

Die Membranfunktion der Niere

Autor(en): **Kinne, R.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **32 (1976)**

PDF erstellt am: **20.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308062>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. Main

DIE MEMBRANFUNKTION DER NIERE

R. KINNE

Zusammenfassung

Bürstensaummembranen und Membranen des basalen Labyrinths wurden aus der Rattenniere isoliert und auf ihre Funktionen im Stofftransport des proximalen Tubulus untersucht. Die enzymatische Charakterisierung der Membranen ergab, dass eine durch Bikarbonat stimulierbare ATPase nur in den Bürstensaummembranen nachzuweisen ist, während eine durch Calcium stimulierbare ATPase und eine durch Natrium und Kalium stimulierbare ATPase nur in den Membranen des basalen Labyrinths vorkommt. Die zelluläre Verteilung der Enzyme ist mit der bereits aus elektrophysiologischen Daten abgeleiteten Lokalisation der aktiven Transportprozesse im Einklang, nämlich, dass an der luminalen Seite der Zellen des proximalen Tubulus ein aktiver - vermutlich durch die Bikarbonat-ATPase vermittelter - Transport von Bikarbonat oder Protonen stattfindet. An der kontraluminalen Zellseite hingegen erfolgt ein aktiver - ebenfalls durch ATPase vermittelter - Transport von Natrium. Ob der an der kontraluminalen Zellseite zu lokalisierende aktive Ca^{++} -Transport direkt durch ATP-Spaltung getrieben wird oder im Gegentransport gegen Natrium abläuft, ist jedoch noch nicht eindeutig entschieden.

Eine Analyse der Transporteigenschaften isolierter Membranbläschen zeigte, dass in der Bürstensaummembran natriumabhängige Transportsysteme für Zucker, Aminosäuren und Phosphat vorhanden sind; die Membranen des basalen Labyrinths enthalten natriumunabhängige Transportsysteme für Zucker, Aminosäuren, Phosphat und p-Aminohippursäure. Die natriumabhängigen Systeme stellen Natrium-Substrat-Kotransportsysteme dar, die durch Flusskopplung den an der Bürstensaummembran bestehenden Natriumgradienten als Energiequelle für die intrazelluläre Akkumulation und für den aktiven transepithelialen Transport von Zucker, Aminosäuren und Phosphat benutzen. Die Bürstensaummembran enthält ausserdem ein Natrium/Protonen-Austauschsystem, das ebenfalls in die Protonensekretion eingeschaltet sein könnte.

Für Laktat, das von der Tubuluszelle verstoffwechselt wird, haben die Bürstensaummembranen in Anwesenheit eines Natriumgradienten eine sehr viel höhere Permeabilität als die Membranen des basalen Labyrinths. Das weist darauf hin, dass die Versorgung der Tubuluszelle mit Laktat überwiegend von der luminalen Zellseite aus erfolgt.

Einblick in die Funktion von Membranen während der Aufnahme von Proteinen in die Tubuluszelle konnte durch biochemische Analyse von isolierten pinozytotischen Vesikeln gewonnen werden. Im Vergleich zu den Bürstensaummembranen haben pinozytotische Vesikel einen hohen Gehalt an sauren Phospholipiden und Glykoproteinen. Letztere haben eine höhere Umsatzrate als die Proteine der Bürstensaummembran. Daraus kann geschlossen werden, dass die pinozytotischen Vesikel während der Pinozytose neusynthetisiert werden und eigenständige von der Bürstensaummembran unabhängige Membraneinheiten darstellen. Die sauren Phospholipide und die Glykoproteine könnten bei der Pinozytose als Rezeptor für basische Proteine und Polysaccharide dienen.

Die hier dargestellten Befunde zeigen, dass, wie zu erwarten, die luminalen und kontraluminalen Abschnitte der Zellmembran der Epithelzellen des proximalen Tubulus unterschiedliche Funktionen besitzen, die die Zellen zu aktiver Resorption, aktiver Sekretion und Pinozytose befähigen.

Summary

Brush border membranes (luminal) and basal-lateral plasma membranes (contraluminal) of rat kidney proximal tubules were isolated by freeflow electrophoresis and their role in transepithelial transport was investigated. Enzymatic analysis revealed that the brush border membranes contain a bicarbonate stimulated ATPase and that the basal-lateral plasma membranes contain a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and a calcium stimulated ATPase. These findings suggest that an active, ATPase-mediated step in transepithelial bicarbonate or proton transport is located in the luminal membrane, whereas an active, ATPase-mediated step in transepithelial sodium and calcium transport is located in the contraluminal membrane.

Transport studies with membrane vesicles demonstrated that sodium-dependent stereospecific transport systems for sugars, amino acids and phosphate are located in the brush border membrane; the basal-lateral plasma membranes contain sodium-independent transport systems for sugars, amino acids, phosphate and p-aminohippurate. The sodium-dependent systems represent sodium-substrate cotransport systems which in the course of transepithelial transport derive energy from the transmembranal electrochemical potential difference of sodium for the intracellular accumulation and active transepithelial transport of sugars, amino acids and

phosphate. The brush border membrane contains in addition a Na^+/H^+ exchange system which might be involved in the proton secretion of the proximal tubule.

In the presence of a sodium gradient the permeability of the luminal membrane vesicles for L-lactate is higher than the permeability of the contraluminal membrane vesicles. This indicates that L-lactate - which is metabolized by the tubular epithelium - enters the tubular cell mainly from the tubular lumen.

The role of membranes in the uptake of proteins by the tubular cell was investigated by isolation and biochemical characterization of microvilli, pinocytic vesicles and lysosomes. Pinocytic vesicles were found to be rich in acid phospholipids and glycoproteins which show a more rapid turnover than the proteins of the microvilli. It is concluded that pinocytic vesicles are biochemically defined entities with unique functions which are synthesized during the pinocytic process.

These findings demonstrate that the luminal and contraluminal faces of the epithelial cells in the proximal tubule have different functions which enable the cell to perform active reabsorption, active secretion and pinocytosis.

Einleitung

Die Niere ist ein wesentliches Organ zur Aufrechterhaltung des Milieu intérieur des Körpers. Sie erfüllt ihre Aufgabe durch die Kombination der Prozesse: Filtration eines Primärharns im Glomerulus, gefolgt von spezifischer Resorption und Sekretion im Tubulus. Die Funktion von Membranen bei diesen Prozessen ist dabei unterschiedlich, je nachdem, ob es sich um die Basalmembranen handelt, die das Gefässknäuel im Glomerulus umhüllen und den Tubulus schlauchartig umfassen, oder um die Plasmamembranen, die die Tubuluszellen umgeben, oder um intrazelluläre Membransysteme wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Lysosomen.

Ueber die Rolle der glomerulären Basalmembran im Filtrationsprozess liegen ausführliche Untersuchungen vor. So ist bekannt, dass sie fibrilläre Strukturen mit Zwischenräumen von 30 - 75 Å zeigt, eine Barriere für die Filtration grosser Moleküle wie z.B. Hämoglobin und Serumalbumin darstellt und dass ihre Filtrationseigenschaften pathologischen Alterationen unterworfen sind (16). Die tubuläre Basalmembran hat die Funktion, die Tubuluszellen im Epithelverband zusammenzuhalten. Als relativ starres Maschenwerk kann sie Volumenänderungen der Zellen bei hypoosmotischen Zuständen verhindern und damit Änderungen der Geometrie des Tubulus entgegenwirken, die die physikalischen Triebkräfte für den Transport beeinflussen können.

Die Funktion der Plasmamembranen während der Resorption und Sekretion behandelt der folgende Beitrag. Auf diesem Gebiet sind in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt worden, und zwar besonders was die Eigenschaften der Plasmamembranen im proximalen Tubulus angeht (18).

Intrazelluläre Membransysteme spielen eine Rolle während der Aufnahme von Proteinen in die Zellen des proximalen Tubulus. Auf die Pinozytose des Proteins und seine Konzentrierung in apikalen Resorptionsvakuolen folgt die Verschmelzung der Vakuolen mit primären Lysosomen, die dem Golgi-Apparat entstammen. In diesen sekundären Lysosomen findet dann der Abbau der Proteine statt. Ueber die biochemische Zusammensetzung und mögliche Funktion der Bestandteile dieser Membranen soll hier ebenfalls kurz berichtet werden.

Trennung der Isolierung luminaler und kontraluminaler Abschnitte der Plasmamembran von Tubulusepithelien

Tubulusepithelien zeigen wie andere transportierende Epithelzellen eine ausgeprägte morphologische Asymmetrie der Zellen, die durch die unterschiedliche Gestaltung der luminalen (oder apikalen) und kontraluminalen (oder basal-lateralen) Abschnitte der Plasmamembranen hervorgerufen wird. Besonders auffällig ist das am proximalen Tubulus, wo die luminalen Zellseite vom Bürstensaum gebildet wird, der sich aus zahlreichen Ausstülpungen, den sogenannten Mikrovilli, zusammensetzt. An der kontraluminalen Seite sind benachbarte Zellen durch zahlreiche Fortsätze der basal-lateralen Plasmamembranen miteinander verzahnt. Sie bilden das basale Labyrinth.

Es war schon frühzeitig die Vermutung geäußert worden, dass der unterschiedliche morphologische Aufbau der beiden Zellpole einen Unterschied in der Funktion der beiden Plasmamembranen widerspiegelt. Eine biochemische Analyse der Funktion der Membranen war jedoch erst nach Isolierung der beiden Zellmembranabschnitte möglich.

Bei einer solchen Isolierung wird im Prinzip folgendermassen vorgegangen. Die Epithelzellen werden zunächst aus ihrem Verband und dem Bindegewebe herausgelöst, dann wird die Plasmamembranhülle durch Scherkräfte aufgebrochen und der zelluläre Inhalt freigesetzt. Es schliesst sich eine Trennung der einzelnen Zellbestandteile durch Zentrifugation nach Grösse und Dichte an, wodurch eine Membranfraktion gewonnen werden kann, in der sowohl luminal als auch kontraluminal Membranabschnitte angereichert sind. Die Trennung dieser Abschnitte erfolgt dann auf Grund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung in einer vertikalen Ablenkungselektrophorese (trägerfreie Elektrophorese). Die apikalen und basal-lateralen Membranen wandern dabei unterschiedlich schnell im elektrischen Feld und reichern sich in verschiedenen Fraktionen an, die getrennt untersucht werden können.

Für die Unterscheidung zwischen apikalen und basal-lateralen Membranen können folgende Kriterien benutzt werden: Im Fall von ausgeprägt polaren Zellen wie im proximalen Tubulus hilft die Morphologie der Zellmembranfragmente weiter. Abbildung 1 zeigt zum Beispiel das elektronenoptische Bild der luminalen und der kontraluminalen Membranfraktionen im Verfahren der Negativkontrastung. Die luminalen Membranfraktionen enthalten einzelne Mikrovilli mit ihrem Oberflächen-Coat, während die basal-laterale Membranfraktion aus grossen Membranfetzen mit glatter Oberfläche besteht (12).

Als Hauptkriterium werden aber sog. Leitenzyme benutzt, die in der Zelle ausschliesslich in einer der Membranen vorkommen. Für den proximalen Tubulus ist das zum Beispiel die alkalische Phosphatase, die nach histochemischen Befunden in hoher Aktivität im Bürstensaum vorhanden ist, und die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, die nach quantitativ histochemischen Befunden von SCHMIDT und DUBACH (28) dem basalen Labyrinth zuzuordnen ist. Die Verteilung dieser Leitenzyme während der vertikalen Ablenkungselektrophorese von Plasmamembranen, die aus der Rattennierenrinde gewonnen wurden, ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt. Es ist deutlich, dass die alkalische Phosphatase und $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase sich unterschiedlich verhalten; und es können daher, bei geeigneter Wahl der Fraktionen, Bürstensaummikrovilli und Membranen des basalen Labyrinths getrennt voneinander erhalten werden.

