

Aus dem Physiologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Beitrag von anorganischen Ionen zur Volumenregulation von renalen A6-Zellen  
-eine Elektronenstrahlmikroanalyse der zellulären Elementzusammensetzung-

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Thomas Große  
aus Braunschweig  
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Dörge

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Schmolke  
Prof. Dr. Th. Sitter

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2007

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Einführung</b>	<b>3</b>
<b>Literaturübersicht</b>	<b>7</b>
1. Na-Resorption	7
2. Cl-Sekretion	13
3. Volumenregulation	17
<b>Methoden</b>	<b>29</b>
1. Kultivierung von A6-Zellen	29
1.1 A6-Zellen	29
1.2 Inkubation und Nährmedium der A6-Zellen	29
1.3 Splitten und Aussaat von A6-Zellen	30
1.4 Einfrieren und Auftauen von A6-Zellen	32
2. Experimentelle Bedingungen	33
2.1 Akute Änderung der basolateralen Osmolarität	33
2.1.1 Inkubationslösungen	33
2.1.2 Versuchsablauf	34
2.1.3 Inkubation in Ussingkammern	35
2.1.4 Inkubation im Filtertöpfchen	37
2.2 Kontinuierliche Abnahme der basolateralen Osmolarität	38
2.2.1 Versuchsablauf	38
2.2.2 Gradientenmixer	40
3. Herstellung gefriergetrockneter Kryoschnitte	42
3.1 Einfrieren der Epithelien	42
3.2 Albuminstandardlösungen	44
3.3 Kryoschnitte	44
3.4 Gefriertrocknung	46
4. Elektronenstrahlmikroanalyse	46
4.1 Physikalische Grundlagen	46
4.2 Schnittanalyse	48

## *Inhaltsverzeichnis*

---

5. Erfassung der zellulären Konzentrationen	50
5.1 Auswertung der Röntgenspektren	50
5.2 Quantifizierung	50
6. Statistik	52
<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
1. Elektrische Parameter	53
2. Elementkonzentrationen von A6-Zellen unter Basisbedingungen	55
3. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress	58
4. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress und anschließender Isotonie	65
5. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität	74
<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
1. Experimentelle Bedingungen und elektrische Transportparameter	81
2. Elementkonzentrationen von A6-Zellen unter Basisbedingungen	83
3. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress	87
4. Basolaterale Isotonie nach vorhergehendem akutem hypotonem Stress	97
5. Isovolumetrische Volumenregulation	103
<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>

## **Einführung**

Um ihre Struktur und Funktion zu bewahren, versuchen Zellen auch unter widrigen Umständen ihr Volumen aufrecht zu erhalten. Generell sind alle Zellen des Organismus mit der Situation konfrontiert, dass sie aufgrund von nichtpermeablen Osmolyten wie Proteinen und anderen großmolekularen Substanzen einen höheren onkotischen Druck als der extrazelluläre Raum aufweisen. Nach dem heutigen Erkenntnisstand soll die dadurch verursachte Tendenz eines ständigen Flüssigkeitseinstroms und eine damit verbundene Zellschwellung durch die Aktivität der Na-K-Pumpe unterbunden werden (Macknight und Leaf 1977). Die Na-K-Pumpe sorgt nicht nur dafür, dass das in die Zelle einströmende Na sofort wieder heraustransportiert wird und somit virtuell als impermeabel angesehen werden kann (leak-pump-hypothesis, Leaf 1956 und 1959), sondern baut auch Gradienten für Na und K auf, die für sekundär aktive Transporte (Co- und Antitransporte) von anderen Ionen im Rahmen der Zellvolumenregulation genutzt werden können.

Zu ausgeprägten Unterschieden in der extrazellulären Osmolarität, die Einfluss auf das Zellvolumen nehmen können, kann es vor allem bei Epithelzellen kommen, die zum Teil völlig unterschiedlich zusammengesetzte Extrazellularräume (Lumen und Interstitium) voneinander trennen. Dies gilt vor allem für sogenannte dichte Epithelien mit hohen transzellulären, elektrischen Widerständen wie sie im Colon, dem Magen, den Drüsenausführungsgängen, den distalen Tubulusabschnitten der Niere und der Harnblase vorkommen. Die luminale Flüssigkeit dieser Epithelien ist anisoton, häufig hypoton aber auch hyperton. Im Sammelrohr der Niere und den ableitenden Harnwegen kann die luminale Osmolarität in Abhängigkeit vom Diuresestatus sowohl hypoton als auch hyperton sein (Jamison und Kritz 1982). Ein genereller Schutz dieser Epithelzellen gegen Zellvolumenveränderungen könnte in einer relativ schlechten Wasserpermeabilität der luminalen Membran bestehen, so dass sich die Zellen vorwiegend mit der isotonen interstitiellen Flüssigkeit osmotisch ins Gleichgewicht setzen. Während für die meisten genannten dichten Epithelien die Wasserdurchlässigkeit der apikalen Membran tatsächlich viel niedriger ist als die der basolateralen, weist die apikale

Membran der renalen Sammelrohrzellen jedoch in Abhängigkeit vom Diuresezustand unterschiedliche Wasserpermeabilitäten auf (Van Os et al 2000). Abgesehen davon, dass Harnverdünnung und Harnkonzentrierung eine unterschiedliche Wasserpermeabilität der luminalen Membran der Sammelrohrzellen verlangen, könnte eine relativ niedrige Wasserdurchlässigkeit der luminalen Membran die Sammelrohrzellen nicht vor den osmotischen Auswirkungen schützen, wie sie beim Übergang von einem in den anderen Diuresezustand auftreten. Bei Änderung des Diuresestatus ändert sich nämlich nicht nur die Osmolarität in der Sammelrohrflüssigkeit sondern auch im Interstitium. Um dieser prekären Situation zu begegnen, verfügen die Sammelrohrzellen über spezielle Mechanismen mit denen neben kleinen anorganischen Elektrolyten auch organische Osmolyte (Aminosäuren, Glycerophosphorylcholin, Betain, Sorbitol und Inositol) beim Übergang zur Diurese abgegeben und beim Übergang zur Antidiurese aufgenommen oder synthetisiert werden (Beck et al 1998). Ähnliche volumenregulatorische Mechanismen sind auch an vielen anderen Körperzellen gefunden worden. Da viele Zellen im Warmblüterorganismus heute kaum einem osmotischem Stress ausgesetzt werden, könnte es sich hierbei um ein Relikt aus der Phylogenese handeln.

A6-Epithelzellen, die ursprünglich aus der Niere des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) stammen, werden seit mehr als 20 Jahren als kontinuierliche Zelllinie gezüchtet. Auf permeablen Unterlagen ausgesät, bilden A6-Zellen konfluente Epithelien aus, die aufgrund ihrer transepithelen elektrischen Transportparameter als dicht angesehen werden müssen. Zahlreiche Transportstudien an A6-Epithelien haben wesentlich zum Verständnis der Einzelschritte des transepithelialen Na- und Cl-Transportes beigetragen. Außerdem wurden A6-Epithelien extensiv zur Aufklärung volumenregulatorischer Prozesse eingesetzt. Wie bei vielen anderen dichten Epithelien ist die apikale H<sub>2</sub>O-Permeabilität von A6-Zellen sehr viel niedriger als die basolaterale (De Smet et al 1995c). Während also eine Absenkung der Osmolarität in der apikalen Badelösung keine Auswirkung auf das Zellvolumen hat, wird durch eine Osmolaritätsverminderung in der basolateralen Badelösung eine Reihe von volumenregulatorischen Prozessen in Gang gesetzt. Eine akute Herabsetzung der

basolateralen Osmolarität führt unmittelbar zur Zellschwellung und anschließend zu einer regulatorischen Volumenabnahme (RVD = regulatory volume decrease). Wird die Osmolarität der basolateralen Badelösung kontinuierlich und langsam herabgesetzt, erfolgt die Volumenregulation ohne zwischenzeitlich nennenswerte Änderung des Zellvolumens (IVR = isovolumetric regulation). Mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze konnte gezeigt werden, dass zelluläre Verluste von K und Cl zur Volumenregulation während des hypertonen Schocks beitragen (Brochiero et al 1995, Van Driessche et al 1997, Broillet et al 1991, De Smet et al 1998, Ehrenfeld et al 1994, Banderali et al 1996). Obwohl direkte Hinweise für den zellulären Verlust von K und Cl durch Bestimmung des zellulären K-Gehalts und der Cl-Aktivität erhalten werden konnten, blieb das exakte Ausmaß mit welchem diese Ionen zur Volumenregulation beitragen ungeklärt. Während die K-Messung nur Gehalte bezogen auf das zelluläre Protein von nicht konfluenten A6-Zellen lieferten (Van Driessche et al 1997), wurden Änderungen der zellulären Cl-Aktivität nur relativ erfasst (Brochiero et al 1995). Detaillierte Informationen über die Beteiligung von kleinen Elektrolyten an der Volumenregulation konnte dagegen mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse an Epithelzellen der Kaninchenniere gewonnen werden (Rick 1993).

Über das Verhalten der A6-Zellen, das sich nach vorhergegangenem hypertonem Stress bei Wiederherstellung von isotonen Bedingungen zeigt, ist z.Z. wenig bekannt. Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen, bei denen eine solche Änderung der extrazellulären Osmolarität nach einer initialen Zellschrumpfung eine regulatorische Volumenzunahme (RVI = regulatory volume increase) auslöst, scheinen sich A6-Zellen in dieser Situation wie ideale Osmometer zu verhalten (De Smet et al 1995a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Elektronenstrahlmikroanalyse angewandt, um Änderungen in der Elementzusammensetzung von A6-Zellen nach hypotonem Stress quantitativ zu erfassen. Im Gegensatz zu anderen Methoden bietet die Elektronenstrahlmikroanalyse die Möglichkeit alle kleinen, an der Regulation beteiligten Ionen gleichzeitig zu erfassen. Da die Bremsstrahlung der Röntgenspektren, die mit der Elektronenstrahlmikroanalyse an gefriergetrockneten Kryoschnitten erhalten werden, ein Maß für die Masse darstellt, können ebenfalls Aussagen über Variationen

des zellulären Trockengewichts und somit Zellvolumenveränderungen getroffen werden.

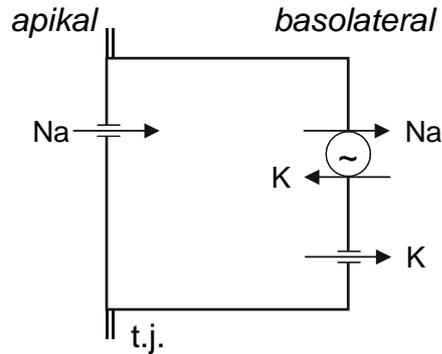
Gegenüber Epithelzellen, die aus Nieren entnommen werden, haben A6-Epithelien den Vorteil, dass sie leichter zugänglich und besser handhabbar sind. Auf permeablen Unterlagen gezogen, können sie in Ussingkammern eingespannt und seitengetrent inkubiert werden. Dieses Vorgehen bietet außerdem die Möglichkeit die Transportfunktion des Epithels während der Inkubation durch Bestimmung der transepithelialen Transportparameter fortlaufend zu kontrollieren. Die Bestimmungen wurden 2 und 60 Minuten nach Einführung eines akuten hypotonen Schocks (Absenkung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l) und 2 und 30 Minuten nach Reperfusion mit isotoner Lösung durchgeführt. Außerdem erfolgten Messungen nach kontinuierlicher Absenkung der Osmolarität von 260 auf 200 bzw. 140 mosmol/l In allen Fällen wurden die Änderungen der basolateralen Osmolarität durch Änderungen der NaCl-Konzentration erzielt.

## **Literaturübersicht**

### **1. Na-Resorption**

Angeregt durch die von Handler und seinen Mitarbeitern um 1980 gemachte Beobachtung, dass A6-Zellen zur Na-Resorption befähigt sind, haben sich eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen mit der Aufklärung des transepithelialen Na-Transports befasst. Die kontinuierlich gezüchtete A6-Zelllinie kann daher heute als Modellstruktur angesehen werden, an der die der Na-Resorption zugrunde liegenden Mechanismen detailliert untersucht werden können. A6-Epithelien weisen Eigenschaften des Na-Transports auf, die denen anderer dichter Epithelien wie dem renalen distalen Tubulus (Meneton et al 2004 ), dem Magen (Machen et al 1978; Fritzenwanger et al 1996 ), dem Colon (Frizzel et al 1976) und der Harnblase von Warmblütern (Dörge et al 1988; Lewis und Diamond 1976) sowie der Haut (Ussing und Windhager 1964; Rick et al 1978) und der Harnblase (Brodsky und Schilb 1966; Buchinger et al 1989) von Amphibien und Reptilien sehr ähnlich sind. Gegenüber nativen epithelialen Strukturen haben A6-Epithelien den Vorteil, dass sie weniger komplex aufgebaut sind, d. h. nur aus einem Zelltyp bestehen und keinem Bindegewebe als Unterlage aufsitzen. Dieser einfache Strukturaufbau macht A6-Epithelien für eine ganze Reihe von Untersuchungsmethoden leichter zugänglich.

Abbildung 1 gibt schematisch die Einzelschritte des transepithelialen Na-Transportes wieder, wie sie heute für alle oben genannten dichten Epithelien allgemein akzeptiert werden. Dieses 2-Barrierenmodell, das ursprünglich von Ussing und seinen Mitarbeitern für den Na-Transport an der Froschhaut entwickelt wurde (Koefoed-Jensen und Ussing 1958), diente später als Vorlage für alle bisher bekannten transepithelialen Transporte. Nach dieser Modellvorstellung strömt Na entlang eines elektrochemischen Gradienten passiv über einen Kanal in der apikalen Membran in die Zelle ein, um dann gegen einen elektrochemischen Gradienten mit Hilfe der Na-K-Pumpe in der basolateralen Membran aktiv heraustransportiert zu werden. Die Grenze zwischen



**Abb. 1** : Modell der transepithelialen Na-Resorption; t.j. = tight junction

apikaler und basolateraler Membran bilden die „tight junctions“ im apikalen Zellbereich. Das über die Na-K-Pumpe aufgenommene K verlässt die Zelle über einen K-Kanal in der basolateralen Membran.

Erste Hinweise auf einen absorptiven Transport von Salz und Wasser ergaben sich für A6-Epithelien aus der Beobachtung, dass auf nicht permeablen Unterlagen gezüchtete Epithelien Dome ausbilden (Handler et al 1980). Aus den folgenden Beobachtungen konnte von Handler und Mitarbeitern (1980) der Schluss gezogen werden, dass der Salztransport in resorptiver Richtung auf einem primär aktiven, elektrogenen, transepithelialen Na-Transport beruht, wie er auch an anderen dichten Epithelien vorkommt:

1. Die unter kurzgeschlossenen Bedingungen aus den unidirektionalen Na-Flüssen ermittelte Na-Resorption entspricht unter Basisbedingungen dem Kurzschlussstrom.
2. Durch relativ niedrige, apikale Amiloridkonzentrationen ( $10^{-4}$  M) wird unter Basisbedingungen Na-Resorption und Kurzschlussstrom vollständig aufgehoben.
3. Durch Applikation von cAMP-Analoga (8BRcAMP; 8CPTcAMP) wird Na-Resorption und Kurzschlussstrom um ein Mehrfaches reversibel gesteigert.

In nachfolgenden Untersuchungen konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Steroidhormone wie Dexamethason, Kortikosteron und Aldosteron sowie Peptidhormone wie Insulin und Argininvasopressin (AVP) den transepithelialen Na-

Transport von A6-Epithelien beträchtlich steigern. Interessanter Weise ist die Wirkung des synthetischen Steroids Dexamethason sehr viel stärker ausgeprägt als die von Kortikosteron und Aldosteron (Lyoussi und Crabbe 1996). Da die Effekte von Dexamethason und Aldosteron auf den transepithelialen Na-Transport nicht additiv waren, sollten sie über den gleichen Rezeptortyp vermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnte von verschiedenen Untersuchern nachgewiesen werden, dass die Effekte von Steroid- und Peptidhormonen auf den transepithelialen Na-Transport von A6-Epithelien additiv sind (Blazer-Yost et al 1998; Record et al 1996), was auf eine unterschiedliche zelluläre Signalvermittlung hindeutet.

An intakten, dichten Epithelien bewirkten Steroid- und Peptidhormone in einer frühen Phase eine Zunahme der Na-Resorption über einen Anstieg der apikalen Na-Leitfähigkeit (Garty und Benos 1988). Die primäre Struktur des epithelialen Na-Kanals (ENaC), die durch Injektion von RNA in Froschoozyten aufgeklärt wurde, besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (Burch et al 1995; Palmer et al 1990). Generell kann der Na-Strom über die apikale Membran mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$I_{Na} = \gamma_{Na} \cdot N \cdot P_O \cdot (V_a - E_{Na})$$

Dabei ist  $\gamma_{Na}$  die Leitfähigkeit eines Einzelkanals, N die Anzahl der apikalen Na-Kanäle pro Flächeneinheit,  $P_O$  die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit des Na-Kanals,  $V_a$  das apikale Membranpotential und  $E_{Na}$  das Umkehrpotential für apikale Na-Kanäle, bzw. das Na-Gleichgewichtspotential. Da mögliche Änderungen von  $V_a$  und  $E_{Na}$  die hormoninduzierten Anstiege des Na-Transportes nicht erklären können, muss die Ursache für die Transportsteigerung in einer Erhöhung der Kanalanzahl und/oder einer Verbesserung der Kanaleigenschaften (Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit, und/oder der Kanaloffenwahrscheinlichkeit) liegen. Für die hormoninduzierte Zunahme der apikalen Na-Leitfähigkeit in dichten Epithelien sind bisher verschiedene Möglichkeiten diskutiert worden. Neben einer Aktivierung von nicht oder wenig konduktiven Na-Kanälen (Macknight et al 1980), die sich bereits vor der Hormonapplikation in der apikalen Membran befanden, wurde der Einbau von neugebildeten (Taylor und Palmer 1982) oder aus zellulären Speichern stammenden Kanälen (Li et al 1982) angenommen.

An A6-Epithelien wurden unter der Einwirkung von Steroid- und Peptidhormonen in Abhängigkeit von den verwendeten Nachweismethoden bisher unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Mit Hilfe von Fluktuationsanalysen des Kurzschlussstroms wurde nach akuter und chronischer Einwirkung von Aldosteron sowie nach Applikation von Insulin eine Zunahme der apikalen aktiven Na-Kanäle beobachtet, ohne dass sich der Einzelkanalstrom und die Kanaloffenwahrscheinlichkeit wesentlich veränderten (Baxendale-Cox et al 1997; Helman et al 1998; Erlj et al 1994). Im Gegensatz dazu ergaben Bestimmungen der Einzelkanalströme mit Hilfe der patch clamp-Technik, dass sich der natriferische Effekt von Aldosteron und Insulin ausschließlich auf eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit der Na-Kanäle zurückführen lässt (Marunaka et al 1992; Eaton et al 1995; Kemendy et al 1992). Zur Klärung dieser Diskrepanz wird diskutiert, dass wenig aktive Na-Kanäle unter Kontrollbedingungen mit Hilfe der Fluktuationsanalyse nicht nachgewiesen werden können, oder aber Membranveränderungen oder Schädigungen bei der Herstellung eines „patch“ (Membranflecken) die Hormonwirkung auf den Na-Kanal verändern (Blazer-Yost et al 1998; Kemendy et al 1992). Für die natriferische Wirkung von AVP ist sowohl nach Stromfluktuationsanalysen (Els et al 1991) als auch nach patch-clamp-Untersuchungen (Marunaka und Eaton 1991) eine Zunahme der apikalen Na-Kanäle verantwortlich.

Obwohl über die zellulären Mechanismen, die der hormoninduzierten Na-Leitfähigkeitszunahme der apikalen Membran zugrunde liegen, wenig bekannt ist, konnten in jüngster Zeit einige Wirkungsansätze aufgezeigt werden. So konnten Hinweise dafür erhalten werden, dass die aldosteronbedingte Expression und Aktivierung der serum- und glukokortikoidregulierenden Proteinkinase (SGK1) zu einer Zunahme von ENaC in der apikalen Membran führt. (Alvarez et al 1999). Da die Aktivität von SGK1 auch über vasopressin- bzw. insulinabhängigen Kinasen reguliert wird (Perroti 2001; Wang 2001), könnte dies auch eine Erklärung für die synergistische Wirkung von Aldosteron einerseits und Arginivasopressin oder Insulin andererseits liefern. Weiterhin konnte an A6-Zellen wahrscheinlich gemacht werden, dass die durch cAMP und Proteinkinase A vermittelte Hormonwirkung auf eine gesteigerte Exozytose von zytosolischen Membranvesikeln beruht, die entweder fertige Na-Kanäle oder deren

Untereinheiten enthalten (Butterworth et al 2001). Bindungsstudien mit Antikörpern gegen die drei ENaC-Untereinheiten haben gezeigt, dass nach einer Langzeitbehandlung mit Aldosteron ( $> 24$  h) oder einer Kurzeiteinwirkung von AVP ( $\sim 2$  h) der Oberflächengehalt der relativ kurzlebigen  $\beta$ -Untereinheit ( $t_{1/2} \sim 6$  h) dramatisch ansteigt, während sich der Oberflächengehalt der langlebigeren  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten ( $t_{1/2} > 24$  h) nicht signifikant verändert (Weisz et al 2000). Dies könnte bedeuten, dass für eine hormonbedingte Bildung aktiver Na-Kanäle in der apikalen Membran von A6-Zellen ein alleiniger Einbau von  $\beta$ -Untereinheiten erforderlich ist.

Für die AVP-abhängige Rezeptoraktivierung scheint die Aktivierung der Phosphatidylinositid-3-Kinase eine notwendige Voraussetzung zu sein. Diese Ansicht ergab sich aus Versuchen, in denen eine spezifische Hemmung der Kinase durch Wortmann in den natriferischen Effekt von AVP, nicht aber den von Aldosteron oder Insulin aufhob (Edinger et al 1999).

Sowohl Steroidhormone (Dexamethason, Kortikosteron und Aldosteron) als auch Peptidhormone (AVP, Insulin) führen nach 24 h Einwirkzeit zu einer Aktivitätszunahme der Na-K-ATP-ase in der basolateralen Membran. Allerdings scheint sowohl die Charakteristik als auch die Ursache dieser Aktivitätszunahme für beide Hormontypen unterschiedlich zu sein. Unter der Einwirkung von Peptidhormonen ergab sich ähnlich wie bei Spontanvariationen des Na-Transportes unter Basisbedingungen eine sehr enge Koppelung zwischen dem transepithelialen Na-Transport und der Na-K-ATPase-Aktivität (Lyoussi und Crabbe 1996 a und b). Im Gegensatz dazu nahm unter der Einwirkung von Steroidhormonen der transepitheliale Na-Transport gegenüber der Na-K-ATPase-Aktivität überproportional zu, was auf eine Zunahme der „turn over rate“ auf das 2-3-fache hindeutet.

Während unter Einwirkung der Peptidhormone der Effekt auf die Na-K-ATPase-Aktivität offensichtlich nur indirekt erzielt wird, scheint es sich bei den Steroidhormonen im Wesentlichen um eine direkte Wirkung zu handeln. Diese Aussage stützt sich auf Untersuchungen, in denen unter der Einwirkung von AVP und Dexamethason eine Zunahme des transepithelialen Na-Transportes entweder durch apikal appliziertes Amilorid nicht zugelassen wurde oder aber der Na-Transport durch

apikales Amilorid oder apikale Na-freie Inkubationslösung vollständig aufgehoben war (Lyoussi und Crabbe 1996 a und b). Unter diesen Bedingungen blieb die Aktivitätszunahme der Na-K-ATP-ase nach Applikation von AVP aus, wohingegen sie bei Einwirkung von Dexamethason immer noch nahezu gleich groß war wie unter transportaktiven Bedingungen. Während also die durch AVP hervorgerufene ATP-ase-Aktivitätsteigerung an die gesteigerte Na-Transportrate geknüpft ist, muss der Hauptanteil der Dexamethason induzierten Aktivitätszunahme auf eine direkte Hormonwirkung zurückgeführt werden. Die indirekte Hormonwirkung könnte auf eine von mehreren Arbeitsgruppen aufgeworfene Hypothese zurückgeführt werden, wonach eine Änderung der zellulären Elektrolytzusammensetzung als Folge des hormoninduzierten erhöhten Na-Einstroms über die apikale Membran die Neusynthese von Na-K-Pumpen fördert. Änderungen in der zellulären Elementzusammensetzung, die vor allem eine Zunahme der Na-Konzentration betreffen, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl nach Einwirkung von AVP (Rick et al 1984) als auch Gabe von Aldosteron (Rick et al 1988) an Na-transportierenden dichten Epithelien beobachtet werden. Der aldosteronbedingte Anstieg der zellulären Na-Konzentration und einer damit verbundenen Verschiebung des Arbeitspunktes auf der Kennlinie aus Na-K-ATPase-Aktivität und Na-Konzentration könnte auch die durch Steroidhormone bedingte Zunahme der „turn over rate“ (Umsatzrate) der Na-K-Pumpe erklären. Da nach Steroidapplikation die Anzahl der Ouabainbindungsstellen als Maß für die Anzahl der Na-K-Pumpen um etwa den gleichen Betrag wie die ATP-ase-Aktivität zunahm, scheint eine Rekrutierung von Na-K-Pumpen, die sich bereits vor der Hormonapplikation in der basolateralen Membran befanden, unwahrscheinlich .

Änderungen des transepithelialen Na-Transportes müssen zur Aufrechterhaltung der zellulären K-Homöostase und aus Gründen der Elektroneutralität auch von Änderungen des basolateralen K-Effluxes begleitet werden. Eine hormonbedingte Zunahme des transepithelialen Na-Transportes und damit gesteigerter Aktivität der Na-K-ATPase sollte also zu einer gesteigerten K-Rezirkulation über die basolaterale Membran führen. Prinzipiell kann dies über eine Aktivierung basolateraler K-Kanäle oder Zunahme der Triebkraft erzielt werden. Die bisher nach der Einwirkung von Steroidhormonen

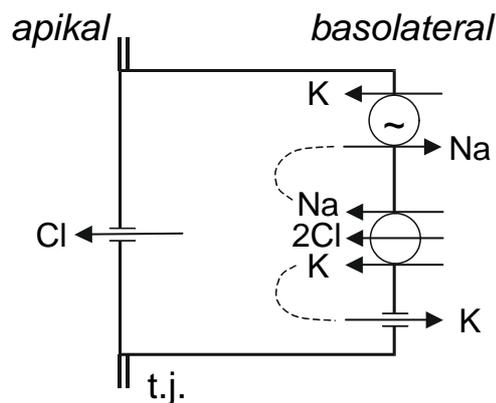
durchgeführten Untersuchungen lieferten etwas unterschiedliche Ergebnisse. Nach Permeabilisierung der apikalen Membran durch Amphotericin B und 4-stündiger Aldosteroninkubation blieb eine einwärtsrektifizierende (Broillet und Horrisberger 1993) Basis-K-Leitfähigkeit konstant, wogegen eine volumenabhängige, quinidinsensitive K-Leitfähigkeit auf das Doppelte anstieg (Broillet et al 1993) (Hamilton und Eaton. 1991). Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe von Zellpotentialbestimmungen gezeigt werden, dass eine Steigerung des transepithelialen Na-Transportes durch Dexamethason zu keiner Änderung der basolateralen K-Leitfähigkeit führt (Granitzer et al 1992; Granitzer et al 1991; Granitzer et al 1993). Die in diesen Untersuchungen zu erwartende Steigerung des K-Effluxes ließ sich allein durch eine Depolarisation der basolateralen Membran erklären. Da jedoch von dieser Arbeitsgruppe ebenfalls gefunden wurde, dass eine Depolarisation der basolateralen Membran zu einer Inaktivierung der einwärtsrektifizierenden K-Kanäle führt, wurde auch unter der Einwirkung von Dexamethason die Aktivierung anderer Kanaltypen gefordert (Granitzer et al 1993).

## **2. Cl-Sekretion**

Neben der Eigenschaft Na aktiv zu resorbieren, besitzen A6-Epithelien auch die Fähigkeit Cl aktiv zu sezernieren. Allerdings findet unter Basisbedingungen keine Cl-Sekretion statt, so dass der Kurzschlußstrom allein dem amiloridhemmbaren Na-Transport entspricht (Perkins und Handler 1981, Sariban-Sohraby et al 1983). Einen ersten Anhalt für die Existenz einer Cl-Sekretion ergab sich aus der Beobachtung, dass nach Transportstimulation durch cAMP der Anstieg im Kurzschlusstrom nur teilweise durch Amilorid aufgehoben werden konnte (Perkins und Handler 1981). Eine nähere Charakterisierung des amilorid-insensitiven Kurzschlusstroms, lieferte eindeutige Hinweise dafür, dass dieser auf eine aktive Cl-Sekretion beruht (Yanase und Handler 1986). Da der amiloridinsensitive Kurzschlusstrom mit einem Netto-Cl-Fluß in sekretorischer Richtung identisch war und durch Wegnahme von Na und Cl in den Badelösungen sowie durch basolateral appliziertes Ouabain, Furosemid und Bumetanid gehemmt werden konnte, wurde von Yanase und Handler (1986) postuliert, dass die Cl-

Sekretion in A6-Epithelien in ihren Grundzügen der von anderen dichten Epithelien entspricht.

Zur gleichen Zeit konnte von Keeler und Wong (1986) gezeigt werden, dass die Cl-Sekretion in A6-Epithelien auch durch PGE<sub>2</sub> hervorgerufen werden kann. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass PGE<sub>2</sub> auch an A6-Epithelien seine Wirkung über cAMP entfaltet und wie Forskolin oder AVP zu einer Steigerung des transepithelialen Na-Transporters führt (Chalfant et al 1993, Matsumoto et al 1997, Paunescu und Helman 2001). Eine cAMP-abhängige Steigerung der Cl-Sekretion konnte auch von Marunaka und seinen Mitarbeitern nach Applikation von AVP, Forskolin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), einem Hemmer der Phosphodiesterase aufgezeigt werden (Marunaka und Eaton 1990, Marunaka 1993, Marunaka und Tohda 1993, Doi und Marunaka 1995.)



**Abb. 2 :** Modell der transepithelialen Cl-Sekretion; t.j. = tight junction.

Abbildung 2 gibt das für viele Cl-sezernierende Epithelien akzeptierte Transportmodell wieder. Wie bei der Na-Resorption besteht die Cl-Sekretion aus einem 2-Stufenprozeß. An der basolateralen Membran wird Cl gegen einen elektrochemischen Gradienten über einen bumetanid-sensitiven elektroneutralen Na-K-2Cl-Cotransporter in die Zelle aufgenommen. Die Triebkraft für die zelluläre Cl-Aufnahme wird durch die zelleinwärts gerichteten chemischen Gradienten für Na und Cl bereitgestellt. Der zelluläre Cl-Ausstrom über die apikale Membran erfolgt entlang eines elektro-

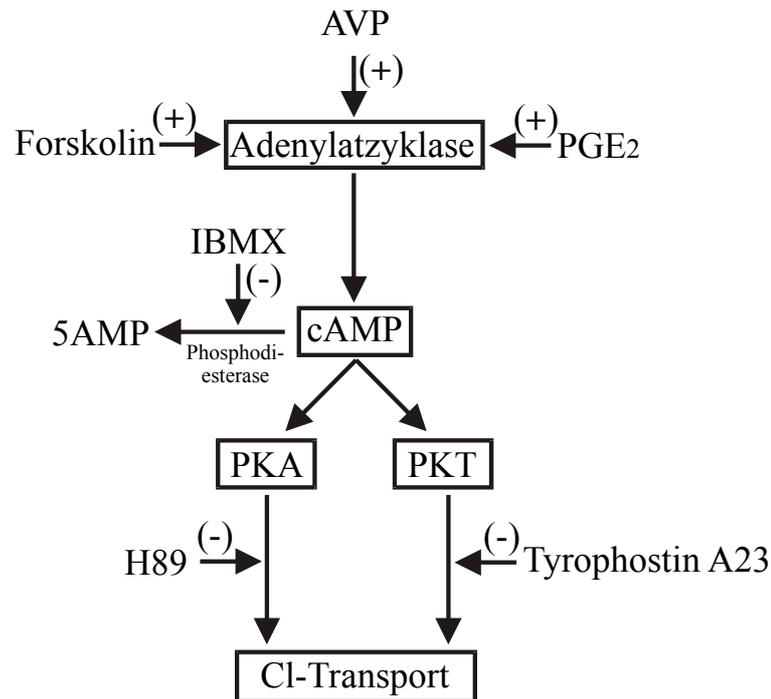
chemischen Gradienten über Cl-Kanäle. Die Na- und K-Ionen, die zusammen mit dem Cl über den Cotransporter zelleinwärts geschleust wurden, verlassen die Zelle über die Na-K-Pumpe bzw. einen K-Kanal in der basolateralen Membran.

Mit Hilfe der patch-clamp-Technik konnten in der apikalen Membran von konfluenten A6-Epithelien 2 verschiedene Cl-Kanäle charakterisiert werden (Marunaka und Eaton 1990). Während der kleinere, häufig vorkommende, cAMP- und Ca-abhängige Kanal (3pS) aufgrund seiner einwärtsrektifizierenden Eigenschaft für eine Cl-Abgabe über die apikale Membran nicht in Frage kommt, ist der seltenere cAMP-abhängige, größere Cl-Kanal (8pS) mit linearer Strom/Spannungscharakteristik für einen Cl-Efflux über die apikale Membran geeignet. Dieser Kanal ist wahrscheinlich mit dem bei der cystischen Fibrose gestörten Cl-Kanal CFTR identisch. Ein sehr großer apikaler Cl-Kanal von 360 pS, der von Nelson et al (1984) an nichtkonfluenten A6-Zellen nachgewiesen wurde, konnte an den ausgereiften A6-Epithelien nicht gefunden werden.

Der von Marunaka und Eaton beschriebene große Cl-Kanal wird nach patch-clamp-Untersuchungen von Kokko et al (1997) auch durch PGE<sub>2</sub> aktiviert. Unter PGE<sub>2</sub>-Einwirkung zeigte dieser Kanal eine Einzelleitfähigkeit von 7 pS und eine Offenwahrscheinlichkeit von 50%. Aus Impedanzanalysen wurde von Paunescu und Helman (2001) gefolgert, dass PGE<sub>2</sub> einen relativ großen Cl-Kanal in der apikalen Membran von A6-Epithelien in weniger als 1 Minute maximal stimuliert, ohne dass dabei die apikale Membrankapazität als Maß für die Membranfläche zunimmt. Dies bedeutet, dass sich die Cl-Kanäle mit großer Wahrscheinlichkeit bereits vor ihrer Aktivierung in der apikalen Zellmembran befanden. Mit Hilfe der von Kokko et al (1997) beschriebenen Kanaleigenschaften und der von Paunescu und Helman (2001) nach PGE<sub>2</sub> ermittelten Zunahme der apikalen Cl-Leitfähigkeit lässt sich eine Eröffnung von nur 190 Cl-Kanälen pro Zelle errechnen. Andererseits war die durch PGE<sub>2</sub> hervorgerufene Zunahme der Cl-Leitfähigkeit so groß, dass als Triebkraft ein elektrochemischer Gradient von nur 3 mV ausreicht um den beobachteten Cl-Strom von etwa 2  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  zu erklären. Die relativ große Zunahme der Cl-Leitfähigkeit, die sich aus den Impedanzanalysen nach der Einwirkung von PGE<sub>2</sub> ergab, lässt außerdem den Schluss zu, dass die Cl- Sekretion durch den Cl-Aufnahmeschritt an der basolateralen

Membran begrenzt wird. Durch kinetische Studien der Rb-Aufnahme über die basolaterale Membran wurde von Fan et al (1992) sichergestellt, dass die Cl-Aufnahme über die basolaterale Membran von einem Furosemid- und Bumetanid-sensitiven elektroneutralen Na-K-2Cl-Cotransporter bewerkstelligt wird.

Wie bei der hormonbedingten Steigerung des transepithelialen Na-Transports sind die intrazellulären Signalwege, die zu einer Steigerung der Cl-Sekretion führen, nicht endgültig aufgeklärt. Abbildung 3 gibt die bisher aufgedeckten cAMP-abhängigen Signalvermittlungswege wieder, über die eine Steigerung der Cl-Sekretion erzielt werden kann. Außerdem werden die verwendeten Stimulatoren der intrazellulären cAMP-Bildung sowie einige Hemmer der zellulären Signalwege aufgeführt. Wie an anderen Cl-sezernierenden Epithelien ist an der cAMP-vermittelten Aktivierung der Cl-Sekretion in A6-Epithelien die Proteinkinase A (PKA) beteiligt (Shintani und Marunaka 1996, Niisato und Marunaka 1997). Da eine Hemmung der PKA durch H98 jedoch zu keiner vollständigen Aufhebung der Cl-Sekretion führte, wurde auch die Existenz eines PKA-unabhängigen Signalweges vermutet. Nach einer kürzlich von Niisato und Marunaka (2001) veröffentlichten Arbeit wird dieser PKA-unabhängige Effekt durch die Proteintyrosinkinase (PTK) vermittelt. Nach Blockierung dieses Signalweges durch Tyrphostin A23 wurde neben einer Aufhebung des Cl-Transport-abhängigen Kurzschlussstroms eine teilweise Hemmung der apikalen Cl-Leitfähigkeit und eine vollständige Hemmung des basolateralen Na-K-2Cl-Cotransporters festgestellt. Genistein hat, wie die zelluläre Akkumulation von cAMP, einen biphasischen Effekt auf den Cl-Transport-abhängigen Kurzschlußstrom von A6-Epithelien (Niisato et al 1999). Die durch Genistein verursachten Anstiege der apikalen Cl-Leitfähigkeit und der Aktivität des basolateralen Na-K-2Cl-Cotransporters werden jedoch offensichtlich nicht durch eine indirekte Wirkung auf den zellulären cAMP-Spiegel (Hemmung der Phosphodiesterase durch Inhibition der PTK) sondern durch einen direkten Effekt von Genistein hervorgerufen. Diese Deutung basiert im wesentlichen auf der Beobachtung, dass Tyrphostin, ein Hemmer der PTK, weder apikale Cl-Kanäle noch den basolateralen Cotransporter aktiviert.



