Aus der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II) der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ulrich Welsch

Neunaugenlarven in destilliertem Wasser und 10% Meerwasser - Der Einfluss der Osmolalität des externen Milieus auf die Mitochondrienreichen Zellen im Kiemenepithel. Eine ultrastrukturelle stereologische Untersuchung.

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

vorgelegt von

Johannes Rosenbruch
aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Bartels
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. W. Neuhofer
	Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 2006

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 4

1.1 Die Stellung der Neunaugen an der Basis des Wirbeltierstammbaumes 4

1.2 Vorkommen und Lebenszyklus der Neunaugen 6

1.3 Osmoregulation der Neunaugen 7

1.3.1 Mechanismen der Osmoregulation im Süßwasser 8

1.3.2 Mechanismen der Osmoregulation im Meerwasser 10

1.3.3 Osmoregulation während des Lebenszyklus der Neunaugen 11

1.3.4 Die zelluläre Zusammensetzung des Kiemenepithels in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus 12

1.4 Ziele der Arbeit 13

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Tiere 15

2.2 Gewebeentnahme und –fixierung 15

2.3 Elektronenmikroskopie 15

2.4 Morphometrie 16

2.4.1 Morphometrische Methoden 16

2.4.2 Relative Häufigkeit verschiedener Zelltypen 18

2.4.3 Morphometrische Untersuchungen der Zelloberfläche 18

2.4.4 Bestimmung der subzellulären Kompartimente 19

2.5 Statistik 20

3 BEFUNDE 21

3.1 Ultrastruktur des Kiemenepithels 21

3.2 Stereologische Untersuchungen 24

3.2.1 Relative Häufigkeit von Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen 24

3.2.2 Oberflächendichten der apikalen Zellmembran der verschiedenen Zelltypen 25

3.2.3 Bestimmung der subzellulären Kompartimente 27

4 DISKUSSION 30

4.1 Ammocoeten MR-Zellen 31

4.2 Schaltzellen 32

4.3 Deckzellen 36

4.4 Fazit und Ausblick 38

5 ZUSAMMENFASSUNG 39

6 LITERATURVERZEICHNIS 40

1 Einleitung

1.1 Die Stellung der Neunaugen an der Basis des Wirbeltierstammbaumes

Neunaugen (Petromyzoniformes) und Schleimaale (Myxiniformes) (Abb. 1) sind die einzigen heutigen Vertreter der im Paläozoikum weit verbreiteten kieferlosen Wirbeltiere (Agnatha). Aufgrund ihrer phylogenetischen Stellung an der Basis des Wirbeltierstammbaumes sind diese beiden Gruppen von herausragender Bedeutung für das Verständnis der Evolution der Vertebraten (Forey und Janvier 1993).

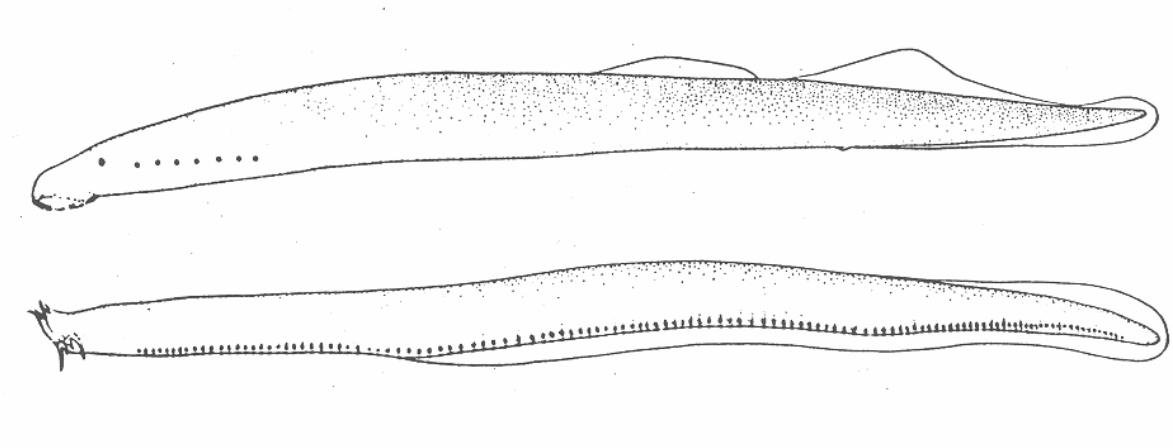


Abb. 1 Laterale Ansicht eines Flussneunauges *Lampetra fluvialis* (oben) und eines atlantischen Schleimaals *Myxine glutinosa* (unten) (Starck 1978).

Neunaugen und Schleimaale wurden traditionell als Cyclostomata (Rundmäuler) bezeichnet. Dieser Begriff basiert auf der Tatsache, dass die rezenten Agnathen über gemeinsame ursprüngliche („primitive“) Merkmale verfügen, in denen sie sich von den Kiefermündern (Gnathostomata) unterscheiden. Von diesen gemeinsamen Merkmalen war das Fehlen beweglicher Kiefer und die daraus resultierende Form der Mundöffnung namensgebend. Weitere Gemeinsamkeiten von Neunaugen und Schleimaalen, in denen sich Agnathen und Gnathostomen unterscheiden, betreffen u. a. die Lage der Kiemen innerhalb des knorpeligen Skelettes („Endobranchiaten“), die Ausbildung eines Nasenhypophysenganges und das Fehlen von Knochen, Schuppen und paarigen Flossen (Hardisty 1979, Marinelli und Strenger 1954a, Marinelli und Strenger 1954b).

In den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde diese traditionelle Sichtweise durch eine Hypothese abgelöst, der zufolge die Schleimaale eine frühe

isolierte Abspaltung in der Entwicklung der Wirbeltiere darstellen, während die Neunaugen in enger Verwandtschaft zu den gnathostomen Fischen gesehen werden (Hardisty 1982). Da die Chorda dorsalis adulter Neunaugen dorsal segmental angeordnete Arcualia (Wirbelbogenanlagen) aufweist, die bei Schleimaalen nicht ausgebildet sind, rechneten einige Autoren die Schleimaale nicht mehr zu den Vertebraten, sondern wählten den Oberbegriff Craniota, der die Vertebraten im engeren Sinne (Petromyzonta und Gnathostoma) und die Myxinoidea umfasst (Janvier 1981, Forey 1984, Hardisty 1982, Forey und Janvier 1993).

War die Betonung gemeinsamer morphologischer Merkmale der rezenten Agnathen die Basis, diese als Cyclostomata zusammenzufassen und gegen die gnathostomen Fische abzugrenzen, so waren die vielfältigen morphologischen, genetischen und biochemischen Unterschiede zwischen Neunaugen und Schleimaalen die Grundlage für deren taxonomische Neubewertung. Neben den bereits erwähnten Arcualia finden sich hervorstechende morphologische Unterschiede u. a. auch in der Kiemenregion. Die Kiemen der Schleimaale nehmen eine Sonderstellung ein, in dem sie echte Kiemensäcke (Bursae branchiales) ausbilden, deren Oberfläche durch von medial nach lateral verlaufende Falten vergrößert ist (Hofbauer 1934, Rauther 1935). Die Kiemen der Neunaugen ähneln denen gnathostomer Fische. Bei den beiden Gruppen bilden jeweils durch ein Septum getrennte Hemibranchien, deren Oberfläche durch Filamente und Lamellen in ähnlicher Anordnung vergrößert ist, eine Holobranchie (Mallatt und Ridgway 1984).

Diese von Hardisty (1982) und Janvier (1981) verfochtene These steht jedoch in Gegensatz zu neueren molekularbiologischen Untersuchungen, die das alte Cyclostomata - Konzept bestätigen. Auch wenn die Analysen von mitochondrialer DNS darauf hindeuten, dass Schleimaale und Neunaugen eine monophyletische Gruppe bilden (Stock und Whitt 1992, Mallatt und Sullivan 1998, Kuraku et al. 1999, Delarbre et al. 2002), so ist doch zweifellos unbestritten, dass Gruppen der rezenten Agnathen eine sehr lange getrennte Entwicklung durchlaufen haben, wahrscheinlich seit dem unteren Kambrium (Janvier 1999).

Auch die unterschiedlichen Lebensräume der Schleimaale und Neunaugen weisen auf diese sehr lange separate Entwicklung hin. Nach heutiger Auffassung haben die zur Osmoregulation unfähigen Schleimaale nie ihren marinen Lebensraum verlassen, während die Vorläufer der heutigen Neunaugen sich über einen sehr langen Zeitraum im Süßwasser entwickelt haben und relativ spät ins Meer gelangten,

möglicherweise erst nachdem die Knochenfische (Teleosteer) vom Meer ins Süßwasser vorgedrungen waren (Lutz 1975, Hardisty et al. 1989b). So stehen auch die ausgeprägten Unterschiede in der ionalen Zusammensetzung, der Osmolarität des internen Milieus und der Fähigkeit zur Osmoregulation der Schleimaale und Neunaugen im Einklang mit der Annahme, dass die Entwicklung dieser beiden kieferlosen Gruppen über einen sehr langen Zeitraum getrennt verlaufen ist. Tatsächlich hat Homer Smith bereits 1930 festgestellt, dass „these two groups lead back to a parting of the ways in the evolution of body fluids" (Smith 1930a). Wann die Entwicklung der Neunaugen begonnen bzw. stattgefunden hat, ist jedoch in Ermangelung fossiler Belege ungeklärt.

Die kürzliche Entdeckung eines Fossils in marinen Ablagerungen des unteren Kambriums in China, das bereits Merkmale von Neunaugen trägt und sich von anderen fossilen Agnathen hinreichend unterscheidet (Shu et al. 1999), könnte ein Indiz dafür sein, dass die ursprüngliche Entwicklung der Neunaugen in marinem Milieu stattgefunden hat. Dies muss zu einem sehr frühen Zeitpunkt, vermutlich vor über 545 Millionen Jahren gewesen sein, d. h. bevor diese Gruppe in Süßwasserlebensräume eingewandert ist. Seit spätestens dieser Zeit haben sich demzufolge Schleimaale und Neunaugen getrennt entwickelt.

1.2 Vorkommen und Lebenszyklus der Neunaugen

Die rezenten Neunaugen bilden drei Familien: Petromyzontidae, Geotriidae und Mordaciidae, die wiederum in ca. 40 Arten unterteilt werden, von denen die Mehrzahl (36) den Petromyzontidae zugerechnet werden. Petromyzontidae sind holarktische Tiere, d. h. sie sind ausschließlich auf der nördlichen Halbkugel zu finden, während die beiden anderen Familien in ihrer Verbreitung auf die südliche Hemisphäre beschränkt sind (Hardisty 1979, Potter 1986).

Allen Neunaugenarten ist ein komplexer Lebenszyklus gemeinsam. Am Anfang steht ein speziesabhängig unterschiedlich langes, mindestens jedoch dreijähriges Larvenstadium im Süßwasser (Potter et al. 1980). Die Larven (Ammocoeten) leben im sandigen Grund von Bächen und kleinen Flüssen und ernähren sich als Strudler von Algen und Detritus (Moore und Mallatt 1980). Im Anschluss an das Larvenstadium durchlaufen die Neunaugen eine mehrmonatige Metamorphose, in deren Verlauf es u. a. zu einer umfassenden Umwandlung der Mund- und Kiemenregion kommt, eine Voraussetzung für die veränderte Nahrungsaufnahme der Erwachsenen (Potter

et al. 1980). Einige Neunaugenarten sind anadrom, d. h. ähnlich wie Lachse verbringen sie einen Teil des adulten Lebens im Meer und kehren zum Laichen in die Oberläufe der Flüsse zurück. Die Jungtiere anadromer Arten wandern zumindest in die Flussmündungen oder ins offene Meer, wo sie sich saugend vom Blut (*Petromyzon, Mordacia*) oder mit Hilfe einer Raspelzunge vom Muskel (*Lampetra, Geotria*) der Wirtsfische, zumeist Teleosteer, ernähren (Bahr 1952, Potter und Hilliard 1987, Hilliard et al. 1985, Beamish 1980). Diese marine trophische Phase wird häufig als „parasitisch“ bezeichnet. Sie dauert 1-2 Jahre und in ihrem Verlauf nehmen die Neunaugen rasch an Länge und Gewicht zu. Nach Abschluss der marinen Phase stellen sie die Nahrungsaufnahme ein und ziehen flussaufwärts zu den Laichplätzen, wo sie nach Erlangung der Geschlechtsreife laichen und sterben (Hardisty und Potter 1971, Hardisty 1979).

Neben den anadromen Neunaugen gibt es einige Arten, die nach der Metamorphose nicht flussabwärts ziehen, sondern in ihren Lebensräumen bleiben und rasch zur Geschlechtsreife kommen. In der Regel ist jede dieser als „nicht-parasitisch“ bezeichneten Süßwasserarten eng mit einer anadromen „parasitischen“ Art verwandt (Potter 1980b). Ein Beispiel für solche „paired species“ sind in Nordeuropa das anadrome Flussneunauge *Lampetra fluviatilis* L. und das Bachneunauge *Lampetra planeri* Bloch. Da die Bachneunaugen nach Abschluss der Metamorphose die Nahrungsaufnahme nicht wiederaufnehmen, erreichen sie nur die Größe der Larven vor der Metamorphose (ca. 10 cm). Neben diesen nicht-parasitischen gibt es auch einige wenige fluviatile Arten, die sich als Erwachsene räuberisch von Teleosteern ernähren, z.B. *Eudontomyzon danfordi* in der Donau und *Ichthyomyzon unicuspis* im Einzugsbereich des Mississippi (Hardisty 1979).

1.3 Osmoregulation der Neunaugen

Im Unterschied zu den osmokonformern, an ein marines Milieu gebundenen Schleimaalen, sind Neunaugen ähnlich wie Teleosteer (Knochenfische) zur Regulation der Osmolalität des internen Milieus unabhängig von der des externen Milieus fähig (Morris 1972). Dies geschieht über die Regulation der Konzentration von Natrium- und Chloridionen (Robertson 1954, Morris 1972, Beamish 1980). Während einige euryhaline Teleosteer wie *Osseochromis (Tilapia) mossambicus*, *Fundulus heteroclitus* oder *Rivulus marmoratus* unabhängig vom Lebenszyklus in der Lage sind, die Osmolalität des inneren Milieus über einen sehr weiten Bereich der Osmola-

lität des externen Milieus nahezu konstant zu halten (Parry 1966, Karnaky 1986), ist diese Fähigkeit bei anadromen Neunaugen an bestimmte Phasen des Lebenszyklus geknüpft. Während Ammocoeten an Süßwasserlebensräume gebunden und zur Regulation in hypertonem Milieu unfähig sind (Beamish 1980, Morris 1980), sind die Tiere am Ende der Metamorphose in der Lage, in marinem Milieu zu überleben. So konnte in Experimenten gezeigt werden, dass Ammocoeten des Meerneunauges (*Petromyzon marius)* nicht in einem Milieu überleben, dessen Osmolalität ihre eigene (ca. 225 mosmol kg H_2O^{-1}) überschreitet. Nach Abschluss der Metamorphose können die juvenilen Meerneunaugen rasch an 100 % Meerwasser akklimatisiert werden und eine Serumosmolalität von 260 mosmol kg H_2O^{-1} aufrechterhalten (Potter und Huggins 1973, Potter und Beamish 1977, Potter et al. 1980, Beamish 1980). Diese Fähigkeit zur Osmoregulation in hypertonem Milieu geht jedoch während der Laichwanderung bald nach dem Wiedereintritt in Süßwasser verloren (Morris 1956, Morris 1958, Morris 1972).