Es ist also durch Verwendung der obengenannten Methoden möglich, luminalen und kontraluminalen Membranen des proximalen Tubulus (12) und – hier nicht näher geschildert – des Sammelrohrs (29) gleichzeitig und unter identischen Bedingungen zu isolieren. Das bedeutet, ihre Funktionen können getrennt voneinander und in Abwesenheit von intrazellulären Faktoren unter wohl definierten Bedingungen untersucht werden.

Funktionelle Analyse isolierter Plasmamembranen

An isolierten Plasmamembranen können folgende Eigenschaften beobachtet werden, die sich aus den Eigenschaften des Tubulusepithels im intakten Organ ergeben. Selektive, transzelluläre Resorption und Sekretion erfordern die Anwesenheit von spezifischen Transportsystemen in den Membranen, d.h. die Membranen fungieren als Träger spezieller Transportsysteme. Im Falle eines aktiven Transports, für den die Zelle Energie bereitstellen muss, sind die Plasmamembranen Kopplungsstellen zwischen Transport und energieliefernden Reaktionen. Beim Vorliegen von sogenanntem primär-aktiven Transport ist der Substanzfluss durch die Membran direkt mit entsprechenden Stoffwechselreaktionen verknüpft, z.B. mit der Hydrolyse von ATP, während beim sekundär-aktiven Transport der Transport einer Substanz x durch Flusskopplung mit dem Transport einer primär-aktiv transportierten Substanz y verknüpft ist. Eine weitere Eigenschaft des Tubulusepithels ist die hormonelle Steuerung der Transporte-

genschaften, z.B. der Wasserpermeabilität des Sammelrohrs durch antidiuretisches Hormon, die die Anwesenheit spezifischer Hormonsysteme und spezifischer Effektorsysteme bedingt. Auf die letzteren kann in diesem Bericht nicht eingegangen werden. Der interessierte Leser wird auf einen kürzlich fertiggestellten Uebersichtsartikel verwiesen (20).

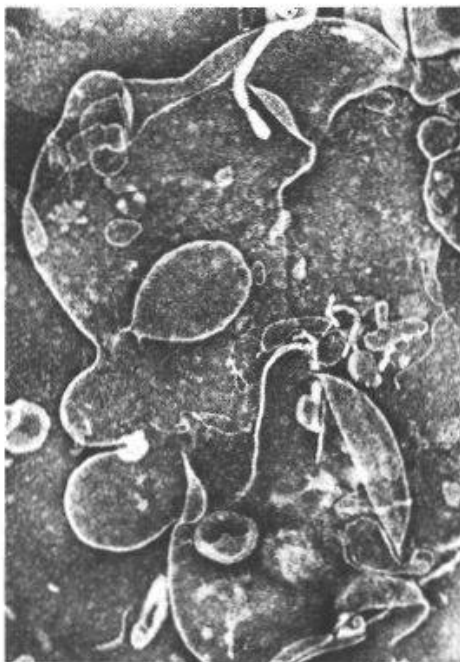
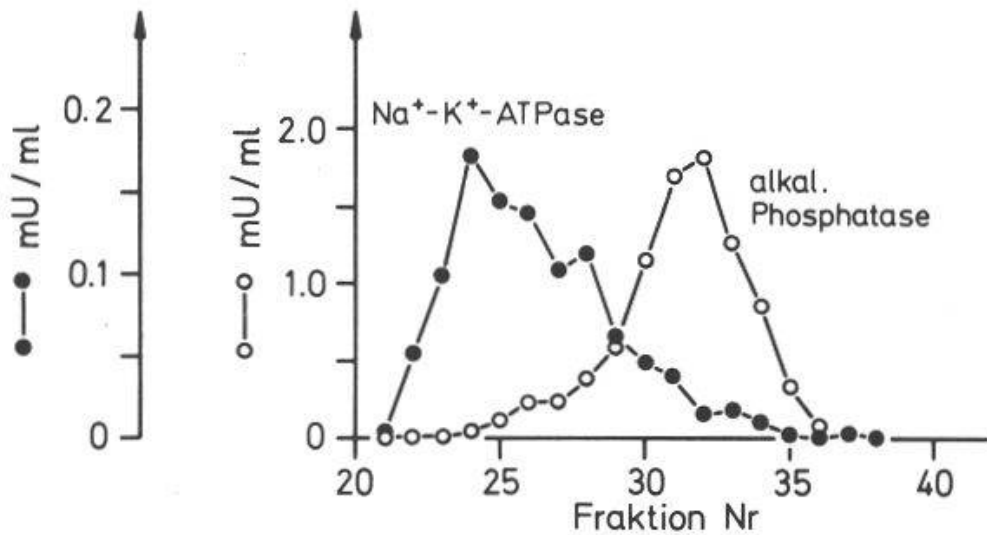
Transporteigenschaften der Plasmamembranen des proximalen Tubulus

a) Natrium

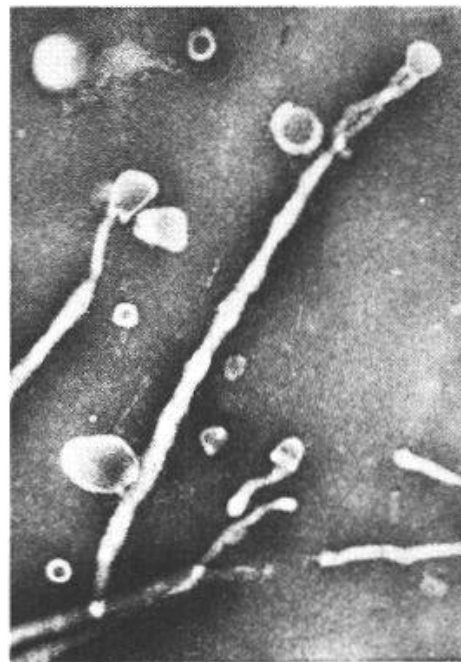
Eine der Hauptfunktionen des proximalen Tubulus ist die isotone Reabsorption von Natriumchlorid. Nach den Untersuchungen von FROEMTER et al. (11) werden bei der Ratte etwa 60 - 70 % des Natriums durch passive Triebkräfte wie elektrische Potentialdifferenz und durch Flusskopplung mit Wasser (solvent drag) zwischen den Zellen hindurch (parazellulär) und 30 - 40 % aktiv durch die Zellen hindurch (transzellulär) transportiert. An isolierten Plasmamembranen der Niere sind folgende Transportmechanismen für Natrium nachgewiesen worden. Im Bürstensaum wird Natrium durch einen Natrium/Protonen-Austauschmechanismus durch die Membran transportiert (27). Die Anwesenheit eines solchen Austauschmechanismus wird durch folgende in Abbildung 2 gezeigte Befunde belegt: Einmal wird die Aufnahme von Natrium in Bürstensaummembranbläschen durch einen Protonengradienten (Protonenkonzentration im Bläschen höher als im Inkubationsmedium) stimuliert, zum anderen stimuliert ein Natriumgradient den Austritt von Protonen* aus Bürstensaumbläschen. Im letzteren Fall konnte durch einen Kurzschluss der Membran mit Hilfe von Valinomycin und Kalium ausgeschlossen werden, dass die Bewegung der beiden Kationen indirekt, d.h. über das Membranpotential, miteinander gekoppelt ist. Man kann daher annehmen, dass Natrium- und Protonenflüsse durch ein spezifisches Transportsystem miteinander gekoppelt sind. Dieser gekoppelte Na^+/H^+ -Austausch stellt wahrscheinlich den hauptsächlichen Eintrittsmechanismus für Natrium in die Zelle dar; die weiter unten ausführlich beschriebenen Natrium-Kotransportsysteme tragen quantitativ nur in geringem Ausmass dazu bei. Eine unabhängige, durch begleitende Anionen elektrisch kompensierte Bewegung von Natrium scheint ebenfalls nur wenig am Natriumeintritt in die Zelle beteiligt zu sein (27).

In den Membranen des basalen Labyrinths fehlt das Natrium/Protonen-Austauschsystem; hier wird Natrium aktiv durch die Membran transportiert, wie aus der Anwesenheit der durch Natrium und Kalium stimulierbaren ATP-Phosphohydrolase (Na^+-K^+ -ATPase) in diesen Membranen zu schliessen ist (Abb. 1). Dieses Enzym ist asymmetrisch in der Zelle verteilt; es ist

*) Es kann experimentell nicht zwischen einem H^+ -Transport in die eine und einem OH^- -Transport in die andere Richtung unterschieden werden.



basal-laterale
Plasmamembranen



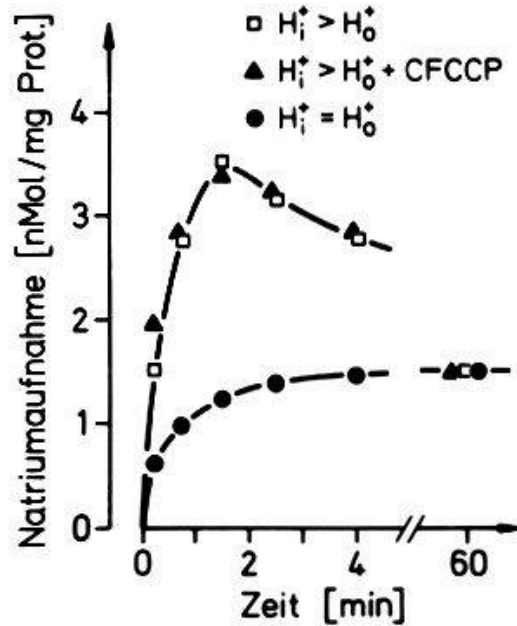
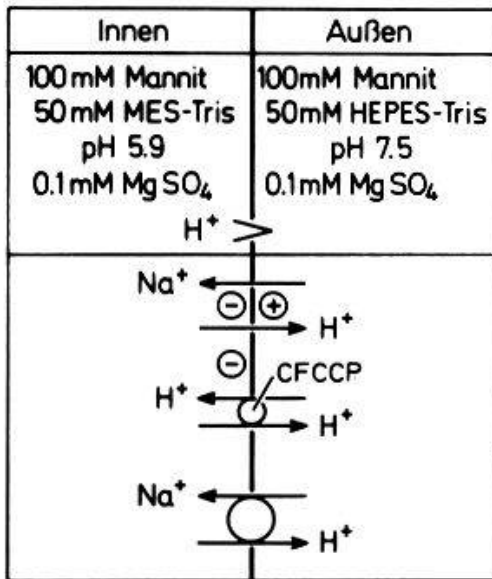
Bürstensaum-
membranen

Abb. 1. Leitenzyme und Morphologie als Kriterien bei der Trennung luminaler und kontraluminaler Plasmamembranabschnitte der Epithelzellen des proximalen Tubulus. Im oberen Teil der Abbildung ist die Verteilung des Leitenzyms für basal-laterale Plasmamembranen ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) und des Leitenzyms für Bürstensaummikrovilli (alkalische Phosphatase) nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Plasmamembrangemisches angegeben. Der untere Teil zeigt die Morphologie der isolierten basal-lateralen Plasmamembranen und Bürstensaummikrovilli im Verfahren der Negativkontrastierung.

nur in den Membranen des basalen Labyrinths in hohen Aktivitäten vorhanden (12, 28).