**Abb. 3 :** Signalvermittlungswege des Cl-Transportes.

Durch die Applikation von ATP und Nukleotidanaloga konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass purinergische Rezeptoren in die Regulation des Cl-Transportes eingeschaltet sind (Middleton et al 1993). Die durch ATP und Nukleotidanaloga bewirkte Aktivitätszunahme des Na-K-2Cl-Cotransporters wurde von einer Anhebung des zellulären Ca-Spiegels begleitet, wogegen die zelluläre cAMP-Konzentration unbeeinflusst blieb. Da außerdem eine ATP-abhängige Steigerung eines Cl-Effluxes und des Zellgesamtstroms durch einen Cl-Kanalblocker aufgehoben werden konnte, wurde die Cotransportaktivierung auf eine primäre, Ca-abhängige Aktivierung von Cl-Kanälen zurückgeführt.

### 3. Volumenregulation

Ein wesentlicher zellulärer Homöostase-Mechanismus ist die Regulation des zellulären Volumens. Neben den Prozessen, die für eine Konstanterhaltung des Zellvolumens unter physiologischen Gleichgewichtsbedingungen sorgen, haben die meisten bisher untersuchten Zellen die Fähigkeit bei einer Störung des Zellvolumens Gegenmaßnahmen zu ergreifen, die zu einer Normalisierung des Volumens führen. Dies

gilt auch für solche Körperzellen, die auf Grund einer sehr strengen Osmoregulation der Körperflüssigkeiten nie einer Änderung der Umgebungsmolarität ausgesetzt sind. Ausnahmen hiervon sind die renalen Markzellen und die Blutzellen, die das Nierenmark passieren. In Abhängigkeit vom Diuresezustand können diese Zellen sowohl von einem hypo- wie hypertonen Milieu umgeben sein.

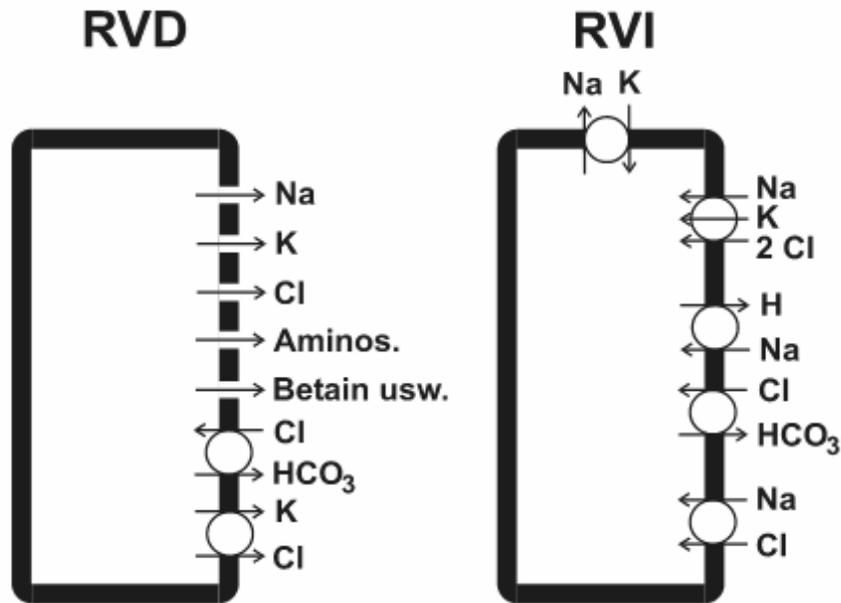
Pathologische Störungen der Körperflüssigkeitshomöostase können klinisch sowohl in Form von Hypo- wie Hypertonizität beobachtet werden. Anisotonie mit nachfolgenden Störungen der Wasserbalance können z.B. bei Störungen der ADH-Sekretion, Wasserintoxikation, angeborenem Herzfehler, Dehydratation, Diabetes mellitus und insipidus sowie bei inadäquater Behandlung mit Diuretika auftreten (McManus und Churchwell 1994). Unter physiologischen Bedingungen wurden Veränderungen des zellulären Osmolytgehaltes und damit verbundene Zellvolumenänderungen besonders in Epithelzellen beobachtet. So führen die Absorption von Zuckern und Aminosäuren zu einer Nettosubstanzaufnahme von osmotisch wirksamen Substanzen (Schütz et al 1985, MacLeod 1994) und Zellschwellung und die Sekretion in Speicheldrüsen, dem Pankreas und der Rektaldrüse des Hais zu einem Verlust von zellulären Osmolyten und Zellschrumpfung. (Petersen und Gallacher 1988; Fosket und Melvin 1989; Greger et al 1988). Formal können nach Änderung der Umgebungstonizität 4 verschiedene Formen der Zellvolumenregulation unterschieden werden:

- 1.) Regulatorische Volumenabnahme (regulatory volume decrease = RVD) nach einer durch hypotonen Schock hervorgerufenen Zellschwellung.
- 2.) Isovolumetrische Regulation (IVR) bei kontinuierlicher Abnahme der Umgebungsmolarität.
- 3.) Regulatorische Volumenzunahme (regulatory volume increase = RVI) nach einer durch Hypotonizität bedingten Zellschrumpfung.
- 4.) Pseudoregulatorische Volumenzunahme (pseudo regulatory volume increase = Pseudo-RVI) nach einer durch hypotonen Schock hervorgerufenen RVD und einer durch Wiederherstellung von isotonen Bedingungen bedingten Zellschrumpfung.

Während eine RVD nach hypotonem Streß an fast allen bisher untersuchten tierischen Zellen auftrat, konnte eine IVR bisher nur an A6-Zellen (Van Driessche et al 1997) und den Tubuluszellen der Kaninchenniere (Lohr 1990) nachgewiesen werden. Obwohl eine Pseudo-RVI nach Wiedereinführung von isotonen Bedingungen an fast allen Zelltypen ausgelöst werden konnte, trat eine RVI nach primärer Erhöhung der Umgebungsmolarität nicht bei allen Zelltypen auf. Diese Diskrepanz wurde ursprünglich damit erklärt, dass es primär wie bei der RVD zu einer Absenkung der zellulären Cl-Konzentration kommen muß, damit zur Elektrolytaufnahme befähigte Transporter (Na-K-2Cl-Cotransporter, Na-H-Austauscher) aktiviert werden (Hoffman et al 1983; Robertson und Fosket 1994). Andererseits scheint die Fähigkeit zur RVI auch von den involvierten Transportern und somit von den nach hypertonem Streß vorliegenden Elektrolytgradienten abhängig zu sein. So konnte an Ehrlich-Ascitestumorzellen erst dann eine RVI ausgelöst werden, wenn zur Erzeugung eines hypertonen Streß neben der NaCl-Konzentration auch die K-Konzentration erhöht wurde (Jensen et al 1993). Für den für die RVI an Ascitistumorzellen verantwortlichen Na-K-2Cl-Kotransporter bedeutet die Erhöhung auch der K-Konzentration eine Zunahme der zelleinwärts gerichteten Triebkraft um etwa den Faktor 2.

Die Zellvolumenregulation setzt die zelluläre Abgabe bzw. Aufnahme von Osmolyten voraus. Um dies zu erreichen, müssen Ionenkanäle und sekundär aktive Transporter aktiviert werden. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die wesentlichen an RVD und RVI beteiligten Transporter wieder. In sehr vielen Zellen wird die RVD im wesentlichen durch eine zelluläre Abgabe von K und Cl bewerkstelligt, die vorwiegend über K- und Cl-Kanäle in bestimmten Erythrozyten und Epithelzellen aber auch über einen K-Cl-Kotransporter erfolgt. (Hoffman und Dunham 1995). Der Cl-HCO<sub>3</sub>-Austauscher sorgt dafür, dass im Endeffekt mehr K als Cl die Zelle verlassen hat. Die Größe der Cl-Lücke ist unterschiedlich und im hohen Maße von der Pufferkapazität der Zellen abhängig, da die Wiederaufnahme von Cl nach dem Jacob-Stewart-Zyklus eine zelluläre Azidifizierung nach sich zieht (Freeman et al 1987). Die Abgabe von organischen Osmolyten variiert von Zell- zu Zelltyp, ist aber bei einigen Zellen wie den

renalen Markzellen (Garzia-Perez und Burs 1991) auch quantitativ von entscheidender Bedeutung.



**Abb. 4 :** Schema der an RVD und RVI beteiligten Transporter.

Die Aufnahme von K und Cl während der RVI erfolgt in vielen Zelltypen im wesentlichen über einen Na-K-2Cl-Kotransporter und/oder über eine kombinierte Aktion von Na-H- und Cl-HCO<sub>3</sub>-Austauschern. Für das Tracheaepithel konnte nach osmotisch bedingter Zellschrumpfung außerdem die Aktivierung eines K-unabhängigen Na-Cl-Kotransporters aufgezeigt werden (Musch und Field 1989). Der Na-K-2Cl-Kotransporter ist unter physiologischen Gleichgewichtsbedingungen untätig und wird erst durch die Zellschrumpfung aktiviert. Das über den Kotransporter aufgenommene Na wird über die Na-K-Pumpe gegen extrazelluläres K ausgetauscht. Der Beitrag des Na-H- und Cl-HCO<sub>3</sub>-Austauschers zur RVI variiert beträchtlich zwischen verschiedenen Zelltypen und ist neben der Kapazität und pH-Empfindlichkeit der Transporter sowie der zellulären Pufferkapazität auch von der HCO<sub>3</sub>-Konzentration im Medium abhängig. Osmotisch bedingte Zellschrumpfung aktiviert zunächst den Na-H-Austauscher und dann durch eine Erhöhung des zellulären pH auch den Cl-HCO<sub>3</sub>-Austauscher (Cala 1980; Grinstein und Fosket 1990). Liegen beide Aktivierungspunkte

nahe beieinander, also nur ein geringer Anstieg im Zell-pH erforderlich ist, um den Anionenaustauscher zu aktivieren, kommt es bei hoher Transportkapazität des Austauschers und großer Pufferkapazität zur Zellschwellung und nur geringen Veränderung des zellulären pH. Sind dagegen zelluläre Pufferkapazität und Transportkapazität des Anionenaustauschers begrenzt, erfolgt eine zelluläre Alkalinisierung ohne nennenswerte Zellvolumenzunahme. Für die unterschiedlichen RVI-Reaktionen von Zellen, die entweder in einer  $\text{HCO}_3^-$ -haltigen oder nicht- $\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Lösung inkubiert werden scheint hauptsächlich die Möglichkeit den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher durch eine Erhöhung des zellulären pH und möglicherweise der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration zu aktivieren, die entscheidende Rolle zu spielen. Bei der Inkubation von Ascitestumorzellen in  $\text{HCO}_3^-$ -freiem Medium ist allein der Na-K-2Cl-Kotransporter für die RVI verantwortlich (Hoffman et al 1993). Die osmotisch bedingte Zellschrumpfung bewirkt zwar eine Aktivierung des Na-H-Austauschers und Zellalkalisierung wobei aber der Aktivierungspunkt für den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher nicht erreicht wird. Bei Pufferung der Inkubationslösung durch  $\text{HCO}_3^-$ , bei der der zelluläre pH-Basiswert beträchtlich größer ist, trägt dagegen sowohl der Na-H- und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher zur RVI bei Kromthoef et al (1994).

Prinzipiell muss von 2 Mechanismen ausgegangen werden, die bei einer Zellvolumenverschiebung als Signale für eine Aktivitätsänderung der membranalen Transporter in Frage kommen: mechanische Veränderungen und Änderungen in den Konzentrationen der zellulären Elemente. Mechanische Änderungen betreffen Membranspannung und Deformation sowie Änderungen in der Beziehung zwischen Membran und Zytoskelett. (Luna und Hitt 1992; Mills et al 1994). Änderungen z. B. in der zytosolischen Proteinkonzentration können Volumenänderung über „Makromolekular crowding“ signalisieren (Parker 1993).

Sensoren der Signale sind mechanosensitive Kanäle wie besondere Ca-Kanäle oder cytosolische und membranale Enzymsysteme (Hoffmann und Dunham 1995).

Das Interesse an Volumenänderungen von A6-Zellen wurde geweckt, als Wills und Mitarbeiter (Wills et al 1991) zeigen konnten, dass eine moderate Absenkungen der basolateralen Osmolarität zu einer beträchtlichen Steigerung des amiloridsensitiven

transepithelialen Na-Transportes von A6-Epithelien führt. Als primäre Ursache für diese Transportsteigerung wurde eine Zunahme der Anzahl der apikalen Na-Kanäle nachgewiesen.

Um zu klären, ob die hypoosmotische Stimulation des Na-Transportes, ähnlich wie bereits von Ussing 1965 für das Froschhautepithel gezeigt, von einer Zellschwellung begleitet wird, wurde von Crowe and Wills (1991) eine Methode entwickelt, mit der das Volumen von A6-Epithelien bei gleichzeitiger Bestimmung der elektrischen Transportparameter erfasst werden kann. Das Epithelvolumen wurde dabei mit Hilfe von fluoreszierenden Mikroperlen ( $\varnothing$  1 $\mu$ m) bestimmt, die nach dem Auftragen auf apikale und basale Oberfläche mit einem Fluoreszenzmikroskop fokussiert wurden. Der Abstand zwischen apikalen und basalen Mikroperlen wurde elektrisch über ein Potentiometer ermittelt das mit dem Feinvortrieb des Mikroskops mechanisch verbunden war.

Die ersten mit dieser Volumenbestimmung durchgeführten Experimente lieferten folgende Ergebnisse (Crowe und Wills 1991):

1. Nach Absenkung der basolateralen Osmolarität ging dem Anstieg im transepithelialen Na-Transport zeitlich eine Zellschwellung voraus.
2. In einigen wenigen Fällen kam es nach Absenkung der basolateralen Osmolarität und initialer Volumenexpansion zu einer RVD.
3. Der initiale Anstieg im Zellvolumen war nach Absenkung der basolateralen Osmolarität unter Kontrollbedingungen signifikant größer als man es bei einem reinen Osmometerverhalten der Zellen erwarten würde. Die Zellen reagierten jedoch wie reine Osmometer, wenn der apikale Na-Einstrom durch Amilorid blockiert worden war.
4. Erfolgte nach Absenkung der basolateralen Osmolarität eine Reperfusion mit isotoner Lösung, gingen Na-Transport und Zellvolumen in etwa auf den Kontrollwert zurück.

Eine eingehendere Analyse des Volumens von A6-Zellen in Abhängigkeit von den äußeren osmotischen Bedingungen wurde in der Folgezeit von Van Driessche und Mitarbeitern vorgenommen. Zur Volumenbestimmung wurde dabei eine modifizierte

Version der von Crowe und Wills (1991) eingeführten Methode verwendet, mit der eine nahezu kontinuierliche Erfassung des Zellvolumens (Abstand der Einzelmessungen 6s) bei einer räumlichen Auflösung von 0,1 µm möglich war. Schon bei der Erprobung der verbesserten Methode (Van Driessche 1993) wurden bereits wesentliche Erkenntnisse über das Verhalten des Volumens von A6-Zellen nach Änderung der Zusammensetzung und Osmolarität der Inkubationslösung gewonnen. Wie bereits für andere dichte Epithelien beschrieben, (Kachadorian et al 1985) hatte eine Absenkung der apikalen Osmolarität keinen signifikanten Einfluß auf das Zellvolumen. Dies kann nur bedeuten, dass ähnlich wie bereits für andere dichte Epithelien unter Basisbedingungen gezeigt, die apikale Wasserpermeabilität relativ gering ist. Ein osmotischer Ersatz des NaCl in der basolateralen Ringerlösung durch Sukrose mit einem hohen Reflexionskoeffizienten von ca. 1 hatte keinen Einfluß auf das Zellvolumen. Wurde dagegen die Sukrose durch Glycerol mit einem Reflexionskoeffizient von nur 0,77 ersetzt, kam es zu einem Anstieg des Zellvolumens ohne erkennbare nachfolgende RVD. Eine Absenkung der basolateralen Osmolarität führte zu einer initialen Volumenzunahme mit anschließender RVD. Im Gegensatz zu den Versuchen von Wills et al (1991), in denen eine RVD nach vorangegangenem hypotonen Stress nur gelegentlich auftrat, wurde eine solche Volumenregulation in allen Fällen beobachtet. Diese Diskrepanz wurde von Van Driessche und Mitarbeitern damit erklärt, dass die Osmolaritätsabsenkung in ihren Experimenten stärker ausgeprägt und/oder die Zellzüchtung möglicherweise unterschiedlich abgelaufen war.

Weitere Einsichten in das Volumenverhalten von A6-Zellen ergaben sich aus nachfolgenden Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von zellulärem K und Cl und Effekten des transepithelialen Na-Transports auf die RVD befassten (De Smet et al 1995 b und c).

Unter Kontrollbedingungen kam es während der Kammerinkubation zu einem geringfügigen Abfall des Zellvolumens von A6-Zellen, der weder durch Absenkung der apikalen Osmolarität noch durch die Wegnahme von apikalem Na wesentlich beeinflusst wurde. Eine Aufhebung des transepithelialen Na-Transportes durch Hemmung der Na-K-Pumpe mit Ouabain führte dagegen zu einem Anstieg des

Zellvolumens, der wohl auf einen extrazellulären Zustrom von NaCl zurückgeführt werden muß (Borgmann et al 1994). Oxytocin und Insulin bewirkten zwar eine beträchtliche Steigerung des Na-Transports hatten aber keinen wesentlichen Einfluß auf das Zellvolumen. Da es unter der Einwirkung von Oxytocin auch dann nicht zu nennenswerten Änderungen des Zellvolumens kam, wenn die apikale Osmolarität drastisch von 260 auf 60 mosmol/kg vermindert wurde, scheint Oxytocin im Gegensatz zu Beobachtungen an anderen dichten Epithelien (Frindt et al 1982 aus De Smet II., 1995; Handler 1981) keine Steigerung der apikalen Wasserpermeabilität hervor zu rufen. Die basolaterale Applikation von den K-Kanalblockern Ba und Quinin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. Während beide Substanzen eine massive Hemmung des Na-Transportes bewirkten, stieg das Zellvolumen zwar unter der Einwirkung von Ba nicht aber unter der von Quinin an. Dies wurde damit erklärt, dass Quinin im Gegensatz zu Ba nur volumenaktivierte K-Kanäle blockiert. Danach würde es also unter der Einwirkung von Ba über die Hemmung von basolateralen K-Kanälen neben einer Abnahme des Na-Transports zu einer zellulären K-Akkumulation und Zellschwellung kommen, wogegen Quinin auf einem anderen Weg als durch Blockade der K-Kanäle den Na-Transport beeinflusst. Bei Wiedereinführung von isotonen Bedingungen nach vorangegangenem hypotonen Stress verhalten sich die A6-Zellen wie perfekte Osmometer, da die dabei auftretende Abnahme des Zellvolumens unter den Kontrollwert nicht mit einer Pseudo-RVI beantwortet wurde. Nach Einführung eines zweiten hypotonen Stress, wobei das Ausmaß der Hypotonizität gleich groß war wie beim ersten Stress, stieg das Volumen der A6-Zelle auf Werte wie am Ende des 1. hypotonen Stress an. Die Beobachtung, dass der 2. hypotone Stress keine weitere RVD in Gang setzt, wurde so interpretiert, dass sich das Zellvolumen auf nahezu den „Set point“ (Kontrollwert) einstellte. Nach dem „Set point“-Konzept (Parker 1993) werden aber volumenregulatorische Prozesse erst ausgelöst, wenn das „Set-point“-Volumen überschritten wird. Die Möglichkeit, dass ein durch die 1. RVD bedingter Mangel an zellulären Osmolyten für das Ausbleiben einer 2. RVD verantwortlich ist, konnte durch Experimente ausgeschlossen werden, in denen der 2. hypotone Stress stärker ausgeprägt

war als der erste. Bei diesem Vorgehen, bei dem das Zellvolumen über den „Set point“ hinaus anstieg, wurde nämlich eine 2. RVD ausgelöst.

Die von De Smet und Mitarbeitern (De Smet et al 1995 b und c) verwendeten experimentellen Bedingungen (Änderung der ionalen Zusammensetzung der Inkubationslösung, Einsatz von Kanalblockern) lieferten außerdem Hinweise darauf, dass zelluläre Verluste von K und Cl eine wesentliche Voraussetzung für die RVD bilden und dass beide Ionen die A6-Zellen auf einem konduktiven Transportweg verlassen. Eine drastische Verzögerung und Reduktion der RVD nach Austausch von Cl gegen Sulfat oder Glutamat deutete auf eine wesentliche Beteiligung von Cl an der RVD hin. Die noch zu beobachtende reduzierte RVD könnte auf einen Cl-unabhängigen Mechanismus beruhen, wobei es zu einer zellulären Abgabe von anderen Anionen wie  $\text{HCO}_3$  und Aminosäuren kommt. Da Nitrat als Ersatzanion die RVD nicht hemmte, sollte der zelluläre Efflux von Cl während der RVD über Kanäle erfolgen. Für Nitrat konnte nämlich gezeigt werden, dass es zwar Cl-Kanäle passieren kann, nicht aber von Kotransportern akzeptiert wird (Berkowitz und Orringer 1987; Brugnara und Tostesen 1987). Von Ehrenfeld und Mitarbeitern (Ehrenfeld et al 1994) konnte zudem gleichzeitig gezeigt werden, dass der Cl-Kanalblocker NPPB eine osmotisch initiierte RVD an A6-Zellen hemmt.

Für eine Beteiligung von K als Begleitkation an der RVD von A6-Zellen konnte eine ganze Reihe von Hinweisen erhalten werden. Bei Na-freier Inkubation der apikalen Seite war die RVD stärker ausgeprägt als unter Kontrollbedingungen, was auf eine unterschiedliche ionale Zellzusammensetzung (Austausch von zellulärem Na gegen extrazelluläres K) zurückgeführt werden könnte (Rick et al 1978). Wurde dagegen der Na-Transport durch Hemmung der Na-K-Pumpe mit Ouabain aufgehoben, kam es nach hypotonem Stress zwar zur Zellexpansion nicht aber zur RVD. Da eine Hemmung der Na-K-Pumpe an dichten Epithelien zu einem fast vollständigen Austausch von zellulärem K gegen extrazelluläres Na führt (Borgmann et al 1994), deutet dieser Befund auf eine wesentliche Beteiligung des zellulären K an der RVD hin. Während basolateral appliziertes Ba die RVD teilweise aufhob, kam es nach basolateraler Zugabe von Quinin und Depolarisation der basolateralen Membran durch Erhöhung der basalen

K-Konzentrationen zur vollständigen Hemmung der RVD. Sowohl die Hemmung der RVD durch K-Kanalblocker als auch die Hemmung durch Wegnahme eines zellauswärts gerichteten elektrochemischen K-Gradienten spricht dafür, dass das K während der RVD die Zelle über volumenaktivierte K-Kanäle verlässt. In Anwesenheit von Oxytocin kam es unmittelbar nach dem hypotonen Stress zu einem geringeren Zellvolumenanstieg, was auf eine sehr früh einsetzende RVD hinweist. Dies würde auch mit dem Befund im Einklang stehen, dass Oxytocin konduktive Transportwege für Cl (3, 20 aus De Smet und Van Driessche 1992.; Marunaka und Tokda 1993) und K (30 aus Van Driessche und Erlj 1988) aktiviert.

Aus zellulären Rb-Efflux-Studien, die unter der Einwirkung verschiedener K-Kanalblocker durchgeführt wurden, wurde geschlossen, dass der zelluläre K-Verlust, wenn er während der RVD von A6-Zellen im wesentlichen über einen nichtselektiven lanthanid-sensitiven basolateralen Kationenkanal erfolgt (De Smet et al 1998) den neben K und Rb auch Methylammonium und Guanidinium passieren können (Li et al 1998).

Wurden A6-Zellen einem hypotonem Stress ausgesetzt, der durch kontinuierliche Absenkung der basolateralen Osmolarität erzielt wurde, kam es bei niedrigen Verdünnungsraten bis zu 1,5 mosmol/min zu keiner nennenswerten Änderung des Zellvolumens (Van Driessche et al 1997). Bei höheren Verdünnungsraten von 3 und 6 mosmol/min war die isovolumetrische Volumenregulation aufgehoben und es kam zum Zellvolumenanstieg. Da es bei einem Ersatz von basolateralem Cl durch NO<sub>3</sub> und SCN zwar zur Hemmung der IVR nicht aber der RVD kam, wurde gefolgert, dass unterschiedliche Mechanismen involviert sind, um das Zellvolumen nach kontinuierlicher und akuter Absenkung der basolateralen Osmolarität zu kontrollieren. Aus Bestimmungen des zellulären K-Gehalts vor und nach hypotonem Stress ergab sich ein zellulärer K-Verlust, der zusammen mit dem Verlust eines einwertigen Anions erfolgt, 70% des zu erwartenden Osmolytverlusts ausmacht (Van Driessche et al 1997). Eine Beteiligung von Cl an dem zellulären Osmolytverlust während der RVD wurde durch Bestimmungen der zellulären Cl-Aktivität nachgewiesen (Brochiero et al 1995).

Um zu prüfen, ob auch Aminosäuren an der RVD von A6-Zellen beteiligt sind, wurden die zellulären Konzentrationen vor und nach dem hypotonen Stress sowie der zelluläre Efflux der Aminosäuren analysiert (De Smet et al 1995 b und c). Obwohl sich die Aminosäuren sehr unterschiedlich verhielten und einige von ihnen sogar während der RVD geringfügig anstiegen, kam es insgesamt zu einem zellulären Verlust von 8,4 mM während der RVD. Die Schlussfolgerung, dass dieser Aminosäurenverlust nicht den ganzen während der RVD zu erwartenden Osmolytverlust abdeckt, konnte auch experimentell bestätigt werden. In Experimenten, in denen die nur am Verlust beteiligten Aminosäuren (Glutamat, Aspartat, Glycin) in der Inkubationslösung in höherer Konzentration als in der Zelle vorkamen, konnte die RVD nach vorangegangenem hypotonen Stress nicht unterbunden werden. An dem gesamten zellulären Osmolytverlust, der ursächlich während der RVD auftreten sollte, war der Aminosäureefflux zu etwa 20% beteiligt.



## Methoden

### 1. Kultivierung von A6-Zellen

#### 1.1 A6-Zellen

Die Versuche wurden an konfluenten A6-Epithelien durchgeführt, die auf permeablen Filtermembranen gezüchtet worden waren. Die ursprünglich aus Nierenzellen des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) gezüchteten A6-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Van Driessche (Leuven, Belgien) bei der American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA) beschafft und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

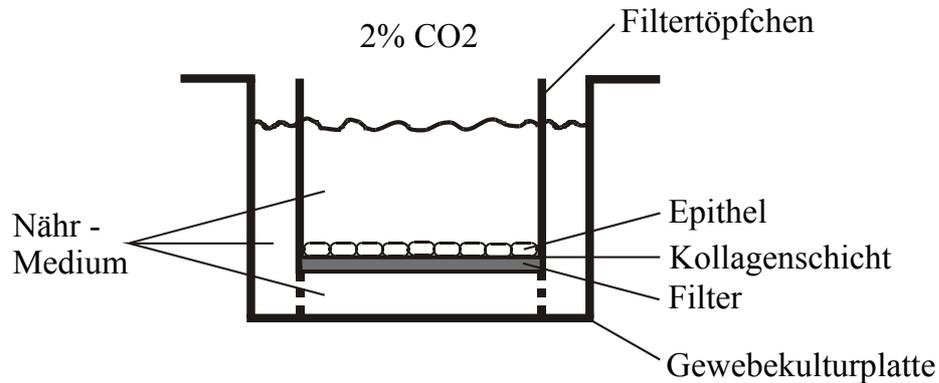
#### 1.2 Inkubation und Nährmedium der A6-Zellen

Die A6-Zellen wurden in einem Spezialmedium bei 27° C in einem Brutschrank (MCO-17 AI, CO<sub>2</sub>, Sanyo, Japan) kultiviert. Die Inkubationsluft hatte eine hohe Luftfeuchtigkeit und enthielt 2 % CO<sub>2</sub>. Das Nährmedium wurde zweimal wöchentlich unter aseptischen Bedingungen gegen frisches ausgetauscht.

Das Nährmedium war eine Komposition aus 350 ml Leibowitz F-15 Medium (Gibco BRL, Karlsruhe, 11415-049), 350 ml Nutrient Mixture Ham F-12 (Gibco BRL, Karlsruhe, 21765-029), 200 ml bidestilliertem Wasser, 100 ml fötalem Kälberserum (Seromed, Berlin, S0213), 20 ml 200 millimolarer L-Glutaminlösung (Gibco BRL, Karlsruhe, 25030-024), 20 ml Penicillin-Streptomycinlösung (Gibco BRL, Karlsruhe, 15070-022) und 3 ml 7,5 prozentige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Gibco BRL, Karlsruhe, 25080-060). Ein solcher Ansatz ergab ein Mediumvolumen von 1043 ml. Das Medium hatte eine Osmolalität von 260 mosmol/kg und einen pH-Wert von 7,4. Das fertige Medium einschließlich des fötalen Kälberserums wurde mit Flaschenaufsatzfiltern, die einen Porendurchmesser von 0,2 µm hatten (Falcon 7111, Becton & Dickinson, N.J., USA), in autoklavierten Glasflaschen steril filtriert und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei +4° C gelagert. Die Zugabe des fötalen Kälberserums vor der Sterilfiltration und nicht wie sonst üblich danach war nötig, da einige Chargen des verwendeten Serums in mehreren Anzuchtungen als Quelle für aufgetretene Hefeinfektionen der Zellkulturen identifiziert wurden.

### 1.3 Splitten und Aussaat von A6-Zellen

In Zellkulturflaschen ausgesäte A6-Zellen bildeten innerhalb weniger Tage ein konfluentes Epithel aus. Aus dem am Boden der Zellkulturflaschen anhaftenden Epithel wurden dann Einzelzellen gewonnen. Dazu wurde das Epithel von altem Medium befreit, mit PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, München, 1000-3) gespült und für 10 bis 45 min in 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, Karlsruhe, 45300-019) inkubiert. Sobald sich das Epithel von der Unterlage abgelöst hatte und der Zellverband anfang sich aufzulösen, wurde der Zellsuspension 10 ml Nährmedium zugegeben. Durch das im Nährmedium enthaltene Ca wurde die Enzymaktivität sofort gestoppt. Durch wiederholtes Aufziehen der Zellsuspension in eine 13 ml Kunststoffeinmalpipette wurden noch vorhandene kleinere Zellverbände mechanisch so weit getrennt bis die Suspension nur noch Einzelzellen enthielt. Die Zellkonzentration dieser Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Invertlichtmikroskops bei 100-facher Vergrößerung bestimmt. Danach wurden die Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Filter oder in Kulturflaschen ausgesät und mit zusätzlichem Nährmedium versehen. Um eine ausreichende Ernährung der Zellen für drei bis vier Tage sicher zu stellen, war eine 0,5 cm hohe Mediumsschicht über den Zellen ausreichend. Die in den Kulturflaschen ausgesäten Zellen dienten der Weiterzucht der A6-Zelllinie. Die Aussaat auf Filtermembranen diente der Gewinnung von konfluenten A6-Epithelien. Dabei kamen zwei unterschiedliche Filtergrößen zur Anwendung. Für Versuche in denen auch transepitheliale Transportparameter erfasst werden sollten, wurden große Epithelflächen (5,47 cm<sup>2</sup>) gewonnen, die komplikationslos in Ussingkammern eingesetzt werden konnten. Für einige andere Inkubationsversuche wurden die Epithelien auf kleine Filtermembranen (0,7 cm<sup>2</sup>) gezogen. Nach 10 Tagen hatten sich konfluente und reife Epithelien ausgebildet. Für die Versuche wurden Epithelien verwendet, die 10 – 14 Tage lang gezüchtet worden waren. Abbildung 5 gibt schematisch die Anordnung wieder, die bei der Züchtung von A6-Epithelien auf permeablen Filtermembranen vorlag. Die Filtermembran



**Abb. 5 :** Anordnung zur Züchtung von A6-Epithelien auf Filtermembranen.

(Porendurchmesser 0,2  $\mu\text{m}$ ), die den Boden eines kleinen Kunststoffgefäßes bildete, war an ihrer Oberseite mit einer dünnen Kollagenschicht versehen worden, auf der sich die Epithelzellen befanden. Das Millicell-CM-Filtertöpfchen (Millipore, Eschborn) stand in einer Vertiefung einer Zellkulturplatte (Nunc, Roskilde, DK, 152795), die wie das Filtertöpfchen, Nährmedium enthält.

Bei der Aussaat der Zellen und der Zugabe des Nährmediums wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde Zellsuspension (ca. 0,1 ml) auf die Kollagenschicht gegeben und das Filtertöpfchen mit Nährmedium gefüllt. Danach wurde Nährmedium in die Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Flüssigkeitsspiegel in der Vertiefung der Kulturplatte und dem Filtertöpfchen gleich hoch waren, so dass Druckunterschiede über das Epithel hinweg nicht vorkamen. Um Druckunterschiede zwischen den beiden Epithelseiten beim Wechseln des Nährmediums zu vermeiden, die zur Ablösung des Epithels führen könnten, wurde das Innere des Töpfchens immer zuletzt abgesaugt und zuerst gefüllt.

Die Kollagenschicht diente der besseren Anhaftung der Zellen. Zur Herstellung der dünnen Kollagenschicht wurde eine Kollagenlösung verwendet, die aus 10 mg Rattenschwanzkollagen Typ I (Sigma, Heidelberg, C7661) und 4 ml 0,2-prozentiger Essigsäure bestand. Damit die Kollagenlösung gleichmäßig auf der Filteroberfläche verteilt werden konnte, wurde sie 1:3 in reinem Ethanol verdünnt. Von dieser Zubereitung wurden etwa 25  $\mu\text{l}$  auf 1  $\text{cm}^2$  Filteroberfläche aufgetragen und mit der Pipettenspitze solange verteilt, bis die gesamte Filteroberfläche benetzt war. Danach wurden die Filter über Nacht unter aseptischen Bedingungen getrocknet.

#### **1.4 Einfrieren und Auftauen von A6-Zellen**

Zum Einfrieren wurden die A6-Zellen zunächst in oben beschriebener Weise abtrypsiniert, in +4° C kaltem Nährmedium aufgenommen und in einer Kühlzentrifuge bei 120 g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 1 ml auf +4° C gekühltem Frostschutzmedium aus einem Teil DMSO-Lösung (Sigma, Deisenhofen, D2650) und neun Teilen fötalem Kälberserum resuspendiert und in Kryoröhrchen (Greiner, Frickenhausen, 121261) gegeben. Danach erfolgte die Einfrierung der A6-Zellen in einem Gefrierschrank bei –80° C. Um den Einfriervorgang etwas zu verzögern, wurden die Kryoröhrchen in Styropor verpackt. Nach etwa 24 Stunden wurden die Röhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt, in dem die Epithelzellen über Monate aufbewahrt werden konnten.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei Raumtemperatur aufgewärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit 10 ml Nährmedium versehen und in eine Kulturflasche gegeben. Die Zellen begannen sofort ein neues Epithel am Flaschenboden zu bilden. Nach 24 Stunden wurden dann durch den ersten Mediumwechsel alle nicht vitalen Zellen entfernt.

## 2. Experimentelle Bedingungen

### 2.1 Akute Änderung der basolateralen Osmolarität

#### 2.1.1 Inkubationslösungen

Nach Ausbildung von konfluenten Epithelflächen wurden die A6-Epithelien seitengetreunt in Lösungen unterschiedlicher Osmolarität inkubiert. In Tabelle 1 werden die Zusammensetzungen und Osmolaritäten der verwendeten Badelösungen wiedergegeben. Die normale Ringerlösung hatte eine Elektrolytzusammensetzung, die

**Tabelle 1** : Zusammensetzung und Osmolarität der Badelösungen ( in mmol/l und mosmol/l.)

	<b>Ringer-Lsg.</b>	<b>Na-freie, hypotone Lsg.</b>	<b>hypotone Lsg.</b>
<b>Na</b>	140	—	70
<b>Cl</b>	142	72	72
<b>NMDG*</b>	—	70	—
<b>K</b>	2,5	2,5	2,5
<b>Ca</b>	1	1	1
<b>HCO<sub>3</sub></b>	2,5	2,5	2,5
<b>Osmolarität</b>	260	140	140

\**N-Methyl-D-Glucamin*

weitgehend der des Nährmediums entsprach. Die Ringerlösung bestand aus 140 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KHCO<sub>3</sub> und 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub> und hatte eine Osmolarität von 260 mosmol/l. Im Vergleich zur Ringerlösung enthielt die Na-freie, hypotone Lösung anstelle von 140 mmol/l NaCl 70 mmol/l NMDG-Cl und die hypotone Lösung anstelle von 140 mmol/l NaCl nur 70 mmol/l NaCl. Beide hypotonen Lösungen besaßen eine Osmolarität von 140 mosmol/l. Alle Lösungen wurden bei Raumtemperatur mit KOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Die Osmolarität der fertigen Lösungen wurde mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers (5100B, Wescor Logan, Ut, USA) kontrolliert.

