

Elektrophysiologie der Volumenregulation von
Retzius-Neuronen im Zentralnervensystem des
medizinischen Blutegels

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Philippe Coulon
aus Hamburg

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Natur-
wissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schluë

Koreferent: Prof. Dr. Klaus Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG..... 5

1.1 Regulation des Zellvolumens 5

1.2 Veränderungen des Zellvolumens 7

1.3 Modellsysteme zur Untersuchung des Zellvolumens 8

1.4 Zielsetzung..... 10

2 MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Versuchstiere und Präparation..... 13

2.2 Glasmikroelektroden 14

2.2.1 Einkanalelektroden 14

2.2.2 Ionensensitive Glasmikroelektroden 15

2.2.3 Eichung ionensensitiver Glasmikroelektroden 17

2.3 Aufbau und Arbeitsprinzip der Messapparaturen..... 21

2.3.1 Messprinzip 21

2.3.2 Versuchsaufbau 23

2.4 Auswertung 26

2.5 Lösungen 27

3 ERGEBNISSE..... 31

3.1 Membranpotential und Eingangswiderstand unter Ruhebedingungen 31

3.2 Einfluss anisotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften 32

3.2.1 Einfluss hypertonischer Bedingungen auf E_m und R_{in} 32

3.2.2 Einfluss hypertonischer Bedingungen auf die Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren..... 33

3.2.3 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in} 33

3.2.4 Wirkung anisotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in} : Zusammenfassung der Daten 34

3.3 Einfluss von E_m auf die Änderung des Zellvolumens unter anisotonischen Bedingungen.. 35

3.4 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf die Membrankapazität 37

3.5 Strom-Eingangswiderstandsbeziehungen..... 38

3.6 Schwellungsaktivierter Membranstrom 41

3.6.1 Änderung des Membranstroms bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität 41

3.6.2 Umkehrpotential von ΔI_{VC} 41

3.7 Einfluss von Ionenstärke und extrazellulärer NaCl-Konzentration auf E_m 43

3.8	Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC}	46
3.9	Einfluss des Cytoskeletts auf die Aktivierung von ΔI_{VC}	46
3.10	Identität des schwellungsaktivierten Stroms (ΔI_{VC})	48
3.10.1	Einfluss von K^+ -Kanalblockern auf die Änderungen von E_m und R_{in} unter hypotonischen Bedingungen.....	48
3.10.2	Änderungen von E_m und R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität unter Cl^- -freien Bedingungen	49
3.10.3	Einfluss von Cl^- -Kanalblockern auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität induzierten Änderungen von E_m und R_{in}	50
3.10.4	Einfluss Cl^- -freier Bedingungen und des Cl^- -Kanalblockers DIDS auf die Strom-Eingangswiderstandsbeziehung und ΔI_{VC}	51
3.11	Wirkung verminderter extrazellulärer Osmolalität auf R_{in} und E_m : Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	53
4	DISKUSSION	55
4.1	Einfluss anisotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften.....	55
4.1.1	Einfluss hypertotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften	55
4.1.2	Einfluss hypotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften	57
4.2	Zusammenhang zwischen Zellvolumenänderung und Membranpotential	62
4.3	Aktivierung von Ionenströmen durch Membrandepolarisation	63
4.4	Funktionelle Eigenschaften des volumenaktivierten Cl^- -Stroms	64
4.5	Schlussbetrachtungen und Ausblick	67
	ZUSAMMENFASSUNG	69
	LITERATUR.....	72
	ABBILDUNGEN	87
	ANHANG.....	124
	DANKSAGUNG.....	127
	ERKLÄRUNG	129

1 EINLEITUNG

Die Plasmamembran tierischer Zellen stellt für Ionen eine Barriere dar, ist jedoch für Wasser durchlässig. Das Volumen einer tierischen Zelle verändert sich deshalb bei einem osmotischen Ungleichgewicht zwischen Intrazellulärraum und extrazellulärer Matrix durch Aufnahme oder Abgabe von Wasser, bis keine Druckdifferenz mehr über der Plasmamembran besteht und wieder ein osmotisches Gleichgewicht herrscht. Die Wasserpermeabilität wird bei manchen Zelltypen durch den Einbau von Aquaporinen noch zusätzlich erhöht (Murata *et al.* 2000, King *et al.* 2004). Da nicht-autotrophe, tierische Organismen in der Regel beweglich bleiben müssen, um ihr Überleben zu sichern, sind tierische Gewebe weich und elastisch. Tierische Zellen haben daher keine feste Zellwand, und können folglich keinen nennenswerten hydrostatischen Druck aufrecht erhalten. Das Zellvolumen hängt also weitgehend von der intra- und extrazellulären Osmolalität ab. Da drastische Veränderungen des Zellvolumens jedoch erhebliche Störungen zellulärer Funktionen verursachen können, besitzen praktisch alle tierischen Zellen Mechanismen, die eine Regulation des zellulären Wasserhaushalts ermöglichen (Lang *et al.* 1998, Fürst *et al.* 2002).

1.1 Regulation des Zellvolumens

Unter Ruhebedingungen wird die hohe intrazelluläre Konzentration essentieller organischer Moleküle (z. B. Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fette, Zucker) durch eine im Vergleich zum Extrazellulärraum geringe Konzentration anorganischer Osmolyte kompensiert, so dass die Osmolalitäten des Cytosols und des extrazellulären Mediums identisch sind und das Zellvolumen konstant bleibt (*steady-state volume*). Die ungleichmäßige Verteilung von anorganischen Osmolyten wird durch das „*pump-leak-concept*“ beschrieben (Wilson 1954, Hallows und Knauf 1994). Diesem Modell liegt zu Grunde, dass die Konzentrationen von Na^+ und Cl^- im Cytosol geringer sind als im Extrazellulärraum, während die cytosolische K^+ -Konzentration viel höher ist als die extrazelluläre. Da unter Ruhebedingungen die Permeabilität der Plasmamembran für K^+ -Ionen deutlich höher ist als für Na^+ -

Ionen, fließen bevorzugt K^+ -Ionen aus der Zelle in den Extrazellulärraum und bauen über der Membran eine Potentialdifferenz auf. Diese Potentialdifferenz treibt Cl^- -Ionen aus der Zelle, erniedrigt die intrazelluläre Cl^- -Konzentration und schafft damit „osmotischen Raum“ für die essentiellen organischen Moleküle. Die Gradienten für Na^+ und K^+ werden durch die Na^+K^+ -ATPase aufrecht erhalten, die pro Pumpzyklus unter Spaltung eines ATP-Moleküls 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus und 2 K^+ -Ionen in die Zelle hinein transportiert (Skou 1990).

Da Veränderungen des Zellvolumens zu erheblichen Störungen zellulärer Funktionen und sogar zum Zelltod führen können, besitzen die meisten tierischen Zellen Mechanismen zur Regulation des Zellvolumens (Okada 1998, Sarkadi und Parker 1991, Waldegger *et al.* 1998, Wehner 1998). Dabei wird zwischen einer regulatorischen Volumenabnahme (regulatory volume decrease = RVD), die eine Zellschwellung kompensiert und einer regulatorischen Volumenzunahme (regulatory volume increase = RVI), mit der die Zelle auf Schrumpfung reagiert, unterschieden.

Die grundlegende RVD-Strategie ist, die Menge der im Cytosol gelösten Osmolyte zu verringern und einen Wasserausstrom zu induzieren. Dies kann zum einen durch den Transport von Osmolyten in den Extrazellulärraum geschehen, zum anderen durch Polymerisierung organischer Monomere. Die Menge der im Cytosol gelösten Ionen, Aminosäuren, Zucker und Alkohole kann durch Auswärtstransport vorübergehend abgesenkt werden, ohne die normalen Zellfunktionen nachhaltig zu beeinträchtigen. Das Resultat dieser Vorgänge ist die Verringerung des Zellvolumens unter den „*volume-set-point*“, der das Volumen darstellt, bei dessen Überschreitung eine RVD einsetzt. Der „*volume-set-point*“ kann jedoch durch eine Zellschwellung verändert werden, so dass bei einer RVD nicht unbedingt das Ausgangsvolumen erreicht wird (Fürst *et al.* 2002, Simkiss 1998). Bei einer RVI wird analog durch die Aufnahme von Osmolyten oder die Depolymerisierung von organischen Makromolekülen die Menge im Cytosol gelöster Osmolyte erhöht, so dass Wasser in die Zelle einströmt.

Bei höheren Eukaryonten ist für eine RVD primär eine KCl-Abgabe der Zelle verantwortlich, wohingegen eine RVI auf einer NaCl-Aufnahme beruht (Siebens und Kregenow 1985, Eveloff und Warnock 1987). An der KCl-Abgabe während der RVD sind je nach Zelltyp der K^+/Cl^- -Cotransporter (Larson und Spring 1984) sowie schwellungsaktivierte K^+ - und Cl^- -Kanäle beteiligt (Niemeyer *et al.* 2000, Nilius *et al.* 1996, Egée *et al.* 1997, Okada 1997, Nagasaki *et al.* 2000, Idriss *et al.* 2000, Fürst *et al.* 2002), bei Nierenzellen zusätzlich spannungsaktivierte K^+ -Kanäle (Kv 1.3, Kv 1.5) und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (Pasantes Morales *et al.* 2000). An der NaCl-Aufnahme bei der RVI ist unter anderem der Na^+H^+ -Austauscher beteiligt, der in Kooperation mit dem $Cl^-HCO_3^-$ -Austauscher Na^+ - und Cl^- -Ionen in die Zelle transportiert (Kregenow *et al.* 1985, Eveloff und Warnock 1987).

Auch das Cytoskelett kann an der Regulation des Zellvolumens beteiligt sein (Schwiebert *et al.* 1994, Cantiello 1997, Larsen *et al.* 2000). Sowohl Aktin-Filamente als auch Mikrotubuli können die Aktivierung von Ionenkanälen bewirken, die den Transport von Osmolyten über die Zellmembran ermöglichen und das Zellvolumen verändern. Hierbei erfolgt eine mechanische Weiterleitung der durch Zellschwellung auftretenden Kräfte an mechanosensitive Kanäle (Janmey 1998).

1.2 Veränderungen des Zellvolumens

Veränderungen des Zellvolumens können auf Veränderungen der intra- oder extrazellulären Osmolalität beruhen. Bei Wirbeltieren wird die Osmolalität des Extrazellulärraums im allgemeinen gut kontrolliert, jedoch kann bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen die extrazelluläre Osmolalität langfristig verändert sein (z. B. Diabetes, Störungen der Nierenfunktion, Ödeme; Arieff und Carroll 1972, Burg und Kador 1988, Parker 1993). Änderungen der intrazellulären Osmolalität können bei verschiedenen Störungen des Metabolismus auftreten.

Auch die Aktivierung oder Inaktivierung von Transportsystemen kann das Zellvolumen verändern. Insbesondere bei Na^+ -gekoppelten Transportprozessen, wie Glutamin-, Taurin- oder Glucose-Transport, wurde eine drastische cytosolische Anreicherung dieser Stoffe beobachtet, die zu einer erheblichen Zellschwellung führt (Häussinger *et al.* 1990, Lang *et al.* 1998). Das Hormon Insulin induziert bei Hepatozyten über eine gleichzeitige Aktivierung des Na^+ - H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters eine Zellschwellung, während das Hormon Glucagon eine Zellschrumpfung bewirkt, die wahrscheinlich auf die Aktivierung von Ionenkanälen zurückgeht (vom Dahl *et al.* 1991, Häussinger 1996).

Im Zentralnervensystem (ZNS) kann die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren eine Veränderung des Zellvolumens hervorrufen (Lang *et al.* 1998). Vor allem wird durch die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren eine Zellschwellung ausgelöst (Choi 1987). Auch Veränderungen der ionalen Zusammensetzung des Extrazellulärraums können Volumenänderungen hervorrufen, ohne dass sich dabei die extrazelluläre Osmolalität verändert (Ayrapetyan und Sulejmanian 1979, Ballanyi *et al.* 1990). Eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration bewirkt sowohl eine Membrandepolarisation, als auch eine durch K^+ - und Cl^- -Aufnahme verursachte Volumenzunahme (Neumann *et al.* 2001). Veränderungen der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_a$) treten im ZNS bei erhöhter neuronaler Aktivität auf. Dabei steigt $[\text{K}^+]_a$ von ~ 4 mM auf bis zu 10 mM an (Baylor und Nicholls 1969, Dietzel *et al.* 1989). Diese Konzentration kann unter pathophysiologischen Bedingungen jedoch weit überschritten werden. So wurde in Schnitten des Ratten-Hippocampus unter hypoxischen Bedingungen ein Anstieg von $[\text{K}^+]_a$ auf 47 mM gemessen (Müller und Somjen 2000) und bei einer „spreading depression“ sogar ein Anstieg auf ~ 80 mM (Mazel *et al.* 2002).

1.3 Modellsysteme zur Untersuchung des Zellvolumens

Eine pharmakologische Kontrolle der Zellschwellung wäre ein möglicher Ansatz zur Vermeidung weitreichender Folgeschädigungen pathophysiologischer Volumenänderungen. Die Entwicklung therapeutischer Ansätze setzt jedoch ein umfassendes Verständnis der Prozesse voraus, die an der Zellschwellung beteiligt sind. Viele frühere Arbeiten nutzten *in vitro*-Modellsysteme, wie kultivierte Neuroblasten der Maus oder Drüsenzellen, zur Charakterisierung volumenregulatorischer Prozesse (siehe Altamirano *et al.* 1998, Takemura *et al.* 1991). Ein Nachteil dieser Modellsysteme ist die fehlende Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Kompartimenten des intakten Gewebes. Daher sind Modellsysteme geeigneter, bei denen die *in vivo*-Bedingungen erhalten bleiben.

Ein neurobiologisches Modellsystem, das diese Anforderungen erfüllt und seit den 60er Jahren für die Untersuchung vieler neuro- und zellphysiologischer Fragestellungen verwendet wurde, ist das ZNS des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis* (Abb. 1 A). Elektrophysiologische und morphologische Studien zeigen die Struktur und die Funktionen dieses Nervensystems, wobei Arbeiten über die Verteilung und Eigenschaften von aktiven und passiven Ionen-transportsystemen bei Neuronen und Gliazellen einen besonderen Schwerpunkt bilden (Ballanyi und Schlue 1989, Dörner *et al.* 1990, Günzel und Schlue 1996, Pellegrino und Simonneau 1984, Schlue und Thomas 1985, Walz und Schlue 1982). Diese Arbeiten werden durch molekularbiologische Studien ergänzt, die eine Zuordnung funktionell charakterisierter Transportsysteme zu Genfamilien erlauben (Salzet *et al.* 1998, Weiss *et al.* 1999).

Der medizinische Blutegel nimmt bei einer Mahlzeit ein Vielfaches seines eigenen Körpergewichtes an Blut auf und scheidet innerhalb der folgenden 24 h einen Großteil des im Blut enthaltenen Wassers wieder aus (Nieczej und Zerbst-Boroffka 1993). Das eingedickte Blut wird in den Magenblindsäcken gespeichert und bildet einen Nahrungsvorrat für bis zu sechs Monate. Unmittelbar nach der Blutmahlzeit kommt es auch zu einer Erhöhung des Elektrolytgehaltes der

Blutegel-Hämolymphe, so dass das Nervensystem im ventralen Blutsinus (Abb. 2 B) nun hypertonen Bedingungen unterliegt und eine Schrumpfung der Nervenzellen zu erwarten ist. Viele Zelltypen zeigen unter solchen Bedingungen eine RVI.

Bei der Applikation hypotonischer Badlösungen wird nach einer anfänglichen Zellschwellung in der Regel eine RVD beobachtet. Bei Retzius-Neuronen konnte eine RVD zwar nicht beobachtet werden, jedoch waren die experimentell ermittelten Volumenzunahmen kleiner als bei einem idealen Osmometer (Wüsten 2004). Möglicherweise erfolgt bei diesen Zellen eine RVD bereits während der Zellschwellung.

Mit Hilfe ionensensitiver Glasmikroelektroden und mikrofluorimetrischer Methoden wurden Zellvolumenänderungen im ZNS des Blutegels nach Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren (Ballanyi *et al.* 1990, Neumann 2000), Veränderung der extrazellulären Osmolalität (Neumann 2000, Wüsten 2000, 2004), Hemmung der Na⁺-K⁺-Pumpe (Dierkes *et al.* 1999) sowie isotonischer Erhöhung von [K⁺]_a (Neumann *et al.* 2001) beschrieben und näher charakterisiert. In *patch-clamp*-Studien wurde u. a. für Retzius-Neuronen gezeigt, dass eine Zellschwellung die Offenwahrscheinlichkeit von K⁺- und Cl⁻-Kanälen sowie von unselektiven Kationenkanälen erhöht, die möglicherweise eine Rolle bei einer Regulation des Zellvolumens spielen (Buchholz 1999, Pellegrini *et al.* 2001, Pellegrino *et al.* 1990).

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lag zunächst darin, die Auswirkung anisotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften, wie Membranpotential (E_m), Eingangswiderstand (R_{in}) und Membrankapazität (C_{in}), von Blutegel-Neuronen zu untersuchen, um Hinweise auf eine osmotisch induzierte Aktivierung von Membranströmen sowie den Ein- oder Ausbau von Membranelementen zur Vergrößerung der Zelloberfläche zu erhalten. Hierzu wurden die *current-clamp*-Technik (Stromklemme) und die *voltage-clamp*-

Technik (Spannungsklemme) angewendet. Die Untersuchungen wurden an Retzius-Neuronen des medizinischen Blutegels durchgeführt, die zu den am besten charakterisierten Zellen im Blutegel-ZNS gehören (Carretta 1988, Sahley 1995).

Da die Verminderung der extrazellulären Osmolalität mit einer Verminderung der extrazellulären Ionenstärke sowie der Konzentrationen bestimmter Ionensorten verbunden war, musste der Einfluss dieser Parameter in Kontrollexperimenten überprüft werden, um osmotisch bedingte Effekte zu isolieren.

Ein weiteres Ziel war es, Änderungen des Zellvolumens bei unterschiedlichem E_m zu bestimmen, um eine Aussage über die Spannungsabhängigkeit treffen zu können. Hierzu wurde die Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik kombiniert.

Die Charakterisierung der Ionenströme, die durch die Änderung des Zellvolumens hervorgerufen wurden, war ein weiteres wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit. Der Schwerpunkt lag dabei auf Ionenströmen, die unter hypotonischen Bedingungen auftraten, da hier R_{in} stark verringert war und somit einen Hinweis auf die Aktivierung von Ionenkanälen lieferte. Es wurde versucht, die Identität dieser Ionenkanäle durch die Bestimmung funktioneller und pharmakologischer Parameter zu ermitteln.

Bei Neuronen des medizinischen Blutegels wurde nach einer Depolymerisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes durch Colchizin, einem Alkaloid der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale* (Abb. 8), eine Verstärkung der Zellschwellung unter hypotonischen Bedingungen beobachtet (Wüsten 2004). Im Gegensatz zu Mikrotubuli scheinen Aktin-Filamente bei der Kontrolle des Zellvolumens von Blutegel-Neuronen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ob die Mikrotubuli bei Retzius-Neuronen nur eine mechanische Stabilisierung bewirken oder auch die an einer RVD beteiligten Ionenkanäle aktivieren, blieb ungeklärt. Diese offene Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen bereits als Tagungsbeiträge bzw. einer Originalarbeit veröffentlicht (Coulon *et al.* 2002, 2003, Dierkes *et al.* 2002).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Präparation

Der medizinische Blutegel, *Hirudo medicinalis*, ist systematisch den *Hirudinea* (Egel) zuzuordnen, einer Unterklasse der *Clitellata* (Gürtelwürmer), die dem Stamm der *Annelida* (Ringelwürmer) angehört. Die *Annelida* und die *Arthropoda* (Gliederfüßler) werden unter dem Begriff *Articulata* (Gliedertiere) zusammengefasst. Der medizinische Blutegel weist den für Gliedertiere typischen segmentierten Körperbau auf, der sich auch in der Gliederung des ZNS widerspiegelt.

Der Hautmuskelschlauch ist in 32 Segmente unterteilt. Die ersten vier Segmente enthalten das Unterschlundganglion und die letzten sieben das Analganglion. Dazwischen befinden sich 21 Segmentalganglien, die untereinander sowie mit Unterschlund- und Analganglion über paarige Konnektive und den dünnen Faivre-Nerv verbunden sind (Abb. 1). Die Geschlechtsganglien (Segmente 5 und 6) enthalten etwa 700 Neuronen, während alle übrigen Segmentalganglien nur etwa 400 Neuronen enthalten (Abb. 2), von denen vielen bereits Funktionen zugeordnet werden konnte (siehe Muller *et al.* 1981). Etwa 60-70 Neuronenzellkörper sind in jeweils einem von insgesamt sechs „Paketen“ zusammengefasst, die durch Bindegewebslamellen voneinander getrennt sind und von einer Paket-Gliazelle versorgt werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden hauptsächlich an den nach Gustav Retzius benannten Retzius-Neuronen durchgeführt, die mit einem Durchmesser von $\sim 80 \mu\text{m}$ die größten Zellkörper aller Blutegel-Neuronen besitzen (Retzius 1891; Abb. 2 C). Die Retzius-Neuronen sind an der Koordination der Schwimmbewegung, der Schleimsekretion und der Modulation des Muskeltonus beteiligt (Lent 1973, 1977, Willard 1981) und werden deshalb den multifunktionellen Neuronen zugeordnet (Caretta 1988).

Die Präparation der Segmentalganglien wurde nach dem Protokoll von Deitmer und Schlue (1981) durchgeführt. Der Blutegel wurde in einer mit Wachs ausgegossenen Präparierschale in leicht gestrecktem Zustand mit Stecknadeln fixiert. Durch einen tiefen dorso-ventralen Schnitt direkt hinter dem Kopfsaugnapf wurden Ober- und Unterschlundganglion von der Ganglienkette getrennt. Mit einer feinen Schere wurde der Hautmuskelschlauch auf der Dorsalseite über die ganze Länge des Tieres aufgeschnitten, wobei das Darmepithel mit durchtrennt wurde. Der Hautmuskelschlauch wurde vorsichtig auseinandergezogen und seitlich mit Stecknadeln fixiert (Abb. 2 A). Das im Darm vorhandene Blut wurde mit Normalsalzlösung (NSL, siehe 2.5) ausgespült. Anschließend wurde die ventrale Darmwand und umgebendes Bindegewebe entfernt und der ventrale Blutsinus freigelegt. Nach Durchtrennung der Konnektive und Seitenwurzeln wurden die Segmentalganglien aus dem Blutsinus heraus gezogen, in ein mit NSL gefülltes Blockschälchen überführt und dort bis zum Versuchsbeginn gekühlt aufbewahrt. Die Segmentalganglien wurden ausschließlich adulten Tieren entnommen, die entweder aus der institutseigenen Zucht stammten oder von der Fa. Moser (Schorndorf) bezogen wurden. Mit Ausnahme der Geschlechtsganglien (Segmentalganglien 5 und 6) wurden alle Segmentalganglien für die Versuche verwendet.

2.2 Glasmikroelektroden

2.2.1 Einkanalelektroden

Die Einkanal-Glasmikroelektroden wurden aus Borsilikatglas-Kapillaren mit Filament (GC 150 F-15, Clark Electromedical Instruments, Reading, UK; äußerer Durchmesser: 1,5 mm) mit einem vertikalen Elektrodenziehgerät ausgezogen (PE-2, Narishige, Tokyo, Japan). Die Mikrokapillaren wurden mit einer wässrigen Lösung mit 0,5 M K_2SO_4 + 5 mM KCl gefüllt. Nach Einführen eines chlorierten Silberdrahtes wurden die Glasmikroelektroden mit Hartklebewachs (Deiberit) verschlossen. Der elektrische Widerstand der Glasmikroelektroden betrug bei Eintauchen der Elektrodenspitze in NSL im Mittel $73 \pm 43 M\Omega$ ($n = 313$).

2.2.2 Ionensensitive Glasmikroelektroden

Ionensensitive Glasmikroelektroden ermöglichen es, in einem kleinen Volumen die Konzentration (genauer: Aktivität) einer einzelnen Ionensorte innerhalb eines Gemischs unterschiedlicher Ionen zu messen. Die Spitze der ionensensitiven Glasmikroelektrode wird hierzu mit einem Sensorcocktail gefüllt, in dem in einer organischen Phase Carriermoleküle gelöst sind („Flüssigmembran-Ionophor“), über die spezifisch Ionen aus der Lösung in die organische Phase übertreten können. Hierdurch entsteht ein Sensorpotential, aus dem sich die Konzentration des zu messenden Ions errechnen lässt.

Ionensensitive Glasmikroelektroden registrieren auch „elektrische“ Potentiale, wie das Membranpotential (E_m), die nicht durch das zu messende Ion bedingt sind und vom Sensorpotential subtrahiert werden müssen. Diese Potentiale werden in der Regel mit elektrolytgefüllten Glasmikroelektroden registriert, wobei in der Praxis ein oder mehrere ionensensitive Kanäle mit einem elektrolytgefüllten Referenzkanal zu einer doppel- oder mehrläufigen Glasmikroelektrode kombiniert werden (Schlue *et al.* 1997; Abb. 3 A).

In dieser Arbeit wurden ionensensitive Glasmikroelektroden zur Messung des Zellvolumens verwendet. Hierbei wird die cytosolische Konzentration eines Ions bestimmt, das im Idealfall weder über die Plasmamembran transportiert noch in Organellen aufgenommen oder anderweitig metabolisiert wird, so dass dessen Konzentration allein vom Zellvolumen abhängt („Volumenmarker“; Reuss 1985). Ein Anstieg der Konzentration des Volumenmarkers entspricht einer Zellschrumpfung, ein Abfall einer Zellschwellung. Bei Retzius-Neuronen erwiesen sich für diesen Zweck Tetramethylammonium-Ionen (TMA^+) als Volumenmarker besonders geeignet (Neumann 2000, Neumann *et al.* 2001, Dierkes *et al.* 2002).

Zur Messung der TMA^+ -Konzentration wurden Mikrokapillaren mit dem Flüssigmembran-Ionophor Corning 477317 gefüllt. Dieser Sensor wurde ursprünglich zur

Messung der Aktivität von K^+ -Ionen entwickelt, reagiert jedoch wesentlich empfindlicher auf quaternäre Ammoniumionen, wie beispielsweise TMA^+ (Neher und Lux 1973). Der Sensorcocktail wurde mit 100 mM KCl-Lösung überschichtet („backfill“), also nicht wie üblich mit einer Lösung, die das zu messende Ion (nämlich TMA^+) enthielt. Andernfalls wäre die Funktion der ionensensitiven Elektrode über den Einstich in das Neuron nicht zu kontrollieren. Das zu Beginn der Messung K^+ -abhängige Elektrodenpotential wird während der Beladung der Zellen mit TMA^+ zunehmend und schließlich vollständig von der cytosolischen TMA^+ -Konzentration ($[TMA^+]_i$) abhängig (Neumann *et al.* 2001). Der Referenzkanal der doppelläufigen Glasmikroelektroden war entweder mit 3 M Lithiumacetat-Lösung + 8 mM KCl oder mit 0,5 M K_2SO_4 -Lösung + 5 mM KCl gefüllt. Ein Einfluss des Elektrolyten auf die Messung des Zellvolumens wurde nicht beobachtet.

Zur Herstellung ionensensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden wurden Borsilikatglas-Kapillaren (GC 150 F-15) auf eine Länge von 75 mm geschnitten und mit Zweikomponentenkleber (Araldit) mit etwas dünneren, 65 mm langen Glaskapillaren (GC 100 F-15) parallel verklebt, so dass die beiden Enden der dicken Kapillare die der dünnen Kapillare um 5 mm überragten. Zum Aushärten des Klebers wurden die Kapillaren für eine Stunde in einem Ofen auf 60° C erwärmt. Anschließend wurden die Kapillaren mit dem Elektrodenziehgerät (PE-2) in einem ersten Schritt geringfügig gezogen (< 2 mm) und um 180° gedreht und im zweiten Schritt vollständig ausgezogen. Die dünne Kapillare diente stets als Referenzkanal, die dicke als ionensensitiver Kanal.

Da der Sensorcocktail stark hydrophob ist, wurde der spätere ionensensitive Kanal mit der von Kilb (1994) modifizierten Dampfmethode nach Berridge und Schlue (1978) mit Hexamethyldisilazan (HMDS) silanisiert. Der Referenzkanal wurde mit destilliertem Wasser gefüllt, um den Kontakt mit HMDS zu vermeiden. Der dicke Kanal wurde in die Bohrung des Silanisierungshalters gesteckt, der seinerseits auf einen Weithalskolben gestellt wurde, der ~10 ml HMDS enthielt. Um eine HMDS-gesättigte Atmosphäre zu schaffen, wurde der Weithalskolben

zuvor mit einer Heizplatte auf 40° C erwärmt und mindestens 20 min bei dieser Temperatur belassen, bevor mit der Silanisierung begonnen wurde. Nach ~90 min HMDS-Bedampfung bei 40° C wurden die Mikrokapillaren im Ofen für 120 min auf 200° C erhitzt, wobei das Wasser in den Referenzkanälen verdampfte und die HMDS-Schicht fixiert wurde.

Zunächst wurde der Referenzkanal mit Elektrolytlösung gefüllt. So konnten etwaige Luftblasen durch Erwärmen mit einem LötKolben entfernt werden, ohne den temperaturempfindlichen Corning-Sensor zu beschädigen. Danach wurde der Sensor mit Hilfe einer fein ausgezogenen Kunststoffkapillare in den silanisierten Kanal eingebracht und die Elektrode im Exsikkator ~10 min lang einem Unterdruck ausgesetzt, um Luftblasen in der organischen Phase zu beseitigen. Anschließend wurde der Sensor mit der „backfill“-Lösung überschichtet. Beide Kanäle wurden mit chlorierten Silberdrähten versehen und mit Hartklebewachs verschlossen. Die Glasmikroelektroden wurden mit ihren Spitzen in NSL eingetaucht und konnten in einem verschlossenen Gefäß ohne Qualitätseinbuße für bis zu 3 Tage aufbewahrt werden.

2.2.3 Eichung ionensensitiver Glasmikroelektroden

Da eine ideale ionensensitive Membran nur für eine Ionensorte permeabel ist, lässt sich das Potential E , das sich über der Membran einstellt, durch die Nernst-Gleichung beschreiben (Ammann 1986):

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log a_i \quad (1)$$

E_{ion} : Potential der ionensensitiven Messzelle

E_0 : Standardpotential

s : Nernst-Steigung

a_i : Aktivität des Messions

Die Nernst-Steigung s ist definiert durch:

$$s = 2,303 \frac{R \cdot T}{z_i \cdot F} \quad (2)$$

R : allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T : absolute Temperatur (K)

z_i : Ladungszahl des Messions

F : Faradaykonstante (96487 Cmol^{-1})

Bei einer Temperatur von 21°C (siehe 2.3.2) beträgt die Nernst-Steigung s für ein einfach positiv geladenes Ion 58 mV .

Alle Flüssigmembran-Ionophore weisen eine geringe Empfindlichkeit gegenüber anderen Ionen auf („Störionen“). Dies hat zur Folge, dass bei niedrigen Messionenaktivitäten das Potential der ionensensitiven Glasmikroelektrode nicht mehr proportional zum dekadischen Logarithmus der Messionenaktivität ist. Der Zusammenhang zwischen Elektrodenpotential, Messionen- und Störionenaktivität wird durch die Nikolsky-Eisenman-Gleichung beschrieben (Eisenman 1962, Ammann 1986):

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log \left[a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (3)$$

a_j : Aktivität der Störionen

z_j : Ladungszahlen der Störionen

$k_{i,j}^{pot}$: potentiometrische Selektivitätskoeffizienten des Ionophors

Der potentiometrische Selektivitätskoeffizient ($k_{i,j}^{pot}$) gibt an, wie groß der Anteil des Störions am Potential der ionensensitiven Glasmikroelektrode ist. Für eine ideale ionensensitive Membran ist $k_{i,j}^{pot}$ für alle Störionen 0. Für den hier

verwendeten Flüssigmembran-Ionophor wurde nur eine Störionensorte angenommen, so dass sich die Nikolsky-Eisenman-Gleichung vereinfacht:

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log \left[a_i + k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (4)$$

Der Einfluss der Messionen auf E_{ion} nimmt mit wachsender a_i immer mehr zu, so dass sich Gleichung (4) der Nernst-Gleichung (1) annähert. Mit abnehmendem a_i nähert sich E_{ion} asymptotisch einem konstanten Wert, der dem Potentialbeitrag von a_j entspricht. Das Detektionslimit a_i^0 ist durch den Schnittpunkt der beiden Asymptoten der Eichkurve definiert und stellt definitionsgemäß die kleinste a_i dar, die vor einem Störionenhintergrund messbar ist (Abb. 4). Die rechnerische Bestimmung von a_i^0 erfolgt durch Gleichsetzen der Nernst-Gleichung (1) mit Gleichung (4):

$$E_0 + s \cdot \log a_i^0 = E_0 + s \cdot \log \left[k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (5a)$$

Hieraus folgt:

$$a_i^0 = k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \quad (5b)$$

Das Einsetzen von Gleichung (5b) in Gleichung (4) liefert folgende Gleichung (6), nach der E_{ion} dem Logarithmus der Summe von a_i und a_i^0 proportional ist:

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log(a_i + a_i^0) \quad (6)$$

Durch Umwandeln der Aktivität in Konzentration (c ; $a = c \cdot \gamma$, γ = Aktivitätskoeffizient) ergibt sich:

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log(\gamma_i \cdot c_i + \gamma_i \cdot c_i^0) \quad (7)$$

Da der Aktivitätskoeffizient γ_i des Messions in den Eichlösungen nur um 2% variiert und E_0 und s konstant sind, kann Gleichung (7) folgendermaßen umgeschrieben werden:

$$E_{ion} = E_0 + s \cdot \log \gamma_i + s \cdot \log(c_i + c_i^0)$$

mit $E_0 + s \cdot \log \gamma_i = E'_0$:

$$E_{ion} = E'_0 + s \cdot \log(c_i + c_i^0) \quad (8)$$

Alle ionensensitiven Glasmikroelektroden wurden vor und nach jeder Messung geeicht. Die Eichlösungen enthielten einen Ionenhintergrund, der bezüglich der Kationenzusammensetzung weitgehend intrazellulären Verhältnissen entsprach: 80 mM KCl, 5 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂ und als pH-Puffer 10 mM HEPES. Der pH wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Zur Bestimmung der TMA⁺-Sensitivität wurde TMA-Cl in Konzentrationen von 10, 2,5 oder 0,5 mM hinzugegeben. Der zur Eichung verwendete Messaufbau und ein Registrierbeispiel für die Eichung einer TMA⁺-sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode sind in Abb. 3 dargestellt.

Zur Auswertung der Experimente wurde aus den Eichkurven der einzelnen ionensensitiven Glasmikroelektroden jeweils die maximale Steigung und der Störionenbeitrag ermittelt, letzterer anhand des Ionenpotentials in TMA⁺-freier Lösung. Mit Hilfe dieser beiden Größen wurden c_i^0 und E'_0 bestimmt. E'_0 wurde durch Iteration unter Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen zwischen gemessenen und berechneten Eichsignalen ermittelt (Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach Gauss). Die maximale Steigung der verwendeten Elektroden war deutlich größer als die Nernst-Steigung und betrug im Mittel $-74,4 \pm 22,0$ mV pro Dekade ($n = 51$); c_i^0 lag bei $0,45 \pm 0,31$ mM TMA⁺ (Abb. 4).

2.3 Aufbau und Arbeitsprinzip der Messapparaturen

2.3.1 Messprinzip

In dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit die extrazelluläre Osmolalität elektrophysiologische Parameter und das Zellvolumen von Retzius-Neuronen beeinflusst. Hierzu wurden drei Methoden angewendet: die *current-clamp*-Technik (Stromklemme), die *voltage-clamp*-Technik (Spannungsklemme) und die Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden in Kombination mit der *voltage-clamp*-Technik (Abb. 5). Zur Anwendung der *current-clamp*- und der *voltage-clamp*-Technik wurden jeweils zwei Einkanal-Glasmikroelektroden in die Zelle eingestochen, wobei eine Elektrode zur Strominjektion und die andere Elektrode zur E_m -Messung diene. Bei der Kombination der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik wurden eine Einkanal-Glasmikroelektrode und eine ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektrode in die Zelle eingestochen. Hierbei diene die Einkanal-Elektrode zur Strominjektion und der Referenzkanal der Zweikanal-Elektrode zur Registrierung von E_m . Mit dem ionensensitiven Kanal wurden durch Messung der TMA^+ -Konzentration Zellvolumenänderungen bestimmt (siehe 2.2.2).

Bei der *current-clamp*-Technik (Abb. 5 A) wird die Wirkung einer Strominjektion auf das E_m registriert. Ein negativer Strom hyperpolarisiert, ein positiver Strom depolarisiert die Membran der Zelle. Die Amplitude der E_m -Verschiebung ist dem Injektionsstrom und dem Eingangswiderstand (R_{in}) der Zelle proportional. R_{in} ist somit umso höher, je größer die durch den Injektionsstrom hervorgerufene E_m -Verschiebung ist. Änderungen der durch Strominjektion induzierten E_m -Verschiebung können somit Aufschluss über die Aktivierung bzw. De- oder Inaktivierung von Ionenkanälen geben. Der Vorteil der *current-clamp*-Technik besteht darin, dass zusätzlich zu R_{in} auch E_m sowie Frequenz, Kinetik und Amplitude von Aktionspotentialen registriert werden können.

Bei der *voltage-clamp*-Technik wird der Strom (I_{VC}) gemessen, der in die Zelle injiziert werden muss, um E_m auf ein vorgegebenes Haltepotential (E_h) zu klemmen. Somit kompensiert I_{VC} den Nettostrom, der bei E_h über die Zellmembran fließt. I_{VC} wird über einen Rückkopplungsschaltkreis des *voltage-clamp*-Verstärkers, der im Prinzip aus zwei Differenzverstärkern besteht, ermittelt (Abb. 5 B). Der erste Differenzverstärker registriert über die Potentialelektrode E_m , das auf den invertierenden Eingang des zweiten Differenzverstärkers, des so genannten Klemmverstärkers gelegt wird. Der Klemmverstärker injiziert I_{VC} in die Zelle, entsprechend der Differenz zwischen E_m und E_h , und klemmt dadurch E_m auf E_h . Die *voltage-clamp*-Technik liefert ebenso wie die *current-clamp*-Technik Aufschluss über die Aktivierung bzw. De- oder Inaktivierung von Ionenkanälen. Sie bietet gegenüber der *current-clamp*-Technik jedoch zum einen den Vorteil der Quantifizierung von Membranströmen. Zum anderen bleibt wegen der Klemmung von E_m die Aktivität spannungsgesteuerter Ionenkanäle unverändert.

Die Kombination der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um bei einem definierten E_m die Änderungen des Zellvolumens zu messen, die nach Veränderung der extrazellulären Osmolalität auftreten. Die Beladung der Retzius-Neuronen mit dem Volumenmarker TMA^+ erfolgte durch Applikation von 5 mM $TMA-Cl$ über die Badlösung (Abb. 6 A). Das aufgenommene TMA^+ wurde von der Zelle in TMA^+ -freier Lösung langsam wieder abgegeben, so dass $[TMA^+]_i$ kontinuierlich abnahm. Dieser $[TMA^+]_i$ -Abfall konnte mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft) durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden („*Fit*“; gestrichelte Linie in Abb. 14 A), so dass es möglich war, den durch Auswärtstransport bedingten $[TMA^+]_i$ -Abfall zu jedem Zeitpunkt des Experiments zu berechnen ($[TMA^+]_{i,fit}$) und somit volumenbedingte $[TMA^+]_i$ -Änderungen zu isolieren. In früheren Arbeiten zeigte sich, dass die K^+ -Sensitivität von Corning 477317 bei einer hinreichenden TMA^+ -Konzentration, die das 2- bis 3-fache des Detektionslimits für TMA^+ betrug, vollständig unterdrückt ist (Neumann *et al.* 2001, Trosiner 2003). Entsprechend wurde die Messung des Zellvolumens nur solange durchgeführt, bis $[TMA^+]_i$ auf das 3-fache

des Detektionslimits abgefallen war. In Abb. 6 A ist ein Registrierbeispiel zur TMA⁺-Beladung eines Retzius-Neurons unter *voltage-clamp*-Bedingungen gezeigt ($E_m = -60$ mV). Zu Beginn der Applikation von 5 mM TMA⁺ trat ein transienter Einwärtsstrom auf, der wahrscheinlich die Aktivierung von ionotropen Acetylcholin-Rezeptoren widerspiegelt (Neumann *et al.* 2001). Gleichzeitig setzte ein rascher, kontinuierlicher [TMA⁺]_i-Anstieg ein und nach Auswaschen des TMA⁺ erfolgte eine langsame [TMA⁺]_i-Abnahme. In Abb. 6 B sind die mittleren TMA⁺-Aufnahme- und Abgaberaten zusammengefasst. Die TMA⁺-Aufnahme erfolgte demnach ~3 mal so schnell wie die Abgabe. Im untersuchten Potentialbereich (-40 bis -70 mV) war die Geschwindigkeit der TMA⁺-Aufnahme unabhängig von E_m , während die TMA⁺-Abgabe mit negativeren E_m tendenziell schneller wurde.

