedium gegeben. In einem weiteren Versuch ließen wir die Zellen erst einen Tag anwachsen, bevor das Natriumpropionat zugegeben wurde. Ab der ersten Zählung wurde täglich das Nährmedium wie bei der Kultivierung der Monolayer gewechselt und anschließend aus einer Pipette die Stammlösung zur Herstellung der jeweiligen Natriumpropionatkonzentration in die Schälchen gegeben.

2.13.2. Zählung

Zur Zählung wurde je ein Schälchen (Kontrolle, 0,2 mM und 20 mM Natriumpropionat) aus dem Brutschrank genommen und das Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen über 2 min in 1 ml einer Ca^{2+} -freien und EDTA-reichen Lösung im Brutschrank gespült. Diese Lösung wurde nun abgesaugt, 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen für 5 min unter leichtem Schütteln (ca. 30 rpm) in den Brutschrank gestellt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Nährmedium gestoppt und die Zellen, nachdem sie in Suspension gebracht wurden, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die erste Zählung fand am 2. Tag nach Ansetzen der Kultur statt, danach erfolgten die Zählungen täglich bis zum 8. Tag. Die Zellkulturen eines Ansatzes wurden hierbei als identisch in Ursprungszellzahl und Wachstumsverhalten angesehen. Deshalb konnte für jede Zählung eine am gleichen Tag unter gleichen Verhältnissen angesetzte, neue Petrischale verwendet werden. Auf diese Weise wurde verhindert, daß eventuelle Wachstumsstörungen durch mehrmaliges Trypsinisieren mit in die Zählung eingingen.

3. Ergebnisse

3.1. Verhalten des pH_i nach intrazellulärer Ansäuerung

Im Ruhezustand beträgt der intrazelluläre pH der MCF-7-Zellen $7,29 \pm 0,07$ ($n = 90$). Die Abbildungen 3.1. bis 3.2. zeigen die konzentrationsabhängigen Unterschiede des initialen pH_i -Abfalls nach Gabe von Natriumpropionat, der Steigung des Wiederanstiegs und der Höhe des Wiederanstiegs; jeweils im Vergleich mit der Reaktion auf Zugabe von 20 mM Natriumpropionat ($n = 5$ für die Messung mit 0,002, 0,02, 0,2, 2 und 20 mM und $n = 4$ für die Messungen mit 10 und 50 mM Natriumpropionat).

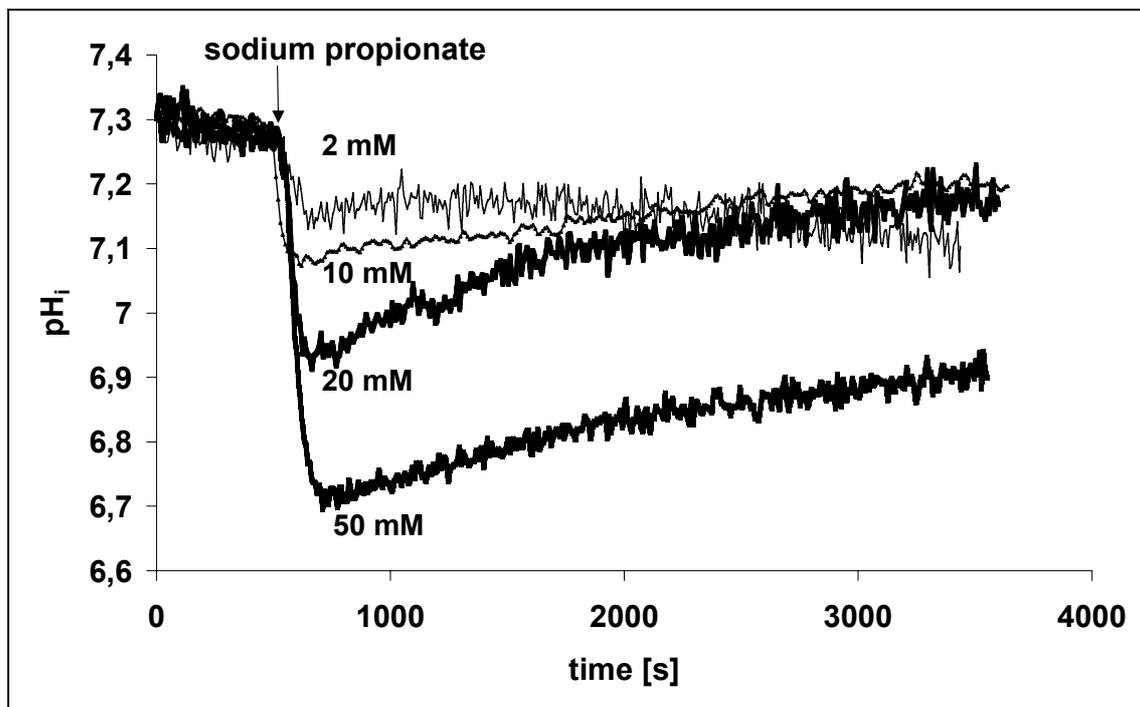


Abbildung 3.1.: Verlauf des pH_i nach Ansäuerung mit 2-, 10-, 20- und 50 mM Natriumpropionat.

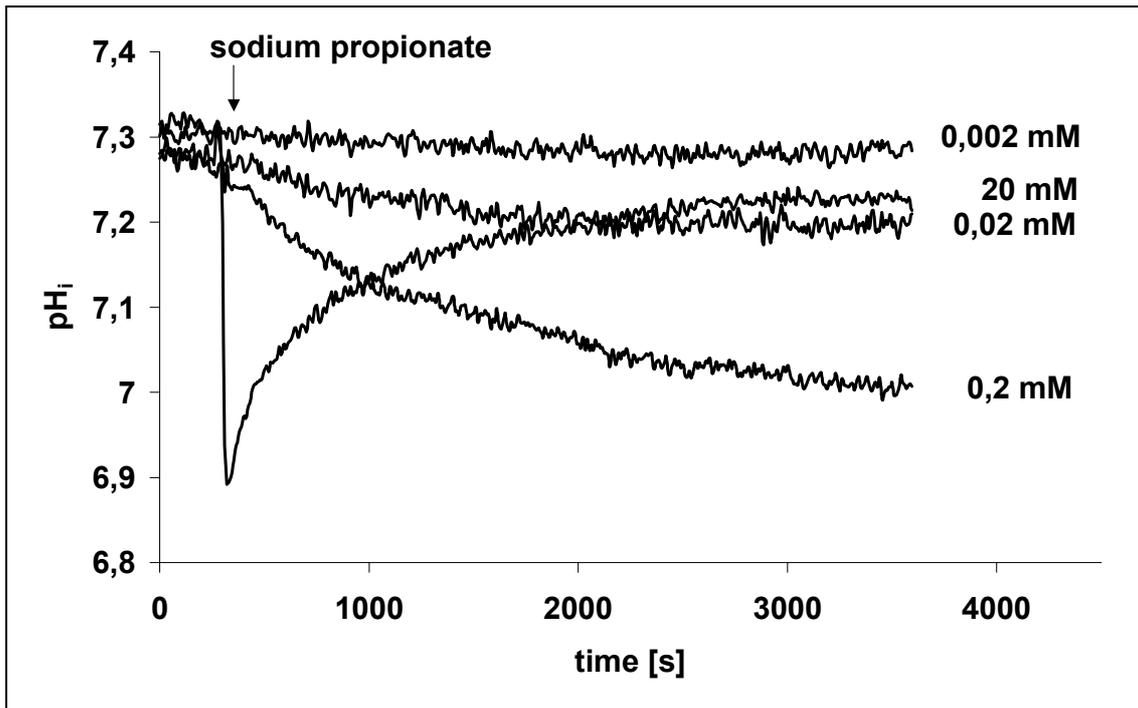


Abbildung 3.2.: Darstellung der unterschiedlichen pH_i -Senkung nach Gabe von niedrigen Natriumpropionatkonzentrationen (0,002, 0,02 und 0,2 mM); Vergleich: Zugabe von 20 mM Natriumpropionat.

Natriumpropionatkonzentrationen größer 10 mM bewirken zunächst einen starken Abfall des pH_i . Der pH_{\min} ist dabei mit steigenden Konzentrationen niedriger. Der sich anschließende, durch Regulationsmechanismen hervorgerufene Wiederanstieg ist am steilsten nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat (0,00027 pH-Einheiten/s). Sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen zeigen eine verminderte Steigung im Wiederanstieg auf. Auch die Höhe des Wiederanstiegs (ΔpH_{WA}) hat ihr Maximum nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat. Etwa 3000 s nach Ansäuerung erreicht der pH_i ein stabiles Maximum, das 0,06 pH-Einheiten unter dem Ausgangswert pH_0 liegt. Auf niedrigere Konzentrationen (10 mM) reagiert die Zelle mit einer verminderten Steigung des Wiederanstiegs (0,00013 pH-Einheiten/s) und einem, daraus folgenden, verminderten ΔpH_{WA} . Bei Gabe von 50 mM Natriumpropionat fällt der pH_i zunächst um $0,22 \pm 0,02$ pH-Einheiten tiefer ab als die 20 mM Kontrollmessung. Die Steigung des Wiederanstiegs mit 0,0001 pH-Einheiten/s ist jedoch deutlich vermindert.

Eine Konzentration von 2 mM bewirkt noch einen raschen Abfall des pH_i um $0,17 \pm 0,01$ Einheiten. Ein Wiederanstieg mit schwacher Steigung (0,00006 pH-

Einheiten/s) findet statt und nach 500 ± 25 s fällt der pH weiter ab. Der pH_{end} ist um 0,05 pH-Einheiten niedriger als der pH_{min} .

Konzentrationen kleiner 2 mM führen zu einem langsamen Abfall des pH_i ohne Wiederanstieg. Dieses Phänomen hat sein Maximum nach Gabe von 0,2 mM Natriumpropionat. Hier sinkt der pH_i im Verlauf einer Stunde immer weiter ab bis ein pH_{end} erreicht ist, das 0,28 pH-Einheiten unter dem Ausgangswert vor Ansäuerung liegt (Abbildungen 3.1. bis 3.4.).

Keine signifikante Ansäuerung findet sich nach Gabe von Konzentrationen kleiner 0,002 mM (ohne Abbildung).

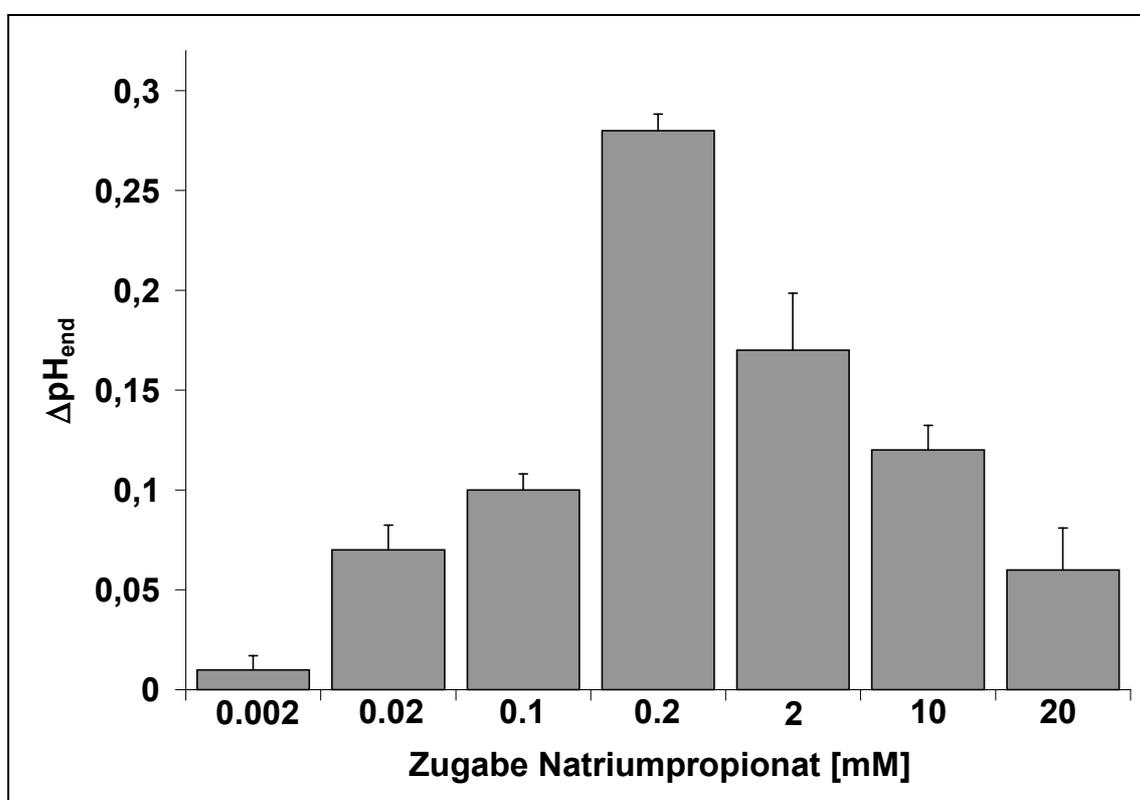


Abbildung 3.3.: Darstellung des dosisabhängig unterschiedlich starken pH-Abfalls im ICR 2 h nach Zugabe von Natriumpropionat ($\Delta\text{pH}_{\text{end}} = \text{pH}_0 - \text{pH}_{\text{end}}$). Für die Zugabe von 0,002, 0,02, 0,2 und 2 mM Natriumpropionat galt $n = 5$, für die Zugabe von 0,1 und 10 mM galt $n = 4$ und für die Zugabe von 20 mM Natriumpropionat galt $n = 10$.

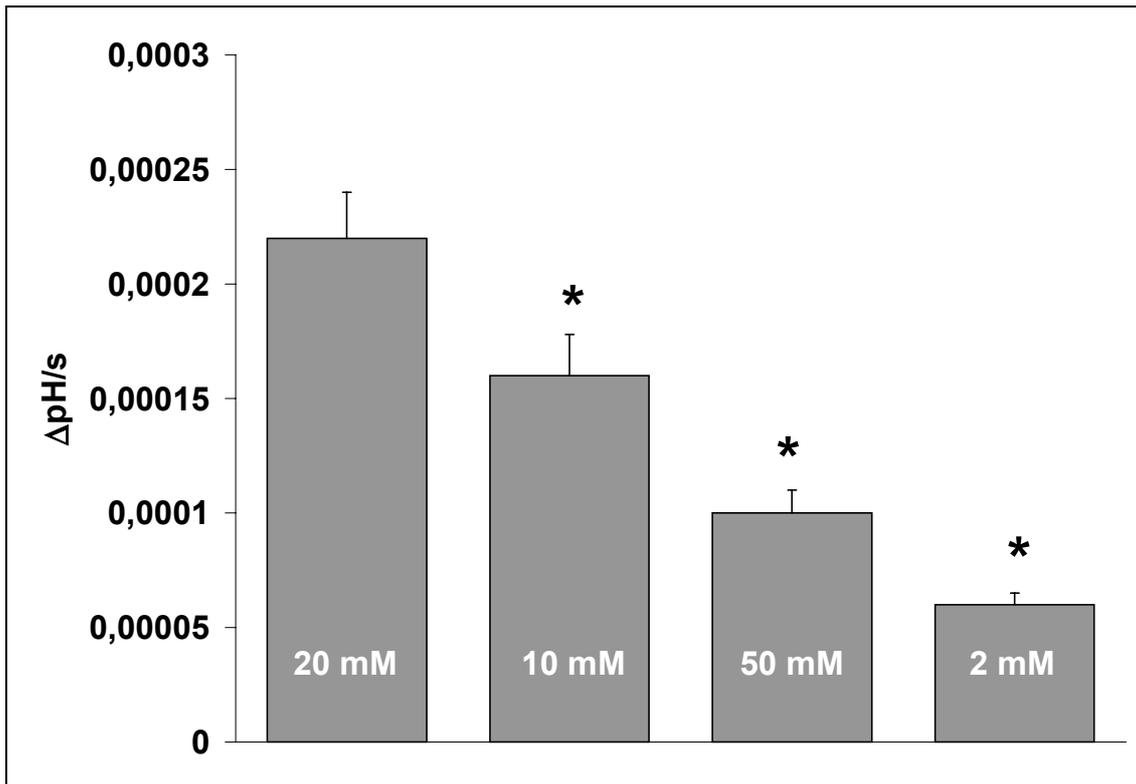


Abbildung 3.4.: Konzentrationsabhängige Unterschiede in der Steigung m [$\Delta\text{pH/s}$] des Wiederanstiegs nach Zugabe von Natriumpropionat ($m = \Delta\text{pH}_{\text{ausw}} / \Delta t_{\text{ausw}}$). $n = 5$ für 2 und 20 mM, $n = 4$ für 10 und 50 mM Natriumpropionat. * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wiederanstieg nach 20 mM Natriumpropionat ($p < 0,05$).

3.1.1. Effekte der pH_i -Senkung auf die Zellkultur

Die Gabe von Natriumpropionat in das Nährmedium der MCF-7 Zellen hat zwei grundsätzlich voneinander zu unterscheidende Wirkungen auf die Zellkultur. Zum einen kann durch die Zugabe zu einer neu angesetzten Zellkultur das Anwachsen der Zellen gestört werden. Hier verhindert das früh (also mit dem Ansetzen der Zellen) zugegebene Natriumpropionat kaum konzentrationsabhängig die Proliferation.

Zum anderen ist bei bereits angewachsenen Zellen ein konzentrationsabhängiger zytostatischer bzw. zytotoxischer Effekt zu beobachten. Die Zählung der an der Polymeroberfläche der Kulturschälchen angewachsenen – und damit lebendigen – Zellen ergibt, daß bei einer permanenten Säurebelastung der Zellen das Wachstum bei einer Natriumpropionatkonzentration von 20 mM fast vollständig gehemmt wird bzw. die Zellen absterben.

Eine Konzentration von 200 μM läßt die Zellen im Vergleich zur Kontrollmessung deutlich langsamer wachsen.

In Abbildung 3.5. wird die Proliferationshemmung dargestellt. Das Natriumpropionat ist am Tag 2 nach dem Ansetzen zugegeben.

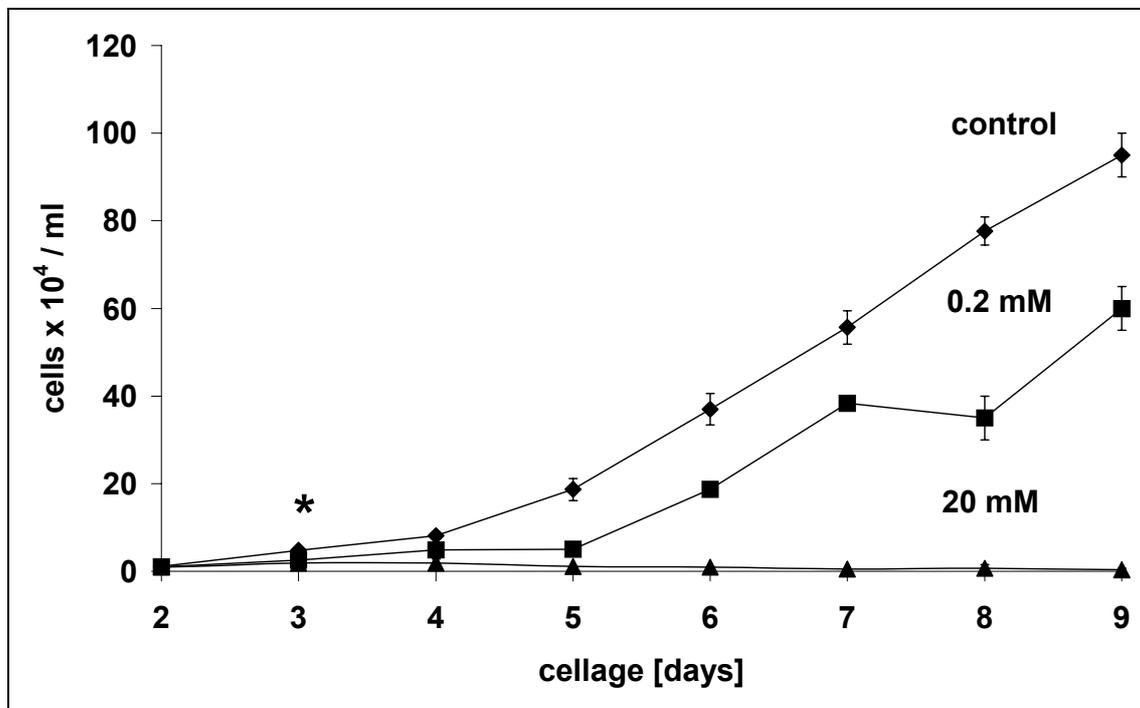


Abbildung 3.5.: Einfluß einer permanenten Säurebelastung auf das Zellwachstum. Zugabe von Natriumpropionat bei Tag 0, erste Messung am Tag 2. \blacklozenge = Kontrollmessung; \blacksquare = 200 μM Natriumpropionat im Medium; \blacktriangle = 20 mM Natriumpropionat im Medium. $n = 3$ für jede Zellkultur. * = nach dem 3. Tag waren alle Mittelwerte vom Mittelwert der Kontrollkulturen signifikant verschieden ($p < 0,05$).