Für den transzellulären Natriumtransport ergibt sich damit folgendes Bild. Passiver Eintritt in die Zelle an der luminalen Zellseite durch das Na^+/H^+ -Austauschsystem, getrieben durch

Effekt von H^+/OH^- auf den Natriumtransport



Effekt von Natrium auf den H^+/OH^- Transport

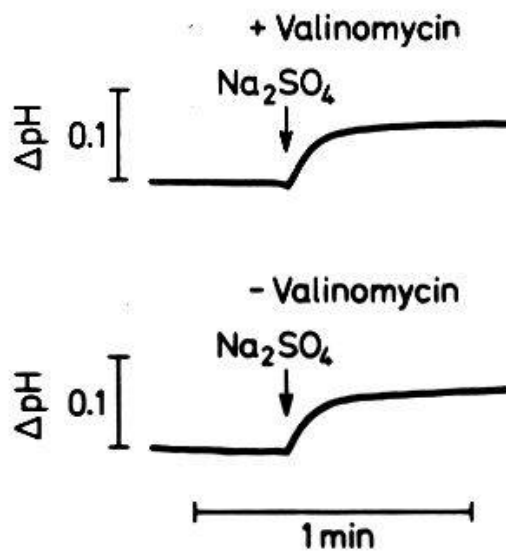
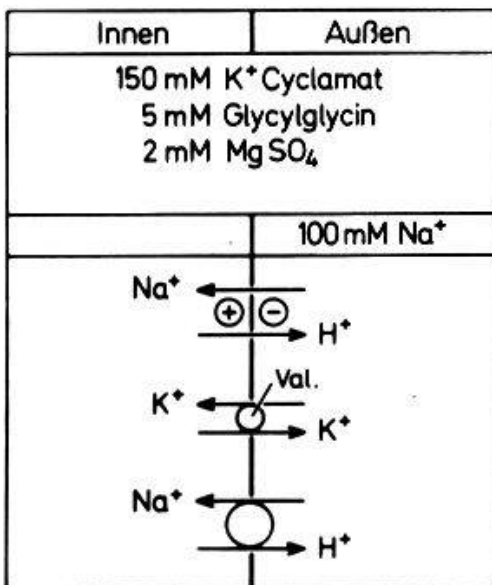


Abb. 2

die in ihrer genauen Grösse noch unbekannte Konzentrationsdifferenz für Natrium. An der kontraluminalen Zellseite erfolgt ein aktiver Transport von Natrium aus der Zelle heraus durch die $Na^+ - K^+$ -ATPase. Dieses Modell wird durch die Befunde über die Abhängigkeit der isotonen Flüssigkeitsresorption (Na^+ -Resorption) von der Anwesenheit von Bikarbonat oder anderen lipophilen Puffern (39) (die als Protonendonatoren und als Puffer für die bei

dem $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -Austausch zurückbleibenden OH^- -Ionen fungieren) und durch die Befunde über die Hemmung des Natriumtransportes durch Ouabain, eines spezifischen Hemmstoffs der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, unterstützt (37). Die beobachtete Hemmung beträgt dabei in der Ratte, die sehr ouabain-unempfindlich ist, bei peritubulärer Perfusion etwa 50 % und beim Goldhamster unter gleichen Bedingungen etwa 80 % (37).

b) Bikarbonat-Puffer (H^+ , HCO_3^- , OH^-)

Auch der Bikarbonattransport im proximalen Tubulus ist, wie FROEMTER et al. (11) gezeigt haben, ein aktiver Prozess, der aber im Gegensatz zum Natriumtransport vollständig transzellulär verläuft. Der wesentliche Schritt in der aktiven Bikarbonatresorption ist wahrscheinlich die Sekretion von Protonen in das Tubuluslumen. Das kann aus intratubulären pH-Messungen und Untersuchungen mit lipophilen Puffern (40) geschlossen werden. In isolierten Membranen sind bisher zwei Mechanismen nachgewiesen worden, die in eine aktive Protonensekretion eingeschaltet sein könnten: der oben beschriebene Natrium/Protonen-Austauschmechanismus und eine durch Bikarbonat stimulierbare ATPase. Einige Eigenschaften der ATPase sind in Abbildung 3 zusammengestellt. Das Enzym ist nur in den isolierten Bürstensaummembranen und nicht in den Membranen des basalen Labyrinths nachweisbar (22). In den Bürstensaummembranen wird die basale Mg^{++} -ATPase-Aktivität in der Anwesenheit von 25 mM Bikarbonat um etwa 50 % erhöht; eine noch stärkere Aktivierung erhält man mit

Abb. 2. Kopplung zwischen Natrium- und Protonenfluss in der Bürstensaummembran. Im oberen Teil der Abbildung ist der Einfluss eines Protonengradienten auf die Natriumaufnahme in Bürstensaummembranbläschen dargestellt; ausserdem ist eine schematische Darstellung der Versuchsbedingungen gegeben. Die Aufnahme von Natrium wurde in der Abwesenheit eines Protonengradienten ($\text{H}^+_i = \text{H}^+_o$, Bläscheninneres pH 7,5, Inkubationsmedium pH 7,5) und in Anwesenheit eines Protonengradienten ($\text{H}^+_i > \text{H}^+_o$, Bläscheninneres pH 5,9, Inkubationsmedium pH 7,5) gemessen. Durch Verwendung des Entkopplers Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (CFCCP) wird bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Protonengradienten ein Diffusionspotential erzeugt, das das Innere des Membranbläschens negativ auflädt. Da die Natriumaufnahme durch die Zugabe von CFCCP nicht beeinflusst wird ($\text{H}^+_i > \text{H}^+_o + \text{CFCCP}$), kann eine Kopplung des Natrium- und Protonenflusses durch das Membranpotential ausgeschlossen werden.

Im unteren Teil der Abbildung ist der Einfluss eines Natriumgradienten auf den Protonenfluss dargestellt. Der pH-Wert einer Bürstensaummembransuspension wurde unter Rühren kontinuierlich bei 25°C registriert. Bei Zugabe von 50 mM Na_2SO_4 zur Suspension erfolgt eine Ansäuerung des Inkubationsmediums. Diese Ansäuerung wird auch noch nach Zugabe von Valinomycin (Val.) beobachtet, welches in der Anwesenheit gleicher Kaliumkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran die Entstehung eines Na_2SO_4 Diffusionspotentials verhindert (siehe Schema). Auch aus diesem Versuch kann eine elektrische Kopplung von Na^+ und H^+ ausgeschlossen werden. Weitere Einzelheiten können der Veröffentlichung von Murer et al. (27) entnommen werden.

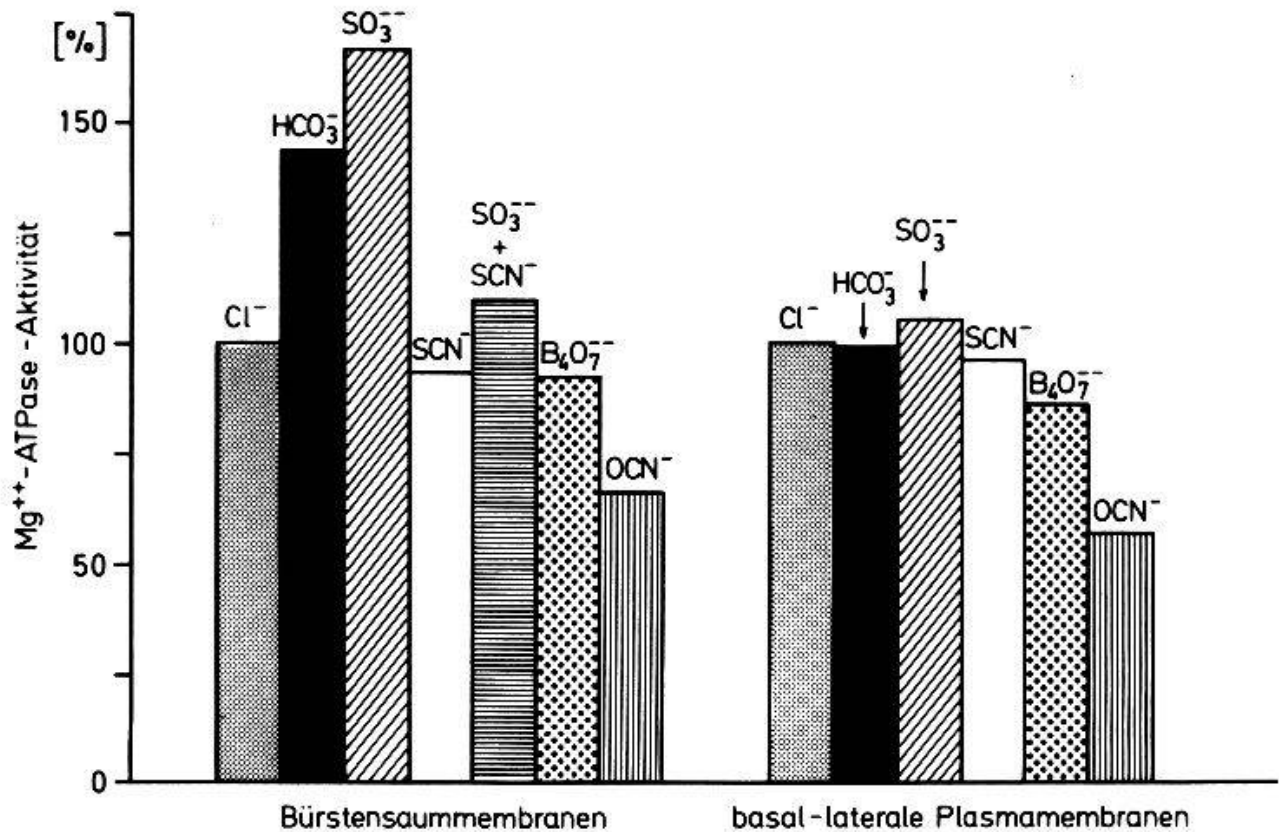


Abb. 3. Einfluss von Anionen auf die Aktivität der Mg⁺⁺-ATPase in isolierten Bürstensaummikrovilli und isolierten basal-lateralen Plasmamembranen. Die Aktivitäten sind als % der Aktivität in Anwesenheit von 25 mM NaCl aufgetragen. Von allen Anionen wurden 25 mM des Natriumsalzes verwendet. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte wie von Kinne-Saffran und Kinne beschrieben (22). Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen. (E. Kinne-Saffran und R. Kinne, nicht publizierte Befunde).

einem anderen Anion, dem Sulfit. Thiocyanat, das die Bikarbonat-ATPase aus anderen Geweben wie der Magenschleimhaut hemmt, inhibiert auch die durch Sulfit hervorgerufene Stimulierung der Mg⁺⁺-ATPase. Borat hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, während Cyanat die Basisaktivität in der Anwesenheit von Magnesium hemmt. Die Stimulierung durch Bikarbonat erreicht ein Maximum bei etwa 50 mM; halbmaximale Stimulierung wird bei etwa 16 mM beobachtet (22). Interessanterweise scheint die Aktivität der Bikarbonat-ATPase nicht an die Anwesenheit von Natrium gebunden zu sein. Wie Tabelle 1 zeigt, ist die Stimulierung durch Natriumbikarbonat, Kaliumbikarbonat und Cholinbikarbonat gleich gross.

An der isolierten Bürstensaummembran kann also ein natriumabhängiger und ein natriumunabhängiger Mechanismus des Protonentransports nachgewiesen werden. Dabei ist es nicht klar, ob die beiden Mechanismen nur ein System darstellen, das unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in vitro unterschiedliche Eigenschaften zeigt. Auch im intakten Tubulus

Tabelle 1. Kationenspezifität der HCO_3^- -ATPase in Bürstensaummembranen der Rattenniere.

	15 mM	25 mM	30 mM	100 mM
NaHCO_3	119 ± 3 (3)	123 (1)	130 ± 3 (3)	119 (2)
KHCO_3	n.b.	123 (1)	n.b.	119 (2)
Cholin HCO_3	117 ± 2 (3)	n.b.	127 ± 3 (3)	n.b.

