Zellvolumen-Regulation und Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen in Retzius- und P-Neuronen des medizinischen Blutegels

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans Joachim Wüsten

aus Wuppertal

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. W.-R. Schlue Koreferent: Prof. Dr. K. Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	9
	2.1. Der medizinische Blutegel Hirudo medicinalis als Versuchstier	9
	2.1.1. Aufbau des Zentralnervensystems	9
	2.2. Präparation und Identifizierung der Neuronen	10
	2.2.1. Präparation	10
	2.2.2. Identifizierung der Neuronen	11
	2.3. Theoretische Grundlagen und Anwendungsgebiete von Fluoreszenz-	11
	farbstoffen	
	2.3.1. Messung des Zellvolumens mit Fluoreszenzfarbstoffen	12
	2.3.2. Messung von Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzfarbstoffen	13
	2.3.2.1. Messung von $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2	13
	2.3.2.2. Eichung Fura-2	15
	2.3.2.3. Messung von [Na ⁺] _i mit SBFI	16
	2.3.2.4. Eichung SBFI	17
	2.3.2.5. Messung von pH _i mit BCECF	18
	2.3.2.6. Eichung BCECF	18
	2.4. Farbstoffinjektion	19
	2.5. Mikrofluorimeter und Mikroskop	20
	2.6. Konfokale Laserscan-Mikroskopie	21
	2.7. Elektrophysiologische Untersuchungen	22
	2.8. Fluoreszenzfarbstoffe, Versuchslösungen und Pharmaka	23
	2.9. Auswertung der Daten	26
3.	Ergebnisse	27
	3.1. Einfluss der Versuchsbedingungen	27
	3.1.1. Auswirkungen der Farbstoffinjektion	27
	3.2. Mikrofluorimetrische Messungen von Zellvolumenänderungen	28

3.2.1. Eignung der verwendeten Farbstoffe	28
3.2.2. Fluoreszenzänderungen unter anisotonischen Bedingungen	30
3.2.3. Einfluss des Messareals	30
3.2.4. Einfluss der injizierten Farbstoffmenge	31
3.3. Volumenänderungen unter isotonischen Bedingungen	34
3.3.1. Wirkung von Ouabain und K ⁺ -freier Lösung auf Zellvolumen,	
$[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und E_m unter isotonischen Bedingungen	34
3.4. Wirkung anisotonischer Bedingungen auf Zellvolumen, $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$,	
pH _i und E _m	36
3.4.1. Änderungen der NaCl-Konzentration	37
3.4.2. Zugabe von Sorbitol oder Glucose	39
3.4.3. Morphologische Änderungen der Neuronen unter anisotonischen	
Bedingungen	40
3.4.4. Wirkung anisotonischer Bedingungen auf $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$,	
pH _i und E _m	41
3.5. Volumenänderung und die Volumenregulation bei pharmakologischer	
Beeinflussung von Transportsystemen in der Plasmamembran	42
3.5.1. Wirkung der Cl ⁻ -Kanal-Inhibitoren Nifluminsäure, DIDS,	
9-AC und NPPB bei Retzius-Neuronen unter anisotonischen	
Bedingungen	42
3.5.2. Wirkung der Inhibitoren des K^+ - Cl^- und des Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -	
Cotransporters Furosemid und Bumetanid unter anisotonischen	
Bedingungen	44
3.5.3. Wirkung der K ⁺ -Kanal-Aktivatoren Diazoxid und Minoxidil und	
der K ^{$+$} -Kanal-Inhibitoren Glibenclamid und Clofilium Tosylat	
unter hypotonischen Bedingungen	45
3.5.4. Wirkung der Na ⁺ -Kanal Inhibitoren Phenytoin und Lidocain unter	
hypertonischen Bedingungen	46
3.5.5. Wirkung von Amilorid, Änderungen des extrazellulären pH (pHa)	
sowie HCO3 ⁻ -gepufferten Versuchslösungen auf die Volumen-	
änderung unter hypertonischen Bedingungen	47

7.	Abbildungen	88
6.	Literaturverzeichnis	71
5.	Zusammenfassung	68
	4.8. Schlussfolgerung und Ausblick	66
	volumens unter anisotonischen Bedingungen	64
	4.7. Beteiligung des Cytoskeletts an der Aufrechterhaltung des Zell-	
	durch den extrazellulären pH	63
	4.6. Modulation der Volumenregulation unter hypertonischen Bedingungen	
	4.5. Volumenregulation unter hypertonischen Bedingungen	60
	4.4. Volumenregulation unter hypotonischen Bedingungen	59
	4.3. Anisotonie	57
	isotonischen Bedingungen	55
	4.2. Rolle der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase bei der Kontrolle des Zellvolumens unter	
	zur Volumenmessung	54
	4.1.2. Eignung der Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, SBFI und BCECF	
	Fluoreszenzfarbstoffen	53
	4.1.1. Die Iontophorese zur Beladung von Neuronen mit	20
	4.1. Messung von Zellvolumenänderungen mit Fluoreszenzfarbstoffen	53
4.	Diskussion	53
	anisotonischen Bedingungen	50
	3.6.1. Wirkung von Cytoskelett-Modulatoren auf das Zellvolumen unter	
	unter anisotonischen Bedingungen	50
	3.6. Beteiligung des Cytoskeletts an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens	
	unter hypertonischen Bedingungen	48
	die Volumenregulation von Retzius- und P-Neuronen	
	3.5.5.2. Wirkung Bicarbonat-gepufferter Versuchslösungen auf	
	Bedingungen	47
	Retzius- und P-Neuronen unter anisotonischen	
	zellulären pH-Werts (pH _a) auf das Zellvolumen von	
	3.5.5.1. Wirkung von Amilorid und Änderungen des extra-	

1. Einleitung

Die Konstanthaltung des Zellvolumens ist ein zentraler Aspekt der zellulären Homöostase. Wie eine Vielzahl experimenteller Beobachtungen zeigt, müssen allzu große Änderungen des Zellvolumens vermieden werden, damit die strukturelle und funktionelle Integrität von Zellen aufrechterhalten bleibt (*Lang et al.* 1998a). Die Plasmamembran tierischer Zellen besitzt eine hohe Permeabilität für Wasser, die in vielen Gewebetypen durch spezielle Membranproteine, Aquaporine, erhöht wird (*Murata et al.* 2000). Da tierische Zellen keinen nennenswerten hydrostatischen Druck aufbauen können, hängt der Wassertransport über die Plasmamembran weitgehend vom osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum ab (*Sarkadi & Parker* 1991), und entsprechend führt jede Veränderung dieses Gradienten zu einer Veränderung des Zellvolumens. Dabei führen Zellschwellungen zur Stimulierung des Anabolismus und Zellschrumpfungen zur Stimulierung des Katabolismus (*Schliess & Häussinger* 2003).

Bei Säugetieren wird die Osmolarität des Extrazellulärraums besonders gut kontrolliert, und nur wenige Gewebe sind unter physiologischen Bedingungen größeren osmotischen Schwankungen ausgesetzt. Doch selbst bei konstanter extrazellulärer Osmolarität können der Transport osmotisch aktiver Substanzen über die Membran sowie der zelluläre Stoffwechsel zu Änderungen der intrazellulären Osmolarität führen und damit durch Wasseraufnahme oder -abgabe das Zellvolumen beeinflussen (*Häussinger* 1996).

Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Zellvolumens

Bei pflanzlichen Zellen wird das Volumen durch eine Zellwand, die als mechanische Barriere wirkt, weitgehend konstant gehalten. Tierischen Zellen fehlt diese mechanische Stabilität, so dass die Zellen auf volumenregulatorische Mechanismen zurückgreifen müssen. Hierbei wird unterschieden zwischen der regulatorischen Volumenzunahme (RVI, 'regulatory volume increase') als Antwort auf eine Zellschrumpfung und der regulatorischen Volumenabnahme (RVD, 'regulatory volume decrease') als Antwort auf eine Zellschwellung. Diese beiden Prozesse ermöglichen es tierischen Zellen, innerhalb gewisser Grenzen auf osmotische Stresssituationen zu reagieren und Zellschädigungen zu vermeiden (*Strange* 1993).

Kennzeichnend für RVD ist eine KCl-Abgabe der Zelle, während RVI primär auf eine NaCl-Aufnahme zurückzuführen ist (*Siebens & Kregenow* 1985, *Eveloff & Warnock* 1987). Neben anorganischen Ionen trägt auch der Transport organischer Osmolyte, wie Polyalkohole, Methylamine oder Aminosäuren zur Stabilisierung des Zellvolumens bei (*Burg* 1994). Hierbei erfolgt die Regulation entweder über die Bildung oder den Abbau der jeweiligen organischen Osmolyte bzw. deren Aufnahme oder Abgabe. Im Vergleich zu der durch anorganische Elektrolyte hervorgerufenen Volumenregulation erfolgt die Regulation durch organische Osmolyte meist langsam und kann sich über Tage hinziehen (*Häussinger* 1996).

Allgemein wird zwischen Faktoren unterschieden, die das Zellvolumen unter physiologischen Verhältnissen (isotonische Bedingungen, 'steady-state volume') oder in osmotischen Stresssituationen (anisotonische Bedingungen) aufrechterhalten. In osmotischen Stresssituationen werden spezielle volumenregulatorische Transporter aktiviert, sobald das Zellvolumen von einem bestimmten Sollwert ('volume set point') abweicht. Bei der Aktivierung dieser Transportsysteme nimmt das Zellvolumen oftmals über die Membrandehnung direkten Einfluss auf intrazelluläre Prozesse, beispielsweise die Steuerung von G-Proteinen, Proteinphosphorylierung, Genexpression oder Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen (Ca²⁺, Mg²⁺, H⁺; *Lang et al.* 1998a, *Burg* 2000, *Jakab et al.* 2002).

Transportsysteme zur Kontrolle des Zellvolumens unter isotonischen Bedingungen

Die Na⁺/K⁺-ATPase ist das wichtigste Transportprotein, das an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter isotonischen Bedingungen beteiligt ist. Durch den Export von Na⁺-Ionen und den Import von K⁺-Ionen wird die cytosolische Na⁺-Konzentration niedrig und die von K⁺ hoch gehalten. Die hohe K⁺-Permeabilität der Zellmembran ermöglicht es, dass K⁺-Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten aus der Zelle

strömen. Die hierdurch entstehende Negativierung des Cytosols treibt Cl⁻-Ionen aus der Zelle heraus und hält so die cytosolische Cl⁻-Konzentration niedrig, wodurch es den Zellen möglich ist, eine hohe Konzentration meist negativ geladener organischer Osmolyte zu kompensieren (*O'Neill* 1999). Die Bedeutung der Na⁺/K⁺-ATPase für die Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter Ruhebedingungen wird dadurch deutlich, dass ihre Hemmung mittels Ouabain bei den meisten Zelltypen zu einer Schwellung führt (*Lang et al.* 1998a).

Mechanismen zur Regulation des Zellvolumens unter hypertonischen Bedingungen

Zu den wichtigsten Transportsystemen zur Anreicherung von Elektrolyten in geschrumpften Zellen zählen die Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) und der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter (NKCC). Zur Familie der Na⁺/H⁺-Austauscher gehören sechs Isoformen (NHE1-6), die in unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert werden (*Counillon & Pouysségur* 2000) und mit Ausnahme von NHE5 alle an der Volumenregulation beteiligt sind (*Lang et al.* 1998a, *Counillon & Pouysségur* 2000). Durch den Export von H⁺-Ionen im Austausch gegen Na⁺ kommt es zu einer Alkalinisierung der Zelle und somit häufig zur parallelen Aktivierung des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers (Anionen-austauscher, AE). Die Aktivierung beider Systeme hat eine Nettoaufnahme von NaCl und damit einen Wassereinstrom bzw. RVI zur Folge. Da eine Aktivierung der Na⁺/H⁺-Austauscher durch verschiedene Liganden möglich ist und Verbindungen zu anderen zellulären Proteinen, insbesondere dem Cytoskelett, bestehen, stellen die Na⁺/H⁺-Austauscher ein Bindeglied zwischen dem Zellvolumen und vielen zellulären Prozessen dar (*Ritter et al.* 2001).

Der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter ist ebenfalls ein wesentliches volumenregulatorisches Transportsystem unter hypertonischen Bedingungen. Die Aktivierung dieses Systems bewirkt den gekoppelten Transport von Na⁺, K⁺ und zwei Cl⁻-Ionen in die Zelle und damit die Aufnahme von Wasser bzw. RVI (*Häussinger* 1996, *Wehner & Tinel* 1998). In manchen Zellen wird RVI aber auch durch die Aktivierung von speziellen Na⁺-Kanälen und/oder unselektiven Kationenkanälen ausgelöst. Die durch den Na⁺-Einstrom induzierte Membrandepolarisation begünstigt die Aufnahme von Cl⁻. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Zellschrumpfung auch zu einer Inhibierung von K⁺-Kanälen führen kann, wodurch dem Verlust von Osmolyten entgegenwirkt wird (*Lang et al.* 1998b). Weiterhin können Na⁺-abhängige Transportsysteme für organische Osmolyte aktiviert werden, zu denen beispielsweise der Na⁺-abhängige Glucose-Transporter SGLT1 zählt, der durch Glucose-Aufnahme zu RVI beiträgt (*Häussinger* 1996).

Transportsysteme zur Regulation des Zellvolumens unter hypotonischen Bedingungen

Bei einer Zellschwellung wird RVD durch eine unabhängige Aktivierung von K⁺- und Cl⁻-Kanälen hervorgerufen, die einen KCl-Efflux und damit den Verlust von Wasser ermöglichen (*Häussinger* 1996). Außer über Ionenkanäle kann ein KCl-Efflux auch über den K⁺-Cl⁻-Cotransporter (KCC) erfolgen (*Lang et al.* 1998b, *Lauf & Adragna* 2000). Allerdings scheint dieses Transportsystem bevorzugt bei einer isotonischen Schwellung aktiviert zu werden (*Garcia-Romeu et al.* 1996). In manchen Zelltypen erfolgt unter hypotonischen Bedingungen eine parallele Aktivierung des K⁺/H⁺- und Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers (*Cala* 1985): H⁺ und HCO₃⁻ werden im Austausch mit KCl aufgenommen und bilden CO₂, welches aus der Zelle diffundiert und daher osmotisch inaktiv ist.

Einige K⁺-Kanäle können direkt durch die bei Zellschwellung auftretende Membrandehnung aktiviert werden ($I_{K,Vol}$, *Hoffmann* 2000). Weiterhin wurde eine Öffnung von K⁺-Kanälen durch intrazelluläres Ca²⁺ (BK_{Ca} oder Maxi-K), Abbau des Membranpotentials (IK) sowie durch intra- und extrazelluläre pH-Verschiebungen (TASK) beschrieben (*Hoffmann* 2000, *Wehner et al.* 2003). Cl⁻-Kanäle können ebenfalls direkt durch Änderungen des Zellvolumens aktiviert werden (VRAC, I_{Cl,Vol}; *Nilius et al.* 1998). Sie sind Ca²⁺-insensitiv, können aber durch F-Aktin-Filamente und Proteinphosphorylierung moduliert werden (*Hoffmann* 2000, *Jentsch et al.* 2002). Die parallele Aktivierung von K^+ - und Cl⁻-Kanälen hat eine Nettoabgabe von KCl und damit Wasserverlust und RVD zur Folge.

Der Export organischer Osmolyte wie Aminosäuren und Eicosanoide (beispielsweise Arachidonsäure) wird ebenfalls häufig genutzt, um RVD zu erzielen. Hierzu dienen volumensensitive Transportsysteme (Organische-Osmolyt-Kanäle, VSOAC), die bidirektional arbeiten und sowohl zu RVD als auch zu RVI beitragen können (*Kirk* 1997, *Junankar & Kirk* 2000).

Morphologische Strukturen zur Aufrechterhaltung des Zellvolumens

Die Beteiligung des Cytoskeletts und der Plasmamembran an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens wurde für verschiedene Präparate beschrieben (*Cantiello* 1997, *Larsen et al.* 2000). So sind Aktin-Filamente sowohl bei Zellschrumpfung als auch bei Zellschwellung an der Neuordnung der Plasmamembran beteiligt oder nehmen direkten Einfluss auf die Steuerung von Transportsystemen (*Herring et al.* 1999). Bei Hepatocyten wurde eine Stabilisierung des Zellvolumens durch das Microtubuli-Netzwerk nachgewiesen (*Häussinger et al.* 1994). Weiterhin sind Zellen in der Lage unter geänderten osmotischen Bedingungen mit Ein- bzw. Ausstülpungen der Plasmamembran auf ein geändertes Zellvolumen zu reagieren (*Herring et al.* 1998).

Bedeutung der Volumenregulation bei Neuronen

Ein Gewebetyp, bei dem sich Änderungen des Zellvolumens besonders schwerwiegend auswirken, ist das Nervensystem. Aufgrund der räumlichen Begrenzung des Gehirns im Schädel kann eine Schwellung des Hirngewebes in Folge von Ischämie, Anoxie oder Tumorbildung dramatische Einflüsse auf zentralnervöse Funktionen haben (*Go* 1997).

Bei veränderter extrazellulärer Osmolarität kann die Erregbarkeit einzelner Neuronen oder ganzer Neuronenverbände verstärkt oder abgeschwächt werden. Zum Beispiel

führt die akute Hypernatriämie, die durch einen erhöhten Natrium-Gehalt im Blutplasma charakterisiert ist, zur Schrumpfung von Gehirnzellen, mit Folgeerscheinungen wie Tremor, Reizbarkeit oder Lethargie. Eine chronische Hypernatriämie kann im schlimmsten Fall zu Läsionen, Ödemen oder der Schrumpfung des gesamten Gehirns führen (*Trachtman* 1992, *De Petris et al.* 2001). Auf der anderen Seite kann eine chronische Hyponatriämie zur Gehirn-Schwellung und ebenfalls zu bleibenden Schädigungen des Nervensystems führen. Bei chronischen Krankheitszuständen reichen Änderungen des osmotischen Gradienten allein durch Elektrolyte nicht mehr aus, um das normale Volumen wieder herzustellen, vielmehr kommt zusätzlich der Transport organischer Osmolyte zum Tragen (*Pasantes-Morales et al.* 2000b). Die angeführten Beispiele verdeutlichen die Wichtigkeit der Volumenregulation und die Notwendigkeit der Untersuchung ihrer Mechanismen, um Strategien zu entwickeln, die pathophysiologischen Folgeerscheinungen entgegenwirken.

Möglichkeiten zur Untersuchung volumenregulatorischer Mechanismen

Verschiedene Techniken wurden bereits erfolgreich zur Untersuchung von Volumenänderungen angewendet. Bildgebende Verfahren oder die Erweiterung ionensensitiver Glasmikroelektroden (*Schlue et al.* 1997) zu Mehrkanalelektroden ermöglichen die simultane Bestimmung des Zellvolumens und der Konzentration physiologisch relevanter Ionen (*Ballanyi et al.* 1990, *Neumann et al.* 2001).

Die in dieser Arbeit angewandte Technik der Mikrofluorimetrie ermöglicht die Bestimmung des Zellvolumens durch Messung der Fluoreszenzemission eines als Volumenmarker eingesetzten membranimpermeablen Fluoreszenzfarbstoffes (*Muallem et al.* 1992, *Crowe et al.* 1995, *Altamirano et al.* 1998). Bei Verwendung geeigneter Farbstoffe erlaubt die Technik die simultane Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen, wie beispielsweise von Ca²⁺, Na⁺ oder H⁺ (*Altamirano et al.* 1998, *Diarra et al.* 2001, *Weinlich et al.* 1998). Wichtige Vorteile dieser Technik sind die große Messgenauigkeit und die hohe zeitliche Auflösung. In dieser Arbeit wurden Neuronen des medizinischen Blutegels verwendet, die sich im intakten Gewebeverband befanden (*in situ*). Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass unterschiedliche Neuronen sowie die Neuropil-Gliazellen des Blutegelnervensystems volumenregulatorische Mechanismen aufweisen, die mit bei Vertebraten beschriebenen Mechanismen vergleichbar sind (*Ballanyi et al.* 1990, *Pellegrino et al.* 1990, *Buchholz* 1999, *Neumann* 2000, *Wüsten* 2000). Die bisherigen Befunde sprechen insgesamt dafür, dass Mechanismen der Volumenänderung und -regulation am Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels erfolgreich untersucht werden können.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der an der Volumenänderung und -regulation von Blutegelneuronen beteiligten Transportsysteme unter isotonischen und anisotonischen Bedingungen. Hierzu wurden pharmakologische Experimente mit Substanzen durchgeführt, die potentielle volumenregulatorische Mechanismen unterdrücken bzw. fördern. Weiterhin standen Untersuchungen zu einer möglichen Beteiligung des Cytoskeletts bei der Volumenregulation im Vordergrund. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde das Methodenspektrum um Fluoreszenzfarbstoffe erweitert, welche die simultane Bestimmung des Zellvolumens und physiologisch relevanter Ionen ermöglichen. Hier standen Ca^{2+} , Na^+ und H^+ im Vordergrund, da diese Ionen in vielen Präparaten mit Volumenregulationsvorgängen in Verbindung gebracht wurden. Die Untersuchungen zeigten, dass unter isotonischen Bedingungen die Na^+/K^+ -ATPase für die Aufrechterhaltung des Zellvolumens verantwortlich ist, während unter anisotonischen Bedingungen das Cytoskelett, die Plasmamembran sowie ionale Transportmechanismen das Zellvolumen kontrollieren. Es wurde deutlich, dass Interaktionen zwischen den volumenregulatorischen Transportsystemen auftreten, die für neuronale Zellen bislang wenig beschrieben wurden. Die Resultate zeigen insgesamt, dass das Modellpräparat des medizinischen Blutegels und die Technik der Mikrofluorimetrie gut für die Untersuchung allgemeiner Aspekte der Volumenregulation tierischer Zellen geeignet sind.

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge veröffentlicht (*Wüsten et al.* 2000, 2001, 2002, 2003). Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt durch Mittel des DFG-Graduiertenkollegs 320 "Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten".

2. Material und Methoden

2.1. Der medizinische Blutegel Hirudo medicinalis als Versuchstier

Als Versuchstiere dienten adulte Blutegel der Gattung *Hirudo medicinalis* (Abb. 1A). Der medizinische Blutegel gehört zum Stamm der Annelida [Ringelwürmer; Klasse: Clitellata (Gürtelwürmer), Unterklasse: Hirudinea (Blutegel), Ordnung: Gnathobdellida (Kieferegel)]. Sowohl am Vorder- als auch am Hinterende besitzt der Blutegel je einen Saugnapf, mit dessen Hilfe sich das Tier auf festen Flächen festhalten und fortbewegen kann. Auf dem Grund des vorderen Saugnapfes befinden sich drei bezahnte Kiefer, die der Nahrungsaufnahme dienen. Der Körper des Blutegels ist segmentiert, wobei die einzelnen Glieder durch Dissepimente begrenzt sind. Auffällig ist die Rückbildung des Cöloms durch eingelagertes parenchymatisches Gewebe, innerhalb dessen sich die inneren Organe und das ventral liegende Zentralnervensystem befinden. Die Experimente wurden an identifizierten Neuronen innerhalb isolierter Segmentalganglien des Zentralnervensystems durchgeführt (siehe 2.2.1.). Die Versuchstiere wurden von der Zaug GmbH (Biebertal) geliefert.

2.1.1. Aufbau des Zentralnervensystems

Das Zentralnervensystem des Blutegels weist entsprechend dem Körperbau eine stark segmentierte Organisation auf. Die Ganglien der ersten vier Segmente sind zum Kopfganglion, die der letzten sieben Segmente zum Analganglion verschmolzen (Abb. 1B). Dazwischen befinden sich insgesamt 21 Segmentalganglien, die durch zwei Konnektive und den Faivre´schen Nerv miteinander verbunden sind. Die gesamte Ganglienkette ist vom ventralen Blutsinus umgeben.

Die 21 Segmentalganglien sind stereotyp gebaut und enthalten ca. 400 monopolare Neuronen, 6 Paket- und 2 Neuropilgliazellen (Abb. 2). Eine Ausnahme bilden die Geschlechtsganglien in Segment 5 und 6 mit der doppelten Anzahl von Neuronen (*Macagno* 1980). Diese Ganglien wurden für die Experimente nicht verwendet.

Jedes Ganglion ist von einer äußeren Kapsel aus Bindegewebe umhüllt, die in sechs Pakete gegliedert ist. Jedes Pakete enthält 60 bis 80 Neuronzellkörper, die von den Ausläufern einer Paket-Gliazelle umhüllt werden. Die innere Region des Ganglions, das Neuropil, enthält die Ausläufer der Neuronen und ist der Ort der synaptischen Verschaltung. Umgeben sind die Axone von den Ausläufern zweier Neuropil-Gliazellen. Jedes Ganglion mündet lateral in jeweils zwei Seitennerven, über die der Hautmuskelschlauch und andere Zielorgane innerviert werden.

2.2. Präparation und Identifizierung der Neuronen

2.2.1. Präparation

Der Blutegel wurde in eine mit Wachs ausgegossene Metallschale überführt und mit Hilfe zweier Stecknadeln an beiden Saugnäpfen unter leichter Streckung fixiert. Durch einen Schnitt hinter dem vorderen Saugnapf wurde das Cerebralganglion vom restlichen Nervensystem getrennt. Die Öffnung des Körpers erfolgte durch vorsichtiges Durchtrennen des Hautmuskelschlauchs vom Vorderende zum Hinterende entlang der Dorsalmedianlinie. Der Hautmuskelschlauch wurde seitlich aufgeklappt und mit weiteren Stecknadeln fixiert. Die Blutegel-Hämolymphe wurde durch Überspülen mit physiologischer Salzlösung (Normalsalzlösung, NSL) entfernt. Die weitere Präparation erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle (Binokular, Zeiss). Das Bindegewebe sowie die dorsale und ventrale Darmwand wurden entfernt und dadurch das Zentralnervensystem freigelegt. Der das Zentralnervensystem umgebende ventrale Blutsinus wurde über jeder Ganglionkapsel mit einer Pinzette angehoben und durch einen feinen Schnitt eröffnet. Nach Durchtrennung der Konnektive und der Seitenwurzeln wurden die Segmentalganglien vorsichtig aus dem Blutsinus entnommen und in ein Kulturschälchen mit physiologischer Salzlösung überführt. Während der Präparation war das Versuchstier ständig mit NSL überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Bis zu den Experimenten wurden die Segmentalganglien bei Raumtemperatur (18 - 21° C) aufbewahrt. Die Messungen wurden an Ganglien durchgeführt, deren Präparation höchstens 10 Stunden zurücklag.

2.2.2. Identifizierung der Neuronen

Die Identifizierung der Neuronen erfolgte nach morphologischen und elektrophysiologischen Kriterien (*Dierkes et al.* 1996). Als morphologische Kriterien dienten die Lage der Neuronen im Segmentalganglion sowie die Größe der Neuronzellkörper. Zu den elektrophysiologischen Kriterien zählten das Membranruhepotential sowie Amplitude, Zeitverlauf und Frequenz spontan auftretender Aktionspotentiale. Für die Experimente wurden Retzius- und P-Neuronen verwendet (Abb. 2). Retzius-Neuronen (nach ihrem Erstbeschreiber *Gustav Retzius* benannt) sind die größten Zellen im anterior-medianen Paket und eindeutig zu identifizieren. Die P-Neuronen (P = pressure) in den posterior-lateralen Paketen heben sich ebenfalls durch ihre Größe von den meisten benachbarten Neuronen ab. Sie sind von den in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden, ähnlich großen Leydig-Neuronen durch die fehlende Spontanaktivität zu unterscheiden.