3.2. Untersuchung der V-Typ H^+ -ATPase

3.2.1. Bafilomycin A_1 -induzierte pH_i -Effekte

Die Gabe von 100 nM Bafilomycin A_1 (BAF) hat einen geringen Effekt auf den Ruhe- pH_i . Nach kurzer Latenzzeit fällt der pH_i der MCF-7 Zellen um 0,06 Einheiten und bleibt dann stabil. (Abb. 3.6.)

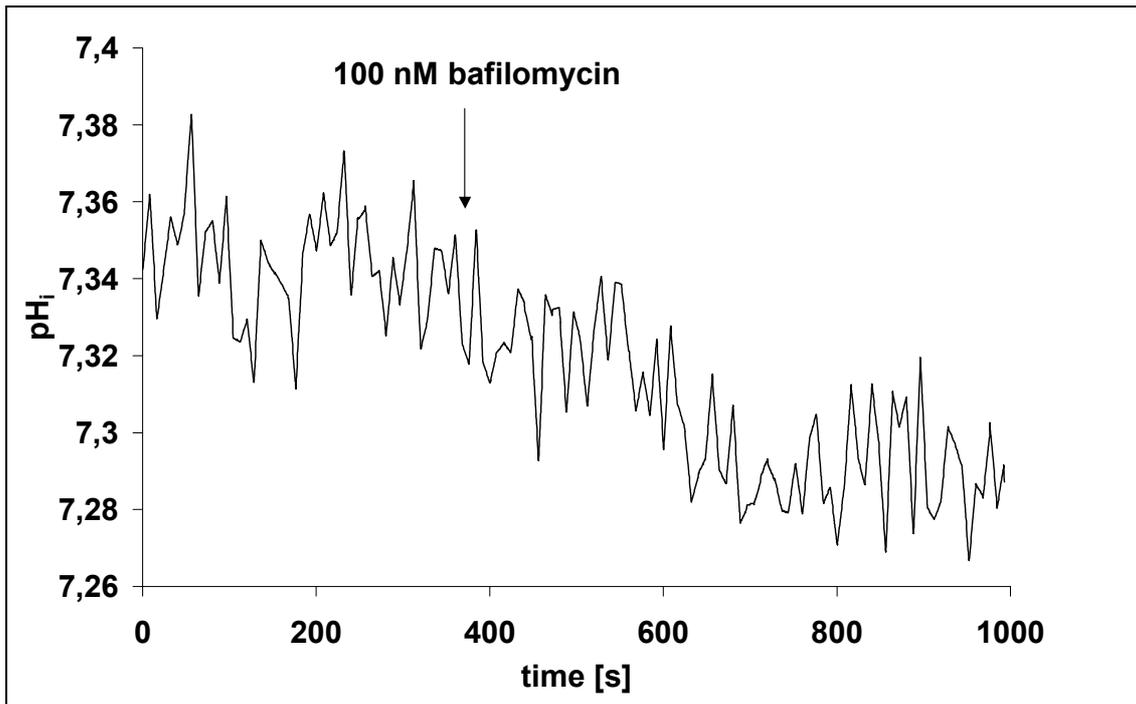


Abbildung 3.6.: Inhibition der V-Typ H^+ -ATPase durch 100 nM Bafilomycin A_1 und der Einfluß auf den Ruhe pH_i . Kurve gemittelt ($n = 5$).

3.2.2. Hemmung des pH_i -Wiederanstieg durch Bafilomycin A_1

Der Wiederanstieg des pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat wird fast ausschließlich in der frühen Phase durch 10 μ M Bafilomycin A_1 gehemmt. Nach einem Abfall des pH_i um $0,38 \pm 0,01$ Einheiten findet über 3 min kein Wiederanstieg statt. Dies bewirkt eine stark verringerte Steigung im frühen Auswertintervall, in dem nur $27,66 \pm 1,65\%$ des Kontrollwertes erreicht werden. In dieser frühen Phase ist der Wiederanstieg also fast aufgehoben. In der sich anschließenden späten Phase des Wiederanstiegs ist die Steigung zwar noch signifikant niedriger ($p < 0,05$) als die der Kontrollmessung, jedoch ist die Kurve annähernd parallel, so daß man in dieser Phase nur von einer schwachen Hemmung sprechen kann. ΔpH_{wa} ist um $0,07 \pm 0,008$ Einheiten kleiner als die Kontrollmessungen und damit signifikant verringert ($n = 3$, s. Abb. 3.7.).

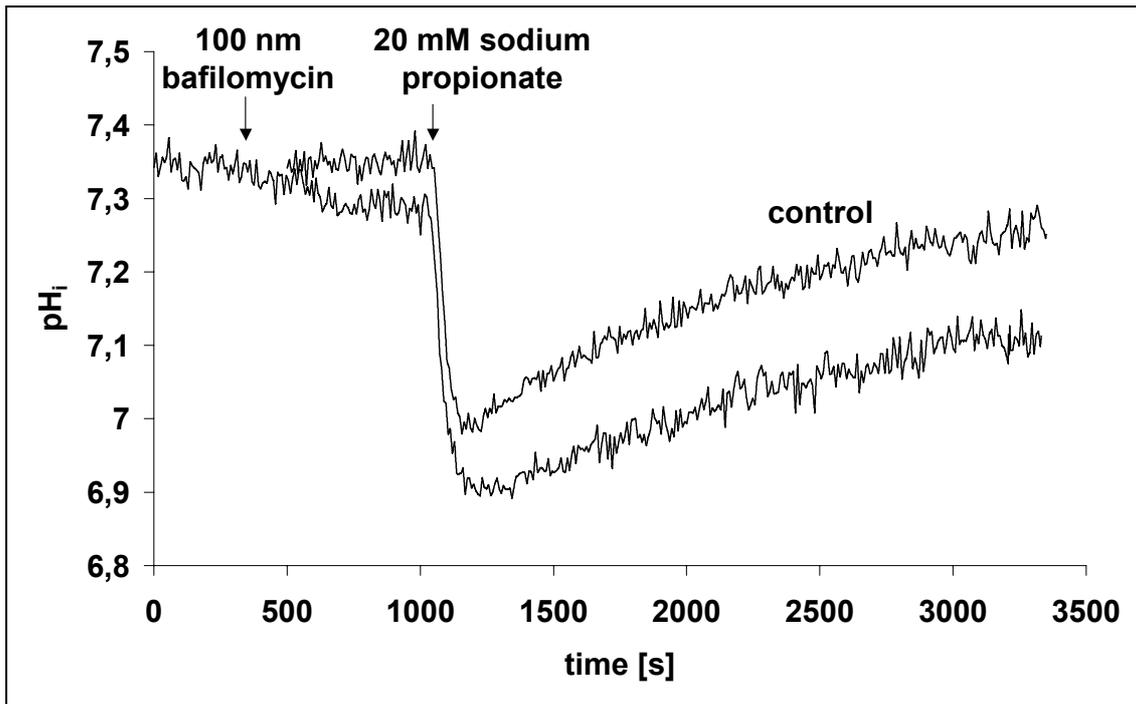


Abbildung 3.7.: Die V-Typ H^+ -ATPase wird durch 100 nM Bafilomycin A_1 gehemmt, der Wiederanstieg nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat ist anschließend verlangsamt.

3.3. Untersuchung des Natrium-Wasserstoff-Austauschers

3.3.1. Effekte von EIPA auf den Ruhe pH_i

Die Hemmung des $Na^+/-H^+$ -Austauschers durch das Amiloridanalogen EIPA (N-ethyl-N-isopropyl-Amilorid) führt nach kurzer Latenzzeit zu einem konzentrationsabhängigen Abfall des pH_i ohne Wiederanstieg. EIPA-Konzentrationen von 1 μM führen zu einem stetigen Abfall des pH_i um $0,17 \pm 0,02$ pH-Einheiten innerhalb einer Stunde. Nach dieser Zeit bleibt er auf einem niedrigeren Niveau stabil.

10 μM EIPA haben einen kurzen steilen Abfall des pH-Wertes zur Folge, der anschließend langsamer wird und nach einer Stunde einen stabilen Wert ausbildet. Im Mittel liegt er $0,25 \pm 0,01$ pH-Einheiten tiefer als der Ausgangs-pH.

Auch 20 μM EIPA bewirken einen steilen Abfall des pH_i , der sich nach ca. 10 min verlangsamt und noch ca. 30 - 40 min andauert. Anschließend bleibt er auf einem Niveau stabil, das im Mittel $0,27 \pm 0,035$ pH-Einheiten unter dem Ausgangs-pH liegt (Abb. 3.8.).

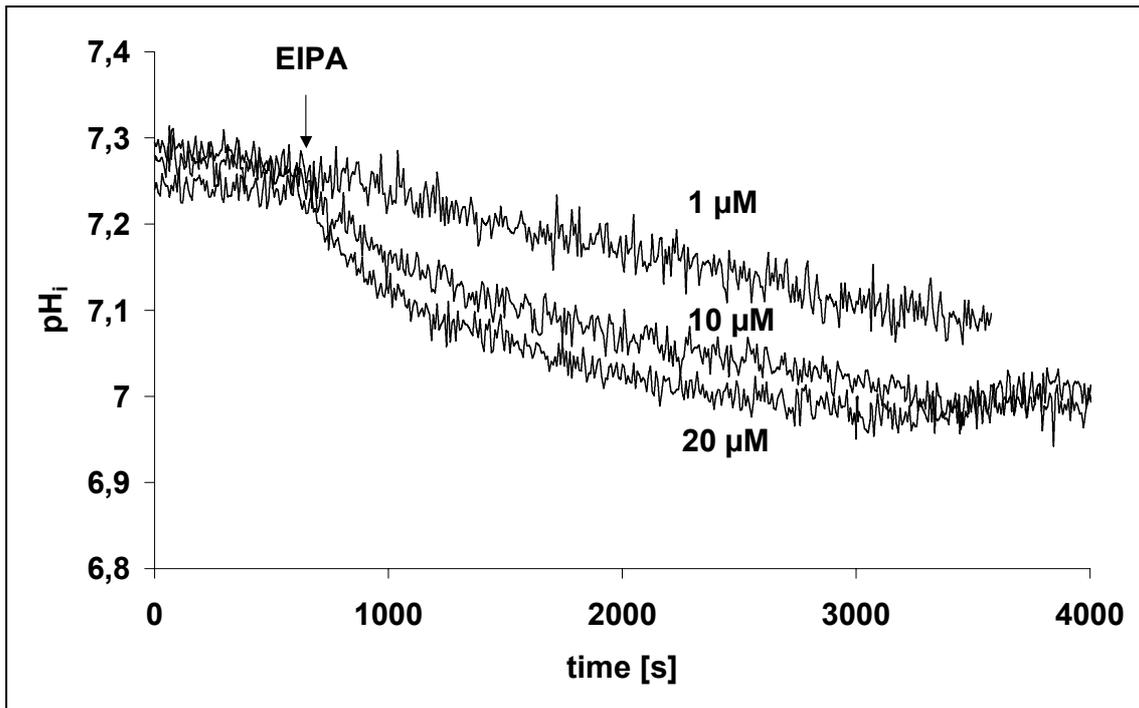


Abbildung 3.8.: Ansäuerung der Zellen nach Blockade des NHE durch Zugabe von 1-, 10- bzw. 20 μM EIPA.

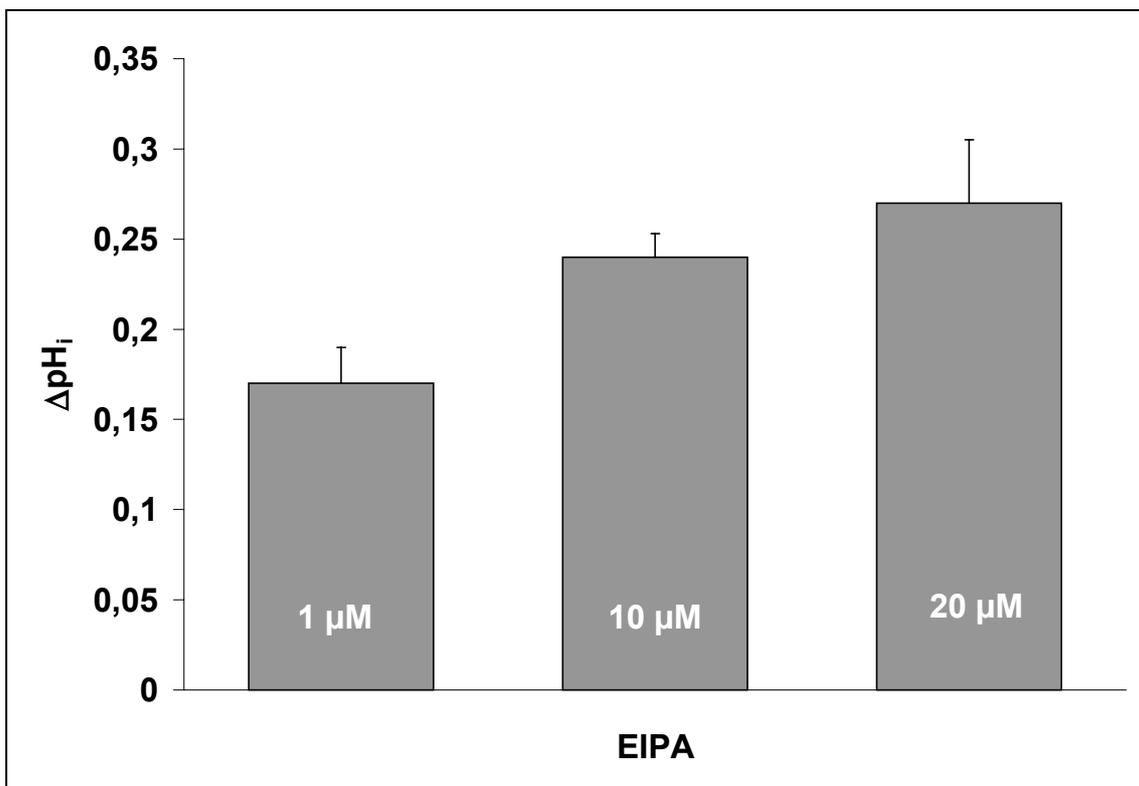


Abbildung 3.9.: Darstellung des pH-Abfalls nach Gabe von 1 μM , 10 μM und 20 μM EIPA nach einer Stunde. $n = 5$ für die Zugabe von 10 und 20 μM , $n = 3$ für die Zugabe von 1 μM . Für alle Messungen untereinander gilt $p < 0,05$.

3.3.2. Hemmung des pH_i -Wiederanstiegs durch Gabe von EIPA

Der pH_i wird initial durch die Gabe von $10 \mu\text{M}$ EIPA um $0,24 \pm 0,03$ Einheiten gesenkt. Nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat fällt er steil weiter um $0,22 \pm 0,02$ Einheiten. Der Wiederanstieg muß wiederum in zwei Abschnitte unterteilt werden. Zunächst ist die Steigung des Wiederanstiegs im frühen Auswertintervall mit $81,82 \pm 4,23\%$ gegenüber der Kontrollmessung kaum abgeschwächt. Anschließend flacht die Kurve jedoch deutlich ab und die Höhe des Wiederanstiegs ist mit $0,18 \pm 0,01$ pH-Einheiten im Vergleich zur Kontrollmessung ($0,27 \pm 0,03$) deutlich niedriger. EIPA hemmt demnach fast ausschließlich die späte Phase des Wiederanstiegs ($n = 4$, s. Abb. 3.10).

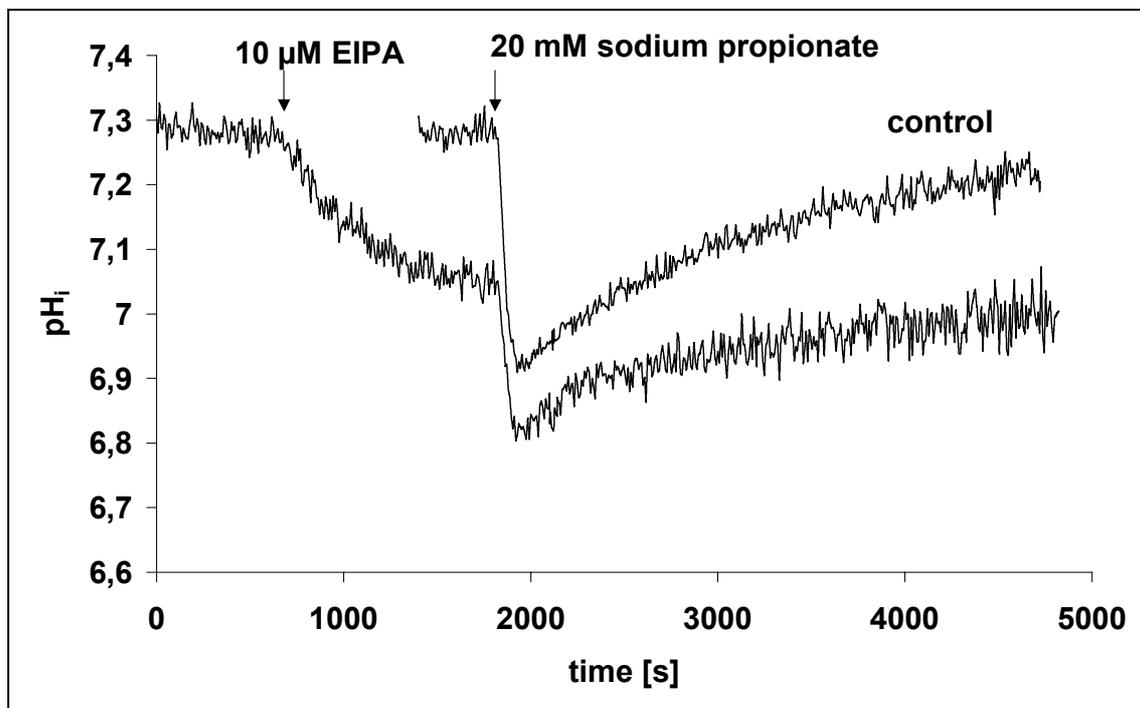


Abbildung 3.10.: Der pH_i nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ EIPA und der Wiederanstieg nach Zugabe von 20 mM Natriumpropionat. Zum Vergleich eine Kontrollmessung ohne Zugabe von EIPA.

3.3.3. Einfluß von Na^+ -freier PSS auf den Ruhe pH_i

Da die Wirkung des NHE vom Natriumgradienten über der Zellmembran abhängt, ist es möglich, ihn durch Verwendung von Cholinchlorid anstelle von Natriumchlorid in der PSS zu hemmen. Durch das Fehlen von Na^+ in der extrazellulären Flüssigkeit wird der Gradient, der durch eine hohe extrazelluläre und eine niedrige intrazelluläre Na^+ -Konzentration gegeben ist, aufgehoben. Im ersten Versuchsaufbau wird das Deckglas wie im Methodikteil beschrieben präpariert. Die Küvette mit den Zellen wird mit normaler PSS perfundiert. Nach 200 s wird die PSS durch Na^+ -freie PSS ersetzt. Nach einer kurzen Latenzzeit von 60 s fällt der pH_i innerhalb von 140 s um $0,07 \pm 0,015$ pH-Einheiten und verbleibt auf diesem Niveau (s. Abb. 3.11.)