1.3.1 Mechanismen der Osmoregulation im Süßwasser

Im Süßwasser sind Neunaugen, auf Grund des osmotischen Gradienten von einem ständigen Einstrom von Wasser und/oder von einem passiven Ionenverlust über die Haut und die Kiemen bedroht. Es wird allgemein angenommen, dass die osmoregulatorischen Mechanismen bei Neunaugen und Teleosteern im Süßwasser sehr ähnlich sind (Abb. 2). Die Kiemen sind neben der der Niere, die große Mengen hypotonen Urins produzieren (Morris 1972, McVicar und Rankin 1983), das wichtigste extrarenale Organ der Osmoregulation (Hardisty et al. 1989a). Im Kiemenepithel werden Natrium- und Chloridionen stöchiometrisch im Verhältnis 1:1, aber unabhängig voneinander im Austausch gegen Protonen bzw. gegen Bikarbonat vom Kiemenepithel aufgenommen (Krogh 1939, Kirschner 1983).

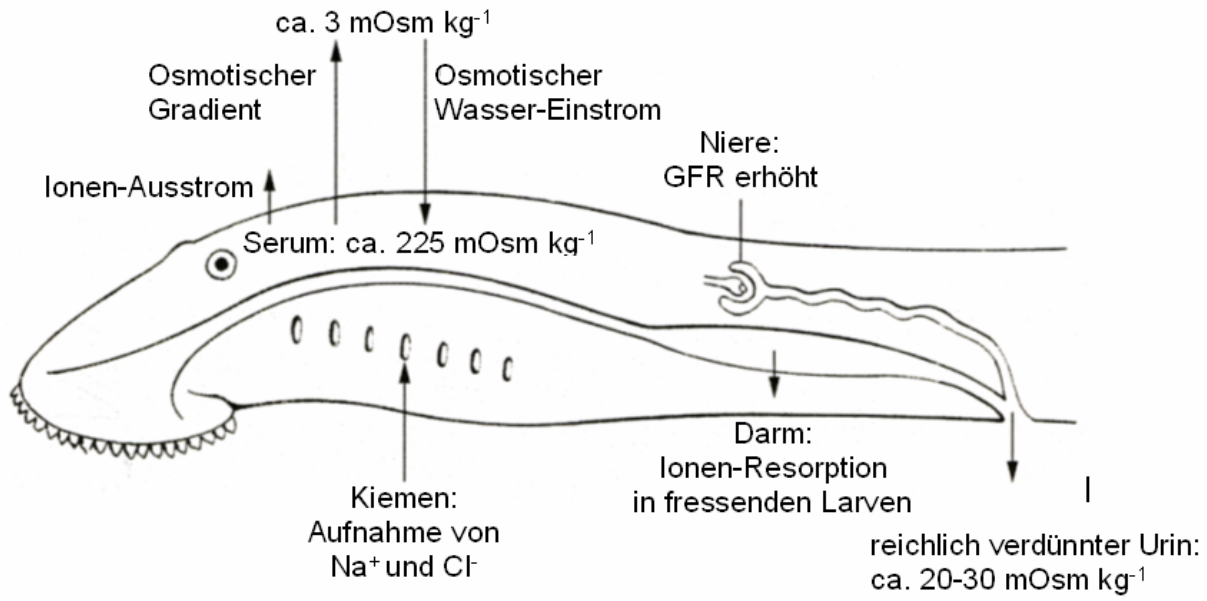


Abb. 2 Mechanismen der Osmoregulation im Süßwasser

Die Mechanismen des epithelialen Ionentransports können z. B. mit Hilfe einer Ussing-Kammer untersucht werden. Diese Untersuchungen setzen eine glatte Epitheloberfläche voraus, d. h. eine Situation, die in der durch Filamente und Lamellen vergrößerten Fischkieme nicht gegeben ist. Mechanismen der Ionenaufnahme im Süßwasser sind daher bevorzugt an der Epidermis von Amphibien (Froschhaut) durchgeführt worden (Kirschner 1983, Garcia und Ehrenfeld 1975, Larsen 1988). Die Ergebnisse dieser Studien haben zu der Erkenntnis geführt, dass der Austausch von Natrium und Protonen nicht durch einen einfachen Natrium/Protonen-Antiport, sondern dass die Protonen-Sekretion aktiv, mittels einer Protonen-ATPase und die Natrium-Resorption durch einen amilorid-sensitiven Natrium-Kanal verläuft (Harvey und Ehrenfeld 1986, Nagel und Doerge 1996, Ehrenfeld und Klein 1997, Harvey et al. 1988). Dieser Mechanismus ist abhängig von der Aktivität der Carboanhydrase im Zytosol der Protonen-sezernierenden Zellen und der Natrium/Kalium-ATPase in der basolateralen Membran der Natrium-resorbierenden Zellen. Auch das Epithel der Harnblase von Kröten und Schildkröten weist eine ähnliche zelluläre Zusammensetzung wie die Epidermis der Amphibien auf (Wade et al. 1975, Wade 1976, Rick et al. 1978, Durham und Nagel 1986, Brown und Breton 1996) und nutzt im wesentlichen die gleichen Mechanismen für die Reabsorption von Natrium und zur Sekretion von Protonen in den Urin (Stetson und Steinmetz 1985, Durham und Nagel 1986, Lang 1988). Durch immunhistochemische Versuche konnte gezeigt werden, dass im Kiemenepithel von Teleosteern im Süßwasser die Protonen-ATPase, der amilorid-

sensitive Natrium-Kanal und die Carboanhydrase vorhanden sind, so dass die wesentlichen Voraussetzungen für den oben beschriebenen Mechanismus der Natrium-Aufnahme gegeben sind. Es wird heute allgemein angenommen, dass diese Mechanismen der Natrium-Aufnahme aus dem Süßwasser bei allen Wirbeltieren und auch bei wirbellosen Tieren wie Ringelwürmern, Schalen- und Weichtieren im Prinzip dieselben sind (Kirschner 1983).

Im Gegensatz zu der indirekten Kopplung der Natrium-Aufnahme an die Protonen-Sekretion, wie oben beschrieben, zeigen alle bisherigen Untersuchungen, dass die Aufnahme von Chloridionen im direkten Austausch gegen Bikarbonat über einen Antiport verläuft (Garcia und Ehrenfeld 1975, Larsen et al. 1992). Die Chlorid-aufnehmenden Zellen verfügen über eine zytoplasmatische Carboanhydrase und einen Chlorid-Kanal in der basolateralen Zellmembran (Larsen et al. 1992).

1.3.2 Mechanismen der Osmoregulation im Meerwasser

Obwohl die Mechanismen der Osmoregulation im Meerwasser für die vorliegende Arbeit keine Rolle spielen, sollen sie der Vollständigkeit halber hier kurz erwähnt werden.

Da die Osmolalität des Meerwassers ca. 3 - 4 mal höher ist als die ihres internen Milieus (Parry 1966, Lutz 1975), sind Neunaugen, wie Teleosteer im Meerwasser von einem osmotisch bedingten Wasserverlust bzw. Einstrom von Ionen bedroht. Um einer hyptertonen Dehydration entgegenzuwirken, trinken sie Meerwasser, resorbieren die monovalenten Ionen im Darm und sezernieren eine hypertone Natrium- und Chloridlösung mit Hilfe der Chloridzellen im Kiemenepithel, so dass bei stark eingeschränkter glomerulärer Filtration „freies“ Wasser im Körper verbleibt (Smith 1930b, Foskett und Scheffey 1982, Zadunaisky 1984, Karnaky 1986, Loretz 1995) (Abb.3).

Bereits 1932 haben Keys und Willmer eine große eosinophile Zelle im Kiemenepithel von Aalen identifiziert, die den Belegzellen in der Magenschleimhaut der Säugetiere ähnelt und diese daher für die Chlorid-Sekretion verantwortlich gemacht. Konsequenterweise nannten sie diese Zelle „Chloride-secreting cell“. Diese Zelle ist durch zahlreiche Mitochondrien und ein System membranöser Tubuli in ihrem Zytoplasma charakterisiert (Pisam und Rambourg 1992, Philpott 1980). Diese Membranen stellen eine intrazelluläre Erweiterung der basolateralen Zellmembran dar und enthalten die Natrium/Kalium-ATPase und das Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransportsystem (Karnaky et al. 1976, Karnaky 1980, Karnaky 1986). Der Mechanismus der Natrium- und Chlorid-Sekretion im Kiemenepithel von marinen Teleosteern wurde am Epithel

des Kiemendeckels (Operculum) von *Fundulus heteroclitus* aufgeklärt. Dieses Epithel enthält bei einigen Teleosteern zahlreiche Chloridzellen und ist im Gegensatz zu den Kiemenepithelien flach, so dass es sich für Untersuchungen in der „Ussing"-Kammer eignet (Karnaky, Jr. und Kinter 1977). Durch eine Kombination morphologischer und elektrophysiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Knochenfische im Salzwasser Chlorid-Ionen durch Chloridzellen über einen sekundär aktiven Transportweg sezernieren, der die treibende Kraft für den passiven Natrium-Ausstrom durch „Leaky-Pathways" zwischen benachbarten Chloridzellen ist (Karnaky, Jr. und Kinter 1977, Ernst et al. 1980, Foskett und Scheffey 1982, Foskett und Machen 1985). Der Chlorid-Kanal der Chloridzellen der Knochenfische ist homolog mit dem „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)" der Säugetiere (Marshall et al. 1995, Marshall 2002).

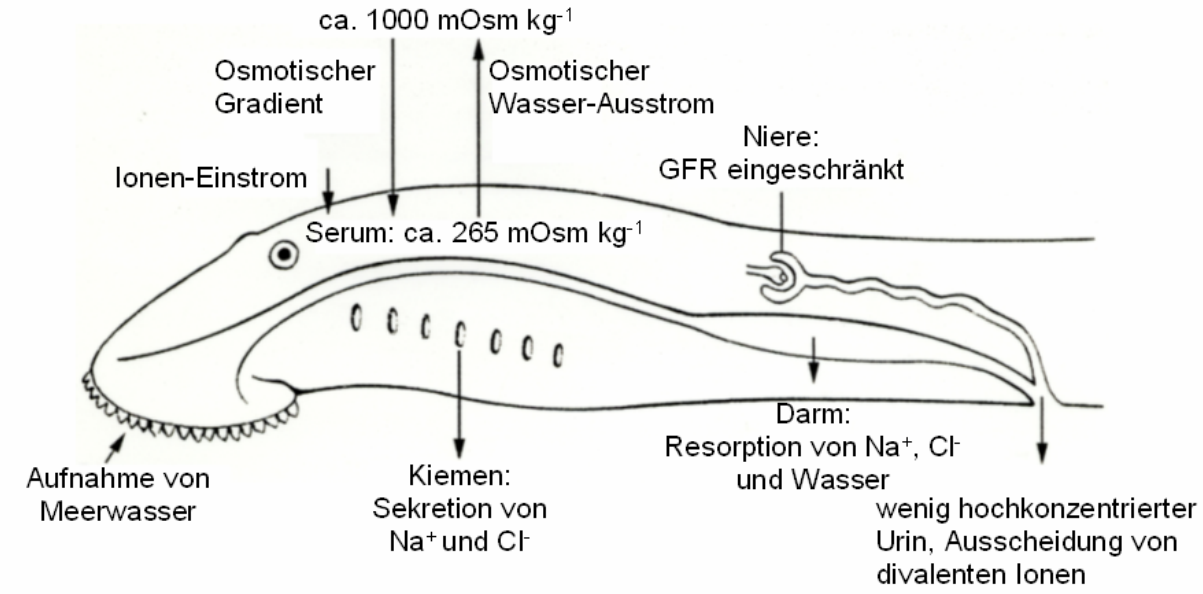


Abb. 3 Mechanismen der Osmoregulation im Meerwasser

Identische Mechanismen der hypertonen Salzsekretion finden sich in den sekretorischen Drüsen der Rektaldrüse der Elasmobranchien und in der Salzdrüse bei einigen marinen Vögeln (Kirschner 1979, Ernst et al. 1980), und es kann davon ausgegangen werden, dass die Mechanismen der Salzsekretion bei allen Wirbeltieren im Meerwasser, also in einem hypertonen Milieu sehr ähnlich, wenn nicht identisch sind.

1.3.3 Osmoregulation während des Lebenszyklus der Neunaugen

Die mehrjährige larvale Entwicklung der Neunaugen findet obligat im Süßwasser statt

(Potter et al. 1980). Versuche an Ammocoeten des Meerneunauges *Petromyzon marinus* haben gezeigt, dass diese nicht in der Lage sind, in einem Milieu zu überleben, das die Osmolalität ihres Serums von ca. 225 mosmol kg H_2O^{-1} übersteigt. So verstarben ca. 50 % der Ammocoeten innerhalb von 24 Stunden in Wasser mit Osmolalität von 350 mosmol kg H_2O^{-1}, was etwa einem Drittel der des Meerwassers entspricht. Dagegen konnten Neunaugen nach Abschluss der Metamorphose auch in 100 % Meerwasser eine Serumosmolalität von 260 mosmol kg H_2O^{-1} aufrechterhalten (Beamish 1980). Diese Fähigkeit zur Osmoregulation ist so wirksam, dass mehr als 80 % einer Gruppe junger Meerneunaugen nach der Metamorphose den direkten Transfer ohne Zwischenschritte von Süßwasser in Meerwasser überlebten. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei den Arten *Lampetra fluvialis* und *Geotria australis* (Potter und Huggins 1973, Potter et al. 1980). Die Fähigkeit zu hypotoner Osmoregulation geht erwachsenen Neunaugen nach dem Abschluss der trophischen marinen Phase während der Stromaufwärtswanderung wieder verloren.

1.3.4 Die zelluläre Zusammensetzung des Kiemenepithels in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus

Auch das Kiemenepithel macht bedeutende Veränderungen während des Lebenszyklus der Neunaugen durch. Sie sind sowohl während der Flussabwärts- und der Flussaufwärtswanderung zu beobachten. Diese Veränderungen betreffen die Zusammensetzung und die räumliche Beziehung der Zellen und die Struktur der Tight junctions. Die Oberfläche der Kiemen ist durch Filamente und Lamellen vergrößert und von einem zweischichtigen Plattenepithel bedeckt, das an der Basis in das vielschichtige kubische Epithel der interlamellären Region des Filaments übergeht. In der oberflächlichen Epithelschicht kommen in Abhängigkeit von der Phase des Lebenszyklus vier verschiedenen Zellarten vor: Ammocoeten Mitochondrienreiche (MR-) Zellen, Deckzellen, Schaltzellen und Chloridzellen (Bartels et al. 1998).

Im Epithel der Ammocoeten kommen neben den Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen vor. Diese Zellen differenzieren sich aus den basalen Zellen, die die untere Schicht des Epithels bilden und sich mitotisch teilen. Während die Schaltzellen und Deckzellen im Kiemenepithel in allen Süßwasserphasen des Lebenszyklus von Neunaugen vorkommen, sind die Ammocoeten MR-Zellen nur während des Larvenstadiums vorhanden. Sie verschwinden während der Metamorphose und treten während der Laichwanderung nicht wieder auf. Während der Metamorphose entwickeln sich die Chloridzellen als Vorbereitung auf die marine Phase.

Zwischen dem Abschluss der Metamorphose und dem Eintritt in Meerwasser, d. h. während der Flussabwärtswanderung sind an der Kiemenoberfläche demzufolge Schaltzellen, Deckzellen und Chloridzellen vorhanden. Die Schaltzellen verschwinden, sobald die Tiere in Meerwasser sind und treten erst nach Wiedereintritt ins Süßwasser wieder auf. Während der folgenden Flussaufwärtswanderung wird die Kiemenoberfläche nur noch durch Schalt- und Deckzellen gebildet. Die Tatsache, dass nur Schaltzellen und Deckzellen immer an der Kiemenoberfläche vorhanden sind, wenn sich das Neunauge in Süßwasser aufhält, lässt darauf schließen, dass diese beiden Zellen an der hypotonen Osmoregulation beteiligt sind. Sollten die Ammocoeten MR-Zellen, die auf Grund ihres Mitochondrienreichtums und dem Vorhandensein von Carboanhydrase zunächst als „Ion-uptake Cells“ bezeichnet wurden (Mallatt und Ridgway 1984, Pickering und Morris 1976), tatsächlich Ionen aus dem Süßwasser aufnehmen und somit zur Ionen- und Osmoregulation beitragen, dann muss ihre Funktion entweder von Schaltzellen oder von den Deckzellen nach Abschluss der Metamorphose übernommen werden, da die osmotischen Probleme insbesondere während der Laichwanderung dieselben sind, wie während des Larvenstadiums.