2.3. Theoretische Grundlagen und Anwendungsgebiete von Fluoreszenzfarbstoffen

Fluoreszenzfarbstoffe besitzen allgemein die Eigenschaft Licht zu absorbieren und als längerwelliges (energieärmeres) Licht zu emittieren. Damit ist es möglich, durch den Einsatz geeigneter Sperrfilter das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht zu trennen. Zur Messung von Ionenkonzentrationen werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren optische Eigenschaften durch die Bindung einer bestimmten Ionensorte spezifisch verändert werden. Dabei kann die Bindung des jeweiligen Ions eine Verschiebung des Absorptions- und/oder Emissionsspektrums oder auch eine Änderung der Quantenausbeute bewirken. Bei Erfüllung weiterer Kriterien (Photostabilität, hohe Absorption und Quantenausbeute, hohe Selektivität, geeignete Gleichgewichtskonstante, geringe Toxizität, niedrige Membranpermeabilität) können diese Farbstoffe zur Messung der freien cytosolischen Konzentrationen verschiedener Ionen (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, H⁺ oder Cl⁻) verwendet werden (*Haugland* 2002). Besitzen diese Farbstoffe darüber hinaus innerhalb ihres Anregungsspektrums einen Isofluarpunkt, d. h. eine Anregungswellenlänge, bei der die Farbstofffluoreszenz unabhängig von der Konzentration des zu messenden Ions ist, so besteht die Möglichkeit simultan Änderungen der Farbstoff-konzentration und damit des Zellvolumens zu ermitteln (*Crowe et al.* 1995).

2.3.1. Messung des Zellvolumens mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um Änderungen des Zellvolumens anhand der Fluoreszenzemission zu bestimmen, werden einzelne Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen, die dann als Volumenmarker dienen (*Gray et al.* 1983, *Muallem et al.* 1992). Wichtige Voraussetzungen zur Erfüllung dieser Funktion sind, dass die Farbstoffe nicht metabolisiert werden und nicht toxisch sind. Weiterhin muss das Verbleiben im Cytosol und die Unabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Änderungen des cytosolischen Milieus gewährleistet sein (*Crowe et al.* 1995). Die mit einer Volumenänderung verbundenen Änderungen im Zellwasservolumen (cell water volume, CWV, *Altamirano et al.* 1998) führen zu entsprechenden Änderungen der Farbstoff-Konzentration. Um diese Konzentrationsänderungen zu erfassen, wird die Fluoreszenzemission des Volumenmarkers nur in einem kleinen Volumenelement in der Mitte der Zelle bestimmt (*Crowe et al.* 1995). Die Änderungen der Fluoreszenzemission verhalten sich umgekehrt proportional zu denen des Zellvolumens (*Alvarez-Leefmans et al.* 1995):

$$\frac{F_0 - F_{HF}}{F_{exp} - F_{HF}} = \frac{V_{Exp}}{V_0}$$
(1)

 F_0 bezeichnet die Fluoreszenz innerhalb des Volumenelements der Zelle unter Kontrollbedingungen, F_{Exp} die Fluoreszenz unter veränderten experimentellen Bedingungen. F_{HF} ist die Hintergrundfluoreszenz des Präparats, die zur Korrektur von der jeweiligen Gesamtfluoreszenz subtrahiert werden muss. Entsprechend bezeichnet V_0 das Wasservolumen der Zelle unter Kontrollbedingungen und V_{Exp} das Wasservolumen bei veränderten experimentellen Bedingungen.

In dieser Arbeit wurden zur Volumenmessung Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die gleichzeitig die Bestimmung bestimmter Ionenarten erlauben: Fura-2 für Ca²⁺, BCECF für H⁺ und SBFI für Na⁺. Diese Farbstoffe können als Volumenmarker nur bei Anregung am Isofluarpunkt verwendet werden, an dem die Fluoreszenzemission von der Konzentration des registrierten Ions unabhängig ist (*Muallem et al.* 1992, *Crowe et al.* 1995). Für Fura-2 liegt der Isofluarpunkt bei 360 nm (Abb. 5), für SBFI bei 370 nm (Abb. 8) und für BCECF bei 440 nm (Abb. 9).

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden iontophoretisch in die Zellen injiziert (siehe 2.4.). Die Farbstoffinjektion hatte zum einen den Vorteil, dass die Neuronen anhand elektrophysiologischer Parameter (Membranpotential, spontane Aktionspotentiale) eindeutig identifiziert werden konnten. Zum anderen wurde direkt die membranimpermeable Form des Farbstoffes in die Neuronen gebracht. Somit lag der Farbstoff ausschließlich im osmotisch aktiven Kompartiment der Zellen, dem Cytosol, vor und nicht wie bei Beladung mit dem jeweiligen Esterderivat auch in intrazellulären Organellen (siehe *Haugland* 2002).

2.3.2. Messung von Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.3.2.1. Messung von $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2

Zur Messung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Das Anregungsspektrum von Fura-2 ändert sich bei der Bindung von Ca^{2+} , während das Emissionsspektrum nahezu konstant bleibt

(*Grynkiewicz et al.* 1985; Abb. 5A). Die Ca²⁺-gesättigte Form des Farbstoffs absorbiert maximal Licht der Wellenlänge 335 nm, die Ca²⁺-freie Form Licht der Wellenlänge 362 nm. Das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen des Farbstoffs ist durch die freie Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]) festgelegt und folgt einer 1:1-Stöchiometrie.

Prinzipiell ist es möglich, Fura-2 mit nur einer Wellenlänge anzuregen und Rückschlüsse auf die $[Ca^{2+}]$ aufgrund der Fluoreszenzemission zu ziehen. Jedoch hängt die Fluoreszenzemission außer von $[Ca^{2+}]$ auch von der Farbstoffkonzentration sowie von apparativen Parametern ab (Intensität des Anregungslichts, Empfindlichkeit des Detektors, Transmission der Filter). Eine Farbstoffeichung am Ende des Experiments ist technisch schwierig und würde voraussetzen, dass Farbstoffkonzentration und apparative Parameter während der Messung unverändert bleiben (*Grynkiewicz et al.* 1985, *Cobbold & Rink* 1987). Zelluläre Transportmechanismen (siehe Abb. 6C) oder Ausbleichung des Farbstoffs ('Photobleaching') erniedrigen jedoch in der Regel die Farbstoffkonzentration, wodurch eine Eichung weiter erschwert wird.

Um diese Probleme zu umgehen, wird bei der $[Ca^{2+}]$ -Messung mit Fura-2 die Ratio-Methode verwendet, durch die sich $[Ca^{2+}]$ unabhängig von absoluten apparativen Parametern und der Farbstoffkonzentration bestimmen lässt (*Grynkiewicz et al.* 1985). Hierbei wird der Farbstoff mit zwei Wellenlängen λ_1 und λ_2 alternierend angeregt und $[Ca^{2+}]$ aus dem Verhältnis der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten F₁ und F₂ bestimmt. F₁ und F₂ sind durch folgende Beziehungen gegeben:

$$\mathbf{F}_{1} = \mathbf{S}_{b1} \cdot \mathbf{c}_{b} + \mathbf{S}_{f1} \cdot \mathbf{c}_{f} \tag{2}$$

$$F_2 = S_{b2} \cdot c_b + S_{f2} \cdot c_f \tag{3}$$

Dabei bezeichnen c_b und c_f die Konzentrationen der Ca²⁺-gesättigten bzw. Ca²⁺-freien Form des Farbstoffs. Die Faktoren S_{b1}, S_{b2}, S_{f1} und S_{f2} beinhalten apparative Parameter sowie physikalische Farbstoffeigenschaften (Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute). Die Konzentrationen c_b und c_f sind über die Dissoziationskonstante K_d folgendermaßen mit [Ca²⁺] verknüpft:

$$c_{b} = \frac{c_{f} \cdot [Ca^{2+}]}{K_{d}}$$

$$\tag{4}$$

Aus dem Verhältnis ('ratio') $R = F_1/F_2$ ergibt sich nach Einsetzen von Gleichung (4) in die Gleichungen (2) und (3) der Zusammenhang:

$$R = \frac{\left(S_{f1} + S_{b1} \cdot [Ca^{2+}] / K_{d}\right)}{\left(S_{f2} + S_{b2} \cdot [Ca^{2+}] / K_{d}\right)}$$
(5)

Auflösungen von Gleichung (5) nach [Ca²⁺] ergibt:

$$[Ca^{2+}] = K_{d} \cdot \left(\frac{R - (S_{f1} / S_{f2})}{(S_{b1} / S_{b2}) - R}\right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}}\right)$$
(6)

Das Verhältnis S_{f1}/S_{f2} gibt den minimalen Wert für R wieder, der bei Abwesenheit von Ca^{2+} erreicht wird und mit R_{min} bezeichnet wird. Analog bildet der Quotient S_{b1}/S_{b2} den maximalen Wert R_{max} , der sich bei Ca^{2+} -Sättigung des Farbstoffs einstellt. Damit ergibt sich:

$$[\operatorname{Ca}^{2+}] = \operatorname{K}_{d} \cdot \left(\frac{\operatorname{R} - \operatorname{R}_{\min}}{\operatorname{R}_{\max} - \operatorname{R}}\right) \cdot \left(\frac{\operatorname{S}_{f2}}{\operatorname{S}_{b2}}\right)$$
(7)

2.3.2.2. Eichung Fura-2

Die Werte für R_{min} , R_{max} und für den Quotienten S_{f2}/S_{b2} wurden durch eine *in vitro*-Eichung ermittelt. Die Eichlösungen enthielten 100 μ M Fura-2 in 100 mM KCl, 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,40. Die Lösung mit der Ca²⁺-gesättigten Form von Fura-2 enthielt zusätzlich 10 mM CaCl₂, während die Lösung mit der Ca²⁺-freien Form stattdessen 10 mM Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) enthielt. Zur Eichung wurden die Lösungen in Messkammern mit einer Schichtdicke von 150 µm und einem Fassungsvolumen von ca. 5 µl pipettiert. Die Eichung wurde in derselben Apparatur durchgeführt, die auch zur [Ca²⁺]_i-Messung verwendet wurde (siehe 2.5., Abb. 3).

Die Anregungsspektren der Ca²⁺-freien und Ca²⁺-gesättigten Form von Fura-2 über einen Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm sind in Abb. 5A wiedergegeben. Für die [Ca²⁺]-Bestimmung nach der Ratio-Methode wurden die Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm ausgewertet und folgende Parameter ermittelt: R_{min} = 0,3, R_{max} = 7,3 und S_{f2}/S_{b2} = 9,13. Für K_d wurde ein Wert von 135 nM verwendet, der unter Bedingungen gemessen wurde, die in etwa den hier vorliegenden Versuchsbedingungen entsprachen (100 mM KCl, 20^o C, pH 7,1 - 7,2; *Grynkiewicz et al.* 1985). In Abb. 5B ist der Zusammenhang zwischen R und [Ca²⁺] dargestellt.

Bei der Übertragung der *in vitro*-Eichung auf die *in vivo*-Verhältnisse muss beachtet werden, dass sich die optischen Eigenschaften des Farbstoffs im Cytosol verändern können. Untersuchungen der spektralen Eigenschaften von Fura-2 *in vitro* zeigten eine Abhängigkeit vom pH und wiesen auf Interaktionen mit Proteinen hin (*Bancel et al.* 1992). Um zu prüfen, ob vergleichbare Effekte bei Neuronen des Blutegels auftreten, wurden die intrazellulär gemessenen Fura-2-Anregungsspektren durch eine gewichtete Überlagerung der *in vitro*-Spektren simuliert. Die gute Übereinstimmung der intrazellulär gemessenen mit den simulierten Spektren deutet darauf hin, dass die Farbstoffeigenschaften in den Zellen weitgehend erhalten (*Dierkes* 1998).

2.3.2.3. Messung von [Na⁺]_i mit SBFI

Zur Messung der cytosolischen Na^+ -Konzentration ($[Na^+]_i$) wurde der Fluoreszenzindikator SBFI (sodium-binding benzofuran isophtalate; *Minta & Tsien* 1989) verwendet. Die *in vitro*-Anregungsspektren bei unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen sind in Abb. 8A dargestellt. Die Bindung von Na⁺ an den Farbstoff (1:1-Stöchiometrie) führt zu einer leichten Verschiebung des Absorptionsmaximums von 344 nach 336 nm. Das Emissionsmaximum verschiebt sich durch die Bindung von Na⁺ ebenfalls zu kürzeren Wellenlängen. Auch bei SBFI wurde analog zu Fura-2 die Ratio-Methode angewendet (vergl. Gl. 6; $\lambda_1 = 340$ nm, $\lambda_2 = 380$ nm):

$$[Na^{+}] = K_{d} \cdot \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}\right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}}\right)$$
(8)

2.3.2.4. Eichung SBFI

Da sich die intrazellulär gemessenen SBFI-Spektren nicht durch *in vitro*-Spektren simulieren ließen, war eine *in vitro*-Eichung nicht möglich (*Dierkes et al.* 1998). Um von der SBFI-Fluoreszenz auf $[Na^+]_i$ schließen zu können, wurde das bei Retzius-Neuronen unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessene Fluoreszenzsignal anhand von $[Na^+]_i$ -Messungen mit ionensensitiven Glasmikroelektroden geeicht, die unter denselben Bedingungen erhalten wurden. Hierzu wurde die Beziehung zwischen R und $[Na^+]_i$ unter Verwendung des in Gl. 8 gegebenen Formalismus gefittet (Abb. 8C, siehe *Dierkes et al.* 1996, *Dierkes* 1998, *Nett & Deitmer* 1998). Für K_d wurde ein Wert von 17 mM verwendet, der unter Bedingungen ermittelt wurde, die den vorliegenden Versuchsbedingungen annähernd entsprachen ($[Na^+] + [K^+] = 135$ mM, 10 mM 3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), pH 7,05; *Minta & Tsien* 1989). Für die Fitparameter ergaben sich folgende Werte: R_{min} = 0,66, R_{max} = 1,90 und S_{f2}/S_{b2} = 5,18.

2.3.2.5. Messung von pH_i mit BCECF

Zur Messung des cytosolischen pH-Werts (pH_i) wurde 2´,7´-bis-(2-Carboxyethyl)-5,6carboxyfluoreszein (BCECF) verwendet (*Rink et al.* 1982, *Weinlich et al.* 1998). Das Anregungsspektrum von BCECF weist zwei Isofluarpunkte bei 360 und 440 nm auf (Abb. 9A). Die Bindung von H⁺ an den Farbstoff (1:1-Stöchiometrie) führt bei Anregung zwischen 360 und 440 nm zu einer Erhöhung und außerhalb dieses Bereichs zu einer Erniedrigung der Fluoreszenzemission (*Haugland* 2002). BCECF wurde analog zu Fura-2 nach der Ratio-Methode ausgewertet ($\lambda_1 = 440$ nm und $\lambda_2 = 470$ nm; *James-Kracke* 1992). Der Zusammenhang zwischen R und [H⁺] entspricht dem in Gl. 6 gegebenen Zusammenhang zwischen R und [Ca²⁺]. Für die Beziehung zwischen R und pH gilt somit die folgende Form der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, wobei pK_a = -log K_d (*James-Kracke* 1992):

$$pH = pK_{a} - log\left[\left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}\right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}}\right)\right]$$
(9)

2.3.2.6. Eichung BCECF

Die Eichung der BCECF-Fluoreszenz wurde mit Hilfe von Lösungen vorgenommen, die 100 μ M BCECF in 100 mM KCl enthielten und mittels verschiedener pH-Puffer auf pH-Werte zwischen 4,0 und 10,0 eingestellt waren: 10 mM Na-Succinat (pK_a = 4,25) für pH 4,0; 10 mM MOPS (pK_a = 7,20) für pH 6,0 und 7,0; 10 mM HEPES (pK_a = 7,55) für pH 7,0 und 8,0; 10 mM Glycin (pK_a = 9,78) für pH 10,0.

Die Beziehung zwischen R und [H⁺] wurde unter Verwendung des Formalismus von *Grynkiewicz et al.* (1985) gefittet (Abb. 9B). Für K_d wurde ein Wert von 107 nM (pK_a = 6,97) verwendet, der unter Bedingungen ermittelt wurde, die in etwa den vorliegenden Versuchsbedingungen entsprachen (130 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM MOPS; *Rink et al.* 1982). Ein ähnlicher Wert (6,72) wurde auch bei einer *in situ*-

Kalibrierung in Neuropil-Gliazellen des Blutegels erhalten (*Nett & Deitmer* 1996). R_{min} = 0,158 wurde aus dem *in vitro*-Spektrum der weitgehend deprotonierten Form von BCECF bei pH 10,0 übernommen. Für die zwei Fitparameter ergaben sich R_{max} = 0,453 und S_{f2}/S_{b2} = 3,45.

2.4. Farbstoffinjektion

Zur Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Segmentalganglien in spezielle Halterungen eingespannt. Diese Halterungen bestanden aus einem Deckglas (10 x 5 mm) auf das parallel zwei Minutiennadeln (Abstand 1-3 mm) mit ihren stumpfen Enden geklebt wurden. Zur Stabilisierung wurde ein zweites Deckglas (8 x 5 mm) auf das erste aufgeklebt, wodurch die stumpfen Enden der Minutiennadeln eingeschlossen wurden. Der Halter wurde in einem Faraday-Käfig in einer Petrischale (\emptyset 3 cm) fixiert, die mit physiologischer Salzlösung gefüllt war. Das Segmentalganglion wurde unter optischer Kontrolle (Stereolupe, V = 64x) mit Hilfe zweier Pinzetten in der Halterung befestigt, wobei die beiden Konnektive zwischen die Minutiennadeln und das größere Deckglas geklemmt wurden.

Zur Farbstoffinjektion wurden Glaskapillaren mit Innenfilament (GC 150F-15, \emptyset 1,5 mm, Clark Electromedical Instruments) mit einem Vertikal-Elektrodenpuller (Narishige PE-2) zu Mikroelektroden ausgezogen. Zum Füllen der Injektionselektrode wurde eine stumpfe, filamentlose Glaskapillare mit der wässrigen Lösung des Farbstoffs (siehe 2.8.) von hinten an das Filament der Injektionselektrode geführt. Über die entstehende Flüssigkeitsbrücke lief die Farbstofflösung zwischen Filament und innerer Kapillarwand bis in die Elektrodenspitze. Nach Einführen eines Silberdrahtes (\emptyset 0,1 mm) wurde das Elektrodenende mit Hartklebewachs (Deiberit 502) verschlossen. Der Widerstand der Injektionselektroden betrug in physiologischer Salzlösung ca. 100 M Ω . Dies entsprach in etwa dem dreifachen Widerstand der für die elektrophysiologischen Messungen verwendeten Mikroelektroden (siehe 2.7.). Die Injektionselektrode wurde unter optischer Kontrolle (Stereolupe) mit Hilfe eines Mikromanipulators in das jeweilige Neuron eingestochen. Der Einstich wurde auf einem Oszilloskop (PM3233,

Philips) verfolgt, wobei das Membranruhepotential (E_m) sowie Amplitude (A_{AP}) und Frequenz (f_{AP}) spontan auftretender Aktionspotentiale bestimmt wurden.

Die Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte über einen Iontophoreseverstärker (L/M-1, List) mittels hyperpolarisierender Ströme. Bei P-Neuronen wurde 45 Sekunden mit einer Stromstärke von 10 nA injiziert, bei Retzius-Neuronen betrug die Injektionszeit 60 Sekunden. 5 min Nach Beendigung der Injektion wurden E_m , A_{AP} und f_{AP} erneut bestimmt. Anschließend wurde die Halterung mit dem Präparat in die Messkammer des Mikrofluorimeters überführt.

Einige der verwendeten Farbstoffe waren ungeladen und konnten daher nicht per Iontophorese in die Neuronen gebracht werden. Diese Farbstoffe wurden mittels einer pneumatischen Picopumpe (PV830, WPI) per Druck injiziert (siehe 2.8.). Da die Injektionselektroden denen der Iontophorese entsprachen, war es wiederum möglich, die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neuronen über einen Silberdraht in der Injektionselektrode zu bestimmen. Der Haltedruck betrug 1,38 bar und der Injektionsdruck 4,14 bar. In einzelnen Experimenten wurde als dritte Beladungsmethode die Inkubation mit einer Farbstofflösung gewählt (vergl. 2.8.).

2.5. Mikrofluorimeter und Mikroskop

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem kommerziellen Mikrofluorimeter (Deltascan 4000, Photon Technology International, PTI) durchgeführt (Abb. 3). Das Anregungslicht lieferten zwei Xenon-Kurzbogenlampen (UXL-75XE, 75 Watt, Ushio). Mit Hilfe zweier rotierender Sektorscheiben (Chopper) wurde der Lichtbogen alternierend auf die Eintrittsspalten zweier Paare von Gitter-Monochromatoren abgebildet, die das Licht in seine spektralen Anteile zerlegten. Licht der benötigten Wellenlänge wurde unmittelbar hinter den Austrittsspalten der Monochromatoren von Quarzlichtleitern aufgenommen, in den Epifluoreszenzeingang eines Umkehrmikroskops (Diaphot-TMD, Nikon) eingespeist und durch ein UV-durchlässiges Objektiv (Fluor 40Ph 3DL, V = 40x, Nikon) zum Präparat geleitet. Das vom Präparat emittierte Licht

wurde über das Objektiv aufgefangen und durch ein Sperrfilter (BA 520/580, Nikon) vom Anregungslicht getrennt. Ein zweites UV-taugliches Objektiv (Fluor 10Ph 2DL, V = 10x, Nikon) wurde für fotografische Aufnahmen bzw. zur Justierung des Präparats genutzt. Die mit den Monochromatoren eingestellten Wellenlängen wurden regelmäßig mit zwei Bandengläsern überprüft (BG 20 und BG 36, Schott).

Eine Halogenlampe oberhalb des Präparats ermöglichte die Betrachtung im Durchlicht. In Kombination mit zwei Blau-Filtern mit UV-Durchlass (BG3 und BG12, Schott) wurde diese Lampe auch zur Fluoreszenzanregung benutzt. Mit Hilfe von Strahlenteilern konnte das Bild des Präparats entweder dem Betrachter, dem Photometer oder einer Kamera zugeführt werden. Das Photometer (PMT 4000, PTI) bestand aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) und optischen Hilfseinrichtungen zur Objektbetrachtung und Einstellung des Messareals. Im SEV trifft ein Photon auf eine negativ geladene Kathode und schlägt ein Elektron heraus, welches beschleunigt wird und aus einer Prallelektrode (Dynode) weitere Elektronen herausschlägt. Nach mehreren Dynodenschritten treffen die Elektronen auf die Anode und fließen über einen Arbeitswiderstand zur Masse ab. Die durch den Photonenstrom erzeugten Spannungspulse über dem Arbeitswiderstand wurden von einer Zählelektronik registriert, die über ein Interface mit einem Computer verbunden war. Der Computer wurde außer zur Datenaufnahme auch zur Systemsteuerung verwendet (Software: PTI).

2.6. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Zur Erstellung optischer Schnittbilder fluoreszenzmarkierter Zellen wurde eine kommerzielle Laserscan-Mikroskop-Einheit verwendet (Leica TCS NT, Leica; Abb. 4A). Das Mikroskop war mit drei Objektiven (HC PL Fluotar 10x, HC PL APO 20x, HCX PL APO 63x, Leica) ausgestattet, die zur Betrachtung des Präparats verwendet wurden. Ein Piezo-Element ermöglichte die vertikale Bewegung des Präparats während der Aufzeichnung mit einer Genauigkeit von 40 nm. Als Lichtquelle diente ein Argon-Krypton Laser (75 mW) der eine alternierende Fluoreszenzanregung bei drei Wellenlängen (488, 568 und 647 nm) ermöglichte. Zwei Bandpass- und ein LangpassFilter (BP 525/50, BP 600/30 und LP 665) dienten in Kombination mit drei Sekundärelektronenvervielfachern zur Aufzeichnung des Fluoreszenzlichts. Die Scannereinheit (CCD, 'charge coupled device') ermöglichte Aufzeichnungen von drei Bildern pro Sekunde mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln. Die Software des Systems diente neben der Steuerung des Geräts auch zur Aufzeichnung der Bilder.

Mit den verschiedenen Anregungswellenlängen und Filtern war es möglich, unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, um simultan ionale Transportsysteme, intrazelluläre Organellen, den Zellkern oder das Cytosol zu lokalisieren (vergl. Tabelle 1; siehe Abb. 4B, 12, 20, 25 und 30). Die nachträgliche computergestützte Bearbeitung ermöglichte es, die einzelnen Schnittbilder zu dreidimensionalen Bildern zusammenzusetzen, um morphologische Veränderungen zu beschreiben (Abb. 4B III, und 20).

2.7. Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Experimente wurden in einem geerdeten Faraday-Käfig durchgeführt. Die Segmentalganglien wurden mit Hilfe zweier Minutiennadeln in einer mit Sylgard® (Dow Corning®) ausgegossenen Versuchswanne (0,2 ml Volumen) an den Konnektiven so fixiert, dass die Ventralseite nach oben wies. Die Versuchswanne war über eine Agarbrücke (5 % Agar, 3 M KCl) geerdet.

Die Glasmikroelektroden waren mit 3 M KCl gefüllt und wiesen in physiologischer Salzlösung Widerstände von 20 bis 40 M Ω auf. Die Positionierung der Elektroden und der Elektrodeneinstich in die Neuronen erfolgte unter optischer Kontrolle (Binokular, Zeiss) mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators (Leitz). Die Versuchslösungen wurden über eine Durchflussapparatur appliziert (Durchflussgeschwindigkeit 2 ml/min) und mit einer Vakuumkolbenpumpe (Hyflo) über eine Glaskapillare wieder abgesaugt.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Zweikanal-Tintenschreibers aufgezeichnet (2200S, Gould). Ein Datenerfassungsprogramm und ein Datenkonvertierungsprogramm

(beide E. von Berg, Institut für Neurobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ermöglichten außerdem eine digitale Registrierung und die Auswertung in Microsoft Excel 2000.

2.8. Fluoreszenzfarbstoffe, Versuchslösungen und Pharmaka

In Tabelle 1 sind die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Konzentration, die Beladungsmethode und das jeweilige Anwendungsgebiet aufgeführt.

 Tabelle 1: Fluoreszenzfarbstoffe (Bezug über Fa. Molecular Probes)

Fluoreszenzfarbstoff	K	onzentration	Beladung	Anwendung
Fura-2	50 mM	(wässrige Lösung)	lontophorese	Ca ²⁺ -/Volumen
SBFI	50 mM	(wässrige Lösung)	Iontophorese	Na ⁺ -/Volumen
BCECF	50 mM	(wässrige Lösung)	Iontophorese	H⁺-/Volumen
Oregon Green ® 488 BAPTA-1	50 mM	(wässrige Lösung)	lontophorese	Volumen
Paclitaxel Oregon Green ® 488	20 µM	(wässrige Lösung)	Druckinjektion	Mikrotubulus
Bodipy FL Ouabain	20 µM	(gelöst in NSL)	Inkubierung	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
Bodipy FL Amilorid	20 µM	(gelöst in NSL)	Inkubierung	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
Mito Tracker ® Red CM-H ₂ XRos	250 nM	(gelöst in NSL)	Inkubierung	Mitochondrien
Propidium Iodid	500 nM	(gelöst in NSL)	Inkubierung	Zelltod

Alle Versuchslösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt (Entsalzungsanlage: Milli Q Reagent Watersystem, Millipore). Die Osmolalität der Versuchslösungen wurde wiederholt mit einem kommerziellen Osmometer (Osmomat 030, Gonotec) überprüft.

