

**Warum zeigen die Herzglykoside Ouabain und
Digoxin unterschiedliche Kreislaufwirkung?**

**Charakterisierung eines mutmaßlichen Herzglykosid-
Bindungsproteins im Serum und Analyse der Wirkung
beider Steroide auf die Endothelin-1 und NO-Frei-
setzung aus arteriellen Endothelzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. oec. troph.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dipl. oec. troph. CHRISTINE WEITKAMP

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. em. Dr. Wilhelm Schoner

**Warum zeigen die Herzglykoside Ouabain und Digoxin
unterschiedliche Kreislaufwirkung?
Charakterisierung eines mutmaßlichen Herzglykosid-
Bindungsproteins im Serum und Analyse der Wirkung beider
Steroide auf die Endothelin-1
und NO-Freisetzung aus arteriellen Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Christine Weitkamp
Gießen 2005

Dekan: Prof. Dr. W. Köhler

Promotionsausschuss: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

1. Betreuerin: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

2. Betreuer: Prof. em. Dr. W. Schoner

INHALTVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Struktur und Vorkommen der Herzglykoside	3
1.3	Die Natrium-Pumpe als Herzglykosid-Rezeptor	5
1.4	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher und Herzglykosidwirkung	6
1.5	Endogenes Digitalis	7
1.6	Transport von Steroidhormonen im Blut	10
1.7	Bluthochdruck.....	12
1.8	Aufbau der Arterien	14
1.8.1	Das Endothel	14
1.8.1.1	Die Signalkaskade zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS)	16
1.8.2	Die glatte Muskulatur der Gefäße	21
1.9	Fragestellung.....	23
1.9.1	Gibt es einen weiteren Weg der Signalvermittlung für Herzglykoside?	23
1.9.2	Warum wirken Digoxin und Ouabain unterschiedlich auf den Blutdruck?.....	24
1.10	Ziel der Arbeit	26
2	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	28
2.1	Geräte und Materialien	28
2.2	Chemikalien.....	29
2.3	Methoden.....	31
2.3.1	Reinigung von CGBG aus Rinderblut	31
2.3.1.1	Ammoniumsulfatfällung	31
2.3.1.2	Ionenaustausch-Chromatographie an einer DEAE-Säule.....	32
2.3.1.3	Affinitätschromatographie mittels einer Antikörpersäule gegen CGBG	32
2.3.1.4	Biosep DEAE-FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....	34
2.3.1.5	Ionenaustausch-Chromatographie mittels HPLC an einer MiniS- Säule	36
2.3.2	Antikörpergewinnung.....	37

II

2.3.2.1	Immunisierung von Kaninchen	37
2.3.2.2	Gewinnung des Serums	38
2.3.2.3	Aufarbeitung des Serums	38
2.3.2.4	Ammoniumsulfat-Fällung	38
2.3.2.5	Dialyse	39
2.3.2.6	Affinitätschromatographie an einer Protein A-Säule	39
2.3.2.7	Einfrieren	39
2.3.2.8	Affinitätschromatographische Reinigung der CGBG-Antikörper an einer CGBG-Säule in einer FPLC-Anlage.....	40
2.3.3	Herstellung von Gewebehomogenaten	41
2.3.4	Gewinnung von Plasma aus Rinderblut.....	41
2.3.5	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	41
2.3.5.1	ELISA zur Messung der CGBG-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes.....	42
2.3.5.2	ELISA zur Messung der IgM-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes.....	43
2.3.5.3	ELISA zur Messung der BSA-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes.....	44
2.3.5.4	ELISA zur Lokalisation der CGBG-Antikörper in den Fraktionen nach Affinitätschromatographie an einer CGBG-Säule	44
2.3.5.5	ELISA zur Bestimmung der Verdrängbarkeit der Anti-IgM- bzw. Anti- CGBG-Antikörper von IgM bzw. CGBG durch IgM und CGBG.....	44
2.3.6	Gelelektrophorese des CGBG (diskontinuierliche SDS-Page nach Lämmli).....	45
2.3.7	Western-Blot.....	46
2.3.8	Proteinbestimmung nach Bradford	47
2.3.9	Zellkulturmethoden	47
2.3.9.1	Menschliche Endothelzellen der Nabelschnurarterie (HUAEC).....	47
2.3.9.1.1	Präparation von HUAEC aus der Nabelschnurarterie.....	47
2.3.9.1.2	Zellpassage	48
2.3.9.1.3	Auftauen der Zellen	49
2.3.9.2	Humane glatte Muskelzellen der Aorta.....	49
2.3.9.2.1	Zellpassage	50
2.3.9.3	Bestimmung der Zellzahl mittels MTT-Test	50
2.3.9.4	Messung der Rubidiumaufnahme.....	51

III

2.3.9.5	Immunologischer Nachweis von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Proteinen in Zell-Lysat von HUAEC unter Einfluss von Ouabain und Digoxin	52
2.3.9.6	Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration im Zellüberstand von HUAEC nach Inkubation mit Digoxin und Ouabain mittels EIA.....	54
2.3.9.6.1	Inkubation der Zellen mit Ouabain und Digoxin	54
2.3.9.6.2	Durchführung der Endothelin-1-Bestimmung.....	54
2.3.9.7	Bestimmung der NO-Konzentration im Zellüberstand von HUAEC nach Inkubation mit Digoxin und Ouabain	55
2.3.9.8	Nachweis der Caspase-Aktivität in HUAEC nach Inkubation mit Ouabain, Digoxin und Staurosporin.....	56
2.3.9.8.1	Inkubation der Zellen mit Ouabain, Digoxin und Staurosporin.....	56
2.3.9.8.2	Ermittlung der Caspase-Aktivität	57
2.3.9.9	Bestimmung von cAMP und cGMP in den Zellextrakten von HUAEC unter Ouabain- und Digoxineinfluss.....	57
3	<u>RESULTATE.....</u>	59
3.1	Immunologische Charakterisierung eines Bindungsproteines für Herzglykoside (CGBG)	59
3.1.1	Eigenschaften eines ELISA zum quantitativen Nachweis von CGBG	59
3.1.2	Bestimmung der CGBG-Konzentration in Plasma und Geweben des Rindes	60
3.1.3	Bestimmung der IgM-Konzentration in Plasma und Geweben des Rindes	61
3.1.4	Bestimmung der Konzentrationen an Rinderserum-Albumin in Plasma und Geweben des Rindes	63
3.1.5	Korrektur der CGBG-Konzentrationen um den Restblutgehalt der Organe.....	65
3.1.6	Messung der Verdrängbarkeit von IgM und CGBG von IgM- und CGBG-Antikörpern	67
3.2	Bewirken Ouabain und Digoxin unterschiedliche Antworten an HUAEC und glatten Muskelzellen der Aorta?	69
3.2.1	Die Aktivität der Natrium-Pumpe von HUAEC in Gegenwart verschiedener Herzglykoside.....	69
3.2.2	Wirken Ouabain und Digoxin auf die Proliferation von HUAEC und glatten Muskelzellen der Aorta stimulierend?	71

3.2.3	Beruhet die Abnahme des Zellwachstums bei toxischen Herzglykosidkonzentrationen auf einer Aktivierung der Apoptose?	72
3.2.4	Wirkung von Ouabain und Digoxin auf die Endothelin-Freisetzung in HUAEC	74
3.2.5	Wirkung von Digoxin und Ouabain auf die NO-Freisetzung in HUAEC	75
3.2.6	Ändern Ouabain und Digoxin die Phosphorylierung von eNOS?.....	77
3.2.7	Studien zur Aufklärung des Signalweges zur eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin	79
3.2.7.1	Wirkung von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung von akt/PKB.....	79
3.2.7.2	Bestimmung des Einflusses der Phosphatidylinositol-3-Kinase auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin	81
3.2.7.3	Ist die src-Kinase in die eNOS-Aktivierung durch Digoxin und Ouabain eingeschaltet?	82
3.2.7.4	Studium der Bedeutung von Ca ²⁺ und Ca ²⁺ -Kanälen auf die erhöhte NO-Freisetzung unter Digoxin- und Ouabaineinfluss	84
3.2.7.5	Studium möglicher intrazellulärer Wege zur Erhöhung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration als möglicher Grund für eine erhöhte NO-Freisetzung unter Digoxin- und Ouabaineinfluss	88
3.2.7.6	Sind G-Proteine, cAMP oder cGMP an der herzglykosidbedingten Aktivierung der NO-Freisetzung aus HUAEC beteiligt?	90
4	<u>DISKUSSION</u>	92
4.1	Studien zur Natur und zum Ort der Biosynthese eines möglichen Bindungsproteins für Herzglykoside im Blutplasma.....	92
4.2	Unterscheiden sich die Herzglykoside Ouabain und Digoxin in ihrer Wirkung auf die Natrium-Pumpe, Endothelin-1-Freisetzung und die NO-Freisetzung in humanen Endothelzellen?	94
4.3	Wie wird die NO-Freisetzung in humanen Endothelzellen stimuliert?	96
4.4	Wie kommt es zu der unterschiedlichen Wirkung von Ouabain und Digoxin auf die Aktivierung der Natrium-Pumpe, Endothelin-Freisetzung und dem Fehlen solcher Unterschiede auf die NO-Freisetzung?	99
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	100
6	<u>SUMMARY</u>	103

7 LITERATURVERZEICHNIS105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Struktur des Gonans	3
Abbildung 2	Struktur der Bufadienolide und Cardenolide.....	3
Abbildung 3	Strukturen verschiedener Herzglykoside	4
Abbildung 4	Auf der Suche nach endogenem Digitalis in Säugetieren entdeckte Herzglykoside	9
Abbildung 5	Mechanismus der eNOS-Aktivierung durch Calmodulin.....	18
Abbildung 6	Hemmstoffe des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (akt)-eNOS-Signalweges	20
Abbildung 7	Strukturen des Ouabain-Antagonisten PST 2238 und des Aldosteron-Antagonisten K-Canrenoat.....	25
Abbildung 8	DEAE-Chromatographie der Globulinfraktion.....	32
Abbildung 9	Affinitätschromatographie der vorgereinigten Globulinfraktion	33
Abbildung 10	Trennung von CGBG an einer BIOSEP DEAE-Säule bei pH 8,0	35
Abbildung 11	SDS-PAGE der DEAE-Peaks aus Abbildung 10	36
Abbildung 12	Chemiluminiszenz-Reaktion von Lumigen PS-3 mit Meerrettich- Peroxidase	53
Abbildung 13	Prinzip der Stickoxid-Detektion mittels DAF-2-DA.....	55
Abbildung 14	Spaltung des nicht-fluoreszierenden Caspase-Substrates Rhodamin-110-bis-(N-CBZ-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L- aspartylamid) durch Caspase 3/7 zum fluoreszierenden Rhodamin-110	57
Abbildung 15	Eichkurve des kompetitiven ELISA auf CGBG (links) und Western-Blot des zur Immunisierung eingesetzten Proteins (CGBG) (rechts).....	59
Abbildung 16	CGBG-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes	61
Abbildung 17	IgM-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes.....	62
Abbildung 18	Vergleich der CGBG- und IgM-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes	63
Abbildung 19	BSA-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes	64
Abbildung 20	Quotient der Mittelwerte µg CGBG/µg BSA in Plasma und Geweben des Rindes.....	66

VII

Abbildung 21	Verdrängbarkeit der Anti-CGBG-Antikörper von CGBG durch IgM und CGBG	67
Abbildung 22	Verdrängbarkeit der Anti-IgM-Antikörper von IgM durch IgM und CGBG	68
Abbildung 23	Effekt von verschiedenen Herzglykosidkonzentrationen auf die ⁸⁶ Rb ⁺ -Aufnahme in HUAEC als Maß für die Aktivität der Natrium-Pumpe	70
Abbildung 24	Wirkung steigender Herzglykosidkonzentrationen auf das Wachstum von HUAEC	71
Abbildung 25	Wirkung steigender Herzglykosidkonzentrationen auf das Wachstum humaner glatter Muskelzellen	72
Abbildung 26	Vergleich der Wirkung von Ouabain und Digoxin auf das Zellwachstum in 5 Tagen und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in HUAEC	73
Abbildung 27	Studium der Wirkung von Herzglykosiden auf den Phosphorylierungsgrad der Fokal Adhesion Kinase in HUAEC	74
Abbildung 28	Freisetzung von Endothelin-1 aus HUAEC unter Einfluss von nanomolaren Konzentrationen von Ouabain und Digoxin in Prozent der Kontrolle	75
Abbildung 29	Einfluss der Herzglykoside Digoxin und Ouabain auf die Freisetzung von NO in HUAEC nach 4-stündiger Inkubation in ECGM II	76
Abbildung 30	Die Stimulierung der NO-Synthese durch Ouabain und Digoxin (1 nM) ist auch in Normalmedium möglich und braucht kein zusätzliches extrazelluläres Arginin als Substrat der NO-Synthese	77
Abbildung 31	Einfluss von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung des eNOS-Enzyms	78
Abbildung 32	Einfluss von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung von akt/Proteinkinase B	80
Abbildung 33	Hemmung der Herzglykosid-induzierten Aktivierung der eNOS durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Hemmstoff Ly294002	81
Abbildung 34	Die Substanz Wortmannin zeigt keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin	82
Abbildung 35	Aktivierung der eNOS über die src-Kinase und den PIP ₃ -Weg	83

VIII

Abbildung 36	Die Herzglykosid-induzierte Aktivierung der eNOS erfolgt nicht über eine Tyrosinkinase der src-Familie, da der src-Kinase-Hemmstoff PP2 nicht in der Lage ist, die Aktivierung zu blockieren.....	84
Abbildung 37	Aktivierung der eNOS über die Aktivierung eines L-Typ-Ca ²⁺ -Kanals.....	85
Abbildung 38	Die Ca ²⁺ -Kanal-Blocker Verapamil und Nimodipin zeigen keinen hemmenden Einfluss auf die NO-Freisetzung durch Ouabain und Digoxin	86
Abbildung 39	Aktivierung der eNOS über die Interaktion der Natrium-Pumpe mit dem Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher, Annahme der Bildung von Ca ²⁺ -Kanälen im Austauscher bei Ouabain-Konzentrationen, die nicht die Natrium-Pumpe hemmen.....	87
Abbildung 40	Die Hemmung des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers mit 1 mM NiCl ₂ , 1 mM CoCl ₃ und 0,1 mM Benzamil stimuliert die Ouabain-aktivierte NO-Synthese in HUAEC weiter	88
Abbildung 41	Aktivierung der eNOS über die Aktivierung des IP ₃ -Weges	89
Abbildung 42	Der Phospholipase C-Hemmstoff U73122 zeigt keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin	90
Abbildung 43	Modell des Signalweges der Ouabain-modulierten Aktivierung der Natrium-Pumpe, Endothelin-1-Freisetzung und NO-Abgabe in HUAEC.....	98

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Steroidhormonbindungsproteine im Serum.....	11
Tabelle 2	Assoziationskonstanten der Steroidhormone in Humanserum.....	11
Tabelle 3	CGBG-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes	60
Tabelle 4	IgM-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes	62
Tabelle 5	Konzentrationen an Rinder-Serumalbumin (BSA) in Plasma und Geweben des Rindes.....	64
Tabelle 6	Quotienten der Gehalte an CGBG und BSA in Plasma und Geweben des Rindes.....	65
Tabelle 7	Vergleich der Quotienten μg CGBG/ μg BSA der untersuchten Gewebe, Ergebnisse des multifaktoriellen Vergleichstests nach Tukey	66
Tabelle 8	Vergleich der Quotienten μg CGBG/ μg BSA der untersuchten Gewebe, Ergebnisse des multifaktoriellen Vergleichstests nach Bonferroni	67

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ABP	Androgen Binding Protein
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AG	Antigen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaMK II	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKK	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CBG	Cortison Binding Protein
CGBG	Cardiac Glycoside Binding Globuline
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CM	Carboxymethyl
Da	Dalton
DAF-2	Diaminofluorescein
DBP	Vitamin D Binding Protein
DEAE	Diethylaminoethyl-Dextran
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Reticulum
ET-1	Endothelin-1
FAK	Focal Adhesion Kinase

FKS	fötales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HDMA	N-hydroxysuccinimidyl-digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- γ -amino-caproate
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUAEC	Human umbilical artery endothelial cells
IC ₅₀	inhibitory concentration (50%)
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
IgM	Immunglobulin der Subklasse M
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
K _D	Dissoziationskonstante eines Substrates
kDa	Kilodalton
Log	Logarithmus zur Basis 10
M	molar (Mol/l)
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
min	Minute
mm Hg	Maß für den arteriellen Blutdruck in mm der Quecksilbersäule
MTT	Tetrazolylblau-Tetrazoliumbromide
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumbromid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat
NYHA	New York Heart Association
O.D.	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Progesteron Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK-1	Phosphatidylinositol-dependent-Proteinkinase-1
PDK-2	Phosphatidylinositol-dependent-Proteinkinase-2
PI ₃ -Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat

PKB	Proteinkinase B
SBP	Sex Binding Protein
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHBG	Sex Hormone Binding Globuline
SOC	Store-operated Ca ²⁺ -Channels
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-Buffered-Saline
TBST	Tris-Buffered-Saline-Tween
TeBG	Testosteron Binding Protein
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin
TES	N-Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl-2-Aminoethan-Sulfonsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
α -FP	α -Fetoprotein
¹ H-NMR	¹ H-Nuclear Magnetic Resonance

1 EINLEITUNG

Seit der Veröffentlichung der Schrift „An Account on the Foxglove and Some of its Medical Uses“ durch den Arzt William Withering im Jahre 1785 wird der Extrakt des Fingerhutes *Digitalis purpurea* gezielt zur Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzt [1]. Da die Konzentration an Herzglykosiden in Blättern des Fingerhutes variiert und ihre Verabreichung in Form von Tees leicht zur Vergiftung führte, war es zunächst das Bestreben, das herzaktive Prinzip in reiner Form darzustellen, da die Hoffnung bestand, dass sich die toxischen Begleiterscheinungen verlieren.

In dem Bemühen, die wirksamen Bestandteile des Digitalis-Extraktes zu ermitteln, wurde eine Gruppe von Substanzen entdeckt, die als herzaktive Steroide oder Herzglykoside bezeichnet wurden.

1.1 HERZINSUFFIZIENZ

Unter Herzinsuffizienz wird ein akutes oder chronisches Unvermögen des Herzens verstanden, bei Belastung oder in Ruhe die für den Stoffwechsel erforderliche Blutmenge zur Verfügung zu stellen. Es handelt sich also um eine Schwäche der Pumpfunktion des Herzens, die zu den häufigsten internistischen Erkrankungen zählt. Im Jahre 1995 wurde die Anzahl der weltweit betroffenen Patienten auf 15 Millionen geschätzt.

Eine chronische Herzinsuffizienz kann verschiedene Ursachen haben:

Perikardiale, myokardiale oder endokardiale Störungen, Veränderungen der Herzklappen oder der großen Gefäße können ihr zugrunde liegen. Bei einem Großteil der betroffenen Patienten beruht die Erkrankung auf einer Störung der ventrikulären Funktion [2].

Ursache ist meist eine koronare Herzerkrankung, die oft von arterieller Hypertonie begleitet wird [3,4]. Auch eine isolierte arterielle Hypertonie sowie idiopathische oder alkoholische Kardiomyopathien können zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen [2].

Um die anfängliche Schädigung des Myokards auszugleichen, kommt es, um das Schlagvolumen aufrechtzuerhalten, zu einem ventrikulären Remodeling mit Hypertrophie der Myozyten. Diese Verdickung der Herzwand führt jedoch nicht

zu einer verstärkten Kontraktion, da es durch eine erhöhte Adrenalin-Sekretion zu einer Änderung des Expressionsmusters der Muskelproteine kommt. Der weiterhin bestehende Blutrückstau führt zu einer ventrikulären Dilatation [4-7].

Durch die Dilatation werden apoptotische Signale ausgelöst, die zum Zelltod der Myozyten führen und eine weitere Dilatation zur Folge haben. Die Schädigung des Myocards schreitet somit fort.

Durch die resultierende verminderte Pumpleistung des Herzens werden lebenswichtige Organe nicht richtig versorgt. Um dies auszugleichen, werden verschiedene neuroendokrine Systeme aktiviert.

Die vermehrte Freisetzung von Catecholaminen und antidiuretischem Hormon sowie eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems haben eine periphere Vasokonstriktion, verstärkte Flüssigkeitsretention, Arrhythmie neigung und Catecholaminrefraktärität des Herzens zur Folge.

Die klinischen Symptome der Patienten nehmen durch diese Kompensationsversuche des Körpers weiter zu [2].

Herzinsuffiziente Patienten werden ihrer Leistungsfähigkeit entsprechend nach der New York Heart Association in verschiedene Stadien (NYHA I bis IV) eingeteilt, wobei in Stadium I keine Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit zu sehen ist, während Stadium IV die Patienten derartig körperlich beeinträchtigt, dass sie bettlägerig sind.

Zur medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz werden verschiedene Medikamente eingesetzt:

- Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Blocker
- Beta-Rezeptorenblocker
- Diuretika
- Aldosteron-Antagonisten
- Herzglykoside [8].

Klinische und pharmakologische Untersuchungen haben ergeben, dass die therapeutische und die toxische Dosis der Herzglykoside sehr nah zusammen liegen. Das bedeutet in der medizinischen Praxis, dass die gleiche Dosis bei dem einen Patienten therapeutisch hilft, bei dem anderen aber schon zu Vergiftungserscheinungen wie Erbrechen und Verlangsamung des Herzschlags führt [9]. Insbesondere diese Schwierigkeit hat dazu geführt, dass in der modernen Herztherapie die Anwendung der Digitalis-Derivate weitgehend

aufgegeben wurde. Sie werden derzeit nur für die Therapie der linksventrikulären Dysfunktion aufgrund von Vorhofflimmern und bei schwerer Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) empfohlen [8].

1.2 STRUKTUR UND VORKOMMEN DER HERZGLYKOSIDE

Max Cloetta und Adolf Windaus begannen Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Aufklärung der Struktur der Herzglykoside. Im Jahre 1932 wurde entdeckt, dass die Herzglykoside zu den Steroiden gehören. Nach der Einführung der Chromatographie konnten bis heute über 100 verschiedene herzaktive Steroide aus den verschiedenen *Digitalis*-Arten isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden [10].

Das gemeinsame Merkmal aller Herzglykoside ist das Kohlenstoffgerüst des Gonans (Abbildung 1).

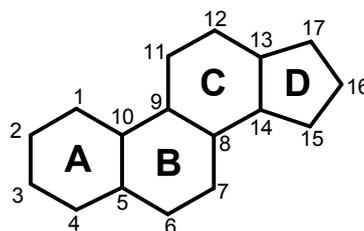


Abbildung 1 Struktur des Gonans

Die Herzglykoside zeichnen sich dadurch aus, dass eine cis-Verknüpfung zwischen A- und B-Ring und zwischen C- und D-Ring besteht. Dadurch unterscheiden sie sich wesentlich von anderen Steroiden, die an diesen Stellen trans-verknüpft sind.

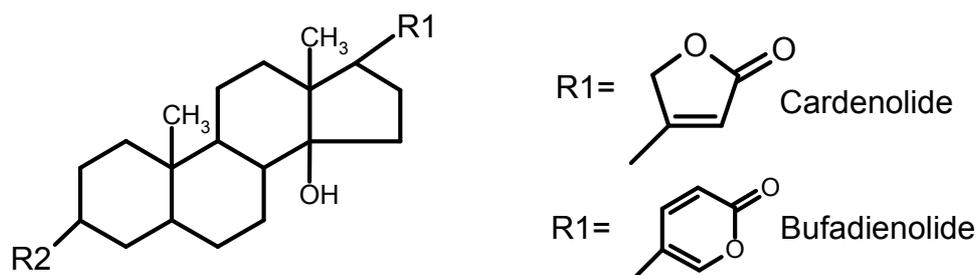


Abbildung 2 Struktur der Bufadienolide und Cardenolide

Abhängig von der Natur des Lactonringes können die Herzglykoside in 2 Gruppen eingeteilt werden: Diejenigen mit einem fünfgliedrigen Ring werden als Cardenolide bezeichnet, diejenigen mit einem sechsgliedrigen Ring als Bufadienolide (Abbildung 2).

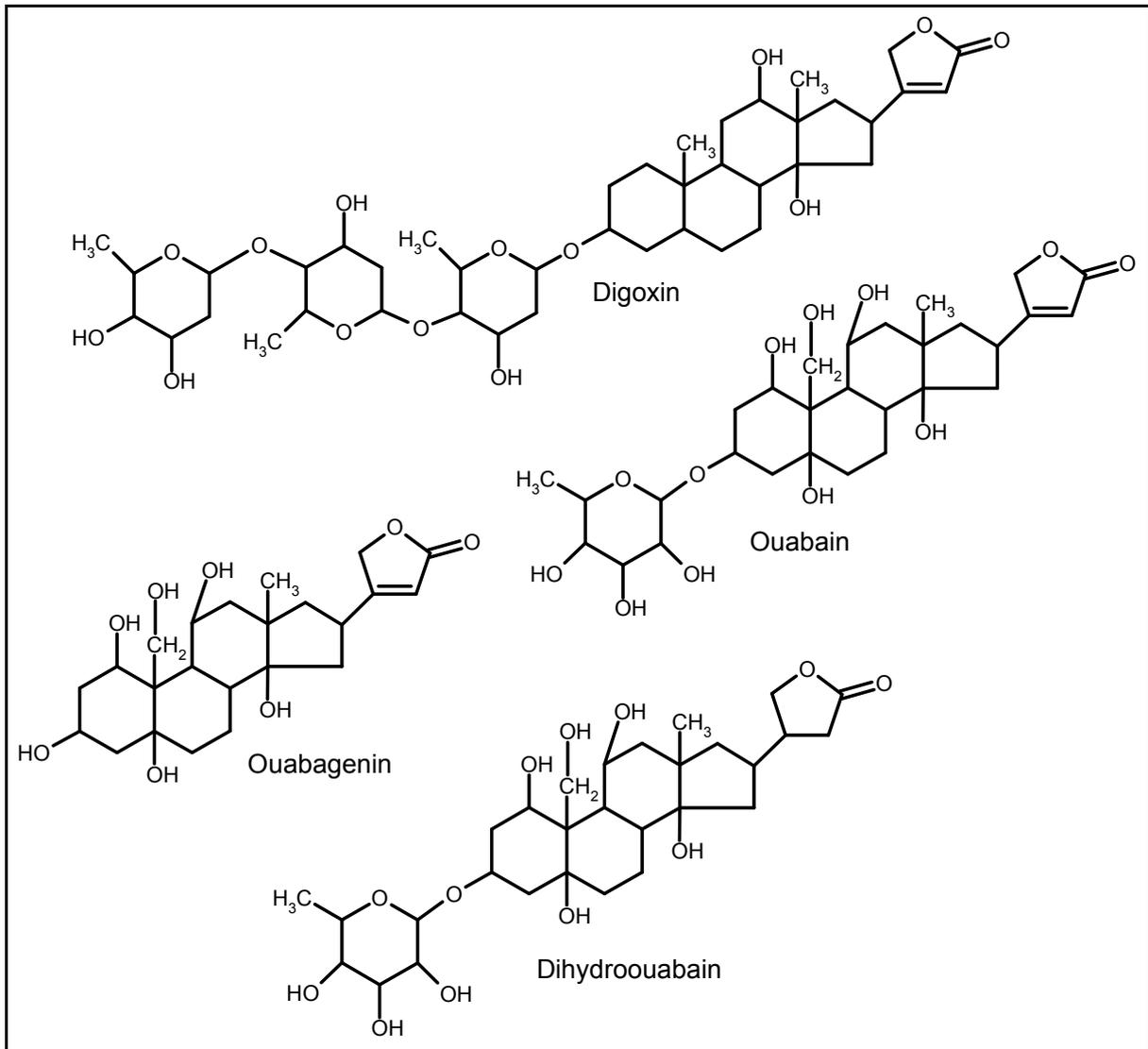


Abbildung 3

Strukturen verschiedener Herzglykoside**Digoxin (Cardenolid mit drei Digitoxosen an C-Atom 3)****Ouabain (Cardenolid mit einer Rhamnose an C-Atom 3)****Dihydro-Ouabain (wie Ouabain mit gesättigtem Lactonring)****Ouabagenin (Aglykon des Ouabains)**

Am C-Atom 3 tragen die Herzglykoside eine OH-Gruppe; an dieses C-Atom können aber auch ein bis vier Zuckermoleküle glykosidisch gebunden sein, was zu dem Namensteil „-glykoside“ der Substanzgruppe geführt hat. Diese Zucker

sind relativ selten vorkommende wie Digitoxose, Rhamnose oder Cymarose [11]. Abbildung 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Herzglykoside.

Herzglykoside sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen nicht nur im Pflanzenreich, sondern auch im Tierreich vor.

Im Hautsekret bestimmter Krötenarten finden sich die sogenannten Bufogenine, die zur Gruppe der herzaktiven Steroide vom Typ der Bufadienolide zählen. Diese Hautsekrete werden in Südostasien bis heute zur Therapie bei Herzinsuffizienz eingesetzt [12].

Im Pflanzenreich finden sich neben *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata* weitere herzglykosidhaltige Arten, wie zum Beispiel die das g-Strophanthin (Ouabain) enthaltenden Pflanzen der Gattung *Strophanthus*. Dabei handelt es sich um milchsaffführende Schlingsträucher, die in Asien und Afrika heimisch sind. Zu den ebenfalls herzglykosidhaltigen Pflanzen der Gattung *Acokanthera* gehört der afrikanische Ouabaio-Baum (*Acokanthera ouabaio*), dem das Ouabain seinen Namen verdankt [13].

1.3 DIE NATRIUM-PUMPE ALS HERZGLYKOSID-REZEPTOR

H. J. Schatzmann entdeckte 1953, dass die Natrium-Pumpe der Plasmamembran von Erythrozyten durch Herzglykoside gehemmt wird. Seitdem gilt die Natrium-Pumpe als Herzglykosidrezeptor [14].

Die Natrium-Pumpe pumpt 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle im Austausch gegen 2 K⁺-Ionen, die in die Zelle gelangen. Dadurch wird nicht nur das physiologische Ungleichgewicht dieser Ionen über die Plasmamembran aufgebaut, sondern auch ein Membranpotential, das für die Signalübertragung und den Energietransfer benutzt werden kann. Es werden Muskelzellen durch die Veränderung des Membranpotentials erregt. Der Na⁺-Konzentrationsgradient über die Plasmamembran energetisiert in den Epithelzellen des Darms und der Niere über Na⁺-abhängige Symportsysteme die Aufnahme von Energiesubstraten (Glucose, Aminosäuren, Lactat, Phosphat). Die durch den Neurotransmitter Acetylcholin eröffneten Na⁺-Kanäle starten postsynaptisch die saltatorische Erregungsleitung an Nervenzellen.

Aufgrund der spezifischen Hemmung durch Herzglykoside konnte J.C. Skou 1957 zeigen, dass eine in Plasmamembranen vorkommende und gleichzeitig

Na^+ - und K^+ -Ionen als Aktivatoren benötigende Mg^{2+} -ATPase das biochemische Äquivalent der Natriumpumpen der Zellmembranen der Tiere ist [15]. Die Na^+/K^+ -ATPase besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen α -Untereinheit (ca. 100 kDa) und dem Glykoprotein der β -Untereinheit (ca. 50 kDa). Die katalytische α -Untereinheit trägt neben der Bindungsstelle für ATP auf der cytosolischen Seite den Ionophorenanteil für den Kationentransport im Membranteil und auf der Blutseite die Herzglykosidbindungsstelle. Die Spaltung eines ATP zu $\text{ADP} + \text{P}_i$ führt zum Export von 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus und im Gegenzug zum Import von 2 K^+ -Ionen in die Zelle hinein. Wie diese Kopplung geschieht und welche Strukturen die Ionophoren-Bindungsstellen liefern, ist derzeit unbekannt [16-18]. Es wurden 4 Isoformen der α -Untereinheit identifiziert. Die Haupt-Isoform α_1 kommt in fast allen Geweben vor, während α_2 , α_3 und α_4 eine spezifischere Gewebeverteilung zeigen [16].

1.4 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -AUSTAUSCHER UND HERZGLYKOSIDWIRKUNG

Es ist schon lange bekannt, dass die Natrium-Pumpe mit dem $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der zunächst in Nervenzellen identifiziert wurde [19,20], gekoppelt ist [21]. Funktionell wirkt dieses Protein durch seine Kopplung mit der Natrium-Pumpe wie eine Ca^{2+} -Pumpe der Plasmamembran [3,22-24].

Dieser Mechanismus ist insbesondere für die Erregungsübertragung in Herzmuskelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen von Bedeutung, wo dieser Austauscher ebenfalls vorkommt [25].

Ca^{2+} -Ionen verstärken die Kontraktion von Muskelzellen und Herzmuskelzellen. Eine Hemmung der Natrium-Pumpe durch Herzglykoside in diesen Zellen soll nach den Vorstellungen von Blaustein [25-27] zu einem Anstieg des Na^+ -Spiegels in dem schmalen Spalt zwischen Plasmamembran und sarcoplasmatischem Reticulum (dem sogenannten PlasmERosom) führen, in dem Natrium-Pumpe und $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher liegen. Die durch die Umkehr der Flux-Richtung ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt zur vermehrten Freisetzung von Ca^{2+} aus den Ca^{2+} -Speichern des sarcoplasmatischen Reticulums, was zu einer verstärkten Muskelkontraktion führt. Diese Vorstellung hat als Erklärung der positiv inotropen Wirkung der Herzglykoside Einzug in die Lehrbücher der Pharmakologie gehalten. Der

Mechanismus erklärt auch, weshalb sich glatte Muskelzellen unter Einfluss von die Natrium-Pumpe hemmenden Herzglykosidkonzentrationen vermehrt kontrahieren, was zum Anstieg des Blutdruckes führt.

1.5 ENDOGENES DIGITALIS

Die Tatsache, dass die Natrium-Pumpe eine spezifische Bindungsstelle für Herzglykoside hat, führte um 1870 zu der Vermutung, dass es auch einen endogenen Liganden für diese Bindungsstelle geben könnte. Im Jahre 1953 postulierte der damals führende ungarische Biochemiker Albert Szent-György die Existenz eines endogenen Digitalis [28]. Die darauf erneut beginnenden intensiven Bemühungen, Herzglykoside in menschlichen und tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten zu finden, haben schließlich dazu geführt, solche endogenen Herzglykoside aus der Gruppe der Cardenolide und Bufadienolide im Blut und den Geweben von Tier und Mensch nachzuweisen, zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären (Abbildung 4).

Unter den Cardenoliden nimmt Ouabain eine besondere Rolle ein. Die Arbeitsgruppe von Hamlyn isolierte eine von Ouabain massenspektrometrisch nicht zu unterscheidende Substanz aus menschlichem Blutplasma [29]. Der Arbeitsgruppe von Wilhelm Schoner gelang 1998 die Isolierung und Strukturaufklärung von Ouabain aus Rindernebennieren mittels $^1\text{H-NMR}$ und Massenspektrometrie [30]. Ein Jahr später wurde bekannt, dass es sich bei dem aus dem Hypothalamus des Rindes isolierten sogenannten „hypothalamisch inhibitorischen Faktor“ ebenfalls um Ouabain handelte [31,32]. Ouabain wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet [33]. Seine Freisetzung steht unter der Kontrolle von ACTH und Angiotensin II [34,35]. In isolierten Zellen der Nebennierenrinde stellen Pregnenolon und Progesteron Vorstufen für die Biosynthese von Ouabain dar [36,37]. Nebennieren wacher Hunde sezernieren Ouabain [38]. Unter Kreislaufbelastung wird das endogene Ouabain bei Mensch und Hund rasch ins Blut abgegeben und fällt unter Ruhe ebenso rasch wieder ab (Halbwertszeit 2-5 min) [39,40].

Ein weiterer Beweis für die Bildung von Ouabain in der Nebenniere ist die Existenz bestimmter Tumore der Nebennierenrinde, die Ouabain in verstärktem Maße sezernieren. Das Entfernen des Tumors führt zur Senkung des Ouabain-

Blutspiegels und des Blutdrucks [41,42]. Bei der Ratte führt die Entfernung der Nebennieren zur Senkung des Ouabain-Blutspiegels [42].

Es ist gezeigt worden, dass die Blutspiegel an endogenem Ouabain mit der Schwere der Herzinsuffizienz zunehmen [43,44] und dass 50 % der Kaukasier mit arteriellem Bluthochdruck erhöhte Blutwerte an endogenem Ouabain haben [45].

Die Ouabain-Blutspiegel normotoner Menschen liegen im Bereich von $0,16 \times 10^{-9}$ bis $0,7 \times 10^{-9}$ M. Bei Herzinsuffizienz sind die Werte auf $1,6 \times 10^{-9}$ bis 3×10^{-9} M erhöht [43].

Die Infusion von $1,3 \times 10^{-8}$ M Ouabain in die Unterarmarterie des Menschen führt zu Vasokonstriktion [46]. Bei Ratten führt die Gabe kleiner Dosen Ouabain langfristig zur Ausbildung einer Hypertonie [47,48], während die Gabe von Digoxin unter gleichen Bedingungen den Blutdruck nicht nur nicht erhöht, sondern den durch Ouabain induzierten Bluthochdruck sogar senken kann. Diese blutdrucksenkende Wirkung des Digoxins könnte durch eine Hemmung des sympathischen Systems zustande kommen [49,50]. Der Ouabain-Antagonist PST 2238 (Abbildung 7) senkt langfristig ebenfalls den Blutdruck hypertensiver Ratten [51,52].

Als weiteres Cardenolid wurde eine von Digoxin nicht zu unterscheidende Substanz aus menschlichem Harn isoliert [53]. Endogene Substanzen, die mit Digoxin-Antikörpern reagierten, konnten bei Nierenversagen, in Nabelschnurblut und bei Bluthochdruck in der Schwangerschaft in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden [54]. Ebenso ist die Digoxin-Immunreaktivität nach erschöpfender Kreislaufbelastung und im akuten Herzinfarkt erhöht [55]. Qazzaz et al. entdeckten 2004, dass Digoxin in Nebennierenrindenzellen in Gewebekultur aus Essigsäure und Cholesterin synthetisiert wird. Eine Hemmung des zur Cholesterinsynthese und somit auch zur Steroidhormonsynthese benötigten Enzyms HMG-CoA-Reduktase führte zu einer verminderten Digoxinsynthese [56].

Langzeitbehandlungen mit Ouabain und Digoxin haben nicht nur unterschiedliche Auswirkungen auf den Blutdruck, auch die Expression von Isoformen der Natrium-Pumpe im Herzen und die Aldosteronsekretion der Nebennieren werden auf verschiedene Weise beeinflusst.

So nimmt die Aldosteron-Sekretion unter Ouabain-Einfluss ab, während sie unter Digoxin-Einfluss gleich bleibt [57-59].