Die 5- bis 10-minütige Badapplikation von 5 mM TMA⁺ führte zu einer [TMA⁺]_i von mehr als 5 mM. Bei einer passiven Verteilung von TMA⁺ über der Zellmembran könnte [TMA⁺]_i bei $E_m = -60$ mV sogar auf 54 mM ansteigen.

2.3.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau war zur Abschirmung gegen elektrische Störeinflüsse in einem Faraday-Käfig untergebracht, der zur Dämpfung mechanischer Schwingungen auf Gummipuffern gelagert war. Einzelne Segmentalganglien wurden in einer mit Sylgard[®] ausgegossenen Versuchswanne mit der Ventralseite nach oben mit vier Minutiennadeln festgesteckt. Das Flüssigkeitsvolumen in der Versuchswanne betrug ~50 µl. Die Versuchslösungen wurden zum Abfangen von Gasblasen über einen Windkessel in die Versuchswanne gespült und über eine Glaskapillare mittels einer Vakuum-Kolbenpumpe (HyFlo Bros. Medcalf, Potters Bar, Herts, UK) wieder abgesaugt. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug ~4 ml/min, so dass die Badlösung ~80 mal pro Minute ausgetauscht wurde. Die Versuchswanne wurde über eine mit einem chlorierten Silberdraht versehene Agarbrücke geerdet (Kunststoffschlauch, 3 % Agar in 3 M KCl). Die Positionierung der Elektroden und der Einstich in die Zelle erfolgten unter optischer Kontrolle (Stereolupe M5,

Wild, Heerbrugg, Schweiz) mit Hilfe zweier Mikromanipulatoren (Leitz, Wetzlar). Die Versuche wurden in einem klimatisierten Raum bei 21°C durchgeführt.

Die Glasmikroelektroden wurden mit den Messköpfen verbunden, die nahe der Versuchswanne angebracht waren. Die Stromelektrode war an den niederohmigen Eingang ($\sim 10^{10} \Omega$) und die Potentialelektrode an den hochohmigen Eingang ($> 10^{13} \Omega$) des Messverstärkers angeschlossen (TEC-05L: Modifizierter Zwei-Elektroden-*voltage-clamp*-Verstärker, NPI-Instruments, Tamm; Abb. 7 A). Die Funktion des Verstärkers wurde regelmäßig mit dem in Abb. 7 C wiedergegebenen Zellmodell überprüft.

Bei Kombination der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik wurde ein zusätzlicher Verstärker verwendet (FD-223 Electrometer, WPI), an dessen hochohmigen Eingang ($\sim 10^{15} \Omega$) der ionensensitive Kanal der ionensensitiven Glasmikroelektrode angeschlossen wurde. Der Referenzkanal war mit dem hochohmigen Eingang des TEC-05L verbunden. Das aufgezeichnete E_m wurde mit Hilfe eines Computers vom Potential des ionensensitiven Kanals subtrahiert, um E_{ion} zu erhalten.

Amplitude, Dauer und Polarität des Injektionsstroms bei *current-clamp*-Messungen und E_h bei *voltage-clamp*-Messungen wurden über einen D/A-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments, CA, USA), mit Hilfe des Programms Clampex eingestellt (Version 8.1, Axon Instruments, CA, USA). Die Ausgangssignale wurden auf einem Zweikanal-Speicheroszilloskop (PM 3380A, Fluke) dargestellt und nach Digitalisierung durch einen A/D-Wandler (ebenfalls Digidata 1322A) mit Hilfe des Programms Clampex von einem Computer registriert. Für die Registrierung des Einstichs, und der Beobachtung von R_{in} wurden Injektionsströme bzw. E_h mit Hilfe eines Stimulators (MAX 21, Zeitz Instruments, München) eingestellt. Um zwischen den beiden Stimulations-Systemen (Digidata 1322A und MAX 21) rasch umschalten zu können, wurde die in Abb. 7 B dargestellte Schaltung verwendet. Die Verwendung von zwei

Stimulationssystemen war aus technischen Gründen erforderlich. Der Digidata wurde genutzt, um rasche Folgen unterschiedlicher Spannungs- oder Stromsprünge zu erzeugen und übereinandergelegt darzustellen (sog. „sweeps“). Mit dem MAX 21 wurden regelmäßige Spannungs- oder Stromsprünge erzeugt, die während des Versuchs zeitlich nacheinander dargestellt wurden, was mit dem Digidata nicht möglich war.

Um eine verlustfreie Rekonstruktion des analogen Signals aus den digitalen Daten zu garantieren, sollte der Zeitraum zwischen zwei Abtastungen um den Faktor 2 kürzer sein als das schnellste zu messende Signal (Nyquist-Theorem, „oversampling“; siehe Sherman-Gold 1993). Hierdurch wird auch eine durch die Abtastung hervorgerufene künstliche Erhöhung des Rauschens („aliasing“) minimiert. In der vorliegenden Arbeit waren die schnellsten gemessenen Signale Aktionspotentiale (~ 1 ms). Um den Anforderungen des Nyquist-Theorems gerecht zu werden, wurde bei Messungen, in denen Aktionspotentiale ausgewertet werden sollten, die Abtastfrequenz auf 2,5 oder 5 kHz eingestellt. Bei allen übrigen Messungen betrug die Abtastfrequenz zwischen 20 und 50 Hz.

Die Elektroden wurden zunächst oberhalb der Zelle in die Versuchslösung getaucht und die Elektrodenpotentiale auf Null abgeglichen. Die Bestimmung der Elektrodenwiderstände sowie die Kompensation von Streukapazitäten erfolgten mit den dafür vorgesehenen Vorrichtungen des TEC-05L. Der Potentialsprung beim Einstich der Potentialelektrode wurde sowohl auf dem Oszilloskop als auch mit Hilfe eines in den TEC-05L integrierten Audio-Monitors („*voltage-to-frequency-converter*“) verfolgt. Der Einstich der Stromelektrode wurde ebenfalls über den Audio-Monitor verfolgt und durch den Effekt repetitiv applizierter Strompulse auf E_m kontrolliert (-5 nA für 1 s; Pause: 9 s).

Mit den *current-clamp*-Messungen wurde begonnen, nachdem sich E_m bei mindestens -35 mV stabilisiert hatte und die durch den Strompuls hervorgerufene Potentialänderung mindestens 25 mV betrug, entsprechend einem R_{in} von 5 M Ω .

Wurden diese Werte nicht innerhalb von 5 min nach dem Elektrodeneinstich erreicht, wurden Präparat und Elektroden verworfen.

Bei den *voltage-clamp*-Messungen wurde nach dem Elektrodeneinstich E_m zunächst auf -50 mV geklemmt. Mit den Messungen wurde begonnen, nachdem I_{VC} unter 3 nA gefallen war und für eine kurzzeitige (1 s) Membranhypolarisation auf -100 mV maximal 10 nA zusätzlich benötigt wurde, wiederum entsprechend einem R_{in} von 5 M Ω . Zur Ermittlung von Strom-Spannungskennlinien wurde E_m in 10 mV-Intervallen für jeweils 1 s auf -120 bis -20 mV geklemmt, wobei zwischenzeitlich immer wieder für mindestens 3 s auf -50 mV zurückgeklemmt wurde. Um eine mögliche Schädigung der Zellen durch zu hohe I_{VC} zu vermeiden, wurde der TEC-05L so eingestellt, dass in der Regel nicht auf E_h positiver als -20 mV geklemmt werden konnte („oscillation shut-off“). Nur in Na^+ -freien Lösungen waren die Ströme zur Einstellung positiver E_h verhältnismäßig gering, so dass es in einigen Fällen möglich war, die Zellen ohne Schädigung bis auf +10 mV zu klemmen.

2.4 Auswertung

Die digitalisierten Registrierungen wurden mit dem Programm Clampfit (Axon Instruments) ausgewertet und die erhaltenen Daten mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms zusammengefasst (Microsoft Excel). Die unter veränderten extrazellulären Bedingungen gemessenen R_{in} wurden auf den zuvor in NSL gemessenen R_{in} normiert, da der absolute R_{in} von Zelle zu Zelle erheblich variierte.

Wenn nicht anders vermerkt, sind alle Ergebnisse als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (S.D.) angegeben. Unterschiede zwischen Messergebnissen wurden durch einen zweiseitigen t-Test auf ihre Signifikanz überprüft (Bailey 1992). Dabei wurde zwischen signifikant ($p < 0,05$) und hochsignifikant unterschiedlichen Ergebnissen ($p < 0,01$) differenziert oder p wurde an

entsprechender Stelle angegeben. Der Test wurde gepaart oder ungepaart durchgeführt, je nachdem ob abhängige oder unabhängige Stichproben vorlagen.

2.5 Lösungen

Die Lösungen wurden mit entsalztem Wasser hergestellt, das über eine Umkehr-Osmose-Anlage (Milli-Q Reagent Water System; Millipore, Molsheim, Frankreich) aus vorentsalztem Leitungswasser gewonnen wurde. Der spezifische Widerstand des so aufbereiteten Wassers betrug mindestens 18 M Ω -cm.

Die Zusammensetzungen der Versuchslösungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die NSL entsprach der von Nicholls und Kuffler (1964) verwendeten Lösung, jedoch war der NaCl-Gehalt um 26 mM reduziert, um Isotonie zur Blutegel-Hämolymphe zu erreichen (Munsch und Deitmer 1992). Zur pH-Pufferung wurde HEPES verwendet (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Appli-chem, Darmstadt). Der pH-Wert wurde normalerweise mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt, wodurch die Na⁺-Konzentration um ~4 mM erhöht wurde und entsprechend 4 mM HEPES in die anionische Form überführt wurden.

Lösungen, in denen Na⁺ anteilig oder vollständig ersetzt war, wurde NMDG (N-Methyl-D-Glucamin, Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt, das durch Titrierung mit HCl in NMDG-Cl umgesetzt wurde. Zur Herstellung von Lösungen mit reduzierter Cl⁻-Konzentration wurden die entsprechenden Gluconatsalze verwendet. Um auszuschliessen, dass die bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität auftretenden Wirkungen auf der verminderten NaCl-Konzentration bzw. der Ionenstärke beruhen, wurde eine hypotonische Lösung (-40 mM NaCl) mit 80 mM Saccharose versetzt. Dadurch wurde Isotonie zur NSL erhalten, NaCl-Konzentration und Ionenstärke der Lösung entsprachen jedoch einer hypotonischen Badlösung, in der 40 mM NaCl ersatzlos fehlte.

Die Osmolalität der Lösungen wurde mit einem Osmometer überprüft (Osmomat 030, Gonotec). Für NSL und hierzu isotonische Lösungen ergaben sich dabei

Werte von ~ 189 mosm/kg, für hypotonische Lösungen, in denen 40 mM NaCl fehlte, ergaben sich ~ 115 mosm/kg.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Versuchslösungen

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	Gluc ⁻	NMDG ⁺	Bemerkungen
NSL	89	4	2	1	95	-	-	190 mosm/kg
-20 NaCl	69	4	2	1	75	-	-	150 mosm/kg
-30 NaCl	59	4	2	1	65	-	-	130 mosm/kg
-40 NaCl	49	4	2	1	55	-	-	110 mosm/kg
-50 NaCl	39	4	2	1	45	-	-	90 mosm/kg
-59 NaCl	30	4	2	1	36	-	-	81 mosm/kg
+20 NaCl	109	4	2	1	105	-	-	230 mosm/kg
+40 NaCl	129	4	2	1	135	-	-	270 mosm/kg
+85 NaCl	174	4	2	1	180	-	-	360 mosm/kg
-40 NaCl iso. konst. Ionenstärke	49	4	2	1	95	40	40	-
-40 Na ⁺ iso.	49	4	2	1	95	-	40	-
-40 Cl ⁻ iso.	89	4	2	1	55	40	-	-
-40 NaCl iso. red. Ionenstärke	49	4	2	1	55	-	-	+80 mM Saccharose
Cl ⁻ -frei	89	4	2	1	-	95	-	-
Cl ⁻ -frei hypotonisch	49	4	2	1	-	55	-	-
Na ⁺ -frei	-	4	2	1	95	-	89	-
Na ⁺ -frei hypotonisch	-	4	2	1	55	-	49	-
20 TEA ⁺	69	4	2	1	95	-	-	+20 mM TEA ⁺
20 TEA ⁺ hypotonisch	29	4	2	1	55	-	-	+20 mM TEA ⁺
Eichlösungen (pH 7,3)	5	80	-	0,5	89	-	-	+0,5 bis +10 mM TMA ⁺

Konzentrationsangaben in mM. Alle Lösungen enthielten 10 mM HEPES, wovon 4 mM bei pH-Einstellung in die anionische Form übergehen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die Osmolalität der Versuchslösungen wurde mit einem Osmometer bestimmt. Abweichungen von maximal 5 % von der in der Tabelle angegebenen Osmolalität wurden toleriert.

Zur pharmakologischen Charakterisierung von Ionenströmen wurden die in Tabelle 2 genannten Pharmaka verwendet, deren Strukturformeln in Abb. 8 dargestellt sind.

Tabelle 2: Verwendete Pharmaka

	Vollständiger Name	Quelle	Konzentration
TEA ⁺	Tetraethylammonium, Chloridsalz	Sigma	20 mM (Tabelle 1)
Clofilium-tosylat	4-Chlor-N,N-diethyl-N-heptylbenzenbutanamin tosylat	Sigma	1 µM
Nifluminsäure	2-[3-(Trifluormethyl)anilin]nicotinsäure	Sigma	50 µM
NPPB, N-150	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamin)benzoesäure	Sigma	50 µM
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatstilben-2,2'-Disulfonsäure	Sigma, Fluka	0,5 mM
Colchizin	N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo[a]heptalen-7-yl)-acetamid	Sigma	25 µM
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-dion	Tocris	20 µM
GABA	γ-Aminobuttersäure	Sigma	0,5 mM
Carbachol	Carbamylcholinchlorid	Sigma	0,5 mM

3 ERGEBNISSE

3.1 Membranpotential und Eingangswiderstand unter Ruhebedingungen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden immer zwei Glasmikroelektroden in ein einzelnes Neuron eingestochen. Bei den *current-clamp*- und den *voltage-clamp*-Experimenten handelte es sich dabei um zwei Einkanal-Glasmikroelektroden, bei der Kombination der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik um eine ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektrode und eine Einkanal-Glasmikroelektrode (Abb. 5, Abb. 9). E_m wurde unmittelbar nach dem Einstich der Elektroden sowie nach einer Erholungsphase von einigen Minuten bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: E_m und R_{in} von Retzius-Neuronen nach dem Elektroden-Einstich

	E_m nach Einstich P_{EI} [mV]	E_m nach Einstich C_{EI} [mV]	E_m nach Erholung [mV]	R_{in} nach Erholung [M Ω]
P_{EI} : Einkanal	$-46,8 \pm 7,6$ (375)	$-42,4 \pm 6,8$ (343)	$-49,4 \pm 7,5$ (336)	$8,0 \pm 1,7$ (357)
P_{EI} : Zweikanal	$-47,8 \pm 8,2$ (44)	$-44,4 \pm 7,7$ (27)	$-49,1 \pm 9,1$ (33)	$6,9 \pm 1,6$ (23) $p = 0,002$

Mittelwerte \pm S.D., die Anzahl der Messungen ist in Klammern angegeben. P_{EI} : Potentialelektrode (diese wurde stets zuerst eingestochen, bei ionensensitiven Zweikanal-Elektroden wurde das über den Referenzkanal bestimmte Potential angegeben), C_{EI} : Stromelektrode (diese wurde stets nach der Potentialelektrode eingestochen). R_{in} wurde anhand der durch Injektion von -5 nA induzierten E_m -Verschiebung bestimmt.

Die Werte für E_m nach Einheilung der Elektroden waren in den beiden Versuchsanordnungen praktisch identisch und stimmen mit Angaben aus früheren Arbeiten gut überein (Dierkes 1998, Lucht 1997). Der Einstich der Stromelektrode bewirkte zwar eine leichte Abnahme von E_m , nach einer Erholungsphase von einigen Minuten stellte sich jedoch ein stabiles E_m ein, das negativer war als unmittelbar nach dem Einstich der Potentialelektrode. Der R_{in} der Zellen war bei Verwendung

von Zweikanal-Elektroden gegenüber Einkanal-Elektroden zwar geringfügig verringert, dennoch erscheint eine Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Retzius-Neuronen durch den Einstich der Elektroden vernachlässigbar.

3.2 Einfluss anisotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften

3.2.1 Einfluss hypertotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in}

Um die Auswirkungen einer Zellschrumpfung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Retzius-Neuronen näher zu untersuchen, wurden Badlösungen appliziert, deren Osmolalität durch Zugabe von NaCl erhöht war (+20, +40 und +85 mM NaCl, siehe 2.5). Das Registrierbeispiel in Abb. 10 A wurde von einem Retzius-Neuron erhalten, das spontan keine Aktionspotentiale auslöste. Die Erhöhung der NaCl-Konzentration um 20 mM bewirkte eine leichte, reversible Membrandepolarisation, hatte jedoch keinen erkennbaren Effekt auf R_{in} . Die Erhöhung der NaCl-Konzentration um 40 mM bewirkte neben einer leicht verstärkten Membrandepolarisation die Auslösung von Aktionspotentialen sowie eine R_{in} -Zunahme von 0,6 M Ω . Diese Effekte waren nach Erhöhung der NaCl-Konzentration um 85 mM verstärkt. In beiden Fällen verliefen Membrandepolarisation und R_{in} -Abnahme zeitlich parallel (Abb. 10 B, C). Die Rückkehr zu NSL führte jeweils zu einer Membranhyperpolarisation, die nach Gabe von +85 mM NaCl einige Minuten anhielt.

Diese Membranhyperpolarisation ist wahrscheinlich auf eine erhöhte Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ zurückzuführen, die pro Pumpzyklus eine positive Elementarladung in den Extrazellulärraum transportiert und dadurch die Membran hyperpolarisiert. Die Applikation einer stark hypertotonischen Badlösung mit +85 mM NaCl führt zu einem Anstieg der cytosolischen Na^+ -Konzentration auf das Doppelte des Ruhewertes (Dierkes *et al.* 2003) und sollte dadurch die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ steigern (Senatorov *et al.* 2000).

3.2.2 Einfluss hypertonischer Bedingungen auf die Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren

Die R_{in} -Zunahme nach Erhöhung der extrazellulären Osmolalität könnte auf der Deaktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren beruhen. In Abb. 11 A sind Registrierbeispiele gezeigt, in denen ein Retzius-Neuron unter isotonischen und unter hypertonischen Bedingungen dem inhibitorischen Neurotransmitter GABA ausgesetzt war. In beiden Fällen bewirkte GABA eine Membranhypolarisation und eine R_{in} -Abnahme, die Wirkung von GABA war jedoch unter hypertonischen Bedingungen verstärkt. Möglicherweise wurden durch die Erhöhung der extrazellulären Osmolalität bereits aktive GABA-Rezeptoren deaktiviert und für eine Aktivierung durch GABA bereit gestellt. Dies würde auch die bei Erhöhung der extrazellulären Osmolalität beobachtete R_{in} -Zunahme erklären. In Abb. 11 B sind die durch GABA, Carbachol und DNQX hervorgerufenen Änderungen von R_{in} unter isotonischen und unter hypertonischen Bedingungen zusammengefasst. Carbachol, ein Agonist von Acetylcholin-Rezeptoren, bewirkte eine R_{in} -Abnahme, die von der extrazellulären Osmolalität unabhängig war. Eine leichte R_{in} -Zunahme unter isotonischen Bedingungen bei Applikation von DNQX, einem Antagonisten für Kainat-Rezeptoren, zeigt eine geringe Ruhe-Aktivität der Kainat-Rezeptoren an. Unter hypertonischen Bedingungen war praktisch keine DNQX-induzierte Änderung von R_{in} zu beobachten, so dass zu vermuten ist, dass auch Kainat-Rezeptoren durch Erhöhung der extrazellulären Osmolalität deaktiviert werden. Da der Effekt gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Deaktivierung von Kainat-Rezeptoren zur R_{in} -Zunahme bei Erhöhung der extrazellulären Osmolalität nur wenig beiträgt. Die Befunde lassen vermuten, dass die R_{in} -Zunahme unter hypertonischen Bedingungen auf eine Deaktivierung von tonisch aktiven GABA-Rezeptoren zurückzuführen ist.

3.2.3 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in}

Um die Auswirkungen einer Zellschwellung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Retzius-Neuronen näher zu untersuchen, wurden Badlösungen appliziert, deren Osmolalität durch Wegnahme von NaCl vermindert war (-20, -30, -40, -50 und -59 mM NaCl, siehe 2.5). Sollten durch die Applikation dieser Versuchslösungen schwellungsaktivierte Ionenkanäle aktiviert werden, wäre dies an einer R_{in} -Abnahme erkennbar. Das Registrierbeispiel in Abb. 12 A zeigt die Wirkung einer um 20 bzw. 40 mM NaCl reduzierten Badlösung auf E_m und R_{in} . Die Verminderung der NaCl-Konzentration um 20 mM bewirkte eine Membranhypolarisation, eine Abnahme der Frequenz spontaner Aktionspotentiale sowie eine R_{in} -Abnahme. Nach Verminderung der NaCl-Konzentration um 40 mM waren die R_{in} -Abnahme und Membranhypolarisation verstärkt und die spontanen Aktionspotentiale vollständig unterdrückt. Die R_{in} -Abnahme war gegenüber der Membranhypolarisation verzögert. Im Mittel betrug die Membranhypolarisation $-6,5 \pm 4,6$ mV (-20 mM NaCl, $n = 4$) bzw. $-5,1 \pm 5,3$ mV (-40 mM NaCl, $n = 56$; Abb. 13 A) und die R_{in} -Abnahme $-2,6 \pm 2,2$ % (-20 mM NaCl, $n = 4$, $p = 0,12$) bzw. -24 ± 14 % (-40 mM NaCl, $n = 56$, $p < 10^{-6}$; Abb. 13 B). Nach Verminderung der extrazellulären NaCl-Konzentration um 40 mM setzte die R_{in} -Abnahme um 62 ± 40 s ($n = 40$) verzögert gegenüber der Membranhypolarisation ein und kehrte nach dem Überwechseln zu NSL entsprechend verzögert auf den Ruhewert zurück.

3.2.4 Wirkung anisotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in} : Zusammenfassung der Daten

Der Einfluss anisotonischer Bedingungen auf E_m und R_{in} von Retzius-Neuronen ist in Abb. 13 zusammengefasst. Hypertonische Lösungen bewirken eine Membrandepolarisation, die mit der Osmolalität der Versuchslösung zunimmt (Abb. 13 A). Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass die E_m -Änderung auf eine Erhöhung des Na^+ -Gradienten zurückzuführen ist. Hypotonische Bedingungen haben entsprechend der Schwächung des Na^+ -Gradienten eine Membran-

hyperpolarisation zur Folge, die jedoch mit abnehmender Osmolalität geringer wird. Dies deutet auf die Beteiligung eines weiteren gegenläufigen Vorgangs hin, z. B. die Aktivierung depolarisierend wirkender, schwellungsaktivierter Ionenkanäle. Für die Aktivierung derartiger Ionenkanäle spricht, dass nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität die R_{in} -Abnahme gegenüber der Membranhyperpolarisation verzögert erfolgt (Abb. 12 C).

Wie Abb. 13 B zeigt, wird R_{in} durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität sehr viel stärker beeinflusst als durch eine Erhöhung, ein weiteres Indiz für die Öffnung schwellungsaktivierter Ionenkanäle. Selbst bei einer Steigerung der Osmolarität um 80 % nahm R_{in} nur um ~10 % zu. Da ab einer relativen Osmolalität kleiner als ~50% R_{in} besonders stark absank, wurde für alle folgenden Experimente zum Einfluss hypotonischer Bedingungen eine Badlösung gewählt, deren Osmolalität geringfügig über diesem Wert lag (-40 mM NaCl). Für weitere Experimente zur Wirkung hypertotonischer Bedingungen wurde eine Badlösung gewählt, bei der die NaCl-Konzentration um 40 mM erhöht war, weil bei Zugabe von 85 mM NaCl die cytosolische Na^+ -Konzentration stark ansteigt.

3.3 Einfluss von E_m auf die Änderung des Zellvolumens unter anisotonischen Bedingungen

Die Änderungen der extrazellulären Osmolalität führten stets auch zu Änderungen von E_m . Um den Einfluss von E_m auf das Zellvolumen zu überprüfen, wurde E_m mit Hilfe der *voltage-clamp*-Technik auf feste Werte geklemmt und dabei die Änderung des Zellvolumens und des Membranstroms bei geänderter extrazellulärer Osmolalität gemessen.

Ein Registrierbeispiel zur Wirkung anisotonischer Lösungen auf das Zellvolumen und den Membranstrom unter *voltage-clamp*-Bedingungen wird in Abb. 14 A gezeigt. Wegen der TMA^+ -Abgabe nahm $[TMA^+]_i$ während des gesamten Experiments kontinuierlich ab. In hypotonischer Lösung war eine zusätzliche, reversible $[TMA^+]_i$ -Abnahme zu beobachten, in hypertotonischer Lösung eine

entsprechende $[TMA^+]_i$ -Zunahme. Die Anpassung des TMA^+ -Verlusts mittels einer Exponentialfunktion (gestrichelte Linie in Abb. 14 A) verdeutlicht die durch die Änderung des Zellvolumens bedingten $[TMA^+]_i$ -Änderungen. I_{VC} zur Klemmung von E_m auf -60 mV veränderte sich in hypotonischer Lösung langsam in positive Richtung (Abb. 18). Nach Rückkehr zu NSL wurde I_{VC} rasch wieder negativer und sank vorübergehend unter den Ausgangswert ab. Bei der Applikation hypertotonischer Badlösung verschob sich I_{VC} in negative Richtung und kehrte nach Rückkehr zu NSL auf den Ausgangswert zurück.

Die bei E_m zwischen -40 und -70 mV durch Erhöhung bzw. Erniedrigung der extrazellulären Osmolalität induzierten Volumenänderungen sind in Abb. 14 B zusammenfassend dargestellt. Bei $E_m = -50$ mV, also in der Nähe des Ruhepotentials, wurde in hypotonischer Lösung im Mittel eine Volumenzunahme von 55 ± 24 % ($n = 6$) gemessen. Bei $E_m = -40$ mV betrug die Volumenzunahme nur 33 ± 16 % ($n = 5$, $p = 0,15$), bei $E_m = -70$ mV dagegen 66 ± 58 % ($n = 4$, $p = 0,25$). Dennoch ließ sich weder bezüglich der Abnahme des Zellvolumens in hypertotonischer Lösung, noch bezüglich der Zunahme in hypotonischer Lösung ein signifikanter Einfluss von E_m nachweisen. Bei $E_m = -70$ mV konnte nur bei 4 von 15 Retzius-Neuronen das Volumen bestimmt werden. Bei zwei Zellen bewirkte hypotonische Lösung einen schnellen Abfall von $[TMA^+]_i$ unter das Detektionslimit. Bei den übrigen Zellen war bereits während der TMA^+ -Beladung eine Klemmung auf -70 mV unmöglich oder die Zellen verloren das TMA^+ so schnell, dass eine Bestimmung des Zellvolumens nicht durchgeführt werden konnte.

Die Zusammenfassung sämtlicher Daten unabhängig von E_m ergab eine Volumenabnahme von -23 ± 8 % ($n = 9$) in hypertotonischer Lösung und eine Volumenzunahme von 49 ± 34 % ($n = 19$) in hypotonischer Lösung. Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von denen, die unter ungeklemmten Bedingungen erhalten wurden (+40 mM NaCl: -25 ± 6 %, $n = 10$; Klees, unveröffentlicht; -40 mM NaCl: 57 ± 37 %, $n = 6$; Dierkes *et al.* 2002).

3.4 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf die Membrankapazität

Mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie wurden bei Retzius-Neuronen unter hypertonen Bedingungen Membraneinstülpungen und unter hypotonischen Bedingungen Membranausstülpungen („blebs“) nachgewiesen, während die Zellkörper unter isotonischen Bedingungen eine annähernd kugelförmige Gestalt zeigten (Wüsten 2004). Unter der Annahme, dass ein Retzius-Neuron eine kugelförmige Gestalt mit einem Radius (r) von $40\ \mu\text{m}$ hat, ergibt sich das Volumen (V) des Zellkörpers zu $268\ \text{pl}$ und die Oberfläche (A) zu $20.100\ \mu\text{m}^2$. Nach Verminderung der extrazellulären NaCl-Konzentration um $40\ \text{mM}$ nimmt das Zellvolumen um durchschnittlich $57\ \%$ zu ($\pm 37\ \%$, $n = 6$; Dierkes *et al.* 2002), also auf $421\ \text{pl}$. Damit errechnet sich der Radius zu $46,5\ \mu\text{m}$ und die Zelloberfläche zu $27.200\ \mu\text{m}^2$, entsprechend einem Zuwachs um $35\ \%$.

Da eine Plasmamembran nicht um mehr als $3\text{-}4\ \%$ gedehnt werden kann (Nichol und Hutter 1996), muss bei der errechneten Oberflächenzunahme um $35\ \%$ eine Vergrößerung der Membranfläche stattgefunden haben. Ob dies durch Ausstülpung von Membraninvaginationen oder durch den Einbau neuer Membranelemente erfolgt, kann durch die Bestimmung der Membrankapazität (C_{in}) geklärt werden. Sollte die Zunahme der Membranoberfläche ausschließlich durch den Einbau neuer Membranelemente erfolgen, so sollte C_{in} entsprechend zunehmen. Sollte die Zunahme der Membranoberfläche durch Ausstülpung von Membraninvaginationen erfolgen, so sollte C_{in} konstant bleiben.

Um C_{in} zu bestimmen, wurde durch Injektion geringer Ströme ($1\text{-}2\ \text{nA}$) eine Membranhyperpolarisation von $\sim 10\ \text{mV}$ induziert (Abb. 15 A), die für eine Aktivierung von I_{h} -Kanälen zu schwach war (Gerard *et al.* 2001; vgl. Abb. 21). Aus der Amplitude der E_{m} -Verschiebung am Ende der Strominjektion wurde R_{in} bestimmt und aus dem Zeitpunkt, zu dem die Membranhyperpolarisation zu $\sim 63\ \%$ (entsprechend $1 - 1/e$) abgeschlossen war, die Membranzeitkonstante (τ). Der Quotient aus τ und R_{in} liefert C_{in} . Es wird angemerkt, dass eine präzise Anpassung des Zeitverlaufs der strominduzierten Membranhyperpolarisation nur

durch eine Summe von zwei e-Funktionen möglich war, was zwei Zeitkonstanten lieferte. Dabei spiegelt die kleinere vermutlich die Membrankapazität des Zellsomas wider und die größere die Membrankapazität der Zellfortsätze. Da jedoch R_{in} nur für die gesamte Zelle bestimmt wurde und zudem der Innenlängswiderstand zwischen Soma und Fortsätzen unbekannt ist und sich bei einer Zellschwellung möglicherweise verändert, wurde τ nur näherungsweise bestimmt.

Die Registrierbeispiele der strominduzierten Membranhyperpolarisation in Abb. 15 A zeigen, dass unter hypotonischen Bedingungen τ signifikant kleiner war als unter isotonischen Bedingungen (19 ± 7 ms bzw. 37 ± 15 ms, $n = 60$, $p < 10^{-6}$; Abb. 15 B). Da jedoch R_{in} noch stärker reduziert war ($6,7 \pm 2,8$ M Ω bzw. $13,3 \pm 4,2$ M Ω , $n = 60$, $p < 10^{-6}$; vgl. Abb. 17 B), ergab sich insgesamt eine C_{in} -Zunahme um ~ 14 % ($2,8 \pm 0,8 \rightarrow 3,2 \pm 1,8$ nF, $n = 60$, $p = 0,06$; Abb. 15 B). Wegen der C_{in} -Zunahme kann davon ausgegangen werden, dass zusätzliche Membran, beispielsweise durch die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, bereitgestellt wird, die vor der Volumenzunahme keinen elektrischen Kontakt zur Badlösung aufwies. Da die Zunahme der Membrankapazität jedoch kleiner war als 35 %, ist zu vermuten, dass zusätzlich eine Ausstülpung von Membraninvaginationen zur Vergrößerung der Zelloberfläche und somit des Zellvolumens notwendig ist. Ob umgekehrt bei einer Zellschrumpfung die Membranoberfläche reduziert wird, wurde nicht untersucht.

3.5 Strom-Eingangswiderstandsbeziehungen

Um zu überprüfen, inwieweit zwischen Strominjektion und E_m -Verschiebung Proportionalität besteht, wurden *current-clamp*-Experimente durchgeführt, bei denen nacheinander Strompulse von -10 bis +3 nA in 1 nA-Schritten injiziert wurden (Stufenprotokoll). In Abb. 16 sind die durch diese Strompulse hervorgerufenen E_m -Verschiebungen in NSL (A), in hypotonischer Lösung (B) und nach Rückkehr zu NSL (C) überlagert wiedergegeben. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde E_m vor Versuchsbeginn durch konstante

Strominjektion auf ~ -50 mV eingestellt. In NSL betrug dieser Offsetstrom vor Verminderung der extrazellulären Osmolalität $-0,1 \pm 0,8$ nA ($n = 61$) und danach $-0,1 \pm 0,6$ nA ($n = 37$). In hypotonischer Lösung musste zur Kompensation der Membranhyperpolarisation ein Offsetstrom von $+0,6 \pm 1,6$ nA ($n = 61$) eingestellt werden.

In Abb. 16 A ist ersichtlich, dass sich bei einer Strominjektion von -1 nA eine stabile Membranhyperpolarisation erst nach ~ 300 ms einstellt. Bei der Injektion von größeren negativen Strömen nahm die Membranhyperpolarisation nach Durchlaufen eines Maximums partiell wieder ab („voltage-sag“), bedingt durch die Aktivierung von I_h -Kanälen (Gerard 2003). Bei sehr starken Membranhyperpolarisationen (≥ -100 mV) wurde der „voltage-sag“ trotz maximaler Aktivierung der I_h -Kanäle immer kleiner, da der Aktivierungsvorgang zunehmend in der Anstiegsphase der Membranhyperpolarisation erfolgte. Wegen der langen Anstiegsphase der Membranhyperpolarisation war es erforderlich, R_{in} am Ende der Strominjektion zu bestimmen, d. h. zu einem Zeitpunkt, in dem die I_h -Kanäle beim jeweiligen E_m maximal aktiviert sind (vgl. Abb. 21, siehe 3.6.2).

Positive Strominjektionen lösten eine Membrandepolarisation aus, die von Aktionspotentialen überlagert war, deren Häufigkeit mit steigender Strominjektion bzw. Membrandepolarisation zunahm. Nach der Strominjektion trat eine vorübergehende Membranhyperpolarisation auf, die möglicherweise auf die Aktivierung von K^+ -Kanälen zurückgeht (Merz 1995, Yang und Kleinhaus 1984, Johansen und Kleinhaus 1986, Stewart *et al.* 1989). Unter hypotonischen Bedingungen war der „voltage-sag“ unterdrückt und die Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale vermindert, beides möglicherweise wegen der reduzierten extrazellulären Na^+ -Konzentration (Tabelle 4). Vor allem waren in hypotonischer Lösung die E_m -Verschiebungen und damit R_{in} über den gesamten Messbereich vermindert. Alle Veränderungen waren vollständig reversibel.

Tabelle 4: Anzahl der Retzius-Neuronen (von 61), die bei Injektion von +1, +2 oder +3 nA in NSL bzw. in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) Aktionspotentiale zeigten sowie Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale

Strom (nA)	+1		+2		+3	
Lösung	NSL	-40 mM NaCl	NSL	-40 mM NaCl	NSL	-40 mM NaCl
Anzahl (n = 61)	52	37	54	43	57	47
Frequenz (s ⁻¹)	2,6 ± 1,5	2,1 ± 1,5 p = 3 · 10 ⁻³	6,1 ± 3,4	4,2 ± 3,2 p = 1 · 10 ⁻⁴	9,8 ± 5,1	6,3 ± 4,7 p = 1 · 10 ⁻⁶
Amplitude (mV)	31 ± 10	18 ± 8 p < 10 ⁻⁶	24 ± 8	15 ± 7 p < 10 ⁻⁶	20 ± 7	13 ± 6 p < 10 ⁻⁶

Die Bestimmung von p erfolgte mit einem beidseitigen, gepaarten t-Test.

Die bei den einzelnen Zellen gemessenen E_m -Verschiebungen wurden gemittelt und in Form von Strom-Spannungsbeziehungen zusammengefasst (Abb. 17 A). In NSL war die Strom-Spannungsbeziehung bei Injektionsströmen von -1 bis +1 nA, also in der Nähe des Ruhe- E_m , relativ steil und flachte bei höheren positiven oder negativen Injektionsströmen deutlich ab. Diese Abflachung zeigt eine R_{in} -Abnahme an und spricht für die Aktivierung von Ionenkanälen sowohl bei einer Membrandepolarisation als auch bei einer Membranhyperpolarisation. Bei einer Membranhyperpolarisation beruht die R_{in} -Abnahme wohl teilweise auf der Aktivierung von I_h -Kanälen, bei einer Membrandepolarisation werden vermutlich ein verzögerter K^+ -Strom („delayed rectifier“, I_K ; Johansen und Kleinhaus 1986, Stewart *et al.* 1989) sowie ein anhaltender Na^+ -Strom ($I_{Na,P}$; Angstadt 1999) aktiviert. Unter hypotonischen Bedingungen war die Strom-Spannungsbeziehung insgesamt annähernd linear, so dass anzunehmen ist, dass sowohl I_h als auch I_K unter diesen Bedingungen dauerhaft aktiviert sind. Nach Abschalten positiver Ströme wurde manchmal eine langsame Repolarisation registriert, die zwischen -30 und -40 mV abrupt schneller wurde und vermutlich durch die Deaktivierung der $I_{Na,P}$ -Kanäle bedingt war (nicht gezeigt, siehe Coulon 2001). Diese Deaktivierung blieb in hypotonischer Lösung erhalten, war aber zu negativeren Potentialen hin verschoben. Eine dauerhafte Aktivierung von $I_{Na,P}$ durch hypotonische Lösung ist demnach ausgeschlossen.

Kleine, negative Injektionsströme riefen verhältnismäßig große E_m -Verschiebungen hervor, entsprechend einem großen R_{in} (Abb. 17 B). Bei stärkeren Injektionsströmen und folglich größeren E_m -Verschiebungen wurde R_{in} zunehmend kleiner. In hypotonischer Lösung war R_{in} bei allen Stromstärken erniedrigt, wobei die Erniedrigung bei schwachen Injektionsströmen, also in der Nähe des Ruhe- E_m , am größten war. Wegen der Spannungsabhängigkeit von R_{in} wurde das Stufenprotokoll bei allen Experimenten angewendet, bei denen die R_{in} -Abnahme unter hypotonischen Bedingungen durch die Versuchsbedingungen verändert war.

3.6 Schwellungsaktivierter Membranstrom

3.6.1 *Änderung des Membranstroms bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität*

Die Aktivierung einer Membranleitfähigkeit sollte neben einer R_{in} -Abnahme auch eine Veränderung des Membranstroms bedingen. Tatsächlich trat in hypotonischer Lösung bei Klemmung von E_m auf -60 mV ein sich langsam entwickelnder Membranstrom auf (Abb. 18), der im Folgenden als ΔI_{VC} bezeichnet wird. Um ΔI_{VC} genauer zu charakterisieren, wurde E_m anhaltend auf Werte zwischen -70 und -30 mV geklemmt und für 5 min die Osmolalität vermindert. In dem in Abb. 18 A gezeigten Registrierbeispiel war zur Klemmung von E_m auf -50 mV ein Strom von -1,3 nA erforderlich. Die Applikation von hypotonischer Lösung löste einen auswärts gerichteten Strom aus, der über ~1 min relativ schnell und danach langsamer zunahm und nach ~4 min einen stabilen Wert erreichte. Nach Rückkehr zu NSL nahm ΔI_{VC} rasch wieder ab und wurde vorübergehend negativer als vor der Verminderung der extrazellulären Osmolalität. Bei Klemmung von E_m auf -60, -40 und -30 mV wurden sehr ähnliche ΔI_{VC} registriert (Abb. 18 B). Bei $E_m = -70$ mV wurde dagegen in 4 von 9 Experimenten ein negativer ΔI_{VC} gemessen. Das Umkehrpotential von ΔI_{VC} ließ sich anhand dieser Befunde nicht bestimmen. Daher wurde der untersuchte Spannungsbereich erweitert.

3.6.2 Umkehrpotential von ΔI_{VC}

Um eine Veränderung des intrazellulären Milieus durch eine lang andauernde Klemmung von E_m weit ab vom Ruhepotential zu vermeiden, wurde die Klemmung auf das jeweilige Testpotential auf 1 s begrenzt und zwischenzeitlich für 5 s auf -50 mV geklemmt. Auf diese Weise wurde E_m nacheinander auf Werte von -120 bis -20 mV (wenn möglich bis -10 mV) gebracht.

In Abb. 19 A sind Registrierbeispiele der hierzu erforderlichen Klemmströme (I_{VC}) in NSL und in hypotonischer Lösung jeweils überlagert wiedergegeben. In isotonischen Lösungen nahm I_{VC} bei Potentialsprüngen in negative Richtung langsam zu, wahrscheinlich bedingt durch einen Na^+ -Einstrom infolge der Aktivierung von I_h -Kanälen (Angstadt 1999, Gerard *et al.* 2001). In hypotonischen Lösungen nahm I_{VC} dagegen leicht ab oder blieb konstant. Bei Sprüngen in positive Richtung nahm I_{VC} sowohl in isotonischer als auch in hypotonischer Lösung langsam ab. Diese Abnahme beruht vermutlich auf der Verminderung eines K^+ -Ausstroms durch die Inaktivierung von spannungsabhängigen oder Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen sowie auf einem verstärkten Na^+ -Einstrom durch die Aktivierung von $I_{Na,P}$ -Kanälen. Die I_{VC} am Ende der Potentialsprünge wurden gemittelt und in Strom-Spannungskennlinien zusammengefasst (Abb. 19 B). In NSL war die Steigung der Kennlinie in der Nähe des Ruhepotentials am geringsten und nahm bei E_m zwischen -70 und -120 mV geringfügig zu. Bei E_m positiver als -40 mV nahm die Steigung der Kennlinie drastisch zu, vermutlich bedingt durch die Aktivität von K^+ - und $I_{Na,P}$ -Kanälen (siehe 3.5). In hypotonischer Lösung war I_{VC} über den gesamten Spannungsbereich vergrößert, wobei die Strom-Spannungskennlinie zwischen -50 und -120 mV linear war. Die Steigung der Kennlinie nahm bei E_m positiver als -40 mV wiederum zu, jedoch nicht so stark wie in NSL. Die Veränderungen der Strom-Spannungskennlinien in hypotonischer Lösung waren vollständig reversibel.

Die Änderungen des Membranstroms wurden durch Subtraktion der in NSL gemessenen I_{VC} von denen in hypotonischer Lösung ermittelt (Abb. 20 A). Das Umkehrpotential von ΔI_{VC} wurde zu -56 ± 10 mV bestimmt ($n = 37$; Abb. 20 B), liegt also in der Nähe des Cl^- -Gleichgewichtspotentials (E_{Cl} , siehe Munsch und Schlue 1993). Zwar wird durch die Absenkung der extrazellulären Cl^- -Konzentration in hypotonischer Lösung das E_{Cl} zunächst in positive Richtung verschoben, jedoch sinkt daraufhin die intrazelluläre Cl^- -Konzentration rasch um ~ 3 mM, so dass sich wieder das ursprüngliche E_{Cl} einstellt (siehe Dierkes *et al.* 2002). Die Spannungsabhängigkeit des ΔI_{VC} flacht bei negativen E_m etwas ab. Diese Auswärtsgleichrichtung wurde bereits für viele Cl^- -Kanäle beschrieben (Gschwentner *et al.* 1999, Okada 1997, Sardini *et al.* 2003).

Um sicherzustellen, dass die in Abb. 16 gezeigte R_{in} -Abnahme bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität nicht auf die Deaktivierung von I_h -Kanälen zurückzuführen ist, wurde der Beitrag von I_h zu ΔI_{VC} gesondert überprüft. Bei P-Zellen wird I_h mit Zeitkonstanten zwischen ~ 80 ms (-60 mV) und ~ 400 ms (-80 mV) aktiviert. Zu Beginn des Spannungssprungs ist I_h folglich noch nicht aktiviert, gegen dessen Ende sollte jedoch eine dem jeweiligen E_m entsprechende maximale Aktivierung erfolgt sein. Eine durch I_h bedingte Zunahme von I_{VC} war in NSL bei 31 von 47 Retzius-Neuronen erkennbar (Abb. 21 A). Der Beitrag von I_h zum Membranstrom von Retzius-Neuronen war aber insgesamt so gering, dass er vernachlässigt werden kann.

3.7 Einfluss von Ionenstärke und extrazellulärer NaCl-Konzentration auf E_m

Eine Absenkung der extrazellulären Osmolalität kann nur durch Verminderung der extrazellulären Konzentration eines oder mehrerer Salze erfolgen (hier NaCl). Um sicherzustellen, dass die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität induzierten R_{in} -Änderungen und Membranströme nicht auf einer Reduktion der Ionenstärke beruhen, wurden Experimente mit Badlösungen durchgeführt, in denen 40 mM NaCl isotonisch durch 80 mM Saccharose ersetzt war (siehe 2.5). Bei dem in Abb. 22 wiedergegebenen Experiment wurde zunächst der Effekt von

hypotonischer Lösung auf die durch Strominjektion hervorgerufenen E_m -Verschiebungen reproduziert (Abb. 16). Nach dem Austausch von 40 mM NaCl durch 80 mM Saccharose blieben die strominduzierten E_m -Verschiebungen dagegen unverändert. Auch die Membranhyperpolarisation nach Injektion positiver Ströme blieb erhalten. Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale waren jedoch ähnlich verringert wie unter hypotonischen Bedingungen, da diese Parameter wahrscheinlich von der extrazellulären Na^+ -Konzentration bzw. dem elektrochemischen Na^+ -Gradienten bestimmt werden (siehe 3.5).

Die Daten in Abb. 23 zeigen, dass der Austausch von 40 mM NaCl gegen 80 mM Saccharose die Strom-Spannungs- und Strom-Eingangswiderstandsbeziehungen kaum beeinflusst. Tendenziell waren die strominduzierten E_m -Verschiebungen und entsprechend R_{in} sogar vergrößert und nicht wie in hypotonischer Lösung deutlich vermindert (vgl. Abb. 16 und 22).

Der Ersatz des extrazellulären NaCl durch Saccharose löste eine ähnliche Membranhyperpolarisation aus wie die Verminderung der extrazellulären Osmolalität (-40 mM NaCl / +80 mM Saccharose: $-4,6 \pm 3,0$ mV, $n = 9$; -40 mM NaCl: $-5,1 \pm 5,3$ mV, $n = 56$). Um sicherzustellen, dass diese Membranhyperpolarisation auf der Schwächung des Na^+ -Gradienten beruht, wurden Experimente durchgeführt, bei denen in der Badlösung Na^+ bzw. Cl^- durch NMDG⁺ bzw. Gluconat ersetzt wurden (Tabelle 5). Die Daten zeigen, dass der Ersatz von NaCl durch Saccharose oder NMDG-Gluconat zu einer ähnlichen Membranhyperpolarisation führte wie die hypotonische Lösung. Dagegen war die Membranhyperpolarisation nach einem partiellen Austausch von Cl^- gegen Gluconat vergleichsweise gering und blieb nach dem völligen Austausch ganz aus. Diese Befunde sprechen sehr dafür, dass die Membranhyperpolarisation nach Verminderung der extrazellulären NaCl-Konzentration durch die Schwächung des elektrochemischen Na^+ -Gradienten bedingt ist.

Die Beobachtung, dass beim isotonischen Austausch von 40 mM Na^+ , Cl^- oder NaCl R_{in} unverändert blieb, lässt den Schluss zu, dass die R_{in} -Abnahme in

hypotonischer Lösung tatsächlich auf der verringerten Osmolalität und damit der Zellschwellung beruht. In Na^+ -freier Lösung war zwar eine R_{in} -Abnahme zu beobachten, die jedoch deutlich kleiner als die in hypotonischer Lösung ausfiel.

Tabelle 5: Einfluss des extrazellulären Na^+ bzw. Cl^- auf E_m und R_{in}

Lösung	ΔE_m (mV) zu NSL	ΔR_{in} (%) zu NSL
-40 mM NaCl	$-5,1 \pm 5,3$ (n = 56)	$-24,0 \pm 14,4$ (56)
-40 mM NaCl +80 mM Saccharose	$-4,6 \pm 3,0$ (9)	$+0,5 \pm 5,4$ (9)
-40 mM NaCl +40 mM NMDG-Gluc	$-4,8 \pm 5,1$ (9)	$-2,0 \pm 2,8$ (9)
-40 mM Na^+ +40 mM NMDG ⁺	$-4,3 \pm 3,9$ (8)	$+1,6 \pm 2,8$ (9)
-40 mM Cl^- +40 mM Gluc	$-3,6 \pm 5,7$ (7)	$-3,0 \pm 7,9$ (7)
-89 mM Na^+ +89 mM NMDG ⁺	$-9,6 \pm 3,2$ (8)	$-13,9 \pm 5,8$ (8)
-89 mM Cl^- +89 mM Gluc	$+0,6 \pm 7,6$ (7)	$+3,2 \pm 11,0$ (7)

Mittelwerte \pm S.D. aus n = 7 bis 56 Experimenten. R_{in} wurde anhand der durch einen -5nA-Strompuls induzierten E_m -Verschiebung bestimmt. ΔE_m und ΔR_{in} wurden 5 min nach Applikation der angegebenen Lösung bestimmt.

Die Registrierbeispiele in Abb. 24 zeigen, dass der Austausch von 40 mM NaCl gegen 80 mM Saccharose eher eine Verkleinerung des I_{VC} hervorrief und nicht eine Vergrößerung wie in hypotonischer Lösung (Abb. 25 A). Folglich war ΔI_{VC} nach dem Austausch von NaCl gegen Saccharose ein geringer Auswärtsstrom, der möglicherweise auf den verminderten Na^+ -Gradienten zurückzuführen ist (Abb. 25 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die R_{in} -Abnahme als auch ΔI_{VC} tatsächlich auf der verminderten Osmolalität und nicht auf der reduzierten NaCl-Konzentration oder allgemein auf der verminderten Ionenstärke beruhen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei ΔI_{VC} tatsächlich um einen schwellungsaktivierten Strom handelt.

3.8 Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC}

Um die Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC} verfolgen zu können, wurde E_m für jeweils 1 s auf -100, -80, -60 und -40 mV und zwischenzeitlich für 2 s auf -50 mV geklemmt (Abb. 26 A). Dieses Protokoll wurde während der 5-minütigen Applikation hypotonischer Lösung alle 17 s wiederholt. Die Registrierungen in Abb. 26 B zeigen den zur Klemmung auf die genannten Potentiale erforderlichen I_{VC} , und zwar in NSL vor Verminderung der extrazellulären Osmolalität und nach 5 min in hypotonischer Lösung, wobei der Übersicht halber I_{VC} zur Klemmung auf -50 mV immer gleich null gesetzt wurde.

Aus Abb. 26 C und D wird ersichtlich, dass die Aktivierung von ΔI_{VC} nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität langsam erfolgte und nach 5 min noch nicht abgeschlossen war. Umgekehrt blieb ΔI_{VC} nach Rückkehr zu NSL noch eine Weile aktiviert. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Aktivierung dieses Stromes Folge der Volumenzunahme ist.

3.9 Einfluss des Cytoskeletts auf die Aktivierung von ΔI_{VC}

Das Cytoskelett ist eine filamentöse Struktur innerhalb der Zelle, die von F-Aktin, Mikrotubuli und intermediären Filamenten gebildet wird. Eine wesentliche Funktion des Cytoskeletts ist es, extrazelluläre Reize mechanisch an das Zellinnere weiterzuleiten (Janmey 1998). Auch schwellungsaktivierte Ionenkanäle werden häufig über das Cytoskelett aktiviert. Schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle, u. a. die als VSOR bezeichneten Cl^- -Kanäle („volume sensing outwardly rectifying“, Okada 1997), werden sowohl mit F-Aktin als auch mit Mikrotubuli in Verbindung gebracht (siehe Fürst *et al.* 2002).

Colchizin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), depolymerisiert die Mikrotubuli und verhindert dadurch bei vielen Präparaten die Öffnung von schwellungsaktivierten Cl^- -Kanälen und folglich auch eine RVD (Downey *et al.* 1995, Shen *et al.* 1999; siehe Fürst *et al.* 2002). In Abb. 27 A sind

Registrierbeispiele gezeigt, anhand derer die Wirkung von Colchizin auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität verursachte R_{in} -Abnahme ersichtlich wird. Nach 60-minütiger Inkubation mit 25 μ M Colchizin war R_{in} praktisch unverändert ($+0,4 \pm 1,1 \text{ M}\Omega$, $n = 5$), die R_{in} -Abnahme in hypotonischer Lösung war jedoch deutlich verringert.

In Abb. 28 ist die Wirkung von Colchizin auf ΔI_{VC} wiedergegeben. Die Registrierbeispiele in Abb. 28 A zeigen, dass I_{VC} unter hypotonischen Bedingungen über den gesamten Potentialbereich in Gegenwart von Colchizin deutlich kleiner war als unter Kontrollbedingungen. Unter isotonischen Bedingungen übte Colchizin keine Wirkung auf I_{VC} aus (nicht gezeigt). In Abb. 28 B ist die Spannungsabhängigkeit von ΔI_{VC} unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Colchizin wiedergegeben. Colchizin bewirkte neben einer Verringerung von ΔI_{VC} auch eine Verschiebung des Umkehrpotentials in negative Richtung. Dieser Effekt ist vermutlich auf die vergrößerte Zellschwellung in Gegenwart von Colchizin zurückzuführen (Wüsten 2004), wodurch $[Cl^-]_i$ stärker sinkt und E_{Cl} weiter in negative Richtung verschoben wird.

Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Aktivierung von ΔI_{VC} . Möglicherweise kommt es bei einer Zellschwellung über die Mikrotubuli zu einer mechanischen Aktivierung der Kanäle, über die ΔI_{VC} fließt.

3.10 Identität des schwellungsaktivierten Stroms (ΔI_{VC})

3.10.1 Einfluss von K^+ -Kanalblockern auf die Änderungen von E_m und R_{in} unter hypotonischen Bedingungen

Im Zusammenhang mit der elektroneutralen KCl-Abgabe bei einer RVD wurde auch eine Beteiligung schwellungsaktivierter K^+ -Kanäle (K_{Vol}) beschrieben (Barrière *et al.* 2003). Der für K_{Vol} -Kanäle selektive Blocker Clofiliumtosylat (CT, 1 μ M, siehe 2.5 und Abb. 8) hatte jedoch bei Retzius-Neuronen keinen Einfluss auf die R_{in} -Abnahme unter hypotonischen Bedingungen, unabhängig davon, ob R_{in} durch positive oder negative Strominjektionen bestimmt wurde (Tabelle 6). Die durch hypotonische Bedingungen hervorgerufene Membranhyperpolarisation war in Gegenwart von CT deutlich verstärkt.

In Gegenwart von TEA^+ , einem Blocker für I_K -Kanäle (siehe 2.5 und Abb. 8), lösten depolarisierende Strompulse nach einiger Zeit große Spannungsspitzen aus (nicht gezeigt), die vermutlich auf eine durch die Blockierung der I_K -Kanäle bedingte, stark verlangsamte Repolarisation eines einzelnen Aktionspotentials zurückzuführen sind. TEA^+ hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität hervorgerufene R_{in} -Abnahme und Membranhyperpolarisation (Tabelle 6).

Überraschenderweise führte die Applikation von 3 mM 4-AP, einem Blocker für I_A -Kanäle, zu einer Abnahme des R_{in} (nicht gezeigt), so dass es unmöglich war, die Wirkung dieser Substanz auf ΔI_{VC} zu untersuchen. Eine 4-AP-induzierte R_{in} -Abnahme, deren Ursache möglicherweise die Aktivierung eines Na^+ - oder Ca^{2+} -Einstroms war, wurde bereits bei Gliazellen beschrieben (Müller 1996).

Die Befunde sprechen gegen eine Aktivierung von K^+ -Kanälen bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität. Ein elektroneutraler KCl-Ausstrom kann jedoch durch K^+ -Kanäle erfolgen, die bereits unter Ruhebedingungen aktiv sind.

Tabelle 6: Einfluss der K⁺-Kanalblocker TEA⁺ und Clofiliumtosylat auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität (-40 mM NaCl) hervorgerufenen Änderungen von E_m und R_{in}

Lösung	ΔE_m (mV)	ΔR_{in} (%)
Kontrolle	$-5,1 \pm 5,3$ (n = 56)	$-24,0 \pm 14,4$ (56)
+20 mM TEA ⁺	$-4,0 \pm 4,8$ (6)	$-34,9 \pm 27,7$ (6)
+1 μ M CT	$-11,2 \pm 6,0$ (4) (p = 0,03)	$-24,9 \pm 4,9$ (4)

Mittelwerte \pm S.D. aus n = 4 bis 56 Messungen. Die Kontrollwerte wurden aus Tabelle 5 übernommen.

3.10.2 Änderungen von E_m und R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität unter Cl⁻-freien Bedingungen

Das Umkehrpotential von ΔI_{VC} lag in der Nähe des E_{Cl} (siehe 3.6.2). Um zu überprüfen, ob ΔI_{VC} tatsächlich von Cl⁻-Ionen getragen wird, wurde eine Badlösung appliziert, in der Cl⁻ vollständig durch Gluconat ersetzt war. Der Entzug des extrazellulären Cl⁻ führte zunächst zu einer R_{in}-Abnahme um ~30% (Abb. 29). Danach nahm R_{in} kontinuierlich zu und war nach einigen Minuten größer als zuvor in NSL (+10 %), wahrscheinlich bedingt durch die Unterdrückung eines tonisch aktiven Cl⁻-Stroms. Außerdem führte der Cl⁻-Entzug zu einer anhaltenden Membrandepolarisation um 5 bis 10 mV, zur verstärkten Bildung von Aktionspotentialen sowie zu sprunghaften, stärkeren Depolarisationen, deren Häufigkeit mit der Zeit zunahm und die vermutlich auf die zeitweilige Aktivierung des anhaltenden Na⁺-Stroms (I_{Na,p}) zurückzuführen sind (Beck *et al.* 2001). Die Verminderung der extrazellulären Osmolalität übte entweder keinen Effekt auf R_{in} aus oder bewirkte nur eine geringe Abnahme (Tabelle 7, Abb. 30). Auf E_m hatte die Verminderung der extrazellulären Osmolalität unter Cl⁻-freien Bedingungen praktisch keine Wirkung.

3.10.3 Einfluss von Cl⁻-Kanalblockern auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität induzierten Änderungen von E_m und R_{in}

Bei Muskelzellen von Säugetieren unterdrückt Nifluminsäure, ein Blocker von Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanälen, bereits in geringer Konzentration (<100 µM) einen bei einer RVD aktivierten Strom (siehe Fürst *et al.* 2002, Okada 1997). Bei Retzius-Neuronen hatte Nifluminsäure (50 µM, siehe 2.5 und Abb. 8) keine Wirkung auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität hervorgerufene Membranhyperpolarisation oder die R_{in} -Abnahme (Tabelle 7).

Das Benzooesäurederivat NPPB (50 µM, siehe 2.5 und Abb. 8), ein selektiver Blocker von volumenabhängigen Cl⁻-Kanälen (siehe Fürst *et al.* 2002, Wehner *et al.* 2003), zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität induzierte R_{in} -Abnahme, führte jedoch zu einer Verminderung der Membranhyperpolarisation (Tabelle 7). Das Stilbenderivat DIDS (0,5 mM, siehe 2.5), ein unselektiver Cl⁻-Kanalblocker, führte selbst zu einer leichten Membrandepolarisation und zur vermehrten Bildung von Aktionspotentialen (Abb. 31), wahrscheinlich bedingt durch die Schwächung eines tonisch aktiven Cl⁻-Stroms (vgl. Abb. 29). Die durch Cl⁻-Entzug hervorgerufenen transienten Membrandepolarisationen traten in Gegenwart von DIDS jedoch nicht auf, ein Indiz dafür, dass diese Membrandepolarisationen auf einem Mangel an cytosolischem Cl⁻ beruhen, der in Gegenwart von DIDS nicht auftreten sollte. DIDS bewirkte darüber hinaus eine R_{in} -Zunahme um ~20 %, ein Effekt der bei der Blockierung von Cl⁻-Kanälen zu erwarten ist. Die Verminderung der extrazellulären Osmolalität in Gegenwart von DIDS bewirkte eine R_{in} -Abnahme, die jedoch sehr viel kleiner war als unter Kontrollbedingungen (Abb. 32, Tabelle 7). Die unter hypotonischen Bedingungen normalerweise beobachtete Membranhyperpolarisation blieb in Gegenwart von DIDS völlig aus (Tabelle 7).

Quinidin, ein Wirkstoff aus Chinin (*Cinchona spec.*), hemmt bei einigen Präparaten neben K⁺-Kanälen auch schwellungsaktivierte Cl⁻-Kanäle (siehe Okada 1997). Bei Retzius-Neuronen führte Quinidin (1 mM) zu einer häufig

irreversiblen starken R_{in} -Abnahme bzw. I_{VC} -Zunahme (nicht gezeigt), so dass die Wirkung dieser Substanz auf die durch verminderte extrazelluläre Osmolalität hervorgerufenen Veränderungen von E_m und R_{in} nicht untersucht werden konnte.

Tabelle 7: Einfluss von Cl^- -Kanalblockern auf die Änderungen von E_m und R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität

Lösung	ΔE_m (mV) in -40 mM NaCl	ΔR_{in} (%) in -40 mM NaCl
-40 mM NaCl	$-5,1 \pm 5,3$ (n = 56)	$-24,0 \pm 14,4$ (56)
Cl^- -frei -40 mM Na-Gluc.	$+0,8 \pm 7,6$ (5)	$-3,9 \pm 10,8$ (5) (p = 0,004)
-40 mM NaCl +50 μ M NFA	$-5,4 \pm 3,2$ (3)	$-30,1 \pm 23,1$ (4)
-40 mM NaCl +50 μ M NPPB	$-1,2 \pm 5,8$ (4)	$-28,4 \pm 12,8$ (4)
-40 mM NaCl +0,5 mM DIDS	$0,0 \pm 5,7$ (12) (p = 0,005)	$-5,8 \pm 10,4$ (12) (p = 0,0001)

Mittelwerte \pm S.D. aus n = 3 bis 56 Messungen. Die in Gegenwart der verschiedenen Cl^- -Kanalblocker bestimmten Werte für ΔE_m und ΔR_{in} wurden auf signifikante Unterschiede zu den Kontrollbedingungen (-40 mM NaCl) geprüft. R_{in} wurde über einen -5nA-Strompuls bestimmt.

3.10.4 Einfluss Cl^- -freier Bedingungen und des Cl^- -Kanalblockers DIDS auf die Strom-Eingangswiderstandsbeziehung und ΔI_{VC}

Der Einfluss Cl^- -freier Bedingungen und des Cl^- -Kanalblockers DIDS wurde in *current-clamp*- und *voltage-clamp*-Messungen mit der in Abschnitt 3.5 und 3.6 beschriebenen Vorgehensweise näher untersucht. In Abb. 33 wurden die unter Kontrollbedingungen durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität hervorgerufenen R_{in} -Abnahmen (Abb. 17) mit den Abnahmen verglichen, die in Abwesenheit des extrazellulären Cl^- (A) bzw. in Gegenwart des Cl^- -Kanalblockers DIDS (B) induziert wurden.

Die Daten zeigen erneut, dass R_{in} nach Entzug des extrazellulären Cl^- bzw. in Anwesenheit von DIDS zunimmt und die R_{in} -Abnahme nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität stark reduziert ist (Tabelle 7). Es fällt auf, dass unter Cl^- -freien Bedingungen die R_{in} -Abnahme bei Injektionsströmen negativer als -5 nA und bei positiven Injektionsströmen besonders gering war, während die Abnahme bei Injektionsströmen von -1 bis -4 nA noch verhältnismäßig deutlich war. Entsprechendes gilt für die R_{in} -Änderung in Gegenwart von DIDS. Auch unter Kontrollbedingungen war die R_{in} -Abnahme bei kleinen negativen Injektionsströmen stärker als bei großen Injektionsströmen.

In Abb. 34 ist die Wirkung von Cl^- -freien Bedingungen und von DIDS auf ΔI_{VC} gezeigt. Der bereits in Abb. 20 gezeigte ΔI_{VC} war in Gegenwart von DIDS und unter Cl^- -freien Bedingungen deutlich vermindert (Abb. 34 A, B). Der verbleibende Strom ist vermutlich auf unzureichende Blockierung der Cl^- -Kanäle durch DIDS bzw. auf eine Leitfähigkeit der Cl^- -Kanäle für andere Anionen zurückzuführen. Die Tatsache, dass das Umkehrpotential der verbleibenden Ströme unverändert in der Nähe von E_{Cl} liegt (Abb. 34 C), spricht für die Vermutung, dass bei Verminderung der extrazellulären Osmolalität ausschließlich Cl^- -Kanäle aktiviert werden. Der hier als ΔI_{VC} bezeichnete Strom weist ähnliche Eigenschaften auf wie ein als $I_{Cl,swell}$ bzw. VSOR- Cl^- -Kanal bei zahlreichen Präparaten beschriebener Strom (siehe Fürst *et al.* 2002, Okada 1997). Gegen eine Verwandtschaft mit VSOR- Cl^- -Kanälen spricht allerdings, dass sich ΔI_{VC} bei Retzius-Neuronen nicht durch NPPB hemmen ließ. Da die Aktivierung des Cl^- -Stroms nur mit geringen Änderungen von E_m einhergeht (Abb. 12), ist zu erwarten, dass es zu einer gemeinsamen Bewegung von K^+ - und Cl^- -Ionen kommt, wobei der K^+ -Transport über tonisch aktive K^+ -Kanäle erfolgt.

3.11 Wirkung verminderter extrazellulärer Osmolalität auf R_{in} und E_m :

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die E_m - und R_{in} -Änderungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen sind in Abb. 35 zusammengefasst. Isotonische Badlösungen, bei denen durch Ersatz von 40 mM NaCl durch 80 mM Saccharose die Ionenstärke reduziert war, lösten eine ähnliche Membranhyperpolarisation aus wie die Kontrolle (Abb. 35 A). Die Tatsache, dass in Gegenwart von DIDS eine Membranhyperpolarisation ausblieb, führt zu der Vorstellung, dass unter Kontrollbedingungen unmittelbar nach NaCl-Wegnahme aus der Badlösung zunächst eine Membranhyperpolarisation aufgrund des verminderten Na^+ -Gradienten erfolgt, die dann jedoch im Verlauf der Applikation durch die schwellungsbedingte Abnahme der intrazellulären Na^+ -Konzentration und der damit verbundenen Wiederherstellung des ursprünglichen Na^+ -Gradienten abklingen sollte. Der schwellungsaktivierte Cl^- -Strom hält dann E_m weiterhin auf einem gegenüber Ruhebedingungen hyperpolarisierten Wert. Bei einer Blockierung der Cl^- -Kanäle durch DIDS fehlt diese hyperpolarisierende Wirkung und E_m kehrt zum Ausgangswert zurück, da auch E_{Na} wieder annähernd den Ausgangswert erreicht. Bei isotonischem Austausch von NaCl gegen Saccharose kommt es zu einer anhaltenden Membranhyperpolarisation, da E_{Na} wegen der fehlenden Zellschwellung anhaltend verringert bleibt.

In Gegenwart von Clofiliumtosylat war die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität hervorgerufene Membranhyperpolarisation signifikant vergrößert. Dagegen war die Membranhyperpolarisation in Gegenwart von TEA^+ , NPPB bzw. Nifluminsäure von der unter Kontrollbedingungen nicht signifikant verschieden.

Der Austausch von NaCl gegen Saccharose führt zu keiner signifikanten R_{in} -Änderung (Abb. 35 B). In Cl^- -freier Lösung und in Gegenwart von DIDS war die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität induzierte R_{in} -Abnahme deutlich kleiner. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die R_{in} -Abnahme und folglich auch ΔI_{VC} durch schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle hervorgerufen werden.

Unter Na⁺-freien Bedingungen war die R_{in}-Abnahme signifikant größer als unter Kontrollbedingungen. Die K⁺-Kanalblocker TEA⁺ und Clofiliumtosylat sowie die Cl⁻-Kanalblocker NPPB und Nifluminsäure beeinflussten die R_{in}-Abnahme nicht.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss anisotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften

4.1.1 Einfluss hypertotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften

In den Experimenten wurde die Erhöhung der extrazellulären Osmolalität durch NaCl-Zugabe zur Badlösung erreicht, so dass sich die Gleichgewichtspotentiale für Na^+ und Cl^- in positive bzw. negative Richtung verschoben. Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration um 40 mM verschob sich E_{Na} um ~ 9 mV in positive und E_{Cl} um ~ 9 mV in negative Richtung (Tabelle 8). Die beobachtete Membrandepolarisation (Abb. 10) zeigt, dass die Verschiebung des Na^+ -Gradienten E_m stärker beeinflusst als die Verschiebung des Cl^- -Gradienten, da E_m der Verschiebung von E_{Na} folgt. Die Verschiebung von E_{Na} und E_{Cl} führt zu einem verstärkten Einstrom von Na^+ und Cl^- und wirkt somit einer Zellvolumenabnahme entgegen, so dass eine Abweichung vom Verhalten eines idealen Osmometers auftritt (siehe Dierkes *et al.* 2003). Dennoch ist eine Zellvolumenabnahme von ~ 23 % zu beobachten, die eine Erhöhung der intrazellulären Ionenkonzentrationen und dadurch eine erneute Verschiebung der Gleichgewichtspotentiale bewirkt (Tabelle 8). Dabei verschiebt sich E_{Na} in negative Richtung und erreicht schließlich einen gegenüber Ruhebedingungen um ~ 2 mV positiveren Wert. Die partielle Repolarisation nach einer anfänglichen Membrandepolarisation (Abb. 10) ist auf diese erneute volumenbedingte Verschiebung von E_{Na} zurückzuführen. Allerdings blieb E_m in hypertotonischer Lösung um ~ 3 mV depolarisiert. Die R_{in} -Abnahme, die durch die Applikation hypertotonischer Lösung hervorgerufen wurde, konnte auf die Deaktivierung von GABA-Rezeptoren zurückgeführt werden (Abb. 11). Die Deaktivierung dieser Rezeptoren sollte eine Membrandepolarisation hervorrufen und an der anhaltenden Membrandepolarisation in hypertotonischer Lösung beteiligt sein. Darüber hinaus sollte dies die Cl^- -Leitfähigkeit der Plasmamembran verringern und somit die NaCl-Aufnahme, die der Zellvolumenabnahme entgegenwirkt, erschweren. Die physiologische Bedeutung

einer GABA-Rezeptor-Deaktivierung unter hypertonen Bedingungen bleibt unklar.

Tabelle 8: Gleichgewichtspotentiale für Na⁺ und Cl⁻ in NSL und nach Erhöhung der extrazellulären NaCl-Konzentration

	[Na ⁺] _a (mM)	[Na ⁺] _i (mM)	E _{Na} (mV)	[Cl ⁻] _a (mM)	[Cl ⁻] _i (mM)	E _{Cl} (mV)	[K ⁺] _i (mM)	E _K (mV)
NSL	89	9,1 ⁽¹⁾	+58	95	8,0 ⁽¹⁾	-63	78 ⁽²⁾	-75
+40 mM NaCl (Beginn)	129	9,1	+67 ⁽³⁾	135	8,0	-72 ⁽³⁾	78	-75
+40 mM NaCl (5 min)	129	~12	~+60 ⁽⁴⁾	135	~10	~-66 ⁽⁴⁾	~101	~-82 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾aus Dierkes *et al.* 2002: [Na]_i = 9,1 ± 3,0 (n = 14), [Cl]_i = 8,0 ± 3,6 (n = 6); ⁽²⁾aus Dierkes *et al.* 2003: [K⁺]_i = 78 ± 26 (n = 15); ⁽³⁾bestimmt unter der Annahme, dass die intrazelluläre NaCl-Konzentration unmittelbar nach dem Wechsel der Badlösung unverändert war; ⁽⁴⁾geschätzt unter der Annahme, dass die intrazellulären Ionenkonzentrationen nur durch das Volumen verändert wurden: Volumenabnahme: -23 ± 8 % (n = 9; siehe 3.3).

Die Tatsache, dass die Erhöhung der extrazellulären Osmolalität eine R_{in}-Zunahme hervorrief (Abb. 13), spricht gegen eine Aktivierung von Ionenkanälen zur NaCl-Aufnahme. Dies unterstützt Befunde einer früheren Arbeit (Wüsten 2004), welche die NaCl-Aufnahme auf die gemeinsame Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers und des Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers zurückführen. Sollte die R_{in}-Zunahme tatsächlich auf einer Deaktivierung von GABA-Rezeptoren beruhen (Abb. 11), könnte die Cl⁻-Leitfähigkeit unter Ruhebedingungen auf die Aktivität von GABA-Rezeptoren zurückgehen (siehe Abb. 29 und 31). Die vermehrte Aktionspotential-Auslösung bei der Erhöhung der extrazellulären Osmolalität beruht vermutlich sowohl auf der Membrandepolarisation als auch auf der Deaktivierung von GABA-Rezeptoren.

Die vorübergehende Membranhyperpolarisation nach Rückkehr zu NSL ist auf die erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration zurückzuführen, die durch die Zellvolumenabnahme hervorgerufen wurde (Abb. 10, vgl. Dierkes *et al.* 2003).

Die in früheren Experimenten an Blutegel-Segmentalganglien von Nicholls und Kuffler (1964) verwendete Normalsalzlösung wies eine Osmolalität von ~ 230 mosm/kg auf und entsprach in etwa der in dieser Arbeit verwendeten isotonischen NSL nach Zugabe von 20 mM NaCl. Es stellt sich daher die Frage, ob die Messergebnisse, die bei Verwendung der Nicholls-Kuffler-Lösung erhalten wurden, durch osmotischen Stress beeinflusst wurden (Munsch 1991). Nach Zugabe von 20 mM NaCl traten außer einer geringfügigen Membrandepolarisation ($1,9 \pm 1,4$ mV, $n = 7$) keine Änderungen elektrophysiologischer Eigenschaften auf (Abb. 10), während von Munsch (1991) eine Membrandepolarisation um ~ 11 mV gemessen wurde. Das in dieser Arbeit bestimmte E_m von $-49,4 \pm 7,5$ mV ($n = 336$) in NSL wich ebenfalls von dem von Munsch (1991) gemessenen Wert ab ($-60,3 \pm 3$ mV, $n = 18$), stimmte aber mit Messwerten anderer Arbeiten gut überein (Dierkes 1998, Lucht 1997). Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen eine Beeinflussung der Messergebnisse durch eine Verwendung der Nicholls-Kuffler-Lösung.

4.1.2 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf passive Membraneigenschaften

Die Verminderung der extrazellulären Osmolalität wurde durch Absenken der NaCl-Konzentration der Badlösung erreicht. Entsprechend verschoben sich die Gleichgewichtspotentiale für Na^+ und Cl^- in negative bzw. positive Richtung. Bei Verminderung der NaCl-Konzentration um 40 mM verschob sich E_{Na} um ~ 15 mV in negative und E_{Cl} um ~ 14 mV in positive Richtung (Tabelle 9). Die beobachtete Membranhyperpolarisation zeigt, dass die Verschiebung des Na^+ -Gradienten wiederum potentialbestimmend ist. Die Verschiebung von E_{Na} und E_{Cl} führt hier zu einem verminderten Na^+ -Einstrom und einem Cl^- -Ausstrom und wirkt einer Zellschwellung entgegen, so dass auch hier eine Abweichung vom Verhalten

eines idealen Osmometers auftritt (siehe Wüsten 2004). Durch die Zunahme des Zellvolumens (~57 %) werden die intrazellulären Ionenkonzentrationen abgesenkt, so dass sich erneut die Gleichgewichtspotentiale verschieben (Tabelle 9). E_{Na} verschiebt sich dabei in positive Richtung und erreicht schließlich einen gegenüber Ruhebedingungen um ~4 mV negativeren Wert. Auch hier ist eine partielle E_m -Repolarisation nach einer anfänglich stärkeren Membranhyperpolarisation zu beobachten (Abb. 12). Eine Membranhyperpolarisation von ~5 mV bleibt über die Applikationsdauer erhalten.

Tabelle 9: Gleichgewichtspotentiale für Na^+ und Cl^- in NSL und nach Absenkung der extrazellulären NaCl-Konzentration

	$[Na^+]_a$ (mM)	$[Na^+]_i$ (mM)	E_{Na} (mV)	$[Cl^-]_a$ (mM)	$[Cl^-]_i$ (mM)	E_{Cl} (mV)	$[K^+]_i$ (mM)	E_K (mV)
NSL	89	9,1 ⁽¹⁾	+58	95	8,0 ⁽¹⁾	-63	78 ⁽²⁾	-75
-40 mM NaCl (Beginn)	49	9,1	+43 ⁽³⁾	55	8,0	-49 ⁽³⁾	78	-75
-40 mM NaCl (5 min)	49	~5,8 ⁽⁴⁾	~+54	55	~5,1 ⁽⁴⁾	~-60	~50	~-64 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾aus Dierkes *et al.* 2002: $[Na]_i = 9,1 \pm 3,0$ (n = 14), $[Cl^-]_i = 8,0 \pm 3,6$ (n = 6); ⁽²⁾aus Dierkes *et al.* 2003: $[K^+]_i = 78 \pm 26$ (n = 15); ⁽³⁾bestimmt unter der Annahme, dass die intrazelluläre NaCl-Konzentration unmittelbar nach dem Wechsel der Badlösung unverändert war; ⁽⁴⁾geschätzt unter der Annahme, dass die intrazellulären Ionenkonzentrationen nur durch das Volumen verändert wurden: Volumenzunahme: $+57 \pm 37$ % (n = 6; siehe 3.3).

Die in hypotonischer Lösung auftretende R_{in} -Abnahme spiegelt wahrscheinlich die Aktivierung von Ionenkanälen wider. Um sicherzustellen, dass diese R_{in} -Abnahme auf der verminderten Osmolalität und der damit verbundenen Zellschwellung beruht, wurden isotonische Lösungen appliziert, in denen die Wegnahme von Na^+ und/oder Cl^- durch Zugabe von NMDG⁺ und/oder Gluconat bzw. Saccharose osmotisch kompensiert war, so dass das Zellvolumen unverändert blieb (siehe Wüsten 2004). In diesen Versuchslösungen war auch R_{in} kaum

beeinflusst (Abb. 35 B). Eine R_{in} -Abnahme war folglich von der Verminderung der Osmolalität abhängig, jedoch unabhängig von der Ionenstärke sowie der extrazellulären Na^+ - und Cl^- -Konzentration. Die Tatsache, dass unter Cl^- -freien Versuchsbedingungen bzw. in Gegenwart von DIDS diese R_{in} -Abnahme stark vermindert war (Abb. 35 B) zeigt, dass sie durch die Aktivierung von Cl^- -Kanälen verursacht wird. Abb. 13 zeigt, dass R_{in} dann besonders stark absinkt, wenn eine Osmolalität von $\sim 60\%$ von NSL unterschritten wird. Dabei erreicht das Zellvolumen offenbar eine Schwelle, die eine verstärkte Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle verursacht. Die Amplitude der Membranhyperpolarisation wurde mit abnehmender extrazellulärer Osmolalität immer kleiner (Abb. 13), was ebenfalls auf die stärkere Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle als Folge zunehmender Zellschwellung zurückzuführen sein könnte. Diese volumenabhängige Aktivierung spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass die R_{in} -Abnahme im Mittel erst ~ 60 s nach Beginn der Membranhyperpolarisation einsetzte (vgl. Abb. 12 C), also zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits eine gewisse Zellschwellung erfolgt war (Abb. 14).

Die Membranhyperpolarisation von ~ 5 mV, die über die Applikationsdauer hypotonischer Lösung erhalten blieb, ist wahrscheinlich auf die Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle zurückzuführen, die letztlich bewirken, dass sich E_m zunehmend E_{Cl} annähert. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Membranhyperpolarisation in Gegenwart von DIDS unterdrückt war (Abb. 35 A). Die Befunde lassen die Schlussfolgerung zu, dass unmittelbar nach der Verminderung der Badosmolalität E_{Na} für die Membranhyperpolarisation verantwortlich ist, während am Applikationsende schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle potentialbestimmend sind, die auch die R_{in} -Abnahme bedingen.

Bei Klemmung von E_m auf -50 mV trat nach Verminderung der extrazellulären $NaCl$ -Konzentration zunächst ein schneller Auswärtsstrom auf, der wahrscheinlich die Verminderung des Na^+ -Einstroms widerspiegelt (Abb. 18). Aufgrund der Zellschwellung und der dadurch bedingten Wiederherstellung des ursprünglichen Na^+ -Gradienten sollte dieser Strom nach und nach abklingen. Dass

der Strom erhalten blieb, lässt sich auf die zunehmende Öffnung der schwellungsaktivierten Cl^- -Kanäle zurückführen, die eine Erhöhung des Klemmstroms durch zwei Faktoren bewirken. Zum einen wird durch die Öffnung der Kanäle für die Klemmung auf -50 mV zunehmend mehr Strom benötigt, zum anderen wird ein Teil des Klemmstroms aufgewendet, um den durch die Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle verursachten Strom zu kompensieren. Am Ende der 5-minütigen Applikation ist der schwellungsaktivierte Strom (ΔI_{VC}) wahrscheinlich ausschliesslich auf schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle zurückzuführen. Dies erklärt den Befund, dass das Umkehrpotential von ΔI_{VC} in der Nähe von E_{Cl} liegt (Abb. 20). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Aktivierung von ΔI_{VC} über mehrere Minuten hinzieht. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung über das Cytoskelett an die Zellschwellung gekoppelt ist (siehe 4.4). Da unmittelbar nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität zunächst der verminderte Na^+ -Einstrom kompensiert wird, war eine verzögerte Aktivierung von ΔI_{VC} nicht erkennbar. In *patch-clamp*-Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass eine schwellungsabhängige Kanalaktivierung erst erkennbar war, nachdem das Zellvolumen um mindestens 10 % zugenommen hatte (Buchholz 1999).

Da E_{Cl} unmittelbar nach Verminderung der NaCl -Konzentration zunächst positiver ist als E_{m} , sollte es zunächst zu einem Cl^- -Ausstrom durch tonisch aktive und später durch schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle kommen. Dieser Cl^- -Ausstrom kommt jedoch nach Wiederherstellung des Na^+ - und Cl^- -Gradienten zum Erliegen. Dies erklärt das Fehlen einer messbaren regulatorischen Volumenabnahme (Abb. 14 A). Der Cl^- -Ausstrom, der gemeinsam mit einem K^+ -Ausstrom erfolgen sollte, ist offenbar zu gering, um die Zellschwellung zu unterbinden.

Unter der Annahme eines idealen Osmometers sollte die intrazelluläre Cl^- -Konzentration bei einer Zellschwellung von 67 % auf $\sim 4,8 \text{ mM}$ absinken. Bei der tatsächlich auftretenden Zellschwellung von $\sim 57 \%$ sollte die intrazelluläre Cl^- -Konzentration auf $\sim 5,1 \text{ mM}$ absinken, was mit experimentell ermittelten Werten übereinstimmt ($5,2 \pm 2,6 \text{ mM}$, $n = 6$; Dierkes *et al.* 2002). Wäre die

Verringerung der Zellschwellung ausschliesslich auf einen KCl-Ausstrom zurückzuführen, müsste die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ~4,8 mM betragen. Da Cl⁻-Kanäle häufig auch für andere Anionen permeabel sind (siehe Fürst *et al.* 2002), könnte die Abweichung vom idealen Osmometer auch durch einen Ausstrom organischer Anionen erfolgt sein.

Bei Applikation anisotonischer Lösungen ändert sich durch den Ein- oder Ausstrom von Wasser auch die intrazelluläre Ionenstärke. Bei Ovarzellen des chinesischen Hamsters beispielsweise führt eine Verminderung der intrazellulären Ionenstärke zur Aktivierung eines schwellungsaktivierten Ionenstroms (Cannon *et al.* 1998). Die Öffnung schwellungsaktivierter Cl⁻-Kanäle dieser Arbeit könnte ebenfalls auf der Verminderung der intrazellulären Ionenstärke beruhen.

Die Zunahme von C_{in} (Abb. 15) spricht für den Einbau zusätzlicher Membranelemente während der Zellschwellung. Die Tatsache, dass die R_{in}-Abnahme nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität zeitlich verzögert stattfand und die Aktivierung von ΔI_{VC} nach 5 min noch nicht abgeschlossen war, spricht für den kontinuierlichen Einbau zusätzlicher Ionenkanäle, vermutlich über den Einbau zusätzlicher Membranelemente. Die experimentell bestimmte Membranzeitkonstante lieferte eine Membrankapazität von ~3 nF, was einer Membranoberfläche von 300.000 μm² entspricht. Dies entspricht in etwa der 10-fachen Oberfläche, die aus dem Durchmesser des Neurons bei Annahme einer Kugelform bestimmt wurde. Diese Abweichung zeigt, dass die Beschreibung von Oberfläche und Form eines Retzius-Neurons mit einer glatten Kugel unzutreffend ist. Viele Zellen besitzen auch im Ruhezustand Membraneinstülpungen und -falten (Coggeshall und Fawcett 1964), die eine Oberflächenvergrößerung und bei Ausstülpung eine Vergrößerung des Volumens bewirken.

Eine Verminderung der extrazellulären Osmolalität kommt unter physiologischen Bedingungen nicht vor, eine Zellschwellung kann jedoch auch durch einen isotonischen Anstieg der extrazellulären K⁺-Konzentration ausgelöst werden (Trosiner 2003), wie er beispielsweise nach starker neuronaler Aktivität auftritt. In

Verbindung mit der hierbei beobachteten Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Konzentration könnte die Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle und der resultierende KCl -Ausstrom das Zellvolumen wirksam regulieren.

4.2 Zusammenhang zwischen Zellvolumenänderung und Membranpotential

Oft sind Änderungen des Zellvolumens von drastischen E_m -Verschiebungen begleitet (Lang *et al.* 1998). Bereits beschriebene Auslöser von Volumenänderungen bei Retzius-Neuronen, wie beispielsweise Änderungen der Badosmolalität (Neumann 2000, Wüsten 2000), Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ (Dierkes *et al.* 1997, Neumann *et al.* 2001), Applikation des glutamatergen Agonisten Kainat (Dörner *et al.* 1990, Dierkes *et al.* 1996) und Hemmung der Na^+ - K^+ -Pumpe durch Ouabain (Dierkes *et al.* 1999) führen zu erheblichen E_m -Verschiebungen. Um den Zusammenhang zwischen Zellvolumenänderungen und Änderungen des E_m experimentell zu überprüfen, wurde E_m auf unterschiedliche Werte geklemmt und die Zellvolumenänderung bestimmt. Das Volumen der Retzius-Neuronen in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) nimmt ohne E_m -Klemmung um 40 bis 60 % zu (Neumann *et al.* 2001, Dierkes *et al.* 2002, Wüsten 2004). Dieser Volumenanstieg ist vergleichbar mit dem hier unter *voltage-clamp*-Bedingungen bei $E_m = -50$ mV bestimmten Wert von ~55% (Abb. 14). Bei einem idealen Osmometer wäre eine Volumenzunahme von ~67 % zu erwarten. Die Tatsache, dass die Volumenzunahme unabhängig von der Messmethode (ionensensitive Glasmikroelektroden oder Mikrofluorimetrie) im Mittel unter diesem Wert lag, deutet auf eine Volumenregulation der Zellen hin. Bei $E_m = -70$ mV entsprach die Volumenänderung der eines idealen Osmometers ($+66 \pm 58$ %, $n = 4$). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das eingestellte Potential in der Nähe von E_K und negativer als E_{Cl} lag, so dass ein Ausstrom von K^+ und Cl^- unterblieb.

4.3 Aktivierung von Ionenströmen durch Membrandepolarisation

Retzius-Neuronen besitzen eine Reihe spannungsabhängiger Ionenkanäle, die durch die Membrandepolarisation bei positiven Strompulsen aktiviert werden sollten und deren Effekte zur Interpretation der Zusammenhänge zwischen Injektionsstrom und Potentialverschiebung sowie zwischen Haltepotential und Haltestrom zu beachten sind. Außerdem ist die Aktivierung dieser Ionenkanäle für die R_{in} -Abnahme bei Injektion positiver Ströme verantwortlich (Abb. 17).

Die spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle (I_{Na}) sind für den Na^+ -Einstrom während der Depolarisationsphase des Aktionspotentials verantwortlich (Denac *et al.* 2000). Bei verminderter extrazellulärer NaCl-Konzentration reduziert sich der von diesen Ionenkanälen getragene Strom und somit die Aktionspotential-Amplitude. Möglicherweise ist die Aktivität von I_{Na} unter hypotonischen Bedingungen vermindert, da die Aktionspotential-Amplitude trotz des nahezu unveränderten E_{Na} nach 5 min in hypotonischer Lösung deutlich vermindert war (Abb. 16, Tabelle 4).

Der anhaltende Na^+ -Strom ($I_{Na,p}$) wird ab -40 mV aktiviert (Angstadt 1999, Kleinhaus und Angstadt 1995, Johansen und Kleinhaus 1987). In *current-clamp*-Experimenten wurde nach Abschalten großer positiver Injektionsströme gelegentlich eine langsame Membranrepolarisation registriert, die ab -30 bis -40 mV abrupt schneller wurde, vermutlich bedingt durch die Deaktivierung der $I_{Na,p}$ -Kanäle. Die Aktivierung des $I_{Na,p}$ -Stroms war wegen der verstärkten Aktionspotential-Auslösung nicht zu beobachten. Der verringerte R_{in} bei positiven Injektionsströmen (Abb. 17) ist wenigstens zum Teil auf die Aktivierung von $I_{Na,p}$ zurückzuführen.

Der transiente K^+ -Strom (I_A) aktiviert ab -35 mV rasch mit Zeitkonstanten von 6 bis 12 ms (-20 bzw. +10 mV) und inaktiviert spannungsunabhängig innerhalb von ~100 ms (Johansen und Kleinhaus 1986). Allgemein wird I_A eine Rolle bei der Steuerung der Erregbarkeit von Nervenzellen zugesprochen, da dieser

Membranstrom auch bei E_m unterhalb der Schwelle zur Aktionspotential-Auslösung in gewissem Maße aktiv ist (Kolb 1990). I_A -Kanäle waren wahrscheinlich für den anfänglich höheren Klemmstrom bei Verstellung von E_m auf Werte positiver -40 mV verantwortlich (Abb. 19) und trugen möglicherweise auch zur Membranhyperpolarisation nach Abschalten positiver Ströme bei. Der verzögerte K^+ -Strom („delayed rectifier“, I_K ; Johansen und Kleinhaus 1986, Stewart *et al.* 1989a) aktiviert erst ab -20 mV und trägt daher nicht zu der in Abb. 17 gezeigten R_{in} -Abnahme bei.

Der Ca^{2+} -abhängige K^+ -Strom (Stewart *et al.* 1989), der zum Gesamtstrom erheblich beitragen kann, wird durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert, wie er beispielsweise bei einem Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle auftritt (Merz 1995, Yang und Kleinhaus 1984, Stewart *et al.* 1989). Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle könnten ebenfalls an der vorübergehenden Membranhyperpolarisation nach der Injektion positiver Ströme beteiligt sein.

Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle benötigen zur Aktivierung eine Membrandepolarisation auf -40 bis -30 mV und sind bei fortgesetzter Membrandepolarisation anhaltend aktiv (Dierkes *et al.* 1997, Hochstrate *et al.* 1995, Lührke und Deitmer 1996, Bookman und Liu 1990, Dierkes *et al.* 1997, Kleinhaus und Prichard 1976). Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle könnten ebenfalls an der R_{in} -Abnahme bei positiven Injektionsströmen beteiligt sein.

4.4 Funktionelle Eigenschaften des volumenaktivierten Cl^- -Stroms

Sowohl die R_{in} -Abnahme als auch ΔI_{VC} konnten auf die Öffnung schwellungsaktivierter Cl^- -Kanäle zurückgeführt werden. Bei ~ -56 mV kehrte ΔI_{VC} die Polarität um, also in der Nähe des nach 5 min in hypotonischer Lösung bestimmten E_{Cl} (~ -60 mV; Tabelle 9; vgl. Munsch und Schlue 1993). Die Strom-Spannungskennlinie war zwischen -70 und -40 mV annähernd linear und flachte im Bereich negativerer E_m -Werte zunehmend ab, d. h. die Zunahme des Cl^- -Ausstroms wurde

immer geringer. Diese Auswärtsgleichrichtung ist für schwellungsaktivierte Cl⁻-Kanäle typisch (Okada 1997).

Die Tatsache, dass Nifluminsäure, ein Blocker Ca²⁺-abhängiger Cl⁻-Kanäle, auf die durch hypotonische Bedingungen hervorgerufene R_{in}-Abnahme keinen Einfluss ausübte, lässt die Beteiligung von Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanälen am schwellungsaktivierten Cl⁻-Strom unwahrscheinlich erscheinen, zumal bei einer Zellschwellung nur geringe Anstiege der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration im nanomolaren Bereich beobachtet wurden (Wüsten 2004). Die verwendete Nifluminsäure-Konzentration von 50 µM sollte zur Blockierung ausreichend sein, da die halbmaximale Blockierung von Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanälen bei Mäusen bereits bei 7,6 µM erreicht ist (Qu *et al.* 2003).

Der Blocker für schwellungsaktivierte Cl⁻-Kanäle, NPPB (siehe Fürst *et al.* 2002, Barrière *et al.* 2003, Okada 1997), übte ebenfalls keinen Effekt auf die durch hypotonische Bedingungen hervorgerufene R_{in}-Abnahme aus. Auch für diesen Blocker wurde für die hier verwendete Konzentration von 50 µM in früheren Arbeiten eine weitgehende Blockierung von Cl⁻-Kanälen erzielt (Kirkup 1996, Schmieder *et al.* 2002, Wehner *et al.* 2003). Schwellungsaktivierte Cl⁻-Kanäle, die von NPPB nicht gehemmt werden, wurden bisher nicht beschrieben.

In Cl⁻-freier Lösung war ΔI_{VC} nur um ~60 % reduziert. Da zum Zeitpunkt der Messung wegen der Cl⁻-Ruheleitfähigkeit und der Abwesenheit extrazellulären Cl⁻ wahrscheinlich kein intrazelluläres Cl⁻ mehr vorhanden ist, kann der verbleibende Strom nur durch andere Anionenströme durch die Cl⁻-Kanäle verursacht worden sein. Schwellungsaktivierte Cl⁻-Kanäle sind für zahlreiche Ionensorten permeabel, u. a. auch Anionen aus Glykolyse und Citratzyklus, so dass sie auch als unselektive Anionenkanäle bezeichnet werden. Die Permeabilitätssequenz wurde zu SCN⁻ > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻ > Gluconat⁻ bestimmt (siehe Fürst *et al.* 2002). Die hemmende Wirkung von DIDS beruht darauf, dass die beiden Thiocyanat-Gruppen des Blockers (Abb. 8) mit der Kanalpore starke Wechselwirkungen eingehen, so dass Cl⁻ verdrängt wird. DIDS kann jedoch wegen seiner voluminösen Phenylgruppen

den Kanal nicht permeieren. Der Cl⁻-Kanalblocker DIDS (0,5 mM) hemmte ΔI_{VC} zu ~75 % (Abb. 34).

Nach 60-minütiger Inkubation in 25 μ M Colchizin war ΔI_{VC} deutlich reduziert (Abb. 28). Das Umkehrpotential war in negative Richtung verschoben, möglicherweise durch eine starke Erniedrigung der intrazellulären Cl⁻-Konzentration infolge einer verstärkten Zellschwellung bedingt (Wüsten 2004). Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Aktivierung schwellungsaktivierter Cl⁻-Kanäle.

Die zeitliche Verzögerung zwischen Membranhypolarisation und R_{in} -Abnahme nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität deutet darauf hin, dass zwischen diesen Ereignissen kein Zusammenhang besteht. Sie gibt jedoch Aufschluss über den Zeitraum der Aktivierung der schwellungsaktivierten Cl⁻-Kanäle. Die R_{in} -Abnahme und damit die Aktivierung setzte im Mittel ~60 s nach dem Lösungswechsel ein. Der Zeitpunkt war stark variabel (\pm 40 s). Unklar bleibt, ob dabei die Zellschwellung unterschiedlich schnell verlief oder ein jeweils unterschiedlicher „*volume-set-point*“ verantwortlich war.

Der untersuchte Potentialbereich gab keinen Aufschluss über eine mögliche spannungsabhängige Inaktivierung von ΔI_{VC} . Bei verschiedenen Präparaten wurde bei $E_m > +40$ mV eine Inaktivierung von schwellungsaktivierten Cl⁻-Kanälen beobachtet, die ATP-abhängig war und durch hohe intrazelluläre Mg²⁺-Konzentrationen verstärkt wurde (Okada 1997). Die physiologische Bedeutung dieser Inaktivierung ist unklar, da E_m unter physiologischen Bedingungen keine positiven Werte dieser Größenordnung erreicht.

Bei vielen Präparaten wurden Cl⁻-Kanäle mit Einzelkanalleitfähigkeiten von 0,2 bis 2 pS („mini ClC“) bis über 100 pS („maxi ClC“) mit einer RVD in Verbindung gebracht. In der Mehrzahl betrug die Einzelkanalleitfähigkeiten ~50 pS und variierten mit den Versuchsbedingungen (Fürst *et al.* 2002). Mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik wurden beim Blutegel vier verschiedene Cl⁻-Kanäle mit

Einzelkanalleitfähigkeiten von 39, 59, 72 und 97 pS identifiziert (Buchholz 1999). Unter hypotonischen Bedingungen steigerte sich die Offenwahrscheinlichkeit der 97 pS- und 72 pS-Kanäle, so dass ΔI_{VC} mit einer Aktivierung dieser Cl^- -Kanäle erklärt werden kann.

4.5 Schlussbetrachtungen und Ausblick

Die aufgrund der Ergebnisse gewonnenen Vorstellungen über den Effekt hypotonischer Bedingungen werden in Abb. 36 zusammengefasst. Hierbei wird zwischen Ereignissen unterschieden, die unmittelbar nach der NaCl-Wegnahme stattfinden und primär durch die Verstellung der elektrochemischen Gradienten für Na^+ und Cl^- bedingt sind und Ereignissen, die wegen der Zellschwellung zu einem späteren Zeitpunkt ausgelöst werden. Sofort nach der Verminderung der extrazellulären NaCl-Konzentration kommt es aufgrund der Verschiebung des Na^+ -Gradienten in negative Richtung zu einer Verminderung des Na^+ -Einstroms und zu einer Membranhyperpolarisation und durch die Verschiebung des Cl^- -Gradienten in positive Richtung zu einem Cl^- -Ausstrom. Die Veränderung der extrazellulären Osmolalität zieht einen Wassereinstrom nach sich, wodurch das Zellvolumen zunimmt. Bei Überschreitung eines bestimmten Zellvolumens werden schwellungsaktivierte Cl^- -Kanäle aktiviert oder eingebaut, die durch DIDS, nicht jedoch durch NPPB blockiert werden können. Die Aktivierung der Kanäle bzw. die Auslösung des Kanal-Einbaus erfolgt unter Mitwirkung des Mikrotubulisystem. Um einen elektroneutralen KCl-Ausstrom zu ermöglichen reicht scheinbar die Membranleitfähigkeit für K^+ -Ionen in Ruhe aus, da keine zusätzlichen K^+ -Kanäle aktiviert werden. Durch die Zellschwellung werden die intrazelluläre Na^+ - und Cl^- -Konzentration abgesenkt, so dass Na^+ - bzw. Cl^- -Gradient annähernd Ausgangswerte erreichen. Der KCl-Ausstrom kommt zum Erliegen und wird von einem Cl^- -Einstrom gefolgt, wodurch die Membran hyperpolarisiert bleibt. Ein KCl-Ausstrom, der die Zellschwellung verringert, ist also nur so lange möglich, bis die Zellschwellung die intrazelluläre Cl^- -Konzentration soweit abgesenkt hat, dass E_{Cl} negativer als E_m wird. Darüber hinaus ist ein Cl^- -Ausstrom durch die geringe intrazelluläre Cl^- -Konzentration von

~8 mM (siehe Dierkes *et al.* 2002) begrenzt. Beides könnte die geringe Wirkung der Volumenregulation und das Fehlen einer regulatorischen Volumenabnahme erklären.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der *current-clamp*- und der *voltage-clamp*-Technik untersucht, ob Änderungen der Osmolalität und der ionalen Zusammensetzung des Extrazellulärraums Membranpotential (E_m), Eingangswiderstand (R_{in}) und Membrankapazität (C_{in}) von Retzius-Neuronen des medizinischen Blutegels beeinflussen. Darüber hinaus wurden Änderungen des Zellvolumens bei unterschiedlichem E_m bestimmt, um die Spannungsabhängigkeit von Zellvolumenänderungen zu erfassen. Hierzu wurde die Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik kombiniert. Schließlich wurde ein Membranstrom, der durch Zellschwellung aktiviert wird, funktionell und pharmakologisch charakterisiert. Die Veränderung der extrazellulären Osmolalität wurde entweder durch Erhöhung der extrazellulären NaCl-Konzentration vorgenommen (hypertonische Bedingungen) oder durch deren Absenkung (hypotonische Bedingungen).
2. Hypertonische Bedingungen führten zu einer Membrandepolarisation und einer simultanen R_{in} -Zunahme, die beide mit zunehmender Osmolalität immer stärker wurden. Die Membrandepolarisation betrug nach Zugabe von 20 mM NaCl: $1,9 \pm 1,4$ mV ($n = 7$), von 40 mM: $3,4 \pm 4,3$ mV ($n = 23$) und von 85 mM: $9,7 \pm 4,9$ mV ($n = 8$). Die R_{in} -Zunahme betrug nach Zugabe von 20 mM NaCl: $3,7 \pm 3,1$ % ($n = 7$), von 40 mM: $7,4 \pm 7,3$ % ($n = 23$) und von 85 mM: $8,3 \pm 8,6$ % ($n = 8$).
3. Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA; 0,5 mM) löste eine R_{in} -Abnahme aus (-26 ± 9 %, $n = 6$), die unter hypertonischen Bedingungen signifikant vergrößert war (-52 ± 15 %, $n = 6$). R_{in} -Änderungen, die durch Applikation des cholinergen Agonisten Carbachol (Carbamylcholinchlorid; 0,5 mM) oder des glutamatergen Antagonisten DNQX (6,7-Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-dion; 20 μ M) induziert wurden, waren unter hypertonischen Bedingungen nicht signifikant beeinflusst.

4. Hypotonische Bedingungen bewirkten eine Membranhyperpolarisation und eine R_{in} -Abnahme, die mit einer Verzögerung von 62 ± 40 s ($n = 40$) einsetzte. Mit sinkender Osmolalität wurde die Membranhyperpolarisation immer schwächer, während die R_{in} -Abnahme immer deutlicher wurde. Die Membranhyperpolarisation betrug nach Wegnahme von 20 mM NaCl: $-6,5 \pm 4,6$ mV ($n = 4$), von 30 mM: $-4,8 \pm 5,0$ mV ($n = 8$), von 40 mM: $-5,1 \pm 5,3$ mV ($n = 56$), von 50 mM: $-4,3 \pm 5,3$ mV ($n = 5$) und von 59 mM: $-2,2 \pm 3,3$ mV ($n = 6$). Die R_{in} -Abnahme betrug bei Wegnahme von 20 mM NaCl: $-2,6 \pm 2,2$ % ($n = 4$), von 30 mM: -18 ± 20 % ($n = 8$), von 40 mM: -24 ± 14 % ($n = 56$), von 50 mM: -72 ± 15 % ($n = 5$) und von 59 mM: -83 ± 3 % ($n = 6$).
5. In der Spannungsklemme führten hypotonische Bedingungen (nach Absenkung der extrazellulären NaCl-Konzentration um 40 mM) bei $E_m = -40$ mV zu einer Zellschwellung von 33 ± 16 % ($n = 5$), die nur halb so groß war, wie bei $E_m = -70$ mV (66 ± 58 %, $n = 4$). Dagegen war die Zellschrumpfung unter hypertonen Bedingungen (nach Erhöhung der extrazellulären NaCl-Konzentration um 40 mM) im untersuchten E_m -Bereich (-40 bis -70 mV) spannungsunabhängig und betrug im Mittel -23 ± 8 % ($n = 9$).
6. Hypotonische Bedingungen (nach Absenkung der extrazellulären NaCl-Konzentration um 40 mM) bewirkten eine Verkürzung der Membranzeitkonstante (τ) von 37 ± 15 ms auf 19 ± 7 ms ($n = 60$). Dabei nahm C_{in} von $2,8 \pm 0,8$ auf $3,2 \pm 1,8$ nF ($n = 60$) zu.
7. Versuchslösungen mit isotonischem Ersatz von 40 mM NaCl durch NMDG-Gluconat oder Saccharose führten zu einer vergleichbaren Membranhyperpolarisation wie Versuchslösungen ohne osmotische Kompensation, übten jedoch keinen Einfluss auf R_{in} aus. Nach vollständigem Austausch von Na^+ durch NMDG⁺ (89 mM) war die Amplitude der Membranhyperpolarisation verdoppelt ($-9,6 \pm 3,2$ mV, $n = 8$), während der vollständige Austausch von Cl^- durch Gluconat keinen Einfluss auf E_m ausübte.

8. Mit Hilfe der *voltage-clamp*-Technik konnte ein schwellungsaktivierter Ionenstrom mit einem Umkehrpotential von -56 ± 10 mV ($n = 37$) nachgewiesen werden. Dieser Ionenstrom war in Gegenwart des Cl⁻-Kanalblockers DIDS (4,4'-Diisothiocyanatstilben-2,2'-Disulfonsäure, 0,5 mM) sowie unter Cl⁻-freien Bedingungen unterdrückt. Mit Hilfe der *current-clamp*-Technik wurde gezeigt, dass in Gegenwart von DIDS sowie unter Cl⁻-freien Bedingungen die Membranhyperpolarisation und die R_{in} -Abnahme unter hypotonischen Bedingungen signifikant verringert waren.
9. Colchizin (25 μ M), ein Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisierung, führte zu einer Unterdrückung des schwellungsaktivierten Cl⁻-Stroms.
10. Aus den beschriebenen Ergebnissen werden folgende Schlussfolgerungen gezogen:
 - Die Membrandepolarisation unter hypertonen Bedingungen ist auf die Verschiebung des Na⁺-Gleichgewichtspotentials in positive Richtung durch Zugabe von extrazellulärem Na⁺ zurückzuführen.
 - Die Deaktivierung von GABA-Rezeptoren trägt zur R_{in} -Zunahme unter hypertonen Bedingungen bei.
 - Die R_{in} -Abnahme unter hypotonischen Bedingungen ist auf einen DIDS-sensitiven Cl⁻-Strom zurückzuführen, der durch die Zellschwellung aktiviert wird. Das Mikrotubulsystem des Cytoskeletts ist an der Aktivierung beteiligt.
 - Die Membranhyperpolarisation unter hypotonischen Bedingungen ist unmittelbar nach Veränderung der extrazellulären Na⁺-Konzentration auf die Verschiebung des Na⁺-Gleichgewichtspotentials in negative Richtung zurückzuführen. Im weiteren Verlauf wird E_m durch den schwellungsaktivierten Cl⁻-Strom zunehmend dem Cl⁻-Gleichgewichtspotential angenähert.

LITERATUR

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

Ammann, D. (1986): Ion-Selective Microelectrodes. *Springer Verlag, Berlin*

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

Arieff, A.I., Carroll, H.J. (1972): Nonketotic hyperosmolar coma with hyperglycemia: clinical features, pathophysiology, renal function, acid-base balance, plasma cerebrospinal fluid equilibria and the effects of therapy in 37 cases. *Medicine* **51**, 73-94

Ayrapetyan, S.N., Suleymanyan, M.A. (1979): On the pump-induced cell volume changes. *Comp. Biochem. Physiol. A* **64**, 571-575

Bailey, N.T. (1992): Statistical Methods in Biology. 2nd Edition, *Cambridge University Press*

Ballanyi, K., Schlue, W.-R. (1989): Electrophysiological characterization of a nicotinic acetylcholine receptor on leech neuropile glial cells. *Glia* **2**, 330-345

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

Barrière, H., Rubera, I., Belfodil, R., Tauc, M., Tonnerieux, N., Poujeol, C., Barhanin, J., Poujeol, P. (2003): Swelling-activated chloride and potassium conductance in primary cultures of mouse proximal tubules. Implication of KCNE1 protein. *J. Membr. Biol.* **193**, 153-170.

Baylor, D.A., Nicholls, J.G. (1969): Changes in extracellular potassium concentration produced by neuronal activity in the central nervous system of the leech. *J. Physiol. (Lond.)* **203**, 555-569

Beck, A., Lohr, C., Nett, W., Deitmer, J.W. (2001): Bursting activity in leech Retzius neurons induced by low external chloride. *Eur. J. Physiol.* **442**, 263-272

Berridge, M.J., Schlue, W.-R. (1978): Ion-selective electrode studies on the effects of 5-hydroxytryptamine on the intracellular level of potassium in an insect salivary gland. *J. Exp. Biol.* **72**, 203-216

Bookman, R.J., Liu, Y. (1990): Analysis of calcium channel properties in cultured leech Retzius cells by internal perfusion, voltage-clamp and single-channel recording. *J. Exp. Biol.* **149**, 223-237

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

Burg, M.B., Kador, P.F. (1988): Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. *J. Clin. Invest.* **81**, 635-640

Cannon, C.L., Basavappa, S., Strange, K. (1998): Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am. J. Physiol.* **275**, C416-C422

Carretta, M. (1988): The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comp. Biochem. Physiol. A* **91**, 405-413

Choi, D.W. (1987): Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **7**, 369-379

Coggeshall, R.E., Fawcett, D.W. (1964): The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Neurophysiol.* **27**, 229-289

Coulon, P. (2001): Einfluss extrazellulärer Ionen auf das Volumen und die elektrophysiologischen Eigenschaften identifizierter Blutegel-Neuronen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Coulon, P., Dierkes, P.W., Neumann, S., Schlue, W.-R. (2002): Potentiometric measurement of cell volume changes under voltage-clamp conditions in invertebrate nerve cells. *Pflügers Arch.* **443** (suppl.), 236

Coulon, P., Klees, G., Dierkes, P.W., Schlue, W.-R. (2003): Effect of hyposmotic conditions on cell volume and electrophysiological properties of leech Retzius neurones. In Elsner, N., Zimmermann, H. (Eds.): The Neurosciences from Basic Research to Therapy. *Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society 2003*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 795

Cserr, H.F., Patlak, C.S. (1991): Regulation of brain volume under isosmotic and anisosmotic conditions. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **9**, 61-80

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

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 neurones. *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., Müller, A., Schlue, W.-R. (1999): Ouabain-induced swelling of leech Retzius neurones. In: Elsner N., Eysel, U. (Eds.) *Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference 1999*, Vol. II, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 842

Dierkes, P.W., Coulon, P., Neumann, S., Schlue, W.-R. (2002): Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations under voltage-clamp conditions in invertebrate nerve cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 762-766

Dierkes, P.W., Neumann, S., Klees, G., Schlue, W.-R. (2003): Multi-barrelled ion-selective microelectrodes as tools for the investigation of volume regulation mechanisms in invertebrate nerve cells under hyperosmotic conditions. *Electrochim. Acta* **48**, 3373-3380

Dietzel, I., Heinemann, U., Lux, H.D. (1989): Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* **2**, 25-44

Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391-397

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

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

Egée, S., Harvey, B.J., Thomas, S. (1997): Volume-activated DIDS-sensitive whole-cell chloride currents in trout red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)* **504**, 57-63

Eisenman, G. (1962): Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* **2**, Pt. 2, 259-323

Eveloff, J.L., Warnock, D.G. (1987): Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* **252**, F1-F10

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. *Eur. J. Physiol.* **444**, 1-25

Gerard, E., Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (2001): Functional properties of I_h channels in leech P neurones. In: Elsner, N., Kreutzberg, G.W. (Eds.): *Proceedings of the 4th meeting of the german neuroscience society 2001*; Vol. II, *28th Göttingen Neurobiology Conference* Georg Thieme Verlag Stuttgart, p. 814

Gerard, E. (2003): Elektrophysiologische Eigenschaften und Modulation hyperpolarisations-aktivierter Kationenkanäle im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Günzel, D., Schlue, W.-R. (1996): Sodium-magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J. Physiol. (Lond.)* **491**, 595-608

Häussinger, D., Lang, F., Bauers, K., Gerok, W. (1990): Interaction between glutamine metabolism and cell-volume regulation in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* **188**, 689-695

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

Hallows, K.R., Knauf, P.A. (1994): Principles of cell volume regulation. In: Strange, K. (Ed.): Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, Boca Raton, FL, *CRC Press*, 3-29

Hille, B. (Ed.; 2001): Ionic Channels of Excitable Membranes (3rd Edition). *Sinauer Associates, Sunderland, MA*

Hochstrate, P., Piel, C., Schlue, W.-R. (1995): Effect of extracellular K⁺ on the intracellular free Ca²⁺ concentration in leech glial cells and Retzius neurones. *Brain Res.* **696**, 231-241

Idriss, H.T., Hannun, Y.A., Boulpaep, E., Basavappa, S. (2000): Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! *J. Physiol. (Lond.)* **524**, 629-36

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

Johansen, J., Kleinhaus, A.L. (1986): Transient and delayed potassium currents in the Retzius cell of the leech *Macrobdella decora*. *J. Neurophysiol.* **56**, 812-822

Johansen, J., Kleinhaus, A.L. (1987): Saxitoxin differentiates between two types of Na⁺-dependent potentials in the Retzius cell of hirudinid leeches. *J. Exp. Biol.* **131**, 351-363

Kilb, W. (1994): Modulation der pH-Regulation durch Neurotransmitter bei identifizierten Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

King, L.S., Kozono, D., Agre, P. (2004): From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 687-698

Kleinhaus, A.L., Angstadt, J.D. (1995): Diversity and modulation of ionic conductances in leech neurons. *J. Neurobiol.* **27**, 419-433

Kleinhaus, A.L., Prichard, J.W. (1976): Sodium-dependent tetrodotoxin-resistant action potentials in a leech neuron. *Brain Res.* **102**, 363-373

Kolb, H.-A. (1990): Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **115**, 52-91

Kregenow, F.M., Caryk, T., Siebens, A.W. (1985): Further studies of the volume-regulatory response of *Amphiuma* red cells in hypertonic media. Evidence for amiloride-sensitive Na/H exchange. *J. Gen. Physiol.* **86**, 565-584

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

Larson, M., Spring, K.R. (1984): Volume regulation by *Necturus* gallbladder: basolateral KCl exit. *J. Membr. Biol.* **81**, 219-232

Lent, C.M. (1973): Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science* **179**, 693-696

Lent, C.M. (1977): The Retzius cells within the central nervous system of leeches. *Prog. Neurobiol.* **8**, 81-117

Löhrke, S., Deitmer, J.W. (1996): Kainate responses of leech Retzius neurons *in situ* and *in vitro*. *J. Neurobiol.* **31**, 345-358

Lucht, M. (1997): Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren und *second-messenger*-Kaskaden bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Nervensystems. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

McManus, M.L., Churchwell, K.B. (1994): Clinical significance of cellular osmoregulation. In: Strange, K. (Ed.): Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, *CRC Press*, 63-77

Merz, D.C. (1995): Segmental specialization of calcium-activated potassium conductances in an identified leech neuron. *J. Neurophysiol.* **73**, 957-963

Müller, M. (1996): Elektrophysiologische Eigenschaften und Regulation von K⁺- und Cl⁻-Kanälen der Neuropil-Gliazellen in den Segmentalganglien des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Müller, M., Somjen, G.G. (2000): Na⁺ and K⁺ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **83**, 735-745

Muller, K.J., Nicholls, J.G., Stent, G.S. (1981): Neurobiology of the Leech. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*

Munsch, T. (1991): Elektrophysiologische Untersuchungen zur Wirkung von 5-Hydroxytryptamin an Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Munsch, T., Deitmer, J.W. (1992): Calcium transients in identified leech glial cells *in situ* evoked by high potassium concentrations and 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* **167**, 251-265

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., Fujiyoshi, Y. (2000): Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605

Nagasaki, M., Ye, L., Duan, D., Horowitz, B., Hume, J.R. (2000): Intracellular cyclic AMP inhibits native and recombinant volume-regulated chloride channels from mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)* **523**, 705-717

Neher, E., Lux, H.D. (1973): Rapid changes of potassium concentration at the outer surface of exposed single neurons during membrane current flow. *J. Gen. Physiol.* **61**, 385-399

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

Nichol, J.A., Hutter, O.F. (1996): Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **493**, 187-198

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

Nieczaj, R., Zerst-Boroffka, I. (1993): Hyperosmotic acclimation in the leech, *Hirudo medicinalis* L.: energy metabolism, osmotic, ionic and volume regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A* **106**, 595-602

Niemeyer, M.I., Hougaard, C., Hoffmann, E.K., Jorgensen, F., Stutzin, A., Sepulveda, F.V. (2000): Characterisation of a cell swelling-activated K^+ -selective conductance of ehrlich mouse ascites tumour cells. *J. Physiol. (Lond.)* **524**, 757-767

Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., Droogmans, G. (1996): Volume-activated Cl^- channels. *Gen. Pharmacol.* **27**, 1131-1140

Okada, Y. (1997): Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl^- channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* **273**, C755-C789

Okada, Y. (1998): Cell volume-sensitive chloride channels. *Contrib. Nephrol.* **123**, 21-33

Parker, J.C. (1993): Urea alters set point volume for K-Cl cotransport, Na-H exchange, and Ca-Na exchange in dog red blood cells. *Am. J. Physiol.* **265**, C447-C452

Pellegrini, M., Menconi, M.C., Pellegrino, M. (2001): Stretch-activated cation channels of leech neurons exhibit two activity modes. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 503-511

Pellegrino, M., Simmoneau, M. (1984): Distribution of receptors for acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on identified leech neurones growing in culture. *J. Physiol. (Lond.)* **352**, 669-684

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

Qu, Z., Wei, R.W., Hartzell, H.C. (2003): Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: F326-F335

Retzius, G. (1891): Zur Kenntnis des centralen Nervensystems der Würmer. Das Nervensystem der Annulaten. *Biol. Untersuch. (NF)* **2**, 1-28

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

Sahley, C.L. (1995): What we have learned from the study of learning in the leech. *J. Neurobiol.* **27**, 434-445

Salzet, B., Stefano, G.B., Verger-Bocquet, M., Salzet, M. (1998): Putative leech dopamine-like receptor molecular characterization: sequence homologies between dopamine and serotonin leech CNS receptors explain pharmacological cross-reactivities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **58**, 47-58

Sardini, A., Amey, J.S., Weylandt, K.H., Nobles, M., Valverde, M.A., Higgins, C.F. (2003): Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochim. Biophys. Acta.* **1618**, 153-162

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

Schlue, W.-R., Thomas, R.C. (1985): A dual mechanism for intracellular pH regulation by leech neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **364**, 327-38.