Als Normalsalzlösung (NSL, Ringer-Lösung) diente eine von *Munsch & Schlue* (1993) nach *Nicholls & Kuffler* (1964) modifizierte physiologische Salzlösung. Ihre Osmolalität entsprach mit 190 mosmol/kg der Osmolalität der Hämolymphe des Blutegels (190 - 200 mosmol/kg; *Zerbst-Boroffka* 1973). Zur Herstellung der Versuchslösungen wurden die folgenden Stammlösungen verwendet: KCl, CaCl₂, MgCl₂ (jeweils 1 M). NaCl, HEPES, Sorbitol und Glucose wurden in fester Form eingewogen. Die NSL enthielt 85 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ und 10 mM HEPES. Der

pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, war der pH-Wert aller Versuchslösungen auf 7,40 eingestellt.

In einigen Experimenten wurden CO_2/HCO_3^- -gepufferte Lösungen verwendet. Diesen Lösungen wurde 22 mM NaHCO₃ anstelle von NaCl zugesetzt und der pH-Wert durch ständige Begasung mit Carbogen (5 % CO_2 in O_2) eingestellt (*Schlue & Deitmer* 1987). In der Na⁺-freien Lösung war Na⁺ durch NMDG⁺ ersetzt, der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt. In der Cl⁻-freien Lösung war Cl⁻ durch Gluconat⁻ ersetzt, die pH-Einstellung erfolgte mit NaOH. In der 89 mM K⁺-Lösung war NaCl durch KCl ersetzt, der pH-Wert wurde mit KOH eingestellt. Die Ca⁺-freie Lösung wurde zusätzlich mit 5 mM EGTA versetzt.

Die anisotonischen Versuchslösungen waren Modifikationen der NSL. In den hypotonischen Salzlösungen war die NaCl-Konzentration reduziert, in den hypertonischen Salzlösungen war entweder die NaCl-Konzentration erhöht oder Sorbitol oder Glucose hinzugegeben. Die verschiedenen Versuchslösungen und ihre jeweilige Osmolalität sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Zusammensetzungen und Osmolalitäten der anisotonischen Versuchslösungen

hypertonisch, NaCl erhöht (mM)		+20	+30	+40	+60	+85	+170			
Osmolalität (mosmol/kg)	207	224	243	261	302	349	9 510			
hypotonisch, NaCl reduziert (mM)	-10	-20	-30	-40	-59	-81				
Osmolalität (mosmol/kg)	171	151	132	114	78	38			-	
hypertonisch, + Sorbitol (mM)	+10	+20	+40	+60	+80	+100	+170	+250	+340	+500
Osmolalität (mosmol/kg)	200	208	229	247	271	288	352	441	538	695
hypertonisch, + Glucose (mM)	+10	+20	+40	+60	+80	+100	+170	+250	+340	+500
Osmolalität (mosmol/kg)	200	213	233	252	274	289	361	442	562	702

Um die Beteiligung von Ionentransportsystemen oder des Cytoskeletts an Änderungen des Volumens und dessen Regulation zu überprüfen, wurden spezifische Pharmaka als Inhibitoren oder Aktivatoren eingesetzt (Tabelle 3). Es wurden sättigende Konzentration gewählt, wie sie auch für andere Präparate beschrieben sind.

Substanz	Konzentration	Wirkung	Bezug
9-AC	1 mM	Inhibitor Cl ⁻ -Kanal	Sigma
Amilorid	1 mM	Inhibitor Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	Sigma
Bumetanid	100 µM	Inhibitor Na ⁺ /K ⁺ 2Cl ⁻ -Cotransporter	Sigma
Clofilium Tosylat	1 μΜ	Inhibitor I _{K.Vol} -Kanal	Aldrich
Colchizin	25 nM	Depolymerisation Mikrotubuli	Sigma
Cytochalasin B	0,5 mM	Depolymerisation F-Aktins	Sigma
Cytochalasin D	0,5 mM	Depolymerisation F-Aktins	Fluka
Diazoxid	0,5 mM	Aktivator K _{ATP} -Kanal	Sigma
DIDS	0,5 mM	Inhibitor Cl ⁻ -Kanal, Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austauscher	Sigma
Furosemid	0,5 mM	Inhibitor Na ⁺ /K ⁺ 2Cl ⁻ -Cotransporter	Sigma
Glibenclamid	10 µM	Inhibitor KATP-Kanal	Sigma
Lidocain	5 mM	Inhibitor Na ⁺ -Kanal	Sigma
Minoxidil	10 µM	Aktivator K _{ATP} -Kanal	
Nifluminsäure	1 mM	Inhibitor CI ⁻ -Kanal	Sigma
NPPB	200 µM	Inhibitor Cl ⁻ -Kanal	Sigma
Ouabain	0,5 mM	Inhibitor Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Sigma
Paclitaxel	30 nM	Stabilisierung Mikrotubuli	Aldrich
Phenytoin	100 µM	Inhibitor Na ⁺ -Kanal	Sigma
Probenecid	2 mM	Inhibitor organ. Anionen-Transporter	Sigma
Triton X-100	2%	Detergens	Serva
Vinblastin	200 µM	Depolymerisation Mikrotubuli	Aldrich

 Tabelle 3: Pharmaka zur Beeinflussung von Ionentransportsystemen oder des Cytoskeletts (in alphabetischer Reihenfolge)

Colchizin, Cytochalasin B und D, Diazoxid, Nifluminsäure, Paclitaxel und Vinblastin wurden aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit vor der Zugabe zur NSL in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration an Ethanol in den verwendeten Lösungen lag unterhalb von 2%. Amilorid, DIDS und Nifluminsäure konnten nur in Verbindung mit BCECF als Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, da die drei Pharmaka kurzwelliges Licht < 400 nm absorbierten und so mit der Anregung der Fura-2- bzw. SBFI-Fluoreszenz interferierten.

2.9. Auswertung der Daten

Die unter identischen Versuchsbedingungen gewonnenen Daten wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (S. D.) angegeben. Bei den statistischen Auswertungen wurde der t-Test nach *Student* (1908) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p < 0,05 (bzw. hochsignifikant p < 0,01) festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der Versuchsbedingungen

3.1.1. Auswirkungen der Farbstoffinjektion

Bei Fura-2 handelt es sich einen Ca^{2+} -Indikator, der Ca^{2+} im physiologischen Konzentrations-Bereich bindet (K_d = 135 nM; *Grynkiewicz et al.* 1985). Demzufolge erhöht sich durch die Injektion von Fura-2 die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität. Um Aussagen über mögliche Auswirkungen dieses Effekts treffen zu können, wurden vor und nach der Farbstoffinjektion das Membranruhepotential sowie Frequenz und Amplitude spontan auftretender Aktionspotentiale der untersuchten Zellen ermittelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss der Farbstoffinjektion auf Membranruhepotential (E_m) , sowie Amplitude (A_{AP}) und Frequenz (F_{AP}) spontaner Aktionspotentiale bei Retzius- und P-Neuronen

Zelltyp	E _m (mV) vor Inj.	E _m (mV) nach Inj.	A _{AP} (mV) vor Inj.	A _{AP} (mV) nach Inj.	F _{AP} (Hz) vor Inj.	F _{AP} (Hz) nach Inj.
Retzius	-39 ± 7	-41 ± 8 **	18 ± 4	24 ± 8 **	12 ± 10	7 ± 7*
n =	279	279	259	259	259	259
Р	-39 ± 6	-41 ± 5 **	-	-	-	-
n =	118	118				

Mittelwerte (\pm S. D.) aus n = 118 - 279 Einzelmessungen. Die vor und nach der Injektion bestimmten Parameter wurden auf signifikante Unterschiede hin überprüft (* = p < 0,05; ** = p < 0,01). Von 279 untersuchten Retzius-Neuronen waren 20 nicht spontan aktiv, ebenso wie sämtliche P-Neuronen.

Bei Retzius- und P-Neuronen war das Membranruhepotential nach der Fura-2-Injektion geringfügig, jedoch signifikant in negative Richtung verschoben. Bei Retzius-Neuronen war zudem die Amplitude der Aktionspotentiale signifikant erhöht und deren Frequenz erniedrigt. Beide Effekte sind bei Verstellung des Membranruhepotentials in negative Richtung zu erwarten und lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass diese Verstellung durch die Ausbildung eines negativen Elektrodenpotentials vorgetäuscht ist (siehe *Dierkes* 1994). Bei P-Neuronen kann eine entsprechende Aussage nicht getroffen werden, da diese Zellen weder vor noch nach der Farbstoffinjektion spontan aktiv waren.

Die Ruhewerte für $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und pH_i von Retzius- und P-Neuronen sind in Tabelle 5 wiedergegeben. In wenigen Experimenten wurde bei Messbeginn eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet, die jedoch nach 3 bis 5 min auf den basalen Wert zurückkehrte. Diese zeitweilige Erhöhung könnte auf die Entfernung der Injektionselektrode nach der Farbstoffbeladung zurückzuführen sein. Hierfür sprechen Befunde bei anderen Präparaten, bei denen nach einer Axotomie $[Ca^{2+}]_i$ lokal stark erhöht war, jedoch nach selbsttätigem Schließen der verletzten Membranstelle innerhalb kurzer Zeit wieder zurückreguliert wurde (*Ziv & Spira* 1995). Anfängliche Abweichungen von $[Na^+]_i$ oder pH_i von den Ruhewerten konnten bei gleichen Injektionsparametern der Farbstoffe SBFI und BCECF nicht beobachtet werden.

Tabelle 5: $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und pH_i von Retzius- und P-Neuronen unter Ruhebedingungen

	Retzius-Neuronen	P-Neuronen	
[Ca ²⁺] _i (nM)	77 ± 9	70 ± 9	
n =	207	76	
[Na⁺] _i (mM)	7 ± 3	6 ± 2	
n =	54	12	
pHi	7,28 ± 0,17	7,26 ± 0,13	
n =	49	26	

Mittelwerte (± S. D.).

3.2. Mikrofluorimetrische Messungen von Zellvolumenänderungen

3.2.1. Eignung der verwendeten Farbstoffe

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass Änderungen des Zellvolumens mikrofluorimetrisch gemessen werden können (*Crowe et al.* 1995, *Altamirano et al.*

1998, *Weinlich et al.* 1998). Hierzu eignen sich Fluoreszenzfarbstoffe, deren Fluoreszenzemission nur von der Farbstoffkonzentration abhängt, nicht jedoch von anderweitigen Veränderungen des cytosolischen Milieus. Bei Fura-2 ist diese Bedingung am Isofluarpunkt bei 360 nm (siehe Abb. 5) erfüllt, wie das Experiment in Abb. 6A zeigt. Die Applikation einer Versuchslösung, in der Na⁺ durch K⁺ ersetzt war (89 mM K⁺), führte zu einem raschen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 6A), der auf die Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle durch die K⁺-induzierte Membrandepolarisation zurückzuführen ist (*Dierkes* 1997). Dieser $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war erkennbar durch einen raschen Abfall von F₃₈₀ und einem schnellen Anstieg von F₃₄₀. Dahingegen blieb F₃₆₀ unverändert; erst nach ca. 50 s war ein langsamer Abfall zu beobachten, der vermutlich auf einer Zellschwellung beruhte (vergl. *Neumann et al.* 2001).

Während der Messungen wurde ein Farbstoffverlust der Neuronen beobachtet, der sich durch eine einfache Exponentialfunktion beschreiben ließ. Dadurch konnte die gemessene Fluoreszenz hinsichtlich des Farbstoffverlustes korrigiert werden und durch Volumenänderungen bedingte Fluoreszenzänderungen isoliert werden (rote Linie, Abb. 7). Der einfach exponentielle Farbstoffverlust deutet darauf hin, dass der Farbstoff lediglich im osmotisch aktiven Kompartiment (dem Cytosol) der Neuronen lokalisiert war. Entsprechend führte die Permeabilisierung der Zellmembran durch das Detergens Triton X-100 (2%) zu einem einphasigen Abfall von F₃₆₀ (Abb. 6B). Bei gleichzeitiger Lokalisation des Farbstoffs in anderen Kompartimenten, beispielsweise intrazellulären Organellen, wäre mit einem komplexeren Zeitverlauf der Fluoreszenzabnahme zu rechnen (vergl. *Crowe et al.* 1995, Abb. 6B).

Der Farbstoffverlust ist vermutlich auf einen Transport von Fura-2 aus der Zelle zurückzuführen. Bei den Neuropil-Gliazellen des Blutegels wurde ein Probenecidsensitiver organischer Anionentransporter beschrieben, der Fura-2 aus den Zellen transportiert (vergl. *Munsch & Deitmer* 1995). Der Fura-2-Verlust konnte bei Retzius-Neuronen durch Probenecid (2 mM), einem Inhibitor organischer Anionen-Transporter, weitgehend verhindert werden (Abb. 6C).

3.2.2. Fluoreszenzänderungen unter anisotonischen Bedingungen

Eine Volumenänderung führt zu einer Änderung des Zellwasservolumens (cell water volume, CWV) und somit zu einer Konzentrationsänderung des Farbstoffs. Da die Farbstoffmenge in der Zelle und damit die Gesamtfluoreszenz konstant bleibt, wurde die Fluoreszenzemission nur in einem kleinen Ausschnitt der Zelle bestimmt um derartige Konzentrationsänderungen zu messen (C*rowe et al.* 1995, siehe 3.2.3.).

Fura-2 als Volumenmarker

Bei Applikation einer hypertonischen Versuchslösung (+85 mM NaCl, 349 mosmol/kg) zeigte sich eine reversible Erhöhung der durch 360 nm angeregten Fura-2-Fluoreszenz (F_{360}), während bei Applikation hypotonischer Versuchslösungen (-59 mM NaCl, 78 mosmol/kg) eine reversible Fluoreszenzabnahme auftrat (Abb. 7A). Eine Fluoreszenzzunahme spiegelt eine Zellschrumpfung und eine Abnahme eine Zellschwellung wider. Der Fura-2-Verlust konnte durch einen exponentiellen Zeitverlauf beschrieben (rote Linie, Abb. 7A) und somit die Volumen-bedingten Fluoreszenzänderungen isoliert werden (Abb. 7B). Die Änderung der Badosmolarität hatte praktisch keinen Einfluss auf [Ca²⁺]_i (Abb. 7C).

3.2.3. Einfluss des Messareals

Der Einfluss des Messareals auf die Fluoreszenzänderungen bei experimentell induzierten Volumenänderungen wurde bestimmt, in dem die Größe des Messareals auf 5, 15, 75 und 100 % des Zellquerschnitts eingestellt wurde. Die Volumenänderung wurde durch eine schwach hypertonische (+30 mM NaCl; 243 mosmol/kg) und eine schwach hypotonische (-30 mM NaCl; 132 mosmol/kg) Versuchslösung, die in unterschiedlicher Reihenfolge appliziert wurden, ausgelöst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

% der Zellfläche	5	15	75	100
	Vol _{rel.} (%)	Vol _{rel.} (%)	Vol _{rel.} (%)	Vol _{rel.} (%)
-30 mM NaCl	129 ± 5	124 ± 11	125 ± 5 *	113 ± 4 **
+30 mM NaCl	82 ± 4	85 ± 4	87 ± 2	89 ± 4 *
+30 mM NaCl	83 ± 4	87 ± 2	86 ± 4	91 ± 1 **
-30 mM NaCl	128 ± 7	124 ± 7	122 ± 8 *	114 \pm 1 **

Tabelle 6: Einfluss des Messareals (% der Zellfläche) auf die registrierte Volumenänderung.

Mittelwerte (\pm S. D.) 5 min nach Änderung der extrazellulären Osmolarität (jeweils n = 5). Die Ergebnisse wurden auf signifikante Unterschiede hinsichtlich des kleinsten Messareal überprüft (* = p < 0,05; ** = p < 0,01). Die Reihenfolge der Applikation wurde variiert.

Es zeigte sich, dass bei den größeren Messarealen (75 %, 100 %) Volumenänderungen um bis zu 50 % unterschätzt wurden, unabhängig von der Reihenfolge, in der die Lösungen appliziert wurden. In den nachfolgend beschriebenen Messungen wurde eine Diaphragmagröße gewählt, die 5 - 10 % des sichtbaren Zellquerschnitts erfasste.

3.2.4. Einfluss der injizierten Farbstoffmenge

Um den Einfluss der injizierten Farbstoffmenge auf die Messung des Zellvolumens zu überprüfen, wurden Experimente an Retzius-Neuronen durchgeführt, die unterschiedlich lang mit Fura-2 beladen wurden (10 - 200 s, 10 nA). Volumenänderungen wurden wiederum mit schwach anisotonischen Versuchslösung ausgelöst (+/-30 mM NaCl). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, was auf einen geringen Einfluss der injizierten Farbstoffmenge schließen lässt (Tabelle 7). Dennoch wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten eine eher kurze Injektionsdauer verwendet (Retzius-Neuronen: 60 s, P-Neuronen: 45 s) um die intrazelluläre Pufferkapazität möglichst wenig zu beeinflussen. Bei Retzius-Neuronen sind Ruhemembranpotential sowie Amplitude und Frequenz der Aktionspotentiale von der injizierten Farbstoffmenge (*Dierkes* 1998).
Tabelle 7: Einfluss der injizierten Farbstoffmenge auf Volumenänderungen von Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen. Die Farbstoffmenge wurde durch Änderung der Injektionsdauer variiert (Stromstärke: 10 nA).

Injektionsdauer	Vol _{rel.} (%)	Vol _{rel.} (%)
(s)	-30 mM NaCl	+30 mM NaCl
10	123 ± 4	85 ± 9
20	121 ± 13	83 ± 4
40	129 ± 13	83 ± 3
60	122 ± 11	85 ± 3
100	124 ± 3	87 ± 2
200	120 ± 1	90 ± 0

Angegeben sind Mittelwerte (\pm S.D.) des minimalen bzw. maximalen Volumens unter anisotonischen Bedingungen (Vol_{rel.}). Die anisotonischen Lösungen wurden für 5 min appliziert (n = 4-22).

SBFI als Volumenmarker

Der Isofluarpunkt des Na⁺-sensitiven Farbstoffs SBFI liegt *in vitro* bei 370 nm (Abb. 8A, vergl. *Minta & Tsien* 1989). Die Experimente dieser Arbeit und auch Befunde von *Diarra et al.* (2001) zeigten, dass das intrazellulär gemessene SBFI-Anregungsspektrum zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist. Um den Isofluarpunkt zu identifizieren, wurden die Präparate mit K⁺-freier Lösung überspült, um durch Hemmung der Na⁺/K⁺- ATPase einen Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration ([Na⁺]_i) auszulösen (Abb. 8B, 17; vergl. 3.3.1.). Das Zellvolumen wird durch Entzug des extrazellulären K⁺ nicht beeinflusst (vergl. 3.3.1.). Wie Fura-2 wurde SBFI mit den Wellenlängen 340, 360 und 380 nm angeregt (F₃₄₀, F₃₆₀ und F₃₈₀). Die K⁺-freie Lösung führte zu einem Abfall von F₃₆₀ und F₃₈₀, wohingegen F₃₄₀ unbeeinflusst blieb (Abb. 8B). Dies zeigt, dass der Isofluarpunkt bei 340 nm liegt und folglich wurden die Messungen des Zellvolumens bei einer Anregung mit dieser Wellenlänge durchgeführt. Der SBFI-Verlust war geringer als der von Fura-2 (vergl. Tabelle 8), konnte aber wiederum mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden (Abb. 10). Auch SBFI schien somit ausschließlich im Cytosol lokalisiert zu sein.

BCECF als Volumenmarker

Der pH-sensitive Farbstoff BCECF wies zwei Isofluarpunkte bei 360 und 440 nm auf, die prinzipiell beide zur Volumenmessung geeignet sind (vergl. Abb. 9A). Manche der hier verwendeten Pharmaka (z. B. Amilorid, DIDS) absorbieren Anregungslicht im kurzwelligen Bereich (< 400 nm) und verursachen so zusätzlich zum Farbstoffverlust eine volumenunabhängige Fluoreszenzänderung. In Gegenwart dieser Substanzen war es angezeigt, das Zellvolumen durch BCECF-Anregung mit 440 nm zu verfolgen. Auch der BCECF-Verlust war deutlich geringer als der von Fura-2 und ließ sich ebenfalls mit einer Exponentialfunktion beschreiben (vergl. Tabelle 8, Abb. 10).

Die Geschwindigkeit des Farbstoffverlusts war Farbstoff- und Zelltyp-spezifisch. Der schnellste Farbstoffverlust zeigte sich für Fura-2 bei Retzius-Neuronen. Im Gegensatz dazu war der Fura-2-Verlust bei P-Neuronen signifikant langsamer. Auch bei BCECF war der Farbstoffverlust bei Retzius-Neuronen signifikant schneller als bei P-Neuronen. Beide Neurontypen zeigten dagegen im Fall von SBFI einen ähnlichen Farbstoffverlust. Die Zeitkonstanten (τ [s]) für den Farbstoffverlust von Fura-2, SBFI und BCECF in Retzius- und P-Neuronen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zeitkonstanten des Farbstoffverlustes von Fura-2, SBFI und BCECF beiRetzius- und P-Neuronen.

Farbstoff	Retziu	is-Neuron	nen	P	P-Neuronen							
Fura-2	1425 ±	405 s	(12)	6025	±	2081 s	(12)	**				
SBFI	3921 ±	1287 s	(14)	3422	±	1359 s	(9)					
BCECF	2520 ±	374 s	(10)	14400	±	5867 s	(12)	**				

Mittelwerte (\pm S. D.), die Daten wurden auf signifikante Unterschiede zwischen Retzius- und P-Neuronen überprüft (* = p<0,05; ** = p<0,01). Die Anzahl der Messungen ist in Klammern angegeben.

Die mit Fura-2, SBFI und BCECF gemessenen Volumenänderungen waren praktisch identisch (Abb. 11). Unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl, 5 min) betrug die maximale Zellschrumpfung gemessen mit Fura-2 72 \pm 6 %, mit BCECF 73 \pm 7 % und mit SBFI 69 \pm 7 %. Unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl, 5 min) betrug die maximale Zellschwellung gemessen mit Fura-2 157 \pm 20 %, mit BCECF 160 ± 15 % und mit SBFI 164 ± 14 % (n = 9 - 85, Abb. 11). Die drei verwendeten Farbstoffe sind somit zur Volumenregistrierung gleichermaßen geeignet.

3.3. Volumenänderungen unter isotonischen Bedingungen

3.3.1. Wirkung von Ouabain und K⁺-freier Lösung auf Zellvolumen, [Ca²⁺]_i, [Na⁺]_i und E_m unter isotonischen Bedingungen

Die Konzentration organischer (meist negativ geladener) Osmolyte, wie Proteine, Aminosäuren oder Carbohydrat-Metabolite ist intrazellulär höher als extrazellulär. Dieses Ungleichgewicht wird im Wesentlichen durch eine niedrige intrazelluläre Cl⁻ Konzentration ausgeglichen, die durch das negative Membranpotential bedingt ist, welches Cl⁻ aus der Zelle treibt (*Lang et al.* 1998a). Dieses Gleichgewicht wird letztlich durch die Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten, die Na⁺ aus der Zelle heraus und im Gegenzug K⁺ in die Zelle hinein transportiert.

Das herzaktive Digitalis-Glykosid Ouabain (G-Strophantin) ist bekannt für seine hemmende Wirkung auf die Na⁺/K⁺-ATPase (*Scheiner-Bobis & Schoner* 2001), wobei die katalytische α -Untereinheit der ATPase die Bindestelle für Ouabain beinhaltet (*Juhaszova & Blaustein* 1997). Konfokale Aufnahmen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy FL Ouabain, das spezifisch die Na⁺/K⁺-ATPase markiert, zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase in der Plasmamembran von Retzius-Neuronen (Abb. 12).

Eine 10-minütige Badapplikation von Ouabain (0,5 mM) führte bei Retzius-Neuronen zu einer mehrphasigen Membrandepolarisation sowie zu einem Anstieg von $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ und (Abb. 13, vergl. *Deitmer & Schlue* 1983, *Schlue* 1991, *Hochstrate & Schlue* 2001). Weiterhin löste Ouabain eine deutliche Zellschwellung aus. Alle Effekte waren reversibel (Abb. 13).

Die Ouabain-induzierte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ verlief oftmals mehrphasig, was auf die unterschiedliche Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen durch die

mehrphasige Membrandepolarisation zurückzuführen sein könnte (vergl. *Hochstrate & Schlue* 2001). Die Zellschwellung setzte erst ca. 5 min nach Applikation von Ouabain ein, wohingegen Membrandepolarisation und $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg deutlich früher auftraten. Die maximalen Änderungen von E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und Zellvolumen waren jedoch zum gleichen Zeitpunkt zu beobachten.

Auch in Ca^{2+} -freier Lösung induzierte Ouabain eine Zellschwellung (Abb. 15A), jedoch war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg reversibel unterdrückt (Abb. 15B). Die Ca^{2+} -freie Lösung selbst führte zu starken Oszillationen des Membranpotentials, die in Gegenwart von Ouabain verschwanden (Abb. 15C).

In Cl⁻ oder Na⁺-freier Lösung hatte Ouabain dagegen keine Wirkung auf das Zellvolumen (Abb. 14A und B). Weiterhin waren in Cl⁻-freier Lösung der Ouabaininduzierte $[Na^+]_i$ - und $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vermindert und in Na⁺-freier Lösung vollständig unterdrückt. Auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ hatte der Entzug des extrazellulären Cl⁻ keinen Einfluss (Abb. 14). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Abb. 16 graphisch dargestellt.

Tabelle 9: Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf Zellvolumen, [Ca²⁺]_i und [Na⁺]_i in NSL sowie in Ca²⁺-freier, Cl⁻-freier und Na⁺-freier Lösung unter jeweils isotonischen Bedingungen

			0,5 mM (Duabain	
Außenmedium	NSL	NSL	Ca ²⁺ -frei	Cl ⁻ frei	Na ⁺ -frei
Vol _{rel.} (%)	100 ± 0 (25)	128 ± 11 (19)	130 ± 14 (7)	102 ± 4 (15)	104 ± 3 (6)
	basale [Ca ²⁺] _i	max. [Ca ²⁺] _i			
[Ca ²⁺] _i (nM)	80 ± 13 (25)	560 ± 139 (13)	87 ± 14 (4)	579 ± 136 (6)	80 ± 5 (2)
	basale [Na⁺] _i	max. [Na⁺] _i	max. [Na⁺] _i	max. [Na⁺] _i	max. [Na⁺] _i
[Na [⁺]] _i (mM)	7 ± 2 (20)	73 ± 39 (7)	74 ± 38 (3)	57 ± 37 (5)	6 ± 3 (5)

Mittelwerte (\pm S. D) aus n = 2-25 Experimenten.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aufnahme von Na⁺ und Cl⁻ für die Ouabaininduzierte Zellschwellung verantwortlich ist. Es ist davon auszugehen, dass die Ouabain-induzierte Membrandepolarisation die Cl⁻Aufnahme fördert. Um dies zu prüfen wurden Experimente durchgeführt, in denen die Na⁺/K⁺-ATPase durch Entzug des extrazellulären K⁺ inhibiert wurde (Abb. 17). Die 20-minütige Applikation von K⁺freier Lösung hatte eine deutliche E_m-Verschiebung zur Folge, von -48 ± 8 mV auf -59 ± 11 mV (n = 6). Das Zellvolumen (Vol_{rel.} max. = 98 ± 2 %, n = 13) und [Ca²⁺]_i (von 80 ± 20 nM auf 77 ± 24 nM, n = 3) blieben unbeeinflusst, wohingegen [Na⁺]_i hochsignifikant und reversibel anstieg (von 8 ± 2 mM auf 28 ± 20 mM, p < 0,01, n = 10; Abb. 17). Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass die Membrandepolarisation wesentlich an der Ouabain-induzierten Zellschwellung beteiligt ist.