Im Gegensatz dazu lässt die Bildung der Chloridzellen unmittelbar vor der marinen Phase und ihr Verschwinden nach Beendigung dieser Phase den Schluss zu, dass diese Zellen ausschließlich der Osmoregulation in hypertonem Milieu dienen.

Allein die Deckzellen kommen in allen Lebensstadien vor und können somit sowohl in Süßwasser als auch in Meerwasser osmoregulatorisch aktiv sein. Für eine Beteiligung an der hypotonen Regulation in Meerwasser fehlt aber bisher jeder Hinweis.

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund zytologischer Merkmale werden zurzeit folgende Modelle für den Ionentransport der Neunaugen im Süßwasser diskutiert (Bartels und Potter 2004): Die aktive Protonensekretion und vermutlich auch die Chloridresorption erfolgt unabhängig von der Phase des Lebenszyklus durch die Schaltzellen, während für die Natriumresorption verschiedene Möglichkeiten in Betracht kommen. Vor der Metamorphose könnte die Natriumaufnahme durch die Ammocoeten MR Zellen entweder allein oder zusammen mit den Deckzellen erfolgen, während nach der Metamorphose, wenn die Ammocoeten MR Zellen verschwunden sind, müsste diese Funktion von den Deck-

zellen allein übernommen werden. Auch wenn Untersuchungen an der Froschhaut widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Beteiligung der Schaltzellen an der Na Aufnahme ergeben haben (Ehrenfeld et al. 1989, Nagel und Doerge 1996, Ehrenfeld und Klein 1997), so muss diese Zelle in die Überlegungen mit einbezogen werden, da sie in allen Phasen des Lebenszyklus der Neunaugen im Süßwasser im Kiemenepithel vorhanden ist. Da die Ionen - transportierende Funktion der Ammocoeten MR-Zellen von den Deckzellen und / oder den Schaltzellen nach der Metamorphose mit übernommen werden muss, stellt sich die Frage, ob die Ammocoeten MR-Zellen tatsächlich an der Ionenresorption, wie Pickering und Morris (1976) und Mallatt und Ridgway (1984) aufgrund des Mitochondrienreichtums vorgeschlagen haben, beteiligt sind.

Um dieser Frage nachzugehen wurden in der vorliegenden Arbeit Ammocoeten für 14 Tage entweder in destilliertem Wasser oder 10 % Meerwasser gehalten. Während bei Ammocoeten, die in 10 % Meerwasser gehalten werden, die Ionenaufnahme auf Grund des niedrigen osmotischen Gradienten zwischen internem und externem Milieu gering sein sollte, sollte sie bei Tieren in destilliertem Wasser maximal stimuliert sein.

Das Kiemenepithel wurde daraufhin ultrastrukturell mit stereologischen Methoden auf folgende Parameter untersucht:

1. Die numerische Zelldichte der drei Zelltypen Ammocoeten MR-, Deck- und Schaltzellen.
2. Die Oberflächendichte der apikalen Zellmembran der drei Zelltypen.
3. Die Volumendichten der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien der Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Ammocoeten (Larven) der in der südlichen Hemisphäre vorkommenden Neunaugen *Geotria australis* wurden in kleinen Zuflüssen des Donnelly River im äußersten Südwestens Australiens gefangen und in Tanks, die Flusswasser enthielten, ins Labor der School of Envirommental and Life Sciences der Murdoch University, Murdoch, West - Australien, gebracht. Nach Akklimatisierung an die Laborverhältnisse wurden die Tiere in zwei Gruppen geteilt und bei gleichen Licht- und Temperaturbedingungen bei ca. 18°C für zwei Wochen entweder in destilliertem Wasser oder in 10% Meerwasser (Kontrollgruppe) gehalten. Nach Abschluss dieser Zeit, während der die Tiere nicht gefüttert wurden, wurden sie durch Zugabe von 0,01% Benzocain in das jeweilige Medium anästhesiert und getötet.

2.2 Gewebeentnahme und –fixierung

Transversalschnitte, die die 4. bzw. 5. Kieme enthielten, wurden sofort in einer Lösung aus 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, immersionsfixiert. Aus diesen Schnitten wurden unter einem Stereomikroskop kleine Gewebeproben, die 2-4 Filamente enthielten, isoliert und diese in etwa der Mitte der Filamente quer geteilt.

2.3 Elektronenmikroskopie

Die so erhaltenen Proben wurden bis zur Einbettung bei 4° C aufbewahrt, gründlich in Puffer gespült und in 2% Osmiumtroxid in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, für 2 Stunden nachfixiert. Die Einbettung erfolgte in Epon nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Immersion in einem Propylenoxyd-Epongemisch als Zwischenmedium. Semidünnschnitte wurden an einem Ultracut-Mikrotom (Reichardt) hergestellt und mit Toluidinblau gefärbt. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 60 nm wurden an demselben Mikrotom mit Diamantmessern angefertigt, auf Pioloformbeschichtete Einlochblenden aufgefangen und mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert. Die Schnitte wurden an einem Zeiss Elektronenmikroskop bei 80 kV untersucht.

2.4 Morphometrie

Als Morphometrie werden quantitative Methoden in der Strukturforschung bezeichnet. Bei der Quantifizierung in der Mikroskopie, insbesondere in der Elektronenmikroskopie muss die Reduktion in der Größe und in der Dimension berücksichtigt werden. Alle Methoden, die eine Gewinnung morphometrischer Daten in der Mikroskopie erlauben, werden unter dem Begriff Stereologie zusammengefasst. Die Stereologie bietet die Möglichkeit, an zweidimensionalen Objekten (z. B. Dünnschnitte) dreidimensionale Bestimmungen durchzuführen. Voraussetzung hierfür ist erstens eine genügend geringe Schnittdicke, so dass der Flächenanteil einer dreidimensionalen Struktur auf der Unter- und Oberseite eines Schnitts gleich ist (Delesse-Prinzip)(Delesse 1847), zweitens die Einhaltung von bestimmten Zufallskriterien, so dass dimensionslose Stichproben gewonnen werden (Howard und Reed 1998).
Folgende Parameter wurden morphometrisch bestimmt:

- die relative Häufigkeit der drei an der Oberfläche der Kiemenfilamente und -lamellen vorhandenen Zelltypen
- der relative Anteil der apikalen Oberfläche dieser Zelltypen, die apikale Oberflächendichte und das Verhältnis von apikaler Oberfläche zum Zellvolumen (S_v-ratio) dieser Zellen
- die Volumendichte (prozentualer Volumenanteil am Zellvolumen) der Mitochondrien, des Zellkerns und des Zytoplasmas in Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen, in Deckzellen zusätzlich die Volumendichte der Sekretgranula
- das Oberflächen / Volumen-Verhältnis der Mitochondrien in Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen
- das mittlere Mitochondrienvolumen in Ammocoeten MR-Zellen.
- Jede Versuchsgruppe umfasste 4 Tiere. Pro Tier wurden 5 Proben ausgewertet, um die intraindividuelle Streuung möglichst gering zu halten.

2.4.1 Morphometrische Methoden

2.4.1.1 Sampling

Die Testfelder eines Schnitts wurden nach dem „systematic quadrat subsampling“-Verfahren ausgewählt, welches eine Kombination aus einem zufälligen Start außerhalb des Schnitts (z.B. rechts oben) und einer folgenden systematischen - feste Abstände umfassenden - mäanderförmigen Durchmusterung in x- und y-Richtung dar-

stellt (Muller et al. 1981). Dieses Verfahren ermöglicht eine Berücksichtigung aller Bereiche im Präparat und eine zufällige Verteilung der Testfelder. Somit erhalten alle Areale im Schnitt die gleiche Chance, ausgewertet zu werden (Weibel 1979). Pro Schnitt wurden bis zu 70 Testfelder ausgewertet. (Abb. 4)

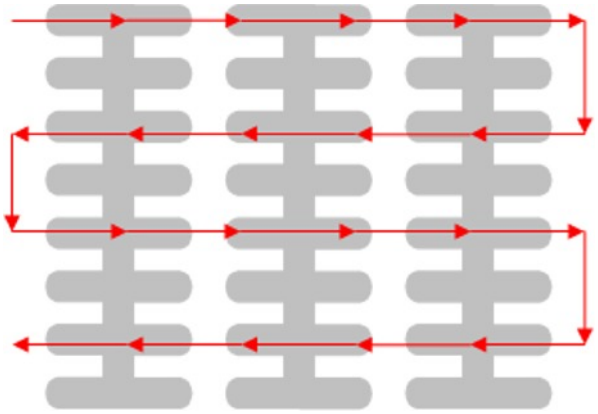


Abb. 4 Sampling - Verfahren

Das elektronenmikroskopische Bild wurde durch eine CCD-Kamera auf einen Computerbildschirm übertragen. Dem Monitorbild wurde ein Testfeldrahmen (Größe 23,15 cm x 15,25 cm) vorgeschaltet. Dieser Rahmen definiert einerseits die ausgewertete Fläche, andererseits wird durch ihn auch definiert, wie mit am Rand angeschnittenen Zellen zu verfahren ist (Abb.5). Zellen, die innerhalb des Rahmens liegen oder vom oberen und linken Rahmen berührt werden, werden erfasst (in der Abbildung grün), schneidet dagegen der untere bzw. rechte Rand die Zelle, gehen sie nicht in die Auswertung ein (in der Abbildung rot).

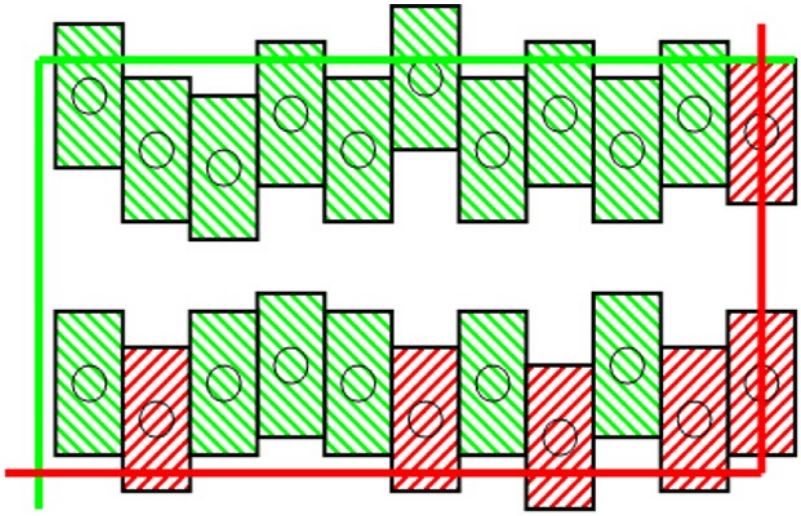


Abb. 5 Testfeldrahmen

2.4.1.2 Testraster

Die morphometrischen Bestimmungen der Oberflächen- und Volumendichten und Oberflächen/Volumenverhältnisse erfolgten nach dem Punkt- und Schnittpunkt-Zählverfahren (Weibel 1979). Hierfür wurde ein Punkte-Raster mit bogenförmig verlaufenden Testlinien auf einen Computerbildschirm gelegt. Die beiden Endpunkte jeder Testlinie dienten als Testpunkte. Die Zahl der Testlinien betrug 18, die der Testpunkte 36.

2.4.2 Relative Häufigkeit verschiedener Zelltypen

Die Zellen an der Oberfläche der Kiemenfilamente und -lamellen wurden auf Grund zytologischer Kriterien identifiziert und einem der drei Zelltypen zugeordnet. Die Schnitte wurden nach dem oben angegebenen Verfahren durchfahren, die Zellen in den Testfeldern gezählt und ihr relativer Anteil an der Gesamtzellzahl in Prozent angegeben.

2.4.3 Morphometrische Untersuchungen der Zelloberfläche

2.4.3.1 Relativer Oberflächenanteil

Der relative Oberflächenanteil der apikalen Oberfläche eines jeden Zelltyps erlaubt Aussagen über eine durch Ausstülpungen der Zellmembran (Mikrovilli / Mikroplicae) hervorgerufene apikale Oberflächenvergrößerung der Zellen. Er wurde für jeden der drei Zelltypen ermittelt, indem die Schnittpunkte der Testlinien mit den Mikrovilli / Mikroplicae und die auf die Zelle fallenden Endpunkte der Testlinien bestimmt wurden. Die Angaben erfolgen in Prozent.

2.4.3.2 Oberflächendichte

Die Oberflächendichte einer Struktur (S_V) gibt ihre Oberfläche bezogen auf das Volumen eines Referenzraumes an. Zur Bestimmung der Oberflächendichte wird ein Raster mit Testlinien verwendet. Die Schnittpunkte der Testlinien (Intersektionen) mit der äußeren Begrenzung einer Struktur (a) werden gezählt und auf die Gesamtlänge aller Testlinien bezogen:

$$S_V = 2\ I_a / L_T\ (\mu m^2/\mu m^3)$$

2.4.3.3 Oberflächen-Volumen-Verhältnis

Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis einer Struktur (S_v-ratio) ist das Verhältnis von Oberflächendichte zu Volumendichte. Die S_v-ratio wird ermittelt, indem man die Zahl der Schnittpunkte mit der äußeren Begrenzung zu der auf die Struktur fallenden Punktezahl bezieht.

$S_V/V_V = S_V\text{-ratio} = 2I/P_a \times L$ ($\mu m^2/\mu m^3$)

Mit der S_v-ratio können Größenänderungen einer Struktur ermittelt werden.

2.4.4 Bestimmung der subzellulären Kompartimente

Der Volumenanteil der Zellorganellen in den Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen wurde morphometrisch bestimmt

2.4.4.1 Zelluläre Volumendichten

Die Volumendichte einer Struktur (V_V) gibt den Anteil ihres Volumens am Volumen eines Referenzraumes, z. B. der Zelle, an. Für die Bestimmung der Volumendichten (V_V) wurde das Punktzählverfahren angewendet (Weibel 1979). Wenn eine Gesamtzahl von Punkten (P_C) zufällig in eine Struktur (c) mit einem Volumen (V) gelegt wird, dann wird mit geometrischer Wahrscheinlichkeit ein Teil (P_a) der zufällig verteilten Punkte in einem in der Struktur liegenden Objekt mit dem Volumen (V_a) enthalten sein, woraus folgt:

$$\frac{V_a}{V_c} = \frac{P_a}{P_c}$$ (Weibel 1979).

Diese Gleichung wird auch in anderer Form wiedergegeben (Weibel 1979):

$$V_{Va} = P_{Pa}$$

oder einfach:

$$V_V = P_P$$

Die Volumendichten werden in Prozent (%) angegeben.

Bei einer Vergrößerung von 4400:1 wurden die Volumendichten (V_V) der Mitochondrien (V_{VMi}), des Zytoplasma (V_{VZpl}), der Zellkerne (V_{VNc}) und für Deckzellen zusätzlich der Sekretgranula (V_{VVs}) ermittelt.

2.4.4.2 Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Mitochondrien

Die S_V-ratio der Mitochondrien wurde in beiden Zelltypen ermittelt, um mögliche Unterschiede in der Größe der Mitochondrienanschnitte beurteilen zu können.

2.4.4.3 Mittleres volumengewichtetes Volumen der Mitochondrien

Das mittlere volumengewichtete Volumen der Mitochondrien dient als Maß für das mitochondriale Volumen. Zur Bestimmung wurde die „Point Sampled Intercept Methode“ angewendet. Die Messmethode basiert auf folgender theoretischer Grundlage: Wenn ein Punkt zufällig auf das Profil eines Partikels, z.B. eines Mitochondriums eines ebenfalls willkürlichen Schnittbildes fällt, kann die Länge l des linearen Abschnittes über seinem Profil und durch den Punkt gemessen werden. Denn die zufälligen Punkte treffen mit der Wahrscheinlichkeit auf die Partikel, die zu dem volumengewichteten Volumen der Partikel direkt proportional ist. Beim Messen der Abschnitte durch die Mitochondrien erhält man eine erwartungstreue Abschätzung des volumengewichteten mittleren Mitochondrien-Volumens (V_V) mit der Formel

$$V_V = à/3\ l_0^3$$

lässt sich über diese Länge des Partikelvolumens V ermitteln.