Schlue, W.-R., Kilb, W., Günzel, D. (1997): Ultramicroelectrodes for membrane research. *Electrochim. Acta* **42**, 2197-3205

Schmieder, S., Lindenthal, S., Banderali, U., Ehrenfeld, J. (1998): Characterization of the putative chloride channel xClC-5 expressed in *Xenopus laevis* oocytes and comparison with endogenous chloride currents. *J. Physiol. (Lond.)* **511**, 379-393

Segal, M., Rogawski, M.A., Barker, J.L. (1984): A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. *J. Neurosci.* **4**, 604-609

Senatorov, V.V., Stys, P.K., Hu, B. (2000): Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase by persistent sodium accumulation in adult rat thalamic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **525**, 343-353

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

Sherman-Gold, R. (Ed.) (1993): The axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques. *Axon Instruments Inc.*, Foster City, CA, USA, Part Number **2500-102 Rev A**, 195-207

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., Part A Mol. Integr. Physiol.* **120**, 17-22

Skou, J.C. (1990): The energy-coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺,K⁺-pump. *FEBS Lett.* **268**, 314-324

Stewart, R.R., Nicholls, J.G., Adams, W.B. (1989): Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ currents in identified leech neurones in culture. *J. Exp. Biol.* **141**, 1-20

Takemura, T., Sato, F., Saga, K., Suzuki, Y., Sato, K. (1991): Intracellular ion concentrations and cell volume during cholinergic stimulation of eccrine secretory coil cells. *J. Membr. Biol.* **119**, 211-219

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

vom Dahl, S., Hallbrucker, C., Lang, F., Häussinger, D. (1991): Regulation of cell volume in the perfused rat liver by hormones. *Biochem. J.* **280**, 105-109

Waldegger, S., Steuer, S., Risler, T., Heidland, A., Capasso, G., Massry, S., Lang, F. (1998): Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrol. Dial. Transplant* **13**, 867-874

Walz, W., Schlue, W.-R. (1982): Ionic mechanism of a hyperpolarizing 5-hydroxytryptamine effect on an invertebrate glial cell. *Brain Res.* **250**, 111-121

Wehner, F. (1998): Cell volume-regulated cation channels. *Contrib. Nephrol.* **123**, 8-20

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

Weiss, J.L., Yang, J., Jie, C., Walker, D.L., Ahmed, S., Zhu, Y., Huang, Y., Johansen, K.M., Johansen, J. (1999): Molecular cloning and characterization of LKv1, a novel voltage-gated potassium channel in leech. *J. Neurobiol.* **38**, 287-299

Willard, A.L. (1981): Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* **1**, 936-944

Wilson, T.H. (1954): Ionic permeability and osmotic swelling of cells. *Science* **120**, 104-105

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

Wüsten, H.J. (2004): Zellvolumen-Regulation und Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen in Retzius- und P-Neuronen des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Yang, J., Kleinhaus, A.L. (1984): Effects of tetraethylammonium-chloride and divalent cations on the afterhyperpolarization following repetitive firing in leech neurons. *Brain Res.* **311**, 380-384

ABBILDUNGEN

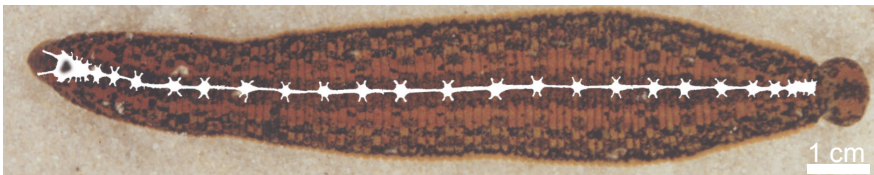
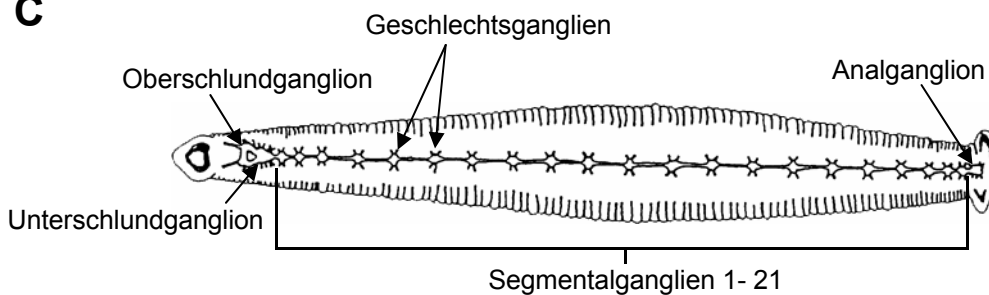
A**B****C**

Abb. 1 Das Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis*

- A) Habitus von *H. medicinalis*. Die äußere Schicht des Körpers ist eine dünne Kutikula, die ein charakteristisches Muster aufweist. Auf der Kutikula sind Ringe (Annuli) sichtbar, die jedoch nicht die Segmentierung widerspiegeln: Die mittleren Segmente umfassen jeweils fünf Annuli, am Vorder- und Hinterende sind es weniger.
- B) Dorsalansicht. Die dorsale Zeichnung der Kutikula lässt die Segmentierung erahnen. Die Lage des ventral gelegenen Zentralnervensystems (ZNS) ist schematisch angedeutet.
- C) Schematische Darstellung des ZNS (nach Riehl 1990). Das ZNS gliedert sich in drei Bereiche: Das Oberschlundganglion, das Bauchmark und das Analganglion. Das Bauchmark wiederum besteht aus dem Unterschlundganglion und 21 Segmentalganglien, zu denen auch die zwei Geschlechtsganglien gehören.

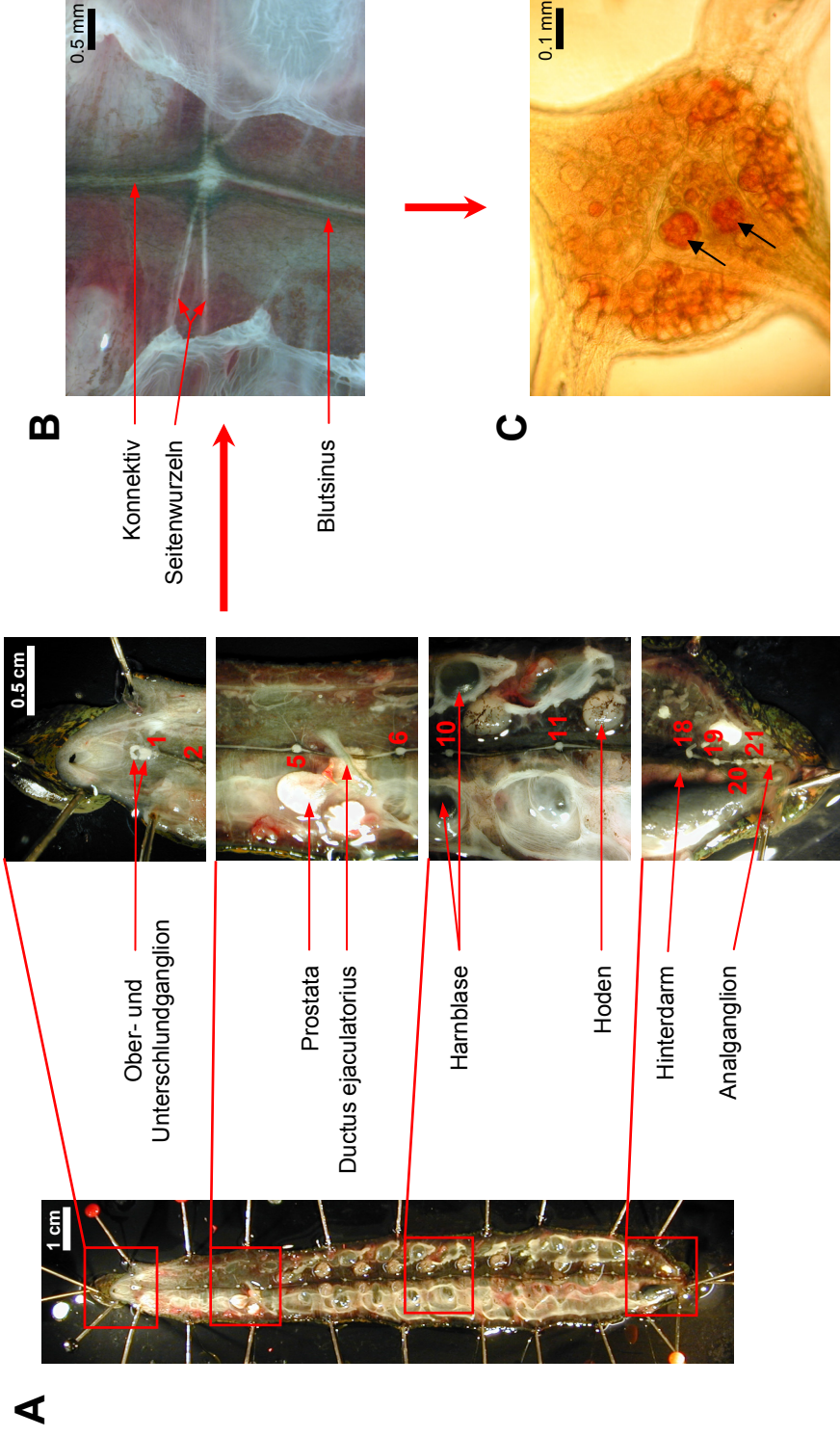


Abb. 2 Präparation, Organisation und Lage des Blutegel-ZNS

Nach Durchtrennung der Kutikula und der Darmwände von dorsal liegt das ventral gelegene ZNS frei (A). Das Oberschlundganglion liegt dorsal über dem vorderen Teil des Pharynx, das Unterschlundganglion ventral darunter. Beide sind über die Schlundkonnektive miteinander verbunden. Die Zahlen in den Ausschnittsvergrößerungen bezeichnen die jeweiligen Segmentalganglien. Im Bereich der Geschlechtsganglien (5 und 6) sind die Organe des Geschlechtsapparates lokalisiert. Insgesamt siebzehn Paare Nephridien mit Harnblasen und neun Paare Hoden ziehen sich vom Bereich der Geschlechtsganglien bis zu den hinteren Segmentalganglien. Im Bereich des Analganglions ist der glatte Enddarm zu sehen. Die Segmentalganglien sind miteinander über paarige Konnektive und den dünnen Segmentalganglien. Im Bereich des Analganglions ist der glatte Enddarm zu sehen. Die Segmentalganglien führen zu den Organen des jeweiligen Segmentes. Die Aufnahme eines isolierten Segmentalganglions im Durchlicht-Mikroskop ist in C gezeigt: In der oberen linken und der unteren rechten Ecke sind die Seitenwurzeln zu erkennen. Die Pfeile markieren die serotonergen Retzius-Neuronen, die hier zur Verdeutlichung mit Neutralrot angefärbt wurden.

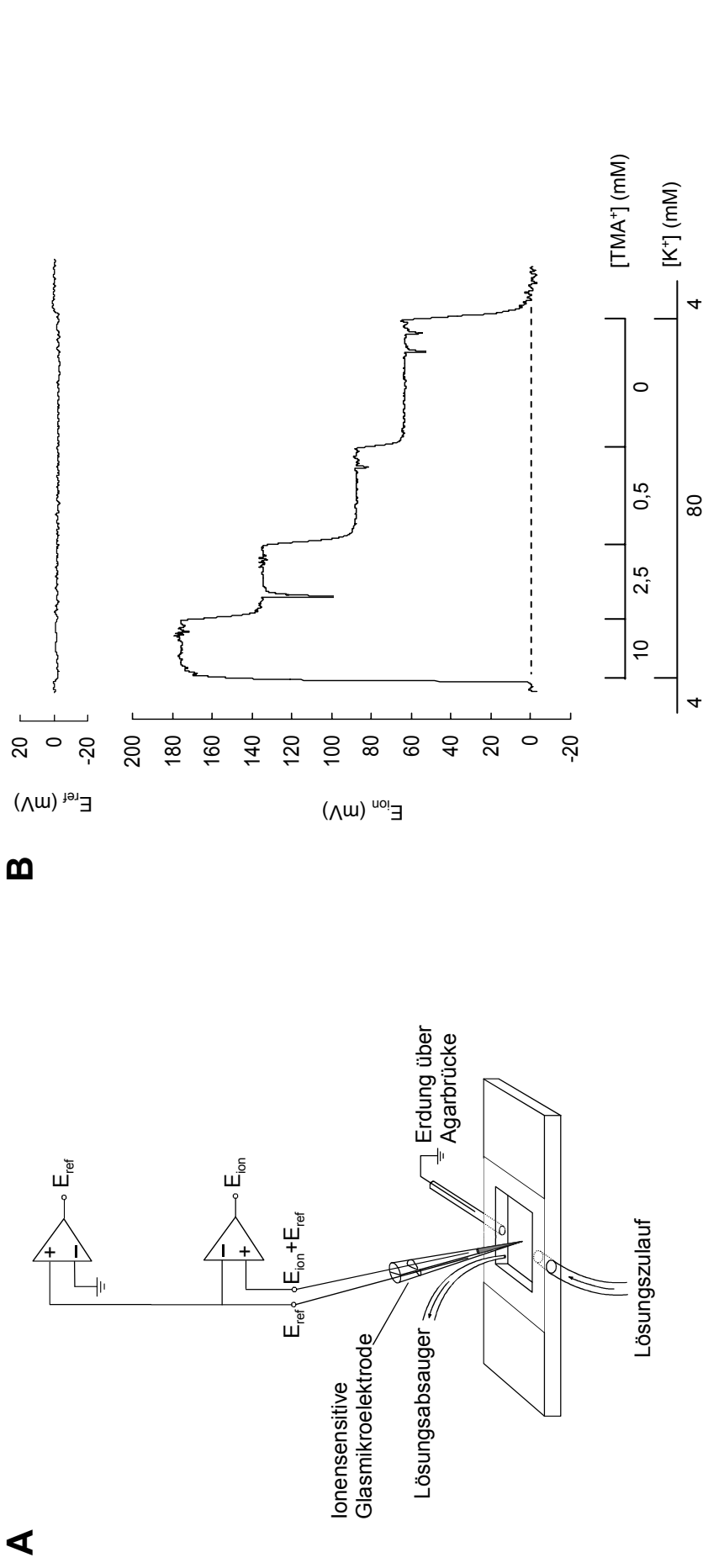


Abb. 3 Ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektroden: Versuchsaufbau und Eichung

- A) Versuchsaufbau (schematisch): Die beiden Kanäle der Glasmikroelektrode waren über chlorierte Silberdrähte mit den Eingängen des Verstärkers verbunden. Der ionensensitive Kanal registrierte die Summe aus Ionenpotential (E_{ion}) und Referenzpotential (E_{ref}), der Referenzkanal nur E_{ref} . Durch Subtraktion des Referenzpotentials vom Summenpotential mittels eines Differenzverstärkers wurde E_{ion} ermittelt. Als ionenselektive Glasmikroelektroden wurden Zweikanal-Elektroden des gedrehten Typs verwendet.
- B) Registrierbeispiel einer Eichung: Der ionensensitive Kanal war mit dem K^+ -Ionophor Corning 477317 gefüllt, der auch für TMA^+ sensitiv ist, das hier als Volumenmarker verwendet wurde. E_{ion} nahm mit der TMA^+ -Konzentration der Eichlösungen zu. In den Eichlösungen war die K^+ -Konzentration von 4 auf 80 mM erhöht, um die intrazellulären ionalen Verhältnisse zu simulieren. In Gegenwart von TMA^+ ist die K^+ -Sensitivität des Sensors unterdrückt (Neumann *et al.* 2001).

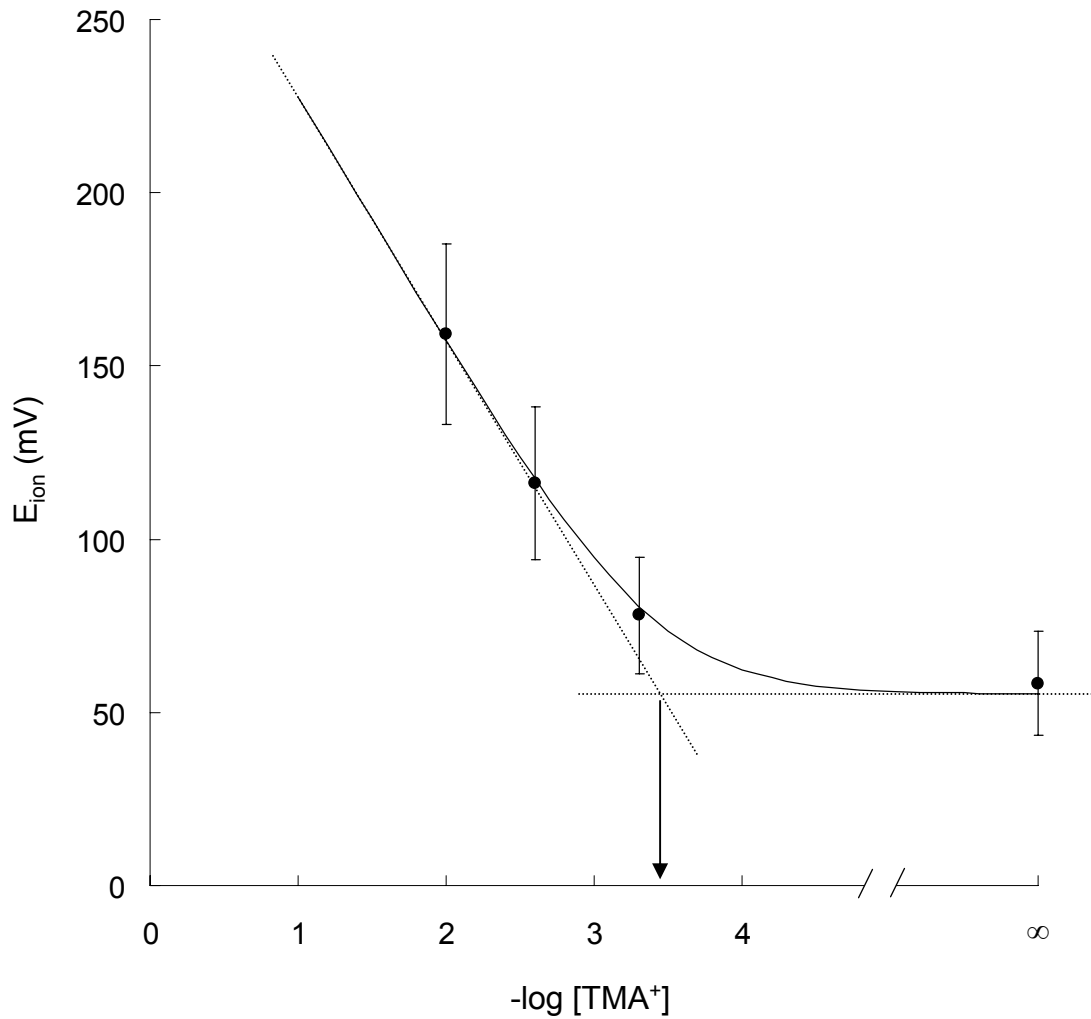


Abb. 4 Eichkurve der TMA^+ -sensitiven Glasmikroelektroden

Die ermittelten E_{ion} (Mittelwerte \pm S.D., $n = 51$) wurden gegen den negativen dekadischen Logarithmus der TMA^+ -Konzentration der Eichlösung aufgetragen. Die durchgezogene Kurve wurde mittels der Nikolsky-Eisenman-Gleichung berechnet. Der Schnittpunkt der beiden Asymptoten (gestrichelte Linien), die sich aus der Steigung der Eichkurve im TMA^+ -sensitiven Bereich und dem in TMA^+ -freier Lösung ermittelten Meßwert ergeben, entspricht dem Detektionslimit der Elektroden (Pfeil). Im Mittel betrug die Steigung -74 ± 22 mV und das Detektionslimit $0,45 \pm 0,31$ mM.

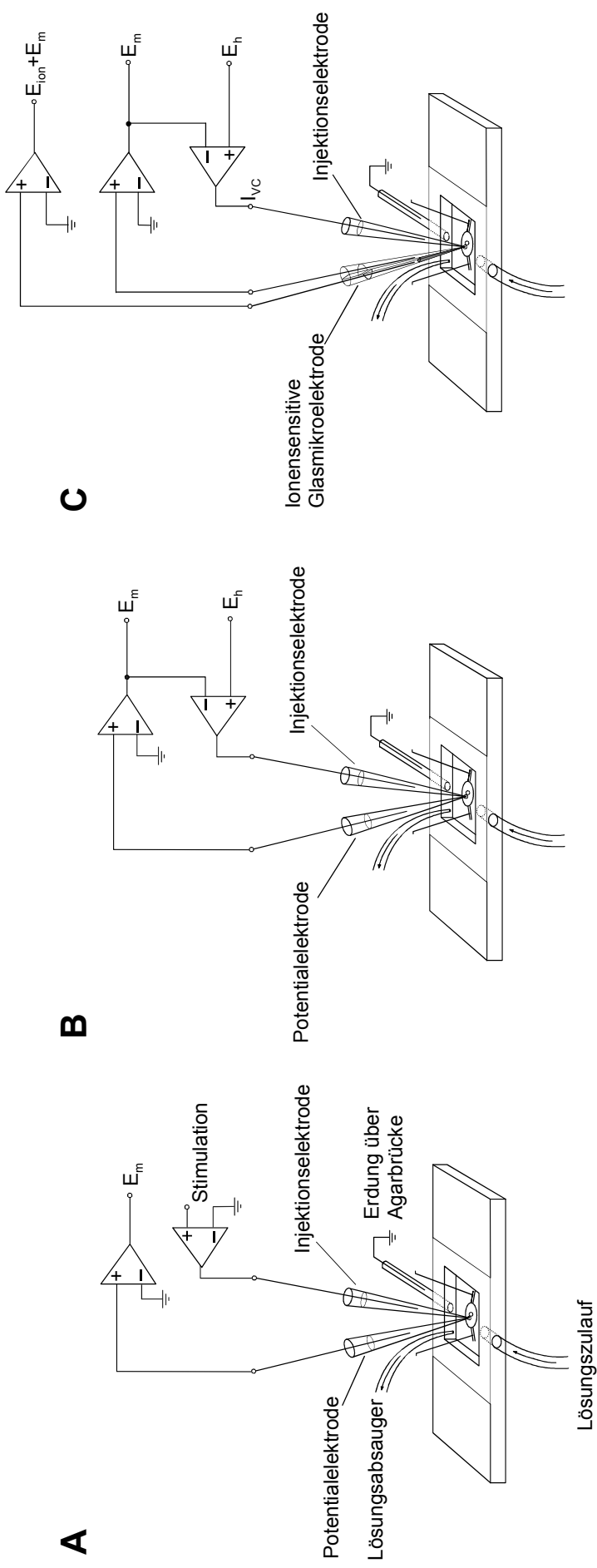


Abb. 5 Schematische Darstellung der verwendeten experimentellen Techniken

- A) *Current-clamp*-Technik: Über die Stromelektrode wurde ein definierter Injektionsstrom appliziert und die dadurch hervorgerufene Änderung des Membranpotentials (E_m) über die Potentialelektrode registriert.
- B) *Voltage-clamp*-Technik: Das von der Potentialelektrode registrierte E_m wurde auf den invertierenden Eingang des Klemmverstärkers gelegt, der proportional zur Differenz zwischen E_m und dem eingestellten Haltepotential (E_h) Strom in die Zelle injiziert und dadurch E_m auf E_h klemmt.
- C) Kombination der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik: Der ionensensitive Kanal registrierte die Summe aus Ionenpotential und E_m , der Referenzkanal nur E_m . Das registrierte E_m wurde auf den invertierenden Eingang des *voltage-clamp*-Verstärkers gelegt, der wiederum durch Strominjektion E_m auf das vorgegebene E_h klemmt.

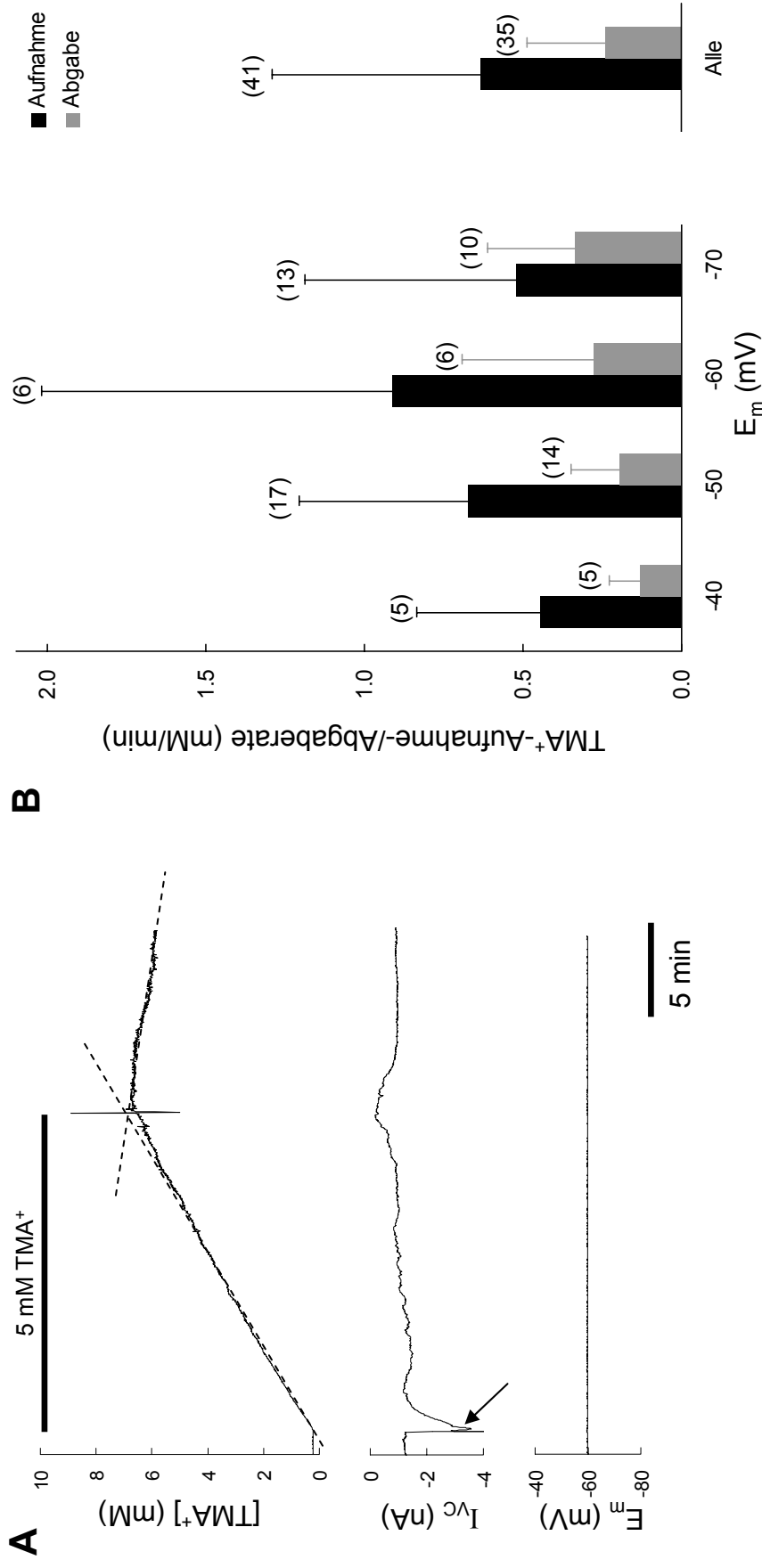


Abb. 6 Aufnahme und Abgabe des Volumenmarkers TMA⁺ bei unterschiedlichen Membranpotentialen (E_m)

A) Registrierbeispiel der TMA⁺-Aufnahme durch ein Retzius-Neuron. Die Applikation von 5 mM TMA⁺ bewirkte einen Anstieg der intrazellulären TMA⁺-Konzentration sowie einen transienten Einwärtsstrom (Pfeil). Die Messung erfolgte mit einer Corning 477317-gefüllten Zweikanal-Glasmikroelektrode (siehe Abb. 3 und 4) unter Klemmung von E_m auf -60 mV (siehe Abb. 5 C). Nach dem Ende der TMA⁺-Applikation wurde das intrazellulär akkumulierte TMA⁺ wieder abgegeben. Die Aufnahme- und Abgaberraten wurden aus den Steigungen der jeweiligen Kurvenabschnitte ermittelt (gestrichelte Linien). Der transiente Einwärtsstrom ist auf die Aktivierung von Acetylcholin-Rezeptoren durch TMA⁺ zurückzuführen (Neumann *et al.* 2001).

B) Zusammenfassung der Messergebnisse. Die TMA⁺-Aufnahmerate war unabhängig von E_m , während die Abgaberrate mit negativer werdendem E_m um den Faktor 2,6 anstieg (-40 mV vs. -70 mV; $p = 0.06$). Die Aufnahmerate war etwa um den Faktor drei größer als die Abgaberrate. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 5$ bis 41 Messungen.

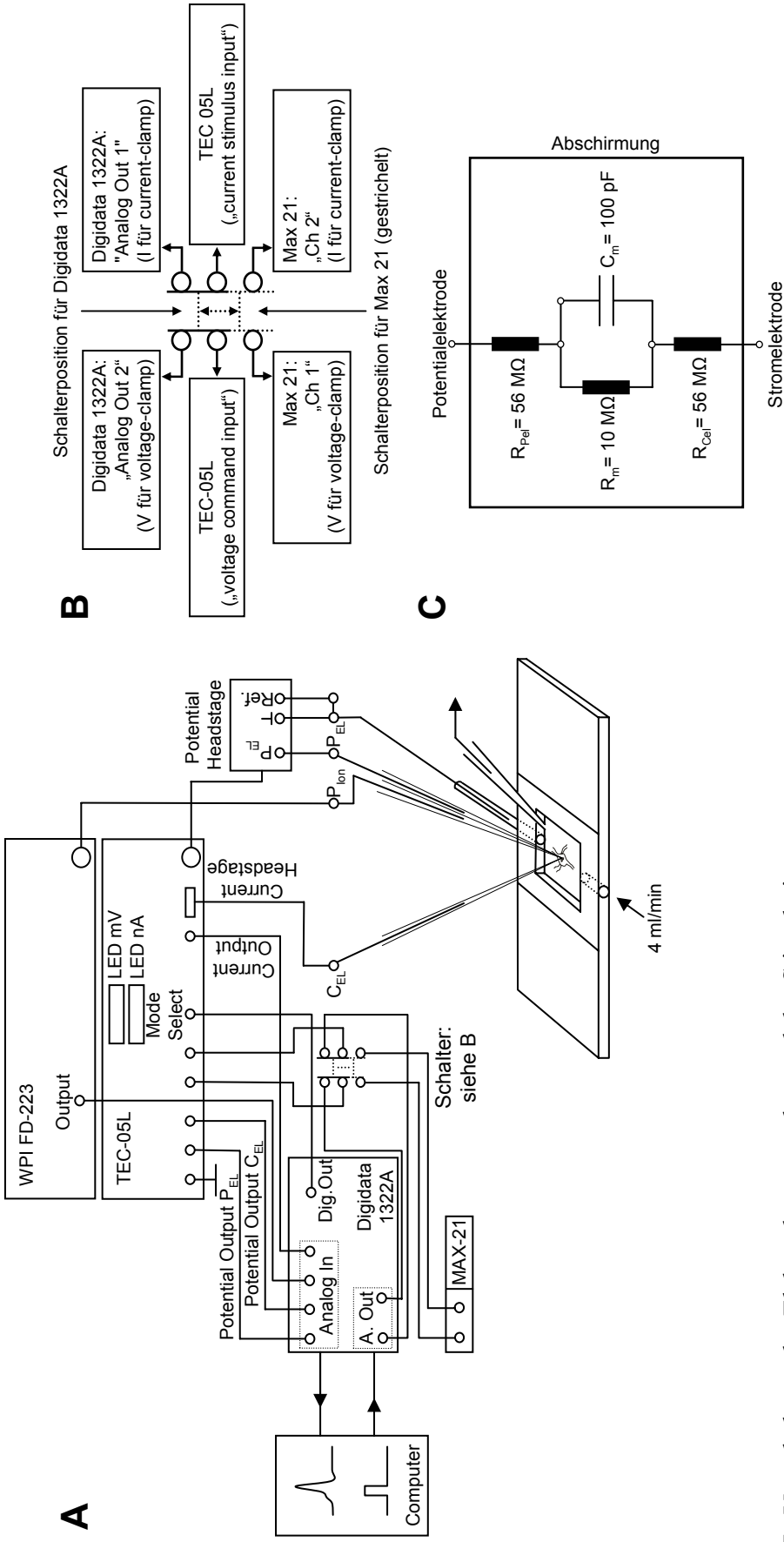
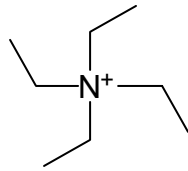
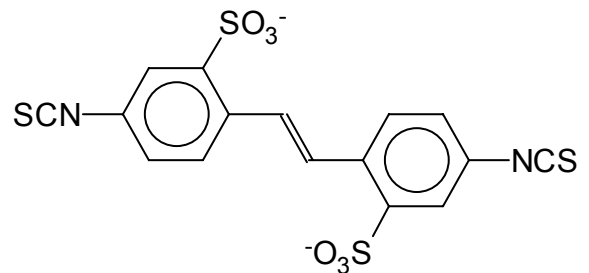


Abb. 7 Verschaltung der Elektrodenverstärker und der Stimulationssysteme

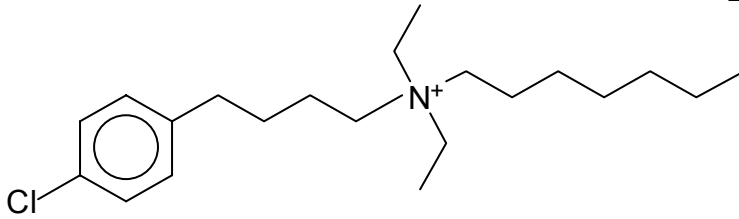
Zur Erfassung der elektrischen Signale wurde ein Zwei-Elektroden *voltage-clamp*-Verstärker (modifizierter TEC-05L, NPI Electronics) sowie ein Verstärker für die ionensensitive Glasmikroelektrode verwendet (FD-223, World Precision Instruments; A). Über einen Analog/Digital-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments) wurden die Daten digitalisiert und an einen Computer geleitet. Injektionsströme oder Haltepotentiale konnten entweder über einen Stimulator (Max21, Zeitz Instruments) eingestellt werden oder in programmierter Folge über den analogen Ausgang (A. Out) des Digidata 1322A. Um diese beiden Stimulationssysteme alternierend verwenden zu können, wurde die in B dargestellte Schaltung verwendet. Die Messapparatur wurde mit einem Zellmodell (C) regelmäßig auf ihre korrekte Funktion geprüft. Die elektrischen Elemente des Zellmodells entsprachen in ihrer Dimension ungefähr den Versuchsbedingungen (R_{pel} = Widerstand der Potentialelektrode, R_m = Membranwiderstand, C_m = Membrankapazität, R_{cel} = Widerstand der Stromelektrode).



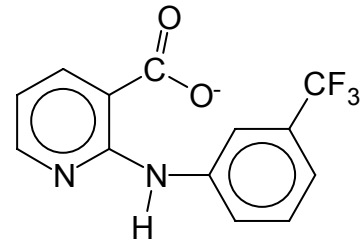
Tetraethylammonium (20 mM)



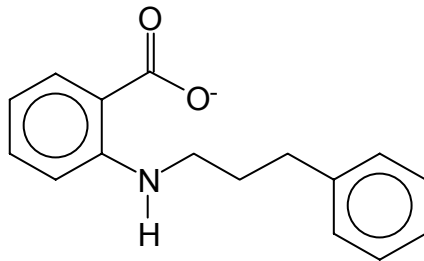
DIDS (0,5 mM)



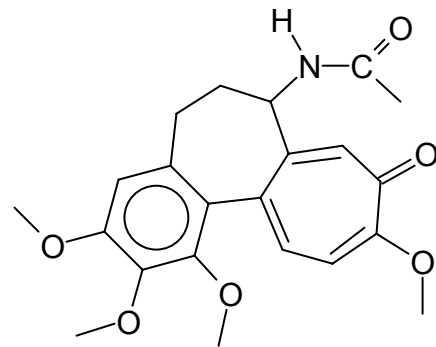
Clofiliumtosylat (1 μ M)



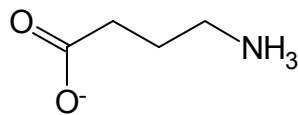
Nifluminsäure (50 μ M)



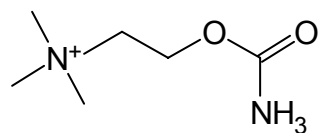
NPPB (50 μ M)



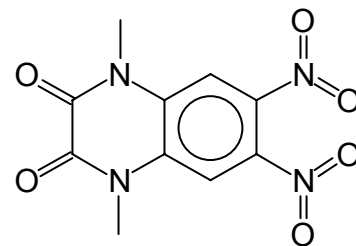
Colchizin (25 μ M)



GABA (0,5 mM)



Carbachol (0,5 mM)



DNQX (20 μ M)

Abb. 8 Strukturformeln der verwendeten Pharmaka mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen.

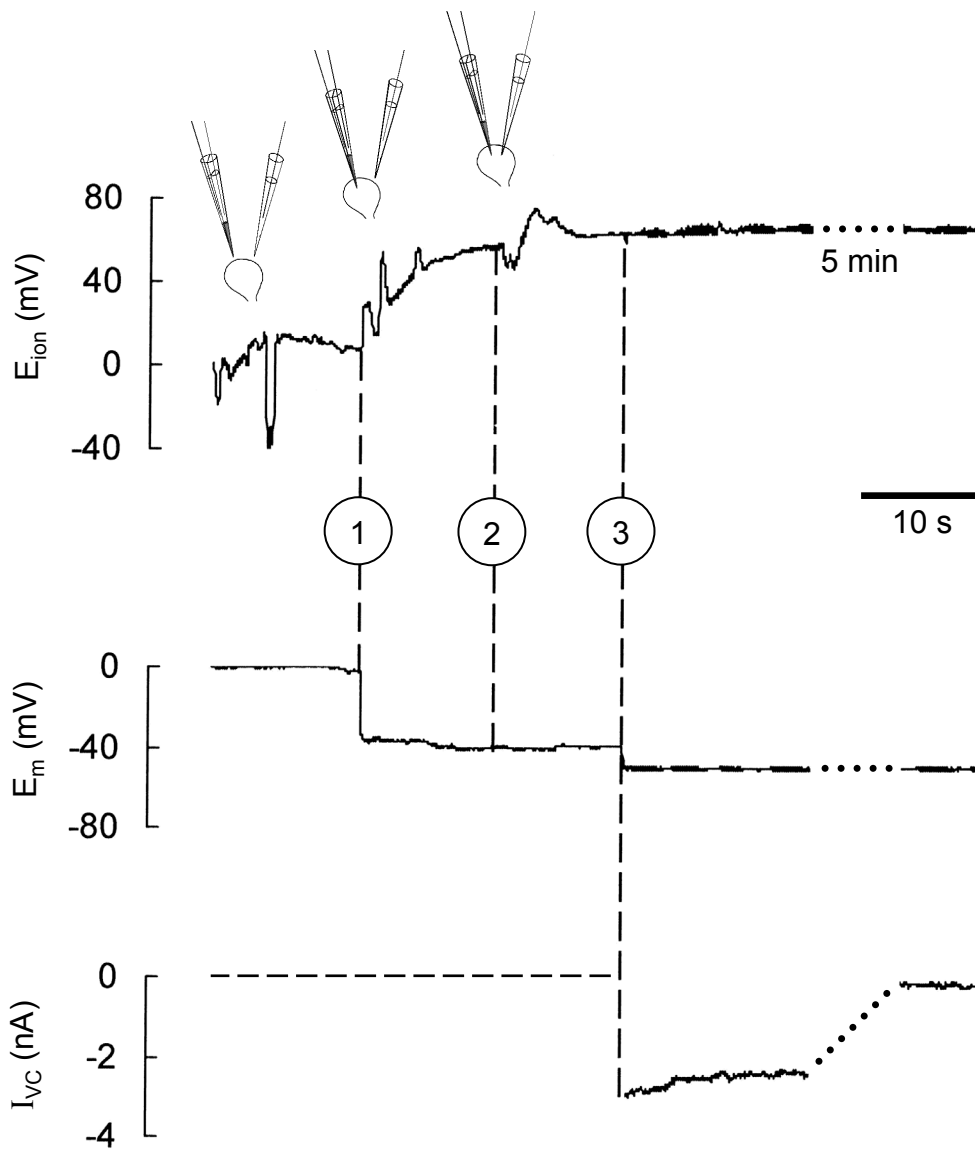


Abb. 9 Ionenpotential (E_{ion}), Membranpotential (E_m) und Haltestrom (I_{VC}) bei Einstich einer K^+ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode und einer elektrolytgefüllten Einkanal-Glasmikroelektrode

Nach dem Einstich der K^+ -sensitiven Elektrode (1) stieg das Ionenpotential (E_{ion}) bedingt durch die hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration um ~ 50 mV an. Gleichzeitig wurde vom Referenzkanal der Elektrode das Membranpotential (E_m) registriert (~ 38 mV). Der Einstich der Einkanal-Elektrode (2) veränderte E_m und E_{ion} kaum. Die Klemmung von E_m auf -50 mV durch die Einkanal-Elektrode (3) erforderte anfangs einen Klemmstrom (I_{VC}) von ~ 3 nA. Anschließend nahm I_{VC} erheblich ab und betrug nach 5 min nur noch $\sim 0,2$ nA. E_{ion} wurde durch die Klemmung von E_m nicht signifikant beeinflusst ($E_h = -50$ mV: $67,5 \pm 14,7$ mV, $n = 15$; $E_h = -70$ mV: $60,5 \pm 12,0$ mV, $n = 17$).

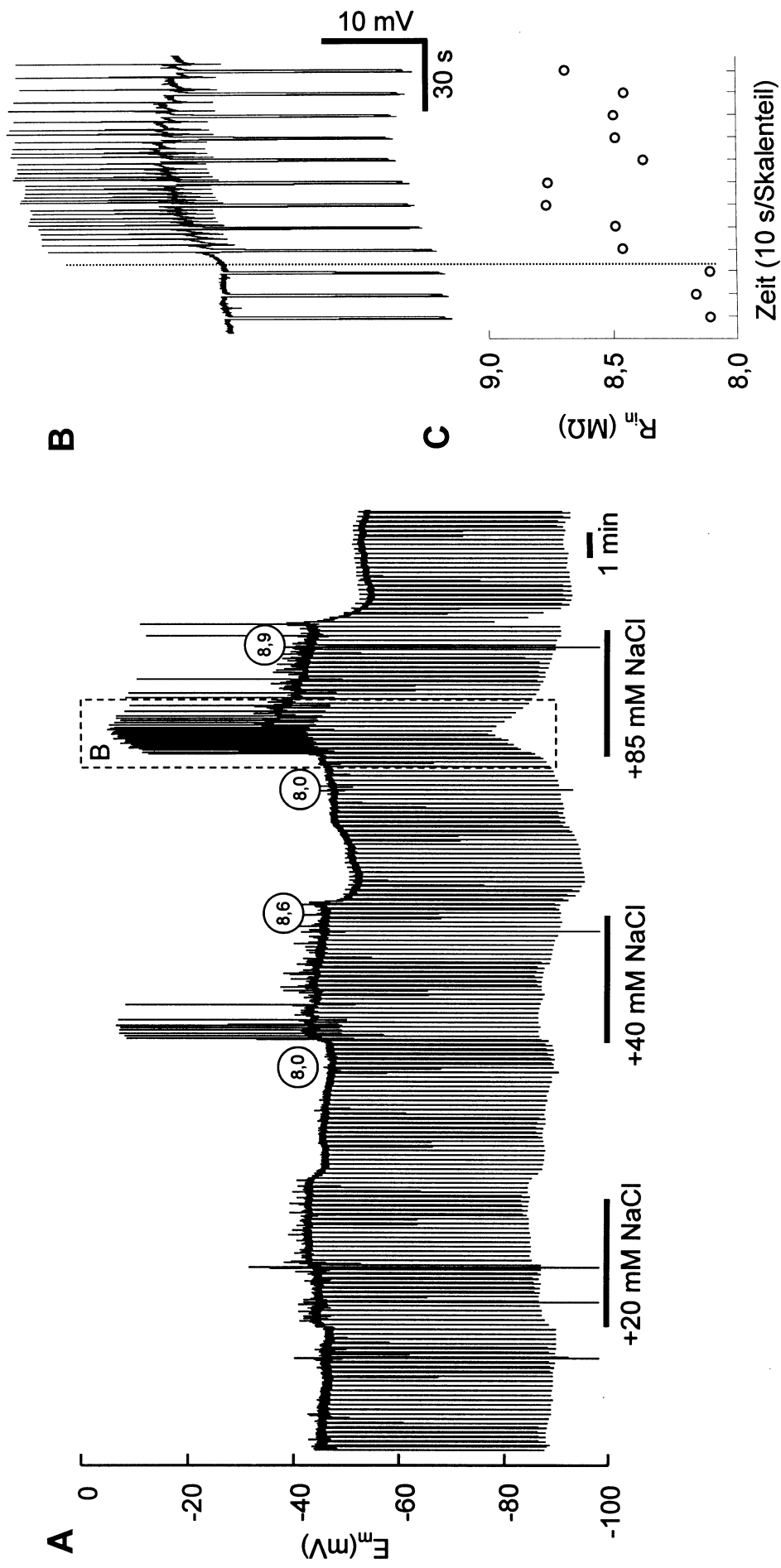


Abb. 10 Wirkung erhöhter extrazellulärer Osmolarität auf E_m und R_{in}

R_{in} wurde anhand der durch negative Strompulse hervorgerufenen Membranhypolarisation bestimmt (A; Strompuls -5 nA, Pulsdauer 1 s, Pulsabstand 10 s; die Zahlen in den Kreisen geben R_{in} in $M\Omega$ an). Die Applikation einer schwach hypertonen Lösung (+20 mM NaCl) bewirkte eine leichte Membranhypolarisation aber keine Änderung von R_{in} . Stärker hypertone Lösungen (+40, +85 mM NaCl) führten zu einer stärkeren Membranhypolarisation, der Bildung von Aktionspotentialen sowie zur Erhöhung von R_{in} . Nach Rückwechsel in isotonische Lösung trat jeweils eine transiente Membranhypolarisation auf. Der markierte Bereich der Registrierung ist in B zeitlich gedehnt dargestellt. Der anhand der Spur in B bestimmte R_{in} ist in C gegen die Zeit aufgetragen. Die R_{in} -Zunahme erfolgte zeitgleich mit der Membranhypolarisation.

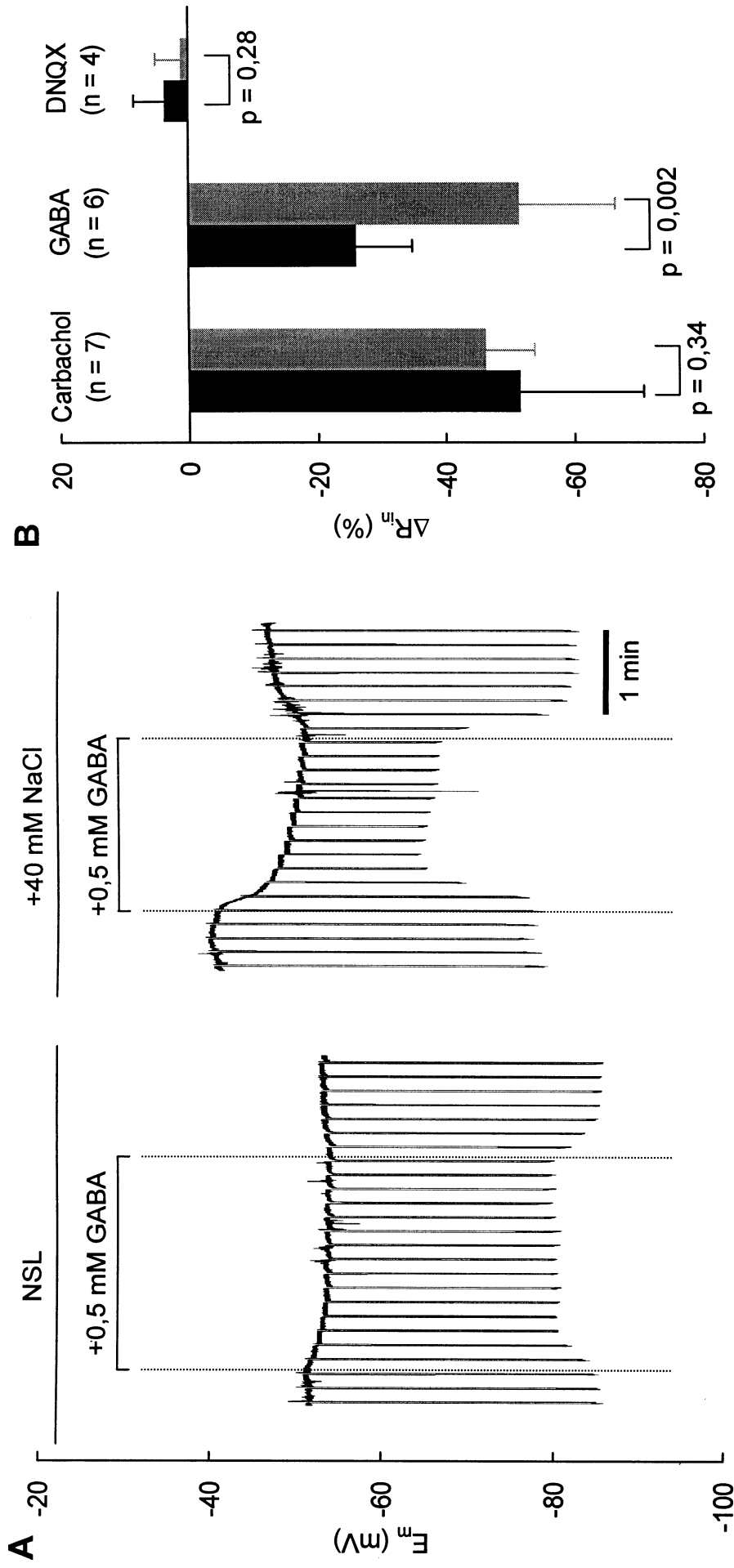


Abb. 11 Einfluss erhöhter extrazellulärer Osmolalität auf die Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren

- A) Registrierbeispiele zur Wirkung von GABA auf E_m und R_{in} in NSL und in hypertonischer Lösung (+40 mM NaCl). Die Wirkung von GABA auf beide Parameter war in hypertonischer Lösung deutlich verstärkt.
- B) Änderungen von R_{in} bei Applikation von Carbachol (0,5 mM), GABA (0,5 mM) und DNQX (20 μ M) in NSL (schwarze Balken) und in hypertonischer Lösung (graue Balken). Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 4, 6$ bzw. 7 Versuchen. Unter hypertonischen Bedingungen war die Wirkung von GABA auf R_{in} signifikant verstärkt, während die Wirkungen von Carbachol und DNQX tendenziell vermindert waren.

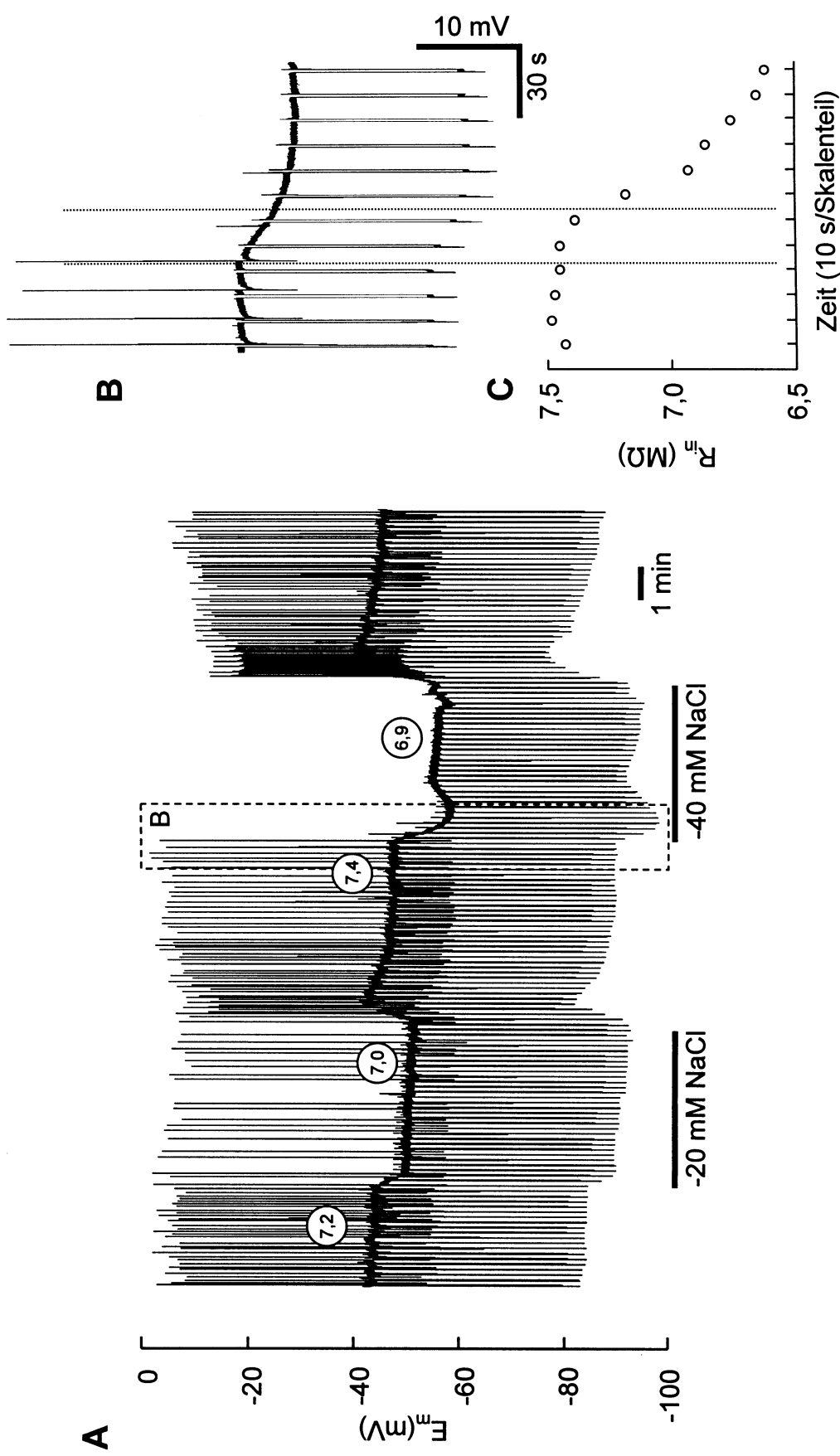


Abb. 12 Wirkung verminderter extrazellulärer Osmolalität auf E_m und R_{in}

Die Applikation einer schwach hypotonischen Lösung (-20 mM NaCl; A) bewirkte eine leichte Membranhyperpolarisation, eine R_{in} -Abnahme sowie eine Abnahme der Frequenz spontaner Aktionspotentiale. Die Applikation einer stärker hypotonischen Lösung (-40 mM NaCl) hatte eine stärkere Membranhyperpolarisation und R_{in} -Abnahme sowie die vollständige Unterdrückung der spontanen Aktionspotentiale zur Folge. Nach Rückwechsel in isotonische Lösung trat jeweils eine transiente Depolarisation und die verstärkte Bildung von Aktionspotentialen auf. Der markierte Bereich ist in B zeitlich gedehnt dargestellt. Der anhand der Spur in B bestimmte R_{in} ist in C gegen die Zeit aufgetragen. Die Abnahme von R_{in} war gegenüber der Membranhyperpolarisation um ~20 s verzögert. Weitere Einzelheiten siehe Abb. 10.

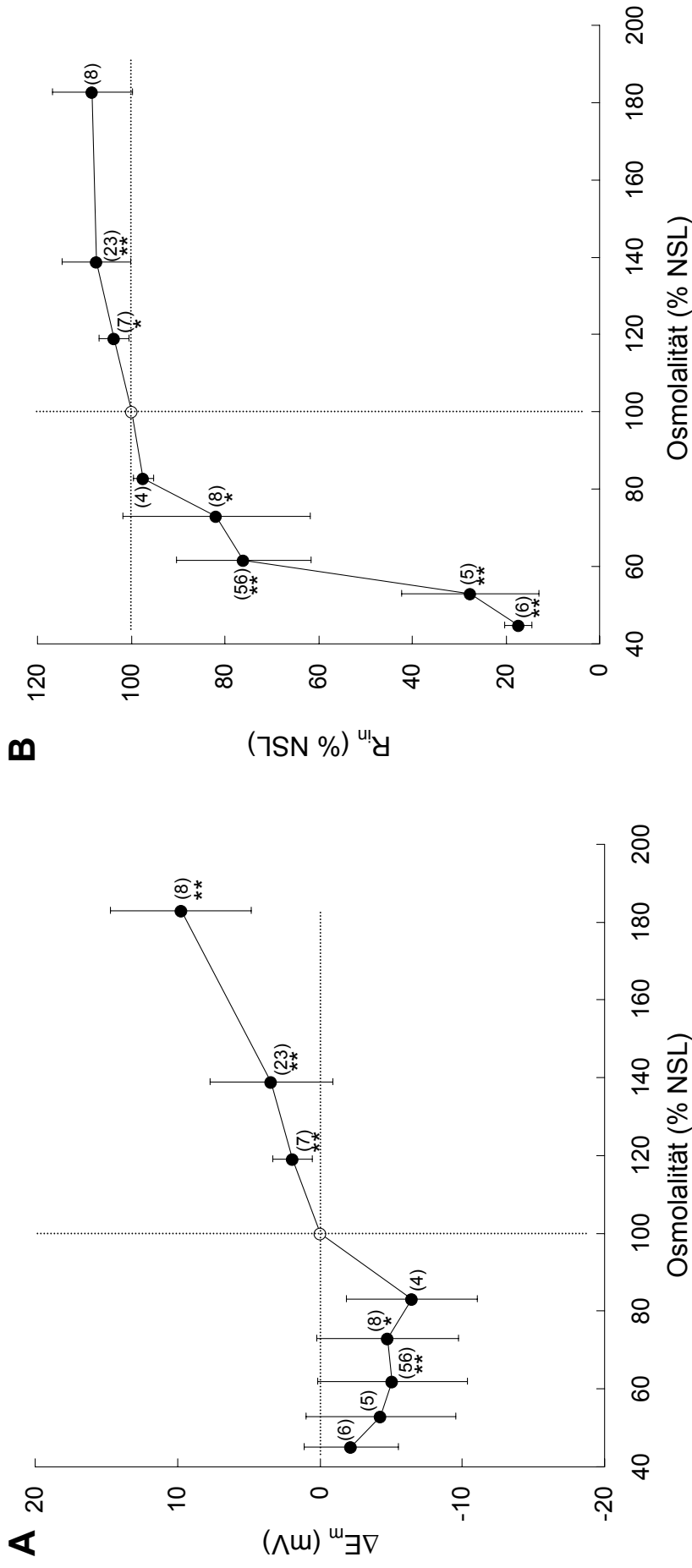


Abb. 13 Einfluss veränderter extrazellulärer Osmolalität auf E_m und R_{in}

- A) Die Erhöhung der Osmolalität bewirkte eine kontinuierlich zunehmende Membrandepolarisation, die jedoch mit abnehmender Osmolalität immer geringer wurde.
- B) Die Erhöhung der extrazellulären Osmolalität führte zu einer vergleichsweise kleinen Zunahme von R_{in} , die Verminderung zu einer starken Abnahme, insbesondere bei Osmolalitäten kleiner als 60 %. Die nach Änderung der extrazellulären Osmolalität erhaltenen Werte für R_{in} wurden auf den zuvor in NSL bestimmten Wert normiert.
- Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 4$ bis 56 Messungen. Sternchen markieren signifikante (*, $p < 0,05$) bzw. hoch-signifikante (**, $p < 0,01$) Veränderungen. Zur Erhöhung der extrazellulären Osmolalität wurde die NaCl-Konzentration um 20, 40 bzw. 85 mM erhöht und zur Verminderung um 20, 30, 40, 50 bzw. 59 mM reduziert. Die Daten aus A und B stammen aus identischen Messungen.

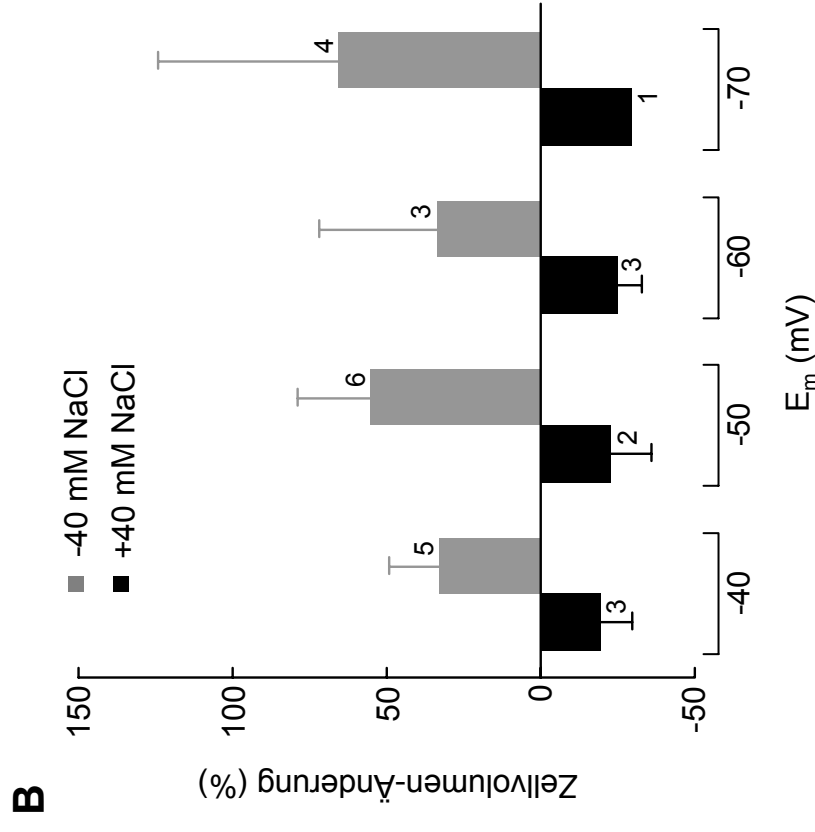
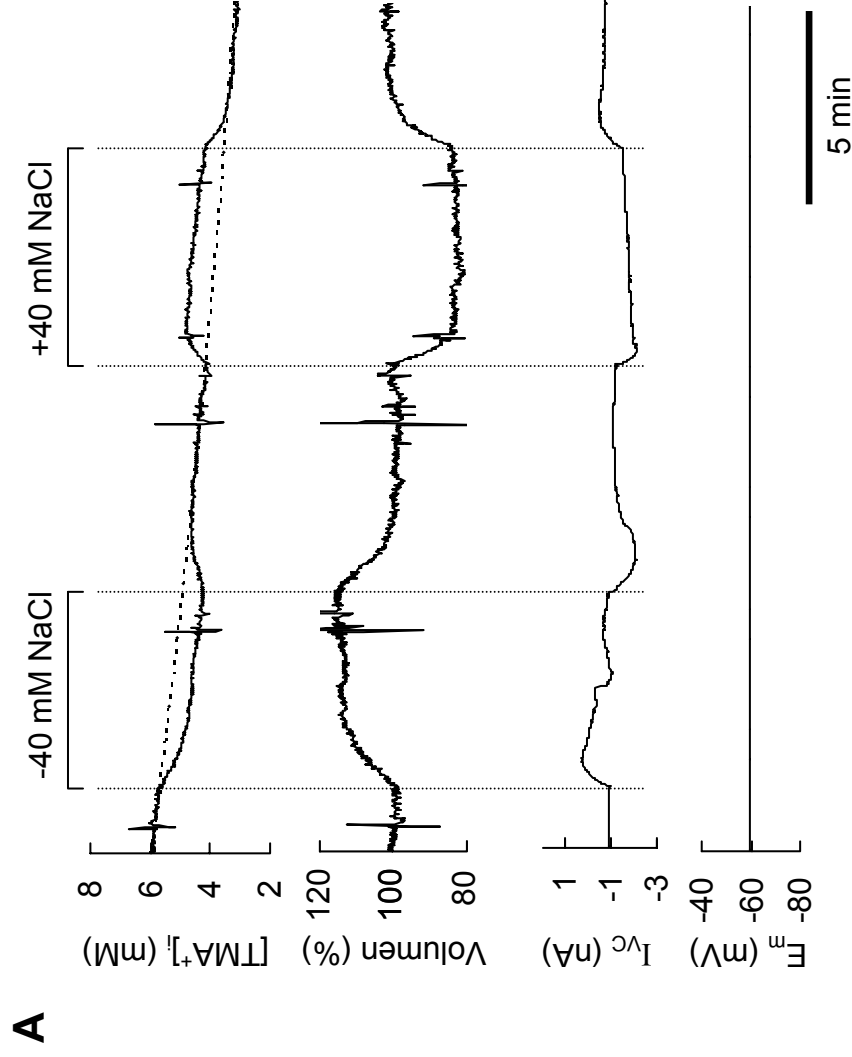


Abb. 14 Einfluss von E_m auf die Änderung des Zellvolumens nach Veränderung der extrazellulären Osmolarität

A) Wirkung anisotonischer Bedingungen auf $[TMA]_i$, das Zellvolumen und den Membranstrom (I_{vc}) bei $E_m = -60$ mV. $[TMA^+]_i$ nahm während des gesamten Experiments kontinuierlich ab (gestrichelte Linie). In hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) trat ein zusätzlicher, reversibler $[TMA^+]_i$ -Abfall auf, in hypertotonischer Lösung ein $[TMA^+]_i$ -Anstieg. Die Änderungen von $[TMA^+]_i$ zeigen eine Zunahme bzw. eine Abnahme des Zellvolumens an. I_{vc} verschob sich in hypotonischer Lösung reversibel in positive Richtung und in hypertotonischer Lösung in negative Richtung.

B) Änderungen des Zellvolumens nach Veränderung der extrazellulären Osmolarität bei unterschiedlichem E_m . Ein signifikanter Einfluss von E_m auf die Änderung des Zellvolumens war nicht erkennbar. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 2$ bis 6 Experimenten.

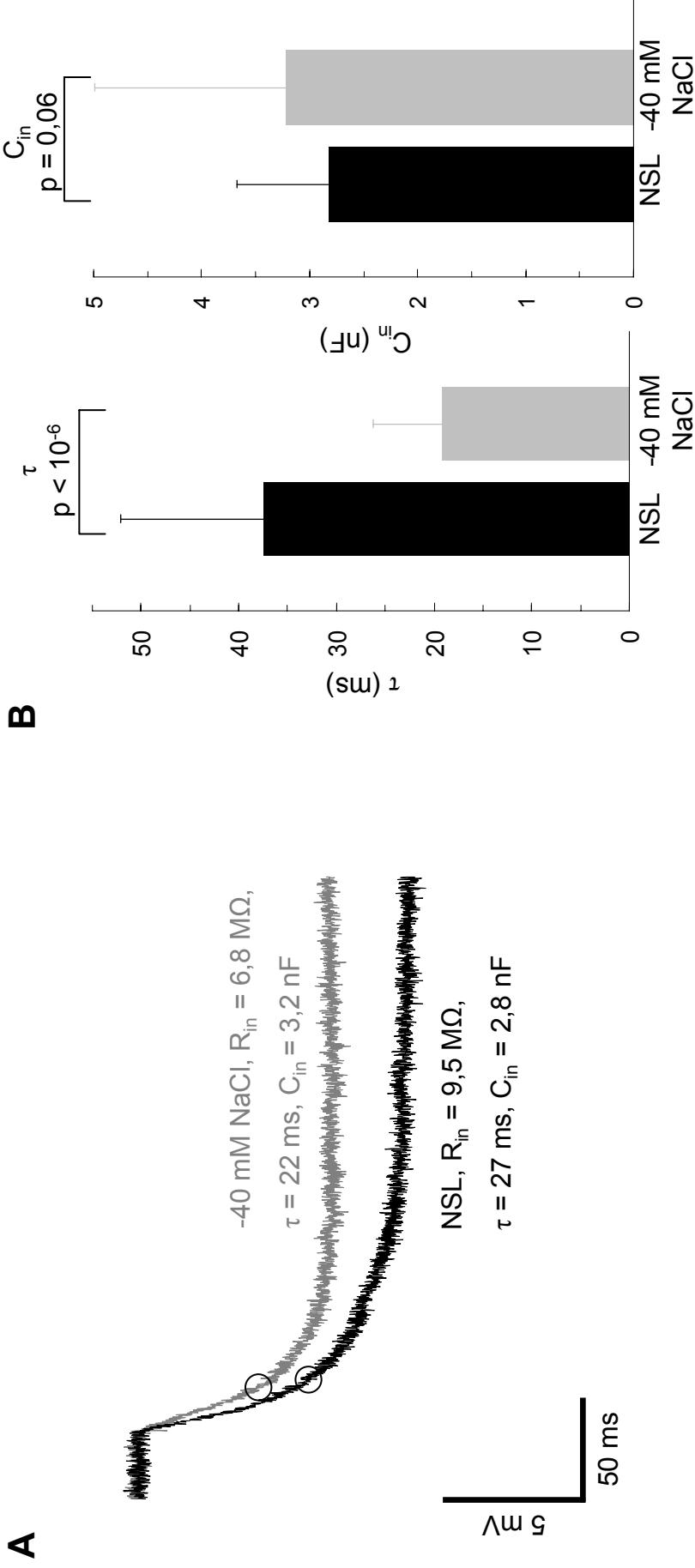


Abb. 15 Einfluss verminderter extrazellulärer Osmolarität auf die Membrankapazität

- A) Registrierbeispiele von E_m -Verschiebungen unter isotonischen (NSL) und hypotonischen Bedingungen (-40 mM NaCl), induziert durch die Injektion eines hyperpolarisierenden Strompulses (-1 nA für 1 s). Die Membranzeitkonstante (τ) wurde über den Zeitpunkt erhalten, zu dem die Hyperpolarisation zu 63 % abgeschlossen war (Kreise). Anhand der Amplitude der E_m -Verschiebung am Ende des Pulses wurde R_{in} bestimmt und aus R_{in} und τ die Membrankapazität (C_{in}).
- B) Statistische Auswertung. Unter hypotonischen Bedingungen sank τ von $37 \pm 15 \text{ ms}$ auf $19 \pm 7 \text{ ms}$ während C_{in} von $2,8 \pm 0,8 \text{ nF}$ auf $3,2 \pm 1,8 \text{ nF}$ anstieg. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 60$ Experimenten.

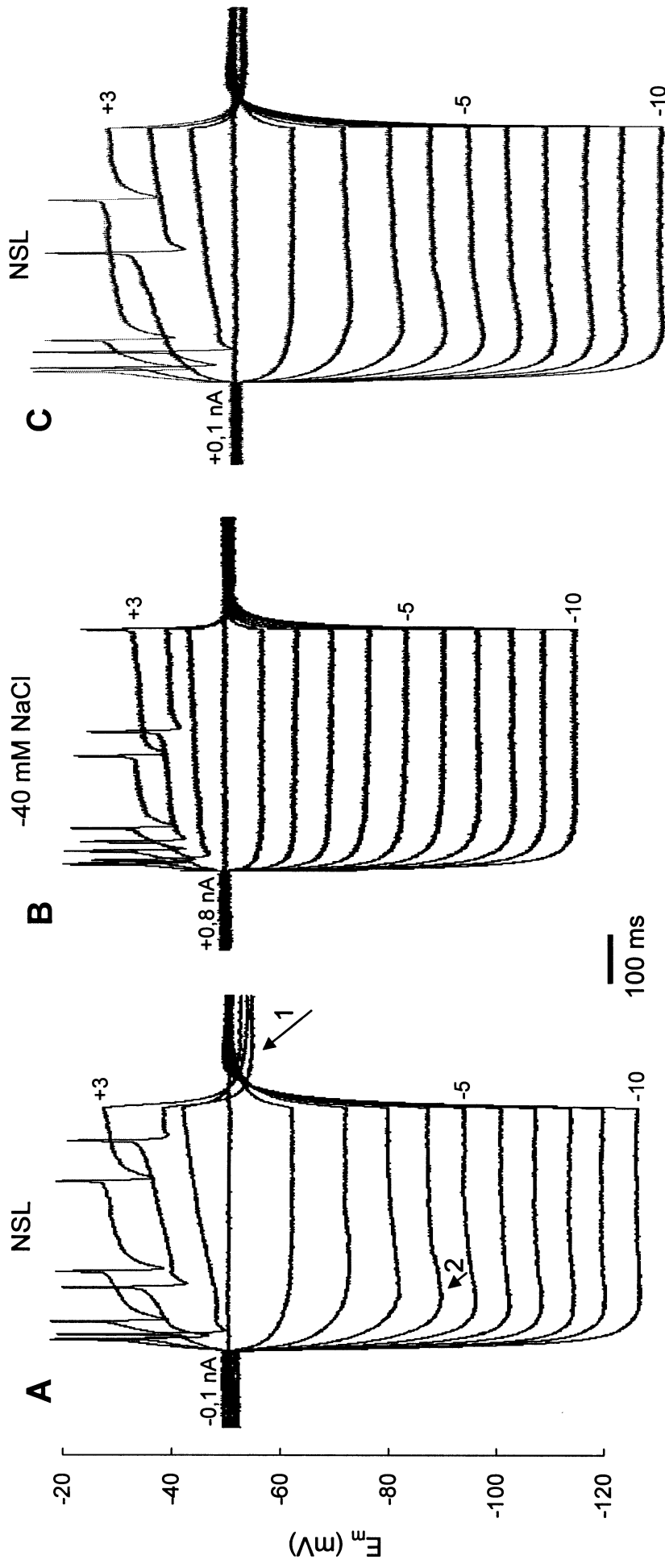


Abb. 16 Strominduzierte E_m -Verschiebungen in NSL und in hypotonischer Lösung

Die durch Strompulse von -10 bis +3 nA in 1 nA-Schritten induzierten E_m -Verschiebungen wurden jeweils überlagert dargestellt (Pulsdauer: 0,5 s, Pulsintervall: 5 s). Vor jeder Messung wurde E_m durch konstante Strominjektion von -0,1, +0,8 bzw. +0,1 nA auf ~ -50 mV gebracht.

- A) Strominduzierte E_m -Verschiebungen in NSL. Positive Strompulse lösten Aktionspotentiale aus, nach Beendigung der Strominjektion trat eine Membranhyperpolarisation auf (Pfeil 1). Negative Strompulse führten durch die Aktivierung von I_h -Kanälen zu sog. "voltage-sags" (Pfeil 2).
- B) Nach 5 min in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) waren die Amplituden der Aktionspotentiale und die E_m -Verschiebungen vermindert (siehe Abb. 12). Voltage-sags waren nicht zu erkennen.
- C) Die Veränderungen in hypotonischer Lösung waren innerhalb von 5 min vollständig reversibel.

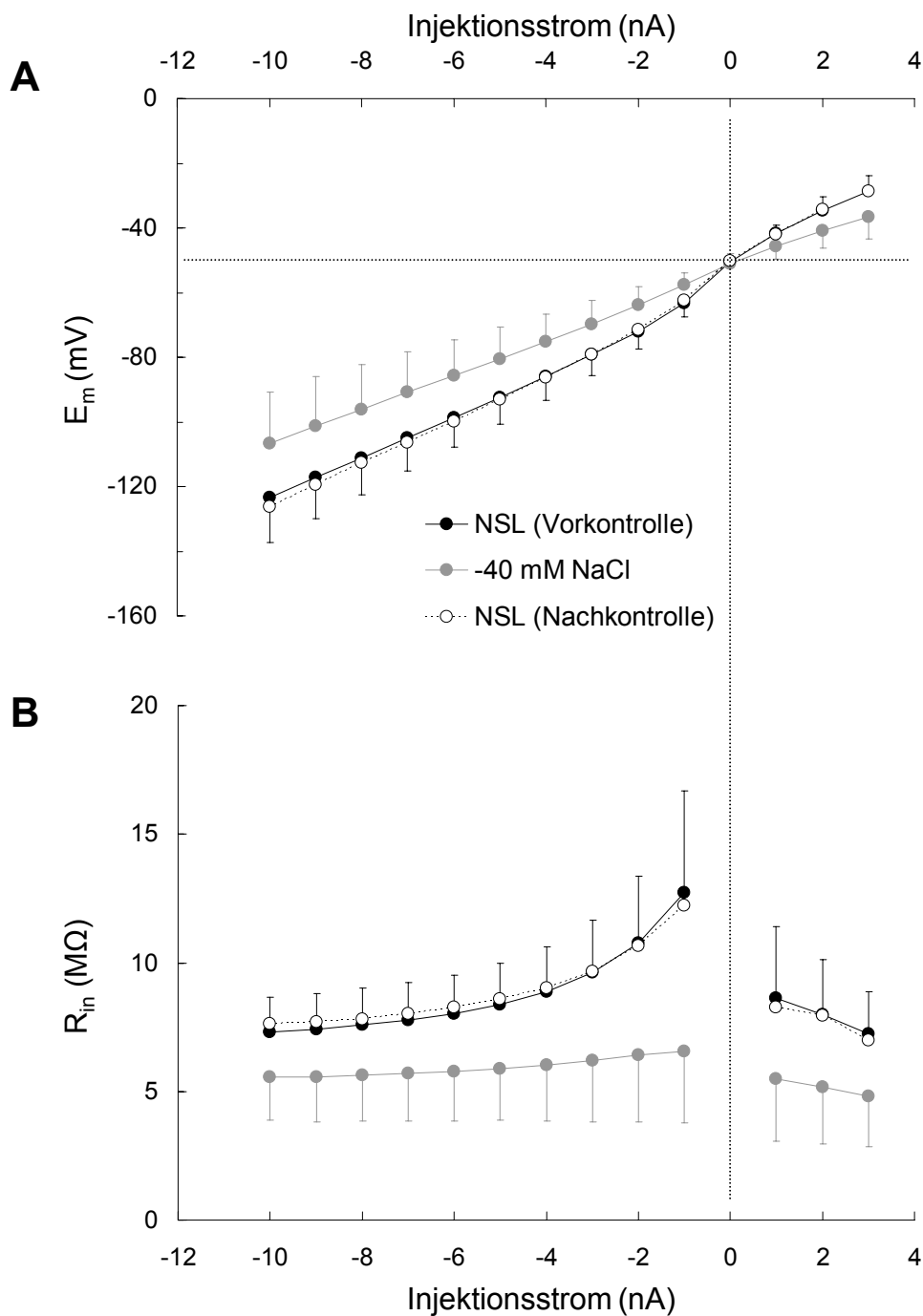


Abb. 17 Wirkung verminderter extrazellulärer Osmolalität auf den Zusammenhang zwischen Injektionsstrom und E_m bzw. R_{in}

A) In NSL war die Strom-Spannungsbeziehung leicht sigmoid, nach 5 min in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) dagegen nahezu linear. Die strominduzierten E_m -Verschiebungen und damit R_{in} waren in hypotonischer Lösung insgesamt vermindert.

B) In NSL war R_{in} bei kleinen Injektionsströmen, d. h. in Nähe des Ruhepotentials, am größten und fiel bei größeren Injektionsströmen zunehmend ab. Unter hypotonischen Bedingungen war R_{in} durchweg vermindert, wobei die Abnahme in Nähe des Ruhepotentials am größten war. Zur Bestimmung von R_{in} siehe Abb. 10.

Datenpunkte in A und B sind Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 61$ Messungen. Die Wirkung verminderter extrazellulärer Osmolalität auf die Strom-Spannungsbeziehung und R_{in} war vollständig reversibel.

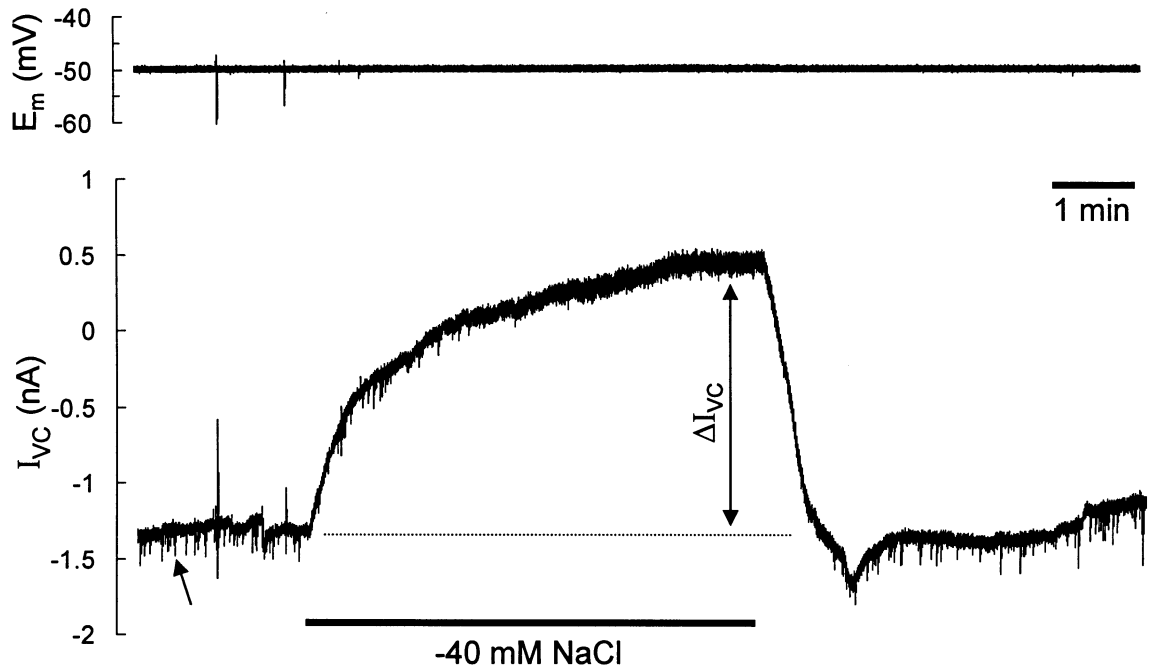
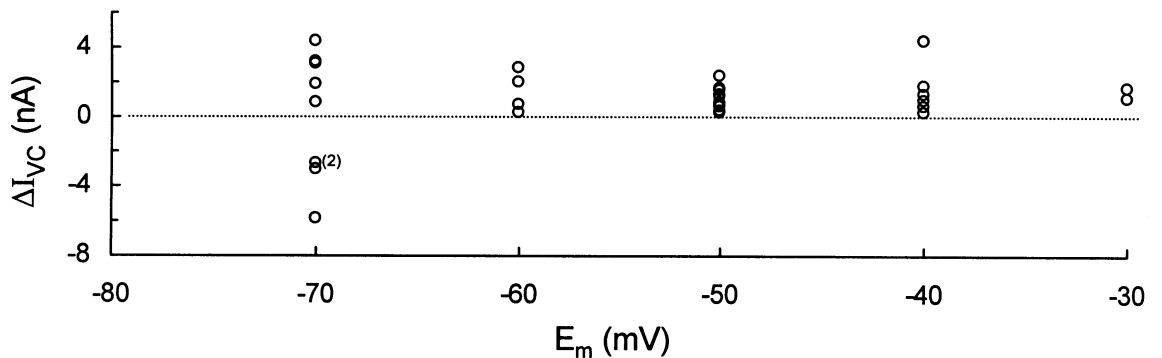
A**B**

Abb. 18 Einfluss hypotonischer Bedingungen auf den Membranstrom (I_{VC})

A) Die Verminderung der extrazellulären Osmolalität (-40 mM NaCl) induzierte einen auswärts gerichteten Strom (ΔI_{VC}), der zunächst schnell, dann zunehmend langsamer anstieg und nach Rückkehr zu NSL rasch wieder abklang. Die negativen Stromspitzen (Pfeil) sind möglicherweise EPSCs, die unter hypotonischen Bedingungen reversibel unterdrückt werden.

B) Zusammenhang zwischen ΔI_{VC} und E_m . Zwischen $E_m = -60$ und -30 mV war eine E_m -Abhängigkeit von ΔI_{VC} nicht erkennbar. Bei $E_m = -70$ mV war ΔI_{VC} bei 4 von 9 Zellen einwärts gerichtet.

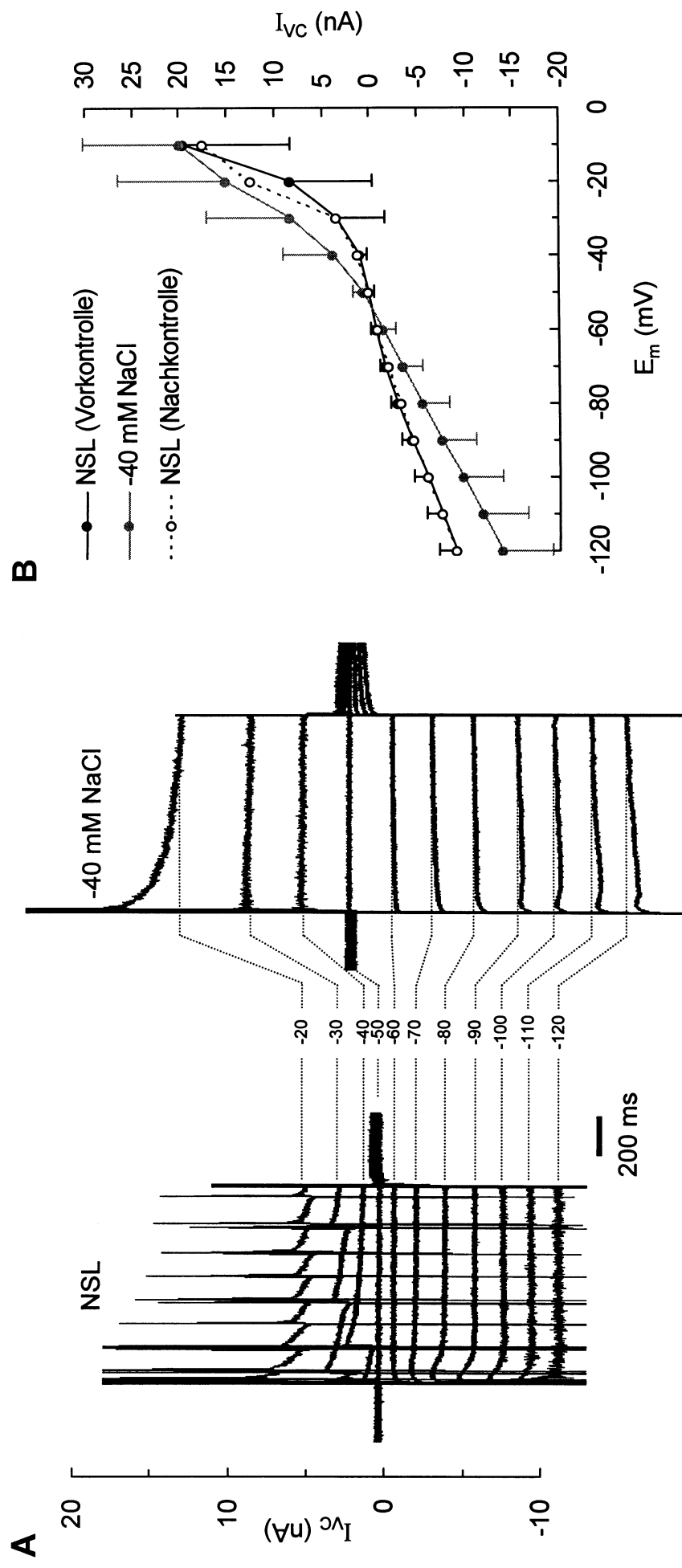


Abb. 19 Membranströme (I_{VC}) bei sprunghafter Verstellung von E_m in NSL und bei verminderter extrazellulärer Osmolarität

- A) Überlagerte I_{VC} zur Klemmung von E_m auf -120 bis -20 mV für jeweils 1 s (Pulsabstand 5 s). Aktionspotentiale, die in nicht geklemmten Zellbereichen generiert wurden, sind als Stromspitzen zu erkennen, die zuerst in negative (Na^+ -Einstrom) und danach in positive Richtung (K^+ -Ausstrom) verlaufen. Unter hypotonischen Bedingungen (-40 mM NaCl) war I_{VC} insgesamt vergrößert und Aktionspotentiale traten nicht mehr auf.
- B) Strom-Spannungskennlinien in NSL und bei verminderter extrazellulärer Osmolarität. Die Steigungszunahme der Kennlinie in hypotonischer Lösung war vollständig reversibel. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 10$ bis 35 Messwerten.

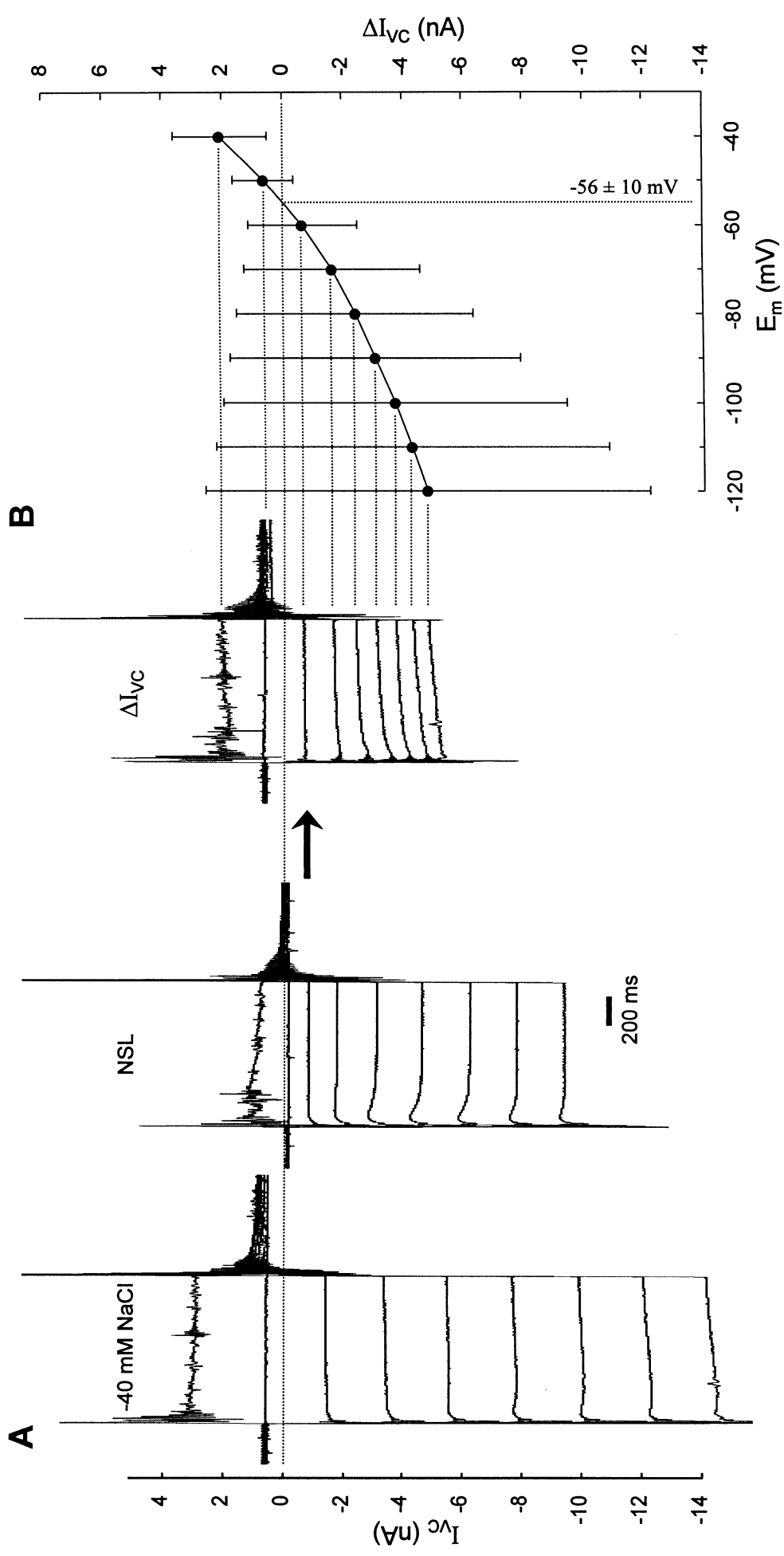


Abb. 20 Bestimmung des schwellungsaktivierten Membranstroms (ΔI_{VC})

Die Spuren in A sind Mittelwerte aus 25 Einzelregistrierungen und wurden zur Verringerung von Störsignalen gefiltert (50 Hz, 8-Pole Bessel). ΔI_{VC} wurde bestimmt, indem von den Klemmströmen in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) die entsprechenden Klemmströme in NSL abgezogen wurden. Aus den Strom-Spannungskennlinien (Mittelwerte \pm S.D. in B) ergab sich das Umkehrpotential von ΔI_{VC} zu -56 ± 10 mV ($n = 37$). Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Abb. 19.

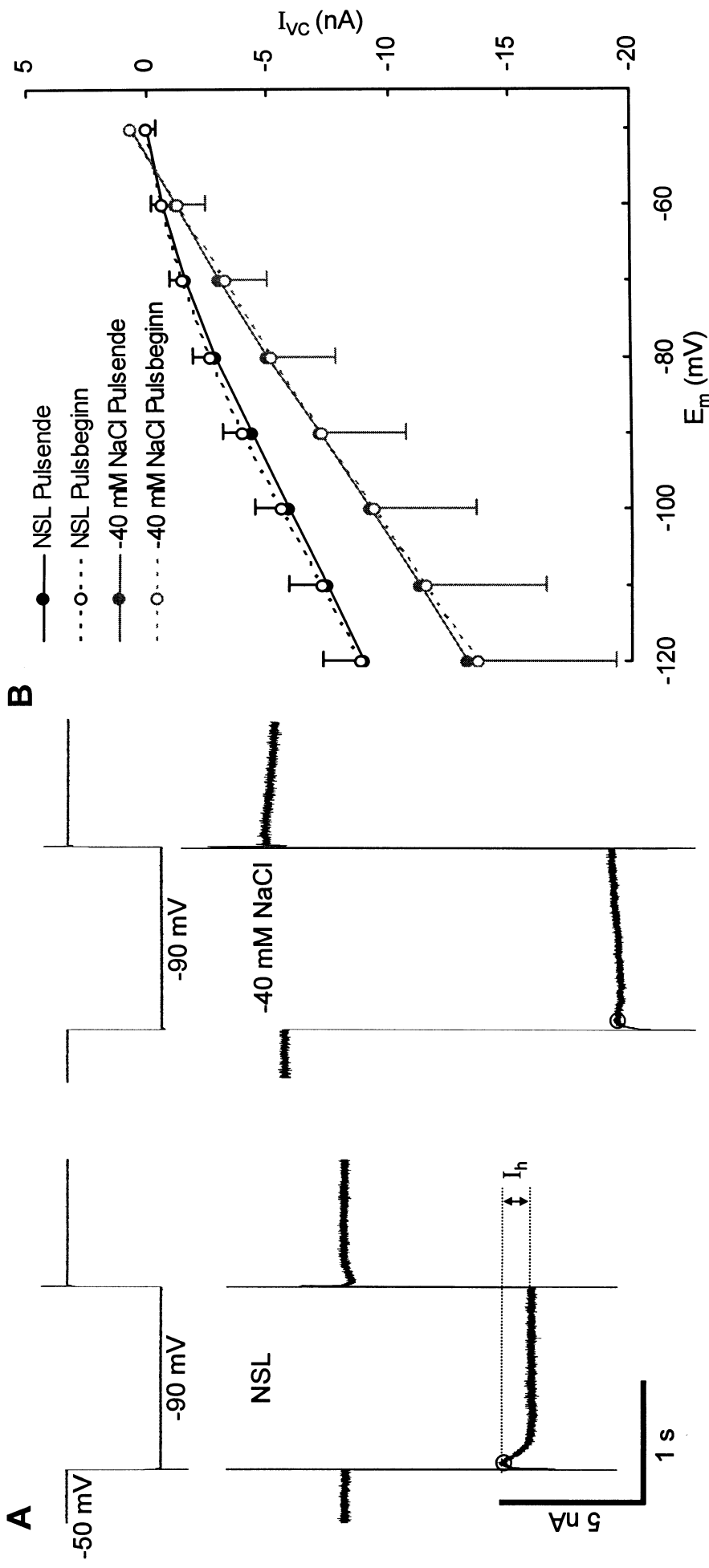


Abb. 21 Beitrag des I_h zu I_{vc} bei verminderter extrazellulärer Osmolalität

- A) Bei 31 von 47 Retzius-Neuronen trat I_h auf, erkennbar an der Zunahme von I_{vc} während der Klemmung von E_m auf Werte negativer als -50 mV. In hypotonischer Lösung war I_h unterdrückt.
- B) Strom-Spannungskennlinien. Die gestrichelten Kurven zeigen jeweils den zu Beginn der Klemmung gemessenen I_{vc} (Kreise in A), die durchgezogenen Kurven den I_{vc} am Ende der Klemmung. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 23$ Messwerten.

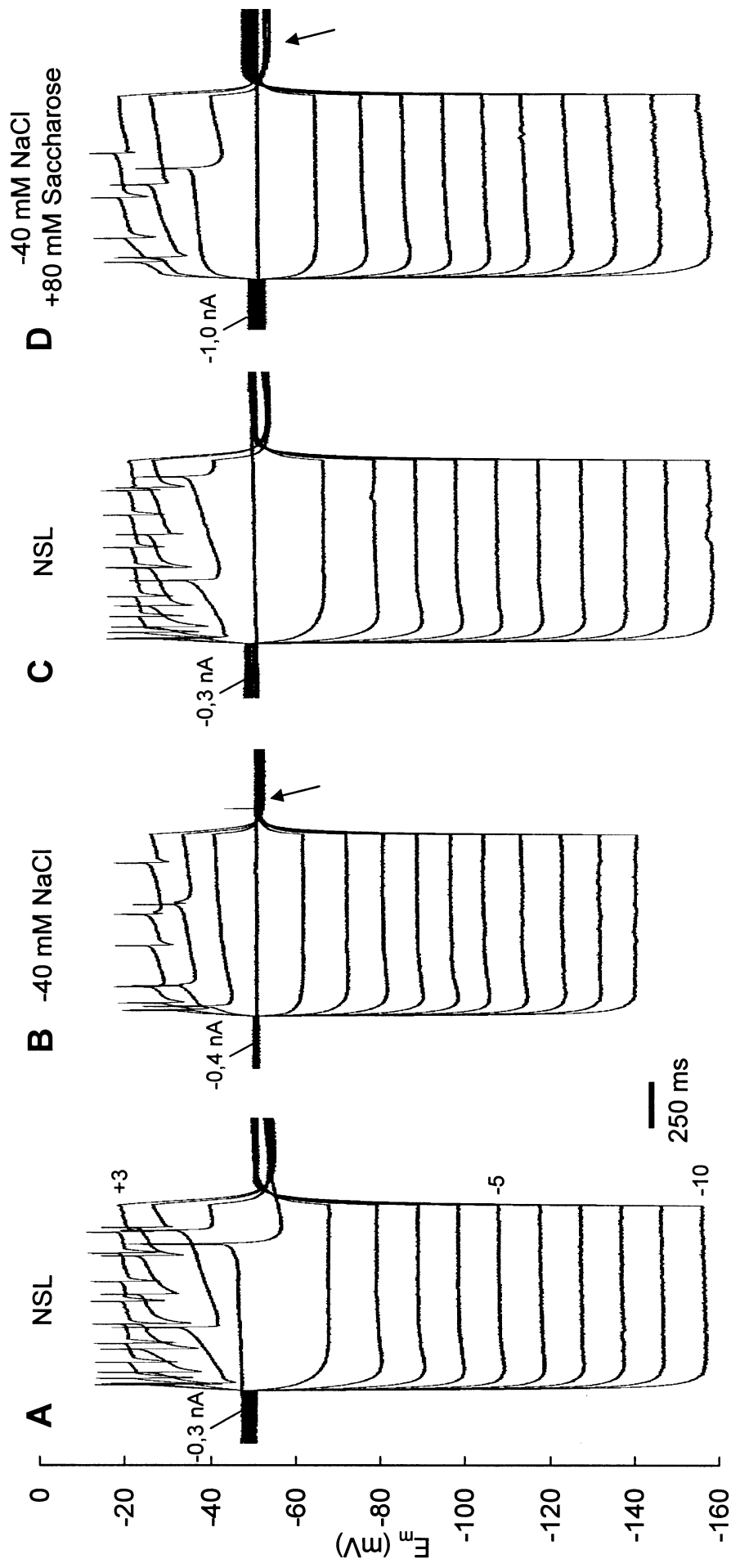


Abb. 22 Einfluss von Ionenstärke bzw. NaCl-Konzentration auf die strominduzierten E_m -Verschiebungen

Unter hypotonischen Bedingungen (-40 mM NaCl) waren die strominduzierten E_m -Verschiebungen sowie Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale reduziert (A, B). Außerdem blieb die Membranhypolarisation nach Injektion positiver Ströme aus (Pfeil; siehe Abb. 16). Nach Erholung in NSL (C) wurde eine isotonische Badlösung appliziert, in der 40 mM NaCl durch 80 mM Saccharose ersetzt war (D). In dieser Lösung entsprachen die strominduzierten E_m -Verschiebungen denen in NSL. Insbesondere blieb die Membranhypolarisation nach Injektion positiver Ströme erhalten (Pfeil). Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale waren jedoch wie in hypotonischer Lösung reduziert. Weitere experimentelle Details siehe Abb. 16.

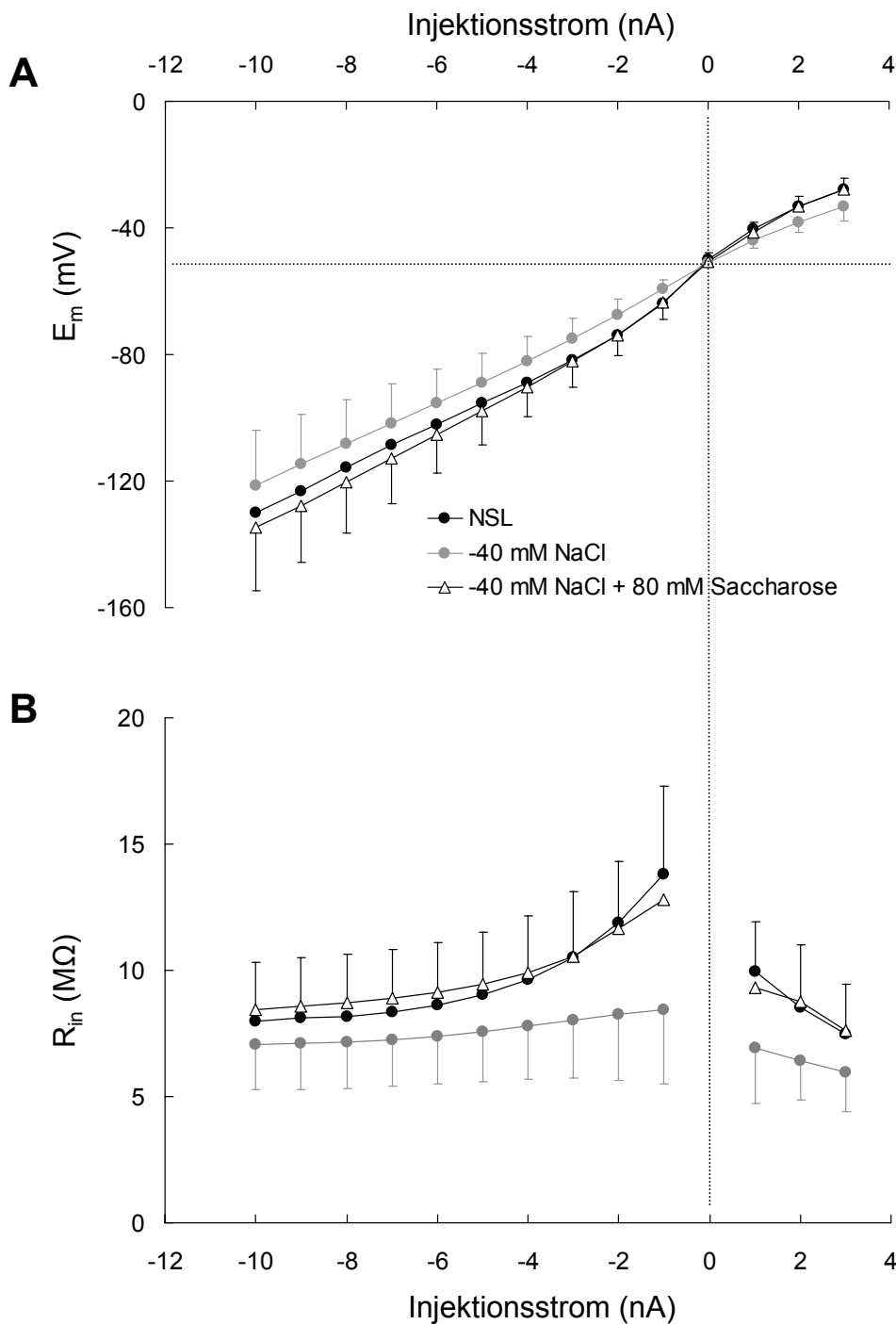


Abb. 23 Einfluss von Ionenstärke bzw. NaCl-Konzentration auf den Zusammenhang zwischen Injektionsstrom und E_m bzw. R_{in}

A) Die Strom-Spannungsbeziehung war nach Austausch von 40 mM NaCl gegen 80 mM Saccharose kaum verändert. Bei hohen Injektionsströmen waren die E_m -Verschiebungen sogar tendenziell verstärkt.

B) Entsprechend wurde R_{in} durch den Austausch von NaCl gegen Saccharose kaum beeinflusst. Bei großen negativen Strömen war R_{in} sogar geringfügig vergrößert.

Datenpunkte in A und B sind Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 7$ Messungen. Versuchsaufbau siehe Abb. 22.

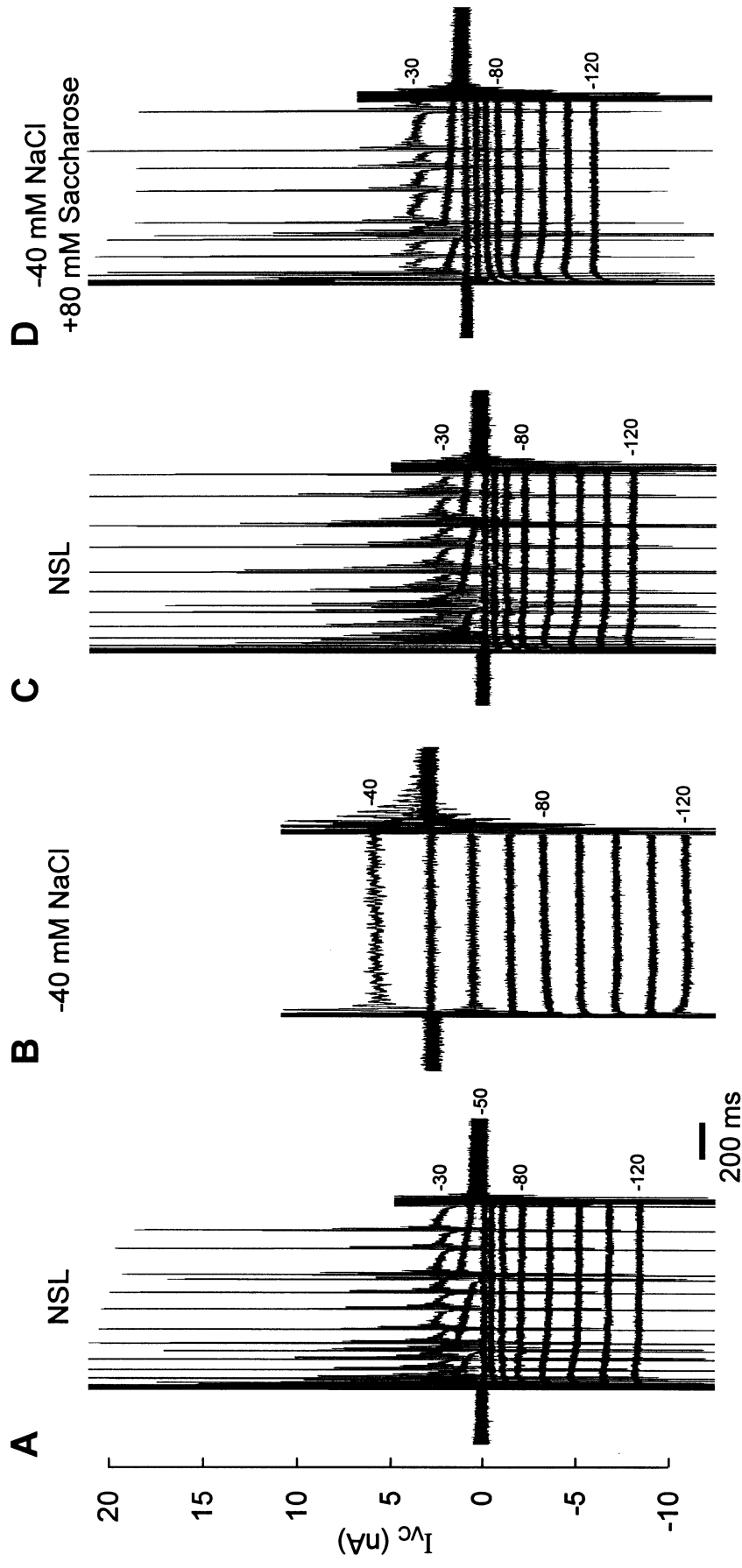


Abb. 24 Einfluss von Ionenstärke bzw. NaCl-Konzentration auf den I_{Vc} bei sprunghafter Verstellung von E_m

Unter hypotonischen Bedingungen (-40 mM NaCl) war I_{Vc} zur Klemmung von E_m auf -120, -110 ... -30 mV erhöht (A, B); der I_{Vc} für -30 mV ist in B nicht gezeigt). Nach Erholung in NSL (C, siehe Abb. 19 B) wurde eine isotonische Badlösung appliziert, in der 40 mM NaCl durch 80 mM Saccharose ersetzt war (D). In dieser Lösung war I_{Vc} gegenüber NSL leicht vermindert. Die Stromspitzen bei Klemmung auf E_m positiver -50 mV wurden von Aktionspotentialen hervorgerufen. Weitere experimentelle Details siehe Abb. 19.

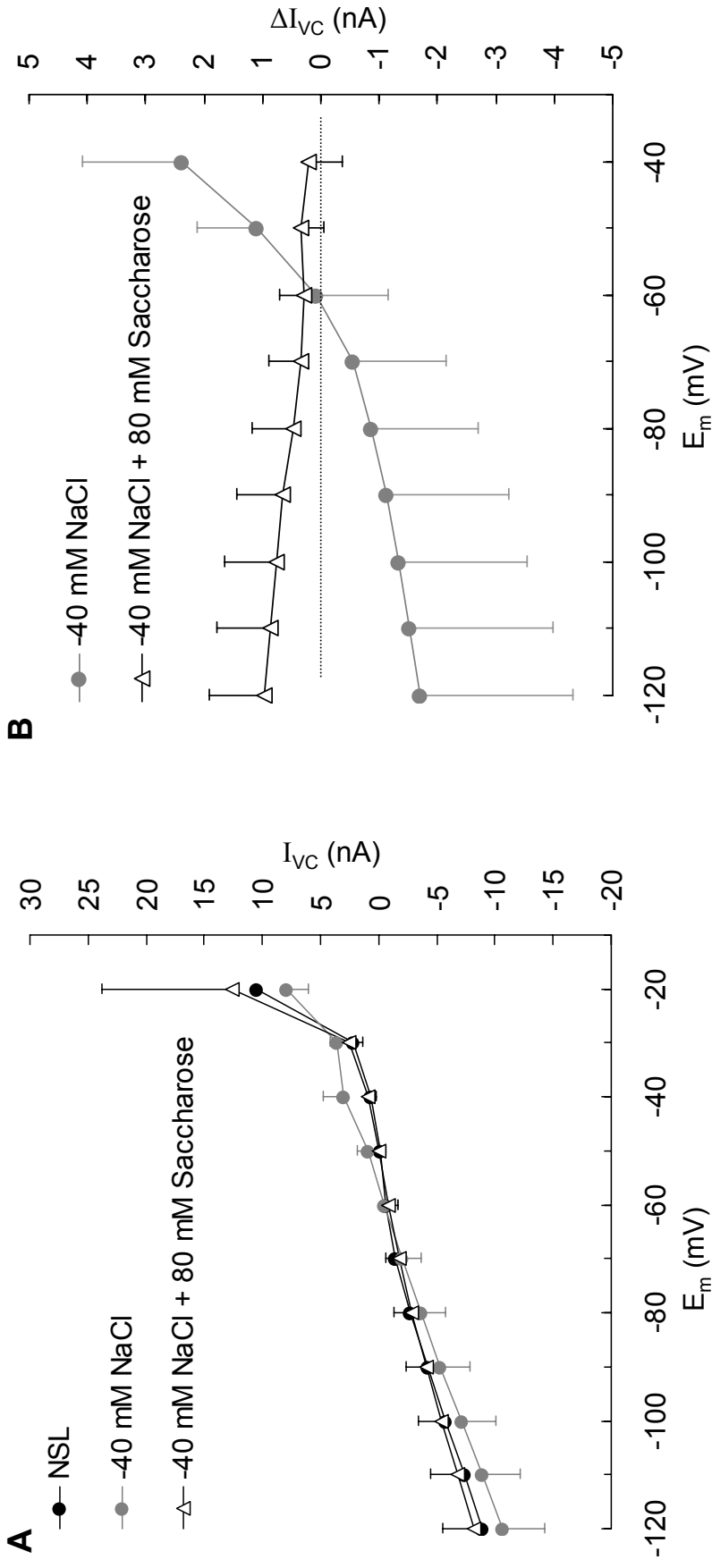


Abb. 25 Einfluss von Ionenstärke bzw. reduzierter NaCl-Konzentration auf die Strom-Spannungskennlinie und auf ΔI_{VC}

- A) Nach Austausch von 40 mM NaCl gegen 80 mM Saccharose war I_{VC} geringfügig vermindert und nicht wie in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) vergrößert (siehe Abb. 24).
- B) Nach Austausch von 40 mM NaCl gegen 80 mM Saccharose trat ein auswärts gerichteter Strom auf, der mit zunehmender Negativierung von E_m anstieg. Zur Bestimmung von ΔI_{VC} siehe Abb. 20.

Datenpunkte in A und B sind Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 6$ Messungen. Versuchsablauf siehe Abb. 24.

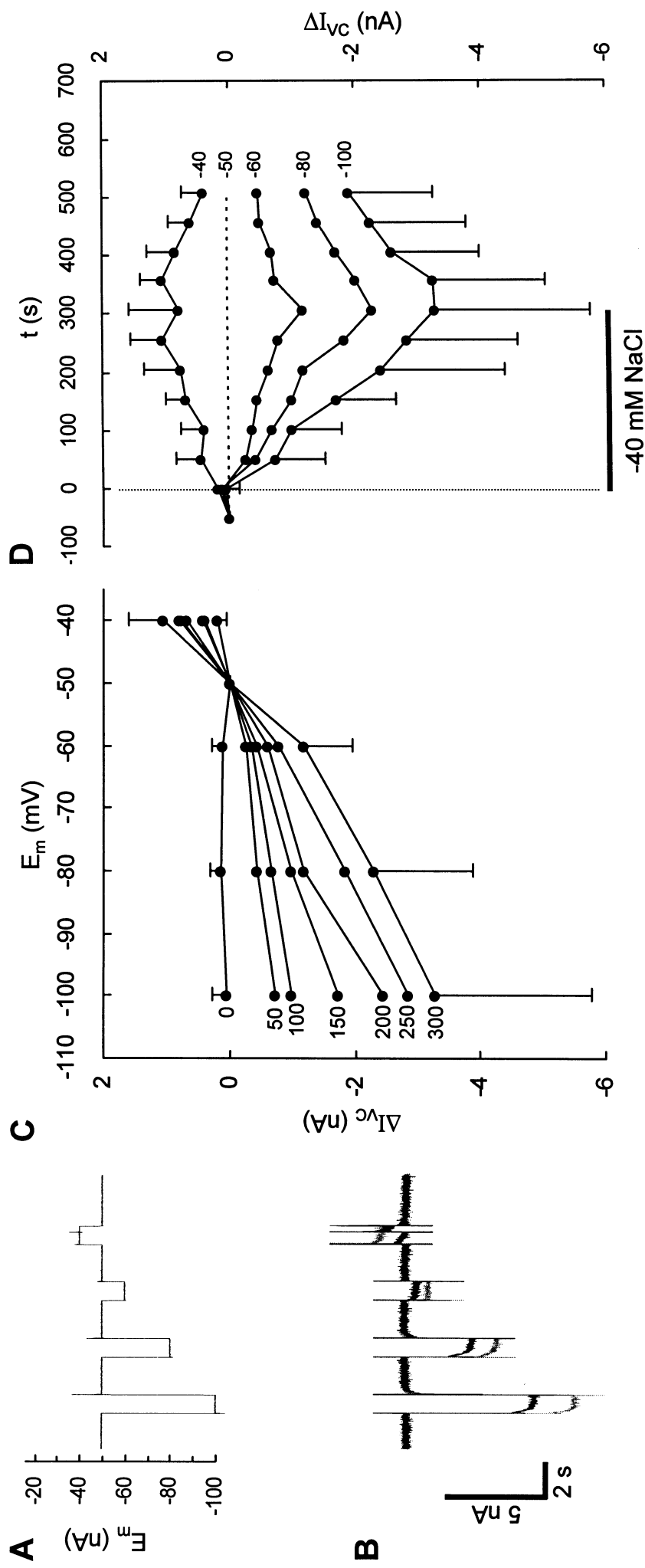


Abb. 26 Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC}

Um Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC} zu verfolgen, wurde E_m regelmäßig für 1 s auf Werte zwischen -100 und -40 mV verschoben und jeweils dazwischen für 2 s auf -50 mV (A). Die in B wiedergegebenen I_{VC} wurden in NSL (schwarz) und nach 5 min in hypotonischer Lösung (grau) registriert (siehe Abb. 18). Die Spuren wurden so überlagert, dass der I_{VC} für -50 mV identisch war. In C ist ΔI_{VC} („grau - schwarz“, siehe Abb. 20) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 bis 300 s) nach dem Übergang in hypotonische Lösung gegen E_m aufgetragen (Mittelwerte \pm S.D., $n = 5$). In D ist ΔI_{VC} bei $E_m = -100, -80, -60$ und -40 mV gegen die Zeit in hypotonischer Lösung aufgetragen. Aktivierung und Deaktivierung von ΔI_{VC} erfolgten langsam. Nach 300 s hatte ΔI_{VC} seine maximale Aktivierung noch nicht erreicht.

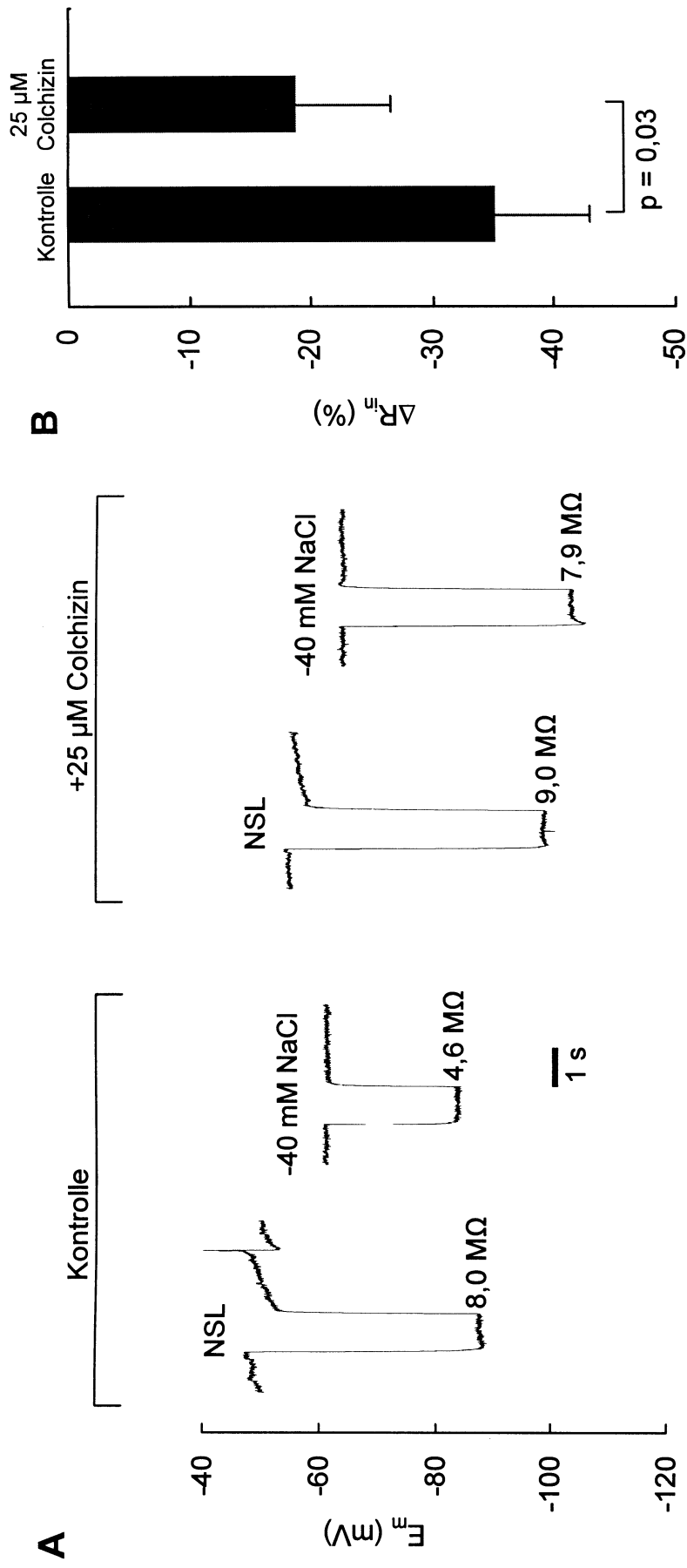


Abb. 27 Wirkung von Colchizin auf die Abnahme von R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolarität

A) Registrierbeispiele von E_m -Änderungen bei Injektion von -5 nA für 1 s . Die hieraus bestimmten R_{in} sind angegeben. Nach 60 -minütiger Applikation von $25 \text{ }\mu\text{M}$ Colchizin war die R_{in} -Abnahme in hypotonischer Lösung etwa halbiert.

B) Zusammenfassung der Daten. Die Abnahme von R_{in} in hypotonischer Lösung war in Gegenwart von $25 \text{ }\mu\text{M}$ Colchizin signifikant verringert. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 5$ Messungen.

