

Aus dem Zentrum der Physiologie
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Institut für Physiologie II (Nieren- und Membranphysiologie)
Direktor: Prof. Dr. E. Frömter

UNTERSUCHUNG EINES NICHTSELEKTIVEN KATIONENKANALS IN M-1 ZELLEN
AUS DEM SAMMELROHR DER MAUS UND IN ANDEREN GEWEBEN
MIT DER PATCH CLAMP-TECHNIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jan-Peter Koch
aus Ulm an der Donau

Frankfurt am Main, 1999

Dekan: Prof. Dr. med. G. von Jagow

Referent: Prof. Dr. med. E. Frömter

Koreferent: Prof. Dr. H. Gögelein

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1995 bis Februar 1997 am Institut für Nieren- und Membranphysiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

Ich danke allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Fr 233/9-1 und Ko 1057/7-1) und dem Wellcome Trust (Großbritannien) unterstützt.

INHALT

Abkürzungen.....	6
Einleitung	7
Aufgaben der Niere und insbesondere des Sammelrohrs	7
Die M-1 Zelllinie als Modell für das Sammelrohrepithel.....	8
Nichtselektive Kationenkanäle	8
Die molekulare Struktur der Ca ²⁺ -aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle ist noch unbekannt.....	9
Volumenregulation und mögliche Rolle eines durch Zellschrumpfung aktivierten nichtselektiven Kationenkanals	10
Vorkommen des Ca ²⁺ -aktivierten und ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanals	10
Material und Methoden	12
ZELLEN.....	12
Zellkultur der M-1 Sammelrohrzellen	12
Zellbehandlung	12
Zellkulturmedien.....	12
Aussaat.....	13
TECHNIK.....	13
Patch Clamp.....	13
Elektrische Messungen	14
Datenverarbeitung.....	16
PIPETTEN UND LÖSUNGEN	16
Pipettenherstellung	16
Pipettenlösungen.....	17
Badlösungen	18
Chemikalien.....	19
Phasengrenzpotentiale	19
Berechnung der Permeabilität.....	22
Ergebnisse.....	23
A. KONTROLLUNTERSUCHUNGEN AN M-1 ZELLEN	23
Zellschrumpfung durch extrazelluläre Hyperosmolarität stimuliert einen Ganzzellstrom	23
Der osmotische Gradient ist entscheidend.....	25
B. SELEKTIVITÄT.....	26
Selektivität für Anionen.....	26
Selektivität für monovalente Kationen	27
Selektivität für divalente Kationen	28

C. PHARMAKOLOGIE	31
Inhibitoren der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit.....	31
Maitotoxin	34
D. UNTERSUCHUNG DES AKTIVIERUNGSMECHANISMUS.....	34
Die Rolle des intrazellulären Kalziums	34
Rolle von intrazellulärem ATP.....	36
Beteiligung von Proteinkinasen und Magnesium.....	38
Rolle des Zytoskeletts.....	39
E. EXPERIMENTE MIT ANDEREN ZELLINIEN.....	39
Effekt von extrazellulärer Hyperosmolarität auf Ganzzellströme in HT ₂₉ Zellen.....	39
Selektivität für monovalente Kationen und Chlorid; Hemmung durch Flufenaminsäure.....	41
Auflösung von Einzelkanalströmen.....	43
Effekt von Hyperosmolarität auf Ganzzellströme von BSC-1, A 10 und Neuro-2a Zellen	44
Diskussion.....	49
Der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal wird offenbar ubiquitär exprimiert.....	49
Selektivität der aktivierten Leitfähigkeit	50
Inhibitoren der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenleitfähigkeit	51
Maitotoxin, ein potentieller Aktivator nichtselektiver Kationenkanäle, hat keinen Effekt	53
Intrazelluläres Kalzium ist für die Aktivierung notwendig	53
Rolle von intrazellulärem ATP.....	54
Beteiligung von Proteinkinasen.....	55
Zellschrumpfung und Apoptose	56
Rolle des Zytoskeletts.....	56
Mögliche physiologische Bedeutung des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals	58
Zusammenfassung	60
Literatur	62
Ehrenwörtliche Erklärung.....	71
Curriculum vitae.....	72

Abkürzungen

ADH	Antidiuretisches Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N',N',N',N'-Tetraacetat (hochselektiver Kalziumchelator)
DCDPC	3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DPC	Diphenylamin-2-Carboxylsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ENaC	Epithelialer (amiloridsensitiver) Natriumkanal
FCCP	Carbonyl-Zyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	Fötale Kalbsserum
g	Einzelkanalleitfähigkeit
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethanschwefelsäure)
i	Einzelkanalstrom
i/o	<i>inside out</i>
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
M	mol/l
NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
Patch	Membranfleck
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i>
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (<i>platelet-derived growth factor</i>)

Einleitung

Aufgaben der Niere und insbesondere des Sammelrohrs

Eine der Hauptaufgaben der Niere ist es, schädliche Endprodukte des Stoffwechsels auszuscheiden und durch gezielte Resorptions- und Sekretionsvorgänge den Wasser- und Ionenhaushalt des Körpers zu bilanzieren und damit die ionale Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten konstant zu halten. Erst durch die effektive Kontrolle des „milieu intérieur“ konnten sich Lebensformen entwickeln, die fähig waren, sich an stark unterschiedliche Lebensräume anzupassen.

Die funktionelle Einheit der Niere, das Nephron, besteht aus dem Glomerulum, dem proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr, welches den Harn mehrerer Tubuli vereinigt und von der Nierenrinde durch das äußere und innere Mark bis zur Papillenspitze im Nierenbecken zieht. Bei allen Tierarten trägt das Sammelrohr die Hauptlast der Regelung. In der Säugerniere gelangen etwa 10 % des im Glomerulum filtrierten Primärharns ins Sammelrohr. Bei normaler Ernährung und Wasserzufuhr werden dort Natrium und Chlorid resorbiert und Kalium sezerniert, und es findet die Feinregulation des Säure/Basen-Haushalts statt.

Das Epithel, das diese Arbeit verrichtet, ist in zwei Zellarten differenziert. Der häufigste Zelltyp sind die Hauptzellen. Sie resorbieren Natrium und sezernieren Kalium und nehmen in Richtung Nierenbecken an Anzahl zu. Die andere Zellart stellen die Schaltzellen dar. Sie werden in zwei Typen untergliedert: Typ A sezerniert Wasserstoffionen und ist fähig zur Kaliumresorption, Typ B sezerniert Bikarbonat.

Der „Motor“ für die Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion der Hauptzellen des Sammelrohrs ist die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase, die den größten Teil des Energieumsatzes der Zelle für sich beansprucht. Sie hält die intrazelluläre Kaliumkonzentration hoch und die Natriumkonzentration niedrig und schafft damit die Voraussetzung für die Entstehung des Membranpotentials von etwa -70 mV (Zytoplasma negativ gegen interstitielle Flüssigkeit) über der basolateralen Zellmembran, das wie an fast allen Körperzellen in erster Linie durch die Rückdiffusion von K^+ -Ionen von der Zelle in das Interstitium entsteht. Durch luminale amiloridsensitive Natriumkanäle (ENaC) strömt Na^+ in die Zelle und wird von der Na^+/K^+ -ATPase ins Interstitium transportiert. Dies führt zur Entstehung einer lumennegativen transepithelialen Poten-

tialdifferenz, die für den Nachstrom von Cl^- -Ionen aus dem Lumen sorgt. Dabei handelt es sich offenbar im wesentlichen um einen parazellulären Transport (durch die Schlußleisten zwischen den Epithelzellen). Diese Prozesse werden in erster Linie durch zwei Hormone geregelt: Aldosteron, das die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase stimuliert und zur Insertion von apikalen ENaC zusammen mit Erhöhung ihrer Offenwahrscheinlichkeit führt, und ADH, das die Wasser- und Natriumresorption über einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration erhöht [Garty & Benos, 1988].

Daneben existieren auch andere Kanäle in Hauptzellen, deren physiologische Bedeutung zum Teil noch unklar ist. Dazu gehören auch nichtselektive Kationenkanäle [Korbmacher & Barnstable, 1993], die das Thema dieser Arbeit sind.

Die M-1 Zelllinie als Modell für das Sammelrohrepithel

Die M-1 Zelllinie gleicht in ihren Eigenschaften weitgehend den Hauptzellen des Sammelrohrs. Sie wurde von Stoos et al. (1991) aus einem mikrodisszezierten kortikalen Sammelrohr einer für die Anfangsregion des SV40-transgenen Maus entwickelt (Simian Virus 40 verbessert die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation). In Kultur bilden M-1 Zellen nach einigen Tagen einen dichten Zellrasen mit Mikrovilli auf der apikalen Seite, einer glatten basolateralen Seite und den für Epithelien typischen Schlußleisten. Etwa drei Viertel der Zellen zeigt Antigen-Merkmale von Hauptzellen des Sammelrohrepithels, und auch die entsprechenden Ionentransportprozesse sind erhalten [Stoos et al., 1991]. Insbesondere exprimieren die M-1 Zellen den für die Hauptzellen des Sammelrohrs typischen ENaC [Letz et al., 1995], aber nur, wenn die Zellen zu konfluenten Zellrasen herangewachsen sind. Unter diesen Bedingungen lassen sich die Zellen aber nur schlecht mit der *Patch Clamp*-Technik untersuchen, da Zellen im Verbund elektrisch gekoppelt sind und die Messung eines Ganzzellstroms nicht mehr möglich ist, wenn der elektrische Eingangswiderstand des Zellverbands unter den elektrischen Widerstand der Glaspipette (*access resistance*) abfällt. Gleiches gilt für die Untersuchung der osmotischen Zellschrumpfung. An Einzelzellen kann sie einfacher beobachtet werden als an Zellen in einem konfluenten Zellrasen.

Nichtselektive Kationenkanäle

Nichtselektive Kationenkanäle sind aus einer Vielzahl von Geweben bekannt [Siemen, 1993]. Sie stellen eine sehr heterogene Gruppe von Kanälen dar, deren Spektrum vom nikoti-

nischen Acetylcholinrezeptor in der neuromuskulären Endplatte über cGMP-sensitive Photorezeptorkanäle und mechanosensitive Kanäle bis zu Na^+ -sensitiven Kanälen in Geschmacksrezeptoren reicht. Einige sind auch für divalente Kationen durchlässig, aber die größte Gruppe, die durch intrazelluläres Kalzium aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle, ist in der Regel selektiv für monovalente Kationen. Diese nichtselektiven Kationenkanäle sind in exzidierten Membranflecken normalerweise inaktiv und benötigen nach Exzision des Membranflecken mindestens mikromolare Kalziumkonzentrationen an der Zytosoloberfläche, um aktiviert zu werden. Sie sind typischerweise durch cytosolisches ATP im Bereich millimolarer Konzentrationen hemmbar. Viele dieser Kanäle werden durch Diphenylamincarboxylsäure-Derivate wie Flufenaminsäure inhibiert. Da unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre Kalziumkonzentration niedriger als $1 \mu\text{M}$ und die ATP-Konzentration hoch ist (im millimolaren Bereich), stellt sich die Frage, wie diese Kanäle in einer lebenden Zelle aktiviert werden können [Siemen, 1993; Korbmacher & Barnstable, 1993]. Diese Frage sowie die physiologische Bedeutung der Ca^{2+} -aktivierten und ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanäle ist noch nicht geklärt.

Die molekulare Struktur der Ca^{2+} -aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle ist noch unbekannt

Die Primärstruktur einiger nichtselektiver Kationenkanäle wurde kürzlich aufgeklärt. Zu dieser Gruppe zählt ein nicht näher auf ATP- und Kalziumsensitivität untersuchter Kanal in MIN6 Zellen, einer Insulin-sezernierenden β -Zelllinie [Suzuki et al., 1998], ein durch Zugspannung inhibierter nichtselektiver Kationenkanal aus Rattenniere [Suzuki et al., 1999] und zwei für Kalzium permeable nichtselektive Kationenkanäle, die bei Expression der Proteine *trp* und *trpl* aus *Drosophila*-Photorezeptoren gebildet werden [Vaca et al., 1994]. Inzwischen sind auch eine Reihe *trp*-homologer Kanäle identifiziert worden, so daß man von einer Kanalfamilie der *trp* und *trpl* Kanäle sprechen kann. Die Primärstruktur der übrigen nichtselektiven Kationenkanäle ist mit Ausnahme der Struktur des ACh-Rezeptors der motorischen Endplatte unbekannt. Ob es sich bei diesen Kanälen um Isoformen eines einzigen Kanalproteins handelt oder um gänzlich verschiedene Proteine, ist ungewiß. Sicher ist nur, daß keiner der bisher klonierten Kationenkanäle die charakteristischen Eigenschaften der Ca^{2+} -aktivierten, ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanäle aufweist. Die molekulare Identifizierung dieser Kanalfamilie steht also noch aus.

Volumenregulation und mögliche Rolle eines durch Zellschrumpfung aktivierten nichtselektiven Kationenkanals

Die meisten Zellen sind fähig, als Antwort auf osmotische Veränderungen durch Aktivierung volumenregulatorischer Mechanismen ihren Gehalt an Osmolyten zu verändern, um übermäßige Schwellung oder Schrumpfung zu verhindern. Da Ionen den größten Anteil zur intra- und extrazellulären Osmolarität beitragen, gelingt dies am besten und schnellsten durch Abgabe oder Aufnahme von Salzen. Bei Schwellung werden Transportmechanismen aktiviert, die Ionen exportieren, worauf das Zellvolumen aus osmotischen Gründen wieder abnimmt (regulatorische Volumenabnahme); bei Schrumpfung werden Mechanismen aktiviert, die Ionen einströmen lassen, so daß das Zellvolumen wieder zunimmt (regulatorische Volumenzunahme). Zellschwellung aktiviert üblicherweise Leitfähigkeiten für Kalium und Chlorid; der resultierende Kaliumausstrom aus der Zelle kehrt dann den osmotischen Gradienten um und damit die Richtung des Wasserstroms. Zellschrumpfung aktiviert in erster Linie den elektroneutralen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransport oder den Na^+/H^+ -Antiport und parallel dazu den Cl^-/HCO^- -Antiport. Dies führt in beiden Fällen zum Anstieg der intrazellulären NaCl -Konzentration und damit zum Wassereinstrom. Darüber hinaus haben Chan und Nelson (1992) an Primärkulturen aus Atemwegsepithel und Volk et al. (1995) an der M-1 Zellkultur aus Sammelrohrepithel der Maus beobachtet, daß Zellschrumpfung nichtselektive Kationenkanäle aktiviert. In Gegenwart konstitutiv offener Cl^- Kanäle kann in dieser Situation ebenfalls NaCl in die Zelle einströmen, so daß es sich hierbei um einen weiteren Mechanismus der regulatorischen Volumenzunahme handeln könnte.

Welche Rezeptoren die regulatorische Volumenabnahme oder -zunahme einleiten und über welche Signaltransduktionswege die Ionentransportmechanismen aktiviert werden, ist noch weitgehend unbekannt. Das gilt auch für die schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle. Im ersten Teil der Arbeit wird deshalb der Aktivierungsmechanismus dieser Kanäle in M-1 Zellen näher untersucht.

Vorkommen des Ca^{2+} -aktivierten und ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanals

Nachdem in M-1 Zellen gezeigt wurde, daß Zellschrumpfung einen nichtselektiven Kationenkanal aktiviert, fragte sich, ob vergleichbare Kanäle auch in anderen Geweben existieren und durch Zellschrumpfung aktiviert werden können. In M-1 Zellen scheint der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal identisch mit dem erwähnten Ca^{2+} -aktivierten

und ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanal zu sein, der in *i/o*-Patches in M-1 Zellen gefunden wurde [Korbmacher et al., 1995]. Solche Ca^{2+} -aktivierte nichtselektive Kationenkanäle wurden bereits in vielen Geweben beobachtet, unter anderem in *i/o*-Patches von HT₂₉ humanen Kolonkarzinomzellen, einem etablierten Modell für Kolonkryptzellen [Champigny et al., 1991], in der basolateralen Membran von Kolonkryptzellen der Ratte [Bleich et al., 1996], in Neuroblastomzellen [Yellen, 1982], glatten Gefäßmuskelzellen [Wang et al., 1993], proximalen Tubuluszellen der Niere [Chraïbi et al., 1994], Atemwegsepithelzellen [Orser et al., 1991], einer Reihe von endo- und exokrinen Drüsenzellen [Sturgess et al., 1987; Gögelein & Pfannmüller, 1989] und in braunen Fettzellen [Siemen & Reuhl, 1987]. Die meisten dieser Kanäle besitzen eine Einzelkanalleitfähigkeit von 20-30 pS.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit untersucht deshalb, ob es sich bei der Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals durch Zellschrumpfung um ein ubiquitäres Phänomen handelt, d.h. ob Zellschrumpfung durch extrazelluläre Hyperosmolarität auch in anderen Zellen, die Ca^{2+} -aktivierte nichtselektive Kationenkanäle besitzen, diese oder ähnliche Kanäle aktiviert. Die Experimente wurden an HT₂₉, BSC-1 (Nierenepithelzellen der afrikanischen Meerkatze *C. aethiops*), A10 (glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta) und Neuro-2a Zellen (aus Neuroblastom in Mäusen) durchgeführt. Die BSC-1 Zelllinie bildet Eigenschaften typischer proximaler Nierentubuluszellen aus, wie einen elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symport [Jentsch et al., 1986]. Die A 10 Zelllinie besitzt elektrophysiologische Eigenschaften von glatten Muskelzellen [Korbmacher et al., 1989], und die Neuro-2a Zelllinie gleicht in ihren Eigenschaften neuronalen Zellen mit ihren TTX-sensitiven, spannungsabhängigen Natriumkanälen [Baumgarten et al., 1995]. All diese Zelllinien, wie auch die M-1 Zelllinie, werden weltweit als Modellsysteme zur Erforschung gewebespezifischer Membrantransportprozesse benutzt.

Material und Methoden

ZELLEN

Zellkultur der M-1 Sammelrohrzellen

Die M-1 Zellkultur, die aus einem mikrodisssezierten kortikalen Sammelrohr einer für die Anfangsregion des SV-40-Virus transgenen Maus vom Stamm Tg(SV40)Bri/7 etabliert worden war [Stoos et al. 1991], wurde von Dr. Fejes-Tóth in der 6. Kulturpassage zur Verfügung gestellt. Zellen der HT₂₉ Zelllinie (ATCC HTB-38) wurden freundlicherweise von Dr. G. Burckhardt zur Verfügung gestellt; die A 10 Zelllinie (ATCC CRL-1476) und die Neuro-2a Zelllinie stammten aus dem Labor von Dr. T.J. Jentsch. Die BSC-1 Zelllinie (ATCC CCL-26) wurde von der American Type Culture Collection bezogen. M-1 Zellen wurden ab der 10. bis zur 36. Passage für *Patch Clamp*-Experimente verwendet, HT₂₉ Zellen von der 4. bis zur 5. Passage, A 10 Zellen von der 2. bis zur 3. Passage, Neuro-2a Zellen in der 3. Passage und BSC-1 Zellen von der 60. bis zur 65. Passage.

Zellbehandlung

Konfluente M-1 Zellrasen wurden in Trypsin-Lösung (0.05 % Trypsin / 0.53 mM EDTA in kalzium- und magnesiumfreiem Phosphatpuffer) dissoziiert. Der Trypsinierungsvorgang wurde nach ca. 30 Minuten durch Zugabe von proteinhaltigem Earle's MEM Zellkulturmedium [Gibco-BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland] mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS: Seromed/Biochrom KG, Berlin, Deutschland) gestoppt. Nach einmaligem Waschen und Zentrifugieren (fünf Minuten bei 141 g) wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und erneut in kollagenbeschichteten 100 mm-Zellkulturschalen auf einer im Vergleich zur Ausgangsschale etwa fünfmal größeren Gesamtoberfläche ausgesät. Die Zellen wurden bei 37° C in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre gehalten. Dreimal pro Woche wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Ein- bis zweimal pro Woche, nach Erreichen eines konfluenten Monolayers, wurden die Zellen erneut ausgesät.

Zellkulturmedien

Die folgende Tabelle 1 beschreibt die Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die verschiedenen Zelllinien.

Tabelle 1

Zellen	Mediumzusammensetzung
M-1 (Sammelrohr d. Maus)	<i>Complete PC-1 Medium</i> mit <i>Supplement</i> ¹ + 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 % FCS (nur bei Aussaat für <i>Patch Clamp</i> -Experimente)
HT ₂₉ (humanes Kolon CA)	DMEM ² + 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 3.7 g NaHCO ₃ , 10 % FCS
BSC-1 (Sammelrohr d. Grünen Meerkatze)	MEM ³ mit <i>Earle's Salts</i> ⁴ + 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2.2 g NaHCO ₃ , 10 % FCS
A10 (Gefäßmuskel d. Ratte)	DMEM + 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2.2 g NaHCO ₃ , 1 % (v/v) <i>nonessential amino acid solution</i> ⁵ , 20 % FCS
Neuro-2a (Neuroblastom d. Maus)	MEM mit <i>Earle's Salts</i> + 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2.2 g NaHCO ₃ , 1 % (v/v) <i>nonessential amino acid solution</i> , 10 % FCS

Aussaat

Für die *Patch Clamp*-Experimente wurden die Zellen auf kleinen, rechteckigen Deckgläschen (ca. 9 x 2.5 mm) ausgesät und nach 24 Stunden verwendet (BSC-1 Zellen erst nach 1 - 3 Tagen). Für die Aussaat von HT₂₉ Zellen wurden die Deckgläschen kollagenbeschichtet.

TECHNIK

Patch Clamp

Alle Messungen wurden mit der von Hamill et al. (1981) beschriebenen *Patch Clamp*-Technik durchgeführt. Dabei wird eine Glaspipette (Mikrosaugel Elektrode oder „*Patch-Pipette*“) auf die Zellmembran aufgesetzt und ein kleiner Fleck (*patch*) der Membran elektrisch isoliert, indem sich die Zellmembran so eng an die Innenwand der Pipettenspitze anlegt, daß die Pipettenflüssigkeit mit einem hohen elektrischen Widerstand (*Seal*-Widerstand) von ca. 1 – 10 GΩ gegen die Badlösung abgedichtet wird. Die physikalischen Grundlagen dieser elek-

¹ PC-1 ist ein auf der Basis von DMEM/F-12 entwickeltes, speziell modifiziertes Zellkulturmedium mit niedrigem Proteingehalt (BioWhittaker, Walkersville, MD 21793, USA). Es enthält 5 µM Dexamethason und 15 µg/ml Insulin.

² DMEM: BioWhittaker, Walkersville, MD 21793, USA

³ MEM: Gibco-BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

⁴ *Earle's Salts*: Gibco-BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

⁵ *Nonessential amino acid solution*: Gibco-BRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

trischen Abdichtung des Membranflecken sind noch nicht im einzelnen aufgeklärt [Rae & Levis, 1992]. Wird jetzt in der sogenannten „*cell attached*-Konfiguration“ der Membranflecken durch kurzfristigen Unterdruck in der Pipette rupturiert, erreicht man die konventionelle Ganzzellkonfiguration (*whole cell*) mit direktem elektrischen Zugang zum Zellinnern. Dabei wird das Zytosol innerhalb von wenigen Sekunden mit Pipettenlösung dialysiert [Marty & Neher, 1995] und so die Zugabe von pharmakologisch wirksamen Stoffen zur Pipettenlösung ermöglicht.

Wenn die Pipette in der Ganzzellkonfiguration von der Zelle weggezogen wird, löst sich ein Teil der Zellmembran von der Zelle und fügt sich an der Pipettenspitze wieder zu einer intakten Membran zusammen. In dieser „*outside out*-Konfiguration“ weist die extrazelluläre Seite der Membran zur Badlösung hin. Alternativ dazu kann man den Membranflecken von der „*cell attached*-Konfiguration“ ausgehend aus der Zelle herausreißen, um die „*inside out*-Konfiguration“ (*i/o*-Konfiguration) zu erreichen, bei der die Membraninnenseite zur Badlösung zeigt.

Zur genauen Lokalisation der Pipettenspitze auf der Zellmembran wurden alle Experimente unter einem Nikon TMS Invertmikroskop [Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland] bei 40x durchgeführt und die Kontrastdarstellung des Mikroskops durch eine Hoffmann-Interferenzkontrastoptik [Modulation Optics Inc., Greenvale, NY, USA] verbessert.

Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde eine Flußkammer mit einem Volumen von 250-500 μ l (25 mm Länge, 5 mm Breite, Flüssigkeitsstand 2-4 mm) verwendet, die erlaubte, die Lösung im Bad innerhalb weniger Sekunden vollständig auszutauschen.

