Der Effekt von Gallensalzen und CD95-Ligand auf Chloridkanäle isolierter Hepatozyten der Ratte

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Funke aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2010

aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Häussinger Erster Koreferent: Prof. Dr. William Martin Zweiter Koreferent: Prof. Dr. Markus Paulmichl

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einlei	itung	1
1.	1 I	Die Leber	1
1.2	2 (Gallensäuren	3
1	3 A	Apoptose	5
	1.3.1	Apoptose in Hepatozyten	6
1.4	4 I	Das CD95-System	7
1.:	5 (Chloridkanäle	8
	1.5.1	Der schwellungsaktiviert Chloridstrom	1
1.0	6 F	Fragestellung und Ziel der Arbeit	2
2	Mate	rial und Methoden 1	l 4
2.	1 I	solierung und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte	4
2.2	2 k	Kultivierung von HEK293 Phoenix-Zellen	4
	2.2.1	Lösungen und Medien in der Zellkultur	15
2	3 E	Elektrophysiologische Messungen mittels Patch-Clamp-Technik	6
2.4	4 I i	Der Effekt verschiedener Gallensalze auf den basalen Chloridstrom n Hepatozyten	20
	2.4.1	Der Effekt von extrazellulär appliziertem TLCS auf den schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten	21
2.:	5 I i	Der Effekt von CD95-Ligand auf den basalen Chloridstrom n Hepatozyten	22
	2.5.1	Der Effekt von CD95-Ligand auf den schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten	23
2.0	6 N	Messung der basalen Chloridleitfähigkeit in HEK293 Phoenix-Zellen2	24

	2.7	Stimulationsprotokolle für die Patch-Clamp Experimente	24
	2.8	Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente	25
	2.9	Graphische und statistische Auswertung	26
	2.10	Reagenzien	27
3	Erg	ebnisse	28
	3.1	Charakterisierung der basalen Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran von Hepatozyten	29
	3.2	Charkterisierung des schwellungsaktivierten Chloridstroms in Hepatozyten	33
	3.3	Gallensalze: Der Effekt der verschiedenen Gallensalze auf die zuvor charakterisierten Chloridströme	35
	3.3.	1 Taurolithocholat (TLCS)	36
	3.	3.1.1 Der Effekt von extrazellulär appliziertem TLCS auf den basalen Chloridstrom	36
	3.	3.1.2 Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von TLCS auf den basalen Chloridstrom	42
	3.	3.1.3 Der Effekt von extrazellulär appliziertem TLCS auf den schwellungsaktivierten Chloridstrom	44
	3	3.1.1 Der Effekt von intrazellulär appliziertem TLCS auf den basalen Chloridstrom	50
	3	3.1.2 Der basale Chloridstrom nach 30 Minuten Stimulation mit TLCS	52
	3.3.2	2 Tauroursodesoxycholat (TUDC)	56
	3	3.2.1 Der Effekt von extrazellulär appliziertem TUDC auf den basalen Chloridstrom	56
	3.	3.2.2 Der Effekt von intrazellulär appliziertem TUDC auf den basalen Chloridstrom	61

т 1 1		1 .
Inhal	tsverzeic	hnis

	3.3.3	Taurocholat (TC)	. 64
	3.3.	3.1 Der Effekt von extrazellulär appliziertem TC auf den	
	33	basalen Chloridstrom	. 64
	5.5.	basalen Chloridstrom	. 68
	3.4 C	D95-Ligand: Der Effekt von CD95-Ligand auf die zuvor harakterisierten Chloridströme	. 70
	3.4.1	Der Effekt von extrazellulär appliziertem CD95-Ligand auf den basalen Chloridstrom	. 70
	3.4.2	Der basale Chloridstrom nach 30 Minuten Stimulation mit CD95-Ligand	. 74
	3.4.1	Der basale Chloridstrom nach 16 – 24 Stunden Stimulation mit CD95-Ligand	. 78
	3.4.2	Der schwellungsaktivierte Chloridstrom nach 16 – 24 Stunden Stimulation mit CD95-Ligand	. 80
4	Disku	ssion	. 85
	4.1 H	Iepatozyten weisen einen basal aktiven Chloridstrom auf, welcher lie biophysikalischen Charakteristika des schwellungsaktivierten Chloridstroms zeigt	. 85
	4.2 D u	Die Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran im Rahmen der Gallensalz nd der CD95-Ligand-induzierten Apoptose in Hepatozyten	z- . 87
	4.2.1	TLCS, nicht aber TUDC und TC, hemmt den Chloridausstrom aus der Zelle, wodurch es zur Akkumulation von Chlorid im Hepatozyter kommt	ı . 88
	4.2.2	CD95-Ligand aktiviert den basalen Chloridstrom in Hepatozyten, wodurch es zum erhöhten Einstrom von Chlorid in die Zelle kommt	. 95
5	Zusar	nmenfassung	100
6	Abstr	act	102
7	Litera	turverzeichnis	104
8	Abkü	rzungsverzeichnis	120

9	Danksagung	122
10	Lebenslauf	124
11	Versicherung	126

1 Einleitung

Die Leber i st d as z entrale S toffwechselorgan d es K örpers. A ufgenommene Nährstoffe werden vom Verdauungstrakt über die Pfortader der Leber zugeführt, um dort um- oder abgebaut zu werden. Die Leber versorgt auf diese Weise den Körper mit e iner V ielzahl von lebenswichtigen S toffen und s orgt f ür di e E xkretion von Abbauprodukten über die Galle oder die Niere. Die Entgiftung des Körpers ist eine der wichtigsten Aufgaben der Leber. Hierbei ist besonders die Ammoniakentgiftung beim Abbau von Aminosäuren von Bedeutung.

1.1 Die Leber

Die Leber b esitzt ei ne komplexe räumliche Struktur, welche au s v erschiedenen Zellsorten aufgebaut ist. Die Leberparenchymzellen, die Hepatozyten, stellen mit 70 – 80 % der gesamten Leberzellmasse den Hauptzelltyp dar (Grisham et al., 1975, Motta, 1984, Junqueira und Carneiro, 1984). Als die k leinste mikrozirkulatorische und funktionelle E inheit de r Leber ka nn de r Leberazinus a ngesehen w erden. (Rappaport 1973, 1976). Der u nregelmäßig o rientierte P arenchymbereich, der s ich um einen t erminalen A st d er P fortader und de r Leberarterie sowie um de n ableitenden G allengang bis z u d er u mliegenden Zentralvene er streckt, w ird al s Azinus be zeichnet. Alle Z ellen ei nes A zinus w erden v on d en gleichen t erminalen Blutgefäßen versorgt, und alle Hepatozyten eines Azinus scheiden ihre Galle in den gleichen terminalen Gallengang aus (Abbildung 1. 1).

Die Leber besitzt eine zweifache Blutzufuhr, welche zu 80 % aus der Pfortader (V. portae) und zu 20 % aus der Leberarterie (A. hepatica) gespeist wird. Die Pfortader bringt s auerstoffarmes, nä hrstoffhaltiges Blut a us de m V erdauungstrakt i n di e Sinusoide, w o e s m it de m s auerstoffreichen Blut de r Leberarterie vermischt wird. Das Blut fließt nun a n den Hepatozyten vorbei und schließlich über die terminalen Lebervenen i n den Zentralvenenbereich ab . Das Z ytoplasma d er H epatozyten i st reich a n M itochondrien, R ibosomen, E ndoplasmatischen Reticula (glatt und r au) sowie Go lgi-Komplexen, P eroxisomen und Lysosomen. D ies s piegelt die hohe metabolische Aktivität dieses Zelltyps wider (Katz, 1992, zur Übersicht Häussinger, 1990, Ramadori et al., 2008).



Abbildung 1. 1:(A) A rchitektur ei nes ei nfachen Leberazinus u nd (B) A usschnitt e ines L ebersinusoiden mit seinem t ypischen Aufbau. D as nährstoffreiche B lut de r P fortader un d da s sauerstoffreiche B lut der L eberarterie münden in d ie S inusoiden der L eber u nd vermischen s ich dort. Das Blut fließt durch das sinusoidiale Lumen an den Hepatozyten vorbei, wobei ein direkter Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten, über die Fenestrae des Leberendothels, stattfindet. Modifiziert nach Adams und Eksteen 2006.

Die d em Blutstrom zugewandte ba solaterale (sinusoidiale) M embran de r Hepatozyten i st d urch ei ne s tark f enestrierte E ndothelschicht vom B lutstrom abgegrenzt. Während die E ndothelschichten von Blutgefäßen normalerweise geschlossen s ind, be sitzt da s Leberendothel gr oßflächige P oren, di e als F enestrae bezeichnet werden und einen di rekten S toffaustausch der Hepatozyten mit dem sinusoidalen Blut ermöglichen (Wisse et al., 1985). An der Innenwand der Sinusoide befinden s ich di e ortsständigen Makrophagen der Leber, di e a ls K upffer-Zellen bezeichnet werden. Der Bereich zwischen Leberendothel und Hepatozyten wird als Dissé-Raum b ezeichnet. In ihm liegen d ie H epatischen S ternzellen (HSZ) (zur Übersicht Geerts, 2001), die V itamin A s peichern (Wake, 1971) und dessen Zytoplasma r eich a n Lipidtröpfchen i st (Friedman et al., 1985). HSZ weisen Merkmale von Progenitorzellen auf (Kordes et al., 2007) und exprimieren Elemente des kanonischen Wint-Signalweges (Kordes et al., 2008). Sie können sowohl zu Myofibroblasten-artigen Z ellen (Friedman et al., 1985 und 1993, Rockey et al., 1992) als auch zu Hepatozyten- und Endothelzell-artigen Zellen (Kordes et al., 2007 und 2008) transformieren. Weiterhin konnt e gezeigt werden, dass der Dissé Raum

Merkmale ei ner S tammzellniesche au fweist (Sawitza et al ., 2 009). Diese Eigenschaften deuten darauf hin, dass HSZ eine Stammzell-ähnliche Funktion in der Leber übernehmen und somit bei der Leberregeneration eine tragende Rolle spielen.

1.2 Gallensäuren

Die G alle w ird von de r L eber g ebildet, i n d ie G allengänge s ezerniert und interdigestiv in der Gallenblase gespeichert, um zu den Mahlzeiten in das Duodenum abgegeben zu werden. Die G alle b esteht z um größten T eil au s Wasser (82 %), i n dem Elektrolyte in einer ähnlichen Zusammensetzung wie im Blutplasma gelöst sind. Die w ichtigsten funktionellen B estandteile s ind d ie G allensäuren (12 %). Als Emulgatoren unt erstützen sie die F ettverdauung im D arm. D urch M izellenbildung erhöhen sie die Angriffsfläche für Lipasen.

Die pr imären G allensäuren C holsäure und C henodesoxycholsäure w erden in de n Hepatozyten dur ch H ydroxylierungsreaktionen und ox idative V erkürzung d er Seitenkette aus Cholesterin gebildet. Ersteres geschieht immer nur an einer Seite des Moleküls, w odurch e ine a mphipatische S truktur ge schaffen w ird. Bevor di e Gallensalze in die Galle ab gegeben werden, findet meist eine Konjugation an der Carboxylgruppe der Seitenkette über eine Amidbindung mit Glycin oder Taurin statt. Dies erhöht die Fähigkeit zur Mizellenbildung. Aufgrund des alkalischen pH-Werts der Galle liegen Gallensäuren hauptsächlich in Form ihrer Anionen (Gallensalze) vor (zur Übersicht Maitra und Mukhopadhyay, 2004). 95 % der konjugierten Gallensäuren w erden i m terminalen Ileum übe r p assive und a ktive M echanismen rückresorbiert und über die Pfortader zur Leber zurückgeführt. Hier werden sie von den Hepatozyten aufgenommen und stehen somit zur erneuten Exkretion in die Galle zur V erfügung (zur Ü bersicht Perez u nd Briz, 2009). D ie W iederaufnahme von Gallensalzen w ird p rimär ü ber d en N a²⁺-abhängigen G allensalztransporter N tcp $(Na^+$ -taurocholate c otransporting pe ptide) in de r ba solateralen (sinusoidialen) Membran d er H epatozyten v ermittelt (Meier, 1995, S chroeder et al., 1998). Da es sich hi erbei um e inen sekundär aktiven Transport e ntlang de s N atriumgradienten handelt, ist es möglich, die Gallensalze entgegen ihres Konzentrationsgradienten in den H epatozyten z u t ransportieren. D ie E xkretion i n di e G alle übe r d ie a pikale (kanikuläre) Membran findet über primär aktiven, ATP-abhängigen Transport über die Gallensalz-Export-Pumpen, Bseps (bile salt export pumps), statt (Nishida et al.,

1991, Stieger et al., 1992). Die Sekretion der Gallensalze und anderer Substanzen in die Gallengänge is t v om o smotischen E instrom v on W asser g efolgt, wodurch de r Gallefluss entsteht (Wheeler, 1972, Hofmann, 1990).