Die Werte sind in % der Aktivität in der Abwesenheit von Bikarbonat angegeben, dabei wurde Bikarbonat durch Chlorid ersetzt. Die eingeklammerten Zahlen geben die Zahl der Versuche an, in jedem Versuch wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. n.b. bedeutet "nicht bestimmt". (E. Kinne-Saffran und R. Kinne, nicht publizierte Befunde).

sind Protonentransport und Natriumtransport nicht starr miteinander gekoppelt. So ist zwar der H^+ -Transport natriumabhängig (40), jedoch wird er nicht wie andere Natrium-Kotransportsysteme für Glukose, Aminosäuren und Phosphat durch Ouabain beeinträchtigt (37). Eine mögliche, jedoch noch sehr spekulative Erklärung (37) für diese Befunde wäre, dass unter Normalbedingungen (d.h. in Anwesenheit des Natriumgradienten über die Bürstensaummembran) das Protonentransportsystem mehr Protonen transportiert als Natriumionen. Das würde die in elektrophysiologischen Untersuchungen beobachtete Elektrogenität des Protonentransports erklären (10). Die Triebkraft für den Transport wäre sowohl der Natriumgradient als auch ATP. Nach Gabe von Ouabain steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration, und der Gradient für Natrium über die Bürstensaummembran wird ausgeglichen. Unter diesen Bedingungen würde die Energie für den Transport ausschliesslich von ATP geliefert werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Arbeitshypothese zu bestätigen. Die basal-lateralen Plasmamembranen besitzen nach elektrophysiologischen Untersuchungen eine hohe Permeabilität für Bikarbonat und andere Anionen. Als Durchtrittsmechanismen werden dabei entweder verschiedene Anionentransportsysteme oder ein Transportsystem für Hydroxylionen angenommen, das den Durchtritt der Anionen als undissoziierte Säure und OH^- beschleunigen könnte. Diese Systeme werden durch Diamox gehemmt (38).

c) Calcium

Ueber die Transporteigenschaften der Membranen des proximalen Tubulus für Calcium ist noch wenig Sicheres bekannt. Das einzige bisher biochemisch näher charakterisierte System ist eine durch Calcium stimulierbare ATPase, die nur in den Membranen des basalen Laby-

rinths nachweisbar ist (21). Ihre Rolle im transepithelialen Calciumtransport ist jedoch noch ungeklärt. Ebenso ist auch noch unbekannt, wie Natrium den Calciumtransport stimuliert (43). Eine Hypothese, die die Natriumabhängigkeit des transepithelialen Calciumtransports zu erklären versucht (43), beinhaltet die Annahme, dass an der basalen Zellseite ein $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ -Austauschmechanismus lokalisiert ist. In den isolierten Plasmamembranen ist ein solches System noch nicht systematisch untersucht worden. Für eine eventuelle Beziehung zwischen Calcium-ATPase, die nicht durch Natrium beeinflusst wird, und dem $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ -Austauschsystem käme wahrscheinlich eine ähnliche, gleitende Kopplung in Frage, wie sie für das Protonensystem diskutiert wurde.

In diesem Zusammenhang sollte auch das renale calciumbindende Protein erwähnt werden. Es kommt hauptsächlich in der Nierenrinde vor, und seine Konzentration wird durch Vitamin D reguliert (13). Ueber die Rolle des Proteins im transmembranalen und transepithelialen Calciumtransport des proximalen Tubulus können noch keine sicheren Angaben gemacht werden, da Untersuchungen über den Einfluss von Vitamin D auf den Calciumtransport in isolierten Tubulismembranen fehlen.

d) Phosphat

Phosphat wird im proximalen Tubulus natriumabhängig gegen eine elektrochemische Potentialdifferenz, d.h. aktiv aus dem Tubuluslumen resorbiert. Ueber die Transporteigenschaften der beiden Tubulismembranen für Phosphat liegen folgende Befunde vor (15). Die Bürstensaummembran besitzt, wie in Abbildung 4 gezeigt, ein Transportsystem für Phosphat, das durch Arsenat hemmbar ist und das durch die Anwesenheit eines Natriumgradienten über die Bürstensaummembran stimuliert wird. Natriumstimulierbarkeit und Arsenatempfindlichkeit sind neben dem Nachweis einer Sättigbarkeit des Transportsystems eindeutige Hinweise für ein spezifisches Transportsystem. Dieses natriumabhängige Transportsystem scheint in den Membranen des basalen Labyrinths zu fehlen (15).

In Abbildung 5 ist der Einfluss von Natrium auf die Phosphataufnahme in isolierte Bürstensaummembranbläschen näher untersucht. Dabei wird deutlich, dass bei identischer Natriumkonzentration innerhalb und ausserhalb des Bläschens (Nichtgradientenbedingung) die initiale Aufnahme von Phosphat um etwa den Faktor 2 gegenüber der Aufnahme im Kaliummedium stimuliert wird, während unter Gradientenbedingungen (Konzentration ausserhalb des Bläschens höher als im Bläschen) die initiale Aufnahme etwa um den Faktor 4 gesteigert wird und Phosphat vorübergehend in den Bürstensaumbläschen akkumuliert wird. Sowohl die Steigerung der Phosphataufnahme unter Nichtgradientenbedingung als auch die Akkumula-

Phosphataufnahme in isolierte Plasmamembranvesikel

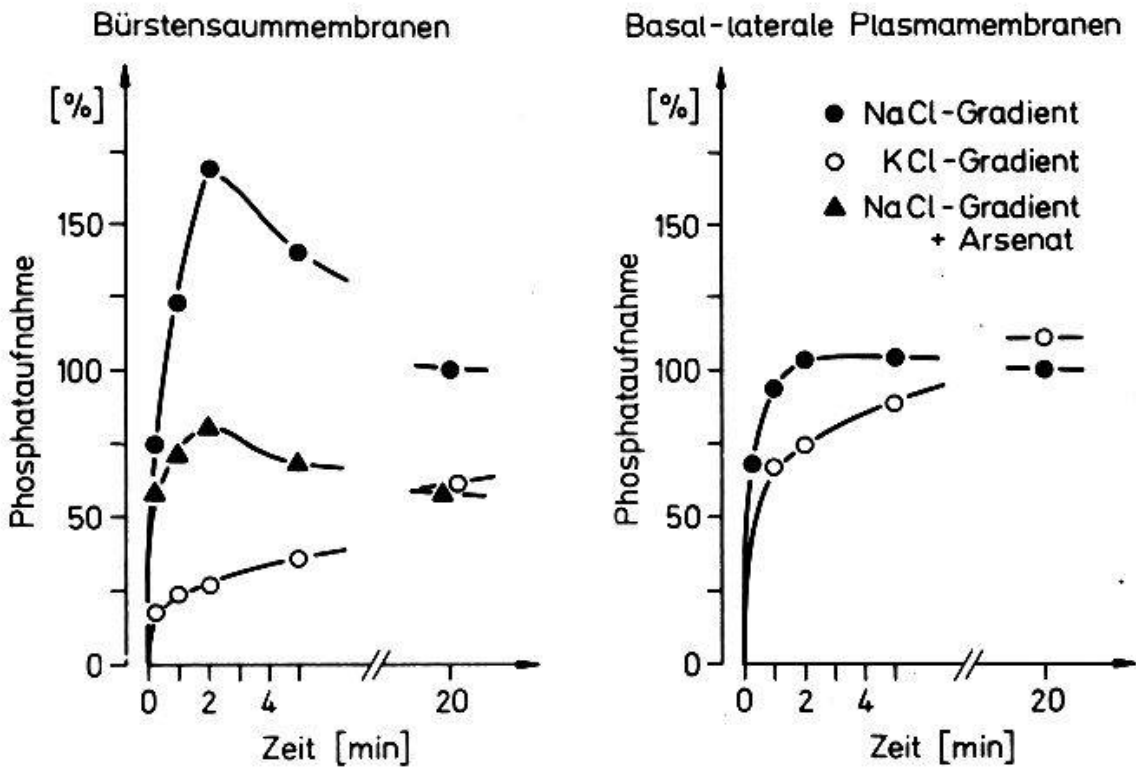


Abb. 4. Aufnahme von Phosphat in Bürstensaummembranbläschen und basal-laterale Plasmamembranbläschen. Die Membranen wurden mit Hilfe der vertikalen Ablenkungselektrophorese aus der Rattennierenrinde isoliert. Die Membranbläschen enthielten 100 mMol/l Mannit und 20 mMol/l Tris¹-HEPES²-Puffer, pH 7,4, und wurden in einem Medium inkubiert, das zusätzlich 1 mMol/l Phosphat (³²P markiert) und 100 mMol/l NaCl (●-●) oder 100 mMol/l KCl (○-○) enthielt. Ausserdem wurde einigen Ansätzen Arsenat in einer Konzentration von 5 mMol/l hinzugefügt (▲-▲). Die Phosphataufnahme ist in Prozent der nach 20 Minuten in der Anwesenheit von Natrium in den Bläschen vorhandenen Phosphatmenge ausgedrückt. Nach Hoffmann et. a. (15).

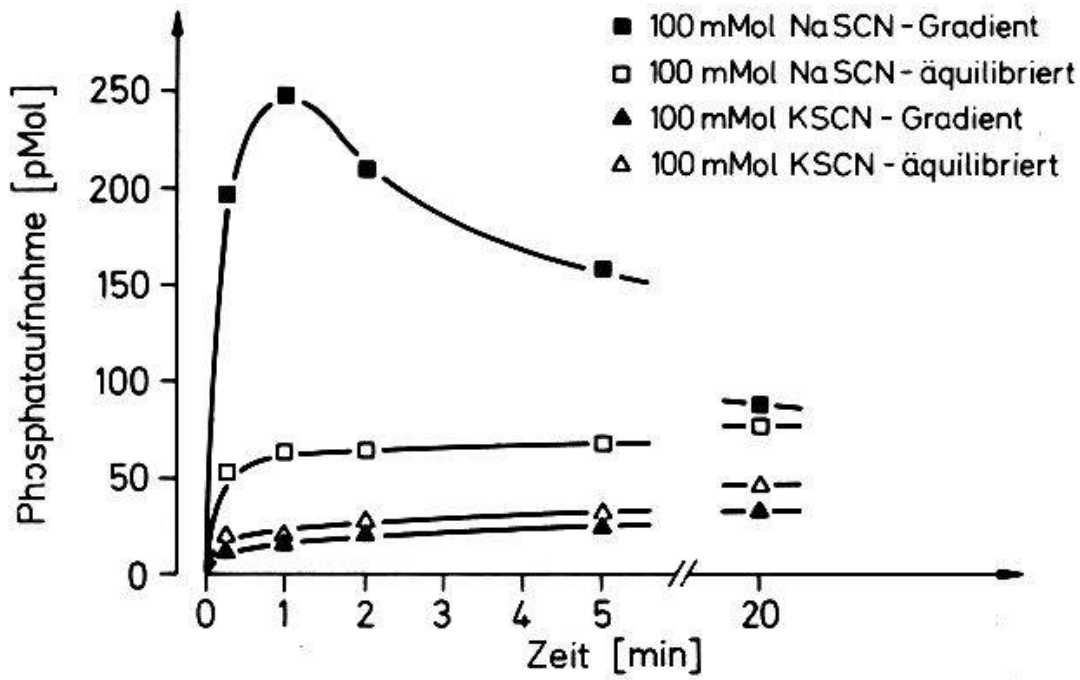
¹ Tris = Trishydroxymethylaminomethan

² HEPES = N-2-hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure

tion in Anwesenheit eines Natriumgradienten weisen darauf hin, dass in der Bürstensaummembran ein Phosphat-Natrium-Kotransportsystem vorhanden ist, das durch Flusskopplung die Energie des Natriumgradienten für die intravesikuläre Akkumulation von Phosphat benutzt. Einen weiteren Hinweis für das Vorhandensein eines Phosphat-Natrium-Kotransportsystems geben die ebenfalls in Abbildung 5 dargestellten Befunde, wonach der Natriumfluss durch die Bürstensaummembran in der Anwesenheit eines Phosphatgradienten beschleunigt wird und eine vorübergehende Akkumulation von Natrium in den Membranbläschen erfolgt.

In weitergehenden Untersuchungen konnte ausserdem gezeigt werden, dass der Transport von Phosphat und Natrium durch die Membran elektroneutral erfolgt, d.h. dass durch das Trans-

Effekt von Natrium auf den Phosphattransport



Effekt von Phosphat auf den Natriumtransport

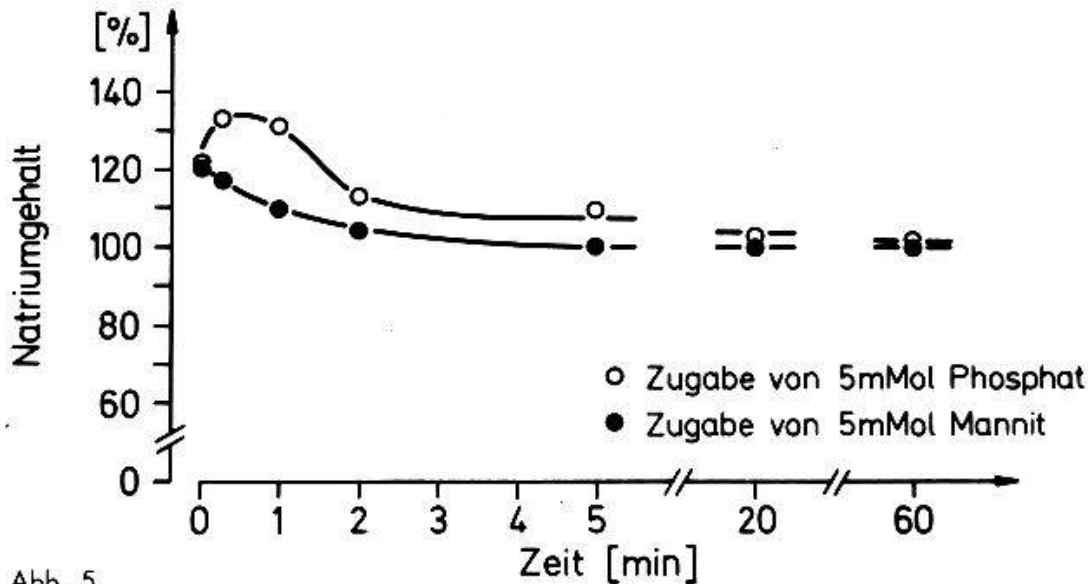


Abb. 5

portsystem eine der Ladung des Anions Phosphat entsprechende Zahl von Natriumionen gleichzeitig transportiert wird. Aus der Abhängigkeit des Phosphattransports von der Natriumkonzentration und der Wasserstoffionenkonzentration wurde geschlossen, dass das sekundäre (zweiwertige) Phosphat zusammen mit zwei Natriumionen die Membran passiert (15). Aus den oben geschilderten Befunden kann folgender Mechanismus für den transepithelialen

Transport von Phosphat im proximalen Tubulus postuliert werden. An der luminalen Zellseite wird Phosphat zusammen mit Natrium durch das Natrium/Phosphat-Kotransportsystem in die Zelle aufgenommen. Der über die Bürstensaummembran vorhandene Konzentrationsgradient für Natrium wirkt dabei als treibende Kraft für eine intrazelluläre Akkumulation von Phosphat. An der kontraluminalen Zellseite verlässt Phosphat die Zelle über natriumunabhängige Transportsysteme; die Triebkräfte für den Zellaustritt sind die Konzentrationsdifferenz von Phosphat zwischen der Zelle und dem Interstitium und die elektrische Potentialdifferenz. Die Polung des elektrischen Feldes (Zellinneres negativ gegenüber dem Interstitium) fördert dabei den Austritt von Phosphat aus der Zelle. Eine schematische Zusammenfassung dieser Vorstellungen ist in Abbildung 6 gegeben. Eine wesentliche Stütze für alle diese Annahmen sind die kürzlich erhobenen Befunde, dass die Phosphatresorption im proximalen Tubulus vollständig natriumabhängig ist (1). Auch weisen Versuche zur hormonellen Regulation der Phosphatresorption durch Parathyreoïdhormon darauf hin (8), dass der natriumabhängige Transport von Phosphat durch die Bürstensaummembran den wesentlichen Schritt für den aktiven transepithelialen Transport von Phosphat darstellt.

e) D-Glukose und Phenylalanin

Zucker und neutrale Aminosäuren werden im proximalen Tubulus aktiv und natriumabhängig resorbiert (41, 42). Der Transport von Glukose und Phenylalanin durch Bürstensaummembranen und durch Membranen des basalen Labyrinths ist in Abbildung 7 miteinander verglichen. In der Bürstensaummembran können für Glukose und Phenylalanin stereospezifische Transportsysteme nachgewiesen werden. Diese Transportsysteme sind durch Natrium stimulierbar. Ausserdem wird in der Anwesenheit eines Natriumgradienten eine vorübergehende Akkumu-

Abb. 5. Kopplung zwischen Phosphat- und Natriumfluss in der Bürstensaummembran. Im oberen Teil der Abbildung ist der Einfluss von Natrium auf die Phosphataufnahme in isolierte Bürstensaummembranvesikel dargestellt. Die Phosphataufnahme wurde in folgenden Inkubationsmedien gemessen: 1 mMol/l Phosphat (^{32}P -markiert), 100 mMol/l Mannit, 20 mMol/l Tris-HEPES pH 7,4 und 100 mMol/l des auf der Abbildung angegebenen Salzes. In einigen Ansätzen wurde der Salzgradient über die Membran durch Vorinkubation in natrium- bzw. kaliumhaltigen Medien ausgeglichen. Im unteren Teil der Abbildung ist der Einfluss von Phosphat auf die Bewegung von Natrium durch die Bürstensaummembran dargestellt. Bürstensaummembranbläschen wurden bei 25°C 1 Stunde lang in einem Medium folgender Zusammensetzung inkubiert: 100 mMol/l Mannit, 5 mMol/l Tris-HEPES pH 7,4, 95 mMol/l KSCN, 5 mMol/l $^{22}\text{NaSCN}$. Zum Zeitpunkt null der Abbildung wurden dann zu 150 μl dieser Suspension 30 μl einer Lösung, die 5 mMol/l Tris-HEPES, 95 mMol/l KSCN und 5 mMol/l anorganisches Phosphat oder 5 mMol/l Mannit enthielt, gegeben. Die Messwerte sind in % des nach 60 Minuten erreichten neuen Gleichgewichts angegeben. Nach Hoffmann et al. (15).

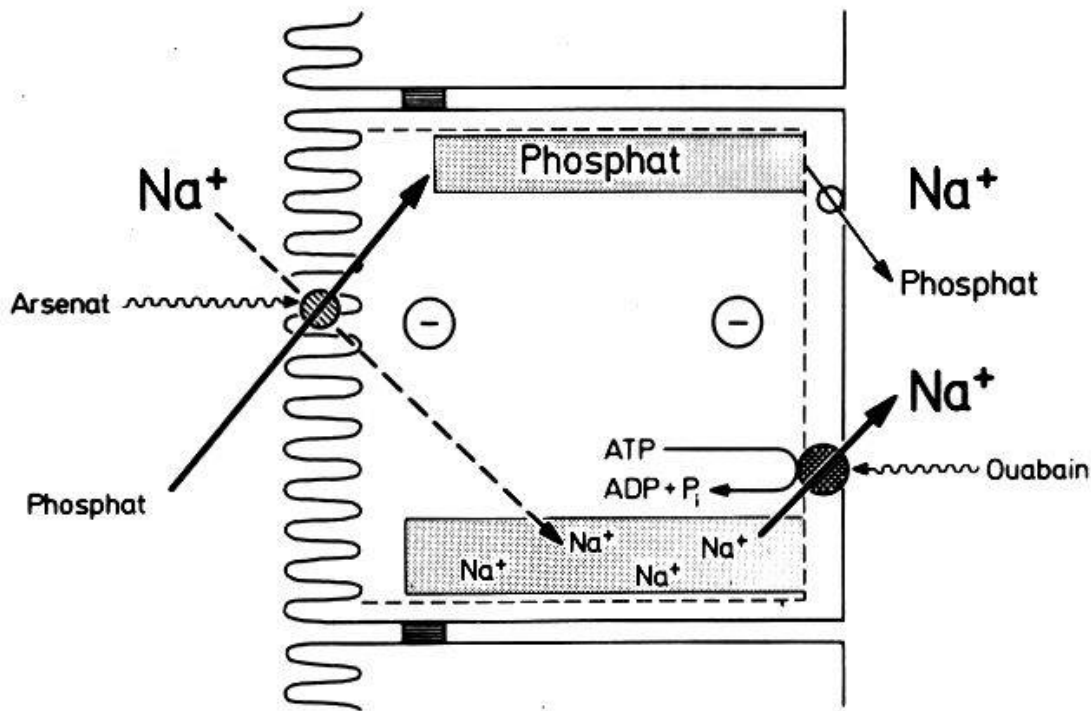


Abb. 6. Schematische Darstellung der Transportsysteme und der Triebkräfte für die Resorption von Phosphat im proximalen Tubulus. Phosphat wird durch einen elektroneutralen Transportmechanismus (Natrium-Phosphat-Kotransport) gemeinsam mit Natrium an der luminalen Seite in die Zelle aufgenommen; dabei kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation, die durch die Konzentrationsdifferenz von Natrium über die Bürstensaummembran aufrechterhalten wird. Der Austritt von Phosphat an der kontraluminalen Zellseite folgt der elektrochemischen Potentialdifferenz und wird durch ein natriumunabhängiges Transportsystem vermittelt. Die niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration wird durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten, die in den basal-lateralen Plasmamembranen vorkommt. Die Hemmung des Phosphattransports durch Arsenat und bei Erniedrigung der intratubulären Natriumkonzentration betrifft das luminale Natrium-Phosphat-Kotransportsystem. Die Hemmung des Phosphattransports durch Ouabain beruht auf einem durch die Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ bedingten Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration; dadurch wird die Triebkraft für die Aufnahme von Phosphat in die Zelle vermindert.

lation des Zuckers und der Aminosäure in den Bläschen beobachtet. Das Zuckertransportsystem im Bürstensaum ist durch Phlorrhizin hemmbar. In den basal-lateralen Plasmamembranen wird nur eine geringfügige Stimulierung des Transports von D-Glukose und L-Phenylalanin durch Natrium beobachtet, die wahrscheinlich auf eine geringgradige Verunreinigung der Membranfraktion mit Bürstensaummembranen zurückzuführen ist. Alle diese Befunde weisen darauf hin, dass die spezifischen natriumabhängigen Transportsysteme für Zucker und neutrale Aminosäuren an die Bürstensaummembran gebunden sind.

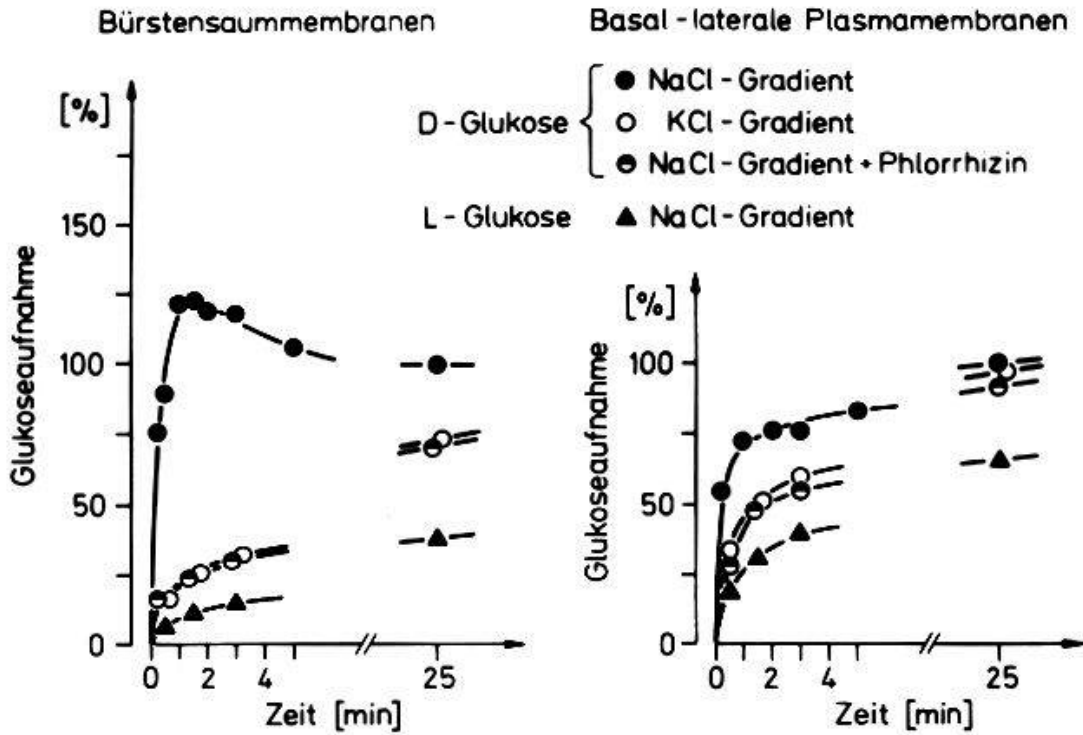
Die Aufnahme von D-Glukose in Bläschen aus basal-lateralen Plasmamembranen wird durch Phloretin stärker gehemmt als die Aufnahme in Bürstensaummembranbläschen (19). Ausserdem unterscheiden sich beide Aufnahmesysteme in ihrer Substratspezifität, so dass gefolgert wer-

den kann, dass basal-laterale Plasmamembranen ebenfalls spezifische aber natriumunabhängige Transportsysteme für Zucker (und auch für neutrale Aminosäuren) besitzen. Die Anwesenheit solcher Systeme ist schon aus in vivo Versuchen postuliert worden (2, 9, 23, 30, 32, 33).