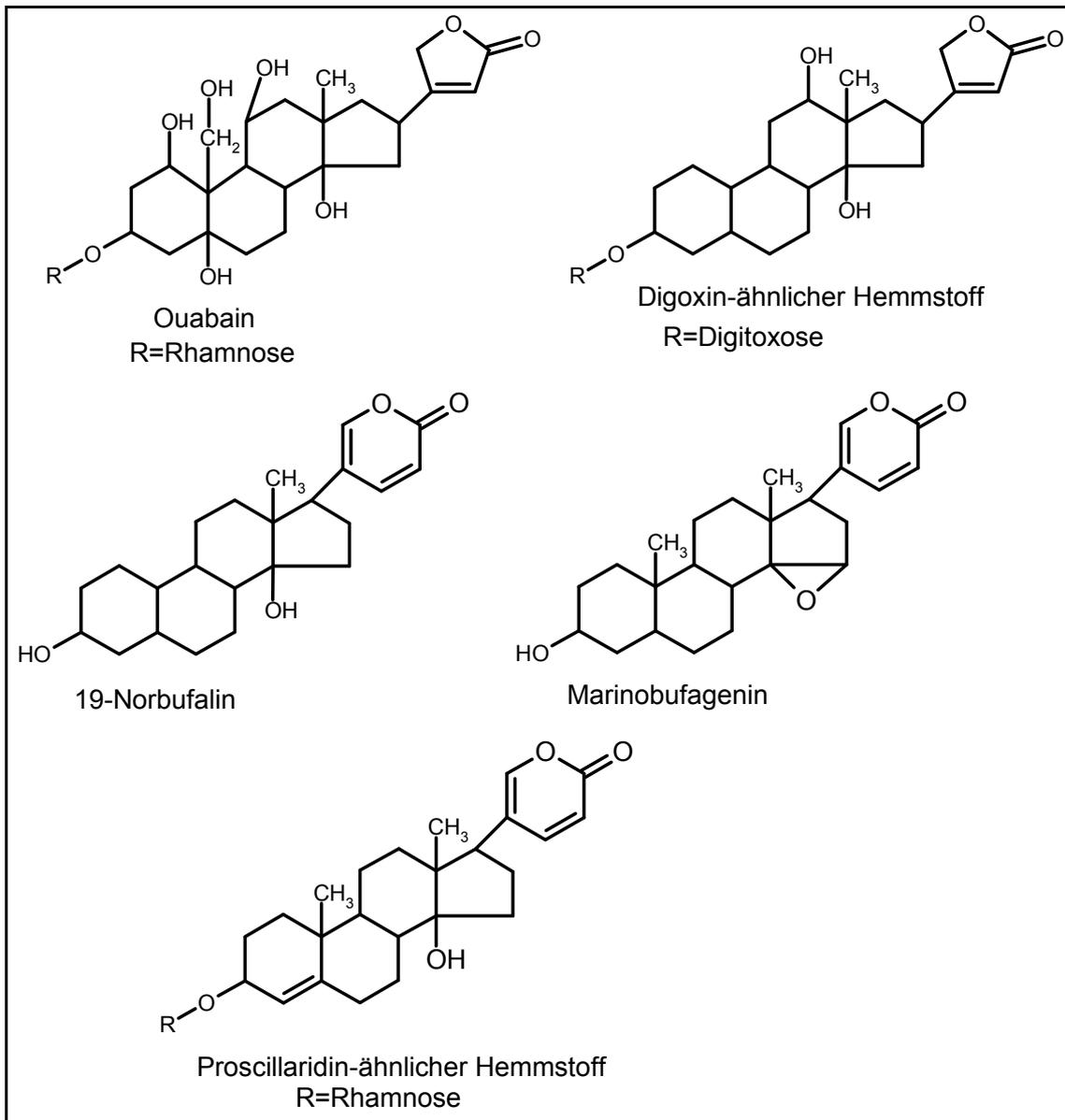


Abbildung 4 Auf der Suche nach endogenem Digitalis in Säugetieren entdeckte Herzglykoside

Die Expression der α_1 -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase nimmt nach Langzeitbehandlung mit Ouabain ab, während die Expression der α_3 -Untereinheit sowohl unter Ouabain- als auch unter Digoxin-Einfluss zunimmt [60].

Neben Cardenoliden wurden auch Bufadienolide gefunden (Abbildung 4 und Abbildung 2). Erhöhte Konzentrationen des Bufadienolids Marinobufagenin

wurden in Urin und Blut von Menschen mit akutem Herzinfarkt nachgewiesen [61]. Bei Präeklampsie [62], Hypoventilation [63], bei Anstieg des Plasmavolumens und der Natriumkonzentration steigt der Marinobufageninspiegel an. Marinobufagenin wirkt vasokonstriktorisch [64]. Diese Effekte von Stress und NaCl-Belastung auf die Konzentration des Bufadienolides Marinobufagenin unterscheiden sich deutlich von der Antwort des Cardenolids Ouabain [65,66]. Marinobufagenin bindet spezifischer an die α_1 -Untereinheit, während Ouabain besser an die α_2 - und α_3 - Isoformen der Natrium-Pumpe bindet.

Ein weiteres Bufadienolid, das 19-Norbufalin, wurde aus menschlichen Kataraktlinsen isoliert, wo es vermutlich an der Ausbildung des grauen Stars beteiligt ist [67]. Sich et al. wiesen bei Hochdruckpatienten einen Anstieg der Proscillaridin-A-Immunreaktivität nach [68]. In der Nebennierenrinde und im Hypothalamus konnte ebenfalls eine Proscillaridin-A-Immunreaktivität nachgewiesen werden [69].

1.6 TRANSPORT VON STEROIDHORMONEN IM BLUT

Viele Herzglykoside, wie z. B. Digoxin und Digitoxin, sind wasserunlöslich; dagegen ist Ouabain gut wasserlöslich. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die hydrophoben Herzglykoside im Blut an Albumin gebunden transportiert werden [70].

Wurden jedoch die therapeutischen Herzglykosidkonzentrationen betrachtet und mit der Dissoziationskonstante des Herzglykosid-Albumin-Komplexes verglichen, so zeigte sich, dass die Dissoziationskonstanten der Herzglykosid-Albuminkomplexe weit über ihrer therapeutischen Plasma-Konzentration liegen. Sollten Herzglykoside als Steroidhormone angesehen werden, dann könnte ihr Transport im Blut ähnlich dem der Steroidhormone an ein spezifisches Bindungsprotein gebunden erfolgen. Für viele Steroidhormone wurden im Blutplasma spezifische Bindungsproteine identifiziert, die für den Transport der Steroidhormone an ihre Zielzellen sorgen und diese Steroide mit hoher Affinität binden [71]. Erst bei höheren Steroid-Konzentrationen findet eine Bindung von Steroidhormonen an Albumin statt. In Tabelle 1 sind einige dieser spezifischen Bindungsproteine aufgeführt.

Tabelle 1 Steroidhormonbindungsproteine im Serum

Name	Abkürzung	Gebundene Hormone
Corticosteroidbindungsglobulin	CGB, Transcortin	Cortisol, Progesteron
Sexsteroidbindungs- Plasmaprotein	SBP, TeBG, SHBG	(Dihydro-) Testosteron, Oestradiol
α -Fetoprotein	α -FP	Oestradiol, Oestron
Progesteronbindungsprotein	PBP	Progesteron
Androgenbindungsprotein	ABP	(Dihydro-) Testosteron
Vitamin-D-Bindungsprotein	DBP	1,25- Dihydroxycholecalciferol

Beim Vergleich der Assoziationskonstanten der Hormone mit Albumin bzw. dem spezifischen Bindungsprotein wird deutlich, dass die Hormone Albumin mit hoher Kapazität, aber sehr schlechter Affinität binden, während sie die spezifischen Bindungsproteine mit sehr viel höherer Affinität ($K_D \sim 10^{-9}$ - 10^{-10} M) erkennen. In Tabelle 2 sind die Assoziationskonstanten einiger Steroidhormone mit Albumin denen mit ihren spezifischen Bindungsproteinen gegenüber gestellt.

Tabelle 2 Assoziationskonstanten der Steroidhormone in Humanserum (Mol/l) [72]

Hormon	Albumin	CBG	SHBG
Cortisol	3×10^3	$3-8 \times 10^7$	
Progesteron	6×10^4	2×10^7	
Dihydrotestosteron	$3-4 \times 10^4$		3×10^9
Testosteron	$3-4 \times 10^4$	$0,5 \times 10^7$	1×10^9
Östradiol	$3-6 \times 10^4$		$1-5 \times 10^8$

Auch für Herzglykoside ist bekannt, dass sie mit unterschiedlicher Affinität an Serumproteine binden [70]. Auf der Suche nach einem spezifischen Bindungsprotein für Herzglykoside im Blutserum war es früher gelungen, mittels

spezifischer Affinitätsmarkierung mit dem Protein-reaktiven Digoxin-Derivat HDMA die Existenz eines 50 kDa-Proteins im Rinderserum aufzuzeigen, das mit hoher Affinität Herzglykoside erkannte [73]. Dieses Protein wurde als „Cardiac Glycoside Binding Globuline“ (CGBG) bezeichnet. Antikörper gegen dieses Protein erkannten auch ein Protein mit einer Molmasse von 90 kDa [74]. Die physiologische Funktion der Bindungsproteine für Steroid-Hormone ist unklar. Unbestritten ist, dass freie Hormone auf ihre Zielorgane wirken. Fraglich ist jedoch, ob an Bindungsproteine gebundene Steroidhormone verlangsamt metabolisiert werden, ob die Hormone in gebundenem Zustand eventuell leichter die Kapillarwand passieren können und ob der Komplex erst nach der Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der Zellmembran dissoziiert, so dass das freie Hormon erst dann verfügbar wird [75]. Für das Sex-Binding-Protein (SBG) existieren Daten, die annehmen lassen, dass der Komplex aus Steroidhormon-Bindungsprotein und membranständigem Rezeptor auch als Start einer intrazellulären Signalkaskade dienen kann [71].

1.7 BLUTHOCHDRUCK

Die Beobachtung, dass langzeitige subcutane Infusion von niedrigen Dosen an Ouabain bei Ratten zur Ausbildung eines arteriellen Bluthochdrucks führt, während die Gabe von Digoxin dies nicht tut und sogar den Ouabain-Effekt umkehren kann, lässt darauf schließen, dass die beiden Herzglykoside auf unterschiedliche Weise in die Kreislaufregulation eingreifen [47-49].

Der arterielle Blutdruck wird durch das Herzzeitvolumen und den peripheren Widerstand der Gefäße gesteuert. Druckrezeptoren im Aortenbogen und der Carotisverzweigung (sinus caroticus) messen den Blutdruck und geben ihre Ergebnisse an die Hypophyse und die Medulla oblongata weiter, die über efferente Fasern sowohl das Herzzeitvolumen als auch den peripheren Gefäßwiderstand regulieren (Barorezeptor-Reflex). Im zuführenden Gefäß der Nierenglomerula wird zusätzlich die Durchströmung erfasst. Die Blutdruckwerte können über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch die Erhöhung der Natrium- und Flüssigkeitsretention und die des peripheren Widerstandes an den Bedarf angepasst werden [76].

Die arterielle Hypertonie ist definiert als Erhöhung des Blutdruckes auf mindestens 140 mm Hg systolisch und/oder 90 mm Hg diastolisch.

Aufgrund ihrer Ätiologie wird die primäre oder essentielle Hypertonie von den sekundären Formen der Hypertonie unterschieden. Bei der essentiellen Hypertonie lässt sich im Gegensatz zu den sekundären Formen keine spezifische Ursache benennen; d. h. die Diagnose wird durch den Ausschluss sekundärer Hypertonieformen gestellt. Bei der essentiellen Hypertonie handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Hypertonieformen, bei denen verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, so z. B. eine Aktivierung des sympathoadrenalen Systems durch psychosozialen Stress, erhöhter Kochsalzkonsum, Adipositas oder Alkoholabusus. Etwa 93 % aller Hypertoniker leiden an essentieller Hypertonie.

Als sekundäre Formen der Hypertonie sind renale, endokrine, medikamentöse, kardiovaskuläre, neurogene und schwangerschaftsinduzierte Hypertonien bekannt.

Die renale Hypertonie entsteht entweder durch eine vermehrte Wasser- und Natriumretention, die meist durch eine chronische Glomerulonephritis ausgelöst wird, oder durch eine Einengung einer oder beider Nierenarterien.

Einer endokrinen Hypertonie liegt eine vermehrte Hormonsekretion zu Grunde, z. B. die vermehrte Catecholaminsekretion beim Phäochromozytom, erhöhte Aldosteronspiegel beim Conn-Syndrom oder erhöhte Glucocorticoid-Spiegel beim Cushing-Syndrom. Auch Medikamente wie orale Kontrazeptiva und Mineralo- und Glucocorticoide können eine Hypertonie auslösen.

Eine kardiovaskuläre Hypertonie entsteht infolge einer Erkrankung des Herzens oder großer herznaher Gefäße.

Die Zerstörung der für die Kreislaufregulation zuständigen peripheren oder zentralen nervalen Strukturen liegt der neurogenen Hypertonie zugrunde.

Bei Erstgebärenden im ersten Schwangerschaftsdrittel tritt häufig eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie auf.

Aufgrund der Pathogenese wird zwischen *Widerstandshochdruck*, der durch die Erhöhung des peripheren Widerstandes entsteht, *Minutenvolumenhochdruck*, der durch die Erhöhung des Herzminutenvolumens bei gleichbleibendem peripheren Widerstand zustande kommt und *Elastizitätshochdruck*, bei dem die

Ursache in der mangelnden Dehnbarkeit der großen arteriellen Gefäße zu suchen ist, unterschieden [77].

1.8 AUFBAU DER ARTERIEN

Als Bestandteile der arteriellen Gefäßwand sind vor allem die glatten Muskelzellen und das Endothel an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.

Arterielle Blutgefäße bestehen aus drei Schichten: der *Tunica intima*, der *T. media* und der *T. externa*. Die *T. intima* besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden Blut stehen und von feinen kollagenen Fasern und einer elastischen Membran, der *Elastica interna*, umgeben sind. Die *T. media* besteht aus glatten Muskelgewebsfasern, die in einer dichten Schicht zirkulär oder spiralförmig angeordnet sind und zwischen denen Bindegewebsfasern liegen. Die *T. externa* (auch: Adventitia) bildet die Verbindung zwischen Gefäß und Umgebung und besteht aus glatten Muskelzellen, die in längs verlaufende, elastische, kollagene Fasern eingebettet sind.

Große, herznahe Arterien zeichnen sich durch eine dicke Intima und durch dichte elastische Netze innerhalb der Media aus. Sie sind stark dehnbar und werden als Arterien vom elastischen Typ bezeichnet. Je weiter die Arterien vom Herzen entfernt liegen, desto stärker nehmen die elastischen Fasern der Media ab und die glatten Muskelzellen zu. So erhalten die Gefäße eine geringere Dehnbarkeit und werden als Arterien vom muskulären Typ bezeichnet [78].

1.8.1 Das Endothel

Als regulierende Einheit für den Blutdruck stand bis ca. 1980 die Funktion der glatten Gefäßmuskelzellen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, während die Funktion des Endothels nur wenig Beachtung fand. Furchgott et al. stellten 1980 die Bedeutung des Endothels für den Gefäßtonus klar, indem sie die Existenz eines „Endothelium-Derived Relaxing Factor“ aufdeckten, der später als endogenes Stickoxid erkannt wurde [79]. Dies führte zu vielen weiteren Erkenntnissen über die Funktion des Endothels.

Endothelzellen kleiden als einschichtige Plattenepithelien alle Gefäße des Körpers aus. Abhängig von den lokalen Aufgaben unterscheiden sich die Zellen in ihrer Morphologie; so bilden die Endothelzellen im Gehirn eine fast undurchdringliche Grenzschrift, die sogenannte Blut-Hirn-Schranke, während durch das Endothel der Nierengefäße eine Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen möglich ist und in den Gefäßen der Leber ein reger transmembranärer Stoffaustausch stattfindet. Neben der Erfüllung seiner mechanischen Aufgaben ist das Endothel in der Lage, auto-, para- und endokrin wirksame Substanzen zu produzieren. Verantwortlich ist das Endothel vor allem für den lokalen Gefäßtonus, für Gerinnungsvorgänge und deren Gegenregulation, die Steuerung von lokalen Entzündungsabläufen und das vaskuläre Remodeling.

In den oben genannten physiologischen Abläufen nimmt das Stickoxid (NO) eine Schlüsselrolle ein. Zur Freisetzung von NO kommt es durch die Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin, die von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) katalysiert wird. Eine NO-Synthase findet sich ebenfalls in Muskelzellen und Cardiomyocyten. NO hat als flüchtiges Gas nur eine Halbwertszeit von einigen Sekunden. Es wirkt im Gefäßlumen, wo es Monozyten anzieht und die Eigenschaften der Thrombozyten so moduliert, dass sie antithrombotisch wirksam werden. Ebenfalls entfaltet es seine Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur, in deren Zellen es die Guanylat-Zyklase aktiviert, was zum Anstieg des cGMP (cyclisches Guanosin-Monophosphat) führt. Dies bewirkt den Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was eine Hemmung der Muskelzellkontraktion und somit eine Vasodilatation zur Folge hat.

Es ist gezeigt worden, dass Ouabain die durch Interleukin-1 β [80,81] und Bradykinin [82] stimulierte NO-Freisetzung in Endothelzellen verstärkt.

Die Endothelzellen produzieren auch einen Gegenspieler des vasodilatierenden NO, das Endothelin. Das vasokonstriktorische Endothelin ist ein Peptid aus 21 Aminosäuren, das auch in glatten Muskelzellen, Entzündungszellen, Lunge und Niere produziert wird. Endothelin entsteht durch die proteolytische Spaltung eines größeren Vorstufenproteins, das big-Endothelin genannt wird. Dieser Prozess wird durch das Endothelin-Converting-Enzyme katalysiert. Endothelin weist Ähnlichkeiten zu einem Bestandteil des Giftes einiger Schlangen auf, der

einen tödlichen Vasospasmus bewirkt. Endothelin wirkt auch entzündungsfördernd.

Die Synthese von Endothelin wird durch cardiovascularen Stress induziert, woran die Hormone Angiotensin II, Noradrenalin, Vasopressin oder Bradykinin beteiligt sind, sowie Cytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor- α .

Auch Thrombin und mechanischer Stress stimulieren die Endothelin-Synthese. Saunders et al. ermittelten, dass auch Ouabain in der Lage ist, die Freisetzung von Endothelin aus humanen Endothelzellen der Nabelschnurarterie in Kultur zu steigern. Bei einer Konzentration von 50 nM Ouabain wurde einer Erhöhung der Endothelin-Freisetzung um das zweifache gemessen [83].

An glatten Muskelzellen bindet Endothelin an ET_A -Rezeptoren und bewirkt so eine Kontraktionssteigerung. Am Endothel selbst bindet Endothelin an ET_B -Rezeptoren und bewirkt über eine vermehrte NO-Freisetzung eine kurzfristige Vasodilatation. Die Endothelin-Blutspiegel sind bei verschiedenen Erkrankungen erhöht, so z. B. bei schwerem Bluthochdruck, Herzinfarkt und Atherosklerose. Neben den erhöhten Blutspiegeln kommt es auch zu einer verstärkten Expression von Endothelin in den Geweben.

In den Endothelzellen werden weitere vasokonstriktorische Substanzen hergestellt, zu diesen gehören Angiotensin II und Prostaglandine. Eine weitere vom Endothel produzierte vasodilatorische Substanz ist das Prostazyklin.

Das Endothel ist somit im Körper verantwortlich für das Gleichgewicht zwischen Dilatation und Kontraktion der Gefäße [76,84,85].

Ouabain ist in der Lage, die Zellproliferation von Endothelzellen anzuregen. Bei einer Konzentration von 5 nM Ouabain konnte eine Steigerung der Proliferationsrate um 50 % gemessen werden [83].

1.8.1.1 Die Signalkaskade zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Essentiell für die Aktivität der eNOS ist die Anwesenheit von aktiviertem Calmodulin [86]. Calmodulin ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es fungiert in der Zelle als Ca^{2+} -Rezeptor und hat verschiedene Aufgaben in der Signaltransduktion.

Zur Aktivierung des Calmodulins ist zunächst eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erforderlich. Diese kann entweder durch die Leerung der

intrazellulären Ca^{2+} -Speicher oder durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgen. Verschiedene Ca^{2+} -Kanal-Systeme können hierbei eine Rolle spielen.

Drei verschiedene Typen von Ca^{2+} -Kanälen sind bekannt. Es gibt die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran, die nach einer Depolarisierung der Zellmembran geöffnet werden. In Endothelzellen finden sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle der Typen L und T.

Die IP_3 -abhängigen Kanäle in der Membran des endoplasmatischen Reticulums werden geöffnet, wenn der Inositol-Phospholipid-Signalweg aktiviert wird. Unter Einwirkung der G-Protein-abhängig aktivierten Phospholipase C wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in der Zellmembran zu Inositol-3,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin gespalten. Das kleine, wasserlösliche IP_3 -Molekül wandert durch das Cytosol und bindet am endoplasmatischen Reticulum an einen IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanal, der sich in der Folge öffnet. Unter Einfluss des Ca^{2+} -Ausstromes werden in der Zellmembran die sogenannten store-operated- Ca^{2+} -Kanäle (SOC) aktiviert, die einen weiteren Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch den Einstrom aus dem extrazellulären Raum bewirken. Eine neue Publikation der Arbeitsgruppe von Anita Aperia besagt, dass die IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanäle auch ohne IP_3 -Einwirkung durch direkte Interaktion des IP_3 -Rezeptors mit der Na^+/K^+ -ATPase unter Einfluss von Ouabain geöffnet werden können.

Die sogenannten Ryanodin-Rezeptoren setzen als Antwort auf eine Depolarisation der Zellmembran Ca^{2+} aus dem sarcoplasmatischen Reticulum frei. Sie können durch das pflanzliche Alkaloid Ryanodin gehemmt werden.

Ebenfalls möglich ist der Transport von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle durch eine Änderung der Ionen-Selektivität von Na^+ -Kanälen der Plasmamembran, die auf bestimmte Signale hin in der Lage sind, Ca^{2+} -Ionen in die Zelle zu transportieren.

Der Ca^{2+} -Efflux aus dem Cytosol wird durch ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen und Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher gewährleistet [87-91].

Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel hat die Aktivierung des Calmodulin-Moleküls durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen zur Folge.

Das aktivierte Calmodulin entfaltet seine Wirkung einerseits durch die direkte Bindung an Zielproteine, andererseits indirekt durch die Vermittlung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen.

Im Falle der eNOS kommen beide Wirkprinzipien des Calmodulins zum Tragen.

I. Calmodulin bindet direkt an das eNOS-Enzym und aktiviert es.

eNOS liegt in der Zelle in den sogenannten Caveolae gebunden an das Protein Caveolin-1 vor. Caveolin-1 hat eine hemmende Wirkung auf das eNOS-Enzym. Erhöht sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Einwirkung eines Agonisten und wird in der Folge Calmodulin durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen aktiviert, dann kann dieses aktivierte Calmodulin die Bindung zwischen eNOS und Caveolin-1 kompetitiv unterdrücken und somit eNOS aktivieren (Abbildung 5) [92].

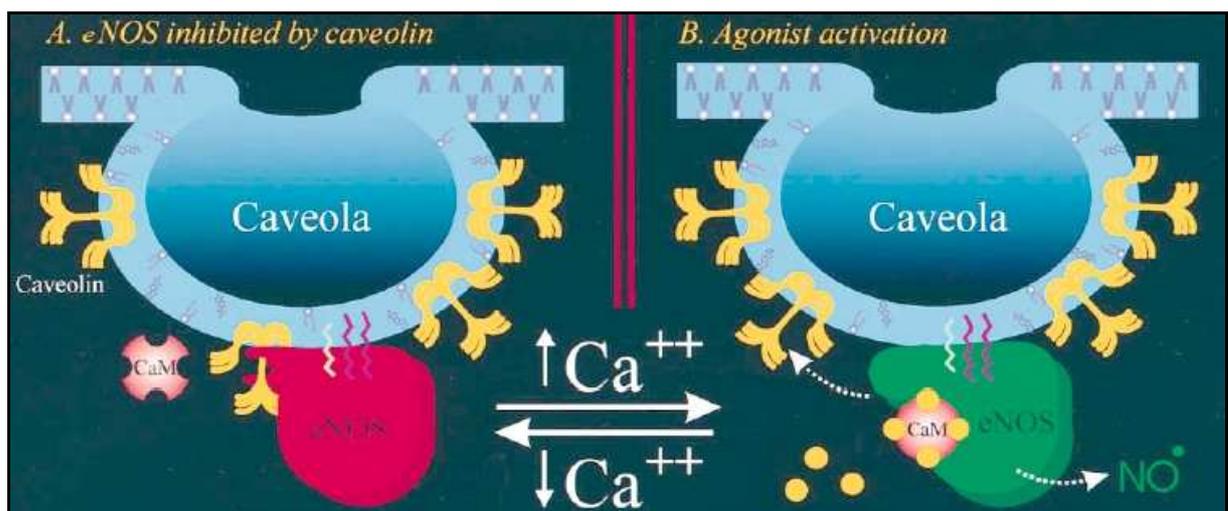


Abbildung 5

Mechanismus der eNOS-Aktivierung durch Calmodulin

Direkte Bindung (aus [92])

A: Im Ruhezustand ist eNOS durch die Bindung an Caveolin-1 inaktiviert.

B: Durch die agonistenvermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird Calmodulin mit Ca^{2+} beladen und aktiviert. Das aktivierte Calmodulin verdrängt das hemmende Caveolin-1 von der Bindungsstelle am eNOS-Molekül. eNOS wird aktiviert.

II. Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II aktiviert eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177.

Neben dieser durch Ca^{2+} /Calmodulin induzierten Konformationsänderung der eNOS kann auch eine Phosphorylierung an Serin 1177 diese aktivieren. Die

Calmodulin/ Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase II ist in der Lage, eNOS an dieser Stelle zu phosphorylieren und somit zu aktivieren [93].

Neben dieser aktivierenden Phosphorylierungsstelle verfügt eNOS auch über eine hemmende Phosphorylierungsstelle an Threonin 495. Im Ruhezustand ist das Threonin 495 der eNOS phosphoryliert und diese somit inaktiv. Die Dephosphorylierung erfolgt Ca^{2+} -abhängig durch die Proteinphosphatase 1.

Dies besagt, dass bei Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einerseits die hemmende Phosphorylierung an Threonin 495 abnimmt, während andererseits die aktivierende Phosphorylierung an Serin 1177 zunimmt. So können Calcium-Ionen sowohl durch Calmodulin-vermittelte Verdrängung des Caveolin-1 als auch durch Dephosphorylierung und Phosphorylierung eNOS aktivieren. Im Gegensatz zur Calmodulin-abhängigen Konformationsänderung hat die Phosphorylierung an Serin 1177 nur eine geringe Aktivitätssteigerung zur Folge. Fleming et al. postulierten, dass die Bindung des Calmodulins an eNOS erst nach der Dephosphorylierung an Threonin 495 erfolgen kann [93].

Die Aktivität der eNOS kann zusätzlich über andere, Ca^{2+} -unabhängige Signalwege durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst werden [94].

Eine Phosphorylierung an Serin 1177 kann durch die Proteinkinase B, die auch als akt bezeichnet wird, erfolgen. Im diesem Falle muss die akt/Proteinkinase B zunächst selbst durch eine Phosphorylierung aktiviert werden. Hierzu ist einerseits die Phosphatidylinositol-3-Kinase, andererseits aber auch die Calmodulin/ Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase-Kinase in der Lage, so dass dieser Signalweg sowohl Ca^{2+} -abhängig als auch Ca^{2+} -unabhängig ablaufen kann [95]. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase muss durch die Bindung eines Liganden an einen Tyrosin-Kinase- oder G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert werden. Unter Einwirkung der aktivierten Phosphatidylinositol-3-Kinase wird das in der Zellmembran enthaltene Molekül Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat am C3 des Inositols phosphoryliert, so dass Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat entsteht. Dieses Molekül verbleibt in der Zellmembran und fungiert dort als Docking-Stelle für intrazelluläre Signalmoleküle, die eine sogenannte Pleckstrin-Homologie-Domäne enthalten. Diese Domäne wurde zuerst im Thrombozyten-Protein Pleckstrin entdeckt. Die Proteinkinase B bindet mit ihrer Pleckstrin-Homologie-Domäne an das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und wird

nach einer durch die Bindung verursachten Konformationsänderung von den 3-Phosphatidylinositol-abhängigen Proteinkinasen 1 und 2 (PDK-1 und PDK-2) an Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert und somit aktiviert. Die aktivierte Proteinkinase B phosphoryliert die endotheliale NO-Synthase (eNOS) an Serin 1177, was zu einer erhöhten NO-Freisetzung führt.

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase kann durch die Substanzen Wortmannin und Ly294002 gehemmt werden. Ozeki et al. stellten 2004 fest, dass Ly294002 neben dieser hemmenden Wirkung auf den Phosphatidylinositol-3-Kinase/akt-Proteinkinase B-Weg auch den Ca^{2+} -Einstrom durch store-operated- Ca^{2+} -Kanäle hemmt und somit auch dadurch Einfluss auf die Aktivierung der eNOS nehmen kann.

Die NO-Synthase wird durch die Substanz L-Name gehemmt (Abbildung 6) [95-98].

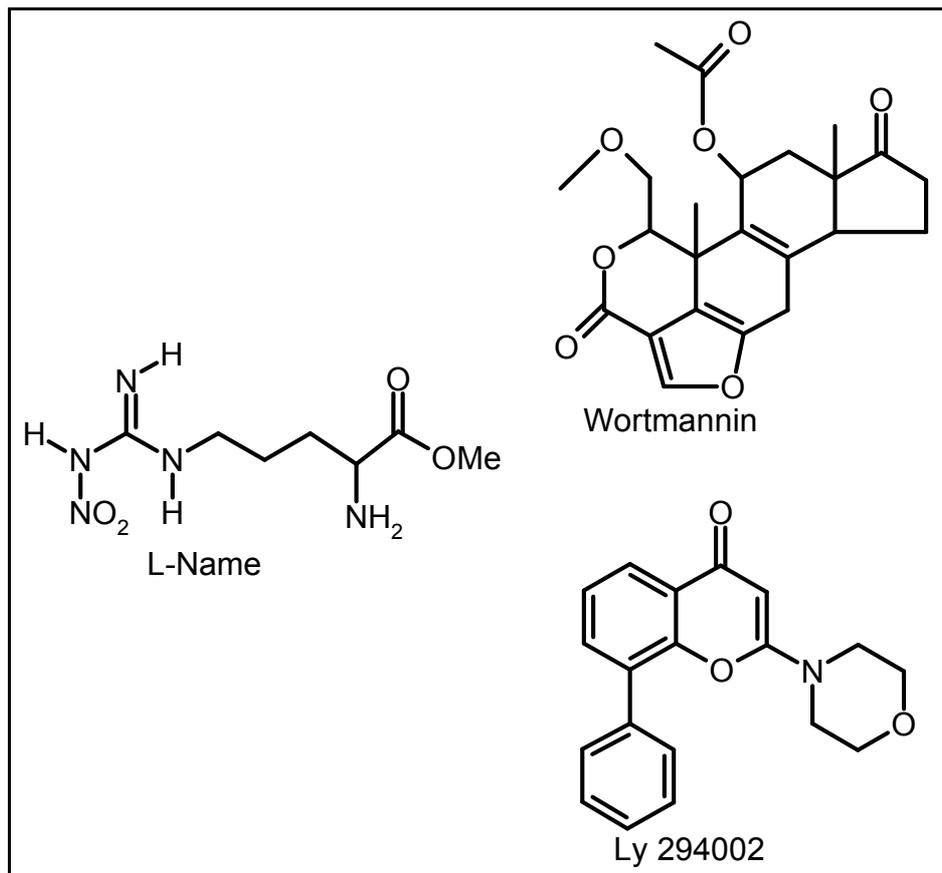


Abbildung 6 Hemmstoffe des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (akt)-eNOS-Signalweges
Wortmannin und Ly 294002 hemmen die Phosphatidylinositol-3-Kinase,
L-Name hemmt die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die Signalkaskade der Proteinkinase A bewirkt eine Phosphorylierung des Serin 1177 und eine Dephosphorylierung an Threonin 495 und hat somit eine Aktivierung von eNOS zur Folge, während die Proteinkinase C eine genau gegensätzliche Wirkung hat und somit eNOS hemmt [94,99].

1.8.2 Die glatte Muskulatur der Gefäße

Die glatte Muskulatur wird wegen ihrer lichtmikroskopisch homogen erscheinenden Fasern als solche bezeichnet. Sie ist auf die Aufrechterhaltung von Dauerspannung und langsame Spannungsänderungen spezialisiert.

Die glatte Muskelzelle ist wie eine Spindel geformt und hat eine Länge von 50-400 µm und eine Dicke von 12-15 µm. Der Zellkern liegt im Zentrum der Zelle. Die Aktin- und Myosinfilamente sind unregelmäßig in Längsrichtung der Zelle angeordnet. Insgesamt haben die Strukturelemente im Vergleich zur quergestreiften Muskulatur einen geringeren Anteil an der Zellmasse. Das sarkoplasmatische Reticulum ist in glatten Muskelzellen nur schwach ausgebildet.

Die glatte Muskulatur gehört zu den nicht-spontanaktiven Muskeln und wird ausschließlich vom vegetativen Nervensystem innerviert. Die Nervenenden des Sympathicus und Parasympathikus setzen ihre Transmitter (Sympathikus: Noradrenalin, Parasympathicus: Acetylcholin) aus Speichern, sogenannten Varikositäten frei, die sich entlang der Muskelzelle befinden.

Die Transmitter erreichen die Muskelzellen durch Diffusion und lösen die Kontraktion aus. Die glatte Muskelzelle ist von ihrer gesamten Membranoberfläche her erregbar.

Die elektromechanische Kopplung beruht wie bei der quergestreiften Muskulatur auf der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da das sarkoplasmatische Reticulum nur schwach ausgebildet ist, reicht die dort gespeicherte Ca^{2+} -Menge nicht zur Kopplung aus, so dass membrangebundenes und extrazelluläres Ca^{2+} hinzu kommen muss. Die Calciumionen dringen in das Sarkoplasma ein und aktivieren unter Mitwirkung des Calmodulins eine Myosinkinase, die eine Phosphatgruppe von ATP auf das Myosin überträgt und dadurch die Verschiebung der beiden Filamente gegeneinander auslöst [100].

In glatten Muskelzellen des Hundes konnten Aydemir-Koksoy et al. eine Steigerung der DNA-Synthese unter Einfluss von nanomolaren Ouabain-Konzentrationen nachweisen [101]. Allen et al. wiesen eine Steigerung der Proliferationsrate dieser Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit nanomolaren Ouabain-Konzentrationen nach, in humanen glatten Muskelzellen konnte ein ähnlicher Effekt gezeigt werden. In glatten Muskelzellen der Ratte zeigte sich erst bei höheren Konzentrationen (10^{-8} – 10^{-6} M Ouabain) eine Steigerung der Proliferation [102,103].

Auch nanomolare Konzentrationen an Marinobufagenin sind in der Lage, die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen zu steigern [104].

1.9 FRAGESTELLUNG

1.9.1 Gibt es einen weiteren Weg der Signalvermittlung für Herzglykoside?

Obwohl kein Zweifel daran besteht, dass die toxische Wirkung der Herzglykoside auf dem oben beschriebenen Zusammenwirken der Na^+/K^+ -ATPase mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher beruht, ergeben sich neuerdings jedoch erhebliche Zweifel daran, dass diese Erklärung auch für die therapeutische Wirkung korrekt ist.

Die bei der Herzglykosidtherapie erreichten Digoxin-Blutspiegel betragen 1,3 bis 2,6 nMol/l. Bei dieser Digoxin-Konzentration wird die Na^+/K^+ -ATPase des Menschen kaum gehemmt, und es kann auch kein Anstieg des intrazellulären Na^+ nachgewiesen werden [105]. Falls die Herzglykosidwirkung, wie von Blaustein vorgeschlagen [27], über eine konstante, chronische Erhöhung des diastolischen intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zustande käme, dann müsste eigentlich daraus eine Herzhypertrophie und ein nachfolgendes Remodeling des Herzens entstehen [3,4,106].

Herzinsuffizienz kann auch mit β -Rezeptorenblockern, ACE-Hemmern, Diuretika und Ca^{2+} -Kanalblockern therapiert werden. Diese Therapie entlastet den Herzmuskel von der ständigen hormonellen Belastung durch Noradrenalin und Angiotensin II, welche über einen konstanten Druck auf die Expression von Proteinen über cAMP-abhängige und vom intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel abhängige Signalkaskaden zur Verstärkung des Herzmuskels (Herzmuskelhypertrophie, Remodeling des Myocards) und zum arteriellen Bluthochdruck führt. Auch bei der Therapie mit Ca^{2+} -Kanalblockern kommt es zu einem relativen Abfall des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels.

Die Therapie mit Herzglykosiden, die über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels die Herzmuskelkontraktion verstärken will, sowie die den Herzmuskel entlastende, den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erniedrigende Therapie verfolgen somit zwei sich widersprechende und unterschiedliche Therapiekonzepte. Dieser Widerspruch legt die Frage nahe, ob die über Jahrzehnte praktizierte Therapie mit Digoxin nicht auf einem anderen, bisher

noch unbekanntem Mechanismus beruht, zumal inzwischen bekannt ist, dass andere Steroidhormone – von denen immer angenommen wurde, dass sie über die Bindung an einen Zellkern-Rezeptor wirken – auch rasche Wirkungen über einen Membranrezeptor haben [107]. Da Ouabain als Steroid-Derivat (Abbildung 3) als ein neues Mineralcorticoid der Nebenniere und des Hypothalamus betrachtet werden kann [108], sich aber in seiner Langzeitwirkung von der des Digoxin unterscheidet [49,50,55] könnten beide Herzglykoside auch über unterschiedliche Signalwege auf die Expression von Proteinen im Zellkern wirken.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass nanomolare Konzentrationen an Ouabain, welche keinesfalls die Natrium-Pumpe hemmen, zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen [83,109,110]. Es ist auch bekannt, dass derartig niedrige Ouabain-Konzentrationen über einen noch nicht im Detail bekannten intrazellulären Signalweg unter Einbeziehung des $\text{NF}\kappa\text{-B}$ und anderer Transkriptionsfaktoren zur Stimulierung des Wachstums glatter Muskelzellen führen [103,109-111].

1.9.2 Warum wirken Digoxin und Ouabain unterschiedlich auf den Blutdruck?

Alle Herzglykoside hemmen mit unterschiedlicher Affinität die Natrium-Pumpe. Somit erhebt sich die Frage, warum sich Ouabain und Digoxin in der Induktion von arteriellem Bluthochdruck und somit bezüglich der Proteinexpression in Herzmuskel- und glatten Muskelzellen unterschiedlich verhalten. Es ist derzeit nicht klar, wie Digoxin als der hauptsächliche Vertreter der therapeutisch angewandten Herzglykoside auf die intrazelluläre Signalkette wirkt. Digoxin kann nicht den durch Ouabain-induzierten Signalweg verwenden, da es sonst auch Bluthochdruck induzieren würde.

Offensichtlich sind die Strukturunterschiede zwischen diesen beiden Substanzen für die unterschiedliche Wirkung verantwortlich: Digoxin und Ouabain unterscheiden sich in der Natur und der Länge der am C3-Atom glykosidisch gebundenen Zuckerkette. Sie unterscheiden sich auch in der Anzahl der OH-Gruppen des Steroidgrundskeletts. Sie unterscheiden sich aber nicht in der Natur des Laktorrings (Abbildung 3). Die Substanzen unterscheiden sich des Weiteren in den physikalisch-chemischen Eigenschaften: Ouabain ist

gut in Wasser löslich, Digoxin ist hydrophob. Die unterschiedliche Hydrophobizität beider Substanzen korreliert auch mit ihrer Resorbierbarkeit aus dem Darm:

Nach den Angaben der Lehrbücher der Pharmakologie wird Digoxin gut aus dem Darm resorbiert (70-80 %), Ouabain dagegen kaum (0-7 %). Digoxin wird zu mehr als 30 % über die Leber ausgeschieden, Ouabain hingegen über die Niere.

Das hydrophobe Digoxin wird zu 20-40 % an Plasmaproteine gebunden, Ouabain als wasserlösliches Steroid im Gegensatz dazu kaum (0-10 %). Wenn — wie im Falle des Sex-Hormone-Binding-Globuline (SHBG) — die Wirksamkeit eines Hormons durch die Bindung an ein spezifisches Bindungsprotein moduliert wird und das Bindungsprotein eventuell Einfluss auf die Hormon-Rezeptor-Bindung hat, dann wäre es auch denkbar, dass das hydrophobe Digoxin auf einem anderen Wege auf den Zellkern wirkt als Ouabain.