Es wurde das folgende Verfahren angewendet: Ein transparentes Testsystem mit 36 Punkten wurde auf einen Rahmen mit winkelgewichteten Gradzahlen gelegt. Neue Gradzahlen wurden errechnet, indem man 37 der vorhergehenden Zahl addierte, oder wenn die Summe > 97 war, 60 subtrahierte. Traf ein Punkt des Testsystems einen Partikel, also auf ein Mitochondrium, wurde mittels eines Rulers der Durchmesser des Partikels gemessen, wobei der Ruler in Richtung der ermittelten Gradzahl des Rahmens ausgerichtet wurde. Der Maßstab (Ruler) war logarithmisch in 15 Klassen unterteilt (L_{15} = 150).

Das volumengewichtete mittlere Volumen wurde entsprechend der Formel von Braendgaard und Gundersen (1986) errechnet:

$$v_V = \pi/3 \times ((L_{15} \times 1000)/3 \times \text{Vergrößerung})^3 \times l_0^3\ (\mu m^3)$$

2.5 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± mittlere Standardabweichung angegeben. Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test überprüft.Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt.

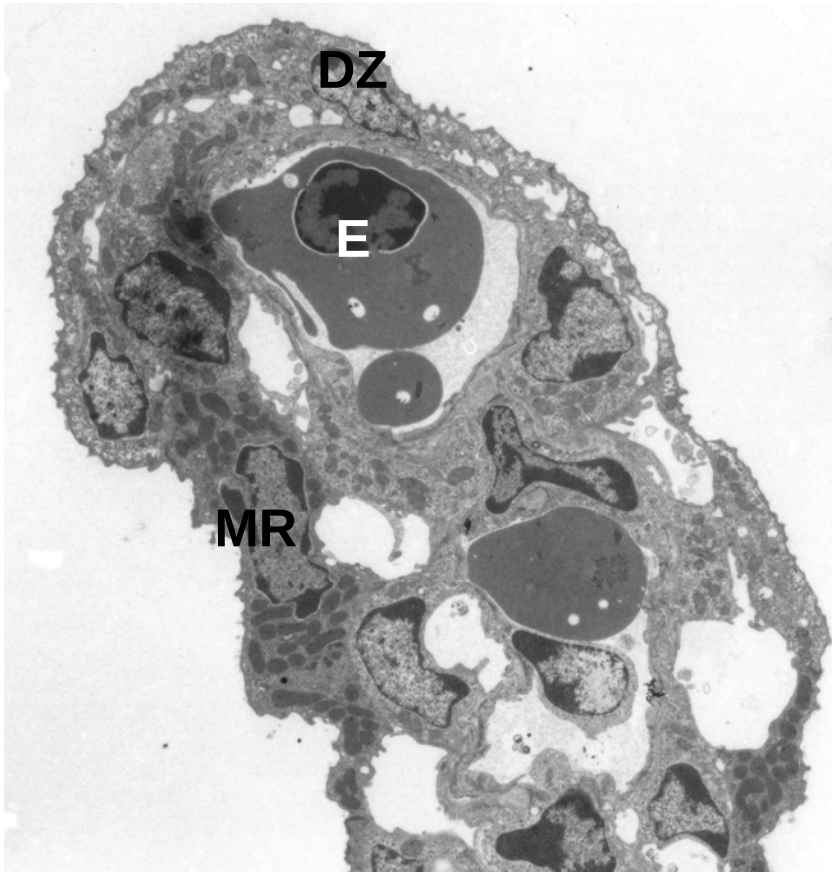
3 Befunde

3.1 Ultrastruktur des Kiemenepithels

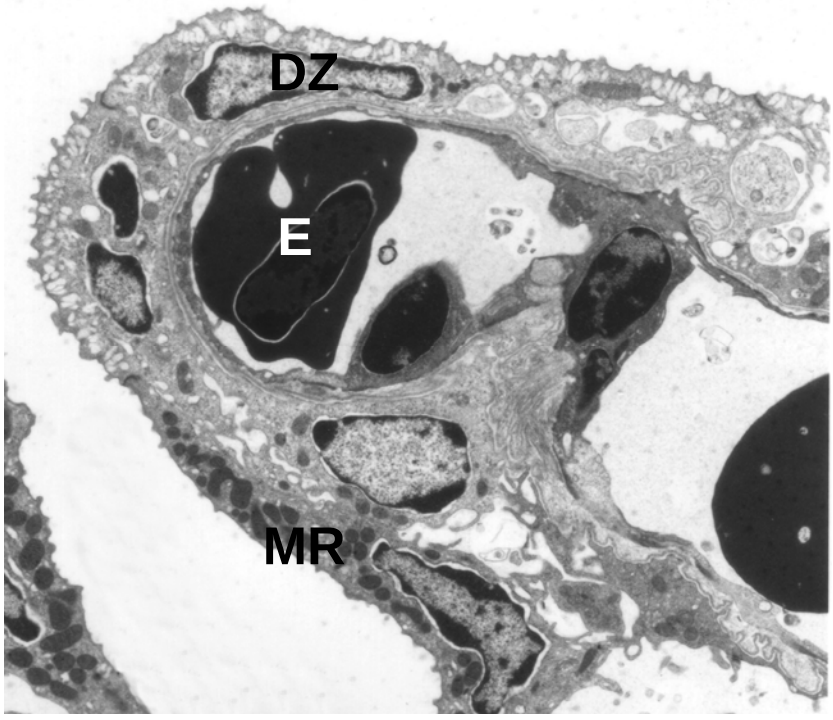
Die Kiemenoberfläche der Ammocoeten von *Geotria australis* ist durch Filamente und Lamellen ähnlich wie bei gnathostomen Fischen (Laurent 1984, Laurent und Dunel 1980) vergrößert. Das Epithel der Lamellen ist ein zweischichtiges Plattenepithel, während das Epithel zwischen den Lamellen und an der Basis der Filamente zwei- oder mehrschichtig isoprismatisch ist. Die oberflächliche Schicht des Epithels wird von Deckzellen und zwei Typen Mitochondrienreicher (MR-) Zellen, den Schaltzellen und den Ammocoeten-MR-Zellen gebildet (Bartels et al. 1998, Bartels und Potter 2004) (Abb. 6, 7). Die Schaltzellen kommen einzeln oder in Paaren an der Basis und in der interlamellären Region des Filaments vor, wo sie von Ammocoeten-MR-Zellen umgeben sind. Letztere bilden einen großen zusammenhängenden Verband, der den filamentnahen Teil der Lamellen bedeckt, während deren freier Rand von Deckzellen bedeckt wird (Bartels et al. 1998, Bartels und Potter 2004).

Die drei an der Oberfläche des Kiemenepithels vorkommenden Zelltypen können nicht nur durch die Lage, sondern auch durch zytologische Merkmale eindeutig voneinander unterschieden werden: Schaltzellen ähneln diesem Zelltyp im Sammelrohr der Niere und den MR-Zellen in der Epidermis der Amphibienhaut und dem Epithel der Harnblase von Amphibien und Reptilien. Sie enthalten zahlreiche Mitochondrien, zwischen denen eine variable Anzahl membranöser Vesikel und Tubuli vorkommen (Abb. 7). Die apikale Membran ist durch schmale, verzweigte Mikrofalten vergrößert. Das Ausmaß dieser Oberflächenvergrößerung, das zwischen individuellen Schaltzellen große Unterschiede aufweisen kann, steht in einem inversen Verhältnis zur Anzahl der membranösen Vesikel und Tubuli, die durch Exozytose in die Membran eingebaut bzw. durch Endozytose aus dieser entfernt werden (Stetson und Steinmetz 1983, Brown 1989, Brown und Breton 2000).

Die Ammocoeten-MR-Zellen sind durch Mitochondrien mit einer extrem elektronendichten Matrix charakterisiert. Weiter enthalten einige dieser Zellen sehr kleine längliche Sekretgranula, die direkt unterhalb der apikalen Zellmembran liegen (Abb. 6 / 7).



A



B

Abb. 6 Freier Rand der Lamelle mit Ammocoeten MR-Zellen (MR) und Deckzellen (DZ) in der oberflächlichen Schicht des Kiemenepithels; E Erythrozyt. A 10% Meerwasser, x4.700, B destilliertes Wasser, x5.450.

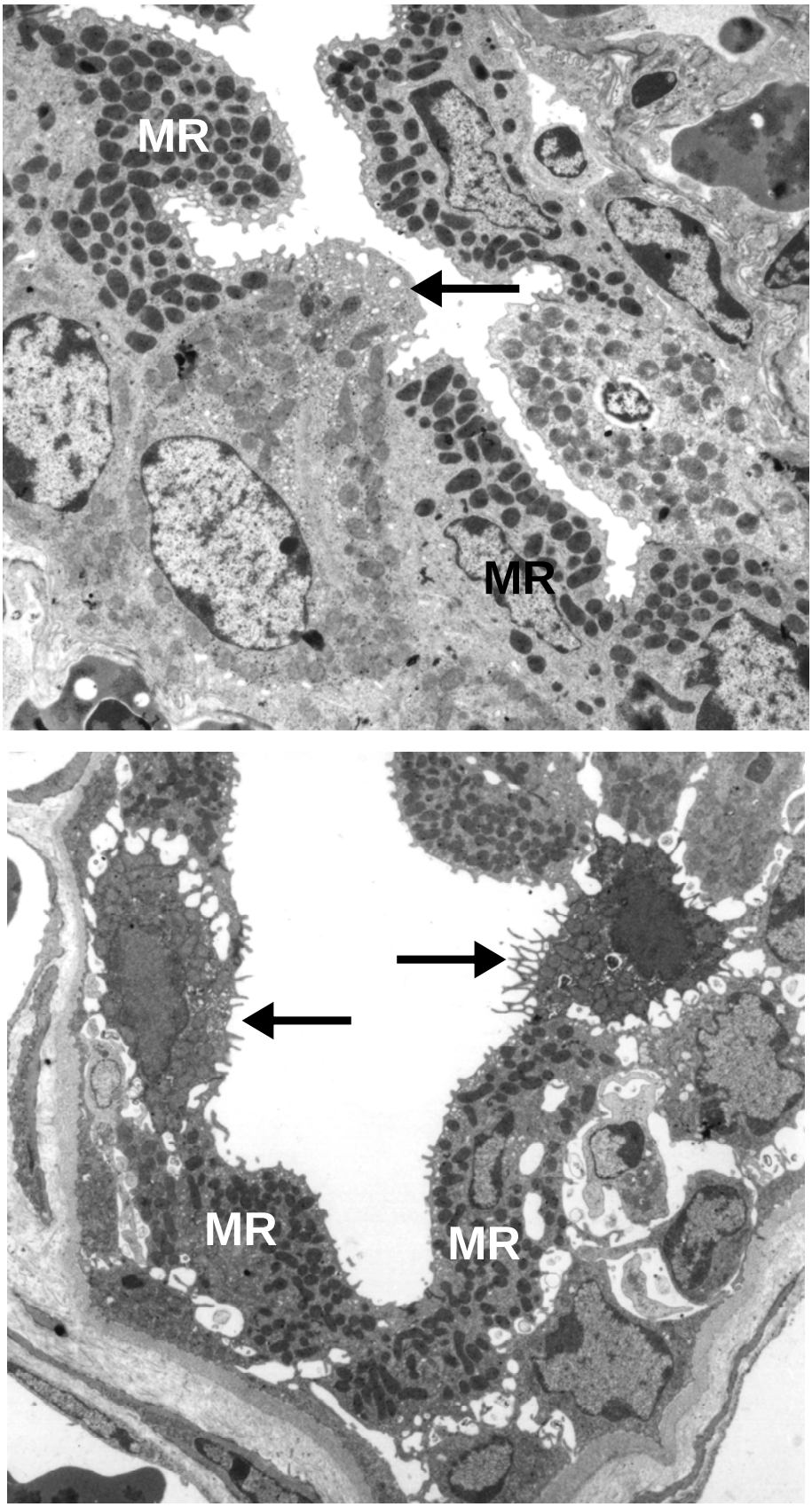


Abb. 7 Basis der Lamellen und interlamelläre Region des Filaments mit Ammocoeten MR-Zellen (MR) und Schaltzellen (Pfeil) in der oberflächlichen Schicht des Kiemenepithels. A 10% Meerwasser x5.100, B destilliertes Wasser x4.300.

Während die Ammocoeten MR-Zellen und die Deckzellen von Ammocoeten, die in destilliertem Wasser gehalten waren, ultrastrukturell nicht von denen der Kontrolltiere in 10% Meerwasser unterschieden werden konnten (Abb. 6), wurden Unterschiede bei Schaltzellen bereits bei qualitativer Betrachtung der Schnitte beobachtet (Abb. 7). So wurden Schaltzellen in den Kiemen der Tiere, die in destilliertem Wasser gehalten waren, häufiger als in denen der Kontrollgruppe in 10% Meerwasser angetroffen. Weiterhin war ihre apikale Oberfläche durch zahlreiche lange, schlanke Mikroplicae vergrößert, während die Zahl der membranösen Tubuli und Vesikel im Zytoplasma kleiner war (Abb. 7).

3.2 Stereologische Untersuchungen

3.2.1 Relative Häufigkeit von Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen

Um die relative Häufigkeit der drei Zelltypen an der Oberfläche der Kiemenfilamente und -lamellen, Schaltzellen, Ammocoeten MR- Zellen und Deckzellen, zu bestimmen, wurden in den vier Ammocoeten, die in 10% Meerwasser gehalten waren (Kontrollgruppe), jeweils 298 bis 646 Zellen und in jedem der Tiere, die in destilliertem Wasser gehalten waren, zwischen 357 und 751 Zellen untersucht. Insgesamt wurden in den beiden Gruppen 1738 bzw. 1961 Zellen klassifiziert.

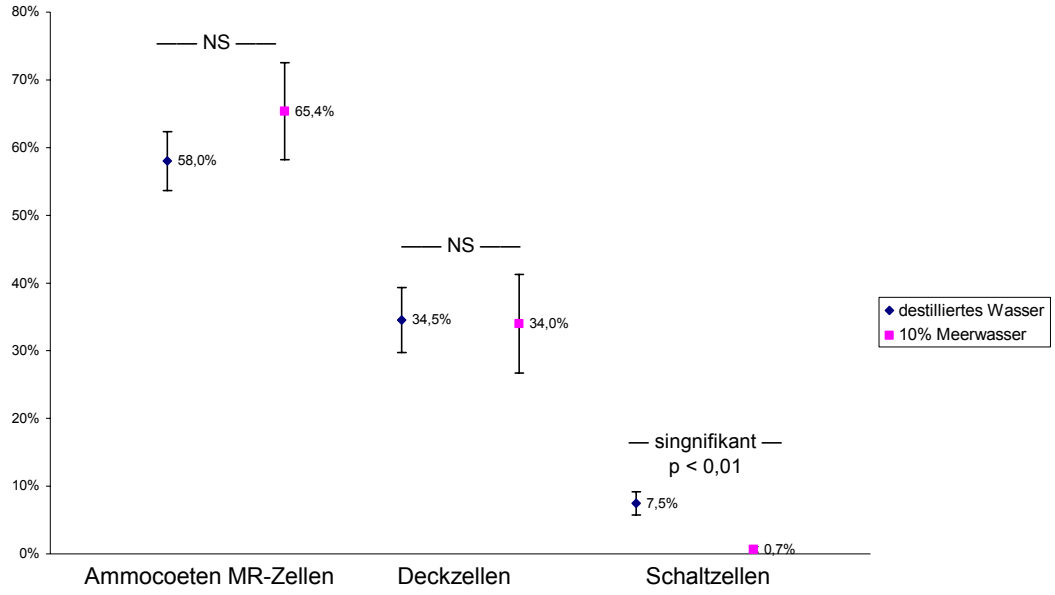


Abb. 8 Relative Häufigkeit von Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen im Kiemenepithel der Ammocoeten von *G. australis* in destilliertem Wasser bzw. 10% Meerwasser.