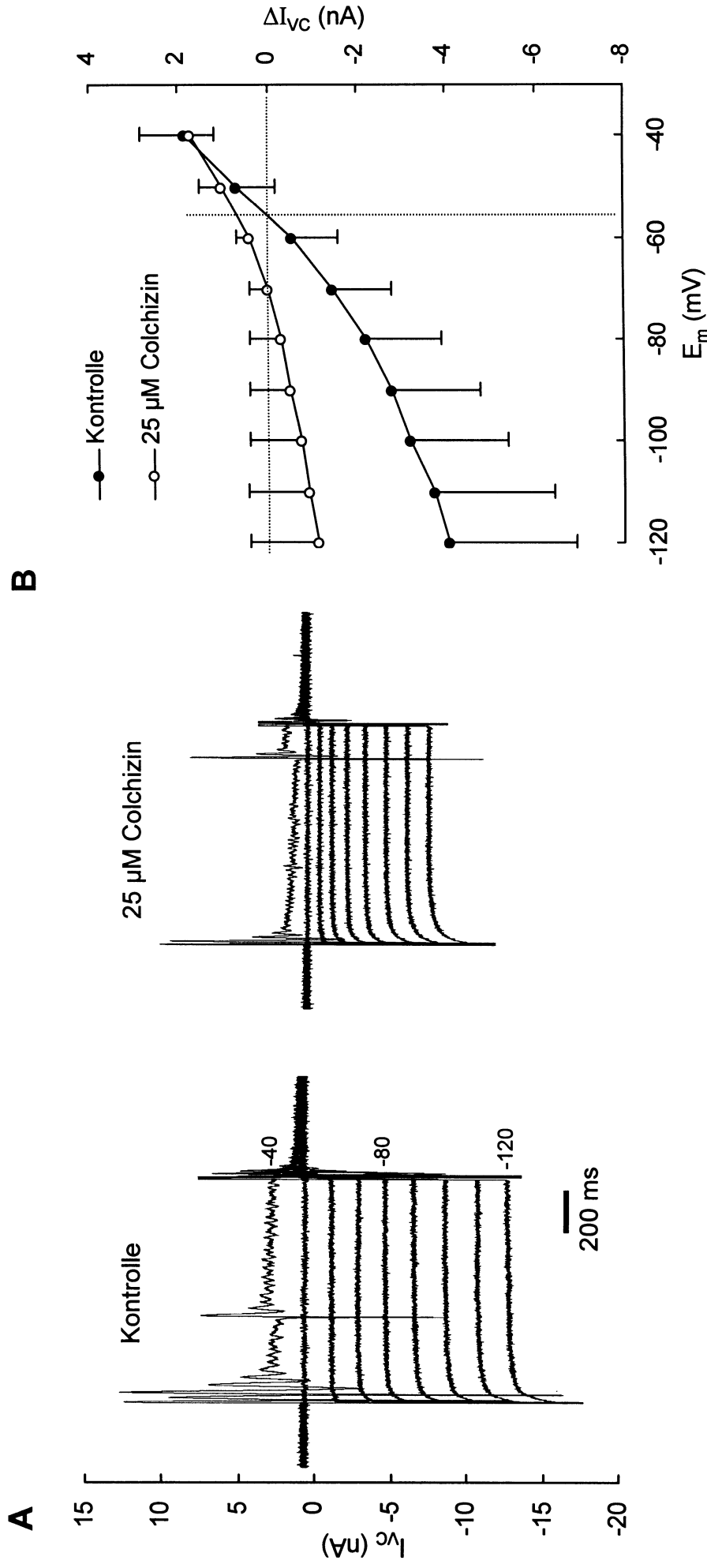


Abb. 28 Wirkung von Colchizin auf ΔI_{VC}

A) Registrierbeispiele von I_{VC} bei Potentialsprüngen auf -120 bis -40 mV in hypotonischer Lösung (-40 mM NaCl) unter Kontrollbedingungen (links) und nach 60-minütiger Applikation von 25μ M Colchizin (rechts; siehe Abb. 19). In Gegenwart von Colchizin war I_{VC} über den gesamten Potentialbereich deutlich vermindert.

B) Strom-Spannungskennlinie von ΔI_{VC} unter Kontrollbedingungen und nach 60-minütiger Applikation von 25μ M Colchizin. Colchizin bewirkte eine Unterdrückung des ΔI_{VC} sowie eine Verschiebung des Umkehrpotentials in negative Richtung. Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 5$ Messungen. Zur Bestimmung von ΔI_{VC} siehe Abb. 20.

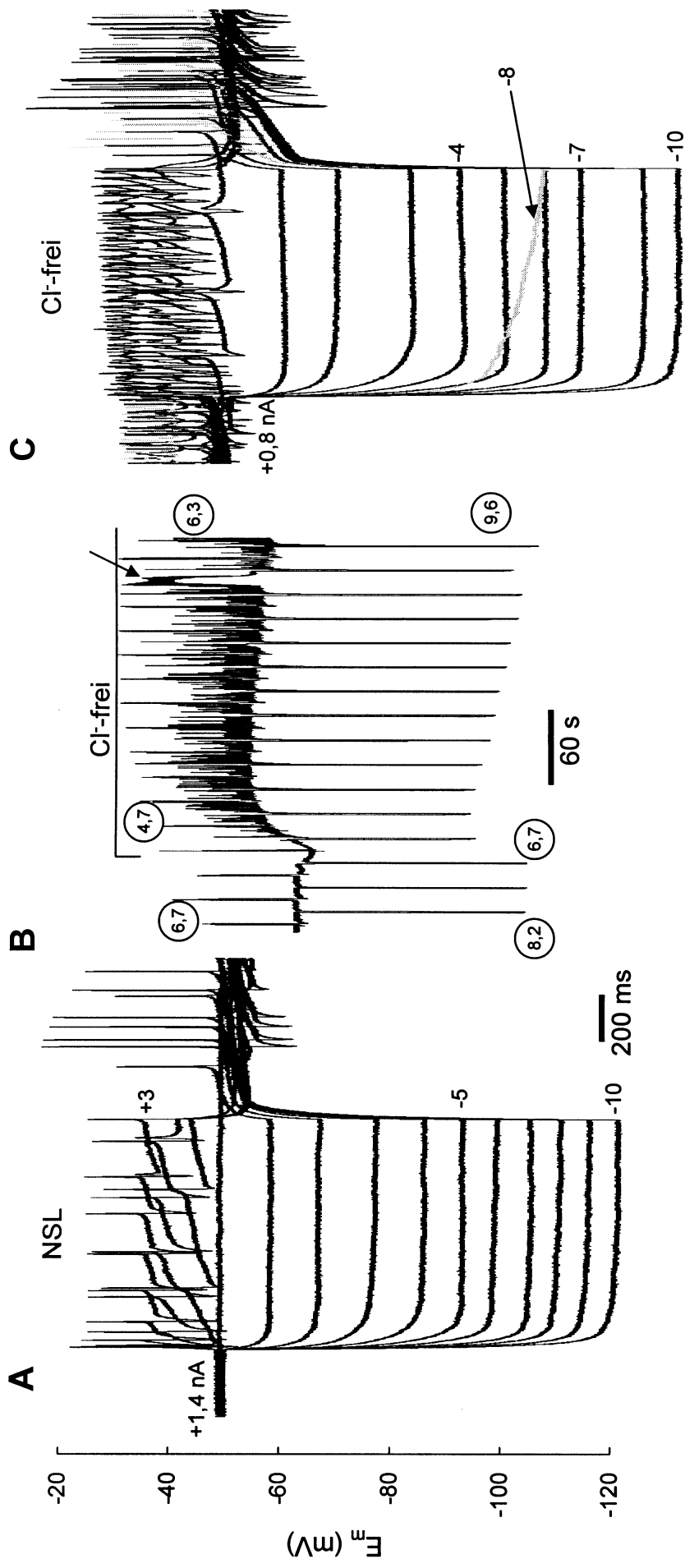


Abb. 29 Änderungen von E_m und R_{in} in Cl^- -freier Lösung

Der Austausch des extrazellulären Cl^- gegen Gluconat bewirkte eine Membrandepolarisation, die gesteigerte Bildung von Aktionspotentialen sowie eine vorübergehende Abnahme von R_{in} (B; R_{in} in $M\Omega$, bestimmt durch Strompulse von -5 und $+2$ nA). Nach ~ 3 min in Cl^- -freier Lösung trat eine starke, sprunghafte Depolarisation auf (Pfeil), die vermutlich durch die zeitweilige Aktivierung des anhaltenden Na^+ -Stroms ($I_{Na,P}$) hervorgerufen wurde (Beck *et al.* 2001). Nach 5 min in Cl^- -freier Lösung (C) waren die durch negative Strompulse hervorgerufenen E_m -Verschiebungen und somit R_{in} größer als zuvor in NSL (A). Die durch positive Strompulse induzierten E_m -Verschiebungen waren dagegen nahezu unverändert. Die E_m -Antwort auf die Injektion von -8 nA war durch eine sprunghafte Depolarisation stark verändert (Pfeil). Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Abb. 16.

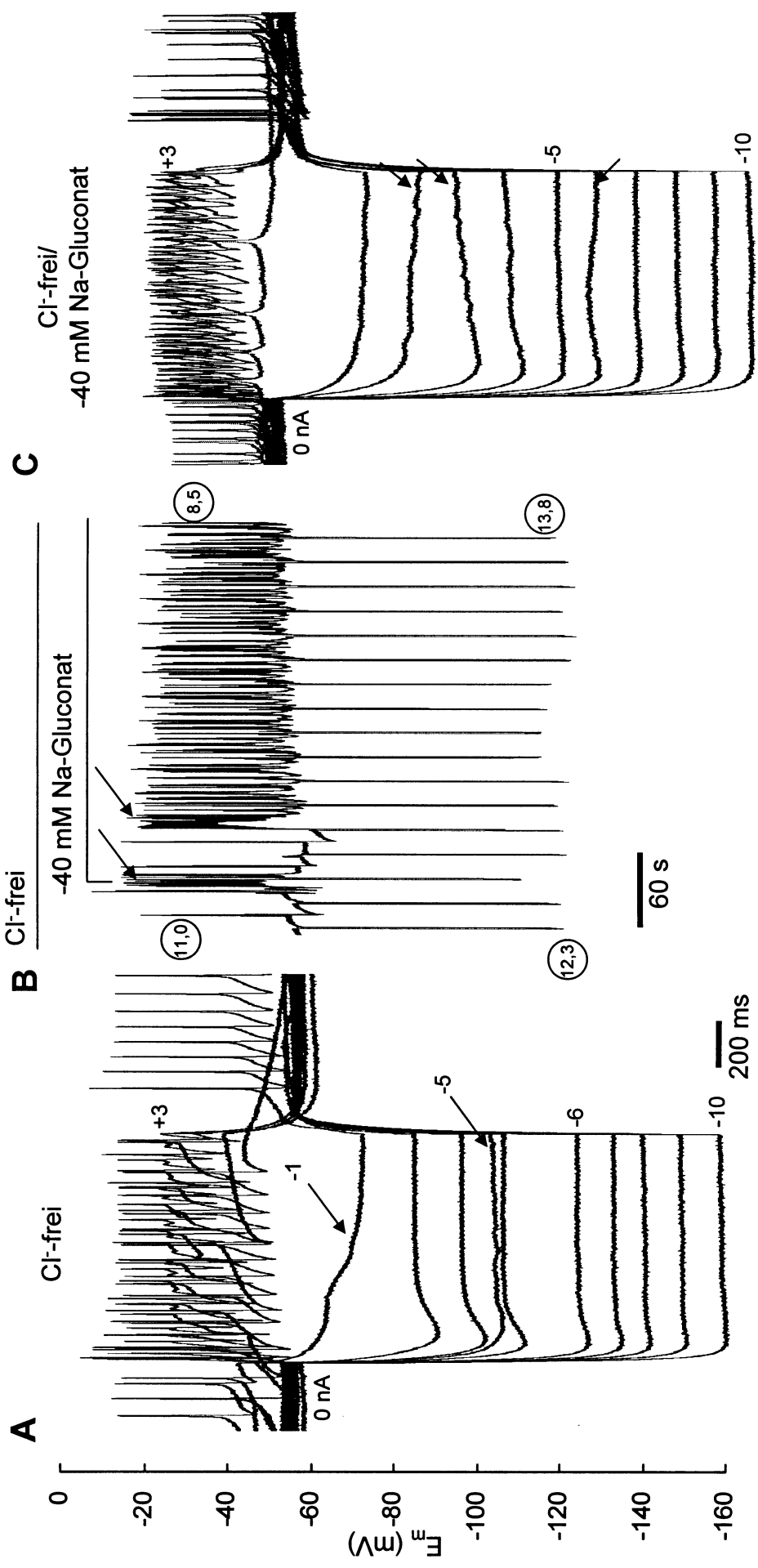


Abb. 30 Änderungen von E_m und R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität in Cl^- -freier Lösung. In Cl^- -freier Lösung kam es immer wieder zu starken E_m -Fluktuationen (siehe Abb. 30), auch während der Strominjektion (Pfeile). Nach Verminderung der extrazellulären Osmolalität (-40 mM Na-Gluconat) blieb E_m unverändert; R_{in} nahm bei negativen Strompulsen geringfügig zu und bei positiven Strompulsen ab (B). Die Membranhypolarisation nach dem Abschalten positiver Strompulse fehlte in hypotonischer Lösung (C; vgl. Abb. 16). Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Abb. 16 und 29.

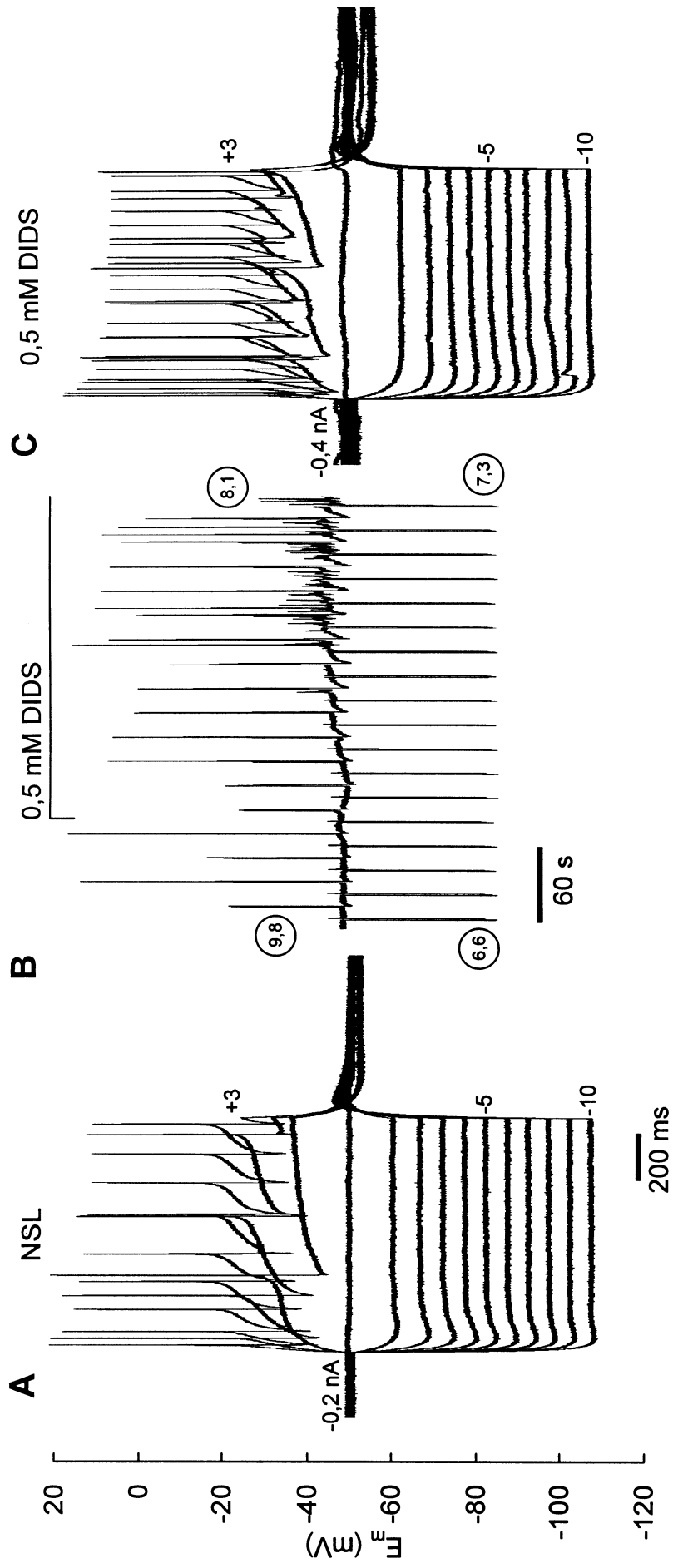


Abb. 31 Einfluss des Cl^- -Kanalblockers DIDS auf E_m und R_{in}

Nach Zugabe von 0,5 mM DIDS kam es zu einer leichten Depolarisation und der vermehrten Bildung von Aktionspotentialen (B), ähnlich wie in Cl^- -freier Lösung (siehe Abb. 29). In Gegenwart von DIDS war der mittels positiver Strompulse bestimmte R_{in} vermindert, der durch negative Strompulse bestimmte R_{in} jedoch kaum verändert (A, C). Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Abb. 16 und 29.

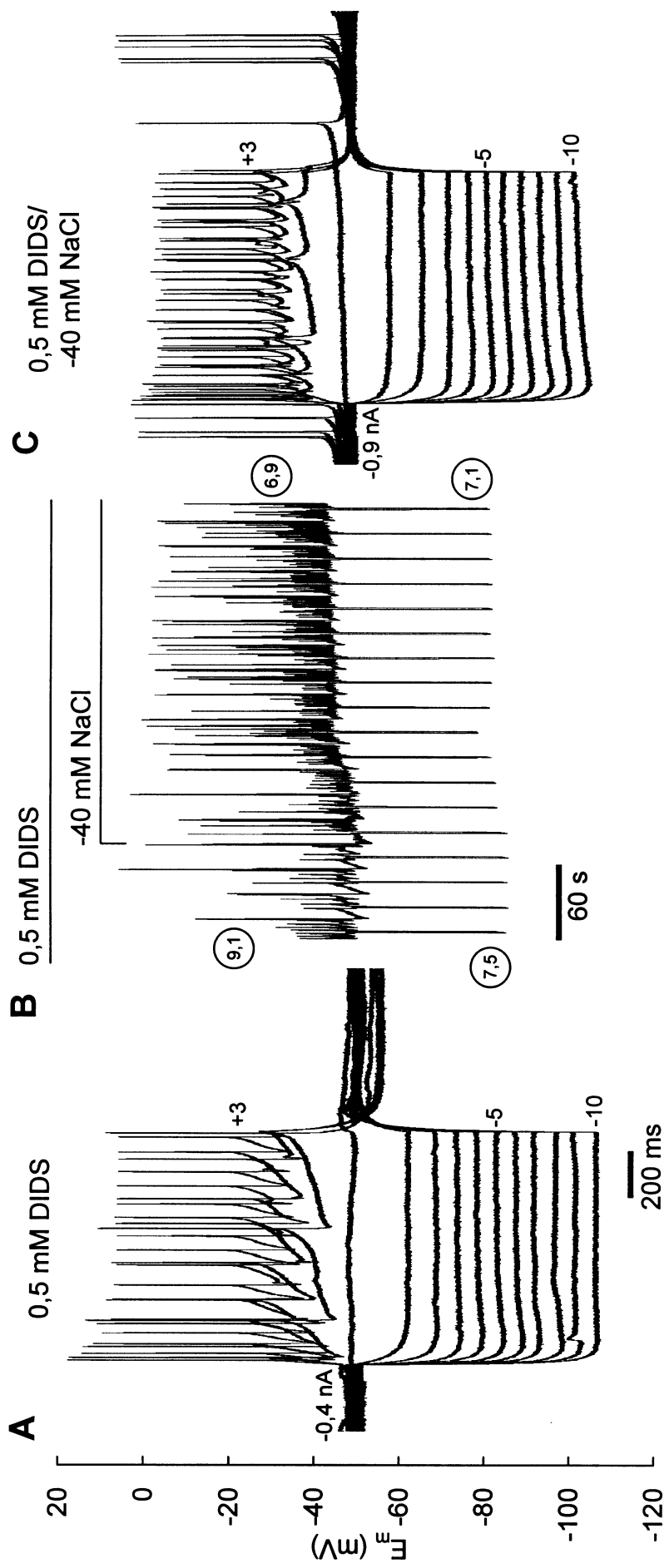


Abb. 32 Änderung von E_m und R_{in} nach Verminderung der extrazellulären Osmolarität in Gegenwart von DIDS

Die Registrierungen wurden von derselben Zelle erhalten wie die in Abb. 31. Zum Vergleich sind in A die Registrierungen von Abb. 31 C noch einmal gezeigt. Nach Verminderung der extrazellulären Osmolarität (-40 mM NaCl) kam es zu einer anhaltenden Membrandepolarisation, zur verstärkten Bildung von Aktionspotentialen sowie zu einer leichten Abnahme von R_{in} (B). Die Membranhypolarisation nach dem Abschalten positiver Strompulse fehlte in hypotonischer Lösung (C; vgl. Abb. 16). Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Abb. 16 und 29.

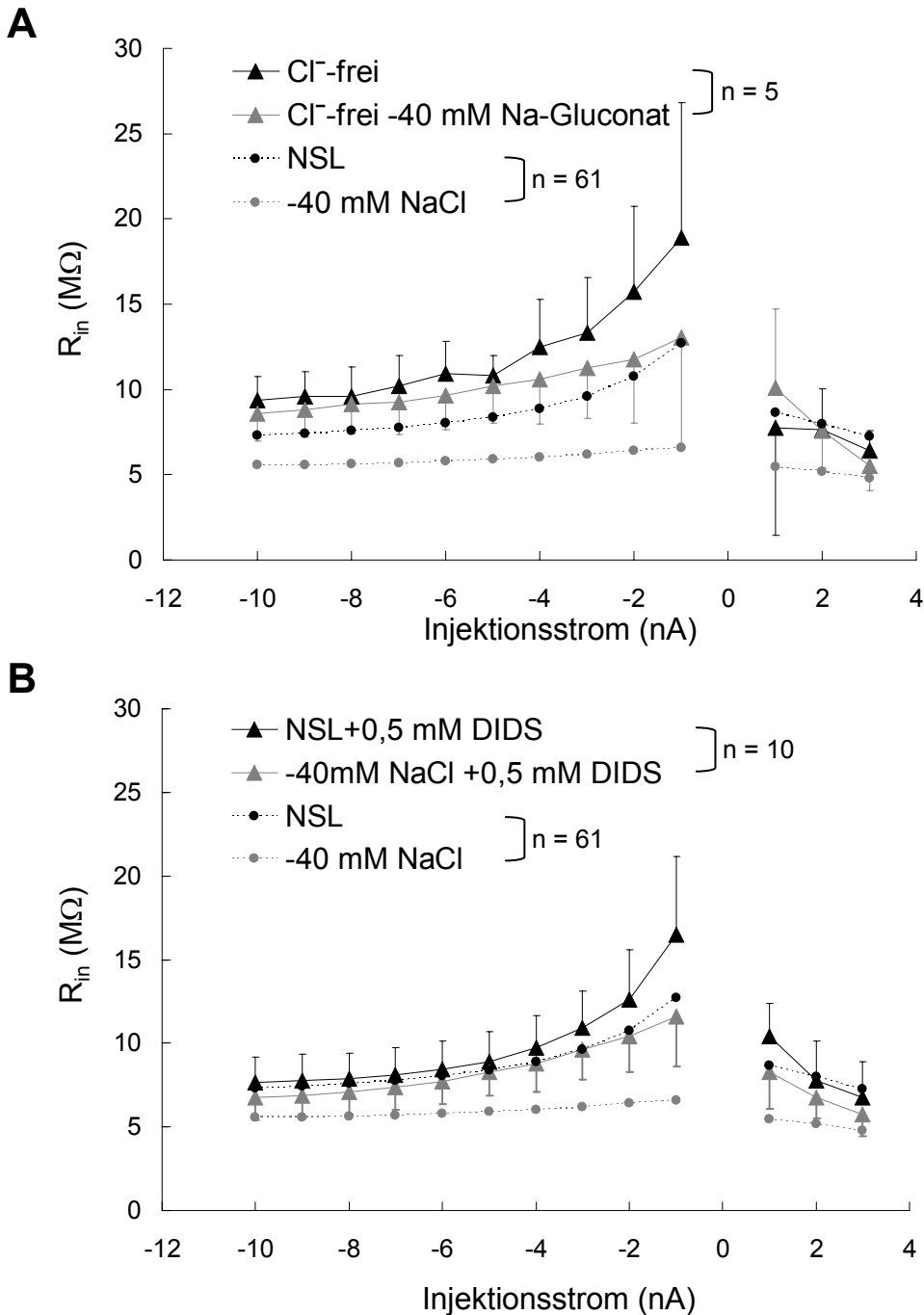


Abb. 33 Einfluss von Cl⁻-freien Bedingungen (A) sowie von DIDS (B) auf die durch Verminderung der extrazellulären Osmolalität hervorgerufene Abnahme von R_{in}

A) Unter Cl⁻-freien Bedingungen war zum einen R_{in} erhöht und zum anderen die R_{in}-Abnahme unter hypotonischen Bedingungen deutlich reduziert.

B) Auch in Gegenwart von DIDS waren R_{in} erhöht und die R_{in}-Abnahme unter hypotonischen Bedingungen deutlich reduziert.

Mittelwerte ± S.D. aus n = 5, 10 bzw. 61 Messungen. Die Vergleichsdaten in A und B (NSL, -40 mM NaCl) wurden bereits in Abb. 17 B gezeigt. Weitere experimentelle Einzelheiten siehe dort.

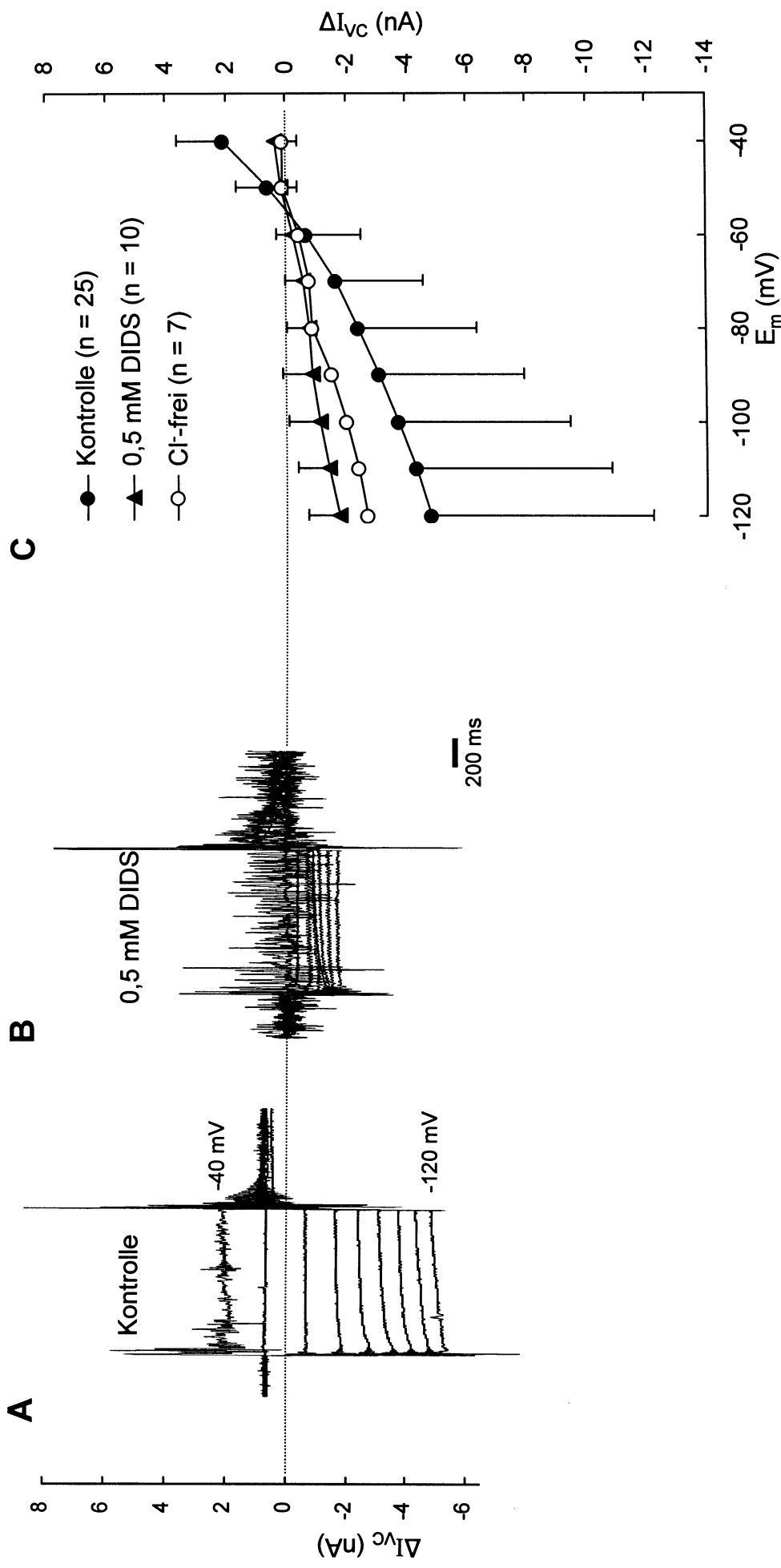


Abb. 34 Einfluss Cl⁻-freier Bedingungen sowie von DIDS auf ΔI_{vc}

Die Spuren in A und B sind Mittelwerte aus 25 (Kontrolle) bzw. 10 (0,5 mM DIDS) Einzelregistrierungen, die vor der Mittelung zur Verringerung von Störsignalen gefiltert wurden (50 Hz, 8-Pole Bessel). Die Auftragung (C) zeigt die Spannungsabhängigkeit von ΔI_{vc} unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart von DIDS bzw. in Cl⁻-freier Lösung. In Gegenwart von DIDS und in Abwesenheit von extrazellulärem Cl⁻ war ΔI_{vc} deutlich vermindert, das Umkehrpotential blieb jedoch erhalten. Zur Bestimmung von ΔI_{vc} siehe Abb. 20.

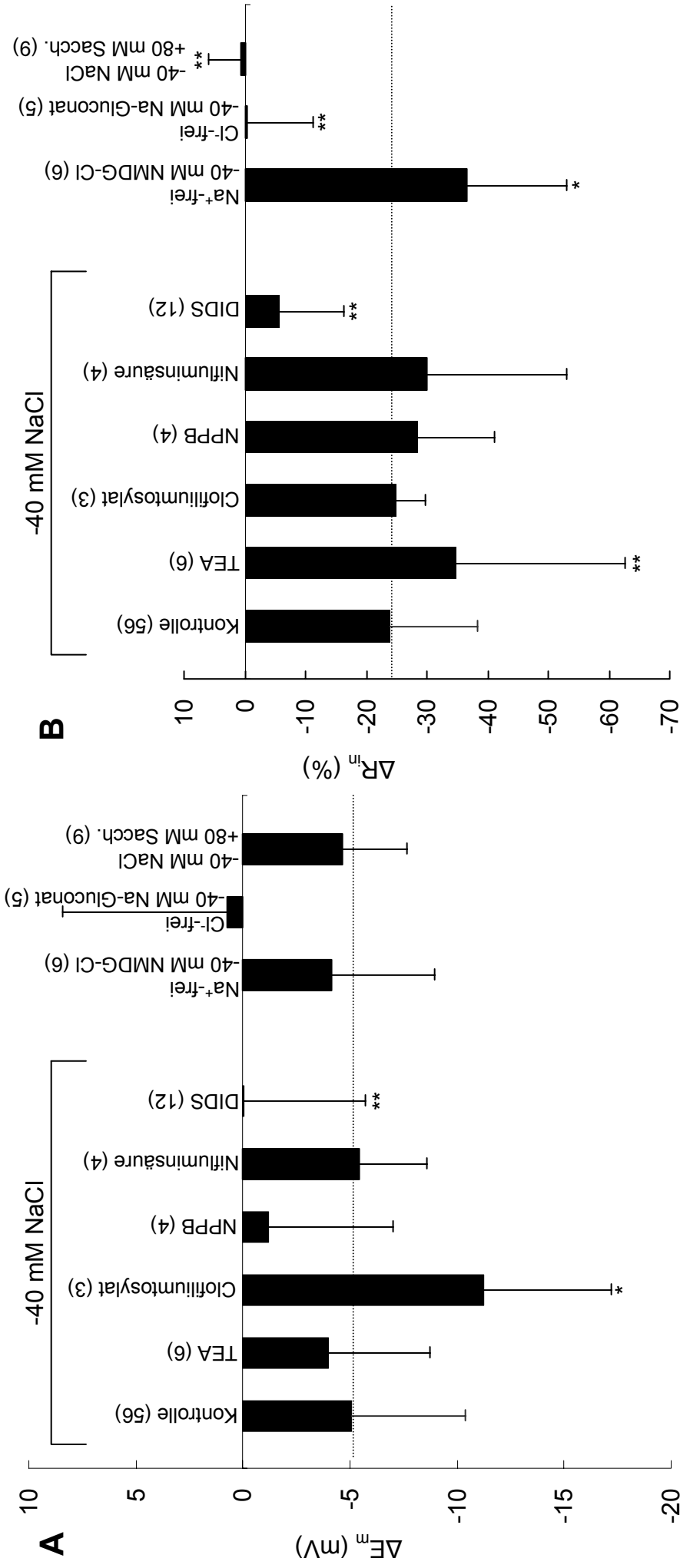


Abb. 35 Änderungen von E_m und R_{in} unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Zusammenfassung der Daten

Im Einzelnen lagen folgende Versuchsbedingungen vor: 1) Verminderung der extrazellulären NaCl-Konzentration um 40 mM unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart verschiedener K^+ -Kanal- bzw. Cl⁻-Kanalblocker. 2) Verminderung der extrazellulären Osmolarität unter Na⁺-freien bzw. Cl⁻-freien Bedingungen. 3) Zum Vergleich: Isotonischer Austausch von 40 mM NaCl durch 80 mM Saccharose. Mittelwerte \pm S.D., die Anzahl der Messungen ist jeweils in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede bezüglich der Kontrolle sind mit einem ($p < 0,05$) bzw. zwei Sternen ($p < 0,01$) markiert.

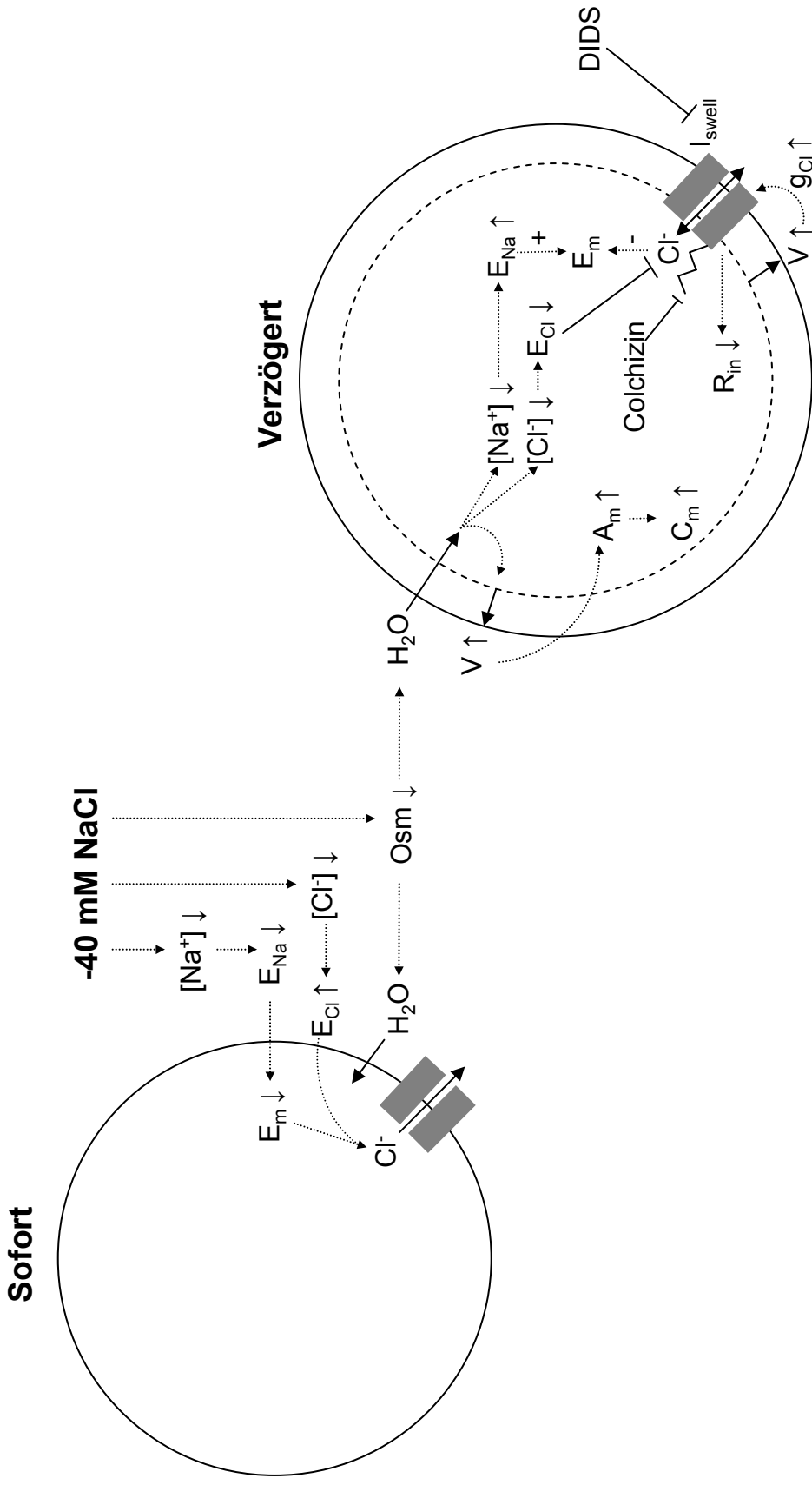


Abb. 36 Schaubild der durch Verminderung der extrazellulären Osmolarität hervorgerufenen Vorgänge

Bei Verminderung der extrazellulären Osmolarität durch Wegnahme von 40 mM NaCl werden die Gleichgewichtspotentiale für Na^+ (E_{Na}) und Cl^- (E_{Cl}) verändert. Die Absenkung des E_{Na} führt zu einer Membrandepolarisation, die Anhebung des E_{Cl} zu einem Cl^- -Ausstrom. Die Verminderung der extrazellulären Osmolarität („Osm“) führt zu einem Wassereinstrom und somit zu einer Zunahme des Zellvolumens (V). Durch das einströmende H_2O vermindern sich die intrazellulären Ionenkonzentrationen und somit auch $[Na^+]_i$ und $[Cl^-]_i$. Gleichzeitig führt die Volumenzunahme zu einer Zunahme der Membranleitfähigkeit für Cl^- (g_{Cl}) und somit zu einer R_{in} -Abnahme durch die Aktivierung von I_{swell} . I_{swell} ist durch DIDS blockierbar und wird vermutlich über das Cytoskelett aktiviert, da die Depolymerisierung der Mikrotubuli mit Colchizinin unterdrückt. Die Volumenzunahme erfordert eine Zunahme der Membranoberfläche (A_m) über Membranausstülpungen und den Einbau neuer Membranelemente. Letzteres führt zu einer Zunahme der Membrankapazität (C_m).

ANHANG

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schlue gilt für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und Prof. Dr. Klaus Lunau für seine Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens besonderer Dank.

Dr. Peter Hochstrate hat mit seinen Hilfestellungen, seiner geduldigen Diskussionsbereitschaft und der akribischen Durchsicht der Arbeit sehr geholfen.

Dr. Paul Wilhelm Dierkes half mir mit vielen Anregungen und Ideen.

Besonders danken möchte ich außerdem Simone Durry und Claudia Roderigo für die hervorragende technische Assistenz und Hanne Horn für die Unterstützung bei fotografischen Arbeiten.

Guido Klees, Dr. Verena Wende und Dr. Hans-Joachim Wüsten gilt besonderer Dank für die überaus gute Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Eberhard von Berg, Dr. Ednan Gerard, Dr. Jürgen Schoppe und Dr. Dirk Schubert für ihre Freundschaft und ihre fachliche Unterstützung bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglichten und auch während der Promotion immer für mich da waren und bei Anne Brockerhoff, die mir mit ihrem Verständnis und ihrer moralischen Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit, insbesondere in Zeiten experimenteller Katastrophen und zeitlicher Engpässe, immer zur Seite stand.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine unerlaubten Hilfsmittel verwendet habe und sie in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

Düsseldorf, den 20. Dezember 2004

Philippe Coulon