Weiterhin kann derzeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Digoxin dann als Ouabain-Antagonist am Rezeptor der Natrium-Pumpe wirkt, wenn Ouabain in nicht-hemmenden Konzentrationen vorliegt. Unterstützung für einen derartigen Wirkungsmechanismus kommt von dem Bericht einer italienischen Arbeitsgruppe, der zeigt, dass das Herzglykosid-Analog PST2238 (Abbildung 7) den Blutdruck senkt [51,52,112]. Der Mechanismus, mit dem PST2238 blutdrucksenkend wirkt, ist derzeit jedoch nicht klar.

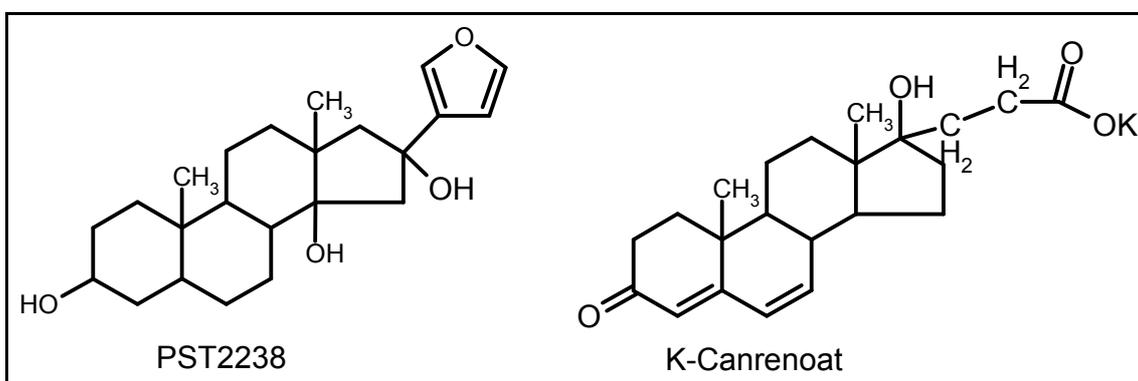


Abbildung 7 **Strukturen des Ouabain-Antagonisten PST 2238 und des Aldosteron-Antagonisten K-Canrenoat**

Es ist aber bekannt, dass es Ouabain von seiner Bindungsstelle an der Na^+/K^+ -ATPase ebenso verdrängt wie der Aldosteron-Antagonist K-Canrenoat [113]

(Abbildung 7). Aglykone der Herzglykoside werden viel weniger fest an die Bindungsstelle für herzaktive Steroide der Na^+/K^+ -ATPase gebunden als die Glykoside.

1.10 ZIEL DER ARBEIT

Die Unterschiede in der Langzeitwirkung von Ouabain und Digoxin, die sich in der Erzeugung oder Vermeidung von Bluthochdruck, aber auch der Myokardhypertrophie und damit in der unterschiedlichen Aktivierung von Genen und der Expression unterschiedlicher Proteine zeigen, können beruhen auf

1. unterschiedlichen Signalwegen, die sich durch eine Bindung des Digoxin – nicht aber des Ouabain - an Blutproteine (CGBG) ergeben. Wenn dies der Fall sein sollte, dann müsste das Bindungsprotein für Herzglykoside besser charakterisiert werden und geklärt werden, wo es außer an die Na^+/K^+ -ATPase bindet und ob es die Digoxin-Wirkung modifiziert.
2. unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen des Ouabain und Digoxin, die an der Entstehung des arteriellen Blutdrucks beteiligt sind. Dazu zählen neben den Herzmuskelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen auch die Endothelzellen. Endothelzellen sezernieren vasokonstriktorische (Endothelin) und vasodilatorische Hormone (NO), deren Sekretionsverhältnis von Ouabain und Digoxin unterschiedlich beeinflusst werden könnte.
3. einer unterschiedlichen Wirkung von Ouabain und Digoxin auf den Barorezeptor-Reflex. Hinweise für diese Möglichkeit wurden publiziert [49].

Die in der Arbeitsgruppe Schoner früher erarbeiteten Methoden erlaubten es, die unter 1 und 2 genannten Möglichkeiten der Unterschiede in der Langzeitwirkung von Ouabain und Digoxin zu untersuchen.

In der Promotion von Holger Kost waren Hinweise erarbeitet worden, dass es im Blut von Rindern ein spezifisches Serumprotein (CGBG) gibt, das sich durch Affinitätsmarkierung mit dem proteinreaktiven Digoxigeninderivat HDMA nachweisen lässt [74]. Die Methoden der Reinigung und der Gewinnung von Antikörpern waren von ihm ausgearbeitet worden. Es war daher ein erstes Ziel dieser Arbeit, das Bindungsprotein für Herzglykoside weiter zu charakterisieren,

reine und affinitätsgereinigte Antikörper gegen das CGBG zu erhalten, seine Gewebeverteilung mit einem ELISA zu messen und dadurch Aufschluss über die Natur und Funktion des Proteins zu erhalten. Ein weiteres Ziel war die Suche nach einer weiteren Signalkette für das Herzglykosid Digoxin, welche sich eventuell von der des Ouabains unterscheidet.

Am Institut für Biochemie und Endokrinologie war außerdem in der Arbeitsgruppe von Saunders und Scheiner-Bobis an menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnur gezeigt worden, dass nanomolare Ouabain-Konzentrationen die Freisetzung von Endothelin-1 stimulieren [83]. Da Endothelzellen neben Endothelin auch NO bilden, war es ein zweites Ziel der Arbeit, herauszufinden ob Digoxin und Ouabain sich in der Stimulierung der Freisetzung beider Hormone gleich verhalten, in welchem Herzglykosid-Konzentrationsbereich die Stimulierung erfolgt, wie die Signalkaskade aussieht und ob die Natrium-Pumpe unter den experimentellen Bedingungen gehemmt wird. Es war auch von Interesse zu überprüfen, ob Herzglykoside das Wachstum von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in Kultur beeinflussen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

12-Well-Platten Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
24-Well-Platten Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
6-Well-Platten Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Platten Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
Biosep-DEAE-Säule	Phenomenex (Aschaffenburg)
Blotkammer	ict GmbH (Idstein)
Braunüle Vasodrop	Clinico (Bad Hersfeld)
CO ₂ -Inkubator	Biohit (Finnland)
Cryoröhrchen	Roth (Karlsruhe)
Dialyseschlauch (10 kDa)	Roth (Karlsruhe)
Druckdialyse (Diaflow)	Pall (Dreieich)
Einwegspritzen	Becton (Dublin, Irland)
Elektrophoresekammer und Zubehör	Biorad (München)
ELISA-Photometer	Labsystems (Frankfurt)
Elisa-Platten-Washer Model 1575 Immuno Wash	Biorad (München)
Faltenfilter	Schleicher&Schuell (Dassel)
Filterpapier (Whatman-Papier)	Whatman (Kent, UK)
FPLC-Anlage	Pharmacia (Freiburg)
HPLC-Anlage	Pharmacia (Freiburg)
Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge RC2B	Sorvall Kendro (Ashville, USA)
Magnetrührer RCO	IKA (Staufen)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar)
Mikrotiterplatten	Nunc (Wiesbaden)
Multipipette	Sucorex (Schweiz)
Netzgerät	Biorad (München)
Nitrocellulose (BA S-85)	Millipore (Bedford)
Orbital-Schüttler	Heidolph (Kelkheim)

Petrischalen Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
pH-Meter	Knick (Frankfurt)
Photometer Lambda 2	Perkin Elmer (Überlingen)
Potter-Elvehjem-Homogenisator	B. Braun (Melsungen)
Sterilbank	Kojair (Finnland)
Sterilfilter	Millipore (Bedford)
Sterilröhrchen Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
Tischzentrifuge EBA 3S	Hettich (Tuttlingen)
Tischzentrifuge Universal K2B	Hettich (Tuttlingen)
Zählkammer nach Neubauer	Superior (Marienfeld)

2.2 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Riedel de Haën (Hannover) und BioRad (München) in der höchsten käuflichen Reinheit bezogen. Die Arbeitsmittel für die Chromatographie wurden von Pharmacia (Freiburg) und Merck AG (Darmstadt) geliefert.

Die verwendeten Antikörper sowie das Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat stammten von den Firmen Bethyl (Montgomery, USA), Dako (Hamburg) und Dianova (Hamburg). Die Antikörper gegen eNOS, phospho-eNOS, akt und phospho-akt wurden von Cell Signaling (Frankfurt am Main) bezogen. Anti-FAK stammte von Oncogene (Cambridge, USA), Anti-phospho-FAK von Calbiochem (Darmstadt). Das Alkalische-Phosphatase-Substrat NBT/BCIP sowie der verwendete Protease-Inhibitor wurden von Roche (Basel, Schweiz) geliefert.

Medien und sonstige Chemikalien für die Zellkultur wurden von den Firmen Gibco Invitrogen (Karlsruhe), Promocell (Heidelberg), Biochrom (Berlin) und ATCC–LGC Promochem (Wesel) geliefert. Die zur Isolierung von Zellen verwendete Kollagenase Typ 2 wurde von Worthington (Lakewood, USA) bezogen.

Der "Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay" zum Nachweis der Caspase-Aktivität stammte von Promega (Madison, USA).

Radioaktives $^{86}\text{Rb}^+$ wurde von Amersham (Freiburg) bezogen. Bovines und humanes IgM lieferten Rockland (Gilbertsville, USA). Der EIA-Kit zum Nachweis des Endothelin-1 stammte von IBL (Hamburg). Ouabagenin war aus Ouabain durch Hydrolyse gewonnen worden [114]. Die Testpackung zur Bestimmung von cGMP mit einem ELISA war von R&D Systems Europe (Lille, France) und die zum Nachweis von cAMP von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA).

Das Reagenz zum Nachweis des Stickoxids, DAF-2 DA, wurde von Calbiochem (Darmstadt) bezogen. Zur Western-Blot-Analyse wurde das „ECL Western Blot Analysis System“ der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Die Inhibitoren der src-kinase PP1 (4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) und PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) wurden von BioSource Europe (Nivelles, Belgien) bezogen. 2',4'-Dichlorobenzamil, ein Hemmstoff des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, wurde von Biomol (Hamburg) geliefert. Das verwendete Pertussis-Toxin stammte von der Firma Alexis (Grünberg). Ly294002 und Wortmannin, Hemmstoffe der PI3-Kinase, Nimodipin und Verapamil, Hemmstoffe von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen der Zellmembran sowie U73122, Hemmstoff der Phospholipase C, wurden von Sigma Aldrich (Seelze) bezogen. Staurosporin stammte von Sigma Aldrich (Seelze).

2.3 METHODEN

2.3.1 Reinigung von CGBG aus Rinderblut

Um bei der Charakterisierung des Herzglykosid-Bindungsglobulins CGBG verlässliche Ergebnisse zu erhalten, mussten die polyklonalen CGBG-Antikörper, die zum Nachweis des CGBG in verschiedenen Geweben und Seren verwendet werden sollten, affinitätsgereinigt werden.

Hierzu war die Herstellung einer CGBG-Säule notwendig, für die zunächst größere Mengen an CGBG gewonnen werden mussten.

Die Reinigung des CGBG wurde mit einer Variation der von Holger Kost in seiner Promotionsarbeit beschriebenen Methode durchgeführt [74]. Aus ca. 10 l frischem Rinderblut vom Schlachthof Gießen wurden durch Gerinnung für 2 Stunden bei Raumtemperatur und eine sich daran anschließende Retraktionsphase des Blutkuchens über Nacht bei 4 °C ca. 4 l Serum gewonnen. Eventuell im Serum noch verbliebene Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3500 x g und 4 °C entfernt.

2.3.1.1 Ammoniumsulfatfällung

Aus dem Serum wurde die Globulinfraktion unter Rühren bei 4-6 °C durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 50 % (291 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$) gefällt.

Die entstandene Trübung wurde bei 13000 x g für 20 min (4 °C) abzentrifugiert und der Niederschlag in einem gerade ausreichenden Volumen an 150 mM NaCl in 50 mM Glycinpuffer pH 8,0 aufgenommen. Da ein hoher Salzgehalt der Proteinlösung in der nachfolgenden DEAE-Ionen-Austauschchromatographie stört, wurde die Probe bei 4 °C zunächst für 4 h gegen destilliertes Wasser, sodann zweimal gegen einen Überschuss an 150 mM NaCl in 50 mM Glycinpuffer pH 8,0 dialysiert. Die Globulinfraktion wurde anschließend in Aliquots von 50 ml portioniert und bei -80 °C eingefroren.

2.3.1.2 Ionenaustausch-Chromatographie an einer DEAE-Säule

Von der dialysierten Globulin-Fraktion wurden 300 ml auf eine gekühlte Säule von 25 cm Höhe und 5 cm Durchmesser (490 ml) aufgetragen, die mit in 50 mM Glycinpuffer pH 8,0, 150 mM NaCl gequollener DEAE Sepharose (A 50) bzw. Sepharose DEAE fast flow gefüllt war. Nach dem Eindringen des Proteins wurde auf die Säule etwa das 4-fache Säulenvolumen (1-2 l) an Waschpuffer (50 mM Glycinpuffer pH 8,0, 150 mM NaCl) gegeben, um in der Säule verbliebenes aber nicht gebundenes Protein zu entfernen.

Die an die DEAE-Sepharose gebundenen Proteine wurden mit einem pH-Sprung eluiert. Dazu wurden 1000 ml 150 mM NaCl, 50 mM Glycin (pH 3,0) auf die Säule gegeben. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt. Die beim pH-Abfall erscheinende Proteinfraction wurde durch Messung der Extinktion (O.D.) bei 280 nm lokalisiert (Abbildung 8). Die Fraktionen, die das Absorptionsmaximum aufwiesen, wurden vereinigt und der pH-Wert der Lösung mit Natronlauge auf 8,0 eingestellt.

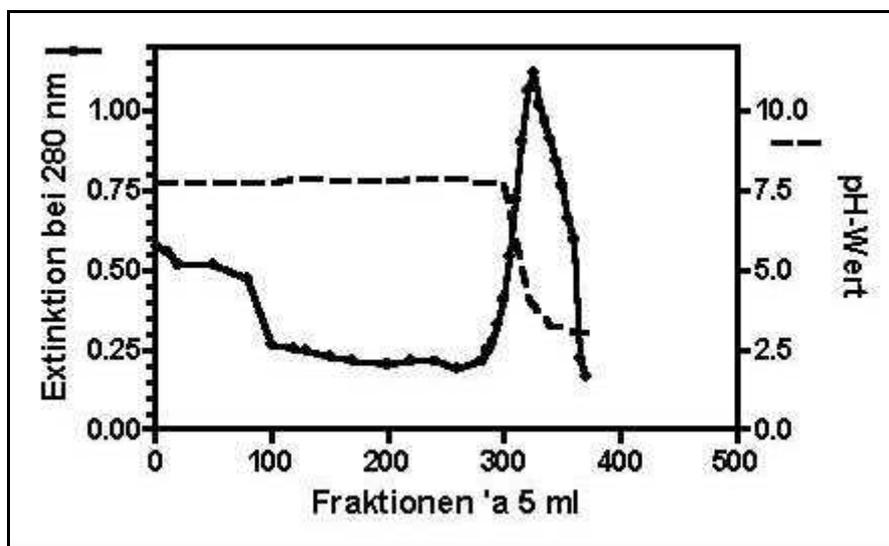


Abbildung 8 DEAE-Chromatographie der Globulinfraktion

2.3.1.3 Affinitätschromatographie mittels einer Antikörpersäule gegen CGBG

Aus der Reinigung des CGBG durch Holger Kost existierten Kaninchenantikörper gegen das Herzglykosid-Bindungsprotein. Sie wurden

verwandt, um über eine Affinitätschromatographie aus der vorgereinigten Proteinfraction das reine Protein zu gewinnen.

Die Hydroxylgruppen der Sepharose lassen sich mit Cyanbromid aktivieren. Dabei entsteht ein reaktives Produkt, an das unter milden Bedingungen Aminogruppen von Proteinen, Nucleinsäuren oder andere Biopolymere gekoppelt werden können.

Trockenes Bromcyan-aktiviertes Sepharose-Pulver (0,22 g) wurde in 1 mM HCl für 15 min gequollen und sodann mit 44 ml 1 mM HCl über eine Fritte unter Anlegen eines Vakuums gewaschen. Danach wurde das Gel mit der Antikörper-Lösung (polyklonaler CGBG-Antikörper K 39) bei pH 8,5 in PBS-Puffer (0,15 M NaCl, 0,05 M NaH_2PO_4 , pH 8,5) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension in einem Schüttler langsam über Kopf gemischt.

Anschließend wurden die Bindestellen blockiert, die noch nicht reagiert hatten, indem aminhaltiger Puffer (TBS: 0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 8,0) zugegeben wurde. Das Säulenmaterial, das die Antikörper kovalent gebunden enthielt, wurde nun vorsichtig mit einer Pipette in eine Säule gefüllt. Zum Äquilibrieren wurde über Nacht mit TBS gespült.

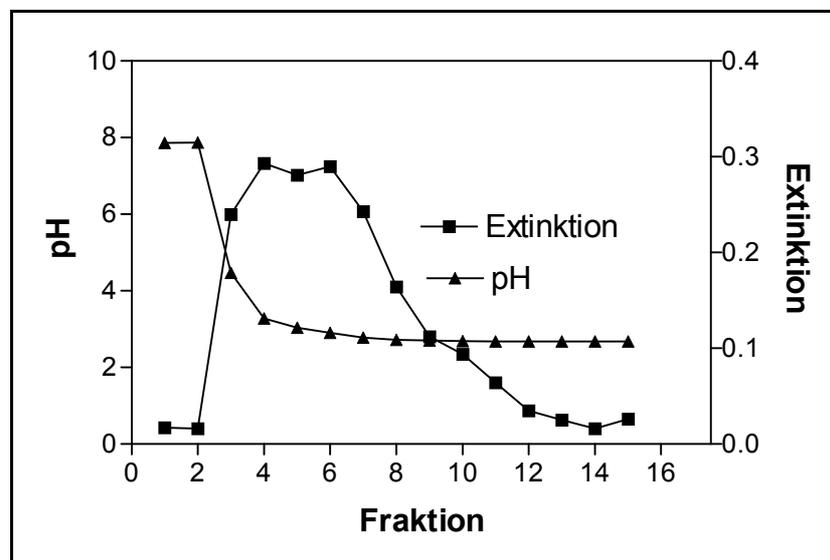


Abbildung 9 Affinitätschromatographie der vorgereinigten Globulinfraktion

Vor jeder Benutzung wurde die Säule (Höhe 10 cm, Durchmesser 1 cm) mit Waschpuffer (0,1 M Glycinpuffer pH 8,0 mit 0,5 M NaCl und 0,04 % NaN_3) äquilibriert. Das Eluat der DEAE-Säule wurde auf pH 8,0 eingestellt und auf die

Säule gegeben. Nach dem Auftrag der Probe wurde für 10 min mit Waschpuffer gewaschen, bis die Extinktion des Durchlaufs bei 280 nm unter 0,02 gesunken war. Damit möglichst wenig Bindungsprotein verloren ging, wurde der Säulendurchlauf ein zweites Mal über eine weitere Säule gegeben.

Nach dem Waschen folgte die Elution durch einen pH-Sprung durch Wechseln auf den Elutionspuffer (pH 2,7). Es wurden 20 Fraktionen à 5 ml gesammelt. Die Extinktion des Eluats bei 280 nm und der pH-Wert wurden gemessen und in einem Diagramm aufgezeichnet (Abbildung 9).

Die CGBG-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, auf pH 8,0 gebracht und 16 Stunden gegen Phosphatpuffer (20 mM NaH₂PO₄) dialysiert. Der erste Probendurchlauf wurde, wie bereits erwähnt, nochmals aufgetragen und die Fraktionen des ersten und zweiten Laufs zur Dialyse vereinigt.

2.3.1.4 Biosep DEAE-FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Da die SDS-Elektrophorese nach der Affinitätschromatographie anzeigte, dass das so erhaltene Protein noch nicht rein war, wurde die erhaltene Fraktion durch eine FPLC-DEAE-Ionenaustauscherchromatographie weiter gereinigt. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Trennschärfe der FPLC-Säulen aufgrund des gegenüber den klassischen Chromatographie-Matrices homogeneren Matrixmaterials wesentlich besser ist. Die allerdings gleichzeitig existierende Abnahme der Flussrate muss durch die Anwendung höherer Drücke ausgeglichen werden. Dies wird durch die Verwendung von Pumpen ermöglicht, die entweder von einer HPLC-Apparatur oder einer FPLC-Apparatur erzeugt werden. Bei der FPLC wird im Gegensatz zur HPLC mit moderaten Drücken von 10-30 bar gearbeitet. Die dabei zum Einsatz kommenden Säulen sind kürzer und haben größere Querschnitte [115].

Eine Biosep DEAE-Säule mit einer Länge von 7,8 mm und einem Durchmesser von 7,5 mm (Volumen von 0,43 ml) wurde in eine FPLC-Apparatur der Firma Pharmacia eingespannt. Die Säule wurde vor dem Auftragen der zu trennenden Probe für 5 min mit Waschpuffer (20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) äquilibriert.

Die durch Dialyse (s. 2.3.1.3) entsalzte Probe wurde mit Hilfe der FPLC-Pumpe durch einen Millipore-Filter (0,22 µm) auf die Biosep DEAE-Säule aufgetragen. Die Säule wurde für 5 min bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min mit

Waschpuffer gewaschen. Das CGBG in der aufgegebenen Probe wurde durch Anlegen eines linearen Kochsalzgradienten eluiert.

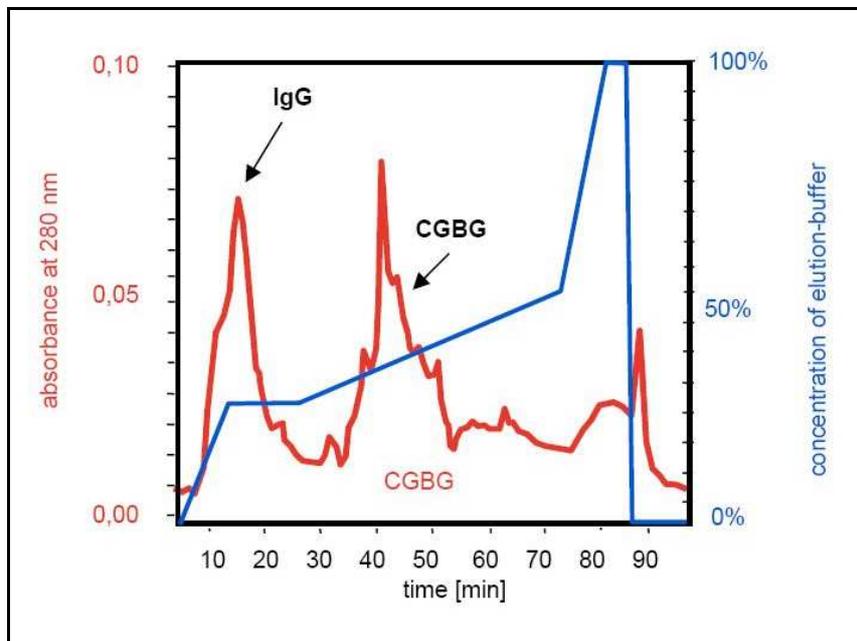


Abbildung 10 Trennung von CGBG an einer BIOSEP DEAE-Säule bei pH 8,0
 Gradient 0-10 min: 0-25 % B; 10-25min: 25 % B; 25-75 min: 25-50 %
 B; 75-85 min: 50-100 % B; 85-90 min: 100 % B; 90-91 min: 100-0 % B

Dazu wurden die Pumpen so programmiert, dass in 60 min die Konzentration des Waschpuffers von 100 % auf 0 % sank und gleichzeitig die Konzentration des Elutionspuffers, der zusätzlich 0,5 M NaCl enthielt, von 0 % auf 100 % stieg.

Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt. Mit Hilfe eines Schreibers wurde die Änderung der Absorption bei 280 nm und die der Kochsalzkonzentration während der Chromatographie aufgezeichnet (Abbildung 10).

Vom Eluat wurden die Fraktionen 8-17 (Peak 1) und 34-53 (Peak 2) vereinigt. Mittels SDS-Page und Western-Blot wurden die beiden Peaks eindeutig als IgG bzw. IgG-Fraktion (Peak 1) und CGBG (Peak 2) identifiziert (Abbildung 11).

Die CGBG-Lösung wurde sodann mittels einer Druckdialyse durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa eingeeengt.

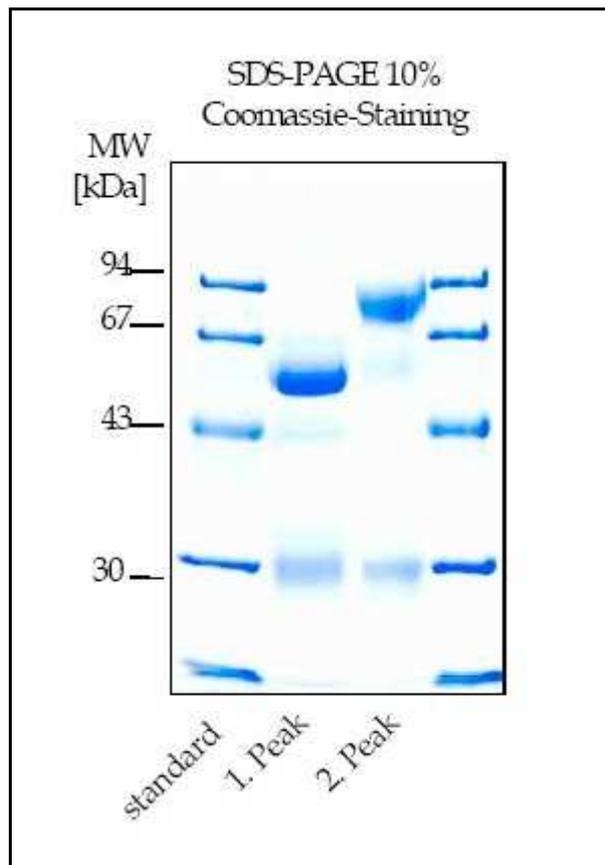


Abbildung 11 SDS-PAGE der DEAE-Peaks aus Abbildung 10
Peak 1 (Fraktion 9-25) zeigt IgG, Peak 2 (Fraktion 34-53) zeigt CGBG

Die Probe wurde in der Druckkammer auf Eis gerührt, eine N₂-Flasche wurde angeschlossen und der Druck auf 1,5 bar eingestellt. Die Kammer blieb so lange angeschlossen, bis fast keine Flüssigkeit mehr im Gefäß war (<1 ml). Dann wurde die eingeeengte Probenflüssigkeit abgenommen und durch 1 ml TBS ersetzt, um noch vorhandenes CGBG aus der Membran zu lösen. Die TBS-Lösung wurde aus der Druckdialyse entnommen und mit der vorher gewonnenen CGBG-Probe vereinigt.

Die Reinheit des Proteins wurde in einer weiteren Austauschchromatographie in einer HPLC-Anlage überprüft.

2.3.1.5 Ionenaustausch-Chromatographie mittels HPLC an einer MiniS-Säule

Zur Überprüfung der Reinheit des CGBG wurde eine weitere Chromatographie durchgeführt. An einer HPLC-Apparatur erfolgte mittels einer MiniS-Säule (Volumen 800 µl) eine Kationenaustausch-Chromatographie.

Zur Durchführung der Reinheitsprüfung wurde die MiniS-Säule in eine HPLC-Anlage der Firma Pharmacia eingespannt und für 1 h mit Waschpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) äquilibriert. Dann wurden 20 μl Probe über den Injektorblock mittels einer Hamiltonspritze auf die Säule injiziert. Gleichzeitig wurde ein Elutionsprogramm gestartet, das innerhalb von einer Stunde die Konzentration des Elutionspuffers (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8,0) von 0 % auf 100 % erhöhte. Es wurde somit die Erhöhung der Salzkonzentration zur Elution genutzt.

Die Absorption bei 280 nm wurde aufgezeichnet und die Retentionszeit von der Software berechnet.

Stimmte die Retentionszeit mit der bekannten Information überein, wurde die Reinheit noch zusätzlich mittels SDS-Page überprüft. Die CGBG-Lösung wurde dann für weitere Tests oder die Gewinnung und Reinigung von Antikörpern eingesetzt.

2.3.2 Antikörpergewinnung

2.3.2.1 Immunisierung von Kaninchen

Zur Durchführung des CGBG-ELISA war die Gewinnung weiterer CGBG-Antikörper erforderlich.

Um polyklonale Antikörper gegen das Herzglykosidbindungsglobulin (CGBG) zu bekommen, wurden 10–12 Wochen alte weiße Neuseeland-Kaninchen aus der Landesanstalt für Tierzucht (Neu-Ulrichstein, Homberg/Ohm) mit CGBG immunisiert. Dazu wurden intrakutan 10 μg des mit komplettem Freudschen Adjuvans versetzten CGBG in mehreren Quaddeln neben die Wirbelsäule gespritzt. Nach in der Regel 2 Wochen wurde erneut Protein in komplettem Adjuvans suspendiert und als Boosterinjektion verabreicht. Die Blutentnahme erfolgte 2 Wochen später über die Ohrvene des Kaninchens. Die Seren wurden nach der Blutgerinnung gewonnen und zur Inaktivierung des Komplementsystems bei 56 °C für 20 min im Wasserbad inkubiert. Nach dem Fällen der Globulinfraktion mit 50 % Ammoniumsulfat wurde die Globulinfraktion an einer Protein-A-Säule in einer FPLC-Anlage fraktioniert. Der IgG-Peak nach Protein-A-Säule wurde durch Druckdialyse eingeeengt.

In dieser Arbeit wurde überwiegend mit dem Antikörper K42 gearbeitet. Dieser Antikörper wurde durch Immunisierung des Kaninchens gegen die 90 kDa-Bande des CGBG in der SDS-PAGE gewonnen.

2.3.2.2 Gewinnung des Serums

Einem zuvor immunisierten Kaninchen wurden nach vorherigem Befeuchten des Ohres mit Xylol etwa 30 ml Blut über die Ohrvene abgenommen.

2.3.2.3 Aufarbeitung des Serums

Das Blut agglutinierte etwa 30 min bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde der Blutkuchen vom Rand des Zentrifugenröhrchens gelöst. Das Blut wurde in der Sorvall-Kühlzentrifuge mit dem Rotor A8-24 für 10 min bei 120 x g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand, das Serum, wurde vorsichtig dekantiert, so dass der gesamte Blutkuchen zurückblieb. Das Serum wurde erneut für 10 min bei 400 x g zentrifugiert, diesmal mit der Hettich-Tischzentrifuge.

Der Überstand wurde abgenommen und dann zur Komplement-Inaktivierung für 10 min bei 56 °C ins Wasserbad gestellt.

2.3.2.4 Ammoniumsulfat-Fällung

Um die Globulinfraktion von der Albuminfraktion zu trennen, wurde das Proteingemisch durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf 50 % (291 mg Ammoniumsulfat/ml Serum) gesättigt. Dieses wurde langsam unter Rühren zum eisgekühlten Serum gegeben. Wenn das Ammoniumsulfat vollständig gelöst war, wurde das trübe Serum für 20 min bei 13000 x g und 4 °C in der Kühlzentrifuge mit dem Rotor A8-24 zentrifugiert.

2.3.2.5 Dialyse

Das Sediment wurde in 4 ml Tris-Puffer gelöst. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und 16 Stunden gegen NaCl-Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 150 mM NaCl) unter Rühren im Kühlschrank dialysiert.

2.3.2.6 Affinitätschromatographie an einer Protein A-Säule

Protein A ist ein Protein des Organismus *Staphylococcus aureus*, das die Eigenschaft besitzt, Immunglobuline spezifisch zu binden. Um Immunglobuline aus Kaninchenserum zu isolieren, wird diese Eigenschaft genutzt [116].

Die verwendete Protein-A-Säule hatte einen Durchmesser von 2 cm und eine Länge von 0,5 cm. Daraus resultierte ein Volumen von 10 ml. Nach der Dialyse wurden zu je 5 ml Probe 0,6 g NaCl hinzugefügt, so dass die Probe etwa 2 M NaCl enthielt. Mit Hilfe einer konzentrierten Tris-Base-Lösung wurde der pH-Wert der Probe auf 9,0 eingestellt. Zur Neutralisation des Eluats wurde in den Reagenzgläsern, in denen die einzelnen Fraktionen gesammelt wurden, je 0,5 ml 1 M Tris, pH 8,0 vorgelegt. Es wurden 5 ml pro Fraktion gesammelt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2 ml pro min. Zunächst wurde mit 30 ml Waschpuffer (50 mM Tris, 2 M NaCl, pH 9,0) gewaschen, dann mit 40 ml des Elutionspuffers (50 mM Zitronensäure, 50 mM NaCl, pH 3,0) eluiert und anschließend mit 20 ml Waschpuffer äquilibriert.

Die Probe wurde in einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen Sterilfilter in den Injektorblock und auf die Probenschleife aufgetragen.

Nach Beendigung des Elutionsprogramms wurden die Fraktionen, in denen sich das Globulin befand, entnommen. Der Antikörper fand sich zumeist in den Fraktionen 9-13.

Die Proteinlösung wurde sodann durch eine Druckdialyse durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa eingeeengt (siehe 2.3.1.4).

2.3.2.7 Einfrieren

Die Antikörperlösung wurde aliquotiert (200 µl) und in Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren. Um einen schnellen Einfriervorgang zu gewährleisten,

wurden die Proben erst in flüssigen Stickstoff getaucht und dann in einer Kühltruhe gelagert.

2.3.2.8 Affinitätschromatographische Reinigung der CGBG-Antikörper an einer CGBG-Säule in einer FPLC-Anlage

Um unspezifische Antikörper aus der IgG-Fraktion zu entfernen, wurde diese an einer CGBG-Säule affinitätsgereinigt.

Zur Herstellung der CGBG-Säule wurde Cyanbromid-aktivierte Sepharose (0,28 g) wie in 2.3.1.3 beschrieben gequollen und gewaschen. Zum Koppeln des CGBG an die Säulenmatrix wurde 1,7 ml (1 mg) CGBG-Lösung, die über Nacht gegen Natriumcarbonat-Lösung (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,0) dialysiert worden war, mit der CNBr-aktivierten Sepharose für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit TBS und 1 mM HCl gewaschen. Das CGBG-haltige Material wurde in eine Säule mit einem Durchmesser von 1 cm, einer Länge von 5 cm und einem Volumen von 3,9 ml gefüllt.

Zur Reinigung der Antikörper wurde die Säule in einer FPLC-Anlage zunächst mit Puffer A (0,1 M Tris, 0,150 M NaCl, pH 8,0) für 30 min äquilibriert. Sodann wurden ca. 2 ml des tiefgefrorenen Antikörpers aufgetaut und mit Puffer A auf 10 ml verdünnt. Mit Hilfe einer Spritze wurden pro Chromatographie-Lauf 2 ml der Antikörperlösung auf die CGBG-Säule aufgetragen. Anschließend wurde für 30 min mit Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte über einen langsam absteigenden pH-Gradienten bis zur Erreichung einer 100%igen Nutzung des Elutionspuffers (0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2,7).

Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Gesammelt wurden 10 Chromatographien übereinander zu je 30 Fraktionen. Die einzelnen Fraktionen wurden im ELISA auf Antikörperaktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

Das Volumen der auf diese Weise erhaltenen Antikörperlösung betrug ca. 100 ml. Zur Stabilisierung der Antikörper wurden 1 % BSA und ein Protease-Inhibitoren-Gemisch (1 Tablette pro 50 ml Lösung) zugegeben, durch das Calpaine sowie ein breites Spektrum an Serin- und Cystein-Metalloproteasen gehemmt werden. Die Lösung wurde sodann in Portionen à 20 µl bei -80 °C eingefroren.

2.3.3 Herstellung von Gewebehomogenaten

Die Messung der CGBG-Konzentrationen mit einem ELISA erfolgte in den in Eis gelagerten Organen von frisch geschlachteten Rindern. Die Organe wurden im Verhältnis von 1 g Gewebe zu 10 ml eiskaltem TBS (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit Proteaseinhibitor (siehe 2.3.2.8) im Potter-Elvehjem-Homogenisator aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 13000 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und die Überstände durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell 595 ½, Rückhaltebereich 4 – 7 µm) filtriert, um an der Oberfläche schwimmende Fettrückstände zu entfernen. Die Homogenate wurden anschließend aliquotiert und bei –20° C eingefroren.

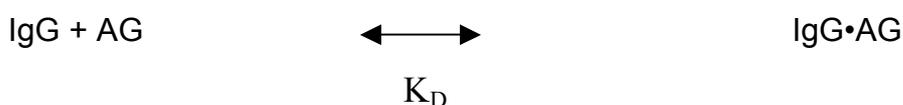
2.3.4 Gewinnung von Plasma aus Rinderblut

Das für die Bestimmungen verwendete Rinderblut stammte von Kühen aus der Klinik für Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität Gießen. Das Blut wurde in Heparinröhrchen abgenommen und bei geringstmöglicher Umdrehungszahl im Rotor A 8.24 in der Kühlzentrifuge für 30 min bei 120 x g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde von den Zellen vorsichtig getrennt und ein zweites Mal auf die gleiche Weise zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.3.5 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist eine empfindliche und sehr spezifische Methode, um Antikörper- und Antigenkonzentrationen zu messen. Beim kompetitiven ELISA wird die Antigen-Antikörperbindung zwischen einem mobilen und einem immobilen Reaktionspartner genutzt. Er ist geeignet, Antigene (AG) zu quantifizieren, die in niedrigen Konzentrationen in einer Probenlösung enthalten sind.

Antikörper erkennen mit hoher Affinität die Epitope, gegen die sie gerichtet sind:



Je kleiner die Dissoziationskonstante des Komplexes (K_D -Wert) ist, um so spezifischer werden die Epitope erkannt. Da die K_D -Werte üblicherweise sehr

niedrig liegen, eignen sich Antikörper hervorragend, Makromoleküle wie Proteine oder Peptide spezifisch nachzuweisen.

Da weiterhin Proteine hervorragend an feste Oberflächen von Polyvinylchlorid bzw. Polystyrol binden (Protein-Bindungskapazität: 300 ng/cm²), wird bei einem indirekten kompetitiven ELISA zunächst eine definierte Menge Protein-Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden. Die in den Vertiefungen (Wells) mit Protein nicht abgesättigten Bindungsstellen werden in einem weiteren Schritt mit Gelatine blockiert. Die Proben und Standards werden nun mit dem Erstantikörper vorinkubiert und anschließend in die Wells pipettiert. Je mehr Antigen in der Probe oder dem Standard enthalten ist, desto mehr Antikörper bindet dort und nicht an das fixierte Antigen. Die Menge des im Komplex an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörpers wird mit einem Zweitantikörper detektiert. Hierbei kann das Signal durch die Verwendung eines biotinylierten Antikörpers verstärkt werden. Das Biotin wird durch Avidin-gekoppelte alkalische Phosphatase detektiert, welche farbloses p-Nitrophenylphosphat in gelbes p-Nitrophenol umsetzt. Das farbige Reaktionsprodukt wird mit Hilfe eines speziellen ELISA-Photometers bei 405 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve können mittels eines Computerprogramms (Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) die Extinktionen der Proben in eine Konzentration überführt werden [75].

Für diese Arbeit wurden drei ELISA-Tests entwickelt. Einer zum Nachweis von CGBG, einer zum Nachweis von Rinder-IgM, der letzte zum Nachweis von BSA. Alle drei Tests waren kompetitive ELISA-Tests und wurden nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt.

2.3.5.1 ELISA zur Messung der CGBG-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes

Zur Durchführung des ELISA wurde zunächst eine 96-Well Mikrotiterplatte mit dem Antigen CGBG beschichtet. Dazu wurde die Platte zunächst für 15 min mit Beschichtungspuffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) alkalisiert und dann mit 100 µl der Antigenlösung (100 ng CGBG/ml Beschichtungspuffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die unspezifischen Bindungsstellen wurden danach mit 1 % Gelatine in TBS (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,04 % NaN_3 , pH 7,4) für 30 min bei Raumtemperatur blockiert.