3.4. Wirkung anisotonischer Bedingungen auf Zellvolumen, $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$, pH_i und E_m

Würden sich Neuronen wie ideale Osmometer verhalten, sollte folgender Zusammenhang gelten:

$$\frac{\mathbf{V}_{\mathrm{exp}}}{\mathbf{V}_{0}} = \frac{\pi_{0}}{\pi_{\mathrm{exp}}} \tag{11}$$

Hier stellt V₀ das Ausgangsvolumen in physiologischer Salzlösung mit der Osmolalität π_0 dar und V_{exp} das Volumen in anisotonischer Lösung mit der Osmolalität π_{exp} . Der Zusammenhang in Gl. 11 ist durch die roten Geraden in Abb. 19 dargestellt.

In den folgenden Experimenten wurde die Osmolalität der Badlösung durch Zugabe von NaCl, Sorbitol oder Glucose erhöht und durch Wegnahme von NaCl erniedrigt (siehe Tabellen 10 und 11). Die gemessenen Volumenänderungen wurden mit dem Verhalten eines idealen Osmometers verglichen, um eventuelle volumenregulatorische Vorgänge aufzuzeigen.

3.4.1. Änderungen der NaCl-Konzentration

In Abb. 18 sind Registrierbeispiele zur Volumenänderung und -regulation in stark anisotonischen Versuchslösungen dargestellt, die durch Zugabe bzw. Wegnahme von NaCl hergestellt wurden. In hypertonischer Lösung (+85 mM NaCl) war die maximale Schrumpfung innerhalb der ersten Minute erreicht, danach setzte bei Retzius- wie bei P-Neuronen in manchen Experimenten eine regulatorische Volumenzunahme (RVI) ein (Abb. 18A). Bei P-Neuronen wurde nach Rückwechsel in NSL gelegentlich ein "Overshoot" beobachtet, der auf eine Aufnahme von Osmolyten während der Volumenregulation zurückzuführen sein könnte. Dadurch wäre die intrazelluläre Osmolalität höher als die der NSL, so dass eine zusätzliche Wasseraufnahme zu erwarten ist. Unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) war die maximale Schwellung bei beiden Zelltypen erst am Ende der 5-minütigen Applikationsdauer erreicht (Abb. 18B). Eine regulatorische Volumenabnahme (RVD) trat nicht auf, jedoch war die Schwellung der Retzius-Neuronen kleiner als die der P-Neuronen, was ein Indiz für eine Volumenregulation während der Schwellungsphase sein könnte.

Der Effekt anisotonischer Versuchslösungen (Zugabe/Wegnahme von NaCl) auf das Volumen von Retzius- und P-Neuronen sowie die auftretende Volumenregulation sind in Tabelle 10 und Abb. 19 dargestellt. Beide Zelltypen zeigten signifikante Abweichungen vom Verhalten eines idealen Osmometers. Die Abweichungen traten bei einer Erhöhung der Badosmolarität um mehr als 15 % auf bzw. bei einer Erniedrigung um mehr als 20 %.

NaCl	ideales Osmo-	Re	tzius-	Neuronen			P-Ne	euronen				
(mM)	meter (%)	Vol _{rel.} (%))	Vol _{rel.} (%) na	ach RVI	Vol _{rel.} (%)	Vol _{rel.} (%) nach RVI				
+170	37	68 ± 7 *	(3)	-		59 ± 1	(2)	65 ± 4	(2/2)			
+85	54	74 ± 7 **	(84)	82 \pm 6 **	(26/84)	78 ± 7 **	(77)	88 ± 8 **	(51/77)			
+60	63	79 ± 4 *	(6)	$84~\pm~4$	(2/6)	75	(1)	-				
+40	73	83 ± 2 *	(4)	-		81 ± 7 *	(4)	89	(1/4)			
+30	78	84 ± 4 *	(13)	-		85	(1)	-				
+20	83	90 ± 2	(6)	-		88	(1)	-				
+10	92	94 ± 1	(5)	100	(1/5)	92 ± 0	(2)	-				
±0	100		1	00		100						
-10	111	107 ± 1	(5)	-		107	(1)	-				
-20	126	116 ± 4 *	(5)	-		111	(1)	-				
-30	144	122 ± 8 **	(10)	-		130 \pm 11 *	(4)	-				
-40	167	142 \pm 19 **	(6)	-		136 ± 1	(2)	-				
-59	243	159 \pm 22 **	(56)	-		192 \pm 30 **	(12)	-				
-81	300	180 \pm 41 *	(13)	-		231 ± 4	(2)	-				

Tabelle 10:Effekt anisotonischer Versuchslösungen (Zugabe / Wegnahme von NaCl)
auf das Volumen von Retzius- und P-Neuronen

Angegeben sind das minimale bzw. maximale Volumen unter anisotonischen Bedingungen, jeweils normiert auf das Ausgangsvolumen in NSL (Vol_{rel.}), sowie Vol_{rel.} nach RVI. Die anisotonischen Lösungen wurden für 5 min appliziert. Mittelwerte (\pm S.D)., die Zahl der Messungen ist in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zum Verhalten eines idealen Osmometers sind gekennzeichnet (* = p < 0,05; ** = p < 0,01).

Bei Zellen mit RVI war die maximale Volumenabnahme höher als die am Ende der 5minütigen Applikationsdauer der hypertonischen Lösung (vergl. Abb. 18A). Dabei zeigte sich, dass RVI mit zunehmender Hypertonizität der Versuchslösungen häufiger auftrat. Weiterhin war RVI bei P-Neuronen häufiger zu beobachten als bei Retzius-Neuronen. So zeigten beispielsweise 66 % der P-Neuronen und nur 31 % der Retzius-Neuronen in +85 mM NaCl RVI. In dieser Lösung schrumpften P-Neuronen ohne RVI auf 78 % des Ausgangsvolumens, wohingegen P-Neuronen mit RVI bei gleicher anfänglicher Schrumpfung innerhalb von 5 min auf 88 % des Ausgangsvolumens zurückregulierten. Bei Retzius-Neuronen war RVI schwächer ausgeprägt, wobei Zellen mit RVI anfänglich auf 74 % schrumpften nach 5 min ein Volumen von 82 % erreichten.

3.4.2. Zugabe von Sorbitol oder Glucose

In hypertonischen Versuchslösungen, deren Osmolalität durch Zugabe von Sorbitol oder Glucose erhöht wurde, traten wie bei Zugabe von NaCl reversible Schrumpfungen auf (Tabelle 11). Auch hier zeigten sich bei Retzius- und P- Neuronen signifikante Abweichungen vom Verhalten eines idealen Osmometers erst in Lösungen mit höheren Sorbitol- oder Glucose-Konzentrationen. (+40 mM Sorbitol, +20 mM Glucose, siehe Tabelle 11), deren Osmolalität etwa der von Lösungen mit erhöhter NaCl-Konzentration entsprach, bei denen ähnliche Abweichungen auftraten (Tabelle 2). Auch in Sorbitol- oder Glucose-haltigen Versuchslösungen trat bei beiden Neurontypen RVI auf.

Tabelle 11: Effekt der Zugabe von Sorbitol oder Glucose auf das Volumen von Retzius- und P- Neuronen

Sorbitol	ideales Osmo-	Retz	ius-N	Veurone	n			P-Ne	uronen					
(mM)	meter (%)	Vol _{rel.} (%) ma	ax	Vol _{rel.} (%	6) na	ach RVI	Vol _{rel.} (%)	max	Vol _{rel.}	(%) na	ach RVI			
0	100		10	00			100							
+10	95	96 ± 1	(6)	97		(1/6)	94 ± 5	(2)	100		(1/2)			
+20	91	92 ± 2	(9)		-		91 ± 2	(5))	-				
+40	83	91 ± 3 **	(7)	99		(1/7)	91 ± 3*	* (2))	-				
+60	77	84 ± 2 **	(4)		-		86 ± 8*	* (2))	-				
+80	70	83 ± 2 **	(4)		-		77	(1)	80		(1/1)			
+100	66	80 ± 6 **	(7)	87		(1/7)	83	(1)	90		(1/1)			
+170	54	73 ± 5 **	(15)	92		(1/15)	78 ± 11	** (7)	89 :	± 5 **	(3/7)			
+250	43	$70 \pm 6 **$	(10)	$77 \pm$	4	(2/10)	68	(1))	-				
+340	35	62 ± 7 **	(4)		-		71 ± 2*	* (2)	76		(1/2)			
+500	27	67 ± 7 **	(8)		-		63 ± 3*	* (3))	-				
Glucose	ideales Osmo-	Retz	ius-N	Veurone	n			P-Ne	uronen					
(mM)	meter (%)	Vol _{rel.} (%) ma	ax	Vol _{rel.} (¢	%) na	ach RVI	Vol _{rel.} (%)	nax	Vol _{rel.}	(%) na	ch RVI			
0			10	00				1	00					
+20	89	92	(1)		-		96 ± 1 **	(2)	96		(1/2)			
+40	82	88 ± 2 **	(3)		-		89 ± 3 **	(3)		-				
+60	77	85 ± 4 **	(3)		-		87 ± 5 **	(4)	91 \pm	5	(2/4)			
+80	69	80 ± 0 **	(2)		-		86 ± 5 **	(3)	91 \pm	4	(2/3)			
+100	66	83 ± 1 **	(2)	86		(1/2)	81	(1)		-				
+170	53	70 ± 11 **	(10)		-		75 ± 8**	(15)	$81 \pm$	4 **	(5/15)			
+250	43	65 ± 4 **	(4)		-		69 ± 9**	(2)	74		(1/2)			
+340	34	63 ± 11 **	(7)		-		72 ± 8**	(23)	$87~\pm$	5 **	(12/23)			
+500	27	61 ± 10 **	(3)		-		60 ± 7 **	(2)	65		(1/2)			

Angegeben sind das minimale bzw. maximale Volumen unter hypertonischen Bedingungen, jeweils normiert auf das Ausgangsvolumen in NSL (Vol_{rel.}), sowie Vol_{rel.} nach RVI. Die hypertonischen Lösungen wurden für 5 min appliziert. Mittelwerte \pm S.D., die Zahl der Messungen ist in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zum Verhalten eines idealen Osmometers sind gekennzeichnet (* = p < 0,05; ** = p < 0,01). Die Daten in den Tabellen 10 und 11 zeigen insgesamt, dass es bei den untersuchten Neuronen unter hypertonischen Bedingungen häufig zu einer Volumenregulation (RVI) kam. Diese trat in stark hypertonischen Versuchslösungen eher auf als in schwach hypertonischen. Bei P-Neuronen konnte eine Volumenregulation häufiger als bei Retzius-Neuronen beobachtet werden. Die Häufigkeit des Auftretens einer Volumenregulation war unabhängig davon, ob die Osmolarität der Versuchslösung durch NaCl, Sorbitol oder Glucose geändert wurde. Deshalb wurde in die folgenden Versuchen auf Sorbitol und Glucose verzichtet.

3.4.3. Morphologische Änderungen der Neuronen unter anisotonischen Bedingungen

Unter isotonischen Bedingungen wiesen die Zellkörper der Retzius-Neuronen eine annähernd kugelförmige Gestalt auf, wie die konfokalen Aufnahmen in Abb. 20 zeigen. In hypertonischer Lösung (+85 mM NaCl) waren die Zellkörper bereits nach 5 min stark geschrumpft, wobei häufig Membraneinstülpungen (Invaginationen) zu beobachten waren (Abb. 20A II). In hypotonischer Lösung (-59 mM NaCl) waren die Zellen dagegen stark geschwollen, wobei große Membranbereiche ausgestülpt waren (Evaginationen bzw. 'blebs'; Abb. 20B II). Sowohl Schrumpfung als auch Schwellung waren innerhalb von 2 min vollständig reversibel.

Zwei weitere Prozesse, die mit der RVD und der RVI in engem Zusammenhang stehen, aber nicht mit ihnen verwechselt werden dürfen, sind die nekrotische Volumenzunahme (necrotic volume increase, NVI) und die apoptotische Volumenabnahme (apoptotic volume decrease, AVD). Bei der NVI führt eine Zellschwellung unter isotonischen Bedingungen zu DNA-Fragmentierung und nachfolgendem Zelltod. Vorgänge, die auch durch unzureichende RVD, unter hypotonischen Bedingungen, eintreten können. Bei der AVD führt eine Zellschrumpfung unter isotonischen Bedingungen zum programmierten Zelltod (Apoptose), was unzureichender RVI unter hypertonischen Bedingungen gleichzusetzen ist (*Okada et al.* 2001). Um Auswirkungen der anisotonischen Lösungen auf die Vitalität der Zellen zu prüfen erfolgte eine Anfärbung der Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidium Iodid, das bei lysierten Zellen durch Interkalation an die DNA und RNA bindet und somit als Zelltod-Marker verwendet werden kann (*Haugland* 2002). In konfokalen Aufnahmen von Neuronen, die unterschiedlichen osmotischen Verhältnissen ausgesetzt waren, ließ sich jedoch nie eine Anfärbung des Zellkerns mit Propidium Iodid feststellen, und waren Änderungen der Zellkernmorphologie zu erkennen, so dass irreversible Zellschädigungen ausgeschlossen werden konnten.

3.4.4. Wirkung anisotonischer Bedingungen auf [Ca²⁺]_i, [Na⁺]_i, pH_i und E_m

Anisotonische Versuchsbedingungen (+85/-59 mM NaCl) hatten bei Retzius- und P-Neuronen nahezu keinen Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$. Es wurden lediglich geringe $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege im nanomolaren Bereich beobachtet. Bei Retzius-Neuronen führten anisotonische Versuchslösungen zu einer schwachen Ansäuerung und bei P-Neuronen zu einer Alkalinisierung. Bei beiden Neuron-Typen stieg $[Na^+]_i$ in hypertonischen Lösungen und fiel in hypotonischen Lösung. Retzius-Neuronen depolarisierten unter hypertonischen und hyperpolarisierten unter hypotonischen Bedingungen. Gleichartige E_m -Verschiebungen traten auch bei P-Neuronen auf, jedoch waren die Depolarisationen in hypotonischen Lösungen deutlich kleiner. Die Auswirkungen anisotonischer Versuchslösungen (+85/-59 mM NaCl) auf $[Ca^{2+}]_i$, pH_i, $[Na^+]_i$ und E_m von Retzius- und P-Neuronen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Wirkung anisotonischer Versuchslösungen (+85/-59 mM NaCl) auf [Ca²⁺]_i, pH_i, [Na⁺]_i und E_m von Retzius- und P-Neuronen.

	Re	tzius-N	Veuronen	P-Neuronen									
	+85 mM N	aCl	-59 mM Na	CI	+85 mM Na	aCl	-59 mM NaCl						
$\Delta [Ca^{2+}]_i$	3±8	(53)	14±18	(58)	0 ± 7	(43)	7 ± 4	(11)					
$\Delta \mathrm{pH}_{\mathrm{i}}$	-0,08±0,11	(25)	$-0,02 \pm 0,09$	(6)	0,12 ± 0,08	(25)	0,05	(1)					
∆ [Na⁺] _i	5 ± 3	(14)	-1 ± 1	(13)	7 ± 5	(8)	-2 ± 2	(7)					
ΔE_{m}	8,1±5,9	(16)	$-3,2 \pm 5,6$	(4)	$2,5\pm5,5$	(6)	$-3,9 \pm 3,4$	(6)					

Mittelwerte (± S. D), die Zahl der Messungen ist jeweils in Klammern angegeben.

3.5. Volumenänderung und die Volumenregulation bei pharmakologischer Beeinflussung von Transportsystemen in der Plasmamembran

Allgemeine Bedeutung pharmakologischer Experimente

Der Transport von anorganischen Ionen über die Zellmembran ist der wichtigste und schnellste Weg für Zellen ihr Volumen zu regulieren. Um zu untersuchen, ob und welche ionalen Transportsysteme an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens und der Volumenregulation beteiligt sind, wurden pharmakologische Experimente mit Substanzen durchgeführt, die bei verschiedenen anderen Präparaten als Inhibitoren oder Aktivatoren von Ionen-Kanälen, -Austauschern und -Cotransportern wirken.

3.5.1. Wirkung der Cl⁻-Kanal-Inhibitoren Nifluminsäure, DIDS, 9-AC und NPPB bei Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen

Die Aufnahme oder Abgabe von Cl⁻-Ionen spielt bei der Volumenregulation unter osmotischem Stress eine bedeutende Rolle (*Lang et al.* 1998a). Entsprechend antworten Zellen auf Volumenänderungen unter anisotonischen Bedingungen oft mit der Aktivierung von Cl⁻-Kanälen oder Cl⁻-Transportern (ClC, *Strange et al.* 1996). Aus diesem Grund wurde versucht Cl⁻-Transportprozesse mit dem Nikotinsäurederivat Nifluminsäure, dem Stilbenderivat DIDS, dem Anthracenderivat 9-AC und dem Benzoesäurederivat NPPB zu hemmen, Substanzen, welche beim Blutegel und bei anderen Präparaten erfolgreich als Inhibitoren des Cl⁻-Transports eingesetzt wurden (*Wehner et al.* 1993, *Müller & Schlue* 1998).

Ein Registrierbeispiel zur Wirkung von Nifluminsäure (1 mM) auf die Volumenänderung eines Retzius-Neurons unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) ist in Abb. 21A wiedergegeben. In Anwesenheit von Nifluminsäure war die maximale Schrumpfung von 78 % auf 72 % erhöht. Außerdem war das Einsetzen einer RVI deutlich erkennbar. Auffällig war, dass bereits durch die Nifluminsäure-Applikation in NSL eine Schrumpfung ausgelöst wurde. Es ist zu betonen, dass die in Abb. 21A wiedergegebenen Effekte in drei weiteren analog durchgeführten Versuchen schwächer ausgebildet waren. Insgesamt gesehen ließ sich eine signifikante Beeinflussung der durch hypertonische Bedingungen induzierten Zellschrumpfung durch Nifluminsäure nicht nachweisen (Tabelle 13).

Auch in Gegenwart von DIDS (0,5 mM) war die maximale Schrumpfung von 79 % auf 64 % erhöht, ebenso trat eine deutliche RVI auf (Abb. 21B). Wie Nifluminsäure induzierte auch DIDS unter isotonischen Bedingungen eine Zellschrumpfung. Insgesamt waren die Schrumpfungen in Gegenwart von DIDS signifikant größer als in NSL (Tabelle 13).

Tabelle 13: Wirkung der Cl⁻-Kanal-Inhibitoren Nifluminsäure und DIDS auf die Zellschrumpfung von Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl)

+85 mM NaCl	Vol _{rel.} (%) Vorkontrolle	Vol _{rel.} (%) Pharmakum	n =
Nifluminsäure DIDS	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	4 4

Mittelwerte (\pm S.D.) von Vol_{rel.} unter hypertonischen Bedingungen in der Vorkontrolle und in Gegenwart des Pharmakums. Die Ergebnisse wurden auf signifikante Unterschiede hin überprüft (* = p < 0,05).

Die Wirkung von Nifluminsäure und DIDS konnte lediglich mit BCECF als Volumenmarker überprüft werden, da beide Substanzen Licht im kurzwelligen Bereich absorbieren, so dass Fura-2 und SBFI nicht verwendet werden konnten (*Schoppe* 2000). Daher sind Aussagen über mögliche Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ und $[Na^+]_i$ in Gegenwart dieser Substanzen nicht möglich. Weder Nifluminsäure noch DIDS hatten jedoch einen Effekt auf pH_i (jeweils n = 4).

Weder 9-AC (1 mM) noch NPPB (200 μ M) hatten bei Retzius-Neuronen einen Effekt auf die Zellvolumenänderung unter hypertonischen Bedingungen (jeweils n = 2). Auch unter isotonischen Bedingungen wurde das Zellvolumen durch die beiden Substanzen nicht beeinflusst. Die Wirkung der Cl⁻-Kanal-Inhibitoren Nifluminsäure, DIDS, 9-AC und NPPB auf die Zellschwellung unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) wurde ebenfalls geprüft. Keine der Substanzen zeigte einen Effekt, weder auf die Zellschwellung noch den pH_i (n = 2 oder 3).

3.5.2. Wirkung der Inhibitoren des K⁺-Cl⁻ und des Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporters Furosemid und Bumetanid unter anisotonischen Bedingungen

Furosemid wirkt als unspezifischer Inhibitor des K⁺-Cl⁻ und Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters, Bumetanid dagegen als spezifischer Inhibitor des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters (*Hoffmann* 1986, *Wehner & Tinel* 1998). Der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter ist primär in RVI involviert, der K⁺-Cl⁻-Cotransporter primär in RVD. (*Lang et al.* 1998a). Die Wirkung von Furosemid und Bumetanid wurde unter hypertonischen (+85 mM NaCl) und hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) geprüft.

In Abb. 22 sind zwei Registrierbeispiele zur Wirkung von Furosemid (0,5 mM) auf die Volumenänderung von P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen wiedergegeben. In dem Beispiel in Abb. 22A war die Zellschrumpfung in Gegenwart von Furosemid geringfügig vergrößert (4 %) und die RVI vermindert. In dem Beispiel in Abb. 22B war dagegen die Schrumpfung verkleinert, doch auch hier war die RVI reduziert. Weder $[Ca^{2+}]_i$, noch die leichte Ansäuerung unter hypertonischen Bedingungen wurden durch Furosemid beeinflusst. Im Mittel schrumpfte das Volumen der P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen in der Vorkontrolle auf 76 ± 5 % und in der Nachkontrolle auf 77 \pm 4 %. In Gegenwart von Furosemid war diese Schrumpfung auf 72 \pm 5 % vergrößert (n = 7, siehe Abb. 23A). Der Effekt von Furosemid war jedoch nicht signifikant (p = 0.06). Bumetanid (100 μ M) hatte dagegen bei P-Neuronen keinen Einfluss auf die Volumenänderung und -regulation unter hypertonischen Bedingungen. Die Zellen schrumpften auf 71 \pm 6 % in der Vorkontrolle und auf 70 \pm 6 % in der Nachkontrolle. In Gegenwart von Bumetanid lag die Schrumpfung unverändert bei 71 \pm 5 % (n = 7, siehe Abb. 23B). Beide Substanzen hatten keinen Effekt auf die Zellschrumpfung von Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (n = 3).

Unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) wurde kein signifikanter Einfluss von Furosemid (0,5 mM) oder Bumetanid (100 μ M) auf die Schwellung von Retziusund P-Neuronen beobachtet (n = 3).

3.5.3. Wirkung der K⁺-Kanal-Aktivatoren Diazoxid und Minoxidil und der K⁺-Kanal-Inhibitoren Glibenclamid und Clofilium Tosylat unter hypotonischen Bedingungen

Die Aktivierung von K⁺-Kanälen zur Verstärkung des K⁺-Ausstroms ist ein wichtiger Mechanismus für die RVD nach einer Zellschwellung (*Pasantes-Morales et al.* 2000a). Diazoxid und Minoxidil gelten als Aktivatoren von ATP-sensitiven K⁺-Kanälen (K_{ATP}, *Bray & Quast* 1992, *Schwanstecher et al.* 1998), Glibenclamid und Clofilium Tosylat als Inhibitoren (*Frey & Schlue* 1996, *Nilius & Droogmans* 2001). Die beiden letzteren Substanzen wurden auch als Inhibitoren von Volumen-sensitiven K⁺-Kanälen eingesetzt (K_{Vol}, *Hougaard et al.* 2001).

Alle vier Substanzen hatten keine Wirkung auf die Schwellung von Retzius-Neuronen unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl, Tabelle 14). Die eingesetzten Konzentrationen betrugen für Diazoxid: 0,5 mM, Minoxidil: 10 μ M, Glibenclamid: 10 μ M, Clofilium Tosylat: 1 μ M.

Diese Experimente zeigen, dass durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen RVD nicht ausgelöst werden kann. Ebenso wenig lässt sich durch die Hemmung dieser Kanäle bzw. die von K_{Vol} -Kanälen RVD unterbinden.

Tabelle 14: Einfluss von Diazoxid, Minoxidil, Glibenclamid und Clofilium Tosylat auf die Zellschwellung von Retzius-Neuronen unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl)

-59 mM NaCl	Vol _{rel.} (%) Vorkontrolle	Vol _{rel.} (%) Pharmakum	Vol _{rel.} (%) Nachkontrolle	n =
Diazoxid	158 ± 5	162 ± 8	162 ± 6	4
Minoxidil	157 ± 17	164 ± 14	166 ± 16	4
Glibenclamid	151 ± 32	153 ± 30	162 ± 23	5
Clofilium Tosylat	144 ± 11	138 ± 2	132 ± 11	4

Mittelwerte (± S. D.) von Vol_{rel.} in den jeweiligen Vor- und Nachkontrollen sowie in Gegenwart der Pharmaka.

3.5.4. Wirkung der Na⁺-Kanal-Inhibitoren Phenytoin und Lidocain unter hypertonischen Bedingungen

Die Aktivierung von Na⁺-Kanälen zur Verstärkung des Na⁺-Einstroms leistet einen wichtigen Beitrag zur RVI von Zellen nach einer Schrumpfung (*Wehner et al.* 2003). Diese Na⁺-Kanäle werden durch Phenytoin und Lidocain inhibiert, wie es in der Literatur bereits für andere Präparate beschrieben wurde (*Kuo* 1998, *Hanck et al.* 2000). Die Wirkung der beiden Substanzen wurde bei P-Neuronen geprüft, da bei diesen Zellen RVI häufiger auftritt als bei Retzius-Neuronen (vergl. 3.4.).

In Gegenwart von Phenytoin (100 μ M) oder Lidocain (5 mM) war die maximale Schrumpfung der P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) nicht signifikant verändert. In Gegenwart von Phenytoin blieb auch RVI unbeeinflusst, wohingegen Lidocain RVI signifikant verminderte (Abb. 24, vergl. Tabelle 15). Die Experimente deuten darauf hin, dass bei P-Neuronen Na⁺-Kanäle (bzw. Na⁺-permeable Kationenkanäle) an nach einer Zellschrumpfung beteiligt sein könnten.