**Tabelle 2 :** *Versuchsablauf bei akuter Osmolaritätsänderung.*

	<b>Inkubation</b>		<b>Dauer</b>
	apikal	basolateral	
<b>1. Einlaufphase</b>	Ringer-Lsg.	Ringer-Lsg.	30 min
<b>2. Kontrollphase</b>	Na-freie, hypotone Lsg.	Ringer-Lsg.	60 min
<b>3. hypotoner Stress</b>	Na-freie, hypotone Lsg.	hypotone Lsg.	2 min bzw. 60 min
<b>4. Aufhebung des hypotonen Stress</b>	Na-freie, hypotone Lsg.	Ringer-Lsg.	2 min bzw. 30 min

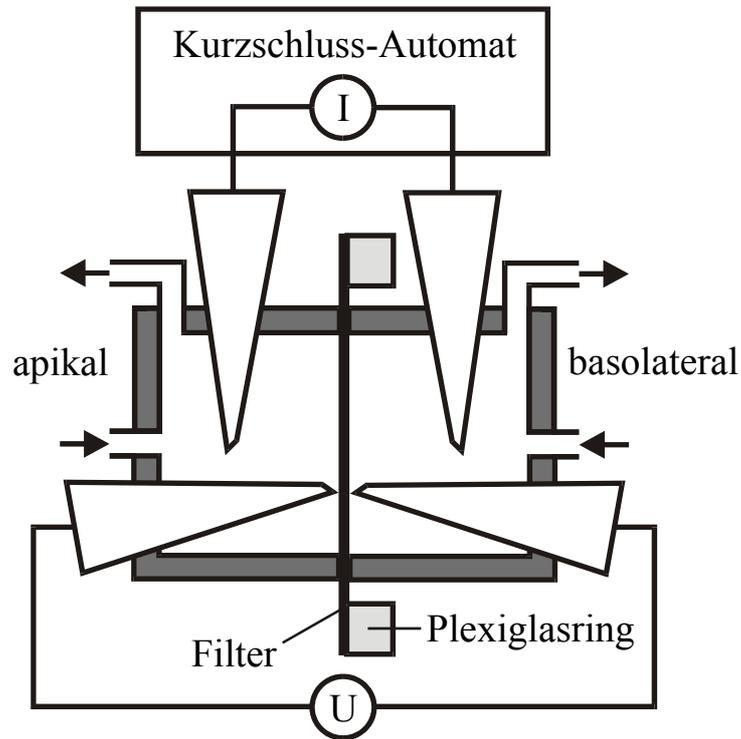
### 2.1.2 Versuchsablauf

Tabelle 2 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf, der bei den akuten Änderungen der basolateralen Osmolarität eingehalten wurde. Nach einer Einlaufphase von 30 Minuten, in der beide Seiten des Epithels mit Ringerlösung inkubiert wurden, wurde die apikale Lösung gegen die Na-freie, hypotone Lösung ausgetauscht. Nach einer Kontrollphase von 60 Minuten wurden die Epithelien durch Austausch der basolateralen Ringerlösung gegen die hypotone Lösung einem akuten hypotonen Stress ausgesetzt. Der hypoosmotische Schock dauerte entweder 2 oder 60 Minuten. Nach 60 Minuten hypotonem Stress wurde dieser durch Wechsel der hypotonen Lösung auf der basolateralen Seite gegen die normale, isotone Ringerlösung wieder aufgehoben. In der Hälfte der Fälle erfolgte die Wiederherstellung von isotonen Bedingungen in der Gegenwart von  $10^{-4}$  M Bumetanid. Hierzu wurde die basolaterale hypotone Lösung zehn Minuten vor dem Lösungswechsel gegen eine Bumetanid-haltige Lösung

ausgetauscht und die isotone Wechsellösung mit Bumetanid versehen. Nach jeder in der Tabelle angegebenen Zeit wurden Epithelien entnommen und eingefroren. Für die Versuche, in denen der hypotone Stress 60 und die Reperfusion mit isotoner Ringerlösung 30 Minuten andauerte, wurden die auf großen Filtern gezüchteten Epithelien in Ussingkammern inkubiert. Bei kurzzeitigem hypertonen Stress und kurzzeitiger isotoner Reperfusion von 2 Minuten wurden die auf den kleinen Filtermembranen gewachsenen Epithelien verwendet. Die Inkubation erfolgte dabei in den bei der Züchtung verwendeten Filtertöpfchen.

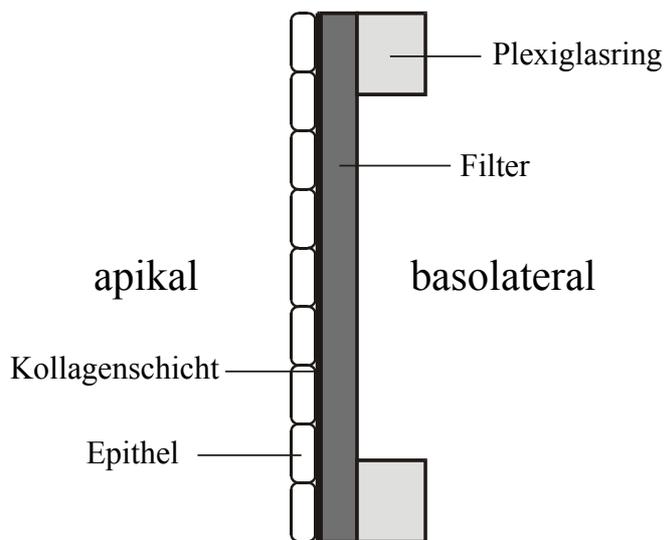
### **2.1.3 Inkubation in Ussingkammern**

Um neben einer seitengetrenten Inkubation auch transepitheliale, elektrische Transportparameter erfassen zu können, wurden Stücke der großen Filter mit anhaftendem Epithel in Ussingkammern eingespannt. Abbildung 6a gibt den schematischen Aufbau einer Ussingkammer wieder. Zur Fixierung des Epithels wurde der Boden eines Filtertöpfchens auf einen zuvor mit Histo-Acrylklebstoff (Braun, Melsungen, Deutschland) bestrichenen Plexiglasring geklebt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Skalpell die auf den Ring aufgeklebte Filtermembran ausgeschnitten und der Plexiglasring in die Ussingkammer eingesetzt. Abbildung 6b zeigt schematisch die Filtermembran mit dem anhaftenden Epithel auf dem Plexiglasring. Die exponierte Epithelfläche betrug  $0,5 \text{ cm}^2$ . Die Ussingkammer bildete mit dem eingelegten Probenring zwei durch das Epithel getrennte Flüssigkeitsräume, die durch je einen Zu- und einen Überlauf mit getrennten Inkubationslösungen perfundiert werden konnten. In jedem dieser Flüssigkeitsräume waren zwei Silber/Silberchloridelektroden eingebracht. Abbildung 6c zeigt den schematischen Aufbau der aus Kunststoffpipettenspitzen selbst hergestellten Elektroden. Die Pipettenspitzen wurden zur Hälfte mit einer frisch gekochten, flüssigen Agar-Agar/KCl-Lösung gefüllt. Die Lösung bestand zu 3 % aus Agar-Agar und enthielt eine KCl-Konzentration von 3 M. Nachdem die Lösung abgekühlt und fest geworden war, wurde die Pipettenspitze mit 3 M KCl-Lösung aufgefüllt, ein elektrophoretisch mit AgCl überzogener Silberdraht eingebracht und die Elektrode mit einem Gummistopfen verschlossen. Ein Elektrodenpaar diente als

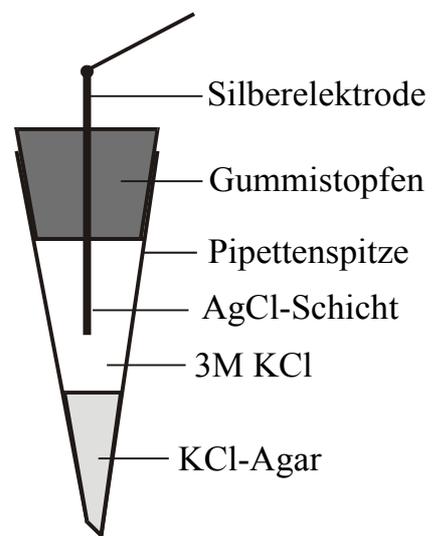


**Abb. 6a :** Schematische Darstellung der Perfusions-Ussing-Kammer.

*I* = Strommessgerät; *U* = Spannungsmessgerät



**Abb. 6b :**  
Plexiglasring mit aufgeklebtem  
Epithel.



**Abb. 6c :**  
Aufbau einer Ag-AgCl-Elektrode.

Stromelektroden und war mit einem Kurzschlussautomaten (Frankenberger, Germering) verbunden. Über das zweite Elektronenpaar, das mit einem mV-Meter verbunden war, wurde die transepitheliale Spannung registriert. Die Spannungselektroden waren so in die Kammer eingebracht, dass ihre Spitzen nur ca. 1 mm von dem Epithel entfernt waren. Auf diese Weise wurde der Widerstand, den die Inkubationslösungen zwischen den Elektrodenspitzen und der Epitheloberfläche verursacht, vernachlässigbar klein gehalten.

In den ersten 10 Minuten der Einlaufphase wurde über die Spannungselektroden das spontan anfallende, transepitheliale Potential ermittelt. Das Epithel wurde dann elektrisch kurzgeschlossen und der Kurzschlussstrom und die transepitheliale Leitfähigkeit über den weiteren Verlauf der Experimente mit Hilfe des Kurzschlussautomaten bestimmt. Der Kurzschlussstrom entspricht dem Kompensationsstrom mit dem das transepitheliale Potential aufgehoben wird und ist ein Maß für die über das Epithel ablaufende Nettoionenbewegungen. Um die transepitheliale Leitfähigkeit (G) zu erhalten, wurden von dem Kurzschlussautomaten 10 mV große Spannungsimpulse von 0,5 Sekunden Dauer alle 5 Sekunden appliziert. Aus der Höhe des Spannungsimpulses und der durch den Spannungsimpuls bewirkten Abweichung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I$ ) wurde vom Kurzschlussautomaten nach dem Ohmschen

$$G = \frac{\Delta I}{10mV}$$

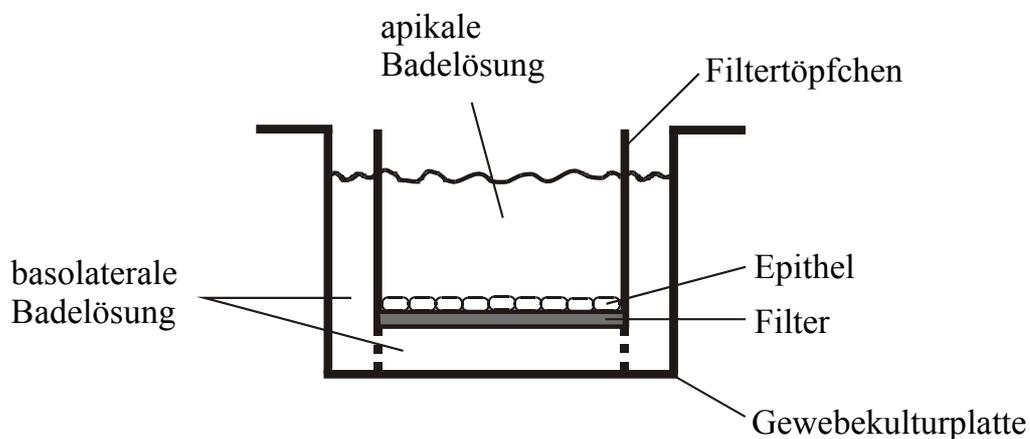
Gesetz die transepitheliale Leitfähigkeit errechnet. Alle elektrischen Daten wurden mit einem Kompensationsschreiber (Philips, Hamburg, PM8252A) registriert.

Während der Versuche wurden die beiden Ussing-Halbkammern ständig mit Hilfe von 2 Schlauchpumpen mit den entsprechenden Inkubationslösungen perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 5 ml/min.

#### **2.1.4 Inkubation im Filtertöpfchen**

Bei kurzzeitiger basolateraler Hypotonie und isotoner Reperfusion erfolgte die Inkubation ohne gleichzeitige Bestimmung der elektrischen Transportparameter in den bei der Züchtung verwendeten Filtertöpfchen. Der Wechsel der Inkubationslösungen

wurde mit Hilfe von Pipetten durchgeführt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Inkubationsdauer von nur 2 Minuten exakt einhalten zu können. Gegenüber der Inkubation in den Ussing-Kammern hatte die Inkubation in den Filtertöpfchen den Vorteil, dass ein Lösungswechsel abrupter durchgeführt und das Epithel rascher entnommen werden konnte. Abbildung 7 zeigt im Schema die Versuchsanordnung, die bei den Kurzzeitinkubationen vorlag. Das Filtertöpfchen, das auf 4 Füßchen in der Vertiefung der Kulturplatten stand, bildete die Trennung zwischen apikalem und basolateralem Flüssigkeitsraum. Sowohl der apikale (Inhalt des Töpfchens) wie der basolaterale Raum (Vertiefung der Kulturplatte) wurden gleich hoch mit Inkubationslösung aufgefüllt. Mögliche Änderungen in der Elektrolytzusammensetzung der Badelösungen durch trans- oder parazelluläre Flüsse wurden dadurch minimiert, dass die Lösungen in der Einlauf- und Kontrollphase alle fünf Minuten gegen frische ausgetauscht wurden. Um auch hier ein Ablösen des Epithels durch hydrostatische Druckunterschiede zu verhindern, wurde beim Wechseln der Lösungen stets die Reihenfolge eingehalten, wie sie für das Wechseln des Nährmediums bei der Züchtung der Epithelien beschrieben wurde.



**Abb. 7 :** Versuchsanordnung bei der Inkubation von A6-Epithelien im Filtertöpfchen.

## 2.2 Kontinuierliche Abnahme der basolateralen Osmolarität

### 2.2.1 Versuchsablauf

Tabelle 3 enthält eine Übersicht über die verschiedenen Inkubationsphasen, die bei der kontinuierlichen Absenkung der basolateralen Osmolarität eingehalten wurden. Wie bei den akuten Osmolaritätsänderungen wurden die Epithelien in der Einlaufphase für 30

Minuten beidseitig mit Ringerlösung und dann in der Kontrollphase für 60 Minuten apikal mit der Na-freien, hypotonen Lösung und basolateral mit Ringerlösung inkubiert. In der experimentellen Phase wurde die basolaterale Osmolarität über 60 oder 120 Minuten kontinuierlich von 260 auf 200 bzw. 140 mosmol/l herabgesetzt.

**Tabelle 3 :** *Ablauf der Versuche zur kontinuierlichen Osmolaritätsabsenkung.*

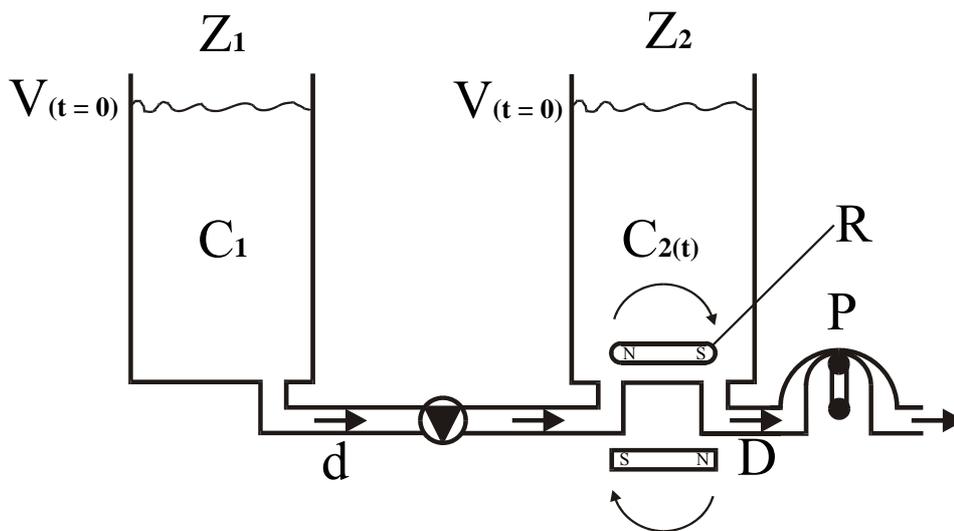
	<b>Inkubation</b>		<b>Dauer</b>
	apikal	basolateral	
<b>1. Einlaufphase</b>	Ringer-Lsg.	Ringer-Lsg.	30 min
<b>2. Kontrollphase</b>	Na-freie hypotone Lsg.	Ringer-Lsg.	60 min
<b>3. Experimentelle Phase</b>	Na-freie hypotone Lsg.	Lsg. abnehmender Osmolarität	60 min*
		(1 mosmol/l · min <sup>-1</sup> )	120 min*

\* nach 60 und 120 min war die Osmolarität von 260 auf 200 bzw. 140 mosmol/l abgefallen.

Die Versuche wurden an den auf großen Filtermembranen gezüchteten Epithelien in Ussingkammern durchgeführt. Die elektrischen Bedingungen, unter denen die Epithelien gehalten wurden, entsprachen denen bei akuter Osmolaritätsänderung. Die kontinuierliche Absenkung der basolateralen Osmolarität erfolgte in einem Gradientenmixer.

### 2.2.2 Gradientenmixer

Für die kontinuierliche Osmolaritätsabsenkung der basolateralen Badelösung wurde ein Gradientenmixer (Eigenbau) verwendet. Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau des Gradientenmixers, der im wesentlichen aus 2 miteinander verbundenen, identischen Zylindern ( $Z_1$  und  $Z_2$ ), einer Entnahmepumpe (P) und einem Rührsystem (R) bestand.



**Abb. 8 :** Aufbau des Gradientenmixers.

$Z_1$  = Zylinder 1,  $Z_2$  = Zylinder 2,  $V_{(t=0)}$  = Volumen zum Startzeitpunkt,

$C_1$  = Konzentration im Zylinder 1,  $C_{2(t)}$  = zeitabhängige Konzentration im Zylinder 2,

$d$  = Fluss von  $Z_1$  zu  $Z_2$ ,  $D$  = Entnahmefluss aus  $Z_2$ ,  $R$  = Rührsystem,

$P$  = Entnahmepumpe

Zur kontinuierlichen Absenkung der Osmolarität (Osmolaritätsrampe) wurden aus dem Gradientenmixer mit Hilfe der Schlauchpumpe P 5 ml/min entnommen und der basolateralen Kammerhälfte zugeführt. Zu Beginn des Versuchs waren beide Zylinder mit 400 ml Lösung gefüllt. Im Zylinder  $Z_2$  befand sich normale Ringerlösung (Osmolarität 260 mosmol/l). Zylinder  $Z_1$  enthielt eine Verdünnungslösung mit einer Osmolarität von 100 mosmol/l. Abgesehen davon, dass die Verdünnungslösung nur 50 mmol/l NaCl enthielt, wies sie die gleiche Zusammensetzung wie die Ringerlösung auf. Wurden während der Osmolaritätsrampe durch die Schlauchpumpe (Ismatec, Zürich, IPS-8) 5 ml/min ( $D$ ) aus dem Gradientenmixer entnommen, flossen zum

Druckausgleich 2,5 ml/min Verdünnungslösung (d) aus Zylinder  $Z_1$  in Zylinder  $Z_2$ . Der Rührfisch R sorgte für eine gleichmäßige Vermischung der Lösung im Zylinder  $Z_2$ . Am Startpunkt der Rampe hatte die durch die Schlauchpumpe entnommene Lösung noch eine Osmolarität von 260 mosmol/l. Im weiteren Verlauf wurde die Osmolarität in Zylinder  $Z_2$  kontinuierlich durch die Lösung aus Zylinder  $Z_1$  verdünnt. Am theoretischen Endpunkt der Rampe, nach 160 Minuten, wenn beide Zylinder leergelaufen sind, hat die Perfusionslösung die Osmolarität der Verdünnungslösung aus Zylinder  $Z_1$  von 100 mosmol/l angenommen. Die Formel

$$C_{(t)} = C_{2(t)} = C_{2(t=0)} - (C_{2(t=0)} - C_1) \frac{D}{2V_{(t=0)}}$$

gibt die Beziehung zwischen der Zeit  $t$  und der Osmolarität  $C_{(t)}$  der Lösung wieder, die mit dem Fluss  $D$  aus dem Gradientenmixer entnommen wird. Die Osmolarität entspricht der im Zylinder  $Z_2$  zum Zeitpunkt  $t$  ( $C_{2(t)}$ ). Dabei ist  $C_1$  die Osmolarität der Lösung im Zylinder  $Z_1$  und  $C_{2(t=0)}$  die Osmolarität der Lösung in Zylinder  $Z_2$  am Beginn der Verdünnungsrampe.  $V_{(t=0)}$  ist das Startvolumen im Zylinder  $Z_1$  bzw. Zylinder  $Z_2$ . In der Praxis wurden die Versuche spätestens nach 120 Minuten beendet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Osmolarität in Zylinder  $Z_2$  140 mosmol/l und es befanden sich in beiden Zylindern ein Restvolumen von je 100 ml. Im Gegensatz zu einer Rampe, bei der am Versuchende beide Zylinder leer laufen würden, bietet diese Situation den Vorteil, dass es auch am Versuchende zu einer gleichmäßigen Durchmischung der Perfusionslösungen kommt, wodurch unkontrollierte Osmolaritätsschwankungen ausgeschlossen werden können.

### **3. Herstellung gefriergetrockneter Kryoschnitte**

#### **3.1 Einfrieren der Epithelien**

Am Ende der Inkubation wurden die Filtermembranen mit dem anhaftenden Epithel aus den Vertiefungen der Kulturplatten oder den Ussingkammern entnommen. Die noch anhaftende Inkubationslösung wurde vorsichtig mit einem Saugtupfer entfernt, und die apikale Seite der Epithels sowie die der basolateralen Lösung zugewandte Seite der Filtermembran mit Albuminstandardlösungen beträufelt, die in ihrer Elektrolytzusammensetzung den Inkubationslösungen entsprachen. Um eine möglichst dünne Albuminschicht zu erhalten, wurde die Probe mit einer Pinzette gehalten und überschüssiges Albumin durch eine kurze Bewegung aus dem Handgelenk abgeschleudert. Die so vorbereiteten Proben wurden in einem flüssigen Propan-Isopentan-Einfriermedium von  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Beste Einfrierergebnisse wurden erzielt, wenn die Probe nahezu gleichzeitig mit dem Einfriermedium übergossen und in dasselbe eingetaucht wurde. Dazu wurden zwei mit Einfriermedium gefüllte Gefäße (ca. 10 ml) verwendet. Während die Epithelseite der Probe aus dem einen Behälter mit dem Einfriermedium übergossen wurde, wurde die Probe mit einer Pinzette in das Einfriermedium des zweiten Gefäßes eingetaucht. Vom Ende der Inkubation bis zum Eintauchen der Probe ins Einfriermedium vergingen höchstens 10 Sekunden. Nach dem Einfrieren der Proben in dem Propan-Isopentan-Gemisch wurden diese zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff überführt.

Die Einfrierate, mit der das Probenmaterial in den gefrorenen Zustand übergeht, hat entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Kryoschnitte und die Ergebnisse der Elektronenstrahlmikroanalyse. Eine optimale Situation würde vorliegen, wenn die Einfrierate so groß wäre, dass es zur Vitrifizierung des Einfriermaterials kommt. Durch seine geringe Wärmeleitfähigkeit friert biologisches Material jedoch relativ langsam ein, so dass es zur Ausbildung von Eiskristallen kommt. Die Eiskristalle, die aus reinem Wasser bestehen, können zur Zerstörung der Gewebestruktur und zur Dislokation der wasserlöslichen Elemente führen. Auf Grund der relativ geringen Matrix bilden sich Eiskristalle bevorzugt im extrazellulären Raum aus. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung der die Eiskristalle umgebenden noch flüssigen Phase. Durch diese Bildung eines eutektischen Gemisches mit teilweise massiven Osmolaritäts-

Veränderungen kommt es zu H<sub>2</sub>O–Ausgleichsströmen entlang der sich bildenden, osmotischen Gradienten von intra- nach extrazellulär. Der durch diesen Vorgang auftretende Verlust von zellulärem Wasser führt zur Zellschrumpfung und Aufkonzentrierung der zellulären Elemente. Bei der Ausbildung von Eiskristallen im Zellinneren kommt es außerdem zur Zerstörung der morphologischen Strukturen und zur Dislokation von wasserlöslichen Elementen.

Eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Einfrierung ist ein geeignetes Einfriermedium. Ein ideales Einfriermedium sollte eine möglichst niedrige Temperatur nahe dem absoluten Nullpunkt, eine hohe Viskosität, sowie eine hohe Wärmeleitfähigkeit bei möglichst hohem Siedepunkt haben. Aber selbst unter diesen idealen Bedingungen würde es auf Grund der geringen Wärmeleitfähigkeit des biologische Probenmaterials auch nur in den äußeren Probenbereichen von 2 – 4 µm Tiefe zu einer Vitrifizierung kommen. Ein besonders zu beachtendes Problem stellt das Leidenfrost-Phänomen dar. Dieses tritt auf, wenn die Wärmeleitfähigkeit des Einfriermediums so gering ist, dass sich das Einfriermedium in unmittelbarer Umgebung der einzufrierenden Probe so weit erwärmt, dass sein Siedepunkt erreicht wird. Auf diese Weise bildet sich ein isolierender Gasmantel um die Probe aus, der den Temperatúrausgleich zwischen Probe und Einfriermedium zusätzlich verzögert.

Eine recht gute Wärmeleitfähigkeit bei hohem Siedepunkt hat das von uns verwendete Propan-Isopentan-Gemisch. In flüssigem Stickstoff auf –196° C abgekühlt, können mit diesem Einfriermedium ausreichende Einfrierraten bis in eine Tiefe von ca. 300 µm in der Probe erreicht werden. An Nierenschnitten konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich die zellulären Konzentrationen in einer Tiefe von 300 – 500 µm nicht von denen unterscheiden, die an der Nierenoberfläche erhalten wurden. Danach beeinflussen die Eiskristalle, die mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche größer werden, das Messergebnis noch nicht.

Zur Herstellung des Einfriermediums wurde gasförmiges Propan durch ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes, 100 cm langes, spiralig aufgedrehtes Kupferrohr von 5 mm Innendurchmesser geleitet und das so verflüssigte Propan in einem Glasbecher aufgefangen. Drei Teilen flüssigem Propan wurden dann ein Teil Isopentan (2-Methylbutan, Merk, Darmstadt, 6056.1000) zugegeben. Das Einfriermedium wurde

anschließend für mindestens zwei Stunden in flüssigem Stickstoff auf  $-196^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Eine Mischung aus Propan und Isopentan wurde verwendet, um den Festpunkt, der für Propan bei  $-187,1^{\circ}\text{C}$  und für Isopentan bei  $-159,7^{\circ}\text{C}$  liegt, auf etwa  $-200^{\circ}\text{C}$  abzusenken (Jehl et al 1981). Damit wurde erreicht, dass das Einfriermedium auch bei anhaltender Kühlung in flüssigem Stickstoff noch flüssig blieb.

### **3.2 Albuminstandardlösungen**

Die Albuminlösungen, die am Ende der Inkubationsversuche auf die Epitheloberflächen aufgetragen wurden, wurden durch Auflösen von 1 g Rinderalbumin (Behringer, Marburg) in 4 ml der verschiedenen verwendeten Inkubationslösungen hergestellt, in 1,5 ml Eppendorfergefäße aliquotiert und zur Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach Herstellung der Albuminlösungen wurde mittels Flammenphotometrie (Carl Zeiss, Kochel, PF5) die Na- und K-Konzentration und mittels Chloridometrie (Eppendorf, Hamburg, Cloridmeter 6610) die Cl-Konzentration in der Albuminlösung ermittelt. Eine exakte Bestimmung der Natriumkonzentration war auch deshalb erforderlich, da im Albumin ein etwas variabler Natriumgehalt von ca. 150 mmol/kg in festgebundener Form vorkam. Zur Bestimmung des Trockengewichtsanteils der Albuminlösungen wurden 100  $\mu\text{l}$  Proben vor und nach Trocknung in einem Heißlufttrockenschrank (Temperatur  $90^{\circ}\text{C}$ ) gewogen. Da die Albuminlösung nach dem Auftragen auf das Epithel der gleichen Präparation wie das Epithel selbst unterworfen war, kann die Albuminschicht als quasi interner Standard betrachtet werden (Dörge et al 1978).

### **3.3 Kryoschnitte**

Das Schneiden der gefrorenen Proben, die aus den Filtermembranen, dem anhaftenden Epithel und den aufgetragenen Albuminschichten bestanden, erfolgte in einem modifizierten Kryoultramikrotom (Reichert, Wien, OM U2). Die Manipulationen, die notwendig waren, um ein Probenstück in einen Probenhalter zu spannen und in den Probenarm des Kryotoms einzusetzen, wurden in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Dazu wurden aus den beschichteten, eingefrorenen Filtern dreieckige Stücke, deren Basis etwa 2 mm und deren Höhe etwa 4 mm betrug, unter flüssigem Stickstoff mit einem Skalpell ausgestochen. Die Basis dieser Stücke wurde in eine Indiumfolie

eingeschlagen und in einen Probenhalter eingespannt. Da die Indiumfolie die Eigenschaft hat auch bei sehr tiefen Temperaturen noch plastisch verformbar zu sein, ist sie geeignet Unregelmäßigkeiten zwischen Probenhalter und Probe auszugleichen und so ein Zersplittern der spröden, gefrorenen Probe beim Einspannen in den Probenhalter zu verhindern. Der bestückte Probenhalter wurde dann in die auf  $-80^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Kryotomkammer überführt und so in den Probenarm eingesetzt, dass das Epithel und die anhaftende Albuminstandardschicht parallel geschnitten werden konnten. Die Kryotomkammer, die Probenarm und Messer enthält, wurde durch ein System von intermittierender Zufuhr von flüssigem Stickstoff und elektrischer Gegenheizung auf eine Temperatur von  $-80 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  gehalten. Eine elektronische Regelung auf möglichst konstante Temperatur in der Kryotomkammer ist nötig, um vor allem thermisch bedingte Längenänderungen des Probenarms und damit verbundene Änderungen der Schneidegeometrie zu verhindern. Das Stahlmesser, das einen Freiwinkel von  $8-10^{\circ}$  (Jung, Heidelberg) aufwies, war auf dem Boden der Kryotomkammer montiert. Die gesamte Kryotomkammer konnte mit einem Mikrometervortrieb bewegt werden und so der Abstand vom Messer zum bewegten Probenarm so eingestellt werden, dass sich eine Schnittdicke von etwa  $1\ \mu\text{m}$  ergab. Die Schneidgeschwindigkeit war mit  $0,2\ \text{mm/sec}$  so niedrig, dass mit einem Auftauen der Schnitte durch Reibungswärme nicht zu rechnen war (Hodson und Marshall, 1970, 1972).

Die Schnitte wurden mit einer Nickelblende (Außendurchmesser  $3\ \text{mm}$ , Öffnung  $2 \times 1\ \text{mm}$ ; Veeco, Eerbeek, Niederlande), die mit Kollodiumfolie bespannt war, vom Messerrücken abgenommen. Zur Handhabung der Nickelblenden wurde ein abgekühlter Stab mit integriertem Elektromagneten verwendet. Bei dem geringsten Kontakt der Kollodiumfolie mit den Schnitten kam es auf Grund von elektrostatischen Kräften zur Anhaftung der Schnitte an die Folie. Die Schnitte wurden schließlich mit einer zweiten Kollodiumfolie abgedeckt in dem die Nickelblende auf eine über die Öffnung einer Lochbühne (Lochdurchmesser  $5\ \text{mm}$ ) gespannte Kollodiumfolie abgelegt wurde. Die vorgekühlte Lochbühne ( $5\ \text{mm}$  dicke Messingplatte mit 12 durchgehenden  $5\ \text{mm}$  Bohrungen) befand sich während der Schnittablage in der Kryokammer des Mikrotoms. Die Folien wurden nach der von Reimer (1967) beschriebenen Methode aus Kollodium

hergestellt. Um eine größere Stabilität der Folien zu erzielen wurde jedoch anstelle einer 3- eine 5-prozentige Kollodiumlösung verwendet.

### **3.4 Gefriertrocknung**

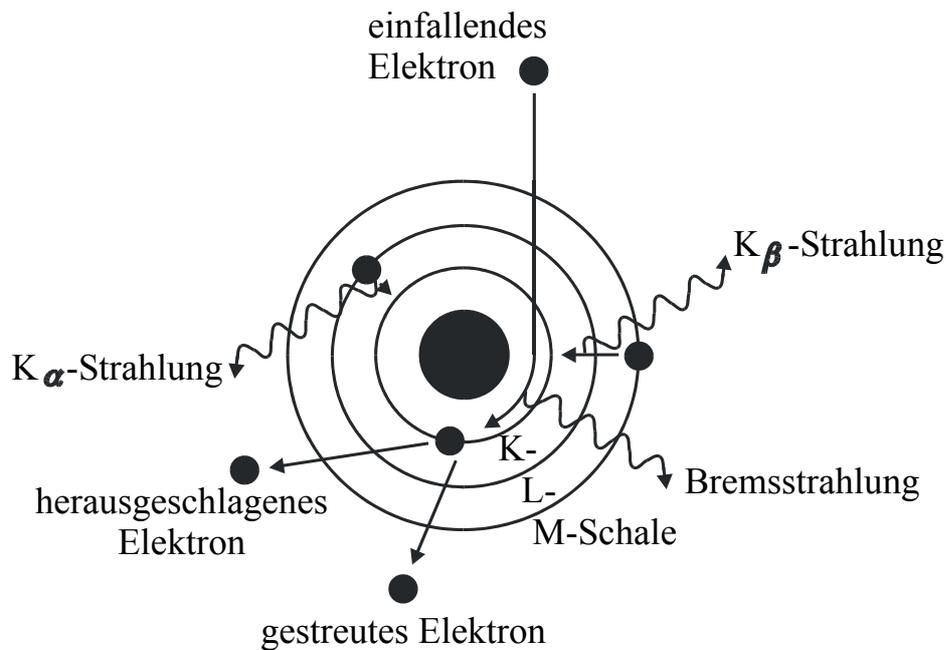
Die in der Kryotomkammer mit Kryoschnitten bestückte Lochbühne wurde mit einer in flüssigem Stickstoff abgekühlten Messingkappe abgedeckt und rasch in eine vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage (Pfeifer, Wetzlar, IKG 100) überführt. In dieser Anlage wurden die Schnitte dann über Nacht bei  $10^{-4}$  Pa und  $-80^{\circ}$  C gefriergetrocknet. Vor der Entnahme der Schnitte wurde die Vakuumkammer der Gefriertrocknungsanlage auf  $+30^{\circ}$  C erwärmt, um eine Rehydratation der Schnitte durch Kondenswasser zu vermeiden. Die Nickelblenden wurden dann unter trockener Stickstoffatmosphäre mit einer kleinen Lötkolbenspitze aus der Kollodiumfolie auf der Lochbühne herausgetrennt und in das Elektronenmikroskop überführt.

## **4. Elektronenstrahlmikroanalyse**

### **4.1 Physikalische Grundlagen**

Bei der Elektronenmikrostrahlanalyse wird die Materie des Probenmaterials mit hochenergetischen Elektronen bestrahlt, wobei Röntgenstrahlung frei wird. Zwei verschiedene Phänomene sind an der Entstehung der Röntgenstrahlen beteiligt. In Abbildung 9 werden diese Vorgänge an Hand des Bohrschen Atommodells erläutert. Die Röntgenbremsstrahlung entsteht, wenn hochenergetische Elektronen einem Atomkern im Probenmaterial relativ nahe kommen und an seinem Culomb-Wall abgelenkt und abgebremst werden. Dabei entsteht ein kontinuierliches Bremsspektrum, dessen obere Grenzfrequenz allein von der Energie der eingestrahnten Elektronen abhängt. Dieses Bremsspektrum bildet bei der Spektrumanalyse den „weißen Untergrund“ und ist ein Maß für den Massegehalt im angeregten Probenvolumen. Trifft bei dem Elektronenbeschuss ein einfallendes Elektron, dessen Energie über der Ionisierungsenergie der bestrahlten Materie liegt, auf ein Elektron in der Elektronenhülle eines Atoms, so wird das Hüllenelektron aus seinem Orbital geschossen und das Atom ionisiert. Die entstehende Lücke in der Schale des Atoms wird durch ein hochenergetisches Elektron aus höheren Schalen aufgefüllt. Dabei werden

Röntgenquanten frei, deren Energie sich aus der Differenz der beiden Energieniveaus ergibt, die das Hüllenelektron vor und nach dem Schalensprung einnahm. Diese Energie lässt sich nach dem Moseleyschen Gesetz berechnen und ist spezifisch für das

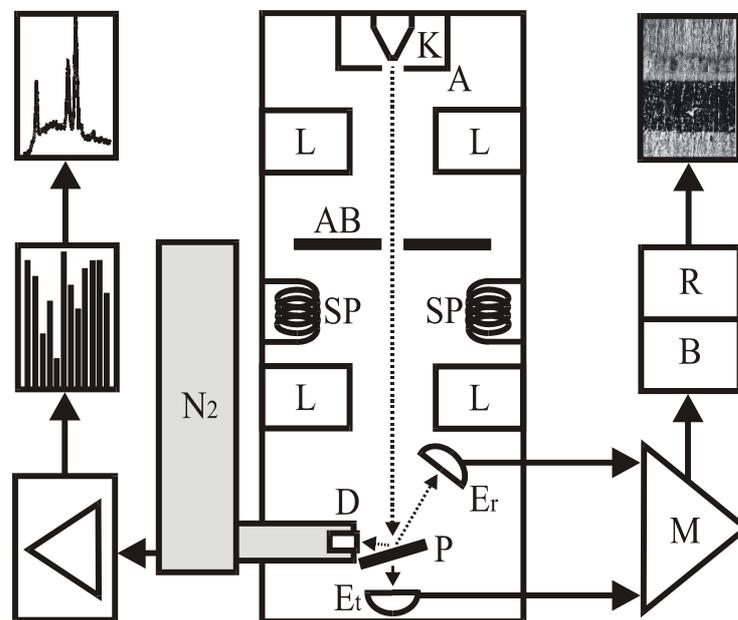


**Abb. 9** : Schematische Darstellung der Entstehung elementcharakteristischer Röntgen- und Bremsstrahlung.

Element sowie für die beteiligten Schalen. So werden die Röntgenquanten, die beim Übergang von der L zur K-Schale entstehen, im Röntgenspektrum in der K $\alpha$ -Linie des entsprechenden Elements zusammengefasst. Der Übergang von der M- zur K-Schale bildet die K $\beta$ -Linie im Röntgenspektrum. Das Intensitätsverhältnis von K $\alpha$ - und K $\beta$ -Linien eines angeregten Elements ist bekannt und wird als Verzweungsverhältnis bezeichnet. Dieses Verzweungsverhältnis liegt bei den untersuchten Elementen unter 0,17/1. Da also die K $\alpha$ -Linie sehr viel intensiver als die K $\beta$ -Linie ist, wurden zur Analyse der Elementkonzentration nur die K $\alpha$ -Linien herangezogen. Bei der Erfassung der Ca-Linie muss allerdings auch die K- K $\beta$ -Linie berücksichtigt werden, da beide Linien nur 40 eV auseinander liegen und sich somit überschneiden.