Die verdünnten Proben und die Standardkonzentrationen (10–500 ng CGBG/ml) wurden in Eppendorf-Gefäßen mit der Antikörperlösung (Anti-CGBG 1:250 in TBS mit 4 % BSA und 4 % Tween 20) im Verhältnis 4 zu 1 für 30 min vorinkubiert.

Die Verdünnung der Proben mit TBS (1% BSA, 1 % Tween) lag je nach CGBG-Gehalt zwischen 1:10 und 1:10000.

Jeweils 100 µl der Standards und Proben, die mit dem Erstantikörper für 30 Minuten vorinkubiert worden waren, wurden in die Wells der Mikrotiterplatte transferiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit TBS (1 % Tween) wurde die Zweitantikörperlösung (100 µl Anti-Rabbit-Biotin (Dianova, Hamburg) 1:2500 in TBS) auf die Platte pipettiert und diese wiederum für 60 min inkubiert.

Nach nochmaligem Waschen wurden dann 100 µl des Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats (Dianova, Hamburg, 1:500 in TBS) in jedes Well der Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde wiederum drei Mal gewaschen und sodann das Enzymsubstrat p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM Ethanolamin, pH 9,6; 100 µl pro Well) auf die Platte gegeben.

Nach 30 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 3 M NaOH pro Well gestoppt. Die Extinktionen der Ansätze wurden dann im ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen.

Die Mittelwerte aus 3 Messungen jedes Organs bzw. Plasmas in drei verschiedenen Konzentrationen sind im Ergebnisteil angegeben. Im Falle der Lymphknoten-, Milz-, Nebennierenrinde- und Nebennierenmarksproben wurden Doppelbestimmungen gemittelt.

2.3.5.2 ELISA zur Messung der IgM-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes

Der ELISA zur IgM-Bestimmung erfolgte analog zum CGBG-ELISA. Der verwendete Anti-IgM-Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:1250 eingesetzt.

2.3.5.3 ELISA zur Messung der BSA-Konzentration in Geweben und Plasma des Rindes

Der ELISA zur Messung von BSA wurde ebenfalls analog zum CGBG-ELISA durchgeführt. Die Beschichtungskonzentration der Platten betrug hier 100 ng BSA/Well, die verwendeten Standardkonzentrationen lagen zwischen 0,1 und 100 µg/ml. Der verwendete BSA-Antikörper (Rockland, Gilbertsville, USA) wurde 1:750 verdünnt.

2.3.5.4 ELISA zur Lokalisation der CGBG-Antikörper in den Fraktionen nach Affinitätschromatographie an einer CGBG-Säule

Zur Messung der Antikörperaktivität in den Fraktionen der CGBG-Säule wurden ebenfalls Platten mit einer Beschichtung von 10 ng CGBG pro Well verwendet. Nach der Blockierungsreaktion wurden 100 µl jeder Fraktion der CGBG-Säule in einer Verdünnung von 1:10 auf die Platte pipettiert. Die Nachweisreaktion erfolgte wie beim CGBG-ELISA.

2.3.5.5 ELISA zur Bestimmung der Verdrängbarkeit der Anti-IgM- bzw. Anti-CGBG-Antikörper von IgM bzw. CGBG durch IgM und CGBG

Zum Test der Verdrängbarkeit der Anti-CGBG-Antikörper von CGBG durch IgM und CGBG wurde eine 96-Well-Platte mit 10 ng CGBG/Well beschichtet. Zusammen mit dem CGBG-Antikörper wurde auf einen Teil der Platte die CGBG-Standardreihe (s. 2.3.5.1), auf einen anderen Teil die IgM-Standardreihe gegeben. Der weitere Test wurde wie oben angegeben durchgeführt. Im umgekehrten Fall wurde eine Platte mit 10 ng IgM/Well beschichtet und zusammen mit dem IgM-Antikörper wurden CGBG und IgM-Standards auf die Platte gegeben.

2.3.6 Gelelektrophorese des CGBG (diskontinuierliche SDS-Page nach Lämmli)

Zum Nachweis der Reinheit des CGBG und um im Anschluss in einem Western Blot die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese des CGBG durchgeführt.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können Proteingemische in mehrere Proteinbanden aufgetrennt werden. Bei der SDS-Page nach Lämmli werden die Proteine in Anwesenheit von 0,1 % SDS denaturiert. Das anionische Detergenz überdeckt die Eigenladung der Proteine und zerstört die Wasserstoffbrücken. Dadurch verändert sich die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine; Protomere werden in ihre Untereinheiten zerlegt. Die Methode trennt folglich die Proteine bzw. deren Untereinheiten ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht [117].

Zunächst wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel (Trenngel) in 1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8 mit 0,03 % APS und 0,06 % TEMED angesetzt. Nach der Polymerisation wurde ein 5%iges Gel (Sammelgel) in 0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8 mit 0,1 % APS und 0,125 % TEMED angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Dabei wurden mit Hilfe einer Schablone die Taschen zum Auftragen der Proben gebildet.

Das polymerisierte Gel wurde in eine vertikale Laufkammer eingespannt. Diese wurde mit Laufpuffer (20 mM Tris, 100 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) befüllt. Die Proben wurden mit Probenpuffer (20 % Glycerin, 10 % Mercaptoethanol, 4 % SDS, 125 mM Tris, 0,025 % Bromphenolblau, pH 6,8) 1 zu 2 gemischt und für 5 min im Wasserbad gekocht, um sie zu denaturieren. Nach dem Auftragen der Proben und des Proteinstandards in die Geltaschen wurde die Elektrophorese bei 200 Volt für 60 min durchgeführt.

Das Gel wurde aus der Kammer entfernt und zum Färben für 15 min in Coomassie R350-Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) gelegt. Zur Entfernung überschüssiger Farbe wurde 3 mal für jeweils 15 min mit 10%iger Essigsäure entfärbt.

Um die Gele haltbar zu machen, wurden sie für 10 min in "Gelkonservierer" (20 % Ethanol, 10 % Glycerin) geschüttelt und anschließend zwischen Cellophanfolien gespannt und getrocknet.

2.3.7 Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren, in dem Proteine durch eine Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel zunächst getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran transferiert werden. Dort werden sie dann mit Hilfe von Antikörpern lokalisiert [118]. Für das Elektroblothing darf das Polyacrylamidgel nicht angefärbt werden.

Die für das Blothing erforderliche Membran und die Whatman-3MM-Filterpapiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten und sodann mit dem Gel in CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 11,0) äquilibriert.

Es wurde eine Blotkammer, die aus einer Anoden- und einer Kathodenplatte besteht, verwendet. Auf die Anodenplatte wurden 3 Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt, darauf die Nitrozellulosemembran, das Gel und 3 weitere Filterpapiere. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt. Der Elektrotransfer erfolgte mit einer Stromstärke von $2,75 \text{ mA/cm}^2$ des Gels für 30 min. Im Anschluss daran wurde die Membran zur Kontrolle des Elektrotransfers zunächst mit 0,2 % Ponceau S-Farbe in 3 % Essigsäure angefärbt und anschließend mit TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) wieder entfärbt. Die nachfolgenden Inkubationsschritte der Immunreaktion wurden auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 60-minütige Inkubation mit 1 % BSA in TBS blockiert. Der erste Antikörper wurde in TBS mit 0,5 % BSA angesetzt und für 60 min auf die Membran gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde sodann mit TBS (1 % Tween) in drei Waschsritten à 10 min entfernt.

Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Rabbit-Alkalische Phosphatase (Dianova, Hamburg)) erfolgte ebenfalls für 60 min. Überschüssiger Antikörper wurde wie oben beschrieben abgewaschen. Das verwendete Substrat der alkalischen Phosphatase NBT/BCIP wurde in 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl_2 , pH 9,5 angesetzt (200 μl /10 ml). Das durch die enzymatische Spaltung entstandene blaue Produkt fiel auf der Membran als blauer Niederschlag aus. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Membran dreimal mit dest. Wasser gewaschen.

2.3.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit Hilfe der von M. M. Bradford entwickelten Methode lassen sich Proteinkonzentrationen quantitativ bestimmen. Dieser Test ist der empfindlichste quantitative Färbe-Assay, es können bereits wenige μg Protein nachgewiesen werden.

Die Farbreaktion beruht auf der Eigenschaft des im handelsüblichen Bradford-Reagenz neben Phosphorsäure und Ethanol enthaltenen Moleküls Coomassie-Brilliantblau, mit den kationischen und unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Bindungen einzugehen. Hierdurch wird der Farbstoff stabilisiert und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 595 nm [119]. Als Referenzlösung diente eine BSA-Lösung (0,1 mg/ml).

Zur Durchführung wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und durch einen Papierfilter filtriert. Jeweils 10, 20 und 30 μl Probe und Standard wurden mit 1 ml verdünntem Reagenz vermischt. Nach 5 min wurden die Proben bei 595 nm gegen verdünntes Bradford-Reagenz gemessen. Durch den Vergleich der Steigung der Standard- und der Probengeraden (Abszisse: eingesetzte μl , Ordinate: Extinktion) konnte die Protein-Konzentration der Probe berechnet werden.

2.3.9 Zellkulturmethoden

2.3.9.1 Menschliche Endothelzellen der Nabelschnurarterie (HUAEC)

2.3.9.1.1 Präparation von HUAEC aus der Nabelschnurarterie

Endothelzellen kleiden als einschichtige Plattenepithelien Blut- und Lymphgefäße, Herz- und Lungeninnenräume aus. Endothelzellen können aus menschlichen Nabelschnurarterien mit Hilfe des Enzyms Kollagenase abgelöst werden [120]. Dazu wurden kurz nach der Geburt von den Hebammen der Universitäts-Frauenklinik Gießen die Nabelschnüre in ein steriles mit Hanks/HEPES (Hanks Salt Solution mit 15 mM HEPES-Puffer) gefülltes Gefäß gegeben und bei 4 °C bis zur Endothelzellenpräparation aufbewahrt.

Die Präparation der Endothelzellen erfolgte in einer Modifikation der Vorschrift von Freshney [121]. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Vor

der Präparation der Nabelschnur wurde eine 10 cm-Petrischale für die isolierten Zellen vorbereitet. Die Platte wurde zunächst für 30 min mit 5 ml 1 % Gelatine im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Gelatinelösung abgesaugt und es wurden 10 ml ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, Promocell) in die Platte gefüllt. Die Platte wurde wiederum für 30 min im Brutschrank erwärmt.

Die Nabelschnur wurde in eine mit in 70%igem Ethanol getränktem Papier ausgelegte Petrischale gelegt und zunächst auf Verletzungen untersucht. Verletzte Bereiche wurden abgeschnitten.

Sodann wurden die Arterien untersucht und die am besten zugängliche ausgewählt. Die Arterie wurde mit Hilfe einer stumpfen Nadel geweitet. Dann wurde eine Braunüle in die Arterie eingeführt und mit Operations-Nähfaden befestigt. Die Arterie wurde mit 40 ml Hanks/HEPES mit Hilfe einer Spritze gespült. Sodann wurde die Kollagenase-Lösung (25 mg Kollagenase in 50 ml Pucks Saline mit 20 mM HEPES) in die Arterie gespritzt, die Nabelschnur unten mit einer Klemme verschlossen und mit Kollagenase-Lösung aufgepumpt. Die Nabelschnur wurde dann für 20 min im Brutschrank belassen.

Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit 30 ml Hanks/HEPES in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml FKS gespült. Die Zellen wurden dann in der Zentrifuge bei 125 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment vorsichtig in 2 ml ECGM gelöst und in die vorbereitete Petrischale pipettiert. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, danach alle 2 bis 3 Tage, bis die Zellen konfluent waren.

2.3.9.1.2 Zellpassage

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dann wurden 2 ml Trypsin-EDTA (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA) auf die Platte pipettiert. Die Ablösung der Zellen von der Platte wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Nachdem sich 50 % der Zellen abgelöst hatten, wurden die restlichen durch Klopfen der Platte gelöst. Es wurden 10 ml EGCM II (300 ml M199, 150 ml ECGM, 4,6 ml Glutamin (200 mM), 4,6 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 9 ml fötales Kälberserum) auf die Platte pipettiert. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Zellsuspension wurden Zellklumpen gelöst. Die Zellsuspension wurde sodann in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml FKS

pipettiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und auf die benötigten Platten verteilt.

Pro 10 cm Petrischale wurden 500.000 Zellen eingesetzt, auf die 24-Well-Platten 20.000 Zellen/Well, auf die 6-Well Platten 150.000 Zellen/Well und auf die 96-Well-Platten 2500 Zellen/Well pipettiert, um ein gutes Wachstum der Zellen zu garantieren.

Für die erste und zweite Passage wurde reines ECGM verwendet.

Nach der zweiten Passage wurden die Zellen eingefroren. Hierzu wurde eine normale Passage mit reinem ECGM durchgeführt. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese bei 125 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in ECGM mit 10 % DMSO aufgenommen, so dass 500.000 Zellen/ml vorhanden waren. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde sodann in ein Cryoröhrchen pipettiert und in Isopropanol in der -80° C Kühltruhe eingefroren.

2.3.9.1.3 Auftauen der Zellen

Zur weiteren Benutzung der Zellen wurde ein Cryoröhrchen (ca. 500.000 Zellen) pro 10 cm Platte für ca. 2 min im 37 °C-Bad aufgetaut. Die Zellen wurden dann in eine vorbereitete 10 cm-Petrischale pipettiert (s. 2.3.9.1.1), gemischt und im Brutschrank inkubiert. Innerhalb von 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das enthaltene DMSO zu eliminieren. Danach wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

Wenn die Zellen konfluent waren (nach ca. 4 Tagen) wurden sie in verschiedene Platten zur Vermehrung oder für Versuche passagiert. Es wurden insgesamt 5 Passagen durchgeführt, zwei vor dem Einfrieren und drei danach. Die Zellen der dritten, vierten und fünften Passage wurden für Versuche verwendet. Die Zellen der zweiten Passage wurden in ECGM, die der weiteren Passagen in ECGM II (s. 2.3.9.1.2) kultiviert.

2.3.9.2 Humane glatte Muskelzellen der Aorta

Es wurden glatte Muskelzellen der Zell-Linie T7G HA-VSMC von ATCC-LGC Promochem (Wesel) verwendet. Hierbei handelt es sich um Muskelzellen der Aorta eines 11 Monate alten Kindes.

Zur Kultivierung wurde das Zellkulturmedium F12-K von American Tissue Culture mit Modifikationen verwendet. Dem Medium wurde 10 % fötales Kälberserum, 0,01 mg/ml Insulin, 0,01 mg/ml Transferrin, 10 ng/ml Natriumselenit, 0,03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, 0,05 mg/ml Ascorbinsäure, 10 mM HEPES und 10 mM TES zugefügt. Diese Mischung wird im folgenden als Wachstumsmedium bezeichnet.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Vermehrung der Zellen wurden 10 cm-Zellkulturschalen verwendet.

2.3.9.2.1 Zellpassage

Zum Ablösen der Zellen wurden diese zunächst mit 2 ml Trypsin-EDTA (2,5 g Trypsin, 0,38 g EDTA/l) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA unter Beobachtung unter dem Mikroskop von der Platte abgelöst. Zu den freien Zellen wurden 10 ml Wachstumsmedium gegeben. Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit einer 10 ml-Pipette gemischt und in ein 50 ml-Sterilröhrchen überführt. Die Suspension wurde zur Entfernung des Trypsins bei 125 x g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium (s. 2.3.9.2) aufgenommen und durch Aufziehen in eine Spritze und Ablassen durch eine Kanüle gemischt und vereinzelt. Die Zellen wurden sodann in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf Vermehrungs- und Versuchsplatten verteilt. Auf 10 cm-Kulturschalen wurden 700000 Zellen ausgesät, auf 6 Well-Platten 150000/Well, auf 96-Well-Platten 2500 Zellen/Well.

2.3.9.3 Bestimmung der Zellzahl mittels MTT-Test

Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen sind in der Lage, Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT-Tetrazoliumsalz) durch Reduktion des Tetrazoliumringes in MTT-Formazan umzuwandeln. Die Spaltung des Farbstoffes ist direkt proportional zur Zellzahl. Mittels dieses Testes wurde der Einfluss von Ouabain und Digoxin auf die Proliferation von HUAEC und glatten Muskelzellen der Aorta ermittelt.

Die verwendeten HUAEC wurden nach dem Protokoll von Saunders [83] behandelt, also zunächst in konfluentem Zustand für 12 Stunden mit

Hungermedium (ECGM II ohne Supplement mit 0,5 % FKS) inkubiert und dann für weitere 12 Stunden den Herzglykosiden exponiert.

Mit den verwendeten glatten Muskelzellen der Aorta wurde wie von Aydemir-Koksoy beschrieben verfahren [103]: Die Zellen wurden für einen Tag in vollem Medium inkubiert, gezählt, dann in Medium mit 5 % FKS und Herzglykosiden für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde in beiden Fällen ein MTT-Test zur Ermittlung der Zellzahl durchgeführt.

Zur Durchführung des Testes wurde das Medium von den in 96-Well-Platten kultivierten Zellen abgesaugt und durch MTT-Lösung (0,5 mg/ml MTT-Tetrazoliumsalz in Wachstumsmedium bzw. ECGM II) ersetzt. Bei Verwendung von glatten Muskelzellen wurde das zur Lösung des MTT-Tetrazoliumsalzes verwendete Medium ohne Ascorbinsäure angesetzt, da diese ebenfalls in der Lage ist, den Tetrazoliumring zu reduzieren. Nach 4 Stunden Inkubation im CO₂-Inkubator wurde die Lösung entfernt. Es wurden 100 µl DMSO auf die Zellen gegeben, um den ausgefallenen Farbstoff in Lösung zu bringen.

Nach 10-minütigem Schütteln auf einem Orbitalschüttler wurde die Extinktion im ELISA-Photometer bei 540 nm gemessen [122].

2.3.9.4 Messung der Rubidiumaufnahme

Zur Bestimmung der Aktivität der Natrium-Pumpe in HUAEC und ihrer Hemmbarkeit durch Herzglykoside wurde die Aufnahme von ⁸⁶Rb⁺ als radioaktivem K⁺-Analogon in die Zellen gemessen. Hierzu wurden steigende Konzentrationen an Ouabain, Digoxin, Dihydroouabain und Ouabagenin eingesetzt. Sie lagen zwischen 0,1 nM und 100 µM. Um die Konzentrationen experimentell zu erhalten wurden Verdünnungen aus Stammlösungen (5 mM) in H₂O oder DMSO in das ⁸⁶Rb⁺-Aufnahme-Medium (150 mM NaCl, 5 mM RbCl, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 10 mM Glucose, pH 7.0) gegeben.

Eine ⁸⁶Rb⁺-Standardreihe wurde parallel mitgeführt, um die aufgenommene Radioaktivität in molare Konzentrationen umrechnen zu können. Die Standardreihe enthielt Radioaktivität im Bereich von 0,65 nCi bis 166 nCi. Zur Durchführung des Versuches wurden Zellen verwendet, die in 24-Well-Platten 4

Tage bis zur Konfluenz gewachsen waren. Es waren 20.000 Zellen pro Well ausgesät worden.

Die Endothelzellen wurden für 30 min im Brutschrank mit $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahmemedium und Herzglykosiden bei 37 °C inkubiert. Dann wurde pro Well 1 μCi $^{86}\text{Rb}^+$ zugegeben und gut gemischt. Danach wurden die Platten erneut bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 μl eiskaltem MgCl_2 (0,1 M) pro Well gestoppt. Das nicht aufgenommene $^{86}\text{Rb}^+$ wurde in zwei weiteren Waschschrritten entfernt. Anschließend wurden zum Aufschluss der Zellen 300 μl 0,1 M Trichloressigsäure in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde für 60 min bei 4 °C stehen gelassen. Danach wurden die Proben und Standards in Szintillationsröhrchen überführt. Die Radioaktivität des $^{86}\text{Rb}^+$ wurde im Wallac-Szintillationszähler über die Čerenkov-Strahlung gemessen.

2.3.9.5 Immunologischer Nachweis von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Proteinen in Zell-Lysat von HUAEC unter Einfluss von Ouabain und Digoxin

Um Hinweise auf die durch Digoxin und Ouabain induzierte Signalkette zu erhalten, wurden verschiedene Proteine der Signaltransduktion (Focal Adhesion Kinase, akt/PKB, eNOS) in ihrer phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form in Lysaten von mit Herzglykosiden behandelten Zellen immunologisch nachgewiesen und quantifiziert. HUAEC wurden auf 6-Well-Platten bis zur Konfluenz inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Hungermedium (ECGM II ohne Supplement mit nur 0,5 % FKS) wurden die Zellen für 30 min mit den Herzglykosiden im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter Einwirkung von Lysispuffer (TBS mit 2 % SDS, 10 % Glycerol und 50 mM DTT, pH 6,8; 100 μl /well) auf Eis von den Platten abgekratzt und in Eppendorf-Gefäße überführt.

Die Lysate wurden für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt um die DNA zu scheren und die Viskosität der Proben herabzusetzen. Die Proben wurden dann wie in 2.3.6 beschrieben in einer SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (siehe 2.3.7).

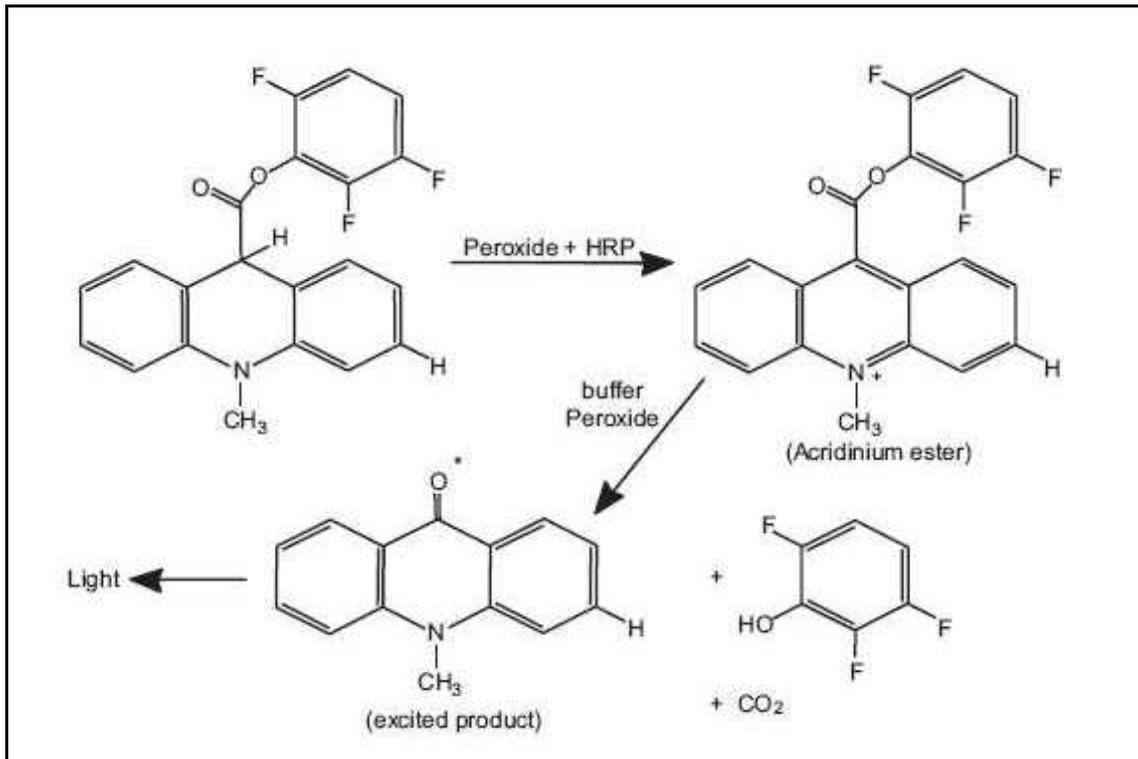


Abbildung 12 Chemiluminiszenz-Reaktion von Lumigen PS-3 mit Meerrettich-Peroxidase
(Quelle: www.amershambiosciences.com)

Der Immunnachweis erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blotting Analysis System der Firma Amersham (Freiburg). Zu Beginn der Immunreaktion wurden bei Raumtemperatur durch 60-minütige Inkubation mit Blocking-Puffer (TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % fettfreies Milchpulver, pH 6,8) die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Reste der Blocking-Lösung wurden durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Danach wurde der erste Antikörper (Anti-Phospho-Protein oder Anti-Protein (akt, eNOS, FAK)) in Blocking-Lösung in geeigneter Verdünnung angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf der Membran belassen. Nach der Wiederholung des oben beschriebenen Waschschrtes wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper in Blocking-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrte erfolgte der Nachweis des gesuchten Proteins durch Lumigen-PS-3, ein luminol-basiertes Chemilumineszenz-Substrat der Peroxidase (Abbildung 12). Ein Röntgenfilm wurde für einen geeigneten Zeitraum auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt. Die

quantitative Auswertung der Banden erfolgte mit dem Computerprogramm Total Lab (Phoretix, Newcastle upon Tyne, GB).

2.3.9.6 Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration im Zellüberstand von HUAEC nach Inkubation mit Digoxin und Ouabain mittels EIA

2.3.9.6.1 Inkubation der Zellen mit Ouabain und Digoxin

Um zu ermitteln, ob die unterschiedliche Wirkung der Herzglykoside Ouabain und Digoxin auf den Blutdruck möglicherweise auf einer Beeinflussung der Endothelin-Freisetzung aus Endothelzellen beruht, wurde im Zellüberstand von mit diesen Substanzen behandelten HUAEC die Endothelin-Konzentration gemessen.

Die Zellen wuchsen in 6-Well-Platten bis zur Konfluenz. Die Zellen wurden dann für 30 min bei 37 °C mit Ouabain und Digoxin in Konzentrationen zwischen 0 und 20 nM inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellüberstände in Eppendorfgefäße pipettiert und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren.

2.3.9.6.2 Durchführung der Endothelin-1-Bestimmung

Die Messung des Endothelin-1 wurde mit Hilfe des Endothelin-1-EIA-Kit der Firma IBL (Hamburg) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-ELISA, der auf mit Endothelin-1-Antikörpern vorbeschichteten Platten durchgeführt wird.

Die verwendeten Standard-Konzentrationen lagen zwischen 0,78 und 100 pg Endothelin-1/ml.

Es wurden jeweils 100 µl der Proben und der Standards eingesetzt. Nach der Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Platte neunmal mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Endothelin-1-Antikörper für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 9 Waschschritten wurden die Proben mit dem Substrat Tetramethylbenzidin versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen.

Die Substratreaktion wurde sodann durch Zugabe von 1 N H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion wurde im ELISA-Photometer bei 450 nm gemessen.

2.3.9.7 Bestimmung der NO-Konzentration im Zellüberstand von HUAEC nach Inkubation mit Digoxin und Ouabain

Ebenfalls untersucht wurde die Freisetzung des vasodilatatorischen Stickoxids aus HUAEC unter Einfluss von Digoxin und Ouabain. Dazu wurde die sensitive Diaminofluorescein-Methode eingesetzt [123].

Hierfür wurden konfluente HUAEC in 24-Well-Platten verwendet. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Hungermedium wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und dann für 4 Stunden mit den Herzglykosiden und dem Reaktionsgemisch (1 μM 4,5-Diaminofluorescein-Diacetat (DAF-2-DA), 100 μM L-Arginin) in PBS inkubiert. DAF-2-DA ist ein zellpermeables Diaminofluorescein-Derivat, das in der Zelle von cytosolischen Esterasen zunächst in Diaminofluorescein gespalten wird. Diaminofluorescein fluoresziert nur sehr schwach, wird aber in Anwesenheit von Sauerstoff und Stickoxid zum grünfluoreszierenden Triazolofluorescein (DAF-2T) umgewandelt (Abbildung 13). Arginin ist das Substrat des Enzyms eNOS zur NO-Synthese.

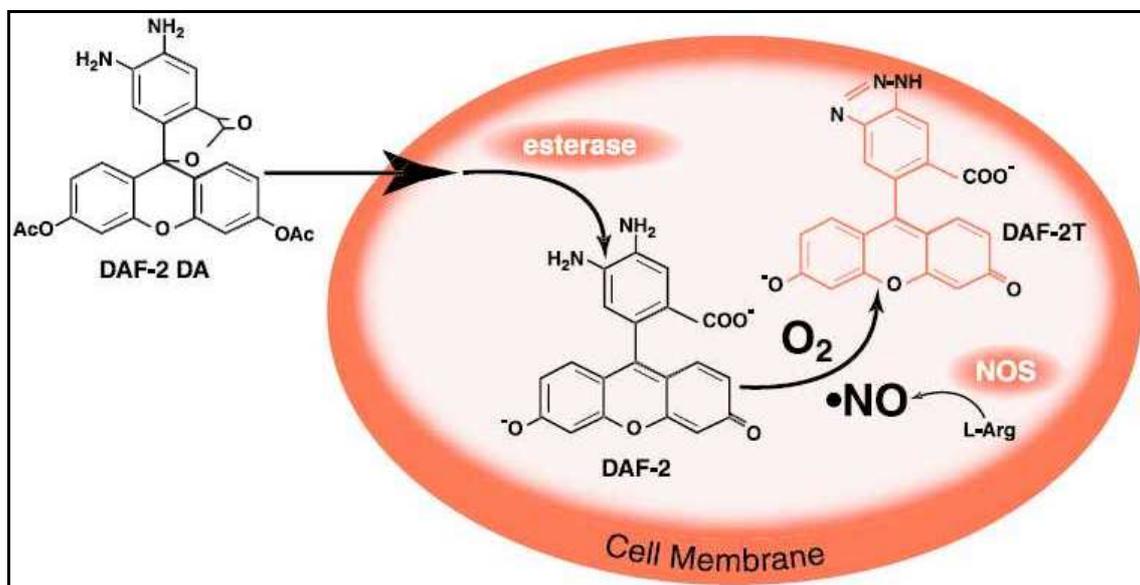


Abbildung 13

Prinzip der Stickoxid-Detektion mittels DAF-2-DA
 DAF-2-DA = 4,5-Diaminofluorescein-Diacetat
 DAF-2T = Triazolofluorescein
 NOS = NO-Synthase
 (Quelle: Calbiochem, San Diego, CA, USA)

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände in eine 96-Well-Platte überführt und bei einer Excitation von 485 nm und einer Emission von 538 nm gemessen.

2.3.9.8 Nachweis der Caspase-Aktivität in HUAEC nach Inkubation mit Ouabain, Digoxin und Staurosporin

2.3.9.8.1 Inkubation der Zellen mit Ouabain, Digoxin und Staurosporin

Um eine mögliche Wirkung von Herzglykosiden auf die Apoptose von HUAEC nachzuweisen, wurde die Caspase-Aktivität in den Zellen nach der Inkubation mit Digoxin, Ouabain und Staurosporin gemessen.

Apoptose ist ein genetisch gesteuertes Programm, das auch als „Zell-Selbstmord“ bezeichnet wird. Auf ein inneres oder äußeres Signal hin werden bestimmte Enzyme, die Caspasen, aktiviert. Caspasen sind Proteasen, die ein Cystein (Caspase) im aktiven Zentrum tragen und im Protein nach einem Aspartat (Aspase) spalten.

Sie spalten das Zellgerüst und die Zellmatrix proteolytisch. Die Zelle zerfällt in kleine Fragmente, die apoptotischen Körperchen, die von Nachbarzellen phagozytiert werden. Beim Menschen sind 11 verschiedene Caspasen bekannt, die alle die Eigenschaft besitzen, sich gegenseitig in einer Art Schneeballsystem zu aktivieren.

Unter ihrem Einfluss wird die Zelle innerhalb weniger Stunden in ihre Bestandteile zerlegt. Die Caspasen aktivieren eine weitere Enzymgruppe, die Endonucleasen, die die DNA spalten. Neben der Caspase-Aktivität ist auch der Nachweis der DNA-Spaltung durch die Trennung der DNA mittels eines Agarose-Gels möglich. Auf dem Gel zeigt sich das sogenannte DNA-Laddering, d. h. die Aufspaltung der DNA in verschieden große Bestandteile, die sich in der Gelspur in Form einer DNA-Leiter zeigen [124].

Die Zellen wuchsen in 96-Well-Platten bis zur Konfluenz. Zur Synchronisierung wurden sie dann für 12 Stunden in Hungermedium inkubiert. Im Anschluss wurden verschiedene Konzentrationen von Digoxin und Ouabain sowie Staurosporin (1 μM) als Positivkontrolle auf die Zellen gegeben und diese für 24 Stunden im Brutschrank belassen. Staurosporin ist ein Inhibitor zellulärer Proteinkinasen und induziert Apoptose in vielen Säugerzellarten [125]. Zur Ermittlung des Einflusses der Herzglykoside auf die Staurosporinwirkung wurden den Herzglykosidansätzen teilweise 1 μM Staurosporin zugefügt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-3} M Ouabain bzw. Digoxin mit und ohne 1 μM Staurosporin.

2.3.9.8.2 Ermittlung der Caspase-Aktivität

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mit Hilfe des "Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay" der Firma Promega gemessen. Das Reaktionsgemisch enthielt neben einem Lyse-Puffer, der die Zellen lysiert, ein Caspase-Substrat, dessen Umsetzung fluorimetrisch bestimmt werden konnte (Abbildung 14).

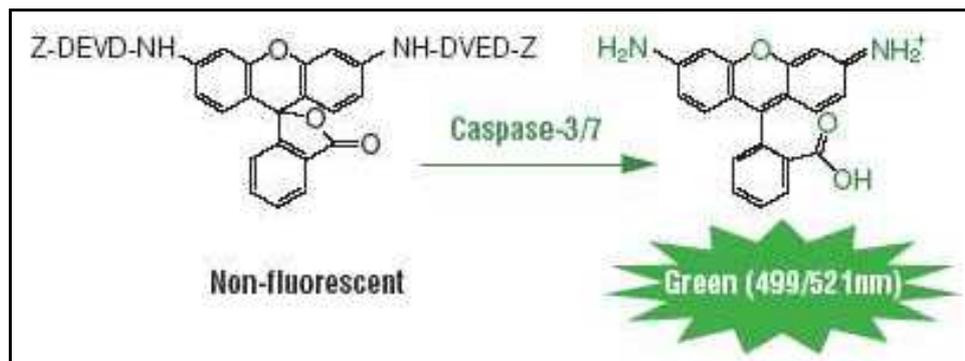


Abbildung 14 Spaltung des nicht-fluoreszierenden Caspase-Substrates Rhodamin-110-bis-(N-CBZ-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartylamid) durch Caspase 3/7 zum fluoreszierenden Rhodamin-110 (Quelle: www.promega.com)

Nach der Inkubation mit den Herzglykosiden wurde das Reaktionsgemisch zum Nachweis der Caspase-Aktivität gemischt und zu dem auf den Zellen befindlichen Medium hinzugegeben. Das Substrat wurde durch die enthaltenen Caspasen in Rhodamin 110 und Peptid gespalten. Das Rhodamin konnte nach zweistündiger Inkubation auf dem Orbitalshaker fluorimetrisch mit einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm quantitativ nachgewiesen werden.

2.3.9.9 Bestimmung von cAMP und cGMP in den Zellextrakten von HUAEC unter Ouabain- und Digoxineinfluss

Die Zellen wurden für 30 min mit steigenden Konzentrationen von Ouabain und Digoxin im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-6} M inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 0,1 M HCl aufgeschlossen. Nach vorausgehender Acetylierung der Proben wurden diese in kompetitive ELISA-Tests für cAMP und cGMP (Cayman Chemical Company, R&D-Systems) eingesetzt. Die Tests messen die beiden

cyclischen Nucleotide im Bereich von 10^{-12} bis 10^{-10} M. Acetylierung erhöht die Sensitivität des Tests und lässt den Nachweis der beiden Nucleotide im Bereich von 10^{-13} bis 10^{-11} M zu.

3 RESULTATE

3.1 IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG EINES BINDUNGSPROTEINES FÜR HERZGLYKOSIDE (CGBG)

3.1.1 Eigenschaften eines ELISA zum quantitativen Nachweis von CGBG

Durch Affinitätsmarkierung mit dem Protein-reaktiven Digoxin-Derivat HDMA konnte aus Rinderserum ein Protein mit dem Molgewicht von 90 kDa isoliert werden, das spezifisch Herzglykoside zu binden schien [73,74]. Gegen dieses Protein (CGBG) waren durch Immunisierung von Kaninchen Antikörper gewonnen worden, die durch Affinitätsreinigung an einer CGBG-Säule von Verunreinigungen befreit worden waren. Um eine Aussage darüber zu bekommen, ob das Protein in geringen Konzentrationen im Blut kreist, was bei einer Blutkonzentration von Digoxin und Ouabain im nanomolaren Bereich [9,126] anzunehmen ist, oder aber in höheren Konzentrationen vorkommt, wurde ein kompetitiver ELISA für das Protein ausgearbeitet und mit ihm die Konzentration des CGBG im Blutplasma bestimmt. 0 zeigt eine Eichkurve des ELISA. Es konnten mit dem Test CGBG-Konzentrationen von 10 bis 500 ng/ml gemessen werden. Der Antikörper zeigte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen eine halbmaximale Verdrängung im Bereich von 60 ng/ml.

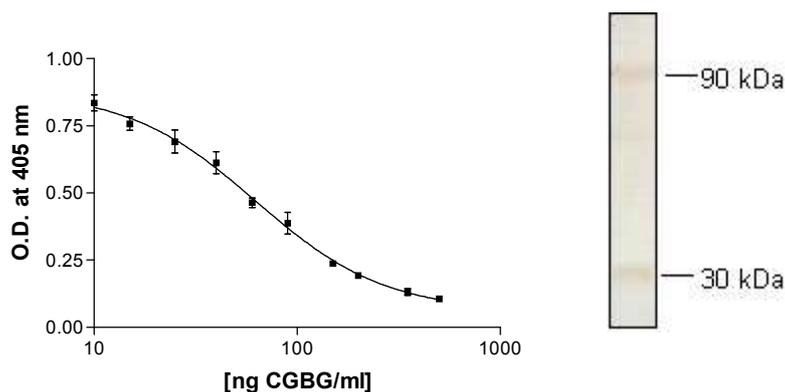


Abbildung 15 Eichkurve des kompetitiven ELISA auf CGBG (links) und Western-Blot des zur Immunisierung eingesetzten Proteins (CGBG) (rechts) Die Bande bei 30 kDa entspricht vermutlich einem Abbauprodukt des CGBG

Die Eichkurve und der ebenfalls in 0 gezeigte Western Blot des gereinigten CGBG zeigen somit, dass für die nachfolgenden Bestimmungen ein sensitiver

und sehr spezifischer quantitativer Test verfügbar war, mit dem auch geringe Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.

3.1.2 Bestimmung der CGBG-Konzentration in Plasma und Geweben des Rindes

Um zu erfahren, in welchem Organ CGBG synthetisiert wird, wurde außer den Untersuchungen im Plasma seine Konzentration auch in verschiedenen Rinderorganen bestimmt. Diese Bestimmung wurde in Niere, Nebenniere, Leber, Zwerchfell, Hirn, Nackenmuskulatur und Herz von jeweils 10 Rindern und in Plasma, Lymphknoten, Milz, Nebennierenrinde und Nebennierenmark von jeweils 5 verschiedenen Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind aus Tabelle 3 und Abbildung 16 ersichtlich.