Unabhängig vom Milieu, in dem sich die Tiere befanden, war die Reihenfolge der prozentualen Anteile der drei Zelltypen in beiden Gruppen die gleiche. Die Ammocoeten MR- Zellen kamen am häufigsten vor, gefolgt von den Deckzellen, während die Schaltzellen am seltensten waren (Abb. 8).

Die Variationsbreiten (ranges) der prozentualen Häufigkeiten der Ammocoeten MR-Zellen überlappten sich in den beiden Gruppen und reichten von 56-75% bzw. 52-61%. Die Mittelwerte betrugen 65,4 ± 3,5% bzw. 58,0 ± 4% und unterschieden sich nicht signifikant ($p>0,05$). Die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der relativen Häufigkeiten, die für die Deckzellen der Ammocoeten in 10% Meerwasser (34,0 ± 3,5%) und in destilliertem Wasser (34,5 ± 5%) bestimmt wurden, waren nahezu identisch und unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant ($p>0,05$). Dagegen überlappten sich die Variationsbreiten der prozentualen Häufigkeiten der Schaltzellen in den beiden Gruppen nicht. Sie betrugen 0-1% in der Gruppe der Tiere, die in 10% Meerwasser gehalten waren und 5-10% in der Gruppe der Tiere in destilliertem Wasser. Die Mittelwerte (± Standardabweichungen) betrugen 0,7 ± 0,4 % bzw. 7,5 ± 2 % und unterschieden sich signifikant ($p<0,01$).

3.2.2 Oberflächendichten der apikalen Zellmembran der verschiedenen Zelltypen

Die Tatsache, dass die Schaltzellen im Kiemenepithel von Ammocoeten, die in Ionenfreiem Medium gehalten werden, relativ häufiger vorkommen als in Tieren in 10% Meerwasser, deutet darauf hin, dass diese Zellen stimuliert sind. Aus verschiedenen Untersuchungen an der Schildkrötenblase und dem Sammelrohr der Niere ist bekannt, dass eine Stimulation der Schaltzellen zur Vergrößerung der apikalen Oberfläche und Ausbildung zahlreicher schlanker Mikrofalten führt (Stetson und Steinmetz 1983, Madsen und Tisher 1984, Stanton 1984).

Der Anteil der apikalen Oberfläche an der gesamten Zelloberfläche stieg bei den Schaltzellen von 18,70 ± 8,10% in der Kontrollgruppe auf 54,10 ± 17,10% in der Gruppe der Tiere, die in destilliertem Wasser gehalten wurden, signifikant an ($p<0,01$). Dieser Parameter zeigte weder für die Ammocoeten MR-Zellen (13,30 ± 2,00% vs. 14,35 ± 1,50%) noch für die Deckzellen (17,16 ± 0,75% vs. 15,00 ± 2,00 %) Unterschiede (Abb. 9).

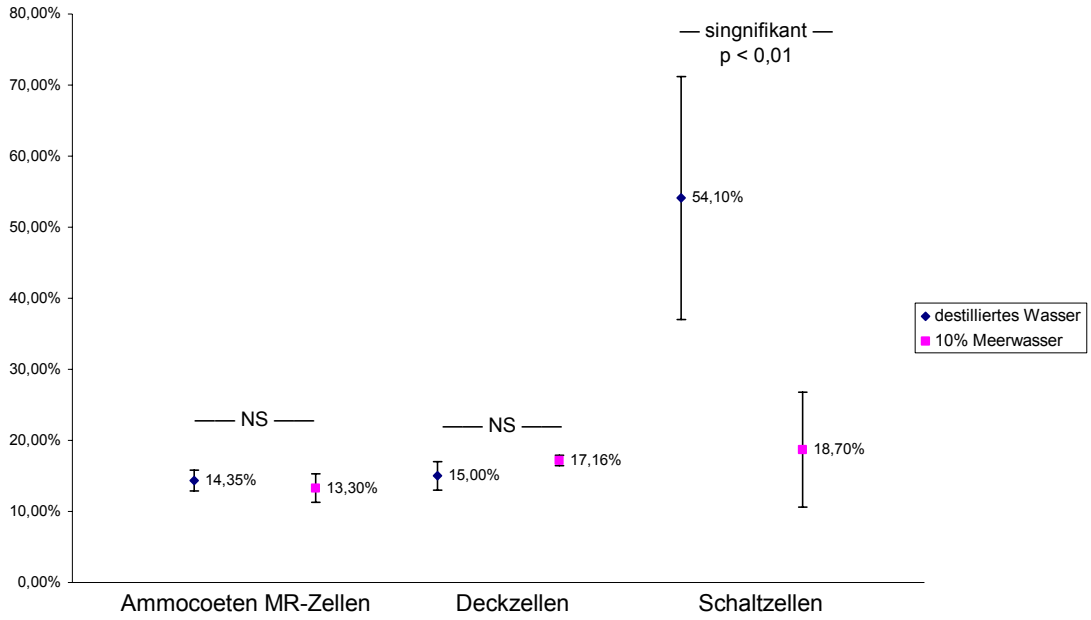


Abb. 9 Anteil der apikalen Oberfläche an der gesamten Zelloberfläche von Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen im Kiemenepithel der Ammocoeten von *G. australis* in destilliertem Wasser bzw. 10% Meerwasser.

Diese Befunde wurden durch die Bestimmung der apikalen Oberflächendichte bestätigt. Diese zeigte eine signifikante Zunahme ($p<0,01$) für die Schaltzellen der Ammocoeten in destilliertem Wasser (0,312 ± 0,030µm²/µm³) gegenüber denen der Kontrollgruppe in 10% Meerwasser (0,119 ± 0,038µm²/µm³). Dagegen unterschieden sich die apikalen Oberflächendichten weder der Ammocoeten MR-Zellen (0,100 ± 0,010µm²/µm³ vs. 0,108 ± 0,006µm²/µm³) noch der Deckzellen (0,099 ± 0,002µm²/µm³ vs. 0,110 ± 0,007µm²/µm³) in den beiden Gruppen signifikant ($p>0,05$) voneinander (Abb. 10).

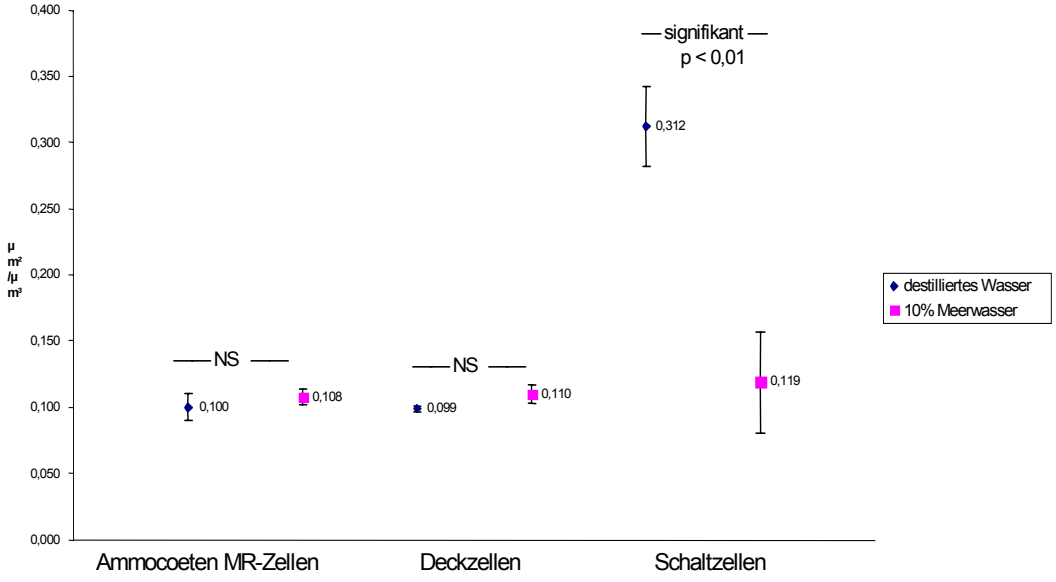


Abb. 10 Apikale Oberflächendichte von Ammocoeten MR-Zellen, Schaltzellen und Deckzellen im Kiemenepithel der Ammocoeten von *G. australis* in destilliertem Wasser bzw. 10% Meerwasser.

Das Verhältnis der Oberflächendichte der apikalen Zellmembran zur Volumendichte der Zellen zeigte ebenfalls zellspezifische Unterschiede. Die S_V-ratio der apikalen Zellmembran der Schaltzellen der Ammocoeten in destilliertem Wasser war mit 0,872 ± 0,138µm^2/µm^3 signifikant höher als die der Kontrollgruppe (0,301 ± 0,070µm^2/µm^3), während die beiden anderen Zelltypen keine von der Zusammensetzung des Wassers abhängigen Unterschiede zeigten (Tab. 1).

	destilliertes Wasser	**10% Meerwasser**
Ammocoeten MR-Zellen	0,231 ± 0,010µm²/µm³	0,215 ± 0,030µm²/µm³
	— NS —	
Deckzellen	0,242 ± 0,030µm²/µm³	0,267 ± 0,007µm²/µm³
	— NS —	
Schaltzellen	0,872 ± 0,138µm²/µm³	0,301 ± 0,070µm²/µm³
	— signifikant — p<0,01	

Tab. 1 SV Ratio der apikalen Zellmembran in Ammocoeten MR-Zellen, Deckzellen und Schaltzellen

3.2.3 Bestimmung der subzellulären Kompartimente

Obwohl die Exposition der Ammocoeten in einem Ionen-freien Milieu weder zu einer Zunahme der relativen Häufigkeit der Ammocoeten MR-Zellen und der Deckzellen noch zu einer morphometrisch fassbaren Vergrößerung der apikalen Zellmembran bei einer dieser Zellen geführt hat, wurden in diesen beiden Zelltypen der prozentuale Volumenanteil der Mitochondrien an der Zelle (Volumendichte) und das Oberflächen/Volumen-Verhältnis der Mitochondrien bestimmt, um einen erhöhten Energieverbrauch in diesen Zellen auszuschließen. Der prozentuale Volumenanteil der Mitochondrien unterschied sich nicht signifikant (p>0,05) in beiden Gruppen und betrug für die Ammocoeten MR-Zellen in 10% Meerwasser 36,2 ± 4,1 % und jene in destilliertem Wasser 30,65 ± 5,35%. Auch für die Mitochondrien-armen Deckzellen wurden keine Unterschiede (p>0,05) im prozentualen Volumenanteil der Mitochondrien ermittelt. Die Werte betrugen 4,3 ± 0,76 % bzw. 3,13 ± 0,79 %. In den Ammocoeten MR-Zellen wurden außerdem die Volumendichten des Kerns und des Mitochondrien-freien Zytoplasmas, in den Deckzellen zusätzlich zu diesen Parametern die Volumendichten der schleimhaltigen Sekretgranula bestimmt. In keinem der unter-

suchten Parameter wurden Unterschiede (p>0,05) zwischen den beiden Gruppen ermittelt.

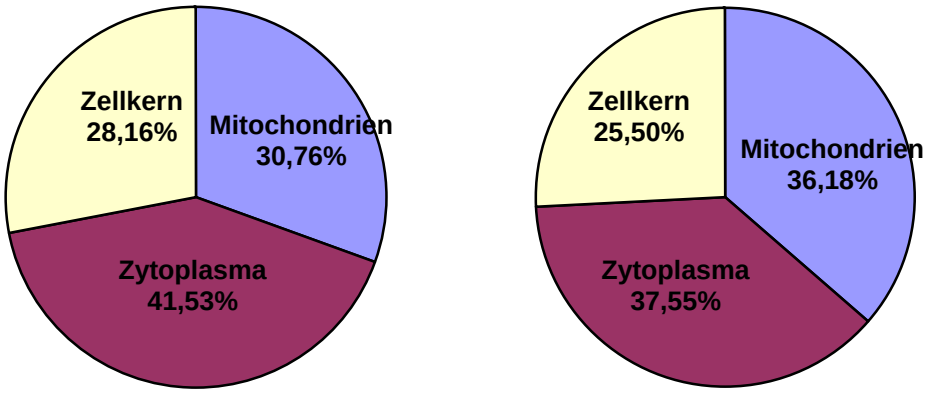


Abb. 11 Volumendichten von Zellkern, Mitochondrien und mitochondrienfreiem Zytoplasma in Ammocoeten MR-Zellen in (A) destilliertem Wasser und (B) 10% Meerwasser.

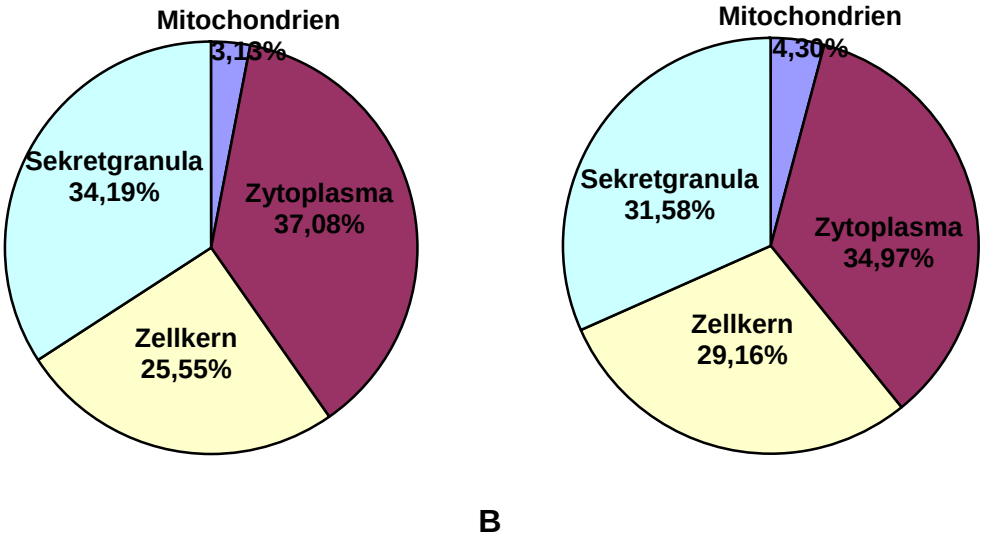


Abb. 12 Volumendichten von Zellkern, Mitochondrien, Sekretgranula und Restzytoplasma in Deckzellen in (A) destilliertem Wasser und (B) 10% Meerwasser.

Auch für die Oberflächen/Volumen-Verhältnisse der Mitochondrien fanden sich keine Unterschiede in Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen zwischen den beiden Gruppen (Tab. 2).