Abbildung 1. 2: Chemische Struktur der in dieser Arbeit untersuchten Gallensalze. (A) Das proapoptotische Gallensalz Taurolithocholat (TLCS), (B) das antiapoptotische Gallensalz Tauroursodesoxycholat (TUDC) und (C) Taurocholat (TC), ei n Gallensalz, welches weder A poptose induziert no ch jener entgegenwirken kann. (D) Das primäre Gallensalz Cholat zei gt die amphipatische S truktur der Gallensalzmoleküle mit einer hydrophoben, konvexen S eite (rot unterlegt) und der hydrophilen konkaven S eite (blau unterlegt). Modifiziert nach Garidel et al., 2007.

Die ch emische S truktur d er G allensalze u nterscheidet s ich deutlich von de r klassischen "H ead-Tail"-Struktur von D etergenzien, be i de nen d er h ydrophile "Kopf" und de r h ydrophobe " Schwanz" de s M oleküls kl ar vone inander g etrennt sind. G allensalze hi ngegen ha ben e in s tarres S teroid-Gerüst m it e iner h ydrophoben Fläche, welche die konvexe S eite des S teroidrings ei nnimmt und einer hydrophilen Fläche, welche von de n H ydroxylgruppen a uf der konka ven S eite d es M oleküls gebildet w ird (Abbildung 1. 2) (zur Ü bersicht Maitra und Mukhopadhyay, 2004, Garidel et al., 2007). Eine wichtige Determinante der Toxizität eines Gallensalzes ist seine h ydrophobe E igenschaft. D iese i st s owohl von de r A nzahl und P osition de r Hydroxylgruppen s owie der A midierung a n P osition C -24 a bhängig. D ie i n di eser

Arbeit untersuchten Gallensalze unterscheiden sich in der Stärke ihrer hydrophoben Eigenschaft mit folgender Ordnung: TUDC < TC < TLCS (zur Übersicht Garidel et al., 2007, Perez u nd B riz, 2009). Hydrophobe G allensäuren könne n i n de r Leber sowohl ne krotischen a ls a uch a poptotischen Zelltod a uslösen (Schmucker e t a l., 1990). E ine l angfristige E xposition g egenüber e rhöhten Konzentrationen von hydrophoben G allensäuren, wie s ie b ei ch olestatischen Lebererkrankungen a uftritt, kann eine irreversible Schädigung und den zirrhotischen Umbau der Leber nach sich ziehen. Hierbei wird die Apoptose als eine wichtige Form des Zelltodes angesehen (Attili et al., 1986, Patel et al., 1998, Guicciardi et al., 2005). Der Abschnitt 1.3.1 beschreibt den akutellen Wissensstand der Gallensalz-induzierten CD95-abhängigen Apoptose in Hepatozyten.

1.3 Apoptose

Die Apoptose ist ein Prozess, der auch als "programmierter" Zelltod bezeichnet wird und an e iner V ielzahl le benswichtiger Prozesse beteiligt ist. S ie ist e in essentieller Mechanismus in der Entwicklung (Brenner et al., 1974, Sulston et al., 1976) und der Aufrechterhaltung d er Homöostase (Kerr et al., 1972, O pferman u nd K orsmeyer 2003) von Geweben. Die E liminierung entarteter Zellen mitte ls A poptose b ewahrt die F unktionalität de s G ewebes und s chützt es beispielsweise v or ei ner neoplastischen T ransformation (Kerr et al., 1972, Lowe et al., 2 004). E ine Fehlsteuerung de r A poptose ka nn s omit zu schwerwiegenden P roblemen i m Organismus führen (zur Übersicht Nijhawan et al., 2000, Ghavami et al., 2005).

Der apoptotische Zelltod ist durch bestimmte biochemische Prozesse charakterisiert, welche s pezifische m orphologische V eränderungen z ur Folge ha ben. Zu di esen charakteristischen Veränderungen z ählen d as S chrumpfen d er Zelle, d ie Chromatinkondensation, di e F ragmentierung de r c hromosomalen D NA und de s gesamten Z ellkerns, s owie di e B ildung von m embranumschlossenen V esikeln, de n sogenannten *"apoptotic bodi es"* (zur Ü bersicht Hengartner, 2000, E lmore, 2007). Während d ieses P rozesses w erden bestimmte Enzyme, wie Caspasen *(cystein-aspartat-proteases)* und E ndonucleasen aktiviert, w elche P roteine und C hromatin spalten.

Caspasen l iegen i n al len Z ellen z unächst i n i hrer i naktiven Form a ls Procaspasen (Zymogene) vor. Durch einen spezifischen apoptotischen Stimulus werden Initiator-Caspasen (Caspase-8/ -10) gespalten, w elche i hrerseits i n d er Lage s ind E ffektor-Caspasen (z.B. Caspase 3/-7) zu aktivieren. Es entsteht eine proteolytische Caspasen-Kaskade (Cohen, 1997). Die Aktivität der Caspasen wird durch Mitglieder der Bcl-2 *(B-cell lymphoma 2)* und IAP *(inhibitor of apoptosis protein)*-Proteinfamilie reguliert (zur Übersicht Deveraux und Reed, 1999, Cory und Adams, 2002).

Man unterscheidet z wei prominente Signalwege, den e xtrinsischen und de n intrinsischen W eg, die z um a poptotischen Z elluntergang führen können. Der extrinsische Weg verläuft über Ligandenbindung an die Rezeptoren der TNF *(tumor necrose factor)*-Rezeptor-Superfamilie (Ashkenazi und Dixit, 1998, Locksley et al., 2001), wodurch es zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8 (/-10) kommt (1.4). Diese aktiviert konsekutiv die Effektor-Caspasen.

Toxische S ubstanzen, w ie Zytostatika, DNA-Schädigung und Entzug von Wachstumsfaktoren a ktivieren de n i ntrinsischen S ignalweg. H ierbei ve rmittelt d ie Aktivierung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bax und Bid) eine Depolarisation der M itochondrien-Membran und di e F reisetzung von C ytochrom c aus de m m itochondrialen Intermembranraum. Dies w ird du rch di e Caspase-8-abhängige Spaltung des Proteins Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) zu tBid (truncated Bid) realisiert (Li et al., 1998). Es kommt zur Bildung des sogenannten Apoptosoms, e ines M ultiproteinkomplexes, w elches di e P rocaspase-9 und A paf (*apoptotic protesase activating factor*)-1 enthält (Green und Reed, 1998, Saelens et al., 2004).

Es wird z wischen T yp I- und T yp II-Zellen unterschieden. In T yp I-Zellen, wie Hepatozyten, kommt es früh im z eitlichen V erlauf zu einer Caspasen-Aktivierung. Hierbei ist der mitochondriale Weg nicht essentiell. Lymphatische Zellen beispielsweise gehöhren z u de r G ruppe de r T yp II-Zellen. H ier kommt es immer z ur Aktivierung de r M itochondrien und e rst s päter z u e iner Caspasen-Aktivierung (Scaffidi et al., 1998, zur Übersicht Barnhart et al., 2003, Lavrik et al., 2005).

1.3.1 Apoptose in Hepatozyten

Proapoptotische S timuli, w ie C D95-Ligand (CD95L) (Reinehr et a l., 2008), hydrophobe Gallensalze (Becker et al., 2007) oder hyperosmotisches Zellschrumpfen

(Schreiber et al., 1996) induzieren innerhalb von wenigen Sekunden ein Absinken des va sikulären pH-Wertes von ca. 6 auf 5,6 - 5,7 in den frühen Endosomen von Hepatozyten. E s k onnte g ezeigt w erden, d ass diesem P rozess ei n A nstieg d er intrazellulären C hloridkonzentration vor ausgeht (Reinehr et al., 2006) and 2008, Becker et al., 2007). Es wird angenommen, da ss e ine e rhöhte K onzentration von Chlorid im Zytoplasma die H⁺-ATPase in der Endosomenmembran aktiviert, welche daraufhin den Abfall des vasikulären pH-Wertes vermittelt (Moriyama und Nelson 1997, P azoles e t a l., 1980) . D ie A zidifizierung d ieser frühen endosomalen Kompartimente aktiviert nun eine komplexe Signalkaskade, welche schließlich zum apoptotischen Untergang des Hepatozyten führt. Zunächst wird die endosomale saure Sphingomyelinase ASM (acidic sphingomyelinase) aktiviert. Dies führt zur Bildung von C eramiden und z ur A ktivierung d er Protein-Kinase C (PKC) ζ. Daraufhin kommt es zur Serinphosphorylierung von p47^{phox}, einer regulatorischen Untereinheit der NA DPH (nicotinamide ade nosine di nucleotide ph osphate)-Oxidase. Di ese Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Reinehr et al., 2005, 2006, Becker et al. 2007) und di ese w iederum z ur Aktivierung de s E GF (epidermal gr owth f actor)-Rezeptors. D ieser assoziiert mit CD95 und a ktiviert diesen über eine Tyrosinphosphorylierung (Eberle et al., 2007), was z ur T ranslokation de s E GFR-CD95-Komplexes z ur P lasmamembran f ührt (Reinehr et al., 2003). Hier kom mt es nun zur Bildung des DISC (zur Übersicht Reinehr und Häussinger 2007).

1.4 Das CD95-System

Der extrinsische Signalweg wird über die Rezeptoren der TNF–Superfamilie an der Zelloberfläche durch Bindung ihrer Liganden vermittelt (Ashkenazi und Dixit, 1998, Locksley et al., 2001). CD95 (Fas/Apo-1) ist ein Typ I -Transmembranprotein und Mitglied d er T NF-Rezeptor-Superfamilie (Itoh et a l., 1991, O ehm et al., 1992), welche durch verschiedene Cystein-reiche Motive in der extrazellulären Domäne (N-terminal) s owie e iner i ntrazellulären, s tark kon servierten R egion aus 8 0 A mino-säuren, der sogenannten Todesdomäne *(death domain)*, charakterisiert sind (Itoh und Nagata, 1993, T artaglia e t a l., 1993). D urch Interaktion m it de r N -terminalen Domäne bindet der Rezeptor seine "Todesliganden", bei denen es sich hauptsächlich um T yp II-Transmembranproteine de r T NF-Familie h andelt (zur Ü bersicht

Ashkenazi, 1998, 2002). E iner d ieser n atürlichen Liganden i st C D95-Ligand (CD95L) (Nagata, 1997, Smith et al., 1994).

In uns timulierten H epatozyten i st C D95 ha uptsächlich i m Z ytoplasma und nur z u einem s ehr geringen Anteil in der Zellmembran lokalisiert (Sodeman et al., 2000, Reinehr et al., 2002, G raf et al., 2002). Die Aktivierung des intrazellulär gelagerten CD95-Rezeptors kann sowohl Liganden-abhängig, durch Bindung eines natürlichen Liganden oder eines CD95-spezifischen Antikörpers als auch Liganden-unabhängig, z.B. nach Stimulation mit hydrophoben Gallensalzen (z.B. TLCS) (Graf et al., 2002) oder hyperosmotischer Zellschrumpfung (Reinehr et al., 2002) geschehen. Daraufhin transloziert CD95 z ur P lasmamembran, wodurch e s z ur A utoamplifikation de s apoptotischen Signals kommt (Reinehr et al., 2008).

Die B indung des L iganden (oder e ines CD95-spezifischen A ntikörpers) führt z ur Trimerisierung d es R ezeptors i n d er P lasmamembran und z ur R ekrutierung d es Adaptermoleküls F ADD *(Fas-associated de ath dom ain).* FADD b esitz e ine C terminale T odesdomäne, welche an die T odesdomäne de s C D95-Rezeptors bi ndet. Am N-terminus befindet sich die T odeseffektordomäne *(death effector domain)* mit der FADD an die Todeseffektordomäne der inaktiven Initiator-Caspasen Procaspase-8 oder -10 bindet (Wallach et al., 1999). Durch autoproteolytische Spaltung werden diese nun aktiviert. Den so entstandenen Komplex nennt man DISC *(death inducing signaling complex)*.