## 4.2 Schnittanalyse

Die Analyse der gefriergetrockneten Schnitte erfolgte in einem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge Instruments, Stereoscan 150), das zusätzlich mit einem energiedispersiven Röntgendetektor (LINK, High Wycomb, GB) ausgerüstet war. Abbildung 10 gibt schematisch die Anordnung von Elektronenmikroskop und Röntgenanalysator wieder:



**Abb. 10 :** Schematischer Aufbau des Elektronenmikroskops und des Röntgenanalysators  $K$  = Kathode,  $A$  = Anode,  $L$  = Linse,  $AB$  = Aperturblende,  $SP$  = Ablenkspule,  $P$  = Probe,  $D$  = Röntgendetektor,  $E_r$  und  $E_t$  = Elektronendetektoren,  $M$  = Photomultiplier,  $B$  = Bildeinheit und  $R$  = Rastergenerator

Die an der Kathode ( $K$ ) thermisch emittierten Elektronen werden im Hochspannungsfeld zwischen Kathode und Anode ( $A$ ) beschleunigt. Über ein System aus elektrischen Linsen  $L$ , einer Aperturblende  $AB$  und Ablenkspulen  $SP$  wird der Elektronenstrahl konditioniert und ausgerichtet. Im Strahlengang liegt die Probe  $P$ . Zur Herstellung von elektronenmikroskopischen Reflexions- und Transmissionsbildern können je nach Wahl entweder von der Probe rückgestreute Elektronen mit einem Reflexionsdetektor  $E_r$  oder die die Probe durchdringenden Elektronen mit einem Transmissionsdetektor  $E_t$  erfasst werden. Aus dem Lichtsignal der Elektronendetektoren

$E_r$  oder  $E_t$  wird über ein Photomultiplier M die Bildeinheit B und den Rastergenerator R ein Bild der Probe erzeugt und auf Bildschirmen dargestellt.

Röntgenstrahlung, die bei der Elektronenbestrahlung aus dem Probenmaterial emittiert wird, tritt durch ein 7  $\mu\text{m}$  dickes Berylliumfenster und trifft dann auf einen mit flüssigem  $\text{N}_2$  gekühlten Röntgendetektor D. Der Halbleiter-Röntgendetektor besteht aus einem Litium dotierten Siliziumkristall, der eingestrahlte Röntgenquanten in Stromimpulse umwandelt. Die Amplitude der Stromimpulse ist dabei der Energie der eingestrahnten Röntgenquanten proportional. Nach Verstärkung der Stromimpulse werden diese in einem Impulshöhenanalysator nach ihrer Energie aufgetrennt und mittels eines Vielkanalzählers mit 1024 Kanälen aufgenommen und schließlich zu einem Röntgenspektrum zusammengesetzt.

Die Analyse wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einem Probenstrom von 300 pA durchgeführt. Dabei ergaben sich nach 100 Sekunden gut auswertbare Röntgenspektren.

Die Probenbühne bestand aus reinem Graphit und war so angeordnet, dass während des Elektronenbeschusses gestreute und die Probe passierende Elektronen, sowie unterhalb der Probenbühne in Bestandteilen der Probenkammer generierte Röntgenstrahlung von der Probenbühne absorbiert wurden.

Das Ausrichten der Schnitte im Elektronenmikroskop erfolgte zunächst bei kleinen Vergrößerungen im Reflexionsbildmodus. Dann wurde die Vergrößerung erhöht und in den Transmissionsmodus umgeschaltet. Hier ließen sich die Zellgrenzen und auch größere zelluläre Strukturen gut erkennen, obwohl die Schnitte verglichen zu herkömmlichen Schnittpräparaten sehr dick und nicht entsprechend vorbehandelt waren. Vor der Analyse wurde von jedem Schnitt ein Polaroidübersichtsbild angefertigt, auf dem die Messpositionen bestimmt und eingetragen wurden. Während der Analyse wurden bei 5000-facher Vergrößerung etwa 0,5  $\mu\text{m}^2$  große Probenareale in den Zellen des Epithels und in dem anhaftenden Albuminstandard abgerastert. Die Messpositionen wurden so gewählt, dass sich die Messungen in den Zellen und dem Albuminstandard auf gleicher Schnitthöhe befanden. Dadurch wurde der Einfluss von Unterschieden in der Schnittdicke auf das Messergebnis weitgehend eliminiert.

## 5. Erfassung der zellulären Konzentrationen

### 5.1 Auswertung der Röntgenspektren

Die aufgenommenen, energiedispersiven Röntgenspektren wurden mit Hilfe eines Rechnerprogramms (Bauer und Rick, 1978) ausgewertet. Dieses Programm trennt rechnerisch die elementspezifischen Spektrallinien vom Untergrundkontinuum. Dabei werden neben prinzipiellen physikalischen Begebenheiten auch die Eigenschaften der Messanlage und die gewählten Messbedingungen berücksichtigt. Für alle zu bestimmenden Elemente wurde die Intensität der  $K\alpha$ -Strahlung ermittelt.

Abgesehen von der Ca-  $K\alpha$ -Strahlung, die nur 40 eV von der K- $K\beta$ -Strahlung entfernt erscheint, kommt es bei den  $K\alpha$ -Strahlungen der übrigen Elemente zu keiner wesentlichen Überlappung mit anderen im Röntgenspektrum vorkommenden Haupt- und Nebenlinien. Zur Ermittlung der Intensität der Ca-  $K\alpha$ -Strahlung wurden zunächst die K- $K\beta$ - und die Ca- $K\alpha$ -Strahlung gemeinsam erfasst und dann mit Hilfe des Intensitätsverzweigungsverhältnisses von K-  $K\alpha$  / K- $K\beta$  von 13,1/1 der Anteil der Ca- $K\alpha$ -Strahlung ermittelt.

### 5.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des quasi internen Albuminstandards durchgeführt, der vor dem Einfrieren auf die Epitheloberfläche aufgetragen worden war. Als Standardelemente wurden nur Na und Cl herangezogen, da sie im Albuminstandard in so hoher Konzentration vorkamen, dass ihre  $K\alpha$ -Linien exakt erfasst werden konnten. Die Bestimmung der zellulären Na- und Cl- Konzentrationen in mmol/kg Feuchtgewicht erfolgte über einen direkten Vergleich der elementcharakteristischen Linienintensitäten von Probe und Standard:

$$[Na]_{(z)} = (I_{Na(z)} / I_{Na(s)}) \cdot [Na]_{(s)} \quad \text{und} \quad [Cl]_{(z)} = (I_{Cl(z)} / I_{Cl(s)}) \cdot [Cl]_{(s)}$$

$[Na]_{(z)}, [Cl]_{(z)}$  = Na- bzw. Cl-Konzentration der Zelle

$[Na]_{(s)}, [Cl]_{(s)}$  = Na- bzw. Cl-Konzentration des Standards

$I_{Na(z)}, I_{Cl(z)}$  = Intensität der Na- bzw. Cl-Strahlung der Zelle

$I_{Na(s)}, I_{Cl(s)}$  = Intensität der Na- bzw. Cl-Strahlung des Standards

Elemente, die im Standard nur in geringer Konzentration oder gar nicht vorhanden waren, wurden indirekt über die Cl-Strahlung im Standard ermittelt. Dabei wurden die unterschiedlichen Röntgenausbeuten dieser Elemente im Vergleich zum Cl berücksichtigt. Die Proportionalitätsfaktoren waren zuvor mit Hilfe von Albuminstandards ermittelt worden.

$$[X]_{(Z)} = (IX_{(Z)} / ICl_{(S)}) \cdot [Cl]_{(S)} \cdot \alpha_{(X)}$$

$[X]_{(Z)}$	=	P-, K-, Ca- oder Mg-Konzentration der Zelle
$[Cl]_{(S)}$	=	Cl-Konzentration des Standards
$IX_{(Z)}$	=	Intensität der P-, K-, S-, Ca- oder Mg-Strahlung der Zelle
$ICl_{(S)}$	=	Intensität der Cl-Strahlung des Standards
$\alpha_{(X)}$	=	Proportionalitätsfaktor des entsprechenden Elements

Die Bestimmung des zellulären Trockengewichts in g/100g Feuchtgewicht erfolgte über einen direkten Vergleich der Bremsstrahlung von Proben- und Standardspektren.

$$TG_{(Z)} = (BS_{(Z)} / BS_{(S)}) \cdot TG_{(S)}$$

$TG_{(Z)}, TG_{(S)}$	=	Trockengewichtsanteil der Zellen bzw. des Standards
$BS_{(Z)}, BS_{(S)}$	=	Bremsstrahlung der Zellen bzw. des Standards

Fehlbestimmungen der Elementkonzentrationen durch Dickenunterschiede innerhalb eines Schnittes wurden dadurch vermindert, dass bei der Quantifizierung nur Röntgenstrahlungsintensitäten von Zellen und Standard miteinander verglichen wurden, die von Messstellen gleicher Schnitthöhe stammten.

Da durch das Quantifizierungsverfahren zelluläre Elementkonzentrationen in mmol/kg Feuchtgewicht erhalten wurden und das Trockengewicht über die weiße Strahlung

bekannt war, konnte auch die Konzentration pro Zellwasser oder pro Trockengewicht errechnet werden.

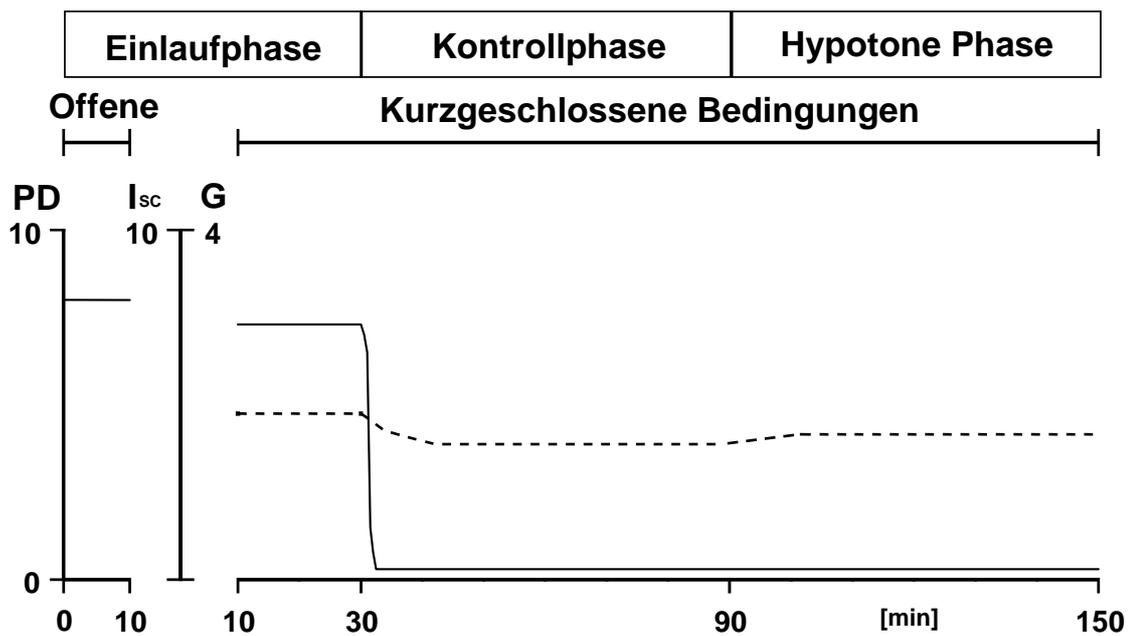
## **6. Statistik**

Der Kurzschlussstrom und die transepitheliale Leitfähigkeit wurden auf 1 cm<sup>2</sup> Epithelialfläche standardisiert und in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  bzw.  $\text{mS}/\text{cm}^2$  angegeben. Die Angabe des transepithelialen Potentials erfolgte in mV. Die tabellarisch erfassten Daten sind Mittelwerte  $\pm 2$  SE von mindestens 6 Einzelversuchen. Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten zellulären Elementkonzentrationen und Trockengewichte sind Mittelwerte  $\pm 2$  SE von mindestens 6 Einzelversuchen mit jeweils ca. 20 zellulären Messungen. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mit dem Student t-Test, Unterschiede zwischen 3 Versuchsgruppen durch Kombination von Variantsanalyse und Student-Newman-Keuls-Test auf dem Niveau  $2p < 0,05$  als signifikant eingestuft.

## Ergebnisse

### 1. Elektrische Parameter

Transepitheliale elektrische Parameter wurden an allen A6-Epithelien ermittelt, die während des Versuches in Ussing-Kammern eingespannt waren. Abgesehen von den



**Abb. 11:** Verlauf der transepithelialen Potentialdifferenz (PD in mV) während der ersten 10 Minuten der Einlaufphase sowie der Verlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$  in  $\mu A/cm^2$ , durchgezogene Linie) und der transepithelialen Leitfähigkeit (G in  $mS/cm^2$ , gestrichelte Linie) während der letzten 20 Minuten der Einlaufphase, der Kontrollphase und der hypotonen Phase.

Epithelien, bei denen der hypertone Streß oder die Reperfusion unter isotonen Bedingungen nur 2 Minuten andauerte, betrifft dies alle untersuchten A6-Epithelien. Abbildung 11 zeigt den typischen Verlauf der elektrischen Parameter eines Epithels, das dem akuten hypotonen Stress ausgesetzt wurde. In den ersten zehn Minuten der Einlaufphase stellte sich spontan ein stabiles, transepitheliales Potential (PD) von etwa 8 mV (basolaterale Seite positiv) ein. In den weiteren 20 Minuten der Einlaufphase ergaben sich unter kurzgeschlossenen Bedingungen ein Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) von etwa 8  $\mu A/cm^2$  und eine transepitheliale Leitfähigkeit (G) von etwa 2  $mS/cm^2$ . Beim

Übergang von der Einlauf- zur Kontrollphase, bei dem die Ringerlösung auf der apikalen Seite des Epithels gegen die Na-freie, hypotone Lösung ausgetauscht wurde, fiel der Kurzschlussstrom rapide auf Werte nahe Null ab und die Leitfähigkeit verminderte sich um etwa 20 %. Während durch Einführung des hypotonen Stress (Herabsetzung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l) der Kurzschlussstrom nicht beeinträchtigt wurde, stieg die transepitheliale Leitfähigkeit auf Werte an wie sie in der Einlaufphase beobachtet wurden.

**Tabelle 4 :** *Transepitheliale, elektrische Parameter in den verschiedenen Phasen der Kammerinkubation.*

Einlaufphase			Kontrollphase		Hypotone Phase	
PD	I <sub>sc</sub>	G	I <sub>sc</sub>	G	I <sub>sc</sub>	G
mV	μA /cm <sup>2</sup>	mS/cm <sup>2</sup>	μA /cm <sup>2</sup>	mS/cm <sup>2</sup>	μA /cm <sup>2</sup>	mS/cm <sup>2</sup>
10,0 ±2,1	8,4 ±1,0	2,0 ±0,2	0,3* ±0,1	1,6* ±0,1	0,2* ±0,1	2,3 <sup>•</sup> ±0,2

\* *signifikant verschieden verglichen zur Einlaufphase*

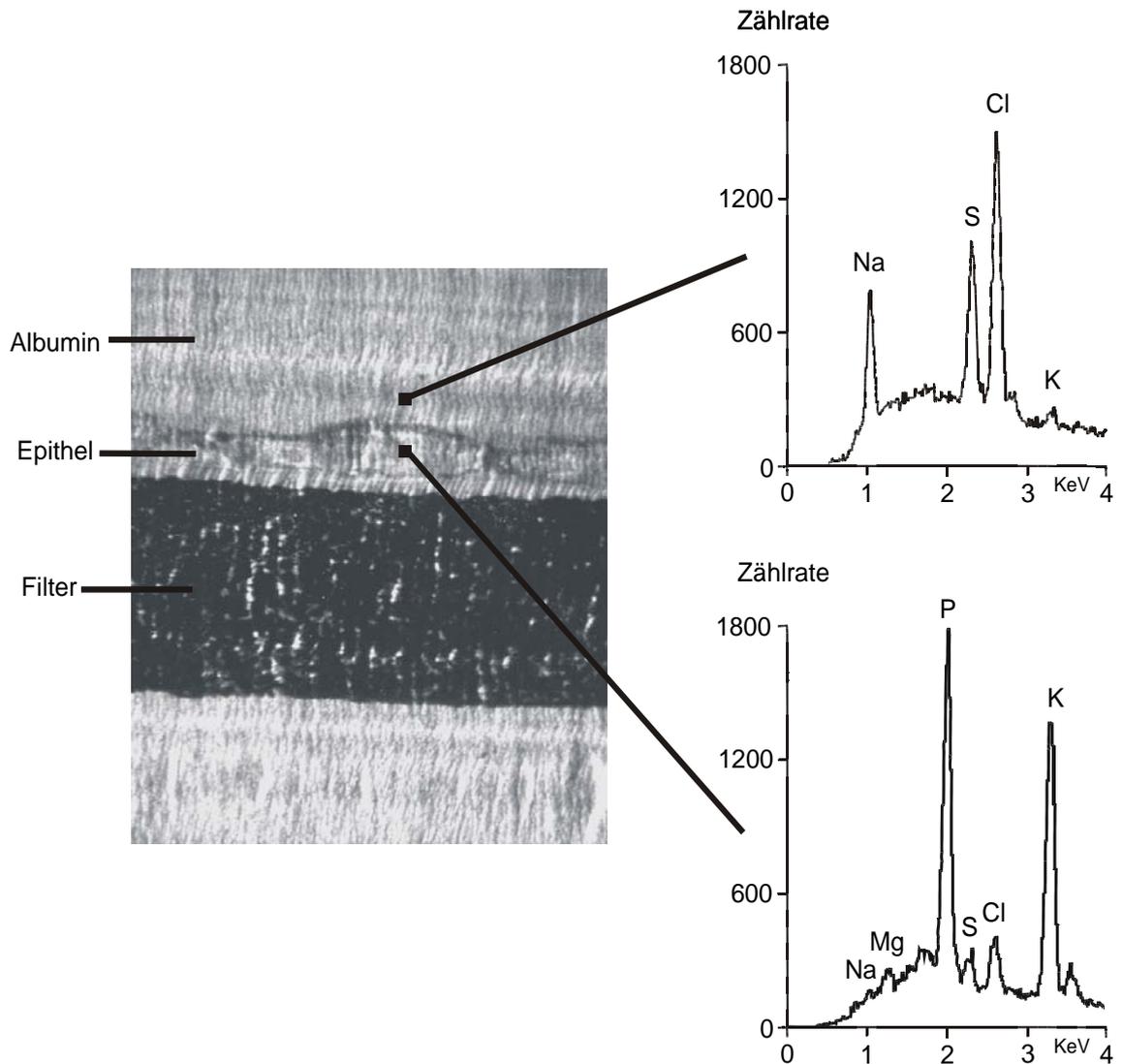
• *signifikant verschieden verglichen zur Kontrollphase*

In Tabelle 4 werden die elektrischen Parameter von Versuchen zusammengefasst, in denen die Epithelien einem akuten hypotonen Stress ausgesetzt waren. In der Einlaufphase wurden am Ende der offenen Periode eine transepitheliale Potentialdifferenz von 10,0 mV und am Ende der Einlaufphase ein Kurzschlussstrom und eine transepitheliale Leitfähigkeit von 8,4 μA/cm<sup>2</sup> bzw. 2,0 mS/cm<sup>2</sup> ermittelt. In der Kontrollphase fielen Kurzschlussstrom und Leitfähigkeit signifikant auf 0,3 μA/cm<sup>2</sup> bzw. 1,6 mS/cm<sup>2</sup> ab. Der hypotone Streß hatte keinen Einfluß auf den Kurzschlussstrom, verursachte jedoch einen Wiederanstieg der transepithelialen Leitfähigkeit auf 2,3 mS/cm<sup>2</sup>.

Ganz ähnliche Werte wie für die akut einsetzende hypotone Phase wurden nach der Wiedereinführung von isotonen Bedingungen und während kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkungen erhalten. Nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen betrug der Kurzschlussstrom 0,2 ± 1 μA/cm<sup>2</sup> und die Leitfähigkeit 2,1 ± 0,3 mS/cm<sup>2</sup>. Am Ende der kontinuierlichen Osmolaritätsabsenkung betrug der Kurzschlussstrom 0,2

$\pm 0,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  und die Leitfähigkeit  $1,7 \pm 0,3 \text{ mS}/\text{cm}^2$ . Epithelien, die in der Einlaufphase eine höhere transepitheliale Leitfähigkeit als  $4 \text{ mS}/\text{cm}^2$  aufwiesen (5%) wurden verworfen.

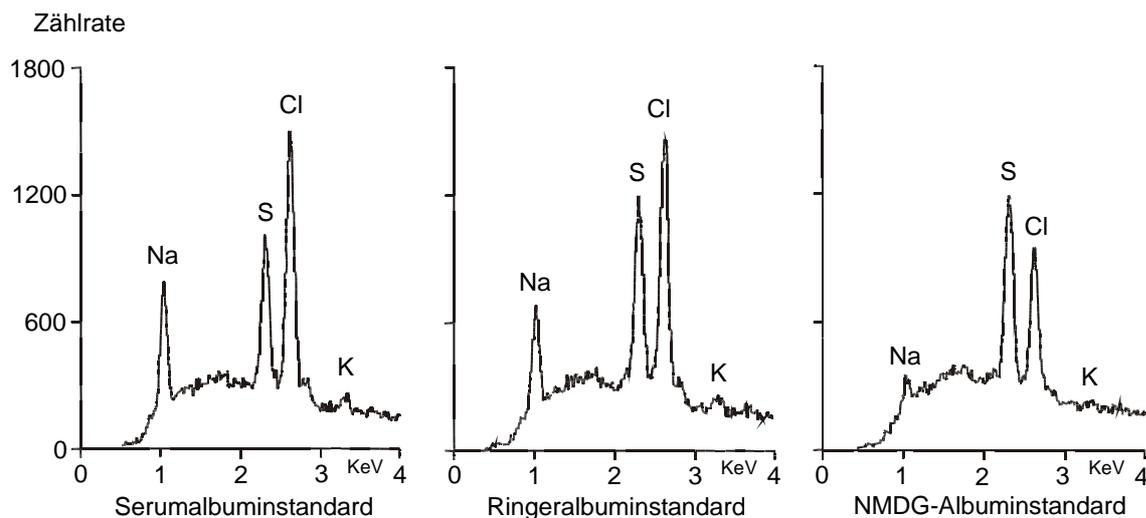
## 2. Elementkonzentrationen von A6-Zellen unter Basisbedingungen



**Abb. 12 :** Rastertransmissionsbild eines gefriergetrockneten Kryoschnitts eines A6-Zellpräparats unter Kontrollbedingungen und 2 Röntgenspektren, die in der Albuminstandardschicht und einer Epithelzelle aufgenommen wurden.

Unter Basisbedingungen wurden zelluläre Elementkonzentrationen unmittelbar nach der Epithelzüchtung sowie nach Inkubation der Epithelien in Ussing-Kammern ermittelt.

Abbildung 12 zeigt neben 2 Röntgenspektren ein Rastertransmissionsbild eines Präparates, das unmittelbar nach der Epithelzüchtung eingefroren wurde. Obwohl in Rastertransmissionsbildern von 1 Mikrometer dicken gefriergetrockneten Kryoschnitten, keine ultrastrukturellen Details erkennbar sind, lassen sich Epithelzellen, Albuminschichten und Filterunterlage gut voneinander unterscheiden. In vielen Fällen konnte auch auf Grund von Dichteunterschieden zwischen Kern und Zytoplasma in den A6-Zellen unterschieden werden. Falls Zellkerne in den Anschnitten vorkamen, stellten sich diese heller dar als das sie umgebende Zytoplasma. Die Röntgenspektren wurden in der apikalen Albuminstandardschicht, die aus Rinderalbumin und den Bestandteilen des Züchtungsmediums bestand, und in einer Epithelzelle aufgenommen. Verglichen zum extrazellulären Standardspektrum weist das zelluläre Spektrum deutlich niedrigere Signale für Na und Cl und viel höhere für P und K auf.



**Abb. 13 :** Röntgenspektren verschiedener Albuminstandards

Abbildung 13 zeigt Röntgenspektren von verschiedenen Albuminstandards, die am Ende der Inkubation auf die apikale Seite des Epithels aufgetragen wurden. Während die Röntgenspektren des Serum- und Ringeralbuminstandards nahezu identisch sind, weist das Spektrum des NMDG-Albuminstandards deutlich geringere Na- und Cl-Signale auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zu den beiden anderen Standardlösungen die Lösung des NMDG- Standards an Stelle von 140 mmol/l NaCl 70 mmol/l NMDG-Cl enthält. Das kleine Na-Signal im Spektrum des NMDG-

Albuminstandards rührt von Na her, das in festgebundener Form im Albumin vorliegt. Der Na-Anteil des Rinderalbumins variierte von Charge zu Charge und betrug zwischen 120 und 150 mmol/kg Albumin.

In Tabelle 5 werden die zellulären Elementkonzentrationen und Trockengewichte, die unter den verschiedenen Basisbedingungen erhalten wurden, gegenübergestellt. Während die Epithelien, die apikal mit normaler Ringerlösung oder Na-freier, hypotoner Lösung (NMDG) vor dem Einfrieren in Ussing-Kammern inkubiert wurden,

**Tabelle 5 :** Zelluläre Elementkonzentrationen und Trockengewichte (TG) unter den verschiedenen Basisbedingungen.

Bedingung		Na	K	CL	Mg	P	Ca	TG
apikal	basal	mmol/kg Feuchtgewicht						g/100g FG
<b>Medium</b>	<b>Medium</b>	20,4 ± 0,6	130,9 ± 4,5	30,1 ± 0,8	6,7 ± 0,1	142,6 ± 2,6	1,3 ± 0,2	20,6 ± 0,4
<b>Ringer</b>	<b>Ringer</b>	20,0 ± 0,5	132,3 ± 3,2	28,7 ± 0,9	7,2 ± 0,1	144,7 ± 2,1	1,7 ± 0,2	20,1 ± 0,3
<b>NMDG*</b>	<b>Ringer</b>	20,4 ± 0,4	127,9 ± 1,5	28,2 ± 0,4	6,2 ± 0,1	138,9 ± 1,5	1,5 ± 0,1	19,2 ± 0,2

*NMDG\* = N-Methyl-D-Glucamin haltige, Na-freie, hypotone Lösung*

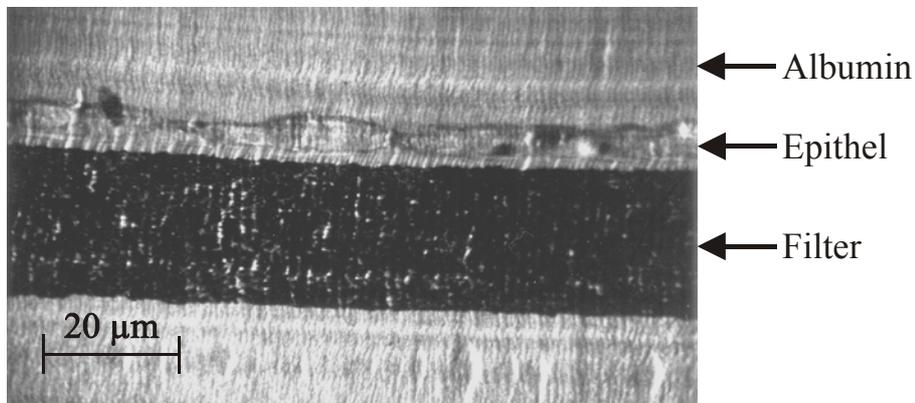
kurzgeschlossen gehalten wurden, wurden die im Medium gezüchteten Epithelien sofort nach der Entnahme aus dem Brutschrank mit dem Serumalbuminstandard versehen und eingefroren. Unter diesen unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ergaben sich in der zellulären Elementzusammensetzung und den zellulären Trockengewichten keine wesentlichen Unterschiede. Unter allen Bedingungen betrug die Konzentration für Na etwa 20, für Cl 29, für K 130, für Mg 7, für P 140 und für Ca 1,5 mmol/kg Feuchtgewicht. Auch der Trockengewichtsanteil war mit ca. 20 g/100 g Feuchtgewicht unter allen Bedingungen etwa gleich groß. In den folgenden Kapiteln werden die nach

akutem und kontinuierlichem hypotonem Stress sowie nach wiederhergestellter Isotonie beobachteten Änderungen der zellulärer Elementkonzentrationen und Trockengewichte auf Kontrollwerte bezogen, wie sie nach apikal Na-freier hypotoner Inkubation ermittelt wurden.

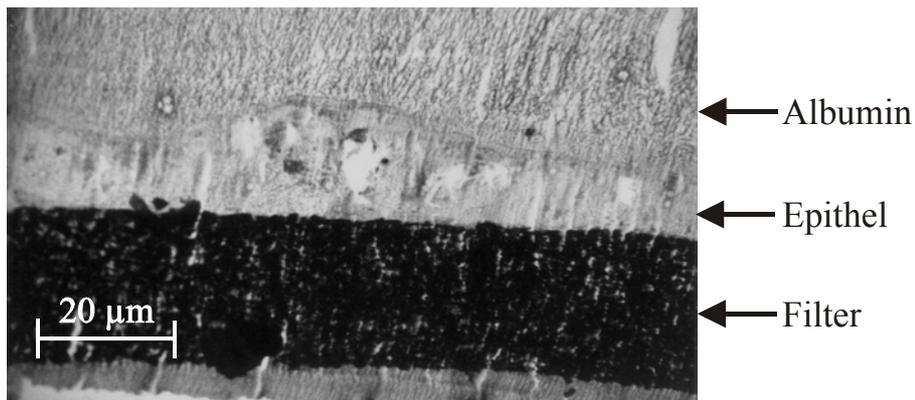
### 3. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress

Abbildung 14 zeigt Rastertransmissionsbilder von zwei gefriergetrockneten Kryoschnitten, die unter Kontrollbedingungen und zwei Minuten nach Einführung eines

#### **Kontrolle**

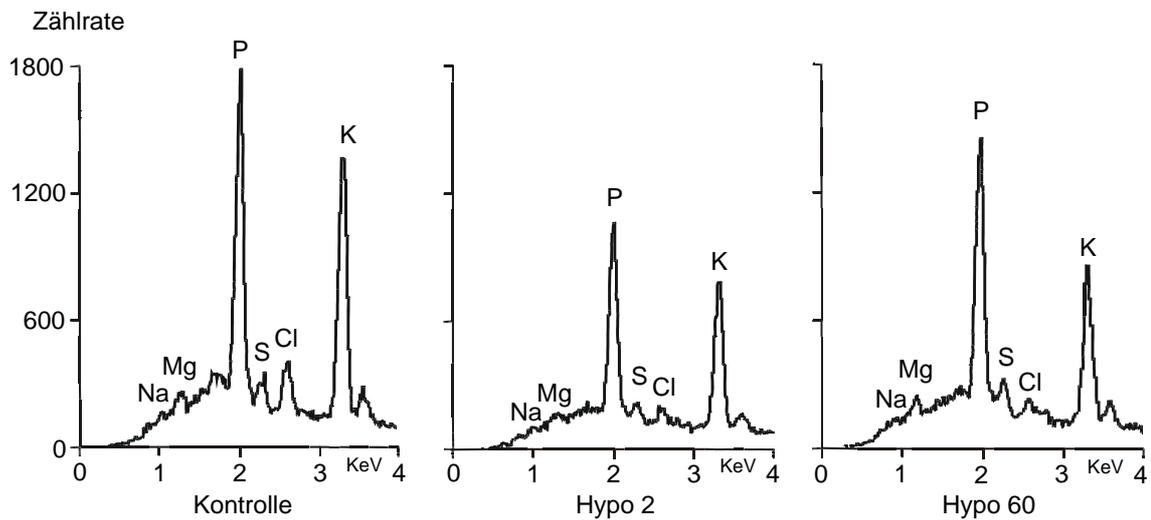


#### **Hypo 2 min**



**Abb. 14 :** Rastertransmissionsbilder gefriergetrockneter Kryoschnitte von A6 Epithelien unter Kontrollbedingungen und 2 min nach abrupter Absenkung der basalen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l (Hypo 2).

akuten hypotonen Schocks aufgenommen wurden. Ein Vergleich der beiden Epithelien zeigt, dass sich die Höhe der Epithelzellen während der ersten beiden Minuten der Verminderung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l in etwa verdoppelt hat.



**Abb. 15 :** Zelluläre Röntgenspektren unter Kontrollbedingungen sowie 2 (Hypo2) und 60 Minuten (Hypo60) nach akutem hypotonem Stress.

Abbildung 15 demonstriert an Hand von Röntgenspektren die Auswirkung des hypotonen Stresses auf die zelluläre Elementzusammensetzung. Zwei Minuten nach Verminderung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l haben sich die Röntgensignale für alle zellulären Elemente in etwa halbiert. Dies gilt auch für den Spektrenuntergrund, der ein Maß für das zelluläre Trockengewicht ist. Nach einer Hypotoniedauer von 60 Minuten haben sich die Röntgensignale für Mg und P sowie die Höhe des Spektrenuntergrundes wieder den Kontrollwerten angenähert. Im Gegensatz dazu hat die Dauer des hypotonen Stresses keinen wesentlichen Einfluß auf die Signale für Na, Cl und K.

Abbildung 16a gibt den Verlauf der zellulären Elementkonzentrationen nach akutem hypotonem Stress in mmol/Kg Feuchtwicht wieder. In den ersten beiden Minuten der basolateralen Hypoosmolarität fiel die Konzentration aller Elemente auf 50 bis 60 % der Kontrollwerte ab. Im weiteren Verlauf stiegen die Konzentrationen von Mg, P

### Elementkonzentration

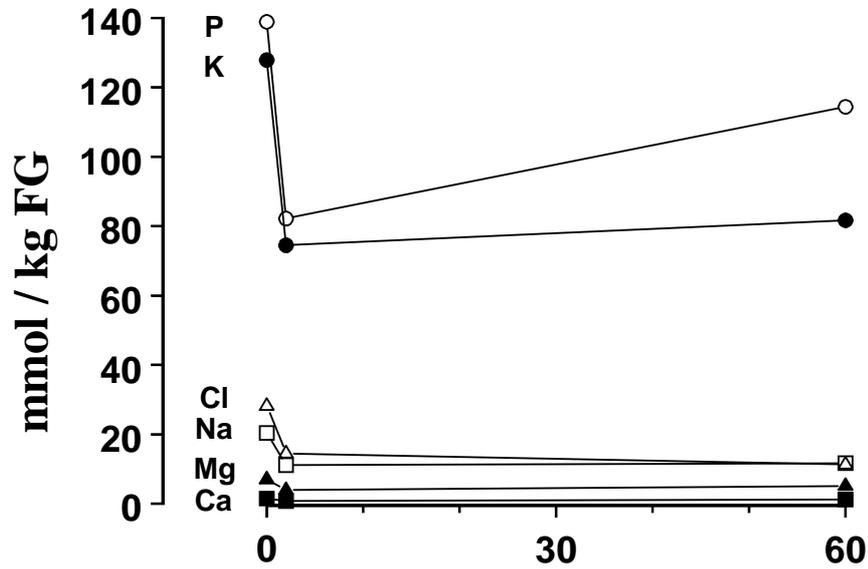


Abb. 16a: Verlauf der zellulären Elementkonzentrationen nach akutem hypotonem Stress in mmol / Kg bezogen auf das Feuchtgewicht.

### Trockengewicht

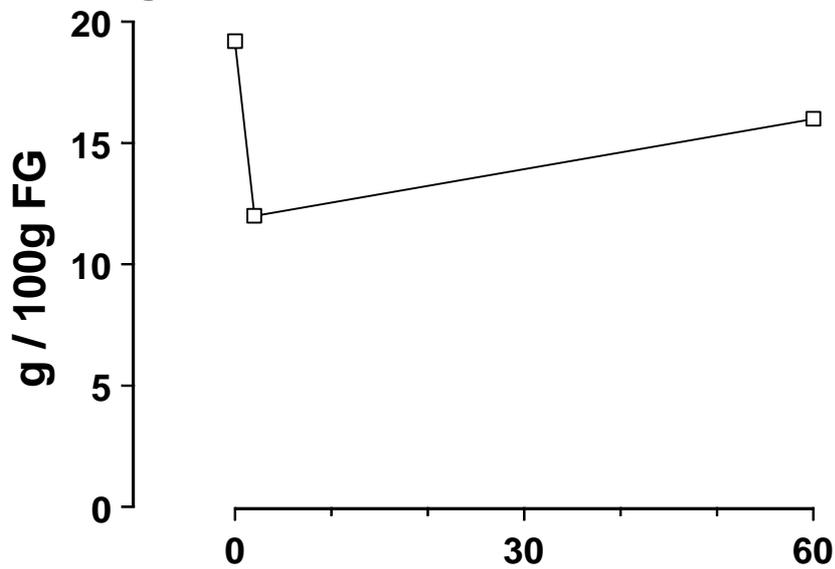


Abb. 16b: Verlauf des zellulären Trockengewichts nach akutem hypotonem Stress in g/100g bezogen auf das Feuchtgewicht.

und Ca wieder signifikant an, wogegen sich die Konzentrationen für Na, Cl und K nicht wesentlich veränderten. Wie aus Abbildung 16b ersichtlich, konnte ein ähnlicher Verlauf wie für Mg, P und Ca auch für den Trockengewichtsgehalt beobachtet werden. Das zelluläre Trockengewicht fiel nach zwei Minuten des hypotonen Stress auf etwa 60 % des Kontrollwertes ab, um dann im weiteren Verlauf wieder in Richtung des Kontrollwertes anzusteigen. Der besseren Übersicht wegen werden die zellulären Elementkonzentrationen und Trockengewichtsgehalte in Abbildung 17 und 18 in Säulendiagrammen wiedergegeben. Die Diagramme in der oberen Reihe der Abbildung 17 geben die Konzentrationen der Elemente wieder, die sich nach initialer

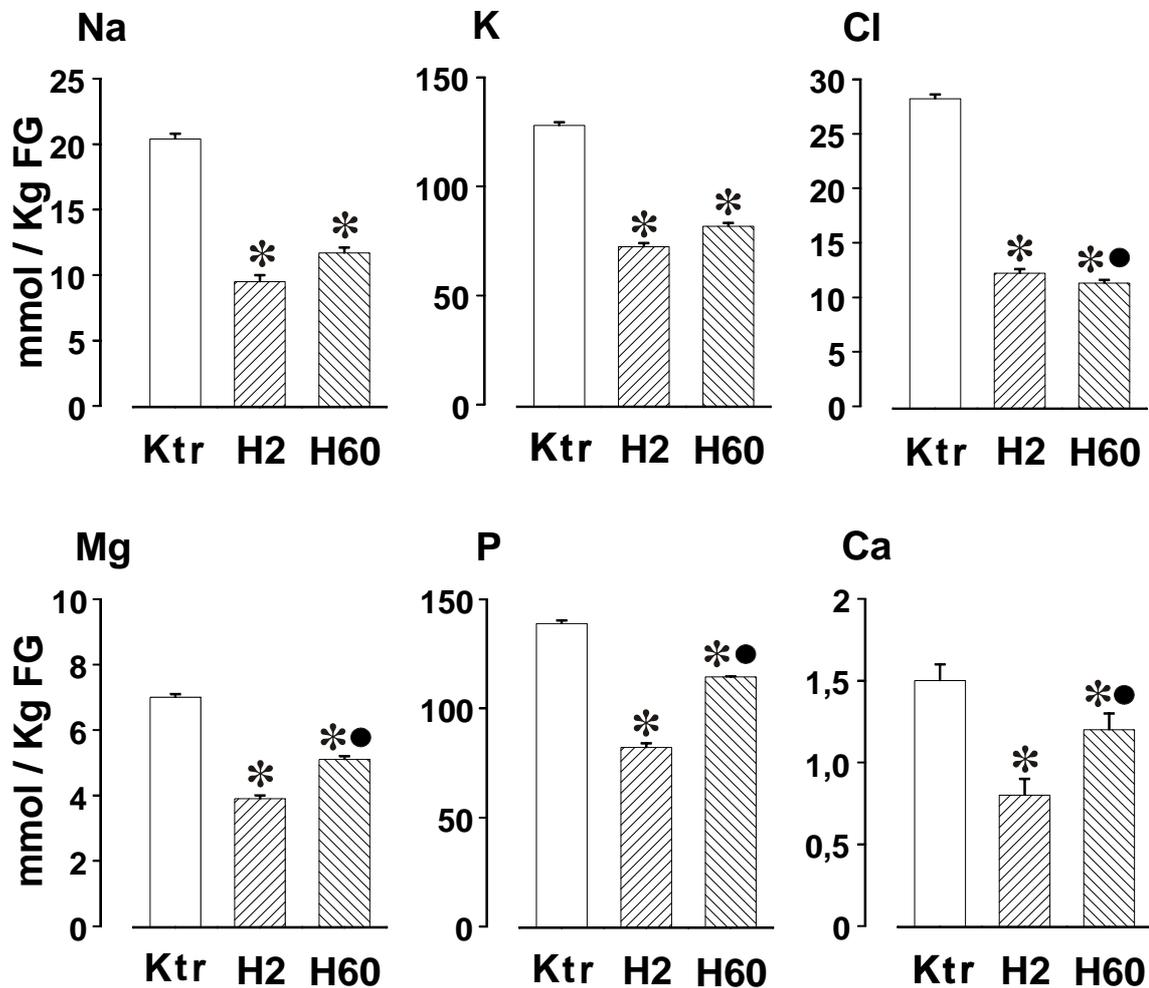


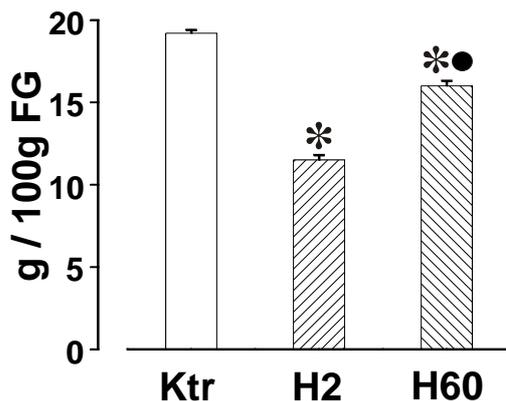
Abb. 17: Zelluläre Elementkonzentrationen unter Kontrollbedingungen (Ktr) sowie 2 (H2) und 60 Minuten (H60) nach akutem hypotonem Stress.