Das gleiche gilt für das mittlere Mitochondrienvolumen der Ammocoeten MR-Zellen, das sich für Ammocoeten in destilliertem Wasser mit 0,474 μm^3 nicht von dem für Tiere in 10% Meerwasser (0,519 μm^3) unterschied (p>0,05).

	destilliertes Wasser		10% Meerwasser
Ammocoeten MR-Zellen	11,50±0,78 µm²/µm³	— NS —	11,25±1,30 µm²/µm³
Deckzellen	9,44±0,66 µm²/µm³	— NS —	9,28±1,08 µm²/µm³

Tab. 2 Oberflächen/Volumenverhältnis der Mitochondrien in Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen

4 Diskussion

Der Reichtum an Mitochondrien in den Ammocoeten MR-Zellen im Kiemenepithel von Neunaugenlarven veranlasste eine Reihe von Autoren zu diskutieren, dass diese Zellen für die Aufnahme von Na^+ und Cl^- im Süßwasser zuständig sein könnten (Morris und Pickering 1975, Youson und Freeman 1976, Mallatt und Ridgway 1984). Diese Sichtweise kam nicht zuletzt in der Wahl des Begriffs „ion-uptake cell“ durch Morris und Pickering (1975) und Mallatt und Ridgway (1984) zum Ausdruck. Sie wurde bestärkt durch den histochemischen Nachweis des Enzyms Carboanhydrase in diesen Zellen, das H^+ und HCO_3^- für den Austausch von Na^+ bzw. Cl^- bereitstellt (Conley und Mallatt 1988). In Frage gestellt wurde diese Hypothese von Bartels et al. (1998) mit der Begründung, dass die Zellen im Kiemenepithel von adulten Neunaugen während der Laichwanderung nicht vorhanden sind, obwohl die Tiere mit den gleichen osmotischen Problemen konfrontiert sind wie Ammocoeten. Diese Autoren argumentieren, dass, wenn die osmoregulatorischen Mechanismen und die daran beteiligten Zellen bei Ammocoeten und adulten Neunaugen im Süßwasser identisch sind, nur die Schaltzellen und / oder die Deckzellen, nicht aber die Ammocoeten MR-Zellen für die Ionenaufnahme in Frage kommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem experimentellen Ansatz die These, dass die Ammocoeten MR-Zellen für die Aufnahme von Ionen aus dem Süßwasser verantwortlich sind, zu überprüfen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die für die Ionenaufnahme zuständigen Zellen umso mehr stimuliert werden, je größer der Ionen- bzw. osmotische Gradient zwischen internem und externem Milieu ist. Es wurde weiter davon ausgegangen, dass die Stimulation zu einer Zunahme sowohl der relativen Häufigkeit dieser Zellen in einem heterozellulären Epithel als auch ihres Energieverbrauchs führt, was sich in einer Zunahme der Mitochondrienzahl bzw. ihres Volumens am Zellvolumen äußert.

Zu diesem Zweck wurden Ammocoeten über 14 Tage in destilliertem Wasser gehalten, um die Ionenaufnahmemechanismen maximal zu stimulieren, während Tiere, die über den gleichen Zeitraum in 10% Meerwasser in der Annahme gehalten wurden, dass der relativ geringe osmotische Gradient von ca. 100 mosmol kg H_2O^{-1} (Faktor 2 zwischen innerem und äußerem Milieu) zu einer weitgehenden Inaktivierung bzw. Downregulation der Ionenaufnahmemechanismen führt, als Referenzgruppe dienten. Das Kiemenepithel der Tiere beider Gruppen wurde mit ultrastrukturellen stereologischen Methoden untersucht.

4.1 Ammocoeten MR-Zellen

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ammocoeten MR-Zellen sich in der relativen Häufigkeit und der Volumendichte, dem Oberflächen-Volumenverhältnis und der Größe der Mitochondrien sich in der Gruppe der Tiere, die in destilliertem Wasser gehalten wurde, nicht von denen der Kontrollgruppe in 10% Meerwasser unterschieden. Auch wurden in der Oberflächendichte der apikalen Membran der Ammocoeten MR-Zellen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine Stimulation der Ionenaufname in Ammocoeten nicht zu einer relativen Zunahme der Ammocoeten MR-Zellen im Kiemenepithel führt und dass der Energieverbrauch in diesen Zellen nicht signifikant zunimmt, wenn die Tiere einem stärkeren osmotischen Stress ausgesetzt sind. Auf Grund dieser Befunde ist die von Morris und Pickering (1975), Youson und Freeman (1976) und Mallatt und Ridgway (1984) diskutierte These, dass die Ammocoeten MR-Zellen für die Aufnahme von Na^+ bzw. Cl^- aus dem Süßwasser zuständig sind, nicht aufrecht zu halten. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Zellen, die, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, unabhängig von der Osmolalität des externen Milieus ca. 60% der Zellen der oberflächlichen Schicht im Kiemenepithel von Ammocoeten ausmachen, zusätzliche oder andere Aufgaben als die der Ionenaufnahme haben.

Die Ammocoeten MR-Zellen haben offensichtlich kein morphologisches Äquivalent in anderen Ionen - transportierenden Epithelien innerhalb der Wirbeltiere (Bartels und Potter 2004), so dass über ihre Funktion nur spekuliert werden kann. Da anadrome Neunaugen im Süßwasser nur während des Larvenstadiums, nicht aber während der Laichwanderung fressen, ist es denkbar, dass die Ammocoeten MR-Zellen für die Ausscheidung von Ionen und / oder Stoffwechselendprodukten ihrer speziellen Nahrung zuständig sind (Bartels et al. 1998), die überwiegend aus Algen und Detritus besteht (Moore und Mallatt 1980). Die Ionenaufnahme über das Kiemenepithel ist gerade während der Laichwanderung von besonderer Bedeutung, da die Neunaugen in dieser Phase des Lebenszyklus die Nahrungsaufnahme einstellen, der Darm degeneriert (Youson 1981) und damit die Möglichkeit, Ionen mit der Nahrung aufzunehmen, fehlt.

4.2 Schaltzellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen andererseits, dass die Schaltzellen relativ an Häufigkeit zunehmen, wenn Ammocoeten über einen Zeitraum von 14 Tagen in einem Ionen - freien Medium gehalten werden und die Ionenaufnahme über das Kiemenepithel wahrscheinlich maximal stimuliert ist, um den renalen und durch den osmotischen Gradienten bedingten passiven Ionenverlust über das Integumen zu kompensieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Zunahme am ehesten auf Kosten der Ammocoeten MR-Zellen geht, wenn auch eine signifikante Abnahme der relativen Häufigkeit der letzteren nicht nachweisbar war.

Die relative Zunahme der Schaltzellen von ca.1% in 10% Meerwasser auf ca. 7% in destilliertem Wasser ist ein deutliches Zeichen dafür, dass diese Zellen eine entscheidende Rolle bei der Osmoregulation von Neunaugen im Süßwasser spielen. Sie haben die gleichen ultrastrukturellen Eigenschaften wie die gleichnamigen Zellen (intercalated mitochondria-rich cells) in der Epidermis der Amphibien, im Epithel der Harnblase von Schildkröten und Amphibien und im Sammelrohr der Niere der Wirbeltiere (Brown und Breton 1996). Histochemische Untersuchungen an Schaltzellen in diesen Epithelien haben ergeben, dass diese Zellen reich an Carboanhydrase (CAII) sind (Brown und Breton 1996). Ein hervorstechendes gemeinsames morphologisches Merkmal der Schaltzellen ist die Anwesenheit von stäbchenförmigen Partikeln in der Zellmembran und in den Membranen zytoplasmatischer Vesikel, wenn diese mit der Gefrierbruchtechnik untersucht werden (Brown und Breton 1996, Bartels et al. 1998). Außerdem enthalten sie in ihrer Zellmembran und den Membranen der zytoplasmatischen Vesikel den vakuolären Subtyp einer Protonenpumpe (H^+ V-ATP-ase) (Brown und Breton 1996, 2000). Es wird heute allgemein davon ausgegangen, dass die stäbchenförmigen Partikel entweder die transmembranen Domänen der Protonenpumpe darstellen oder zumindest eng mit ihnen assoziiert sind (Stetson und Steinmetz 1986, Brown et al. 1987, Kohn et al. 1997). So korreliert z.B. der H^+ Transport in der Schildkrötenblase mit der Dichte der stäbchenförmigen Partikel in der apikalen Membran der Schaltzellen (Stetson und Steinmetz 1986). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass in allen Membranen, in denen stäbchenförmige Partikel gefunden wurden, auch H^+ V-ATP-ase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, bestätigt (Brown und Breton 1996).

Die in Gefrierbruchabdrücken sichtbaren stäbchenförmigen Partikel stellen entweder die transmembranen Domänen der Protonenpumpe dar oder sind zumindest eng mit

ihnen assoziiert (Stetson und Steinmetz 1986, Brown et al. 1987, Kohn et al. 1997). So korreliert z.B. der H^+ Transport in der Schildkrötenblase mit der Dichte der stäbchenförmigen Partikel in der apikalen Membran der Schaltzellen (Stetson und Steinmetz 1986). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass in allen Membranen, in denen stäbchenförmige Partikel gefunden wurden, auch H^+ V-ATP-ase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, bestätigt (Brown und Breton 1996).

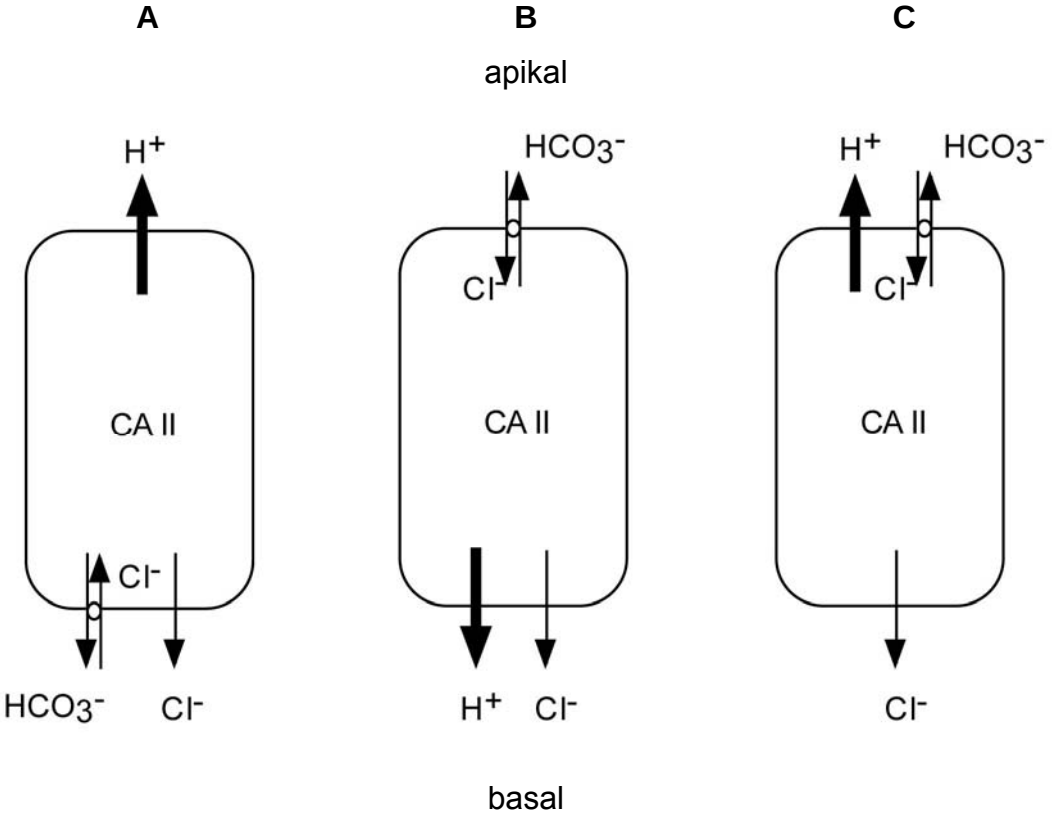


Abb. 13 Schematische Darstellung der 3 Schaltzell-Subtypen (A,B,C). Die dicken Pfeile bezeichnen aktive, die dünnen passive Transportprozesse. CA II, Carboanhydrase II.

Zwei Subtypen von Schaltzellen (A und B) wurden ursprünglich auf Grund der verschiedenen Lokalisationen der H^+ V-ATP-ase, der stäbchenförmigen Partikel und eines HCO_3^-/Cl^--Austauschers im Sammelrohr der Säugerniere und der Harnblase von Schildkröten unterschieden (Stetson und Steinmetz 1985, Brown et al. 1988, Brown und Breton 1996). Im Subtyp A sind die H^+ V-ATP-ase und die stäbchenförmigen Partikel in der apikalen Zellmembran und den Membranen der zytoplasmatischen Vesikel lokalisiert, während der Anionenaustauscher in der basolateralen Membran vorkommt (Abb 13A). Dieser Anionenaustauscher wurde als eine renale Splicevariante des Bande 3-Proteins AE 1 identifiziert. Der Subtyp A der Schaltzelle ist für die elektrogene H^+ Sekretion verantwortlich. Der Subtyp B der Schaltzelle be-

sitzt in der apikalen Membran einen Bikarbonataustauscher, der nicht mit Antiseren gegen AE 1 reagiert und inzwischen im Sammelrohr der Niere als Pendrin identifiziert wurde (Royaux et al. 2001) (Abb. 13B). Dieser Subtyp ist in renalen und harnableitenden Epithelien für die HCO_3^- Sekretion verantwortlich. Obwohl der Subtyp B vom Subtyp A zunächst durch das Vorkommen der H^+ V-ATP-ase und der stäbchenförmigen Partikel in der basolateralen Membran unterschieden wurde, haben immunzytochemische Untersuchungen inzwischen gezeigt, dass die H^+ V-ATP-ase in AE 1-negativen Zellen in verschiedenen Lokalisationen, d. h. auch in der apikalen Membran vorkommen kann (Brown und Breton 1996). Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Identifikation eines dritten Subtyps der Schaltzellen in der Epidermis von Amphibien, der durch die Anwesenheit der H^+ V-ATP-ase und eines Anionenaustauschers in der apikalen Membran und eines Chloridkanals in der basolateralen Membran charakterisiert ist. Dieser Subtyp C wird für die Cl^- Aufnahme aus hypotonem Medium, z.B. Süßwasser, verantwortlich gemacht (Larsen et al. 1992).

Die ultrastrukturellen und funktionellen Eigenschaften der Schaltzellen sind in verschiedenen transportierenden Epithelien in verschiedenen Wirbeltiergruppen wie Amphibien, Reptitlien und Säugern konserviert (Brown und Breton 1996). Darüber hinaus sind Zellen mit den gleichen morphologischen Charakteristika auch in der Niere von Teleosteern nachgewiesen (Hentschel und Elger 1987). Da die Schaltzellen im Kiemenepithel der Neunaugen die gleichen ultrastrukturellen Merkmale wie die Vertreter dieses Zelltyps in anderen Spezies aufweisen, haben sie vermutlich die gleiche Funktion. Frühere Untersuchungen mit der Gefrierbruchtechnik des Kiemenepithels von Ammocoeten, aber auch adulter Neunaugen, im Süßwasser haben gezeigt, dass bei der überwiegenden Mehrzahl der Schaltzellen die stäbchenförmigen Partikel in der apikalen Membran lokalisiert sind (Bartels et al. 1998) und diese Zellen damit dem Subtyp A oder C angehört. Allein auf Grund der Lokalisation der H^+ V-ATP-ase und der stäbchenförmigen Partikel in der apikalen Membran können diese beiden Subtypen nicht voneinander unterschieden werden. Es wird davon ausgegangen, dass beide Subtypen im Kiemenepithel der Neunaugen im Süßwasser nebeneinander vorkommen. Bartels und Potter (2004) schlugen vor, dass der Subtyp A für die H^+-Sekretion und der Subtyp C für die Cl^--Aufnahme zuständig ist. Dabei würde die parallele Anordnung der H^+ V-ATP-ase und eines Anionenaustauschers in der apikalen Membran der Schaltzellen, wie es für den Subtyp C diskutiert wird, die Voraussetzung dafür schaffen, dass die aktiv sezernierten H^+ Ionen das Bi-

karbonat unmittelbar nach Verlassen der Zelle binden und damit den Bikarbonatgradienten als treibende Kraft für die Cl^{-}Aufnahme über die Membran vergrößern bzw. aufrecht erhalten. Der durch in der Nähe gelegene Schaltzellen vom Subtyp A verursachte niedrige pH könnte diesen Effekt weiter verstärken und dazu beitragen, den für die passive Aufnahme ungünstigen Cl^{-}- Gradienten mit 10 - 20 fach höheren intrazellulären als extrazellulären Cl^{-}- Konzentrationen zu überwinden (Bartels und Potter 2004). Die Ausstattung der apikalen Membran mit einer H^{+} V-ATP-ase und einem Anionenaustauscher machen den Subtyp C sehr viel wirkungsvoller für die Cl^{-} Aufnahme aus Süßwasser als die des Subtyps B, die nur den Anionenaustauscher und keine H^{+} V-ATP-ase enthält. Der Subtyp B der Schaltzelle wäre demzufolge in erster Linie für die HCO_3^{-} Sekretion unter alkalotischen Bedingungen zuständig (Bartels und Potter 2004), z. B. im Sammelrohr der Niere oder in der Harnblase von Kröten und Schildkröten, wo diese Zellen zahlreich vorkommen (Alper et al. 1989).