1.5 Chloridkanäle

Ionenkanäle sind por enbildende Transmembranproteine, die Ionen das Durchqueren von Biomembranen ermöglichen. Der Transport erfolgt dabei immer passiv, entlang des bestehenden elektrochemischen Gradienten. Dadurch unterscheiden sie sich von aktiven Transportproteinen, w elche i n d er Lage s ind, Ionen en tgegen i hres elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Beim primär aktiven Transport wird dazu E nergie a us der H ydrolyse von ATP genutzt. D er s ekundär aktive T ransport verläuft über einen K otransport, der sich des elektrochemischen Gradienten an derer Ionen bedient. Zu dieser Transportergruppe zählen beispielsweise der Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporter (N KCC) o der d er Na⁺/Cl⁻-Kotransporter (N CC) (zur Ü bersicht Russell, 2000, G amba, 2005) . Ionenkanäle f inden s ich s owohl i n de r Plasmamembran al s auch in den M embranen der Zellorganellen. Ionenkanäle s ind

selektiv permeabel für bestimmte I onentypen. So s ind C hloridkanäle a uch i mmer permeabel für andere Anionen, wie Iodid, Bromid und organische Anionen sowie für Nitrat, Phosphat und n egativ geladene Aminosäuren. Sie werden als Chloridkanäle bezeichnet, da Chlorid das bevorzugt transportierte Anion in allen Organismen ist (zur Ü bersicht Nilius and D roogmans, 2003). D ie F unktion plasmamembranständiger Chloridkanäle kann in drei Hauptaufgaben gegliedert werden: Volumenregulation / ionsche H omöostase, t ransepithelialer T ransport und di e R egulation elektrischer E rregbarkeit (zur Ü bersicht Jentsch e tal., 2002). In der Membran intrazellulärer Organellen wird ihnen u.a. eine wichtige Rolle in der Azidifizierung dieser K ompartimente zugesprochen (Al-Awqati, 1995). D er A ktivitätsstatus is t abhängig von der K onformation des P orenproteins oder einer oder mehrerer Untereinheiten d er P ore. D iese k ann d urch verschiedenste Stimuli b eeinflusst werden. Das ehr viele biophysikalisch i dentifizierte und weitreichend untersuchte Chloridkanäle noch nicht in ihrer molekularen Struktur identifiziert werden konnten, ist di e E inteilung de r C hloridkanäle n ach i hrem bi ophysikalischen P hänotyp s ehr verbreitet.

Exemplarisch sind im Folgenden die wichtigsten Untergruppen kurz beschrieben:

- Liganden-gesteuerte C hloridkanäle (LGIC, *ligand-gated c hloride channels*) werden übe r1 igandenbindende R ezeptoren, w ie de n N ikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (Lindstrom e t al., 1995), den G ABA-Rezeptor (γ-aminobutric acid receptor) (Bormann et al., 1987 und 2000) oder den Glycin-Rezeptor (Pfeiffer et a l., 1982, Lewis et a l., 1991, M orales et a l., 1 994) gesteuert. Die Chloridkanäle dieser Familie sind hauptsächlich an der Erregung (Reichling et al., 1994, Owens et al., 1996) und Hemmung (Wang et al., 1994) neuronaler Singaltransmission beteiligt.
- Calcium-aktivierte Chloridkanäle werden durch Bildung von Nachpotentialen in N euronen und M uskelzellen (Mayer, 1985, Frings et a l., 2000), be i de r rezeptorvermittelten S ignaltransduktion (Lowe and G old, 1993) und beim transepithelialen Wasser- und Ionentransport (Kidd and Thron, 2000) aktiviert.
- Der *cystic f ibrosis t ransmembrane conductance r egulator* (CFTR) i st e in cAMP-aktivierter Chloridkanal und ist d as e inzige bis he ute be kannte Kanalprotein au s der F amilie der A BC *(adenosine t riphosphate-binding*)

cassette)-Transporter. D as C FTR-Protein besitzt z wei Nukleotidbindungsstellen, z wei T ransmembrandomänen und e ine r egulatorische D omäne mit verschiedenen P hosphorylierungsstellen (Riordan et a l., 1989, Ostedgaard et al., 2001, zur Übersicht Higgins, 2001). Er ist am transepithelialen Transport von Wasser und E lektrolyten beteiligt (Quinton et al., 1990). In der Membran von Zellorganellen wird ihm eine Rolle in der Azidifizierung, Bewegung und Fusion di eser K ompartimente z ugesprochen (Bradbury e t a l., 1 992). Mutationen im C FTR-Gen be im M enschen f ühren z um F ehlen ode r einer eingeschränkten Funktion des Kanals, welche die Ursache der Mukoviszidose (zystische Fibrose) ist.

- Die F amilie d er C LC-Chloridkanäle i st na ch ihrer S equenzhomologie klassifiziert, welche wiederum in verschiedene Äste aufgeteilt wird. Den ersten Ast bilden Plasmamembrankanäle. Die beiden anderen Subfamilien schließen zum G roßteil in trazelluläre C hloridkanäle d er Z ellorganellen ein. Unter bestimmten U mständen könne n di ese j edoch z ur P lasmamembran translozieren. Ob dieser Prozess unter physiologischen Konditionen eine Rolle spielt ist jedoch noch unklar (Friedrich et al., 1999). Sehr viele, jedoch nicht alle d er C LC-Kanalproteine, sind s pannungsgesteuerte Kanäle. Alle bi sher bekannten CLC-Kanäle bilden D imere (Middleton et al., 1994, Fahlke et al., 1997, Maduke et a l., 1 999). P athophysiologisch s pielen di e C hloridkanäle dieser F amilie eine große R olle. S o führen M utationen in de n verschiedenen CLC-Genen im Menschen zu Erkrankungen, wie der Dent-Krankheit (Lloyd et al., 1996), Myotonien (Koch et al., 1992) und der Osteopetrose (Kornak et al., 2001).
- Eine Vergrößerung des Zellvolumens aktiviert in nahezu allen Zelltypen einen schwellungsaktivierten Chloridstrom, der im Allgemeinen I_{Cl,swell} oder VRAC *(volume r egulated ani on c urrent)* genannt wird. Obwohl auf m olekularer Ebene bis heute noch kein entsprechendes K orrelat gefunden w erden konnte, ist dieser C hloridstrom auf f unktioneller E bene e ingehend be schrieben (zur Übersicht Nilius e t a l., 1996 und 2003, J entsch e t a l., 2002, Suzuki e t a l., 2005). I m f olgenden Abschnitt wird der schwellungsaktivierte C hloridstrom detaillierter dargestellt.

1.5.1 Der schwellungsaktiviert Chloridstrom

Die Fähigkeit z ur V olumenregulation i st e in fundamentales M erkmal al ler Z ellen, welches i hnen er laubt, das o smotische G leichgewicht z wischen i ntra- und extrazellulärem R aum bei os motischen V eränderungen de r Umwelt aufrecht z u erhalten. Das Zellvolumen ist eine wichtige Determinante nahezu aller Prozesse der Zelle, wie Metabolismus (Häussinger et al., 1990a und b, Hallbrucker et al., 1991a), Hormonaktivität (Häussinger und Lang, 1992, H allbrucker et al., 1991b) und Sekretion (Häussinger et al., 1992) Somit i st die R egulation des Z ellvolumens und die dazugehörigen Mechanismen an einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen der Zelle b eteiligt. Beeinträchtigungen di eser M echanismen könne n z u Dysfunktionen der Z elle führen (zur Übersicht H äussinger und Lang, 1991, H äussinger, 1996, Häussinger und Schliess 1999, Schliess und Häussinger, 2002 und 2005, Lang et al., 1998).

In nahezu je dem Zelltyp aktiviert Zellschwellung einen charakteristischen au swärts gleichrichtenden Anionenstrom, I_{Cl,swell}, welcher d urch eine p otentialabhängige Inaktivierung bei positiven Potenzialen (über +40 mV) gekennzeichnet ist (Paulmichl et al., 1992, Tseng, 1992, Kubo et al., 1992, Nilius et al., 1994a, b, Ackerman et al., 1994, zur Übersicht Nilius et al., 1996, Okada, 2006). Dieser Strom ist abhängig von der Anwesenheit intrazellulären ATPs (Jackson et al., 1994, Oiki et al., 1994), dessen Hydrolyse aber keine Voraussetzung für d ie A ktivität ist (Jackson et al., 1994, Strange et al., 1996). Hypertone Bedingungen und Nukleotide inhibieren den I_{Cl,swell} (Paulmichl et al., 1992, Gschwentner et al., 1996, S zücs et al., 1996), welcher d ie Permeabilitätssequenz $\Gamma > Br^- > Cl^- > F^- > Glutamat und zusätzlich eine geringe Durchlässigkeit für Aspartat und Taurin zeigt (Banderali and Roy, 1992).$

Es m uss j edoch be achtet w erden, da ss der $I_{Cl,swell}$ nicht de r e inzige schwellungsaktivierte C hloridstrom is t. S o w ird b eispielsweise au ch C LC-2, e in Mitglied der CLC-Chloridkanalfamilie, durch Zellschwellung aktiviert. Der hierbei entstehende C hloridstrom ka nn j edoch durch ve rschiedene Charakteristika leicht vom I _{Cl,swell} unterschieden w erden. S o z eigt d er C LC-2-exprimierte C hloridstrom eine E inwärtsgleichrichtung und ei ne an dere Permeabilitätssequenz (\mbox{CH} Γ) (Gründer et al., 1992, Furukawa et al., 1998, Xiong et al., 1999).

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Obwohl de r k omplexe C D95-abhängige A poptose-Signalweg, w elcher d urch hydrophobe Gallensalze sowie CD95-Ligand induziert wird, intensiv untersucht und verstanden wurde (Graf et al., 2002, Eberle et al., 2007, Reinehr et al., 2002, 2003, 2004, 2006 und 2008, B ecker et al., 2007a und b), ist der initiale Trigger, der zum Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration ([Cl⁻]_i) führt, noch unklar. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass in der Gallensalz- und CD95L-induzierten Apoptose u nterschiedliche M echanismen z ur A kkumulation von Chlorid im Zytoplasma führen. Dies ergibt sich aus vorangegangenen Experimenten, die zeigten, dass de r C D95L-induzierte [C1] i-Anstieg, i m G egensatz zu j enem Gallensalzinduzierten Anstieg, Caspase-8-abhängig i st. Weiterhin s ind auch alle darauf folgenden Ereignisse, w ie d ie A zidifizierung d er frühen endosomalen Kompartimente, d ie Bildung von C eramiden und di e A ktivierung v on C D95 Caspase-8-abhängig. D ies b edeutet, dass d ie C aspase-8-Aktivierung n ach Stimulation m it C D95L V oraussetzung f ür die intrazelluläre A kkumulation von Chlorid is t. Die T atsache, dass B afilomycin, e in I nhibitor der vakuolären H⁺-ATPase, und DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disodium salt), ein Inhibitor von Chloridkanälen und -austauschern, die TLCS-induzierte sowie die CD95L-induzierte endosomale A zidifizierung und a lle darauf folgende Ereignisse d es C D95abhängigen A poptose-Signalweges stark h emmen, weist d arauf h in, dass di e Akkumulation von C hlorid ein s ehr f rühes E reignis i n di esem Signalweg ist. Möglicherweise wird di ese A kkumulation von Chlorid über V eränderungen de r Chloridleitfähigkeit d er P lasmamembran vermittelt. Dies w äre durch eine Modulation von Chloridkanälen in der Plasmamembran realisierbar. Ausgehend von dieser I dee sollten in der vorliegenden Arbeit folgende F ragestellungen geklärt werden:

- Ist der in trazelluläre A nstieg d er C hloridkonzentration im R ahmen der Apoptose-Induktion mit dem proapoptotischen Gallensalz TLCS und mit dem Todesliganden C D95-Ligand au f eine Veränderung der C hloridleitfähigkeit der Plasmamembran zurückzuführen?
- 2.) Haben das a ntiapoptotische Gallensalz T UDC und da s weder pro- noch antiapoptotisch w irkende Gallensalz T C, w elche n icht z ur i ntrazellulären

Chlorid-Akkumulation führen, einen Effekt auf die Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran?

- 3.) Welche M echanismen liegen einer pot entiellen Gallensalz- und C D95Linduzierten Veränderungen des C hloridflusses ü ber d ie P lasmamembran zugrunde?
- 4.) Welche Unterschiede lassen sich zwischen dem Gallensalz- und dem CD95Linduzierten Effekt feststellen?