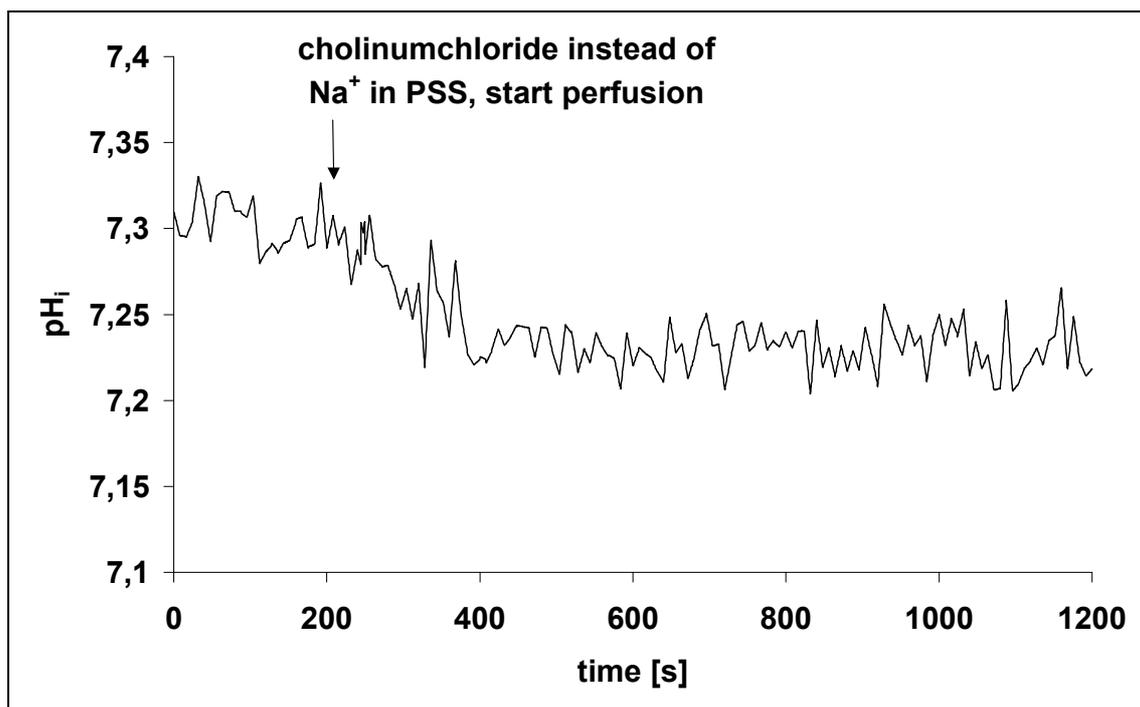


Abbildung 3.11.: Einfluß einer natriumfreien PSS auf den Ruhe-pH. Bei 200 s wird die Perfusion auf natriumfreie Lösung umgestellt. $n = 4$, gemittelte Kurve.

3.3.4. Hemmung des Wiederanstiegs durch Verwendung von Na⁺-freier PSS

Die Zellen werden direkt aus dem Nährmedium in die natriumfreie Lösung gesetzt, die Zeit in dieser Lösung vor Beginn der Messung beträgt also ca. 40 min. Der nach intrazellulärer Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat stattfindende, steile Abfall des pH_i und der sich anschließende frühe Abschnitt des Wiederanstiegs unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollmessung. Erst ca. 800 s nach t_{min} flacht der Wiederanstieg ab und verbleibt im zweiten Abschnitt auf einem Niveau, das $0,18 \pm 0,02$ pH-Einheiten ($\Delta\text{pH}_{\text{end}}$) niedriger ist als die Kontrollmessung. Wie bei der Hemmung des NHE mit EIPA wird also auch hier praktisch ausschließlich die späte Phase des Wiederanstiegs gehemmt, ein Einfluß auf die frühe Phase besteht nicht ($n = 4$, s. Abb. 3.12).

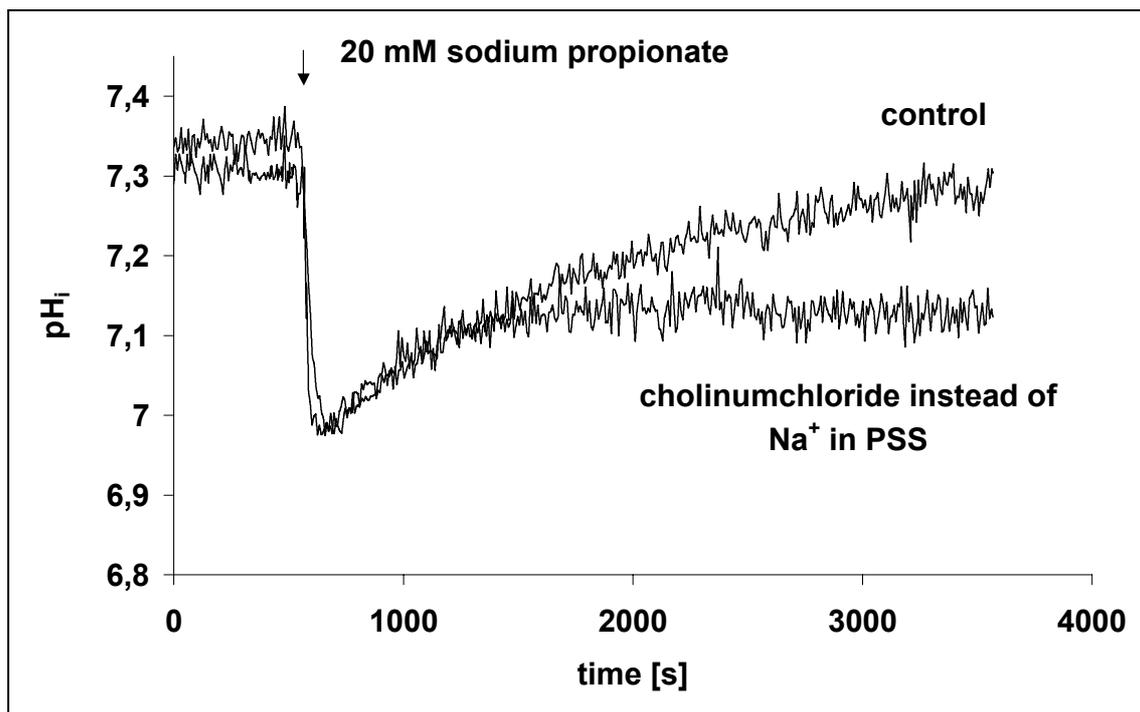


Abbildung 3.12.: Wiederanstieg nach zweistündiger Inkubation in Na⁺-freier PSS. Zugabe von 20 mM Natriumpropionat. Kontrollmessung mit normaler PSS.

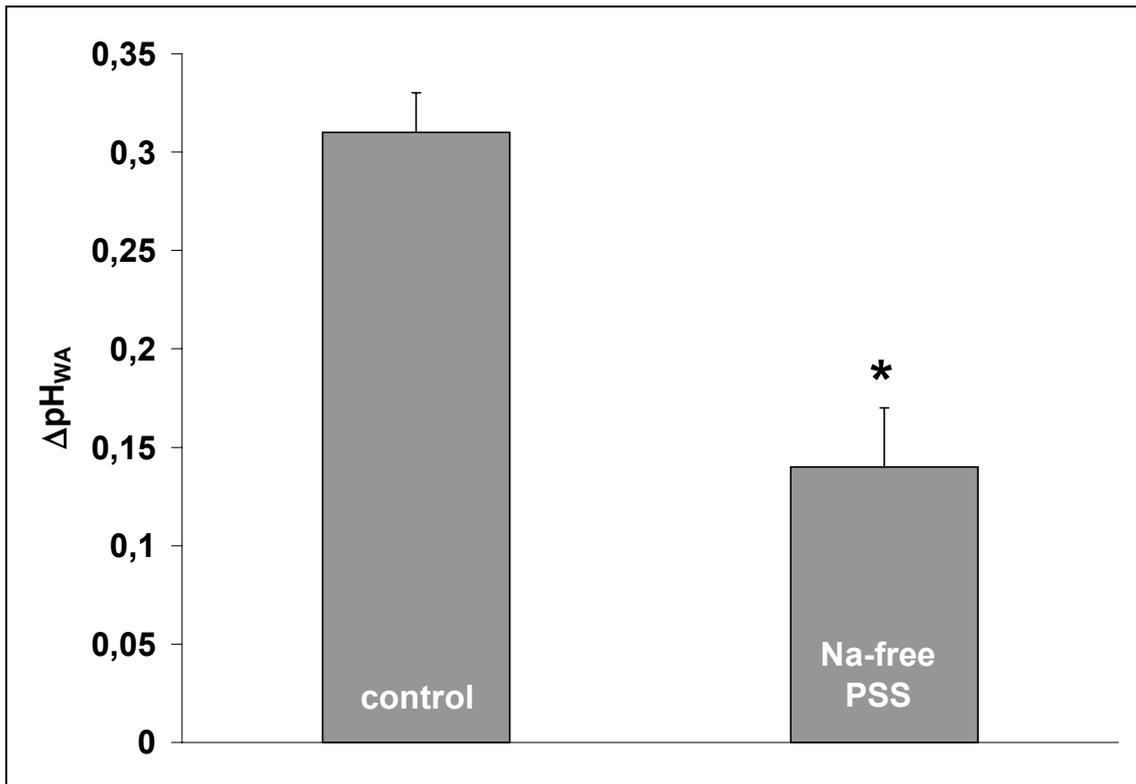


Abbildung 3.13.: Hemmung des Wiederanstiegs durch Verwendung von natriumfreier PSS. Dargestellt ist $\Delta\text{pH}_{\text{WA}}$ nach 1 h. ($n = 4$). * = das Ergebnis unterscheidet sich signifikant vom Mittelwert der Kontrollmessung ($p < 0,05$).

3.3.5. Stimulierung des NHE durch Verwendung von kaliumfreier PSS in Ruhe

Wie im Abschnitt 3.3.4 dargestellt, ist es möglich, den NHE durch eine erniedrigte $[\text{Na}^+]_e$ zu hemmen. Im Umkehrschluß ist es möglich, ihn durch eine erhöhte Konzentration zu stimulieren.

In dieser Untersuchung wird bei gleicher Methodik wie in 3.3.4. die PSS durch eine Lösung ersetzt, in der statt Kalium gleiche Anteile Natrium verwendet werden. Durch Ersetzen des Kaliums durch Natrium in der PSS wird isoosmolar der Natriumgradient über der Zellmembran erhöht. Der NHE wird dadurch stimuliert und H^+ -Ionen werden vermehrt aus der Zelle transportiert. Nach Umstellen der Perfusion auf K^+ -freie PSS steigt der pH_i nach einer Latenzzeit von $t = 45$ s um $\Delta\text{pH}_i = 0,04 \pm 0,01$ Einheiten. Nach einer Anstiegszeit von 250 s stellt sich ein neuer Ruhe-pH auf diesem höheren Niveau ein.

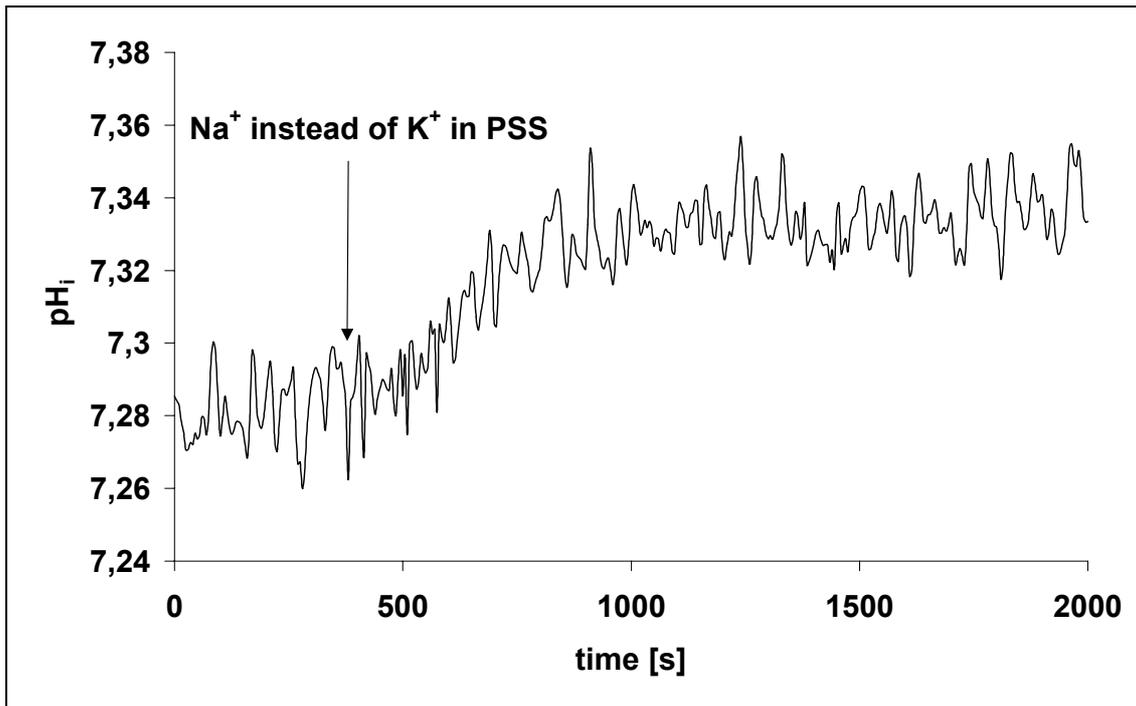


Abbildung 3.14.: Anstieg des Ruhe-pH nach Umstellen der Perfusion auf K⁺-freie PSS. Bei 500 s wurde die PSS durch K⁺-freie PSS ersetzt. Kurve gemittelt ($n = 3$).

3.3.6. Stimulierung des Wiederanstiegs durch Verwendung von K⁺-freier PSS

Die Zellen werden wie in 3.3.4. direkt aus dem Nährmedium in die kaliumfreie PSS gesetzt, sind also vor Meßbeginn 40 min in der Lösung.

Nach der Zugabe von 20 mM Natriumpropionat fällt der pH_i zunächst steil ab, erreicht jedoch nur einen pH_{min} von $7,08 \pm 0,05$, während die Kontrollmessungen bis auf einen pH_{min} von $6,89 \pm 0,07$ abfallen. Der sich anschließende Wiederanstieg ist um $14,29 \pm 6,23\%$ steiler als die Kontrollmessungen. Der pH_i nach 2 h (pH_{end}) liegt bei Verwendung einer kaliumfreien PSS um $0,08 \pm 0,01$ Einheiten höher als der Ausgangs-pH, in den Kontrollmessungen liegt er $0,07 \pm 0,02$ Einheiten niedriger. Stimuliert wird vor allem die frühe Phase des Wiederanstiegs, die pH-Wertkurve in der späten Phase verläuft annähernd parallel mit der der Kontrollmessung ($n = 5$).

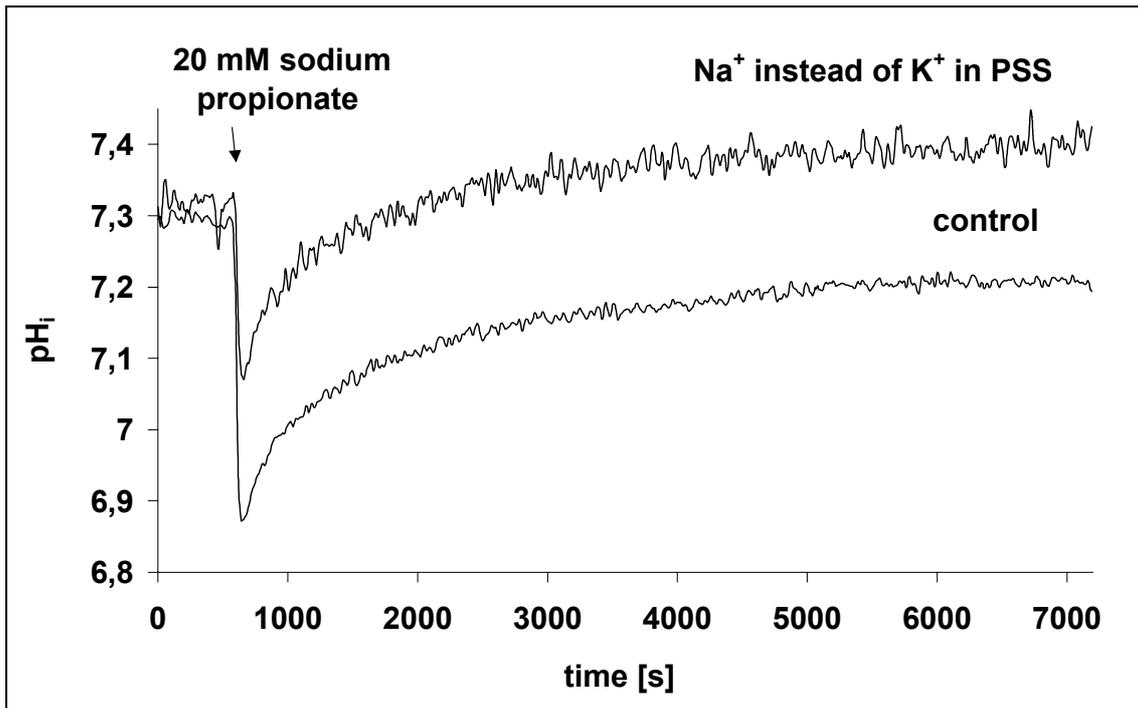


Abbildung 3.15.: Wiederanstieg nach 40 min Inkubation in K⁺-freier PSS. Zugabe von 20 mM Natriumpropionat. Kontrollmessung in normaler PSS.

3.3.7. Blockade der Na⁺-/K⁺-ATPase durch Ouabain

Mit dem Glycosid Ouabain ist es möglich, die Na⁺-/K⁺-ATPase spezifisch zu hemmen. Dadurch wird, indirekt über eine Verringerung des Natriumgradienten über der Zellmembran, auch der NHE inhibiert.

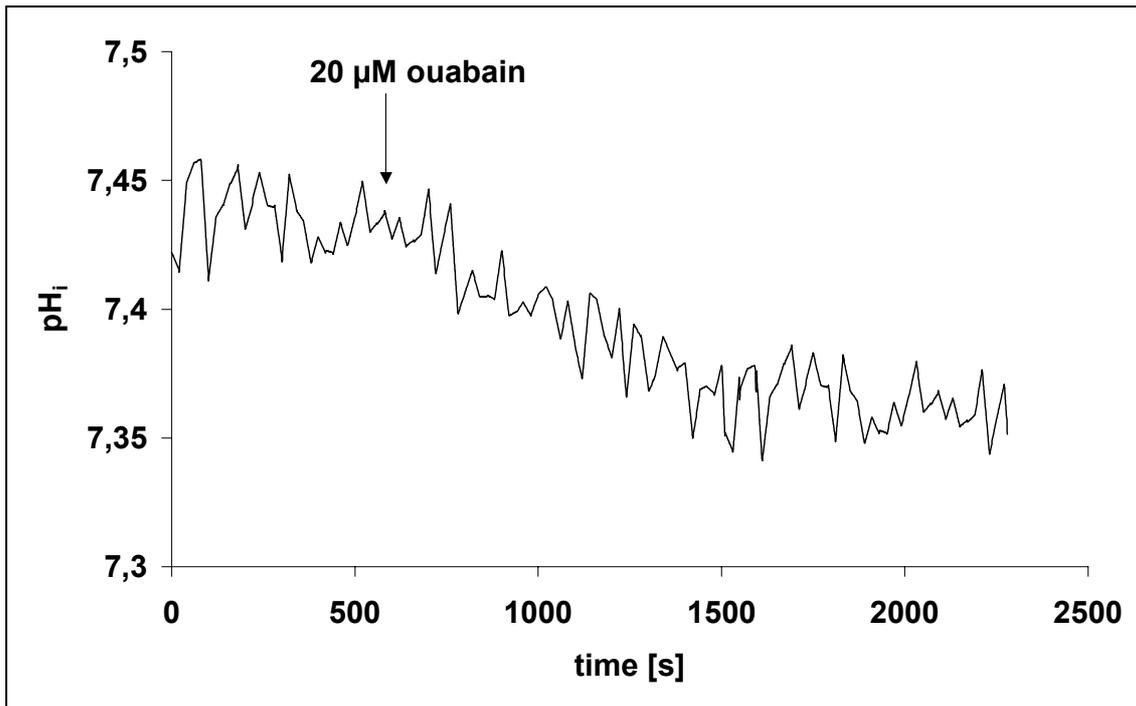


Abbildung 3.16.: Einfluß von 20 µM Ouabain auf den Ruhe pH. Gemittelte Kurve aus $n = 3$ Messungen.