Die Interpretation, dass die Subtypen A und C der Schaltzellen über die Aktivität der H^{+} V-ATP-ase die treibende Kraft der Na^{+} und Cl^{-} Resorption darstellen, wird durch die stereologischen Untersuchungen zur Oberfläche der Schaltzellen unterstützt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante, ca. dreifache Zunahme der apikalen Zelloberfläche, der apikalen Oberflächendichte und im Verhältnis der Oberflächendichte der apikalen Zellmembran zur Volumendichte der Zellen. Untersuchungen am Epithel der Schildkrötenblase haben zuerst gezeigt, dass das Ausmaß der Vergrößerung der apikalen Oberfläche in einem inversen Verhältnis der Zahl der membranösen Vesikel und Tubuli im Zytoplasma der Schaltzelle steht (Stetson und Steinmetz 1983). Im stimulierten Zustand, z.B. unter azidotischen Bedingungen, werden die Vesikel und Tubuli, deren Membranen die H^{+} V-ATP-ase und stäbchenförmigen Partikel enthalten, durch Exozytose in die apikale Membran eingebaut und nach Ende des Reizes durch Endozytose wieder entfernt (Brown 1989, Brown und Breton 1996). Die ca. dreifache Zunahme der Oberflächendichte der apikalen Schaltzellmembran in den Ammocoeten, die in destilliertem Wasser gehalten waren, gegenüber Tieren, die in 10% Meerwasser gehalten wurden, muss als Stimulation der Schaltzellen und damit als morphologisches Indiz für einen erhöhten Protonentransport interpretiert werden. Diese H^{+} Sekretion stellt, wie oben dargestellt, die treibende Kraft für die Cl^{-} Aufnahme durch den Subtyp C der Schaltzellen dar und begünstigt auch die Na^{+} Aufnahme, die in Epithelien, die Ionen aus stark verdünnten

Medien wie Süßwasser aufnehmen, charakteristischerweise durch einen epithelialen Na^+ Kanal erfolgt (Ehrenfeld und Klein 1997).

4.3 Deckzellen

Da Schaltzellen und Deckzellen als einzige Zellen an der Oberfläche des Kiemenepithels sowohl bei Ammocoeten als auch bei adulten Neunaugen vorkommen wenn die Tiere sich im Süßwasser befinden, kommen nur diese beiden Zelltypen für die Na^+ Aufnahme in Betracht, wenn man davon ausgeht, dass die Mechanismen der Na^+ Aufnahme bei Larven und adulten Neunaugen identisch sind.(Bartels 1989, Bartels et al. 1998, Bartels und Potter 2004). Die Anordnung und die Ultrastruktur der Schaltzellen und Deckzellen im Kiemenepithel von flussaufwärts ziehenden adulten Neunaugen ähneln weitest gehend derjenigen der Schaltzellen und granulierten Zellen in der Epidermis und Harnblase von Amphibien (Bartels 1989, Bartels et al. 1998, Bartels und Potter 2004). Auf Grund dieser morphologischen Übereinstimmung hat Bartels (1989, s. auch Bartels und Potter 2004) diskutiert, dass - in Analogie zur Situation in der Harnblase und Haut der Amphibien - in den Kiemen der Neunaugen die Schaltzellen (Subtyp und A und C) die Na^+ Aufnahme durch aktive H^+ Sekretion erleichtern und dass die Na^+ Resorption wahrscheinlich durch die Deckzelle erfolgt. Mit Ausnahme von Epithelien, die als „very tight“ gelten und einen sehr hohen transepithelialen Widerstand aufweisen, erfordert eine solche indirekte Kopplung von H^+ Sekretion und Na^+ Resorption eine sehr enge räumliche Beziehung zwischen den beteiligten Zelltypen. Dieses ist während der beiden Phasen des Lebenszyklus der Fall, den adulte Neunaugen im Süßwasser verbringen, d. h. unmittelbar nach der Metamorphose während der Flussabwärtswanderung ins offene Meer und während der flussaufwärts gerichteten Laichwanderung im Anschluss an die marine parasitische Phase. In beiden Fällen sind die einzeln liegenden Schaltzellen komplett von Deckzellen umgeben oder zumindest direkt benachbart. In Ammocoeten sind die Deckzellen jedoch durch große Gruppen von Ammocoeten MR-Zellen von den Schaltzellen getrennt. Der Abstand zwischen den Schaltzellen und den Deckzellen ist wahrscheinlich zu groß, damit es eine Wirkung auf das durch die H^+ Sekretion der Schaltzellen hervorgerufene elektrische Potential auf die Deckzellen ausübt. Obwohl der elektrische Widerstand des Kiemenepithels von Ammocoeten bisher nicht bestimmt wurde, zeigen die Zonulae occludentes keines der Strukturmerkmale, die diese Verbindungen in sehr dichten Epithelien charakterisie-

ren, z.B. eine große Anzahl übereinander liegender Fibrillen („strands“), die einen hohen Vernetzungsgrad aufweisen und eher aus soliden Fibrillen als auch Reihen einzelner Partikel bestehen (s. Abb.3A in Bartels et al. 1998, Claude und Goodenough 1973, Cerejido et al. 1979).

Bartels und Potter (2004) haben zwei Alternativen für die Na^+ Resorption durch das Kiemenepithel in Ammocoeten diskutiert. Das eine Modell geht davon aus, dass das Kiemenepihel der Ammocoeten nicht „very tight“ ist und dass die Ammocoeten MR Zellen nicht an der Na^+ Resorption beteiligt sind, eine Annahme, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen. Diese Hypothese geht weiter davon aus, dass die Na^+ Aufnahme an die H^+ Sekretion gekoppelt ist. Unter diesen Bedingungen kann nur die Schaltzelle für die Na^+ Resorption zuständig sein.

Das alternative Modell setzt voraus, dass die Na^+ Aufnahme durch die Deckzellen erfolgt und dass die Aufnahme energetisch allein auf der Aktivität der Na^+/K^+ATPase in der basolateralen Membran dieser Zellen beruht und nicht durch die H^+ Sekretion der Schaltzellen gekoppelt ist. Unter diesen Umständen wäre ein erhöhter Energiebedarf der Deckzellen in den Ammocoeten, die in destilliertem Wasser gehalten wurden, gegenüber Deckzellen der Ammocoeten in 10% Meerwasser zu erwarten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass die Deckzellen weder in ihrer Häufigkeit noch der Volumendichte und dem Oberflächen-Volumenverhältnis der Mitochondrien durch das experimentelle Regime beeinflusst wurden. Diese Befunde liefern keine weiteren Argumente zu Gunsten der zweiten Hypothese und lassen diese wenig wahrscheinlich erscheinen, so dass die Funktion dieses auch als „mitochondria-poor cell“ bezeichneten Zelltyps (Youson und Freeman 1976) primär im Gasaustausch und nicht in der Ionen- und Osmoregulation liegen könnte.

Die Befunde dieser Arbeit stehen dagegen nicht in Widerspruch mit der ersten der oben referierten Hypothesen, die besagt, dass die Na^+ Resorption in Ammocoeten durch Schaltzellen erfolgt. Dieses Modell steht im Einklang mit Befunden an der Froschhaut, die so interpretiert wurden, dass die Na^+ Aufnahme, die in einer Ussing-Kammer unter „natürlichen Bedingungen“, d. h. niedrige externe Na^+ Konzentration und unter „open circuit“ Bedingungen, gemessen wurde, durch die Schaltzellen erfolgt, während nur unter so genannten Ussing-Bedingungen, d. h. gleiche Na^+ Konzentrationen auf beiden Seiten des Epithels und damit eine unphysiologisch hohe externe Na^+ Konzentration sowie ein kurzgeschlossenes Epithel, der überwiegende

Teil des Na^+ Flusses durch die granulierten Zellen, d. h. die den Deckzellen analogen Zellen, erfolgt (Ehrenfeld et al. 1989, Ehrenfeld und Klein 1997). Es muss allerdings eingeräumt werden, dass Nagel und Dörge (1996) aus ihren Untersuchungen schlossen, dass auch unter „natürlichen Bedingungen“ die Na^+ Aufnahme durch Schaltzellen vernachlässigbar sei und fast ausschließlich durch die granulierten Zellen erfolge.

4.4 Fazit und Ausblick

Das Modell, das mit den Ergebnissen der vorliegenden quantitativ ultrastrukturellen Arbeit am ehesten in Einklang zu bringen ist, geht davon aus, dass die Schaltzellen sowohl für die Na^+ als auch die Cl^- Aufnahme durch das Kiemenepithel verantwortlich sind, dass diese Zellen in zwei Subtypen (A und C) existieren, von denen die eine, der Subtyp C mittels eines apikalen HCO_3^-/Cl^- Austauschers für die Cl^- Resorption zuständig und dass diese wie die Na^+ Resorption durch die Aktivität der H^+ V-ATPase, die in beiden Subtypen in der apikalen Membran lokalisiert ist, begünstigt wird. Immunhistochemische Untersuchungen sind nötig, um den epithelialen Na^+ Kanal in einem der beiden Subtypen nachzuweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben weiter keinen Hinweis darauf, dass weder die Ammocoeten MR-Zellen noch die Deckzellen für die Ionenaufnahme durch das Kiemenepithel von Ammocoeten in signifikantem Ausmaß verantwortlich sind.

Es bleibt abschließend die Frage, ob die Mechanismen der Ionenaufnahme im Süßwasser bei Ammocoeten und adulten Neunaugen bzw. die beteiligten Zellen identisch sind. Um eine Beteiligung der Deckzellen für die Na+ Aufnahme bei adulten Neunaugen auszuschließen, sind vergleichbare Experimente, wie sie für diese Untersuchung durchgeführt wurden, notwendig.

5 Zusammenfassung

Die Kiemen der Fische sind zugleich Atmungsorgan und, neben der Niere, das zentrale Organ der Ionen- und Osmoregulation, wobei monovalente Ionen im Süßwasser über das Kiemenepithel aufgenommen und im Meerwasser ausgeschieden werden. Die Oberfläche der Kiemenfilamente und -lamellen der obligat im Süßwasser lebenden Neunaugenlarven (Ammocoeten) wird von Schaltzellen, Ammocoeten Mitochondrienreichen (MR-) Zellen und Deckzellen gebildet. Eine Gruppe von Ammocoeten (n=4) wurde für 14 Tage in destilliertem Wasser mit dem Ziel gehalten, die Ionenaufnahme maximal zu stimulieren, während eine Kontrollgruppe (n=4) über denselben Zeitraum in 10% Meerwasser gehalten wurde, d. h. unter Bedingungen, unter denen die Ionenaufnahme eher gering ist. Die Kiemen der Ammocoeten jeder Gruppe wurden für die Dünnschnittelektronenmikroskopie eingebettet und die Schnitte mit stereologischen Methoden mit dem Ziel untersucht, den oder die Zelltypen, die an der Ionenaufnahme aus dem hypotonen Milieu beteiligt sind, zu identifizieren.

Die Ammocoeten MR-Zellen und Deckzellen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer relativen Häufigkeit in beiden Gruppen, während die Schaltzellen weniger als 1% der Zellen an der Epitheloberfläche in 10% Meerwasser, aber 7 % dieser Zellen in destilliertem Wasser ausmachten. Die apikale Oberflächendichte der Schaltzellen war in destilliertem Wasser ca. dreimal so groß wie in 10% Meerwasser, während weder die Ammocoeten MR-Zellen noch die Deckzellen Unterschiede in diesem Parameter zwischen den Gruppen aufwiesen. Ähnlich verhielten sich die S_V-ratio (Verhältnis der Oberflächendichte der apikalen Zellmembran zur Volumendichte der Zellen) und der Anteil der apikalen Oberfläche an der gesamten Zelloberfläche. Unterschiede fanden sich ferner weder in der Volumendichte der Mitochondrien (Anteil der Mitochondrien am Zellvolumen) noch dem Oberflächen / Volumen-Verhältnis der Mitochondrien in AMR Zellen und Deckzellen der beiden Gruppen als Hinweis auf einen gesteigerten Energiebedarf dieser Zellen in destilliertem Wasser.

Die Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine Beteiligung von Ammocoeten MR-Zellen oder Deckzellen an der Ionenaufnahme aus dem hypotonem Milieu. Sie deuten vielmehr daraufhin, dass die Schaltzelle für diese Funktion zuständig ist. Diese Zelle liegt vermutlich in zwei Subtypen vor, von denen der Typ A für die Na^+ Resorption und der Typ C für die Cl^- Aufnahme zuständig sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

Alper, S. L.; Natale, J.; Gluck, S.; Lodish, H. F. und Brown, D. (1989): Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H+-ATPase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **86**, 14, 5429-5433.

Bahr, K. (1952): Beiträge zur Biologie des Flußneunauges Petromyzon fluviatilis L. (Lebensdraum und Ernährung). Zool.Jb **81**, 408-436.

Bartels, H. (1989): Freeze-fracture study of the pavement cell in the lamprey gill epithelium. Analogy of membrane structure with the granular cell in the amphibian urinary bladder. Biol.Cell **66**, 1-2, 165-171.

Bartels, H. und Potter, I. C. (2004): Cellular composition and ultrastructure of the gill epithelium of larval and adult lampreys: implications for osmoregulation in fresh and seawater. J.Exp.Biol. **207**, Pt 20, 3447-3462.

Bartels, H.; Potter, I. C.; Pirlich, K. und Mallatt, J. (1998): Categorization of the mitochondria-rich cells in the gill epithelium of the freshwater phases in the life cycle of lampreys. Cell Tissue Res. **291**, 2, 337-349.

Beamish, F.-W. H. (1980): Osmoregulation in juvenile and adult lampreys. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **37**, 1739-1750.

Braedgaard, H. und Grundersen, H. J. (1986): The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. J Neurosci Methods **18**, 39-78.

Brown, D. (1989): Membrane recycling and epithelial cell function. Am J Physiol **256**, F1-F12.

Brown, D. und Breton, S. (1996): Mitochondria-rich, proton-secreting epithelial cells. J Exp Biol **199**, 2345-2358.

Brown, D. und Breton, S. (2000): H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. J.Exp.Biol. **203**, Pt 1, 137-145.

Brown, D.; Gluck, S. und Hartwig, J. (1987): Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H+ATPase. J.Cell Biol. **105**, 4, 1637-1648.

Brown, D.; Hirsch, S. und Gluck, S. (1988): An H+-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations of kidney epithelial cells. Nature **331**, 6157, 622-624.

Cerejido, M.; Conzales-Mariscal, L. und Contreas, G. (1979): Tight junction: barrier between higher organisms and environment. NIPS **4**, 72-75.

Claude, P. und Goodenough, D. A. (1973): Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. J.Cell Biol. **58**, 390-400.

Conley, D. M. und Mallatt, J. (1988): Histochemical localization of Na^+-K^+-ATPase and carbonic anhydrase activity in gills of 17 fish species. Can J Zool **66**, 2398-2405.

Delarbre, C.; Gallut, C.; Barriel, V.; Janvier, P. und Gachelin, G. (2002): Complete mitochondrial DNA of the hagfish, Eptatretus burgeri: the comparative analysis of mitochondrial DNA sequences strongly supports the cyclostome monophyly. Mol.Phylogenet.Evol. **22**, 2, 184-192.

Delesse, A. (1847): Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. C.R.Acad.Sci., 25: 544-545.

Durham, J. H. und Nagel, W. (1986): Evidence for separate cellular origins of sodium and acid-base transport in the turtle bladder. Am J Physiol **250**, 606-619.

Ehrenfeld, J. und Klein, U. (1997): The key role of the H+ V-ATPase in acid-base balance and Na+ transport processes in frog skin. J.Exp.Biol. **200 (Pt 2)**, 247-256.

Ehrenfeld, J.; Lacoste, I. und Harvey, B. J. (1989): The key role of the mitochondria-rich cell in Na^+ and H^+ transport across the frog skin epithelium. Pfluegers Archiv European Journal of Physiology **414**, 1, 59-67.

Ernst, S. A.; Dodson, W. B. und Karnaky, K. J. Jr. (1980): Structural diversity of occluding junctions in the low-resistance cloride-secreting opercular epithelium of seawater-adapted Killifish (Fundulus heteroclitus). J Cell Biol **87**, 488-497.

Forey, P. L. (1984): Yet more reflections an Agnathan - gnathosome relationships. J Vert Palaeontol **4**, 330-343.

Forey, P. L. und Janvier, P. (1993): Agnathans and the origin of jawed vertebrates. Nature **361**, 129-134.

Foskett, J. K. und Machen, T. E. (1985): Vibrating probe analysis of teleost opercular epthelium: correlation between active transport and leak pathways of individual chloride cells. J Membrane Biol **85**, 25-35.

Foskett, J. K. und Scheffey, C. (1982): The cloride cell: definitive indetification as salt-secretory cell in telerosts. Science **215**, 164-166.

Garcia, Romeu F. und Ehrenfeld, J. (1975): Chloride transport through the non-short-circuited isolated skin *Rana-Esculenta*. American Journal of Physiology **228**, 3, 845-849.

Hardisty, M. W. (1982): Lampreys and hagfishes: an analysis of cyclostome relationships, Hardisty, M. W. und Potter, I. C., The biology of lampreys, 165-259, Academic Press, London

Hardisty, M. W. (1979): Biology of cyclostomes, Chapman and Hall, London

Hardisty, M. W. und Potter, I. C. (1971): The biology of Lampreys. VOL 1.

Hardisty, M. W.; Potter, I. C. und Hilliard, R. W. (1989b): Physiological adaptations of the living agnathans. Transactions of the Royal Society of Edinburgh Earth Sciences **80**, 3-4, 241-254.

Hardisty, M. W.; Potter, I. C. und Hilliard, R. W. (1989a): PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS OF THE LIVING AGNATHANS. Transactions of the Royal Society of Edinburgh Earth Sciences **80**, 3-4, 241-254.

Harvey, B. J. und Ehrenfeld, J. (1986): Regulation of intracellular sodium an pH by the electrogenic proton pump in Frog *Rana-Esculenta* skin. Pfluegers Archiv European Journal of Physiology **406**, 4, 362-366.

Harvey, B. J.; Lacoste, I. und Ehrenfeld, J. (1988): Sodium transport in principal cells and mitochondria-rich cells of isolated frog skin epithelium. Faseb Journal **2**, 4, ABSTRACT.

Hentschel, H. und Elger, M. (1987): The distal nephron in the kidney of fishes. Adv.Anat.Embryol.Cell Biol. **108**, 1-151.

Hilliard, R. W.; Potter, I. C. und Macey, D. J. (1985): The dentition and feeding mechanism in adults of the Southern hemisphere lamprey Geotia Australis. Acta Zoologica Stockholm **66**, 3, 159-170.

Hofbauer, M. (1934): Anatomischer und histologischer Bau der Kiemensäcke von Myxine glutinosa. Biologia Gen **12**, 330-348.

Howard, C. V. und Reed, M. G. (1998): Unbiased Stereology, Three-Dimensional Measurement in Microscopy, BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford

Janvier, P. (1981): The phylogeny of Craniata, with particular reference to the significance of fossil "Agnathans". J Vert Palaeontol **1**, 121-159.

Janvier, P. (1999): Catching the first fish. Nature **402**, 11/1999, 21-22.

Karnaky, K. J., Jr. und Kinter, W. B. (1977): Killfish percular skin a flat epithelium with high density of chloride cells. Journal of Experimental Zoology **199**, 3, 355-364.

Karnaky, K. J. Jr. (1986): Structure and Function of the Chloride Cell of *Fundulus heteroclitus* and Other Teleosts. Am Zool **26**, 209-224.

Karnaky, K. J. Jr. (1980): Ion-secreting epithelia: chloride cells in the head region of *Fundulus heteroclitus*. Am.J.Physiol **238**, 185-198.

Karnaky, K. J. Jr.; Ernst, S. A. und Philpott, C. W. (1976): Teleost chloride cell part 1 response of pupfish cyprinodon-variegatus gill sodium potassium atpase and chloride cell fine structure to various high salinity environments. Journal of Cell Biology **70**, 1, 144-156.

Keys, A. B. und Willmer, E. N. (1932): Chloride secreting cells in the gills of fishes with special reference to the common eel. J.Physiol. **(Lond) 76**, 368-378.

Kirschner, L. B. (1983): Sodium chloride absorption across the body surface: frog skins and other epithelia. Am J Physiol **244**, 429-443.

Kirschner, L. B. (1979): Control mechanisms in crustaceans and fishes., Gilles, R, *Mechanisms of Osmoregulation in Animals. Maintenance of Cell Volume*, 157-222, John Wiley & Sons, Chichester

Kohn, O. F.; Hand, A. R.; Mitchell, P. P. und Steinmetz, P. R. (1997): Intra- and submembrane particle densities during CO2 stimulation of H+ secretion in turtle bladder. Am.J.Physiol **272**, 4 Pt 2, F491-F497.

Krogh, A. (1939): Osmotic regulation in aquatic animals, Cambridge University Press, London

Kuraku, S.; Hoshiyama, D.; Katoh, K.; Suga, H. und Miyata, T. (1999): Monophyly of lampreys and hagfishes supported by nuclear DNA-coded genes. J.Mol.Evol. **49**, 6, 729-735.

Lang, F. (1988): NaCl transport in the kidney., Greger, R, Advances in Comparative and Environmental Physiology, 153-188, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Larsen, E. H. (1988): NaCl transport in amphibian skin, Greger, R., 189-248, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg,

Larsen, E. H.; Willumsen, NJ und Christoffersen, BC (1992): Role of proton pump of mitochondria-rich cells for active transport of chloride ions in toad skin epithelium. J Physiol **450**, 203-216.

Laurent, P. (1984): Gill internal morphology., Hoar WS und Randall DJ, Fish physiology, **10, Part A**, 73-183, Academic Press, Orlando

Laurent, P. und Dunel, S. (1980): Morphology of gill epithelia in fish. Am.J.Physiol **238**, 3, R147-R159.

Loretz, C. A. (1995): Natriuretic peptide-induced hyperpolarization of goby posterior intestinal cells. Faseb Journal **9**, 3, A77.

Lutz, P. (1975): Adaptive and evolutionary aspects of the ionic content of fishes. Copeia **1975**, 369-379.

Madsen, K. M. und Tisher, C. C. (1984): Response of intercalated cells of rat outer medullary collecting duct to chronic metabolic acidosis. Lab Invest **51**, 3, 268-276.

Mallatt, J. und Ridgway, R. L. (1984): Ultrastructure of a complex epithelial system: the pharyngeal lining of the larval lamprey Petromyzon marinus. J.Morphol. **180**, 3, 271-296.

Mallatt, J. und Sullivan, J. (1998): 28S and 18S rDNA sequences support the monophyly of lampreys and hagfishes. Mol.Biol.Evol. **15**, 12, 1706-1718.

Marinelli, W. und Strenger, A. (1954a): *Lampetra fluviatilis*, Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere, **Vol 1**, L. Deutliche, Wien

Marinelli, W. und Strenger, A. (1954b): *Myxine glurtinosa*, Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere, **Vol 2**, L. Deutliche, Wien

Marshall, W. S. (2002): Na+, Cl, Ca2+ and Zn2+ Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective Synthesis. Journal of Experimental Zoology **293**, 264-283.

Marshall, W. S.; Bryson, S. E.; Wood, C. M. und Hamilton, W. F. (1995): Low conductance anion channel activated by cyclic AMP in teleost Cl^- secreting cells . Am J Physiol **268**, R963-R969.

McVicar, A. J. und Rankin, J. C. (1983): Renal function in unanaesthetized river lampreys (Lampetra fluviatilis) L.): effects of anaesthesia, temperature and enviromental salinity. J Exp.Biol. **23**, 235-248.

Moore, J. W. und Mallatt, J. (1980): Feeding in larval lampreys. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **37**, 1658-1664.

Morris, R. (1958): The mechanism of marine osmoregulation in the lampern (Lampetra fluviatilis L.) and causesa of its breakdown during the spawning migration. J Exp.Biol. **35**, 649-665.

Morris, R. (1956): The osmoregulation ability of the lampern (*Lampetra fluviatilis* L.) in sea water during the course of its spawning migration. J Exp.Biol. 23, 235-248.

Morris, R. (1980): Blood Composition and osmoregulation in ammocoete larva. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **37**, 1665-1679.

Morris, R. (1972): Osmo regulation, Hardisty, M. W. und Potter, I. C., The biology of Lampreys, **2**, 192-239, Academic Press, London

Morris, R. und Pickering, A. D. (1975): Ultrastructure of the presumed ion-transporting cells in the gills of ammocoete lampreys, Lampetra fluviatilis (L.) and Lampetra planeri (Bloch). Cell Tissue Res. **163**, 3, 327-341.

Muller, A. E.; Cruz-Orive, L. M.; Gehr, P. und Weibel, E. R. (1981): Comparison of two subsampling methods for electron microscopic morphometry. J.Microsc. **123**, Pt.1, 35-49.

Nagel, W. und Doerge, A. (1996): The role of mitochondria-rich cells in sodium transport across amphibian skin. Pfluegers Archiv European Journal of Physiology **433**, 1-2, 146-152.

Parry, G. (1966): Osmotic adaptation in fishes. Biol rev **41**, 392, 444.

Philpott, C. W. (1980): Tubular system membranes of teleost chloride cells: Osmotic response and transport sites. Am.J.Physiol. **238**, R171-R184.

Pickering, A. D. und Morris, R. (1976): Fine structure of the interplatelet area in the gills of the macrophthalmia stage of the river lamprey, Lampetra fluviatilis (L.). Cell Tissue Res. **168**, 4, 433-443.

Pisam, M. und Rambourg, A. (1992): Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. Int Rev Cytol **130**, 191-232.

Potter , I. C. und Huggins, R. J. (1973): Observations on the morphology, behaviour and salinity tolerance of downstream migrating river lampreys (*Lampetra fluviatilis*). Journal of Zoology London **169**, 3, 365-379.

Potter, I. C. (1986): The distinctive character of Southern hemisphere lampreys (Geodriidae and Mordaciidae), Uyeno T; Arai R; Taniuci T und Masuura K, Indo-Pacific Fishes, Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes, 9-19, Ichthyological Society of Japan, Tokyo

Potter, I. C. und Beamish, F.-W. H. (1977): The fresh water biology of adult anadromous sea lamprey *Petromyzon marius*. Journal of Zoology London **181**, 1, 113-130.

Potter, I. C.; Hillard, R. W. und Bird, D. J. (1980): Metamorphosis in the Southern Hemisphere lamprey, Geotria australis. J Zool London **190**, 405-430.

Potter, I. C. und Hilliard, R. W. (1987): A proposal for the functional and phylogenetic significance of the differences in the dentition of lampreys (Agnatha: Petromyzontiformes). J Zool London **212**, 713-737.

Rauther, M. (1935): Zur Kenntnis der Myxinoiden-Kiemen. Gegenbauers Morphologisches Jahrbuch **75**, 613-633.

Rick, R.; Doerge, A.; v.Arnim, E und Thurau, K. (1978): Electron microbe analysis of frog skin epithelium: evidence for a syncytical sodium transport compartment. J Membrane Biol **39**, 313-331.

Robertson, J. D. (1954): The chemical composition of the blood of some aquatic chordates, including members of the Tunica, Cyclostomata and Osteichthyes. J Exp.Biol. **31**, 424-442.

Royaux, I. E.; Wall, S. M.; Karniski, L. P.; Everett, L. A.; Suzuki, K.; Knepper, M. A. und Green, E. D. (2001): Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**, 7, 4221-4226.

Shu, D. G.; Chen, L.; Han, J. und Zhang, X-L. (1999): An Early Cambrian tunicate from China. Nature **413**, 203-210.

Smith, H. W. (1930a): The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. Am.J.Physiol **93**, 485-505.

Smith, H. W. (1930b): Localisation of chloride conductance to mitochondria-rich cells in frog skin epithelium. Am.J.Physiol **93**, 485, 505.

Stanton, B. A. (1984): Regulation of ion transport in epithelia: role of membrane recruitment from cytoplasmic vesicles. Lab Invest **51**, 3, 255-257.

Starck, D. (1978): 1. Theoretische Grundlagen, Stammesgeschichte und Systematik unter Berücksichtigung der neidereb. Chordaten, Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionsbiologischer Grundlage, Springer Verlag, Berlin

Stetson, D. L. und Steinmetz, P. R. (1983): Role of membrane fusion in CO2 stimulation of proton secretion by turtle bladder. Am.J.Physiol **245**, 1, C113-C120.

Stetson, D. L. und Steinmetz, P. R. (1986): Correlation between apical intramembrane particles and H+ secretion rates during CO2 stimulation in turtle bladder. Pflugers Arch. **407 Suppl 2**, S80-S84.

Stetson, D. L. und Steinmetz, P. R. (1985): α and ß types of carbonic anhydrase-rich cells in turtle bladder. Am J Physiol **249**, F553-F565.

Stock, D. W. und Whitt, G. S. (1992): Evidence from 18S ribosomal RNA sequence that lambreys and hagfishes form a natural group. Science **257**, 787-789.

Wade, J. B. (1976): Membrane structural specializations of the toad urinary bladder revelad by the freeze-fracture technique. II.The mitochondia-rich cell. J Membrane Biol **29**, 111-126.

Wade, J. B.; Di Scala, V. A. und Karnovski, M. J. (1975): Membrane structural specializations of the toad urinary bladder revelad by the freeze-fracture technique. I.The granular cell. J Membrane Biol **22**, 385-402.

Weibel, ER. (1979): Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry (Vol. 1) **(Vol. 1)**, Academic Press, New York,

Youson, J. H. (1981): The alimentary canal., Hardisty, M. W. und Potter, I. C., The biology of Lampreys, **3**, 95-189, Academic Press., London

Youson, J. H. und Freeman, P. A. (1976): Morphology of the gills of larval and parasitic adult sea lamprey, Petromyzon marinus L. J.Morphol. **149**, 1, 73-103.

Zadunaisky, J. A. (1984): The Chloride cell: the active transport of chloride and the paracellular pathways, Hoar WS und Randall DJ, Fisch physiology, **10B**, 130-176, Academic Press, Orlando

Danksagung:

Herzliches Dankt Herrn Prof. Dr. H. Bartels, Anatomische Anstalt München (Lehrstuhl II), für das interessante Thema, die Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine sehr gute und vorbildliche Betreuung.

Vielmals bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. A. Schmiedl, Anatomie 2, Funktionelle und angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Einarbeitung in die Morphometrie und die Hilfe bei der Auswertung der stereologischen Daten.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau U. Fazekas für die sehr gute Hilfe im Labor und die Einarbeitung am Elektronenmikroskop.

Außerdem herzlichen Dank an das gesamte Team des Lehrstuhl II, Anatomische Anstalt München, für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Rosenbruch
Vorname:	Johannes
Anschrift:	Luigenkamer Weg 16
	82541 Ambach
geboren am / in	12. November 1972 in München

Bildungsweg

1979 – 1991	Rudolf-Steiner-Schule München-Daglfing
1991	Oak Park River Forest High School, Illinois, U.S.A.
1992 – 1993	Abitur an der Rudolf-Steiner-Schule München-Daglfing
1994 – 2001	Studium der Humanmedizin an der
	Ludwig Maximilians Universität München
Mai 2001	III. Staatsexamen Humanmedizin

AIP

2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der
	Anatomischen Anstalt der
	Ludwig Maximilians Universität München
2002	Stiftklinik Augustinum München
	Abteilung Innere Medizin
	(Prof. M. Blumenstein, Prof. M. Block, Prof. N. Frank)

Assistenzarztzeit

2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der
	Anatomischen Anstalt der
	Ludwig Maximilians Universität München
Seit August 2003	Interne Klinik Dr. Argirov
	Abteilung Innere Medizin
	(Prof. D. Beuckelmann)