Als M odellsysteme wurde di e C D95-Ligand-induzierte A poptose s owie d ie Stimulation mit d en Gallensalzen TLCS, TUDC und Gallensalz T C in is olierten Hepatozyten (primäre Zellkultur) der Ratte gewählt. Vergleichend wurde der basale Chloridstrom i n H EK293 P hoenix-Zellen ab geleitet. Die C hloridleitfähigkeit d er Plasmamembran w urde mittels Patch-Clamp-Technik in de r " Whole-Cell"-Konfiguration ge messen. Somit konnt en alle C hloridströme ü ber d ie g esamte Plasmamembran d er H epatozyten abgeleitet w erden, w obei Ca²⁺- und cAMPaktivierte Chloridströme durch das experimentelle Setup ausgeschlossen wurden. Die verschiedenen Versuchsprotokolle und S timulationen ließen Rückschlüsse a uf di e zugrunde l iegenden M echanismen z u. D ie Experimente w urden unt er hypertonen, isotonen oder h ypotonen Bedingungen und einer symmetrischen Chloridkonzentration im extra- und intrazellulären Raum durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte

Hepatozyten, die Parenchymzellen der Leber, wurden mittels Kollagenase-Perfusion aus männlichen W istar-Ratten (150-300 g Körpergewicht) i soliert (Meijer et a l., 1975). Die is olierten Z ellen wurden mit K rebs-Henseleit-Puffer (Carbogen-begast) mit 6 mmo l/l G lukose mit ca. 500.000 Zellen/ml in S uspension gebracht. F ür di e anschließenden e lektrophysiologischen M essungen m ussten di e Zellen vereinzelt werden. H ierzu w urde die Z ellsuspension ca. 1:40 ve rdünnt und di e Z ellen auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen (Ø 10 mm) a usplattiert. Bevor die Z ellen i n *Williams E agle Medium* (2 mmo l/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg /ml Streptomycin, 0,1 µmol/l Insulin, 0,1 µmol/l Dexamethason und 5 % FCS) überführt werden konnten, wurden sie für 3 Stunden bei 37°C, 5 % CO2 und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (Incubator N APCO, P recision S cientific, C hicago). Die Vitalität wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug stets mehr als 95 %. Die so gewonnenen Hepatozyten wurden nun 12 bis 48 Stunden kultiviert und für die elektrophysiologischen Messungen verwendet.

2.2 Kultivierung von HEK293 Phoenix-Zellen

HEK293 P hoenix-Zellen (human e mbryonic ki dney) w urden in *Eagle M edium* (2 mmol/l L -Glutamin, 1 00 U /ml P enicillin, 0 ,1 mg /ml S treptomycin, 1 mM Brenztraubensäure, 10 % FCS) bei 37°C, 5 % CO2 und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (Incubator NAPCO, Precision Scientific, Chicago) und bei Erreichen einer ca. 90 %igen Konfluenz (alle 2 bis 3 Tage) mittels Trypsin/EDTA-Behandlung aufgeteilt und verdünnt. Für d ie elektrophysiologischen M essungen wurden di e Zellen subkonfluent auf Deckgläschen (Ø 10 mm) ausplattiert und 12 bis 24 Stunden kultiviert.

2.2.1 Lösungen und Medien in der Zellkultur

Kollagenase-Lösung:	
v	

115 mM	NaCl
25 mM	NaHCO3
5.9 mM	KC1
1.18 mM	MgCl2 · 6H2O
1.23 mM	NaH2PO4 · H2O
0.1 mM	CaCl2
0.01 %	Glukose
2 %	BSA
0.02 %	Kollagenase Type II (Biochrom AG, Deutschland)

Krebs-Henseleit Puffer:

115 mM	NaCl
25 mM	NaHCO ₃
5.9 mM	KCl
1.18 mM	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
1.23 mM	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
1.2 mM	Na_2SO_4
1.25 mM	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0.01 %	Glukose

Williams Eagle Medium (22551 GIBCO, Deutschland)

2 mmol/l	L-Glutamine	
100 U/ml	Penicillin/	
0.1 mg/ml	Streptomycin	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
0.1 µmol/l	Insulin	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
0.1 mol/l	Dexamethason	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
5 %	FCS	(Cambrex, Belgien)

Eagle Medium (M5650 Sigma, Italien)

2 mmol/l	L-Glutamin	
100 U/ml	Penicillin	
0.1 mg/ml	Streptomycin	
1 mM	Brenztraubensäure	
10 %	FCS	(Cambrex, Belgien)

Trypsin/EDTA-Lösung (T3924 Sigma-Aldrich, Deutschland)

5 mg/ml	Trypsin (vom Schwein)
2 mg/ml	EDTA

2.3 Elektrophysiologische Messungen mittels Patch-Clamp-Technik

In Abbildung 2. 1A ist de r A ufbau de r ve rwendeten Patch-Clamp-Apparatur schematisch d argestellt. Alle E xperimente w urden i n de r,, Whole-Cell"-Konfiguration dur chgeführt (Abbildung 2. 1B). Diese M ethode e rlaubt es , Ionenflüsse über al le i n d er Zellmembran ak tiven C hloridkanäle ei ner einzelnen Zelle als elektrische Ströme aufzuzeichnen. Hierzu wird das Membranpotential der zu unt ersuchenden Zelle mit einem R ückkopplungsverstärker auf die gewünschte Klemmspannung gebracht u nd f ür ei ne g ewisse D auer gehalten. Diese Klemmspannungen wurden in Form von Stimulationsprotokollen angelegt. Diese sind im A bschnitt 2.7 dargestellt. Das K omandopotential wird kont inuierlich mit dem t atsächlichen M embranpotential v erglichen. Bei A bweichungen erzeugt d er angeschlossene V erstärker e inen kom pensatorischen S trom. der d ie Potentialdifferenz g egen N ull b ringt. Dieser S trom is t g leich dem S trom, der i n diesem Moment über die Plasmamembran fließt, aber mit umgekehrtem Vorzeichen. Auf di ese W eise w ird di e S pannung der Zellmembran auf den gewünschten W ert "geklemmt" ("clamped") und gleichzeitig d er Ionenfluss übe r di e M embran gemessen.

Der Chloridstrom über die Zeit eines Experiments wurde mittels Sweeps-Protokollen (2.7) verfolgt und aufgezeichnet. Somit lie ß s ich e in E xperiment kont inuiertlich kontrollieren. Die S tromintensität wurde alle 5 Minuten durch di e Messung de r Strom-Spannungs-Beziehung mittels Anlegen des IV-Protokolls (2.7) abgeleitet. Um eine Klemmspannung a nlegen und di e Chloridströme a bleiten z u kön nen, muss zunächst e ine s ehr di chte V erbindung z wischen G laspipette und Zellmembran hergestellt w erden. H ierzu w ird di e Glaspipette mit H ilfe eines mechanisch-hydraulischen Mikromanipulators (Narishige) so dicht an die zu untersuchende Zelle gebracht, dass sich d ie Plasmamembran a n d ieser S telle le icht e indellt. Der z uvor erzeugte leichte Unterdruck in der Glaspipette wird abgelassen, sodass die Membran noch dichter an die Pipette gesaugt wird. Somit entsteht ein hoch-ohmiger Kontakt, der s ogenannte Giga Ω (G Ω)-Seal, zwischen dem R and de r G laspipette und de m entsprechenden M embranabschnitt. Der elektrische W iderstand betrug nun 1 – 10 G Ω . Durch einen kurzen, kräftigen Sog wurde nun das Membranstück, welches vom Rand de r G laspipette u mgeben war, h eraus getrennt. Der elektrische W iderstand

sank nun a uf 300 – 800 M Ω . S omit wurde di e " Whole-Cell"-Konfiguration geschaffen (Abbildung 2. 1B). D ie s o e ntstandene di rekte V erbindung z wischen Zytoplasma und Pipettenlösung bedingt den Einstrom der Pipettenlösung in die Zelle und e rmöglicht s omit de n f reien Ladungsfluss zwischen P ipettenlösung und Zytoplasma. Die P lasmamembran b efand sich n un zwischen P ipettenlektrode und Badelektrode, s odass alle ü ber die gesamte Zellmembran fließenden Chloridströme abgeleitet werden konnten. Da die Pipettenlösung frei von Ca²⁺ und cAMP war und EGTA a ls C helatbildner z weiwertiger K ationen e ingesetzt w urde, ko nnte s icher gestellt w erden, d ass keine Calcium- oder cA MP-abhängigen C hloridströme gemessen w urden. D er s tarke, transiente K ⁺-Strom w urde durch S ubstitution de s intrazellulären K aliums dur ch C äsium unt erdrückt. Da in de r " Whole-Cell"-Konfiguration das Z ytoplasma durch di e P ipettenlösung s ehr stark v erdünnt w ird, sind a lle z ytosolischen K omponenten ni cht m ehr i n i hrer ph ysiologischen Konzentration und ihrem physiologischen Aktivierungsstatus vorhanden.

In u nseren E xperimenten w urde di e " Whole-Cell"-Konfiguration entweder in isotoner oder in hypertoner B adlösung erstellt. Die V ariation d er O smolarität d er verschiedenen E xtrazellulärlösungen (hyperton, i soton oder h ypoton) wurde dur ch Änderung de r M annitol-Konzentration e rreicht und mit H ilfe e ines Osmometers (VAPRO 5520, S anova) übe rprüft. D er p H-Wert w urde mit e inem pH-Meter (symPHony, VWR) bestimmt und gegebenenfalls eingestellt (pH 7,2 oder pH 7,4).

Die Messkammer fasste ein Volumen von 1 m l (Badlösung), in welche die zellentragenden D eckgläschen e ingelegt und m it ein wenig S ilikon am g läsernen Untergrund befestigt wurden. Ein inverses Phasenkontrast-Mikroskop (Axiovert 125, Zeiss) ermöglichte ein gezieltes Heranfahren der Patchpipette an die Zelle und eine optische K ontrolle der Z ellen während der Messungen. Die Patchpipette war über eine s pezielle H altevorrichtung an ei nem mechanisch-hydraulischen Mikromanipulator (Narishige) befestigt, der eine sehr genaue Steuerung der Pipette ermöglichte.

Die G laspipetten w urden a us B orosilikat-Glaskapillaren (Garner G lass C ompany, Deutschland) m it e inem A ußendurchmesser von 1 $.65 \pm 0.05$ m m und e inem Innendurchmesser von 1.15 ± 0.05 m m, m it H ilfe e ines H orizontal-Pullers (P-87, Sutter Instruments CO, USA) in mehreren Schritten gezogen. Die Resistenz der mit Intrazellärlösung (Pipettenlösung) gefüllten Pipetten betrug zwischen 2 und 5 M Ω .

17

Sowohl die in der Pipette befindliche Messelektrode als auch die Referenzelektrode, welche i n d ie B adlösung ei ntauchte, b estanden au s ch loriertem F einsilberdraht $(Ag^+/AgCl)$.



Abbildung 2. 1: (A) Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Apparatur. Der an den Computer angeschlossene Rückkopplungsverstärker legt die gewünschten Klemmspannungen an die Membran an und leitet die Chloridströme ab. Die Glaspipette ist mit der Pipettenlösung gefüllt und beinhaltet die Pipettenelektrode. Die Messkammer ist mit einer Badlösung gefüllt, in welche die Badelektrode eintaucht. (B) Schematische Darstellung zur Herstellung der "Whole-Cell"-Konfiguration. Zunächst wird d ie G laspipette s ehr nah a n d ie Zelle herangeführt. Durch U nterdruck wird n un d ie Plasmamembran d er Z elle a n d en Rand d er P ipettenspitze g esaugt. E s en tsteht ein ho chohmiger Kontakt, d ie s ogenannte "C ell-Attached"-Konfiguration. Durch k urzen, kräftigen S og wird da s Membranstück, welches vom P ipettenrand umschlossen wird, a bgelöst. D ie P ipettenlösung vermischt s ich nun mit d em Zytoplasma d er Zelle, s odass ei n freier L adungsfluss z wischen Zellinnerem und Pipettenlösung möglich ist (verändert nach Hamill et al., 1981).

Um die hochsensible Patch-Clamp-Apparatur vor elektromagnetischen Störungen zu schützen, befand s ich der gesamte V ersuchsaufbau i nnerhalb e ines g eerdeten Faraday'schen Käfigs. Lediglich der Computer (Power Macintosh 8100/80) und der Rückkopplungsverstärker (EPC-8 amplifier, HEKA, Ge rmany) mit in tegriertem Interface waren außerhalb des F araday'schen K äfigs au fgebaut. Alle im Faraday'schen Käfig b efindlichen Metallkomponenten wurden über di esen geerdet. Zum S chutz vor E rschütterung waren die Messkammer, das Mikroskop und der Mikromanipulator auf einem pneumatisch-schwingungsgedämpften Tisch montiert. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Datenerfassung wurde ein EPC-8 Verstärker (HEKA, Deutschland) verwendet, der mit einem ITC-16 analog-digitalen Interface verbunden war. Kontrolliert wurde alles über einen Power Macintosh 8100/80 Computer mit dem Programm "Pulse" (HEKA, Deutschland). Für di e D atenanalyse w urden di e P rogramme "Pulse F it" (HEKA, Deutschland), "Excel" (Microsoft) und "Prism 4" (GraphPad) verwendet.

Die z ellentragenden D eckgläschen w urden e inzeln entnommen un d i n di e Messkammer (gefüllt mit Badlösung) überführt. W enn i nnerhalb von 30 M inuten kein s tabiler "Whole-Cell"-Kontakt a ufgebaut werden konnt e, w urde ein ne ues Deckgläschen m it Z ellen übe rführt. K onnte e in "Whole-Cell"-Kontakt he rgestellt werden, w urde d as er ste IV-Protokoll (Zeitpunkt 0') a ppliziert. Die er ste M essung am Zeitpunkt 0' diente zusätzlich der Kontrolle, ob die "Whole-Cell"-Konfiguration stabil war und keine, bzw. nur sehr geringe Leckströme vorhanden waren, welche die Messungen hätten verfälschen können.

Jedes Experiment sollte i dealerweise mit der Zugabe des Chloridkanal-Blockers *5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid* (NPPB, N4779, Sigma) beendet werden. Dies stellte sicher, dass in den Experimenten Ströme über Chloridkanäle gemessen wurden und der Anteil an Leckströmen akzeptabel gering war. Da die "Whole-Cell"-Kontakte während eines Experiments instabil werden oder gar ganz brechen können, konnten nicht alle Versuche bis zum Ende durchgeführt werden. Somit erklärt sich die abnehmende Anzahl an Einzelexperimenten (n) über die Zeit, die bei annähernd jeder Versuchsreihe zu beobachten war.

Zu Beginn d ieser A rbeit s ollte z unächst d ie b asale C hloridleitfähigkeit d er Plasmamembran unter i sotonen Bedingungen gemessen und charakterisiert werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden, wie unter 2.1 beschrieben, isoliert und für 24 - 48 Stunden kultiviert (bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit). Nachdem der "Whole-Cell"-Kontakt in isotoner Badlösung erstellt wurde, konnte der basale Chloridstrom abgeleitet werden.

Weiterhin w urde di e C hloridleitfähigkeit na ch V eränderung der ex trazellulären Osmolarität ch arakterisiert. D ie p räparierten H epatozyten w urden z unächst in hypertone Badlösung überführt, der Whole-Cell-Kontakt erstellt und de r Strom bei Zeitpunkt 0' abgeleitet. Über ein P erfusionssystem mit e iner Fließgeschwindigkeit von 5 m l/min wurde di e h ypertone B adlösung dur ch di e h ypotone Badlösung substituiert. Wenn möglich, wurde das Experiment bis zum Erreichen der maximalen Aktivierung *(steady s tate)* des C hloridstroms aufgezeichnet, w obei al le 5 Minuten die S tromintensität (mittels IV-Protokoll) abgeleitet wurde. Zwischen de n IV-Protokollen w urden S weeps-Protokolle (2.7) angelegt um de n V ersuchshergang aufzuzeichnen und kons tant z u kont rollieren. Der *"steady s tate"* der m aximalen Aktivierung galt a ls e rreicht, w enn de r S trom f ür m indestens e ine Minute be i gleicher Intensität blieb

2.4 Der E ffekt v erschiedener Gallensalze a uf den ba salen Chloridstrom in Hepatozyten

Bei de n folgenden V ersuchsreihen s ollte d er E ffekt d es proapoptotischen Gallensalzes TLCS (Taurolithocholat), des an tiapoptotischen G allensalzes TUDC (Tauroursodesoxycholat) und de s G allensalzes T C (Taurocholat), w elches w eder Apoptose i nduziert noc h j ener entgegenwirkt, auf den ba salen C hloridstrom untersucht w erden. Hierzu wurden isolierte Hepatozyten der Ratte in verschiedenen Versuchsreihen m it d en u nterschiedlichen Gallensalzen stimuliert u nd d ie Chloridströme über die Plasmamembran, wie zuvor beschrieben (2.3), abgeleitet. Zu jeder V ersuchsreihe w urde ei ne S erie K ontrollexperimente m it d em j eweiligen Lösungsmittel ohne G allensalz durchgeführt. Die Gallensalze T LCS u nd T UDC wurden im Lösungsmittel DMSO und TC in isotoner Extrazellulärlösung gelöst.

Alle i n di esem A bschnitt be schriebenen E xperimente w urden unt er i sotonen Bedingungen durchgeführt.

Im Folgenden sind die einzelnen Versuchsreihen detailliert dargestellt:

1) Extrazelluläre Applikation:

In di eser V ersuchsreihe w urde zunächst de r "Whole-Cell"-Kontakt e rstellt und der Strom am Zeitpunkt 0' abgeleitet. Unmittelbar danach wurden 50 μ M des zu untersuchenden Gallensalzes zur isotonen Badlösung pipettiert. Somit wurde das Z ytoplasma vor de r Zugabe de s G allensalzes d urch d ie Pipettenlösung nahezu vol lständig verdünnt. Eine B eteiligung von zytosolischer S ignaltransduktion an e inem pot entiellen E ffekt kann da her weitgehend ausgeschlossen werden.

Zum extrazellulären Effekt von TLCS wurde zusätzlich die <u>Dosis-Wirkungs-Beziehung</u> untersucht. Die hierbei eingesetzten Konzentrationen (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) wurden innerhalb eines Experimentes alle 5 Minuten erhöht. Somit wurde der Effekt der jeweiligen Konzentration nach 5-minütiger Exposition gemessen. In den Kontrollexperimenten wurden entsprechend au fsteigende K onzentrationen d es Lösungsmittels DMSO (0,0001 % - 1 %) eingesetzt.

2) Intrazelluläre Applikation:

Durch Z ugabe des z u unt ersuchenden G allensalzes $(50 \mu \text{ M})$ zur Pipettenlösung, konnt e e ine (Transporter-unabhängige) i ntrazelluläre Stimulation der Plasmamembran mit dem jeweiligen Gallensalz stattfinden.

3) <u>30 Minuten Stimulation:</u>

In di eser V ersuchsreihe w urden di e i solierten H epatozyten 24 Stunden kultiviert und vor den elektrophysiologischen Ableitungen 30 Minuten mit 50 μ M T LCS vor inkubiert (bei 37°C, 5 % C O₂ und 100 % r elativer Luftfeuchtigkeit). D iese A rt d er Stimulation lie ß e ine Beteiligung z ytoplasmatischer S ignaltransduktion an ei nem p otentiellen E ffekt d es G allensalzes zu. TUDC und TC wurden in dieser Weise nicht getestet.

Wenn möglich, wurden alle Experimente (ausgeschlossen jene der Dosis-Wirkungs-Beziehung) über 15 Minuten aufgezeichnet und mit dem Chloridkanalblocker NPPB beendet.

2.4.1 Der Effekt von extrazellulär ap pliziertem TLCS auf de n schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten

Wie bei den vorherigen Versuchsreihen, wurden die zu untersuchenden Hepatozyten, 24 - 48 S tunden be vor di e E xperimente s tattfanden, isoliert u nd bi s z u de n Messungen kultiviert (bei 37°C, 5 % CO2 und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit). Die "Whole-Cell"-Konfiguration wurde i n h ypertoner B adlösung erstellt. E s folgte di e erste Messung (Zeitpunkt 0') der Stromintensität mittels IV-Protokoll in hypertoner Badlösung. Nachdem d ie S tabilität d es S eals u nd d as A uftreten v on Leckströmen kontrolliert wurden, fand eine schnelle Substitution (5 ml/min) der Badlösung s tatt. Hierbei wurde die h ypertone Badlösung durch j ene h ypotone mit Hilfe e ines Perfusionssystems au sgetauscht. Nach E rreichen d er ma ximalen A ktivierung des Chloridstroms, als A ntwort a uf di e R eduktion de r extrazellulären Osmolarität, wurden 50 μ M TLCS zur hypotonen B adlösung pi pettiert. Nach 5-minütiger Exposition mit TLCS wurde die Stromintensität gemessen (mittels IV-Protokoll). In den Kontrollexperimenten wurde nach Erreichen der maximalen Aktivierung 5 % DMSO z ur Badlösung pipettiert und di e E ntwicklung des S troms gleichermaßen aufgezeichnet. Die B adlösung wurde erneut s ubstituiert. D ie T LCS-haltige (bzw. DMSO-haltige) hypotone Badlösung wurde durch frische, TLCS-freie (bzw. DMSO-freie) hypotone Badlösung ausgetauscht ("Wash-Out"). 5 Minuten nach Auswaschen des Gallensalzes aus der Badlösung wurde die Stromintensität erneut gemessen. Im Anschluss wurden 50 μ M N PPB z ur B adlösung pi pettiert und d as Experiment beendet.

2.5 Der E ffekt v on CD9 5-Ligand a uf den ba salen Chloridstrom in Hepatozyten

Des Weiteren sollte der Effekt des proapoptotischen Faktors CD95-Ligand (CD95L) auf den basalen Chloridstrom untersucht werden. Auch hierbei wurden verschiedene Versuchsreihen dur chgeführt. Zu j eder V ersuchsreihe wurde ei ne Serie von Kontrollexperimenten dur chgeführt, in denen die Zellen ausschließlich mit d em Enhancer de s C D95L behandelt wurden. Alle in d iesem A bschnitt b eschriebenen Experimente wurden unter i sotonen Bedingungen dur chgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Versuchsreihen detailliert dargestellt:

1) Extrazelluläre Applikation:

Entsprechend den Stimulationsprotokollen der Gallensalz-Experimente wurde zunächst ge testet, o b extrazellulärer CD95L ohne B eteiligung zytoplasmatischer S ignaltransduktion einen Effekt au f d en basalen Chloridstrom in Hepatozyten hat.

Hierzu wurde zunächst der "Whole-Cell"-Kontakt erstellt und der Chloridstrom bei Zeitpunkt 0' abgeleitet. Im Anschluss pipettierte man 1 00 ng/ml CD95L (+1 μ g/ml Enhancer) zur Badlösung. Die Stromintensität wurde nun alle 5 M inuten, mitte ls IV-Protokoll, ge messen. Der Chloridstrom über die Zeit wurde mit Hilfe der Sweeps-Protokolle verfolgt.

2) <u>30 Minuten Stimulation:</u>

Die isolierten Hepatozyten wurden 24 Stunden kultiviert und unmittelbar vor den elektrophysiologischen Messungen für 30 Minuten mit 100 ng/ml CD95L (+1 μ g/ml Enhancer) unter Zellkulturbedingungen (bei 37°C, 5 % CO2 und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert. Die Zellen wurden nun in die

Messkammer, gefüllt m it i sotoner B adlösung, übe rführt und di e Chloridströme abgeleitet. Die Stromintensität wurde alle 5 M inuten, mittels IV-Protokoll, gemessen. Der Chloridstrom über die Zeit wurde mit Hilfe der Sweeps-Protokolle verfolgt.

3) <u>16 – 24 Stunden Stimulation:</u>

Die is olierten H epatozyten w urden f ür 24 Stunden kul tiviert und i m Anschluss über N acht (16-24 S tunden) m it 100 ng /ml C D95L ($+1 \mu$ g/ml Enhancer), unter Z ellkulturbedingungen, vorinkubiert. Die el ektrophysiologischen Messungen fanden, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, statt.

Wenn möglich, wurden alle Experimente über 15 M inuten aufgezeichnet und m it dem Chloridkanalblocker NPPB beendet.

2.5.1 Der Effekt von C D95-Ligand auf den schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten

Die z unächst 24 S tunden kultivierten H epatozyten w urden übe r N acht (16 – 24 Stunden) mit 100 n g/ml CD95L (+1 μ g/ml E nhancer) unt er Zellkulturbedingungen stimuliert. Der "Whole-Cell"-Kontakt wurde in hypertoner B adlösung erstellt. Das erste I V-Protokoll w urde a ngelegt und di e Chloridströme unter hy pertonen Bedingungen g emessen. Nun w urde di e h ypertone B adlösung m it j ener hypotonen substituiert (5 m l/min). Ein Experiment wurde bis z um E rreichen d er m aximalen Aktivierung (steady s tate) de s C hloristroms a ufgezeichnet. Die S tromintensität wurde alle 5 M inuten, mittels IV-Protokoll, gemessen. D er C hloridstrom über di e Zeit wurde mit Hilfe der Sweeps-Protokolle verfolgt.

Für die Kontrollexperimente wurden die Hepatozyten über Nacht (16 – 24 Stunden) mit 1 μ g/ml E nhancer d es Liganden i nkubiert. Jedes Experiment wurde n ach Erreichen der maximalen Aktivierung des Chloridstroms durch Zugabe von 50 μ M NPPB zur B adlösung be endet. Dieser P unkt g alt als erreicht, wenn der Strom für mindestens eine Minute bei gleicher Intensität lag.

2.6 Messung der ba salen Chlo ridleitfähigkeit in HEK293 Phoenix-Zellen

Um die basale Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran von Hepatozyten mit derer anderer Zelltypen vergleichen zu können, wurden die Chloridströme in den Zellen einer hum anen, embryonalen N ieren-Zelllinie, H EK293 P hoenix-Zellen *(human embrional kidney)*, abgeleitet. Hierzu wurden die H EK293 P hoenix-Zellen, wie in 2.2 beschrieben, präpariert und in die Messkammer, gefüllt mit isotoner Badlösung, transferiert. N un wurde e in s tabiler " Whole-Cell"-Kontakt hergestellt und di e Chloridströme, durch A nlegen de s IV-Protokolls, g emessen. D ie Zugabe d es Chloridkanalblockers NPPB stellte sicher, d ass es s ich b ei d en au fgezeichneten Strömen um Chloridströme über Ionenkanäle und nicht um Leckströme handelte.

2.7 Stimulationsprotokolle f ür die Patch-Clamp-Experimente

IV-Protokoll:

Von einer initialen Klemmspannung von 0 m V wurden Impulse von 500 ms Dauer appliziert. Diese Impulse s tarteten b ei ei nem n egativen P otential v on -120 m V, erhöhten sich in Schritten von j e 20 m V und e ndeten bei einem positiven Potential von +100 mV.



Sweeps-Protokoll bei + 40 mV:

Von e iner intialen Klemmspannung von 0 m V w urde ein Impuls v on + 40 m V angelegt und für 400 ms gehalten. Dieser Impuls wurde alle 20 S ekunden gegeben bis es durch das IV-Protokoll unterbrochen wurde.

2.8 Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente

Lösungen für Experimente unter isotonen Bedingungen:

Pipettenlösung (Intrazellulärlösung):		
125mM	CsCl	
5mM	MgCl ₂	
25mM	Raffinose	
11mM	EGTA	
10mM	HEPES	
2mM	ATP-Mg ²⁺	
рН 7.2		
Osmolarität: 310 mOsm		

Isotone Badlösung (Extrazellulärlösung):

125mM	NaCl	
2.5mM	MgCl ₂	
2.5mM	CaCl ₂	
10mM	HEPES	
50mM	Mannitol	
рН 7.4		
Osmolarität: 310 mOsm		

Lösungen für Experimente unter hypertonen/hypotonen Bedingungen:

Pipettenlösung (Intrazellulärlösung):

125mM	CsCl	
5mM	MgCl ₂	
50mM	Raffinose	
11mM	EGTA	
10mM	HEPES	
2mM	ATP-Mg ²⁺	
рН 7.2		
Osmolarität: 340 mOsm		

Hypertone Badlösung (Extrazellulärlösung):

125mM	NaCl	
2.5mM	MgCl ₂	
2.5mM	CaCl ₂	
10mM	HEPES	
100mM	Mannitol	
рН 7.4		
Osmolarität: 360 mOsm		

Hypotone Badlösung (Extrazellulärlösung):

125mM	NaCl	
2.5mM	MgCl ₂	
2.5mM	CaCl ₂	
10mM	HEPES	
рН 7.4		
Osmolarität: 260 mOsm		

2.9 Graphische und statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit angegebenen W erte z ur Stromintensität (ausgedrückt in p A) wurden zu Beginn des Impulses (IV-Protokoll), unter Ausschluss kapazitiver Effekte, abgeleitet. Die s o gewonnenen Werte jedes Einzelexperiments w urden mitte ls Division durch die Membran-Kapazität (ausgedrückt in pF) der entsprechenden Zelle normalisiert. S omit s ind alle W erte z ur S tromintensität dur ch die S tromdichte in pA/pF ausgedrückt. Hierbei ist das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung des Mittelwerts (**SEM**; *standard e rror of t he m ean*) einer V ersuchsreihe, mit **n** als Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente, angegeben. In den dargestellten Strom-Spannungs-Beziehungs-Grafen (IV-Graphen) wurden die S tromdichten (pA/pF) gegen d ie an gelegten Klemmspannungen aufgetragen. A uch hi er wurde i mmer da s arithmetische Mittel \pm Standardabweichung des Mittelwerts der Stromdichte (pA/pF) der Einzelexperimente (n) einer Versuchsreihe dargestellt. Der beim Anlegen des IV-Protokolls d irekt a bgeleitete S trom g ibt d ie S tromstärke (pA) ü ber d ie Z eit d es Impulses wieder und ist in Form der "Originalableitungen" dargestellt.

Die statistische Auswertung wurde mittels zweiseitigem Student t-Test für abhängige oder u nabhängige D atensätze durchgeführt. Eine I rrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5 \%$ mit *p < 0.05, $\alpha = 1 \%$ mit **p < 0.01 oder auch $\alpha = 0.1 \%$ mit ***p < 0.001 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Die prozentuale R eduktion der S tromintensität bei einer Klemmspannung von + 80 mV wurde durch die folgende Formel berechnet:

% der Hemmung = 100 – (I_{post-Stimulation}*100/I_{pre-Stimulation})

Hierbei ist I die elektrische Stromdichte bei +80 mV.

Die Z eitkonstante der I naktivierung wird definiert dur ch τ_{off} und gibt die Z eit in Millisekunden (ms) an, welche benötigt wird, um eine Verringerung der Stromdichte auf 36,8 % des ursprünglichen Wertes (welcher zu Beginn des Impulses gemessen

wurde) zu erreichen. Hierzu wird die Stromdichte (I) bei +80 und +100 mV mit der folgenden exponentiellen Funktion erster Ordnung idealisiert:

 $I(t) = a_0 + a_1 \exp(-t/\tau_{off})$

Die a ufgeführten τ_{off} -Werte s ind a ls arithmetisches M ittel ± SEM einer Versuchsreihe, mit n a ls A nzahl de r una bhängigen E inzelexperimente i n m s angegeben.

Die h alb-maximale E ffektkonzentration EC_{50} (half m aximal e ffect c oncentration) wurde a us den D osis-Wirkungs-Kurven berechnet. H ierzu wurde di e prozentuale Reduktion der Stromintensität sowie die prozentuale Reduktion von τ (τ_{off}) bei einer Klemmspannung von + 80 m V na ch S timulation m it de n getesteten T LCS-Konzentrationen (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M u nd 100 μ M) bestimmt, al s s emi-logarithmischer G raph d argestellt u nd mit e iner s igmoidalen Kurve interpoliert.

2.10 Reagenzien

Alle n icht au fgeführten Reagenzien wurden von Sigma-Aldich (Deutschland) oder Cabrex B io S cience (Italien) in de r höc hst möglichen Q ualität be zogen. Die Verbrauchsmaterialien wurden von E ppendorf (Italien) od er S arstedt (Österreich) bezogen.

TLCS (Taurolithocholat)	Sigma-Aldrich (Deutschland, T0512)
TUDC (Tauroursodesoxycholat)	Sigma-Aldrich(Deutschland,T0266)
TC (Taurocholat)	Sigma-Aldrich (Deutschland, T4009)
CD95-Ligand	Alexis (Deutschland)
Kollagenase Type II	Biochrom AG (Deutschland)
Williams Eagle Medium	GIBCO (Deutschland)

3 Ergebnisse

Die Isolierung de r H epatozyten aus der Leber von männlichen Wistar Ratten (Wildtyp) erfolgte, wie in 2.1 beschrieben, nach einem definierten Protokoll (Meijer et al., 1975). Die so gewonnenen Hepatozyten wurden nun bis maximal 48 Stunden in p rimärer Zellkultur g ehalten. Abbildung 3. 1 zeigt d ie lic htmikroskopische Aufnahme einer solchen Zellkultur mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen/ml.



Abbildung 3. 1: Primäre Zellkultur von Hepatozyten der Ratte. Die Zellen wurden mit einer D ichte von 500. 000Zell/ml a uf Kollagen-beschichtete K ulturschalen a usgesät und für 24 Stunden kultiviert (bei 37°C, 5 % CO_2 , und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Für di e e lektrophysiologischen M essungen w urden di e Zellen mit s ehr geringer Zelldichte (ca. 1200 Zellen/ml) a uf Kollagen-beschichtete D eckgläschen ausgesät. Dies w ar w ichtig, d a die Z ellen b ei d en Patch-Clamp-Messungen i n de r " Whole-Cell"-Konfiguration ke ine Kontakte untereinander a usbilden dür fen. A ndernfalls wäre ei ne Messung de r C hloridströme über d ie P lasmamembran ei ner ei nzelnen Zelle nicht möglich. Die Originalspuren wurden durch Anlegen des IV-Protokolls bei den an gegebenen Zeitpunkten ab geleitet u nd aufgezeichnet. Die e rste S trom-Spannungs-Beziehung w urde a m Z eitpunkt 0', unmittelbar n ach Erstellen d er "Whole-Cell"-Konfiguration, durch A nlegen de s IV-Protokolls a bgeleitet. Um d ie Stromintensität zu analysieren, wurde die Stromdichte (in pA/pF), durch die Division der ab geleiteten S tromstärke (in pA) durch d ie Membrankapazität d er u ntersuchten Zelle (in pF), bestimmt. A lle im T ext angegebenen mittleren S tromdichten w urden bei e iner K lemmspannung von + 80 m V a bgleitet. Die aufgezeichneten Ströme

Hepatozyten s ind p olarisierte Zellen, die unt er physiologischen Bedingungen e ine basolaterale (sinusoidale) u nd ei ne ap ikale (kanalikuläre) M embran besitzen. I n unseren Experimenten verlieren die Zellen ihre Polarität, sodass die in dieser Arbeit gemessenen Chloridströme jene über die gesamte Membran repräsentieren.

3.1 Charakterisierung der ba salen Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran von Hepatozyten

Zunächst sollte die basale Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran von Hepatozyten gemessen und charakterisiert werden. Dazu wurden die Chloridströme unter isotonen Bedingungen und ohn e Stimulation abgeleitet. Alle Experimente wurden mit einer symmetrischen C hloridkonzentration de r Intra- und E xtrazellulärlösung (Pipettenund B adlösung) durchgeführt. Da die Pipettenlösung frei von C a²⁺ und c AMP war und EGTA als Chelatbildner zweiwertiger Kationen eingesetzt wurde, konnte sicher gestellt w erden, d ass keine C alcium- oder cA MP-abhängigen C hloridströme gemessen w urden. D er starke, t ransiente K⁺-Strom w urde dur ch S ubstitution de s intrazellulären Kaliums durch Cäsium unterdrückt.

Der beim Anlegen des ersten IV-Protokolls direkt abgeleitete Strom ist in Abbildung 3.1. 1 durch die Originalspuren dargestellt. Es zeigte sich, dass der aufgezeichnete Chloridstrom di e bi ophysikalischen Eigenschaften d es s chwellungsaktivierten Chloridstroms, de s s ogenannten I Cl.swell oder VR AC (volume r egulated ani on *current*) aufwies. Dieser is t d efiniert d urch e ine Auswärtsgleichrichtung, e ine schnelle A ktivierung und eine p otenzialabhängige I naktivierung b ei K lemmspannungen über +40 mV (Paulmichl et al., 1992, Kubo et al., 1992, N ilius et al., 1994a, Ackerman et al., 1994, zur Übersicht Nilius et al., 1996, O kada, 2006). Die Namensgebung, Auswärtsgleichrichtung" r ichtet s ich n ach d er al lgemeinen Nomenklatur für Ionenströme/kanäle. Diese leitet sich von pos itiven Ionenströmen, d.h. Kationenströmen ab. Ein auswärtsgleichrichtender Ionenkanal ist de mnach ein Kanal, der bevorzugt positive Ladung in die Auswärtsrichtung, d.h. a us der Zelle heraus, be fördert. In Bezug a uf A nionen, w ie C hloridionen, be deutet a uswärtsgleichrichtend demnach in die entgegengesetzte Richtung, somit negative Ladung in die Zelle hinein. Betrachtet man die Orginalableitungen und den Strom-Spannungs-Beziehungs-Graphen (IV-Graphen), erkennt man einen deutlich stärkeren Strom bei positiven P otentialen. B ei pos itiven M embranpotentialen t endiert C hlorid z um Einstrom in die Zelle, um der Depolarisation entgegen zu wirken. Somit wird klar, dass es s ich b ei d em h ier g emessenen S trom u m ei nen a uswärts g leichrichtenden Chloridstrom handelt.

Wie der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph (IV-Graph) in Abbildung 3.1. 2 zeigt, konnte e ine h ohe b asale C hloridleitfähigkeit mit e iner mittle ren S tromdichte von $30,55 \pm 3,86$ pA/pF (n=11, bei +80 mV) gemessen werden.

Die Charakteristika des gemessenen Chloridstroms legen nahe, dass es sich hier um eine basal aktive Form des I_{Cl,swell} handelt (Paulmichl et al., 1992, Kubo et al., 1992, Nilius et al., 1994, A ckerman et al., 1994). In den meisten Zelltypen wird diese Art von C hloridstrom e rst na ch E rniedrigung de r e xtrazellulären O smolarität a ktiviert und ist unter i sotonen Bedingungen sehr gering (Nilius et al., 1994b, z ur Übersicht Nilius et al., 1996, Okada, 2006).



Abbildung 3. 1. 1: (A) Originalableitung des u nter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte. Dieser wurde nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts d urch Anlegen d es I V-Protokolls a bgeleitet. Der au fgezeichnete S trom zeigt d ie Charakteristika des schwellungsaktivierten Chloridstroms, wie eine Auswärtsgleichrichtung, eine schnelle Aktivierung u nd e ine p otentialabhängige I naktivierung ü ber d ie Z eit. (B) D as IV - Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.


Abbildung 3. 1. 2: Der S trom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert d ie mittleren Stromdichten bei den angelegten Klemmspannungen (IV-Protokoll) in Hepatozyten unter isotonen B edingungen. Die e rmittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen di e applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). Es wurde ein auswärts gleichrichtender Chloridstrom mit einer mittleren Stromdichte von 30,55 ± 3,86 pA/pF bei +80 mV (n=11) gemessen.

In der vor liegenden A rbeit wurden vergleichend H EK293 Phoenix-Zellen *(human embryonal k idney)* untersucht. Diese Zellen wiesen unter i sotonen B edingungen einen deutlich geringeren Strom auf. Dies zeigen sowohl die Originalableitungen in Abbildung 3.1. 3 sowie der IV-Graph in Abbildung 3.1. 4.

Die A uswertung von 5 Einzelmessungen (n=5) e rgab e ine du rchschnittliche Stromdichte von 6 ,08 ± 1,00 pA /pF (bei + 80mV) i n de n Zellen d ieser r enalen Zelllinie. Die statistische Auswertung (Student t-Test für u nabhängige Datensätze) ermittelte e inen s ignifikant h öheren (*p < 0,05, **p < 0,01 ode r ***p < 0,001) Chloridstrom i n H epatozyten i m V ergleich z u H EK293 P hoenix-Zellen unt er denselben isotonen B edingungen (Abbildung 3.1. 4). Dies führt z u de r Annahme, dass s ich di e hohe C hloridleitfähigkeit de r H epatozyten-Plasmamembran, w elche bereits von anderen Gruppen beschrieben wurde (Moule und McGivan, 1990, Li und Weinman, 2002), auf eine hohe Durchlässigkeit schwellungsaktivierter Ionenkanäle zurückführen lassen könnte.



Abbildung 3. 1. 3: (A) O riginalableitung des u nter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms in HEK293 Phoenix Zellen. Dieser wurde nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts durch A nlegen d es I V-Protokolls abgeleitet. D er ab geleitete S trom i st s ehr g ering (6.08 ± 1.00 pA/pF, be i +80mV, n=5). (B) D as IV-Protokoll i mplizierte K lemmspannungen von -120 mV bi s +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.



Abbildung 3.1. 4: Der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph repräsentiert die mittleren Stromdichten bei den angelegten Klemmspannungen (IV-Protokoll) in Hepatozyten und HEK293 Phoenix Zellen unter i sotonen B edingungen. Die er mittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden g egen di e applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). Der basale Chloridstrom ist in Hepatozyten signifikant höher als in HEK293 Zellen (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, s ind k eine * a ngegeben, u nterschieden s ich d ie D atensätze b ei d en a ngegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

3.2 Charkterisierung des schwellungsaktivierten Chloridstroms in Hepatozyten

Um die zuvor genannte Hypothese zu bestärken, wurden nun die Chloridströme nach Erhöhung bzw. nach Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität abgeleitet. Hierzu wurden di e z u unt ersuchenden Zellen z unächst in hypertone B adlösung überführt. Die S tromamplitude u nter hypertonen B edingungen wurde dur ch A nlegen des IV-Protokolls am Z eitpunkt 0' gemessen. Die Or iginalableitungen (Abbildung 3.2. 1) zeigen de utlich, da ss di e Erhöhung der ex trazellulären O smolarität (hypertone Badlösung) eine Hemmung des gemessenen Chloridstroms zur Folge hatte.



Abbildung 3. 2. 1: O riginalableitungen des un ter (A) hy pertonen un d un ter (B) hy potonen Bedingungen au fgezeichneten C hloridstroms i n is olierten Hepatozyten der R atte. D ie du rch Substitution der B adlösung erzeugte Reduktion d er ex trazellulären O smolarität führte zu ei ner schnellen Aktivierung d es g emessenen C hloridstroms. D ieser z eigte dieselben bi ophysikalischen Charakteristika wie der zuvor, unter isotonen Bedingungen, gemessene Strom. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Die mittlere Stromdichte unter hypertonen Bedingungen betrug $15,19 \pm 3,01$ pA/pF (n=9, bei +80 mV). Die darauf folgende Reduktion der extrazellulären Osmolarität (hypotone B adlösung) be wirkte e ine starke A ktivierung di eses C hloridstroms,

welcher nach nur 5 Minuten eine mittlere Stromdichte von $76,30 \pm 9,53$ pA/pF (n=9, bei +8 0 m V) e rreichte. Dieser S trom z eigte d ieselben b iophysikalischen Eigenschaften wie der unter isotonen Bedingungen gemessene Chloridstrom (3.1).

In Abbildung 3.2. 2: wurden die bei den verschiedenen Osmolaritäten gemessenen Stromdichten g emeinsam in e inem IV-Graph au fgetragen. D ie s tatistische Auswertung ergab eine s ignifikante E rhöhung de s g emessenen C hloridstroms, sowohl na ch R eduktion der extrazellulären Osmolarität von h ypertoner z u isotoner Badlösung (mit *p < 0,05 ode r **p < 0,01) als a uch von i sotoner z u hypotoner Badlösung (mit *p < 0,01 ode r ***p < 0,001). Dies b edeutet, d ass d er Aktivierungsstatus de s hi er gemessenen C hloridstroms a bhängig von der extrazellulären O smolarität w ar. Dies i st ein w esentliches M erkmal d er schwellungsaktivierten Chloridströme (zur Übersicht Nilius et al., 1996, S trange et al., 1996). Somit unterstützt das Ergebnis dieser Versuchsreihe die Hypothese, dass Hepatozyten unter i sotonen B edingungen e ine basal aktive F orm de s schwellungsaktivierten C hloridströms, I _{Cl,swell}, aufweisen und d ass di eser unt er anderem für die hohe Chloridleitfähigkeit der Hepatozyten-Plasmamembran (Moule und McGivan, 1990, Meng und Weinman, 1996, Jackson et al., 1996, zur Übersicht Li und Weinman, 2002) verantwortlich sein könnte.



Abbildung 3.2. 2: Der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph repräsentiert die mittleren Stromdichten bei den angelegten Klemmspannungen (IV-Protokoll) in Hepatozyten unter hypertonen, isotonen und hypotonen B edingungen. Die e rmittelten mittleren S tromdichten (pA/pF) wurden g egen d ie applizierten K lemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches M ittel + S EM). D ie Reduktion bzw. E rhöhung d er ex trazellulären O smolarität h at e ine s tatistisch s ignifikante H emmung bzw. Aktivierung d es gemessenen Chloridstroms z ur F olge (*p < 0, 05, **p < 0, 01, ***p < 0, 001, sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen K lemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

3.3 Gallensalze: Der Effekt der v erschiedenen Gallensalze auf die zuvor charakterisierten Chloridströme

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob und wenn ja, welchen Effekt die Gallensalze TLCS, TUDC und TC auf die zuvor charakterisierten Chloridströme unter i sotonen s owie unt er h ypotonen Bedingungen ha ben. E s wurden Versuchsreihen m it v erschiedenen Stimulationsprotokollen dur chgeführt. H ierzu gehörte s owohl e ine e xtrazelluläre al s au ch ei ne intrazelluläre S timulation d er Hepatozyten mit den drei verschiedenen Gallensalzen. Diese beiden Versuchsreihen sind so ausgerichtet, dass der direkte Effekt des Gallensalzes auf plasmamembranständige S trukturen od er de n K anal s elbst ohne B eteiligung z ytoplasmatischer Signaltransduktion getestet w ird. Die V orinkubation de r H epatozyten mit T LCS sollte einen potentiellen Effekt mit Beteiligung zytoplasmatischer Signaltransduktion aufdecken. Weiterhin wurde di e D osis-Wirkungs-Beziehung von extrazellulär appliziertem TLCS getestet.

3.3.1 Taurolithocholat (TLCS)

3.3.1.1 Der Effekt von ex trazellulär a ppliziertem TLCS a uf d en basalen Chloridstrom

Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, schloss das Protokoll dieser Versuchsreihe eine Beteiligung z ytoplasmatischer Signaltransduktion am gemessenen E ffekt aus. Dies bedeutete, da ss e ine Veränderung de r z uvor gemessenen C hloridströme au sschließlich durch eine Interaktion des Gallensalzes mit extrazellulären Bestandteilen der Z ellmembran hervorgerufen werden kon nte. Nachdem di e "Whole-Cell"-Konfiguration i n i sotoner B adlösung hergestellt und da serste IV -Protokoll aufgerufen wurde, folgte die Zugabe von 50 μ M TLCS zur Badlösung. Die Originalspuren, abgeleitet vor u nd 5 Minuten na ch de r A pplikation von T LCS, sind i n Abbildung 3.3.1. 1 dargestellt u nd zeigen ei ne deutliche Hemmung der S tromamplitude nach Zugabe des proapoptotischen Gallensalzes.



Abbildung 3.3.1. 1: Originalableitungen des unt er isotonen Bedingungen aufgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) vor und (B) 5 Minuten nach Zugabe von 50 μ M TLCS z ur B adlösung. TLCS hatte ei ne starke Reduktion der Stromamplitude un d e ine beschleunigte potentialabhängige Inaktivierung des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

TLCS verringerte den basalen Chloridstrom von $30,55 \pm 3,86$ pA/pF (n=11, bei +80 mV) vor d er S timulation auf 13,78 \pm 2, 52 p A/pF (n=11, be i +80 m V) na ch 5 minütiger, auf $14,94 \pm 3,35$ pA/pF (n=8, be i + 80 mV) nach 10-minütiger und a uf $12,50 \pm 3,89 \text{ pA/pF}$ (n=6, be i + 80 mV) na ch 15 -minütiger Exposition mit 50 μ M TLCS (Abbildung 3.3.1. 2). Dies entsprach einer Hemmung um 52 ± 9 % (n=11, bei +80 m V) d er i nitialen Stromdichte na ch nur 5 Minuten Stimulation mit TLCS (Abbildung 3.3.1.2 B). Die s tatistische A uswertung mitte ls S tudent t -Test (für abhängige Datensätze) ergab eine hochsignifikante (p < 0,01, n=11) Hemmung des basalen C hloridstroms durch ex trazellulär ap pliziertes TLCS. D er Maximaleffekt wurde bereits nach 5-minütiger Exposition erreicht (Abbildung 3.3.1. 2 A). Obwohl der hemmende Effekt von TLCS bei positiven Klemmspannungen höher war als bei negativen (Abbildung 3.3.1. 3A), ist die Hemmung bei negativen Klemmspannungen für di ese A rbeit von b esonderer Bedeutung. Dies e rgibt s ich da raus, da ss be i negativen Membranpotentialen der Ausstrom von Chlorid aus der Zelle gemessen wird. Eine Hemmung des Chloridefflux könnt e somit netto zu einer kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration führen.



Abbildung 3.3.1. 2: (A) Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Stromdichten bei +80 mV vor (n= 11) und na ch Zugabe von 50 μ M TLCS z ur i sotonen B adlösung (arithmetisches Mittel + S EM). Sowohl 5 (n=11), 10 (n=8) als auch 15 Minuten (n=6) nach der Zugabe von TLCS war der basale Chloridstrom signifikant gehemmt. Der Maximaleffekt war bereits nach 5-minütiger Exposition mit dem G allensalz er reicht. (B) D as B alkendiagramm zeigt d ie p rozentuale Hemmung de r Stromintensität (bei + 80 m V) 5 M inuten na ch Z ugabe von TLCS b zw. D MSO (Kontrolle) z ur Badlösung (arithmetisches Mittel + SEM). TLCS hemmte den basalen Chloridstrom um 52 \pm 9 % (**p < 0,01, ***p < 0,001).