\* signifikant verschieden verglichen zur Kontrolle (Ktr)

• signifikant verschieden verglichen zur Hypotoniedauer von 2 min (H2)

Abnahme nicht mehr wesentlich veränderten. Die unten dargestellten Diagramme enthalten die Konzentrationen der Elemente, die nach dem initialen Abfall wieder signifikant anstiegen. Zwei und 60 Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stresses

### Trockengewicht



**Abb. 18 :**

Zelluläre Trockengewichte unter Kontrollbedingungen (Ktr) sowie 2 (H2) und 60 Minuten (H60) nach akutem hypotonem Stress.

\* signifikant verschieden verglichen zur Kontrolle (Ktr)

• signifikant verschieden verglichen zur Hypotoniedauer von 2 min (H2)

fielen die Na-Konzentration von 20,4 auf 11,1 bzw. 11,7, die K-Konzentration von 127,9 auf 74,5 bzw. 81,7 und die Cl-Konzentration von 28,2 auf 14,5 bzw. 11,3 mmol/kg Feuchtgewicht ab. Für die übrigen Elemente, deren Konzentrationen sich während des hypotonen Stresses wieder regenerierten, ergaben sich folgende Werte. Zwei und 60 Minuten nach Beginn des hypotonen Stress verminderte sich die Konzentration für Mg von 6,2 auf 3,9 bzw. 5,1, für P von 138,9 auf 82,2 bzw. 114,4 und für Ca von 1,5 auf 0,8 bzw. 1,2 mmol/kg Feuchtgewicht. Wie in Abbildung 18 dargestellt, hatte sich das zelluläre Trockengewicht 2 und 60 Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stresses von 19,2 auf 11,5 bzw. 16,0 g/100 g Feuchtgewicht vermindert. Tabelle 6 gibt die Elementgehalte von A6-Zellen bezogen auf das zelluläre Trockengewicht unter Kontrollbedingungen sowie 2 und 60 Minuten nach Applikation des akuten hypotonen Stresses wieder. Geht man davon aus, dass das zelluläre Trockengewicht während der Dauer des hypotonen Stresses von 1 Stunde nicht beeinträchtigt wurde, spiegeln Änderungen der so angegebenen Elementkonzentrationen Veränderungen des zellulären Elementbestandes wieder. Während sich die Konzentrationen für Mg, P und Ca unter der Einwirkung des hypotonen Schocks nicht wesentlich gegenüber den Kontrollwerten verändert haben, sind die Konzentrationen für

*Ergebnisse*

Na, K und Cl signifikant abgefallen. Zwei und 60 Minuten nach Beginn des hypotonen Stresses verminderte sich der zelluläre

**Tabelle 6:** Zelluläre Elementgehalte bezogen auf die zellulären Trockengewichte unter Kontrollbedingungen sowie 2(H2) und 60 Minuten (H60) nach Einführung des akuten hypotonen Stress.

	Na	K	CL	Mg	P	Ca
	mmol/kg Trockengewicht					
<b>Kontrolle</b>	106,3 ± 2,2	666,1 ± 8,1	146,9 ± 1,9	32,3 ± 2,2	723,4 ± 6,8	7,8 ± 0,3
<b>Hypo 2</b>	96,6* ± 2,1	648,1 ± 5,2	126,0* ± 1,8	33,9 ± 1,2	714,8 ± 6,7	7,0 ± 0,2
<b>Hypo 60</b>	73,1*• ± 2,5	510,6*• ± 6,8	70,6*• ± 2,5	31,9 ± 1,2	715,0 ± 8,1	7,5 ± 0,3

\* signifikant verschieden verglichen zur Kontrolle

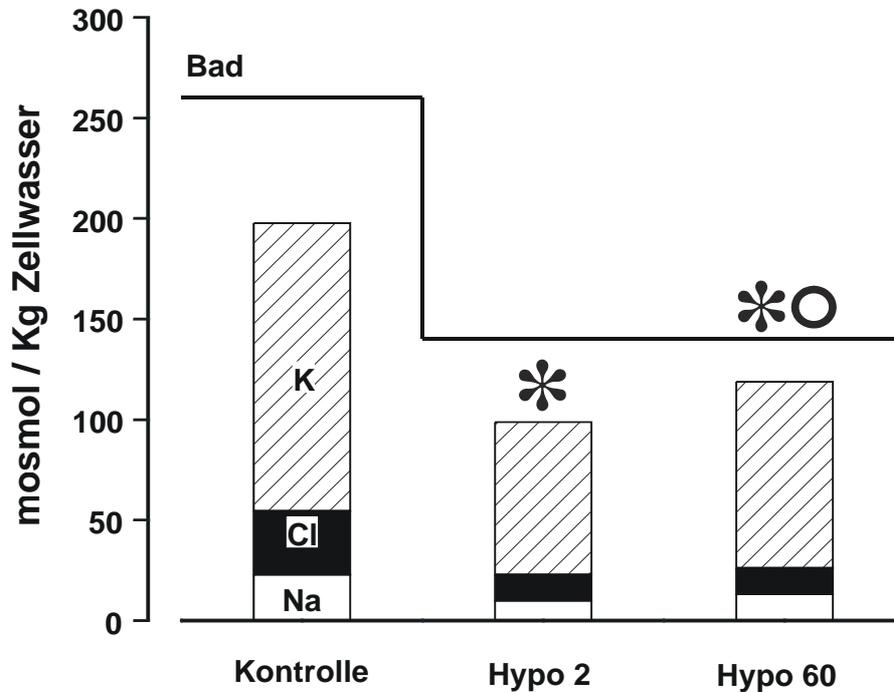
• signifikant verschieden verglichen zu Hypo2

Bestand von Na um 9 bzw. 31 %, der von K um 3 bzw. 23 % und der von Cl um 14 bzw. 62 %.

Abbildung 19 verdeutlicht den Beitrag von zellulärem Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolalität. Bei der Kalkulation der Osmolalitätsbeiträge wurde davon ausgegangen, dass Na, K und Cl nur in der wässrigen Phase der Zelle vorkommen und ihre osmotischen Koeffizienten denen in extrazellulärer Lösung entsprechen. Außerdem wurde angenommen, dass sich die Zellen ausschließlich mit der basolateralen Seite osmotisch ins Gleichgewicht setzen, so dass die zelluläre Gesamtosmolalität der der basolateralen Inkubationslösung gleicht. Zwei Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stress verminderte sich die aus den Na-, Cl- und K-Konzentrationen errechnete Osmolalität von 197,8 auf 98,8 mosmol/kg, um dann nach 60 Minuten hypotonem Stress wieder auf 118,7 mosmol/kg anzusteigen. Unter Kontrollbedingungen trugen

K, Cl und Na zu 76 %, nach zwei Minuten hypotonem Stress zu 70 % und nach 60 Minuten hypotonem Stress zu 85% zur zellulären Gesamtosmolalität bei.

### Osmolalität



**Abb. 4:** Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolalität unter Kontrollbedingungen sowie 2 (Hypo 2) und 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (Hypo 60). Die mit Bad gekennzeichnete durchgezogene Linie gibt die Osmolarität der basolateralen Inkubationslösung an.

\* signifikant verschieden verglichen zu Kontrolle

o signifikant verschieden verglichen zu Hypo 2

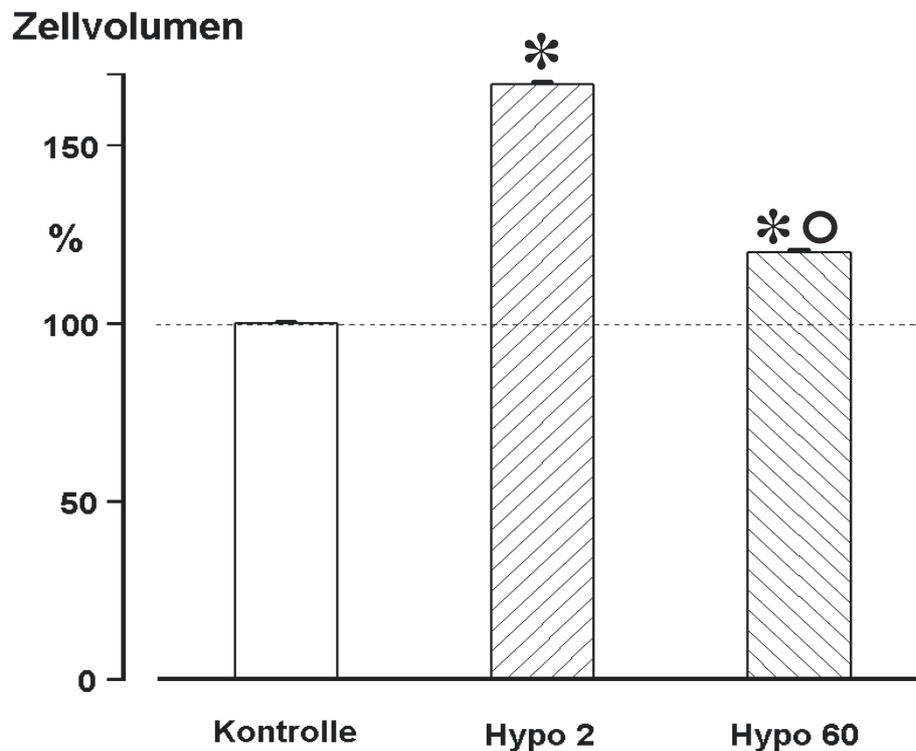
Abbildung 20 gibt die durch akuten hypotonen Stress hervorgerufenen Änderungen des Zellvolumens wieder. Die relativen Zellvolumina wurden mit Hilfe des zellulären Trockengewichtes kalkuliert. Geht man davon aus, dass sich die zelluläre Trockenmasse während des hypotonen Stresses nicht verändert, dann ist:

$$TG_{Ktr} \cdot V_{Ktr} = TG_{Hypo} \cdot V_{Hypo}$$

Dabei sind TG das Trockengewicht und V das Zellvolumen unter Kontrollbedingungen (Ktr) und während des hypotonen Stress (Hypo). Setzt man das Volumen unter Kontrollbedingungen gleich 100 % und löst die Gleichung nach  $V_{Hypo}$  auf, so ergibt sich:

$$V_{Hypo} = TG_{Ktr} \cdot 100 \% / TG_{Hypo}$$

Nach 2 Minuten des akuten hypotonen Stresses stieg das Zellvolumen auf 160 % an, um in den folgenden 58 Minuten wieder auf 120 % abzufallen.



**Abb. 20 :** Zelluläres Volumen in % der Kontrolle sowie 2 (Hypo2) und 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (Hypo 60).

\* signifikant verschieden verglichen zu Kontrolle

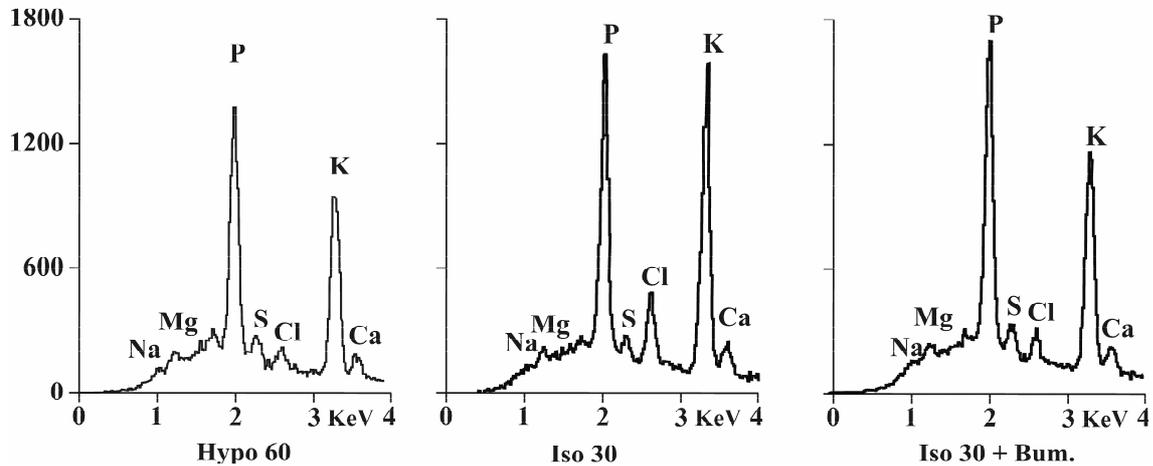
○ signifikant verschieden verglichen zu Hypo 2

#### **4. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress und anschließender Isotonie**

In einer separaten Versuchserie wurden Epithelien nach vorhergehendem akutem hypotonem Stress basolateral wieder mit isotoner Ringerlösung perfundiert. Bei der Darstellung dieser Resultate werden die Daten, die nach 60 Minuten akutem hypotonem Stress erhalten wurden, als Ausgangsbasis herangezogen.

Abbildung 21 demonstriert anhand von 3 zellulären Röntgenspektren die Effekte auf die zellulären Elementkonzentrationen, die bei Aufhebung eines hypotonen Schocks auftraten. Die Röntgenspektren wurden nach einem einstündigen hypotonen Stress und

30 Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von Bumetanid aufgenommen. Ohne Bumetanid nahmen nach dem Zählrate



**Abb. 21:** Zelluläre Röntgenspektren 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (Hypo 60) und 30 Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen auf der basolateralen Seite des Epithels in Ab- (Iso 30) und Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (Iso 30 + Bum).

Übergang von basolateraler Hypotonie zu Isotonie die Röntgensignale für Mg und P geringfügig und die für Cl und K beträchtlich zu. Während in Anwesenheit Bumetanid die Anstiege in dem Mg- und P- Signals etwas stärker ausgeprägt waren, waren diese für das Cl- und K-Signal deutlich vermindert. Abbildung 22 zeigt den Verlauf der zellulären Elementkonzentrationen und des Trockengewichts nach der Wiederherstellung von isotonen Bedingungen. 2 Minuten nach dem Wechsel auf isotone Bedingungen waren die Konzentrationen aller zellulären Elemente und das Trockengewicht signifikant angestiegen. Während im weiteren Verlauf der isotonen Phase die Konzentrationen für P, Mg, und Na und auch das Trockengewicht wieder abfielen, stiegen die K- und Cl- Konzentrationen deutlich weiter an.

### Elementkonzentration

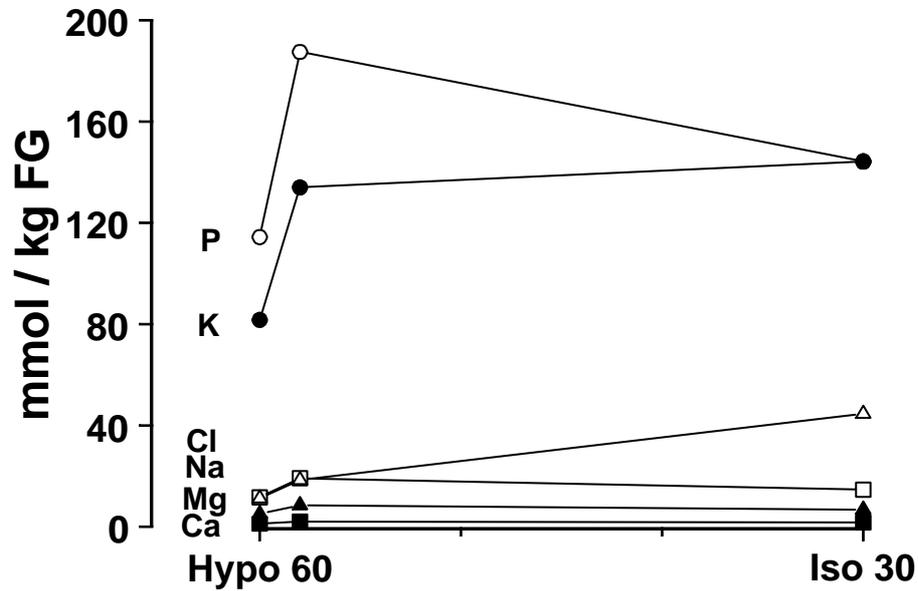


Abb. 22a: Verlauf der zellulären Elementkonzentrationen nach der Wiederherstellung isotoner Bedingungen in mmol / Kg bezogen auf das Feuchtgewicht.

### Trockengewicht

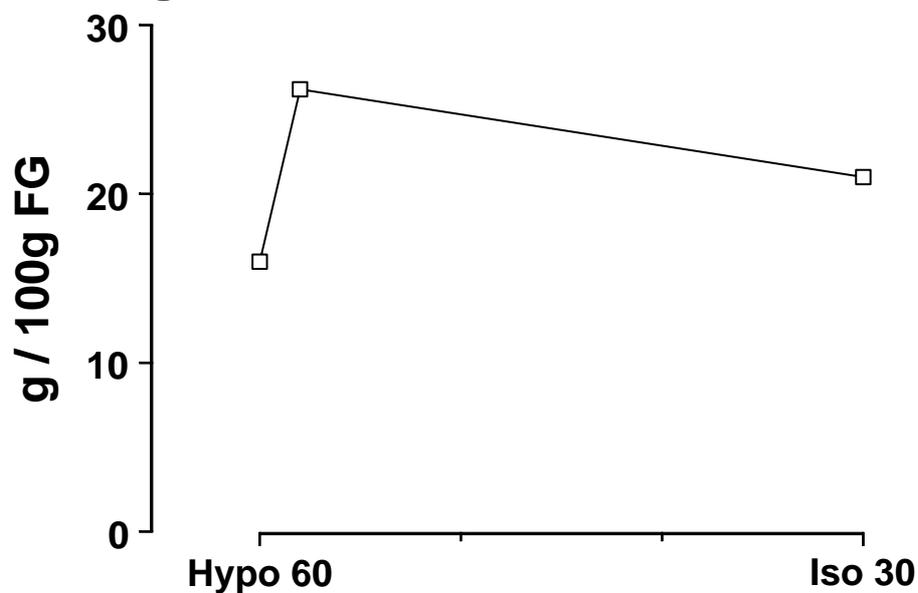


Abb. 22b: Verlauf des zellulären Trockengewichts nach der Wiederherstellung isotoner Bedingungen in g/100g bezogen auf das Feuchtgewicht.

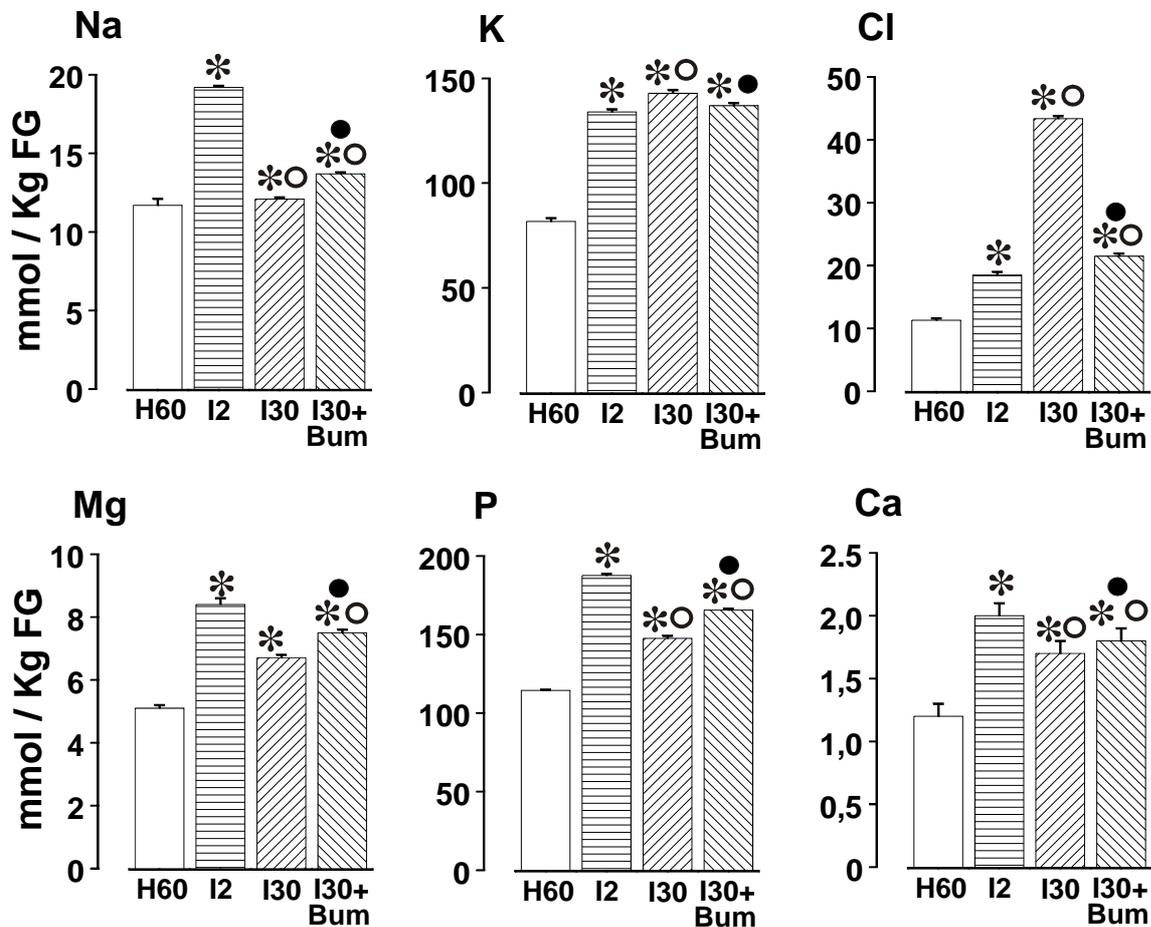


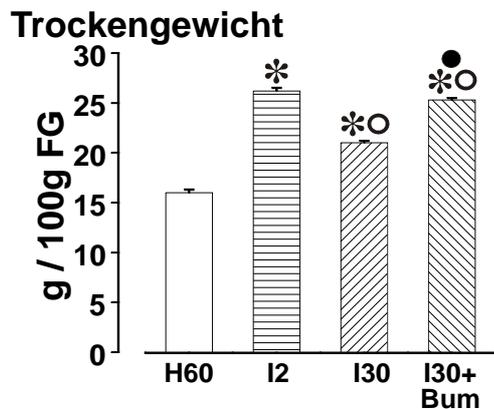
Abb. 23 : Zelluläre Elementkonzentrationen 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (H 60) sowie 2 (I 2) und 30 (I 30) Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen. Die 30 Minuten dauernde isotope Reperfusion wurde in etwa der Hälfte der Fälle in Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (I 30+Bum) durchgeführt.

\* signifikant verschieden verglichen zu H60

○ signifikant verschieden verglichen zu I2

● signifikant verschieden verglichen zu I30

Abbildung 23 gibt die Elementkonzentrationen 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress sowie 2 und 30 Minuten nach Aufhebung der basolateralen Hypoosmolarität in Säulendiagrammen wieder. Nach Wiedereinführung von isotonen Bedingungen stieg innerhalb von 2 Minuten die Konzentration aller Elemente um 50 – 60 % an. In der späten Phase der isotonen Reperfusion fielen die Konzentrationen für Na, Mg, P und Ca wieder ab, wogegen die Konzentrationen für K und Cl weiter anstiegen.



**Abb. 24:** Zelluläre Trockengewichte 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (H 60 sowie I 2) und 30 (I 30) Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen. Die 30 Minuten dauernde isotone Reperfusion wurde in etwa der Hälfte der Fälle in Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (I 30+Bum) durchgeführt.

- \* signifikant verschieden verglichen zu H 60
- signifikant verschieden verglichen zu I 2
- signifikant verschieden verglichen zu I 30

Sowohl der Abfall der Na-, Mg-, P- und Ca-Konzentration als auch der Anstieg der K- und Cl-Konzentration waren in der Anwesenheit von Bumetanid weniger stark ausgeprägt (nicht dargestellt). Hervorzuheben sind die besonders stark ausgeprägten Änderungen der Cl-Konzentration. Ein ähnliches Verhalten wie für Mg, P und Ca konnte für das Trockengewicht nach Wiedereinführung von isotonen Bedingungen beobachtet werden (Abbildung. 24). Nach Wiederherstellung basolateraler Isotonie kam es nach einem initialen Anstieg des Trockengewichts zu einem Wiederabfall, der durch die Einwirkung von Bumetanid (nicht dargestellt) weitgehend aufgehoben wurde. Tabelle 7 gibt die zellulären Elementkonzentrationen bezogen auf die Trockengewichte in mmol/kg Trockengewicht nach 60 Minuten hypotonem Stress sowie 2 und 30 Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von Bumetanid wieder. Unter allen experimentellen Bedingungen sind die Elementgehalte für Mg, P und Ca in etwa gleich groß. In Abwesenheit von Bumetanid kam es nach 30 Minuten Isotonie zu einem geringfügigen Abfall des zellulären Na-Gehaltes und zu einem beträchtlichen Anstieg des K- und Cl-Gehaltes. Unter der

*Ergebnisse*

Einwirkung von Bumetanid wurde der Abfall des Na-Gehaltes geringfügig gesteigert und die Anstiege im K- und Cl-Gehalt drastisch vermindert.

**Tabelle 7 :** Zelluläre Elementgehalte bezogen auf die zellulären Trockengewichte 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (Hypo 60) sowie 2 und 30 Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen auf der basolateralen Seite des Epithels in Ab- ( Iso 2 und Iso 30 ) und in Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (Iso 30 + Bum).

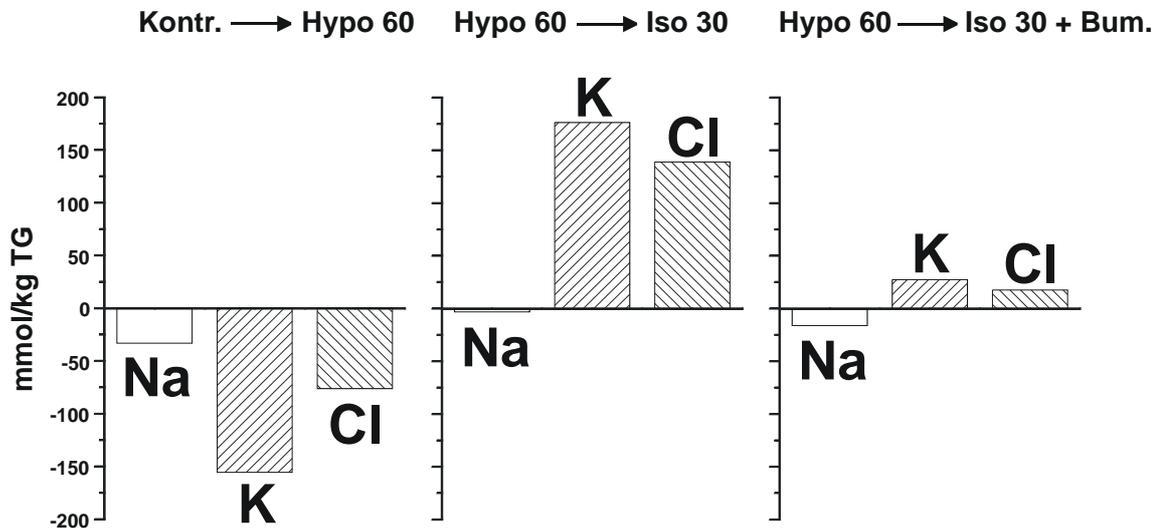
	Na	K	CL	Mg	P	Ca
	mmol/kg Trockengewicht					
<b>Hypo 60</b>	73,1 ± 2,5	501,6 ± 6,8	70,6 ± 2,5	31,9 ± 2,2	715,0 ± 8,1	7,5 ± 0,3
<b>Iso 2</b>	84,0 ± 3,6	540,2* ± 8,4	96,4* ± 2,6	32,0 ± 2,6	714,0 ± 10,8	7,6 ± 0,4
<b>Iso 30</b>	64,9* <sup>■</sup> ± 2,2	686,8* <sup>■</sup> ± 7,1	209,3* <sup>■</sup> ± 2,0	32,2 ± 2,3	707,8 ± 7,8	8,2 ± 0,2
<b>Iso 30 +Bum</b>	56,9 <sup>•</sup> ± 2,2	537,9 <sup>•</sup> ± 7,2	87,9 <sup>•</sup> ± 1,2	28,9 ± 1,2	698,4 ± 8,4	7,6 ± 0,4

\*signifikant verschieden verglichen zu Hypo 60

•signifikant verschieden verglichen zu Iso 30

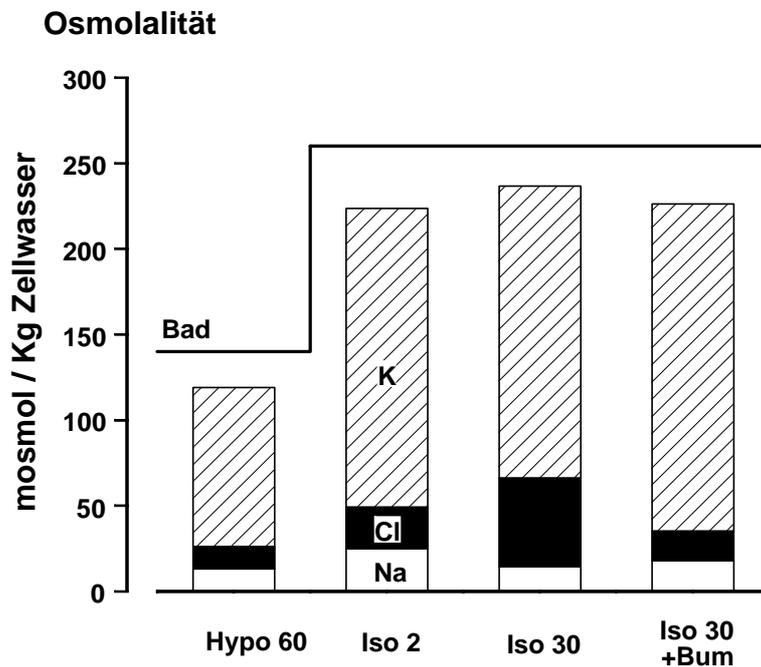
■signifikant verschieden verglichen zu Iso 2

In Abbildung 25 werden die Änderungen der Elementgehalte von Na, K und Cl als zelluläre Verluste bzw. Gewinne wiedergegeben, die sich während der hypotonen Stressphase und in der anschließenden Isotoniephase in Ab- und Anwesenheit von Bumetanid einstellten. In der hypotonen Phase kam es zu einem Verlust von Na, K und Cl, der zusammengefasst 260 mmol/kg Trockengewicht betrug. Dabei trugen die Kationen Na (33,2) und K (155,5) ( $\Sigma$  Na + K = 188,7 mmol/kg Trockengewicht) deutlich stärker als das Anion Cl (76,3 mmol/kg Trockengewicht) zu dem Verlust bei.



**Abb. 25 :** Zelluläre Verluste bzw. Gewinne von Na, K und Cl während der hypotonen Stressphase (Kontr. → Hypo 60) und in der anschließenden Isotoniephase in Abwesenheit (Hypo 60 → Iso 30) und Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (Hypo 60 → Iso 30 + Bum).

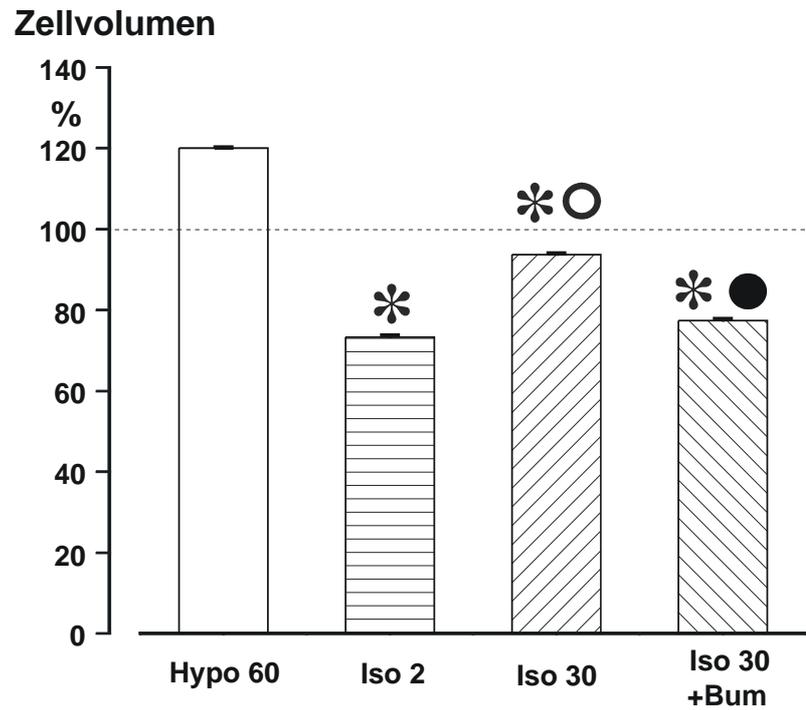
Der Verlust von Na und K wurde daher nur zu 34 % von einem Cl-Verlust begleitet. Ohne Bumetanid wurden in der isotonen Phase geringfügige Mengen an Na (8,2) von den Zellen abgegeben, dafür aber größere Mengen an K (176,2) und Cl (138,7) aufgenommen. Die Nettoaufnahme aus Na-Abgabe und K- und Cl-Aufnahme betrug 311,6 mmol/kg Trockengewicht. Die Nettoaufnahme von Kationen (Summe aus Na-Abgabe und K-Aufnahme) wurde in dieser Phase zu 78,6% von Cl abgedeckt. Wurde die Wiederherstellung der Isotonie in Anwesenheit von Bumetanid durchgeführt, kam es nur zu einer geringfügigen Veränderung des zellulären Elektrolytgehalts. Relativ kleine Mengen wurden an Na (16,2) abgegeben und in Form von K (27,3) und Cl (17,3) aufgenommen. Die Nettoaufnahme von Elektrolyten betrug also 28,4 mmol/kg Trockengewicht. Abbildung 26 gibt Aufschluss über den Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Osmolalität nach 2 und 30 Minuten isotoner Reperfusion. Nach 2 Minuten isotoner Reperfusion betrug der Anteil von Na, K und Cl an der zellulären Gesamtosmolarität 86 % und war damit nur unwesentlich höher als am Ende der hypotonen Phase (85 %). Bis zum Ende der isotonen Reperfusion (Iso 30) stieg der



**Abb. 26 :** Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolalität 60 Minuten nach akutem hypotonem Stress (Hypo 60) sowie 2 und 30 Minuten nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen in Ab- (Iso 2 und Iso 30) und Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (Iso 30 + Bum).

Anteil von zellulärem Na, K und Cl zur Gesamtosmolarität auf 91 % an. Dieser Anstieg konnte durch die Einwirkung von Bumetanid weitgehend aufgehoben werden.

Abbildung 27 verdeutlicht die Zellvolumenänderungen, die sich nach dem Übergang von den hypotonen zu den isotonen Bedingungen ergaben. Der besseren Übersicht wegen, wurden die Volumina in Bezug auf das Kontrollvolumen (100%) angegeben. Zwei Minuten nach Wiederherstellung isotoner Bedingungen (Versuche wurden nur in Abwesenheit von Bumetanid durchgeführt) nahm das zelluläre Volumen verglichen zum Ende der hypotonen Periode von 120 auf 76% ab, um dann bis zum Ende der isotonen Periode auf 94% anzusteigen. Wurde der Wechsel von Hypo- zu Isotonie in Anwesenheit von Bumetanid durchgeführt, ergab sich am Ende der Isotoniephase ein Zellvolumen von 77%, das sich nur unwesentlich von dem nach 2 Minuten Isotonie unterschied.