Tabelle 3 CGBG-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes

Probe	Mittelwert der CGBG-Konzentrationen ($\mu\text{g/g}$ Gewebe bzw. ml)	Anzahl der Proben (n)	SD	SEM
Niere	24	10	10	3
Gehirn	12	10	7	2
Zwerchfell	14	10	4	1
Leber	35	10	5	2
Herz	36	10	14	5
Nebenniere (total)	68	10	21	7
NN-Rinde	54	5	11	5
NN-Mark	52	5	18	8
Plasma	1561	5	649	290
Nackenmuskulatur	9	10	2	1
Lymphknoten	34	5	13	6
Milz	50	5	14	6

Es ergab sich, dass entgegen unserer Annahme das Blutplasma den weitaus höchsten Gehalt an CGBG ($1561 \pm 649 \mu\text{g/ml}$) hatte. In den Organen ließen sich Werte zwischen 9 und $68 \mu\text{g/g}$ Gewebe messen, wobei Zwerchfell ($14 \pm 4 \mu\text{g/g}$ Gewebe), Gehirn ($12 \pm 7 \mu\text{g/g}$ Gewebe) und Nackenmuskulatur ($9 \pm 2 \mu\text{g/g}$ Gewebe) die niedrigsten Werte zeigten. Herz, Leber, Niere und Lymphknoten hatten Gehalte zwischen 24 und $36 \mu\text{g/g}$ Gewebe. Die höchsten CGBG-Konzentrationen wurden in der Nebenniere gemessen ($68 \pm 21 \mu\text{g/g}$ Gewebe). Es bestand kein Unterschied in den Gewebekonzentrationen von Nebennierenrinde und -mark. Die zweithöchste Konzentration fand sich in der

Milz ($50 \pm 14 \mu\text{g/g}$ Gewebe). Die angegebenen Mittelwerte stammen mit Ausnahme der Messungen in Lymphknoten, Milz und Nebenniere aus Dreifachmessungen jeder Einzelprobe.

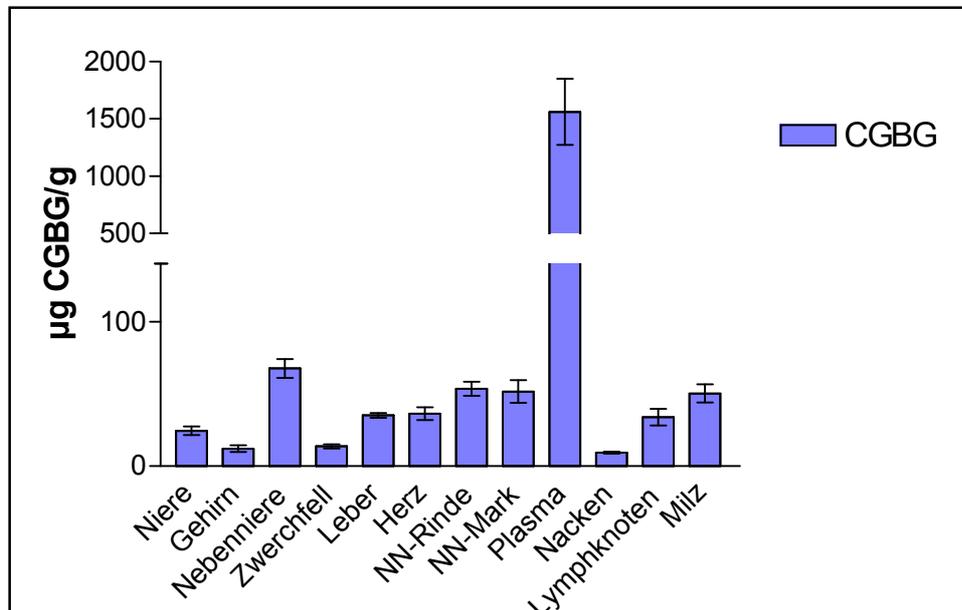


Abbildung 16 CGBG-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes ($\mu\text{g/g}$ Gewebe bzw. ml, Mittelwerte \pm SEM); ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte s. 3.1.5

3.1.3 Bestimmung der IgM-Konzentration in Plasma und Geweben des Rindes

Die hohe Konzentration eines Protein, das sich durch ein proteinreaktives Digoxin-Derivat markieren ließ, erstaunte. Aufgrund der Konzentrationsbestimmungen des endogenen Ouabain [126] und des Digoxin [9] im Blut wären weit geringere Proteinkonzentrationen für ein spezifisches Bindungsprotein zu erwarten gewesen. Da eine japanische Arbeitsgruppe berichtet hatte, dass das Bindungsprotein für Herzglykoside im menschlichen Plasma eine durch Plasmin-Proteolyse generierte Teilsequenz aus der schweren Kette des IgG enthalte [127], kam aufgrund des Molekulargewichts von 90 kDa (0) und der hohen Plasmakonzentration des CGBG (Abbildung 16) der Verdacht auf, dass der CGBG-Antikörper eventuell die schwere Kette (μ -Kette) des IgM erkennen könne und dass möglicherweise CGBG mit der schweren Kette des IgM identisch sei. Daher wurde in den oben erwähnten Geweben und Plasmaproben zusätzlich die IgM-Konzentration mit einem

kompetitiven ELISA bestimmt. Die erhaltenen Werte sind aus Tabelle 4 und Abbildung 17 ersichtlich.

Tabelle 4 IgM-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes

Probe	Mittelwert der IgM-Konzentrationen (µg/g Gewebe bzw. ml)	Anzahl der Proben (n)	SD	SEM
Niere	29	10	14	4
Gehirn	15	10	12	4
Zwerchfell	7	10	5	1
Leber	30	10	8	3
Herz	23	9	15	5
Nebenniere (total)	33	10	13	4
NN-Rinde	53	5	8	4
NN-Mark	45	5	16	7
Plasma	1026	5	392	176
Nackermuskulatur	7	10	2	1
Lymphknoten	89	5	17	8
Milz	129	5	12	5

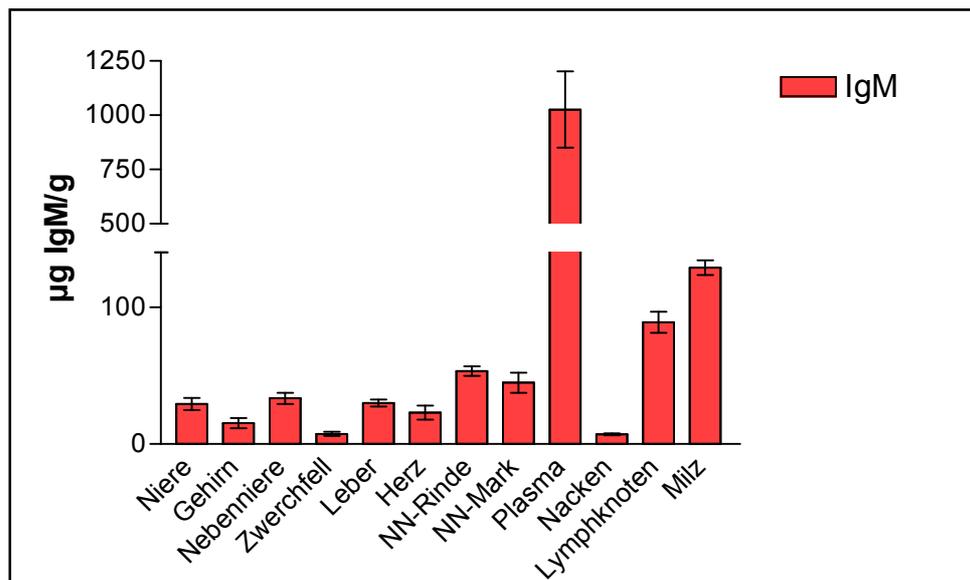


Abbildung 17 IgM-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes (µg/g Gewebe bzw. ml, Mittelwerte ± SEM)

Wie zu erwarten lag die Plasma-Konzentration der µ-Kette mit $1026 \pm 392 \mu\text{g/ml}$ im Bereich des auch beim Menschen bekannten Wertes. Der Vergleich der Plasma- und der Gewebe-Konzentrationen zeigte, dass die Plasmakonzentrationen mit Abstand am höchsten waren. Die niedrigsten Gehalte wiesen Nackermuskulatur ($7 \pm 2 \mu\text{g/g}$ Gewebe), Zwerchfell ($7 \pm 5 \mu\text{g/g}$

Gewebe) und Hirn ($15 \pm 12 \mu\text{g/g}$ Gewebe) auf. Im mittleren Bereich lagen die Gehalte von Niere, Nebenniere, Leber und Herz (zwischen 23 und $33 \mu\text{g/g}$ Gewebe). Interessanterweise lagen die Gehalte von Nebennierenrinde und -mark stark über denen der Nebenniere, auch mehrmalige Messungen bestätigten diesen Sachverhalt. Die höchsten Konzentrationen an IgM von allen Rinder-Organen wurden in den Lymphknoten ($89 \pm 17 \mu\text{g/g}$ Gewebe) und der Milz ($129 \pm 12 \mu\text{g/g}$ Gewebe) gemessen.

Um einen direkten Vergleich der Gewebeverteilung von CGBG und IgM in den Organen von Rindern zu erhalten, wurden beide Werte in Abbildung 18 nebeneinander dargestellt. Es wird daraus ersichtlich, dass die beiden Tests Unterschiede allein in der Gewebekonzentration in Nebennieren, Lymphknoten und Milz maßen.

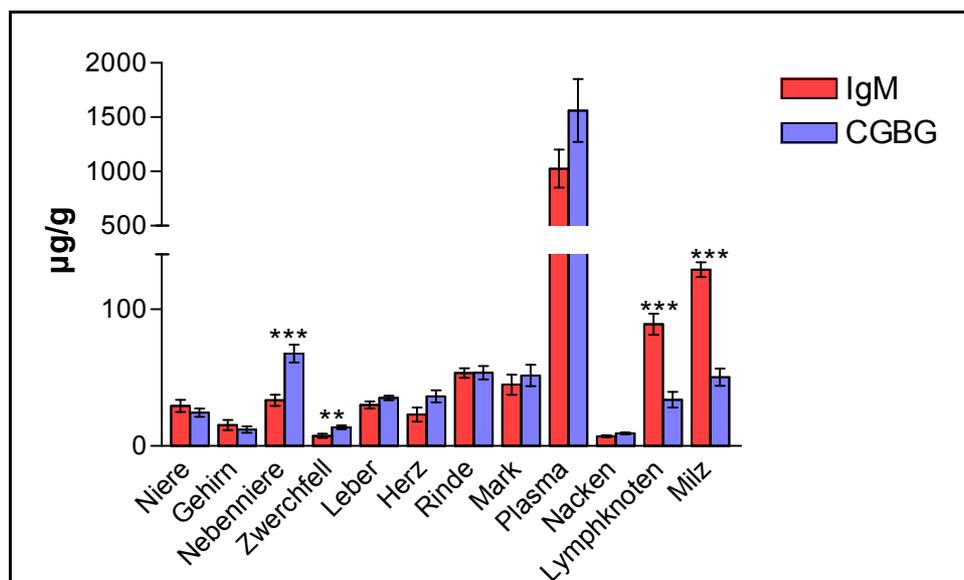


Abbildung 18 Vergleich der CGBG- und IgM-Gehalte in Plasma und Geweben des Rindes ($\mu\text{g/g}$ Gewebe bzw. ml, Mittelwerte \pm SEM), zweiseitiger t-Test: IgM gegen CGBG: Nebenniere, Lymphknoten, Milz:*** $p < 0,001$, Zwerchfell:** $p < 0,01$

3.1.4 Bestimmung der Konzentrationen an Rinderserum-Albumin in Plasma und Geweben des Rindes

Es ist bekannt, dass Organe von Schweinen nach dem Schlachten und Ausbluten aufgrund ihres verschiedenen Restblutgehaltes unterschiedliche Konzentrationen an Serumalbumin enthalten [128]. Um die wirklichen

Gewebekonzentrationen zu erhalten, mussten somit alle Konzentrationsbestimmungen des CGBG hinsichtlich des Blutgehaltes der Organe korrigiert werden. Für die BSA-Bestimmung wurde ein ELISA verwendet. Die damit ermittelten Serumalbumin-Konzentrationen der Organe der Rinder sind aus Tabelle 5 und Abbildung 19 zu ersehen.

Tabelle 5 Konzentrationen an Rinder-Serumalbumin (BSA) in Plasma und Geweben des Rindes

Probe	Mittelwert der BSA-Konzentrationen (µg/g Gewebe bzw. ml)	Anzahl der Proben (n)	SD	SEM
Niere	1581	10	653	206
Gehirn	255	10	89	28
Zwerchfell	920	10	461	146
Leber	861	10	339	107
Herz	1547	10	600	190
Nebenniere	2084	10	725	229
NN-Rinde	474	5	267	120
NN-Mark	682	5	288	129
Plasma	4546	5	1908	853
Nackemusculatur	217	9	80	27
Lymphknoten	538	5	293	131
Milz	335	5	89	40

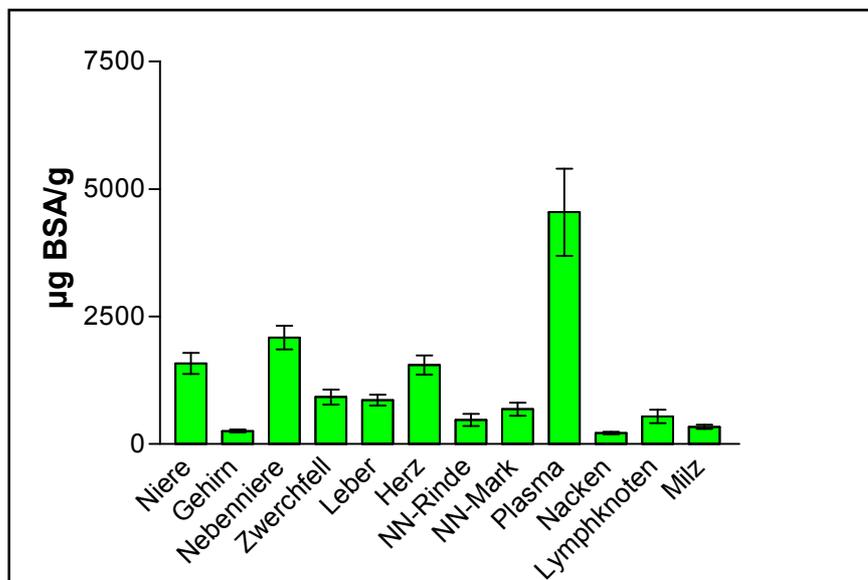


Abbildung 19 BSA-Konzentrationen in Plasma und Geweben des Rindes (µg/g Gewebe bzw. ml, Mittelwerte ± SEM)

3.1.5 Korrektur der CGBG-Konzentrationen um den Restblutgehalt der Organe

Um die CGBG-Konzentrationen der Rinderorgane bestimmen zu können, musste der nach dem Ausbluten der Organe vorhandene Restblut-Gehalt berücksichtigt werden [128]. Deshalb wurden alle CGBG-Konzentrationen auf die Konzentration des in den Organen vorhandenen Serumalbumins bezogen. Die sich dadurch ergebenden Quotienten in $\mu\text{g CGBG}/\mu\text{g BSA}$ sind in Tabelle 6 und Abbildung 20 gezeigt.

Wie aus der Abbildung 20 ersehen werden kann, scheinen nach Korrektur der CGBG-Werte gegen den Blutgehalt der Organe Konzentrations- bzw. Gewebegehaltsunterschiede zwischen den einzelnen Organen und Geweben zu bestehen. Um eine sichere Aussage zu erhalten, wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse getestet, ob die Mittelwerte der Quotienten der einzelnen Gewebe bzw. der Plasmaproben gleich sind. An die Analyse wurden zwei multifaktorielle Vergleichstests angeschlossen. Die durch die statistische Analyse erhaltenen Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 6 Quotienten der Gehalte an CGBG und BSA in Plasma und Geweben des Rindes

Probe	Mittelwert der Quotienten $\mu\text{g CGBG}/\mu\text{g BSA} \times 1000$	Anzahl der Proben (n)	SD	SEM
Niere	19	10	12	4
Gehirn	48	10	23	7
Zwerchfell	19	10	10	3
Leber	47	10	20	6
Herz	26	10	11	3
Nebenniere	36	10	16	5
NN-Rinde	147	5	85	38
NN-Mark	94	5	64	29
Plasma	373	5	176	79
Nackermuskulatur	49	9	30	10
Lymphknoten	91	5	69	31
Milz	163	5	69	31

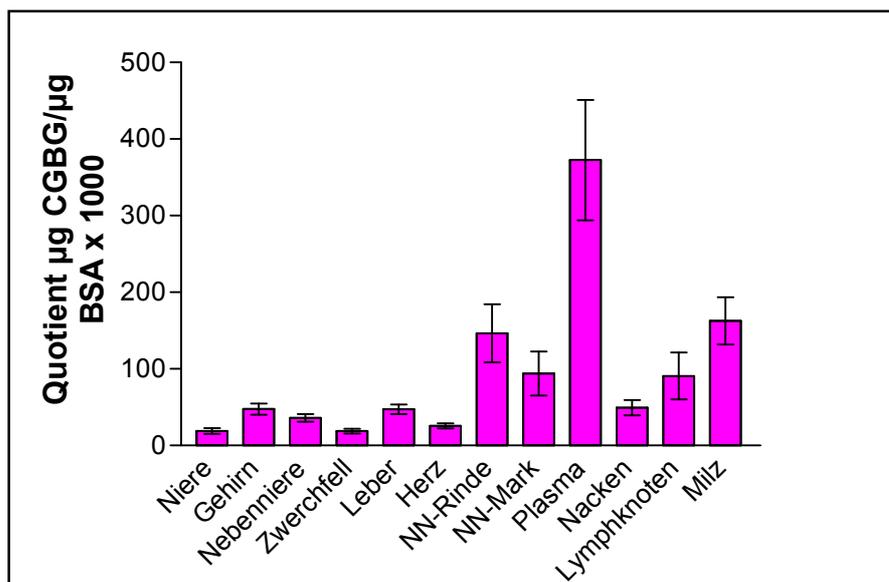


Abbildung 20 Quotient der Mittelwerte $\mu\text{g CGBG}/\mu\text{g BSA}$ in Plasma und Geweben des Rindes multipliziert mit $1000 \pm \text{SEM}$, (ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte siehe Tabelle 7 und Tabelle 8)

Sowohl im multifaktoriellen Vergleichstest nach Tukey als auch in dem nach Bonferroni ergab sich, dass die Konzentration des CGBG im Plasma hochsignifikant erhöht ist ($p < 0.001$) und sich von denen aller Gewebe unterscheidet. Weiterhin wurden nach Tukey Unterschiede zwischen den folgenden Gewebegehalten ermittelt (Tabelle 7):

Tabelle 7 Vergleich der Quotienten $\mu\text{g CGBG}/\mu\text{g BSA}$ der untersuchten Gewebe, Ergebnisse des multifaktoriellen Vergleichstests nach Tukey

Gewebe	Irrtumwahrscheinlichkeit
Milz gegen Gehirn	$p < 0.01$
Milz gegen Herz	$p < 0.001$
Milz gegen Leber	$p < 0.01$
Milz gegen Nackenmuskulatur	$p < 0.05$
Milz gegen Nebenniere (gesamt)	$p < 0.01$
Milz gegen Niere	$p < 0.001$
Milz gegen Zwerchfell	$p < 0.001$
Nebennierenrinde gegen Gehirn	$p < 0.05$
Nebennierenrinde gegen Herz	$p < 0.01$
Nebennierenrinde gegen Leber	$p < 0.05$
Nebennierenrinde gegen Nebenniere (gesamt)	$p < 0.05$
Nebennierenrinde gegen Niere	$p < 0.01$
Nebennierenrinde gegen Zwerchfell	$p < 0.01$

Nach dem Bonferroni-Test waren die Ergebnisse wie folgt (Tabelle 8):

Tabelle 8 Vergleich der Quotienten $\mu\text{g CGBG}/\mu\text{g BSA}$ der untersuchten Gewebe, Ergebnisse des multifaktoriellen Vergleichstests nach Bonferroni

Gewebe	Irrtumwahrscheinlichkeit
Milz gegen Gehirn	$p < 0.01$
Milz gegen Herz	$p < 0.001$
Milz gegen Leber	$p < 0.01$
Milz gegen Nackenmuskulatur	$p < 0.05$
Milz gegen Nebenniere (gesamt)	$p < 0.01$
Milz gegen Niere	$p < 0.001$
Milz gegen Zwerchfell	$p < 0.001$
Nebennierenrinde gegen Herz	$p < 0.01$
Nebennierenrinde gegen Nebenniere	$p < 0.05$
Nebennierenrinde gegen Niere	$p < 0.01$
Nebennierenrinde gegen Zwerchfell	$p < 0.01$

3.1.6 Messung der Verdrängbarkeit von IgM und CGBG von IgM- und CGBG-Antikörpern

Für ein Protein, das am Transport hydrophober Herzglykoside beteiligt sein soll, macht zwar der Nachweis erhöhter Proteinkonzentrationen in der Nebennierenrinde biologischen Sinn, nicht aber seine erhöhte Konzentration und somit eventuelle Biosynthese in der Milz (Abbildung 20).

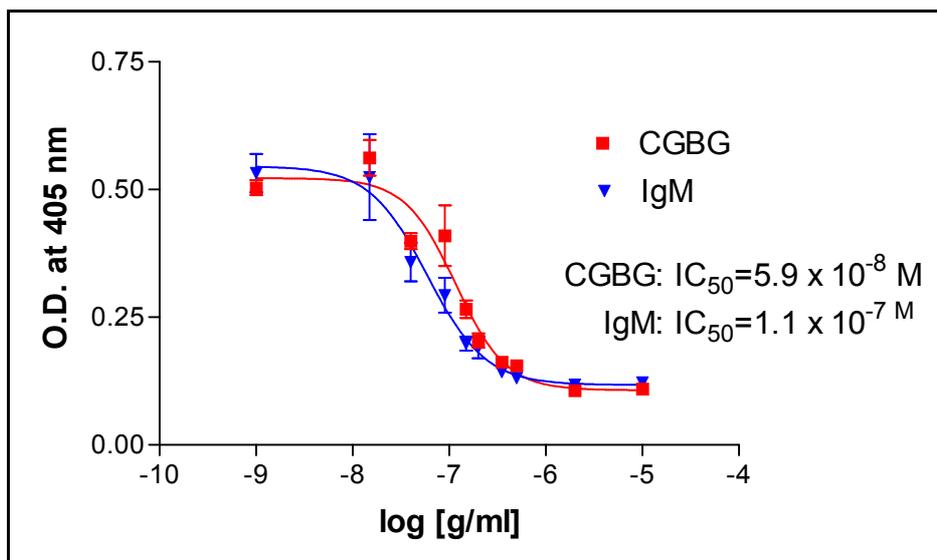


Abbildung 21 Verdrängbarkeit der Anti-CGBG-Antikörper von CGBG durch IgM und CGBG (Mittelwerte aus 3 Messungen \pm SEM)

Um den Verdacht zu erhärten, dass es sich bei dem gesuchten CGBG um die μ -Kette des IgM handelt, wurden die Kreuzreaktivitäten der Anti- μ -IgM Antikörper und der CGBG-Antikörper mit dem jeweils anderen Substrat untersucht (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Wenn die Mikrotiterplatte mit reinem CGBG beschichtet worden war und die Verdrängung der Anti-CGBG-Antikörper gemessen wurde, dann ergab die Verdrängung mit IgM die gleiche Eichkurve (Abbildung 21). Wenn die Mikrotiterplatte mit IgM beschichtet worden war und ein kompetitiver ELISA mit Anti- μ -IgM durchgeführt wurde, dann konnte mit CGBG als verdrängendem Protein ebenfalls die gleiche Eichkurve erhalten werden (Abbildung 22).

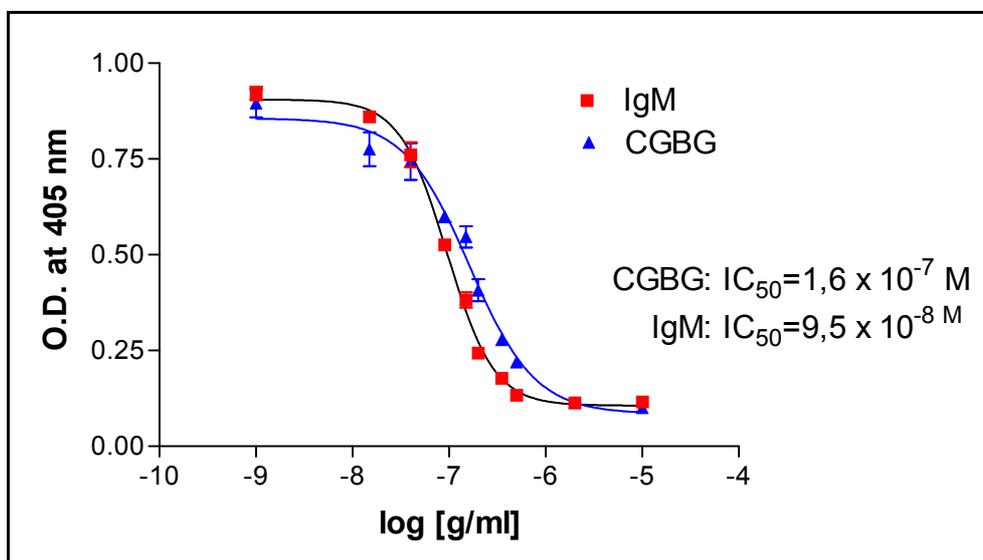


Abbildung 22 Verdrängbarkeit der Anti-IgM-Antikörper von IgM durch IgM und CGBG (Mittelwerte aus 3 Messungen \pm SEM)

3.2 BEWIRKEN OUABAIN UND DIGOXIN UNTERSCHIEDLICHE ANTWORTEN AN HUAEC UND GLATTEN MUSKELZELLEN DER AORTA?

3.2.1 Die Aktivität der Natrium-Pumpe von HUAEC in Gegenwart verschiedener Herzglykoside

Vorhergehende Experimente von Robert Saunders aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis am Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität hatten ergeben, dass nanomolare Konzentrationen an Ouabain die Aktivität der Natrium-Pumpe in humanen Endothelzellen stimulieren [83]. Die Aktivität der Natrium-Pumpe kann unter zellulären Bedingungen über die Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit von radioaktivem $^{86}\text{Rb}^+$, einem dem Kalium analog wirkenden Kation, bestimmt werden. Es wurde überprüft, ob sich auch andere Herzglykoside stimulierend auf die Aktivität der Natrium-Pumpe auswirken.

Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass Ouabain in nanomolaren Konzentrationen die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HUAEC signifikant stimulierte ($p < 0,005$ für 10^{-10} und 10^{-9} M, $p < 0,05$ für 10^{-8} M gegenüber der Kontrolle im zweiseitigen t-Test). Die Herzglykoside Digoxin, Ouabagenin und Dihydroouabain zeigten jedoch in nanomolaren Konzentrationen keine Stimulierung der Natrium-Pumpe. Zugleich waren höhere Konzentrationen dieser Herzglykoside erforderlich, um die Natrium-Pumpe zu hemmen. Wie aus einem Vergleich der IC_{50} -Werte ersichtlich ist, hemmt Ouabagenin ($\text{IC}_{50} = 4,6 \times 10^{-6}$ M) 13-fach schlechter, Dihydroouabain ($\text{IC}_{50} = 1,3 \times 10^{-6}$ M) 3,8-fach schlechter und Digoxin ($\text{IC}_{50} = 5,9 \times 10^{-7}$ M) 1,7-fach schlechter als Ouabain ($\text{IC}_{50} = 2,4 \times 10^{-7}$ M) (Abbildung 23).

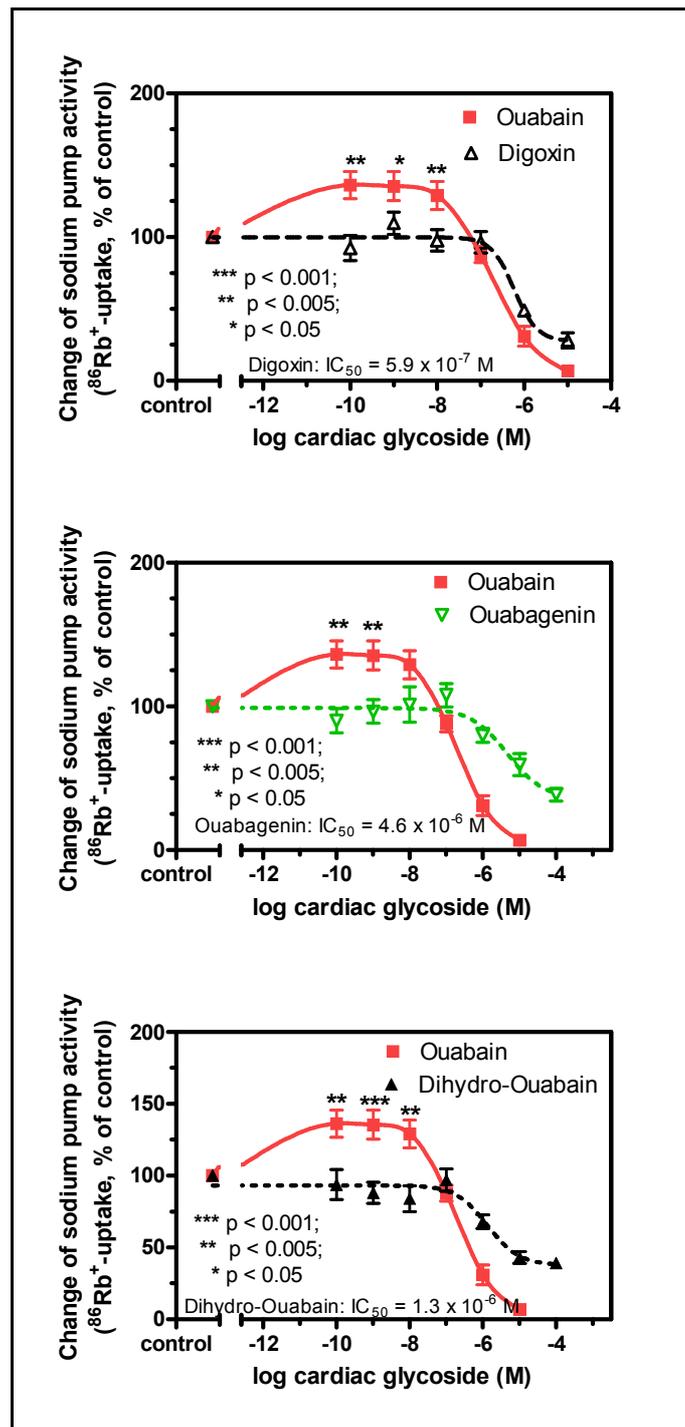


Abbildung 23

Effekt von verschiedenen Herzglykosidkonzentrationen auf die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in HUAEC als Maß für die Aktivität der Natrium-Pumpe

Der Mittelwert der Rubidiumaufnahme in die Zellen innerhalb von 30 min war $1,6 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^4 \text{ Zellen}$. Ouabain: $\text{IC}_{50} = 2,4 \times 10^{-7} \text{ M}$; Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeiten durch einen zweiseitigen t-Test.

Ouabain (n=11), Digoxin (n=16), Ouabagenin (n=9) und Dihydroouabain (n=16)

Mittelwerte \pm SEM

3.2.2 Wirken Ouabain und Digoxin auf die Proliferation von HUAEC und glatten Muskelzellen der Aorta stimulierend?

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Wachstum humaner Endothelzellen durch Ouabain stimuliert wird [83]. Die Proliferation glatter Muskelzellen wird von Ouabain und von Marinobufagenin angeregt [103,104].

Es war daher von Interesse zu ermitteln, ob Digoxin und Ouabain unterschiedlich auf die Proliferationsrate von HUAEC und humanen glatten Muskelzellen der Aorta wirken.

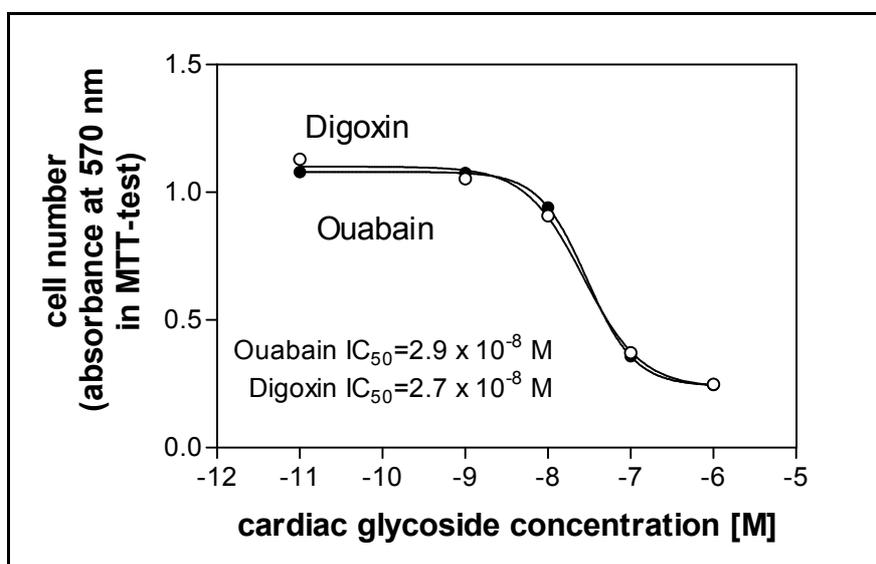


Abbildung 24 Wirkung steigender Herzglykosidkonzentrationen auf das Wachstum von HUAEC (n = 49, Mittelwerte ± SEM)

Weder an Endothelzellen noch an glatten Muskelzellen konnte eine Aktivierung der Proliferationsrate durch Ouabain oder Digoxin gezeigt werden, wenn die Zellzahl mit dem MTT-Test bestimmt wurde. Die IC₅₀-Werte der Wachstumshemmung von HUAEC durch Digoxin und Ouabain waren gleich und lagen im Bereich von 3 × 10⁻⁸ M. Bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M war ein Großteil der Zellen nicht mehr mit dem MTT-Test nachweisbar (Abbildung 24).

In glatten Muskelzellen aus menschlicher Aorta war die Toxizität der Herzglykoside unterschiedlich. Ouabain (IC₅₀ = 1,1 × 10⁻⁷ M) hemmte die Zellproliferation besser als Digoxin (IC₅₀ = 2,2 × 10⁻⁶ M) (Abbildung 25). Allerdings waren Endothelzellen mindestens um den Faktor 10 empfindlicher gegenüber Digoxin und Ouabain als die glatten Muskelzellen.

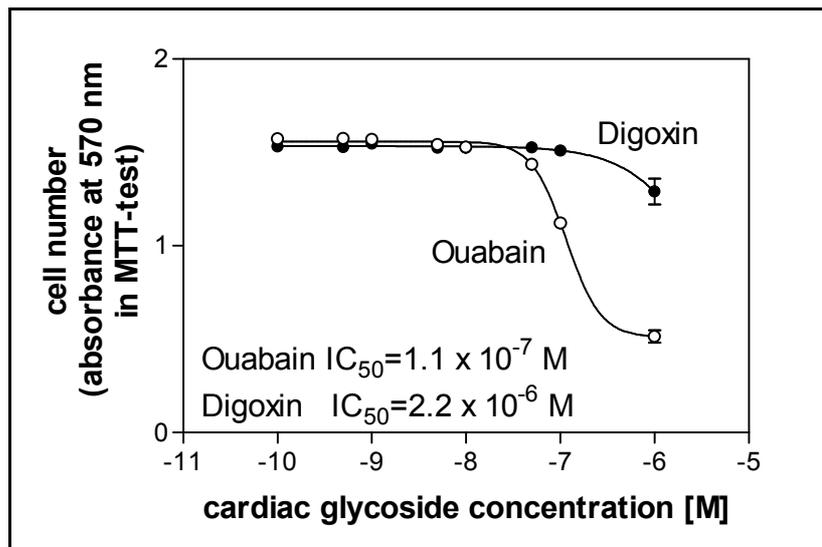


Abbildung 25 Wirkung steigender Herzglykosidkonzentrationen auf das Wachstum humaner glatter Muskelzellen (n = 2, Mittelwerte ± SEM)

3.2.3 Beruht die Abnahme des Zellwachstums bei toxischen Herzglykosidkonzentrationen auf einer Aktivierung der Apoptose?

Die bei Herzglykosidkonzentrationen über 10⁻⁸ M zu beobachtende geringere Proliferationsgeschwindigkeit könnte auf einer Hemmung der Zellteilung, einem erleichterten Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale oder auf einer Stimulierung des Zelltodes durch Apoptose beruhen. Optisch war keine Ablösung von Zellen vom Boden der Kulturschalen im Bereich zwischen 10⁻⁷ – 10⁻⁸ M zu sehen. Apoptose kann leicht und mit großer Empfindlichkeit mit dem Caspase-Test der Firma Promega fluorimetrisch gemessen werden. Dieser Test bestimmt die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7.

Mit diesem Test wurde evident, dass Ouabain und Digoxin erst im Bereich von 10⁻⁶ M die Caspase aktivieren. Bei weiterer Erhöhung der Herzglykosidkonzentration nahm die Caspase-Aktivität wieder ab. Es wurde nicht überprüft, ob sich bei diesen toxischen Konzentrationen die Zellen vom Plattenboden abgelöst hatten (Abbildung 26).

Der im MTT-Test gemessene Abfall der Proliferationsrate der HUAEC bei Herzglykosidkonzentrationen zwischen 10⁻⁹ und 10⁻⁷ M kann daher nicht auf apoptotische Vorgänge zurückgeführt werden.

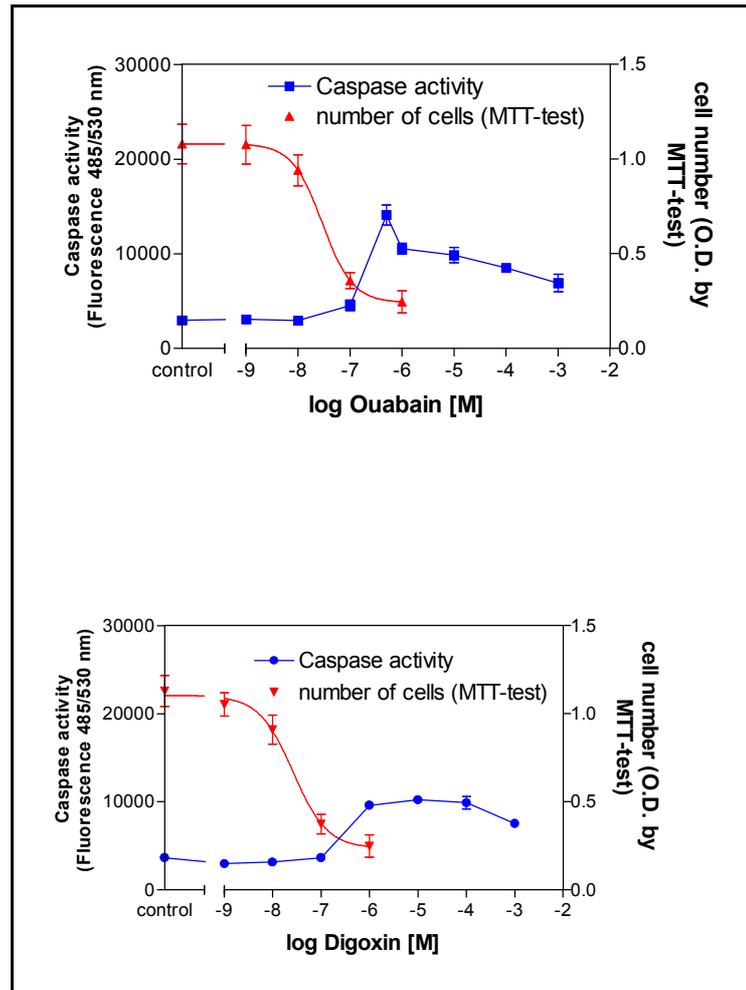


Abbildung 26 Vergleich der Wirkung von Ouabain und Digoxin auf das Zellwachstum in 5 Tagen und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in HUAEC (Caspase-Assay: n = 2, Mittelwerte ± SEM)

Belusa et al. haben an COS-Zellen gezeigt, dass bei partieller Hemmung der Natrium-Pumpe die zelluläre Adhäsion über die verminderte Phosphorylierung der Focal Adhesion Kinase (FAK) verringert wird [129]. Daher wurde die Wirkung der Herzglykoside Ouabain und Digoxin auf die FAK-Phosphorylierung in HUAEC untersucht. Hierbei ergab sich, dass sich der Phosphorylierungsgrad dieses Proteins nicht ändert (Abbildung 27).