 Tabelle 15:
 Einfluss von Phenytoin und Lidocain auf die RVI von P-Neuronen nach einer Zellschrumpfung unter hypertonischen Bedingungen

+85 mM NaCl	Δ Vol (RVI, %)	∆ Vol (RVI, %)	Δ Vol (RVI, %)	n –	
	Vorkontrolle	Pharmakum	Nachkontrolle		
Lidocain	4 ± 3	1 ± 2*	6 ± 4	9	
Phenytoin	3 ± 5	2 ± 3	2 ± 3	6	

Mittelwerte (\pm S. D.) der Volumenregulation (RVI), in den jeweiligen Vor- und Nachkontrollen sowie in Gegenwart der Pharmaka (* = p < 0.05).

3.5.5. Wirkung von Amilorid, Änderungen des extrazellulären pH (pH_a) sowie HCO₃⁻-gepufferten Versuchslösungen auf die Volumenänderung unter anisotonischen Bedingungen

Die Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) gehören zu den wichtigsten Transportsystemen, die an der Volumenregulation beteiligt sind (*Ritter et al.* 2001). Ihre Aktivierung führt zur Aufnahme von Na⁺- und zur Abgabe von H⁺-Ionen. In verschiedenen Präparaten arbeiten diese Transporter in Kombination mit einem Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher, was zur Nettoaufnahme von NaCl und Wasser führt. Die gemeinsame Aktivierung beider Transportsysteme leistet einen wichtigen Beitrag zur RVI nach einer Zellschrumpfung (*Pedersen et al.* 2002). In den folgenden Experimenten wurde geprüft, ob diese Transportsysteme an der Volumenregulation von Blutegel-Neuronen beteiligt sind.

3.5.5.1. Wirkung von Amilorid und Änderungen des extrazellulären pH-Werts (pH_a) auf das Zellvolumen von Retzius- und P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen

In Abb. 25 sind konfokale Aufnahmen zur Verteilung des Na⁺/H⁺-Austauschers in Blutegelneuronen dargestellt. Das Ganglion wurde zu diesem Zweck in einer NSL inkubiert die den Fluoreszenzfarbstoff Bodipy FL Amilorid enthielt (10 min, 25 μ M), der spezifisch Na⁺/H⁺-Austauscher markiert. Beide Teilabbildungen zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Farbstofffluoreszenz in der Plasmamembran der Neuronzellkörper, insbesondere der Retzius-Neuronen (Abb. 25A und B), so dass von einer homogenen Verteilung der Na⁺/H⁺-Austauscher auszugehen ist.

Amilorid inhibiert den Na⁺/H⁺-Austauschers in Blutegelneuronen (*Schlue & Thomas* 1985). Bei einer Applikationsdauer von bis zu 15 min hatte Amilorid (1 mM) unter isotonischen Bedingungen keinen Effekt auf das Zellvolumen und den intrazellulären pH-Wert (pH_i) von Retzius-Neuronen (n = 5, Abb. 25C). Eben so hatte die Applikation von Amilorid keinen Effekt auf die Volumenänderung und -regulation sowie pH_i unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl; n = 9)

Um eine mögliche Beteiligung des Na⁺/H⁺-Austauschers an der Volumenregulation von Retzius- und P-Neuronen zu untersuchen wurde weiterhin die Zellschrumpfung in hypertonischer Lösung (+85 mM NaCl) bei unterschiedlichem extrazellulären pH (pH_a) gemessen (Abb. 26 und 27). Bei pH = 6,80 war die Zellschrumpfung unbeeinflusst, bei pH = 8,00 dagegen vermindert. Darüber hinaus war bei pH = 8,00 die Volumenregulation (RVI) tendenziell verstärkt. Die statistische Darstellung zeigt, dass signifikante Unterschiede nur bei P-Neuronen auftraten (n = 12).

Die Zellschwellung von Retzius- und P-Neuronen unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) wurde durch pH_a nicht beeinflusst (n = 4).

3.5.5.2. Wirkung Bicarbonat-gepufferter Versuchslösungen auf die Volumenregulation von Retzius- und P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen

Die parallele Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers mit einem Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher zu einem wurde bereits bei verschiedenen Präparaten beschrieben (*Ritter et al.* 2001), u. a. auch bei Blutegelneuronen (*Deitmer & Schlue* 1987). Um die Rolle dieses kombinierten Transportsystems bei der Volumenregulation zu überprüfen wurden Versuchslösungen eingesetzt, die nicht mit HEPES sondern mit Natriumbicarbonat gepuffert waren (27 mM NaCl durch 27 mM NaHCO₃ ersetzt). In Bicarbonat-haltigen Lösungen war die Volumenregulation nach Zellschrumpfung (RVI) allgemein begünstigt (Abb. 28 und 29). Das Registrierbeispiel in Abb. 28A zeigt das Verhalten eines Retzius-Neurons unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) bei unterschiedlich gepufferten Versuchslösungen. In HEPES-gepufferter Lösung kam es zu einer Schrumpfung auf 65 % des Ausgangsvolumens und einer RVI auf 68 %. In der Bicarbonat-gepufferten Lösung war die Schrumpfung verringert (74 %) und RVI verstärkt (81 %).

Die statistische Auswertung in Abb. 28B und Tabelle 16 zeigt, dass in Bicarbonatgepufferten Versuchslösungen die maximale Zellschrumpfung der Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen signifikant reduziert war und dass deutlich mehr Neuronen ihr Volumen durch RVI regulieren konnten.

Tabelle 16: Wirkung Bicarbonat-gepufferter Versuchslösungen auf die Volumenabnahme (Δ Vol_{rel.}) von Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl)

	HEPES-gepuffert	Bicarbonat-gepuffert	HEPES-gepuffert
	+85 mM NaCI (VK)	+85 mM NaCl	+85 mM NaCl (NK)
$\Delta \operatorname{Vol}_{rel.}$ (%)	-30 ± 5	-25 ± 4 *	-29 ± 3
Zellen mit RVI (%)	30	71	35

Dargestellt sind Mittelwerte (\pm S.D., n = 20) von Δ Vol_{rel.} (%) in HEPES- und Bicarbonat-gepufferter Versuchslösung (VK, NK: Vor-, Nachkontrolle). Die Ergebnisse wurden auf signifikante Unterschiede bzgl. Vor- und Nachkontrolle überprüft (* : p < 0,05).

Weiterhin wurde untersucht, ob der Effekt Bicarbonat-gepufferter Lösungen auf die Zellschrumpfung unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) durch den Cl⁻-Kanal-Inhibitor DIDS (0,5 mM) blockierbar war. Das Registrierbeispiel in Abb. 29 zeigt zunächst, dass unter hypertonischen Bedingungen (HEPES-gepuffert) kein RVI erfolgte. Beim Übergang in Bicarbonat-gepufferte Lösung erfolgte eine transiente Zellschrumpfung, begleitet von einer deutlichen Ansäuerung. Bei Wechsel in eine Bicarbonat-gepufferte hypertonische Lösung erfolgte wiederum eine Schrumpfung, der jedoch eine deutliche RVI und Alkalinisierung folgte. In Gegenwart von DIDS (Bicarbonat-gepuffert) und auch in beiden Nachkontrollen (HEPES-gepuffert) blieb RVI aus (n =3).

3.6. Beteiligung des Cytoskeletts an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter anisotonischen Bedingungen

Das Cytoskelett stellt eine dynamische Struktur innerhalb der Zelle dar, die auf Stresssituationen reagieren und diese in das Innere der Zelle weiterleiten kann (*Janmey* 1998). So ist beispielsweise F-Aktin daran beteiligt die Plasmamembran je nach osmotischen Verhältnissen ein- oder auszustülpen oder das Öffnungs- und Schließverhalten von Ionenkanälen zu steuern (*Cantiello et al.* 1997, *Herring et al.* 1999, *Ko & McCulloch* 2000). Auch die Mikrotubuli wurden mit der Aufrechterhaltung des Zellvolumens in Verbindung gebracht. So führte die Blockierung der Mikrotubuli-Dynamik bei menschlichen Krebszellen (HT-3-Zellen) und Leukozyten dazu, dass die Aktivierung von schwellungsabhängigen CI⁻Kanälen und somit RVD unterbleibt (*Downey et al.* 1995, *Shen et al.* 1999). Um die Rolle des Cytoskeletts bei der Volumenregulation zu untersuchen wurde die Wirkung von Modulatoren des Cytoskeletts unter anisotonischen Bedingungen geprüft.

3.6.1. Wirkung von Cytoskelett-Modulatoren auf das Zellvolumen unter anisotonischen Bedingungen

Als Cytoskelett-Modulatoren wurden Colchizin, Vinblastin, Paclitaxel, Cytochalasin B und Cytochalasin D verwendet. Colchizin und Vinblastin führen zur Depolymerisation der Mikrotubuli (*Singer et al.* 1989, *Andreu et al.* 1998), Paclitaxel zu deren Stabilisierung (*Parekh & Simpkins* 1997), während Cytochalsin B und D F-Aktin-Filamente depolymerisieren (*Goddette & Frieden* 1986). Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green Paclitaxel®, ein Mikrotubulus-Marker, machte bei Retzius-Neuronen vom Zellkern ausgehende fädige Strukturen sichtbar, während der Cytosol-Marker Oregon Green BAPTA-1® ausschließlich das Cytosol und den Kern der Neuronen anfärbte (Abb. 30).

Colchizin, Vinblastin und Paclitaxel

Um eine möglichst vollständige Depolymerisation der Mikrotubuli zu erreichen wurden Segmentalganglien für eine Stunde in einer Colchicin- (25 µM) oder Vinblastin-haltigen $(200 \ \mu\text{M})$ NSL präinkubiert. In Kontrollexperimenten erfolgte eine zusätzliche einstündige Inkubation in einer Paclitaxel-haltigen NSL (30 nM) zur Konservierung des Mikrotubuli-Netzwerks. Die Volumenänderungen von Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen (+85 mM NaCl, -59 mM NaCl) in derart vorbehandelten Präparaten sind in Abb. 31 anhand von Registrierbeispielen illustriert und in Abb. 33 statistisch dargestellt. Zur weiteren Kontrolle wurden identische Experimente an unbehandelten Segmentalganglien derselben Versuchstiere durchgeführt.

Hypertonische Bedingungen

Die Zellschrumpfung der Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) war nach Colchicin-Präinkubation signifikant vergrößert, in dem in Abb. 31A gezeigten Registrierbeispiel um 8 %. Die mittlere Schrumpfung präinkubierter Neuronen betrug -35 ± 5 % (n = 24), die unbehandelter Neuronen -28 ± 5 % (n = 27). Die Colchizinwirkung konnte durch Präinkubation mit Paclitaxel vollständig verhindert werden (-28 ± 4 %, n = 9).

Nach Vinblastin-Präinkubation war die Zellschrumpfung ebenfalls vergrößert, in dem in Abb. 31B gezeigten Registrierbeispiel um 3 %. Die Schrumpfung präinkubierter Neuronen betrug -30 ± 5 % (n = 12), die unbehandelter Neuronen -28 ± 5 % (n = 27). Auch in diesen Experimenten konnte die Vinblastinwirkung durch Präinkubation mit Paclitaxel vollständig blockiert werden (-25 ± 6 %, n = 12).

Hypotonische Bedingungen

Die Schwellung der Retzius-Neuronen unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) war nach Colchicin-Präinkubation signifikant vergrößert, in dem in Abb. 31A gezeigten Registrierbeispiel um 40 %. Bei den präinkubierten Neuronen betrug die Schwellung 89 ± 43 % (n = 23), bei den unbehandelten Neuronen 46 ± 14 % (n = 23). Die Colchizinwirkung konnte wiederum durch Präinkubation mit Paclitaxel vollständig blockiert werden (50 ± 12 %, n = 8).

Auch nach Vinblastin-Präinkubation war die Zellschwellung signifikant vergrößert, in dem in Abb. 31B gezeigten Registrierbeispiel um 27 %. Bei den präinkubierten Neuronen betrug die Schwellung $67 \pm 10 \%$ (n = 12), bei unbehandelten Zellen $46 \pm 14 \%$

(n = 23). Die Vinblastinwirkung konnte wiederum durch Präinkubation mit Paclitaxel vollständig blockiert werden ($49 \pm 10 \%$, n = 8).

Cytochalasin B und D

Die Präinkubation mit Cytochalasin B oder D (jeweils 20 μ M) hatte keinen Einfluß auf die Volumenänderungen unter anisotonischen Bedingungen (Abb. 32 und 33). Hier betrugen die maximalen Schrumpfungen -28 ± 8 % (n = 7, Cytochalasin B) und -22 ± 3 % (n = 7, Cytochalasin D). Die maximalen Schwellungen betrugen 49 ± 25 % (n = 7, Cytochalasin B) und 59 ± 27 % (n = 7, Cytochalasin D). Alle Werte waren denen der Kontrollen ähnlich.

Das Membranruhepotential sowie Amplitude und Frequenz spontan auftretender Aktionspotentiale blieben durch die Präinkubation mit Colchicin, Vinblastin und Paclitaxel unbeeinflusst, ebenso wie deren Änderung unter anisotonischen Bedingungen (Abb. 34). Unter hypertonischen Bedingungen erfolgte stets eine geringe Membrandepolarisation, unter hypotonischen Bedingungen eine transiente Hyperpolarisation. Die Mittelwerte der jeweiligen E_m -Verschiebungen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Wirkung von Colchizin, Vinblastin und Paclitaxel auf die Em-Änderungenunter anisotonischen Bedingungen (+85 mM NaCl, -59 mM NaCl)

	Kontrolle			Colchizin			Vinblastin			Paclitaxel				Pa C	clit olo	:ax chi	cel +	Paclitaxel + Vinblastin						
ΔE_m (mV) in +85 mM NaCl	7	±	3	(3)	11	±	2	(3)	7	±	4	(3)	7	±	2	(4)	4	±	2	(3)	13	±	4	(3)
ΔE_m (mV) in -59 mM NaCl	-3	±	4	(3)	-1	±	0	(3)	-1	±	1	(3)	-1	±	3	(4)	-2	±	1	(3)	-1	±	0	(3)

Mittlere E_m -Änderungen (± S. D.) aus 3 oder 4 Experimenten unter Kontrollbedingungen sowie nach Inkubation der Präparate in Colchizin, Vinblastin, Paclitaxel oder in Paclitaxel + Colchizin bzw. Paclitaxel + Vinblastin.

4. Diskussion

4.1. Messung von Zellvolumenänderungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

4.1.1. Die Iontophorese zur Beladung von Neuronen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zellen können durch verschiedene Techniken mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen werden. Hierzu gehören die Farbstoffdiffusion über patch-Pipetten in der whole cell-Konfiguration (*Eilers et al.* 1996), die Inkubation in Lösungen mit der membranpermeablen Esterform des Farbstoffs (Esterbeladung: *Crowe et al.* 1995, *Hofer et al.* 1995), Druckinjektion (*Pernberg & Machemer* 1995) sowie die iontophoretische Injektion geladener Farbstoffmoleküle (*Dierkes et al.* 1996).

Die Beladung über patch-Pipetten hat sich als nachteilig erwiesen, da die cytosolische Lösung bereits nach kurzer Zeit durch die Pipettenlösung ausgetauscht wird und Zellen wichtige physiologische Eigenschaften während des Experiments verlieren. Bei der Esterbeladung ist problematisch, dass aufgrund der Membranpermeabilität des Farbstoffs auch eine Diffusion in intrazelluläre Organellen erfolgt, bevor die Hydrolyse zur membranimpermeablen Form (Esterspaltung durch Esterasen) erfolgt ist(*Steinberg et al.* 1987a, *Weinlich et al.* 1998). Nach erfolgter Messung muss daher die Farbstoff-konzentration in den Zellorganellen durch Lysierung bestimmt werden. Ergebnisse an einer Neuroblastoma-Zellinie zeigten, dass lediglich 36 % des Fluoreszenzfarbstoffes im Cytosol vorlagen und die verbleibenden 64 % in anderen Zellkompartimenten lokalisiert waren (*Crowe et al.* 1995). Diese Zellkompartimente stellen ein osmotisch inaktives Kompartiment dar, in Folge dessen Volumenänderungen deutlich unterschätzt werden (*Crowe et al.* 1995).

Durch iontophoretische Farbstoffinjektion können membranimpermeable, geladene Fluoreszenzfarbstoffe in Zellen gebracht werden. Diese gelangen lediglich in das Cytosol, das osmotisch aktive Kompartiment, da sie die Membranen intrazellulärer Organellen nicht passieren können. Als Beleg hierfür kann der einfach exponentielle Abfall der Farbstofffluoreszenz in physiologischer Lösung angeführt werden (Abb. 6C, 7 und 10), ebenso wie der einphasige Fluoreszenzabfall bei Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 (Abb. 6B). Wären Farbstoffmoleküle in intrazelluläre Kompartimente gelangt, so wäre ein komplexerer Zeitverlauf des Fluoreszenzabfalls zu erwarten (*Crowe et al.* 1995).

4.1.2. Eignung der Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, SBFI und BCECF zur Volumenmessung

Die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, SBFI und BCECF erwiesen sich als gut geeignete Volumenmarker. Alle drei Farbstoffe besitzen einen Isofluarpunkt, an dem die Fluoreszenzemission nur von der Farbstoffkonzentration und damit vom Zellvolumen abhängig ist (Fura-2: 360 nm, SBFI: 340 nm, BCECF: 440 nm; Abb. 5, 8 und 9; vergl. *Crowe et al.* 1995, *Altamirano et al.* 1998, *Weinlich et al.* 1998, *Diarra et al.* 2001). Die mit den drei verwendeten Farbstoffen bestimmten Volumenänderungen waren praktisch identisch (Abb. 11). Dass die am jeweiligen Isofluarpunkt registrierte Fluoreszenz tatsächlich exakt die Farbstoffkonzentration und damit das Zellvolumen widerspiegelt, wurde durch Vergleichsmessungen mit ionensensitiven Glasmikroelektroden sichergestellt (*Dierkes et al.* 2003)

Der kontinuierliche Fluoreszenzabfall (Abb. 6C, 7 und 10) ist überwiegend auf ein Transportsystem für organische Anionen zurückzuführen, da dieser Abfall mit Probenecid (2 mM), einem spezifischen Inhibitor organischer Anionen-Transportsysteme, blockierbar war (Abb. 6C). Ähnliche Befunde wurden bereits bei Makrophagen und bei Neuropil-Gliazellen des Blutegels beschrieben (*Steinberg et al.* 1987b, *Munsch & Deitmer* 1995). Der Farbstoffverlust war bei Retzius-Neuronen

größer als bei P-Neuronen, möglicherweise bedingt durch eine stärkere Expression des Transportsystems in der Membran dieser Zellen (siehe 3.2.1. und Tabelle 8). Mit SBFI und BCECF beladene Neuronen zeigten im Vergleich zu Fura-2 einen deutlich geringeren Farbstoffverlust (vergl. Abb. 7 und 10, Tabelle 8), was auf unterschiedliche Affinitäten des Transportsystems zum jeweiligen Farbstoffmolekül hindeutet.

Durch Volumenänderung bedingte Fluoreszenzänderungen ließen sich von Fluoreszenzänderungen abgrenzen, die durch Farbstoffverlust bedingt waren. Hierzu wurde der Farbstoffverlust mit einer Exponentialfunktion angepasst und deren Parameter zur Korrektur verwendet (Abb. 7 und 10, vergl. *Muallem et al.* 1992).

Ein wichtiger Vorteil der mikrofluorimetrischen Methode liegt darin, dass simultan zum Zellvolumen die Konzentration eines definierten Ions bestimmt werden kann, hier Ca²⁺: Fura-2, Na⁺: SBFI, H⁺: BCECF (siehe auch *Crowe et al.* 1995, *Weinlich et al.* 1998, *Diarra et al.* 2001). Es wäre weiter möglich, andere Fluoreszenzfarbstoffe mit ähnlichen Eigenschaften für die simultane Bestimmung des Volumens und anderer Ionenarten einzusetzen, wie beispielsweise mag-Fura-2 zur Messung von $[Mg^{2+}]_i$ oder PBFI zur Messung von $[K^+]_i$. (*Raju et al.* 1989, *Meuwis et al.* 1995). Dass die simultane Bestimmung relevanter Ionensorten die genaue Beschreibung ionaler Mechanismen von Volumenänderungen erlaubt, haben Untersuchungen mit ionenselektiven Glasmikroelektroden bereits gezeigt (*Dierkes et al.* 2003, *Trosiner* 2003).

4.2. Rolle der Na⁺/K⁺-ATPase bei der Kontrolle des Zellvolumens unter isotonischen Bedingungen

Die Inhibierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch Ouabain führt bei vielen Präparaten zu einer Zellschwellung, die auf dem Zusammenbruch der Na⁺- und K⁺-Gradienten, des E_m und dem darauf folgenden Cl⁻-Einstrom beruht (*Hérnandez & Cristina* 1998, *Lang et al.* 1998a). Bei Retzius-Neuronen führt Ouabain zu reversiblen Anstiegen von [Na⁺]_i, und [Ca²⁺]_i sowie zu einer polyphasischen Membrandepolarisation (*Deitmer & Schlue* 1983,

Hochstrate & Schlue 2001), wobei der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ausschließlich auf die Aktivierung von spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanälen infolge der Membrandepolarisation zurückzuführen ist (*Hochstrate & Schlue* 2001, vergl. Abb. 13 und 15).

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ouabain auch eine signifikante Schwellung der Retzius-Neuronen um ca. 28 % auslöst (siehe Abb. 13 und 16, Tabelle 9). Die Schwellung blieb sowohl in CI⁻ als auch in Na⁺-freier Lösung aus (Abb. 14), so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Schwellung auf der simultanen Aufnahme von Na⁺- und CI⁻-Ionen und der damit verbundenen Wasseraufnahme der Neuronen beruht. In Ca²⁺-freier Versuchslösung hatte Ouabain keinen Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$ und die Schwellung war vermindert (Abb. 15). Da die Wiederzugabe von Ca²⁺ zu einer verstärkten Schwellung führte, scheinen Ca²⁺-abhängige Prozesse an der Aufnahme von Na⁺ und CI⁻ beteiligt zu sein.

Die Blockierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch Entzug des extrazellulären K⁺ induzierte neben einem [Na⁺]_i-Anstieg eine Membranhyperpolarisation, hatte jedoch praktisch keinen Effekt auf Zellvolumen und [Ca²⁺]_i (Abb. 17; siehe auch *Deitmer & Schlue* 1983). Die fehlende Wirkung auf das Zellvolumen scheint auf der fehlenden CI⁻ Aufnahme zu beruhen: so fällt in K⁺-freier Lösung [K⁺]_i deutlich ab, wohingegen [CI⁻]_i nur gering beeinflusst ist (*Trosiner* 2003). Weiterhin stimmen Rate und Kinetik für den [K⁺]_i-Abfall sowie [Na⁺]_i-Anstieg gut überein (*Deitmer & Schlue* 1983, *Trosiner* 2003, *Wüsten et al.* 2003). Diese Befunde deuten darauf hin, dass in K⁺-freier Lösung ein Austausch von K⁺ gegen Na⁺ erfolgt, jedoch keine Nettoaufnahme von Osmolyten, so dass das Zellvolumen weitgehend konstant bleibt. Diese Befunde stimmen mit anderen Arbeiten überein, in denen die Inhibierung der Na⁺/K⁺-ATPase kurzfristig keine Wirkung auf das Zellvolumen aufweist (*Macknight & Leaf* 1977, *Ouahbi et al.* 1990, *Granitzer et al.* 1994, *Russo et al.* 1994) oder sogar eine transiente Zellschrumpfung auslöste. (*Kempski et al.* 1991, *Alvaarez-Leefmans et al.* 1992, *Orlov et al.* 1992, *Smith et al.* 1993). Dagegen begünstigt die Membrandepolarisation in Gegenwart von Ouabain die Cl⁻ Aufnahme in die Neuronen, so dass zusätzlich zum Austausch von K⁺ gegen Na⁺ eine Nettoaufnahme von NaCl erfolgt, welche zur Aufnahme von Wasser und somit zur Zellschwellung führt.

Es ist davon auszugehen, dass die Geschwindigkeit der Zellschwellung von den Transportsystemen abhängt, die für die NaCl-Aufnahme verantwortlich sind. Hierfür sprechen Befunde an Nierenzellen, in denen die Schwellung bei Inhibierung des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters deutlich verlangsamt wird (*Dorup & Clausen* 1996). Auch die Ouabain-induzierte Schwellung der Retzius-Neuronen setzte erst nach 5 min ein, entsprechend der verzögerten Membrandepolarisation, welche zur Aktivierung von spannungs- oder Ca²⁺-aktivierten Kanälen für Na⁺ und Cl⁻ führen könnte (siehe 3.3.1. und Abb. 13, vergl. hierzu *Angstadt* 1999). Zusätzlich wird der elektrochemische Gradient für einen Cl⁻-Einstrom in die Zelle durch die Depolarisation deutlich verstärkt.

4.3. Anisotonie

Die Plasmamembran tierischer Zellen weist eine hohe Permeabilität für Wasser auf, so dass eine Änderung des osmotischen Gradienten über der Plasmamembran mit der Aufnahme oder Abgabe von Wasser und daher mit einer Zellschwellung oder Zellschrumpfung verbunden ist (*Lang et al.* 1998a). Neuroblastoma Zellen in Kultur (N1E-115; *Crowe et al.* 1995) und Schnecken-Neuronen *in situ* (*Alvarez-Leefmans et al.* 1992) verhalten sich in schwach anisotonischen Lösungen annähernd wie ideale Osmometer, d. h. die Volumenänderungen waren proportional zum osmotischen Gradienten. Dies trifft bei geringen Änderungen der Badosmolalität auch für Retzius und P-Neuronen zu (Abb. 19, vergl. *Dierkes et al.* 2003). Bei größeren Änderungen der Badosmolalität traten jedoch signifikante Abweichungen vom Verhalten eines idealen Osmometers auf (Abb. 19, Tabellen 10 und 11). Die Abweichungen vom Verhalten idealer Osmometer können verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten die Ganglionkapsel und die Plasmamembran mechanisch extremen Schwellungen entgegenwirken und zum anderen könnten subzelluläre Strukturen, wie Mitochondrien oder andere intrazelluläre Organellen, eine übermäßige Schrumpfung verhindern. Gegen die Ganglionkapsel als mechanische Begrenzung sprechen allerdings Befunde von *Klees* (2002), nach denen die Entfernung der Ganglionkapsel keine Auswirkung auf Volumenänderungen unter anisotonischen Bedingungen hat.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der regulatorischen Aufnahme oder Abgabe von Osmolyten unter anisotonischen Bedingungen, der eine Wasseraufnahme oder -abgabe folgt. Hierauf deutet der beim Rückwechsel von hypertonischer in isotonische Lösung oftmals auftretende 'overshoot' hin, der eine Osmolytaufnahme unter hypertonischen Bedingungen anzeigt (Abb. 18). Entsprechend ist nun die intrazelluläre Osmolalität höher als die der NSL, was wiederum zu Wasseraufnahme und Zellschwellung führt. Tatsächlich nehmen Retzius-Neuronen unter stark hypertonischen Bedingungen NaCl auf, nicht jedoch unter schwach hypertonischen Bedingungen (*Dierkes et al.* 2003). Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung von volumenregulatorischen Transportsystemen erst in osmotischen Stresssituationen erfolgt (vergl. *O'Neill* 1999).