Als Referenzelektrode wurde ein Silber/Silberchloridpellet (WPI, Deutschland) benutzt, das in ein separates Referenzbad getaucht war. Das Referenzbad war mit der jeweiligen Pipettenlösung gefüllt und mit der Flußkammer über eine Agarbrücke (2 % Agar in Pipettenlösung) verbunden.

Elektrische Messungen

Die Membranströme und -potentiale wurden mit einem EPC-9 Verstärker [HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland] zusammen mit einem ATARI-Computersystem für die Datenaufnahme und Analyse aufgenommen. Der *Patch Clamp*-Verstärker ist im Prinzip ein sehr empfindlicher Strom-Spannungswandler, der die kleinen Pipettenströme (im pA bis nA-Bereich) in Spannungssignale umwandelt und dabei eine Reihe von Korrekturen durchführt

(u.a. Korrektur des Spannungsabfalls am Meßwiderstand R_f durch OP-Verstärker, Korrektur der Eingangskapazität inklusive Pipetten-Kapazität C_f).

Der Verstärker hat grundsätzlich zwei Betriebszustände: die Spannungsklemme (*voltage clamp*) und die Stromklemme (*current clamp*). Bei der Spannungsklemme mißt der Verstärker, wieviel Strom bei einer vorgegebenen Haltespannung durch die Zellmembran fließt. Bei der Stromklemme wird die Spannung gemessen, die sich bei einem Stromfluß von null über die Zellmembran einstellt. Diese Spannung entspricht in der Ganzzellkonfiguration dem Zellpotential.

Für die hier besprochenen Ganzzelleexperimente wurde nach dem Durchbrechen der Zellmembran und Erreichen der konventionellen Ganzzellkonfiguration die Membrankapazität C_m und der Serienwiderstand von Zelle und Pipette R_s durch die automatische Kompensationschaltung des EPC-9 Verstärkers ermittelt, und es wurden die kapazitiven Transienten automatisch abgeglichen. Der Serienwiderstand R_s wurde nicht kompensiert, um das Auftreten von Verstärkeroszillationen zu vermeiden.

Die Zellen wiesen folgende Werte für C_m und R_s auf (Tabelle 2):

Tabelle 2

Zelllinie	Membrankapazität (C_m)	Serienwiderstand (R_s)
M-1	8.4 ± 0.2 pF ($n = 387$)	12.1 ± 0.5 M Ω ($n = 387$)
HT ₂₉	13.6 ± 1.6 pF ($n = 15$)	10.2 ± 0.9 M Ω ($n = 15$)
BSC-1	9.8 ± 0.7 pF ($n = 16$)	10.4 ± 0.8 M Ω ($n = 16$)
A10	43.3 ± 3.9 pF ($n = 11$)	9.1 ± 1.3 M Ω ($n = 11$)
Neuro-2a	16.7 ± 1.4 pF ($n = 10$)	10.7 ± 1.2 M Ω ($n = 10$)

Das Stromsignal aller Versuche wurde über einen SONY PCM 501ES A/D-Wandler digitalisiert auf Videobänder [Telefunken A960N] aufgenommen, nachdem die erste Filterstufe des EPC-9 Verstärkers (10 kHz Besselfilter) passiert war. Gleichzeitig wurden Strom- und Spannungssignal nach Passage der zweiten Filterstufe (100 Hz Besselfilter in Serie) des EPC-9 Verstärkers auf einem Analog-Tintenschreiber [EN416, Gould Inc., Cleveland, Ohio, USA] mitgeschrieben. Daneben wurde das Stromsignal nach Filterung sowohl auf dem Computerbildschirm als auch auf einem Oszilloskop [HM408, HAMEG, Deutschland] dargestellt. Zur Auswertung wurde das Stromsignal vom Videoband über den Sony PCM D/A-Wandler in ein Analogsignal rückverwandelt und über den *External Stimulus Input*-Eingang (F2) des EPC-9

Verstärkers aufgenommen, mit der zweiten Filterstufe nachgefiltert, über das eingebaute ITC-16 Interface wieder digitalisiert und auf 44 MB Wechselplatten [SyQuest Technology Inc., Fremont, CA, USA] gespeichert. Dabei wurde das Signal für die Auswertung von Einzelkanalaktivitäten mit 1000 Hz Abtast-Frequenz eingelesen und mit 200 Hz nachgefiltert. Für die Auswertung von großen Summenströmen wurde lediglich mit 100-200 Hz Abtast-Frequenz eingelesen und mit 100 Hz (der niedrigstmöglichen Filterrate des EPC-9 Verstärkers) gefiltert. Einzelkanalstromamplituden wurden mit Hilfe von Amplitudenhistogrammen bestimmt. Stromsignale aus Versuchen mit Spannungspulsen wurden während der Pulserzeugung auf der Wechselplatte gespeichert.

Datenverarbeitung

Die Auswertung der Einzelkanalaktivitäten erfolgte zum Teil mit dem Programm *Patch* von A. Rabe und Dr. J. Disser auf einem *ATARI MegaST* Computer, größtenteils aber mit *Patch for Win9x/NT* von Dr. B. Letz (alle Zentrum der Physiologie, AG Prof. Frömter, J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main). Daten aus Versuchen mit Spannungspulsen wurden mit dem Programm *Review* [Instrutech, Elmont, NY, USA] ausgewertet und anschließend mit *Patch for Win9x/NT*, *Excel5.0* bzw. *Xact4.01/Xact6.02* [SciLab GmbH, Hamburg, Deutschland] in Stromspannungskurven umgewandelt. Die Summenströme aus Ganzzellmessungen wurden direkt vom Papier des Tintenschreibers abgelesen und in den Rechner eingegeben. Die Weiterverarbeitung und mathematische Auswertung (Mittelwerte, SEM, *t*-Test) erfolgte mit dem Programm *Excel5.0*. Alle Abbildungen wurden mit *Patch for Win9x/NT*, *Excel5.0* und *Xact4.01/Xact6.02* erstellt.

Positive Ströme entsprechen (Kationen-) Auswärtsströmen durch die Zellmembran, negative Ströme Einwärtsströmen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten bzw. ungepaarten (je nach Versuchsanordnung) *t*-Test untersucht (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

PIPETTEN UND LÖSUNGEN

Pipettenherstellung

Die Pipetten wurden aus Glaskapillarrohr der Firma Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK, mit dem Elektrodenziehgerät Modell Flaming/Brown P-87 [Sutter Instruments Co., San Rafael, CA, USA] gezogen. Die Kapillarrohre hatten einen Außendurchmes-

ser von 1.65 mm und einen Innendurchmesser von 1.2 mm. Nach dem Ziehen wurden die Pipetten mit Sylgard 184™ beschichtet und an der Spitze durch kurzes Erhitzen an einem glühenden Draht „poliert“ [siehe Hamill et al., 1981]. Die Pipetten hatten einen (inneren) Spitzendurchmesser von ca. 1 μm und einen Widerstand (in symmetrischer NaCl-Lösung) von $3.54 \pm 0.04 \text{ M}\Omega$ ($n = 456$).

Pipettenlösungen

Die Zusammensetzung der Pipettenlösungen ist in Tabelle 3A zusammengefaßt:

Tabelle 3A

Kurzbezeichnung	NaCl	MgCl ₂	Chelator	Hepes	NaOH (titriert auf pH 7.5)
NaCl (Standard)	145	1	1 EGTA	10	ca. 7.5
NaCl 10 EGTA	135	1	10 EGTA	10	ca. 14
NaCl 10 EDTA	120	0	10 EDTA	10	ca. 14
NaCl 10 BAPTA	115 (z.T. 135)	2	10 BAPTA	10	ca. 35
95 NaCl	95	1	1 EGTA	10	ca. 7.5

(alle Angaben in mM)

Um die Konzentration an freiem Magnesium bei etwa 1 mM zu halten, wurde der Pipettenlösung mit 10 mM BAPTA die doppelte Menge an MgCl₂ zugesetzt. Die Konzentrationen an freiem Magnesium in einigen Pipettenlösungen wurden mit dem Programm *Chelator* (Theo J.M. Schoenmakers, Department of Animal Physiology, University of Nijmegen, NL) berechnet. Sie betrug in den verschiedenen Lösungen (Tabelle 3B):

Tabelle 3B

	115 NaCl 10 BAPTA + 2 mM MgCl ₂	135 NaCl 10 EGTA	145 NaCl (1 EGTA) (Standard-Pipettenlösung)
freie [Mg ²⁺] _i	1.52 mM	0.60 mM	0.94 mM

Diese Pipettenlösungen wurden auch in der Agarbrücke und im Referenzbad verwendet. Alle Pipettenlösungen wurden unmittelbar vor den Experimenten filtriert (Spritzenfilter mit Porengröße 0.2 μM , Millipore).

Badlösungen

Die Zusammensetzung der verschiedenen Badlösungen ist in den Tabellen 4A bis 4G zusammengestellt.

Tabelle 4A (NaCl – Lösungen)

Kurzbezeichnung	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Hepes	titriert auf pH 7.5
Kontroll NaCl-Ringer	140	5	1	1	10	ca. 5 NaOH
90 NaCl	90	5	1	1	10	ca. 5 NaOH

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4B (NMDG-Cl Lösungen)

Kurzbezeichnung	NMDG-Cl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Hepes	titriert auf pH 7.5
NMDG-Cl	140	5	1	1	10	HCl
95 NMDG-Cl	95	5	1	1	10	HCl

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4C (KCl – Lösungen)

Kurzbezeichnung	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Hepes	titriert auf pH 7.5	Saccharose
KCl 100 S	145	1	1	10	ca. 5 KOH	100

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4D (LiCl – Lösungen)

Kurzbezeichnung	LiCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Hepes	titriert auf pH 7.5	Saccharose
LiCl 100 S	145	1	1	10	ca. 5 KOH	100

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4E (NH₄Cl – Lösungen)

Kurzbezeichnung	NH ₄ Cl	CaCl ₂	MgCl ₂	Hepes	titriert auf pH 7.5	Saccharose
NH ₄ Cl 100 S	145	1	1	10	ca. 5 KOH	100

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4F (BaCl₂ – Lösungen)

Kurzbezeichnung	BaCl ₂	Mannit	Hepes	titriert auf pH 7.5	Saccharose
75 BaCl ₂ 100 S	75	75	10	Tris	100

(alle Angaben in mM)

Tabelle 4G (CaCl₂ – Lösungen)

Kurzbezeichnung	CaCl ₂	Mannit	Hepes	titriert auf pH 7.5	Saccharose
75 CaCl ₂	75	75	10	Tris	0
75 CaCl ₂ 100 S	75	75	10	Tris	100

(alle Angaben in mM)

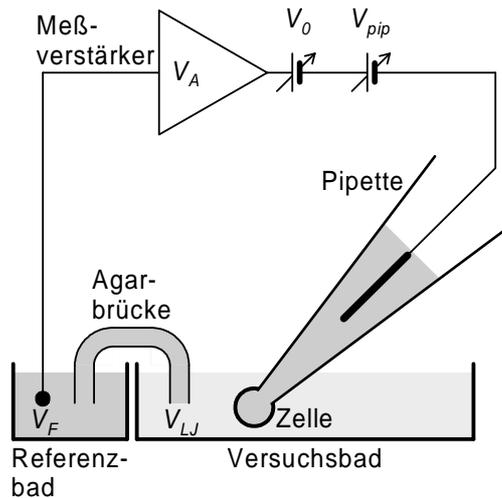
Allen Badlösungen wurde am Versuchstag 5 mM Glukose hinzugefügt.

Chemikalien

Alle verwendeten Substanzen wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, außer HgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland), Maitotoxin (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) und LOE 908 (Dr. Schulz, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland). Wasserunlösliche Substanzen wurden zunächst in DMSO gelöst und dann in die Versuchslösungen überführt. Die DMSO-Endkonzentration in den Versuchslösungen blieb stets unter 0.25 %.

Phasengrenzpotentiale

An den einzelnen Phasengrenzen des Meßkreises treten bei Verwendung der Ganzzellkonfiguration folgende Asymmetriepotentiale auf:



- V_A – festes Asymmetriepotential des Verstärkers
- V_F – festes Asymmetriepotential des Elektrodenpaares
- V_0 – Kompensationsspannung zum Abgleich der Spannung des Meßkreises auf null
- V_{pip} – Haltespannung (frei wählbar)
- V_{LJ} – Phasengrenzpotential (*Liquid Junction Potential*) an der Grenzfläche zwischen Agarbrücke und Badlösung

Während der Dauer des Experiments bleiben die Asymmetriepotentiale des Verstärkereingangs V_A und des Elektrodenpaares V_F konstant. Das Asymmetriepotential des Elektrodenpaares V_F hängt in erster Linie von der Chloridkonzentration der Lösungen, in welche die chlorierten Silberelektroden eintauchen, ab. Die Summe von V_A und V_F wurde beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung gemessen und auf 0 V abgeglichen (V_0). Dieser Abgleich wird bei der Vorgabe der Haltespannung im Verstärker intern berücksichtigt. In der Regel waren V_0 -Werte von -5 mV bis +5 mV erforderlich, um den Meßkreis auf null abzugleichen (im Mittel 1.3 ± 0.2 mV, $n = 455$). Die Veränderung der Summe der Asymmetriepotentiale während des Experiments betrug maximal 3 mV. Entscheidend ist für diese Abweichungen vor allem das Alter der Agarbrücken, die zunehmend verunreinigen, und eine durch Verdunstung bedingte Konzentrierung der Referenzlösung, in der das Silber/Silberchloridpellet hängt.

Zu den variablen Größen im Experiment gehören die Haltespannung V_{pip} und das Phasengrenzpotential (*Liquid Junction Potential*). Die Haltespannung ist frei wählbar. In den meisten Experimenten wurde eine Haltespannung von $V_{pip} = -40$ mV verwendet. Das Phasengrenzpotential V_{LJ} entsteht an der Grenze zweier Elektrolytlösungen aufgrund unterschiedlicher Ionenbeweglichkeiten, wenn sich die Ionenzusammensetzung der Badlösung von der Ionenzusammensetzung der Agarbrücke (die hier gleich der Pipettenlösung ist) unterscheidet (zur Theorie des Phasengrenzpotentials siehe Laprade & Cardinal, 1983). In der Ganzzellkonfiguration spielt nur die Grenzfläche von der Badlösung zur Agarbrücke eine Rolle. Bei Lösungstausch wurde die Haltespannung manuell um die Änderung von V_{LJ} korrigiert.

Zur Bestimmung des Phasengrenzpotentials V_{LJ} wurde die Pipette und das Referenzbad mit 3M KCl-Lösung gefüllt und eine Agarbrücke mit der später im Experiment verwendeten Pi-

pettenlösung eingesetzt. Ein leichter Überdruck gewährleistet einen ständigen Ausstrom von KCl aus der Pipette und verhindert eine Durchmischung mit der Badlösung in der Pipettenspitze. Das Bad wurde zunächst mit derselben Pipettenlösung gefüllt, aus der auch die Agarbrücke hergestellt war, und die Asymmetriepotentiale wurden auf null abgeglichen. Anschließend wurde das Bad mit den Badlösungen, die später im Experiment Anwendung finden sollen, gefüllt und jeweils die Änderung des Asymmetriepotentials bestimmt, die dem Phasengrenzpotential zwischen Badlösung und Agarbrücke entspricht (aufgrund der hohen Konzentration der KCl-Lösung und der in etwa gleich hohen Beweglichkeit der Kalium- und Chloridionen im Referenzbad und in der Pipette bilden sich zwischen Referenzbad und Agar-Brücke bzw. zwischen Pipetten- und Badlösung keine nennenswerten Grenzflächenpotentiale aus, so daß nur das Phasengrenzpotential zwischen Brücke und Badlösung gemessen wird).

In den folgenden Tabellen 5A bis 5C sind Mittelwerte von gemessenen Phasengrenzpotentialen (V_{LJ}) für jedes Paar an Brücken/Pipettenlösung und den verschiedenen Badlösungen angegeben. Die Haltespannung wurde entsprechend korrigiert, wobei für die Ganzzellkonfiguration gilt:

$$V_{pip} = V_M + V_{LJ} \quad , \text{ mit } V_{pip} - \text{Haltespannung}$$

$$V_{LJ} - \text{Phasengrenzpotential}$$

$$V_M - \text{gewünschtes Membranpotential}$$

Das gemessene Umkehrpotential wurde ebenso korrigiert. Es gilt:

$$E_{rev,LJ\text{-korrigiert}} = E_{rev,gemessen} - V_{LJ}, \text{ mit } E_{rev,LJ\text{-korrigiert}} - \text{korrigiertes Umkehrpotential}$$

$$E_{rev,gemessen} - \text{gemessenes Umkehrpotential}$$

$$V_{LJ} - \text{Phasengrenzpotential}$$

Tabelle 5A (Brücke/Pipette: 145 NaCl)

	Kontroll NaCl-Ringer	NMDG-Cl	KCl	LiCl	NH ₄ Cl	75 BaCl ₂	75 CaCl ₂
V_{LJ} [mV]	0	5	-3	2	-4	4	5

Tabelle 5B (Brücke/Pipette: 95 NaCl)

	95 NaCl	95 NMDG-Cl
V_{LJ} [mV]	0	5

Tabelle 5C (Brücke/Pipette: 135 NaCl)

	Kontroll NaCl-Ringer	145 NMDG-Cl	75 BaCl ₂	75 CaCl ₂
V_{LJ} [mV]	1	6	5	6

Berechnung der Permeabilität

Das Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Chlorid wurde wie folgt berechnet (nach Goldman-Hodgkin-Katz):

$$\frac{P_{\text{cation}}}{P_{\text{anion}}} = \frac{c_i^- e^{-\frac{(E_{\text{sym}} - E_{\text{cat_removal}}) zF}{RT}} - c_o^-}{c_i^+ - c_o^+ e^{-\frac{(E_{\text{sym}} - E_{\text{cat_removal}}) zF}{RT}}}$$

wobei P – Permeabilität

E_{sym} – Umkehrpotential in symmetrischen Lösungen

$E_{\text{cat_removal}}$ – Umkehrpotential nach Kationenentzug

c_i^+ – intrazelluläre Kationenkonzentration

c_o^+ – extrazelluläre Kationenkonzentration

c_i^- – intrazelluläre Anionenkonzentration

c_o^- – extrazelluläre Anionenkonzentration

Für die Berechnung des Permeabilitätsverhältnisses von Natrium zu Kalium, Lithium, NH₃⁺, Kalzium und Barium wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{P_1}{P_2} = \frac{c_2 z_2^2}{c_1 z_1^2 e^{-\frac{(E_{\text{rev},2} - E_{\text{rev},1}) z_2 F}{RT}}}$$

wobei P_1 resp. P_2 – Permeabilität von Ion 1 bzw. Ion 2

$E_{\text{rev},1}$ – Umkehrpotential in Ion 1

$E_{\text{rev},2}$ – Umkehrpotential in Ion 2

c_1 resp. c_2 – Ionenkonzentration von Ion 1 bzw. Ion 2

z_1 resp. z_2 – Valenz von Ion 1 bzw. Ion 2

Ergebnisse

A. KONTROLLUNTERSUCHUNGEN AN M-1 ZELLEN

Im ersten Teil der Experimente wurde untersucht, ob die extrazelluläre Hyperosmolarität *per se* oder die mechanische Schrumpfung zum Anstieg des Ganzzellstroms führen.

Zellschrumpfung durch extrazelluläre Hyperosmolarität stimuliert einen Ganzzellstrom

Abbildung 1A zeigt ein typisches Experiment eines durch extrazelluläre Hyperosmolarität aktivierten Ganzzellstroms in M-1 Zellen, wie es in ähnlicher Weise bereits beschrieben wurde [Volk et al., 1995].

Der gemessene Einwärtsstrom war unter isoosmotischen Bedingungen und bei einer Haltespannung von $V_{pip} = -40$ mV anfänglich sehr gering (-10.8 ± 1.5 pA, $n = 103$). Ersatz des extrazellulären Natriums durch das schlecht permeierende Kation NMDG reduzierte den Strom nur wenig (im Durchschnitt auf -4.3 ± 1 pA, $n = 103$). Dieser Effekt war reversibel. Wurde dann die Badlösung von Kontroll NaCl-Ringer zu hyperosmolarer Ringerlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose, in der Abbildung: *Sucrose*) gewechselt, begann der Strom nach drei Minuten (2.7 ± 0.1 Minuten, $n = 103$) stark anzusteigen. Der Zelldurchmesser ging von anfangs 13 μm (im Mittel 16.4 ± 0.2 μm , $n = 100$) auf 8 μm (im Mittel 12.2 ± 0.2 μm , $n = 100$) zurück.

Bei geringen Stromstärken ist es wie früher gezeigt möglich [Volk et al., 1995], in der Ganzzellkonfiguration Einzelkanalströme aufzulösen und darzustellen. Auf dem vergrößerten Ausschnitt der Abbildung 1A sind Schaltvorgänge von Einzelkanälen zu sehen. Die Einzelleitfähigkeit der dort registrierten Kanäle betrug im Durchschnitt 25.9 ± 0.9 pS ($n = 11$); dieses Ergebnis stimmt gut mit dem Befund von Volk et al. (1995) überein (26.4 pS).

Sechs Minuten (6.7 ± 0.3 Minuten, $n = 103$) nach dem Wechsel erreichte der Strom ein Maximum (-211 ± 10 pA, $n = 103$). Ersatz des extrazellulären Na^+ durch NMDG löschte den Strom völlig aus und kehrte ihn sogar zu einem Auswärtsstrom um; dies zeigt, daß er durch Na^+ getragen wurde. Nach Rückkehr zur Kontroll NaCl-Lösung ging der Strom wieder in den Ausgangsbereich zurück (-29 ± 15 pA, $n = 40$). Auch der Zelldurchmesser kehrte mit 12 μm beinahe wieder in den Ausgangsbereich zurück (14.9 ± 0.4 , $n = 40$). Diese Beobachtung wurde in allen 40 (von 103) Experimenten gemacht, in denen die Pipettenabdichtung lange genug stabil war, um die Reversibilität zu testen.