In den MCF-7 Zellen ist dieses nur begrenzt möglich. Der initiale Abfall des pH_i ist mit 0,47 pH-Einheiten um $0,07 \pm 0,02$ Einheiten geringer als die Kontrollmessungen. Der Wiederanstieg ist unter Ouabaineinfluß jedoch um $45,45 \pm 4\%$ steiler als die Kontrollmessungen. Der stärkere initiale pH-Abfall wird durch diesen steileren Wiederanstieg vollständig ausgeglichen, so daß der pH-Wert nach einer Stunde gleich dem der Kontrollmessung ausfällt ($n = 4$).

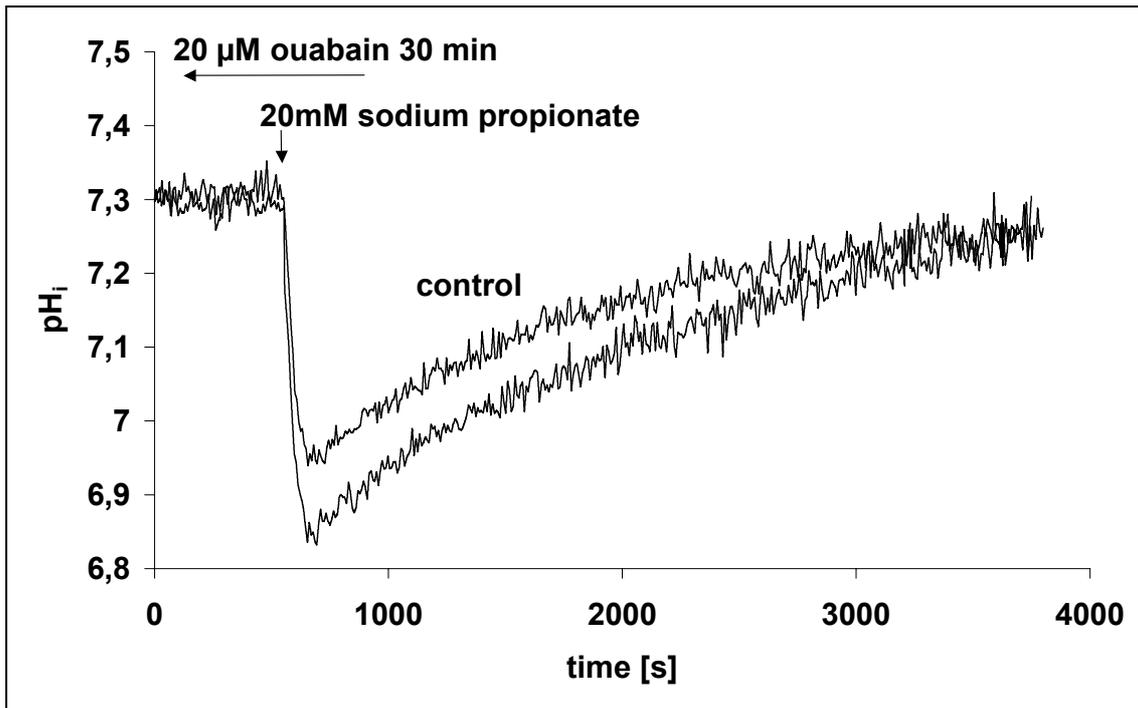


Abbildung 3.17.: Der pH_i nach 30-minütiger Inkubation in 20 μM Ouabain und anschließender Zugabe von 20 mM Natriumpropionat.

3.4. Untersuchung des H^+ -Lactat-Symports

3.4.1. Lonidamininduzierte pH_i -Effekte

Lonidamin (LND) beeinflusst die Hintergrundfluoreszenz nicht. Die Hemmung des H^+ -Lactat-Symports bewirkt in den MCF-7 Zellen nach einer kurzen Latenzzeit von 16 ± 3 s einen konzentrationsabhängigen Abfall des pH_i . Ein Wiederanstieg findet nicht statt. Wäscht man das Lonidamin wieder aus, ist der Effekt noch nach einer Stunde reversibel (ohne Abbildung).

Nach Gabe von 10 μM Lonidamin fällt der pH_i in einer Zeit von 10 min um $0,14 \pm 0,02$ pH-Einheiten ab und bleibt dann auf dem Wert des pH_{min} stabil. Im Verlauf von 40 min sinkt er langsam weiter um $0,04 \pm 0,01$ pH-Einheiten ab.

Nach Gabe von 100 μM Lonidamin sinkt der pH_i der MCF-7 Zellen innerhalb von 450 ± 43 s um $0,41 \pm 0,05$ pH-Einheiten ab. Anschließend bleibt der pH_i auf diesem Wert stabil und sinkt nicht mehr weiter ab (für die Zugabe von 10 μM Lonidamin ist $n = 5$, für die Zugabe von 100 μM ist $n = 4$).

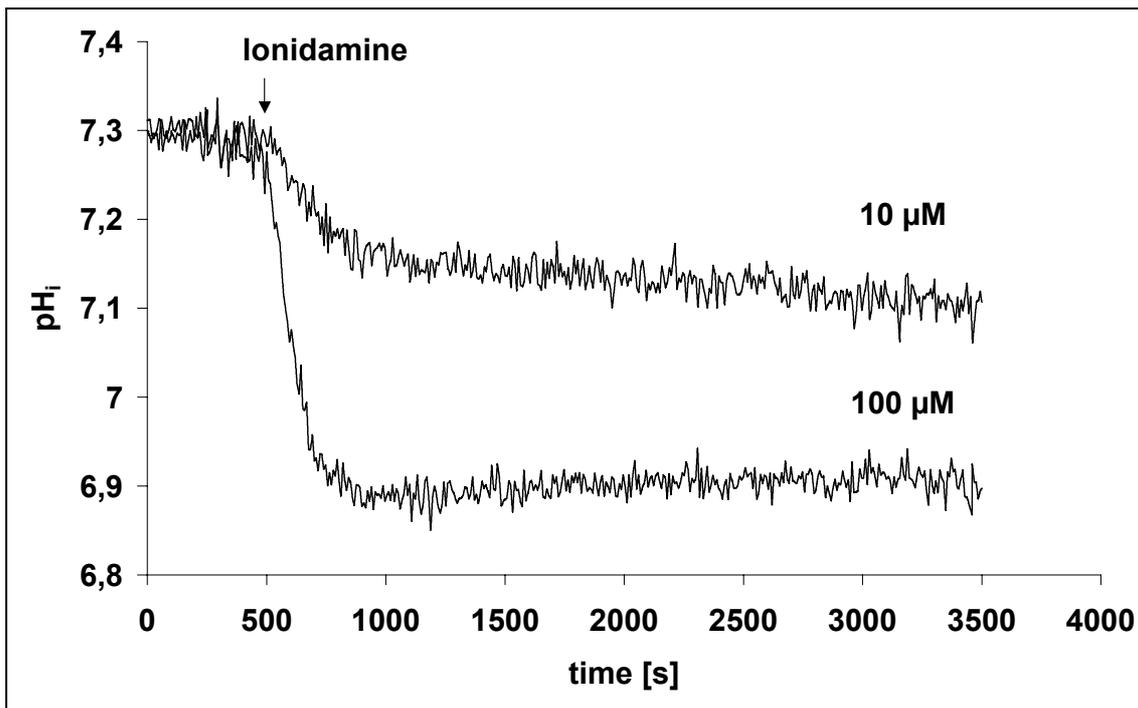


Abbildung 3.18.: Inhibition des H^+ -/Lactat-Symports durch Lonidamin. Obere Kurve: Hemmung mit $10 \mu\text{M}$, untere Kurve: Hemmung mit $100 \mu\text{M}$.

3.4.2. Hemmung des pH_i Wiederanstiegs durch Lonidamin

Durch Gabe von $10 \mu\text{M}$ Lonidamin lässt sich die späte Phase des Wiederanstiegs des pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat hemmen. Nach der Gabe des Lonidamins sinkt der pH_i wie in 3.4.1. beschrieben um $0,14 \pm 0,05$ pH-Einheiten ab. Nach 10 min ist er wieder stabil. Werden nun 20 mM Natriumpropionat zugegeben, so sinkt der pH_i um weitere $0,23 \pm 0,02$ pH-Einheiten ab. Der Wiederanstieg im frühen Auswertintervall (Δt_{ausw}) verhält sich zunächst wie die Kontrollmessungen, nach 500 s flacht er jedoch langsam ab und ΔpH_{wa} liegt um $0,08 \pm 0,01$ pH-Einheiten niedriger als die Kontrollmessungen ($p < 0,05$). In der frühen Phase findet also keine Hemmung statt ($n = 5$).

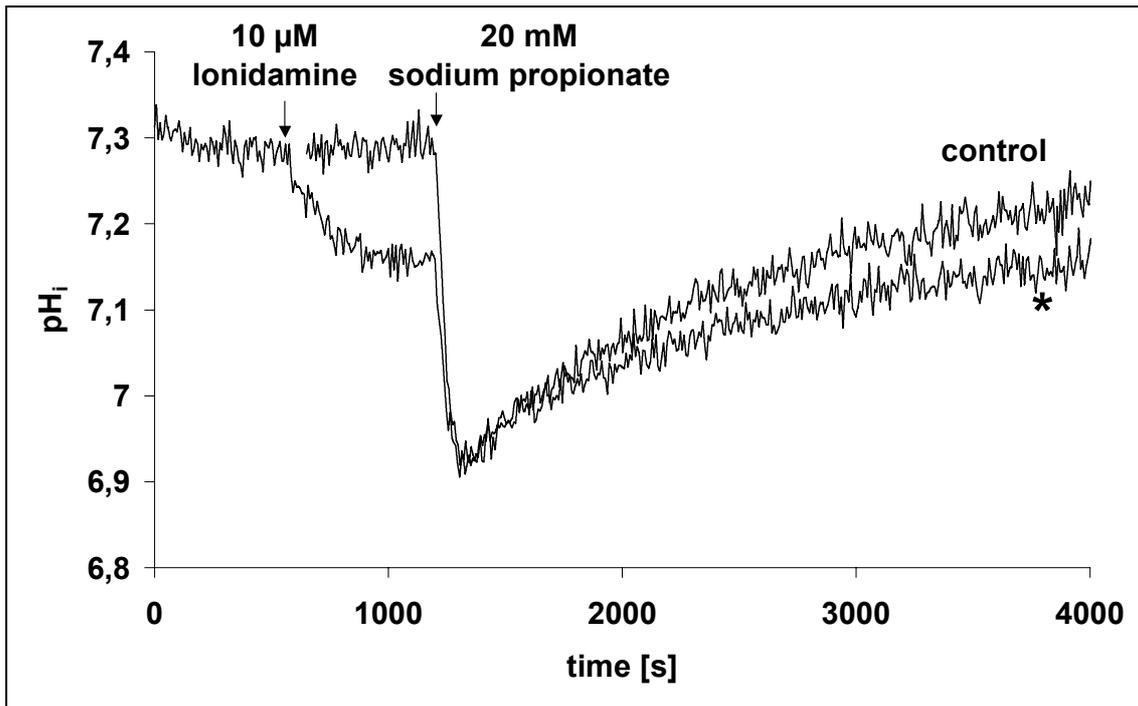


Abbildung 3.19.: Gabe von 20 mM Natriumpropionat nach vorheriger Inhibition des Lactat-/ H^+ -Symports durch 10 μ M Lonidamin. * = ΔpH_{wa} ist signifikant kleiner als der Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

3.5. Hemmung der V-Typ H^+ -ATPase, des NHE und des H^+ -Lactat-Symports und Einfluß auf den Wiederanstieg des pH_i

Werden gleichzeitig die V-Typ H^+ -ATPase durch Bafilomycin A_1 , der NHE durch EIPA und der H^+ -Lactat-Symports durch Lonidamin gehemmt, so fällt der pH_i in $t = 950 \pm 45$ s um $0,41 \pm 0,03$ pH-Einheiten ab und verbleibt ohne Wiederanstieg auf diesem Niveau. ($n = 3$, s. Abb. 3.20.)

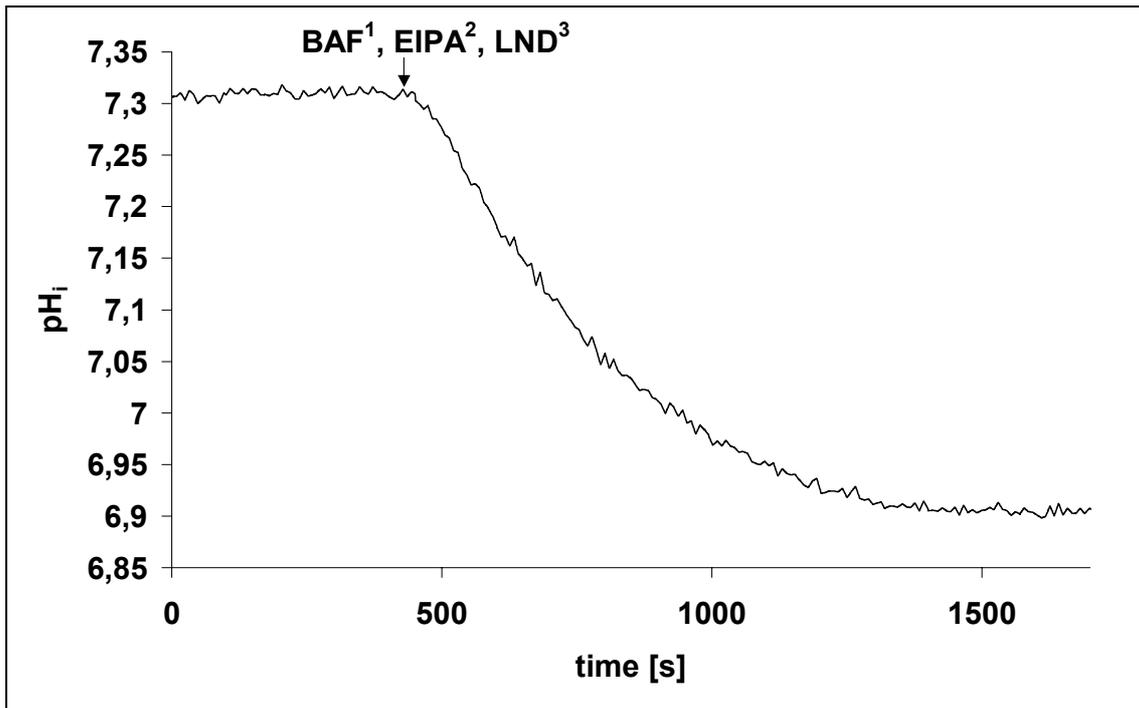


Abbildung 3.20.: Hemmung der V-Typ H⁺-ATPase durch 100 nM Bafilomycin A₁ (1), des NHE durch 10 μM EIPA (2) und des Lactat-/H⁺-Symports durch 10 μM Lonidamin (3).

Werden die Zellen nun mit 20 mM Natriumpropionat angesäuert, so fällt der pH_i um weitere $0,07 \pm 0,008$ Einheiten ab und der Wiederanstieg ist vollständig gehemmt. ($n = 3$, s. Abb. 3.21.)

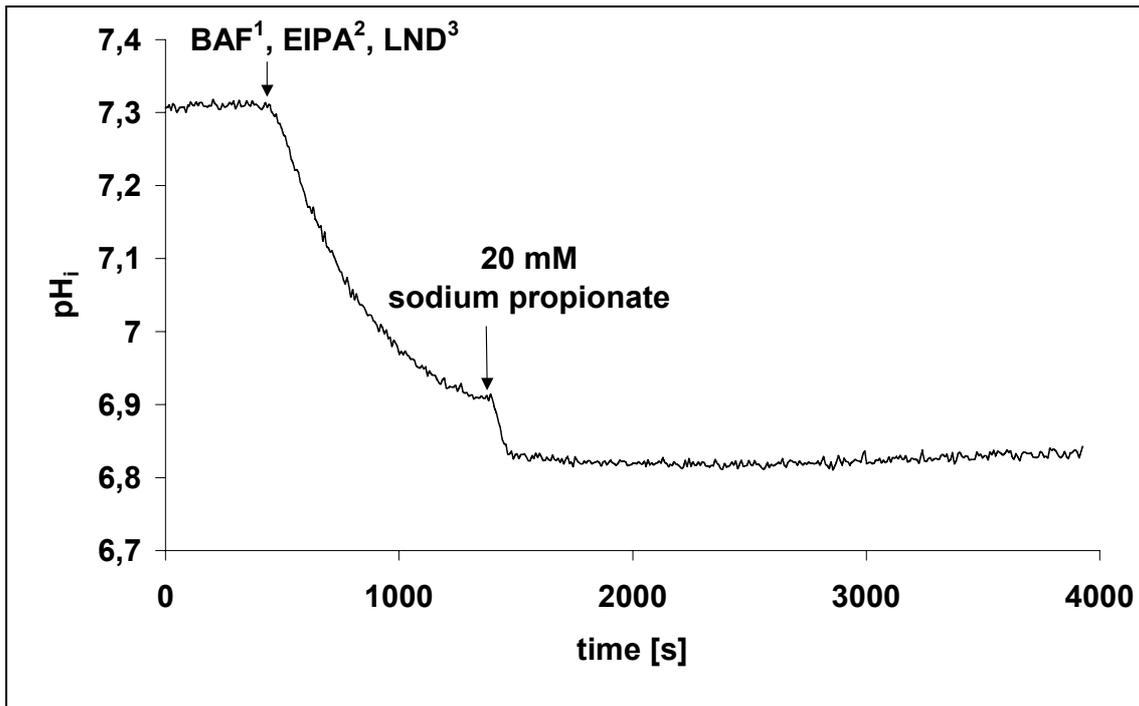


Abbildung 3.21.: Hemmung der V-Typ H⁺-ATPase durch 100 nM Bafilomycin A₁ (1), des NHE durch 10 μM EIPA (2) und des Lactat-/H⁺-Symports durch 10 μM Lonidamin (3). Nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat ist kein Wiederanstieg mehr zu beobachten.

Abbildung 3.22. zeigt einen Vergleich der Wirkung von 100 nM Bafilomycin A₁ 10 μM EIPA und 10 μM Lonidamin auf den Ruhe pH_i. BAF senkt den pH_i um $0,06 \pm 0,01$ Einheiten ($n = 5$), EIPA um $0,25 \pm 0,01$ pH-Einheiten ($n = 5$) und nach Gabe von LND fällt der pH_i um $0,14 \pm 0,02$ Einheiten ($n = 5$). Durch Verwendung aller drei Substanzen zusammen fällt der pH_i um $0,38 \pm 0,011$ Einheiten ($n = 3$).

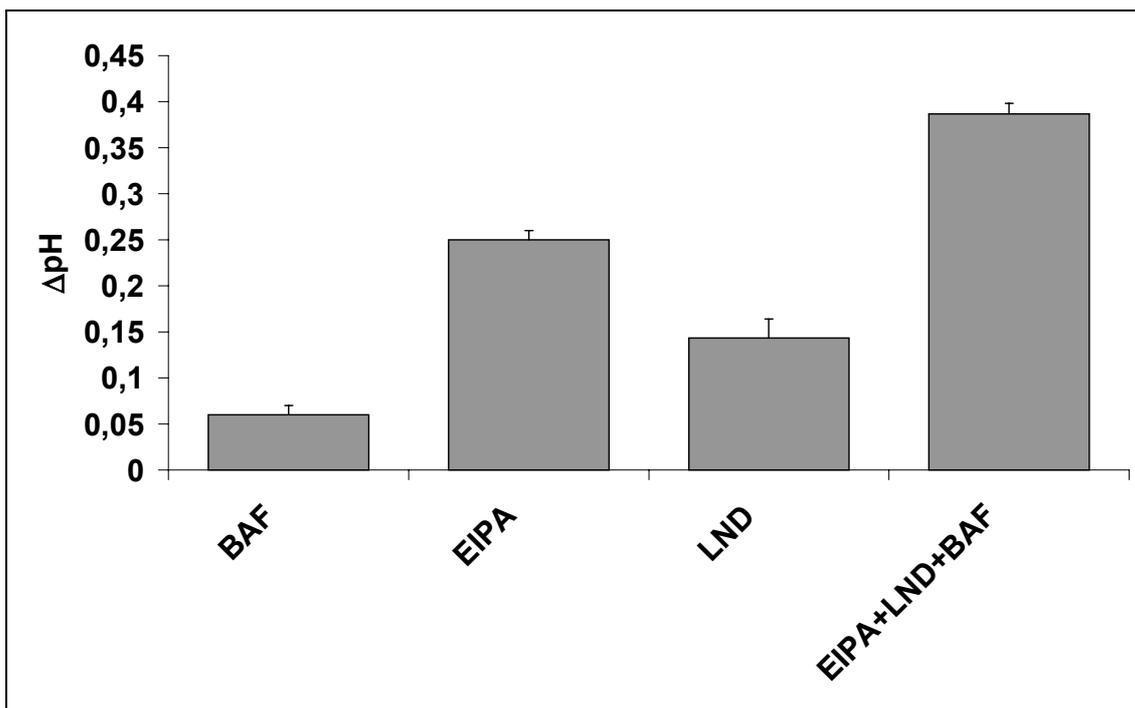


Abbildung 3.22.: Vergleich des Effektes von 100 nM Bafilomycin A₁ (BAF), 10 μM EIPA und 10 μM Lonidamin (LND) auf den Ruhe pH_i der MCF-7 Zellen. Dargestellt ist das ΔpH zwischen den Punkten t_0 und t_{min} , also der pH-Abfall aus dem Ruhezustand nach Zugabe des jeweiligen Inhibitors. Für die Einzelzugaben der Substanzen gilt jeweils $n = 5$, für die Zugabe der Substanzen zusammen gilt $n = 3$.