Interessanterweise waren die Zellschrumpfung und Volumenregulation unabhängig davon, ob die Osmolalität der Lösungen durch NaCl, Glucose oder Sorbitol geändert wurde (Abb. 19, Tabelle 10 und 11). Dies zeigt zum einen, dass die mit der Erhöhung der extrazellulären NaCl-Konzentration verbundene Steigerung der Ionenstärke keinen Einfluss auf Zellschrumpfung und Volumenregulation nimmt. Zum anderen ist auszuschließen, dass eine Glucose-Aufnahme einen nennenswerten Beitrag zur Volumenregulation leistet (siehe *Wolfe & Nicholls* 1967, *Kai Kai & Pentreath* 1981 *Vannucci et al.* 1997, *Walmsley et al.* 1998).

Viele Zellen besitzen volumenregulatorische Transportsysteme in ihrer Plasmamembran (*Lauf & Adragna* 2000). Um eine Beteiligung derartiger Systeme an der Volumen-

regulation von Blutegel-Neuronen näher zu charakterisieren, wurden pharmakologische Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

4.4. Volumenregulation unter hypotonischen Bedingungen

Der wichtigste Mechanismus zur Erzeugung einer RVD nach Zellschwellung besteht in der Abgabe von KCl, der ein Wasserausstrom und somit eine Zellschrumpfung folgt (*Häussinger* 1996). Die KCl-Abgabe kann gekoppelt über den KCl-Cotransporter oder durch den Ausstrom von K⁺- und Cl⁻-Ionen durch spezifische Kanäle erfolgen (*Lang et al.* 1998b, *Hoffmann* 2000, *Lauf & Adragna* 2000, *Fürst et al.* 2002). Es wurde nachgewiesen, dass die Cl⁻-Abgabe durch schwellungs-aktivierte Anionenkanäle erfolgt, die nicht nur für Cl⁻-Ionen sondern auch für organische Anionen sowie für neutrale organische Osmolyte permeabel sind (*Strange & Jackson* 1995).

Bei Retzius- und P-Neuronen wurde RVD nicht beobachtet (Abb. 18B, Tabelle 10), allerdings trat insbesondere bei Retzius-Neuronen unter stark hypotonischen Bedingungen eine Abweichung vom Verhalten eines idealen Osmometers auf, die auf eine mögliche Volumenregulation hindeutet. Daher wurde versucht, RVD durch die Aktivierung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen (K_{ATP}) auszulösen, die bei diesen Zellen nachgewiesen wurden (*Frey et al.* 1993). Aktivatoren dieser Kanäle, Diazoxid (*Schwanstecher et al.* 1998) und Minoxidil (*Seino* 1999), hatten jedoch keinen Einfluss auf die Volumenänderung unter hypotonischen Bedingungen, ebenso wenig wie die Inhibition der Kanäle durch Glibenclamid (Tabelle 14, *Frey et al.* 1993). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, K_{ATP}-Kanäle bei der Volumenregulation von Retzius-Neuronen keinen Rolle spielen.

Auch volumen-aktivierte K⁺-Kanäle (K_{Vol}, *Hoffmann* 2000) scheinen nicht in die Volumenregulation von Retzius-Neuronen involviert zu sein, da Clofilium Tosylat, ein spezifischer Inhibitor dieser Kanäle (*Malécot & Argibay* 1999), wirkungslos war. Schließlich konnte wegen der Wirkungslosigkeit von Furosemid auch eine Beteiligung des KCl-Cotransporters an RVD ausgeschlossen werden (vergl. 3.5.2.). Dies könnte darin begründet liegen, dass der KCl-Cotransporter eher bei isotonischen Zell-schwellungen aktiviert wird (*Garcia-Romeu et al.* 1996)

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die beobachteten Abweichungen vom idealen Verhalten gar nicht durch ionale Transportprozesse hervorgerufen wurden. Vielmehr scheinen hierfür Elemente des Cytoskeletts verantwortlich zu sein. So war nach Depolymerisierung des Mikrotubuli-Systems durch Colchizin oder Vinblastin die Zellschwellung signifikant vergrößert und die Abweichungen vom Verhalten eines idealen Osmometers aufgehoben (Abb. 31 und 33, vergl. Abb. 19). Möglicherweise verfügen also Blutegel-Neuronen nicht über schwellungsaktivierte RVD-Mechanismen, sondern setzen dem osmotischen Unterdruck durch das Mikrotubuli-Netzwerk einen mechanischen Zug entgegen, der zumindest zeitweise die Zellschwellung unter hypotonischen Bedingungen vermindert. Blutegel sind in der Lage, auch in hypotonischen Medien die Osmolalität ihrer Hämolymphe konstant zu halten (*Boroffka* 1968), und folglich kommt RVD-Mechanismen, die durch osmotische Stresssituationen aktiviert werden, unter physiologischen Bedingungen wenig Bedeutung zu.

4.5. Volumenregulation unter hypertonischen Bedingungen

Die in der Literatur beschriebenen RVI-Mechanismen nach einer Zellschrumpfung führen zu einer intrazellulären Anreicherung von Elektrolyten, der ein Wassereinstrom und somit eine Zellschwellung folgt (*Häussinger* 1996). Die Aufnahme von NaCl ist hierbei als wichtigster Prozess zu nennen. An dieser Aufnahme können der Na⁺-K⁺-2Cl⁻ -Cotransporter (NKCC), der Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE) und der Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher (Anionenaustauscher, AE) beteiligt sein (*O'Neill* 1999). Die beiden letzten Transportsysteme zeigen besonders deutlich, dass eine Aktivierung erst nach einer Volumenänderung erfolgt. Von den bereits klonierten Mitgliedern der Na⁺/H⁺-Austauscher-Familie werden NHE1, -2, -4 und -6 bei Zellschrumpfung aktiviert und sind an RVI beteiligt, wohingegen NHE-3 durch Zellschrumpfung inhibiert wird (*Lang* *et al.* 1998a, *Ritter et al.* 2001). Die erhöhte Aktivität der Na⁺/H⁺-Austauscher führt zu intrazellulärer Alkalinisierung, welche wiederum den Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher aktiviert. Hier scheint vor allem der Anionenaustauscher AE2 und weniger der AE1 an RVI beteiligt zu sein (*Jiang et al.* 1997). Bei Blutegel-Neuronen konnte bereits gezeigt werden, dass unter hypertonischen Bedingungen eine Aufnahme von NaCl in die Zellen erfolgt (*Dierkes et al.* 2003).

Auch bei Blutegel-Neuronen ist eine parallele Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers und des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers unter hypertonischen Bedingungen zu vermuten. In Bicarbonat-gepufferten Lösungen wurde durch hypertonische Bedingungen initial eine Alkalinisierung ausgelöst, welche innerhalb von 5 min teilweise zurückreguliert wurde (Abb. 29). Dieser Befund deutet auf eine Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers durch die Zellschrumpfung sowie die nachfolgende Aktivierung des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers hin. Für diese Interpretation spricht, dass die Alkalinisierung in Gegenwart von DIDS, einem Inhibitor des Cl⁻/HCO₃⁻Austauschers, deutlich vergrößert war und nicht zurückreguliert wurde. Darüber hinaus trat RVI in Bicarbonat-gepufferten Lösungen weitaus häufiger auf als in HEPES-gepufferten Lösungen (Tabelle 16). Weiterhin war in Bicarbonat-gepufferten Lösungen die Zellschrumpfung nach 5 min signifikant kleiner als in HEPES-gepufferten Lösungen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass in Bicarbonathaltigen Lösungen beide Transportsysteme maßgeblich zur Volumenregulation von Blutegel-Neuronen beitragen. Da aber auch in HEPES-gepufferten Lösungen, in denen der Cl⁻/HCO₃⁻Austauscher weitgehend ausgeschaltet ist, noch RVI zu beobachten war, scheinen weitere Mechanismen an RVI unter hypertonischen Bedingungen beteiligt zu sein.

Als möglicher weiterer RVI-Mechanismus kommt die Aktivierung des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters in Frage (*Hoffmann* 1986, *Wehner & Tinel* 1998, *Lauf & Adragna* 2000). Tatsächlich war in Gegenwart von Furosemid, ein Inhibitor des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters, RVI abgeschwächt und die initiale Schrumpfung vergrößert (Abb. 22 und 23). Allerdings zeigte der spezifischere Inhibitor Bumetanid (*Isenring & Forbush* 1997) keine Wirkung, so dass eine gesicherte Aussage über die Beteiligung des Na⁺-K⁺-2Cl⁻Cotransporters an RVI von Blutegelneuronen nicht möglich ist. Auch der Einstrom von Na⁺- und Cl⁻-Ionen durch Ionenkanäle könnte zur RVI unter hypertonischen Bedingungen beitragen. Durch Inhibition von Cl-Kanälen mit DIDS und Nifluminsäure wurde die initiale Zellschrumpfung unter hypertonischen Bedingungen bei Retzius-Neuronen deutlich erhöht (Abb. 21). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei Retzius-Neuronen Cl⁻-Kanäle an der Volumenregulation beteiligt sind, wie es bereits für andere Präparate postuliert wurde (Hoffmann 1986, Sarkadi & Parker 1991). Die Vergrößerung der initialen Schrumpfung spricht dafür, dass DIDSbzw. Nifluminsäure-sensitive Cl-Kanäle nicht erst aktiviert werden müssen, sondern bereits aktiv sind. Hierfür spricht auch, dass Retzius-Neuronen unter stark hypertonischen Bedingungen selten RVI zeigen, jedoch signifikante Abweichungen vom idealen Osmometer aufweisen (siehe Abb. 19). Dies würde bedeuten, dass sich RVI bereits während der osmotisch-induzierten Änderung des Zellvolumens vollzieht. Bei P-Neuronen war die initiale Zellschrumpfung deutlich größer als bei Retzius-Neuronen, jedoch trat bei diesem Zelltyp RVI auch häufiger auf. Darüber hinaus war das Volumen beider Zelltypen nach 5 min nahezu gleich. Arbeiten an Ratten-Hepatocyten zeigten, dass an der Volumenregulation mehrere, sich untereinander beeinflussende Transportsysteme beteiligt sind, die sich gegenseitig ersetzen können (Wehner & Tinel 1998). Das bei Retzius-Neuronen auffällige Einsetzen von RVI in Gegenwart von Nifluminsäure und DIDS ließe sich so erklären. Möglicherweise war auch die stärkere Zellschrumpfung für die RVI-Auslösung verantwortlich. So wurden bei anderen Präparaten zelluläre Sensoren nachgewiesen, die erst ab einer bestimmten Schwelle eine Volumenregulation einleiten (Simkiss 1998).

Die Aktivierung von Na⁺-Kanälen, welche eine parallele Aufnahme von Na⁺- und Cl⁻-Ionen ermöglicht, wurde bereits als ein wichtiger RVI-Mechanismus nachgewiesen. So induziert bei Ratten-Hepatocyten eine Zellschrumpfung die Aktivierung von Amiloridsensitiven Na⁺-Kanälen (*Wehner & Tinel* 1998). Auch die Familie der epithelialen Na⁺-Kanäle (ENaCs) ist in vielen Vertebraten-Präparaten an RVI beteiligt (*Böhmer et al.* 2000). Epitheliale Na⁺-Kanäle sind an der Volumenregulation von Blutegelneuronen offensichtlich nicht beteiligt, da Amilorid die Volumenänderung nicht beeinflusst (Abb. 25). Dagegen ist eine Beteiligung von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen nicht auszuschließen. Zwar blieb in Gegenwart von Phenytoin eine Wirkung auf die Volumenänderung aus, jedoch wirkt diese Substanz nur bei einem Teil der Familie der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle inhibitorisch (*Kuo et al.* 2000), wohingegen Lidocain als unselektiver Inhibitor betrachtet wird. Das Ergebnis, dass in Gegenwart von Lidocain RVI reduziert war, könnte ein Indiz für die Aktivierung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle unter hypertonischen Bedingungen sein (Abb. 24). Dagegen spricht allerdings die rasche Inaktivierung "klassischer" spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle (Na_v-Kanäle; Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999). Möglicherweise könnten hierbei Na⁺-sensitive Na⁺-Kanäle eine Rolle spielen (Na_x-Kanäle; *Hiyama et al.* 2002). Diese Kanäle sind mit spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen strukturell eng verwandt, jedoch sind in den für Spannungsabhängigkeit und Inaktivierung verantwortlichen Abschnitten des Kanalproteins Unterschiede zu finden (Goldin 2002). Kennzeichnend für diesen Kanaltyp ist die fehlende Inaktivierung sowie die Na⁺-abhängige Aktivierung. Bei Retzius-Neuronen wurde ein spannungsabhängiger Na⁺-Strom beschrieben, der unter physiologischen Bedingungen bei einem E_m positiver als -40 mV aktiviert und kaum Inaktivierung zeigt (I_{NaP}; Kleinhaus & Angstadt 1995, Angstadt 1999). Die durch hypertonische Lösung hervorgerufene E_m-Verschiebung würde allerdings gerade an diesen Schwellenwert heranreichen (vergl. 3.4.4.), so dass zusätzlich eine Aktivierung durch Erhöhung der extrazellulären Na⁺-Konzentration erfolgen müsste.

4.6. Modulation der Volumenregulation unter hypertonischen Bedingungen durch den extrazellulären pH

Neben dem intrazellulären pH (pH_i) spielt auch der extrazelluläre pH (pH_a) eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Membran-Transportsystemen, wie beispielsweise die Durchlässigkeit von Aquaporinen (AQP) für Wasser und kleinere Moleküle (beispielsweise Glycerin; *Zeuthen & Klaerke* 1999). In kaum einem anderen Gewebetyp ist die Expression von Aquaporinen so wichtig wie im Gehirn, da hier hochspezifische Verbindungen zwischen Nervenzellen und Blut über die Blut-Hirn Schranke bestehen

und Schädigungen durch unkontrollierte Zellschwellung drastische Auswirkungen auf den Organismus hätten (*Agre et al.* 2002). Das Öffnungsverhalten von K⁺-Kanälen kann ebenfalls durch den pH_a reguliert werden. Bei diesen Ionenkanälen handelt es sich um K⁺-Leckkanäle (two-pore-domain acid sensitive K⁺ channels, TASK; *Kim et al.* 2000, *Sirois et al.* 2000), welche bei der Aufrechterhaltung des E_m beteiligt sind. Auch schwellungsaktivierte K⁺-Kanäle (I_{K,vol}) sind pH-sensitiv und werden durch alkalischen pH_a aktiviert und durch sauren pH_a inaktiviert (*Hougaard et al.* 2001). Weiterhin wurde auch eine Modulation der Na⁺/H⁺-Austauscher durch pH_a beobachtet (*Ritter et al.* 2001).

Bei Retzius- und P-Neuronen hatte die Verschiebung des pH_a in den sauren Bereich keinen Einfluss auf die Volumenänderungen unter hypertonischen Bedingungen. Eine extrazelluläre Alkalinisierung hingegen führte zu einer Abschwächung der initialen Schrumpfung und zu einer RVI-Verstärkung (Abb. 26 und 27). Dies ist ein Indiz für pH-sensitive Transportmechanismen, die durch extrazelluläre Alkalinisierung aktiviert werden. Hierbei könnten insbesondere die Aktivierung von Anionenkanälen bzw. Cl⁻Kanälen in Frage kommen, wie sie bereits bei kultivierten Endothelzellen beschrieben wurde (*Nilius et al.* 1998). Für die sogenannten VRACs (volume-regulated anion channel, I_{Cl,swell}) konnte in patch-clamp Experimenten nachgewiesen werden, dass nach einer schwellungsinduzierten Aktivierung die Inaktivierung der Kanäle stark pH-abhängig ist.

4.7. Beteiligung des Cytoskeletts an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter anisotonischen Bedingungen

Das Cytoskelett tierischer Zellen, das unter anderem von Mikrofilamenten (F-Aktin-Filamente, Intermediärfilamente) und Mikrotubuli gebildet wird, gibt der Zelle Stabilität und Festigkeit und dient so der Aufrechterhaltung der Zellform (*Cantiello* 1997, *Ko & McCulloch* 2000). Gleichzeitig sind die Filamente des Cytoskeletts für Bewegung und Lage der Zellorganellen verantwortlich (*Grafstein & Forman* 1980). Bei Neuronen sind die fibrillären Elemente, Neurofilamente, Tubuline und Aktine, hervorzuheben, die bis zu 20 % des Gesamtproteingehalts der Zellen ausmachen. Eine wichtige Rolle des Cytoskeletts ist es, mechanischen Stress, der aus dem Wasserfluss über die Plasmamembran resultiert, zu kompensieren (*Ko & McCulloch* 2000). Dieser eher als passive Funktion zu wertenden Aufgabe steht eine Sensorfunktion gegenüber, die zur Auslösung einer Volumenregulation über mit dem Cytoskelett verbundene Effektoren führen kann (*Papakonstanti et al.* 2000, *Jakab et al.* 2002). So kann das Cytoskelett Signale ausgehend von der Plasmamembran zu Organellen leiten oder auch direkt Ionenkanäle und -transporter oder die Expression von Proteinen steuern (*Janmey* 1998, *Jakab et al.* 2002).

Bereits in früheren Arbeiten wurde die Beteiligung des Cytoskeletts an passiven Volumenänderungen beschrieben. So wurde für F-Aktin gezeigt, dass es an der Invagination der Plasmamembran bei der Zellschrumpfung beteiligt ist (*Herring et al.* 1999). Darüber hinaus können Elemente des Cytoskeletts an der Volumenregulation beteiligt sein (*Moustakas et al.* 1998), beispielsweise durch die Aktivierung von Ionenkanälen (*Cantiello* 1997).

Die Depolymerisation der Mikrotubuli durch Colchizin führt in proximalen Zellen des Nierentubulus zur vollständigen Unterdrückung von RVD (*Downey et al.* 1995). Der gleiche Effekt wurde auch bei peripheren Neutrophilen bezüglich RVI beobachtet (*Miyata et al.* 2002). Interessanterweise konnten diese beiden Effekte auch bei Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen beobachtet werden: Nach Inkubation mit Colchizin oder Vinblastin, das zur Depolymerisation der Mikrotubuli führt (*Andreu et al.* 1998), waren Zellschwellung und -schrumpfung deutlich verstärkt (Abb. 31 und 33). Erhärtet werden diese Befunde dadurch, dass die Präinkubation mit Paclitaxel, einem Mikrotubuli-Stabilisator (*Manfredi et al.* 1982, *Parekh & Simpkins* 1997), die Wirkung von Colchizin und Vinblastin vollständig aufhob.

Die Präsenz eines Mikrotubuli-Netzwerks im Soma von Retzius-Neuronen konnte mittels konfokaler Aufnahmen nachgewiesen werden (Abb. 30). Weiterhin konnte bei Blutegel-Neuronen mittels *in situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass Tubuline insbesondere im Soma der Neuronen zu gegen sind (*Fedorov et al.* 1999). Das Ausbleiben von RVD unter hypertonischen Bedingungen könnte demnach auf eine passive Stabilisierung des Zellvolumens durch die Mikrotubuli zurückgehen. Möglicherweise ist aber auch der Transport von Proteinen die zur Volumenregulation notwendig sind inhibiert, wie es bereits für glatte Muskelzellen gezeigt wurde (*Chen et al.* 1997).

Im Gegensatz dazu scheinen Aktin-Filamente bei der Volumenregulation von Blutegel-Neuronen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Depolymerisation der Aktin-Filamente durch Cytochalasin B und D (*Goddette & Frieden* 1986) keinen Einfluß auf die Volumenänderungen unter anisotonischen Bedingungen hatte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Osmolyt-Transportsysteme in Blutegel-Neuronen nicht durch das Cytoskelett moduliert werden. Weiterhin könnte auch die Ausstülpung der Plasmamembran ausreichen um den osmotischen Druck auszugleichen. So besitzen die Zellmembranen von Mollusken-Neuronen im Ruhezustand Einfaltungen, die bei einer Schwellung entfaltet werden können (*Herring et al.* 1998). Demzufolge können Zellen Stresssituationen überstehen, ohne ionale RVD-Mechanismen zu aktivieren. Ähnliche Einfaltungen und Ausstülpungen der Plasmamembran wurden auch bei Blutegel-Neuronen beobachtet (vergl. Abb. 20).

4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Die physiologische Bedeutung der Volumenregulation bei Neuronen des medizinischen Blutegels wird verdeutlicht, wenn seine Nahrungsaufnahme betrachtet wird. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Blutegel-Hämolymphe nach der Nahrungsaufnahme über Stunden eine deutlich erhöhte Osmolalität aufweist (*Wenning et al.* 1980, *Wenning* 1987). Dementsprechend benötigen die Neuronen Mechanismen, um diesen Stresssituationen entgegenwirken zu können. Ein vom idealen Osmometer abweichendes Verhalten sowie die regulatorische Volumenzunahme (RVI) konnte unter hypertonischen Bedingungen bei Retzius- und P-Neuronen nachgewiesen werden. Hieran sind Transportmechanismen für Ionen sowie das Cytoskelett beteiligt. Eine Beeinflussung der Transportmechanismen untereinander konnte ebenfalls gezeigt werden. Eine regulatorische Volumenabnahme (RVD) ließ sich dagegen nicht nachweisen. Dieser Mechanismus scheint auch überflüssig zu sein, da Blutegel auch in salzarmem Milieu die Osmolalität ihrer Hämolymphe aufrechterhalten können. Alle hier beschriebenen Regulationssysteme finden sich auch in Zellen anderer Spezies, insbesondere bei Wirbeltieren. Insofern kann der medizinische Blutegel als ein geeignetes *in situ-*Modellsystem betrachtet werden, um die Regulationsmechanismen des Zellvolumens bei neuronalen Zellen mit Hilfe von Mikrofluorimetrie und elektrophysiologischen Methoden studieren zu können.
5. Zusammenfassung

- In der vorliegenden Arbeit wurden Änderungen des Zellvolumens und dessen Regulation unter anisotonischen Bedingungen bei Retzius- und P-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems untersucht. Hierzu wurde die Technik der Mikrofluorimetrie angewendet, welche die simultane Bestimmung des Zellvolumens und intrazellulärer Ionenkonzentrationen ermöglicht. Darüber hinaus wurden Messungen des Membranpotentials (E_m) mit Hilfe Elektrolyt-gefüllter Glasmikroelektroden durchgeführt sowie konfokale Aufnahmen zur Aufklärung morphologischer Strukturen und zur Bestimmung der Verteilung von Ionentransportsystemen erstellt. Die Experimente wurden an Neuronen im intakten Gewebeverband (*in situ*) durchgeführt.
- 2. Die mikrofluorimetrische Volumenmessung beruht auf der Konzentrationsbestimmung eines in das Cytosol gebrachten Fluoreszenzfarbstoffes (Volumenmarker) durch Messung der Fluoreszenzemission in einem kleinen Volumenelement. Als Volumenmarker wurden die Fluoreszenzindikatoren Fura-2, BCECF und SBFI verwendet, die zusätzlich die Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i), des intrazellulären pH-Werts (pH_i) bzw. der intrazellulären Na⁺-Konzentration ([Na⁺]_i) ermöglichten. Alle drei Farbstoffe waren zur Volumenmessung gleich gut geeignet.
- 3. Der bei den Fluoreszenzmessungen auftretende Farbstoffverlust konnte durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden, die dann zur Korrektur der Messdaten verwendet wurde. Der einfache Zeitverlauf spricht für eine ausschließlich cytosolische Lokalisation der Farbstoffe. Der Farbstoffverlust wird überwiegend durch ein Probenecid-sensitives Transportsystem vermittelt.
- 4. Bei Superfusion der Segmentalganglien mit physiologischer Salzlösung wiesen Retzius-Neuronen ein E_m von -39 ± 7 mV, eine $[Ca^{2+}]_i$ von 77 ± 9 nM, eine $[Na^+]_i$ von 7 ± 3 mM und einen pH_i von 7,28 ± 0,17 auf. Für P-Neuronen wurde ein E_m

von -39 ± 6 mV, eine $[Ca^{2+}]_i$ von 70 ± 9 nM, eine $[Na^+]_i$ von 6 ± 2 mM und ein pH_i von 7,26 ± 0,13 bestimmt.

- 5. Die Inhibierung der Na⁺/K⁺-Pumpe mittels Ouabain führte zu einer reversiblen Zellschwellung, einem Anstieg von [Ca²⁺]_i und [Na⁺]_i sowie zu einer Membrandepolarisation. Ionenaustauschexperimente zeigten, dass die Zellschwellung primär auf der elektroneutralen Aufnahme von NaCl beruht. Die Na⁺/K⁺-Pumpe ist offensichtlich maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens unter isotonischen Bedingungen beteiligt.
- 6. Die durch hypertonische Lösungen induzierten Zellschrumpfungen waren von ausgeprägten Membraneinstülpungen begleitet, die Zellschwellungen unter hypotonischen Bedingungen von starken Membranausstülpungen ('blebs'). Hypertonische Versuchslösungen führten zu einer geringen Membrandepolarisation und zu einer Zunahme der Aktionspotentialfrequenz, hypotonische Versuchslösungen dagegen zu einer leichten Membranhyperpolarisation und einer Abnahme der Aktionspotentialfrequenz. Die durch anisotonische Lösungen hervorgerufenen Volumenänderungen und Veränderungen des Membranpotentials waren vollständig reversibel.
- 7. Die Neuronen zeigten nur in schwach anisotonischen Versuchslösungen das Verhalten eines idealen Osmometers. Die Abweichungen in stark anisotonischen Lösungen lassen sich auf volumenregulatorische Vorgänge zurückführen. Unter hypotonischen Bedingungen trat jedoch niemals eine regulatorische Volumenabnahme (RVD) auf, während unter hypertonischen Bedingungen bei Retzius-Neuronen vereinzelt und bei P-Neuronen häufig eine regulatorische Volumenzunahme (RVI) beobachtet wurde.
- 8. An der RVI unter hypertonischen Bedingungen ist wahrscheinlich der Na⁺/H⁺-Austauscher beteiligt. Hierfür sprechen die Wirkungslosigkeit von Amilorid auf das Zellvolumen unter isotonischen Bedingungen sowie die Verstärkung der RVI in Bicarbonat-gepufferten Lösungen. Die Befunde deuten auf eine funktionelle

Kopplung des Na⁺/H⁺-Austauschers mit einem Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher hin, die gemeinsam NaCl in die Zelle transportieren und so einen Beitrag zur RVI leisten.

- An der RVI sind wahrscheinlich auch Na⁺- und Cl⁻-Kanäle sowie der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter beteiligt. Hierfür spricht, dass in Gegenwart von Inhibitoren dieser Transportsysteme die Zellschrumpfung verstärkt und die RVI vermindert war.
- 10. Das Mikrotubuli-System ist ebenfalls an der Aufrechterhaltung des Zellvolumens beteiligt, da nach dessen Depolymerisation durch Colchizin oder Vinblastin verstärkte Volumenänderungen unter anisotonischen Bedingungen auftraten. Darüber hinaus ließ sich der Effekt von Colchizin und Vinblastin durch die Mikrotubuli-stabilisierende Substanz Paclitaxel verhindern. Demgegenüber spielen Aktin-Filamente eine untergeordnete Rolle, da deren Depolymerisation durch Cytochalasin B oder D praktisch wirkungslos war.
- 11. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Neuronen des medizinischen Blutegels Mechanismen zur Aufrechterhaltung und zur Regulation des Zellvolumens besitzen und dass diese "*in situ*" mikrofluorimetrisch charakterisiert werden können. Dies könnte zur grundlegenden Erforschung volumenregulatorischer Prozesse und ihrer Interaktionen in neuronalen Geweben dienen.