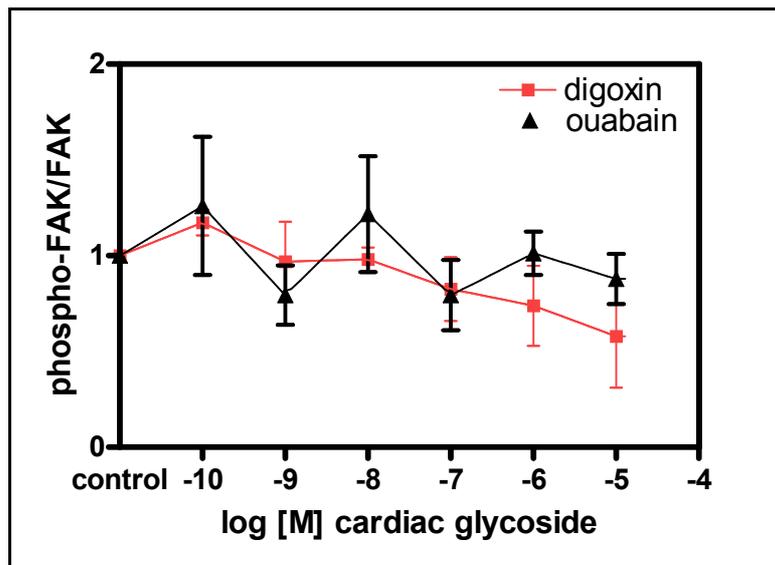


Abbildung 27 Studium der Wirkung von Herzglykosiden auf den Phosphorylierungsgrad der Fokal Adhesion Kinase in HUAEC Mittelwerte \pm SEM von 4 Versuchen. Die Proben ohne Herzglykoside wurden gemittelt und gleich null gesetzt.

Die toxische Wirkung hoher Herzglykosidkonzentrationen im Bereich von 10^{-8} – 10^{-6} molar auf die Zellzahl wachsender Endothelzellen kann daher nicht auf ihr Ablösen von der Kulturschale zurückgeführt werden, sondern muss auf einer Wachstumshemmung der Zellen beruhen.

3.2.4 Wirkung von Ouabain und Digoxin auf die Endothelin-Freisetzung in HUAEC

Robert Saunders hatte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis gemessen, dass Ouabain in nanomolaren Konzentrationen die Freisetzung von Endothelin-1 aus HUAEC sowie die Expression der mRNA des Endothelin-1 stimuliert [83].

Es schien daher interessant zu erfahren, ob Digoxin und Ouabain sich auch in der Stimulierung der Endothelin-1-Freisetzung unterscheiden. Solche Unterschiede könnten verständlich machen, weshalb langfristige Infusionen von Ouabain Bluthochdruck erzeugen können, während Digoxin den Blutdruck nicht erhöht und den Ouabain-Effekt rückgängig machen kann [49,50,130].

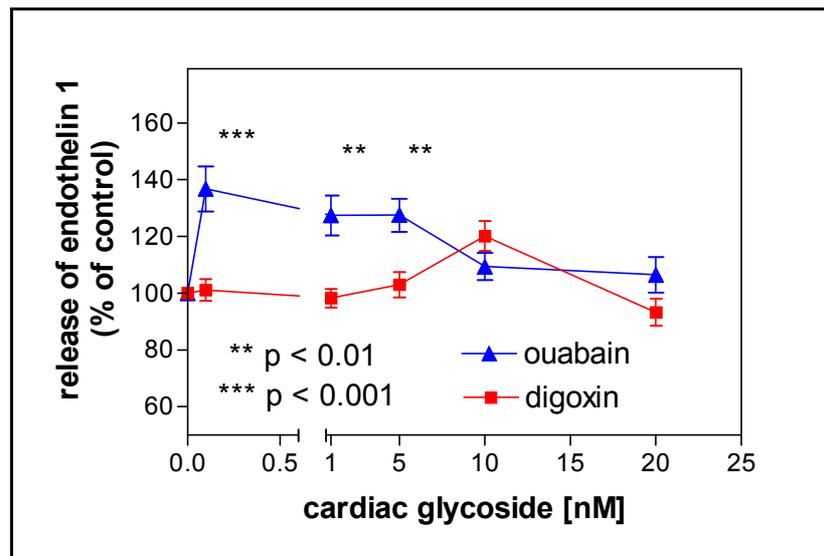


Abbildung 28 Freisetzung von Endothelin-1 aus HUAEC unter Einfluss von nanomolaren Konzentrationen von Ouabain und Digoxin in Prozent der Kontrolle
 Die Zellen wurden für 30 min mit den angegebenen Herzglykosid-Konzentrationen inkubiert.
 Mittelwerte \pm SEM, n=10. Die Signifikanzen wurden mit einem zweiseitigen t-Test berechnet. Endothelin wurde mit einem ELISA gemessen.

Übereinstimmend mit den Daten von Saunders et al. [83] wurde ermittelt, dass Ouabain in der Lage ist, die Endothelin-1-Freisetzung aus Endothelzellen zu stimulieren. Mit 40 % wurde die höchste Stimulierung bei einer Konzentration von 0,1 nM Ouabain erreicht. Digoxin zeigte keinen Einfluss auf die Endothelin-1-Freisetzung. Im Bereich von 0,1 nM bis 5 nM war die Endothelin-1-Freisetzung der beiden Herzglykoside signifikant verschieden (Abbildung 28).

3.2.5 Wirkung von Digoxin und Ouabain auf die NO-Freisetzung in HUAEC

Von Endothelzellen wird neben dem vasokonstriktorisch wirkenden Hormon Endothelin-1 auch das vasodilatatorisch wirkende Stickoxid (NO) gebildet und freigesetzt. Da Ouabain und Digoxin unterschiedlich auf den Blutdruck wirken, erschien es interessant zu überprüfen, ob die beiden Herzglykoside sich in der Freisetzung von NO unterscheiden. Es war aus den Untersuchungen von Dong et al. bekannt, dass Ouabain die Stimulierung der Freisetzung von NO durch Bradykinin weiter verstärkt [82].

Zunächst konnte mit Griess-Reagenz, das früher für derartige Versuche an Endothelzellen verwendet worden war [131], keine Stimulierung der NO-Freigabe unter Ouabain-Einfluss allein an HUAEC gemessen werden. Wurden die Versuche jedoch mit der sehr viel empfindlicheren Fluoreszenzmethode unter Verwendung von Diaminofluorescein-Diacetat (DAF-2-DA) durchgeführt, war dies möglich. Die Zellen mussten dazu 4 Stunden mit dem Reagenz in ECGM inkubiert werden. Kürzere Inkubationszeiten brachten keine reproduzierbaren Daten. Wenn das Inkubationsmedium zusätzlich Herzglykoside enthielt, wurde die NO-Freisetzung stimuliert (Abbildung 29). Bereits so geringe Konzentrationen wie 10^{-10} M der beiden Herzglykoside führten zu einer signifikanten Steigerung der NO-Freisetzung. Diese nahm bis in den Bereich von 10^{-8} M um 17 % zu. Im höheren Konzentrationsbereich von 10^{-7} und 10^{-6} M Ouabain nahm die Bildung von NO wieder ab. Dieser Effekt wurde jedoch nicht unter Digoxin-Einfluss beobachtet. Der Unterschied zwischen 10^{-7} M Digoxin und Ouabain war mit $p < 0.05$ signifikant (Abbildung 29).

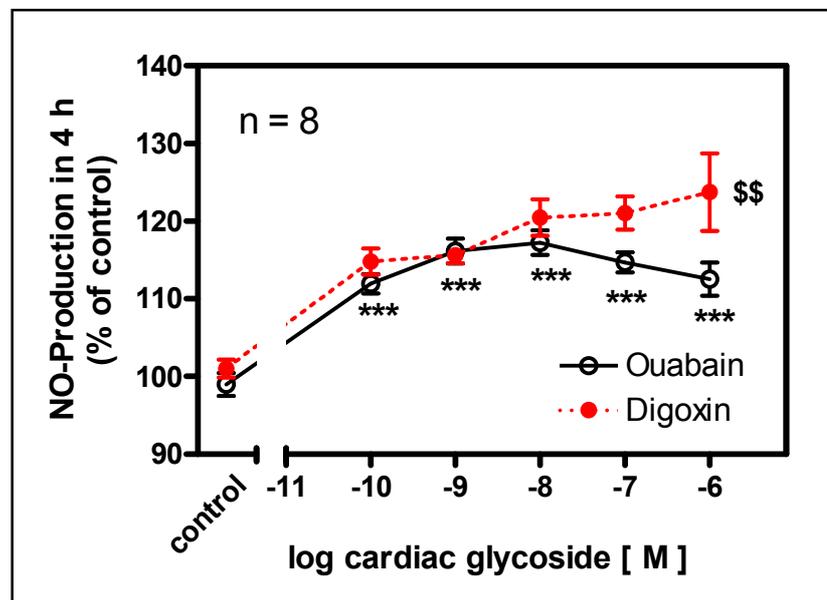


Abbildung 29

Einfluss der Herzglykoside Digoxin und Ouabain auf die Freisetzung von NO in HUAEC nach 4-stündiger Inkubation in ECGM II
 n=8, Mittelwerte \pm SEM
 zweiseitiger t-Test: 10^{-10} - 10^{-7} M Ouabain und Digoxin gegen Kontrolle und 10^{-6} M Ouabain gegen Kontrolle: ***= $p < 0.0001$, 10^{-6} M Digoxin gegen Kontrolle: **= $p < 0,001$
 Ouabain gegen Digoxin 10^{-7} M: \$\$= $p < 0.05$

Da generell die NO-Synthese und Freisetzung in HUAEC in der Gegenwart von 100 μ M Arginin im Kulturmedium bestimmt wurde, war zu überprüfen, ob die Arginin-Konzentration für die NO-Synthese ausreicht; denn NO entsteht über die NO-Synthase aus Arginin. Abbildung 30 zeigt, dass bereits im normalen Kulturmedium (s. 2.3.9.1.2) genügend Arginin vorhanden ist, um eine Herzglykosid-Aktivierung zu erzielen.

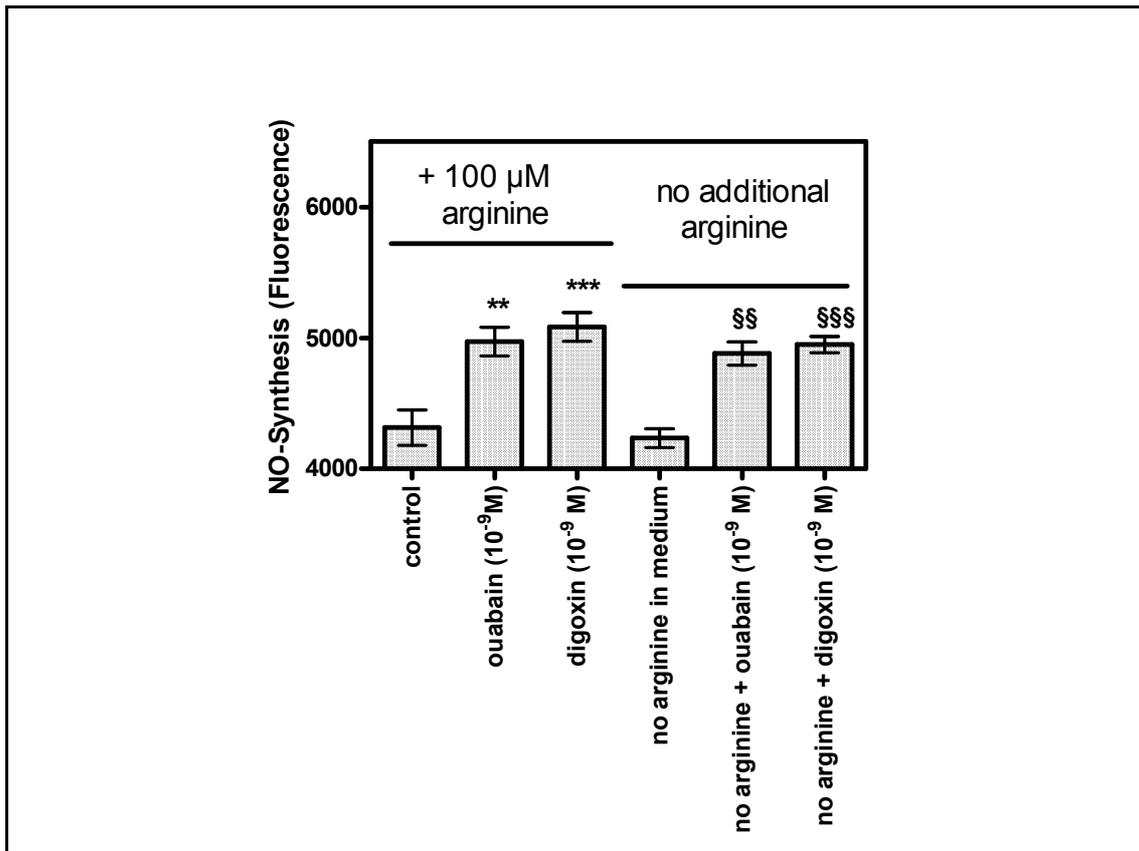


Abbildung 30

Die Stimulierung der NO-Synthese durch Ouabain und Digoxin (1 nM) ist auch in Normalmedium möglich und braucht kein zusätzliches extrazelluläres Arginin als Substrat der NO-Synthase
 Zweiseitiger t-Test: Ouabain und Digoxin gegen Kontrolle: ** bzw. §§ = $p < 0.01$; *** bzw. §§§ = $p < 0,001$ (n=4, Mittelwerte \pm SEM)

3.2.6 Ändern Ouabain und Digoxin die Phosphorylierung von eNOS?

Es ist bekannt, dass die hormonelle Stimulierung der NO-Synthese entweder über eine Phosphorylierung der NO-Synthase (eNOS) oder über eine durch aktives Calmodulin induzierte Konformationsänderung des Enzyms erfolgt [82]. Es wurde daher in einem Westernblot von HUAEC-Lysaten mit Antikörpern

gegen phosphorylierte (Ser1177) und nicht-phosphorylierte eNOS überprüft, ob die beiden Herzglykoside einen Einfluss auf die Entstehung von Phospho-eNOS haben.

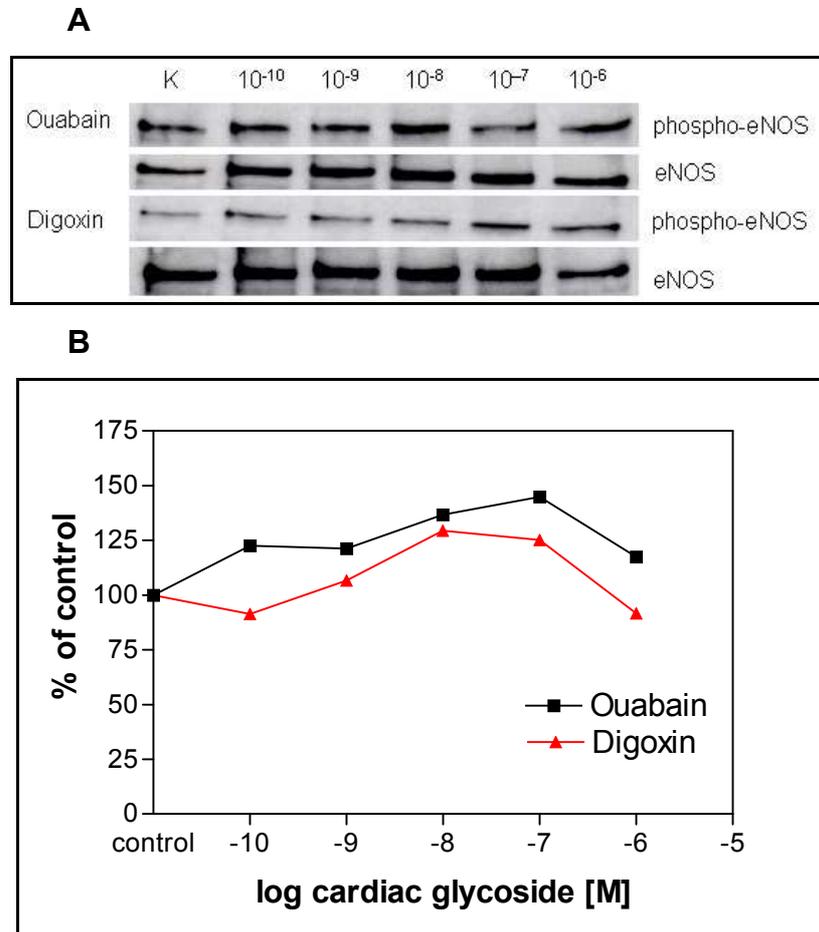


Abbildung 31 Einfluss von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung des eNOS-Enzyms
A: Abbildung der Western Blots gegen phosphorylierte und Gesamt-eNOS (K = Kontrolle, Herzglykosidkonzentrationen in M)
B: Graphische Darstellung der Menge an phosphoryliertem Enzym bezogen auf die Menge an Gesamt-Enzym ausgedrückt in % der Kontrolle (phospho-eNOS/Gesamt-eNOS der Probe ohne Herzglykosid wurde gleich 100 % gesetzt), ausgewertet mit dem Programm TotalLab.

Es stellte sich heraus, dass im Falle des Ouabains bereits ab einer Konzentration von 10^{-10} M die Phosphorylierung des Proteins anstieg und bei einer Konzentration von 10^{-7} M die höchste Aktivierung um etwa 40 % vorlag. Im Falle des Digoxin begann die verstärkte Phosphorylierung bei 10^{-9} M und steigerte sich bis 10^{-7} M auf etwa 20 % (Abbildung 31).

3.2.7 Studien zur Aufklärung des Signalweges zur eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin

Eine Reihe von Hormonen stimulieren eNOS in Endothelzellen durch Phosphorylierung an Serin 1177 [132]. Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, kann die eNOS-Phosphorylierung sowohl durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II als auch durch akt/Proteinkinase B erfolgen, die ihrerseits über die Interaktion mit Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP_3) oder durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase aktiviert werden kann [82,97].

Wie die Stimulierung der NO-Synthese durch Herzglykoside in Endothelzellen erfolgt, ist unbekannt. In Herzmuskelzellen stimuliert Ouabain Tyrosin-Kinasen der src-Familie, was u. a. eine Signalkette zum Zellkern auslöst [109,111]. Eine Stimulierung des Phosphoinositidstoffwechsels durch Ouabain im Herzmuskel [133] sowie der PI3-Kinase [134] ist gezeigt worden. In Nierenzellen wurden Ouabain-induzierte Ca^{2+} -Oscillationen unter Aktivierung des IP_3 -Rezeptor-Kanals des ER gemessen [90,110]. Ca^{2+} -Oscillationen wurden auch in Endothelzellen gefunden [83]. Auch eine Beteiligung von Na^+ -Kanälen [91], Ca^{2+} -Kanälen [135,136] und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers ist denkbar [23]. Im folgenden sollte ermittelt werden, über welchen Signalweg die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin stattfindet.

3.2.7.1 Wirkung von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung von akt/PKB

Wie in der Einleitung erwähnt, kann die Phosphorylierung der eNOS durch akt/Proteinkinase B erfolgen. Die akt/PKB muss dazu zunächst selbst durch die 3-Phosphatidylinositol-abhängigen Proteinkinasen 1 und 2 (PDK-1 und PDK-2) und deren Bindung an Phosphatidylinositoltriphosphat über ihre Pleckstrin-Domäne phosphoryliert werden. Die akt/PKB-Phosphorylierung kann aber auch über die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase geschehen. Um zu ermitteln, ob unter dem Einfluss von Ouabain und Digoxin eine verstärkte akt/PKB-Phosphorylierung erfolgt, wurden in einem Western Blot der Zell-Lysate der Phosphorylierungsgrad mittels Antikörpern gegen akt/PKB und Phospho-akt/PKB gemessen (Abbildung 32).

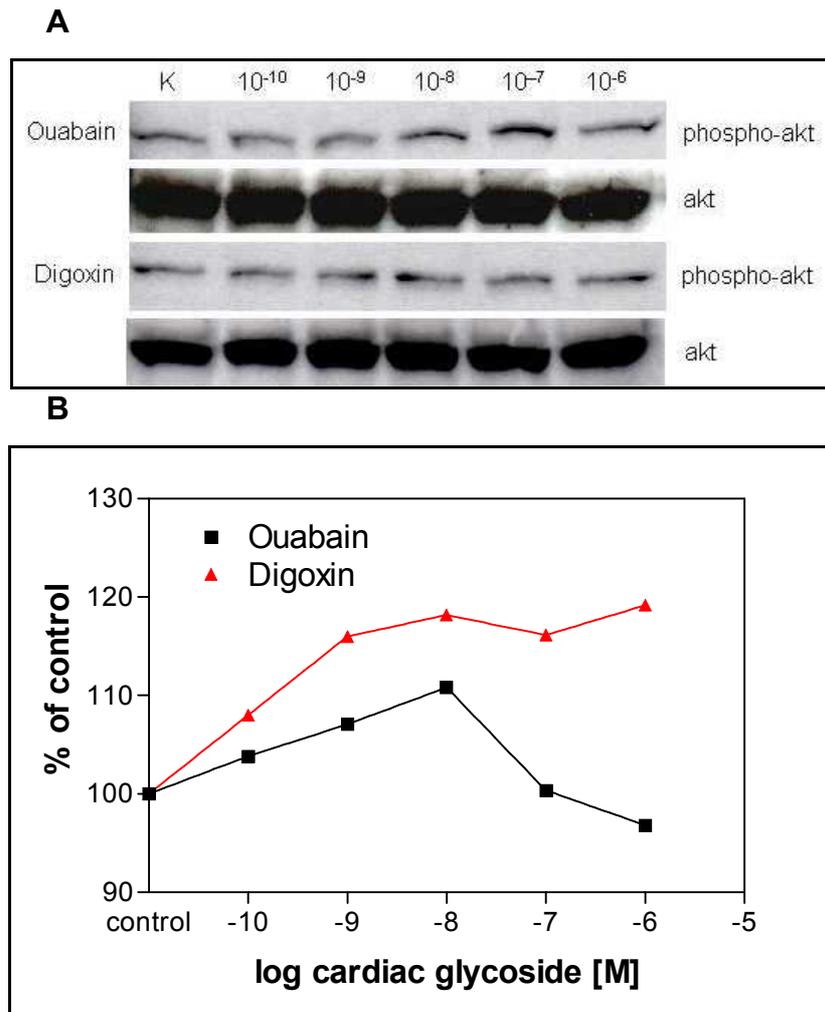


Abbildung 32

Einfluss von Ouabain und Digoxin auf die Phosphorylierung von akt/Proteinkinase B

A: Abbildung der Western Blots gegen phospho-akt und akt (K = Kontrolle, Herzglykosidkonzentrationen in M)

B: Graphische Darstellung der Menge an phosphoryliertem Enzym bezogen auf die Menge an Gesamt-Enzym ausgedrückt in % der Kontrolle (Phospho-akt/Gesamt-akt der Probe ohne Herzglykosid wurde gleich 100 % gesetzt), ausgewertet mit dem Programm TotalLab

Sowohl mit Digoxin als auch mit Ouabain behandelte Zellen zeigten einen erhöhten Anteil von Phospho-akt/PKB gegenüber Gesamt-akt/PKB. Im Falle des Digoxin stieg die Phosphorylierung im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-6} M an, während sich im Falle des Ouabain der Anteil des Phospho-akt ab einer Konzentration von 10^{-8} M wieder verminderte (Abbildung 32).

3.2.7.2 Bestimmung des Einflusses der Phosphatidylinositol-3-Kinase auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin

Die Phosphorylierung der akt/Proteinkinase B erfolgt entweder nach Aktivierung durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase oder durch die Calmodulin/Ca²⁺-abhängige Proteinkinase-Kinase.

Eine mögliche Rolle des PIP₃-Weges in der Signalkaskade zur Aktivierung der NO-Sekretion aus HUAEC wurde mittels der Hemmstoffe der Phosphatidylinositol-3-kinase, Ly294002 und Wortmannin, untersucht. Ly294002 hemmte die durch Ouabain und Digoxin verstärkte NO-Freisetzung (Abbildung 33), während jedoch Wortmannin verwunderlicherweise auch in höheren Konzentrationen als 40 nM keine Wirkung auf die NO-Freisetzung hatte (Abbildung 34).

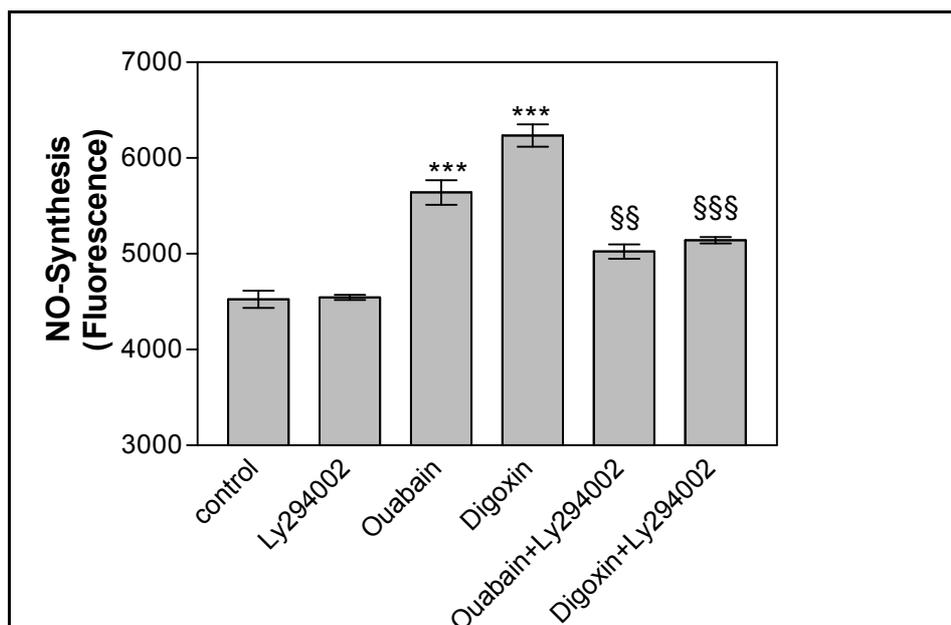


Abbildung 33

Hemmung der Herzglykosid-induzierten Aktivierung der eNOS durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Hemmstoff Ly294002

Ouabain und Digoxin: 1 nM, Ly294002: 50 µM, n=4, Mittelwerte ± SEM

zweiseitiger t-Test: Ouabain und Digoxin gegen Kontrolle:

***p<0,0001, Ouabain gegen Ouabain+Ly294002: §§p<0,01, Digoxin gegen Digoxin+Ly294002: \$\$\$p<0,0001, Ouabain gegen Digoxin:

*p<0,05

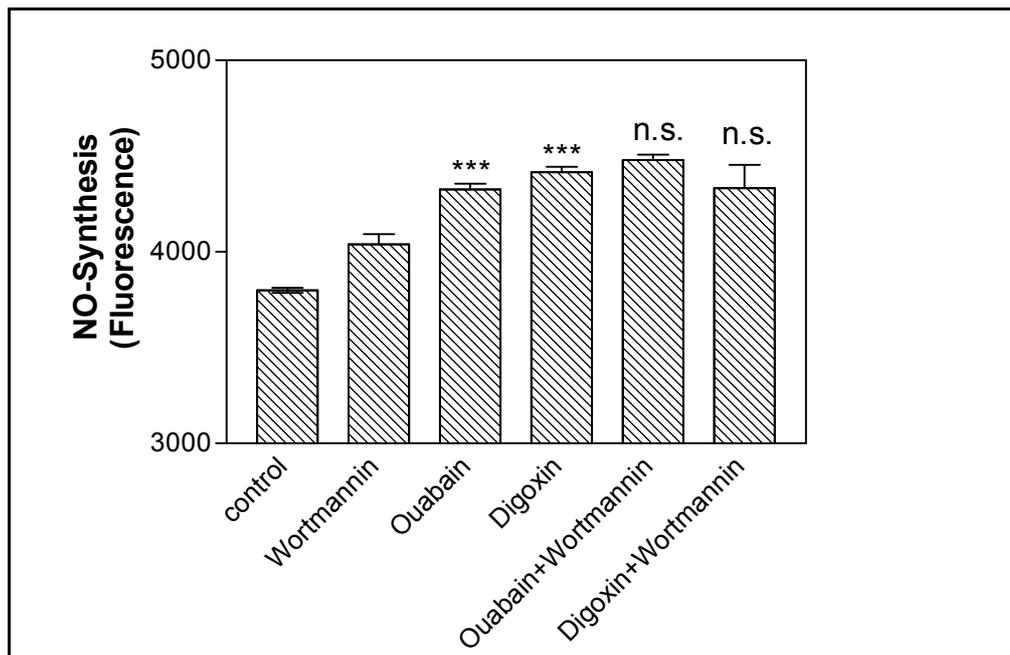


Abbildung 34 Die Substanz Wortmannin zeigt keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin (Ouabain und Digoxin: 1 nM, Wortmannin: 40 nM, n=4, Mittelwerte \pm SEM).

3.2.7.3 Ist die src-Kinase in die eNOS-Aktivierung durch Digoxin und Ouabain eingeschaltet?

Wenn die Aktivierung der NO-Synthese und Freisetzung durch Digoxin und Ouabain über den PIP₃-Weg erfolgt, dann wäre es interessant zu erfahren, auf welchem Signalweg die PI3-Kinase aktiviert wird.

Zunächst schien es aufgrund der Berichte an Herzmuskelzellen [111] möglich, dass nach Bindung der Herzglykoside an die Natrium-Pumpe eine Tyrosin-Kinase aus der Familie der src-Kinasen aktiviert wird (Arbeitshypothese 1, Abbildung 35). Src steht für „sarcoma“, da das src-Kinase-Gen zuerst im Rous-Sarcoma-Virus, einem Bindegewebstumorerzeugenden Virus, gefunden wurde. Die src-Kinase könnte dann ihrerseits über die Phosphatidylinositol-3-Kinase und das vermehrt gebildete Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat die Proteinkinase B/akt aktivieren, die wiederum über eine Phosphorylierung das eNOS-Enzym aktiviert. Xie et al. hatten an Herzmuskelzellen gezeigt, dass die src-Kinase unter Ouabain vermehrt phosphoryliert wird [111].

Um zu erfahren, ob eine Tyrosinkinase der src-Familie in die Signalvermittlung eingreift, wurde PP2 als src-Kinase-Hemmstoff eingesetzt [137].

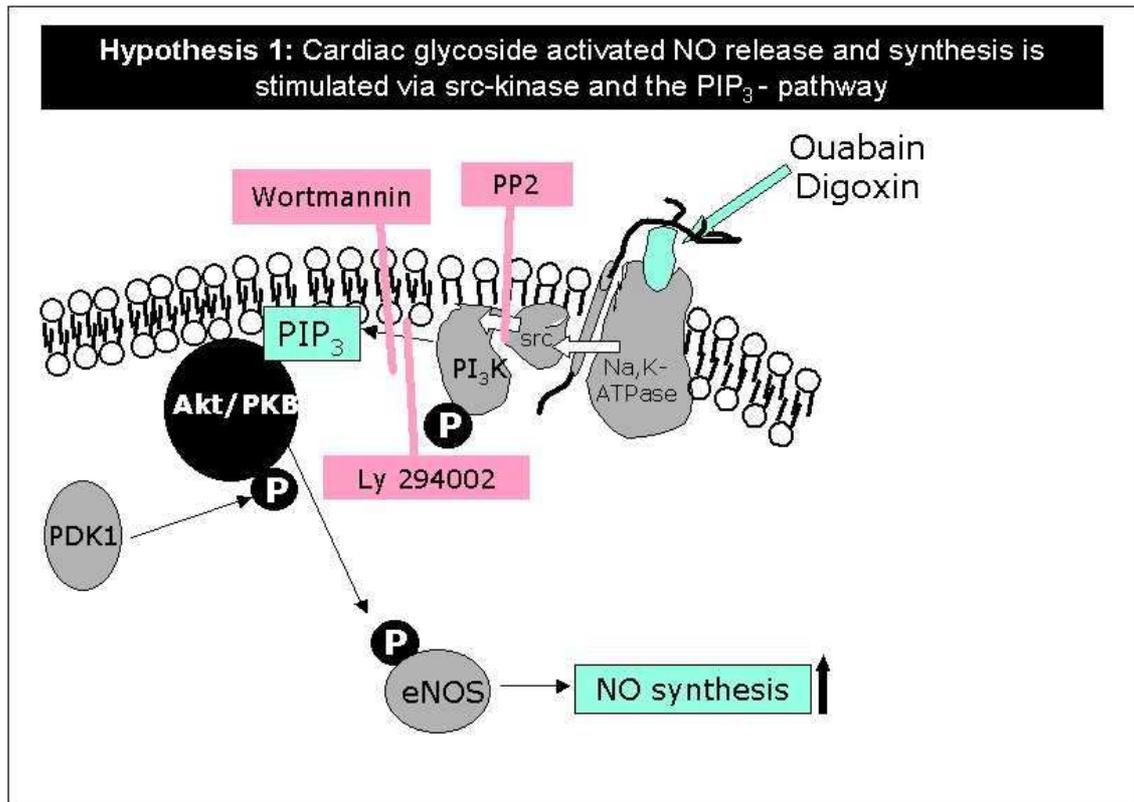


Abbildung 35

Aktivierung der eNOS über die src-Kinase und den PIP₃-Weg
 (PI₃K = Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP₃ = Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat, PDK1 = Phosphatidylinositol-dependent-Kinase 1, PKB = Proteinkinase B, eNOS = endotheliale NO-Synthase)

PP2 zeigte in einer Konzentration von 5 nM keine Hemmung der Herzglykosid-induzierten eNOS-Aktivierung (Abbildung 36). Es war in weiteren Versuchen auch mit PP1 (3000 nM), einem weiteren Hemmstoff der src-Kinase [137], keine Hemmung der Herzglykosid-stimulierten NO-Freisetzung zu messen (Daten nicht gezeigt). Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Aktivierung des intrazellulären Signalwegs über eine Tyrosin-Kinase der src-Familie erfolgt (Abbildung 35).

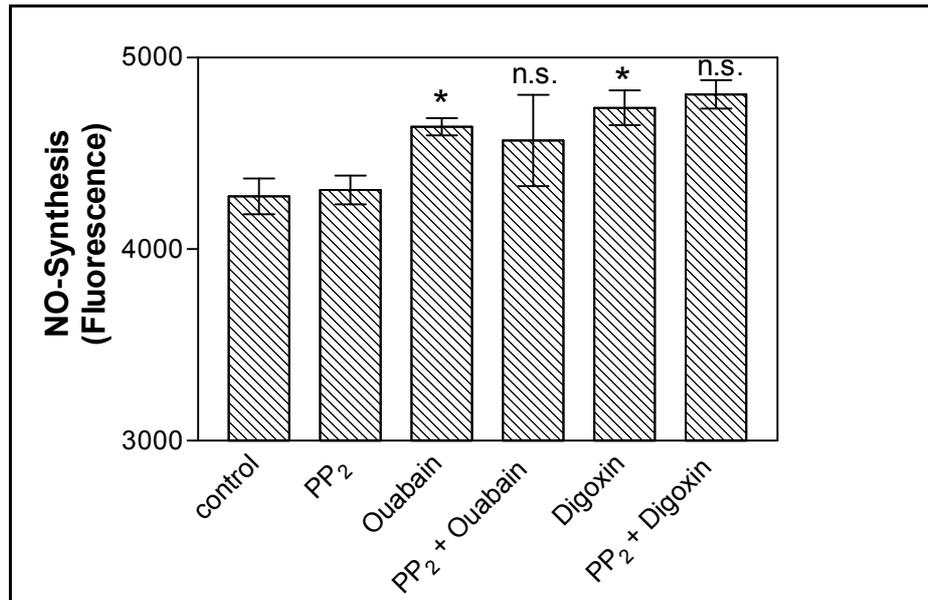


Abbildung 36

Die Herzglykosid-induzierte Aktivierung der eNOS erfolgt nicht über eine Tyrosinkinase der src-Familie, da der src-Kinase-Hemmstoff PP₂ nicht in der Lage ist, die Aktivierung zu blockieren. Ouabain und Digoxin: 1 nM, PP₂: 5 nM, n=4, Mittelwerte ± SEM (zweiseitiger t-Test: 1 nM Ouabain und 1 nM Digoxin gegen Kontrolle: *p<0,05; Ouabain gegen PP₂ + Ouabain und Digoxin gegen PP₂ + Digoxin = nicht signifikant)

3.2.7.4 Studium der Bedeutung von Ca²⁺ und Ca²⁺-Kanälen auf die erhöhte NO-Freisetzung unter Digoxin- und Ouabaineinfluss

Ca²⁺-Ionen werden seit langer Zeit als second messenger der inotropen Wirkung von Herzglykosiden auf die Muskelkontraktion diskutiert [23,26]. Es ist nicht endgültig klar, ob dieser Ca²⁺-Anstieg über eine Öffnung von Ca²⁺-Kanälen [135], slip-mode Na⁺-Kanälen, die auch für Ca²⁺ durchlässig sind [91], die direkte Interaktion der Natrium-Pumpe mit dem IP₃-Rezeptor [90] oder weitere Mechanismen zustande kommt. Alle diese Wege könnten ausgenutzt werden, um eNOS zu aktivieren. Es ist bekannt, dass das eNOS-Enzym durch Bindung an Calmodulin aktiviert wird und dass in HUAEC durch Ouabain ein Ca²⁺-Anstieg induziert werden kann [83].

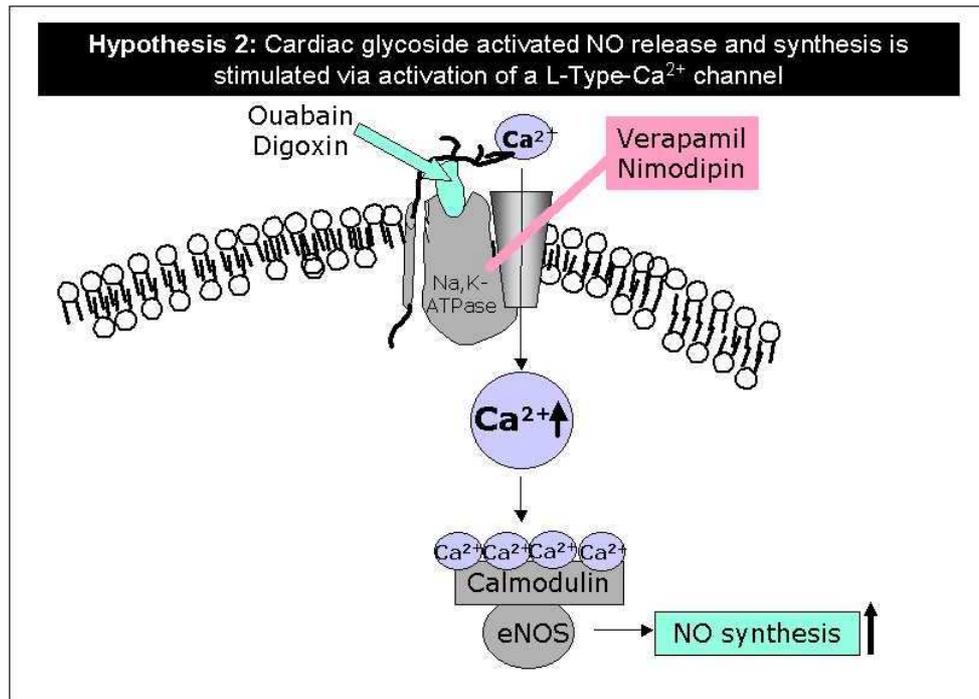


Abbildung 37 Aktivierung der eNOS über die Aktivierung eines L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (eNOS=endotheliale NO-Synthase)

Als weitere Möglichkeit wurde deshalb die Aktivierung der eNOS über einen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle überprüft (Arbeitshypothese 2, Abbildung 37). Daher wurde die Wirkung zweier verschiedener Ca^{2+} -Kanalblocker gemessen. Diese waren Verapamil, ein Phenylalkylamin und Nimodipin, ein Derivat des Dihydropyridin. Beide Substanzen hemmen spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran [138,139].