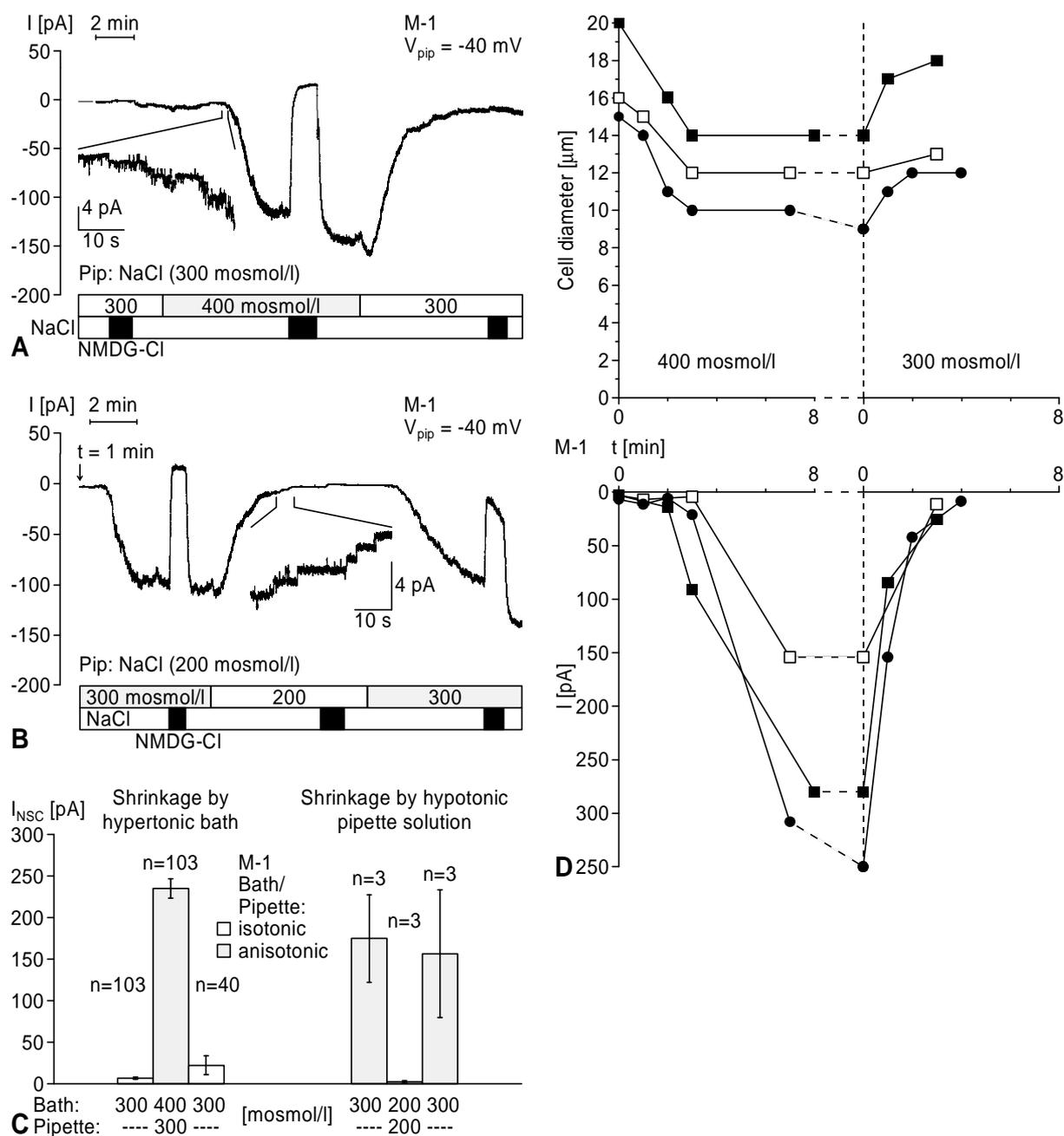


Abbildung 1: Zellschrumpfung durch extrazelluläre Hyperosmolarität oder intrazelluläre Hypoosmolarität aktiviert einen Ganzzellstrom in M-1 Zellen. Kontinuierliche Stromaufzeichnungen mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. **A.** Dieses Experiment zeigt die Aktivierung des Stroms durch extrazelluläre Hyperosmolarität. Zunächst wurde die Badlösung Kontroll NaCl-Ringer (300 mosmol/l) periodisch durch NMDG-Cl ersetzt (schwarz). Dann wurde zu denselben Lösungen 100 mM Saccharose addiert (400 mosmol/l) und später wieder ausgewaschen. Die Pipettenlösung war normoosmolar (NaCl mit 300 mosmol/l). Der obere Balken beschreibt die Osmolarität der Badlösung, der untere den Ersatz von Natrium durch NMDG. Der mit Linien eingegrenzte Teil der Stromkurve ist in höherer Auflösung dargestellt, um Einzelkanäle sichtbar zu machen. **B.** In diesem Experiment wurde eine hypotone Pipettenlösung verwendet (95 NaCl mit 200 mosmol/l). Als Badlösung wurde anfangs 90 NaCl mit 100 mM Saccharose (300 mosmol/l) verwendet, die periodisch mit NMDG-Cl in der selben Konzentration ersetzt wurde. Später erfolgte ein Wechsel zu Saccharose-freier Badlösung (200 mosmol/l) und wieder zur Ausgangslösung. **C.** Gegenüberstellung von Ganzzellstromaktivierung in M-1 Zellen mit den Protokollen von Abbildung 1A (linke Balkengruppe) und 1B (rechte Balkengruppe). Zusammenfassung mehrerer Experimente, wobei nur der NMDG-sensitive Anteil der Einwärtsströme dargestellt ist. **D.** Der Zusammenhang von Zelldurchmesser und Ganzzellstrom in M-1 Zellen in Experimenten wie in Abbildung 1A nach Wechsel zu hyperosmolarer Badlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose, 400 mosmol/l) und beim Auswaschen der Saccharose (300 mosmol/l). Jedes Symbol steht für ein einzelnes Experiment. Im oberen Teil sind die Zelldurchmesser gegen die Zeit aufgetragen, im unteren analog dazu die Ströme. Die gestrichelten Abschnitte auf den Verbindungslinien zwischen den Einzelwerten bedeuten, daß ein stabiler Zustand erreicht wurde. Pipettenlösung: NaCl.

Der osmotische Gradient ist entscheidend

Daß Saccharose keinen spezifischen Effekt auf den Ganzzellstrom hat, wurde von Volk et al. (1995) bereits gezeigt. In der vorliegenden Arbeit zeige ich, daß nicht die Hyperosmolarität per se, sondern das Schrumpfen der Zelle den Strom auslöst und daß die Antwort wiederholbar ist (Abbildung 1B). Dazu wurde eine hypoosmolare Pipettenlösung verwendet (95 NaCl). Bei anfänglich normoosmolarer Badlösung (90 NaCl mit 100 mM Saccharose) schrumpfte die Zelle schnell von 13 auf 10 μm (im Mittel von $12.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$ auf $10.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$, $n = 3$), und ein NMDG-sensitiver Einwärtsstrom wurde aktiviert. Nach Wechsel zu einer hypoosmolaren Badlösung erreichte die Zelle wieder ihre Ausgangsgröße und der stimulierte Strom ging stark zurück. In dem vergrößerten Ausschnitt sind Einzelkanalschaltvorgänge gezeigt, die während des Rückgangs der Stimulation beobachtet werden konnten. Ein weiterer Wechsel zur anfänglichen normoosmolaren Badlösung ließ die Zelle wieder schrumpfen, und der Strom stieg erneut an.

In Abbildung 1C sind mehrere derartige Experimente zusammengefaßt, wobei nur die NMDG-sensitive Komponente des Ganzzellstroms abgebildet ist. Die linke Balkengruppe beschreibt Versuche wie in Abbildung 1A, in denen von Kontroll NaCl-Ringer zu hyperosmolarer Ringer-Badlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose) und wieder zurück gewechselt wurde. Als Pipettenlösung wurde normoosmolare NaCl-Lösung (NaCl) verwendet. Unter isoosmotischen Bedingungen (linker Balken) floß fast kein Strom. Wenn ein osmotischer Gradient bestand und die Zelle schrumpfte, wurde eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit aktiviert (mittlerer Balken), die reversibel war, wenn der Gradient aufgehoben wurde (rechter Balken). Die rechte Balkengruppe betrachtet dagegen Versuche analog zu Abbildung 1B mit anfänglich normoosmolarer Badlösung (90 NaCl mit 100 mM Saccharose), aber hypoosmolarer Pipettenlösung (95 NaCl). Dabei bestand der osmotische Gradient bereits am Anfang, und Zellschrumpfung löste eine nichtselektive Leitfähigkeit aus, deren Maximum der linke Balken zeigt. Danach wurde zu hypoosmolarer Badlösung (90 NaCl) gewechselt und der aktivierte Strom ging völlig zurück (mittlerer Balken). Anschließend konnte durch Wechsel zu normoosmolarer Badlösung wie bei Beginn des Experiments ein zweites Mal die beschriebene Leitfähigkeit ausgelöst werden. Die Antwort auf Zellschrumpfung war also reversibel und konnte wiederholt werden.

Abbildung 1D zeigt den zeitlichen Verlauf von Zelldurchmesser und aktiviertem Ganzzellstrom an drei Experimenten nach dem Protokoll von Abbildung 1A. Wie man sieht, begannen die Zellen unmittelbar nach dem Wechsel der Badlösung zu schrumpfen (respektive zu

schwellen), während der Ganzzellstrom erst später aktiviert bzw. inaktiviert wurde. Beide Effekte, Zellschrumpfung und Aktivierung des Ganzzellstroms, waren reversibel.

B. SELEKTIVITÄT

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Selektivität des beobachteten Ganzzellstroms näher bestimmt.

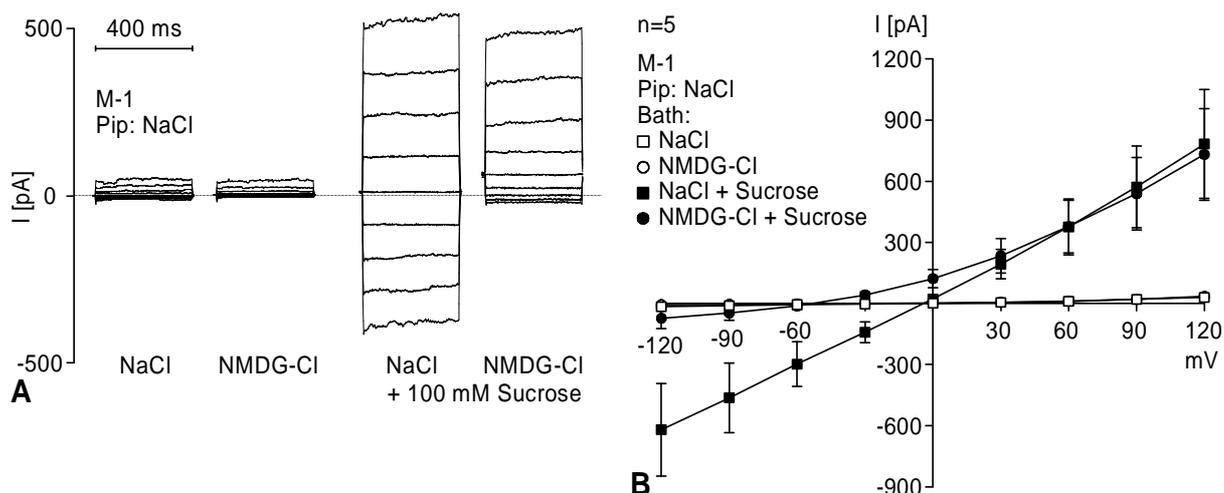


Abbildung 2: **A.** Stromkurven von Ganzzellströmen einer M-1 Zelle unter isoosmotischen Bedingungen und in Gegenwart von 100 mM Saccharose (*Sucrose*), jeweils mit Kontroll NaCl-Ringer oder NMDG-Cl in der Badlösung. Pipettenlösung: NaCl. Es wurde pro Badlösung eine Serie von neun rechteckigen Spannungspulsen zwischen -120 mV und +120 mV appliziert. Die Serie begann mit einem Potentialwechsel von 0 mV auf -120 mV; die nachfolgenden Pulse waren um jeweils 30 mV positiver. Die Pulsdauer betrug 400 ms, in den Intervallen von 1 s Dauer dazwischen betrug die Haltespannung 0 mV. Die resultierenden Stromkurven sind übereinander projiziert. **B.** Stromspannungskennlinien der Ganzzellströme aus fünf ähnlichen Experimenten wie in A. Die offenen Symbole entsprechen den Stromwerten unter isoosmolaren Bedingungen, die gefüllten Symbole den Werten mit hyperosmolarem Bad (mit 100 mM Saccharose). Quadrate zeigen NaCl-Ri Badlösung an, Kreise NMDG-Cl Badlösung. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

Selektivität für Anionen

Um die Selektivität von Natrium über Chlorid zu bestimmen, wurde der Ganzzellstrom vor und während Stimulation durch Zellschrumpfung bei verschiedenen Haltespannungen gemessen und dabei das extrazelluläre Natrium durch NMDG ersetzt. Abbildung 2A zeigt übereinanderprojizierte Stromkurven bei Applikation von Spannungspulsen von 400 ms Dauer in Schritten von 30 mV zwischen -120 mV und +120 mV. Unter isoosmotischen Bedingungen waren die Ströme gering, und sie wurden durch NMDG kaum gehemmt. Das Umkehrpotential in NaCl betrug im Mittel $V_m = -17.2 \pm 1.6$ mV ($n = 103$). Nachdem zu hyperosmolarer Badlösung gewechselt worden war, stieg der Einwärtsstrom stark an. Er zeigt keine besondere

spannungsabhängige Aktivierung oder Inaktivierung. Deutlich zu sehen ist, daß der aktivierte Strom nur von Na^+ getragen wurde, da der Entzug des extrazellulären Na^+ und Ersatz durch NMDG die Einwärtsströme fast vollständig aufhob (bei negativen Haltespannungen), während die Auswärtsströme erhalten blieben (bei positiven Haltespannungen). Das zeigt auch, daß die aktivierte Leitfähigkeit praktisch impermeabel für Cl^- und NMDG war. Während der Stimulation betrug das Membranpotential in NaCl Lösung -5.3 mV ($-4.2 \pm 0.3 \text{ mV}$, $n = 103$) und in NMDG-Cl Lösung -64 mV ($-57.6 \pm 1.3 \text{ mV}$, $n = 103$). Die aus fünf ähnlichen Experimenten abgeleiteten Stromspannungskennlinien zeigt Abbildung 2B. Unter isoosmolaren Bedingungen flossen praktisch keine Ströme. Nach Wechsel zu hyperosmolarer Badlösung und in Gegenwart von extrazellulärem Natrium hatte die Stromspannungskennlinie ein Umkehrpotential von etwa 0 mV . Sie verlief annähernd linear, zeigte aber eine leichte Auswärtsrektifizierung, im Gegensatz zu den Stromspannungskurven bei Einzelkanalexperimenten in der *i/o*-Konfiguration an M-1 Zellen, die völlig linear verlaufen [Korbmacher et al., 1995]. Allerdings wurde in Einzelkanälen eine Spannungsaktivierung durch depolarisierende Haltespannungen beschrieben, die zur Auswärtsrektifizierung in Ganzzellexperimenten führen könnte [Chraïbi et al., 1994; Korbmacher et al., 1995]. Das Umkehrpotential in NMDG-Cl Badlösung mit 100 mM Saccharose betrug etwa -60 mV , das daraus errechnete Permeabilitätsverhältnis von Kationen zu Chlorid ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) betrug etwa 14.

Selektivität für monovalente Kationen

Nichtselektive Kationenkanäle unterscheiden in ihrer Selektivität typischerweise wenig zwischen monovalenten Kationen. Abbildung 3A zeigt eine Ganzzellregistrierung eines Experiments, in dem nach Wechsel von normoosmolarer zu hyperosmolarer Badlösung der Ganzzellstrom stark anstieg und durch Ersatz des extrazellulären Natriums durch NMDG vollständig gehemmt wurde. Ersatz durch Kalium, Lithium oder Ammonium variierte den Strom dagegen nur wenig. Das Umkehrpotential mit Kaliumchlorid im Bad betrug $-4.2 \pm 1.2 \text{ mV}$, mit Lithiumchlorid $-0.8 \pm 1.2 \text{ mV}$ und mit Ammoniumchlorid $10.1 \pm 1.6 \text{ mV}$.

In Abbildung 3B sind mehrere Experimente mit dem Protokoll von Abbildung 3A zusammengefaßt. Die von den verschiedenen monovalenten Kationen getragenen Einwärtsströme sind auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von Natrium normiert. Ersatz des extrazellulären Natriums durch NMDG kehrte den stimulierten Einwärtsstrom in einen Auswärtsstrom um und zeigt, daß der Einwärtsstrom durch Kationen getragen wurde. Die Größe der Einwärtsströme in Gegenwart von Kalium, Lithium und Ammonium befand sich dagegen etwa im selben Bereich. Die relative Leitfähigkeit im Verhältnis zu Natrium betrug für Kalium 0.90,

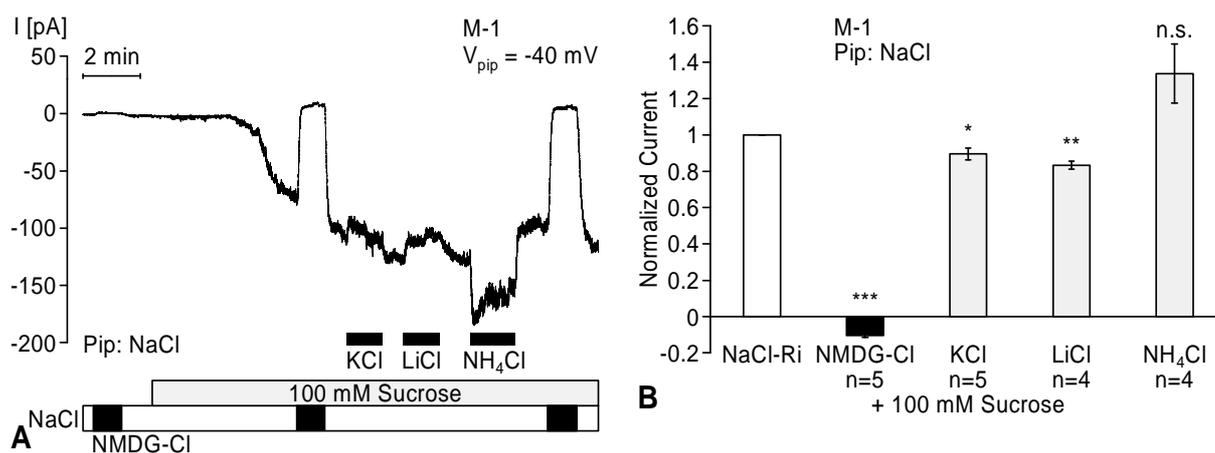


Abbildung 3: Selektivität des durch Zellschrumpfung stimulierten Ganzzellstroms für monovalente Kationen. **A.** Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV unter gleichen Bedingungen wie Abbildung 1A. Pipettenlösung: NaCl, Badlösung anfangs Kontroll NaCl-Ringer. Nach Wechsel zu Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose (grauer Balken) wurde das extrazelluläre Natrium durch NMDG (schwarz), KCl, LiCl und NH₄Cl (schwarze Balken direkt unter Stromkurve) ersetzt. **B.** Zusammenfassung der Ergebnisse von mehreren Experimenten wie in A. Die von den verschiedenen monovalenten Kationen getragenen Einwärtsströme wurden auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von Natrium normiert. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

für Lithium 0,83 und für Ammonium 1,34 ($\text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$), eine für nichtselektive Kationenkanäle typische Leitfähigkeitssequenz.

Selektivität für divalente Kationen

Nichtselektive Kationenkanäle können permeabel für divalente Kationen sein. Um dies zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, in denen das extrazelluläre NaCl während der Phase des maximalen schrumpfungsaktivierten Stroms durch 75 mM CaCl₂ respektive BaCl₂ ersetzt wurde. In Abbildung 4A wird gezeigt, daß es bei Verwendung der üblichen Pipettenlösung mit 1 mM EGTA beim Wechsel zu 75 mM CaCl₂ im hyperosmolaren Bad zu einer initialen Verminderung, dann aber zu einer starken vorübergehenden Erhöhung des Einwärtsstroms kam. In dieser Phase war der Einwärtsstrom nicht mehr durch Ersatz des extrazellulären Kalziums durch NMDG hemmbar (nicht gezeigt); danach ging er auf einen Wert zurück, der sonst bei Anwesenheit von NMDG im Bad meßbar war. Dieser Effekt stellte sich in vier Experimenten in Größe und Dauer recht uneinheitlich dar. Nach Badwechsel zurück zu NaCl stieg der Einwärtsstrom sofort wieder auf den vorherigen Wert an. Dies läßt vermuten, daß die Natriumleitfähigkeit des nichtselektiven Kationenkanals wesentlich größer als die Kalziumleitfähigkeit ist. Abbildung 4B und C zeigen einzelne Stromkurven bei Anwendung eines Pulsprotokolls und daraus abgeleitete Stromspannungskennlinien aus demselben Experiment wie in Abbildung 4A. Unter isoosmotischen Bedingungen waren die Ströme und der Effekt

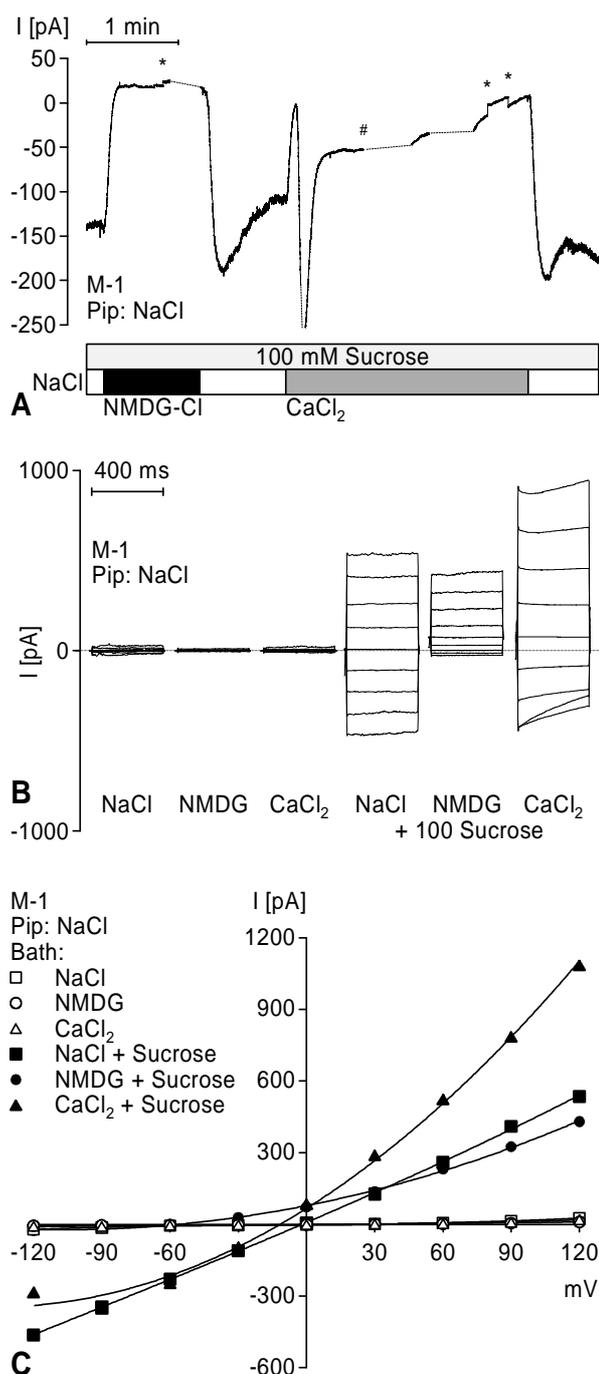


Abbildung 4: Effekt von 75 mM Ca₂Cl₂ Badlösung auf den schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Ganzzellstrom einer M-1 Zelle. **A.** Ersatz des extrazellulären Natriums durch NMDG (schwarz) hemmte den Einwärtsstrom vollkommen; Ersatz durch 75 mM Kalzium führte zunächst zur Reduktion des Stroms, dann aber zu einem starken vorübergehenden Anstieg mit nachfolgendem Rückgang. Nach Wechsel zurück zu Natrium kehrte der Strom zum Ausgangswert zurück. An mit * bezeichneten Stellen wurde die Haltespannung um das *Liquid Junction*-Potential korrigiert; an der mit # bezeichneten Stelle wurden Spannungspulse appliziert, deren resultierenden Stromkurven in B abgebildet sind. Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipette: NaCl. **B.** Stromkurven von Ganzzellströmen einer M-1 Zelle unter isoosmotischen Bedingungen und in Gegenwart von 100 mM Saccharose (Badlösungen Kontroll NaCl-Ringer, NMDG-Cl und CaCl₂). Es wurden die gleichen Spannungspulse wie in Abbildung 2B verwendet. Die resultierenden Stromkurven sind übereinander projiziert. Pipettenlösung: NaCl. **C.** Stromspannungskennlinien der Ganzzellströme aus dem selben Experiment wie in A und B. Die offenen Symbole entsprechen den Stromwerten unter isoosmolaren Bedingungen, die gefüllten Symbole den Werten mit hyperosmolarem Bad (mit 100 mM Saccharose). Quadrate zeigen Kontroll NaCl-Ringer Badlösung an, Kreise NMDG-Cl Badlösung und Dreiecke CaCl₂ Badlösung.

vom Ersatz des extrazellulären Natriums durch NMDG und Kalzium auf die Einwärtsströme gering. Nach Wechsel zu hyperosmolarer Badlösung kann man die normale Stimulation des Ganzzellstroms erkennen, dessen Einwärtskomponente nach Ersatz des Natriums durch NMDG komplett gehemmt wurde. Bei den Strompulsen, die in 75 mM CaCl₂ während des vorübergehenden Stromanstiegs (Stelle „#“ in Abbildung 4A) gewonnen wurden, kann man sehr große Ein- und Auswärtsströme erkennen; letztere sind sogar größer als in Gegenwart von Natrium im Bad. Da Auswärtsströme nicht durch einen Kalziumeinstrom verursacht werden können, muß beim Wechsel von Natrium zu Kalzium eine zusätzliche Leitfähigkeit ak-

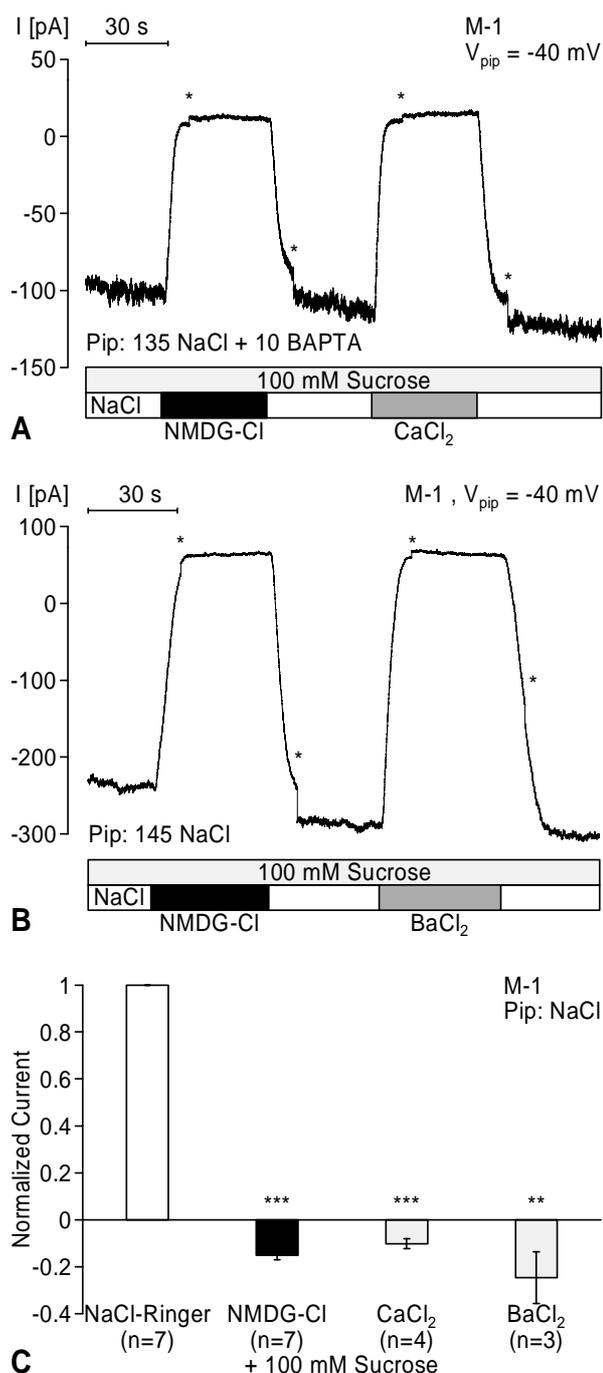


Abbildung 5: Selektivität des stimulierten Ganzzellstroms für divalente Kationen. **A.** Selektivität für Kalzium. In hyperosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung mit 100 mM Saccharose wurde das extrazelluläre Natrium durch NMDG (schwarz) oder Kalzium (dunkelgrau) ersetzt. Bei * am Anfang des NMDG-Pulses bzw. Kalzium-Pulses und nach Wechsel in NaCl wurde die Haltespannung entsprechend des vorher gemessenen Liquid Junction-Potentials korrigiert. Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipettenlösung: 135 NaCl 10 BAPTA. **B.** Selektivität für Barium. In hyperosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung mit 100 mM Saccharose wurde das extrazelluläre Natrium durch NMDG (schwarz) und Barium (dunkelgrau) ersetzt. Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipettenlösung: NaCl. **C.** Zusammenfassung der Ergebnisse von mehreren Experimenten wie in A und B. Die von den verschiedenen divalenten Kationen getragenen Ganzzellströme sind auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von Natrium normiert. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

tiviert worden sein. Tatsächlich zeigen die Ströme in CaCl₂ eine starke Spannungsabhängigkeit mit Aktivierung bei positiver Haltespannung und Deaktivierung bei negativer Haltespannung. Die Stromspannungskennlinien in Abbildung 4C zeigen zudem eine deutliche Auswärtsrektifizierung. Diese Eigenschaften, die Auswärtsrektifizierung und Spannungsabhängigkeit, sind charakteristisch für den Ca²⁺-aktivierten Chloridkanal, der von Meyer & Korbmacher (1996) in M-1 Zellen beschrieben wurde. Ich nehme deshalb an, daß die starke Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration einen kleinen Kalziumeinstrom verursacht, der unter der Membran eine ausreichende Konzentration an Kalzium für die Aktivierung der

kalziumabhängigen Chloridleitfähigkeit bereitstellt. Dieser Effekt trat in allen Experimenten ($n = 4$) auf, in denen die Standardpipettenlösung NaCl mit 1 mM EGTA als Chelator verwendet wurde. Diese Experimente wurden deshalb nicht in die Auswertung der folgenden Daten über die Selektivität divalenter Kationen einbezogen. Um die Aktivierung störender Chloridströme zu verhindern, wurden der Pipettenlösung in den folgenden Experimenten stärkere Kalziumchelatoren zugesetzt (10 mM EGTA oder 10 mM BAPTA).

Abbildung 5A zeigt ein solches Experiment mit 10 mM BAPTA als Chelator in der Pipettenlösung. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer kontinuierlichen Ganzzellregistrierung während der Phase des maximalen schrumpfungsaktivierten Einwärtsstroms. Das extrazelluläre Natrium wurde zunächst durch NMDG, dann durch Kalzium ersetzt. Unter diesen Bedingungen kehrten sich die Einwärtsströme in Gegenwart von Kalzium ähnlich wie in Gegenwart von NMDG zu Auswärtsströmen um. Den gleichen Effekt hatte Ersatz des Natriums durch Barium (Abbildung 5B). Ergebnisse von ähnlichen Experimenten sind in Abbildung 5C zusammengefaßt; sie zeigen, daß weder Kalzium noch Barium einen Einwärtsstrom tragen konnten. Das Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Kalzium betrug $P_{Na}/P_{Ca} \approx 460$, für Barium $P_{Na}/P_{Ba} \approx 1190$. Die Permeabilität des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals für divalente Kationen ist also sehr gering. Dies stimmt gut mit den Eigenschaften Ca^{2+} -aktivierter nichtselektiver Kationenkanäle im *i/o*-Patch überein [Korbmacher et al., 1995], und steht im Gegensatz zum Maitotoxin-aktivierten nichtselektiven Kationenkanal von L-Zellen der Maus [Estación et al., 1996] (siehe Abbildung 7A und B).

C. PHARMAKOLOGIE

Der dritte Teil befaßt sich mit der Untersuchung verschiedener Hemmstoffe auf den nichtselektiven Kationenkanal. Außerdem wurde untersucht, ob Maitotoxin einen aktivierenden Effekt auf die Leitfähigkeit von M-1 Zellen hat.

Inhibitoren der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit

Abbildung 6A zeigt eine Ganzzellregistrierung mit dem Effekt von 100 μ M Flufenaminsäure auf den schrumpfungsaktivierten Ganzzellstrom. Flufenaminsäure wirkte rasch und konnte den stimulierten Einwärtsstrom um etwa 83 % reduzieren. Dieser Effekt war allerdings nur langsam und nicht immer vollständig reversibel, wofür möglicherweise die Nebenwirkungen dieser Substanz verantwortlich sind (siehe Diskussion).

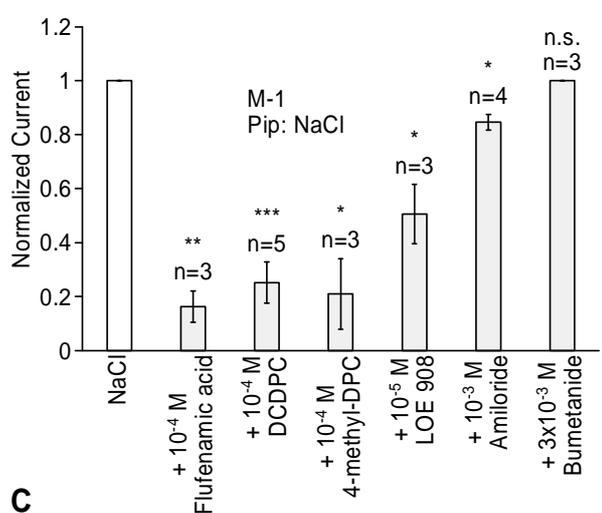
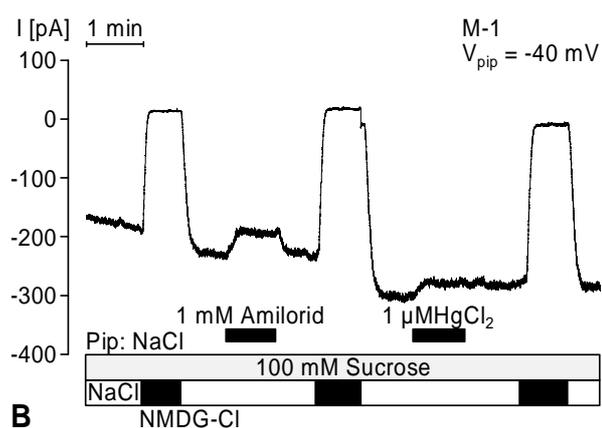
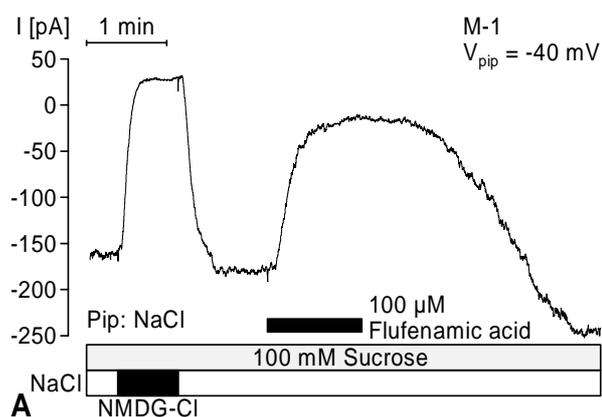


Abbildung 6: Hemmstoffe der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit. **A.** Effekt von Flufenaminsäure auf den stimulierten Ganzzellstrom. In hyperosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung mit 100 mM Saccharose wurde das extrazelluläre Natrium erst durch NMDG (schwarz) ersetzt. Dann wurden der NaCl-Badlösung 100 μ M Flufenaminsäure zugesetzt (schwarzer Balken direkt unter Stromkurve). Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipettenlösung: NaCl. **B.** Effekt von Amilorid und Quecksilber. In hyperosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung mit 100 mM Saccharose wurde 1 mM Amilorid bzw. 1 μ M $HgCl_2$ zugesetzt (schwarzer Balken direkt unter Stromkurve). Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipettenlösung: NaCl. **C.** Zusammenfassung der Ergebnisse von Hemmstoffexperimenten mit ähnlichen Protokollen wie in A und B. In Kontroll NaCl-Ringer Badlösung mit 100 mM Saccharose wurde zunächst der beschriebene nichtselektive Ganzzellstrom aktiviert. Dann wurden in individuellen Experimenten die verschiedenen Hemmstoffe in NaCl-Badlösung angewendet. Die dabei gemessenen Einwärtsströme sind auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von NaCl-Badlösung normiert. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten. Pipettenlösung: NaCl.

Abbildung 6B stellt den Effekt von 1 mM Amilorid und 1 μ M $HgCl_2$ auf den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom in einer Originalstromregistrierung in Ganzzellkonfiguration dar. Amilorid ist ein bekannter Hemmstoff epithelialer Natriumkanäle (ENaC) [Garty & Palmer, 1997] mit einer IC_{50} unter 1 μ M. Nach Light et al. (1988) werden auch nichtselektive Kationenkanäle in Zellen des medullären Sammelrohrs der Ratte durch Amilorid gehemmt. Der schrumpfungsaktivierte Einwärtsstrom in M-1 Zellen wurde dagegen selbst durch 1 mM Amilorid nur sehr wenig vermindert. 1 μ M $HgCl_2$, das eine hemmende Wirkung auf Ca^{2+} -

aktivierte nichtselektive Kationenkanäle in *i/o*-Patches in braunen Fettzellen hatte [Koivisto et al., 1993], konnte den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom ebenfalls nicht wirksam hemmen.

Abbildung 6C faßt Experimente zusammen, in denen mit ähnlichen Protokollen wie in Abbildung 6A und B die Wirkung der folgenden Hemmstoffe nichtselektiver Kationenkanäle auf den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom untersucht wurden:

- 100 μM Flufenaminsäure, ein Derivat von 3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure (DCDPC) und potenter Hemmstoff von nichtselektiven Kationenkanälen [Gögelein et al., 1990], hemmte den Einwärtsstrom um $83.6 \pm 5.8 \%$ ($n = 3$, $p < 0.01$). Die Sensitivität für Flufenaminsäure ist typisch für viele Ca^{2+} -aktivierte nichtselektive Kationenkanäle.
- 100 μM 3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure (DCDPC) reduzierte den Einwärtsstrom um $74.8 \pm 7.6 \%$ ($n = 5$, $p < 0.001$), und 100 μM 4-Methyl-Diphenylamin-2,2'-Dicarboxylsäure (4-methyl-DPC, Derivat von DPC, ähnlich DCDPC) hemmte den Einwärtsstrom um $79.0 \pm 13.0 \%$ ($n = 3$, $p < 0.05$). Diese beiden Substanzen wurden von Gögelein & Pfannmüller (1989) als potente Hemmstoffe des nichtselektiven Kationenkanals in exokrinen Pankreaszellen der Ratte beschrieben.
- 10 μM LOE 908 konnte den Einwärtsstrom um $49.4 \pm 11.0 \%$ vermindern ($n = 3$, $p < 0.05$). LOE 908 wurde von Krautwurst et al. (1993) als hochselektiver Hemmstoff der ADH-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in A7r5 Zellen (glatte Muskulatur aus Rattenaorta) verwendet.
- 1 mM Amilorid reduzierte den Einwärtsstrom lediglich um $15.4 \pm 2.9 \%$ ($n = 4$, $p < 0.05$).
- 3 mM Bumetanid, ein spezifischer Hemmstoff des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symports, führte zu keiner meßbaren Hemmung des Einwärtsstroms, womit ausgeschlossen werden kann, daß der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symport in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt.

Die Untersuchungen der verschiedenen Hemmstoffe zeigen, daß Flufenaminsäure in einer Konzentration von 100 μM die schrumpfungsaktivierte Leitfähigkeit von allen getesteten Substanzen am wirksamsten hemmen kann. Andere Substanzen, die als starke Hemmstoffe nichtselektiver Kationenkanäle bekannt sind, hatten unter den Bedingungen dieser Arbeit nur eine geringere Wirkung (LOE 908, DCDPC). Amilorid hatte fast gar keine Wirkung; dadurch wird der hier untersuchte Kanal deutlich vom ENaC abgegrenzt.

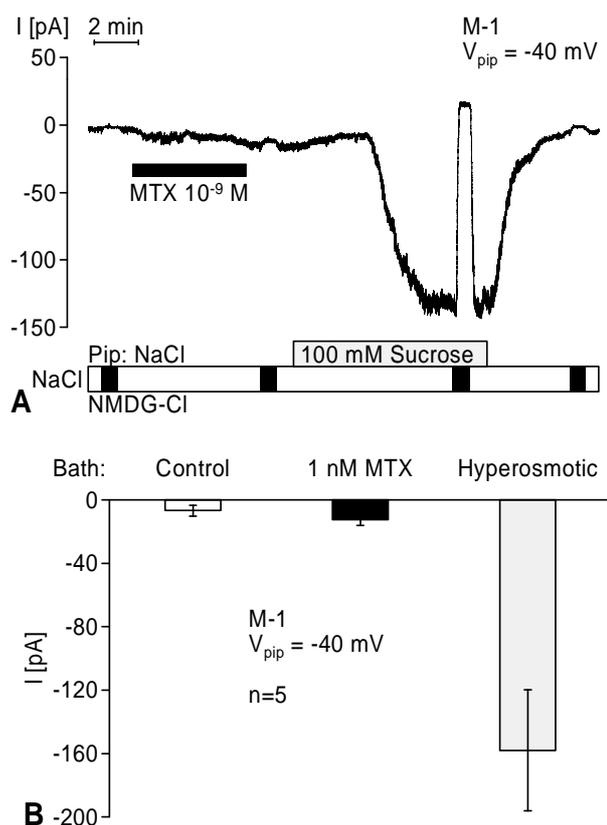


Abbildung 7: Effekt von Maitotoxin auf den Ganzzellstrom. **A.** In isoosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung (weiß) wurde das extrazelluläre Natrium zunächst durch NMDG ersetzt. Dann wurde 1 nM Maitotoxin zugesetzt (schwarzer Balken direkt unter Stromkurve). Danach wurde der bereits beschriebene nichtselektive Ganzzellstrom durch Zusatz von 100 mM Saccharose in die Badlösung aktiviert. Ersatz des extrazellulären Natriums durch NMDG führte zur kompletten Hemmung des Stroms. Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV. Pipettenlösung: NaCl. **B.** Zusammenfassung mehrerer Experimente wie in A. Darstellung der Mittelwerte der Ganzzellströme unter NaCl-Badlösung (Control), Zusatz von 1 nM Maitotoxin (MTX) und 100 mM Saccharose (Hyperosmotic).

Maitotoxin

Maitotoxin aktiviert nichtselektive Kationenkanäle in verschiedenen Zellarten, zum Beispiel in *Xenopus laevis*-Oozyten [Bielfeld-Ackermann et al., 1998] und in L-Zellen der Maus [Estación et al., 1996]. 1 nM Maitotoxin, die von Bielfeld-Ackermann et al. und Estación et al. als wirksam befundene Konzentration, hatte aber in der vorliegenden Arbeit bei Anwendung unter isoosmotischen Bedingungen keinen Effekt auf die Ganzzellströme. Es verhinderte auch nicht eine nachfolgende Stimulation des nichtselektiven Einwärtsstroms durch Hyperosmolarität in derselben Zelle.

D. UNTERSUCHUNG DES AKTIVIERUNGSMECHANISMUS

Die Rolle des intrazellulären Kalziums

Im Zusammenhang mit Experimenten, in denen hoch konzentrierte Kalziumchelatoren verwendet wurden, fiel auf, daß Zusatz von 10 mM BAPTA in der Pipette die Stimulation der nichtselektiven Leitfähigkeit merklich reduzierte. In nominell kalziumfreier NaCl-Pipettenlösung mit 1 mM EGTA war dagegen aber noch eine Antwort auf Schrumpfung zu sehen. Das läßt vermuten, daß eine wenn auch sehr geringe Ca^{2+} -Konzentration vorhanden

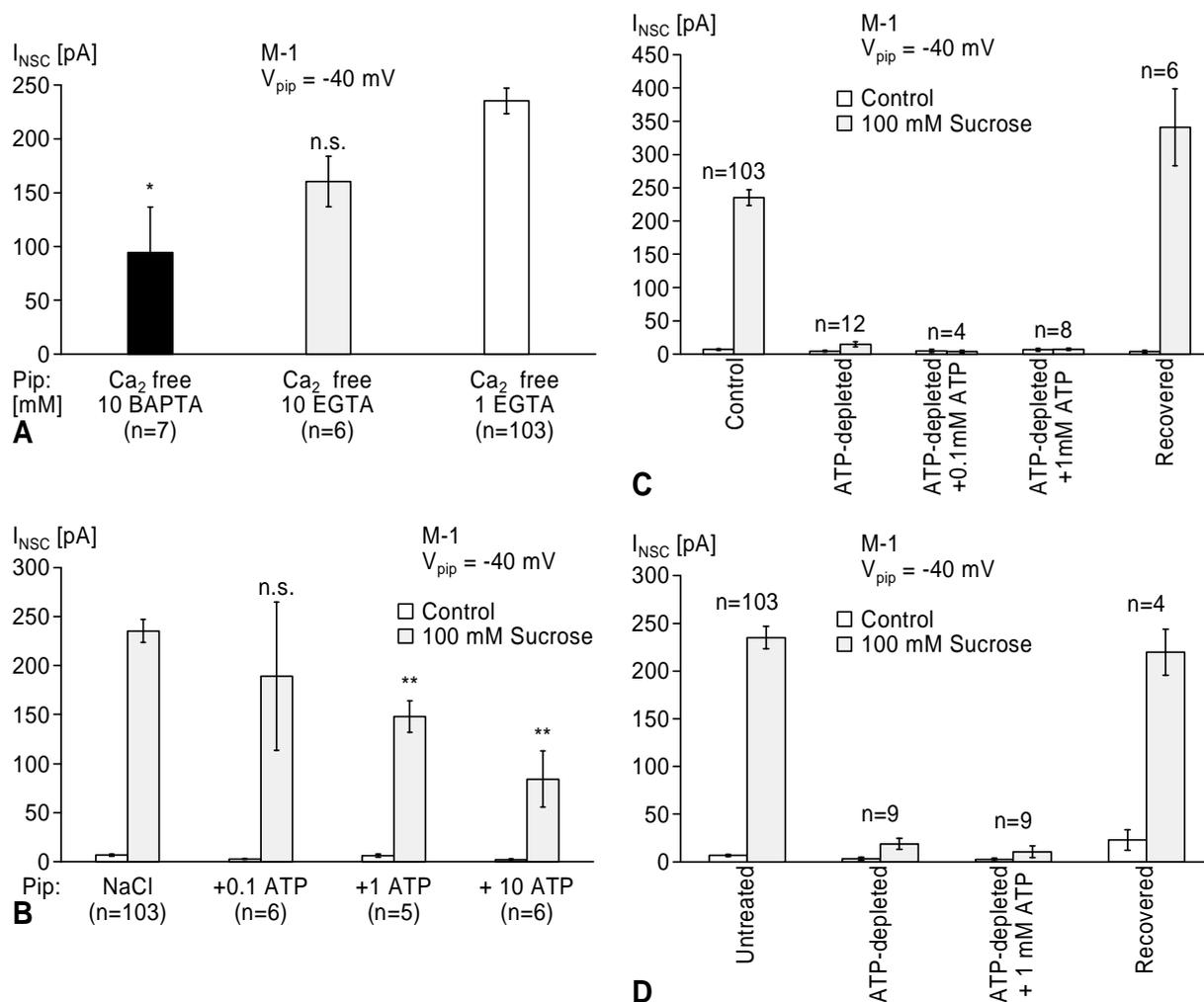


Abbildung 8: Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals. Es wurde das beschriebene Protokoll der Zellschrumpfung mit nachfolgender Aktivierung eines Ganzzellstroms verwendet. Hier nur Darstellung des nichtselektiven Anteils am maximalen Ganzzellstrom, d.h. es wurde die Differenz zwischen dem Strom bei Entzug von extrazellulärem Natrium und des Stroms bei Kontroll NaCl-Ringer im Bad gebildet. **A.** Abhängigkeit des Ganzzellstroms von der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zusammenfassung mehrerer Experimente mit abnehmend stark abgepuffertem intrazellulären Kalzium (Pipettenlösung: 115 NaCl + 10 BAPTA, NaCl + 10 EGTA und Kontrolle NaCl mit 1 mM EGTA). **B.** Abhängigkeit des Ganzzellstroms von der intrazellulären ATP-Konzentration. Zusammenfassung mehrerer Experimente mit von links nach rechts zunehmend hoher intrazellulärer ATP-Konzentration. Pipettenlösung: NaCl. **C.** Reversible Hemmung der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit durch ATP-Verarmung der M-1 Zellen. Zusammenfassung mehrerer Experimente mit Präinkubation in den Stoffwechselgiften 100 nM Rotenon und 2 mM 2-Deoxyglukose. ATP-Substitution erfolgte mit 0.1 mM und 1 mM MgATP in der NaCl-Pipettenlösung. **D.** Reversible Hemmung der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit durch ATP-Verarmung der M-1 Zellen mit einem alternativen Protokoll. Zusammenfassung mehrerer Experimente mit Präinkubation in den Stoffwechselgiften 2.5 μ M FCCP und 2 mM 2-Deoxyglukose. ATP-Substitution mit 1 mM NaATP in der NaCl-Pipettenlösung. Pipettenlösung: NaCl.

sein muß, um die schrumpfung induzierte Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen zu ermöglichen, und umgekehrt, daß vollkommener Ca^{2+} -Entzug die Aktivierung stark reduziert oder komplett verhindert. Es wurden deshalb Experimente mit unterschiedlich hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration durchgeführt (Abbildung 8A), in denen alle Pipettenlö-

sungen zwar nominell kalziumfrei waren, aber mit verschieden starken Ca^{2+} -Chelatoren gepuffert wurden.

Selbst bei starker Abpufferung des intrazellulären Kalziums mit 10 mM BAPTA kam es zu einer Aktivierung des Ganzzellstroms durch Zellschrumpfung. Allerdings war die Antwort abgeschwächt. Bei 10 mM EGTA in der nominell kalziumfreien Pipettenlösung erreichte die Antwort noch 68 % des Kontrollwertes, der mit 1 mM EGTA in der Pipette beobachtet worden war; bei Zusatz von 10 mM BAPTA wurden nur noch 40 % erreicht ($p < 0.05$). Eine minimale Konzentration an Kalzium ist offenbar zur Aktivierung notwendig, ein direkt kalzium-abhängiger Aktivierungsweg ist aber unwahrscheinlich.

Um mögliche Mechanismen der Aktivierung durch Kalzium weiter zu untersuchen, wurden Pilotexperimente mit Zusatz von 250 μM des Calmodulin-Antagonisten W-7 (*N*-(6-Aminoethyl)-[^3H]-5-Chloro-1-Naphtalensulfonamid) zur Pipettenlösung durchgeführt (nach Hidaka & Tanaka, 1979). In den drei gelungenen Experimenten wurde eine komplette und eine teilweise Inhibition des schrumpfungsinduzierten nichtselektiven Kationenstroms, aber auch eine im Größenbereich der Kontrollgruppe liegende Stimulation des Stroms beobachtet. Der Einwärtsstrom wurde im Mittel auf 33 % ($n = 3$) der Kontrolle reduziert. Dieses vorläufige Ergebnis deutet an, daß Calmodulin möglicherweise an der Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals beteiligt ist.

Rolle von intrazellulärem ATP

In *i/o*-Experimenten an M-1 Zellen wurde eine deutliche Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit nichtselektiver Kationenkanäle durch 1 mM ATP oder ADP beobachtet [Korbmacher et al., 1995]. Im Gegensatz dazu habe ich in meinen Ganzzellexperimenten gefunden, daß MgATP den schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanal übereinstimmend mit früheren Befunden von Volk et al. (1995) nicht so stark hemmt (Abbildung 8B). Bei Zusatz von 1 mM ATP zur Pipettenlösung wurde der schrumpfungsaktivierte Einwärtsstrom auf 63 % vermindert. Bei Zusatz von 10 mM ATP waren immerhin noch 36 % der Antwort erhalten.

Pilotexperimente, in denen statt des Magnesiumsalzes 1 mM Na_2ATP ($n = 6$), 1 mM $\text{Na}_{1.5}\text{ADP}$ ($n = 1$) oder 1 mM $\text{Li}_{3.5}\text{AMP-PNP}$ ($n = 1$) verwendet wurde, ließen ebenfalls eine normale bis abgeschwächte Antwort auf Zellschrumpfung erkennen. Verwendung von 10 mM Na_2ATP ($n = 6$), 10 mM $\text{Na}_{1.5}\text{ADP}$ ($n = 5$) oder 10 mM $\text{Li}_{3.5}\text{AMP-PNP}$ ($n = 5$) verhinderte aber die Antwort beinahe vollständig. Dies ist wahrscheinlich auf die Abnahme der freien

intrazellulären Magnesiumkonzentration zurückzuführen, die in Pipettenlösungen mit 10 mM Na₂ATP bis auf 0.012 mM und mit 10 mM Na_{1.5}ADP auf 0.11 mM sinken kann. Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle der intrazellulären Mg²⁺-Konzentration bei der Aktivierung des schrumpfung induzierten nichtselektiven Kationenkanals hin (siehe dazu auch unten).

Eine weitere Möglichkeit, die intrazelluläre ATP-Konzentration zu verändern, besteht in der Vergiftung des Stoffwechsels der Zelle. Wie in Abbildung 8C gezeigt wird, führte eine etwa einstündige Inkubation der M-1 Zellen in Kontroll NaCl-Ringer mit 100 nM Rotenon und 2 mM 2-Deoxyglucose zu einer kompletten Auslöschung der Antwort auf Zellschrumpfung (Inkubationszeit 61.7 ± 10.0 Minuten, $n = 12$, Zusatz auch zur Pipettenlösung). Die Antwort ließ sich aber durch Zusatz von 0.1 mM MgATP (Inkubationszeit 35.0 ± 6.1 Minuten, $n = 4$) bzw. 1 mM MgATP (Inkubationszeit 25.7 ± 3.0 Minuten, $n = 8$) in Pipettenlösung nicht wieder hervorrufen. Das spricht gegen die Hypothese, daß der Verlust der schrumpfung induzierten Kanalaktivierung allein durch den Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration hervorgerufen sein könnte, zumal die bei hohen Konzentrationen beobachtete Hemmwirkung von ATP bei der Konzentration von 1 mM noch keine Rolle spielen sollte (siehe Abbildung 8B). Nach dem Auswaschen von Rotenon und nach einer Erholungsphase von 124.2 ± 10.7 Minuten ($n = 6$) in PC-1 Zellmedium mit 5 % FCS war die Antwort auf Zellschrumpfung jedoch wieder annähernd normal. Offensichtlich war der Aktivierungsmechanismus durch die Vergiftung des Stoffwechsels nur reversibel beeinträchtigt worden.

Ähnliche Beobachtungen wurden mit einem anderen Protokoll zur Senkung der intrazellulären ATP-Konzentration gemacht. Inkubation mit 2.5 µM FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) und 2-Deoxyglucose [nach Leyssens et al., 1996] in Kontroll NaCl-Ringer (Inkubationszeit 58.3 ± 5.8 Minuten, $n = 9$, Zusatz auch zur Pipette), verhinderte ebenfalls die Aktivierung der nichtselektiven Leitfähigkeit durch extrazelluläre Hyperosmolarität (siehe Abbildung 8D). Damit ist ein spezifischer oder unspezifischer Rotenon-Effekt ausgeschlossen. Auch in diesem Fall war die Antwort nur reversibel unterdrückt, nach Auswaschen in NaCl-Badlösung und Erholungsphase in PC-1 Medium (Inkubationszeit 30.0 ± 0.0 Minuten, Erholungsphase 87.5 ± 7.2 Minuten, $n = 4$) konnte sie wieder hervorrufen werden. Zugabe von 1 mM NaATP zur Pipettenlösung in Gegenwart von FCCP und 2-Deoxyglucose im Bad war jedoch wiederum wirkungslos.

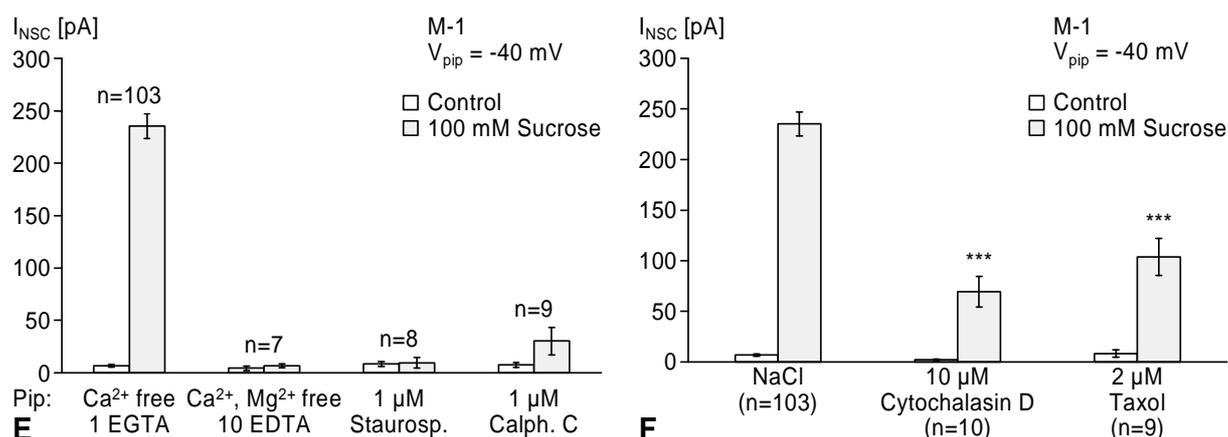


Abbildung 8 (ff): Abhängigkeit des schrumpfungaktivierten Ganzzellstroms von der Magnesiumkonzentration der Pipettenlösung, und Effekt von Proteinkinasehemmstoffen und von Substanzen mit Wirkung auf das Zytoskelett. Es ist der nichtselektive Anteil am maximalen Ganzzellstrom in isoosmolarer Kontroll NaCl-Ringer Badlösung (Control, weiß) und in hyperosmolarer Badlösung mit 100 mM Saccharose (grau) dargestellt. **E.** Zusammenfassung mehrerer Experimente mit magnesiumfreier Pipettenlösung (10 mM EDTA), 1 μM Staurosporin bzw. 1 μM Calphostin C verglichen mit Kontrollversuchen mit der üblichen Pipettenlösung (1 mM EGTA, links). In den Versuchen mit Proteinkinasehemmstoffen Staurosporin und Calphostin C wurden die Zellen zusätzlich mindestens 20 Minuten vor Durchführung der Experimente inkubiert. Pipettenlösung: NaCl. **F.** Effekt von Präinkubation mit Cytochalasin D und Taxol auf den schrumpfungaktivierten Ganzzellstrom in M-1 Zellen. Zusammenfassung mehrerer Experimente mit NaCl-Pipettenlösung mit 10 μM Cytochalasin D bzw. 2 μM Taxol verglichen mit der Kontrolle (links). Zusätzlich mindestens 30 Minuten Inkubation in Cytochalasin bzw. Taxol vor Durchführung der Experimente.

Beteiligung von Proteinkinasen und Magnesium

Da ATP freies Magnesium cheliert, wurde neben der Wirkung von ATP auf den schrumpfungaktivierten nichtselektiven Kationenkanal auch die Wirkung der Mg²⁺-Konzentration untersucht. In der Tat war die Antwort auf Zellschrumpfung auch vom intrazellulären Magnesium abhängig. Wie Abbildung 8 E zeigt, erreichte der Einwärtsstrom bei nominell magnesiumfreier Pipettenlösung, die mit 10 mM EDTA gepuffert war (im Gegensatz zur normalen Pipettenlösung mit 1 mM EGTA), nur noch 2.8 % des Kontrollwertes ($n = 7$). Die Abhängigkeit von der intrazellulären Mg²⁺-Konzentration und von der intrazellulären ATP-Konzentration spricht dafür, daß der Mechanismus der Kanalaktivierung über eine Phosphorylierungsreaktion vermittelt wird.

Um eine mögliche Verknüpfung des Aktivierungsmechanismus mit Proteinkinasen zu untersuchen, wurden Experimente mit entsprechenden Hemmstoffen durchgeführt. Inkubation in NaCl Badlösung mit Staurosporin (Inkubationszeit 66.1 ± 6.0 Minuten), einem relativ unselektiven, aber hochwirksamen Proteinkinasen-Blocker, oder mit Calphostin C (Inkubationszeit 52.2 ± 6.5 Minuten), einem sehr spezifischen Blocker der Proteinkinase C [Tamaoki, 1991], führte tatsächlich zur Reduktion des schrumpfungaktivierten Ganzzellstroms. 1 μM

Staurosporin reduzierte die Antwort auf Zellschrumpfung auf 4.0 % ($n = 8$) des Kontrollwertes, während 1 μM Calphostin C sie auf 12.9 % ($n = 9$) der Kontrolle reduzierte. Demnach scheinen auch die Proteinkinasen eine Rolle zu spielen. Allerdings ist auch hier zu bemerken, daß Hemmeffekte nur bei sehr hohen Hemmstoffkonzentrationen auftraten.

Rolle des Zytoskeletts

Es ist bekannt, daß eine Reihe von Substanzen wie z.B. Cytochalasin D die Aktinfilamente depolymerisieren, während andere Substanzen wie Phalloidin antagonistisch wirken. Ebenso gibt es Substanzen, die Mikrotubuli abbauen (Colchizin), oder stabilisieren (Taxol). Während Experimente mit Colchizin und Phalloidin leider keine verwertbaren Beobachtungen zuließen, verminderte Präinkubation in Cytochalasin D (Inkubationszeit 45.0 ± 3.9 Minuten) nach dem Protokoll von Cooper (1987) und Oike et al. (1994) die Antwort auf Zellschrumpfung auf 29.4 % des Kontrollwertes ($n = 10$), wie in Abbildung 8F gezeigt wird. Auch Inkubation in Taxol (Inkubationszeit 54.4 ± 3.4 Minuten) nach Oike et al. (1994) führte zum Rückgang der Antwort auf 44.1 % ($n = 9$). Die genaue Rolle des Zytoskeletts bleibt also unklar, obwohl die Experimente mit Cytochalasin D zumindest stark vermuten lassen, daß das Zytoskelett am Aktivierungsmechanismus beteiligt ist.

E. EXPERIMENTE MIT ANDEREN ZELLINIEN

Schließlich wurde das Protokoll der Zellschrumpfung auch auf andere Zelllinien ausgedehnt, um diese auf einen schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanal hin zu untersuchen.

Effekt von extrazellulärer Hyperosmolarität auf Ganzzellströme in HT₂₉ Zellen

In ähnlichen Experimenten wie mit M-1 Zellen wurde der Effekt von extrazellulärer Hyperosmolarität auf HT₂₉ (humane Kolonkarzinom) Zellen untersucht. Abbildung 9A zeigt einen typischen Verlauf der Aktivierung eines Einwärtsstroms durch Zellschrumpfung bei diesen Zellen.

Unter isotonen Bedingungen in Kontroll NaCl-Ringer Lösung war der Einwärtsstrom anfänglich sehr gering (Haltespannung $V_{pip} = -40$ mV). Ersatz des extrazellulären Na^+ durch NMDG hatte keine meßbare Wirkung. Nachdem zu hyperosmolarer Badlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose) gewechselt wurde, begann der Strom drei Minuten

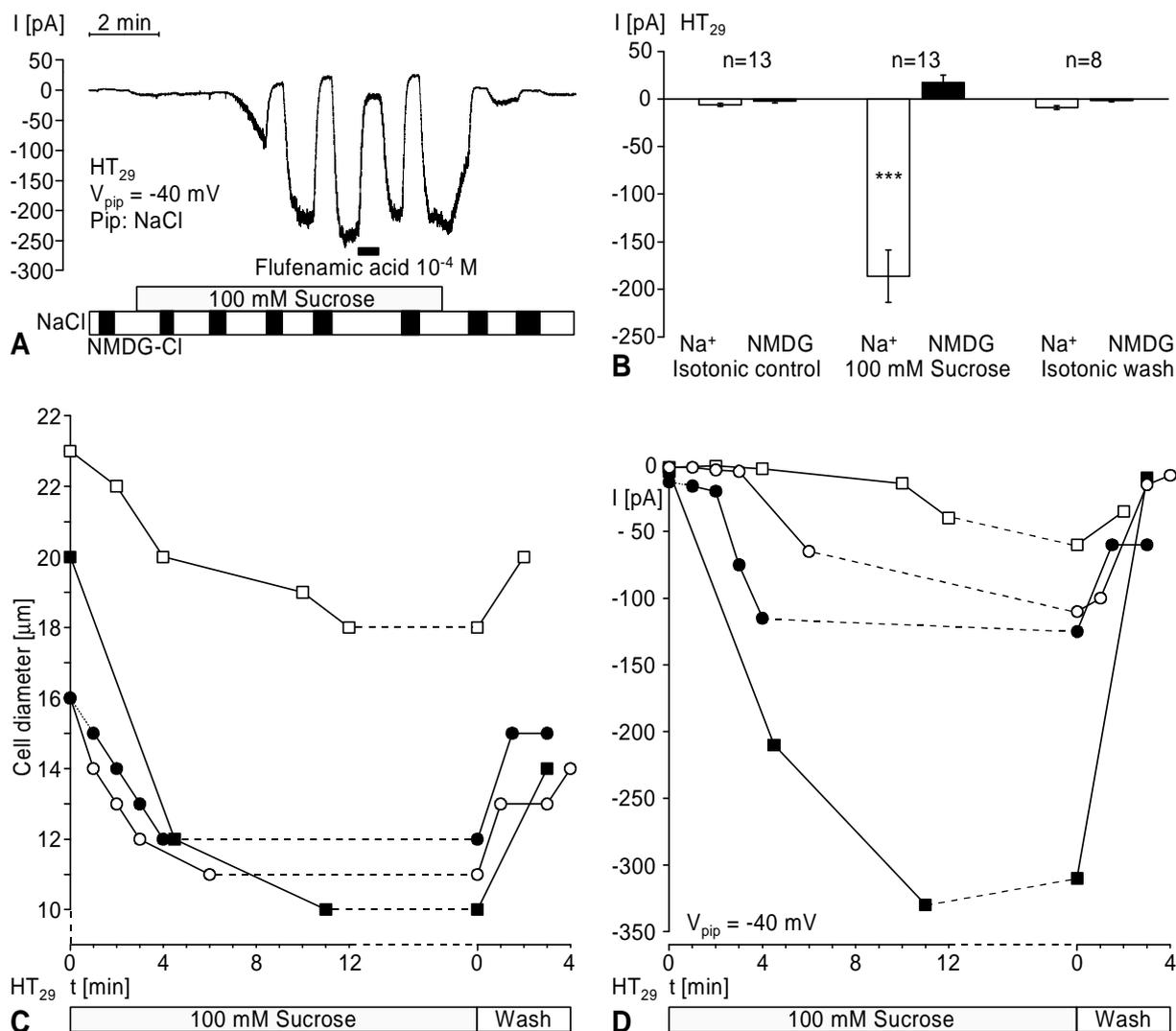


Abbildung 9: Zellschrumpfung aktiviert einen durch Flufenaminsäure hemmbaren Ganzzellstrom in HT_{29} Zellen. **A.** Die kontinuierliche Stromregistrierung wurde bei einem Haltepotential von $V_{pip} = -40$ mV aufgenommen. Als Pipettenlösung wurde NaCl verwendet, als Badlösung anfangs Kontroll NaCl-Ringer (offener Balken), das periodisch durch NMDG-CI (schwarzer Balken) ersetzt wurde. Dann wurde 100 mM Saccharose zu beiden Badlösungen und während der Stimulation außerdem 100 μ M Flufenaminsäure zugegeben. **B.** Zusammenfassung mehrerer Experimente wie in A. Offene Balken entsprechen Kontroll NaCl-Ringer als Badlösung, schwarze Balken Ersatz des Natriums durch NMDG. Als Pipettenlösung wurde NaCl verwendet. Der Strom wurde während isosmotischer Verhältnisse (Control), unter Zusatz von 100 mM Saccharose zum Bad und nach Auswaschen der Saccharose (Wash) gemessen. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten. In Gegenwart von extrazellulärem Natrium erhöht die Zugabe von 100 mM Saccharose den Strom nach einigen Minuten mit hoher Signifikanz (***). **C/D.** Der Zusammenhang von Zelldurchmesser und Ganzzellstrom in HT_{29} Zellen in Experimenten wie in A. Jedes Symbol steht für ein einzelnes Experiment. Im oberen Teil sind die Zelldurchmesser auf die Zeit aufgetragen, im unteren analog dazu die Ströme. Die gestrichelten Abschnitte auf den Verbindungslinien zwischen den Einzelwerten bedeuten, daß ein stabiler Zustand erreicht wurde. Pipettenlösung: NaCl, Badlösungen: NaCl-Ri mit 100 mM Saccharose und ohne Saccharose (Wash).

später stark anzusteigen. Sechs Minuten nach dem Wechsel erreichte der Strom ein Maximum von -250 pA. Ersatz des extrazellulären Na^+ durch das nicht permeierende NMDG führte jetzt zu einem kompletten Verschwinden des Stroms; dies zeigt, daß er von Na^+ -Ionen getragen

wurde. Zusatz von 100 μM Flufenaminsäure im Bad hemmte den Strom im Mittel um $84 \pm 5\%$ ($n = 8$, $p < 0.01$). Nach dem Wechsel zurück zur Kontroll NaCl-Ringer Lösung ging der Strom wieder in den Ausgangsbereich zurück.

Abbildung 9B faßt 13 ähnliche Versuche mit HT₂₉-Zellen zusammen. Der schrumpfungsinduzierte Einwärtsstrom stieg nach Wechsel zur hyperosmolaren Badlösung von durchschnittlich -6 ± 2 pA um den Faktor 30 auf -186 ± 28 pA ($n = 13$) an. Die Stimulation begann 3 ± 1 Minuten ($n = 13$) nach Applikation von hyperosmolare Lösung und erreichte nach 8 ± 1 Minuten ($n = 13$) ein Maximum. In 8 von 13 Experimenten war die Pipettenabdichtung lange genug stabil, um im Mittel 4 ± 0.3 Minuten nach Auswaschen der hyperosmolare Lösung eine Erholung des Stroms auf Anfangswerte zu beobachten.

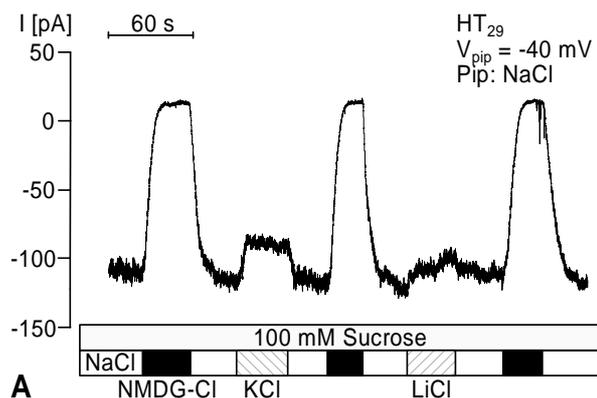
Wie in Abbildung 9C und D zu sehen ist, veränderte sich der Zelldurchmesser reziprok zum Ganzzellstrom von 18 ± 1 μm bei isotonen Bedingungen zu 12 ± 1 μm bei hyperosmolarer Badlösung ($n = 13$). Nach dem Auswaschen stieg er von 13 ± 1 μm wieder auf 15 ± 1 μm an ($n = 8$). Ähnlich wie auch in M-1 Zellen ging Zellschrumpfung dem Anstieg des Stroms voran.

Selektivität für monovalente Kationen und Chlorid; Hemmung durch Flufenaminsäure

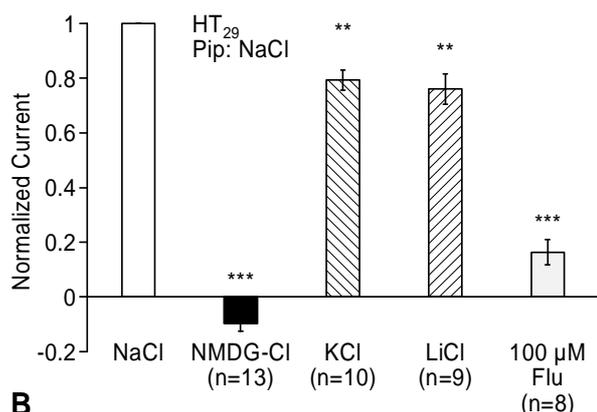
Die Kationenselektivität des stimulierten Ganzzellstroms wurde während maximaler Stimulation in hyperosmolarer Badlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccharose) bestimmt (Abbildung 10A). Das extrazelluläre Natrium wurde dabei durch die monovalenten Kationen Kalium oder Lithium ersetzt. Wie schon vorher gezeigt, hatte der Ersatz von Natrium durch NMDG einen kompletten Rückgang des Einwärtsstroms zu Folge, wogegen er bei Ersatz durch Kalium oder Lithium nur leicht abgeschwächt war. Das zeigt, daß die zugrundeliegenden Kanäle nur wenig zwischen diesen Alkalikationen unterscheiden.

In Abbildung 10B sind mehrere gleichartige Experimente zusammengefaßt. Das Leitfähigkeitsverhältnis von Kalium zu Natrium (P_K / P_{Na}) betrug 0.79 ± 0.04 ($n = 10$, $p < 0.001$) und das von Lithium zu Natrium (P_{Li} / P_{Na}) betrug 0.76 ± 0.06 ($n = 9$, $p < 0.01$).

Die schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenleitfähigkeit war nahezu unabhängig von der angelegten Haltespannung. Das zeigt Abbildung 11A. In diesem Experiment wurden Spannungspulse von 400 ms Dauer zwischen -120 und $+120$ mV appliziert. Nur bei den höchsten Strömen war eine leichte Aktivierung oder Deaktivierung zu erkennen. Die aus drei ähnlichen Experimenten ermittelten Stromspannungskennlinien (Abbildung 11B) zeigen dementsprechend eine leichte Auswärtsrektifizierung (wie in M-1 Zellen).

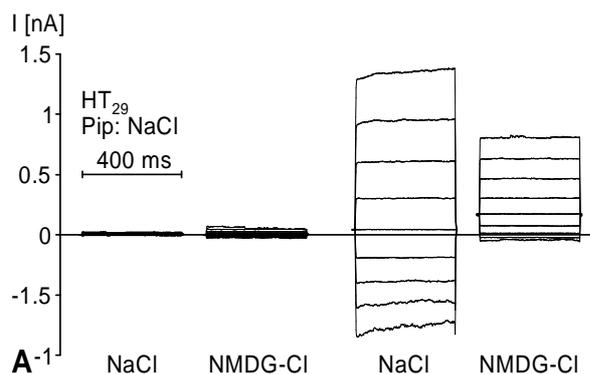
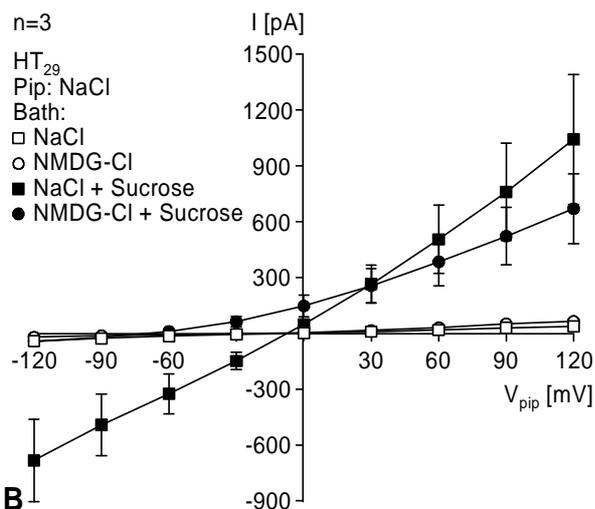


A



B

Abbildung 10: Selektivität des stimulierten Ganzzellstroms in HT_{29} Zellen für monovalente Kationen. **A.** Kontinuierliche Stromaufzeichnung mit Haltepotential $V_{pip} = -40$ mV und gleichen Bedingungen wie in Abbildung 9. Pipettenlösung: NaCl. Nach Wechsel in hyperosmolare NaCl-Ri Badlösung mit 100 mM Saccharose (grauer Balken) wurde das extrazelluläre Natrium durch NMDG (schwarzer Balken), KCl und LiCl (gestreifte Balken) ersetzt. **B.** Zusammenfassung der Ergebnisse von mehreren Experimenten wie in A. Die von den verschiedenen monovalenten Kationen getragenen Einwärtsströme und der Effekt von 100 μ M Flufenaminsäure auf den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom sind auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von Natrium normiert. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

A⁻¹

B

Abbildung 11: **A.** Einzelne Ganzzellstromkurven von Spannungspulsen einer HT_{29} Zelle in Gegenwart und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium (Ersatz durch NMDG) unter isoosmotischen Bedingungen und mit 100 mM Saccharose. Pipettenlösung: NaCl. Es wurde pro Badlösung eine Serie von neun rechteckigen Spannungspulsen zwischen -120 mV und +120 mV appliziert. Die Serie begann mit einem Potentialwechsel von 0 mV auf -120 mV; die nachfolgenden Pulse waren um jeweils 30 mV positiver. Die Pulsdauer betrug 400 ms, in den Intervallen von 1 s Dauer dazwischen betrug die Haltespannung 0 mV. Die resultierenden Stromkurven sind übereinander projiziert. **B.** Stromspannungskennlinien der Ganzzellströme aus fünf ähnlichen Experimenten wie in A. Die offenen Symbole entsprechen den Stromwerten unter isoosmolaren Bedingungen, die gefüllten Symbole den Werten mit hyperosmolarem Bad (mit 100 mM Saccharose). Quadrate zeigen NaCl-Ri Badlösung an, Kreise NMDG-CI Badlösung. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

Der Ersatz von extrazellulärem Na^+ durch NMDG während der Stimulation veränderte das Umkehrpotential von -4.5 ± 0.7 auf -57 ± 4.1 mV ($n = 10$). Das stimmt gut mit der Beobach-

tung eines kleinen Auswärtsstroms überein, der bei einer Haltespannung von -40 mV mit NMDG im Bad auftrat (siehe Abbildung 9B). Zusammengenommen zeigen diese Daten, daß der stimulierte Kanal kaum zwischen Natrium, Kalium und Lithium unterscheidet, aber hochselektiv ist für Kationen gegenüber Anionen. Das Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Chlorid (P_{Na}/P_{Cl}) betrug etwa 12.5.

Wie bereits erwähnt, ist Flufenaminsäure ein potenter Hemmstoff nichtselektiver Kationenkanäle. Ähnlich wie an M-1 Zellen ist die stimulierte Leitfähigkeit an HT₂₉ Zellen durch $100 \mu\text{M}$ Flufenaminsäure im Mittel um $83.6 \pm 4.7 \%$ ($n = 8, p < 0.001$) hemmbar.

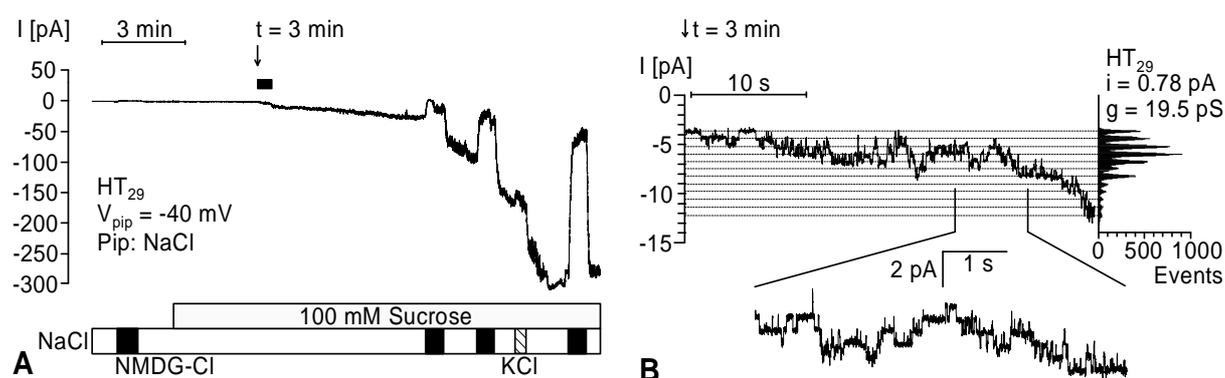


Abbildung 12: Auflösung von Einzelkanalströmen in Ganzzellaufnahmen von HT₂₉ Zellen während der initialen Phase der Stromaktivierung durch Hyperosmolarität. Es herrschten die gleichen Bedingungen wie in Abbildung 10. **A.** Die Ganzzellstromkurve gibt einen Überblick über die Stromaktivierung durch Hyperosmolarität. Die Badwechsel zeigen, daß der stimulierte Strom durch Entzug des extrazellulären Natriums fast vollständig gehemmt wurde (Ersatz durch NMDG) und auch durch Kalium getragen werden konnte. Der durch den schwarzen Balken über der Stromkurve gekennzeichnete Anteil drei Minuten nach Zugabe von 100 mM Saccharose ist in B vergrößert gezeigt. **B.** Stromamplitudenhistogramm des Ausschnitts aus Abbildung 12A. Die horizontalen Linien entsprechen den Spitzen des Histogramms. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt Schaltvorgänge von Einzelkanälen in höherer Vergrößerung.

Auflösung von Einzelkanalströmen

Unter physiologischen Bedingungen ist die Ganzzelleitfähigkeit von HT₂₉ Zellen von einer Kaliumleitfähigkeit bestimmt [Bajna et al., 1991]. Bei den verwendeten experimentellen Bedingungen mit einer symmetrischen NaCl-Konzentration in Bad und Pipette ist diese Kaliumleitfähigkeit von vornherein ausgeschaltet. Als Folge davon ist der Ganzzellstrom bei isoosmolaren Bedingungen sehr klein. Bei einer Haltespannung von $V_{pip} = -40$ mV waren die Einwärtsströme im Mittel -6.7 pA groß, was einen Widerstand von ca. $6 \text{ G}\Omega$ gleichkommt. So war es wie in den M-1 Zellen möglich, in der Ganzzellkonfiguration Einzelkanalströme aufzulösen und darzustellen. In der initialen Phase der Stromaktivierung 3 Minuten nach Beginn der Applikation von hyperosmolarer Badlösung (Kontroll NaCl-Ringer mit 100 mM Saccha-

rose) sind in Abbildung 12B Schaltvorgänge einzelner Kanäle zu erkennen. Die Anzahl der aktiven Kanäle nahm während der Messung in hyperosmolarer Badlösung ständig zu. Das Amplitudenhistogramm der Stromkurve zeigt 12 Spitzen in gleichen Abständen, die den Offen- und Geschlossenzuständen der aktivierten Kanäle entsprechen. Die Amplitude der Einzelkanalströme betrug 0.78 pA. Bei einer Haltespannung von $V_{pip} = -40$ mV entspricht dies einer Einzelkanalleitfähigkeit von 19.5 pS. Im weiteren Versuchsverlauf stieg der Ganzzellstrom weiter an und erreichte schließlich ein Maximum von etwa -280 pA, aber Einzelkanalströme konnten ab einem Strom von etwa -20 pA nicht mehr aufgelöst werden. Dies gelang erst wieder, nachdem das Bad mit Kontroll NaCl-Ringer perfundiert wurde und der Strom wieder unter -20 pA gesunken war. In vier gleichartigen Experimenten betrug die Einzelkanalleitfähigkeit im Mittel 17.6 ± 0.9 pS.

Effekt von Hyperosmolarität auf Ganzzellströme von BSC-1, A 10 und Neuro-2a Zellen

Auch in BSC-1, A10 und Neuro-2a Zellen wurde nach einer schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenleitfähigkeit gesucht.

Abbildung 13A, 14A und 15A zeigen Experimente mit BSC-1, A10 und Neuro-2a Zellen. Auch in diesen Zellen aktivierte Zellschrumpfung durch extrazelluläre Hyperosmolarität eine nichtselektive Leitfähigkeit. Wie bei HT₂₉ Zellen wurde der schrumpfungsaktivierte Einwärtsstrom durch Entzug des extrazellulären Natriums unterbunden. Abbildung 14A und 15A zeigen außerdem den hemmenden Effekt von Flufenaminsäure auf den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom in A 10 bzw. Neuro-2a Zellen, und Abbildung 15A zeigt darüber hinaus den Effekt von Ersatz des extrazellulären Natriums durch Kalium oder Lithium auf den Einwärtsstrom einer Neuro-2a Zelle. In BSC-1 und A10 Zellen fand sich die Leitfähigkeitssequenz $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ (nicht gezeigt); in Neuro-2a Zellen $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$.

Die dem nichtselektiven Einwärtsstroms zugrundeliegenden Einzelkanäle waren in allen Zellen typischerweise während des Initialstadiums kurz nach Wechsel zur hyperosmolaren Badlösung sichtbar. Abbildung 13B (BSC-1 Zellen), 14B (A 10 Zellen) und 15B (Neuro-2a Zellen) zeigen Amplitudenhistogramme aus dem Initialstadium der Stimulation kurz nach Wechsel zur hyperosmolaren Badlösung. Die Einzelkanalleitfähigkeit g ist in allen Zellen im selben Größenbereich, wie auch in M-1 und HT₂₉ Zellen (siehe Tabelle 6).

Abbildung 13C, 14C und 15C fassen nochmals die Ergebnisse mehrerer Experimente an BSC-1, A 10 und Neuro-2a Zellen zur monovalenten Kationenselektivität und zur Hemmung durch Flufenaminsäure zusammen. In allen Zellen sind Kalium und Lithium etwa gleich per-

meabel wie Natrium, und Flufenaminsäure hemmt mit Ausnahme der Neuro-2a Zellen den schrumpfungsaktivierten Strom nahezu vollständig (siehe Tabelle 6).

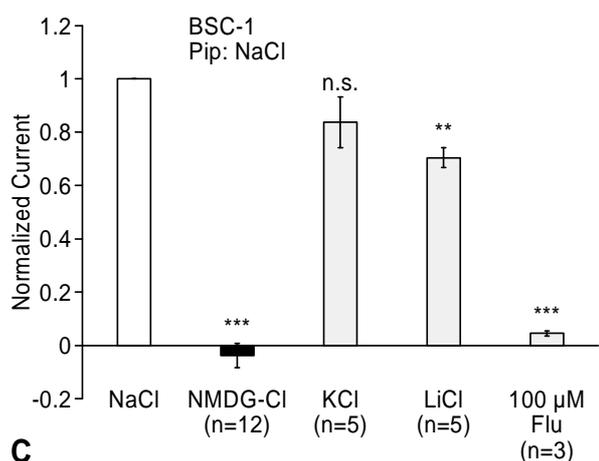
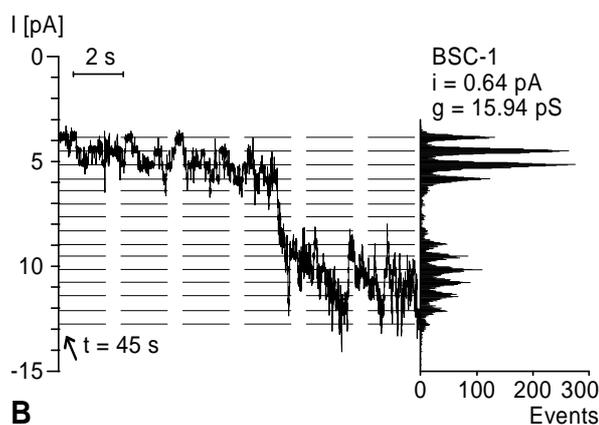
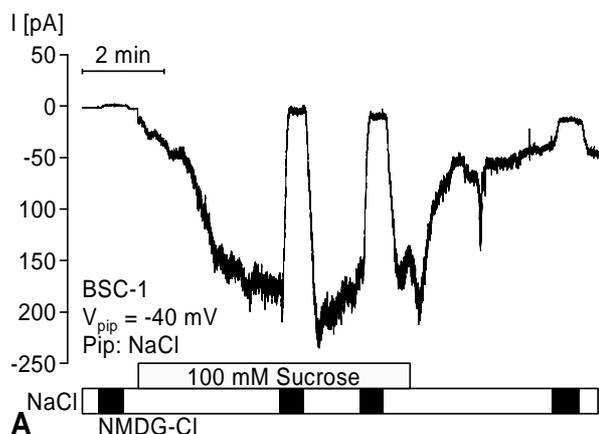


Abbildung 13: Extrazelluläre Hyperosmolarität aktiviert einen Ganzzellstrom in BSC-1 Zellen. **A.** Die kontinuierliche Stromregistrierung wurde bei einem Haltepotential von $V_{pip} = -40$ mV aufgenommen. Als Pipettenlösung wurde NaCl verwendet, als Badlösung anfangs Kontroll NaCl-Ringer (offener Balken), das periodisch durch NMDG-Cl (schwarzer Balken) ersetzt wurde. Dann wurde 100 mM Saccharose zu beiden Badlösungen zugesetzt. **B.** Amplitudenhistogramm eines Ausschnitts einer Ganzzellstromregistrierung 45 Sekunden nach Zugabe von 100 mM Saccharose in die Badlösung. Die horizontalen Linien entsprechen den Spitzen des Histogramms. **C.** Selektivität des durch hyperosmolare Badlösung stimulierten Ganzzellstroms für monovalente Kationen und Effekt von 100 μ M Flufenaminsäure. Pipettenlösung: NaCl. Nach Wechsel in hyperosmolare NaCl-Ri Badlösung mit 100 mM Sucrose wurde das extrazelluläre Natrium durch NMDG (schwarzer Balken), KCl und LiCl ersetzt, und die Hemmung des Einwärtsstroms durch Flufenaminsäure in NaCl-Ri gezeigt (graue Balken). Die von den verschiedenen monovalenten Kationen getragenen Einwärtsströme sind auf den Einwärtsstrom in Gegenwart von Natrium normiert. Die vertikalen Fehlerbalken entsprechen den SEM-Werten.

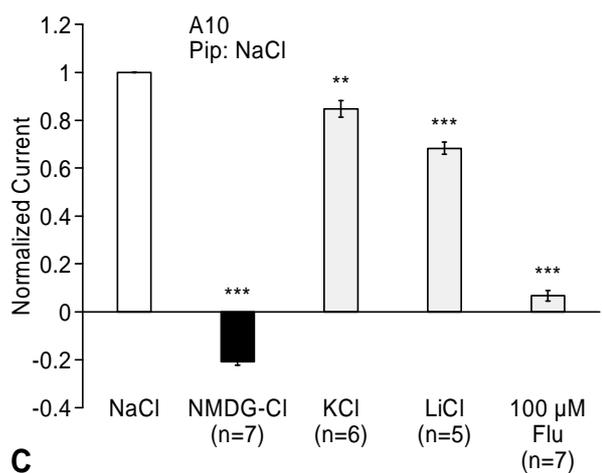
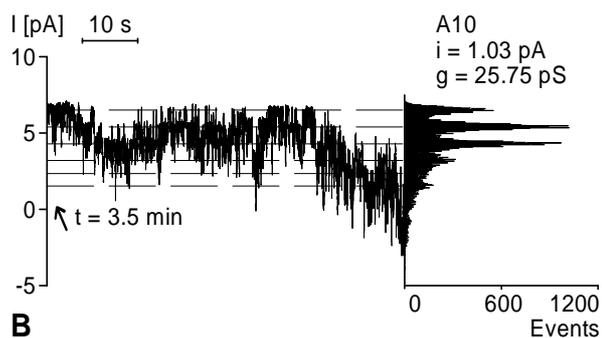
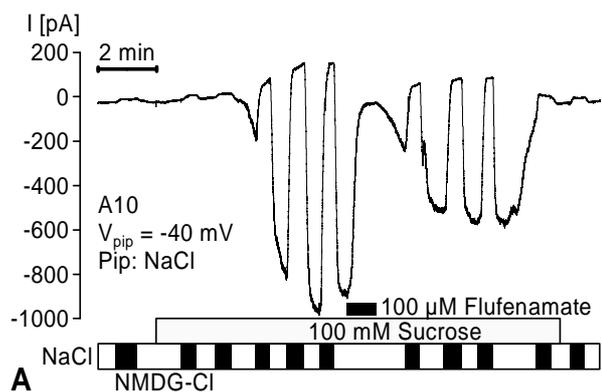


Abbildung 14: Extrazelluläre Hyperosmolarität aktiviert einen durch Flufenaminsäure hemmbaren Ganzzellstrom in A10 Zellen. **A.** Gleiche Bedingungen wie in Abbildung 13A; zusätzlich Anwendung von 100 μ M Flufenaminsäure während der Stimulation. **B.** Amplitudenhistogramm eines Ausschnitts einer Ganzzellstromregistrierung 3½ Minuten nach Zugabe von 100 mM Sucrose in die Badlösung. Die horizontalen Linien entsprechen den Spitzen des Histogramms. **C.** Selektivität des durch hyperosmolare Badlösung stimulierten Ganzzellstroms für monovalente Kationen und Effekt von Flufenaminsäure. Gleiche Bedingungen wie in Abbildung 13C.

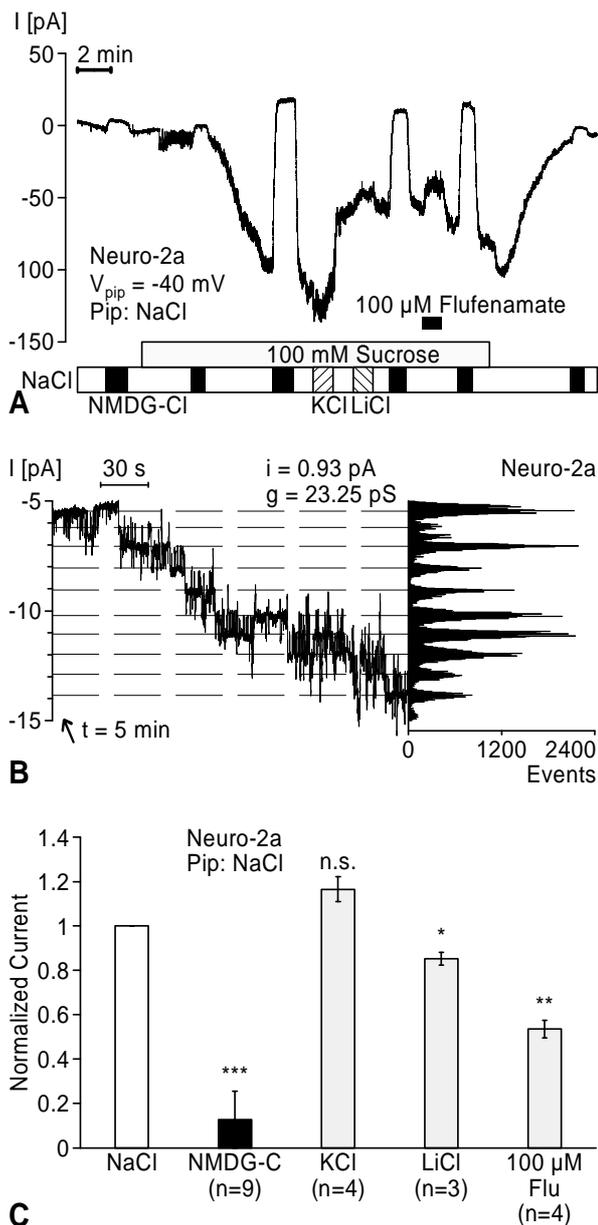


Abbildung 15: Extrazelluläre Hyperosmolarität aktiviert einen nichtselektiven, durch Flufenaminsäure hemmbaren Ganzzellstrom in Neuro-2a Zellen. **A.** Gleiche Bedingungen wie in Abbildung 13A; zusätzlich wurde nach Zugabe von 100 mM Saccharose zum Bad das extrazelluläre Natrium durch Kalium und Lithium ersetzt und 100 μ M Flufenaminsäure angewendet. **B.** Amplitudenhistogramm eines Ausschnitts einer Ganzzellstromregistrierung einer Neuro-2a Zelle fünf Minuten nach Zugabe von 100 mM Saccharose in die Badlösung. Die horizontalen Linien entsprechen den Spitzen des Histogramms. **C.** Selektivität des durch hyperosmolare Badlösung stimulierten Ganzzellstroms in Neuro-2a Zellen für monovalente Kationen und Effekt von Flufenaminsäure. Gleiche Bedingungen wie in Abbildung 13C.

Tabelle 6 faßt die wesentlichen Eigenschaften aller in dieser Arbeit untersuchter Zelllinien zusammen. In allen Ziellinien wurde durch Hyperosmolarität ein nichtselektiver Kationenkanal aktiviert, der durch Flufenaminsäure zu einem großen Teil hemmbar ist, und auf Einzelkanäle mit sehr ähnlichen Eigenschaften zurückzuführen ist. Der Kanal unterscheidet kaum zwischen Natrium und Kalium und die Einzelkanalleitfähigkeiten bewegen sich im Bereich von 15 bis 27 pS. Diese Bandbreite ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die verschiedenen Gewebe sehr ähnliche, aber nicht genau gleiche nicht-selektive Kationenkanäle ausbilden.

Tabelle 6:

Vergleich des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals in verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	[*] I _{NSC} bei V _{pip} = -40 mV		P _{K⁺}/P_{Na⁺}}	P _{Na⁺}/P_{Cl⁻}}	Hemmung d. Flufenamat	Einzelkanal-leitfähigkeit [pS]
		Control [pA]	100 mM Sucrose [pA]				
HT29	humanes Kolonkarzinom	3.5 ± 1.1	203 ± 31 (n = 13)	0.79	10	84 ± 5% (n = 8)	17.6 ± 0.9 (n = 4)
BSC-1	Niere d. Grünen Meerkatze	1.7 ± 0.2	50 ± 15 (n = 15)	0.84	5	95 ± 1 % (n = 3)	15.1 ± 0.3 (n = 4)
A10	Gefäßmuskel Ratte	18.0 ± 6.1	521 ± 127 (n = 7)	0.85	21	93 ± 2 % (n = 7)	27.2 ± 0.7 (n = 3)
Neuro-2a	Neuroblastom Maus	6.0 ± 1.3	181 ± 56 (n = 7)	1.17	4	46 ± 4 % (n = 4)	24.1 ± 0.7 (n = 4)
M-1	Sammelrohr Maus	6.7 ± 1.2	235 ± 12 (n = 103)	0.90	10	84 ± 6 % (n = 3)	25.9 ± 0.9 (n = 11)

^{*}I_{NSC} wurde durch Subtraktion des in Gegenwart von extrazellulärem NMDG-Cl gemessenen Ganzzellstroms vom Ganzzellstrom in Gegenwart von NaCl ermittelt.

Diskussion

Der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal wird offenbar ubiquitär exprimiert

Diese Arbeit zeigt, daß osmotische Zellschrumpfung eine nichtselektive Leitfähigkeit in verschiedenen kultivierten Zellen aktiviert, die aus einer Vielfalt von unterschiedlichen Geweben wie Kolon- und Nierenepithel, glattem Gefäßmuskel der Aorta und Neuroblastom stammen. Die aktivierten Kanäle sind alle hochselektiv für Kationen über Anionen, ohne wesentlich zwischen Natrium und Kalium zu unterscheiden. Sie werden durch Flufenaminsäure gehemmt und haben eine Einzelkanalleitfähigkeit im Bereich von 15 bis 27 pS. Die Aktivierung kann sowohl durch extrazelluläre Hyperosmolarität als auch durch intrazelluläre Hypoosmolarität ausgelöst werden und ist reversibel und wiederholbar.

Die Einzelkanalleitfähigkeit, die Selektivität und die Sensitivität für Flufenaminsäure lassen vermuten, daß dieser Kanal identisch ist mit der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenleitfähigkeit in Atemwegsepithel [Chan & Nelson, 1992] und mit dem Ca^{2+} -aktivierten nichtselektiven Kationenkanal, der in *i/o*-Patches von M-1 Zellen beschrieben wurde [Korbmacher et al., 1995; Champigny et al., 1991]. Allerdings existieren wahrscheinlich unterschiedliche Aktivierungsmechanismen für die *i/o*- und Ganzzellkonfiguration (siehe Aktivierungsmechanismus).

Kürzlich wurde veröffentlicht, daß die Schrumpfung von Zellen aus Kolonkrypten der Ratte nicht zur Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen führt [Weyand et al., 1998], obwohl bekannt ist, daß diese Zellen in exzidierten *i/o*-Patches Ca^{2+} -aktivierte nichtselektive Kationenkanäle aufweisen. Möglicherweise haben frisch isolierte Zellen aus Kolonkrypten andere Eigenschaften als die in Kultur gezüchteten Zellen. Bisher wurden schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle nämlich nur in Kulturzellen beobachtet. Diese Zellen besitzen zwar typische Eigenschaften der ursprünglichen Gewebe, proliferieren aber sehr schnell und erreichen so kaum den Status einer voll differenzierten Zelle. Es wäre deshalb denkbar, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal nur während der Proliferationsphase der Zellen exprimiert wird. Dafür könnte die Beobachtung von Jung et al. (1992) an Fibroblasten sprechen, deren Proliferation von PDGF-aktivierten nichtselektiven Kationenkanälen abhängt. Die fehlende Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen an Kolonkryptzellen [Weyand et al., 1998] könnte aber auch auf einer zu kurzen Verweildauer in hyperosmolarer Lösung beruhen. Sie betrug in den Experimenten mit der *cell attached*-

Konfiguration nur rund 80 Sekunden (für die Ganzzellexperimente fehlen entsprechende Angaben). Nach dieser kurzen Zeit konnte unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit in der Mehrzahl der Fälle noch keine Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle beobachtet werden. Es bleibt daher abzuwarten, ob schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle in Zukunft auch in nativen Zellen aus frisch isolierten Geweben nachgewiesen werden können. Die vorliegenden Befunde sprechen jedenfalls dafür, daß Zellen ganz unterschiedlichen Gewebeansprungs in der Lage sind, schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle zu exprimieren. Das deutet darauf hin, daß dieser Kanal zumindest in bestimmten Phasen des Zellwachstums oder der Zelldifferenzierung in vielen, oder vielleicht auch in allen Zellen von grundlegender Bedeutung ist.

Selektivität der aktivierten Leitfähigkeit

Die durch Schrumpfung aktivierte Leitfähigkeit differenziert kaum zwischen Natrium, Kalium, Lithium und NH_4^+ , so daß die Kriterien für Nichtselektivität erfüllt sind. Ein Teil der erhöhten Leitfähigkeit für NH_4^+ gegenüber Natrium ist möglicherweise durch eine intrazelluläre pH-Verschiebung bedingt. Falls die NH_3 -Permeabilität der Zellmembran niedrig ist, sollten eindringende NH_4^+ -Ionen das Gleichgewicht in Richtung $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ verschieben und damit das Zellinnere ansäuern. Dadurch könnte die Offenwahrscheinlichkeit der nichtselektiven Kationenkanäle zunehmen. So ist bekannt, daß die Offenwahrscheinlichkeit Ca^{2+} -aktivierter, ATP-sensitiver nichtselektiver Kationenkanäle vom Sammelrohr der Maus ein pH-Optimum bei 6.8-7.0 hat [Chraïbi et al., 1995]. In der vorliegenden Arbeit waren alle Pipettenlösungen gepuffert und auf pH 7.5 titriert. Bei diesem pH-Wert sollte nach Chraïbi et al. die Offenwahrscheinlichkeit nur etwa 50 % des Maximalwertes betragen. Falls sich das membrannaha Zytosplasma unter der Badperfusion mit NH_4^+ -Lösungen ansäuert, könnte dies in der Tat zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit und damit zu einer Überschätzung der NH_4^+ -Permeabilität führen.

Im Hinblick auf divalente Kationen ergaben die Versuche, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal offenbar keine meßbare Leitfähigkeit für Kalzium oder Barium besitzt, da nach Aktivierung des Kanals keine von Kalzium oder Barium abhängigen Ganzzellströme gemessen werden konnten. Der Mechanismus, der Kalzium in Epithelzellen der Niere eindringen läßt, ist zur Zeit noch nicht identifiziert, aber es ist bekannt, daß einige Hormone wie z.B. Endothelin einen Kalziumeinstrom in mikrodissezierten Tubuli der Maus wie auch in M-1 Zellen stimulieren [Korbmacher et al., 1993, 1995]. Zur Zeit kann deswegen

nicht ausgeschlossen werden, daß der nichtselektive Kationenkanal eine im Subpicosiemensbereich liegende Leitfähigkeit für Kalzium besitzt [Korbmacher et al., 1995]. Auch eine derart geringe Leitfähigkeit für Kalzium kann von physiologischer Bedeutung sein, wenn man bedenkt, daß ein durch Kalzium getragener Ganzzellstrom von nur 2 pA einen Anstieg des intrazellulären Kalziums um 100 nM/s nach sich ziehen kann [Neher, 1992]. Für eine geringe Kalziumpermeabilität des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals spricht, daß bei Wechsel von 150 mM NaCl zu 75 mM CaCl₂ offenbar Ca²⁺-aktivierte Chloridkanäle stimuliert wurden, wenn die Pipettenlösung keine ausreichend hohe Konzentration an Kalziumchelatoren enthielt. Diese Beobachtung wurde nur in Gegenwart hyperosmolarer Lösungen gemacht. Sie spricht dafür, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal tatsächlich kleine Mengen an Kalzium passieren läßt.

Inhibitoren der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenleitfähigkeit

Ca²⁺-aktivierte, ATP-sensitive nichtselektive Kationenkanäle werden in vielen unterschiedlichen Geweben durch 3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure (DCDPC) oder deren Derivate Flufenaminsäure und Mefenaminsäure inhibiert [Gögelein & Pfannmüller, 1989; Gögelein et al., 1990; Jung et al., 1992; Popp & Gögelein, 1992; Siemer & Gögelein, 1993; Chraïbi et al., 1994; Koivisto et al., 1998]. In der vorliegenden Arbeit hatte der Hemmstoff Flufenaminsäure die beste Wirkung. Er hemmte den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom nicht nur in M-1 Zellen, sondern auch in HT₂₉, BSC-1, A 10 und Neuro-2a Zellen (wenn auch nicht im gleichen Ausmaß). Wegen mangelhafter Selektivität ist die Flufenaminsäure aber kein idealer Hemmstoff für den nichtselektiven Kationenkanal. So hemmt Flufenaminsäure auch den Ca²⁺-aktivierten Chloridkanal in M-1 Zellen [Meyer & Korbmacher, 1996] und setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei [Poronnik et al., 1992]. Die Derivate der Diphenylaminocarboxylsäure DCDPC und 4-Methyl-DPC führen zwar nicht zur Kalziumspeicherung [Poronnik et al., 1992], sind aber ebenfalls Chloridkanalblocker und hemmen den nichtselektiven Kationenkanal weniger stark. Ähnliches gilt für den Hemmstoff LOE 908. Nach Krautwurst et al. (1994) hemmen 560 nM LOE 908 die ADH-stimulierte nichtselektive Kationenleitfähigkeit von A7r5 Zellen um 50 %, und 10 µM LOE 908 hemmen sogar um 90 %. Im Gegensatz dazu reduzierte in der vorliegenden Arbeit 10 µM LOE 908 den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom an M-1 Zellen gerade einmal um die Hälfte.

Amilorid, ein kaliumsparendes Diuretikum, ist als selektiver Hemmstoff des epithelialen Natriumkanals (ENaC) bekannt, soll aber in hohen Konzentrationen auch manche nichtselek-

tive Kationenkanäle hemmen [Bielfeld-Ackermann et al., 1998; Light et al., 1988; Ono et al., 1994 und Tohda & Marunaka, 1995]. Nach Garty & Benos (1988) wird der ENaC im allgemeinen mit einer IC_{50} von weniger als $1 \mu\text{M}$ gehemmt. Dementsprechend fanden Letz et al. (1995) an M-1 Zellen einen IC_{50} -Wert von $0.22 \mu\text{M}$. Nach Light et al. (1988) sollen nichtselektive Kationenkanäle in Zellen des medullären Sammelrohrs der Ratte bereits durch $0.5 \mu\text{M}$ extrazelluläres Amilorid sehr stark gehemmt werden, falls die Experimente bei einer hyperpolarisierenden Haltespannung durchgeführt werden. An M-1 Zellen fanden Volk et al. (1995) dagegen keinen Effekt von Amilorid auf den schrumpfungsaktivierten Ganzzellstrom, auch nicht in der hohen Konzentration von 1 mM . In der vorliegenden Arbeit führte 1 mM Amilorid zu einer geringen Hemmung (15.4%), dieser Effekt ist aber höchstwahrscheinlich auf unspezifische Wirkungen zurückzuführen, die bei diesen hohen Konzentrationen auftreten können [Kleyman & Cragoe, 1990]. Aufgrund meiner Beobachtungen steht außer Frage, daß der epitheliale Natriumkanal nicht zu der Leitfähigkeitsänderung bei Zellschrumpfung beiträgt und daß der zugrundeliegende nichtselektive Kationenkanal nicht zur Gruppe der amiloridsensitiven Kanäle dieser Familie gehört.

Bumetanid hemmt den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symport, der z.B. in Ehrlich-Aszitestumorzellen und T84 Zellen (Kolon) durch extrazelluläre Hypertonizität aktiviert werden kann [Jessen & Hoffmann, 1992; O'Donnell et al., 1995]. Da hier kein Effekt auf den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom zu sehen war, ist eine direkte oder indirekte Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symports an der beobachteten Leitfähigkeit ausgeschlossen.

Quecksilber hemmt Ca^{2+} -aktivierte nichtselektive Kationenkanäle in *i/o*-Patches in braunen Fettzellen sogar noch stärker als DCDPC [Koivisto et al., 1993]. Der IC_{50} -Wert lag bei $0.02 \mu\text{M}$, und der Effekt war innerhalb von Sekunden reversibel, wenn der Komplexbildner Dithiotreitol (DTT) hinzugegeben wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde überhaupt keine Hemmung durch $1 \mu\text{M}$ HgCl_2 beobachtet, im Gegensatz zum deutlichen Effekt von DCDPC (siehe oben).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal in M-1 Zellen in der Ganzzellkonfiguration am besten durch extrazelluläre Flufenaminsäure gehemmt wird. DPC und DCDPC, die eine ähnliche Molekülstruktur besitzen, haben eine etwas schwächere Wirkung. Noch schwächer wirkt LOE 908; Quecksilber und Amilorid sind unwirksam.

Maitotoxin, ein potentieller Aktivator nichtselektiver Kationenkanäle, hat keinen Effekt

Maitotoxin, eines der stärksten bekannten marinen Toxine, wird von *Gambierdiscus toxicus* gebildet. Es hat Wirkungen auf Zellen in einer Vielzahl von Geweben (für eine Zusammenfassung siehe Bielfeld-Ackermann et al., 1998); unter anderem beeinflusst es auch Ionenkanäle. In Oozyten von *Xenopus laevis* aktiviert Maitotoxin ab Konzentrationen von 50 pM eine endogene nichtselektive Kationenleitfähigkeit, und in L-Zellen der Maus aktiviert 1 nM Maitotoxin kalziumpermeable nichtselektive Kationenkanäle [Estación et al., 1996]. Auf die Ganzzellströme in M-1 Zellen hatte diese Maitotoxin-Konzentration aber keinen Effekt.

Intrazelluläres Kalzium ist für die Aktivierung notwendig

Aus Experimenten in der *i/o*-Konfiguration an M-1 Zellen [Korbmacher et al., 1995] ist bekannt, daß der nichtselektive Kationenkanal durch mikromolare Kalziumkonzentrationen an der Membrannenseite aktiviert wird. Wie bereits erwähnt, gibt es eine große Anzahl an Geweben, in denen intrazelluläres Kalzium einen solchen Kanal aktivieren kann. Kalziumentzug verhindert in diesen Geweben eine Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals.

In Ganzzellexperimenten dagegen wurde bisher eine Abhängigkeit der Aktivierung des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanal von der intrazellulären und extrazellulären Kalziumkonzentration weitgehend ausgeschlossen [Volk et al., 1995]. Dort fand sich bei steigender intrazellulärer Kalziumkonzentration lediglich eine Ca^{2+} -aktivierte Chloridleitfähigkeit. Die vorliegenden Befunde, wonach die schrumpfung induzierte Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen selbst dann zu beobachten war, wenn die Pipettenlösung 10 mM EDTA oder 10 mM BAPTA enthielten, scheinen die Interpretation von Volk et al. (1995) zunächst zu stützen. Andererseits war aber die Aktivierung bei den hohen Chelatorkonzentrationen deutlich abgeschwächt. Demnach scheint Kalzium doch eine Rolle zu spielen, insofern als offenbar eine minimale (lokale) Kalziumkonzentration für die Aktivierung erforderlich ist. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine indirekte Interaktion mit Ca^{2+} -bindenden Proteinen. Es wäre denkbar, daß diese Proteine bei Exzision des Membranflecken verloren gehen, und daß die Aktivierung dann erst über die hohe Kalziumkonzentration von 1 mM möglich ist. Außerdem wird bei der Exzision das Zytoskelett zerstört, wodurch sich der Mechanismus der Kanalaktivierung ändern könnte.

Zusammenfassend stimmen diese Beobachtungen gut mit der allgemein akzeptierten Meinung überein, daß intrazelluläre Kalziumsignale eine Hauptrolle bei der Volumenregulation während Zellschwellung in *hypotoner* Lösung spielen, aber nicht während Zellschrumpfung in *hypertoner* Lösung [McCarty & O'Neil, 1992]. Folglich stellt die Ca^{2+} -induzierte Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals in exzidierten *i/o*-Patches durch mehr als millimolare Kalziumkonzentrationen wahrscheinlich nicht den relevanten physiologischen Aktivierungsmechanismus der Antwort auf Zellschrumpfung dar.

Rolle von intrazellulärem ATP

Die meisten Ca^{2+} -aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle sind durch unterschiedlich hohe intrazelluläre Konzentrationen von ATP hemmbar. M-1 Zellen machen dabei keine Ausnahme. So wurde in exzidierten Membranflecken aus M-1 Zellen eine deutliche Reduzierung (69 %) der Offenwahrscheinlichkeit durch 1 mM ATP beobachtet [Korbmacher et al., 1995]. In Ganzzellexperimenten an M-1 Zellen dagegen ist die hemmende Wirkung von ATP geringer [Volk et al., 1995]; bei einer Konzentration von 1 mM ATP wird der Strom nur auf 37.7 % und bei 10 mM nur auf 22.5 % des Kontrollwertes reduziert. In der vorliegenden Arbeit war die Hemmung der Kanalaktivierung durch ATP nicht so stark ausgeprägt. 1 mM ATP führte zu einer Hemmung auf 63 % und 10 mM ATP zu einer Hemmung auf 36 %.

Möglicherweise tritt die ATP-induzierte Hemmung des nichtselektiven Kationenkanals eher bei länger anliegenden Gleichspannungen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde eine konstante Haltespannung von -40 mV verwendet, aber Volk et al. (1995) applizierten Spannungspulse, die zwischen -85 mV, 0 mV und +85 mV alternierten.

Einen weiteren Einblick in die Rolle des ATP bei der Kanalaktivierung sollten die Versuche mit Rotenon und 2-Deoxyglukose bieten. Rotenon verhindert die Oxidation von NADH zu NAD^+ , und 2-Deoxyglucose verhindert die Synthese von ATP durch die anaerobe Glykolyse. In Gegenwart beider Gifte verarmt die Zelle an ATP. Nach Doctor et al. (1994) sinkt der ATP-Gehalt von LLC-PK₁ Zellen (eine Zelllinie mit Eigenschaften proximaler Nierentubuli) nach 30-minütiger Inkubation auf 2 % ab, steigt aber innerhalb 60 Minuten nach Auswaschen der Gifte wieder auf Normalwerte an.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Protokoll der ATP-Verarmung eine vollständige Unterdrückung des schrumpfungsaktivierten Einwärtsstroms erreicht. Diese Unterdrückung war reversibel, was für eine temporäre Unterbrechung des Aktivierungsmechanismus

spricht. Dabei konnte eine stoffwechselunabhängige Rotenonwirkung ausgeschlossen werden, weil dasselbe Phänomen bei Blockade der ATP-Synthese mit dem Entkoppler FCCP zu beobachten war.

Andererseits ist die Unterdrückung der schrumpfungsabhängigen Kanalaktivierung nicht einfach auf das Fehlen von ATP zurückzuführen. Während die schwellungsinduzierte Aktivierung von Cl^- -Strömen, die bei ATP-verarmten M-1 Zellen ebenfalls unterdrückt war, durch Zugabe von 1 mM ATP zur Pipettenlösung reaktiviert werden konnte [Meyer et al., 1996], war dies in den vorliegenden Versuchen mit der schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Leitfähigkeit nicht der Fall. ATP ist also notwendig für die Aktivierung, aber der Mechanismus ist kein direkt ATP-abhängiger Prozeß.

Beteiligung von Proteinkinasen

Staurosporin ist zwar ein sehr potenter, aber relativ unselektiver Proteinkinasehemmstoff. Schon ab einer Konzentration von 2.7 nM wird die Hälfte der Aktivität von Proteinkinase C gehemmt, für andere Proteinkinasen gelten ähnliche IC_{50} -Werte [Tamaoki, 1991]. In der vorliegenden Arbeit wurde Staurosporin in drei Konzentrationen verwendet: 10 nM Staurosporin reduzierte den Einwärtsstrom nur auf 81 %, obwohl die Proteinkinase C bei dieser Konzentration bereits stark inhibiert sein sollte. Erst die Anwendung höherer Konzentrationen von 100 nM und 1 μM Staurosporin führte zu einem Rückgang des Stroms auf 29 % bzw. 4 %. Allerdings ist zu vermuten, daß bei einer derart hohen Konzentration die Wirkungen auf andere Kinasen im Vordergrund stehen. Außerdem ist die Toxizität von Staurosporin hoch; es verhindert zum Beispiel das Wachstum von HeLa S3 Zellen (humanes Zervixkarzinom) bereits ab einer Konzentration von unter 3 nM in 72-stündiger Inkubation [Tamaoki, 1991]. Die mittlere Inkubationszeit in der vorliegenden Arbeit betrug allerdings nur 66 Minuten, so daß die Toxizität möglicherweise keine so große Rolle spielte.

Das gleiche gilt für Calphostin C, das zwar die Proteinkinase C sehr selektiv hemmt (mit einer IC_{50} von 50 nM), aber mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 230 nM auch zytotoxisch auf HeLa S3 Zellen wirkt [Tamaoki, 1991]. Da in der vorliegenden Arbeit zwar eine Konzentration von 1 μM verwendet wurde, die Zellen aber nur für durchschnittlich 52 Minuten inkubiert wurden, spricht die beobachtete Abnahme des Stroms auf 12.9 % eher für die Hemmung einer Proteinkinase als für einen „toxischen“ Effekt. Die verwendeten Hemm-

stoffkonzentrationen lassen jedoch keine eindeutige Schlußfolgerung auf eine spezielle Rolle von Proteinkinase C zu.

Zellschrumpfung und Apoptose

Apoptose geht mit Zellschrumpfung einher, und die Verdoppelung der extrazellulären Osmolarität kann Apoptose auslösen [Bortner & Cidlowski, 1996; Matthews & Feldman, 1996]. Darüber hinaus könnten Veränderungen in der Aktivität von Ionenkanälen bei der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielen [Beauvais et al., 1995; Nagy et al., 1995]. In welcher Weise die Regelmechanismen des Zellvolumens in den Ablauf der Apoptose eingreifen, ist noch nicht abschließend geklärt [Lang et al., 1998]. Falls Zellschrumpfung aber ein essentieller Schritt im Ablauf der Apoptose sein sollte, wäre es denkbar, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal bei diesem Geschehen involviert ist. Das könnte seine quasi-ubiquitäre Expression erklären.

Rolle des Zytoskeletts

Wegen der Mitwirkung des Zytoskeletts an der Volumenregulation der Zelle [Cantiello et al., 1993; Cornet et al., 1993] und wegen der Veränderungen am Zytoskelett, die während der Volumenregulation der Zelle auftreten [Cornet et al., 1994], ist anzunehmen, daß der Mechanismus, der den nichtselektiven Kationenkanal unter den Bedingungen der Zellschrumpfung aktiviert, an das Zytoskelett gekoppelt ist. Es gibt Hinweise darauf, daß Aktinfilamente die Aktivität von Ionenkanälen regulieren können [Cantiello et al., 1991, 1995; Häussler et al., 1994]. Dabei wird das Aktingerüst als Signaltransduktionsmechanismus für den Ionentransport in Epithelien beschrieben. Dies könnte die unterschiedlichen Kalziumempfindlichkeiten in der Ganzzell- und in der *i/o*-Konfiguration erklären, wenn man bedenkt, daß das Zytoskelett bei der Exzision eines Membranflecks zerrissen wird und daß die Signaltransduktionsmechanismen infolgedessen unphysiologisch reagieren dürften [Milton & Caldwell, 1990]. In der Ganzzellkonfiguration ist der lokale Schaden dagegen vernachlässigbar gering und es ist nicht anzunehmen, daß die Zelle dadurch anders reagieren sollte als eine intakte Zelle.

Die Interaktionen zwischen Zytoskelett und Ionenkanälen sind üblicherweise mit Hilfe von Zytoskelett-beeinflussenden Substanzen untersucht worden. Dazu bietet sich z.B. Cytochalasin D an, das die Aktinfilamente depolymerisiert [Cooper, 1987; Oike et al., 1994; Stevenson & Begg, 1994], und Phalloidin, welches das Aktingerüst stabilisiert [Oike et al., 1994]. Entsprechende Modulatoren gibt es auch für die Mikrotubuli: Colchizin baut das Mikrotubu-

linetz ab, und Taxol wirkt antagonistisch [Oike et al., 1994]. In der Übersichtsarbeit von Janmey (1998) wird unter anderem ein Kaliumkanal beschrieben, der in der Ganzzellkonfiguration durch Cytochalasin D inaktiviert und durch Phalloidin wieder aktiviert wurde. Hug et al. (1995) fanden dagegen eine Inaktivierung eines Kaliumkanals und des schwellungsaktivierten Chloridkanals bei Inkubation von Zellen einer Bronchialepithelzelllinie sowohl in Cytochalasin D als auch in Phalloidin. Außer durch Pharmaka, die direkt mit dem Zytoskelett interagieren, kann das Zytoskelett auch durch Stoffwechseländerungen beeinflusst werden. Nach Golenhofen et al. (1995) bewirkt ATP-Verarmung (mit Rotenon und 2-Deoxyglukose, siehe oben) eine Auflösung und Umverteilung des f-Aktingerüsts der Zelle, die reversibel ist.

In dieser Arbeit ging die Anwendung von Cytochalasin D mit auffälligen morphologischen Veränderungen der Zellen einher. Obschon ein deutlicher Effekt der Substanz auf den schrumpfungsinduzierten nichtselektiven Kationenkanal sichtbar war, ist ein unspezifischer Effekt nicht auszuschließen. Dagegen erbrachte die Anwendung von Phalloidin überhaupt keine verwertbare Aussage; in den meisten Fällen brach die Messung zusammen, bevor die Ganzzell-Meßkonfiguration erreicht werden konnte. Die wenigen gelungenen Experimenten mit Phalloidin zeigten keine Auswirkung auf die schrumpfungsinduzierte Kationenleitfähigkeit und lassen vermuten, daß die Stabilisierung des Aktingerüsts die Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals nicht direkt beeinflusst.

Dem Mikrotubuli-System wurden bisher weit weniger Interaktionen mit Ionenkanälen zugeschrieben als dem Aktingerüst [Janmey, 1998]. Die Rolle der Mikrotubuli als Transporter von Proteinen zur Zellmembran läßt aber eine Beeinflussung der Ionenkanäle denkbar erscheinen [Hamm-Alvarez & Sheetz, 1998].

Eine Inkubation in Colchizin (Protokoll nach Oike et al., 1994), das zur Depolymerisation von Mikrotubuli in Monomere führt, hatte in den vorliegenden Versuchen keinen signifikanten Effekt. Präinkubation mit Taxol hingegen, das Mikrotubuli stabilisiert, konnte den schrumpfungsaktivierten Einwärtsstrom auf 44 % des Kontrollwertes reduzieren (Abbildung 8F). Dies ist insofern verwunderlich, als ein Effekt auf den Ganzzellstrom eher durch eine Unterbrechung der Mikrotubuli (Verhinderung des Transports von Kanalproteinen zur apikalen Membran) als durch eine Stabilisierung zu erwarten wäre. Vielleicht wurde mit Inkubation in Taxol aber auch der Tod der Zellen eingeleitet, denn Taxol wirkt zytotoxisch und wird zum Beispiel bei fortgeschrittenen Mamma- und Ovarialkarzinomen als Chemotherapeutikum eingesetzt.

Diese Befunde unterstützen die Interpretation, daß für die schrumpfungsinduzierte Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen ein intaktes Zytoskelett nötig ist. Der Aktivierungsmechanismus ist wahrscheinlich sehr kompliziert und benötigt die Interaktion verschiedener Regulatorproteine und Phosphorylierungsstufen [Nelson et al., 1996]. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß osmotische Zellschrumpfung die Expression verschiedener Proteine veranlaßt, die in den Pfad der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) eingebunden sind [Lang et al., 1998]. Außerdem stimuliert Zellschrumpfung die Transkription einer Serin/Threonin-Kinase [Waldegger et al., 1997], die Teilschritt einer physiologischen Antwort auf osmotische Veränderungen sein könnte.

Mögliche physiologische Bedeutung des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals

Die Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals durch extrazelluläre Hypertonizität legt nahe, daß dieser Kanal an der Regulierung des Zellvolumens teilnimmt. In einigen Zellarten scheint die intrazelluläre Konzentrationsänderung von Elektrolyten bei regulatorischer Volumenzunahme auf der Aktivierung von Natriumkanälen oder nichtselektiven Kationenkanälen zu beruhen [Chan & Nelson, 1992; Volk et al., 1995; Wehner et al., 1995]. Unter physiologischen Bedingungen führt die Öffnung beider Kanalarten zu einem Natriumeinstrom und zur Depolarisation der Zelle. Ein effektiver Natriumeinstrom, der zum Anstieg der intrazellulären Osmolarität (mit nachfolgendem Wassereinstrom) führen kann, setzt jedoch einen parallelen Anioneneinstrom voraus. Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit wurde keine schrumpfungsaktivierte Chloridleitfähigkeit beobachtet, aber die intrinsische Chloridleitfähigkeit der verwendeten Zellen reicht wahrscheinlich aus, um bei abnehmendem Zellpotential einen effektiven Chlorideinstrom zu ermöglichen. Als weiteren Schritt kann die Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration die Na^+/K^+ -ATPase aktivieren, und damit den Kaliumgehalt der Zelle erhöhen. Durch diese Kette von Ereignissen könnte ein schrumpfungsaktivierter nichtselektiver Kationenkanal zur regulatorischen Volumenzunahme der Zelle beitragen. Andererseits können der Natriumeinstrom und die Depolarisation der Zelle auch intrazelluläre Signalwege wie MAP-Kinasen aktivieren oder modulieren. So könnte die Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen ein früher Schritt der Regulierung von Ionentransportprozessen bzw. metabolischen Prozessen, die zur Volumenregulation als Antwort auf Zellschrumpfung beitragen, sein.

Die Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen durch Zellschrumpfung ist ein Phänomen, das in vielen aus Epithelien und anderen Geweben stammenden Zellen zu finden ist. Es erinnert an den ebenfalls ubiquitär exprimierten schwellungsaktivierten Chloridkanal [Strange et al., 1996; Meyer & Korbmacher, 1996; Okada, 1997] und könnte sein funktionelles Gegenstück sein. Die molekulare Struktur des schrumpfungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanals ist noch unbekannt, der Kanal ist aber wahrscheinlich Mitglied der Familie der Ca^{2+} -aktivierten, ATP-sensitiven nichtselektiven Kationenkanäle, die in *i/o*-Patches bereits in vielen Zellen identifiziert wurden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein durch Zellschrumpfung aktivierter nichtselektiver Kationenkanal, der in der M-1 Sammelrohrzelllinie der Maus bereits früher beobachtet worden war [Volk et al., 1995], hinsichtlich seiner Selektivität, seines Inhibitorspektrums und seines Aktivierungsmechanismus mittels der *Patch Clamp*-Technik näher charakterisiert, und es wurde geprüft, ob dieser oder ein ähnlicher Kanal auch von anderen Zelllinien exprimiert wird, wobei außer epithelialen Zelllinien (HT₂₉, BSC-1) auch solche aus Muskel- (A10) und Nervengewebe (Neuro-2a) untersucht wurden.

Zellschrumpfung in symmetrischer NaCl-Lösung mit Zusatz von 100 mM Saccharose im Bad stimulierte einen von Kationen getragenen Einwärtsstrom. Während der initialen Phase der Aktivierung durch extrazelluläre Hyperosmolarität konnten Schaltvorgänge von Einzelkanälen beobachtet werden. Die Einzelkanalleitfähigkeit in den verschiedenen Zelllinien betrug 15 bis 27 pS. Der Strom stieg nach wenigen Minuten um das 30- bis 60fache an. Austausch des extrazellulären Natriums durch das schlecht permeierende NMDG führte zum kompletten Sistieren des Einwärtsstroms. Die Aktivierung des nichtselektiven Kationenstroms war unabhängig von der absoluten Osmolarität der Badlösung. Sie wurde ausschließlich durch osmotisch bedingte Volumenabnahme (Schrumpfung) der Zellen hervorgerufen, wobei die Zellschrumpfung der Aktivierung des Stroms geringgradig vorauseilte. Die Aktivierung durch Zellschrumpfung war reversibel und konnte mit dem gleichen Zeitverlauf und mit der gleichen Leitfähigkeitszunahme auch zweimal hintereinander ausgelöst werden.

Die stimulierte Kationenleitfähigkeit war hochselektiv für Kationen über Anionen, aber nichtselektiv für die monovalenten Kationen NH₄⁺, Natrium, Kalium und Lithium (Leitfähigkeitssequenz NH₄⁺ > Na⁺ > K⁺ > Li⁺). Für divalente Kationen wie Kalzium und Barium war keine Leitfähigkeit meßbar. Flufenaminsäure (100 µM) hemmte den stimulierten Einwärtsstrom um mehr als 80 %, Diphenylamin-2-Carboxylsäure (DPC) und sein Derivat Dichlor-DPC (DCDPC) hatten einen etwas geringeren Hemmeffekt. Noch schwächer hemmte LOE 908. Amilorid, Quecksilber und Bumetanid hatten praktisch keine Hemmwirkung auf den stimulierten Einwärtsstrom. Maitotoxin, ein Aktivator mancher nichtselektiver Kationenkanäle, hatte unter isoomotischen Bedingungen keine stimulatorische Wirkung auf den Strom.

Im Gegensatz zum Ca²⁺-aktivierten nichtselektiven Kationenkanal, der in exzidierten Membranflecken beobachtet wird, war die Aktivierung des schrumpfung induzierten nichtselektiven Kationenkanals unabhängig von der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Das

Ausmaß der Stimulation war allerdings vermindert, wenn die Pipettenlösung hohe Konzentrationen von Kalziumchelatoren (10 mM EGTA oder 10 mM BAPTA) enthielt. Dagegen hemmte Magnesiumentzug die Antwort auf Zellschrumpfung fast vollständig. ATP in Konzentrationen bis 10 mM in der Pipettenlösung konnte die Aktivierung des Einwärtsstroms nicht verhindern, nur reduzieren. Dagegen unterdrückte ATP-Verarmung der Zellen (durch Inkubation mit Rotenon und 2-Deoxyglukose) die Antwort auf Zellschrumpfung völlig. Auch durch Zusatz von 1 mM ATP zur Pipettenlösung konnte die Antwort in ATP-verarmten Zellen nicht wiedergewonnen werden, obwohl die Zellen nach Auswaschen der Stoffwechselgifte wieder normal reagierten. Die Proteinkinasehemmstoffe Staurosporin und Calphostin C (beide in der Konzentration von 1 μ M) konnten die Antwort unterdrücken. Einige auf das Zytoskelett wirksame Substanzen (Cytochalasin D und Taxol) hatten ebenfalls hemmende Wirkungen.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanal offenbar ubiquitär exprimiert wird. Der Aktivierungsmechanismus ist komplex und abhängig von intrazellulärem ATP und Magnesium. Vermutlich sind Proteinkinasen und Zytoskelettelemente an der Kanalaktivierung beteiligt. Der Kanal dürfte im Rahmen der Zellvolumenregulation von Bedeutung sein und spielt möglicherweise eine Rolle für Zellproliferation und Apoptose.

Literatur

- Bajnath, R.B.; Augeron, C.; Laboisse, C.L.; Bijman, J.; de Jonge, H.R.; Groot, J.A. (1991) Electrophysiological studies of forskolin-induced changes in ion transport in the human colon carcinoma cell line HT-29 cl.19A: lack of evidence for a cAMP-activated basolateral K^+ conductance. *Journal of Membrane Biology* 122(3): 239-50.
- Baumgarten, C.M.; Dudley, S.C.Jr.; Rogart, R.B.; Fozzard, H.A. (1995) Unitary conductance of Na^+ channel isoforms in cardiac and NB2a neuroblastoma cells. *American Journal of Physiology* 269: C1356-C1363.
- Beauvais, F.; Michel, L.; Dubertret, L. (1995) Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K^+ channels. *Journal of Leukocyte Biology* 57: 851-855.
- Bleich, M.; Riedemann, N.; Warth, R.; Kerstan, D.; Leipziger, J.; Hör, M.; Van Driessche, W.; Greger, R. (1996) Ca^{2+} regulated K^+ and nonselective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 432: 1011-1022.
- Bortner, C.D.; Cidlowski, J.A. (1996) Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *American Journal of Physiology* 271: C950-61.
- Cantiello, H.F. (1995) Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na^+ channel regulation. *Kidney International* 48: 970-984.
- Cantiello, H.F.; Prat, A.G.; Bonventre, J.V.; Cunningham, C.C.; Hartwig, J.H.; Ausiello, D.A. (1993) Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 268(7): 4596-9.
- Cantiello, H.F.; Stow, J.L.; Prat, A.G.; Ausiello, D.A. (1991) Actin filaments regulate epithelial Na^+ channel activity. *American Journal of Physiology* 261: C882-C888.

- Champigny, G.; Verrier, B; Lazdunski, M. (1991) A voltage, calcium, and ATP sensitive non-selective cation channel in human colonic tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176/3: 1196-1203.
- Chan, H.C.; Nelson, D.J. (1992) Chloride-dependent cation conductance activated during cellular shrinkage. *Science* 257(5070): 669-71.
- Chraïbi, A.; Guinamard, R.; Teulon, J. (1995) Effects of Internal pH on the Nonselective Cation Channel from the Mouse Collecting Tubule. *Journal of Membrane Biology* 148: 83-90.
- Chraïbi, A.; Van den Abbeele, T.; Guinamard, R.; Teulon, J. (1994) A ubiquitous nonselective cation channel in the mouse renal tubule with variable sensitivity to calcium. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 429: 90-97.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *Journal of Cell Biology* 105: 1473-1478.
- Cornet, M.; Isobe, Y.; Lemanski, L.F. (1994) Effects of Anisosmotic Conditions on the Cytoskeletal Architecture of Cultured PC12 Cells. *Journal of Morphology* 222: 269-286.
- Cornet, M.; Ubl, J.; Kolb, H.-A. (1993) Cytoskeleton and Ion Movements During Cell Volume Regulation in Cultured PC12 Cells. *Journal of Membrane Biology* 133: 161-170.
- Doctor, R.B.; Bacallao, R.; Mandel, L.J. (1994) Method for recovering ATP content and mitochondrial function after chemical anoxia in renal cell cultures. *American Journal of Physiology* 266: C1803-C1811.
- Estación, M.; Nguyen, H.B.; Gargus, J.J. (1996) Calcium is permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation channel in mouse L cells. *American Journal of Physiology* 39: C1145-C1152.

- Garty, H.; Palmer, L.G. (1997) Epithelial Sodium Channels: Function, Structure, and Regulation. *Physiological Reviews* 77(2): 359-396.
- Garty, H.; Benos, D.J. (1988) Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiological Reviews* 68(2): 309-73.
- Gögelein, H.; Pfannmüller, B. (1989) The nonselective cation channel in the basolateral membrane of rat exocrine pancreas. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 413: 287-298.
- Gögelein, H.; Dahlem, D.; Englert, H.C.; Lang, H.J. (1990) Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Letters* 268: 79-82.
- Golenhofen, N.; Doctor, R.B.; Bacallao, R.; Mandel, L.J. (1995) Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells. *Kidney International* 48: 1837-1845.
- Hamill, P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 391: 85-100.
- Hamm-Alvarez, S.F.; Sheetz, M.P. (1998) Microtubule-dependent vesicle transport: modulation of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiological Reviews* 78(4): 1109-29.
- Hidaka, H.; Tanaka, T. (1983) Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists. *Methods in Enzymology* 102: 185-94.
- Hug, T.; Koslowsky, T.; Ecke, D.; Greger, R.; Kunzelmann, K. (1995) Actin-dependent activation of ion conductances in bronchial epithelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 429: 682-690.

- Janmey, P.A. (1998) The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews* 78(3): 763-81.
- Jentsch, T.J.; Matthes, H.; Keller, S.K.; Wiederholt, M. (1986) Electrical properties of sodium bicarbonate symport in kidney epithelial cells (BSC-1). *American Journal of Physiology* 251: F954-68.
- Jessen, F.; Hoffmann, E.K. (1992) Activation of the Na/K/Cl cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1110: 199-201.
- Jung, F.; Selvaraj, S.; Gargus, J.J. (1992) Blockers of platelet-derived growth factor-activated nonselective cation channel inhibit cell proliferation. *American Journal of Physiology* 262: C1464-C1470.
- Kleyman, T.R.; Cragoe, E.J. Jr. (1990) Cation transport probes: the amiloride series. *Methods in Enzymology* 191: 739-755.
- Koivisto, A.; Klinge, A.; Nedergaard, J.; Siemen, D. (1998) Regulation of the activity of 27 pS nonselective cation channels in excised membrane patches from rat brown fat cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 8(5): 231-45.
- Koivisto, A.; Siemen, D.; Nedergaard, J. (1993) Reversible blockade of the calcium-activated nonselective cation channel in brown fat cells by the sulfhydryl reagents mercury and thimerosal. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 425: 549-551.
- Korbmacher, C.; Barnstable, C.J. (1993) Renal Epithelial Cells Show Nonselective Cation Channel Activity and Express a Gene Related to the cGMP-Gated Photoreceptor Channel. In: *Nonselective Cation Channels* 147-164. Edited by D. Siemen and J.K.-J. Hescheler. Birkhäuser Verlag, Basel 1993.

- Korbmacher, C.; Helbig, H.; Stahl, F.; Coroneo, M.; Haller, H.; Lindschau, C.; Quass, P.; Wiederholt, M. (1989) Continuous membrane voltage recordings in A10 vascular smooth muscle cells: effect of AVP. *American Journal of Physiology* 257: C323-C332.
- Korbmacher, C.; Volk, T.; Segal, A.S.; Boulpaep, E.L.; Frömter, E. (1995) A calcium-activated and nucleotide-sensitive nonselective cation channel in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Journal of Membrane Biology* 146: 29-45.
- Krautwurst, D.; Degtiar, V.E.; Schultz, G.; Hescheler, J. (1994) The isoquinoline derivative LOE 908 selectively blocks vasopressin-activated nonselective cation currents in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 349(3): 301-7.
- Lang, F.; Busch, G.L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 78: 247-273.
- Laprade, R.; Cardinal, J. (1983) Liquid junctions and isolated proximal tubule transepithelial potentials. *American Journal of Physiology* 244: F3004-F319.
- Letz, B.; Ackermann, A.; Canessa, C.M.; Rossier, B.C.; Korbmacher, C. (1995) Amiloride-sensitive Sodium Channels in Confluent M-1 Cortical Collecting Duct Cells. *Journal of Membrane Biology* 148: 127-141.
- Leyssens A.; Nowicky A.V.; Patterson L.; Crompton M.; Duchon M.R. (1996) The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, $[Mg^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ studied in isolated rat cardiomyocytes. *Journal of Physiology-London* 496 (Pt1): 111-128.
- Light, D.B.; McCann, F.; Keller, T.M.; Stanton, B.A. (1988) Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. *American Journal of Physiology* 255: F278-F286.

- Marty, A.; Neher, E. (1995) Tight-Seal Whole-Cell Recording. In: *Single-Channel Recording* 2nd ed.: 31-52. Edited by Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Press, New York 1995.
- Marunaka, Y.; Shintani, Y.; Downey, G.P.; Niisato, N. (1997) Activation of Na⁺-permeant cation channel by stretch and cyclic AMP-dependent phosphorylation in renal epithelial A6 cells. *Journal of General Physiology* 110(3): 327-36.
- Matthews, C.C.; Feldman, E.L. (1996) Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death. *Journal of Cellular Physiology* 166: 323-331.
- McCarty, N.A.; O'Neil, R.G. (1992) Calcium signalling in cell volume regulation. *Physiological Reviews* 72(4): 1037-61.
- Meyer, K.; Korbmacher, C. (1996) Cell Swelling Activates ATP-dependent Voltage-gated Chloride Channels in M-1 Mouse Cortical Collecting Duct Cells. *Journal of General Physiology* 108: 177-193.
- Milton, R.L.; Caldwell, J.H. (1990) How do patch clamp seals form? A lipid bleb model. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 416(6): 758-62.
- Nagy, P.; Panyi, G.; Jenei, A.; Bene, L.; Gáspár, R.Jr.; Matkó, J.; Damjanovich, S. (1995) Ion-channel activities regulate transmembrane signalling in thymocyte apoptosis and T-cell activation. *Immunology Letters* 44: 91-95.
- Neher, E. (1992) Controls on calcium influx. *Nature* 355: 298-9.
- Nelson, D.J.; Tien, X.Y.; Xie, W.; Brasitus, T.A.; Kaetzel, M.A.; Dedman, J.R. (1996) Shrinkage activates a nonselective conductance: involvement of a Walker-motif protein and PKC. *American Journal of Physiology* 270: C179-91.

- O'Donnell, M.E.; Martinez, A.; Sun, D. (1995) Endothelial Na-K-Cl cotransport regulation by tonicity and hormones: phosphorylation of cotransport protein. *American Journal of Physiology* 269: C1513-C1523.
- Oike, M.; Schwarz, G.; Seherer, J.; Jost, M.; Gerke, V.; Weber, K.; Droogmans, G.; Nilius, B. (1994) Cytoskeletal modulation of the response to mechanical stimulation in human vascular endothelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 428: 569-576.
- Okada, Y. (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *American Journal of Physiology* 273: C755-89.
- Ono, S.; Mougouris, T.; Dubose, T.D.; Sansom, S.C. (1994) ATP and calcium modulation of nonselective cation channels in IMCD cells. *American Journal of Physiology* 267: F558-F565.
- Orser, B.A.; Bertlik, M.; Fedorko, L.; O'Brodovich, H. (1991) Cation selective channel in fetal alveolar type II epithelium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1094(1): 19-26.
- Popp, R.; Gögelein, H. (1992) A calcium and ATP sensitive nonselective cation channel in the antiluminal membrane of rat cerebral capillary endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1108: 59-66.
- Poronnik, P.; Ward, M.C.; Cook, D.I. (1992) Intracellular Ca²⁺ release by flufenamic acid and other blockers of the nonselective cation channel. *FEBS Letters* 296(3): 245-8.
- Rae, J.L.; Levis, R.A. (1992) Glass technology for patch clamp electrodes. In: *Ion Channels* Eds.: Rudy, B. & Iverson, L.E., Methods in Enzymology Vol. 207. Academic Press Inc., San Diego.
- Siemen, D. (1993) Nonselective Cation Channels. In: *Nonselective Cation Channels* 3-25. Edited by D. Siemen and J.K.-J. Hescheler. Birkhäuser Verlag, Basel 1993.

- Siemer, C.; Gögelein, H. (1993) Effects of forskolin on crypt cells of rat distal colon. Activation of nonselective cation channels in the crypt base and of a chloride conductance pathway in other parts of the crypt. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 424: 321-328.
- Stevenson, B.R.; Begg, D.A. (1994) Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *Journal of Cell Science* 107: 367-375.
- Stoos, B.A.; Náray-Fejes-Tóth, A.; Carretero, O.A.; Ito, S.; Fejes-Tóth, G. (1991) Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line. *Kidney International* 39(6): 1168-75.
- Strange, K.; Emma, F.; Jackson, P.S. (1996) Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *American Journal of Physiology* 270: C711-30.
- Suzuki, M.; Murata, M.; Ikeda, M.; Miyoshi, T.; Imai, M. (1998) Primary Structure and Functional Expression of a Novel Nonselective Cation Channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242: 191-196.
- Suzuki, M.; Sato, J.; Kutsuwada, K.; Ooki, G.; Imai, M. (1999) Cloning of a Stretch-inhibitable Nonselective Cation Channel. *Journal of Biological Chemistry* 274: 6330-6335.
- Tamaoki, T. (1991) Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. *Methods in Enzymology* 201: 340-7.
- Tohda, H.; Marunaka, Y. (1995) Insulin-activated Amiloride-blockable Nonselective Cation and Na⁺ Channels in the fetal Distal Lung epithelium. *General Pharmacology* 4: 755-763.
- Vaca, L.; Sinkins, W.G.; Hu, Y.; Kunze, D.L.; Schilling, W.P. (1994) Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *American Journal of Physiology* 267(5): C1501-5.

- Volk, T.; Frömter, E.; Korbmacher, C. (1995) Hypertonicity activates nonselective cation channels in mouse cortical collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* 92: 8478-8482.
- Waldegger, S.; Barth, P.; Raber, G.; Lang, F. (1997) Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* 94: 4440-4445.
- Wang, Q.; Hogg, R.C.; Large, W.A. (1993) A monovalent ion-selective cation current activated by noradrenaline in smooth muscle cells of rabbit ear artery. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 423(1-2): 28-33.
- Wehner, F.; Sauer, H.; Kinne, R.K.H. (1995) Hypertonic Stress Increases the Na⁺ Conductance of Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Journal of General Physiology* 105: 507-535.
- Weyand, B.; Warth, R.; Bleich, M.; Kerstan, D.; Nitschke, R.; Greger, R. (1998) Hypertonic cell shrinkage reduces the K⁺ conductance of rat colonic crypts. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 436: 227-232.
- Yellen, G. (1982) Single Ca⁺⁺-activated nonselective cation channels in neuroblastoma. *Nature* 296: 357-359.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

“UNTERSUCHUNG EINES NICHTSELEKTIVEN KATIONENKANALS IN M-1 ZELLEN AUS DEM SAMMELROHR DER MAUS UND IN ANDEREN GEWEBEN MIT DER PATCH CLAMP-TECHNIK”

im Institut für Physiologie II

Zentrum der Physiologie

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

unter Leitung von Prof. Dr. E. Frömter

mit Unterstützung durch PD Dr. C. Korbmacher

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Journal of Membrane Biology und Pflügers Archiv

Frankfurt am Main, den 29.7.1999



(Jan-Peter Koch)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Nachname	Koch
Vorname	Jan-Peter
Geburtsort	Ulm/Donau
Geburtsdatum	3. März 1970
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1976 – 1980	Grundschule
1980 – 1989	Gymnasium Ulm-Wiblingen
Mai 1989	Abitur
1989 – 1990	15 Monate Zivildienst an der Diakoniestation Ulm (mobile häusliche Krankenpflege)

Universität

	<i>Studium der Humanmedizin</i> <i>Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main</i>
01/04/1991 – 31/03/1993	Vorklinischer Teil des Studiums
15/09/1993	Physikum
01/10/1993 – 27/09/1998	Klinischer Teil des Studiums
28/08/1994	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16/09/1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/10/1997 – 31/05/1998	Praktisches Jahr in den Fächern Innere Medizin, Allgemeine und Abdominalchirurgie am „Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro“, Madrid, Spanien
08/06/1998 – 27/09/1998	Praktisches Jahr in Anästhesiologie am Klinikum der JWG-Universität Frankfurt
30/10/1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftl. Tätigkeit

28/03/1995 – 14/02/1997	Forschungsprojekt für die Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.) am Institut für Nieren- und Membranphysiologie, Zentrum der Physiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main, Deutschland Betreuer: Prof. Dr. E. Frömter und Dr. C. Korbmacher (Oxford)
19/04/1999 – 30/05/1999	„Wellcome Trust Travel Award“ für einen sechswöchigen Forschungsaufenthalt am University Laboratory of Physiology, Oxford, UK, in der Gruppe von Dr. C. Korbmacher
Ab 15/07/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Nieren- und Membranphysiologie, Zentrum der Physiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Veröffentlichungen

- | | |
|------|--|
| 1996 | "Activation of nonselective cation channels in renal and colonic epithelial cells by osmotic shrinkage", Abstract, Pflügers Arch 431:R22, 1996 |
| 1999 | "Osmotic shrinkage activates nonselective cation (NSC) channels in various cell types", Article, J. Membrane Biol. 168:131-139, 1999 |



29/07/1999

Jan-Peter Koch