Fügt man die Ergebnisse der drei zentralen Hemmversuche mit Auswertung des Wiederanstiegs zusammen, so wird deutlich, daß es zwischen dem Effekt Senkung der Steigung m des Wiederanstiegs und dem Effekt Minderung des absoluten Wiederanstiegs deutliche Unterschiede gibt. So wird die schnelle Phase des Wiederanstiegs im Auswertintervall Δt_{ausw} durch BAF am stärksten gehemmt, hier werden nur noch $27,66 \pm 1,65\%$ des Kontrollwertes erreicht. EIPA hat in dieser Phase nur einen geringen Effekt, es werden $72,34 \pm 1,64\%$ des Kontrollwertes erreicht. Die Inhibition des MCT hat mit $89,36 \pm 3,45\%$ den geringsten Effekt auf die frühe Phase. Der weitere Wiederanstieg bis zum sich einstellenden Plateau wird durch die Größe $\Delta\text{pH}_{\text{WA}}$ erfaßt. Hier besitzt EIPA den stärksten Einfluß, $\Delta\text{pH}_{\text{WA}}$ ist hier $0,17 \pm 0,02$ im Gegensatz zu $0,32 \pm 0,01$ in der Kontrollmessung. BAF verringert $\Delta\text{pH}_{\text{WA}}$ auf einen Wert von $0,21 \pm 0,01$ pH-Einheiten und LND auf $0,23 \pm 0,01$ (Abbildungen 3.23. und 3.24.).

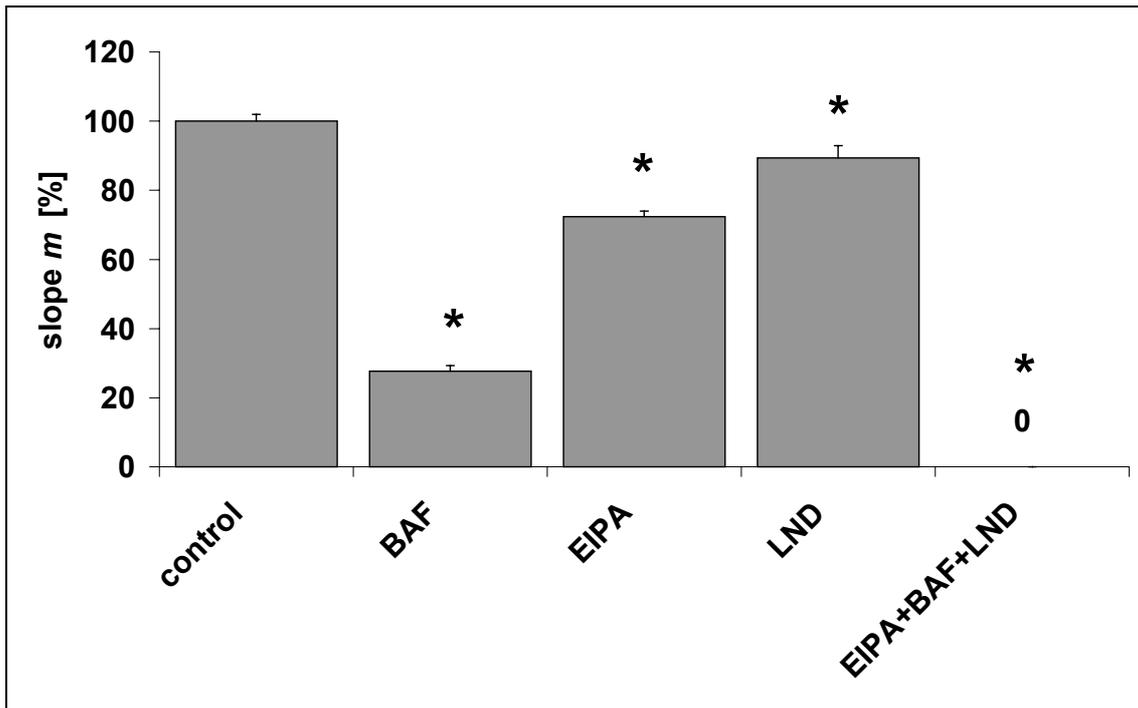


Abbildung 3.23.: Effekte von 100 μM Bafilomycin A_1 (BAF, $n = 3$), 10 μM EIPA ($n = 4$), 10 μM Lonidamin (LND, $n = 5$) und den drei Hemmstoffen zusammen auf die Steigung m der frühen Phase des Wiederanstiegs nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat (300 s) in Prozent des Mittelwertes der Kontrollmessungen. * = das Ergebnis unterscheidet sich signifikant vom Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

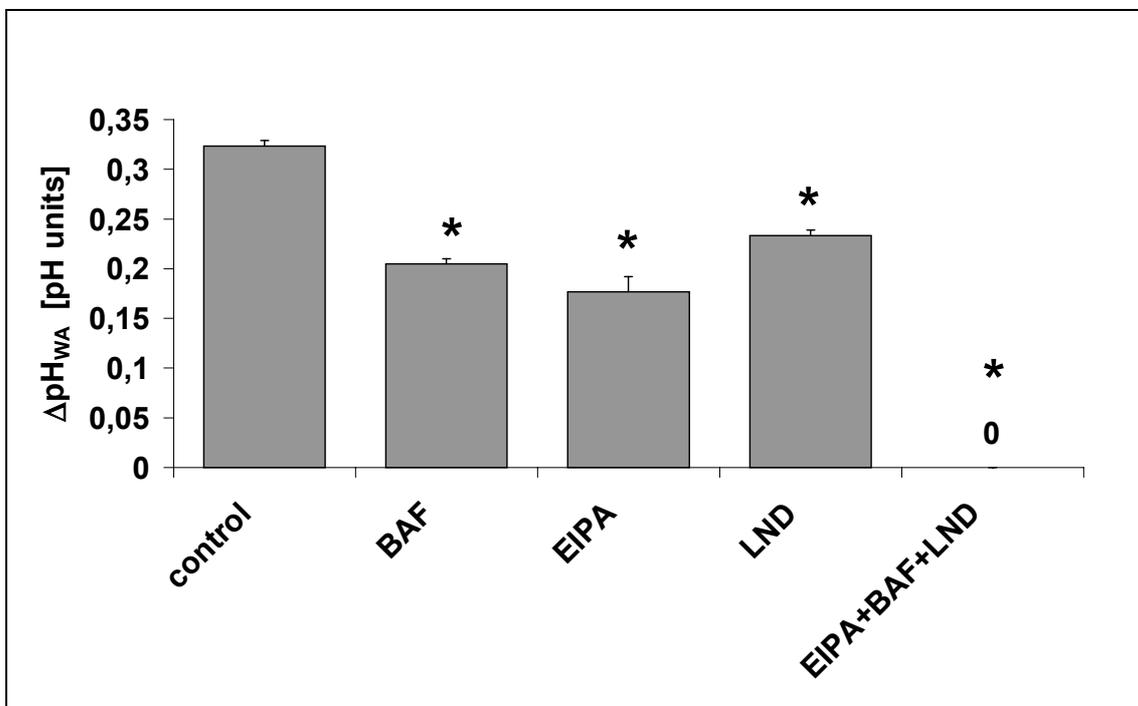


Abbildung 3.24.: Vergleich der Effekte von 100 μM Bafilomycin A_1 (BAF, $n = 3$), 10 μM EIPA ($n = 4$), 10 μM Lonidamin (LND, $n = 5$), und der drei Stoffe zusammen. Verglichen wurde die Höhe des Gesamtwiederanstiegs von pH_{min} bis pH_{end} . Nach Gabe von EIPA, LND und BAF zusammen ist der Wiederanstieg vollständig gehemmt, $\Delta\text{pH}_{\text{wa}}$ ist also null. * = das Ergebnis unterscheidet sich signifikant vom Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

3.6. Einfluß der Temperatur auf die intrazelluläre pH-Regulation

Eine Veränderung der Temperatur der Lösung hat keinen signifikanten Einfluß auf den Ruhe-pH der MCF-7 Zellen. Bei Umstellung der Perfusion auf die 22°C warme Lösung fällt der pH_i zwar leicht ab, jedoch ist der Abfall nicht signifikant ($p > 0,05$). Ebenso finden nach der Erwärmung auf 42°C keine signifikanten Veränderungen des Ruhe-pH statt.

Auf die pH-Wertregulation der MCF-7 Zellen nach Säurebelastung hingegen hat die Temperatur der PSS, in der die Messung stattfindet, großen Einfluß. Je kälter die Lösung, desto flacher und langsamer der Wiederanstieg nach Ansäuerung mit Natriumpropionat. Bei einer Umgebungstemperatur von 22°C fällt der pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat zunächst auf einen mit der Kontrollmessung vergleichbaren Tiefstwert pH_{\min} ab. Die frühe Phase des Wiederanstiegs wird nahezu vollständig unterdrückt. Nach einem schwachen, ca. 15-20 min dauernden Wiederanstieg ($m = 35,71 \pm 5,3\%$ vom Kontrollwert) fällt der pH_i wieder ab und bleibt dann ca. 0,01 pH-Einheiten unter dem pH_{\min} stabil. Ist die Lösung 42°C warm, so fällt der pH_i mit steigenden Temperaturen nach der Ansäuerung um 0,12 pH-Einheiten weniger tief ab als die Kontrollmessung und der Wiederanstieg wird um $21,42 \pm 6,2\%$ steiler als bei 37°C. Die größere Steigung läßt sich vor allem in der frühen Phase des Wiederanstiegs feststellen (für jede Temperatur ist $n = 4$).

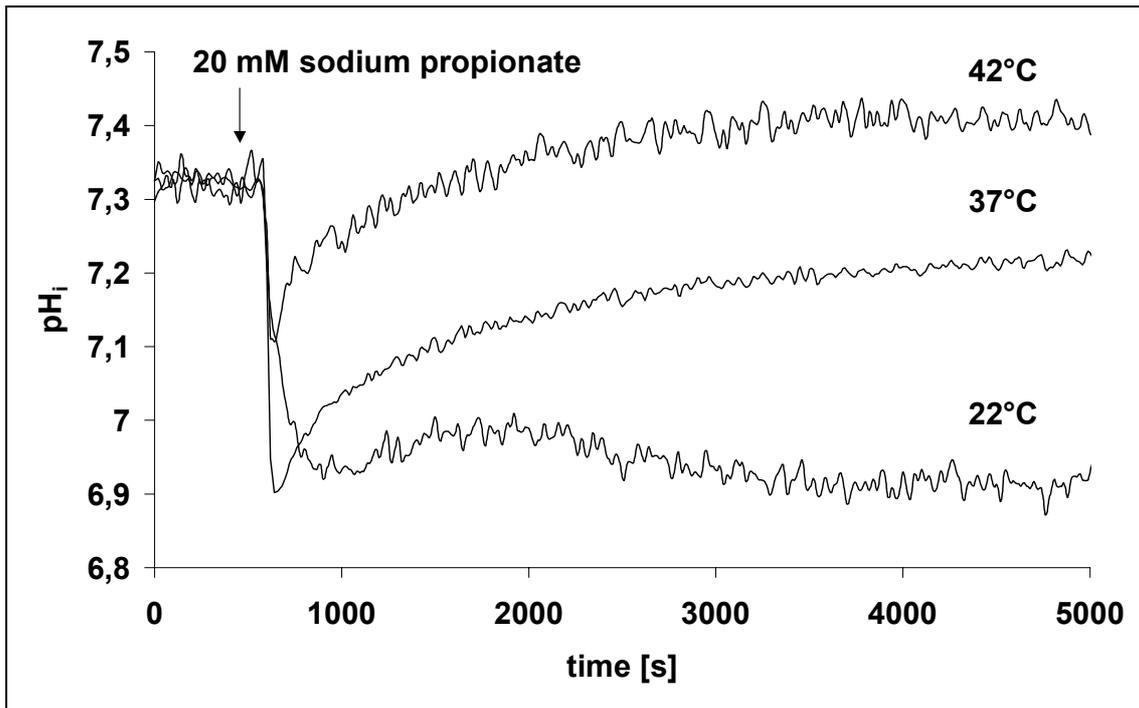


Abbildung 3.25.: Einfluß einer erhöhten (42°C) bzw. einer erniedrigten (22°C) Temperatur auf den Wiederanstieg des pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat. In der Kontrollmessung hatte die PSS in der Küvette eine Temperatur von 37°C.

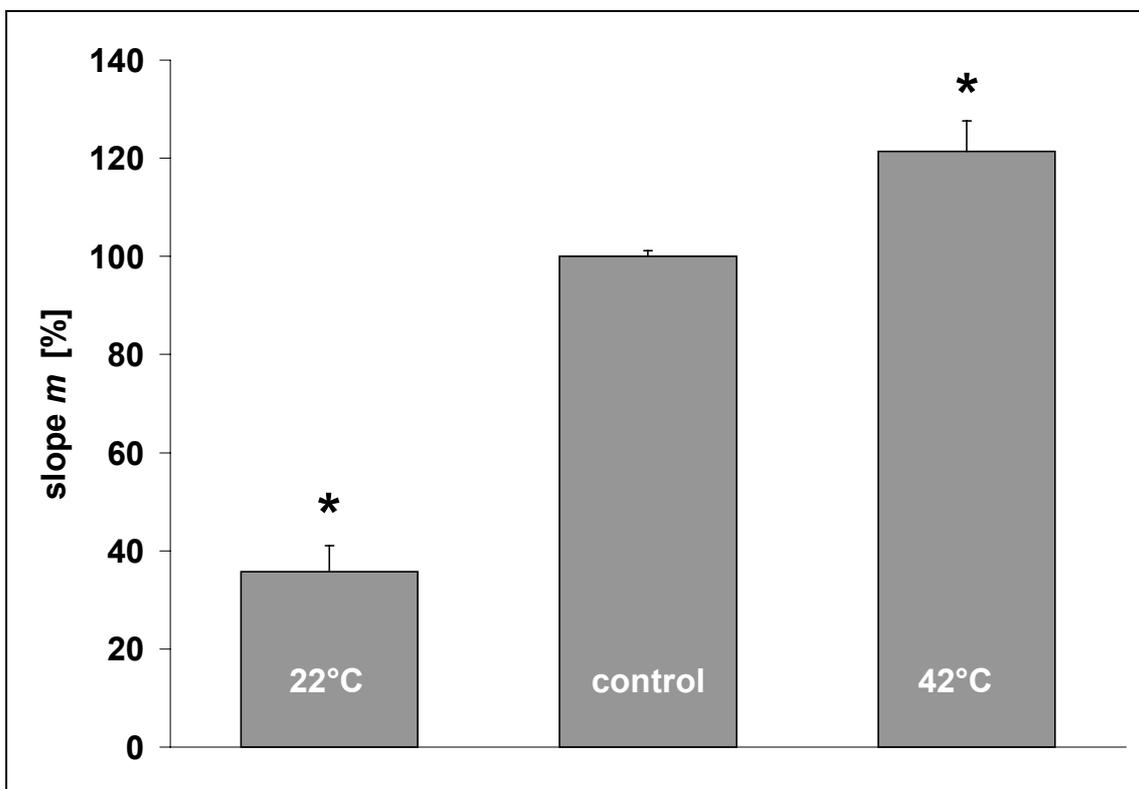


Abbildung 3.26.: Abhängigkeit der Steigung m des Wiederanstiegs von der Temperatur der umgebenden Lösung nach Säurebelastung mit 20 mM Natriumpropionat. Als 100% ist der Mittelwert aus $n = 3$ Kontrollmessungen bei 37°C definiert (jeweils $n = 4$ für 22°C und 42 °C). * = das Ergebnis unterscheidet sich signifikant vom Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

3.7. Verhalten der Zellen in Sauerstoffarmut

Der O_2 -Gehalt der PSS hatte großen Einfluß auf den pH_i der MCF-7 Zellen. Eine für 30 min mit Stickstoff durchperlte PSS senkte den pH_i in einer Zeit von 40 min um $0,09 \pm 0,01$ Einheiten. Gab man anschließend wieder eine PSS, die einen ausreichenden O_2 -Gehalt hatte, so stieg der pH_i wieder an. Abbildung 3.27. zeigt einen solchen Verlauf mit je einer zusätzlich eingezeichneten Trendlinie für jeden Abschnitt des Experiments.

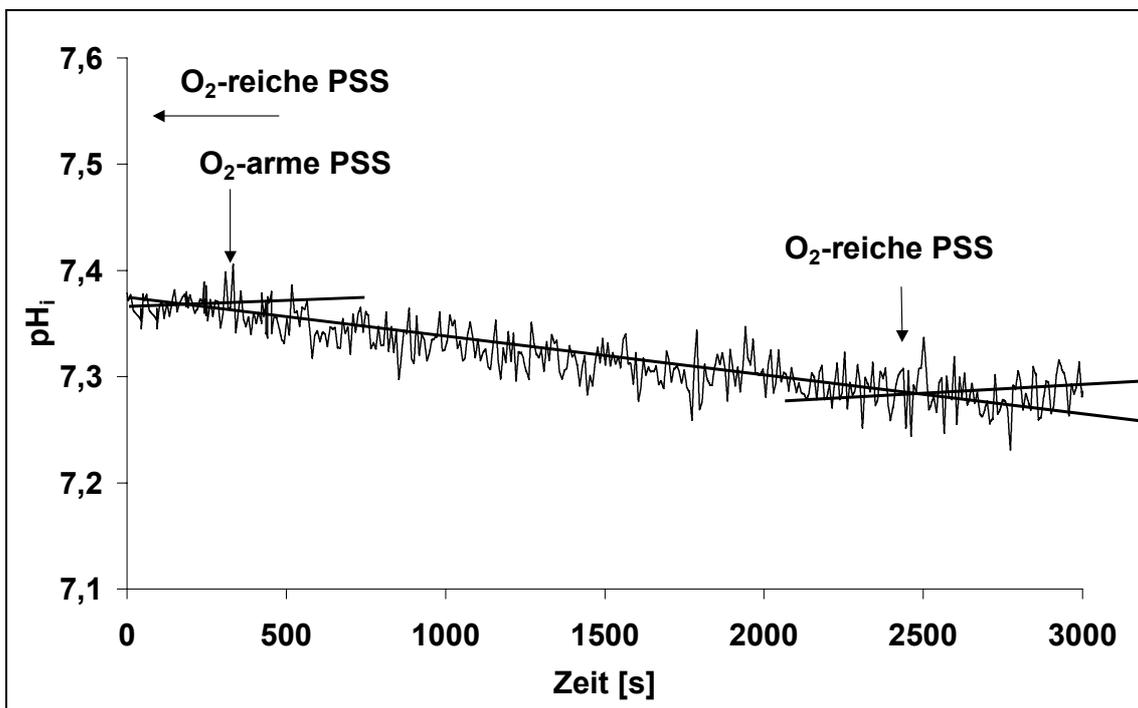


Abbildung 3.27.: Auswirkung einer sauerstoffarmen Phase auf den pH_i ; die O_2 arme Lösung wurde mit Stickstoff durchperlt. Zur besseren Darstellung sind drei Ausgleichsgeraden für die jeweiligen Abschnitte eingezeichnet (gemittelte Kurve, $n = 4$).