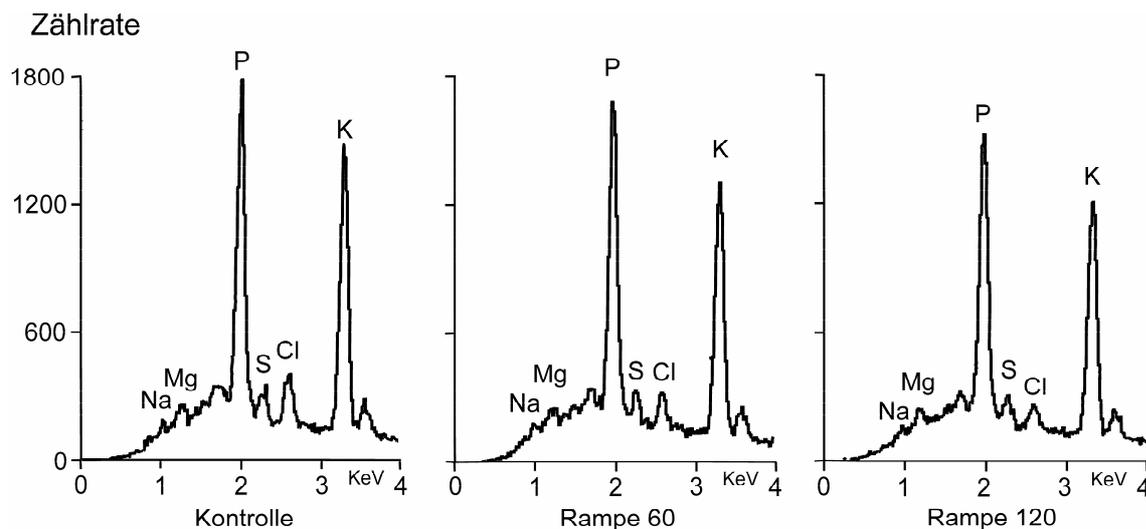
**Abb. 27** : Zelluläres Volumen in % der Kontrolle nach 60 Minuten akutem hypotonem Stress (Hypo 60) sowie 2 (Iso2) und 30 Minuten (Iso30) nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen in Ab- (Iso30) und Anwesenheit von  $10^{-4}$  M Bumetanid (Iso30+Bum).

- \* signifikant verschieden verglichen zu H 60
- signifikant verschieden verglichen zu I 2
- signifikant verschieden verglichen zu I 30

### 5. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität.

Die kontinuierliche Absenkung der basolateralen Osmolarität (Osmolaritätsrampe) erfolgte mit einer Rate von 1 mosmol/min für 60 bzw. 120 min. Dabei wurde die basolaterale Osmolarität von 260 auf 200 bzw. 140 mosmol/l vermindert.

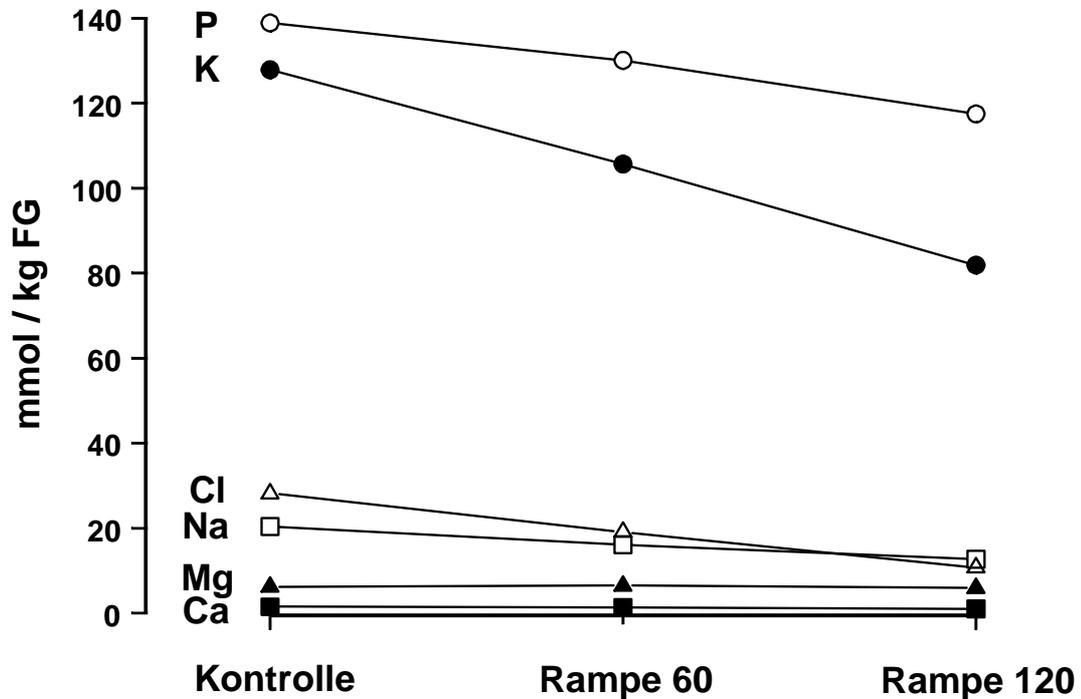
Abbildung 28 verdeutlicht an Hand von repräsentativen Röntgenspektren den Einfluss der kurz- und langandauernden Osmolaritätsrampe auf die zellulären Elementkonzentrationen. Verglichen zu dem Kontrollspektrum weisen die Spektren nach den Osmolaritätsrampen für alle Elemente niedrigere elementcharakteristische Röntgensignale auf. Dabei war die Abnahme elementcharakteristischer



**Abb. 28:** Zelluläre Röntgenspektren unter Kontrollbedingungen und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

Abbildung 29 zeigt die Elementkonzentrationen nach kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe. Ausgehend von den Kontrollbedingungen ist über kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe ein kontinuierlicher Abfall der

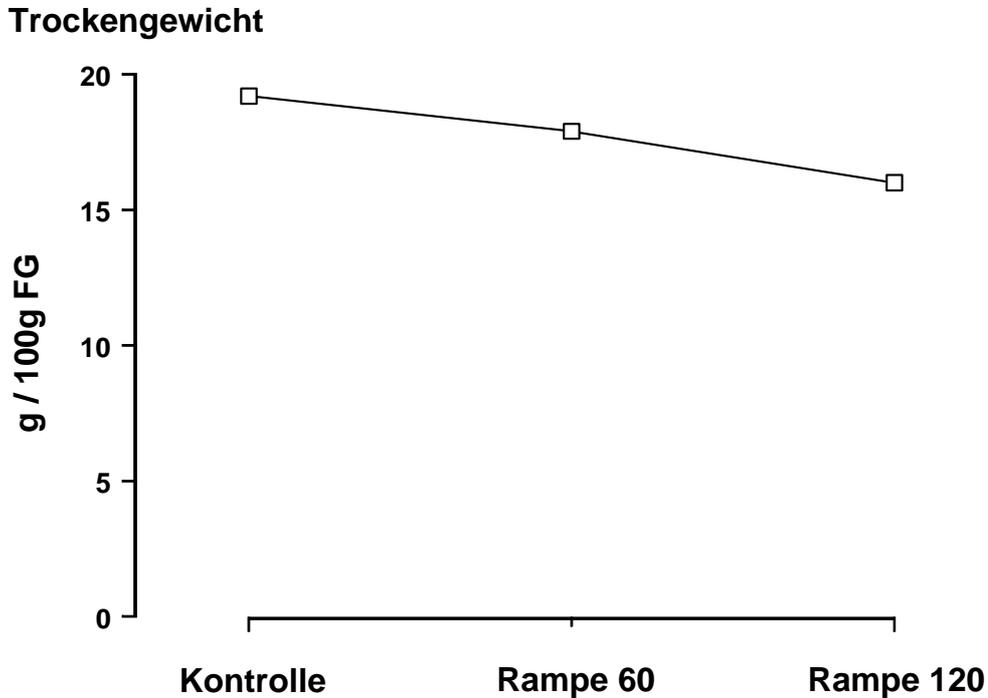
## Elementkonzentration



**Abb. 29a** : Zelluläre Elementkonzentrationen unter Kontrollbedingungen und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/l min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

Elementkonzentrationen zu beobachten. Wie bei dem akuten hypotonen Stress war die Konzentrationsabnahme für die Elemente Na-, Cl- und K stärker ausgeprägt als für die Elemente Mg, P und Ca. Wie aus Abbildung 29b ersichtlich, nimmt der Trockengewichtsgehalt nach den Osmolaritätsrampen ähnlich stark ab wie die P-Konzentration.

Abbildung 30 gibt die zellulären Elementkonzentrationen unter Kontrollbedingungen sowie nach kurz- und langdauernder Osmolaritätsrampe in Säulendiagrammen wieder. Nach kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 200 (R 60) und 140 mosmol/l (R 120) verminderte sich die Konzentration für Na von 20,4 auf 16,1 und 12,7, die für K von 127,9 auf 105,7 und 81,9 und die für Cl von 28,2 auf 19,1 und

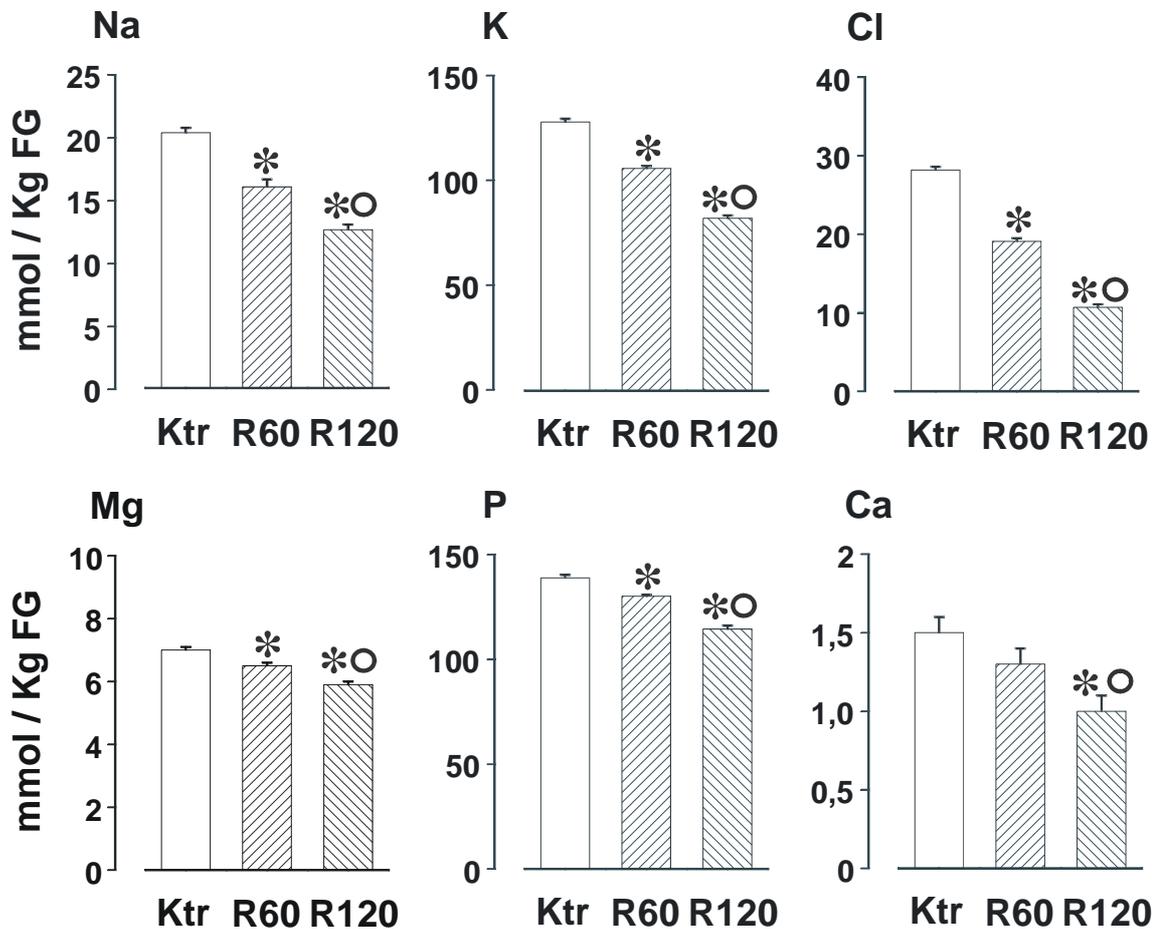


10,7 mosmol/kg Feuchtgewicht. Für die

**Abb. 29 b:** Zelluläre Trockengewichte unter Kontrollbedingungen und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/l min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität von 260 auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

übrigen Elemente, die nur einen relativ geringen Konzentrationsabfall aufwiesen ergaben sich die folgenden Werte. Nach kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe verminderte sich die Konzentration des Mg von 7,0 auf 6,5 und 5,9, die für P von 138,9 auf 130,1 und 117,5 und die für Ca von 1,5 auf 1,3 und 1,0 mosmol/kg Feuchtgewicht. Wie in Abbildung 31 dargestellt, verminderte sich das Trockengewicht mit zunehmender Dauer der Osmolaritätsrampe von 19,2 auf 17,9 bzw. 16,0 g/100 g Feuchtgewicht.

Tabelle 8 zeigt die zellulären Elementgehalte bezogen auf die zellulären Trockengewichte unter Kontrollbedingungen und nach kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe. Verglichen zu den Kontrolldaten haben sich die Konzentrationen



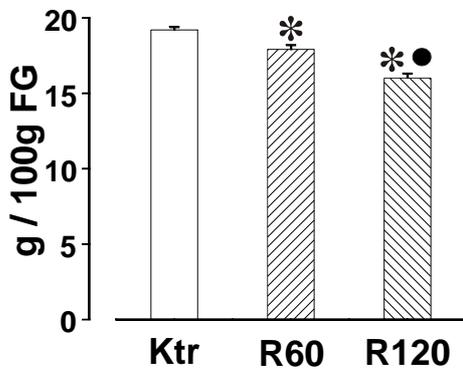
**Abb. 30 :** Zelluläre Elementkonzentrationen unter Kontrollbedingungen (Ktr) und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/l min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (R 60) war die basolaterale Osmolarität auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (R 120) auf 140 mosmol/l abgefallen

\* signifikant verschieden verglichen zu Ktr

○ signifikant verschieden verglichen zu R 60

Für Mg, P und Ca weder nach kurz- noch nach langandauernden Osmolaritätsrampe signifikant verändert. Im Gegensatz dazu kam es nach beiden Osmolaritätsrampen zu einer deutlichen Verminderung des Na-, K- und Cl-Gehalts. Der Abfall dieser Elementkonzentrationen ist nach langandauernder Osmolaritätsrampe signifikant stärker ausgeprägt als nach der kurzen. Nach kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe vermindert sich die Konzentration für Na um 15 bzw. 25 %, die für K um 15 bzw. 23 % und die für Cl um 24 bzw. 55 %.

**Trockengewicht**



**Abb. 31 :**

Zelluläre Trockengewichte unter Kontrollbedingungen und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/l min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (R 60) war die basolaterale Osmolarität auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (R 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

\*signifikant verschieden verglichen zur Ktr

•signifikant verschieden verglichen zu R60

**Tabelle 8 :** Zelluläre Elementgehalte bezogen auf die zelluläre Trockengewichte unter Kontrollbedingungen und nach kontinuierlicher Osmolaritätsabsenkung um 1 mosmol/l min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität von 260 auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

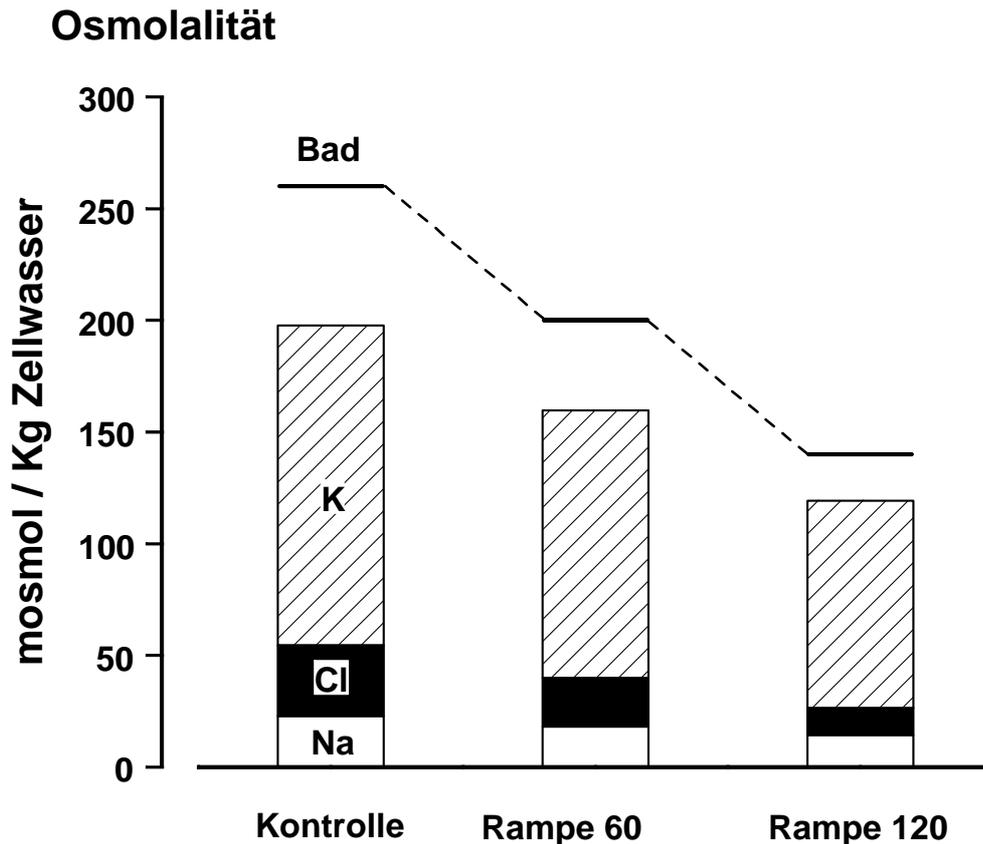
	Na	K	CL	Mg	P	Ca
	mmol/kg Trockengewicht					
<b>Kontrolle</b>	106,3 ± 2,2	666,1 ± 8,1	146,9 ± 1,9	36,4 ± 2,2	723,4 ± 6,8	7,8 ± 0,3
<b>Rampe 60</b>	89,9* ± 2,3	566,5* ± 7,3	112,3* ± 2,5	35,1 ± 1,0	726,8 ± 5,6	7,3 ± 0,4
<b>Rampe 120</b>	79,4*• ± 2,9	511,9*• ± 7,0	66,9*• ± 2,3	36,9 ± 0,6	734,4 ± 8,0	7,5 ± 0,4

\*signifikant verschieden verglichen zur Kontrolle

•signifikant verschieden verglichen zu Rampe 60

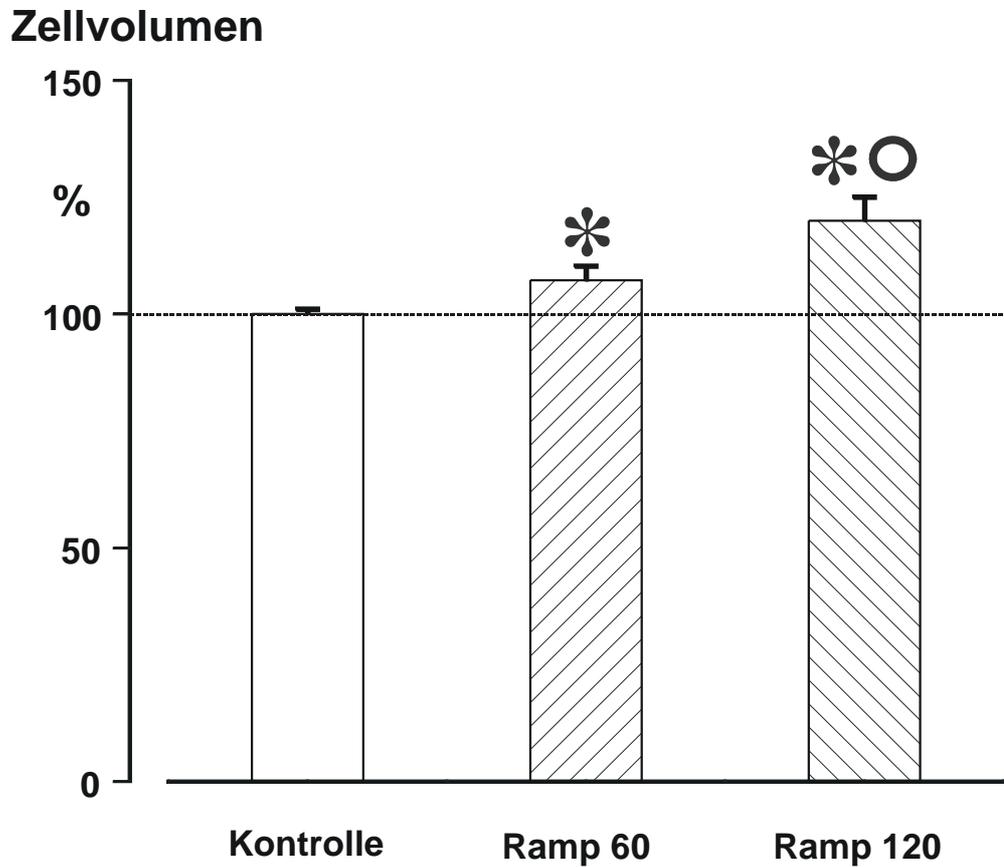
Abbildung 32 demonstriert den Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolarität unter Kontrollbedingungen sowie nach kurz- und langandauernder

Osmolaritätsrampe. Mit zunehmender Abnahme der basolateralen Osmolarität (durchgezogene Linie) nimmt der Beitrag, den das Na, K und Cl zur Gesamtosmolarität der Zelle liefern, zu. Ausgehend von den Kontrollbedingungen steigt dieser von 75 auf 80 % nach kurz- und auf 85 % nach langandauernder Osmolaritätsrampe an.



**Abb. 32 :** Beitrag von zellulärem Na, K und Cl zur Gesamtosmolarität nach 60 und 120 Minuten kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität um 1 mosmol/min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität von 260 auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.

Abbildung 33 gibt die aus den Trockengewichten errechneten Zellvolumenänderungen wieder, die nach kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität auftraten. Verglichen mit der Kontrolle steigt das Zellvolumen nach kurz- und langandauernder Osmolaritätsrampe von 100 auf 107, bzw. 120 % an.



*Abb. 33 : Zelluläres Volumen in % der Kontrolle, nach 60 und 120 Minuten kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität um 1 mosmol/min. Nach der Osmolaritätsrampe von 60 Minuten (Rampe 60) war die basolaterale Osmolarität von 260 auf 200, und nach der Osmolaritätsrampe von 120 Minuten (Rampe 120) auf 140 mosmol/l abgefallen.*

*\*signifikant verschieden verglichen zur Kontrolle*

*○signifikant verschieden verglichen zu Ramp 60*

## **Diskussion**

### **1. Experimentelle Bedingungen und elektrische Transportparameter**

Die experimentellen Bedingungen unter denen in der vorliegenden Arbeit A6-Epithelien in Ussing-Kammern inkubiert wurden, entsprachen denen, wie sie von Van Driessche und seinen Mitarbeitern bei Bestimmungen des Zellvolumens in Abhängigkeit von der basolateralen Osmolarität in mehreren Studien angewendet wurden (De Smet et al 1995 a – c). Dies betrifft vor allem die Zusammensetzung und Tonizität der apikalen Inkubationslösung, das Ausmaß und die Art der Osmolaritätsabsenkung auf der basolateralen Seite des Epithels sowie die elektrischen Bedingungen unter denen die Epithelien gehalten wurden.

Bevor die Epithelien in den Ussing-Kammern einem hypotonen Stress durch Absenkung der basolateralen Osmolarität ausgesetzt wurden, wurde die normale Ringerlösung auf der apikalen Seite gegen eine Na-freie, hypotone Lösung ausgetauscht. Eine Na-freie Lösung wurde gewählt, um Einflüsse des transepithelialen Na-Transports auf volumenregulatorische Prozesse in den A6-Zellen auszuschließen. Von Crowe und Wills (1991) konnte z. B. gezeigt werden, dass sich das osmotisch aktive Volumen der A6-Zellen bei Absenkung der basolateralen Osmolarität in Anwesenheit einer normalen apikalen Ringerlösung nicht wie ein ideales Osmometer verhält. Die beobachtete Zellschwellung war deutlich stärker ausgeprägt als man sie bei einem Osmometerverhalten der A6-Zellen erwartet hätte. Die Ursache für diesen Effekt muss wohl in einer, durch den hypotonen Stress hervorgerufene, allgemeine Aktivitätssteigerung verschiedener Ionentransporter zu suchen sein. Von den oben erwähnten Autoren konnte dann auch tatsächlich nachgewiesen werden, dass es unmittelbar nach dem Beginn des hypotonen Stresses zu einer Zunahme der Na - und Cl - Permeabilität in der apikalen Membran von A6-Zellen kommt (Crowe et al, 1995; Wills et al, 1991), so dass die überproportionale Zellschwellung auf einen apikalen Einstrom von Na und Cl zurückgeführt werden kann.

Mit der Wahl einer hypoosmolaren apikalen Inkubationslösung sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass es bei der Absenkung der basolateralen Osmolarität zur

Ausbildung eines von apikal nach basal gerichteten osmotischen Gradienten kommt. So ausgerichtete osmotische Gradienten führen nämlich zur Eröffnung des passiven parazellulären Transportweges und somit zu einem Substanztausch zwischen apikaler und basolateraler Inkubationslösung. Eine Absenkung der apikalen Osmolarität konnte auch deswegen ohne weiteres angewandt werden, da sie per se keinen Einfluss auf das zelluläre Volumen hat (De Smet et al, 1995 b)

Zur Erzeugung des hypotonen Stresses wurde die NaCl-Konzentration in der basolateralen Inkubationslösung maximal auf fast die Hälfte herabgesetzt. Eine solche relativ große Absenkung der basolateralen Osmolarität wurde angewandt, da A6-Zellen auch dann noch in der Lage sind ihr Volumen nach vorübergehender Zellschwellung nahezu wieder auf den Kontrollwert zurückzuführen (De Smet et al, 1995 a-c). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Volumenregulation in A6-Zellen auch funktioniert, wenn die ursprüngliche, basolaterale Inkubationslösung an Stelle von NaCl 120 mmol Sucrose enthält und der hypotone Stress durch die Wegnahme der Sucrose herbeigeführt wird (Van Driessche et al, 1997).

Um das Ausmaß von variablen Membranpotentialen, die im wesentlichen von den gerade vorliegenden Na- und Cl-Transportraten abhängig sein sollten, einzuengen, wurden die A6-Epithelien bei den lang andauernden Osmolaritätsänderungen der basolateralen Inkubationslösung kurzgeschlossen gehalten. Bei den nur 2 Minuten dauernden Osmolaritätsänderungen (akuter hypotoner Stress und isotone Reperfusion), bei denen die Epithelien aus technischen Gründen nicht kurzgeschlossen wurden, kann man davon ausgehen, dass die zellulären Elementkonzentrationen im wesentlichen nur durch eine transmembranale Wasserbewegung beeinträchtigt werden.

Das basolateral positive transepitheliale Potential sowie der Kurzschlussstrom der A6-Epithelien in der Einlaufphase der Kammerinkubation können prinzipiell auf eine Resorption von Na und/oder Sekretion von Cl zurückgeführt werden. Beiden Transportprozessen liegt zugrunde, dass der Transportschritt über die apikale Membran über rheogene Kanäle erfolgt. Sowohl die zelluläre Na-Aufnahme als auch die zelluläre Cl-Abgabe über die apikale Membran sollte also zu einer Depolarisation der apikalen Membran und somit zur Ausbildung eines transepithelialen Potentials führen. Da der

Kurzschlussstrom jedoch durch Wegnahme des apikalen Na beim Übergang von der Einlauf- auf die Kontrollphase nahezu vollständig aufgehoben wurde, sollte der Kurzschlussstrom und damit auch das transepitheliale Potential im Wesentlichen durch eine Na-Resorption verursacht werden. Dieser Befund stimmt auch mit den Ergebnissen von Voruntersuchungen überein, wonach der transepitheliale Cl-Transport unter nicht stimulierten Bedingungen sehr gering oder gar nicht vorhanden ist (Perkins und Handler, 1981; Keeler und Wenig, 1980; Marunaka und Eaton, 1990). Die bei der Wegnahme des apikalen Na zu beobachtende Reduktion der transepithelialen Leitfähigkeit lässt sich ebenfalls durch die Inhibition des transepithelialen Na-Transportes erklären.

## **2. Elementkonzentrationen von A6-Zellen unter Basisbedingungen**

Elementkonzentrationen von A6-Zellen wurden unter Basisbedingungen entweder direkt nach der Zellzüchtung oder nach vorhergehender Inkubation von A6-Epithelien in Ussing-Kammern ermittelt. In den Ussing-Kammern wurden die Epithelien unter kurzgeschlossenen Bedingungen auf der apikalen Seite entweder mit Ringerlösung oder aber mit Na-freier, hypoosmolarer Lösung perfundiert. Trotz dieser unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ergaben sich in allen drei Fällen ganz ähnliche Elementkonzentrationen (Tabelle 5). Da die zelluläre Na-Konzentration in allen 3 Situationen gleich groß war, obwohl der Na-Transport in einem Fall durch apikale Na-freie Inkubation vollständig unterbunden war, scheint der transepitheliale Na-Transport keinen wesentlichen Einfluss auf die Na-Konzentration von A6-Zellen zu haben. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Untersuchungen an anderen dichten Na-transportierenden Epithelien in denen eine positive Korrelation zwischen Na-Transportrate und zellulärer Na-Konzentration nachgewiesen wurde (Rick et al, 1984; Rick et al, 1988 a +b). Die Ursache für diese Diskrepanz muss wohl darin gesehen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten A6-Epithelien nur eine sehr geringe Na-Transportrate von nur einigen  $\mu\text{A} / \text{cm}^2$  aufwiesen.

Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass eine hypotone, apikale Inkubationslösung keinen nennenswerten Einfluss auf die zellulären Elementkonzentrationen und

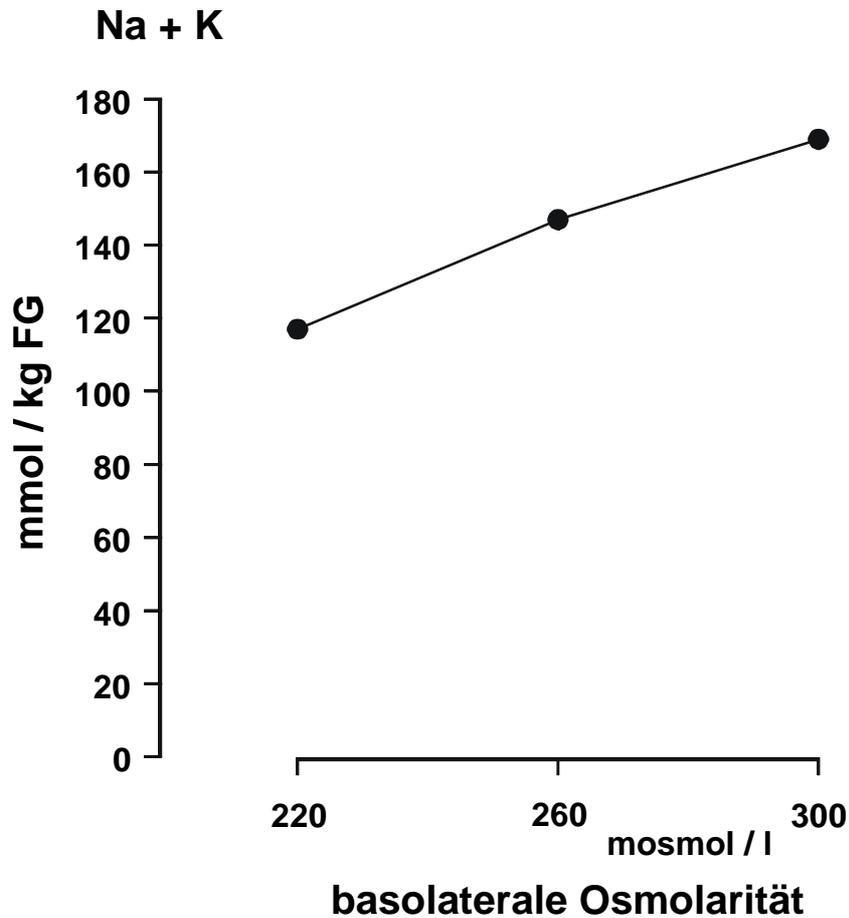
das zelluläre Trockengewicht hat. Dieser Befund steht im Einklang mit Volumenmessungen, nach denen ein Wechsel von isotoner auf hypotone Lösung auf der apikalen Seite von A6-Epithelien zu keiner Veränderung des Zellvolumens führt (De Smet et al, 1995 b). Ein solches Verhalten, dass weder die Elementzusammensetzung noch das Volumen von A6-Zellen auf eine apikale, hypotone Inkubation reagiert, kann nur damit erklärt werden, dass die apikale Membran der Zellen sehr viel schlechter permeabel für Wasser ist als die basolaterale Membran.

Die Elementkonzentrationen, die unter den Basisbedingungen ermittelt wurden, entsprechen weitgehend denen, wie sie mit gleicher Methode an anderen Epithelien erhoben wurden (Buchinger et al, 1989; Beck et al, 1982; Dörge et al, 1988, 1998; Rick et al, 1978, 1985). Bei einem Vergleich dieser Daten können besonders Unterschiede in der Cl-Konzentration festgestellt werden. Während die Cl-Konzentration in den Oberflächenzellen der Krötenharnblase (Buchinger et al, 1989) etwa gleich groß ist wie in den A6-Zellen, konnten für das Epithel des Meerschweinchenkolons (Dörge et al, 1998) und der Froschhaut (Rick et al, 1978) höhere und für das Epithel der Kaninchenharnblase (Dörge et al, 1998), der Rattenniere (Beck et al, 1982) und der Froschkornea (Rick et al, 1985) niedrigere Werte ermittelt werden. Die Ursache für diese Unterschiede ist nicht endgültig geklärt, sollte aber mit der Art und Aktivität der in den verschiedenen Epithelien vorkommenden Cl-Transportern zusammenhängen.

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Elementkonzentrationen im Zusammenhang mit den an A6-Zellen beobachteten Membranpotentialen von etwa 60 mV (Granitzer et al, 1991 und 1993), so lässt sich mit Hilfe der Nernstgleichung feststellen, dass sich die Na-Konzentration weit unterhalb des elektrochemischen Gleichgewichts befinden, während die Konzentrationen für K und Cl weit darüber liegen. Dies entspricht auch den Vorstellungen, die für diese Ionen hinsichtlich ihrer Membrantransporte an A6-Epithelien entwickelt wurden. Während Na entlang eines elektronischen Gradienten passiv in die Zelle einströmt und gegen diesen Gradienten wieder aktiv heraustransportiert wird, wird für K und Cl eine genau entgegengesetzte Transportkonstellation angenommen.

Ein direkter Vergleich zwischen den vorliegenden und den wenigen bisher an A6-Zellen ermittelten Elementkonzentrationen ist nur bedingt möglich. Bestimmt wurden bisher zelluläre Elementgehalte bezogen auf den zellulären P mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse (Borgmann et al, 1994), zelluläre K-Gehalte bezogen auf die zellulären Proteine mit chemischer Analyse (Van Driessche et al, 1997) und Cl-Aktivitäten durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen (Crowe et al, 1995). Verständlicherweise ergeben sich aus den auf den P bezogenen Elementgehalten, die in dem hiesigen Labor erstellt wurden, ganz ähnliche Elementverhältnisse wie aus den Elementkonzentrationen der vorliegenden Arbeit. Die mit chemischer Analyse an nicht konfluenten A6-Zellen erhobenen K-Gehalte führen zu einer etwa gleich großen K-Konzentration wie in der vorliegenden Arbeit, wenn man in der Literatur angegebene Korrekturfaktoren berücksichtigt. Ein Vergleich der Chloridaktivität mit der in dieser Arbeit bestimmten Chloridkonzentration ist insofern schwierig als die Chloridaktivität bei etwas niedrigerer äußerer Osmolarität und Chloridkonzentration ermittelt wurde. Trotzdem sollte erwähnt werden, dass der Aktivitätskoeffizient von 0,75, der sich aus der Chloridaktivität von 27 mM und der hier bestimmten Chloridkonzentration von 36 mmol/kg Zellwasser errechnen lässt, weitgehend mit dem von extrazellulären Lösungen übereinstimmt.

Für die von vielen Wissenschaftlern in der Medizin und der Biologie vertretene Ansicht, dass der osmotische Koeffizient von kleinen, einwertigen Ionen in der Zelle genau so groß ist wie im Extrazellulärraum, gibt es bisher nur indirekte Hinweise. Ein weiterer solcher Hinweis sollte sich ergeben, wenn man die Summe aus Na- und K-Konzentration von Epithelzellen miteinander vergleicht, deren normale Umgebung eine unterschiedliche Osmolarität aufweist. Abbildung 34 zeigt die Summe aus Na- und K-Konzentration verschiedener Epithelien in Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität. Alle gezeigten Daten wurden mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse bestimmt. Für die A6-Zellen, deren basolaterale Osmolarität unter Kontrollbedingungen 260 mosmol/l betrug, ergab sich eine Summe aus Na- und K-Konzentration von 147 mmol/kg Feuchtgewicht.



*Abb. 34 : Summe aus zellulärer Na- und K-Konzentration verschiedener Epithelien in Abhängigkeit von der basolateralen Osmolarität.*

War dagegen die extrazelluläre Osmolarität, wie für das Kaltblüterepithel, dem Froschmagen, um etwa 40 mosmol/l niedriger (Fritzenwanger et al, 1997) oder wie für das Warmblüterepithel, dem proximalen Tubulus der Rattenniere, um etwa 40 mosmol/l höher (Beck et al, 1982), so ergaben sich auch um ca. 20 mmol/kg Feuchtgewicht niedrigere bzw. höhere Werte für die Summe aus Na- und K-Konzentration. Diese positive Korrelation zwischen der Summe der zellulären kleinen Kationen und der basolateralen Osmolarität lässt den Schluss zu, dass die zelluläre Zusammensetzung von Epithelzellen sehr ähnlich ist und dass Na und K substantiell zur zellulären Gesamtosmolarität beitragen.

### 3. Elementkonzentrationen von A6-Zellen nach akutem hypotonem Stress

Mit Hilfe von kontinuierlichen Zellvolumenmessungen konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der ersten Minuten des hypotonen Stresses zu einer Schwellung von A6-Zellen kommt (De Smet, 1995b). Dabei verhalten sich die Zellen, wenn die apikale NaCl-Aufnahme unterbunden ist, wie ideale Osmometer. Hinweise für ein solches Verhalten ergaben sich auch aus den vorliegenden Untersuchungen in denen die apikale NaCl-Aufnahme durch Na-freie Inkubation verhindert wurde. Wie man es bei einem reinen Osmometerverhalten erwarten würde, hatte sich die Höhe der A6-Zellen zwei Minuten nach Beginn des akuten hypotonen Stresses in etwa verdoppelt. (Abbildung 14). Hierbei handelt es sich jedoch um eine mehr qualitative Darstellung, da die Höhe der A6-Zellen auch unter Kontrollbedingungen um  $\pm 20\%$  variierte. Eine exaktere Aussage lässt sich dagegen aus den Änderungen der Elementkonzentrationen und den daraus abgeleiteten Zellvolumina herleiten.

Eine wesentliche Voraussetzung für eine solche Betrachtung besteht in der Annahme, dass sich die Hauptbestandteile des zellulären Trockengewichts während des hypotonen Stresses nicht gravierend verändern, sodass Änderungen im Trockengewichtsgehalt Änderungen im Zellvolumen widerspiegeln. Ein gleiches Verhalten kann auch für die Elemente Mg, P und Ca erwartet werden, die wie Mg und Ca hauptsächlich in gebundener Form vorliegen oder wie P als Bestandteil großer Moleküle vorkommen. Der Befund, dass sich die Konzentrationen bezogen auf das Trockengewicht für Mg, P und Ca während des hypotonen Stress nicht verändert haben (Tabelle 6), spricht für die Richtigkeit der oben gemachten Annahme. Eine weitere Festlegung muss außerdem hinsichtlich des osmotisch inaktiven Volumens gemacht werden. Da in der vorliegenden Arbeit das zelluläre Trockengewicht bei jeder Messung miterfasst wurde, liegt es nahe, den unter Kontrollbedingungen erhaltenen Trockengewichtsanteil von etwa 20 % als osmotisch inaktives Volumen anzusehen. In einer Studie von Crowe et al (1995), in der das Volumen von A6-Zellen 5 Minuten nach Änderung der basolateralen Osmolarität über einen weiten Osmolaritätsbereich ermittelt wurde, wurde dagegen mit Hilfe der Boyle-Van't Hoff Gleichung (Dick, 1966; Hallows und Knauf, 1993) ein osmotisch inaktives Volumen von 30 % ermittelt. Von Crowe et al (1995) wurde jedoch

eingräumt, dass das zelluläre Volumen unter allen Bedingungen aus technischen Gründen zu groß bestimmt wurde und die Volumenbestimmung nach Herabsetzung der äußeren Osmolarität bei bereits angelaufener regulatorischen Volumenabnahme erfolgte. Beide Punkte sollten nach der Boyle-Van't Hoff Gleichung dazu führen, dass das osmotisch inaktive Volumen zu groß abgeschätzt wird. Kontinuierliche Volumenbestimmungen, wie sie von Van Driessche und Mitarbeitern durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass das maximale Zellvolumen nach hypotonem Stress bereits zwischen der zweiten und dritten Minute erreicht wird (van Driessche et al, 1997). Dieses Volumen sollte weitgehend dem Volumen entsprechen, das sich einstellt, wenn sich der osmotisch aktive Raum der Zelle wie ein ideales Osmometer verhält. Impermeable Substanzen wie Mg, P und Ca und auch das Trockengewicht sollten zu diesem Zeitpunkt am stärksten abgefallen sein. In Voruntersuchungen, in denen die Elementkonzentrationen 1,5, 2 und 2,5 Minuten nach Beginn des hypotonen Stress bestimmt wurden, ergaben sich die niedrigsten Werte für das Trockengewicht und für die Konzentrationen für Mg, P und Ca zwei Minuten nach Beginn des hypotonen Stress. Bei der Annahme, dass sich bei einer Änderung der extrazellulären Osmolarität die ganze Zelle wie ein ideales Osmometer verhält, lässt sich die auftretende Zellvolumenänderung durch folgende Beziehung beschreiben:

$$\frac{V_1}{V_0} = \frac{\Pi_0}{\Pi_1} \quad (1)$$

Dabei sind  $V_0$  und  $\Pi_0$  das Ausgangsvolumen der Zelle und die Ausgangsmolarität im Extrazellulärraum und  $V_1$  und  $\Pi_1$  die entsprechenden Parameter nach Änderung der extrazellulären Osmolarität. Unter der Berücksichtigung, dass biologische Zellen ein osmotisch inaktives Volumen  $b$  enthalten, ergibt sich:

$$\frac{V_1 - b}{V_0 - b} = \frac{\Pi_0}{\Pi_1} \quad (2)$$

Aus dieser Beziehung lässt sich durch Einführung der Steigung  $a$  und Verallgemeinerung folgende Geradengleichung ableiten:

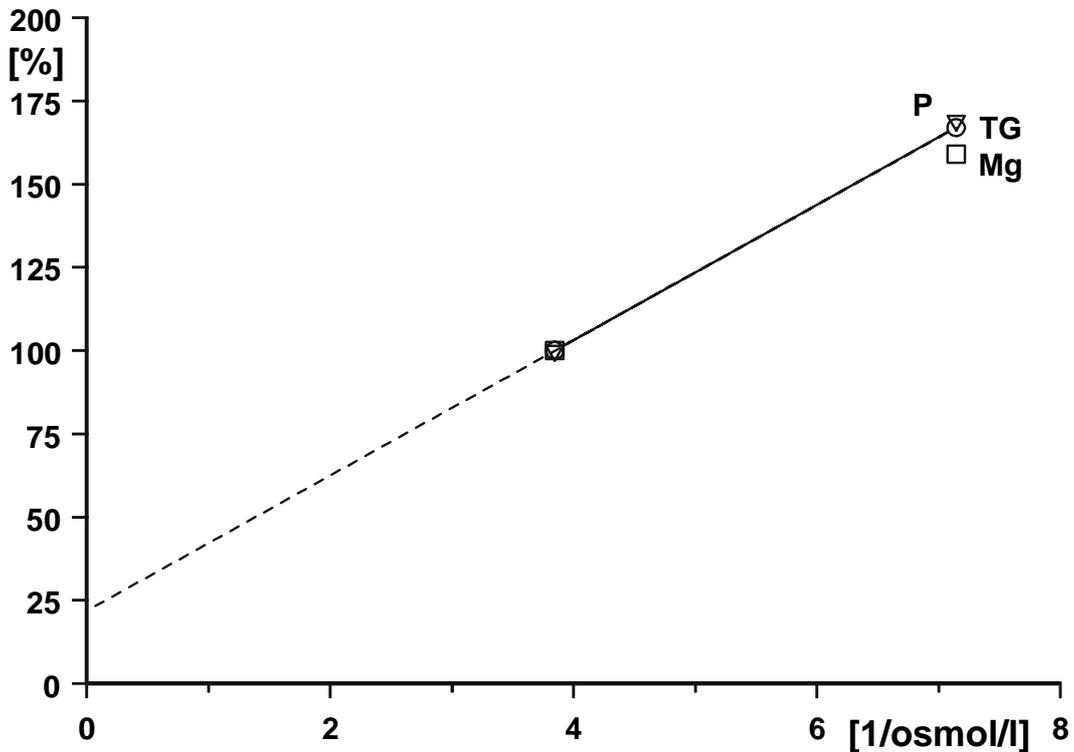
$$(V_1 - b) \cdot \Pi_1 = (V_0 - b) \cdot \Pi_0 = a \quad (3)$$

$$(V_x - b) \cdot \Pi_x = a \quad (4)$$

$$V_x = a \cdot \frac{1}{\Pi_x} + b \quad (5)$$

Bei Auftragung der Zellvolumina gegen die Kehrwerte der extrazellulären Osmolaritäten ergibt sich also das osmotisch inaktive Volumen als Schnittpunkt mit der Ordinate. Das gleiche Resultat wird natürlich erhalten, wenn man die Kehrwerte der zellulären Elementkonzentrationen oder des Trockengewichts als Maß für das zelluläre Volumen gegen die Kehrwerte der verwendeten äußeren Osmolaritäten aufträgt. In Abbildung 35 wurden die Konzentrationsänderungen, die sich nach 2 Minuten des hypotonen Stress ergaben, prozentual angegeben, sodass sich das osmotisch inaktive Volumen in Prozent des gesamten Zellvolumens ablesen lässt. Die eingezeichnete Gerade, die sich aus der Änderung des Trockengewichts ergibt, zeigt ein osmotisch

1 / Konzentration



1 / Osmolarität der Badelösung

**Abb. 35 :** Grafik zur Erfassung des osmotisch inaktiven Volumens. Aufgetragen sind der Kehrwert der Konzentration von Trockengewicht (TG, ○), P(▼) und Mg(□) unter Kontrollbedingungen und 2 Minuten nach hypotonem Stress in % der Kontrolle gegen den Kehrwert der verwendeten basolateralen Osmolaritäten.

inaktives Volumen von 22 % an. Aus der ebenfalls angezeigten Änderung der P- und Mg-Konzentration lässt sich ein etwas höheres bzw. niedrigeres osmotisch inaktives Volumen herleiten. Obwohl der so ermittelte Wert erheblich niedriger ist als der von Crowe et al bestimmte, sollte er eine obere Abschätzung des osmotisch inaktiven Volumens darstellen. Denkbar wäre, dass der durch den hypotonen Stress bedingte Wassereinstrom nach zwei Minuten noch nicht abgeschlossen ist oder aber eine regulatorische Volumenabnahme bereits eingesetzt hat. Beide Vorgänge würden dazu führen, dass die nach hypotonem Stress in Abbildung 35 angegebenen Kehrwerte niedriger sind als sie sich bei einem reinen Osmometerverhalten des osmotisch aktiven Zellvolumens einstellen würde. Wie in dem nächsten Kapitel näher ausgeführt, gibt es Hinweise auf eine sehr früh einsetzende regulatorische Volumenabnahme.

Geht man also davon aus, dass der zelluläre Trockengewichtsgehalt von etwa 20 % unter Kontrollbedingungen das osmotisch inaktive Volumen repräsentiert und dass die osmotische Balance zwischen Zelle und basolateraler Inkubationslösung nach dem hypotonen Stress allein durch Wasserverschiebung (nach Gleichung (2)) wiederhergestellt wird, sollte das zelluläre Volumen auf 169 % ansteigen und die zellulären Elementkonzentrationen auf 59% des Kontrollwertes abfallen. Die Beobachtung, dass das aus den Änderungen des Trockengewichts kalkulierte Zellvolumen tatsächlich innerhalb von 2 Minuten nach Beginn des hypotonen Stress auf 160 % anstieg und die als impermeabel angesehenen Elemente wie Mg, P, S und Ca zur gleichen Zeit auf etwa 60 % abfielen, spricht dafür, dass sich A6-Zellen in der frühen Phase des hypotonen Stress weitgehend wie ideale Osmometer verhalten. Im Gegensatz dazu fiel die Konzentration des Na in den ersten beiden Minuten des hypotonen Stress auf 54 die des K auf 56 und die des Cl auf 51% des Kontrollwertes ab. Aus den Elementgehalten ( Tabelle 6 ) lässt sich außerdem ablesen, dass der zelluläre Bestand dieser Elemente abgenommen hat. Dieser Befund muss damit erklärt werden, dass ein Teil dieser Ionen im Rahmen einer regulatorischen Volumenabnahme bereits 2 Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stresses die Zelle verlassen hat. Diese Interpretation stimmt sehr gut mit der Beobachtung überein, dass der K- und Cl- Efflux von A6-Zellen unmittelbar nach Setzen des hypotonen Stresses gesteigert wird (Ehrenfeld et al, 1994; Van Driessche et al, 1997).

Mit Hilfe der kontinuierlichen Zellvolumenbestimmungen konnte auch gezeigt werden, dass die durch basolaterale Hypoosmolarität hervorgerufene Zellschwellung nach Erreichen eines Maximums (2-3 Minuten nach Einsetzen der Hypoosmolarität) mit einer Zeitkonstante von etwa 5 Minuten wieder aufgehoben wird. (De Smet et al, 1995a). Dieser Vorgang, der in der Literatur auch als „regulatory volume decrease“ (RVD) bezeichnet wird, ist innerhalb von 1 Stunde abgeschlossen. In der vorliegenden Studie wird die RVD durch eine Abnahme des kalkulierten Zellvolumens angezeigt. Während das Zellvolumen in den ersten 2 Minuten des hypotonen Stress auf 160 % anstieg, fiel es in den weiteren 58 Minuten des hypotonen Stress wieder auf 120 % des Kontrollwertes ab. Ähnlich wie das Trockengewicht, aus dessen Änderungen das

relative Zellvolumen kalkuliert wurde, verhielten sich die Elemente Mg, P und Ca. Die Konzentrationen dieser Elemente, deren Zellgehalt sich während des hypotonen Stress nicht verändert, fielen wie das Trockengewicht in der Anfangsphase des hypotonen Stress stark ab, um dann im weiteren Verlauf wieder beträchtlich anzusteigen. (Abbildung 17 und 18). Um die Zellvolumenänderungen nach dem hypotonen Stress zu erfassen, hätte daher an Stelle des Trockengewichts auch jedes dieser Elemente herangezogen werden können.

Die Abnahme des Zellvolumens in der späten Phase des hypotonen Stresses kann nur durch einen Verlust von zellulären Osmolyten erklärt werden. Ausgehend von der Tatsache, dass die apikale Membran von A6-Zellen weitgehend impermeabel für Wasser ist, sollte sich die Zelle osmotisch mit der basolateralen Inkubationslösung ins Gleichgewicht setzen, so dass die zelluläre Osmolarität mit der der basolateralen Inkubationslösung gleichgesetzt werden kann. Würde man also von einer perfekten Volumenregulation ausgehen, sollten die Zellen bei einer Abnahme der basolateralen Osmolarität um 120 mosmol/l auch 120 mosmol/kg Zellwasser verlieren. Bei dieser Vorstellung wird verständlicher Weise davon ausgegangen, dass sich osmotische Vorgänge in der Zelle nur auf die wässrige Phase beschränken. Da jedoch die Volumenwiederherstellung unvollständig war, d. h. auch noch nach 60 Minuten des hypotonen Stress 120 % betrug, sollten die Zellen etwa 25 % weniger Osmolyte verlieren.

Eine Beteiligung des Na, K und Cl an diesen zellulären Osmolytverlusten lässt sich aus den verschiedenen Darstellungen in den Ergebnissen ableiten. So verhalten sich die direkt ermittelten Konzentrationen dieser Elemente in mmol/kg Feuchtwicht in der späten Phase des hypotonen Stress anders als das Trockengewicht und die Konzentrationen der nicht permeablen Elemente Mg, P und Ca (Abbildung 16a und 16b). Während der Trockengewichtsgehalt und die Konzentrationen von Mg, P und Ca mit abnehmenden Zellvolumen wieder ansteigen, bleiben die Konzentrationen von Na, K und Cl weitgehend unbeeinflusst. Dieses Verhalten führt in der späten Phase des hypotonen Stresses zu einem signifikanten Abfall der Na-, K- und Cl-Gehalte ( Tabelle 6 ). Aus dem Abfall der Osmolarität in der basolateralen Inkubationslösung und der am

Ende des hypotonen Stress noch vorhandenen Abnahme des Trockengewichts lässt sich errechnen, dass die Zellen etwa 370 mmol/Kg Trockengewicht an Osmolyten während des hypotonen Stress verloren haben. Davon werden 33 als Na, 156 als K und 76 mmol/kg Trockengewicht als Cl abgegeben. Dies bedeutet, dass 70 % des gesamten, zu erwartenden Osmolytverlustes durch die Ionen Na, K und Cl getragen wird.

Unter der Voraussetzung, dass kleine, einwertige Ionen nur im wässrigen Raum der Zelle vorkommen und ihr osmotischer Koeffizient gleich groß ist wie im extrazellulären Raum, tragen Na, K und Cl unter Kontrollbedingungen zu etwa 75 % zur zellulären Gesamtosmolarität bei. Hinweise für die Richtigkeit der gemachten Annahmen liefern Analysen des intrazellulären Status von Ionen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (Civan und Shporer, 1989) und die gute Übereinstimmung zwischen extra- und intrazellulären osmotischen Koeffizienten in einer Suspension von permeabilisierten Erythrozyten (Freedman und Hoffman, 1979). Der Befund, dass dieser prozentuale Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolarität nach 60 Minuten hypertonen Stress auf 85 % angestiegen ist, kann nur so interpretiert werden, dass auch andere Osmolyte als Na, K und Cl während des hypotonen Stress die Zelle verlassen haben. Dieses Verhalten unterscheidet sich von dem von Zellen isolierter Rattennierentubuli, bei denen der Beitrag von Na, K und Cl zur Gesamtosmolarität sowohl vor als auch nach dem hypotonen Stress etwa 80 % ausmachte (Rick et al, 1993). Obwohl eine endgültige Klärung nicht möglich ist, ist diese Diskrepanz wahrscheinlich nicht auf die unterschiedliche Herkunft der Zellen zurückzuführen, sondern kann mit den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen erklärt werden. Während die basolaterale Osmolarität der A6-Zellen um nahezu die Hälfte (von 260 auf 140 mosmol/l) herabgesetzt wurde, wurde sie im Inkubationsmedium der Nierenzellen nur um etwa 1/3 (von 290 auf 190 mosmol/l) vermindert. Denkbar wäre also, dass bedingt durch den ausgeprägteren hypotonen Stress anteilmäßig mehr andere Osmolyte als Na, K und Cl während der RVD die A6-Zelle verlassen. Dies sollte zu einer Verkleinerung der zellulären osmotischen Lücke führen, die sich aus der Differenz zwischen basolateraler Osmolarität und der Summe der zellulären Konzentrationen von Na, K und Cl errechnen lässt. Außerdem enthielten die Inkubationslösungen der isolierten

Nierentubulie mit 25 mmol/l eine zehnfach höhere  $\text{HCO}_3$ -Konzentration als die Inkubationslösungen der A6-Epithelien. Da allgemein angenommen wird, dass die zelluläre  $\text{HCO}_3$ -Konzentration nur etwas niedriger ist als die extrazelluläre, sollten die Nierenzellen verglichen zu den A6-Zellen auch eine etwa zehnfach höhere  $\text{HCO}_3$ -Konzentration gehabt haben. Während also die osmotische Bedeutung von  $\text{HCO}_3$  in den A6-Zellen als vernachlässigbar klein angesehen werden kann, liefert die  $\text{HCO}_3$ -Konzentration in den Nierenzellen mit etwa 20 mmol/l einen nennenswerten Beitrag zur zellulären Gesamtosmolarität. Die etwas größere osmotische Lücke, die sich nach dem hypotonen Stress für die Nierenzellen ergab, könnte daher zumindest zu einem gewissen Teil auf die relativ hohe  $\text{HCO}_3$ -Konzentration zurückgeführt werden.

Der während der RVD auftretende zelluläre Verlust von Osmolyten von etwa 30 %, der nicht durch eine zelluläre Abgabe von Na, K und Cl erklärt werden kann, betrifft Substanzen, die sich dem Nachweis mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse entziehen. Substanzen und Effekte, die nicht mit der hier verwendeten Methode erfasst werden können, von denen aber gezeigt wurde, dass sie an der Volumenregulation von Zellen beteiligt sind, sind  $\text{HCO}_3$  und anderer organische Substanzen sowie eine Abnahme des osmotischen Koeffizienten von nichtpermeablen Substanzen. Eine Abnahme der osmotischen Koeffizienten von nichtpermeablen Substanzen, wie er nach hypotonem Stress für Hämoglobin in den Erythrozyten demonstriert wurde (Solomon et al, 1986), kann während der RVD von A6-Zellen keine bedeutende Rolle spielen, da die basolaterale Osmolarität nach dem hypotonen Stress nahezu vollständig durch zelluläres Na, K und Cl ausbalanciert wurde. Eine gleiche Aussage sollte auch für den möglichen zellulären Verlust von  $\text{HCO}_3$  zutreffen. Wie bereits erwähnt, ist die zelluläre  $\text{HCO}_3$ -Konzentration in den A6-Zellen mit ca. 2 mmol/l so niedrig, dass eine Abnahme des zellulären  $\text{HCO}_3$ -Gehalts nicht wesentlich zu dem erwarteten Osmolytverlust beitragen kann. Die osmotische Lücke, die durch andere Osmolyte als Na, K und Cl repräsentiert wird, könnte nach Angaben in der Literatur weitgehend durch Aminosäuren geschlossen werden. Durch Bestimmung der zellulären Aminosäurekonzentrationen in A6-Zellen konnte von De Smet et al (1995 a) gezeigt werden, dass der für die RVD erforderliche Osmolytverlust zu 17 % durch eine zelluläre Abgabe von Aminosäuren getragen wird.

Der während der RVD in den A6 – Zellen auftretende zelluläre Verlust an Na und K ( $\Sigma$  Na + K = 189 mmol/kg Trockengewicht) ist sehr viel größer als der gleichzeitig beobachtete Cl-Verlust (76 mmol/kg Trockengewicht). Die hieraus resultierende Anionenlücke könnte zur Gewährleistung der Elektroneutralität durch 2 verschiedene Vorgänge kompensiert werden. Zum einen könnten Anionen, die nicht mit der Elektronenstrahlmikroanalyse nachweisbar sind, die Zellen verlassen, zum anderen wäre eine Abnahme von zellulären, negativen Festladungen in der Zelle denkbar. Als nicht detektierbares Anion käme neben den Verlust von Aminosäuren prinzipiell  $\text{HCO}_3$  in Frage. Aber ähnlich wie bei der Kompensation der osmotischen Lücke, kann davon ausgegangen werden, dass die zelluläre  $\text{HCO}_3$ - Konzentration zu niedrig ist, dass eine Abnahme des zellulären  $\text{HCO}_3$ -Gehalts wesentlich zur Schließung der Anionenlücke beiträgt. Andererseits ist es jedoch denkbar, dass  $\text{HCO}_3$  neben Cl als Begleitanyon für Na und K in Frage kommt. Diese Vorstellung setzt voraus, dass für jedes in der Zelle gebildete  $\text{HCO}_3$ - Ion, das aus Gründen der Elektroneutralität zusammen mit einem Na- oder K- Ion die Zelle verlässt, eine negative Festladung in der Zelle durch ein H- Ion titriert wird. Ein gleicher Effekt würde natürlich erzielt, wenn die für die Titration der negativen Festladungen erforderlichen H-Ionen aus dem extrazellulären Raum stammen und im Verhältnis 1:1 gegen zelluläres Na oder K ausgetauscht werden. Eine solche Beteiligung von zellulären Puffern an der Zellvolumenregulation ist besonders für Erythrozyten diskutiert und beschrieben worden (Freeman et al, 1987; Lew und Bookschin, 1986). Eine ähnlich große Anionenlücke wie für die A6-Zellen konnte während der RVD von Tubuluszellen der Rattenniere aufgezeigt werden (Rick 1993). Der Autor dieser Studie kommt zu dem Schluss, dass möglicherweise andere Anionen als Cl und  $\text{HCO}_3$  die Zelle verlassen müssen und eine Abnahme von negativen Festladungen erfolgen muss, um während der RVD der Tubuluszellen Elektroneutralität zu gewährleisten.

Mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass zelluläre Verluste von K und Cl an der RVD von A6-Zellen beteiligt sind. Bestimmungen von Cl- und Rb-Flüsse ergaben einen erhöhten Efflux von Cl und K während der RVD (Brochiero et al, 1995). Hinweise darauf, dass dieser

gesteigerte Ionenausstrom durch basolaterale K- und Cl-Kanäle erfolgt, wurden durch den Einsatz von verschiedenen K- und Cl-Kanalblockern geliefert (Broillet und Horisberger, 1991; Ehrenfeld et al, 1994). Unter der Einwirkung von Kanalblockern wurde die Charakteristik des K-Effluxes während der RVD verändert, eine erhöhte basolaterale Leitfähigkeit herabgesetzt und die RVD aufgehoben. Die Untersuchung von Einzelkanalströmen hat außerdem gezeigt, dass unmittelbar nach dem akuten hypotonem Stress verschiedene Typen ruhender Cl-Kanäle aktiviert werden und die Aktivität von bereits funktionierenden Cl-Kanälen gesteigert wird (Banderali und Ehrenfeld, 1996; Broilet und Horrisberger, 1991). Ein KCl-Kotransporter, der in die Volumenregulation von bestimmten Epithelzellen eingeschaltet ist (Warnock und Eveloft, 1989), scheint für den erhöhten KCl-Efflux während der RVD von A6-Zellen nicht verantwortlich zu sein. Diese Aussage stützt sich auf Untersuchungen, in denen A6-Zellen infolge eines hypotonen Stresses eine unveränderte RVD aufwiesen, obwohl die basolaterale Badelösung anstelle von Cl NO<sub>3</sub> oder SCN enthielt (Van Driessche et al, 1997). Von beiden Ersatzanionen ist bekannt, dass sie zwar Anionenkanäle passieren können, nicht aber von Kotransportsystemen transportiert werden.

Ein Verlust von zellulärem Na während der RVD ist zwar für verschiedene Epithelzelltypen der Rattenniere (Rick, 1993), nicht aber für A6-Zellen beschrieben worden. Eine Abnahme des Gehaltes an zellulärem Na, dessen Konzentration weit unter dem elektrochemischen Gleichgewicht liegt, könnte prinzipiell auf einen verminderten Na-Influx oder gesteigerten Efflux über die Na-K-Pumpe zurückgeführt werden. Da in den vorliegenden Untersuchungen die apikale Inkubationslösung kein Na enthielt, könnte eine Hemmung des Na-Einstroms nur an der basolateralen Membran erfolgen. Eine solche Möglichkeit muss jedoch als fraglich angesehen werden, da der Na-Einstrom über die basolaterale Membran von A6-Zellen bereits unter Kontrollbedingungen verschwindend klein ist. Dies wird durch Experimente belegt, in denen es bei Aufhebung des apikalen Na-Einstroms durch Amilorid und gleichzeitiger Hemmung der Na-K-Pumpe durch Ouabain nur zu einem geringfügigen Anstieg der zellulären Na-Konzentration kam (Borgmann et al, 1994). Die verbleibende Möglichkeit, dass der Na-Verlust durch die Na-K-Pumpe bewerkstelligt wird, erscheint

auch insofern plausibel, als nach hypotonem Stress eine mehrfache Steigerung der Na-K-ATPase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Niisato und Marunaka, 1999).

#### **4. Basolaterale Isotonie nach vorhergehendem akutem hypotonen Stress**

Ausgehend von kontinuierlichen Zellvolumenmessungen kamen Van Driessche und seine Mitarbeiter zu dem Schluß, dass sich A6-Zellen, die einem hypotonen Stress ausgesetzt waren bei Wiederherstellung von isotonen Bedingungen wie ideale Osmometer verhalten (De Smet et al, 1995; Van Driessche et al, 1993). Bei der Wiedererhöhung der basolateralen Osmolarität sollten also die Zellen auf ein gleichbleibendes Volumen schrumpfen, dass aufgrund des Osmolytverlustes während der vorhergegangenen RVD kleiner ist als das Volumen unter Kontrollbedingungen. Diese Vorstellung deckt sich auch mit der Beobachtung, dass A6-Zellen nicht befähigt sind, eine von der Kontrollsituation ausgehende Erhöhung der basolateralen Osmolarität mit einer regulatorischen Volumenzunahme (regulatory volume increase = RVI) zu beantworten (Van Driessche, persönliche Mitteilung). Da jedoch ein solcher Osmolaritätswechsel von hypo- auf isotone Bedingungen und die damit verbundene initiale Zellschrumpfung bei vielen, verschiedenen Zellen zu einer regulatorische Volumenzunahme (regulatory volume increase = RVI) führt (Hoffmann und Dunham 1995), erschien eine eingehendere Untersuchung dieser Situation angebracht. Diese RVI, bei der der Wechsel auf hypertone Bedingungen nicht von einer isotonen sondern hypertonen Situation ausgeht wird in der Literatur als Pseudo-RVI bezeichnet (Lewis und Donaldson 1990).

Der Verlauf des Zellvolumens, das in der vorliegenden Studie aus den Trockengewichten kalkuliert wurde, spricht tatsächlich dafür, dass auch A6-Zellen zu einer Pseudo-RVI befähigt sind. Nach einer initialen drastischen Zellschrumpfung auf etwa  $\frac{3}{4}$  des Kontrollwertes kam es nämlich im weiteren Verlauf der Isotoniephase zu einer nahezu vollständigen Restauration des Kontrollvolumens ( Abbildung 27 ). Aus dem Ausmaß der Zellschrumpfung in den ersten 2 Minuten der isotonen Phase läßt sich herleiten, dass sich A6-Zellen in einer frühen Phase nach der Osmolaritätsänderung weitgehend wie ideale Osmometer verhalten. Geht man davon aus, dass unter

Kontrollbedingungen ein osmotisch inaktives Volumen von 20% vorliegt und dass die osmotische Balance zwischen extra- und intrazellulärem Kompartiment allein durch Wasserbewegungen hergestellt wird, sollte ein Anstieg der basolateralen Osmolarität von 140 auf 260 mosmol/l, wie er beim Übergang von hypo- zu isotonen Bedingungen vorkommt, das Zellvolumen von 120% auf 73% vermindern. Die so kalkulierte Abnahme des Zellvolumens stimmt sehr gut mit dem tatsächlich beobachteten Abfall von 120% auf 76% überein. Die beobachtete Zellvolumenabnahme ist also etwas geringer als die kalkulierte, was mit einer bereits angelaufenen RVI erklärt werden könnte. Für diese Interpretation spricht auch die während der ersten beiden Minuten der Isotoniephase aufgetretene geringe zelluläre Aufnahme von Na, K und Cl (Tabelle 7). Der Wiederanstieg des Zellvolumens in der späten Isotoniephase von 76 auf 94% kann nur mit einer Zunahme zellulärer Osmolyte erklärt werden. Allein die Beobachtung, dass die zelluläre Cl-Konzentration in der späten Isotoniephase (d.h. zwischen 2. und 30. Minute nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen) um ca. 100% anstieg, spricht für die zelluläre Aufnahme von Na- bzw. KCl. Diese Schlußfolgerung wird neben dem entgegengesetzten Zeitverlauf, den die abfallenden Mg-, P- und Ca-Konzentrationen einerseits und die ansteigenden K- und Cl-Konzentrationen andererseits in der späten Isotoniephase nehmen (Abbildung 22a) vor allem durch die Änderungen der zellulären Ionengehalte von Na, K und Cl belegt. Einem geringen zellulären Verlust an Na, den die Zellen in der Isotoniephase erfahren, steht ein viel größerer Gewinn an K und Cl gegenüber (Abbildung 25, Tabelle 7). Eine Aufsummierung der Änderungen aller drei Ionengehalte ergibt einen zellulären Gewinn von 312 mmol/kg Trockengewicht. Ausgehend von den Änderungen im Trockengewicht und den basolateralen Osmolaritäten kann kalkuliert werden, dass die A6-Zellen in der isotonen Phase 280 mmol/kg Trockengewicht an Osmolyten aufgenommen haben müssen, um das Zellvolumen am Ende der isotonen Phase zu erklären. Unter der Annahme, dass der osmotische Koeffizient für extrazelluläre Ionen von etwa 0,90 auch für intrazelluläre Ionen gilt, ergibt die zelluläre Aufnahme von kleinen Ionen eine Osmolytzunahme, die der kalkulierten weitgehend entspricht. Es kann daher gefolgert werden, dass im Gegensatz zur RVD nach einem hypotonen

Stress, zu der auch der Verlust anderer Osmolyte als Na, K und Cl beiträgt (siehe vorhergegangenes Kapitel), die Pseudo-RVI nach Wiedereinführung von isotonen Bedingungen allein auf eine zelluläre Zunahme von KCl beruht. Dieses Verhalten der A6-Zellen kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass verglichen zur Kontrolle der Beitrag von Na, K und Cl zur zellulären Gesamtosmolarität in der isotone Phase von 75% auf 91% anstieg.

Ein Vergleich des zellulären Elektrolytgewinns während der Pseudo-RVI mit dem zellulären Elektrolytverlust während der RVD offenbart weitere charakteristische Unterschiede:

1. Der Gesamtgewinn an kleinen Elektrolyten (Na, K, Cl) während der Pseudo-RVI (312 mosmol/kg Trockengewicht) war signifikant größer als der Verlust während der RVD (265 mosmol/kg Trockengewicht).
2. Die Anionenlücke (überschießender zellulärer Gewinn oder Verlust von Na+K verglichen zu den entsprechenden Gewinnen oder Verlusten von Cl) war während der Pseudo-RVI (38 mmol/kg Trockengewicht) beträchtlich kleiner als während der RVD (132 mmol/kg Trockengewicht). Der Anteil an Kationen ( $\Sigma$  Na+K), der von Cl begleitet wurde, betrug bei der zellulären Aufnahme während der Pseudo-RVI 80% und bei der zellulären Abgabe während der RVD nur 40%.
3. Na trug zum Osmolytverlust während der RVD bei (-33 mmol/kg Trockengewicht), nicht aber zum Osmolytgewinn während der RVI (+8 mmol/kg Trockengewicht) bei.

Einige dieser Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Transporter und Transportaktivitäten erklärt werden, die für die zelluläre Abgabe bzw. Aufnahme von kleinen Elektrolyten verantwortlich sind. Während der zelluläre Verlust von K und Cl bei der RVD über Kanäle zustande kommen soll, soll die Aufnahme von kleinen Elektrolyten bei der RVI über einen Na-K-2Cl-Kotransporter oder über die kombinierte Aktion von Na/H- und Cl/HCO<sub>3</sub>-Antitransporter erfolgen (Hoffmann und Dunham 1995). Nach den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnissen liegt der Schluß nahe, dass die an A6-Zellen beobachtete Pseudo-RVI auf die Aktivität eines basolateralen Na-K-2Cl-Kotransporters zurückzuführen ist. Diese Aussage stützt sich

primär auf die Beobachtung, dass basolateral appliziertes Bumetanid als diagnostischer Inhibitor des Kotransporters die Aufnahme von K und Cl nach der Wiederherstellung von isotonen Bedingungen fast vollständig aufhob (Abbildung 25, Tabelle 7). Das während der Pseudo-RVI über den Kotransporter aufgenommene Na führt nicht zu einem Anstieg des zellulären Na-Gehalts, da es über die Na-K-Pumpe gegen extrazelluläres K ausgetauscht wird (Hoffman und Dunham, 1995). Die zelluläre Elektrolytaufnahme über den Kotransporter setzt eine zelleinwärts gerichtete Triebkraft und eine gewisse Aktivität des Kotransporters voraus. Beide Bedingungen scheinen durch die experimentell geschaffene Situation begünstigt zu sein. So konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine Zellschrumpfung und / oder Verminderung der zellulären Cl-Konzentration, wie sie in der frühen Phase der wiederhergestellten Isotonie vorlagen, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Na-K-2Cl-Kotransporters spielen (Lytle und Mc Manus, 2003; Matthews et al, 1998; Wehner et al 2003). Ausserdem ist zu erwarten, dass die Erhöhung der basolateralen Elektrolytkonzentrationen durch die isotone Reperfusion auch zu einer Zunahme der einwärts gerichteten Triebkraft führt. Eine Abschätzung der Triebkraft lässt sich bei Kenntniss der zellulären Elektrolytkonzentrationen mit der Beziehung

$$Na_z \cdot K_z \cdot Cl_z^2 = Na_I \cdot K_I \cdot Cl_I^2$$

vornehmen, die den Gleichgewichtszustand des Na-K-2Cl-Kotransporters beschreibt bei dem es zu keiner Nettobewegung kommt. Die mit *Z* versehenen Symbole geben dabei Konzentrationen des zellulären osmotisch aktiven Volumens (Konzentrationen in mmol/kg Zellwasser) und die mit *I* versehenen Symbole die Konzentrationen der basolateralen Inkubationslösung wieder. Die einer solchen Kalkulation zugrunde liegende Annahme ist, dass die Aktivitätskoeffizienten der Ionen in der Zelle und der Inkubationslösung gleich groß sind. Der Quotient der Ionenprodukte, der

$$\frac{Na_i \cdot K_i \cdot Cl_i^2}{Na_z \cdot K_z \cdot Cl_z^2}$$

das Verhältnis der Triebkräfte von unidirektionalem Influx zu Efflux angibt, beträgt unmittelbar nach dem Wechsel von hypo- auf isotone Bedingungen 10. Obwohl dieses Verhältnis in der frühen Isotoniephase durch eine durch Zellschrumpfung bedingte

Erhöhung der zellulären Elektrolytkonzentrationen drastisch abnimmt verbleibt eine zelleinwärts gerichtete Triebkraft (Quotient Influx / Efflux = 2,5). Die Ursache hierfür muss in dem zellulären Verlust von Na und Cl während der vorrangegangenen RVD gesehen werden. Vorausgesetzt, dass der basolaterale Na-K-2Cl-Kotransporter eine gewisse Aktivität aufweist, sollte es also in der Isotoniephase zu einem Nettoeinstrom von Na, K und Cl in die Zelle kommen. Die durch Bumetanid hemmbare, überproportionale Wiederauffüllung der Zellen mit kleinen Ionen in der isotonen Phase muß wohl auf eine günstigere Konstellation des Na-K-2Cl-Kotransporters zurückgeführt werden. Verglichen zur Kontrolle stellte sich am Ende der isotonen Reperfusion neben einer etwas höheren K-Konzentration eine deutlich verminderte Na- und deutlich erhöhte Cl-Konzentration ein. Die Erhöhung der Cl-Konzentration (42,9 gegenüber 28,2 mmol/kg Feuchtwicht unter Kontrollbedingungen) kann nur so gedeutet werden, dass der Anteil des osmotisch aktiven Volumens, der von dem Kotransporter kontrolliert wird, zugenommen hat. Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten des Kotransporters ist durch die gegenüber der Kontrolle verminderte zelluläre Na-Konzentration (13,3 gegenüber 20,4 mmol/kg Feuchtwicht unter Kontrollbedingungen) zu erklären. Die geringere Na-Konzentration sorgt für eine Zunahme der zelleinwärtsgerichteten Triebkraft und ermöglicht damit die Einstellung einer höheren zellulären Cl-Konzentration.

Die relativ niedrige Na-Konzentration, die sich trotz einer initialen Erhöhung durch Zellschrumpfung und trotz eines massiven Na-Zustroms über den Na-K-2Cl-Kotransporter während der isotonen Reperfusion einstellte, setzt eine hohe Aktivität der Na-K-Pumpe voraus. Bei dem vorliegenden Sachverhalt erscheint es daher plausibel anzunehmen, dass die durch hypotonen Stress induzierte hohe Pumpaktivität (Niisato und Marunaka, 1997) auch während der sich anschließenden isotonen Periode aufrechterhalten bleibt. Dies würde auch erklären, warum es in der isotonen Periode sogar zu einem geringen Na-Verlust kommt. Der geringfügige zelluläre Verlust von Na während der Pseudo-RVI muss dem Umstand zugeschrieben werden, dass die hohe Aktivität der Na-K-Pumpe die zelluläre Na-Konzentration auf einem niedrigen Niveau

hält während das Zellvolumen gegenüber der hypotonen Phase deutlich eingeschränkt ist.

Ähnliche Reaktionen, wie hier für A6-Zellen beschrieben, konnten auch an epithelialen Froschhautzellen beobachtet werden, wenn diesen nach vorhergegangenen Cl-Verlust bedingt durch hypotonen Stress oder Cl-freie, basolaterale Inkubation eine normale Ringerlösung angeboten wurde (Mac Robbie und Ussing ,1961; Ussing 1985; Dörge et al 1985; Dörge et al, 1989). Da die Froschhautzellen dabei jedoch ihr Volumen und ihren Elektrolytbestand vollständig restaurieren, scheinen sie im Gegensatz zu den A6-Zellen über keine weiteren volumenregulatorischen Mechanismen zu verfügen. Das Volumen der Froschhautepithelzellen, das von Cl und den zugehörigen Kationen (Na und K) besetzt wird, beträgt etwa 30 % des gesamten Zellvolumens (Ussing 1985). Sowohl Bestimmungen des Zellvolumens als auch der Elementkonzentrationen haben eindeutig gezeigt, dass die hierfür erforderliche Cl-Konzentration von etwa 40 mmol/kg Feuchtgewicht durch einen basolateralen Na-K-2Cl-Kotransport aufrecht erhalten wird (Ussing, 1985; Dörge et al, 1989).

Die Möglichkeit, dass die Cl-Konzentration in den A6-Zellen durch einen Na-Cl-Kotransporter unter Gleichgewichtsbedingungen aufrecht erhalten wird, erscheint insofern unwahrscheinlich, als das Produkt aus zellulärer Na- und Cl-Konzentration sehr viel kleiner ist als das entsprechende Produkt der Inkubationslösung. Insgesamt führt die angestellte Betrachtung auch zu dem Schluß, dass die Aktivität eines basolateralen Na-K-2Cl-Kotransportes für die Afrechterhaltung eines großen Teils des osmotisch aktiven Raums von A6-Zellen verantwortlich ist.

Wie in dem vorangegangenen Kapitel für die zelluläre Abgabe von kleinen Elektrolyten während der RVD bereits diskutiert, muss die Anionenlücke durch andere Anionen als Cl oder durch eine Abnahme der zellulären Pufferkapazität geschlossen werden. Die sehr viel kleinere Anionenlücke, die bei der Aufnahme von K und Cl nach Wiederherstellung von isotonen Bedingungen beobachtet wurde, könnte dadurch zustande kommen, dass unterschiedliche Transporter in die zelluläre Aufnahme bzw. Abgabe von Elektrolyten eingeschaltet sind und dass während der Pseudo-RVI und

RVD unterschiedliche Ionenzusammensetzungen im intra- und extrazellulär Raum vorlagen.

Die Frage, warum eine Pseudo-RVI von Van Driessche und seinen Mitarbeitern an A6-Zellen nicht beobachtet werden konnte, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Allerdings sollte erwähnt werden, dass von Van Driessche und Mitarbeitern zumindest in einigen frühen Versuchsreihen Inkubationsbedingungen gewählt wurden, unter denen die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Pseudo-RVI nicht ablaufen kann. Gerade in der Arbeit, in der die Unfähigkeit der A6-Zellen zur Pseudo-IVR ausführlich diskutiert wird, wurden hypotoner Stress und isotone Reprofusion durch Wegnahme bzw. Zugabe von Sucrose erzielt. Um dies zu ermöglichen, waren in der Ausgangslösung relativ große Mengen an NaCl durch Sucrose ersetzt worden. In einer solchen Situation ist aber die Na- und Cl- Konzentration der basolateralen Inkubationslösung so niedrig, dass sich auch während der isotonen Reprofusion keine zelleinwärtsgerichtete Triebkraft für den NA-K-2Cl-Kotransport ergibt.

### **5. Isovolumetrische Volumenregulation**

Isovolumetrische Volumenregulation (IVR) von Epithelzellen wurde bisher an proximalen Tubuluszellen der „Rattenniere“ (Lohr und Grantham, 1986; Lohr et al, 1989) und an A6-Zellen (Van Driessche et al, 1997) demonstriert. IVR konnte an beiden Zelltypen jedoch nur dann nachgewiesen werden, wenn die Verdünnungsrate mit 1,5 mmol/l/min relativ niedrig war. Bei höheren Verdünnungsraten ging dagegen die Fähigkeit zur IVR in beiden Zelltypen verloren. Bei einer Verdünnungsrate von 3 und 6 mmol/l/min und einer Osmolaritätsabnahme der basolateralen Inkubationslösung von 260 auf 140 mosmol/l stieg das Volumen von A6-Zellen um 32 bzw. 48 % an (Van Driessche et al, 1997).

In der vorliegenden Arbeit ergab die kontinuierliche Absenkung der basolateralen Osmolarität von 240 auf 160 mosmol/l gleiche Ergebnisse wie 60 min nach dem akuten hypotonen Streß. Nach der kontinuierlichen Osmolaritätsabsenkung betrug das kalkulierte Zellvolumen im Mittel 120 % des Kontrollwertes ( Abbildung 33 ). Der während der IVR aufgetretene Verlust an Osmolyten wurde zu etwa 70 % durch eine

zelluläre Abgabe von Na; K und Cl gedeckt. Die Gesamtosmolarität der Zelle stieg während der IVR von etwa 75% auf 85 % an ( Abbildung 32 ). Der Verlust an Na und K war um 96 mmol/kg Trockengewicht größer als der Verlust an Cl. Die im vorhergegangenen Kapitel geführte Diskussion über die RVD trifft daher auch für die IVR zu. Dies Ergebnis ist insofern überraschend als von Van Driessche et al (1997) nahegelegt wurde, dass für die RVD und IVR von A6-Zellen völlig unterschiedliche Sensoren für die Erfassung der Hypotonizität und verschiedene Mechanismen für die Volumenregulation verantwortlich sind. Während eine komplette Volumenregulation nach akutem hypotonem Stress eine große Änderung der basolateralen Osmolarität und damit primäre große Änderung des Zellvolumens voraussetzt, änderte sich das Volumen während der IVR nur um einige Prozent. Eine RVD nicht aber IVR konnte auch dann beobachtet werden, wenn das Hauptanion der basolateralen Inkubationslösung nicht Cl sondern  $\text{NO}_3$  oder SCN war. Die Applikation von 30 mM Ba zur Inhibition von K-Kanälen verzögerte zwar die RVD nicht aber die IVR. Auch die Beobachtung, dass ein zelluläre Rb-Ausstrom als Maß für den K-Exit nach akuter Absenkung der basolateralen Osmolarität auf 200 mosmo/l sofort anstieg, bei kontinuierlicher Absenkung jedoch erst dann, wenn die basolaterale Osmolarität bereits von 260 auf 200 mosmol/l abgefallen war, deutet nach Van Driessche und Mitarbeitern auf die Einschaltung unterschiedlicher Transportwege und Mechanismen während der RVD und IVR hin. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht ohne weiteres nachvollziehbar, da es in den vorliegenden Untersuchungen auch schon während der kontinuierlichen Absenkung der basolateralen Osmolarität auf 200 mmol/l zu einer signifikanten Abnahme des K-Gehalts kam. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, dass es während der IVR zu einer Hemmung des K-Influges z. B. über die Na-K-Pumpe kommt, was auch bei einem unveränderten K-Efflux zu einem zellulären K-Verlust führt.

Nach kontinuierlicher Absenkung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 200 mosmol/l waren die Abnahmen in den zellulären Elementkonzentrationen (Abbildung 30 ) und dem Trockengewicht (Abbildung 31 ) sowie in den Gehalten für Na, K und Cl (Tabelle 8 ) etwa halb so groß wie nach der Osmolaritätsabsenkung auf 140 mosmol/l. Dieser Befund läßt den Schluß zu, dass selbst wenn die Mechanismen der IVR in der

Anfangs- und Spätphase einer ausgedehnten, kontinuierlichen Osmolaritätsabnahme (Verminderung der basolateralen Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l) unterschiedlich sind, die für die IVR verantwortlichen zellulären Osmolyte immer die gleichen sind.

## **Zusammenfassung**

In einer Zelle sorgen volumenregulatorische Prozesse wie eine RVD (regulatory volume decrease) und RVI (regulatory volume increase) durch Konstanterhaltung des Volumens für die Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktionen.

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass an der Volumenregulation eine zelluläre Abgabe und Anhäufung von organischen aber auch anorganischen Osmolyten beteiligt sind. Diese werden bei der RVD beim Übergang von Antidiurese zu Diurese von der Zelle abgegeben und bei der RVI beim Wechsel des Diuresestatus in die umgekehrte Richtung akkumuliert. Als Modellstrukturen wurden hierbei vor allem etablierte Zelllinien, wie die von A6- und MDCK-Zellen, eingesetzt.

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse die Änderung in der Elementzusammensetzung von A6-Zellen nach hypotonem Stress quantitativ erfassen zu können. Zudem sollte ermittelt werden, ob A6-Zellen nach der Wiederherstellung von isotonen Bedingungen zu einer RVI befähigt sind. Der hypotone Stress wurde entweder durch eine abrupt oder kontinuierlich Absenkung der Osmolarität von 260 auf 140 mosmol/l eingeführt. Die Bestimmungen wurden dann 2 und 60 Minuten nach der Einführung sowie 2 und 30 Minuten nach Reperfusion mit isotoner Lösung durchgeführt. Außerdem erfolgten Messungen nach kontinuierlicher Absenkung der Osmolarität von 260 auf 200 bzw. 140 mosmol/l.

Die anschließende Elektronenstrahlmikroanalyse der zellulären Elementzusammensetzung erfolgte an gefriergetrockneten Kryoschnitten mittels eines energiedispersiven Röntgendetektors in einem Rasterelektronenmikroskop. Hierbei können alle in Frage kommenden Elemente gleichzeitig erfasst werden. Da die Bremsstrahlung der Röntgenspektren ein Maß für die Masse darstellt, konnten ferner Aussagen über Variationen des zellulären Trockengewichts und somit zur Zellvolumenveränderung getroffen werden. Die Elementbestimmungen nach dem hypotonen Stress führten zu folgenden Ergebnissen und Aussagen:

1. Obwohl sich die A6-Zellen während der ersten 2 Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stress weitgehend wie ideale Osmometer verhalten, ist es im Rahmen einer RVD bereits zu einem gewissen zellulären Verlust von Na, K und Cl gekommen.
2. 60 Minuten nach Einsetzen des hypotonen Stresses hat sich das zelluläre Volumen nach einer initialen Zellschwellung (160% nach 2 Minuten) wieder dem Kontrollwert angenähert (120%).
3. Der Verlust an kleinen einwertigen anorganischen Ionen (Na, K und Cl) trägt zu 70% zu dem Osmolytverlust bei, der notwendig ist um das neu eingestellte Zellvolumen zu erklären.
4. Hypotoner Stress führt im Rahmen der RVD nicht nur wie bisher angenommen zu einem zellulären Verlust von KCl, sondern auch zur Abgabe von Na.
5. Der Verlust an Na und K ist beträchtlich größer als der von Cl, was auf eine Beteiligung zellulärer Puffer an der RVD hindeutet.
6. Bei einer kontinuierlichen Absenkung der basolateralen Osmolarität wird eine IVR in Gang gesetzt, so dass das Zellvolumen nach Herabsetzung der Osmolarität von 260 auf 140 mosmo/l nur um 20% größer ist als unter Kontrollbedingungen.
7. Qualitativ und quantitativ ist der Verlust an kleinen anorganischen Ionen während der IVR mit dem bei der RVD identisch.

Die folgenden Ergebnisse, die nach der Wiederherstellung von isotonen Bedingungen erzielt wurden, lassen den Schluss zu, dass auch A6-Zellen zu einer RVI fähig sind:

1. Nach dem Wechsel von hypotonen zu isotonen Bedingungen kommt es nach einer anfangs drastischen Zellschrumpfung zu einem signifikanten Wiederanstieg des Zellvolumens.
2. Dieser Volumenanstieg kann allein durch eine zelluläre Anhäufung von KCl erklärt werden, die primär durch die Aktivität eines basolateralen bumetanidsensitiven Na-K-2Cl-Kotransporters in Gang gesetzt wird.

## Literaturverzeichnis

**Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Toth G., Canessa C. M. (1999)**

The serum and glucocorticoid kinase SGK increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes.  
J. Biol. Chem. 274: 37834-37839

**Banderali U., Ehrenfeld J. (1996)**

Heterogeneity of volume-sensitive chloride channels in basolateral membranes of A6 epithelial cells in culture.  
J. Membr. Biol. 154: 23-33

**Baxendale-Cox L.M., Duncan R.L., Liu X., Baldwin K., Els W. J., Helman S. I. (1997)**

Steroid hormone-dependent expression of blockersensitive ENaCs in apical membranes of A6 epithelia.  
Am. J. Physiol. 273: C1650-C1656

**Bauer R. und Rick R. (1978)**

Computer analysis of X-ray spectra (EDS) from thin biological specimens.  
X-Ray Spectrom 7: 63-69

**Beck F.X., Burger-Kentischer A., Muller E. (1998)**

Cellular response to osmotic stress in the renal medulla.  
Pflügers Arch. 436(6): 814-827

**Berkowitz LR., Orringer EP. (1987)**

Cell volume regulation in CC and AA erythrocytes.  
Am.J.Physiol. 252: C300- C306

**Blazer-Yost B. L., Lui X., Helman S. I. (1998)**

Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone  
Am. J. Physiol. 274: C1373-C1379

**Borgmann S., Granitzer M., Crabbe J., Beck FX., Nagel W., Dorge A. (1994)**

Electron microprobe analysis of electrolytes in whole cultured epithelial cells.  
Scanning Microsc. Suppl. 1994;8:139-47

**Brochiero E., Banderali U., Lindenthal S., Raschi C., Ehrenfeld J. (1995)**

Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation.  
Pflügers Arch. 431: 32-45

- Brodsky W. A., Schilb T. P. (1966)**  
Ionic mechanisms for sodium and chloride transport across turtle bladders.  
Am. J. Physiol. 210: 987-996
- Broillet M. C., Horisberger J. D. (1991)**  
Basolateral membrane potassium conductance of A6 cells.  
J. Membr. Biol. 124: 1-12
- Broillet M. C., Horisberger J. D. (1993)**  
Tolbutamide-sensitive potassium conductance in the basolateral membrane of A6 cells.  
J. Membr. Biol. 134: 181-188
- Brugnara C., Tostesen DC (1987)**  
cell volume, K-Transport and cell density in human erythrocytes  
Am. J. Physiol. 252 :C269-C276.
- Buchinger P., Wienecke P., Rick R., Beck F. X., Dörge A., Thureau K. (1989)**  
Localization of transport compartments in turtle urinary bladder.  
Pflügers Arch. 414: 208-215
- Burch L. H., Talbot C. R., Knowles M. R., Canessa C. M., Rossier B., Boucher R.C. (1995)**  
Relative expression of the human epithelial Na<sup>+</sup> channel subunits in normal and cystic fibrosis airways.  
Am. J. Physiol. 269: C511-C518
- Butterworth M.B., Helman S.I., Els W.J. (2001)**  
cAMP-sensitive endocytic trafficking in A6 epithelia.  
Am. J. Physiol. 280: C752-762
- Cala P.M. (1980)**  
Volume regulation by Amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the iron-flux pathways.  
J. Gen. Physio. 76, 638-708
- Civan M. M, Shporer M. (1972)**  
17 O nuclear magnetic resonance spectrum of H 2 17 O in frog striated muscle.  
Biophys J. 1972:404-13
- Chalfant M. L., Coupaye-Gerard B., Kleyman T. R. (1993)**  
Distinct regulation of Na<sup>+</sup> reabsorption and Cl<sup>-</sup> secretion by arginine vasopressin in the amphibian cell line A6.  
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 264: C1480-C1488

**Crowe E., Wills N. K. (1991)**

A simple method for monitoring changes in cell height using fluorescent microbeads and an Ussing-type chamber for the inverted microscope. Pflügers Arch. 419: 349-357

**De Smet P., Van Driessche W. (1992)**

Inhibition of Cl<sup>-</sup> currents in A6-cells by mefenamic acid. Arch. Int. Physiol. Biochem. 315: 123-124

**De Smet P., Simaels J., Declercq P.E., Van Driessche W. (1995a)**

Regulatory volume decrease in cultured kidney cells (A6): role of amino acids. J. Gen. Physiol. 106(3): 525-542.

**De Smet P., Simaels J., Van Driessche W. (1995b)**

Regulatory volume decrease in a renal distal tubular cell line (A6). I. Role of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>. Pflügers Arch. 430(6): 936-944.

**De Smet P., Simaels J., Van Driessche W. (1995c)**

Regulatory volume decrease in a renal distal tubular cell line (A6). II. Effect of Na<sup>+</sup> transport rate. Pflügers Arch. 430(6): 945-953.

**De Smet P., Li J., Van Driessche W. (1998)**

Hypotonicity activates a lanthanide-sensitive pathway for K<sup>+</sup> release in A6 epithelia. Am. J. Physiol. 275: C189-C199

**Doi Y., Maruna Y. (1995)**

Amiloride-sensitive and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent ion transport activated by aldosterone and vasotocin in A6 cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 268: C762-C770

**Dörge A., Rick R., Gehring K., Thureau K. (1978)**

Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative x-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues. Pflügers Arch. 373: 85-97

**Dörge A., Rick R., Beck F., Thureau K. (1985)**

Cl transport across the basolateral membrane in frog skin epithelium. Pflügers Arch. (1985): 8-11

- Dörge A.**, Wienecke P., Beck F. X., Worndl B., Rick R., Thureau K. (1988)  
Na transport compartment in rabbit urinary bladder.  
Pflügers Arch. 411: 681-687
- Dörge A.**, Beck F., Rechkemmer G. (1998)  
Cellular site of active K absorption in the guinea-pig distal epithelium.  
Pflügers Arch. (1998): 280-285
- Edinger R. S.**, Rokaw M. D., Johnson J. P. (1999)  
Vasopressin stimulates sodium transport in A6 cells via a phosphatidylinositide  
3-kinase-dependent pathway.  
Am. J. Physiol. 277: F575-F579
- Eaton D. C.**, Becchetti A., Ma H., Ling B. N. (1995)  
Renal sodium channels: regulation and single channel properties.  
Kidney Int. 48: 941-949 Review
- Ehrenfeld J.**, Raschi C., Brochiero E. (1994)  
Basolateral potassium membrane permeability of A6 cells and cell  
volume regulation.  
J. Membr. Biol. 138:181-195
- Els W. J.**, Helman S. I., Mencio T. (1991)  
Activation of epithelial Na channels by hormonal and autoregulatory  
mechanisms of action.  
J. Gen. Physiol. 98: 1197-1220
- Erlj D.**, De Smet P., Van Driessche W. (1994)  
Effect of insulin on area and Na<sup>+</sup> channel density of apical membrane of cultured  
toad kidney cells.  
J. Physiol. 481: 533-542
- Fan P. Y.**, Haas M., Middleton J. P. (1992)  
Identification of a regulated Na/K/Cl cotransport system in a distal nephron cell  
line.  
Biochem. Biophys. Acta. 1111(1): 75-80
- Foskett J. K.**, Melvin, J.E. (1989)  
Activation of salivary secretion: Coupling of cellvolume and [Ca<sup>2+</sup>] in single  
cells.  
Science 244: 1582-1585

**Freedman JC, Hoffman JF. (1979)**

The relation between dicarbocyanine dye fluorescence and the membrane potential of human red blood cells set at varying Donnan equilibria.  
J. Gen. Physiol. 1979:187-212

**Freeman C. J., Bookchin, R. M., Ortiz, O.E., Lew, V.L. (1987)**

K-permeabilized human red cell lose an alkaline, hypertonic fluid containing excess  $K^+$  over diffusible anions.  
J. Membr. Biol. 96, 235-241

**Frindt G., Windhager E. E., Taylor A. (1982)**

Hydroosmotic response of collecting tubules to ADH or cAMP at reduced peritubular sodium.  
Am. J. Physiol. 243: F503-F513

**Fritzenwanger M., Dörge A., Beck F. X., Thureau K. (1996)**

Na Transport in Rat Gastric Mucosa: An Electron Microprobe Analysis  
Cell. Physiol. Biochem. 6: 234-244

**Frizzel R. A., Koch M. J., Schulz S. G. (1976)**

Iontransport by Rabbit colon. I. Activ and Passive Components.  
J. Membrane Biol. 27: 297-316

**Garcia-Perez, A., Burg, M.B. (1991)**

Al medullary organic osmolytes.  
Physiol. Rev. 71, 1081

**Garty H., Benos D. J. (1988)**

Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable  $Na^+$  channel.  
Physiol. Rev. 68: 309-373. Review

**Greger R., Gögelein, H., Schlatter, E. (1988)**

Stimulation of  $NaCl$  secretion in the rectal gland of the dogfish *Squalus acanthias*.  
Comp. Biochem. Physiol. A 90A: 733-739

**Granitzer M., Lyoussi B., Nagel W., Crabbe J. (1991)**

Effekt of Dexamethason on Membrane Conductance of Culture Renal Distal Cell (A6).  
Cell. Physiol. Biochem. 1: 263-272

- Granitzer M., Nagel W., Crabbe J. (1992)**  
Basolateral membrane conductance in A6 cells: effect of high sodium transport rate.  
Pflügers Arch. 420(5-6): 559-565
- Granitzer M., Nagel W., Crabbé J. (1993)**  
K recirculation in A6 cells at increased Na transport rates.  
Pflügers Arch. 422: 546-551
- Grinstein, S., Foskett, K. J. (1990)**  
Ionic mechanisms of cell volume regulation in leucocytes.  
Annu. Rev. Physiol. 52: 399-414
- Hallows K. R., Knauf P. A. (1994)**  
Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of Cl<sup>-</sup> and organic solutes.  
Am. J. Physiol. 1994:C1045-1056
- Hamilton K. L., Eaton D. C. (1991)**  
cAMP-induced potassium channel activity in apical membrane of cultured A6 kidney cells.  
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 261: F1055-F1062
- Handler J. S., Perkins F. M., Johnson J. P. (1980)**  
Studies of renal cell function using cell culture techniques.  
Am. J. Physiol. 238: F1-F9. Review
- Handler J. S. (1981)**  
Vasopressin-prostaglandin interactions in the regulation of epithelial cell permeability to water.  
Kidney Int. 19: 831-838
- Helman S.I., Liu X., Baldwin K., Blazer-Yost B.L., Els W.J. (1998)**  
Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia.  
Am. J. Physiol. 274: C947-C957
- Hodson S., Marshall J. (1970)**  
Ultracryotomy: a technique for cutting ultrathin sections of unfixed frozen biological tissues for electron microscopy.  
J. Microsc. 91(2): 105-117
- Hodson S., Marshall J. (1971)**  
Migration of potassium out of electron-microscope specimens.  
J. Microsc. 93(1):49-53

**Hoffmann E.K. (1983)**

Volume regulation by animal cells.  
Semin. Ser.-Soc. Exp. Biol. 17: 55-80

**Hoffmann E.K., Simonsen L.O., Lambert I.H. (1993)**

Cell volume regulation: Intracellular transmission. In „Interaction Cell Volume and Cell Function“ (F. Lang and D. Häussinger, eds.), pp. 187-248, Springer Verlag, Berlin.

**Hoffman E. K., Dunham P. B. (1995)**

Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation.  
International Review of cytology 161: 173-262

**Jamison R. L., Kritz W., (1982)**

Urinary concentrating mechanism : Structure and Function.  
Oxford Univ. Press.

**Jensen B.S., Jessen F., Hoffmann E.K. (1993)**

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransport and its regulation in Ehrlich ascites tumor cells Ca<sup>2+</sup> / calmodulin and protein kinase C dependent pathways.  
J. Membr. Biol. 131: 161-178

**Kachadorian W.A., Sariban-Schraby S., Spring KR (1985)**

Regulation of waterpermeability in toad urinary bladder at two barriers.  
Am. J. Physiol. 248: F260-F265

**Keeler R., Wong N. (1986)**

Evidence that prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates chloride secretion in cultured A6 renal epithelial cells.  
Am. J. Physiol. 250: F511-F515

**Kemendy A. E., Kleyman T. R., Eaton D. C. (1992)**

Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia.  
Am. J. Physiol. 263: C825-C837

**Koefoed-Jensen V., Ussing H. H. (1958)**

The nature of frog skin potential.  
Acta Physiol. Scand. 42: 298-308

**Kokko K. E., Matsumoto P. S., Zhang Z. R., Ling B. N., Eaton D. C. (1997)**

Prostaglandin E<sub>2</sub> increases 7-pS Cl<sup>-</sup> channel density in the apical membrane of A6 distal nephron cells.  
Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 273: C548-C557

- Kramthøft B., Hoffmann E.K., Simonsen L.O. (1994)**  
pHi regulation in Ehrlich mouse ascites tumor cells: Role of sodium-dependent chloride-bicarbonate exchange.  
J. Membr. Biol. 138: 121-131
- Laef A. (1956)**  
On the mechanism of fluid exchange of tissues in vitro.  
J. Biol. Chem. 62: 241-248
- Laef A. (1959)**  
Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume.  
N. Y. Acad. Sci. 72: 396-404
- Lew V. L., Bookchin R. M. (1986)**  
Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model.  
J. Membr. Biol. 1986:57-74
- Lewis S. A., Diamond J. M. (1976)**  
Na<sup>+</sup> transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium.  
J. Membr. Biol. 28: 1-40
- Lewis S. A., Donaldson P. (1990)**  
Ion channels and cell volume regulation: chaos in a organized system.  
News Physiol. Sci. 5: 112-119
- Li J. H., Palmer L. G., Edelman I. S., Lindemann B. (1982)**  
The role of sodium-channel density in the natriuretic response of the toad urinary bladder to an antidiuretic hormone.  
J. Membr. Biol. 64: 77-89
- Lohr J.W. (1990)**  
Isovolumetric regulation of renal proximal tubules in hypotonic media.  
Renal Physiol. Biochem. 13 : 233-240
- Luna E.J., Hitt A.L. (1992)**  
Cytoskeleton-plasma membrane interactions.  
Science 258: 955-964
- Lyoussi B., Crabbe J. a (1996)**  
Effects of corticosteroids on parameters related to Na<sup>+</sup> transport by amphibian renal distal cells (A6) in culture.  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 59: 323-331

**Lyoussi B., Crabbe J. b (1996)**

Effects of dexamethasone on (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase and other parameters related to transepithelial Na<sup>+</sup> transport by amphibian renal distal cells (A6) in culture.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 59: 333-338

**Lytle C., McManus T. (2002)**

Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and NaCl cotransport by cell volume and chloride.

Am.J. Physiol. 283: C1422 - C1431

**Machen T. E., Silen W., Forte (1978)**

Na<sup>+</sup> transport by mammalian stomach.

Am. J. Physiol. 234: E228-E235

**Macrobbie E.A., Ussing H. H. (1961)**

Osmotic behaviour of the epithelial cells of frog skin.

Acta. Physiol. Scand. 1961:348-365

**MacLeod R. J. (1994)**

How an epithelial cell swells in a determinant of the signaling pathways that activate RVD. *In* "Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation" (K. Strange, ed.). pp. 191-200. CRC Press, Boca Raton, Fl.

**Macknight A. D., Leaf A. (1977)**

Regulation of cellular volume.

Physiol Rev. 57(3): 510-573

**Macknight A. D., Di Bona D. R., Leaf A. (1980)**

Sodium transport across toad urinary bladder: a model "tight" epithelium.

Physiol. Rev. 60: 615-715. Review

**Matthews J. B., Smith J. A., Mun E. C.; Sicklick J. K. (1998)**

Osmotic regulation of intestinal epithelia Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl cotransport: role of Cl and F-actin.

Am. J. Physiol. 274: C697-C706

**McManus M.L., Churchwell K.B. (1994)**

clinical significance of cellular osmoregulation. *In* „Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation (K. Strange ed.) S.63-77 CRC Press, Boca Raton Fl.

**Marunaka Y., Eaton D. C. (1990)**

Chloride channels in the apical membrane of a distal nephron A6 cell line

Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 258: C352-C368

**Marunaka Y., Eaton D. C. (1991)**

Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels.  
Am. J. Physiol. 260: C1071-C1084

**Marunaka Y., Hagiwara N., Tohda H. (1992)**

Insulin activates single amiloride-blockable Na channels in a distal nephron cell line (A6).  
Am. J. Physiol. 263: F392-F400

**Marunaka Y. (1993)**

Modification of  $Ca^{2+}$ -sensitivity of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channel by vasopressin and cholera toxin.  
Jpn. J. Physiol. 43(4): 553-560

**Marunaka Y., Tohda H. (1993)**

Effects of vasopressin on single  $Cl^-$  channels in the apical membrane of distal nephron cells (A6).  
Biochem. Biophys. Acta. 1153(1): 105-110

**Matsumoto P. S., Mo L., Wills N. K. (1997)**

Osmotic regulation of  $Na^+$  transport across A6 epithelium: interactions with prostaglandin E2 and cyclic AMP.  
J. Membr. Biol. 160(1): 27-38

**Meneton P., Loffing J., Warnock D.G. (2004)**

Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule.  
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 287(4): F593-F601

**Middleton J. P., Mangel A. W., Basavappa S., Fitz J. G. (1993)**

Nucleotide receptors regulate membrane ion transport in renal epithelial cells  
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 264: F867-F873

**Mills G. L., Mord A. J., Snyder H. A. (1994)**

Pressure maxima in the flow of superfluid  $4He$  in tubes.  
Phys. Rev. B. Condens Matter. 1994:666-669

**Musch M.W., Field M. (1989)**

K-independent  $Na-Cl$  cotransport in bovine tracheal epithelial cells.  
Am. J. Physiol. 256: C658-C665

**Nelson D. J., Tang J. M., Palmer L. G. (1984)**

Single-channel recordings of apical membrane chloride conductance in A6 epithelial cells.  
J. Membr. Biol. 80(1): 81-89

**Niisato N., Marunaka Y. (1997)**

Regulation of Cl<sup>-</sup> transport by IBMX in renal A6 epithelium.  
Pflügers Arch. 434(3): 227-233

**Niisato N., Ito Y., Marunaka Y. (1999)**

Activation of Cl<sup>-</sup> channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 254(2): 368-371

**Niisato N., Marunaka Y. (2001)**

Forskolin activation of apical Cl<sup>-</sup> channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter via a PTK-dependent pathway in renal epithelium.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27. 285(4): 880-884

**Palmer L. G., Corthesy-Theulaz I., Gaeggeler H. P., Kraehenbuhl J. P., Rossier B. (1990)**

Expression of epithelial Na channels in Xenopus oocytes.  
J. Gen. Physiol. 96: 23-46

**Paunescu T. G., Helman S. I. (2001)**

PGE<sub>2</sub> Activation of apical membrane Cl<sup>-</sup> channels in A6 epithelia: impedance analysis.  
Biophys J. 81(2): 852-866

**Parker J. C. (1993)**

In defense of cell volume?  
Am. J. Physiol. 265: C1191-1200

**Perkins F. M., Handler J. S. (1981)**

Transport properties of toad kidney epithelia in culture.  
Am. J. Physiol. 241:C154-C159

**Perrotti N., He R. A., Phillips S. A., Haft C. R., Taylor S. I. (2001)**

Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (SGK) by cyclic AMP and insulin.  
J. Biol. Chem. 276: 9406-9412

**Petersen O. H., Gallacher D. V. (1988)**

Electrophysiology of pancreatic and salivary acinar cells  
Annu. Rev. Physiol. 50: 65-80

**Record R. D., Johnson M., Lee S., Blazer-Yost B. L. (1996)**

Aldosterone and insulin stimulate amiloride-sensitive sodium transport in A6 cells by additive mechanisms.  
Am. J. Physiol. 271: C1079-C1084

**Reimer L. (1967)**

Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden.  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

**Rick R. (1993)**

Ion concentration changes in renal cells during regulatory volume decrease.  
Am. J. Physiol. 265(1 Pt 2): F77-F86

**Rick R., Dörge A., von Arnim E., Thureau K. (1978)**

Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: evidence for a syncytial sodium transport compartment.  
J. Membr. Biol. 39: 313-331

**Rick R., Roloff C., Dörge A., Beck F. X., Thureau K. (1984)**

Intracellular electrolyte concentrations in the frog skin epithelium: effect of vasopressin and dependence on the Na concentration in the bathing media.  
J. Membr. Biol. 78: 129-145

**Rick R., Spancken G., Dörge A. (1988)**

Differential effects of aldosterone and ADH on intracellular electrolytes in the toad urinary bladder epithelium.  
J. Membr. Biol. 101: 275-282

**Rick R. (1994)**

pHi determines rate of sodium transport in frog skin: results of a new method to determine pHi.  
Am. J. Physiol. 1994: F367-374

**Robertson M. A., Foskett J. K. (1994)**

Na<sup>+</sup> transport pathways in secretory acinar cells: Membrane cross talk mediated by [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>.  
Am. J. Physiol. 262: C956-C962

**Sariban-Sohraby S., Burg M. B, Turner R. J. (1983)**

Apical sodium uptake in toad kidney epithelial cell line A6.  
Am. J. Physiol. 245: C167-C171

**Shintani Y., Marunaka Y. (1996)**

Regulation of chloride channel trafficking by cyclic AMP via protein kinase A-independent pathway in A6 renal epithelial cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 223(2): 234-239

**Schulz S.G., Hudson R.L., Lapointe J.Y. (1985)**

Electrophysical studies of sodium cotransport in epithelia: Towards a cellular model.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 456: 127-135

- Schütz E., Schaefer R. M., Heidbreder E., Heidland A. (1985)**  
Effect of diuresis on urinary erythrocyte morphology in glomerulonephritis.  
Klin. Wochenschr. 1985:575-7.
- Solomon A. K., Toon M. R., Dix J. A. (1986)**  
Osmotic properties of human red cells.  
J Membr Biol. 1986: 259-273
- Strange K. (1991)**  
Volume regulatory  $\text{Cl}^-$  loss after  $\text{Na}^+$  pump inhibition in CCT principal cells.  
Am. J. Physiol. 260: F225-F234
- Taylor A., Palmer L. A. (1982)**  
Hormonal regulation of sodium chloride and water transport in epithelia  
*In: Biological Regulation and Development*, edited by Goldberger R. F. and Yamamoto K. New York: Plenum, 3A.: 253-298
- Ussing H. H., Windhager E. (1964)**  
Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium.  
Acta Physiol. Scand. 61: 484.
- Ussing H.H. (1965)**  
Relationship between osmotic reactions and active sodium transport in the frog skin epithelium.  
Acta. Physiol. Scand. 1965:141-155
- van Os C. H., Kamsteeg E. J., Marr N., Deen P. M. (2000)**  
Physiological relevance of aquaporins: luxury or necessity?  
Pflugers Arch. 440(4): 513-520.
- Van Driessche W., De Smet P., Raskin G. (1993)**  
An automatic monitoring system for epithelial cell height.  
Pflugers Arch. 1993.164-171
- Van Driessche W., De Smet P., Li J., Allen S., Zizi M., Mountian I. (1997)**  
Isovolumetric regulation in a distal nephron cell line (A6).  
Am J Physiol. 272(6 Pt 1): C1890-C1898.
- Wang J., Barbry P, Maiyar A. C., Rozansky D. J., Bhargava A., Leong M., Firestone G. L., Pearce D. (2001)**  
SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport.  
Am. J. Physiol. 280: F303-F313.

**Warnock D. G, Eveloff J. (1989)**

K-Cl cotransport systems.  
Kidney Int. 1989:412-417

**Wehner F.; Olsen H., Kinne-Soffran E., Kinne R. K. (2003)**

Cellvolume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction.  
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003: 148:1-80

**Weisz O. A., Wang J. M., Edinger R. S., Johnson J. P. (2000)**

Non-coordinate regulation of endogenous epithelial sodium channel (ENaC) subunit expression at the apical membrane of A6 cells in response to various transporting conditions.  
J. Biol. Chem. 275: 39886-39893.

**Wills N. K., Millinoff L. P., Crowe W. E. (1991)**

Na<sup>+</sup> channel activity in cultured venal (A6) Epithelium: Regulation by solution osmolarity.  
J. Membr. Biol. 121: 79-90

**Yanase M., Handler J. S. (1986)**

Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulates chloride secretion in A6 epithelia.  
Am. J. Physiol. 251: C810-C814

## **Lebenslauf**

10.03.1973	Geboren in Braunschweig
1980 – 1983	Grundschule in Braunschweig
1983 – 1984	Grundschule in Hechendorf
1984 – 1986	Christoph-Probst-Gymnasium in Gilching
1986 – 1994	Carl-Spitzweg-Gymnasium in Germering Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Juli-September 1994	Ausbildung zum Rettungssanitäter in Hamburg
Oktober 1994 – September 1995	Wehrdienst an der Marineversorgungsschule, List auf Sylt: Fachrichtung Sanitätsdienst, anschließend als Hauptgefreiter auf dem Zerstörer Mölders im Schiffslazarett
1996 – 2003	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10.03.1998	Physikum
31.08.1999	1. Staatsexamen
25.03.2001	2. Staatsexamen
07.05.2003	Abschluss: 3. Staatsexamen
01.09.2003	Arzt im Praktikum, Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Krankenhaus München-Bogenhausen
seit September 2004	Assistenzarzt, Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Krankenhaus München-Bogenhausen