Keine der beiden Substanzen unterband die Aktivierung der eNOS durch Herzglykoside (Abbildung 38); im Gegenteil, die Blockade spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch Verapamil aktivierte die Herzglykosid-stimulierte NO-Freisetzung weiter (Abbildung 38). Es ist somit wenig wahrscheinlich, dass Herzglykoside spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in Endothelzellen eröffnen.

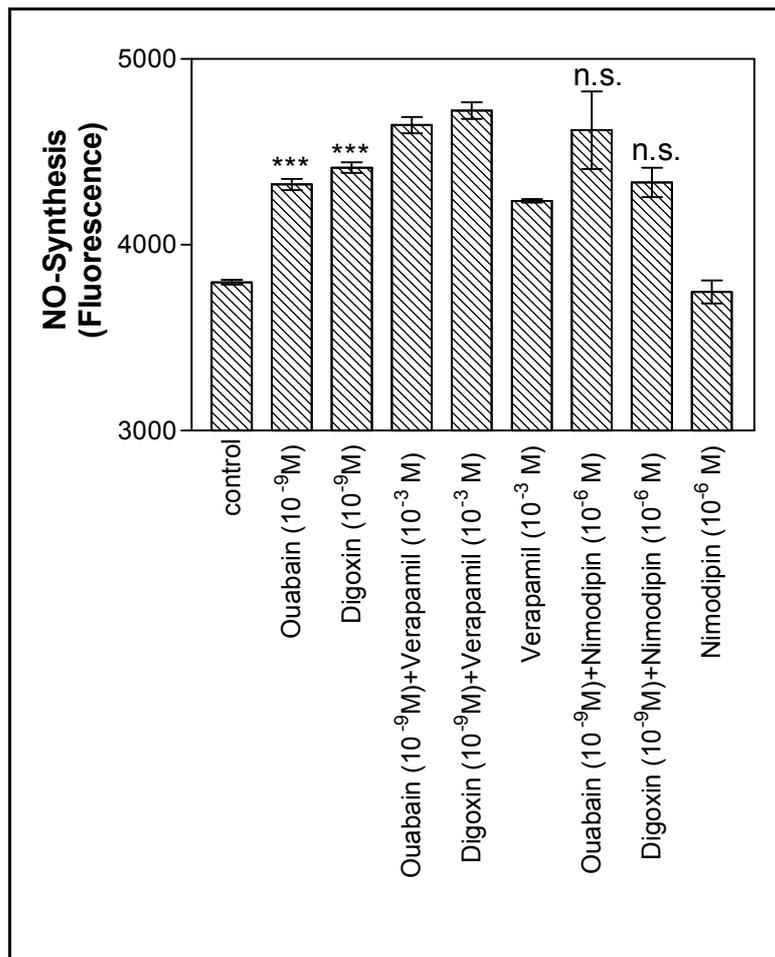


Abbildung 38

Die Ca²⁺-Kanal-Blocker Verapamil und Nimodipin zeigen keinen hemmenden Einfluss auf die NO-Freisetzung durch Ouabain und Digoxin

Verapamil zeigt einen steigernden Effekt (zweiseitiger t-Test: Verapamil gegen Kontrolle ***p<0,001, Ouabain gegen Ouabain + Verapamil und Digoxin gegen Digoxin + Verapamil ***p<0,001; 1 nM Ouabain und 1 nM Digoxin gegen Kontrolle: ***p<0,001; Ouabain gegen Ouabain + Nimodipin und Digoxin gegen Digoxin + Nimodipin = nicht signifikant); n=4, Mittelwerte ± SEM

Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung des intrazellären Ca²⁺ in Endothelzellen aufgrund der Erkennung von Herzglykosiden durch die Natrium-Pumpe besteht darin, dass der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in seiner Aktivität beeinflusst wird und so extrazelluläres Ca²⁺ in die Zellen gelangt (Abbildung 39). Dieser Weg wird insbesondere von der Arbeitsgruppe von Blaustein für die Herzmuskelzellen als Weg zur Steigerung der Herzmuskelkraft diskutiert, wird aber auch für die Gehirnzellen angenommen [25,27]. Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher beeinflusst auch L-Typ Ca²⁺-Kanäle in seiner Wirkung [140]. Das Austauscher-Protein kann durch Phosphorylierung über PKC, PKA bzw. Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase in seiner Aktivität moduliert werden [23]. Da auch nicht

auszuschließen ist, dass dieser Austauscher über Protein-Protein-Interaktion mit der Natrium-Pumpe unter dem Einfluss von nicht-hemmenden Herzglykosidkonzentrationen den Antiporter für beide Kationen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ in einen Ca^{2+} Kanal umwandelt [23], haben wir auch die Wirkung von Hemmstoffen des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers auf die NO-Synthese überprüft.

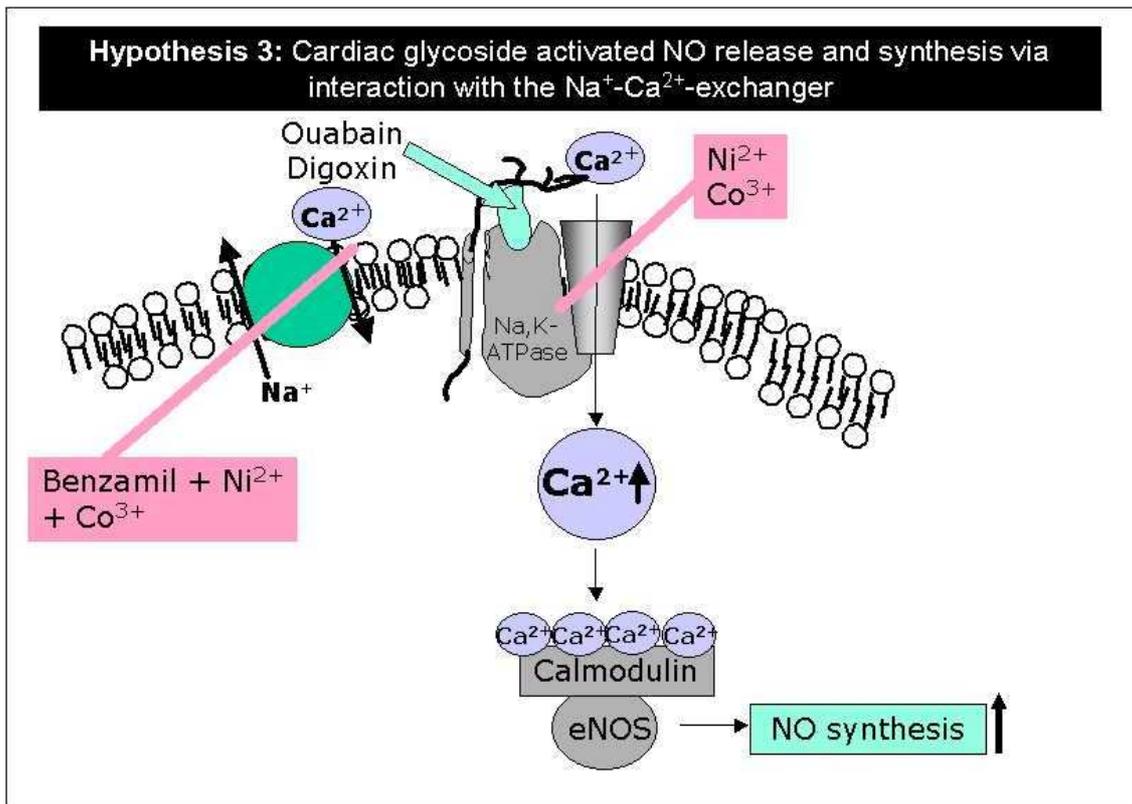


Abbildung 39 Aktivierung der eNOS über die Interaktion der Natrium-Pumpe mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, Annahme der Bildung von Ca^{2+} -Kanälen im Austauscher bei Ouabain-Konzentrationen, die nicht die Natrium-Pumpe hemmen

Als Hemmstoffe des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers sind Benzamil, Ni^{2+} und Co^{3+} bekannt [141]. Wenn ihre Wirkung auf die Ouabain-induzierte NO-Synthese gemessen wurde, fand sich ebenfalls keine Hemmung der Synthese sondern eine weitere Stimulierung (Abbildung 40).

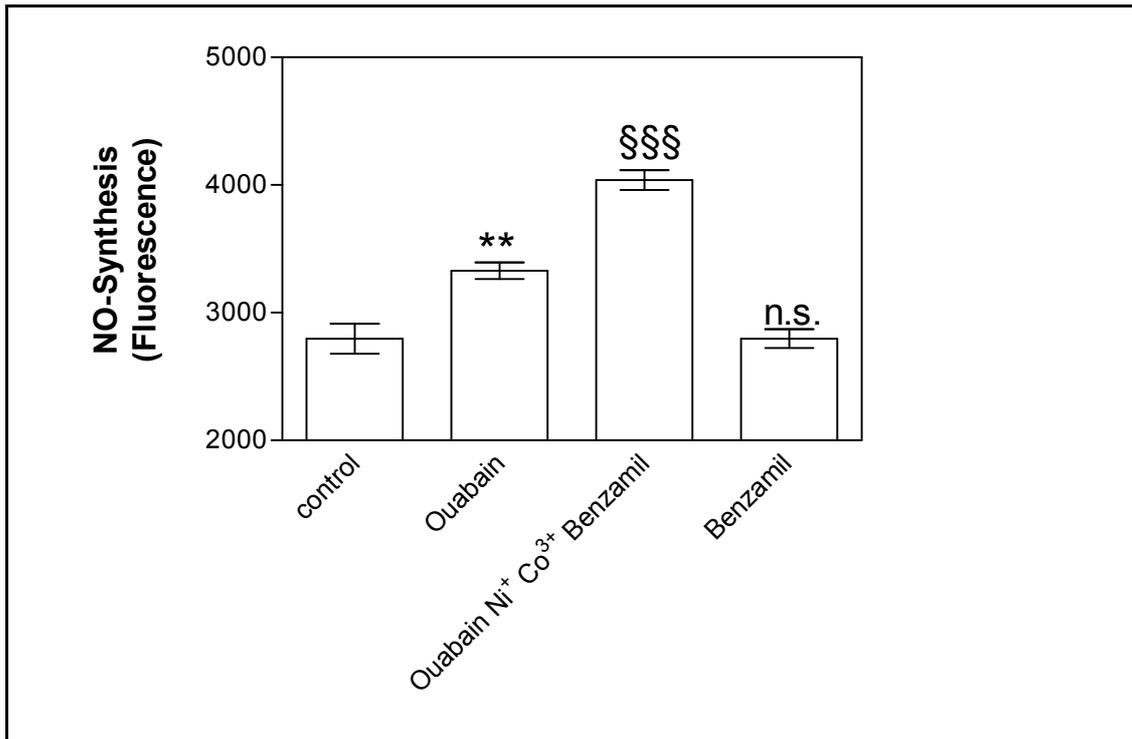


Abbildung 40 Die Hemmung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers mit 1 mM NiCl₂, 1 mM CoCl₃ und 0,1 mM Benzamil stimuliert die Ouabain-aktivierte NO-Synthese in HUAEC weiter
 Ouabain-Konzentration 10⁻⁹ M (n=4, Mittelwerte ± SEM)
 One-way-ANOVA-Test: **p<0.01 Ouabain gegen Kontrolle und §§§p<0.001 Ouabain gegen Ouabain+NiCl₂+CoCl₃+Benzamil.

Diese Beobachtung spricht nicht dafür, dass extrazelluläres Ca²⁺ unter dem Einfluss von Herzglykosiden über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in die Endothelzelle einströmt.

3.2.7.5 Studium möglicher intrazellulärer Wege zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration als möglicher Grund für eine erhöhte NO-Freisetzung unter Digoxin- und Ouabaineinfluss

Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration kann durch Hormon-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern erhöht werden. Wenn Ouabain wie ein Hormon wirkt, das über seine Bindung an die Na⁺/K⁺-ATPase intrazelluläre Prozesse anstößt, dann könnte es, eventuell mit intermediärer Unterstützung eines G-Proteins, die Phospholipase C aktivieren. Unter Einwirkung der Phospholipase C könnte Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) entstehen, welches Ca²⁺-Kanäle in der Membran des endoplasmatischen Reticulums öffnet und

somit auch für einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle sorgt (Abbildung 41). Für den Herzmuskel war gezeigt worden, dass 2-Nitro-4-carboxyphenyl-N,N-diphenylcarbamate (NCDC), ein Hemmstoff der Phospholipase C, den inotropen Effekt des Ouabains auf den Papillarmuskel unterbindet [133].

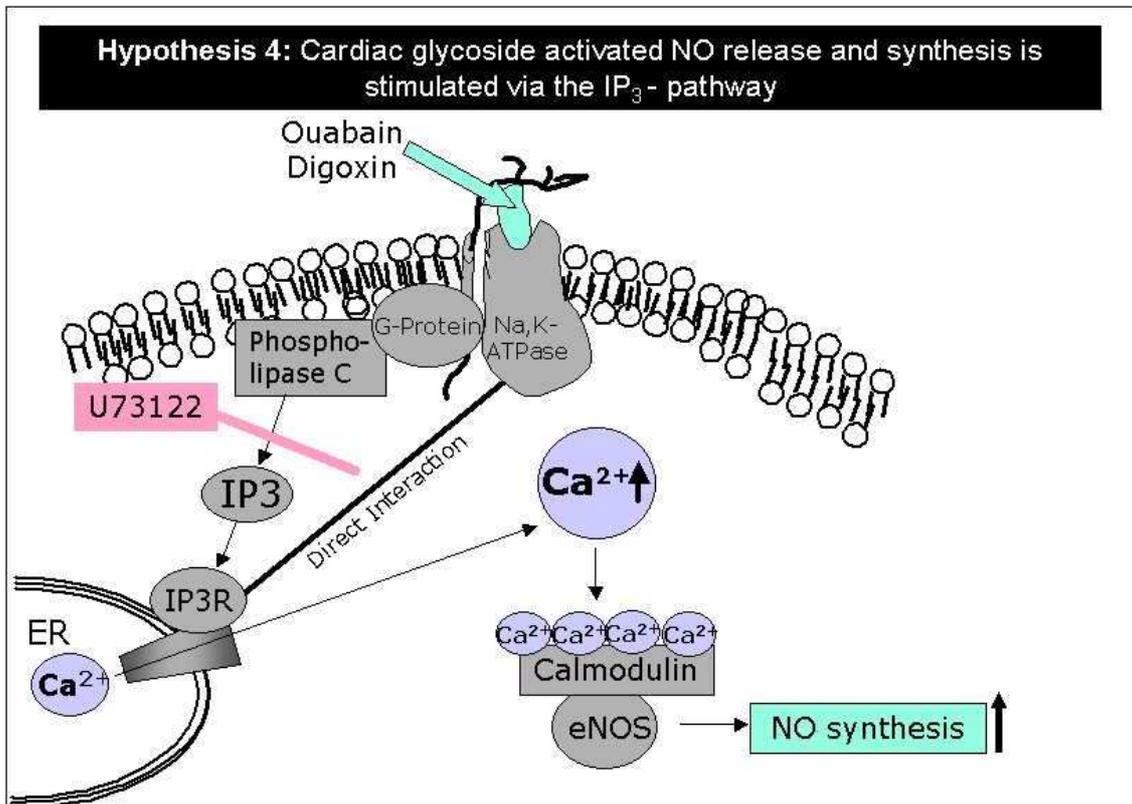


Abbildung 41 Aktivierung der eNOS über die Aktivierung des IP_3 -Weges (eNOS=endotheliale NO-Synthase, IP_3 = Inositoltriphosphat, IP_3R =Inositoltriphosphat-Rezeptor)

Um eine Beteiligung der Phospholipase C an der Signaltransduktion zu überprüfen, wurde die Wirkung des Phospholipase-C-Hemmstoffs U 73122 auf die Herzglykosid-stimulierte NO-Freisetzung gemessen [142]. Es zeigte sich, dass in die Ouabain- und Digoxin-induzierte Aktivierung der eNOS die Phospholipase C nicht eingeschaltet ist (Abbildung 42).

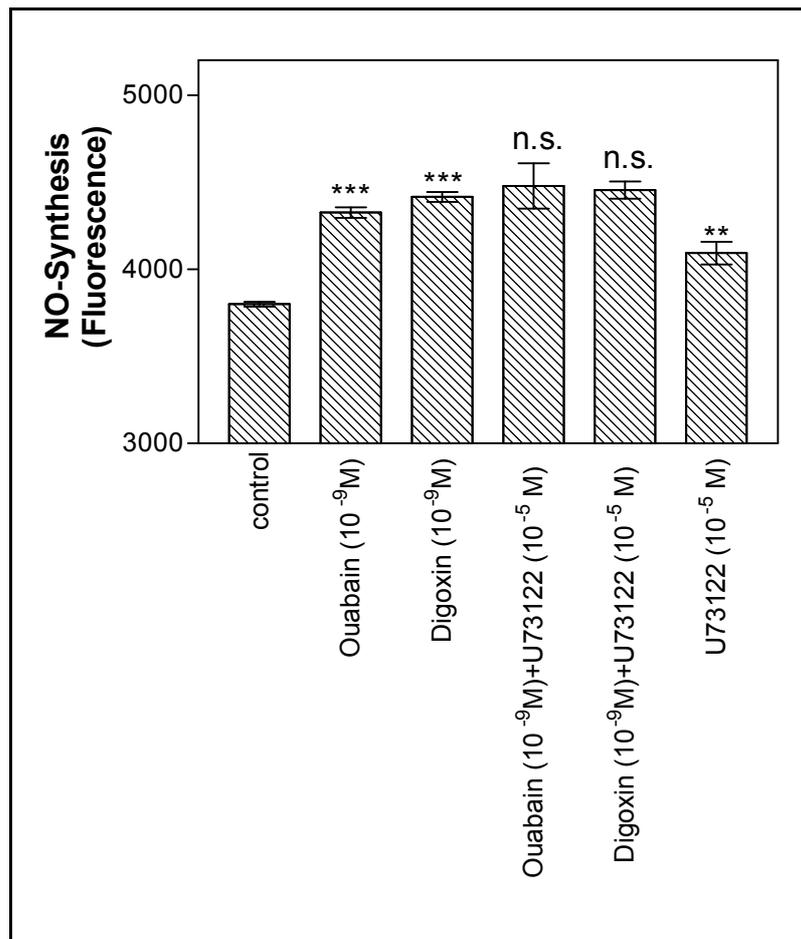


Abbildung 42

Der Phospholipase C-Hemmstoff U73122 zeigt keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivierung durch Ouabain und Digoxin
 n=4, Mittelwerte \pm SEM
 (one-way ANOVA-Test: Ouabain und Digoxin gegen Kontrolle
 ***p<0,001; U73122 gegen Kontrolle **p<0,01; Ouabain gegen
 Ouabain+U73122 und Digoxin gegen Digoxin+ U73122 nicht
 signifikant)

Es besteht aber weiterhin die Möglichkeit, dass der von der Arbeitsgruppe Aperia gefundene Weg einer direkten Interaktion der Natrium-Pumpe mit dem IP₃-Rezeptor des Ca²⁺-Kanals im endoplasmatischen Reticulum zu einer Erhöhung des intrazellären Ca²⁺ führt.

3.2.7.6 Sind G-Proteine, cAMP oder cGMP an der herglykosidbedingten Aktivierung der NO-Freisetzung aus HUAEC beteiligt?

Es ist berichtet worden, dass die eNOS-Phosphorylierung auch über Proteinkinase A erfolgen kann und dass G-Proteine in diesem Prozess

eingeschaltet sind [143]. Es wurde daher der Einfluss von Pertussis-Toxin als Hemmstoff der inhibitorischen G-Proteine im Bereich von 200 bis 400 ng auf die NO-Bildung durch HUAEC gemessen. Nach 4-stündiger Inkubation mit dem Pertussis-Toxin konnte Veränderung der durch 10^{-9} M Ouabain- und Digoxin-bedingten Stimulierung der NO-Synthese festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). An dem Prozess der Aktivierung scheint somit kein G_i -Protein beteiligt zu sein.

Es wurde berichtet, dass cAMP die NO-Produktion in menschlichen Neuroblastomzellen stimuliert [144]. Es stimuliert auch die Endothelin-Freisetzung aus glatten Muskelzellen [145]. In pulmonalen Endothelzellen wurde eine inverse Korrelationen zwischen Endothelin-1-Freisetzung und cGMP gefunden [146]. Wenn die intrazellulären Spiegel von cAMP und cGMP mit einem kompetitiven ELISA gemessen wurden, wurden keine herzoglykosidbedingten Veränderungen der Konzentrationen dieser intrazellulären second messenger gefunden. Sie lagen im Bereich von 0,2–0,3 nM für cAMP und 0,25–0,5 nM für cGMP (nicht gezeigt). Es ist somit auch unwahrscheinlich, dass die Herzglykosid-bedingte Stimulierung der NO-Synthese oder der Endothelin-1-Sekretion in HUAEC über diese "second messenger" erfolgt.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, warum sich die Herzglykoside Ouabain und Digoxin in nanomolaren Konzentrationen in ihrer Wirkung auf den Blutdruck unterscheiden. Ouabain steigert bei längerer Einwirkung den Blutdruck, während Digoxin dies nicht tut und sogar in der Lage ist, den Ouabain-induzierten Bluthochdruck zu senken [50].

Beide Substanzen sind Herzglykoside, binden an den Herzglykosid-Rezeptor der Natrium-Pumpe [147] und hemmen diese in höheren Konzentrationen. Da sie sich in ihrer Wirkung auf den Blutdruck dennoch unterscheiden, lag die Vermutung nahe, dass sie auf Zellen, die an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind, unterschiedliche Wirkungen ausüben und/oder von diesen als unterschiedlich erkannt werden.

Da hydrophobe Steroide im Blut oftmals an Bindungsproteine gebunden transportiert werden, bestand die Möglichkeit, dass das hydrophobe Digoxin durch seine Bindung an ein solches Protein auf einem anderen Weg an die Zielzellen gelangt als das hydrophile Ouabain.

Solche Bindungsproteine für Herzglykoside waren bereits beschrieben worden [73,127,148]. Es war daher ein Ziel dieser Arbeit, die Natur dieser Proteine aufzuklären und ihren Bildungsort zu ermitteln.

Da aber auch nicht auszuschließen war, dass hydrophobe und hydrophile Herzglykoside unterschiedliche intrazelluläre Signale durch Bindung an den Herzglykosid-Rezeptor-Teil der Natrium-Pumpe erzeugen, sollte auch diese Annahme überprüft werden.

Weil Endothelin-1 und NO als Hormone der Endothelzellen der Gefäße an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt sind, bot es sich an, die Wirkung verschiedener Herzglykoside auf die Freisetzung dieser beiden Hormone an Endothelzellen in Kultur zu überprüfen.

4.1 STUDIEN ZUR NATUR UND ZUM ORT DER BIOSYNTHESE EINES MÖGLICHEN BINDUNGSPROTEINS FÜR HERZGLYKOSIDE IM BLUTPLASMA

Das Protein, das sich mit dem proteinreaktiven Digoxigenin-Derivat HDMA markieren ließ [73] und dessen Molekulargewicht von 90 kDa Holger Kost in

seiner Promotionsarbeit ermittelt hatte [74], scheint nach allen vorliegenden Evidenzen kein spezifisches Bindungsprotein für Herzglykoside zu sein. Die Bestimmung der Gewebeverteilung des "cardiac glycoside binding globuline" (CGBG) in Rinderorganen mit einem affinitätsgereinigten Antikörper zeigte, dass die höchste Konzentration des Proteins mit $1,560 \pm 0,059$ mg/ml im Blut gefunden wird (Tabelle 3). Dies ist eine ungewöhnlich hohe Konzentration für ein Hormon-Bindungsprotein, dessen Hormon im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-8} Mol/l wirkt. Die Organe mit den höchsten Gewebe-Konzentrationen an CGBG waren Milz und Nebennierenrinde (Abbildung 20). Da die μ -Kette des IgM in den Rinderorganen eine ähnliche Gewebeverteilung hat (Abbildung 18) und der affinitätsgereinigte Antikörper gegen CGBG die μ -Kette des IgM mit hoher Affinität erkannte (Abbildung 21) und darüber hinaus auch ein käuflicher Antikörper gegen die μ -Kette des IgM gereinigtes CGBG mit gleicher Affinität erkannte wie die authentische μ -Kette des IgM (Abbildung 22), muss es sich bei dem früher als Herzglykosid-Bindungsprotein angesprochenen Protein um die μ -Kette des IgM handeln. Zu gleichen Schlußfolgerungen gelangte auch Thomas Schweitzer beim Screening einer lambda-cDNA-Bank aus der Rinderleber mit dem affinitätsgereinigten CGBG-Antikörper. Die von ihm erhaltene Basensequenz von 1992 Nucleotiden erwies sich beim BLAST-Sequenz-Vergleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) als identisch mit der sekretorischen μ -Kette des IgM vom Allotyp d [39]. IgM enthält hydrophobe Bereiche, an die sich relativ unspezifisch hydrophobe Moleküle wie Steroide anlagern können [149].

Auch andere Arbeitsgruppen, die nach einem Herzglykosid-Bindungsprotein im Blut suchten, haben bei ihren Bemühungen Derivate von Immunglobulinen isoliert. Komiyama et al. isolierten aus menschlichem Blut das carboxyterminale Fragment der schweren Kette des IgG [127]. Parhami-Seren et al. isolierten ebenfalls ein Immunglobulin. Sie vermuten, dass dieses Protein, welches Ouabain mit höherer Affinität als Digoxin bindet, eine Untergruppe des IgG ist [148]. Da Herzglykoside ebenfalls unspezifisch und mit schlechter Affinität an Serumalbumin binden [70], scheint diese Klasse von Steroiden an hydrophobe Bindungstaschen vieler Serumproteine zu binden.

4.2 UNTERSCHIEDEN SICH DIE HERZGLYKOSIDE OUABAIN UND DIGOXIN IN IHRER WIRKUNG AUF DIE NATRIUM-PUMPE, ENDOTHELIN-1-FREISETZUNG UND DIE NO-FREISETZUNG IN HUMANEN ENDOTHELZELLEN?

Diese Frage ist hinsichtlich der Freisetzung von Endothelin-1 aus HUAEC und der Aktivität der Natrium-Pumpe klar mit "Ja" zu beantworten. Ouabain, aber nicht Digoxin stimulierte in nanomalen Konzentrationen innerhalb von 30 min die Freisetzung von Endothelin-1 (Abbildung 28). Rasch stimulierte ebenfalls Ouabain, nicht aber Digoxin, Ouabagenin und Dihydro-Ouabain, in nanomolaren Konzentrationen die Aktivität der Natrium-Pumpe dieser Zellen (Abbildung 23).

Die beiden Herzglykoside Ouabain und Digoxin unterschieden sich jedoch nicht in ihrer stimulierenden Wirkung auf die NO-Bildung (Abbildung 29). Leider konnte die Stimulierung der NO-Bildung und -Freisetzung durch die beiden Herzglykoside (Abbildung 29) erst nach 4-stündiger Exposition der HUAEC sicher gemessen werden. Einige Versuche zeigten eine stärkere Wirkung des Digoxins auf die Freisetzung des die Arteriolen relaxierenden NO insbesondere bei toxischen Herzglykosid-Konzentrationen (Abbildung 33, Abbildung 29). Es besteht die Möglichkeit, dass die bei kürzerer Inkubationszeit eventuell vorhandenen Unterschiede zwischen Ouabain und Digoxin durch die lange Inkubationszeit verwischt wurden. Eine durch Ouabain verstärkte NO-Freisetzung nach einer Grundstimulation durch Interleukin-1 β [80,81] und Bradykinin in Endothelzellen ist bereits früher beschrieben worden [82].

Mithilfe der in dieser Arbeit verwendeten Diaminofluoresceinmethode [123] war sowohl der Nachweis der Stimulierung der NO-Freisetzung durch Ouabain und Digoxin ohne vorherige Grundstimulation wie auch die Untersuchung der Mechanismen, die ausgehend vom Andocken der Herzglykoside an die Natrium-Pumpe zur Stimulierung der NO-Freisetzung führen, möglich.

Da nur unter Ouabain-Einfluss eine Stimulierung des die Blutgefäße kontrahierenden Endothelin-1 zu sehen war, könnte in der erhöhten Sekretion und Expression dieses Proteohormons [83] eine der Ursache für die Induktion arterieller Hypertonie durch Ouabain bei langzeitiger Exposition liegen [50,130]. Doch um dies sicher feststellen zu können, wird abzusichern sein, dass ausschließlich Ouabain nicht aber Digoxin zur Expressionssteigerung der

Endothelin-1-mRNA führt [83]. Vorläufige Befunde mit der PCR scheinen dafür zu sprechen. Sie müssen mit der verlässlicheren Real-time PCR-Methode wiederholt werden.

Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Herzglykosid-Wirkung auf die Natrium-Pumpe der HUAEC (Abbildung 23), die Endothelin-1- (Abbildung 28) und NO-Freisetzung (Abbildung 29) wird deutlich, dass die Wirkung der Herzglykoside bei Konzentrationen erfolgt, die die Natrium-Pumpe nicht hemmen. Damit wird zugleich deutlich, dass die in den Lehrbüchern stehende Annahme, Herzglykoside wirkten über eine Hemmung der Natrium-Pumpe, für die HUAEC nicht zutreffen kann. Blaustein modifiziert neuerdings seine Hypothese: In der Herzmuskulatur und in Nervenzellen sei eine lokale Hemmung der Herzglykosid-sensitiveren α_2 , α_3 -Isoformen der Natrium-Pumpe vorhanden. Diese beiden Isoformen finden sich in der Mikrodomäne der Plasmamembran über dem endoplasmatischen Reticulum (PlasmERosom). Die Natrium-Pumpen-Hemmung führe über einen nicht nachzuweisenden Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration zu einem Ca^{2+} -Influx durch Umkehr der Flux-Richtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und damit zum Auslösen einer Ca^{2+} -stimulierten Signalkette [25,150,151]. Da sich nur in der Herzglykosid-insensitiven Ratte die Isoformen der Natrium-Pumpe in ihrer Herzglykosid-Empfindlichkeit unterscheiden, die Isoformen der Natrium-Pumpe im Menschen jedoch keine Unterschiede in ihrer Affinität für Herzglykoside aufweisen, muss es zumindest im Menschen noch andere Mechanismen geben, über die es zur kontraktionssteigernden Wirkung der Herzglykoside kommt. Die Arbeitsgruppen von Xie und Askari haben kürzlich zeigen können, dass die Natrium-Pumpe in der Caveolin-Domäne als Ausgangspunkt für eine bisher nicht im Detail aufgeklärte Signalkaskade anzusehen ist, die auch zur Freisetzung und zum Oszillieren von intrazellulärem Ca^{2+} führt [109-111]. Humane Endothelzellen enthalten die nur bei Ratten herzglykosidinsensitive α_1 -Isoform der Na^+/K^+ -ATPase [83]. Folglich müssen die bei nanomolaren Ouabain-Konzentrationen sichtbaren stimulierenden Wirkungen auf die Natrium-Pumpe (Abbildung 23), Endothelin-1-Freisetzung (Abbildung 28) und NO-Synthese (Abbildung 29) über den Ouabain-Rezeptor dieses ubiquitär in allen Zellen vorhandenen α_1 -Isoenzym arbeiten.

Die für die Endothelzellen und viele weitere Zellen beschriebene Aktivierung der Zellproliferation [83,103,104] konnte weder mit humanen arteriellen Endothelzellen noch mit glatten Muskelzellen gefunden werden (Abbildung 24, Abbildung 25). Die bei toxischen Herzglykosid-Konzentrationen sichtbare Wachstumshemmung muss auf eine Hemmung der Zellvermehrung auf DNA-Ebene zurückzuführen sein. Sie ist nicht auf eine Änderung der Zelladhäsion (Abbildung 27) noch auf eine Stimulierung der Apoptose zurückzuführen (Abbildung 26). Es wurde mehrfach berichtet, dass Herzglykoside die Apoptose verhindern [152].

4.3 WIE WIRD DIE NO-FREISETZUNG IN HUMANEN ENDOTHELZELLEN STIMULIERT?

Die Untersuchung des intrazellulären Signalkaskade-Wegs in HUAEC zeigte, dass die herzglykosidbedingte Aktivierung der NO-Freisetzung nicht über eine Aktivierung einer Tyrosinkinase der src-Familie erfolgen kann, da die Hemmstoffe PP1 und PP2 dieses Enzyms [137,153] ohne Effekt auf die NO-Synthese sind (Abbildung 36). Auch inhibitorische G-Proteine scheinen nicht an der durch Ouabain stimulierten Signaltransduktion beteiligt zu sein, ebensowenig wie cAMP oder cGMP. Die Aktivierung der NO-Freisetzung und Synthese scheint auch nicht über eine IP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu erfolgen, da der Phospholipase C-Hemmstoff U73122 ohne Wirkung auf diesen Prozess ist (Abbildung 42). Da auch die PIP₃-Kinase durch Wortmannin in herzglykosidstimulierten HUAEC nicht zu hemmen war (Abbildung 34), scheint dieser Signalweg, der zur Aktivierung der akt/PKB- und eNOS-Phosphorylierung (Abbildung 31, Abbildung 32) führen kann [95-98], nicht zur Stimulierung der NO-Freisetzung (Abbildung 29) zu führen. Ly294002, das ebenfalls ein Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-kinase ist [96], hemmt auch andere Wege, die zur Aktivierung der eNOS führen können [95]. Somit ist die in Abbildung 33 beobachtete Hemmung der Ouabain- und Digoxin-stimulierten NO-Freisetzung durch Ly294002 kein Beweis für eine Reaktion über den PIP₃-Weg.

Die Aktivierung von eNOS durch seine Phosphorylierung an Ser1177 [154,155] muss nicht durch die akt/PKB-Phosphorylierung über den PIP₃-Weg erfolgen, sie kann auch bei Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch eine Ca²⁺-Calmodulin-aktivierte Phosphorylierung beider Enzyme geschehen [156,157]. Für eine wesentliche Rolle des intrazellulären Ca²⁺ bei der Ouabain-induzierten Signaltransduktion sprechen nicht nur die früheren Beobachtungen des Entstehens von Ca²⁺-Spikes bei Exposition von HUAEC mit nanomolaren Ouabain-Konzentrationen [83], sondern auch weitere Erkenntnisse. Eine Blockade des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers durch die Kombination Benzamil, Ni²⁺, Co³⁺ sowie der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle der Plasmamembran durch Verapamil führen zu einer Erhöhung der NO-Synthese (Abbildung 38, Abbildung 40) und nicht zu ihrer Hemmung, was aus der Blaustein-Hypothese zu erwarten wäre [25,150,151]. Es ist auch schon früher berichtet worden, dass Hemmstoffe spannungsabhängiger L-Typ-Ca²⁺-Kanäle die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Endothelzellen steigern [158,159]. Dabei bleibt festzuhalten, dass Verapamil auch den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher hemmen kann [160]. Dong et al. wollen jedoch eine Blockade der durch Bradykinin und Ouabain stimulierten NO-Freisetzung aus Endothelzellen von Ratten-Aorten gesehen haben [82]. Wenn auch ein Ouabain-bedingter Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ nicht durch Umkehr des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers und Eröffnung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen zustande zu kommen scheint, sind weitere Möglichkeiten offen.

Möglich ist die von der Arbeitsgruppe von Anita Aperia für Nierentubulus-Epithelien nachgewiesene Kontaktaktivierung der Natrium-Pumpe durch direkten Kontakt mit dem IP₃-abhängigen Ca²⁺-Kanal. Da eine Hemmung des als Ca²⁺-Pumpe wirkenden Na⁺/Ca²⁺-Austauschers zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ führt, ist eine Stimulierung der NO-Synthese bei einer Hemmung dieser Proteine gut zu erklären (Abbildung 40). Infolge der Öffnung des IP₃-abhängigen Ca²⁺-Kanals könnte extrazelluläres Ca²⁺ über eine Öffnung der sogenannten Store-Operated Ca²⁺-Channels (SOC) in die Endothelzelle einströmen. Dafür spricht, dass Ly294002, das SOCs blockieren kann [95], die Ouabain-bedingte NO-Synthese hemmt (Abbildung 33).

Es ist somit wahrscheinlich, dass die Erkennung des Ouabain durch die Natrium-Pumpe über Protein-Protein-Interaktionen zu einer Eröffnung der IP₃-

abhängigen Ca^{2+} -Kanäle des endoplasmatischen Reticulums führt. In der Folge werden SOC eröffnet. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der der aktive $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher entgegenwirkt, führt neben der Verdrängung des Caveolins vom eNOS-Molekül zu einer Phosphorylierung von akt/PKB (Abbildung 32) und eNOS (Abbildung 31) über Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinasen und damit zu einer vermehrten NO-Freisetzung (Abbildung 29). Sollte diese Annahme richtig sein (Abbildung 43), dann müssten Hemmstoffe der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinasen wie P283-302, KN-93, W7 oder Lavendustin [156,157] oder eine Chelierung des intrazellulären Ca^{2+} mit BAPTA-AM [157] zu einer Hemmung der akt/PKB-Phosphorylierung und der eNOS-Phosphorylierung sowie der Ouabain-stimulierten NO-Synthese führen.

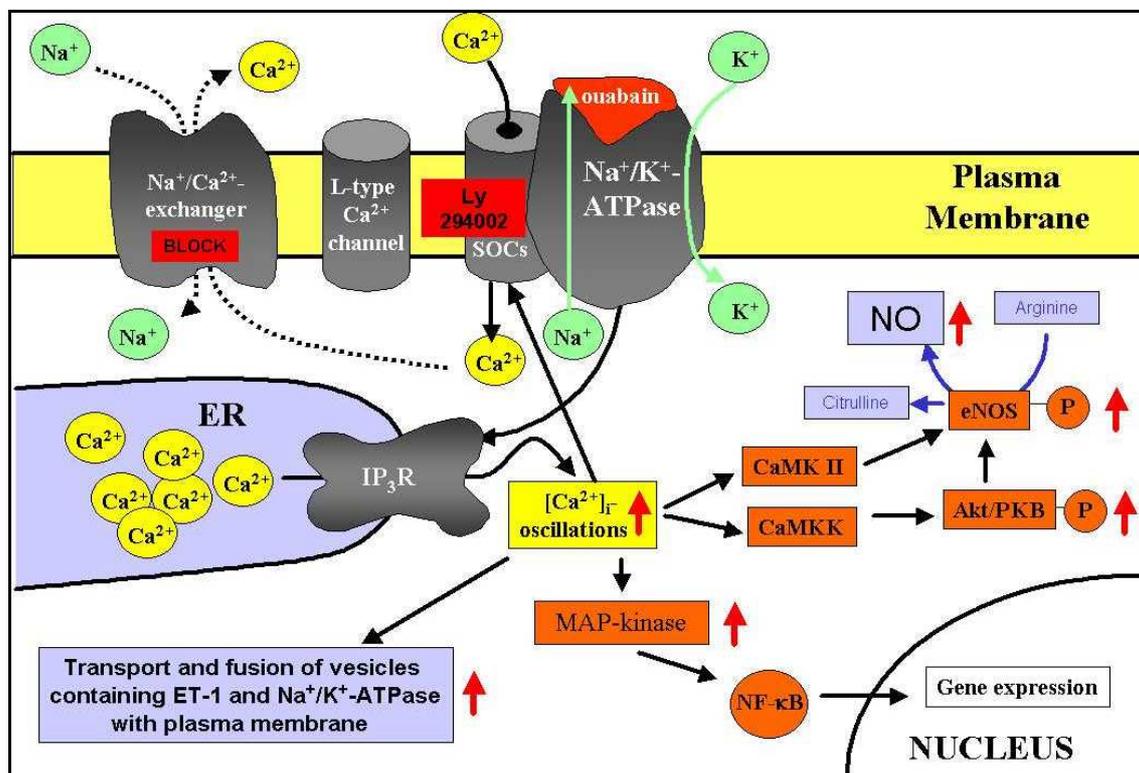


Abbildung 43

Modell des Signalweges der Ouabain-modulierten Aktivierung der Natrium-Pumpe, Endothelin-1-Freisetzung und NO-Abgabe in HUAEC

Das Modell schließt die Daten von Saunders und Scheiner-Bobis [83] mit ein und enthält die Interpretation der Daten in Abbildung 23, Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 31, Abbildung 33 und Abbildung 40.