Für die natriumabhängigen D-Glukose- und L-Phenylalanin-Transportsysteme im Bürstensaum lassen sich ähnliche Kopplungen zwischen Natrium und Substratflüssen nachweisen wie für das Phosphattransportsystem (7); sie können daher ebenfalls als Natrium-Kotransportsysteme bezeichnet werden. Im Gegensatz zum Phosphat ist der Kotransport von Natrium und D-Glukose bzw. L-Phenylalanin nicht elektroneutral, sondern abhängig vom Membranpotential. Solch eine "Elektrogenität" des Transports ist für D-Glukose in Abbildung 8 dargestellt. In diesen Versuchen wurde das elektrische Potential über die Bürstensaummembran durch Ionophoren in der Anwesenheit von Ionengradienten modifiziert. So wurde einmal in der Anwesenheit eines Protonengradienten (Protonenkonzentration im Bläschen höher als im Inkubationsmedium) die Protonenleitfähigkeit der Membran durch einen Entkoppler erhöht (27) und zum anderen in der Anwesenheit eines Kaliumgradienten die Kaliumleitfähigkeit der Membran durch Valinomycin erhöht (18). In beiden Fällen resultiert in der Anwesenheit des Ionophoren eine Hyperpolarisierung des Bläscheninneren, und es wird eine Steigerung der Initialgeschwindigkeit der Aufnahme und eine hohe intravesikuläre Akkumulation beobachtet. Das bedeutet, dass die Ladung des mit dem elektroneutralen Zucker- bzw. Aminosäuremolekül gemeinsam transportierten Natriums weder durch eine gleichgerichtete Bewegung eines Anions noch durch eine entgegengesetzte Bewegung eines Kations durch das Transportsystem elektrisch kompensiert wird.

Aus dem Vorkommen natriumabhängiger, elektrogener Transportsysteme in der Bürstensaummembran, die in der Anwesenheit eines Na^+ -Gradienten zu einer intravesikulären Akkumulation von Zuckern und Aminosäuren befähigt sind, und aus dem Fehlen dieser Transportsysteme in der basal-lateralen Plasmamembran kann man folgenden zellulären Mechanismus der Glukose- und Aminosäureresorption im proximalen Tubulus postulieren. Aehnlich wie in Abbildung 6 für Phosphat dargestellt, ist der Eintritt von Glukose und Aminosäuren an der luminalen Zellseite mit dem Eintritt von Natrium durch Natrium-Kotransportsysteme verknüpft; dabei kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Glukose und Aminosäuren. Die Triebkraft für die intrazelluläre Akkumulation wird dabei einmal von der Natriumkonzentrationsdifferenz über die Bürstensaummembran geliefert, zum anderen, da es sich um elektrogene Prozesse handelt, fördert die elektrische Potentialdifferenz den Eintritt in die Zelle. Letztere bildet wahrscheinlich in situ den Hauptanteil der treibenden Kraft, da im

Aufnahme von Glukose in isolierte Plasmamembranvesikel



Aufnahme von Phenylalanin in isolierte Plasmamembranvesikel

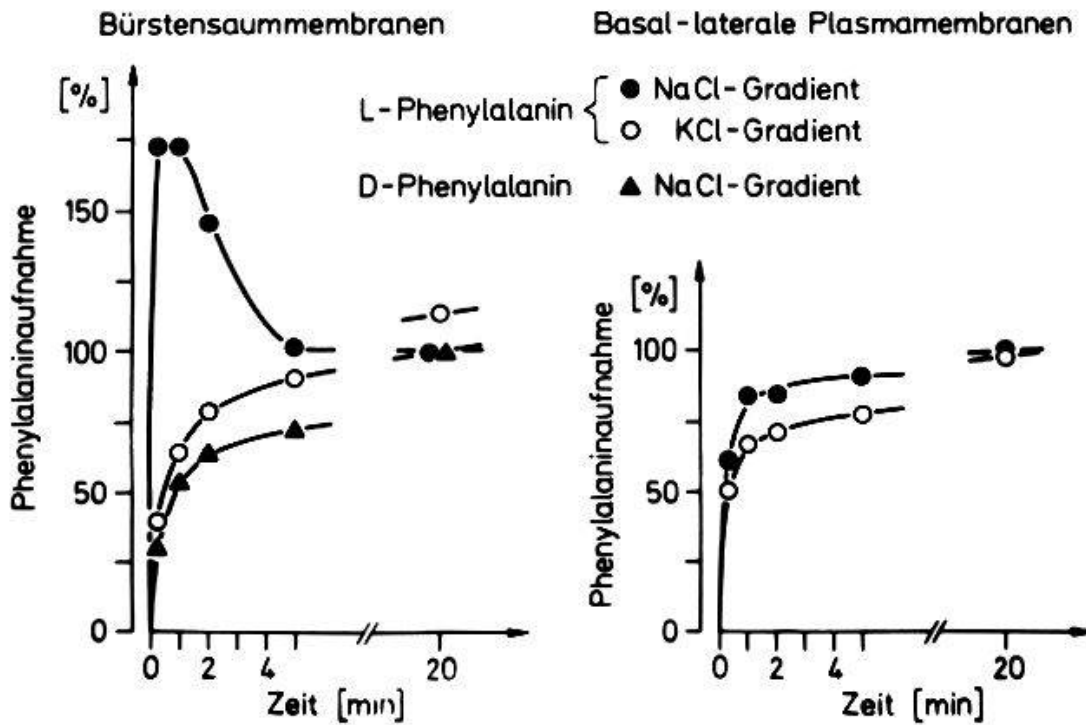


Abb. 7

proximalen Tubulus auch bei Umkehr des Natriumgradienten über die Bürstensaummembran noch 50 % der maximalen L-Phenylalaninresorption gemessen werden können (42). Der Transport wird also unter diesen Bedingungen nur von der elektrischen Potentialdifferenz aufrechterhalten.

f) Schwache organische Säuren

Die Niere sezerniert im proximalen Tubulus eine grosse Anzahl organischer Säuren, unter ihnen die als Modellsubstanz für Untersuchungen der Sekretion benutzte p-Aminohippursäure (PAH). Die Transporteigenschaften isolierter Plasmamembranvesikel für PAH sind kürzlich von BERNER und KINNE untersucht worden (3). Dabei konnte, wie in Abbildung 9 dargestellt, in den basal-lateralen Plasmamembranvesikeln ein durch Probenecid hemmbares Transportsystem für PAH nachgewiesen werden, das in den Bürstensaummembranen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist. Der PAH-Transport ist dabei nicht von der Anwesenheit von Natrium abhängig, wird aber durch die elektrische Potentialdifferenz über die Membran beeinflusst. Wird das Innere des Membranbläschens durch Diffusionspotentiale positiv gegenüber dem Aussenmedium aufgeladen, so wird die Aufnahme gesteigert; Umkehr des elektrischen Feldes reduziert die Aufnahme. PAH wird also wahrscheinlich als Anion durch die Membran transportiert. Die an isolierten Membranbläschen erhobenen Befunde stimmen, soweit es die Lokalisation des Transportsystems in der Zelle angeht, gut mit Transportmodellen überein, die aus Mikroperfusionsexperimenten abgeleitet wurden (36). Sie können aber bisher nichts über die für die aktive Sekretion und für die intrazelluläre Akkumulation benutzte Energie aussagen. Dazu sind weitere Untersuchungen insbesondere über die Wechselwirkung von Anionenflüssen und ATP mit dem Transportsystem erforderlich. Andere schwache organische Säuren wie Laktat und α -Ketoglutarat werden von der Niere als Stoffwechselfsubstrate aus dem Blut und aus dem Primärharn aufgenommen. Die Transport-

Abb. 7. Aufnahme von Glukose und Phenylalanin in Bürstensaummembranbläschen und basal-laterale Plasmamembranbläschen. Die Membranen wurden mit Hilfe der vertikalen Ablenkungselektrophorese aus der Rattennierenrinde isoliert. Im oberen Teil der Abbildung ist die Aufnahme von Glukose, im unteren Teil die Aufnahme von Phenylalanin dargestellt. Die Membranbläschen enthielten 100 mMol/l Mannit und Tris-HEPES-Puffer, pH 7,4, und wurden in einem Medium inkubiert, das zusätzlich 1 mMol/l radioaktivmarkierte D-Glukose, L-Glukose, L-Phenylalanin oder D-Phenylalanin und 100 mMol/l NaCl oder 100 mMol/l KCl enthielt. Einigen Ansätzen wurde Phlorrhizin in einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l hinzugefügt. Die Aufnahme ist in Prozent der nach 20 Minuten in der Anwesenheit von Natrium in den Bläschen vorhandenen Menge an D-Glukose bzw. L-Phenylalanin angegeben. Nach Kinne et al. (19) und Evers et al. (7).

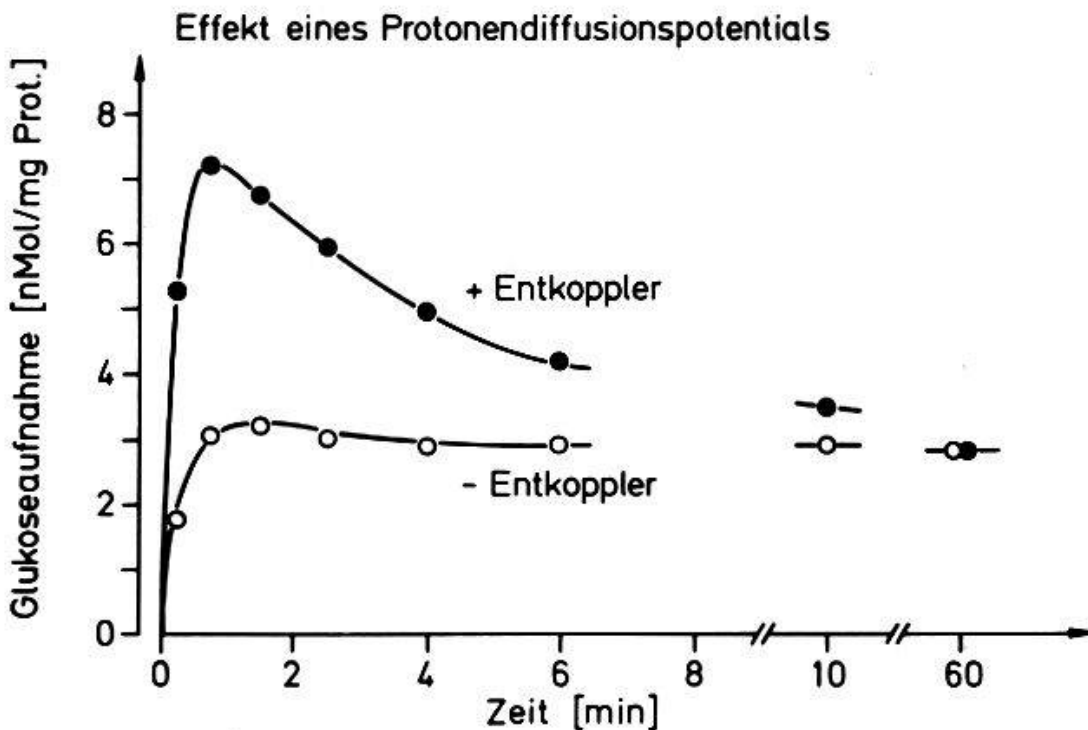
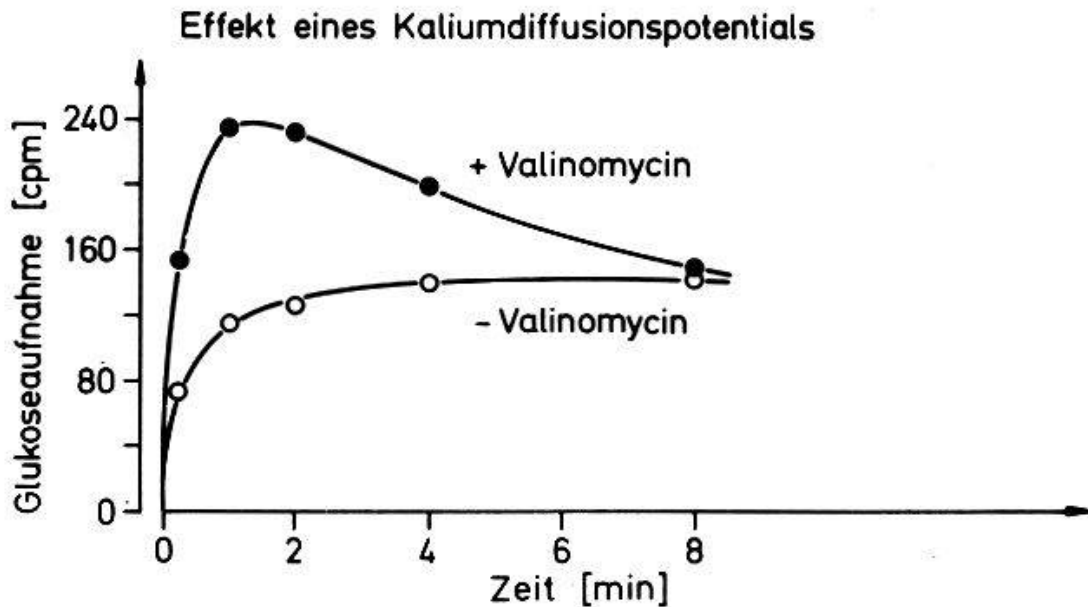


Abb. 8. Einfluss des Membranpotentials auf die Aufnahme von D-Glukose in isolierte Bürstensaummembranbläschen. Im oberen Teil der Abbildung wurde die elektrische Potentialdifferenz über die Membran in Anwesenheit eines Kaliumgradienten durch die Zugabe von Valinomycin verändert. Im unteren Teil der Abbildung wurde die elektrische Potentialdifferenz über die Membran in Anwesenheit eines Protonengradienten durch die Zugabe von CFCCP verändert. Nach Murer et al. (27) und Kinne (18).

eigenschaften der Membranen des proximalen Tubulus für Laktat sind in Abbildung 10 dargestellt (17). Die Laktataufnahme in die Bürstensaummembranen zeigt eine starke Natriumabhängigkeit, und es wird eine vorübergehende intravesikuläre Akkumulation beobachtet.

Aufnahme von p-Aminohippursäure in isolierte Plasmamembranvesikel
 Bürstensaummembranen Basal-laterale Plasmamembranen

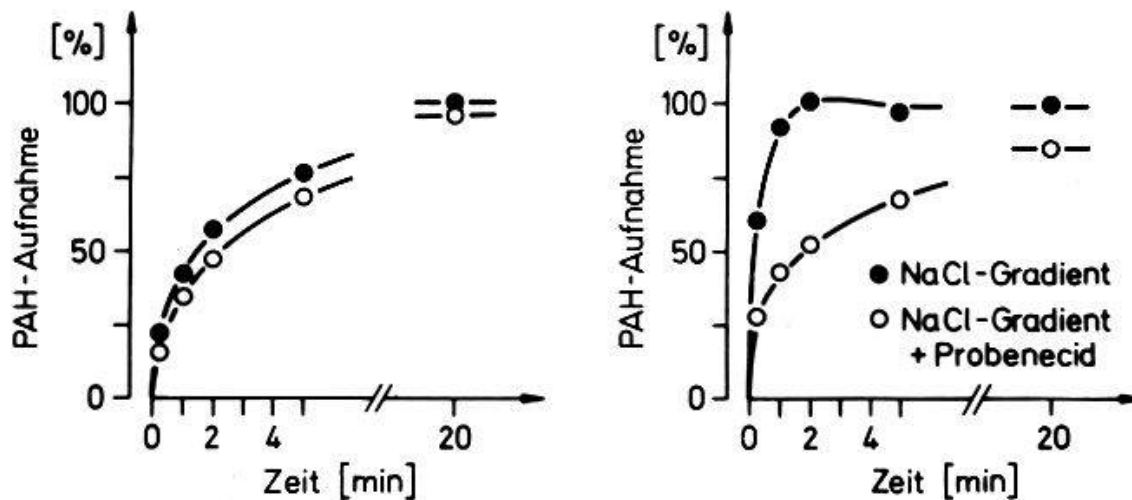


Abb. 9. Aufnahme von p-Aminohippursäure (PAH) in Bürstensaummembranbläschen und basal-laterale Plasmamembranbläschen. Die Membranen wurden mit Hilfe der vertikalen Ablenkungselektrophorese aus der Rattennierenrinde isoliert. Die Membranbläschen enthielten 100 mMol/l Mannit und 20 mMol/l Tris-HEPES-Puffer, pH 7,4, und wurden in einem Medium inkubiert, das zusätzlich $1 \cdot 10^{-5}$ Mol/l radioaktivmarkierte PAH und 100 mMol/l NaCl enthielt. Einigen Versuchsansätzen wurde ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) Probenecid hinzugefügt. Nach Berner und Kinne (3).

Die Laktataufnahme in Bläschen der basal-lateralen Plasmamembranen wird nur unwesentlich durch Natrium gesteigert. Der Mechanismus der Natriumstimulierung der Laktataufnahme in die Bürstensaummembranbläschen ist noch nicht aufgeklärt. Versuche, ein spezifisches Transportsystem durch Untersuchungen der Sättigbarkeit der Aufnahme nachzuweisen, schlugen bisher fehl. Auch in Mikropunktionsuntersuchungen konnte in dem gleichen Konzentrationsbereich keine Sättigung der Aufnahme aus dem Tubuluslumen beobachtet werden (14). Es wurde daher bisher eine Laktataufnahme - in Abwesenheit eines spezifischen Transportsystems - durch einfache Diffusion angenommen (17). Die in der Anwesenheit eines Natriumgradienten beobachtete Beschleunigung wurde mit dem Entstehen eines Diffusionspotentials (Innenseite des Vesikels positiv) erklärt. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen (R. Kinne, unveröffentlicht) zeigen jedoch, dass die Stimulierung der Laktataufnahme durch einen Natriumgradienten unabhängig von dem das Natrium begleitenden Gegenion ist und damit nicht unmittelbar von dem Membranpotential abhängig sein kann. Die dem Laktattransfer zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind daher noch nicht sicher anzugeben.

Überträgt man die Befunde über die Laktatpermeabilität der luminalen und kontraluminalen Membranen auf die Vorgänge im intakten Epithel, so ergeben sich interessante Schlussfolge-

Aufnahme von L-Laktat in isolierte Plasmamembranvesikel

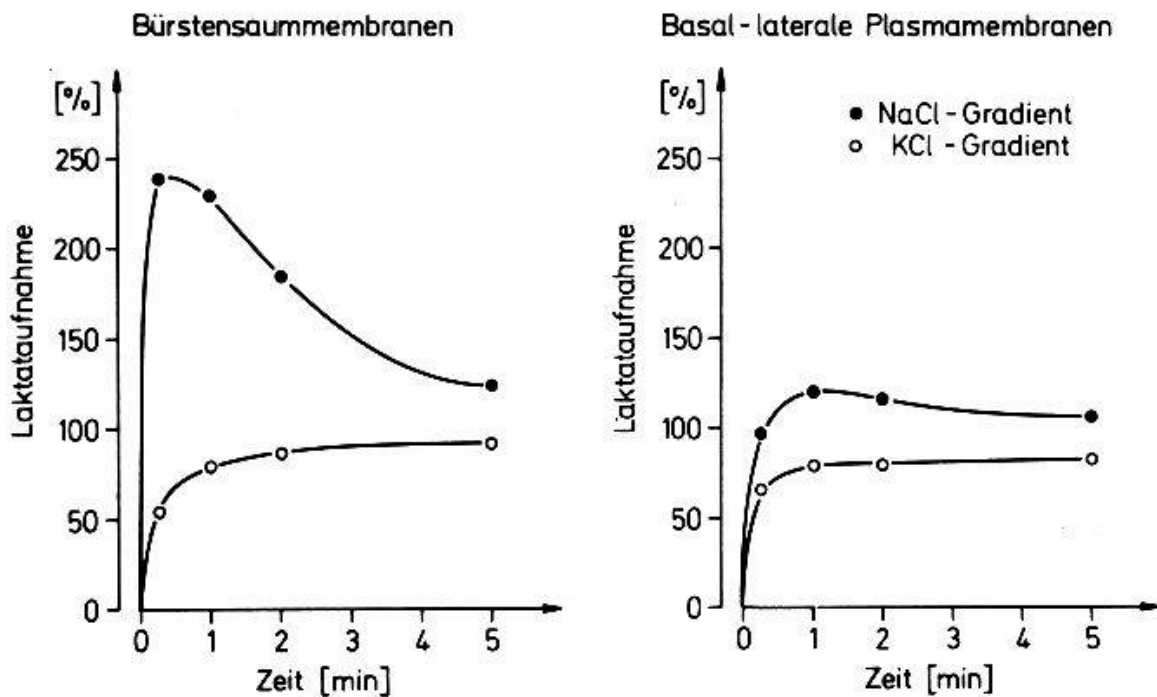


Abb. 10. Aufnahme von L-Laktat in Bürstensaumbläschen und basal-laterale Plasmamembranbläschen. Die Membranen wurden mit Hilfe der vertikalen Ablenkungselektrophorese aus der Rattennierenrinde isoliert. Die Membranbläschen enthielten 100 mMol/l Mannit und 20 mMol/l Tris-HEPES-Puffer, pH 7,4, und wurden in einem Medium inkubiert, das zusätzlich 1 mMol/l radioaktivmarkiertes L-Laktat und 100 mMol/l NaCl (●—●) oder 100 mMol/l KCl (○—○) enthielt. Nach Kinne (17).

rungen. Laktat als Substrat für die renale Glukoneogenese wird im Glomerulum frei filtriert. Es wird also den Zellen des proximalen Tubulus an der luminalen und an der kontraluminalen Seite in gleicher Konzentration angeboten. Die Aufnahme in die Zelle scheint aber hauptsächlich von der luminalen Zellseite zu erfolgen. Dadurch gleicht sich die Laktatkonzentration im Tubulus rasch an die sehr viel niedrigere intrazelluläre Laktatkonzentration an, und Laktat wird aus dem Primärharn zurückgewonnen, jedoch nicht durch aktiven transepithelialen Transport, sondern durch bevorzugte Aufnahme in die Zelle von der luminalen Seite und anschließende intrazelluläre Verstoffwechslung. Eine ähnliche Beziehung zwischen dem intrazellulären Stoffwechsel und der Resorption aus dem proximalen Tubulus ist kürzlich für Prolin postuliert worden (31). Sie muss wahrscheinlich ganz allgemein bei der Resorption verstoffwechselbarer Substanzen in Betracht gezogen werden (17).

g) Proteine

Für die Aufnahme von Proteinen in die Zellen des proximalen Tubulus und für ihre intrazelluläre Verarbeitung kann immer noch folgendes Schema als gültig angesehen werden (6, 24,

35, 35). Die Aufnahme der Proteine erfolgt an der Basis der Mikrovilli in Pinozytosevesikel, die dann mit primären Lysosomen zu sekundären Lysosomen fusionieren. In diesen erfolgt dann der Abbau der Proteine. Ein transtubulärer Transport von Proteinen ohne intrazellulären Abbau scheint nach neueren Untersuchungen – wenigstens für die benutzte Testsubstanz Trasylol – nicht stattzufinden. Ueber die Funktion der in die Pinozytose eingeschalteten Membranen ist noch relativ wenig bekannt, da eine Isolierung mit herkömmlichen Methoden nicht möglich war. Kürzlich ist es jedoch BODE et al. gelungen, unter Verwendung der trägerfreien Elektrophorese Mikrovilli, Pinozytosevesikel und Lysosomen aus der Rattennierenrinde zu isolieren und biochemisch zu charakterisieren (4, 5). Dabei zeigte sich, dass Mikrovilli und Pinozytosevesikel eine unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung besitzen. In den Pinozytosevesikeln überwiegen Glykoproteine und saure Phospholipide, die eine Rezeptorfunktion im Pinozytoseprozess haben könnten. Da ausserdem ein wesentlich schneller Einbau von Protein- und Lipidvorstufen in die Pinozytosevesikel beobachtet wurde, scheint während der Pinozytose eine Neusynthese von Membranmaterial stattzufinden, von der die Mikrovilli nicht betroffen sind. Pinozytosevesikel und sekundäre Lysosomen weisen, wie zu erwarten, mehr Aehnlichkeit in der biochemischen Zusammensetzung auf (4). Die Entstehung der sekundären Lysosomen durch Fusion von Pinozytosevesikeln und primären Lysosomen wird damit durch biochemische Befunde bestätigt.

Schlussbetrachtung

Die im vorliegenden diskutierten Methoden und Konzepte zur Aufklärung der Funktion der Plasmamembranen in der Niere haben schon Anwendung auf pathophysiologische Fragestellungen gefunden. So wurden zum Beispiel Bürstensaummembranen aus der menschlichen Niere isoliert (26) und ihre Antigenstruktur als Leitfaden für die Zuordnung der bei verschiedenen Krankheitsbildern vermehrt im Urin auftretenden Proteine benutzt. Die so gewonnenen Antigene erlangen mehr und mehr Bedeutung für toxikologische und klinisch-pharmakologische Untersuchungen (25). Die Erkenntnisse über die Polarität der Epithelzellen und die Energetik des transepithelialen Transports können ausserdem dazu beitragen, solide Arbeitshypothesen für pathologische und genetische Alterationen (30) der Nierentätigkeit zu entwickeln, die dann klinisch und physiologisch geprüft werden können.

Damit zeigt sich – wie auch auf anderen Gebieten der Wissenschaft –, dass die Grundlagenforschung einen wesentlichen Beitrag zur Erkennung und Behandlung von Störungen der Nierenfunktion liefern kann. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass Kliniker und Theoretiker den Willen – und auch die Möglichkeit – haben, Probleme und Ansichten miteinander zu diskutieren.

Danksagung

Bei der Durchführung der im vorangehenden Beitrag geschilderten Versuche und bei der Abfassung des Manuskripts war mir die Unterstützung und Geduld meiner Frau, Dr. E. KINNE-SAFFRAN, eine unentbehrliche Hilfe. Viele der in der Arbeit dargestellten Konzepte gehen auf fruchtbare Diskussionen mit Prof. Dr. K.J. ULLRICH zurück, dem ich ausserdem für seine ständige, interessierte Förderung meiner Arbeiten danke.

1. Baumann, K., de Rouffignac, C., Roinel, N., Rumrich, G., Ullrich, K.J.: Renal phosphate transport: Inhomogeneity of local proximal transport rates and sodium dependence. *Pflügers Arch.* 356, 287 - 297 (1975).
2. Bergeron, M., Vadeboncoeur, M.: Antiluminal transport of L-arginine and L-leucine following microinjections in peritubular capillaries of the rat. *Nephron* 8, 355 - 366 (1971).
3. Berner, W., Kinne, R.: Transport of p-aminohippuric acid by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Pflügers Arch.* 361, 269 - 277 (1976).
4. Bode, F., Baumann, K., Kinne, R.: Analysis of the pinocytotic process in rat kidney: II. Biochemical composition of pinocytotic vesicles compared to brush border microvilli, lysosomes and basolateral plasma membranes. *Biochim. biophys. Acta* 433, 294 - 310 (1976).
5. Bode, F., Pockrandt-Hemstedt, H., Baumann, K., Kinne, R.: Analysis of the pinocytotic process in rat kidney. I. Isolation of pinocytotic vesicles from rat kidney cortex. *J. Cell Biol.* 63, 998 - 1008 (1974).
6. De Duve, C., Wattiaux, R.: Function of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435 - 492 (1966).
7. Evers, J., Murer, H., Kinne, R.: Phenylalanine uptake in isolated renal brush border vesicles. *Biochim. biophys. Acta* 426, 598 - 615 (1976).
8. Evers, C., Murer, H., Kinne, R.: Effect of parathyroid hormone (PTH) on sodium stimulated phosphate transport in isolated renal brush border vesicles. *FEBS Symposium on Biochemistry of Membrane Transport. Zürich 1976, Abstract P239, p. 48.*
9. Foulkes, E.C., Gieske, T.: Specificity and metal sensitivity of renal amino acid transport. *Biochim. biophys. Acta* 318, 439 - 445 (1973).
10. Frömter, E.: Ion transport across renal proximal tubule: Analysis of luminal, contraluminal and paracellular transport steps. In: *Excretion, A. Wessing, Ed., pp. 248 - 260. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975.*
11. Frömter, E., Rumrich, G., Ullrich, K.J.: Phenomenologic description of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- absorption from proximal tubules of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 343, 189 - 220 (1973).
12. Heidrich, H.G., Kinne, R., Kinne-Saffran, E., Hannig, K.: The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney. Different surface charges for the brush-border microvilli and plasma membranes from basal infoldings. *J. Cell Bio.* 54, 232 - 245 (1972).
13. Hermsdorf, C.L., Bronner, F.: Vitamin D-dependent calcium-binding protein from rat kidney. *Biochim. biophys. Acta* 379, 553 - 561 (1975).
14. Höhmann, B., Frohnert, P.P., Kinne, R., Baumann, K.: Proximal tubular lactate transport in rat kidney: A micropuncture study. *Kidney Int.* 5, 261 - 270 (1974).
15. Hoffmann, N., Thees, M., Kinne, R.: Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles. *Pflügers Arch.* 362, 147 - 156 (1976).
16. Kephallides, N.A.: Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int. Rev. of Connect. Tiss. Res.* 6, 63 - 104 (1973).

17. Kinne, R.: Polarity of the renal proximal tubular cell. Function and enzyme pattern of the isolated plasma membranes. *Medical Clinics of North America* 59, 615 - 627 (1975).
18. Kinne, R.: Membrane-molecular aspects of tubular transport. In: *MTP International Review of Science. Kidney and Urinary Tract Physiology*, Vol. II, K. Thurau, Ed. Butterworths, London, University Park Press, Baltimore, in press.
19. Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M., Sachs, G.: Sugar transport by renal plasma membrane vesicles. Characterization of the systems in the brush-border microvilli and basal-lateral plasma membranes. *J. Membrane Biol.* 21, 375 - 395 (1975).
20. Kinne, R., Schwartz, I.L.: The asymmetric distribution of renal epithelial cell membrane function in the action of antidiuretic hormone and parathyroid hormone. *Physiol. Rev.*, in press.
21. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.: Localization of a calcium stimulated ATPase in the basal-lateral plasma membranes of the proximal tubule of rat kidney. *J. Membrane Biol.* 17, 263 - 274 (1974).
22. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.: Presence of bicarbonate stimulated ATPase in the brush border microvillus membranes of the proximal tubule. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 146, 751 - 753 (1974).
23. Kleinzeller, A., Mc Avoy, E.M.: Sugar transport across the peritubular face of renal cells of the flounder. *J. Gen. Physiol.* 62, 169 - 184 (1973).
24. Maunsbach, A.B.: Functions of lysosomes in kidney cells. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. J.T. Dingle and H.B. Fell, Eds. Vol. I, pp. 115 - 154, North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London, 1969.
25. Mondorf, A.W.: Die Bedeutung lokalisationspezifischer Enzyme im Harn für toxikologische und klinisch-pharmakologische Untersuchungen. *Arzneimittel-Forschung* 23, 1634 - 1637 (1973).
26. Mondorf, A.W., Kinne, R., Scherberich, J.E., Falkenberg, F.: Isolierung, enzymatische und immunologische Charakterisierung einer Plasmamembranfraktion vom proximalen Tubulus der menschlichen Niere. *Clinica Chimica Acta* 37, 25 - 32 (1972).
27. Murer, H., Hopfer, U., Kinne, R.: Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* 154, 597 - 604 (1976).
28. Schmidt, U., Dubach, U.C.: Na-K-stimulated adenosine triphosphatase. Intracellular localization within the proximal tubule of the rat nephron. *Pflügers Arch.* 330, 265 - 270 (1971).
29. Schwartz, I.L., Shlatz, L.J., Kinne-Saffran, E., Kinne, R.: Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of antidiuretic hormone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2595 - 2599 (1974).
30. Scriver, C.R., Chesney, R.W., Mc Innes, R.R.: Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers. *Kidney Int.* 9, 149 - 171 (1976).
31. Scriver, C.R., Mc Innes, R.R., Mohyuddin, F.: Role of epithelial architecture and intracellular metabolism in proline uptake and transtubular reclamation in PRO/Re mouse kidney. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1431 - 1435 (1975).
32. Silverman, M.: The chemical and steric determinants governing sugar interactions with renal tubular membranes. *Biochim. biophys. Acta* 332, 248 - 262 (1974).
33. Silverman, M., Aganon, M.A., Chinard, F.P.: D-glucose interactions with renal tubule cell surfaces. *Amer. J. Physiol.* 218, 735 - 742 (1970).
34. Strauss, W.: Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.* 20, 497 - 507 (1964).
35. Thoenes, W., Langer, K.H., Pfeiffer, U., Roman, W.: Eiweissresorptionstropfen und Lysosomen im proximalen Konvolut der Rattenniere. Elektronenmikroskopische - fermentcytochemische Untersuchungen mit Hilfe intratubulärer Ferritininjektion. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* 5, 124 - 143 (1970).

36. Tune, B.M., Burg, M.B., Patlak, C.S.: Characteristics of p-aminohippurate transport in proximal renal tubules. *Am. J. Physiol.* 217, 1057 - 1063 (1969).
37. Ullrich, K.J., Capasso, G., Rumrich, G., Sato, K.: Effect of p-chloromercuribenzoate (pCMB), ouabain and 4-acetamido-4'-isothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) on proximal tubular transport processes. Ninth Conference on Environmental Toxicity, Rochester, Plenum Press, in press.
38. Ullrich, K.J., Frömter, E., Murer, H.: How is the proximal isotonic absorption inhibited by carbonic anhydrase inhibitors. Bürgenstock Symposium, 1976.
39. Ullrich, K.J., Radtke, H.W., Rumrich, G.: The role of bicarbonate and other buffers on isotonic fluid absorption in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 330, 149 - 161 (1971).
40. Ullrich, K.J., Rumrich, G., Baumann, K.: Renal proximal tubular buffer (glycodiazine) transport: Inhomogeneity of local transport rate, dependence on sodium, effect of inhibitors and chronic adaptation. *Pflügers Arch.* 357, 149 - 163 (1975).
41. Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S.: Specificity and sodium dependence of the active sugar transport in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 351, 35 - 48 (1974).
42. Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S.: Sodium dependence of the amino acid transport in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 351, 49 - 60 (1974).
43. Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klöss, S.: Active Ca^{2+} reabsorption in the proximal tubule of the rat kidney. Dependence on sodium and buffer transport. *Pflügers Arch.*, in press.

Adresse des Autors: Prof. Dr. R. Kinne, Max-Planck-Institut für Biophysik, Kennedyallee 70, D-6000 Frankfurt (Main) 70 (BRD)