3.8. Stimulation der MCF-7 Zellen mit Noradrenalin

3.8.1. Noradrenalin induzierte pH_i Änderungen

Die Zugabe von $1 \mu M$ Noradrenalin bewirkt nach 13 - 20 s Latenzzeit einen Abfall des pH_i um $0,09 \pm 0,01$ Einheiten innerhalb von 310 ± 20 s. Nach dem Abfall wird der pH_i auf diesem niedrigen Niveau stabil.

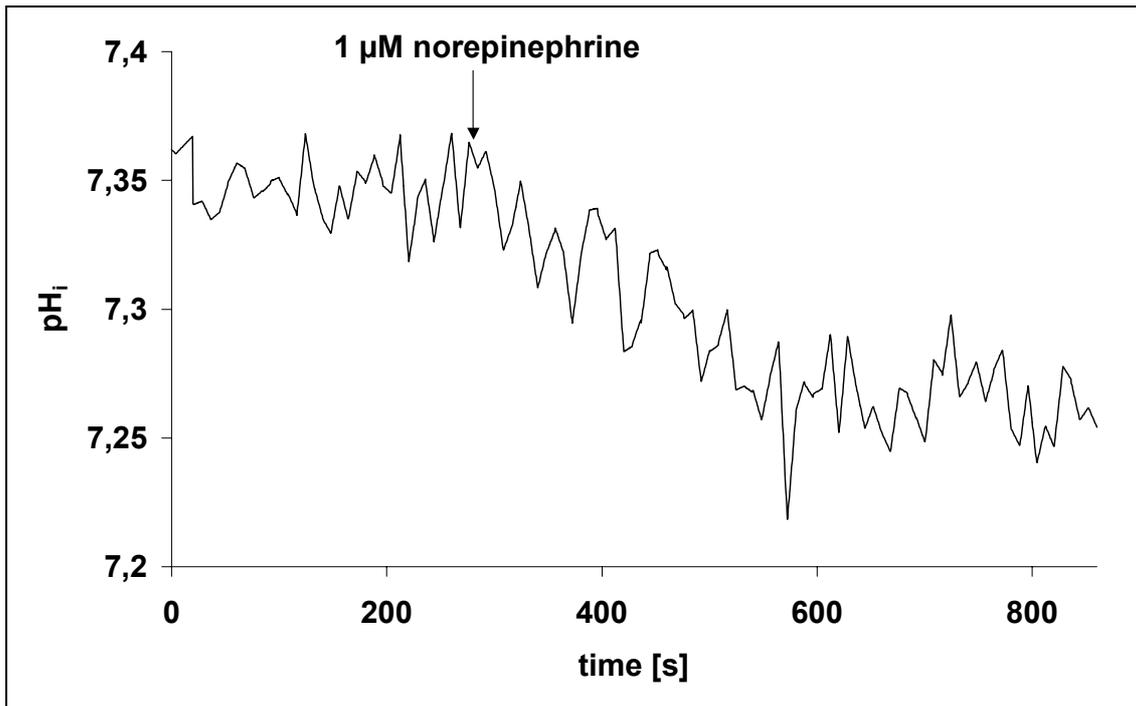


Abbildung 3.28.: Der Verlauf des pH_i nach Stimulierung der Zellen mit 1 μ M Noradrenalin (gemittelte Kurve, $n = 4$).

3.8.2. Stimulierung des Wiederanstiegs durch Noradrenalin

Der Wiederanstieg des pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat in MCF-7 Zellen lässt sich mit 1 μ M Noradrenalin verstärken. Der initiale pH_i -Abfall war um $0,09 \pm 0,004$ Einheiten höher als in den Kontrollmessungen. Der Wiederanstieg im frühen Auswertintervall verhält sich zunächst wie die Kontrollmessungen, nach 500 s wird er jedoch langsam steiler und der pH nach 1 h liegt um $0,13 \pm 0,03$ pH-Einheiten höher als die Kontrollmessungen. Stimuliert wird also nur die späte Phase des Wiederanstiegs, in der frühen Phase verlaufen Messung mit Noradrenalin und Kontrollmessung parallel ($n = 4$).

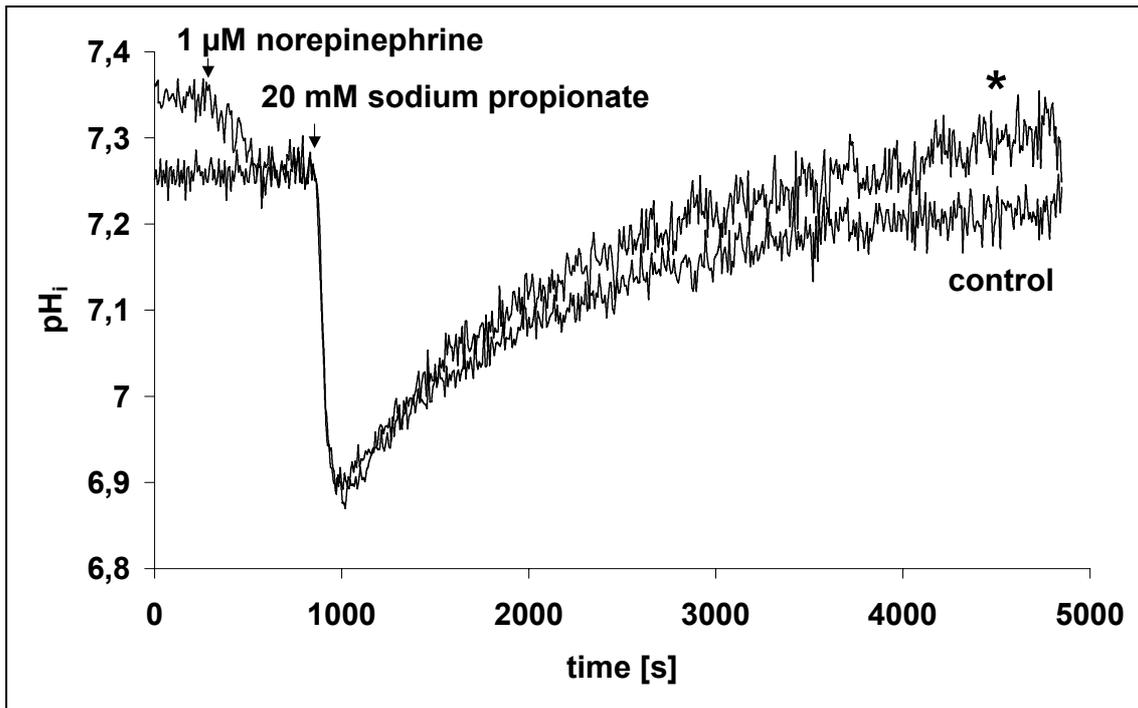


Abbildung 3.29.: Verhalten des pH_i nach Stimulierung mit $1 \mu\text{M}$ Noradrenalin und anschließender Zugabe von 20 mM Natriumpropionat. * = ΔpH_{wa} ist signifikant größer als der Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

3.9. Stimulation der MCF-7 Zellen mit extrazellulärem ATP

3.9.1. ATP induzierte pH_i -Änderungen

Extrazelluläres ATP beeinflusst die Hintergrundfluoreszenz nicht. Es verursacht eine schnelle intrazelluläre Ansäuerung der BCECF-beladenen MCF-7 Zellen ohne Wiederanstieg. Nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ ATP fällt der pH_i innerhalb von $130 \pm 4,9 \text{ s}$ um $0,09 \pm 0,02$ Einheiten. Auf diesem Niveau verbleibt er. Abbildung 3.30. zeigt eine gemittelte Kurve aus $n = 3$ Einzelmessungen.

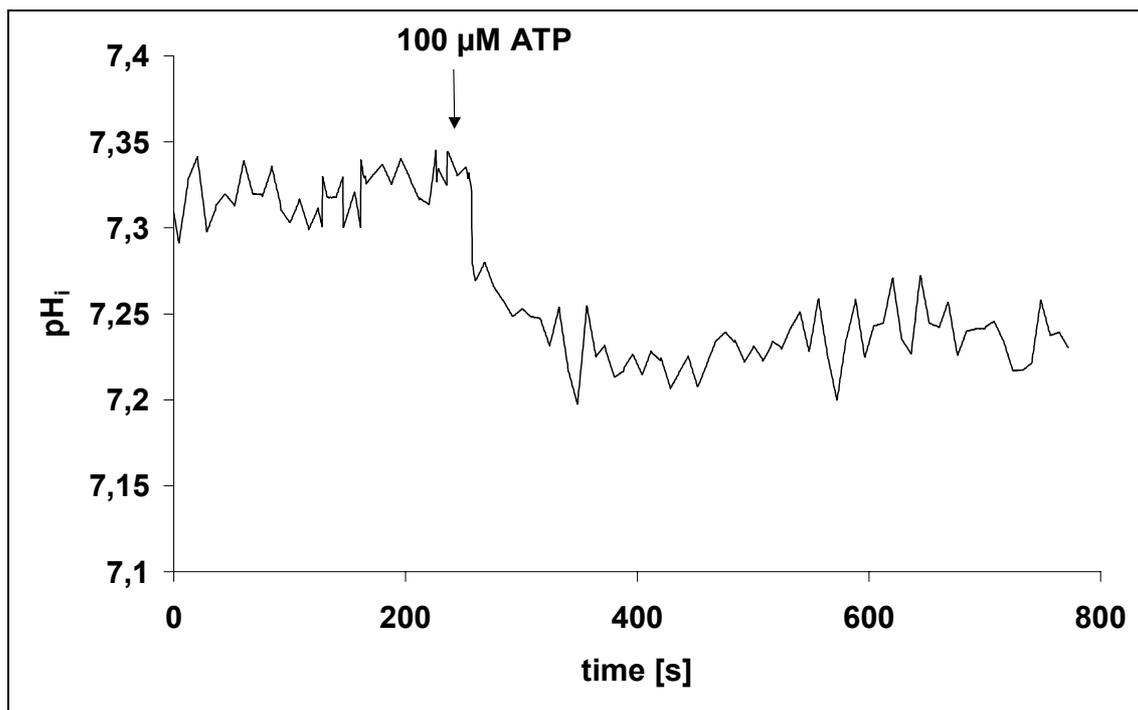


Abbildung 3.30.: Der pH_i nach Stimulierung der Zellen mit 100 µM ATP ($n = 3$, gemittelte Kurve).

3.9.2. Beschleunigung des Wiederanstiegs durch ATP

Durch ATP stimulierte MCF-7 Zellen zeigen eine beschleunigte frühe Phase des Wiederanstiegs nach Zugabe von 20 mM Natriumpropionat. 100 µM ATP wurden zu den Zellen gegeben und nach 10 min wurde der ICR durch Natriumpropionat angesäuert. Der pH_i fällt nach ATP Gabe zunächst wie in 3.9.1. beschrieben um $0,09 \pm 0,02$ pH-Einheiten ab. Die Gabe von Natriumpropionat läßt ihn um weitere $0,28 \pm 0,05$ pH-Einheiten fallen. Die Kontrollmessungen fallen nach Gabe von 20 mM Natriumpropionat um $0,42 \pm 0,06$ pH-Einheiten, der initiale pH_i-Abfall ist also um 0,15 pH-Einheiten tiefer als unter ATP-Einfluß. Der pH_i-Wiederanstieg in der frühen Phase ist in den ATP-stimulierten Zellen um 200% steiler als in der Kontrollmessung. Der pH-Wert nach 1 h liegt nach ATP-Stimulation und Ansäuerung mit Natriumpropionat um $0,09 \pm 0,01$ pH-Einheiten höher als nach alleiniger Natriumpropionatgabe.

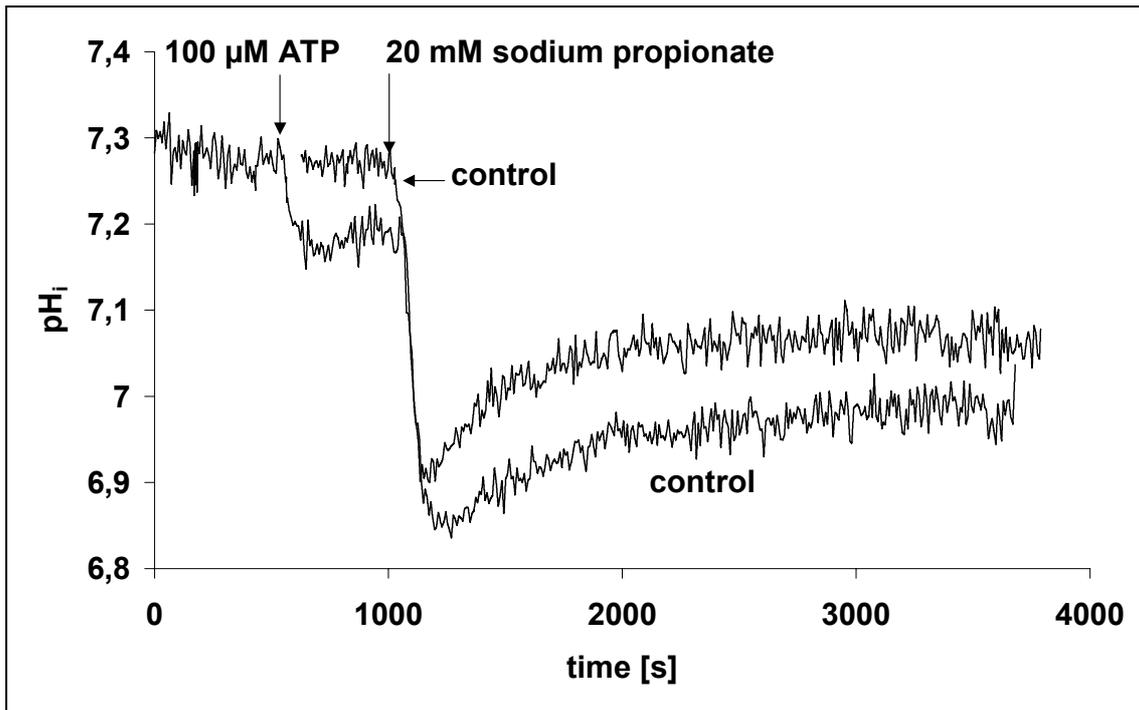


Abbildung 3.31.: Reaktion der Zellen nach Zugabe von 100 μM ATP und anschließender Gabe von 20 mM Natriumpropionat und Kontrollmessung. $n = 5$, beide Kurven sind gemittelt. Die Kontrollmessungen ($n = 3$) sind atypisch. Die Zellen für die ATP-Versuche entstammten jedoch derselben Kulturplatte wie die der Kontrollversuche.

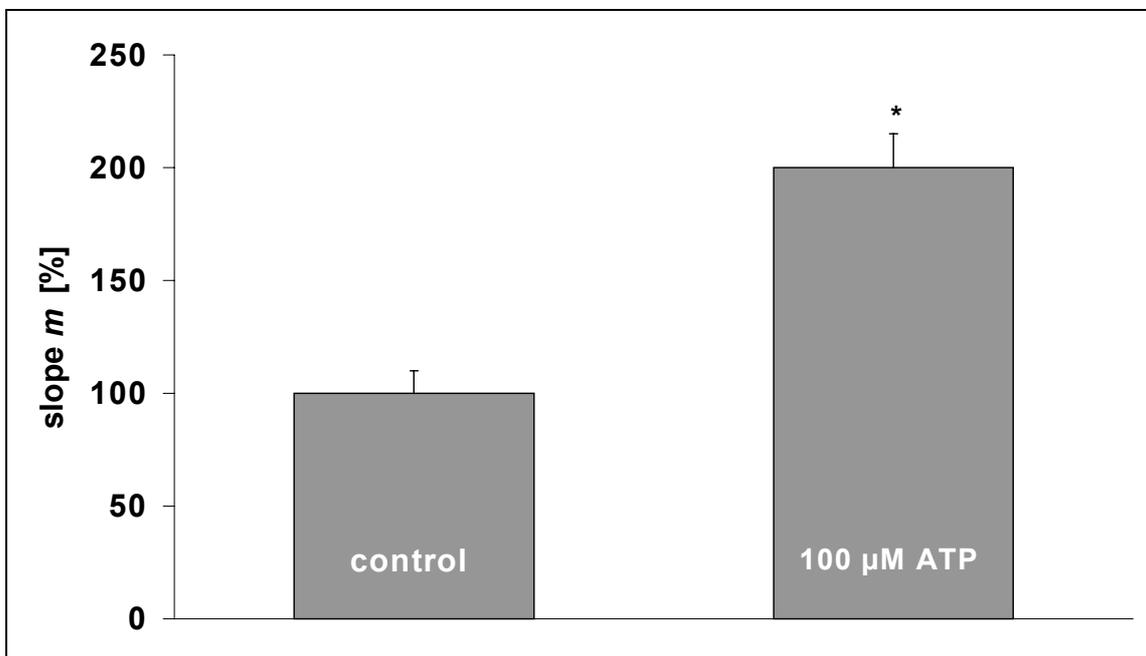


Abbildung 3.32.: Steigung m des Wiederanstiegs nach Gabe von 100 μM ATP und Ansäuerung durch 20 mM Natriumpropionat ($n = 5$). Eine Steigung von 100% entspricht dem Mittelwert von $n = 3$ Kontrollmessungen. * = signifikanter Unterschied zum Mittelwert der Kontrollmessungen ($p < 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Messung des pH_i

Als Fluoreszenzindikator wurde das 1982 von RINK et al. vorgestellte BCECF gewählt. Durch Benutzung von zwei unterschiedlichen Excitationswellenlängen war es möglich, bei abweichender Beladung und Zelldichte und bei Zugabearfakten eine genaue pH-Wertmessung durchzuführen (s.a. Kapitel 2.7.). Somit konnte der ATP-abhängige Efflux des Indikators aus der Zelle (ALLEN et al., 1990) das Meßergebnis nicht verfälschen. Durch die relativ langen Meßzeiten reicherte sich das aus den Zellen herausgelangte BCECF in der Küvettenlösung an und addierte sein Fluoreszenzsignal zu dem des in den Zellen befindlichen BCECF. Im Gegensatz zu anderen Experimenten mit deutlich kürzeren Meßzeiten war dieser Fehler so groß, daß eine Perfusion der Küvettenlösung notwendig war. Dieses Verfahren hatte zusätzlich den Vorteil, daß Substanzen durch einfaches Umstellen der Perfusionslösung ohne Störung der laufenden Messung aus der Küvette entfernt werden konnten (s. Kapitel 2.9.2.).

Zur Beladung mit BCECF/AM wurde eine Konzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ und eine variable Beladungszeit gewählt. Die an der Höhe der Beladung festgelegten Beladungszeiten führten durch die große Konstanz des Fluoreszenzsignals zu wesentlich besser reproduzierbaren Messungen als nach einer Beladung, die einem festen Zeitschema folgte. Die Beladungszeiten lagen zwischen fünf und sieben Minuten. Andere Autoren wählten z.T. wesentlich längere Beladungszeiten und/oder höhere BCECF/AM Konzentrationen (RAMIREZ et al., 2000 [T84 Kolon Zellen]: 10 μM BCECF/AM über 30 min, HASSELBLATT et al., 2000 [Kolon-Krypten der Ratte]: 32 μM BCECF-AM über 15 min, WAHL et al., 2000 [HMT3522 Brustkrebszellen]: 5 μM BCECF/AM über 4 min). In den vorliegenden Versuchsreihen führten längere Beladungszeiten jedoch zu keiner weiteren Zunahme der intrazellulären BCECF-Konzentration. Bei Beladung mit höheren Konzentrationen muß zudem beachtet werden, daß durch die Bindung der H^+ -Ionen an den Indikator die Konzentration der freien H^+ -Ionen und damit auch das H^+ -Signal reduziert wird.

Da sich die *in vivo*-Eichung nach der Nigericinmethode aus verschiedenen Gründen (Kalibrationsfehler abhängig von der Höhe des pH_i [BOYARSKI et al.,

1996], Kontamination des Meßsystems durch Nigericin [BEVENSEE et al., 1999], Induktion von Apoptose durch Nigericin [THANGARAJU et al., 1999]) nicht bewährt hat und die Autofluoreszenz der MCF-7 Zellen sehr niedrig ist, wurden die Ratiowerte mit Hilfe der *in vitro*-Eichung in pH-Werte umgerechnet.