6. Literaturverzeichnis

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. J. Physiol. (Lond.) **542**, 3-16

Altamirano, J., Brodwick, M. S., Alvarez-Leefmans, F. J. (1998). Regulatory volume decrease and intracellular Ca^{2+} in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. J. Gen. Physiol. **112**, 145-160

Alvarez-Leefmans, F. J., Gamino, S. M., Reuss, L. (1992). Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurons. J. Physiol. (Lond.) **458**, 603-619

Alvarez-Leefmans, F. J., Altamirano, J., Crowe, W. E. (1995). Use of ion-selective microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume. Methods Neurosci. **27**, 361-391

Andreu, J. M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M. J., Ayala, D., Timasheff, S. N. (1998). Role of the colchicine ring A and its methoxy groups in the binding to tubulin and microtubule inhibition. Biochemistry **37**, 8356-8368

Angstadt, J. D. (1999). Persistent inward currents in cultured Retzius cells of the medicinal leech. J. Comp. Physiol. **184**, 49-61

Ballanyi, K., Grafe, P., Serve, G., Schlue, W.-R. (1990). Electrophysiological measurements of volume changes in leech neuropile glial cells. Glia **3**, 151-158

Bancel, F., Salmon, J.-M., Vigo, J., Vo-Dinh, T., Viallet, P. (1992). Investigation of noncalcium interactions of Fura-2 by classical and synchronous fluorescence spectroscopy. Anal. Biochem. **204**, 231-238

Böhmer, C., Wagner, C. A., Beck, S., Moschen, I., Melzig, J., Werner, A., Lin, J.-T., Lang, F., Wehner, F. (2000). The shrinkage-activated Na⁺ conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 187-194

Boroffka, I. (1968). Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis*. Z. vergl. Physiologie **57**, 348-375

Bray, K. M., Quast, U. (1992). A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. J. Biol. Chem. **267**, 11689-11692

Buchholz, R. (1999). Elektrophysiologische Untersuchungen zur Volumenänderung identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Burg, M. B. (1994). Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. J. Exp. Zool. **268**, 171-175

Burg, M. B. (2000). Macromolecular crowding as a cell volume sensor. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 251-256

Cala, P. M. (1985). Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: characteristics of volume-sensitive K/H and Na/H exchange. Mol. Physiol. **8**, 199-214

Cantiello, H. F. (1997). Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. J. Exp. Zool. **279**, 425-435

Chen, J.-G., Hinesley, R., Kempson, S. A. (1997). Dual action of colchicine on hypertonic activation of system A amino acid transport in vascular smooth muscle cells. Life Sci. **61**, 29-37

Cobbold, P. H., Rink, T. J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmatic free calcium. Biochem. J. **248**, 313-328

Counillon, L., Pouysségur, J. (2000). The expanding family of eukaryotic Na^+/H^+ exchangers. J. Biol. Chem. **275**, 1-4

Crowe, W. E., Altamirano, J., Huerto, L., Alvarez-Leefmans, F. J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. Neuroscience **6**, 283-296

De Petris, L., Luchetti, A., Emma, F. (2001). Cell volume regulation and transport mechanisms across the blood-brain barrier: implications for the management of hypernatraemic states. Eur. J. Pediatr. **160**, 71-77

Deitmer, J. W., Schlue, W.-R. (1983). Intracellular Na⁺ and Ca²⁺ in leech Retzius neurones during inhibition of the Na⁺-K⁺ pump. Pflügers Arch. **397**, 195-201

Deitmer, J. W., Schlue, W.-R. (1987). The regulation of intracellular pH by identified glial cells and neurones in the central nervous system of the leech. J. Physiol. (Lond.) **388**, 261-283

Denac, H., Mevissen, M., Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **362**, 453-479

Diarra, A., Sheldon, C., Church, J. (2001). *In situ* calibration and $[H^+]$ sensitivity of the fluorescent Na⁺ indicator SBFI. Am J. Physiol. **280**, 1623-1633

Dierkes, P. W. (1994). Mikrofluorimetrische Untersuchungen zur Verteilung von Glutamat-Rezeptoren in Segmentalganglien des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Dierkes, P. W., Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (1996). Distribution and functional properties of glutamate receptors in the leech central nervous system. J. Neurophysiol. **75**, 2312-2321

Dierkes, P. W., Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (1997). Voltage-dependent Ca²⁺-influx into identified leech neurons. Brain Res. **746**, 285-293

Dierkes, P. W. (1998). Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen des Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -Kanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Dierkes, P. W., Coulon, P., Neumann, S., Schlue, W.-R. (2003). Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations under voltageclamp conditions in invertebrate nerve cells. Anal. Bioanal. Chem. **373**, 762-766

Dörner, R., Ballanyi, K., Schlue, W.-R. (1990). Glutaminergic responses of neuropile glial cells and Retzius neurones in the leech central nervous system. Brain Res. **523**, 111-116

Dörner, R. (1991). Elektrophysiologische und autoradiographische Untersuchungen zur Wirkung von Glutamat bei Retzius-Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des Blutegels *Hirudo medicinalis L*.. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Dorup, L., Clausen, T. (1996). Characterization of bumetanide sensitive Na⁺ and K⁺ transport in rat skeletal muscle. Acta Physiol. Scand. **158**, 119-127

Downey, G. P., Grinstein, S., Sue-A-Quan, A., Czaban, B., Chan, C. K. (1995). Volume regulation in leukocytes: requirement for an intact cytoskeleton. J. Cell. Physiol. **163**, 96-104

Eilers, J., Plant, T., Konnerth, A. (1996). Localized calcium signalling and neuronal integration in cerebellar Purkinje neurones. Cell Calcium **20**, 215-226

Eveloff, J., Warnock, D. G. (1987). K-Cl transport systems in rabbit renal basolateral membrane vesicles. Am. J. Physiol. **252**, 883-889

Fedorov, A., Johnston, H., Korneev, S., Blackshaw, S., Davies, J. (1999). Cloning, characterisation and expression of the α -tubulin genes of the leech, *Hirudo medicinalis*. Gene **227**, 11-19

Frey, G., Hanke, W., Schlue, W.-R. (1993). ATP-inhibited and Ca^{2+} -dependent K⁺ channels in the soma membrane of cultured leech Retzius neurons. J. Membrane Biol. **134**, 131-142

Frey, G., Schlue, W.-R. (1993). pH recovery from intracellular alkalinization in Retzius neurones of the leech central nervous system. J. Physiol. (Lond.) **462**, 627-643

Fürst, J., Gschwentner, M., Ritter, M., Bottà, G., Jakab, M., Mayer, M., Garavaglia, L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmüller, S., Wöll, E., Paulmichl, M. (2002). Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. Pflügers Arch. **444**, 1-25

Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fievet, B., Motais, R. (1996). A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. Cell. Mol. Biol. **42**, 985-994

Go, K. G. (1997). The normal and pathological physiology of brain water. Adv. Tech. Stand. Neurosurg. **23**, 47-142

Goddette, D. W., Frieden, C. (1986) Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. J. Biol. Chem. **261**, 15974-15980

Goldin, A. L. (2002). Evolution of voltage-gated Na(+) channels. J. Exp. Biol. 205, 575-584

Grafstein, B., Forman, D. S. (1980). Intracellular transport in neurons. Physiol. Rev. **60**, 1167-1283

Granitzer, M., Mountian, I., De Smet, P., van Driessche, W. (1994). Effect of ouabain on membrane conductances and volume in A6 cells. Renal. Physiol. Biochem. **17**, 223-231

Gray, M. L., Hoffman, R. A., Hansen, W. P. (1983). A new method for cell volume measurement based on volume exclusion of a fluorescent dye. Cytometry **3**, 428-434

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. **260**, 3440-3450

Hanck, D. A., Makielski, J. C., Sheets, M. F. (2000). Lidocaine alters activation gating of cardiac Na channels. Pflügers Arch. **439**, 814-821

Häussinger, D. (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. Biochem. J. **313**, 697-710

Häussinger, D., Stoll, B., vom Dahl, S., Theodoropoulos, P. A., Markogiannakis, E., Gravanis, A., Lang, F., Stournaras, C. (1994). Effect of hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. Biochem. Cell. Biol. **72**, 12-19.

Haugland, R. P. (2002). Handbook of fluorescent probes and research products. 9th edition. Molecular Probes, Inc., Eugene OR.

Hernández, J. A., Cristina, E. (1998). Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the Na⁺ pump and of Cotransport systems. Am. J. Physiol. **275**, 1067-1080

Herring, T. L., Slotin, I. M., Baltz, J. M., Morris, C. E. (1998). Neuronal swelling and surface area regulation: elevated intracellular calcium is not a requirement. Am. J. Physiol. **274**, 272-281

Herring, T. L., Cohan, C. S., Welnhofer, E. A., Mills, L. R., Morris, C. E. (1999). F-actin at newly invaginated membrane in neurons: implications for surface area regulation. J. Membr. Biol. **171**, 151-169 Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M. M., Yoshida, S., Noda, M. (2002). Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. Nat. Neurosci. 5, 511-512

Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (2001). The ouabain-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in leech Retzius neurones is mediated by voltage-dependent Ca^{2+} channels. Brain Res. **892**, 248-254.

Hofer, A. M., Schlue, W.-R., Curci, S., Machen, T. E. (1995). Spatial distribution and quantitation of free luminal [Ca] within the InsP₃-sensitive internal store of individual BHK-21 cell: ion dependence of InsP₃-induced Ca release and reloading. FASEB J. **9**, 788-798

Hoffmann, E. K. (1986). Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells. Biochim. Biophys. Acta **864**, 1-3

Hoffmann, E. K. (2000). Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 273-288

Hougaard, C., Jorgensen, F., Hoffmann, E. K. (2001). Modulation of the volumesensitive K⁺ current in Ehrlich ascites tumour cells by pH. Pflügers Arch. **442**, 622-633

Isenring, P., Forbush, B. (1997). Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. J. Biol. Chem. **272**, 24556-24562

Jakab, M., Fürst, J., Gschwentner, M., Bottà, G., Garavaglia, M.-L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmüller, S., Wöll, E., Chwatal, S., Ritter, M., Paulmichl, M. (2002). Mechanisms Sensing and Modulating Signals Arising From Cell Swelling Cell. Physiol. Biochem. **12**, 235-258

James-Kracke, M. R. (1992). Quick and accurate method to convert BCECF fluorescence to pH_i : calibration in three different types of cell preparations. J. Cell. Physiol. **151**, 596-603

Janmey, P. A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. Physiol. Rev. **78**, 763-781

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiol. Rev. **82**, 503-568

Jiang, L., Chernova, M. N., Alper, S. L. (1997). Secondary regulatory volume increase conferred on *Xenopus* oocytes by expression of AE2 anion exchanger. Am. J. Physiol. **272**, 191-202

Juhaszova, M., Blaustein, M. (1997). Na pump low and high ouabain affinity subunit isoforms are differently distributed in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. **94**, 1800-1805

Junankar, P. R., Kirk, K. (2000). Organic Osmolyte Channels: A Comparative View. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 355-360

Kai Kai, M. A., Pentreath, V. W. (1981). High resolution analysis of 3[H]2deoxyglucose incorporation into neurons and glial cells in invertebrate ganglia: histological processing of nervous tissue for selective marking of glycogen. J. Neurocytol. **10**, 693-708

Kempski, O., von Rosen, S., Weigt, H., Staub, F., Peters, J., Baethmann, A. (1991). Glial ion transport and volume control. Ann. NY Acad. Sci. **633**, 306–317

Kim, Y., Bang, H., Kim, D. (2000). TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. J. Biol. Chem. **275**, 9340-9347

Kirk, K. (1997). Swelling-activated organic osmolytes channels. J. Membrane Biol. **158**, 1-16

Klees, G. (2002). Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Volumenänderungen identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Kleinhaus, A. L., Angstadt, J. D. (1995). Diversity and modulation of ionic conductances in leech neurons. J. Neurobiol. **27**, 419-433

Ko, K. S., McCulloch, C. A. G. (2000). Partners in protection: Interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces. J. Membrane Biol. **174**, 75-85

Kuo, C.-C. (1998). A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na^+ channels. Mol. Pharmacol. **54**, 712-721

Kuo, C.-C., Huang, R.-C., Lou, B.-S. (2000). Inhibition of Na(+) current by diphenhydramine and other diphenyl compounds: molecular determinants of selective binding to the inactivated channels. Mol. Pharmacol. **57**, 135-143

Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D. (1998a). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol. Rev. 78, 247-306

Lang, F., Busch, G. L., Völkl, H. (1998b). The diversity of cell volume regulatory mechanisms. Cell. Physiol. Biochem. **8**, 1-45

Larsen, T. H., Dalen, H., Boyle, R., Souza, M. M., Lieberman, M. (2000). Cytoskeletal involvement during hypo-osmotic swelling and volume regulation in cultured chick cardiac myocytes. Histochem. Cell. Biol. **113**, 479-488

Lauf, P. K., Adragna, N. C. (2000). K-Cl cotransport: Properties and molecular mechanism. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 341-354

Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. Physiol. Rev. **79**, 1317-1372

Macagno, E. R. (1980). Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. J. Comp. Neurol. **190**, 283-302

Macknight, A. D. C., Leaf, A. (1977). Regulation of cellular volume. Physiol. Rev. 57, 510-573

Malécot C. O., Argibay, J. A. (1999). Block of gating currents related to K⁺ channels as a mechanism of action of cloflium and d-sotalol in isolated guinea-pig ventricular heart cells. Br. J. Pharmacol. **128**, 301-312

Manfredi, J. J., Parness, J., Horwitz, S. B. (1982). Taxol binds to cellular microtubules. J. Biol. Chem. **94**, 688-696

Meuwis, K., Boens, N., De Schryver, F. C., Gallay, J., Vincent, M. (1995). Photophysics of the fluorescent K^+ indicator PBFI. Biophys. J. **68**, 2469-2473

Minta, A., Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic sodium. J. Biol. Chem. **264**, 19449-19457

Miyata, Y., Okada, K., Ishibashi, S., Asano, Y., Muto, S. (2002). P-gp-induced modulation of regulatory volume increase occurs via PKC in mouse proximal tubule. Am. J. Physiol. **282**, 65-76

Moustakas, A., Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., Häussinger, D., Stournaras, C. (1998). The cytoskeleton in cell volume regulation. Contrib. Nephrol. **123**, 121-134

Muallem, S., Zhang, B.-X., Loessberg, P. A., Star, R. A. (1992). Simultaneous recording of cell volume changes and intracellular pH or Ca^{2+} concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01. J. Biol. Chem. **267**, 17658-17664

Müller, A. (2000). Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung der Wirkung glutamaterger Stimulation auf Mg²⁺-Einstrom und Mg²⁺-Regulation in Retzius-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Müller, M., Schlue, W.-R. (1998). Macroscopic and single-channel chloride currents in neuropile glial cells of the leech central nervous system. Brain Res. **781**, 307-319

Muller, K. J., Nicholls, J. G., Stent, G. S. (1981). Neurobiology of the Leech. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, pp. 277-288

Munsch, T., Deitmer, J. W. (1995). Maintenance of fura-2 fluorescence in glial cells and neurones of the leech central nervous system. J. Neurosci. Meth. **57**, 195-204

Munsch, T., Schlue, W.-R. (1993). Intracellular chloride activity and the effect of 5-hydroxytryptamine on the chloride conductance of leech Retzius neurons. Eur. J. Neurosci. **5**, 1551-1557

Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., Fujiyosji, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. Nature **407**, 599-605

Nett, W., Deitmer, J. W. (1996). Simultaneous measurements of intracellular pH in the leech giant glial cell using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein and ion-sensitive microelectrodes. Biophys. J. **71**, 394-402

Nett, W., Deitmer, J. W. (1998). Intracellular Ca²⁺ regulation by the leech giant glial cell. J. Physiol. (Lond.) **507**, 147-162

Neumann, S. (2000). Potentiometrische Messungen zur Volumenregulation im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Neumann, S., Dierkes, P. W., Schlue, W. R. (2001). Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations in leech Retzius neurones. Electrochim. Acta **47**, 309-317

Nicholls, J. G., Kuffler, S. W. (1964). Extracellular space as a pathway for exchange between blood and neurons in the central nervous system of the leech: ionic composition of glial cells and neurons. J. Neurophysiol. **27**, 645-671

Nilius, B., Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiol. Rev. **81**, 1415-1459

Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G. (1998). Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. Pflügers Arch. **436**, 742-748

O'Neill, W. C. (1999). Physiological significance of volume-regulated transporters. Am. J. Physiol. **276**, 995-1011

Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., Morishima, S. (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). J. Physiol. (Lond.) **532**, 3-16

Orlov, S. N., Resink, T. J., Bernhardt, J., Buhler, F. R. (1992). Volume-dependent regulation of sodium and potassium fluxes in cultured vascular smooth muscle cells: dependence on medium osmolality and regulation by signalling systems. J. Membrane Biol. **129**, 199-210

Ouahbi, A., C. Duchene, C., Gilles, R. (1990). Comparative studies of volume restoration following cold-stress induced swelling in renal tissues. I. Effects of ouabain, K^+ free medium, colchicine and cytochalasin B on rat and rabbit kidney cortex slices. Comp. Biochem. Physiol. **97**, 265-273

Papakonstanti, E. A., Vardaki, E. A., Stournaras, C. (2000). Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 257-264

Parekh, H., Simpkins, H. (1997). The transport and binding of taxol. Gen. Pharmac. **29**, 167-172

Pasantes-Morales, H., Cardin, V., Tuz, K. (2000a). Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. Neurochem. Res. 25, 1301-1314

Pasantes-Morales, H., Franco, R., Torres-Marques, M. E., Hernández-Fonseca, M., Ortega, A. (2000b). Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and

isovolumetric regulation in brain cells: Contribution and mechanisms. Cell. Physiol. Biochem. **10**, 361-370

Pederson, S. F., Varming, C., Christensen, S. T., Hoffmann, E. K. (2002). Mechanisms of activation of NHE by cell shrinkage and by calyculin A in Ehrlich ascites tumor cells. J. Membrane Biol. **189**, 67-81

Pellegrino, M., Pellegrini, M., Simoni, A., Gargini, C. (1990). Stretch-activated cation channels with large unitary conductance in leech central neurons. Brain Res. **525**, 322-326

Pernberg, J., Machemer, H. (1995). Fluorometric measurement of the intracellular free $Ca(^{2+})$ -concentration in the ciliate *Didinium nasutum* using Fura-2. Cell Calcium **18**, 484-494

Raju, B., Murphy, E., Levy, L. A., Hall, R. D., London, R. E. (1989). A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. Am. J. Physiol. **256**, 540-548

Reuss, L. (1985). Changes in cell volume measured with an electophysiologic technique. Proc. Natl. Acad. Sci. **82**, 6014-6018

Riehl, B., Schlue, W.-R. (1990). Localization of carbonic anhydrase in identified glial cells of the leech central nervous system: application of histochemical and immunocytochemical methods. J. Histochem. Cytochem. **38**, 1173-1178

Rink, T. J., Tsien, R. Y., Pozzan, T. (1982). Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. J. Cell. Biol. **96**, 189-196

Ritter, M., Fuerst, J., Wöll, E., Chwatal, S., Gschwentner, M., Lang, F., Deetjen, P., Paulmichl, M. (2001). Na⁺/H⁺Exchangers: Linking osmotic dysequilibrium to modified cell function. Cell. Physiol. Biochem. **11**, 1-18

Russo, M. A., Morgante, E., Mariani, M. F., Yeh, H. I., Farber, J. L. van Rossum, G. D. (1994). Effects of ouabain and chloride-free medium on isosmotic volume control and ultrastructure of hepatocytes in primary culture. Eur. J. Cell Biol. **64**, 229-242

Sarkadi, B., Parker, J. C. (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. Biochim. Biophys. Acta **1071**, 407-427

Scheiner-Bobis, G., Schoner, W. (2001). A fresh facet for ouabain action. Nat. Med. **12**, 1288-1289

Schliess, F., Häussinger, D. (2003). Cell volume and insulin signaling. Int. Rev. Cytol.225, 187-228

Schlue, W.-R., Thomas, C. (1985). A dual mechanism for intracellular pH regulation by leech neurones. J. Physiol. (Lond.) **364**, 327-338

Schlue, W.-R., Deitmer, J. W. (1987). Direct measurement of intracellular pH in identified glial cells and neurones of the leech central nervous system. Can. J. Physiol. Pharmacol. **65**, 978-985

Schlue, W.-R., Kilb, W., Günzel, D. (1997). Ultramicroelectrodes for membrane research. Electrochim. Acta **42**, 3197-3205

Schoppe, J. (2000). Funktionelle Eigenschaften und Verteilungsmuster Koffeinsensitiver Ionenkanäle in den Segmentalganglien des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dörschner, H., Gross, I., Aquilar-Bryan, L., Schwanstecher, C., Bryan, J. (1998). Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. EMBO J. **17**, 5529-5535

Seino, S. (1999). ATP-Sensitive Potassium Channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. Annu. Rev. Physiol. **61**, 337-362

Shen, M. R., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Hsu, K. S., Wu, M. L. (1999). Modulation of volume-sensitive Cl⁻ channels and cell volume by actin filaments and microtubules in human cervical cancer HT-3 cells. Acta Physiol. Scand. **167**, 215-225

Siebens, A. W., Kregenow, F. M. (1985). Volume-regulatory responses of *Amphiuma* red cells in anisotonic media. The effect of amiloride. J. Gen. Physiol. **86**, 527-564

Simkiss, K. (1998). Cell membranes; barriers, regulators and transducers? Comp. Biochem. Physiol. **120**, 17-22

Singer, W. D., Jordan, M. A., Wilson, L., Himes, R. H. (1989). Binding of vinblastine to stabilized microtubules. Mol. Pharmacol. **36**, 366-370

Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C., Bayliss, D. A. (2000). The TASK-1 twopore domain K^+ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalational anesthetics. J. Neurosci. **20**, 6347-6354

Smith, T. W., Rasmusson, R. L., Lobaugh L. A., Lieberman, M. (1993). Na⁺/K⁺-pump inhibition induces cell shrinkage in cultured chick cardiac myocytes. Basic Res. Cardiol. **88**, 411–420

Steinberg, S. F., Bilezikian. J. P., Al-Awqati, Q. (1987a). Fura-2 fluorescence is localized to mitochondria in endothelial cells. Am. J. Physiol. **253**, 744-747

Steinberg, T. H., Newman, A. S., Swanson, J. A., Silverstein, S. C. (1987b). Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. J. Cell Biol. **105**, 2695-2702

Strange, K. (1993). Maintenance of cell volume in the central nervous system. Pediatr. Nephrol. **7**, 689-697

Strange, K., Emma, F., Jackson, P. S. (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. Am. J. Physiol. **270**, 711-730

Strange, K., Jackson, P. S. (1995). Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. Kidney Int. **48**, 994-1003

Student (1908). The probable error of a mean. Biometrika 6, 1-25

Trachtman, H. (1992). Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances: II. Pediatr. Nephrol. **6**, 104-114

Trosiner, S. (2003). Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Neurotransmitter- und K⁺-induzierten Volumenänderungen bei Retzius- und P-Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Vanucci, R. C., Maher, F., Simpson, I. A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. Glia **2**, 12-21

Walmsley, A. R., Barrett, M. P., Bringaud, F., Gould, G. W. (1998). Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. Trends Biochem. Sci. 23, 476-481

Wehner, F., Rosin-Steiner, S., Beetz, G., Sauer, H. (1993). The anion transport inhibitor DIDS increases rat hepatocyte K^+ conductance via uptake through the bilirubin pathway. J. Physiol. (Lond.) **471**, 617-635

Wehner, F., Tinel, H. (1998). Role of Na⁺ conductance, Na⁺-H⁺ exchange, and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ symport in the regulatory volume increase of rat hepatocytes. J. Physiol. (Lond.) **506**, 127-142

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K. H. (2003). Cell volume regulation: Osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **148**, 1-80

Weinlich, M., Heydasch, U., Mooren, F., Starlinger, M. (1998). Simultaneous detection of cell volume and intracellular pH in isolated rat duodenal cells by confocal microscopy and BCECF. Res. Exp. Med. **198**, 73-82

Wenning, A. (1987). Salt and water regulation *Macrobdella decora* (Hirudinea: Gnathobdelliformes) under osmotic stress. J. Exp. Biol. **131**, 337-349

Wenning, A., Zerbst-Boroffka, I., Bazin, B. (1980). Water and salt excretion in the leech (*Hirudo medicinalis*). J. Comp. Physiol. **139**, 97-102

Wolfe, D. E., Nicholls, J. G. (1967). Uptake of radioactive glucose and its conversion to glycogen by neurons and glial cells in the leech central nervous system. J. Neurophysiol. **30**, 1593-1609

Wüsten, H. J. (2000). Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen von Volumenänderungen bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Wüsten, H. J., Dierkes, P.W., Schlue, W.-R. (2000). Measurement of cell volume changes in leech neurons with microfluorimetric and morphometric methods. Pflügers Arch. **439**, R442

Wüsten, H. J., Dierkes, P.W., Schlue, W.-R. (2003). Role of the Na⁺-K⁺-pump in the maintenance of cell volume in leech neurons. Pflügers Arch. **445**, S57

Zerbst-Boroffka, I. (1973). Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis* nach Nahrungsaufnahme. J. Comp. Physiol. **84**, 185-204

Zeuthen, T., Klaerke, D. A. (1999). Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. J. Biol. Chem. **274**, 21631-21636

Ziv, N. E., Spira, M. E. (1995). Axotomy induces a transient and localized elevation of the free intracellular calcium concentration to the millimolar range. J. Neurophysiol. **74**, 2625-2637

7. Abbildungen





Abb. 1: Der medizinische Blutegel Hirudo medicinalis und sein Zentralnervensystem.

- (A) Fotografische Aufnahme eines Blutegels.
- (B) Schematische Darstellung der Lage des Zentralnervensystems im Blutegelkörper (nach *Riehl & Schlue* 1990). Das Zentralnervensystem beginnt mit dem Kopfganglion und endet mit dem Analganglion. Dazwischen liegen 21 Segmentalganglien, die über paarige Konnektive und den Faivre'schen Nerv miteinander in Kontakt stehen.



Abb. 2: Ventralansicht eines typischen Blutegel-Segmentalganglions.

- (A) Mikroskopische Durchlichtaufnahme eines Segmentalganglions.
- (B) Schematische Darstellung. Die in dieser Arbeit untersuchten Neuronen (Retzius: R, pressure: P) sind farbig hervorgehoben (modifiziert nach *Muller et al.* 1981).

Α



Abb. 3: Schematische Darstellung des Mikrofluorimeters.

Das Licht der beiden Xenonlampen (XL) wurde mittels zweier Chopper (C) alternierend über die beiden Spiegel (S) den jeweiligen Monochromatoren (M1, M2) zugeführt. Das aus den Monochromatoren austretende Anregungslicht gelangte über einen mehrarmigen Quarzlichtleiter in ein Umkehrmikroskop, wo es über einen dichroitischen Spiegel (DS) und das Objektiv (O) zum Präparat (P) geleitet wurde. Das vom Präparat emittierte Fluoreszenzlicht wurde vom Objektiv aufgefangen und über den DS und ein Sperrfilter (SF, 510/540 nm) zum Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) geleitet. Das SEV-Signal wurde über ein Interface (IF) mit einem Personal-Computer aufgezeichnet.