IP₃R=Inositoltriphosphat-Rezeptor, CaMK II= Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, CaMKK= Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase, ER=endoplasmatisches Reticulum, MAP-Kinase=Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ET-1=Endothelin-1

4.4 WIE KOMMT ES ZU DER UNTERSCHIEDLICHEN WIRKUNG VON OUABAIN UND DIGOXIN AUF DIE AKTIVIERUNG DER NATRIUM-PUMPE, ENDOTHELIN-FREISETZUNG UND DEM FEHLEN SOLCHER UNTERSCHIEDE AUF DIE NO-FREISETZUNG?

Diese Frage ist derzeit noch nicht zu beantworten. Jedoch ist evident, dass Ouabain und Digoxin mit unterschiedlichen Affinitäten an die Natrium-Pumpe im HUAEC binden (Abbildung 23). Solche Affinitätsunterschiede wurden auch für die isolierte Na^+/K^+ -ATPase beschrieben [147]. Ouabain-Bindung führt in HUAEC zum Auftreten von Ca^{2+} -Spikes [83], wobei die Frequenz der Ca^{2+} -Oscillationen von der Konzentration der Herzglykosids und vermutlich von der Natur des cardiotonen Steroids bestimmt wird [110]. Eine konstante Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird bei toxischen Herzglykosid-Konzentrationen gefunden [110]. Frequenz-Unterschiede in der Ca^{2+} -Oscillation mögen zu Unterschieden in der Fusionsgeschwindigkeit von intrazellulären Speichervesikeln mit Endothelin-1 oder verborgenen Natriumpumpen mit der Plasmamembran führen und so eine unterschiedliche Aktivierung der Natrium-Pumpe und der Endothelinfreisetzung erzeugen, die bei kürzeren Inkubationszeiten von ca. 30 min sichtbar wird (Abbildung 23, Abbildung 28). Eventuell existierende Unterschiede solcher Oscillationen könnten dann verschwinden, wenn die Expositionszeiten der Endothelzellen mit Herzglykosiden aus meßtechnischen Gründen 4 Stunden betragen. Sie sind dann evtl. nur noch bei Extrembedingungen beobachtbar (Abbildung 29).

Es wird somit weiterer Experimente bedürfen, um diese Frage beantworten zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung des hydrophoben Digoxin im therapeutisch wichtigen nanomolaren Konzentrationsbereich an den Herzglykosid-Rezeptor der Na^+/K^+ -ATPase führt zu keiner Hemmung der Natrium-Pumpe aber zu einer Stärkung der Herzmuskelkontraktion. Auch langjährige Medikation mit Digoxin verändert den Blutdruck nicht. Wenn jedoch Ratten mit nanomolaren Konzentrationen des kürzlich als Nebennierenrinden-Hormon detektierten wasserlöslichen Ouabain (g-Strophanthin) behandelt werden, entwickeln sie einen arteriellen Hochdruck, der durch Digoxin-Therapie aufgehoben werden kann [50]. Es erhebt sich daher die Frage, wieso das "Stress-Hormon" Ouabain einen Bluthochdruck induzieren kann, nicht aber Digoxin, welches ebenfalls von der Nebenniere synthetisiert wird.

Als möglicher Grund für die Wirkungsunterschiede bot sich die unterschiedliche Hydrophobizität beider Moleküle an. Diese könnte Auswirkungen auf den Transport im Blut haben. Es war auch denkbar, dass Affinitätsunterschiede in der Erkennung von Ouabain und Digoxin durch die Natrium-Pumpe intrazelluläre Signalketten in unterschiedlichem Maße aktivieren. Daher wurde in dieser Arbeit versucht

- a. ein früher detektiertes Serumbindungsprotein für Herzglykoside [73] zu charakterisieren und zu identifizieren;
- b. an menschlichen arteriellen Endothelzellen aus der Nabelschnur in Kultur zu erfahren, ob Ouabain und Digoxin unterschiedlich auf die Freisetzung des gefäßkontrahierenden Proteohormons Endothelin-1 bzw. des gefäßrelaxierenden Hormons NO wirken, und Vorstellungen über die Wirkungsweise zu erarbeiten.

Die Untersuchungen ergaben:

1. Bei dem früher im Rinderserum entdeckten Bindungsprotein für Herzglykoside handelt es sich um die μ -Kette des IgM. Dies konnte mittels ELISA mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen das Protein, durch die Kreuzreaktivität mit authentischem Rinder-IgM und durch die Gewebeverteilung des Proteins sicher gestellt werden. Das hydrophobe

- Digoxin bindet wahrscheinlich unspezifisch an hydrophobe Oberflächenbereiche von Proteinen.
2. Ouabain, nicht aber Digoxin, stimuliert in nanomolaren Konzentrationen sowohl die Freisetzung von Endothelin-1 aus menschlichen arteriellen Endothelzellen der Nabelschnur (HUAEC) in Kultur als auch die Aktivität der Natrium-Pumpe. Beide Herzglykoside stimulieren im nanomolaren Konzentrationsbereich die NO-Freisetzung. Die halb-maximale Hemmung der Natrium-Pumpe durch Ouabain erfolgt bei $IC_{50} = 2 \times 10^{-7}$ M, also in weit höheren Konzentrationen.
 3. Die herzoglykosidbedingte Stimulierung der NO-Freisetzung wird nicht durch Hemmstoffe der src-Kinase (PP1, PP2), der Phospholipase C (U73122), von G_i-Proteinen (Pertussis-Toxin) oder der Phosphatidylinositol-3-kinase (Wortmannin) beeinflusst. Es finden keine Änderungen der zellulären cAMP und cGMP Konzentrationen statt.
 4. Ouabain und Digoxin erzeugen in HUAEC eine erhöhte Phosphorylierung von eNOS und akt/PKB.
 5. Die herzoglykosidbedingte NO-Synthese wird aktiviert durch Hemmung der spannungsabhängigen L-Typ-Ca²⁺-Kanäle mit Verapamil und durch Hemmung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers durch Benzamil, Ni²⁺ und Co³⁺. Sie wird gehemmt durch die Blockade von "Store-operated Ca²⁺-Kanälen" (SOC) mit Ly 294002.

Aus den Untersuchungen wird geschlossen:

Herzoglykoside induzieren in nanomolaren Konzentrationen über eine direkte Interaktion der Natrium-Pumpe mit dem IP₃-Rezeptor-Ca²⁺-Kanal des endoplasmatischen Reticulums eine Öffnung desselben und somit einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. In der Folge wird durch die Eröffnung von SOC die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration weiter erhöht. Sie wird durch Hemmung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers, der durch Kopplung an die Na⁺/K⁺-ATPase wie eine Ca²⁺-Pumpe wirkt, erhöht. Die Stimulierung der Phosphorylierung von akt/PKB und eNOS erfolgt vermutlich über Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase. Dies führt zu einer vermehrten NO-Synthese und Freisetzung. Es wird vermutet, dass ein Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ auch zu einer Stimulierung der Endothelin-Freisetzung und

zur vermehrten Integration von Vesikeln mit latenten Natriumpumpen in die Plasmamembran führt. Diese Prozesse scheinen sich in ihrer Ca^{2+} -Sensitivität zu unterscheiden.

Die Unterschiede in der Herzglykosid-Spezifität von HUAEC in der Sekretion des gefäßkontrahierenden Endothelin-1 und des gefäßrelaxierenden NO könnten erklären, warum konstant erhöhte Ouabain-Blutspiegel einen arteriellen Bluthochdruck erzeugen können, nicht aber erhöhte Digoxin-Blutspiegel.

6 SUMMARY

Binding of the hydrophobic cardiac glycoside digoxin in therapeutically relevant nanomolar concentrations to Na^+/K^+ -ATPase does not lead to an inhibition of the sodium pump, but increases muscular contractility of the heart. Medication with digoxin even for many years does not change blood pressure. If, however, rats are treated with nanomolar concentrations of the water soluble cardiac glycoside ouabain, which was recently described to be a hormone synthesized by the adrenal gland, this treatment leads to hypertension. Hypertension induced by Ouabain can be lowered by digoxin therapy [50].

These different findings lead to the question, why the stress hormone ouabain may induce hypertension, whereas digoxin, which is likewise synthesized by the adrenal gland, does not.

As a possible reason for these effects, the different hydrophobicities of both molecules must be considered. These could have effects on the transport mechanisms in blood. It is also conceivable that differences in the sodium pump affinity of ouabain and digoxin lead to different intracellular signaling pathways.

The aim of this work was

1. to characterize and identify a binding protein for cardiac glycosides which had been detected before [74],
2. to investigate whether ouabain and digoxin have different effects on the release of the vasoconstrictive hormone endothelin-1 and the vasodilative NO in human umbilical cord artery endothelial cells (HUAEC)

The following results were achieved:

1. The binding protein for cardiac glycosides, which had been discovered in bovine serum, is the μ -chain of IgM. This could be shown by an ELISA with affinity-purified anti-bodies against the protein, by crossreactivity of these anti-bodies with IgM and by measurement of the tissue distribution of the protein. It seems that the hydrophobic digoxin binds non-specifically to hydrophobic protein surfaces.

2. Ouabain, unlike digoxin, stimulates in nanomolar concentrations both the release of endothelin-1 from HUAEC and the activity of the sodium pump. Either of the investigated cardiac glycosides stimulate NO release in nanomolar concentrations. The IC₅₀ (inhibitory concentration, 50%) of ouabain for sodium pump inhibition is 2×10^{-7} M, indicating that these effects were not results of pump inhibition.
3. The cardiac glycoside-induced stimulation of NO-release is not inhibited by blocking of src-kinase by PP1 and PP2, of phospholipase C by U73122, of G_i-proteins by pertussis toxin or of phosphatidylinositol-3-kinase by wortmannin. It is inhibited by blocking of store operated Ca²⁺-channels (SOC) by Ly294002. No changes in cAMP and cGMP concentrations take place under the influence of either of the substances.
4. Ouabain and digoxin increase phosphorylation of eNOS and akt/PKB in HUAEC.
5. Cardiac glycoside-induced NO synthesis is activated by inhibition of the voltage-dependent L-type-Ca²⁺-channels by verapamil and by inhibition of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger by benzamil, Ni²⁺ and Co³⁺.

These results indicate that:

Nanomolar concentrations of cardiac glycosides induce opening of the IP₃-receptor-Ca²⁺-channel of the endoplasmatic reticulum via direct interaction with the sodium pump and thus a rise of the intracellular calcium concentration. This leads to an opening of SOC. Intracellular Ca²⁺ rises further.

This effect is enhanced by inhibition of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger, which acts physiologically like a Ca²⁺-pump.

Stimulation of phosphorylation of akt/PKB and eNOS is probably achieved by the calcium-calmodulin dependent protein kinases. These phosphorylations lead to an elevated NO synthesis and release.

It is assumed that a rise of intracellular Ca²⁺ also leads to an increased endothelin-1 release and integration of vesicles with latent sodium pumps into the plasma membrane. These processes seem to vary in their Ca²⁺-sensitivity.

The different effects of cardiac glycosides on HUAEC with respect to secretion of endothelin-1 and NO could explain, why constantly increased ouabain levels in blood lead to hypertension, whereas elevated digoxin levels do not.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Withering, W. (1785) *An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases*, G.G.J. and J. Robinson, London
2. Lasek, R., and Müller-Oerlinghausen, B. (2001) Chronische Herzinsuffizienz, *Arzneimittelverordnung in der Praxis-Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft*.
3. Bers, D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature*. **415**, 198-205
4. Towbin, J. A., and Bowles, N. E. (2002) The failing heart, *Nature*. **415**, 227-233
5. Anversa, P., and Nadal-Ginard, B. (2002) Myocyte renewal and ventricular remodeling, *Nature*. **415**, 240-243
6. Francis, G. S. (2001) Pathophysiology of chronic heart failure, *Am J Med*. **110 Suppl 7A**, 37S-46S
7. Remme, W. J. (2003) Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy, *Cardiovasc Drugs Ther*. **17**, 349-360
8. Zylka-Menhorn, V. (1998) Herzinsuffizienz. Neue Erkenntnisse sind noch nicht Allgemeingut, *Deutsches Ärzteblatt*. **95**, B-2479-B2480
9. Kochsiek, K. (1986) Importance of serum glycoside concentrations in *Cardiac Glycosides 1785-1985, Biochemistry-Pharmacology-Clinical Relevance* (Erdmann, E., Greef, K. & Skou, J. C., ed), pp. 407-416, Springer-Verlag, New York
10. Luckner, M., and Wichtl, M. (2000) in *Digitalis*, pp. 19-20, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
11. Fieser, L., and Fieser, M. (1961) *Steroide*, Verlag Chemie, Weinheim
12. Habermehl, G. (1994) Gift-Tiere und ihre Waffen in *Gift-Tiere und ihre Waffen*, pp. 132, 207, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
13. Roth, Daunderer, and Kormann. (1994) *Giftpflanzen, Pflanzengifte*, ecomed, Landsberg

14. Schatzmann, H. J. (1953) Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* **11**, 346-354
15. Skou, J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves, *Biochim. Biophys. Acta.* **23**, 394-401
16. Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase, *Ann. Rev. Biochem.* **71**, 511-535
17. Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O., and Karlsh, S. J. D. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions, *Ann. Rev. Physiol.* **65**, 817-849
18. Lingrel, J. B., and Kuntzweiler, T. (1994) Na⁺,K⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.* **269**, 19659-19662
19. Baker, P. F., and Blaustein, M. P. (1968) Sodium dependent uptake of calcium by crab nerve., *Biochim. Biophys. Acta.* **150**, 167-170
20. Baker, P. F., Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L., and Steinhardt, R. D. (1969) The influence of calcium ions on sodium efflux in squid axons, *J. Physiol. Lond.* **200**, 431-458
21. Blaustein, M. P., and Hodgkin, A. L. (1969) The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons, *J. Physiol. Lond.* **200**, 497-527
22. Shigekawa, M., and Iwamoto, T. (2001) Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange: molecular and pharmacological aspects, *Circ Res.* **88**, 864-876
23. Blaustein, M. P., and Lederer, W. J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications, *Physiol Rev.* **79**, 763-854
24. Philipson, K. D., and Nicoll, D. A. (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective, *Annu Rev Physiol.* **62**, 111-133
25. Blaustein, M. P., Arnon, A., and Hamlyn, J. M. (2000) How ouabain works: control of subplasmalemmal Na⁺ and Ca²⁺, and their influence on Ca²⁺ signaling in *Na/K-ATPase and related ATPases* (Taniguchi, K., and Kaya, S., eds), pp. 633-638, Elsevier Science B.V., Amsterdam
26. Blaustein, M. P. (1977) Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis, *Am. J. Physiol.* **232**, C167-C173

27. Blaustein, M. P. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: Control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness, *Am J. Physiol.* **264 (Cell Physiol. 33)**, C1367-C1387
28. Szent-Györgyi, A. (1953) Chemical physiology of contraction in body and heart muscle, pp. 86-91, Academic Press, New York
29. Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S., DuCharme, D. W., Mandel, F., Mathews, W. R., and Ludens, J. H. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **88**, 6259-6263
30. Schneider, R., Wray, V., Nimtz, M., Lehmann, W. D., Kirch, U., Antolovic, R., and Schoner, W. (1998) Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump, *J Biol Chem.* **273**, 784-792
31. Tymiak, A. A., Norman, J. A., Bolgar, M., DiDonato, G. C., Lee, H., Parker, W. L., Lo, L.-C., Berova, N., Nakanishi, K., Haber, E., and Hauptert jr., G. T. (1993) Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **90**, 8189-8193
32. Zhao, N., Lo, L. C., Berova, N., Nakanishi, K., Tymiak, A. A., Ludens, J. H., and Hauptert, G. T. (1995) Na,K-ATPase inhibitors from bovine hypothalamus and human plasma are different from ouabain: Nanogram scale CD structural analysis, *Biochemistry.* **34**, 9893-9896
33. Laredo, J., Hamilton, J. P., and Hamlyn, J. M. (1995) Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 487-493
34. Laredo, J., Hamilton, B. P., and Hamlyn, J. M. (1994) Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells, *Endocrinology.* **135**, 794-797
35. Laredo, J., Shah, J. R., Lu, Z., Hamilton, B. P., and Hamlyn, J. M. (1997) Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cortical cells via angiotensin II receptors, *Hypertension.* **29**, 401-107
36. Hamlyn, J. M., Lu, Z., Manunta, P., Ludens, J. H., Kimura, K., Shah, J. R., Laredo, J., Hamilton, J. P., Hamilton, M. J., and Hamilton, B. P.

- (1998) Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain, *Clin. & Exptl. Hypertens.* **20**, 523-533
37. Perrin, A., Brasmes, B., Chambaz, E. M., and Defaye, G. (1997) Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound, *Molec. Cell. Endocrinol.* **126**, 7-15
38. Boulanger, B. R., Lilly, M. P., Hamlyn, J. M., Laredo, J., Shurtleff, D., and Gann, D. S. (1993) Ouabain is secreted by the adrenal gland of the awake dogs, *Am. J. Physiol.* **264**, E413-E419
39. Schoner, W., Bauer, N., Müller-Ehmsen, J., Krämer, U., Hambarchian, N., Schwinger, R., Moeller, H., Kost, H., Weitkamp, C., Schweitzer, T., Kirch, U., Neu, H., and Grünbaum, E.-G. (2003) Ouabain as a Mammalian Hormone, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **986**, 678-684
40. Schoner, W., Antolovic, R., Kost, H., Mohadjerani, M., Li, S.-Q., Bauer, N., Neu, H., Gruenbaum, E.-G., Kirch, U., and Paetzold, R. (1999) Endogenous cardiotoxic steroids and its binding globulin, *Jap. J. Pharmacol.* **79**, 30P
41. Manunta, P., Evans, G., Hamilton, B. P., Gann, D., Resau, J., and Hamlyn, J. M. (1992) A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor, *J. Hypertens.* **10**, S27
42. Masugi, F., Ogihara, T., Hasegawa, T., Sagakuchi, K., and Kumahara, Y. (1988) Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma, *J. Hum. Hypertens.* **2**, 17-20
43. Gottlieb, S. S., Rogowski, A. C., Weinberg, M., Krichten, C. M., Hamilton, B. C., and Hamlyn, J. M. (1992) Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure, *Circulation.* **86**, 420-425
44. Manunta, P., Stella, P., Rivera, R., Ciurlino, D., Cusi, D., Ferrandi, M., Hamlyn, J. M., and Bianchi, G. (1999) Left ventricular mass, stroke volume and ouabain-like factor in essential hypertension, *Hypertension.* **34**, 450-456

45. Pierdomenico, S. D., Bucci, A., Manunta, P., Rivera, R., Ferrandi, M., Hamlyn, J. M., Lapenna, D., Cuccurullo, F., and Mezzetti, A. (2001) Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension, *Am. J. Hypertens.* **14**, 44-50
46. Hulthen, U. L., Bolli, P., Kiowski, W., and Bühler, F. R. (1984) Fore-arm vasoconstrictor response to ouabain: Studies in patients with mild and moderate essential hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **6**, 75-81
47. Manunta, P., Rogowski, A. C., Hamilton, B. P., and Hamlyn, J. M. (1994) Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure, *J. Hypertens.* **12**, 549-560
48. Pamnani, M. B., Chen, S., Yuan, C. M., and Haddy, F. J. (1994) Chronic blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor in rats, *Hypertension.* **23**, I-106-I109
49. Huang, B. S., Kudlac, M., Kumarathasan, R., and Leenen, F. H. (1999) Digoxin prevents ouabain and high salt intake-induced hypertension in rats with sinoaortic denervation, *Hypertension.* **34**, 733-738
50. Manunta, P., Hamilton, J., Rogowski, A. C., Hamilton, B. P., and Hamlyn, J. M. (2000) Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin and digitoxin, *Hypertens. Res.* **23**, S77-S85
51. Ferrari, P., Ferrandi, M., Tripoldi, G., Torielli, L., Padoani, G., Minotti, E., Melloni, E., and Bianchi, G. (1999) PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates Na,K-ATPase in genetic hypertension, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeutics.* **288**, 1074-1083
52. Quadri, L., Bianchi, G., Cerri, A., Fedrizzi, G., Ferrari, P., Gobbini, M., Melloni, P., Sputore, S., and Torri, M. (1997) 17 β -(3Furyl)-5 β -androstane-3 β -14 β -17a-triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action, *J. Med. Chem.* **40**, 1561-1564

53. Goto, A., Ishiguro, T., Yamada, K., Ishii, M., Yoshioka, M., Eguchi, C., Shimura, M., and Sugimoto, T. (1990) Isolation of an urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1093-1101
54. Valdes, R., Jr. (1985) Endogenous digoxin-immunoactive factor in human subjects, *Fed. Proc.* **44**, 2800-2805
55. Bagrov, A. Y., Fedorova, O. V., Maslova, M. N., Roukoyatkina, N. I., Ukhanova, M. A., and Zhabko, E. P. (1991) Endogenous plasma Na,K-ATPase inhibitory activity and digoxin-like immunoreactivity after acute myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* **25**, 371-377
56. Qazzaz, H. M., Cao, Z., Bolanowski, D. D., Clark, B. J., and Valdes, R., Jr. (2004) De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors, *Clin Chem.* **50**, 612-620
57. Cushman jr., P. (1969) Inhibition of aldosterone secretion by ouabain in dog adrenal cortical tissue, *Endocrinology.* **84**, 808-813
58. Kley, H. K., Müller, A., Peerenboom, H., and Krüskemper, H. L. (1982) Digoxin does not alter plasma steroid levels in healthy men, *Clin. Pharmacol. Ther.* **32**, 12-17
59. Szalay, K. S. (1993) Ouabain- a local paracrine, aldosterone synthesis regulating hormone?, *Life Sci.* **52**, 1777-1780
60. Wang, H., Yuan, W.-Q., and Lu, Z. R. (2000) Differential regulation of the sodium pump alpha-subunit isoform gene by ouabain and digoxin in tissues of rats, *Hypertens. Res.* **23**, S55-S60
61. Bagrov, A. Y., Fedorova, O. V., Dmitrieva, R. I., Howald, W., N., Hunter, A., P., Kuznetsova, E. A., and Shpen, V. M. (1998) Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction, *Hypertension.* **31**, 1097-1103
62. Lopatin, D. A., Ailamazian, E. K., Dmitrieva, R. I., Shpen, V. M., Fedorova, O. V., Doris, P. A., and Bagrov, A. Y. (1999) Circulating bufadienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia, *J. Hypertens.* **17**, 1179-1187
63. Bagrov, A. Y., Feodorova, O. V., Austin-Lane, J. L., Dimitrieva, R. I., and Andersen, D. E. (1995) Endogenous marinobufagenin-like

- immunoreactive factor and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition during voluntary hypoventilation, *Hypertension*. **26**, 781-188
64. Bagrov, A. Y., Roukayatkina, N. I., Fedorova, O. V., Pinaev, A. G., and Ukhanova, M. V. (1993) Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad, *Eur. J. Pharmacol.* **234**, 165-172
65. Fedorova, O. V., Lakatta, E. G., and Bagrov, A. Y. (2000) Endogenous Na,K pump ligands are differentially regulated during acute NaCl loading of DAHL rats, *Circulation*. **102**, 3009-3014
66. Fedorova, O. V., Talan, M. I., Agalakova, N. I., Lakatta, E. G., and Bagrov, A. Y. (2002) Endogenous Ligand of α_1 -sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride dependent hypertension, *Circulation*. **105**, 1122-1127
67. Lichtstein, D., Gati, I., Samuelov, S., Berson, D., Rozeman, Y., Landau, L., and Deutsch, J. (1993) Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses, *Eur. J. Biochem.* **216**, 261-268
68. Sich, B., Kirch, U., Tepel, M., Ziedek, W., and Schoner, W. (1996) Pulse pressure correlates with a proscillaridin A immunoreactive compound, *Hypertension*. **27**, 1073-1078
69. Li, S.-Q., Eim, C., Kirch, U., Lang, R. E., and Schoner, W. (1998) Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities, *Life Sci.* **62**, 1023-1033
70. Krieglstein, J. (1981) Plasma protein binding of cardiac glycosides, *Handbook of Experimental Pharmacology*. **56**, 95-104
71. Rosner, W., Hryb, D. J., Khan, M. S., Nakhla, A. M., and Romas, N. A. (1999) Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **69**, 481-485
72. Klosterman, L. L., Murai, J. T., and Siiteri, P. K. (1986) Cortisol levels, binding, and properties of corticosteroid-binding globulin in the serum of primates, *Endocrinology*. **118**, 424-434

73. Antolovic, R., Kost, H., Mohadjerani, M., Linder, D., Linder, M., and Schoner, W. (1998) A specific binding protein for cardiac glycosides exists in bovine serum, *J. Biol. Chem.* **273**, 16259-16264
74. Kost, H. (2001) *Isolierung und Analyse eines Bindungsglobulins für Herzglykoside aus Rinderblut*, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen
75. Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K. (1996) *Immunoassay*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto
76. Pilz, H. (2004) Endothel-Endotheldysfunktion-Hypertonie, *Journal für Hypertonie.* **8**, 12-15
77. Buddeke, E., and Fischer, M. (1992) in *Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie*, pp. 337-342, Walter de Gruyter, Berlin, New York
78. Tews, M., Vaupel. (1989) Gefäßsystem und Blutkreislauf in *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, pp. 171-177, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
79. Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature.* **288**, 373-376
80. Pacheco, M. E., Marin, J., Manso, A. M., Rodriguez-Martinez, M. A., Briones, A., Salaices, M., and Redondo, J. (2000) Nitric oxide synthase induction by ouabain in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats, *J Hypertens.* **18**, 877-884
81. Ikeda, U., Furuhashi, K., Kanbe, T., and Shimada, K. (1995) Ouabain enhances nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin- beta, *Eur. J. Pharmacol.* **288**, 379-383
82. Dong, X. H., Komiyama, Y., Nishimura, N., Masuda, M., and Takahashi, H. (2004) Nanomolar level of ouabain increases intracellular calcium to produce nitric oxide in rat aortic endothelial cells, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **31**, 276-283
83. Saunders, R., and Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.* **271**, 1054-1062

84. Gimbrone, M. (1995) Vascular Endothelium In Health and Disease in *Molecular Cardiovascular Medicine* (Haber, E., ed), pp. 49-61, Scientific American, New York
85. Touyz RM, S. E. (2003) Role of endothelin in human hypertension, *Can J Physiol Pharmacol.* **81**, 533-541
86. Busse, R., and Mulsch, A. (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin, *FEBS Lett.* **265**, 133-136
87. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) Cell Communications in *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science Publishing, New York, London
88. Katz, A. M. (1997) Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system, *Am J Cardiol.* **80**, 171-221
89. Putney, J. W., Jr., and McKay, R. R. (1999) Capacitative calcium entry channels, *Bioessays.* **21**, 38-46
90. Miyakawa-Naito, A., Uhlén, P., Lal, M., Aizman, O., Mikoshiba, K., Brismar, H., Zelenin, S., and Aperia, A. (2003) Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-triphosphate receptor generates calcium oscillations, *J. Biol. Chem.* **278**, 50335-50361
91. Santana, L. F., Gómez, A. M., and Lederer, W. J. (1998) Ca²⁺ Flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: Slip-mode conductance, *Science.* **279**, 1027-1033
92. Michel, T., and Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?, *J Clin Invest.* **100**, 2146-2152
93. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., and Busse, R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity, *Circ Res.* **88**, E68-75
94. Boo, Y. C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J., and Jo, H. (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A, *J Biol Chem.* **277**, 3388-3396

95. Ozeki, M., Watanabe, H., Luo, J., Nakano, T., Takeuchi, K., Kureishi, Y., Ito, M., Ohashi, K., and Hayashi, H. (2004) Akt and Ca²⁺ signaling in endothelial cells, *Mol Cell Biochem.* **259**, 169-176
96. Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Exp Cell Res.* **253**, 239-254
97. Shiojima, I., and Walsh, K. (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis, *Circ Res.* **90**, 1243-1250
98. Fleming, I., and Busse, R. (1999) Signal transduction of eNOS activation, *Cardiovasc Res.* **43**, 532-541
99. Michell, B. J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T., and Kemp, B. E. (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem.* **276**, 17625-17628
100. Tews, M., Vaupel. (1989) in *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, pp. 410-412, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
101. Aydemir-Koksoy, A., and Allen, J. C. (2001) Low concentrations of ouabain induce vascular smooth muscle cell proliferation, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **47**, 341-345
102. Allen, J. C., Abramowitz, J., and Koksoy, A. (2003) Low concentrations of ouabain activate vascular smooth muscle cell proliferation, *Ann N Y Acad Sci.* **986**, 504-508
103. Aydemir-Koksoy, A., Abramowitz, J., and Allen, J. (2001) Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Biol. Chem.* **276**, 46605-46611
104. Abramowitz, J., Dai, C., Hirschi, K. K., Dmitrieva, R. I., Doris, P. A., Liu, L., and Allen, J. C. (2003) Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5, *Circulation.* **108**, 3048-3053

105. Arnon, A., Hamlyn, J. M., and Blaustein, M. P. (2000) Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^+ , *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H679-H691
106. Melendez, J., Welch, S., Schaefer, E., Moravec, C. S., Avraham, S. A., H., and Sussman, M. A. (2002) Activation of pyk2/related focal adhesion tyrosine kinase and focal adhesion kinase in cardiac remodeling, *J. Biol. Chem.* **277**, 45203-45210
107. Cato, A. C. B., Nestl, A., and Mink, S. (2002) Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular Signalling Pathways, *Science's STKE* (<http://www.stke.org/content/full/sigtrans;2002/138/re9>). 1-11
108. Schoner, W. (2002) Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones, *Eur. J. Biochem.* **269**, 2440-2448
109. Scheiner-Bobis, G., and Schoner, W. (2001) A fresh facet for ouabain action, *Nature Medicine.* **7**, 1288-1289
110. Aizman, O., Uhlén, P., Lal, M., Brismar, H., and Aperia, A. (2001) Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **98**, 13420-13424
111. Xie, Z., and Askari, A. (2002) Na^+/K^+ -ATPase as a signal transducer, *Eur J Biochem.* **269**, 2434-2439
112. Ferrari, P., Torielli, L., Ferrandi, M., Padoani, G., Duzzi, L., Florio, M., Conti, F., Melloni, L., Vesci, L., Corsico, N., and Bianchi, G. (1998) PST 2238: A new antihypertensive compound that antagonizes the long term pressor effect of ouabain, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeut.* **285**, 83-94
113. Vasallo, P. F., Stefanon, I., Rossoni, L. V., Franca, A., and Vasallo, D. V. (1998) Small doses of canrenone block the effects of ouabain on the mechanical activity of the heart and vessels of the rat, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 679-685
114. Mannich, C., and Siewert, G. (1942) Über g-Strophanthin (Ouabain) und g-Strophanthidin, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* **75**, 737-750
115. Zweig, G., Sherma J. (1972) *Handbook of Chromatography*, CRC Press

116. Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) in *Bioanalytik*, pp. 209-213, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
117. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. **227**, 680-685
118. Rehm, H. (1997) in *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, pp. 18-23, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
119. Bradford. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*. **72**, 248-252
120. Lindl, T. (2002) in *Zell- und Gewebekultur*, pp. 166, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
121. Freshney, R. I. (2000) in *Culture of animal cells*, pp. 372-373, Wiley-Liss, New York
122. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*. **65**, 55-63
123. Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y., and Irimura, T., Tetsuo. (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceines, *FEBS Letters*. **427**, 263-266
124. Chang, H. Y., and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**, 821-846
125. Vinci, M. C., Visentin, B., Cusinato, F., Nardelli, G. B., Trevisi, L., and Luciani, S. (2004) Effect of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor on iatrogenic apoptosis in human endothelial cells, *Biochem Pharmacol*. **67**, 277-284
126. Bauer, N. (2001) *Das bei körperlicher Belastung gesunder Beagle-Hunde freigesetzte endogene Herzglykosid Ouabain steht unter der Kontrolle von Angiotensin II und Adrenalin*, Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen
127. Komiyama, Y., Nishimura, N., Nishino, N., Okuda, K., Munakata, M., Kosaka, C., Masuda, M., and Takahashi, H. (1998) Purification and

- characterization of ouabain-binding protein in human plasma, *Clin. & Exper. Hypertens.* **20**, 683-690
128. Leibetseder, J., Kment, A., and Skalicky, M. (1972) Über den Blutgehalt von Schweineorganen nach dem Entbluten der Tiere, *Wien Tierarztl Monatsschr.* **59**, 99-102
129. Belusa, R., Aizman, O., Andersson, R. M., and Aperia, A. (2002) Changes in Na⁺-K⁺-ATPase activity influence cell attachment to fibronectin, *Am J Physiol Cell Physiol.* **282**, C302-309
130. Yuan, C. M., Manunta, P., Hamlyn, J. M., Chen, S., Bohlen, E., Yeun, J., Haddy, F. J., and Pamnani, M. B. (1993) Long-term ouabain administration produces hypertension in rats, *Hypertension.* **22**, 178-187
131. Privat, C., Lantoine, F., Bedioui, F., Millanvoye van Brussel, E., Devynck, J., and Devynck, M. A. (1997) Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification, *Life Sci.* **61**, 1193-1202
132. Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P. R., Kemp, B. E., and Pearson, R. B. (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase, *Curr Biol.* **9**, 845-848
133. Gotoh, H., Kamiyama, A., Shibayama, R., Sawada, M., and Kashimoto, T. (1993) Involvement of Phosphoinositide turnover in ouabain inotropism, *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **194**, 72-78
134. Li, D., Sweeney, G., Wang, Q., and Klip, A. (1999) Participation of PI3K and atypical PKC in Na⁺/K⁺-pump stimulation by IGF-1 and VSMC, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol. (Heart Circ. Physiol).* **276**, H2109-H2116
135. McGarry, S. J., and Williams, A. J. (1993) Digoxin activates sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels: a possible role in cardiac inotropy, *Br. J. Pharmacol.* **108**, 1043-1050
136. Arnon, A., Hamlyn, J. M., and Blaustein, M. P. (2000) Na⁺ entry via store-operated channels modulates Ca²⁺ signaling in arterial myocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**, C163-C173

137. Hanke, J. H., and al., e. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation., *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701
138. McCarthy, R. T., and TanPiengco, P. E. (1992) Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine, *J Neurosci.* **12**, 2225-2234
139. Atlas, D., and Adler, M. (1981) alpha-adrenergic antagonists as possible calcium channel inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**, 1237-1241
140. Reuter, H., Han, T., Motter, C., Philipson, K. D., and Goldhaber, J. I. (2003) Mice overexpressing the cardiac sodium calcium exchanger: Defects in excitation-contraction coupling, *J. Physiol (Lond).* **554**, 779-789
141. Pierce, G. N., Cole, W. C., Liu, K., Massaelli, H., Maddaford, T. G., Chen, Y. J., McPherson, C. D., Jain, S., and Sontag, D. (1993) Modulation of cardiac performance by amiloride and several selected derivatives of amiloride, *J Pharmacol Exp Ther.* **265**, 1280-1291
142. Smallridge, R. C., Kiang, J. G., Gist, I. D., Fein, H. G., and Galloway, R. J. (1992) U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effects in GH3 rat pituitary cells, *Endocrinology.* **131**, 1883-1888
143. Morales-Ruiz, M., Lee, M. J., Zollner, S., Gratton, J. P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., and Sessa, W. C. (2001) Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells, *J Biol Chem.* **276**, 19672-19677
144. Inada, H., Shindo, H., Tawata, M., and Onaya, T. (1998) cAMP regulates nitric oxide production and ouabain-sensitive Na⁺,K⁺-ATPase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Diabetologia.* **41**, 1451-1458
145. Woods, M., Wood, E. G., Mitchell, J. A., and Warner, T. D. (2000) Cyclic AMP regulates cytokine stimulation of endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36 (suppl. 1)**, S404-406

146. Kelly, L. K., Wedgwood, S., Steinhorn, R. H., and Black, S. M. (2004) Nitric oxide decreases in endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **286**, L984-L991
147. Erdmann, E., and Schoner, W. (1974) Oubain-Receptor Interactions in (Na⁺ + K⁺)-ATPase Preparations. IV. The Molecular Structure of Different Cardioactive Steroids and other Substances and Their Affinity to the Glycoside receptor, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **283**, 335-356
148. Parhami-Seren, B., Haberly, R., Margolies, M. N., and Hauptert Jr., G. T. (2002) Ouabain-Binding Protein(s) from Human Plasma, *Hypertension.* **40**, 220-228
149. Upadhyaya, G. A., Harvey, P. R., and Strasberg, S. M. (1993) Effect of immunoglobulins on the nucleation of cholesterol, *J. Biol. Chem.* **268**, 5193-5200
150. Golovina, V., Song, H., Paul, J., Lingrel, J., and Blaustein, M. P. (2003) Regulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺ pump alpha-2-subunit expression, *Ann N Y Acad Sci.* **986**, 509-513
151. Golovina, V., Song, H., Paul, J., Lingrel, J., and Blaustein, M. P. (2003) Na⁺ pump alpha 2-subunit expression modulates Ca²⁺ signaling, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C475-C486
152. Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004) Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun.* **321**, 716-721
153. Shah, O. J., and al., e. (2002) The Src-family tyrosine kinase inhibitor PP1 interferes with the activation of ribosomal protein S6 kinases, *Biochem.J.* **366**, 57-62
154. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) Activation of Nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature.* **399**, 601-605
155. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujii, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999)

- Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt, *Nature*. **399**, 597-601
156. Schneider, J.-C., El Kebir, D., Chéreau, C., Lanone, S., Huang, X.-L., De Buys Roessingh, A. S., Mercier, J. C., Dall'Ava-Santucci, J., and Dinh-Xuan, A. T. (2003) Involvement of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* **284**, H2311-H2319
157. Deb, T. B., Coticchia, C. M., and Dickson, R. B. (2004) Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* **279**, 38903-38911
158. Uchida, H., Tanaka, Y., Ishii, K., and Nakayama, K. (1999) L-type Ca^{2+} channels are not involved in coronary endothelial Ca^{2+} influx mechanism responsible for endothelium-dependent relaxation, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* **104**, 127-144
159. Dhein, S., Salameh, A., Berkels, R., and Klaus, W. (1999) Dual mode of action of dihydropyridine calcium antagonists: a role for nitric oxide, *Drugs.* **58**, 397-404
160. Erdreich, A., Spanier, R., and Rahaminoff, H. (1983) The inhibition of Na-dependent Ca^{2+} uptake by Verapamil in synaptic plasma vesicles, *Eur. J. Pharmacol.* **90**, 193-202

ICH BEDANKE MICH SEHR HERZLICH BEI

Herrn Prof. em. Dr. W. Schoner für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg, die als Vertreterin des Fachbereiches Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

Frau Ulrike Kirch für ihre Freundschaft und ihre exzellente Arbeit.

Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis und Dr. Robert Saunders für ihre Hilfe.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit, ganz besonders Bianca Kulik, Michaela Bartz, Anja Mayer und Alexander Eva für ihre Freundschaft.

Meiner Familie, die immer für mich da war.

Ralf, der sich in guten und schlechten Tagen um mich kümmert und mich behütet.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 21. März 2005

Foto: Annegret Weitkamp

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-071-8



9 783896 870711