4.2. Natriumpropionatmethode zur Bestimmung der Transporteraktivität und Wirkung von Natriumpropionat auf den pH_i , Dosis Wirkungsbeziehung.

Zur Bestimmung der Aktivität der pH-Regulatoren werden derzeit verschiedene Methoden angewandt. Sie basieren jedoch alle auf dem Prinzip der Störung des zellulären Gleichgewichts des pH_i durch schnelle Beladung des ICR mit H^+ -Ionen. Die Zelle reagiert darauf mit einer Gegenregulation. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen durch schnelle Zugabe von Natriumpropionat mit H^+ -Ionen beladen. Diese 1981 von ROOS und BORON vorgestellte Methode hat gegenüber der zweiten, häufig verwendeten Ansäuerung mit der $NH_4^+Cl^-$ „pre-pulse“-Technik (BORON, 1977) einen entscheidenden Vorteil. Die Zellen werden ausschließlich während des Meßintervalls der pH-Veränderung ausgesetzt. Bei Ansäuerung mit $NH_4^+Cl^-$ werden die Zellen schon während der Indikatorbeladung alkalisiert. Die schnelle Ansäuerung erfolgt danach durch Umsetzen der Zellen in eine natriumfreie Lösung, in der die Zellen bis zur Auslösung des Wiederanstiegs durch Zugabe von Natriumchlorid verbleiben. Die Zellen werden also bereits vor der Messung pH-Wert-Schwankungen ausgesetzt, die Einfluß auf die Messung haben könnten. Auch finden sich in der Literatur Hinweise darauf, daß diese Methode weniger stabile Ergebnisse liefert (HARA et al., 2000). Die verwendete Standardkonzentration Natriumpropionat von 20 mM für die Hemmversuche wurde ähnlich wie an Rattenhepatozyten (MEYER-SCHILLHORN, 1999) gewählt, weil die hierdurch erreichte Ansäuerung in einem physiologisch verträglichen Rahmen für die Zellen blieb und dennoch ausreichend zu differenzierende Unterschiede in der Steigung des Wiederanstiegs lieferte. An Cardiomyocyten setzten KARWATOWSKA-PROKOPCZUK et al. (1998) 50 mM Natriumpropionat ein und ROWE et al. (1993) benutzten 130 mM Natriumpropionat an humanen Kolonzellen. Diese hohen Konzentrationen be-

wirkten in den MCF-7 Zellen jedoch einen abgeschwächten Wiederanstieg und zeigten erhebliche Schwankungen des Wiederanstiegs des pH_i nach der Zugabe von Natriumpropionat.

Die Untersuchung des Wiederanstiegs des pH_i nach Ansäuerung mit Natriumpropionat zeigt, daß die Erholung der Zellen nach der Säurebelastung stark konzentrationsabhängig ist. Hohe Dosen (2 – 50 mM) haben einen Wiederanstieg zur Folge, niedrige Dosen (0,2 – 0,002 mM) bewirken hingegen einen kontinuierlichen pH_i -Abfall. Daß der Wiederanstieg nach 20 mM Natriumpropionat deutlich steiler ist als nach Gabe von 50 mM Natriumpropionat ist am ehesten darauf zurückzuführen, daß bei einer Ansäuerung bis zu einem pH von 6,7 der Arbeitsbereich der Transporter verlassen wird und diese nicht mehr effektiv arbeiten.

Ein wichtiger Schluß, der aus dem Ergebnis gezogen werden kann, ist, daß der gewünschte Effekt (intrazelluläre Ansäuerung) durch niedrige Dosen des ansäuernden Agens viel stärker eintritt als nach Gabe von hohen Dosen, nach denen stets ein starker Wiederanstieg zu beobachten ist.

Im Dosisbereich zwischen 10 und 50 mM Natriumpropionat ist noch ein Vergleich mit Messungen an Rattenhepatozyten von Interesse. In diesem Konzentrationsbereich stellen die Ergebnisse mit den MCF-7 Zellen einen sehr wesentlichen Unterschied zur Arbeit von MEYER-SCHILLHORN (1999) dar, der in Rattenhepatozyten eine annähernd lineare Dosis-Wirkungsbeziehung (Dosis-Natriumpropionat zu Steilheit-Wiederanstieg) zwischen 10 und 50 mM Natriumpropionat fand. Eine Konzentration unterhalb von 10 mM Natriumpropionat hat der Autor jedoch nicht getestet. Der Vergleich mit diesen Ergebnissen zeigt aber auch, daß in den Krebszellen die pH-Wertregulation deutlich langsamer stattfindet als in gesunden Hepatozyten. In Hepatozyten steigt der pH_i nach Ansäuerung mit Natriumpropionat innerhalb von ca. 500 s wieder auf den Ausgangswert, während die MCF-7 Zellen in der vorliegenden Arbeit ca. 3000 s benötigen um ein Plateau zu erreichen, daß deutlich unter dem Ausgangs-pH-Wert liegt.

Um den oben beschriebenen Effekt auch langfristig nachzuweisen, wurden verschiedene Natriumpropionatkonzentrationen zu wachsenden Zellkulturen gegeben. Das erwartete Ergebnis, nämlich ein höheres Wachstum der mit 20 mM gegenüber den mit 0,2 mM Natriumpropionat angesäuerten Zellen aufgrund des

besseren Regulationsverhaltens, blieb jedoch aus. Zellen, die mit 20 mM Natriumpropionat behandelt wurden, stellten ihr Wachstum praktisch vollständig ein, während Zellen unter der Wirkung von 0,2 mM Natriumpropionat noch eingeschränkt teilungsfähig waren. Am ehesten ist dies auf einen stark erhöhten Energieverbrauch zurückzuführen. Es ist anzunehmen, daß die für das Wachstum erforderliche Energie durch die stärkere pH-Regulation nach Zugabe von 20 mM Natriumpropionat nicht mehr zur Verfügung steht, während die fehlende oder sehr schwache Regulation nach Zugabe von 0,2 mM Natriumpropionat noch ausreichend Reserven läßt.

4.3. Die Regulation des pH_i

Durch Zugabe der Inhibitoren Bafilomycin A_1 (BAF), N-ethyl-N-isopropylamilorid (EIPA) und Lonidamin (LND) konnten jeweils die drei wichtigsten Transportproteine V-Typ H^+ -ATPase, Na^+/H^+ -Antiporter (NHE) und Lactat-/ H^+ -Symport (Monocarboxylat-Transporter, MCT) ausgeschaltet und damit in ihrer relativen Beteiligung an der pH_i -Regulation nachgewiesen werden.

In Bezug auf die anteilige Aktivität muß jedoch zwischen ihrem Anteil an der Regulation des Ruhe pH_i und ihrem Anteil am Wiederanstieg nach Säurebelastung differenziert werden.

Unter Ruhebedingungen sind in einer Zelle verschiedene basale Mechanismen aktiv, die für intrazelluläre Homöostase sorgen. Unter dem Ruhezustand einer Zelle muß man sich einen Zustand vorstellen, in dem sich die Zelle mit ihren Regulationsmechanismen in optimalem Einklang mit dem sie umgebenden Medium befindet und auf keine exogenen Stimuli reagieren muß. Dennoch herrscht ein hoher Konzentrationsgradient für H^+ -Ionen über der Zellmembran, so daß die hohe submembranöse H^+ -Konzentration stimulierend auf die Austauschmechanismen wirkt. Das System ist also ständig aktiv, befindet sich aber in einem Gleichgewicht.

Dieses Gleichgewicht wird gestört, wenn die an der Regulation beteiligten Transporter spezifisch durch Inhibitoren ausgeschaltet werden. EIPA, LND und auch BAF lassen die $[\text{H}^+]_i$ in den MCF-7 Zellen ansteigen, so daß davon auszugehen ist, daß alle drei untersuchten Transporter in den Zellmembranen der

MCF-7 Zellen zu finden sind und daher auch einen Anteil an der Regulation des Ruhe-pH_i haben. Die Konzentrationen der Hemmstoffe wurden so gewählt, daß sie auf der einen Seite eine maximal inhibitorische Wirkung auf ihr jeweiliges Zielprotein hatten, auf der anderen Seite aber so niedrig wie möglich gehalten wurden, um zu verhindern, daß unkontrollierbare Nebenwirkungen an anderen zellulären Mechanismen auftraten. Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß jeder Inhibitor neben seinem gewünschten Zielprotein auch unspezifisch andere Enzyme in der Zelle beeinflussen kann.

BAF als spezifischer Hemmstoff der V-Typ H⁺-ATPase senkt den Ruhe-pH_i am wenigsten, EIPA und LND als Hemmstoffe des NHE bzw. des MCT haben konzentrationsabhängig einen größeren Einfluß. Aber auch die indirekte Inhibition des NHE durch Verwendung von Na⁺-freier PSS oder die Hemmung der Na⁺-/K⁺-ATPase durch Ouabain senken den Ruhe pH_i signifikant. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen an genetisch unveränderten Zellen. So verändert sich der Ruhe-pH_i in Cardiomyocyten (KÖHLER-SCHÜTZ, 1997) und Hepatozyten (MEYER-SCHILLHORN, 1999) adulter Ratten nach Zugabe von EIPA nicht, und auch in Cardiomyozyten neonataler Ratten fiel der Ruhe-pH_i weder nach Zugabe von EIPA noch von BAF ab (KARWATOWSKA-PROPUKCZUK et al., 1998). Auch in den von LEES & HEERSCHKE (2000) untersuchten Osteoklasten hatten weder Amilorid noch Na⁺-freie Lösungen Einfluß auf den Ruhe pH_i und auch BAF führte zu keinem signifikanten Abfall (in allen Untersuchungen wurden vergleichbare oder sogar höhere Konzentrationen der Inhibitoren verwendet). Offenbar ist die H⁺-Ionen Extrusion in den untersuchten MCF-7 Zellen schon im Ruhezustand weitaus aktiver als in gesunden Zellen. Es wäre also denkbar, daß hier ein entscheidender Unterschied zwischen der pH_i-Regulation in normalen und maligne veränderten Zellen besteht.

Nach Säurebelastung des ICR werden die Regulatoren stimuliert und der pH_i steigt wieder an (Einschränkungen s. Kapitel 4.2.). Zur Ansäuerung des ICR wurden 20 mM Natriumpropionat verwendet.

Durch die Inhibitoren EIPA, LND und BAF sowie die Verwendung von Na⁺-freier PSS läßt sich der Wiederanstieg nach Säurebelastung abschwächen. Allerdings müssen hier die einzelnen Abschnitte des Wiederanstiegs getrennt voneinander betrachtet werden. Das frühe Zeitintervall beschreibt die ersten 300 s

des pH_i -Wiederanstiegs nach Ansäuerung, in dem die Zelle schnell auf die Säurebelastung reagiert. Anschließend setzt sich der Wiederanstieg langsamer fort, bis er ein Plateau erreicht. In diesem späten Abschnitt werden die langsameren Transporter aktiv. Für die MCF-7 Zellen gilt im frühen Zeitabschnitt, daß die Inhibition der V-Typ H^+ -ATPase durch BAF den größten hemmenden Effekt auf den Wiederanstieg hat, während die Inhibition des NHE durch Gabe von EIPA und die Hemmung des MCT durch Lonidamin nur eine kleine Verminderung der Steilheit des frühen Wiederanstiegs zur Folge haben. In dieser Phase ist demnach ein primär aktiver, also direkt ATP-abhängiger Transporter am aktivsten. Dies läßt sich mit einer Arbeit von BIDANI et al. (1994) vereinbaren, in der für Alveolarmakrophagen beschrieben wurde, daß der Gesamtwiederanstieg nach Säurebelastung hauptsächlich von der bafilomycinsensitiven V-Typ H^+ -ATPase ausgeführt wird und der NHE insgesamt nur geringe Aktivität besitzt. Gegenüber der Unterteilung der Regulatoren nach ihrer Aktivität in der frühen und in der späten Phase des Wiederanstiegs könnte auch eine Gliederung nach ihrem jeweiligen Arbeitsbereich vorgenommen werden. So ist von SWALLOW et al. (1993) für Makrophagen nachgewiesen worden, daß in niedrigen pH-Bereichen bis 6,6 nur die V-Typ H^+ -ATPase aktiv ist, während der NHE hier keinen Einfluß auf die pH-Wertregulation besitzt.

Die späte Phase des Wiederanstiegs hat dagegen andere Eigenschaften. Wie in der Literatur mehrfach erwähnt (VIGNE et al 1983, GORÉ et al., 1994, DEMAUREX & GRINSTEIN, 1994 u.v.m.), kommt dem NHE dabei eine große Bedeutung zu. Durch Behandlung der Zellen mit EIPA bricht der Wiederanstieg nach Gabe von Natriumpropionat ca. 6 min nach dem pH-Minimum ab. Offenbar ist bis zu diesem Zeitpunkt die V-Typ H^+ -ATPase aktiv genug, um einen nur wenig abgeschwächten Wiederanstieg zu bewirken. Danach flacht der Anstieg unter EIPA abrupt ab, was vermuten läßt, daß von diesem Zeitpunkt an vor allem der NHE den weiteren H^+ -Efflux bewirkt. Dies wird auch durch eine ähnlich geformte Kurve bei der Verwendung von Na^+ -freier Lösung bestätigt. Auch der Lactat-/ H^+ -Symport scheint in einem ähnlichen Zeitmuster aktiv zu werden, denn auch nach Gabe von LND flacht der Wiederanstieg nach Ansäuerung mit Natriumpropionat erst ca. 10 min nach Erreichen des Minimums ab und bleibt signifikant unter dem der Kontrollmessung. BAF allein bewirkt in dieser späten Phase nur eine sehr geringe Verminderung der Steigung im Vergleich mit den

Kontrollmessungen, so daß zu vermuten ist, daß die V-Typ H^+ -ATPase in diesem Abschnitt nur noch minimale Aktivität besitzt.

Durch Inhibition der V-Typ H^+ -ATPase durch BAF, des NHE durch EIPA und des MCT durch LND in einem Versuchsaufbau läßt sich der Wiederanstieg vollständig unterdrücken. Weder in der frühen noch in der späten Phase findet ein Anstieg des pH_i statt. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß in der bicarbonatfreien Lösung nahezu ausschließlich die drei o.g. Proteine für die pH -Wertregulation in MCF-7 Zellen zuständig sind oder zumindest einen herausragenden Anteil an ihr besitzen.

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Versuch von Interesse. Die Verwendung von Lösung, in der die 5 mM Kalium durch gleiche Mengen Natrium ersetzt wurden, brachte zunächst einen Anstieg des Ruhe pH_i und nach Zugabe von Natriumpropionat eine Stimulation des Wiederanstiegs. Durch das Fehlen des Kaliums steigt der K^+ -Gradient über der Plasmamembran stark an. Das Membranpotential erhöht sich und mit ihm die submembranöse $[H^+]$. Das führt wiederum zu einer Stimulierung der Austauschmechanismen. Eine Untersuchung von AMEMIYA et al. (1999) konnte zeigen, daß K^+ -arme Lösung, also Lösung, in der das K^+ durch Na^+ ersetzt und der Na^+ -Gradient über der Zellmembran erhöht ist, die Aktivität der NHE 3 Isoform des $Na^+/-H^+$ -Austauschers in OKP Zellen (oppossum kidney cells, clone P) steigert. Es kann also vermutet werden, daß diese Isoform auch in den MCF-7 Zellen aktiv ist.

Weiterhin ist ein pH_i -Abfall unter Hypoxie nachgewiesen worden, so daß gefolgert werden kann, daß in den MCF-7 Zellen eine Abhängigkeit des pH_i vom O_2 -Angebot besteht.

4.4. Einfluß der Temperatur auf den pH_i -Wiederanstieg

Im Hinblick auf die Chemotherapie unter Hyperthermie sollten Temperatureinflüsse Informationen über den Einfluß der Veränderung von Membranfluidität und Reaktionsgeschwindigkeit auf die pH -Wertregulation liefern. Die Ergebnisse zeigen, daß die pH_i -Regulation in MCF-7 Zellen sehr sensibel auf Veränderungen der Temperatur reagiert. Bei einer Temperatur von $42^\circ C$ in der Küvettenlösung ist die Aktivität der beteiligten Transportproteine stark gesteigert.

Der Abfall des pH_i nach Ansäuerung mit Natriumpropionat wird früh abgefangen und die Steigung des Wiederanstiegs ist stark erhöht. Umgekehrt bewirkte eine Temperatur von 22°C eine verminderte Aktivität der Regulatoren. In der frühen Phase des Wiederanstiegs ähnelt der pH_i -Verlauf in der niedrigen Temperatur dem nach Zugabe von BAF, was vermuten läßt, daß vor allem die V-Typ H^+ -ATPase in ihrer Funktion stark von der Temperatur abhängig ist. Dafür spricht auch die starke Steigerung des Wiederanstiegs bei 42°C.

4.5. Stimulierung der MCF-7 Zellen durch Noradrenalin

Nach Zugabe von 1 μ M Noradrenalin sind in MCF-7 Zellen zwei unterschiedliche Wirkungen zu beobachten. Zum einen bewirkt Noradrenalin einen signifikanten Abfall des Ruhe- pH_i . Es handelt sich dabei um einen langsamen Abfall des pH_i ohne anschließenden Wiederanstieg. Zum anderen ist der Wiederanstieg nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat in der späten Phase verstärkt, während die frühe Phase unbeeinflusst bleibt. Der pH_i -Abfall aus dem Ruhezustand ist dabei im Wesentlichen durch eine deutlich vermehrte H^+ -Ionen Produktion bei gesteigertem Zellstoffwechsel unter Noradrenalinwirkung (vermittelt über einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ [SCHREINER, 1989]) zu erklären, die von den Regulationsmechanismen nicht vollständig aufgefangen wird. Im Gegensatz zu den Tumorzellen finden andere Autoren in Hippocampus-CA1-Neuronen (SMITH et al, 1998) und in proximalen Tubuluszellen (ABDULNOUR-NAKHOUL et al., 1998) einen offenbar β -rezeptorvermittelten Anstieg des Ruhe pH_i . In den Hippocampus-Neuronen wird dieser Anstieg auf eine Aktivitätssteigerung des NHE zurückgeführt, während in den Tubuluszellen eine Inhibition des (ansäuernden) $Na^+HCO_3^-$ -Kotransports verantwortlich gemacht wird. Die Befunde deuten darauf hin, daß durch eine hohe Wachstumspotenz der Tumorzellen eine erhöhte Stimulierbarkeit durch Noradrenalin bzw. eine erhöhte basale Stoffwechselaktivität im Vergleich zu den gesunden Zellen vorliegt. Dieses paßt auch zu den Ergebnissen der Hemmversuche, in denen nach Zugabe von EIPA und Lonidamin der pH_i deutlich stärker abfällt als dies in Hepatozyten (MEYER-SCHILLHORN, 1999) oder Cardiomyocyten (KÖHLER-SCHÜTZ,

1997) der Fall ist, weil die Regulatoren in den Tumorzellen eine wesentlich gesteigerte basale Aktivität aufweisen.

Der Wiederanstieg nach Zugabe von 20 mM Natriumpropionat ist dagegen unter Wirkung von Nordrenalin signifikant gesteigert. Dabei ist die stimulierende Wirkung des Noradrenalins auf die zweite Phase des Wiederanstiegs einzugrenzen, während die frühe Phase nicht beeinflusst wird. Es kann demnach eine Stimulation der sekundär aktiven Austauscher NHE und MCT angenommen werden. Ein Einfluß auf die V-Typ H^+ -ATPase besteht offensichtlich nicht.