Abb. 4: Schematische Darstellung der konfokalen Laserscan-Mikroskopie.

- (A) Laserlicht definierter Wellenlänge gelangte über eine konfokale Blende in das Scanner-Modul und wurde durch das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Aus der Fokusebene emittiertes Licht gelangte über Scanner, Farbteiler und Sperrfilter auf die Detektoren (,Photomultiplier'). Eine variable Lochblende (,pinhole') ermöglichte die Detektion von Licht ausschließlich aus der fokalen Ebene, während alle Photonen, die nicht aus dieser Ebene stammen, wirkungsvoll ausgeblendet wurden.
- (B) Der Z-Motor ermöglichte die Detektion der Farbstofffluoreszenzfluoreszenz in verschiedenen Präparatebenen. Mittels verschiedener Objektive konnten entweder das gesamte Ganglion (B I) oder einzelne Schnittebenen des Neurons (B II) gescannt werden. Die Zusammensetzung der Schnittbilder mittels der Software Meta View ermöglichte die dreidimensionale Rekonstruktion einzelner Zellen (B III). Als Farbstoff wurde in Teilabbildung B I und III Oregon Green[®] BAPTA-1 und in B II Mito Tracker Red[®] CM-H₂XRos verwendet.



Abb. 5: Eichung des Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2.

- (A) Mikrofluorimetrisch registrierte Anregungsspektren der Ca²⁺-gesättigten und Ca²⁺freien Form von Fura-2. Die Eichlösungen enthielten 100 μ M Fura-2, 100 mM KCl und 50 mM HEPES, pH = 7,40. Der Ca²⁺-gesättigten Lösung wurden 10 mM CaCl₂ und der Ca²⁺-freien Lösung 10 mM EGTA zugegeben. Der Schnittpunkt der beiden Spektren bei 360 nm stellt den Isofluarpunkt des Farbstoffes dar, bei dem die Fluoreszenzemission unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration ist. Zur Messung des Zellvolumens wurde Fura-2 mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt. Zur Bestimmung von [Ca²⁺]_i wurden die Anregungswellenlängen 340 und 380 nm herangezogen.
- (B) Eichkurve nach der Ratio-Methode: Abhängigkeit des Verhältnisses (R(Fura-2)) der bei Anregung mit 340 und 380 nm ermittelten Fluoreszenzintensitäten (F₃₄₀/F₃₈₀) von der Ca²⁺-Konzentration. Für die Eichung wurden die *in vitro* ermittelten Werte für R_{min}, R_{max} und S_{f2}/S_{b2} eingesetzt. Der Wert für K_d wurde aus der Literatur übernommen (135 nM, *Grynkiewicz et al.* 1985).



Abb. 6: Einfluss von 89 mM K⁺, 2 mM Probenecid und 2 % Triton X-100 auf die Fura-2-Fluoreszenz und [Ca²⁺]_i.

- (A) Die Erhöhung der K⁺-Konzentration von 4 auf 89 mM führt zu einem raschen Anstieg von F_{340} und einem Abfall von F_{380} und somit zu einem $[Ca^{2+}]i$ -Anstieg. F_{360} blieb dagegen unbeeinflusst und fiel erst nach ca. 50 s geringfügig ab.
- (B) Die Applikation des Detergens Triton X-100 (2 %) induzierte einen einphasigen Abfall von F_{360} . F_{340} stieg dagegen zunächst kurz an, was auf den Ca²⁺-Einstrom bedingt durch die Permeabilisierung der Plasmamembran zurückzuführen ist. Entsprechend fiel F_{380} deutlich schneller als F_{360} .
- (C) Die Applikation von 2 mM Probenecid blockierte den durch Farbstoffverlust bedingten F_{360} -Abfall. Die Exponentialfunktion zur Beschreibung des Farbstoffverlustes ist rot dargestellt (t = 1490 s). Auf $[Ca^{2+}]_i$ hatte Probenecid keinen Einfluss.



Abb. 7: Änderungen der Fura-2-Fluoreszenz bei einem Retzius-Neurons unter anisotonischen Bedingungen.

Die Fluoreszenz wurde innerhalb eines kleinen Messareals gemessen, welches ca. 10 % des Zellquerschnitts einnahm. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 360 nm (F₃₆₀). Der Wechsel von physiologischer Salzlösung in eine hypertonische Lösung (+85 mM NaCl) führte zu einem reversiblen Anstieg der F₃₆₀-Fluoreszenz, während der Wechsel in eine hypotonische Lösung (-59 mM NaCl) einen reversiblen Abfall auslöste (A). Während des Experiments konnte ein stetiger Fluoreszenzabfall bedingt durch Farbstoffverlust beobachtet werden, der durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden konnte ($\tau = 1390$ s; rote Linie). Der exponentielle Fit ermöglichte es, das Fura-2-Signal bezüglich des Farbstoffverlustes zu korrigieren (B). Die [Ca²⁺]_i blieb von den Volumenänderungen nahezu unbeeinflusst (C).



Abb. 8: Eichung des Na⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes SBFI.

- (A) *In vitro*-Anregungsspektren von SBFI bei unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen (0-60 mM). Der Isofluarpunkt liegt *in vitro* bei 370 nm (vgl. *Minta & Tsien* 1989).
- (B) Fluoreszenzemissionen von SBFI bei Anregung mit 340, 360 und 380 nm (F₃₄₀, F₃₆₀, F₃₈₀) gemessen in einem Retzius-Neuron in NSL bzw. K⁺-freier Lösung. Durch den Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration ([Na⁺]_i) kommt es zu einem Abfall von F₃₆₀ und F₃₈₀. F₃₄₀ bleibt hiervon unberührt. Aufgrund der Verschiebung des Spektrums in den kürzerwelligen Bereich *in situ* (vergl. *Diarra et al.* 2001) wurde SBFI zur Messung des Zellvolumens mit Licht der Wellenlänge 340 nm angeregt.
- (C) Abhängigkeit des Verhältnisses R(SBFI) der bei Anregung mit 340 und 380 nm ermittelten Fluoreszenzintensitäten von [Na⁺]_i. Die verwendeten Werte für [Na⁺]_i wurden unter den angegebenen Bedingungen bei Retzius-Neuronen mit ionensensitiven Glasmikroelektroden (ISME) gewonnen (*Deitmer & Schlue* 1983, *Dörner et al.* 1990, *Müller* 2000, *Trosiner* 2003, *Klees* pers. Mitteilung). Die Beziehung zwischen R (SBFI) und [Na⁺]_i wurde unter Verwendung des Formalismus von *Grynkiewicz et al.* (1985) gefittet. Fit-Parameter: R_{min} = 0,66; R_{max} = 1,90; S_{f2}/S_{b2} = 5,18; K_d = 17 mM.





- (A) *In vitro*-Anregungsspektren von BCECF bei unterschiedlichen pH-Werten (6,8-10,0). Für die Volumenmessungen wurde der zweite Isofluarpunkt bei 440 nm gewählt.
- (B) Abhängigkeit des Verhältnisses R(BCECF) der bei Anregung mit 440 und 470 nm ermittelten Fluoreszenzintensitäten (F_{440}/F_{470}) vom pH-Wert. Die durchgezogene Linie wurde mit Hilfe des Formalismus von *Grynkiewicz et al.* (1985) berechnet. Fit-Parameter: $R_{min} = 0,158$, $R_{max} = 0,453$, $S_{f2}/S_{b2} = 3,45$ und $K_d = 107$ nM (pK_a = 6,97; *Rink et al.*, 1982). R_{min} wurde aus dem *in vitro*-Spektrum der weitgehend deprotonierten Form von BCECF (pH = 10,0) übernommen.



Abb. 10: Änderungen der SBFI- und BCECF-Fluoreszenz bei Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen.

Gemessen wurde die Fluoreszenz innerhalb eines kleinen Messareals, das ca. 10 % des Zellquerschnitts einnahm. Die Anregung erfolgte bei den jeweiligen Isofluarpunkten mit Licht der Wellenlänge 340 nm (F_{340}) für SBFI und 440 nm (F_{440}) für BCECF (vergl. Abb. 6A, 7A). Der Wechsel von physiologischer Salzlösung in eine hypertonische Lösung (+85 mM NaCl) führte zu einem reversiblen Anstieg von F_{340} bzw. F_{440} , während der Wechsel in eine hypotonische Lösung (-59 mM NaCl) einen reversiblen Abfall von F_{340} bzw. F_{440} auslöste (A, B). Während der Experimente konnte ein stetiger Fluoreszenzabfall bedingt durch Farbstoffverlust beobachtet werden, der durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden konnte (rote Linien in A, B), und der bei beiden Farbstoffen deutlich langsamer war als bei Fura-2 (SBFI: τ = 4350 s, BCECF: τ = 2431 s; vgl. Abb. 5, Tabelle 8). Der exponentielle Fit ermöglichte es, die SBFI- bzw. BCECF-Signale bezüglich des Farbstoffverlustes zu korrigieren (C, D).



Abb. 11: Vergleich der mit Fura-2, BCECF und SBFI gemessenen relativen Volumina von Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen.

Die Volumenänderungen wurden durch 5-minütige Änderung der Badosmolarität ausgelöst und mit den verschiedenen Farbstoffen gemessen. Unter hypertonischen Bedingungen (Zugabe von 85 mM NaCl) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05) bezüglich der maximal induzierten Zellschrumpfung. Entsprechendes gilt für die Zellschwellung unter hypotonischen Bedingungen (Wegnahme von 59 mM NaCl).





Abb. 12: Konfokale Aufnahmen zur Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase in Retzius-Neuronen.

Präparate inkubiert mit dem Fluoreszenzmarker der Na⁺/K⁺-ATPase Bodipy FL Ouabain (250 nM, 20 min). Sowohl die Gesamtaufnahme eines Segmentalganglions (A) als auch die zweier Retzius-Neuronen in stärkerer Vergrößerung (B) zeigen eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung in der Plasmamembran der Neuronen (Pfeile), die auf eine homogene Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase hindeutet.



Abb. 13: Wirkung von Ouabain auf Zellvolumen, $[Ca^{2+}]_i$ und E_m von Retzius-Neuronen. Registrierbeispiel zur Wirkung von Ouabain (0,5 mM) unter isotonischen Bedingungen. Nach 6minütiger Ouabain-Applikation begann das Zellvolumen monophasisch auf 140 % zu steigen, wobei das Maximum erst 10 min nach Auswaschung des Ouabains erreicht wurde (A). $[Ca^{2+}]_i$ begann 1 min nach Beginn der Ouabain-Applikation biphasisch auf ein Maximum von 350 nM zu steigen, das ebenfalls erst nach Auswaschung des Ouabains erreicht wurde (B). Der Effekt von Ouabain auf Zellvolumen und $[Ca^{2+}]_i$ war vollständig reversibel. Die Applikation von Ouabain löste eine mehrphasige, weitgehend reversible Depolarisation aus (C). Auch das Maximum der Depolarisation wurde erst nach Auswaschung des Ouabains erreicht.



Abb. 14: Wirkung von Ouabain auf Zellvolumen, $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ und E_m von Retzius-Neuronen in Cl⁻-freier bzw. Na⁺-freier Lösung. Die Applikation von Ouabain (0,5 mM) hatte in Cl⁻- bzw. Na⁺-freier Lösung keinen Einfluss auf das Zellvolumen (A und B). In Cl⁻-freier Lösung führte Ouabain zu einem 2-maligen transienten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ (A) und zu einer raschen Membrandepolarisation (rechts). Ouabain hatte in Na⁺-freier Lösung keinen Einfluss auf $[Na^+]_i$ oder E_m (B). Nach Rückwechsel in NSL erfolgte ein $[Na^+]_i$ -Anstieg (B).





Die Applikation von Ouabain (0,5 mM) in Ca²⁺-freier Lösung führte zu einer langsamen Zellschwellung (A), die nach Rückwechsel in NSL schnell zunahm (Pfeil). Nach Durchlaufen eines Maximums kehrte das Zellvolumen auf den Ausgangswert zurück. $[Ca^{2+}]_i$ blieb in Ca²⁺-freier Lösung unbeeinflusst, stieg jedoch nach Rückwechsel in NSL stark an (B). In Ca²⁺-freier Lösung kam es zu einer Membrandepolarisation und zu starken Oszillationen (C, Pfeil) des Membranpotentials, die in Gegenwart von Ouabain verschwanden. In NSL kehrte E_m auf den Ausgangswert zurück.


Abb. 16: Statistische Auswertung zur Wirkung von Ouabain (0,5 mM) auf das Zellvolumen, E_m , $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ bei Retzius-Neuronen.

- (A) Die Applikation von Ouabain in NSL führte zur reversiblen Zellschwellung. Die Schwellung war unter Ca²⁺-freien Bedingungen nicht beeinflusst, während sie in Cl⁻ bzw. Na⁺-freier Lösung unterdrückt war.
- (B) Das Ruhemembranpotential in NSL lag bei -49 \pm 10 mV. In NSL und in Ca²⁺-freier Lösung führte Ouabain zu einer mehrphasigen Depolarisation. Diese war in Cl⁻freier Lösung verstärkt und in Na⁺-freier Lösung unterdrückt.
- (C) Die $[Ca^{2+}]_i$ der Retzius-Neuronen betrug in NSL 80 ± 13 nM. In NSL und in Cl⁻-freier Lösung führte Ouabain zu einem reversiblen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. In Ca²⁺- bzw. Na⁺-freier Lösung war dieser Anstieg unterdrückt.
- (D) Die $[Na^+]_i$ der Retzius-Neuronen betrug in NSL 7 ± 2 mM. In NSL, sowie in Ca²⁺- und Cl⁻-freier Lösung führte Ouabain zu einem reversiblen $[Na^+]_i$ -Anstieg, nicht jedoch in Na⁺-freier Lösung.





Die Applikation einer K⁺-freien Lösung (25 min) hatte keine Wirkung auf das Zellvolumen oder $[Ca^{2+}]_i$ (A), führte jedoch zu einem langsamen, reversiblen Anstieg von $[Na^+]_i$ (B).





- (A) Die Schrumpfung unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl) erreichte bereits nach einer Minute ihr Maximum. Beide Neuronen waren in der Lage innerhalb von 5 min ihr Volumen zumindest teilweise zu regulieren (RVI). Auffällig ist der oftmals bei P-Neuronen auftretende "Overshoot" (Pfeil) nach Rückwechsel in NSL, welcher auf die Aufnahme von Osmolyten zurückzuführen ist.
- (B) Unter hypotonischen Bedingungen (-59 mM NaCl) trat die maximale Schwellung erst nach fünf Minuten ein. Eine Volumenregulation (RVD) konnte nie beobachtet werden. Jedoch war die Schwellung des P-Neurons größer als die des Retzius-Neurons.



Abb. 19: Zellvolumen von Retzius- und P-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen im Vergleich zum Verhalten eines idealen Osmometers.

- (A) Hypertonische Bedingungen: Die Zugabe von NaCl, Sorbitol oder Glucose führte bei Retzius- und P-Neuronen zu einer reversiblen Schrumpfungen. Beide Zelltypen zeigten eine signifikante Abweichung vom Verhalten eines idealen Osmometers (rote Linie), sobald die Badosmolarität durch NaCl oder Sorbitol um mehr als 15 % bzw. durch Glucose um mehr als 10 % erhöht wurde.
- (B) Hypotonische Bedingungen: Die Wegnahme von NaCl führte bei Retzius- und P-Neuronen zu einer reversiblen Schwellungen. Beide Zelltypen zeigten eine signifikante Abweichungen vom Verhalten eines idealen Osmometers (rote Linie), sobald die Badosmolarität um mehr als 20 % erhöht wurde.

Dargestellt sind Mittelwerte (± S.D., siehe Tabelle 10 und 11). π_0/π_{exp} bezeichnet den Quotienten aus Ausgangs- und experimentell geänderter Badosmolarität, V_{exp}/V_0 den Quotienten aus experimentell geändertem und Ausgangsvolumen nach 5 Minuten.



Abb. 20: Dreidimensionale Rekonstruktion zweier Retzius-Neuronen unter physiologischen und anisotonischen Bedingungen.

Die Neuronen wurden iontophoretisch mit Oregon Green® 488 BAPTA-1 zur Markierung des Cytosols angefärbt. In NSL zeigten beide Neuronen eine annähernd kugelförmige Morphologie (A I und B I). Nach 5-minütiger Inkubation mit einer hypertonischen Lösung war das obere Neuron geschrumpft und zeigte Membran-Invaginationen (A II). Dagegen zeigte das untere Neuron nach 5-minütiger Inkubation mit einer hypotonischen Lösung eine Schwellung und Membran-Ausstülpungen (,blebs', B II). Beide Prozesse waren vollständig reversibel (nicht dargestellt).



Abb. 21: Registrierbeispiele zur Wirkung von Nifluminsäure und DIDS auf Volumenänderung und -regulation von Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl).

- (A) Bei diesem Neuron wurde in Gegenwart von Nifluminsäure (1 mM) zum einen eine größere Schrumpfung als in der Vorkontrolle ausgelöst, zum anderen trat RVI sowie ein Volumen-Overshoot nach Rückkehr zu isotonischen Bedingungen auf. Darüber hinaus löste Nifluminsäure bereits unter isotonischen Bedingungen eine Zellschrumpfung aus (Pfeil).
- (B) Auch in Gegenwart von DIDS (0,5 mM) war eine deutliche Vergrößerung der Schrumpfung zu beobachten, gefolgt von RVI und einem Volumen-Overshoot in isotonischer Lösung. Auch DIDS führte unter isotonischen Bedingungen zu einer leichten Zellschrumpfung (Pfeil).





(B) Bei diesem Neuron war die Schrumpfung in Gegenwart von Furosemid (0,5 mM) leicht vermindert, die Volumenregulation jedoch deutlich abgeschwächt. [Ca²⁺], blieb während des Experiments nahezu unbeeinflusst.



Abb. 23: Statistische Auswertung zur Wirkung von Furosemid (A) und Bumetanid (B) auf die Volumenänderung bei P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl).

- (A) In Gegenwart von Furosemid (0,5 mM) war die Schrumpfung aus als in den Vor- und Nachkontrollen (n = 7). Der Effekt war jedoch nicht signifikant (p = 0,06).
- (B) In Gegenwart von Bumetanid (0,5 mM) war die Schrumpfung nicht beeinflusst (n = 7).



Abb. 24: Wirkung von Lidocain auf die Volumenregulation von P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen (+85 mM NaCl).

In Gegenwart von Lidocain (5 mM) war RVI fast vollständig unterdrückt (A). Auf $[Ca^{2+}]_i$ hatten weder die hypertonische Lösung noch Lidocain einen nennenswerten Effekt (A). Die Wirkung von Lidocain auf RVI war signifikant (B). In den Kontrollen nahm das Zellvolumen während RVI (Δ Vol_{rel}) im Mittel um 7 bzw. 10 % zu, in Gegenwart von Lidocain nur um 2 % (Mittelwerte ± S.D., n=9)









- (A, B) Konfokale Aufnahmen eines Blutegel-Ganglions (A) und eines Retzius-Neurons (B), die beide mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy FL Amilorid angefärbt wurden (25 μM, 10 min). Beide Aufnahmen zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Farbstofffluoreszenz in den Plasmamembranen der Zellen (Pfeile), so dass von einer gleichmäßigen Verteilung des Na⁺/H⁺-Austauschers ausgegangen werden kann.
- (C) Registrierbeispiel zur Wirkung von Amilorid auf das Zellvolumen und pH_i eines Retzius Neurons. Die 5-, 10- und 15-minütige Applikation von Amilorid (1 mM) hatte keinen Effekt auf das Zellvolumen (obere Spur) und den pH_i (untere Spur).







Abb. 27: Statistische Auswertung zur Wirkung von pH_a auf Volumenänderung und -regulation bei Retzius- und P-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen. Die Erniedrigung von pH_a auf 6,80 hatte bei Retzius- und P-Neuronen keinen Effekt (A und B). Die Erhöhung von pH_a auf 8,00 hingegen führte bei beiden Zelltypen zu einer verminderten initialen Zellschrumpfung und zu verstärkter RVI (C, D). Diese Effekte waren jedoch nur bei P-Neuronen signifikant. Messpunkte sind Mittelwerte (\pm S.D.) des Zellvolumens 1 bzw. 5 min nach Wechsel in hypertonische Lösung.



Abb. 28: Wirkung von Bicarbonat-gepufferten Versuchslösungen auf Volumenänderung und -regulation bei Retzius-Neuronen unter hypertonischen Bedingungen.

- (A) Überlagerte Registrierbeispiele zur Wirkung von Bicarbonat-gepufferten Versuchslösungen auf das Zellvolumen in +85 mM NaCl. Die initiale Zellschrumpfung war in Bicarbonat-gepufferter Lösung (-22 %) geringer als in HEPES-gepufferter Lösung (-35 %). Weiterhin war die Volumenregulation (RVI) verstärkt.
- (B) Mittelwerte (\pm S.D., n = 20) der maximalen Zellschrumpfung in HEPES- und Bicarbonat-gepufferter Lösung. In Bicarbonat-gepufferter Lösung war die maximale Schrumpfung signifikant reduziert.



Abb. 29: Registrierbeispiel zur Wirkung von DIDS auf Volumenregulation und pH₁ in Bicarbonat-gepufferten Versuchslösungen unter hypertonischen Bedingungen bei einem Retzius-Neuron.

Die Applikation der hypertonischen Versuchslösung (HEPES-gepuffert) löste eine Zellschrumpfung ohne RVI, sowie eine leichte intra-zelluläre Ansäuerung aus (1). Der Wechsel in die Bicarbonat-gepufferte Versuchslösung führte zu einer transienten Schrumpfung und einer deutlichen Ansäuerung (Pfeile). Die erneute Applikation einer hypertonischen Lösung (Bicarbonat-gepuffert) resultierte in einer Schrumpfung und ausgeprägter RVI, die von einer Alkalinisierung begleitet war (2). In Gegenwart von DIDS war RVI unterdrückt und die Alkalinisierung verstärkt (3). RVI blieb auch nach Auswaschen von DIDS unterdrückt (4, 5), die durch +85 mM NaCl induzierte Alkalinisierung nahm jedoch deutlich ab.



Abb. 30: Intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe Oregon Green® BAPTA-1 und Paclitaxel Oregon Green® bei Retzius-Neuronen. Oregon Green® BAPTA-1 wurde als cytosolischer Marker verwendet, Paclitaxel Oregon Green® zur Färbung von Mikrotubuli.

- (A) Der Ca²⁺-Indikator Oregon Green® BAPTA-1 wurde iontophoretisch injiziert. Der Farbstoff gelangte auch in den Zellkern (Pfeile).
- (B) Der Mikrotubuli-Indikator Paclitaxel Oregon Green® wurde per Druck injiziert. Er lag lediglich im Cytosol vor. Die Verteilung der Fluoreszenz war weniger homogen als die von Oregon Green® BAPTA-1. So wurden nach Anfärbung mit Paclitaxel Oregon Green® oftmals fädige Strukturen im Cytosol sichtbar, die offensichtlich vom Zellkern ausgingen.



Abb. 31: Registrierbeispiele zur Wirkung von Colchizin, Vinblastin und Paclitaxel, auf Zellvolumen $[Ca^{2+}]_i$ bei Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen (+85 mM NaCl, -59 mM NaCl). Nach Präinkubation in Colchizin (1h) war die initiale Schrumpfung unter hypertonischen Bedingungen vergrößert (A). Dieser Effekt trat bei Vinblastin-Inkubation (1h) nicht ein (B). Die Colchizin-Wirkung konnte durch Präinkubation in Paclitaxel (1h) unterdrückt werden (A). Nach Präinkubation in Colchizin (A) und Vinblastin (B) war die Schwellung unter hypotonischen Bedingungen vergrößert. Dieser Effekt konnte wiederum durch Präinkubation mit Paclitaxel (1h) unterdrückt werden. Die anisotonischen Bedingungen sowie die Präinkubation in Colchizin, Vinblastin oder Paclitaxel hatte nahezu keinen Einfluss auf $[Ca^{2+}]_i$ (A, B).



Abb. 32: Registrierbeispiele zur Wirkung von Cytochalasin B und von Cytochalasin D auf Zellvolumen und $[Ca^{2+}]_i$ von Retzius-Neuronen unter anisotonischen Bedingungen (+85 mM NaCl, -59 mM NaCl). Nach Präinkubation (1h) in Cytochalasin B oder Cytochalasin D war die Schrumpfung unter hypertonischen Bedingungen nicht verändert, ebenso wie die durch hypotonische Bedingungen ausgelöste Schwellung. $[Ca^{2+}]_i$ wurde weder durch Präinkubation in Cytochalasin B oder Cytochalasin D noch durch Änderung der extrazellulären Osmolalität beeinflusst.



Α

Β



- (A) Hypertonische Bedingungen: Nach Präinkubation in Colchizin war die durch +85 mM NaCl ausgelöste Schrumpfung signifikant vergrößert. Dieser Effekt trat nach Vinblastin-Inkubation nicht auf. Der Effekt von Colchizin konnte vollständig durch eine Präinkubation in Paclitaxel verhindert werden. Cytochalasin B und Cytochalasin D hatten keinen Effekt.
- (B) Hypotonische Bedingungen: Nach Präinkubation in Colchizin oder Vinblastin war die durch -59 mM NaCl ausgelöste Schwellung signifikant vergrößert. Dieser Effekt konnte wiederum vollständig durch eine Präinkubation mit Paclitaxel unterdrückt werden. Eine Präinkubation in Cytochalasin B und D hatte wiederum keinen Effekt.



Abb. 34: Registrierbeispiele zur Wirkung von Colchizin und Paclitaxel auf das elektrophysiologische Verhalten von Retzius-Neuronen unter iso- und anisotonischen Bedingungen.

Die Applikation der hypertonischen Versuchslösung (+85 mM NaCl) führte zu einer geringen Depolarisation und einer Steigerung der Aktionspotentialfrequenz, die Applikation der hypotonischen Versuchslösung (-59 mM NaCl) zu einer transienten Hyperpolarisation. Eine Präinkubation in Colchizin sowie in Paclitaxel (jeweils 1h) hatte auf Depolarisation und Hyperpolarisation keinen Einfluss, jedoch blieben spontane Aktionspotentiale unter isotonischen Bedingungen aus.

Erklärung

÷

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich diese in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Düsseldorf, den 12. Dezember 2003

Hans Joachim Wüsten

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schlue für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik herzlich danken.

Herrn Dr. Paul Wilhelm Dierkes möchte ich für seine Ideen, seine intelligenten Anleitungen sowie die außerordentliche Unterstützung während der gesamten Arbeit ganz besonders danken.

Herrn Dr. Peter Hochstrate danke ich für die stetigen theoretischen und praktischen Hilfestellungen während dieser Arbeit.

S. Trosiner, V. Wende, G. Klees und P. Coulon möchte ich für ihre hilfreichen Anregungen während dieser Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich S. Durry und C. Roderigo für die Präparation der Versuchstiere, sowie die Unterstützung in den elektrophysiologischen Untersuchungen danken.

Frau H. Horn gebührt ein besonderer Dank für die professionelle Unterstützung in den fotografischen Arbeiten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung, die mir im Verlaufe dieser Arbeit zuteil wurden.

Herrn Prof. Dr. K. Lunau danke ich für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Meiner Familie möchte ich für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums ganz besonders danken. Des weiteren danke ich von ganzem Herzen M. Fischer für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit.