

# Wie transportieren Zellen Substanzen?

Wichtige Fragen erst in Ansätzen gelöst / Von Armin Wessing

Die Frage, wie Stoffe in eine Zelle gelangen und wie sie diese wieder verlassen, ist eine alte physiologische Frage. Obwohl seit mehreren Jahrzehnten weltweit eine große Anzahl von Wissenschaftlern an der Lösung dieses fundamentalen Problems des zellulären Stofftransportes arbeitet, sind die wichtigen Fragen auch heute nur in den Ansätzen, teilweise nur theoretisch beantwortet.

Die meisten Transportphysiologen sind wie auch an dieser Universität Mediziner, sie arbeiten an Zellen von Wirbeltieren, oft nur an deren isolierten Membranstrukturen. Nicht-Wirbeltiere sind ausschließlich Untersuchungsobjekte von Zoologen (so wie die pflanzlichen Objekte nur von Botanikern untersucht werden).<sup>1</sup>

1952 publizierte der Altmeister der Nierenphysiologie, J. A. Ramsay, die ersten Untersuchungen über die Transportarbeit der Malpighigefäße, die bei Insekten das sie umgebende Blut (Hämolymphe genannt) entgiften und die außerdem osmoregulatorisch wirksam sind. Sie führen die Exkrete dem Enddarm zu, über den sie den Körper verlassen.

## Das Untersuchungsobjekt, die Taufliege *Drosophila*

Die Malpighischen Gefäße sind eines der wichtigsten Untersuchungsobjekte der Arbeitsgruppe „Stofftransport“ im Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie. Wie die Nierentubuli bei Wirbeltieren sind sie schlauchförmige Organe, deren Lumen nur von einer Epithellage umgeben ist. Substanzen, die vom Blut zum Lumen transportiert werden, brauchen also nur eine Zelle zu pas-

sieren. Diese Malpighi-Gefäße lassen sich bei den Larven von Taufliegen (*Bild 1*) in wenigen Sekunden freilegen oder den Versuchstieren entnehmen. Sie arbeiten in einer synthetischen Blutersatzflüssigkeit über längere Zeit weiter, produzieren also in vitro mikroskopisch sichtbare Harntröpfchen, deren Ionenzusammensetzung meßtechnisch erfaßt werden kann. Natürlich kann man auch die produzierte Harnmenge messen und so die Harnflußrate des Organs bestimmen. Bei solchen Versuchen wird das Malpighi-Gefäß am Harnleiter abgetrennt und in eine Blutersatzlösung gegeben. Das offene Stück des Gefäßes wird aus der Lösung herausgezogen, an einer feinen Nadelspitze aufgehängt und das ganze Präparat mit flüssigem Paraffin überschichtet (*Bild 2*). Der umgebenden Badlösung entnehmen die Epithelzellen des Tubulus bestimmte, in Wasser gelöste Ionen und befördern sie zum Lumen. Der produzierte Harntröpfchen (*Bild 3*) kann mit einer Mikropipette abgenommen und der Gehalt an Natrium und Kalium gemessen werden. Ein derartiges in vitro-Präparat arbeitet im Zeitraum einer Stunde fast so gut wie innerhalb des Körpers.

Wie läßt sich das kontrollieren? Man kann mit Hilfe einer elektronenmikroskopischen Analyse die Architektur der in vitro-Zellen mit unbehandelten Zellen vergleichen. Die Architektur der Zellen ist so strukturreich (*Bild 3*), daß jede Störung der Zellfunktion im Zellbild erkennbar wird. Noch besser ist es, den Gehalt an Natrium- und Kaliumionen zu messen und mit den Analysen zu vergleichen, die dem fast unbeschädigten Tier mit einer angeschliffenen Mikropipette aus dem Gefäßlumen entnommen wurden. Mit

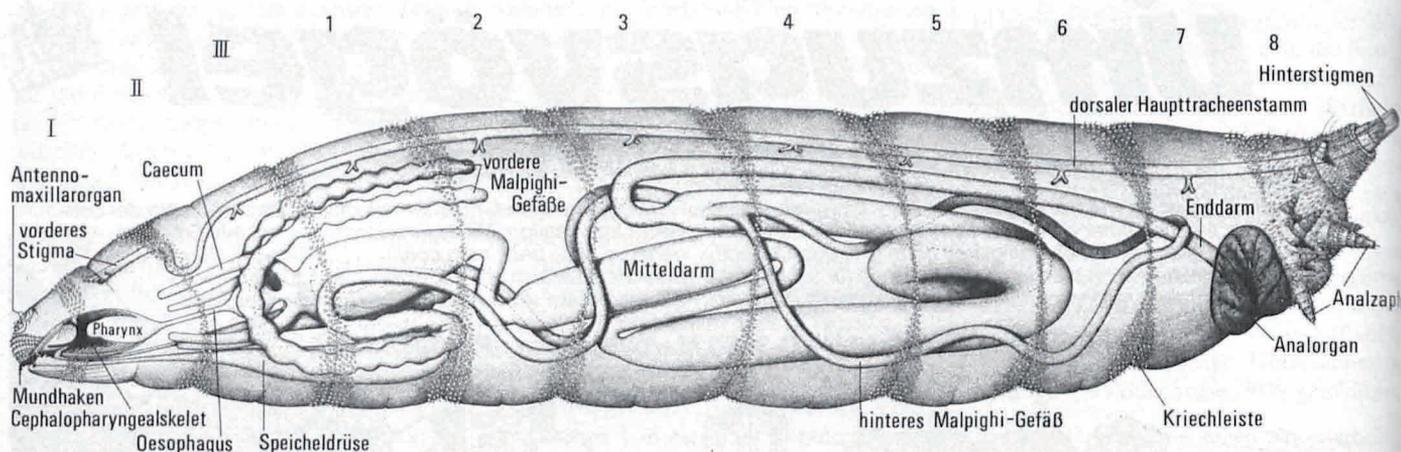
diesen Methoden kann man beweisen, daß Zellstruktur und Transportfunktion über eine Stunde fast unverändert erhalten bleiben.

## Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope gehören heute schon zur Standardausrüstung von biologischen Instituten. Die Gießener Zoologie verfügt über drei derartige Geräte. Die Elektronenmikroskopie wird bei den beschriebenen Versuchen aus mehreren Gründen ständig eingesetzt:

1. wird die normale Zellarchitektur analysiert, um festzustellen, mit und an welchen Strukturen die Transportarbeit abläuft.
2. ermittelt man, wie sich die Struktur unter veränderten physiologischen Bedingungen verhalten, z. B. während der Puppenzeit, unter physiologischen Stresssituationen, herbeigeführt durch das Fehlen eines wichtigen Ions, unter den Bedingungen veränderter osmotischer Werte, wie Salz- und Wasserbelastung, bei Anwesenheit von Hemmsubstanzen oder Stimulantien des Stofftransportes, etc.
3. kann man durch Injektion von elektronendichten Stoffen anorganischer und organischer Art die Transportarbeit direkt sichtbar machen und deren Ablauf analysieren.

Durch eine derartige Vielzahl von Stoffwechselsituationen gelingt es allmählich durch die Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen auf die Dynamik von Zellstrukturen zu schließen; eine elektro-



*Bild 1: Eine Drosophila-Larve ist einfach gebaut. Der Darmkanal und die angehängten Nierenorgane, die Malpighi-Gefäße, liegen verschlungen in der Leibeshöhle und sind vom Blut, der Haemolymphe, umspült. Die Nierenschläuche entgiften das Blut und führen die Stoffe in den Enddarm. Sie werden dem Versuchstier entnommen, wobei die Verbindung zum Enddarm bei der Präparation abgetrennt wird.*

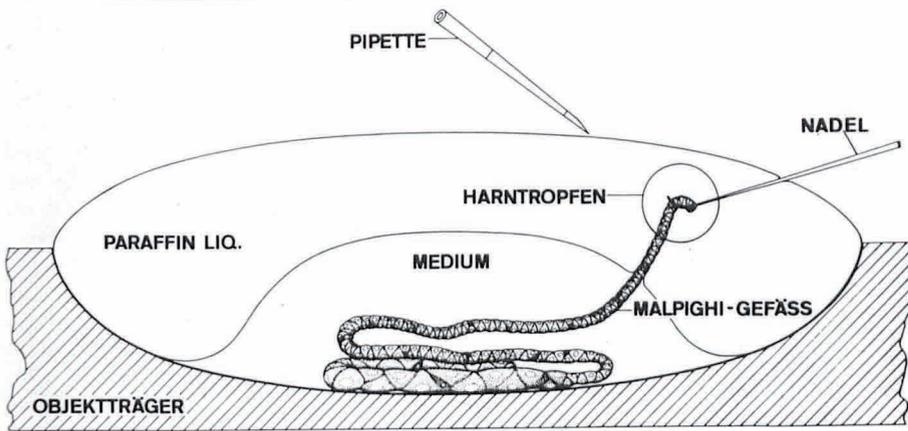


Bild 2: Nierenorgane von Insekten arbeiten auch außerhalb des Körpers weiter. Sie liegen dabei in einem synthetischen Medium, das aus in Wasser gelösten Salzen und Zuckern besteht. Das Gefäßende hängt an einer Nadelspitze, der gebildete Harntropfen wird zur Analyse mit einer feinen Pipette abgesaugt.

nenmikroskopische Aufnahme erfaßt nämlich immer nur einen kurzen Augenblick aus dem Leben einer Zelle.

Durch die Injektion von elektronenmikroskopisch sichtbaren Stoffen in das Blut wissen wir heute, daß die „Nierenzellen“ der Tauflyge innerhalb von nur 60 Sekunden organische Stoffe mit einem Molekulargewicht von 15 000 in Bläschen der Zelle aufnehmen können, diese Vesikel dann durch die Zelle wandern und ihren Inhalt am anderen Pol in das Lumen abgeben können.

Das ist für ein kaltblütiges Nichtwirbeltier eine bisher unbekannte, außerordentlich hohe Transportleistung. Selbst Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 69 000 wird befördert, Goldsolteilchen aber sind zu dick, sie können die Basallamelle nicht mehr passieren. Schon lange ist bekannt, daß dieser extrazelluläre Überzug wie ein Ultrafilter wirkt und bei Stoffbewegungen nur kleinmolekulare Substanzen passieren läßt.

### Physiologische und pharmakologische Experimente

Relativ einfach ist es festzustellen, wie schnell Farbstoffe, die in das Blut gelangen, von den Zellen eliminiert werden, Versuche, die heute schon im Unterricht durchgeführt werden. Interessanter ist dabei der Einsatz von Hemmstoffen des Stofftransportes. Der wichtigste Transportinhibitor ist das *g-Strophantin*, das z. B. auch die Farbstoffausscheidung hemmend beeinflußt. Dieser Inhibitor macht ein Enzym, die Na-K-ATPase, unwirksam, die bei den Malpighi-Gefäßzellen wie bei den Nierenzellen von Wirbeltieren in der basalen Zellmembran stationiert ist und Natriumionen im Austausch gegen Kaliumionen aus der Zelle in das Blut befördert. Diesen Mechanismus nennt man

„Ionenpumpe“, sie verbraucht Energie und kommt in fast allen tierischen und menschlichen Zellen vor. Für die Insekten konnte sie durch die Gießener Arbeitsgruppe zum ersten Mal nachgewiesen werden (Bild 5). Insektenzellen besitzen nämlich auf der anderen Zellseite noch einen weiteren Transport, die elektrogene „K<sup>+</sup>-Pumpe“, die unter Energieaufwand nur Kaliumionen in das Lumen befördert. Dieser Transport kommt nur bei Insekten vor und sollte nach den bisherigen Vorstellungen der einzige aktive Transportvorgang sein, dem andere Ionen und Moleküle passiv folgen.

So gelangt bei *Drosophila* durch zwei Transportsysteme sehr viel Kalium in das

Gefäßlumen. Nach physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten folgen dem positiv geladenen Kalium negativ geladene Anionen, wie das Chlorid, und schließlich auch Wassermoleküle. Diese wiederum nehmen gelöste Stoffe wie z. B. Stickstoff-haltige Exkrete, Aminosäuren- und Zuckermoleküle mit. Da, wie bei allen Nierenorganen, wertvolle Substanzen später rückresorbiert werden, wird auf diese Weise alles, was dem Organismus schädlich oder lästig ist, ausgeschieden.

Dem Test mit Strophantin (Ouabain) folgte der Einsatz eines Pharmakons, das in der klinischen Medizin eines der wichtigsten Diuretika ist, das *Furosemid*. Nachdem bei einigen Wirbeltierzellen die spezifische Wirksamkeit ermittelt worden war, konnten wir auch bei *Drosophila* nachweisen, daß dieser Inhibitor einen Transportmechanismus hemmt, der in der basalen Membran eingebaut ist und gleichzeitig 4 Ionen bewegt, ein Kalium-, ein Natriumion und zwei Chloridionen (Bild 5).

Jede Zellmembran besitzt auch „Kanäle“ oder Poren, durch die Ionen auf die andere Membranseite gelangen können, wenn eine „Leitfähigkeit“ vorhanden ist. Wenn Kaliumionen wie bei den Malpighi-Zellen in so großen Mengen in die Zelle befördert werden, können sie durch solche Membrankanäle wieder ins Blut gelangen. Diese „Lecks“ kann man mit Bariumionen spezifisch verstopfen (Bild 5).

Die Transportvorgänge durch die Zellmembranen lassen sich auch beschleunigen. Im Insektenorganismus macht das wie bei Wirbeltieren ein Hormon, das in Drüsenorga-

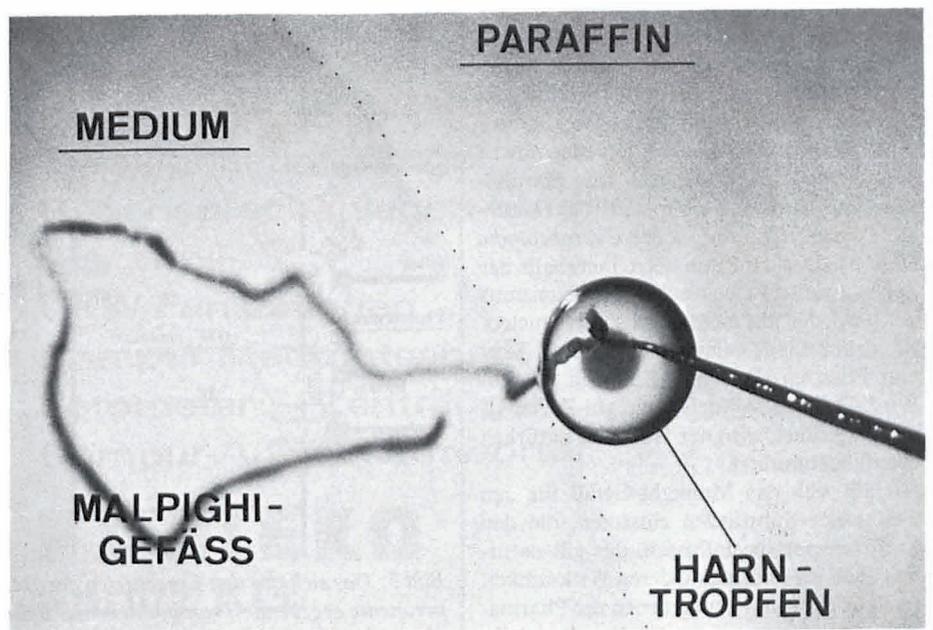
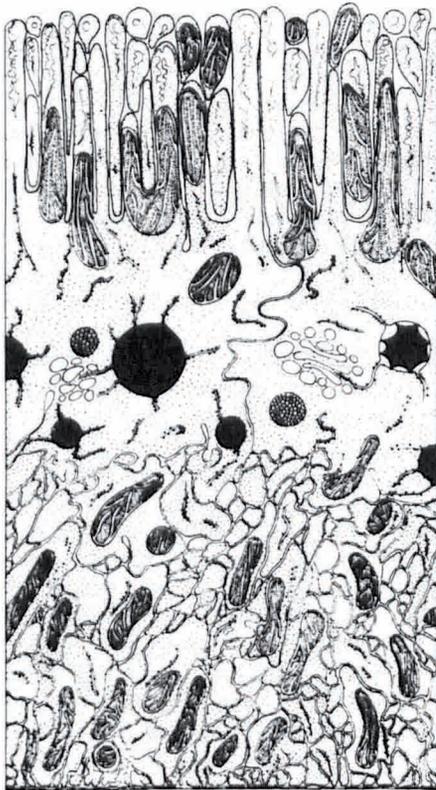


Bild 3: Mikroskopische Aufnahme eines Malpighi-Gefäßes, das in einer künstlichen Blutersatzlösung liegt und dessen offenes Ende mit einer feinen Nadel gehalten und in flüssiges Paraffin gezogen wird, wo sich ein Harntropfen bilden kann.

Lumen



Haemolymphe (Blut)

Bild 4: Die Zellen eines Malpighi-Gefäßes besitzen auf beiden Seiten riesige Membranflächen mit zahlreichen, energieliefernden Mitochondrien. Dazwischen werden Fette, Calcium und die Aminosäure, 3-OH-Kynurenin, gespeichert.

schränkung von Wirbeltierexperimenten könnte auch die Versuche an Malpighi-Gefäßen für den Pharmatest interessanter machen.

Der Leser wird sich fragen, wie die Ergebnisse über die Stofftransporte an Malpighischen Gefäßen von Drosophila ermittelt wurden. Neben der Harngewinnung mit Hilfe eines Tubulus, der in einer Blutersatzlösung auf dem Objektträger arbeitet (Bilder 2, 3), wird am Gefäß der eröffneten Larve die elektrische Potentialdifferenz zwischen der Zelle und dem Blut, der Zelle und dem Gefäßlumen und dem Blut und dem Lumen gemessen.

Damit wird ermittelt, ob die Anzahl der positiven oder der negativen Ladungen in der Zelle und im Lumen überwiegt. Danach sind die Malpighi-Zellen gegen ihre Außenwelt immer negativ geladen.

Weiterhin kann man die Menge der aktiven Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ) in der Zelle messen. Zu diesem Zweck sind in den letzten Jahren spezifische flüssige Ionenaustauscher entwickelt worden, die sich bevorzugt mit bestimmten Ionen beladen. Dieser Vorgang läßt sich meßtechnisch erfassen und mit elektrischer Potentialdifferenz, die simultan gemessen wird, verrechnen. So läßt sich innerhalb der Zellen die Ionenaktivität messen.

Perfusionstechnik

Alle diese Versuche können nicht klären, welche Transporteigenschaft die dem Lumen zugewandte Membran hat. Am Max-

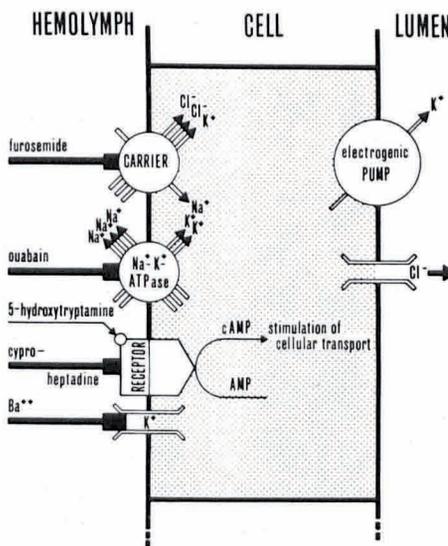


Bild 5: Das sich aus den Ergebnissen der Experimente ergebende Transportschema: links oben, der Furosemid-hemmbar Co-Transport, darunter die Strophantin-hemmbar  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe, zum Lumen hin die  $\text{K}^+$ -Pumpe, (weitere Erläuterungen im Text).

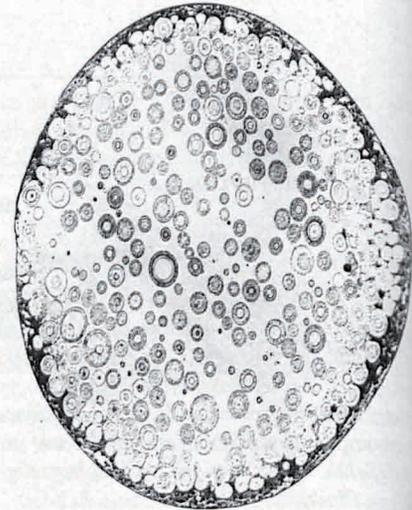


Bild 6: Ein Querschnitt durch das Anfangsstück eines Malpighi-Gefäßes. Hier sind die Zellen flach, und das Lumen ist mit zahlreichen Konkrementen („Nierensteinen“) gefüllt. Elektronenmikroskopisch.

nen des Kopfes gebildet wird. Das Hormon stimuliert die Transportvorgänge der Malpighi-Gefäße. Geht die Produktion zurück, wird auch die Transportrate kleiner. Serotonin (5-Hydroxytryptamin) hat eine solche stimulierende Wirkung auf den Harnbildungsmechanismus, ein spezifischer Hemmstoff dieses Hormons ist das Cyproheptadin (Bild 5). Das Hormon setzt innerhalb der Zellen einen biochemischen Mechanismus in Gang, der mit einem cyclischen Nucleotid, dem cAMP, anläuft und bei allen Tier- und Pflanzenzellen vorzukommen scheint. Wird dieses cAMP den Malpighi-Zellen direkt zugeführt, wird der Harnfluß natürlich ebenfalls stimuliert.

So läßt sich das Malpighi-Gefäß für den Test vieler Substanzen einsetzen, die den Stofftransport beeinflussen, das gilt natürlich auch für Pharmaka, deren Wirksamkeit noch unbekannt ist, von denen der Pharmakologe aber gerne wissen möchte, ob sich ihr Einsatz im klinischen Versuch überhaupt lohnt. Die neuerdings immer lauter werdende Forderung von Tierschützern nach Ein-

Planck-Institut für Biophysik (Prof. Ullrich) in Frankfurt konnte für Nierentubuli von Kaninchen ein sehr aufwendiges, kompliziertes Verfahren entwickelt werden, die Perfusionstechnik. Dr. Hevert hat sie für die Untersuchung Malpighischer Gefäße von Drosophila weiterentwickelt und mit großem Aufwand aufgebaut.

Bei dieser Technik wird ein Gefäß zunächst in eine Mikrokapillare eingesaugt, dann ein darin steckende zweite Kapillare, angetrieben durch einen winzigen Motor, in das Lumen eingeschoben. Eine dritte Kapillare, gefüllt mit einem elektrisch isolierendem Kunststoff, stellt eine schützende Hülle um die dünnen Kapillaren dar und verhindert zudem elektrische Kurzschlüsse. Schließlich wird in das im Lumen steckende Glasrohr eine weitere feine Mikrokapillare eingeführt. Vor dem Versuch muß ein an beiden Seiten offener Tubulus an jedem Ende in derartige Kapillarsätze montiert werden. Das Lumen wird dann über die Lumenpipetten mit physiologischer Lösung durchströmt, außen befindet sich das Präparat in Blutersatzlösung. Nun wird in eine Zelle eine Elektrode zur Registrierung des Elektroentials zwischen Zelle und Lumen eingeschoben.

Wird nun die Perfusionslösung oder die äußere Badlösung schlagartig verändert oder wird über die feine Mikrokapillare ein Hemmstoff zugesetzt, gibt die Registrierung des Elektroentials sofort „eine Antwort“, die eine Erklärung über die Wirksamkeit möglich macht.

### „Nierensteine“

Viele Insekten bilden in den Malpighi-Gefäßen Konkreme, die eine essentielle Rolle bei der Exkretion spielen. Sie bestehen nach unseren Analysen wie eine bestimmte Sorte von Nierensteinen beim Menschen, aus Calcium, Magnesium, Carbonat und Phosphat. Sie stellen Biokristalle dar, da sie eine Matrix von Polysacchariden besitzen.

Diese Gebilde entstehen schon in oder an den Zellen und wachsen im Lumen bis zu einer Größe von 3 µm heran (Bilder 6, 7). Nur während des Winters können diese „Nierensteine“ gelegentlich so groß werden (Bild 8), daß sie das Lumen verstopfen und den Abfluß des Harnes erschweren.



Bild 7: Elektronenmikroskopisches Bild eines Harnkonkrementes aus dem Gefäßlumen, es ist aus anorganischem Material und einem organischen Mucopolysaccharid (konzentrische Schichten) aufgebaut und kann weiterwachsen. Unten: Zellquerschnitt.

Mischt man den Tieren Calcium-Salze zum Futter, gelangt das Calcium über den Darm und das Blut in die Malpighi-Gefäße, wo sich immer mehr Konkreme bilden, bis schließlich das Gefäß mit Tausenden von „Nierensteinen“ angefüllt ist. Calcium-Ionen sind also das Stimulans für die Entstehung dieser Hartgebilde und die „Nierensteine“ der Insekten ein biokristallines Exkretprodukt für Calcium. Wohl kaum ein Versuchstier eignet sich besser dazu, die Genese von Calcium-Steinen zu untersuchen, als bestimmte Insektenarten.

Ebensogut lassen sich Substanzen testen, die Nierensteine verhindern können. Drei Substanzen waren bisher erfolgreich: *Hydrochlorothiazid*, ein älteres Diuretikum, *Acetazolamid*, das das Enzym Carboanhydrase hemmt und *Natriumcellulosephosphat*, das

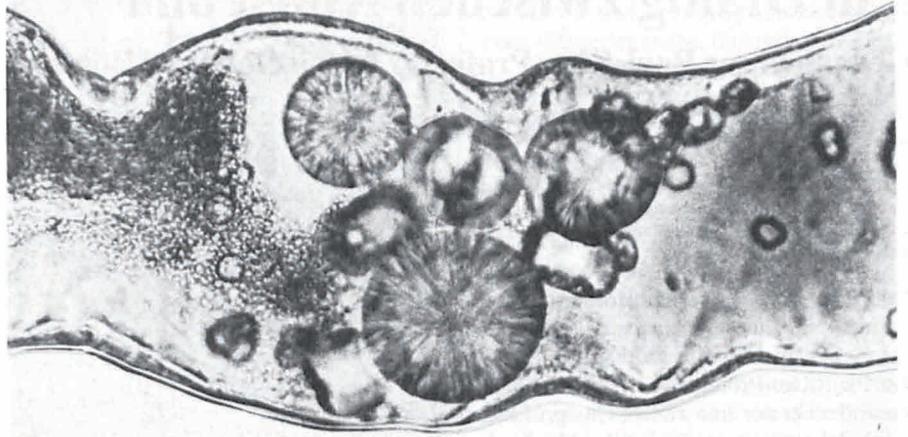


Bild 8: Während der Winterzeit ist der Exkretstoffwechsel offenbar geringer, die Malpighi-Gefäße zeigen nur noch eine geringe Transportleistung. Dann können neben den kleineren Konkrementen (im Lumen links) große Harnsteine (Bildmitte) gebildet werden, die das Lumen verstopfen und den Harnfluß oft vollkommen hemmen. Lichtmikroskopisch.

Calcium im Darmkanal bindet. Nur mit dem letzten Präparat ist es möglich, die Malpighischen Gefäße von „Nierensteinen“ weitgehend zu befreien. Aber es ist nur erfolgreich, wenn nicht gleichzeitig dem Futter Calcium zugegeben wird.

Ob sich bereits gebildete „Nierensteine“ auch auflösen können, wenn dieses Präparat verabreicht wird, untersuchen wir im Augenblick mit Hilfe von Organtransplantationen.

Die Untersuchungen an den Malpighi-Gefäßen stellen nur einen Teilaspekt der Arbeiten dar. Fast ebenso großen Raum nimmt

die Untersuchung von Transportvorgängen an Austern ein, deren Herz außerhalb des Körpers weiterarbeitet und an dem ebenfalls Pharmaka getestet werden können. Darüber wird später berichtet.

1 In der Arbeitsgruppe „Stofftransport“ sind tätig: Prof. Dr. D. Eichelberg (Elektronenmikroskopie u. a.), PD Dr. F. Hevert (Biochemie und Biophysik von zellulären Transportvorgängen), Dr. K. C. Rönnau (Messung der elektrischen Potentiale und der intrazellulären Ionenaktivitäten), Dipl.-Biol. J. Stahl (Wirkung von Pharmaka auf Transportvorgänge), Dipl.-Biol. C. Wendt (Transportvorgänge am isolierten Herzen von Evertbraten)