4.6. Stimulierung der MCF-7 Zellen durch extrazelluläres ATP

Auch extrazelluläres Adenosin '5 triphosphat (ATP) bewirkt einen Abfall des Ruhe- pH_i in MCF-7 Zellen, während der Wiederanstieg nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat gesteigert ist. Ähnlich wie nach Zugabe von Noradrenalin ist der Abfall aus dem Ruhezustand offensichtlich auf einen vermehrten Anfall an H^+ -Ionen zurückzuführen. Extrazelluläres ATP führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und damit zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Zelle (SAINO et al., 2002). Ein pH_i -Abfall ist die Folge, wobei offenbar die pH -Regulatoren diesen nicht vollständig auffangen können. Da nach Zugabe von 100 μM ATP kein Wiederanstieg stattfindet, ist zu vermuten, daß der Abfall des pH_i zu gering ist, um eine Gegenregulation auszulösen. Dagegen ist der Wiederanstieg des pH_i nach Ansäuerung mit 20 mM Natriumpropionat nach Vorbehandlung mit 100 μM ATP gesteigert. Da vor allem die frühe Phase des Wiederanstiegs gesteigert ist, kann angenommen werden, daß ATP offenbar hauptsächlich die V-Typ H^+ -ATPase stimuliert.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe des Fluoreszenzindikators BCECF wurde die Regulation des cytosolischen pH (pH_i) in kultivierten MCF-7 Brustkrebszellen untersucht. Ziel der Arbeit war es, die unterschiedlichen Mechanismen zur Regulation des pH_i zu beschreiben. Dazu wurde zum einen die Reaktion der Zellen auf unterschiedlich starke Ansäuerung mit Natriumpropionat in Form einer Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt und weiterhin die antiproliferative Wirkung einer pH_i -Senkung in einer MCF-7 Zellkultur geprüft. Zum anderen wurden die verschiedenen, zur Konstanthaltung des pH_i vorhandenen Systeme mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren nachgewiesen und untersucht. Darüber hinaus sollten Temperatureinflüsse Informationen über den Einfluß der Veränderung von Reaktionsgeschwindigkeit und Membranfluidität auf die pH-Wertregulation liefern. Zusätzlich sollte der Einfluß der adrenergen Transmitter Noradrenalin und ATP auf den Ruhe- pH_i und den Wiederanstieg getestet werden.

- Die Dosis-/Wirkungsbeziehung zwischen Ansäuerung mit Natriumpropionat und Verhalten des pH_i zeigt, daß ein starker Säurereiz (20 mM Natriumpropionat) einen steilen Abfall des pH_i hervorruft, der von einem Wiederanstieg gefolgt ist. Dabei erreicht der pH_i nach ca. 40 min ein stabiles Plateau, das ca. 0,06 Einheiten unter dem Ausgangswert vor Ansäuerung liegt. Nach schwachen Säurereizen (0,2 mM Natriumpropionat) fällt der pH_i hingegen stetig ab. Ein Wiederanstieg wird nicht beobachtet. Nach ca. 50 min liegt der pH_i um 0,28 pH-Einheiten unter seinem Ausgangswert vor Zugabe des Natriumpropionats.
- Obwohl der pH_i nach hoher Säurebelastung durch den Wiederanstieg näher am Ausgangswert vor Ansäuerung liegt als nach niedriger Belastung, haben hohe Natriumpropionatkonzentrationen einen Stillstand des Wachstums der Krebszellen in der Zellkultur zur Folge, während nach Belastung mit niedrigen Konzentrationen ein, wenn auch eingeschränktes, Wachstum noch möglich ist.
- Mittels der Inhibitoren Bafilomycin A_1 , EIPA und Lonidamin konnten die drei wichtigsten bicarbonatunabhängigen Transportproteine V-Typ H^+ -ATPase, Na^+ / H^+ -Antiporter und Lactat/ H^+ -Symport funktionell und bezüglich ihrer jeweiligen Aktivität nachgewiesen werden. Auf den Ruhe- pH_i haben dabei EIPA und Lonidamin die größte Wirkung, auf den frühen Wiederanstieg nach intrazellulärer

Ansäuerung hingegen Bafilomycin A₁, während EIPA und Lonidamin den späten Anteil des Wiederanstiegs hemmen.

- Durch hohe Temperaturen (42°C) läßt sich vor allem der frühe Wiederanstieg stimulieren. Niedrige Temperaturen (22°C) haben hingegen einen hemmenden Einfluß auf die frühe und auf die späte Phase.
- Noradrenalin wirkt stimulierend auf den späten Anteil des Wiederanstiegs während ATP vor allem die frühe Phase aktiviert.

Die Ergebnisse zeigen, daß nach niedrigen Dosen Natriumpropionat der gewünschte Effekt (intrazelluläre Ansäuerung) viel stärker eintritt als nach höheren Dosen. Dennoch haben hohe Konzentrationen einen Stillstand des Wachstums der Krebszellen zur Folge während nach Belastung mit niedrigen Konzentrationen ein, wenn auch eingeschränktes, Wachstum noch möglich ist. Es ist anzunehmen, daß die für das Wachstum erforderliche Energie durch die erforderliche pH-Regulation nicht mehr zur Verfügung steht. Die Ergebnisse der Hemmversuche zeigen, daß alle drei Transporter in den MCF-7 Zellen vorhanden und an der Regulation des pH_i maßgeblich beteiligt sind. Dabei haben im Ruhezustand der Zelle der NHE und der Lactat-/H⁺-Symport die größte Aktivität, während nach Säurebelastung die V-Typ H⁺-ATPase in der frühen Phase und der NHE in der späten Phase des Wiederanstiegs am aktivsten sind. Die frühe Phase des Wiederanstiegs ist durch erhöhte Temperatur sowie durch Zugabe von ATP stimulierbar. Die späte Phase kann durch Noradrenalin aktiviert werden.

6. Literaturverzeichnis

Abdulnour-Nakhoul S, Khuri RN, Nakhoul NL (1998) Effect of norepinephrine on intracellular pH in kidney proximal tubule: role of Na^+ - HCO_3^- cotransport. Am J Physiol 275: F33-45

Allen CN, Harpur ES, Gray TJ, Simmons NL, Hirst BH (1990) Efflux of biscarboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF) by a novel ATP-dependent transport mechanism in epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 172: 262-267

Amemiya M, Tabei K, Kusano E, Asano Y, Alpern RJ (1999) Incubation of OKP cells in low- K^+ media increases NHE3 activity after early decrease in intracellular pH. Am J Physiol 276: C711-C716

Anwer MS, Atkinson JM (1992) Intracellular Calcium-mediated activation of hepatic Na^+/H^+ -Exchange by Arginin, Vasopressin, and Phenyepinephrine. Hepatology 15: 134-143

Barry MA, Eastman A (1992) Endonuclease activation during apoptosis: role of cytosolic Ca^{2+} and pH. Biochem Biophys Res Commun 186: 782-789

Barry MA, Reynolds JE, Eastman A (1993) Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. Cancer Res 53: 2349-2357

Bender R, Lange S (2001) Was ist der *p*-Wert? Dtsch Med Wschr 126: T39-T40

Ben-Horin H, Tassini M, Vivi A, Navon G, Kaplan O (1995) Mechanisms of Action of the Antineoplastic Drug Lonidamine: ^{31}P and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies. Cancer Res 55: 2814-2821

Ben-Yoseph O, Lyons JC, Song CW, Ross BD (1998) Mechanisms of action of lonidamine in 9L brain tumor model involves inhibition of lactate efflux and intracellular acidification. *J Neurooncol* 36: 149-157

Bevensee MO, Bashi E, Boron WF (1999) Effekt of Trace Levels of Nigericin on Intracellular pH and Acid-Base Transport in Rat Renal Mesangial Cells. *J Membrane Biol* 169: 131-139

Bidani A, Brown SE (1990) ATP-dependent pH_i recovery in lung macrophages: evidence for plasma membrane H^+ -ATPase. *Am J Physiol* 259: C586-C598

Bidani A, Brown SE, Heming TA (1994) pH_i regulation in alveolar macrophages: relative roles of Na^+ - H^+ antiport and H^+ -ATPase. *Am J Physiol* 266: L681-688

Boron WF (1977) Intracellular pH transients in giant barbacle muscle fibres. *Am J Physiol* 233: C61-C73

Boyarski G, Hanssen C, Clyne LA (1996) Inadequacy of high K^+ /nigericin for calibrating BCECF. II. Intracellular pH dependence of the correction. *Am J Physiol* 271: C1146-C1156

Boyer MG, Tannock IF (1992) Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res* 52: 4441-4447

Boyett MR, Kirby MS, Orchard CH (1988) The effect of acidosis in single ventricular cells isolated from ferret heart. *J Physiol Lond* 407: 114P

Busa WB, Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol* 246: R409-438

Decker J (2000) Mechanismen der Krebsentstehung. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H, Die Innere Medizin, Schattauer, Stuttgart New York, 10. Auflage, S. 1229

Demaurex N, Grinstein S (1994) Na⁺/H⁺ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *J Exp Biol* 196: 389-404

Demaurex N, Romanek RR, Orlowski J, Grinstein S (1997) ATP Dependence of Na⁺/H⁺- Exchange, Nucleotide Specificity and Assessment of the Role of Phospholipids. *J Gen Physiol* 109: 117-128

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

Fernandez R, Oliveira M, Malnic G (2000) Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. *Plügers Arch* 441: 287-293

Forgac M (1989) Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 69: 765-96

Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M (1988) The regulation of intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem* 174: 3-14

Furlong IJ, Ascaso R, Rivas AL, Collins MKL (1997) Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *J Cell Science* 110: 653-661

Furlong IJ, Mediavilla CL, Ascaso R, Rivas AL, Collins MKL (1998) Induction of apoptosis by valinomycin: mitochondrial permeability transition causes intracellular acidification. *Cell Death Differ* 5: 214-221

Gerweck LE, Seetharaman K (1996) Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for treatment of cancer. *Cancer Res* 56: 1194-1198

Gluck S, Kelly S, Al-Awqati Q (1982) The proton translocating ATPase responsible for urinary acidification. *J Biol Chem* 257: 9230-9233

Goré J, Besson P, Hoinard C, Bougnoux P (1994) Na⁺-H⁺ antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am J Physiol* 266: C110-C120

Griffiths JR (1991) Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 64: 425-427

Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343: 281-299

Hamann S, La Cour M, Lui GM, Bundgaard M, Zeuten T (2000) Transport of protons and lactate in cultured human fetal retinal pigment epithelial cells. *Eur J Physiol* 440: 84-92

Hara C, Satoh H, Usui T, Kunimi M, Noiri E, Tsukamoto K, Taniguchi S, Uwatoko S, Goto A, Racusen LC, Inatomi J, Endou H, Fujita T, Seki G (2000) Intracellular pH regulatory mechanism in a human renal proximal cell line (HKC-8): evidence for a Na⁺/H⁺- exchanger, Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter. *Plügers Arch Eur J Physiol* 440: 713-720

Harris C, Fliegel L (1999) Amiloride and the Na(+)/H(+) exchanger protein: mechanism and significance of inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger (review). *Int J Mol Med*; 3: 315-321

Hasselblatt P, Warth R, Schulz-Baldes A, Greger R, Bleich M (2000) pH regulation in isolated in vitro perfused rat colonic crypts. *Plügers Arch Eur J Physiol* 441: 118-124

Hodgkin AL, Katz B (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol (Lond)* 108: 37-77

Isford RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, LeBoeuf RA (1993) Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. *Eur J Biochem* 213: 349-357

Karwatowska-Prokopchuk E, Nordberg JA, Li HL, Engler RL, Gottlieb RA (1998) Effect of Vacuolar Proton ATPase on pH_i , Ca^{2+} , and Apoptosis in Neonatal Cardiomyocytes During Metabolic Inhibition / Recovery. *Circ Res* 82: 1139-1144

Kohler-Schütz M (1997) Die Wirkung von Insulin und (-)-Phenylephrin auf pH_i , $[Na^+]_i$, $[Ca^{2+}]_i$, $[K^+]_i$ und Plasmamembranpotential von Cardiomyocyten adulter Ratten. Dissertation, Fachbereich Chemie, Hamburg

Lange S, Bender R (2001) Was ist ein Signifikanztest? *Dtsch Med Wschr* 126: T42-T44

Lees RL, Heersche JN (2000) Differences in regulation of pH_i in large (≥ 10 nuclei) and small (≤ 5 nuclei) osteoclasts. *Am J Physiol* 279: C751-C761

Mardor Y, Kaplan O, Sterin M, Ruiz-Cabello J, Ash E, Roth Y, Ringel I, Cohen JS (2000) Noninvasive Real-Time Monitoring of Intracellular Cancer Cell Metabolism and Response to Lonidamine Treatment Using Diffusion Weighted Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res* 60: 5179-5186

Martin GR, Jain RK (1994) Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res* 21: 5670-5674

Martínez-Zaguilán R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ (1993) Vacuolar-type H^+ -ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol* 265: C1015-C1029

Martínez-Zaguilán R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martinez GM, Rojas B, Smith D, Dalton WS, Gillies RJ (1999) pH and Drug Resistance. I. Functional Expression of Plasmalemmal V-Type H⁺-ATPase in Drug-Resistant Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Biochem Pharmacol* 57: 1037-1046

Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: 318-325

McConkey DJ, Orrenius S (1996) Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 14: 619-631

Messerer D, Rücker G (1997) Statistisches Testen. In: Gödde E: Fünferband Grundlagenfächer, Medizinische Biometrie, Mediscript-Verlag, Bad Wörishofen, 1. Auflage, S. 125-131

Meyer-Schillhorn C (1999) Messung der Aktivität des Na⁺-/H⁺-Austauschers in ruhenden und stimulierten Rattenhepatocyten. Dissertation, Fachbereich Medizin, Hamburg

Moule K, McGivan JD (1990) Epidermal growth factor and cyclic AMP stimulate Na⁺-/H⁺-exchange in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 187: 677-682

Murer H, Hopfer U, Kinne R (1976) Sodium/proton antiport in brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 154: 597-604

Needham J, Needham DM (1926) The hydrogen ion concentration and the oxidation-reduction potential of the cell interior: a microinjection study. *Proc R Soc London Ser B* 98: 259-286

Newell K, Franchi A, Pouysségur J, Tannock I (1993) Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1127-1131

Orchard CH, Kentish JC (1990) Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 258: C 967-981

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

Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo R (1995) Intracellular alkalinisation suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 270: 6235-6242

Pucéat M (1999) pH_i regulatory ion transporters: an update on structure, regulation and cell function. *Cell Mol Life Sci* 55: 1216-1229

Ramirez MA, Toriano R, Parisi M, Malnic G (2000) Control of Cell pH in the T84 Colon Cell Line. *J Membrane Biol* 177: 149-157

Reinertsen KV, Tønnessen TI, Jacobsen J, Sandvig K, Olsnes S (1988) Role of Chloride/Bicarbonate Antiport in the Control of the Cytosolic pH, Cell Line differences in Activity and Regulation of Antiport. *J Biol Chem* 263: 11117-11125

Rich IN, Worthington-White D, Garden OA, Musk P (2000) Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na⁺/H⁺-exchanger. *Blood* 95: 1427-1434

Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T (1982) Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *J Cell Biol* 95: 189-196

Roos A, Boron WF (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* 61: 296-434

Rosenberg SO, Fadil T, Schuster VL (1993) A basolateral lactate/H⁺ co-transporter in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. *Biochem J* 289: 263-268

Rotin D, Steel-Norwood D, Grinstein S, Tannock I (1989) Requirement of the Na⁺/H⁺ exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 49: 205-209

Rowe WA, Blackmon DL, Montrose MH (1993) Propionate activates ion transport mechanisms in the HT29-18-C₁ human colon cell line. *Am J Physiol* 265: G564-571

Saino T, Matsuura M, Satoh Y (2002) Comparison of the effect of ATP on intracellular calcium ion dynamics between rat testicular and cerebral arteriole smooth muscle cells. *Cell Calcium* 32: 153-163

Schreiner V (1989) Korrelation zwischen intrazellulärem pH, intrazellulärer [Ca²⁺] und Kontraktionskraft in arteriellen Gefäßmuskelzellen nach schneller Noradrenalin-Gabe. Dissertation, Fachbereich Chemie, Hamburg

Selvaggio AM, Schwarz JH, Bengel HH, Alexander EA (1986) Kinetics of the Na⁺-/H⁺-antiporter as assessed by the change in intracellular pH in MDCK-cells. *Am J Physiol* 251: C558-562

Shrode LD, Tapper H, Grinstein S (1997) Role of Intracellular pH in Proliferation, Transformation, and Apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 393-399

Simon WE, Albrecht M, Trams G, Dietel M, Hölzel F (1984) In vitro growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen, and prolactin. *J Natl Cancer Inst* 73: 313-321

Smith GA, Brett CL, Church J (1998) Effects of noradrenaline on intracellular pH in acutely dissociated adult rat hippocampal CA1 neurones. *J Physiol* 512: 487-505

Stubbs M, Bhujwala ZM, Tozer GM, Rodrigues LM, Maxwell RJ, Morgan R, Howe FA, Griffiths JR (1992) An assessment of ^{31}P MRS as a method of measuring pH in rat tumours. *NMR Biomed* 5: 351-359

Swallow CJ, Grinstein S, Rotstein OD (1990) A vacuolar type H^+ -ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J Biol Chem* 265: 7645-7654

Swallow CJ, Grinstein S, Sudsbury RA, Rotstein OD (1993) Relative roles of Na^+/H^+ exchange and vacuolar-type H^+ ATPases in regulating cytoplasmic pH and function in murine peritoneal macrophages. *J Cell Physiol* 157: 453-460

Tannock IF, Rotin, D (1989) Acid pH in Tumors and its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Research* 49: 4373-4384

Thangaraju M, Sharma K, Liu D, Shen S-H, Srikant CB (1999) Interdependent Regulation of Intracellular Acidification and SHP-1 in Apoptosis. *Cancer Research* 59: 1649-1654

Thangaraju M, Sharma K, Liu D, Shen S-H, Srikant CB (1999) Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. *J Biol Chem* 274: 29549-57.

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

Tominaga T, Ishazaki T, Narumiya S, Barber DL (1998) Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *EMBO J* 17: 4712-4722

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449-6465

Vaupel P, Briest S, Hockel M (2002) Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr* 152: 334-342

Vigne P, Frelin C, Cragoe Jr. EJ, Lazdunski M (1983) Ethylisopropyl-Amilorid: A new and highly potent derivate of amiloride for inhibition of the Na^+/H^+ -exchange system in various cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 116: 86-90

Vilariño N, Vieytes MR, Vieites JM, Botana LM (1998) Role of HCO_3^- ions in Cytosolic pH Regulation in Rat Mast Cells: Evidence for a New Na^+ -Independent, HCO_3^- Dependent Alkalinizing Mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 320-324

Wahl ML, Pooler PM, Briand P, Leeper DB, Owen CS (2000) Intracellular pH regulation in a nonmalignant and a derived malignant human breast cell line. *J Cell Physiol* 183: 373-380

Wang X, Levi AJ, Halestrap AP (1994) Kinetics of the sarcolemnal lactate carrier in single heart cells using BCECF to measure pH_i . *Am J Physiol* 267: H1759-H1769

Webb SD, Sherratt JA, Fish RG (1999) Mathematical Modelling of Tumour Acidity: Regulation of Intracellular pH. *J Theo Biol* 196: 237-250

Wike-Hooley JL, Van Den Berg AP, Van Der Zee J, Reinhold HS (1985) Human tumour pH and its variation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 785-791

Wolf CM, Eastman A (1999) Intracellular acidification during apoptosis can occur in the absence of a nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 821-827

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Vonderlage für die Überlassung des Themas, die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche sowie für zahlreiche Hinweise und Anregungen und intensive Diskussionen.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau M. Kelterer, Frau A. Hasse und Frau I. Blanck für die freundliche Unterstützung bei der Pflege der Zellkulturen und der Durchführung der Versuche bedanken.


Besonderen Dank möchte ich meinen Eltern für die großzügige finanzielle Unterstützung während meines Studiums aussprechen.

8. Lebenslauf

03.07.1975	Geboren in Hamburg
1981 – 83	Astrid Lindgren Grundschule, Berlin – Spandau
1983 – 85	Schule Sengelmannstraße, Hamburg – Alsterdorf
1985 – 94	Albert Schweitzer Gymnasium, Hamburg – Fuhlsbüttel
1994	Abitur
1994 – 95	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Hamburg
1995 - 2002	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
1998	Physikum
1999	1. Staatsexamen
2001	2. Staatsexamen
2002	3. Staatsexamen
1998 – 2002	Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Zellphysiologie des Physiologischen Instituts der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. med M. Vonderlage
Seit 01.03.2003	Arzt im Praktikum im Klinikum Pinneberg, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

A handwritten signature in black ink, reading "Christian Wawrus". The signature is written in a cursive style with a large initial 'C'.

Hamburg, den 18.10.2002