In d en K ontrollexperimenten hingegen w urde ke ine s tatistisch s ignifikante Veränderung d es Chloridstroms na ch Zugabe von D MSO (0,5 % finale Konzentration i n de r Messkammer) gemessen. B eim A nlegen de s e rsten IV-Protokolls (vor der Zugabe von D MSO) wurde hier eine mittlere Stromdichte von $19,25 \pm 2,75$ pA/pF (n=7, bei +80 mV) abgeleitet. 5 Minuten nach Applikation des Lösungsmittels DMSO betrug di ese $19,13 \pm 4,34$ pA/pF (n=7, be i + 80 mV), n ach zehn Minuten 22,35 \pm 5,08 pA/pF (n=7, bei +80 mV) und nach 15 Minuten 27,62 \pm 6,97 pA/pF (n=6, bei +80 mV). Diese leichte Zunahme der Stromintensität ist nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.3.1. 3B) und ist be dingt durch eine spontane Aktivierung des I_{Cl.swell}, welche durch den hydrostatischen Druck der Pipettenlösung auf das Zellinnere in der "Whole-Cell"-Konfiguration zu er klären i st. Eine solche Aktivierung wurde bereits von verschiedenen Gruppen beschrieben (Sarota, 1992, Hagiwara et al., 1992, Zhang und Lieberman, 1996, zur Übersicht Baumgartner und Clemo, 2003). Aus Abbildung 3.3.1. 3B wird deutlich, dass die Zugabe von DMSO (Kontrolle) keinen Effekt auf die Stromintensität hatte.





Abbildung 3. 3.1. 3: D ie S trom-Spannungs-Beziehungs-Graphen r epräsentieren d ie u nter i sotonen Bedingungen gemessenen Chloridströme in (A) T LCS-stimulierten (50 μ M) H epatozyten und (B) Kontroll-Hepatozyten (0,5 % DMSO). Die ermittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen die ap plizierten K lemmspannungen (mV) au fgetragen (arithmetisches M ittel + S EM). (A) D ie Zugabe von 50 μ M TLCS zur Badlösung hatte eine signifikante H emmung des z uvor ge messenen Chloridstroms z ur F olge. Dieser E ffekt z eigte s ich bei p ositiven a ls a uch b ei ne gativen Klemmspannungen(*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). (B) Die Zugabe von DMSO zur Badlösung (Kontrollexperimente) ha tte keinen signifikanten E ffekt (n=7) auf d en b asalen Chloridstrom in Hepatozyten (sind ke ine * angegeben, u nterschieden s ich d ie Datensätze b ei d en a ngegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

Eine w eitere Versuchsreihe z eigte, d ass de r E ffekt von T LCS a uf di e von uns gemessenen C hloridströme komplett r eversibel war (Abbildung 3.3.1. 4). In di eser Versuchsreihe wurde z unächst e ine in itiale mittle re Stromdichte von 15. 67 ± 1.74 pA/pF (n=9, at +80 mV) gemessen. 5 Minuten nach Applikation von 50 μ M TLCS zur i sotonen B adlösung w ar di ese a uf 9.82 ± 1.34 pA /pF (n=9, be i + 80 m V) reduziert. D ie S ubstitution de r T LCS-haltigen Badlösung dur ch n eue, TLCS-freie isotone B adlösung reaktivierte de n C hloridstrom a uf e ine mittlere Stromdichte von 23.45 \pm 3.32 pA /pF (n=9, bei + 80 m V). S omit w ar di e S tromdichte nach d em "Auswaschen" d es G allensalzes au s d er B adlösung höher a ls zu B eginn de s Experiments (Abbildung 3.3.1. 4).



Abbildung 3.3.1. 4: Das Liniendiagramm stellt die mittleren Stromdichten bei +80 mV vor Zugabe des Gallensalzes (isotone Badlösung) und nach 5-minütiger Exposition mit TLCS sowie 5 Minuten nach Substitution der Badlösungen ("Wash-Out") dar (arithmetisches Mittel \pm SEM). Es zeigte sich erneut, dass die 5-minütige Stimulation der Hepatozyten mit 50 μ M TLCS eine starke Hemmung des basalen C hloridstroms z ur Folge h atte. D er "Wash-Out" d es G allensalzes f ührte zu ei ner Reaktivierung des gemessenen Chloridstroms (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Weiterhin konnte ein zweiter Effekt von TLCS ermittelt werden. Dieser bezieht sich auf die charakteristische potentialabhängige Inaktivierung des I_{CLswell} bei Potentialen positiver a ls + 40 m V. Dieses C harakteristikum wird dur ch di e Zeitkonstante de r Inaktivierung τ_{off} ausgedrückt, welche vor Zugabe von TLCS zur Badlösung 570,17 $\pm 167,38$ ms (n=6) bei +80 mV bzw. 706,50 $\pm 325,37$ ms (n=6) bei +100 mV betrug. 5 Minuten nach der Applikation des proapoptotischen Gallensalzes war dieser Wert auf 59,70 \pm 9,04 ms (n=6, bei +80 mV, p < 0,05) und 37,88 \pm 7,00 ms (n=6, bei +100 mV) gefallen. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte auch beim Vergleich von TLCS-stimulierten und Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 3.3.1. 5). Bei e iner K lemmspannung von +100 m V betrug τ_{off} in TLCS-stimulierten Hepatozyten $37,88 \pm 7,00$ ms (n=6) und 840.5 ± 227.31 ms (n=4) in Kontrollzellen. Bei +80 mV lag τ_{off} bei 59,70 ± 9,04 ms (n=6) in TLCS-behandelten und bei 577,50 \pm 136,64 m s (n=4) i n K ontroll-Hepatozyten. Die s tatistische A uswertung mitte ls Student t -Test f ür u nabhängige D atensätze er gab bei be iden Klemmspannungen einen signifikanten U nterschied (p < 0.01) in der I naktivierungskinetik zwischen TLCS-stimulierten Z ellen und Kontrollzellen. Die ermittelten Z eitkonstanten d er Inaktivierung sind in Abbildung 3.3.1. 5 dargestellt.



Abbildung 3.3.1. 5: Das Säulendiagramm zeigt die Zeitkonstanten der Inaktivierung vor und 5 Minuten nach Zugabe von TLCS b zw. D MSO (Kontrolle) zur B adlösung bei Klemmspannungen von + 80 mV un d +100 mV (arithmetisches Mittel + S EM). D ie 5 -minütige Stimulation mit TLCS hatte eine Beschleunigung d er p otentialabhängigen I naktivierung bei Klemmspannungen von +80 mV und + 100 mV zur Folge (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

3.3.1.2 Die Do sis-Wirkungs-Beziehung von TLCS auf de n basalen Chloridstrom

Diese V ersuchsreihe di ente de r U ntersuchung d er D osis-Wirkungs-Beziehung des TLCS-induzierten E ffekts auf de n ba salen Chloridstrom nach extrazellulärer Stimulation.

Hierzu wurde die Konzentration de s G allensalzes w ährend d er einzelnen Experimente in sieben Schritten erhöht (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M, n=7). Abbildung 3.3.1. 6 zeigt die Originalableitungen, welche nach jeweils 5-minütiger E xposition mit d er angegebenen TLCS-Konzentration aufgezeichnet wurden. Auch hier konnte eine Abnahme in der Stromamplitude sowie eine beschleunigte Inaktivierungskinetik beobachtet werden. Sichtbar wurden beide Effekte ab e iner K onzentration von 10 μ M TLCS m it s teigender A usprägung be i steigender ex trazellulärer TLCS-Konzentration. Die s tärkste R eduktion de r Stromintensität k onnte s omit b ei e iner e xtrazellulären K onzentration von 100 μ M TLCS gemessen werden. Hier betrug die Hemmung des Chloridstroms bei +80 mV Klemmspannung 58 ± 4 % (n=7).

Für d ie d etaillierte A uswertung d ieser V ersuchsreihe b ediente m an s ich d er Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven und der Berechnung des EC_{50} (half maximal effect concentration)-Wertes. Hierzu wurde zunächst die prozentuale Hemmung der Stromdichte s owie di e pr ozentuale R eduktion von τ_{off} bei + 80 m V f ür j ede Konzentration bestimmt. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung beider Effekte wurden nun in einem semi-logarithmischen Graphen aufgetragen und auf eine sigmoidale Kurve interpoliert (Abbildung 3.3.1. 7).



Abbildung 3. 3.1. 6: (A-H) Originalableitungen des u nter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms i n is olierten Hepatozyten der R atte nach j eweils 5 -minütiger S timulation mit d en angegeben TLCS-Konzentrationen. Es wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe von 0, 1 μ M bis 100 μ M TLCS verwendet. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration von TLCS auch die Effektstärke (Ausmaß der Hemmung und Reduktion von τ_{off}) zunahm. (I) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis + 100 mV i n S chritten von 20 mV. Jeder di eser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Die Auswertung ergab, dass beide Effekte dosisabhängig waren. Wie aus Abbildung 3.3.1. 7 ersichtlich is t, zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve des E ffekts auf τ_{off} eine größere Steigung (Abbildung 3.3.1. 7B) als jene der Reduktion der Stromamplitude (Abbildung 3.3.1. 7A). Der ermittelte EC₅₀ von 1,79 µM TLCS bestätigt, dass der Effekt auf die Inaktivierungskinetik bereits bei sehr geringen TLCS-Konzentrationen

auftrat. Im G egensatz da zu be durfte es zur H emmung der S tromintensität einer höheren Konzentration. Die halb-maximale Effekt-Konzentration (EC_{50}) betrug hier 31,7 μ M extrazellulär appliziert TLCS. In den Kontrollexperimenten (1 % DMSO) konnte kein signifikanter Effekt ermittelt werden.



Abbildung 3.3.1. 7: Die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen die Dosisabhängigkeit des TLCS-Effekts auf den basalen Chloridstrom in Hepatozyten unter i sotonen Bedingungen. (A) Prozentuale Hemmung der S tromdichte b ei +80 mV Klemmspannung. (B) Prozentuale Reduktion v on τ_{off} bei +80 mV Klemmspannung. Es z eigte sich, dass b eide E ffekte d osisabhängig waren (arithmetisches M ittel ± SEM, n=7). D ie Berechnung der E C₅₀-Werte e rgab, da ss di e R eduktion v on τ_{off} bereits b ei s ehr geringen K onzentrationen (EC₅₀=1,79 μ M) zu messen war. Die Hemmung der S tromintensität trat hingegen erst bei höherer TLCS-Konzentrationen (EC₅₀=31,7 μ M) auf.

3.3.1.3 Der Effekt von e xtrazellulär appliziertem TLCS a uf de n schwellungsaktivierten Chloridstrom

In d ieser V ersuchsreihe s ollte d er Effekt von T LCS a uf de n durch h ypoosmolare Stimulation a ktivierten C hloridstrom untersucht w erden. W ie be reits i n de r Versuchsreihe 3.2 zur Charakterisierung des schwellungsaktivierten Chloridstroms in Hepatozyten wurde d ie " Whole-Cell"-Konfiguration z unächst i n hypertoner Badlösung erstellt und der Chloridstrom durch Anlegen des ersten IV-Protokolls (bei Zeitpunkt 0') abgeleitet. Auch in dieser Versuchsreihe wiesen die Hepatozyten unter hypertonen Bedingungen e inen s ehr s chwachen Chloridstrom mit e iner mittleren Stromdichte von nur 9, 47 \pm 1,59 pA /pF (n=6, be i + 80 m V) auf. Die s chnelle Substitution (5 ml/min) der hypertonen Badlösung mit jener hypotonen bewirkte eine starke Aktivierung des I_{Cl,swell} (Abbildung 3.3.1. 8A, B und Abbildung 3.3.1. 9). Wie bereits in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschrieben, gehören zu den Charakteristika dieses Chloridstroms eine Auswärtsgleichrichtung, eine schnelle Aktivierung, eine potentialabhängige Inaktivierung (bei P otentialen pos itiver als + 40 mV), di e Aktivierung unt er hypotonen und die Inaktivierung unt er hypertonen Bedingungen (Paulmichl et al., 1992, Kubo et al., 1992, Nilius et al., 1994a und b, Ackerman et al., 1994, zur Übersicht Nilius et al., 1996, Okada, 2006). Nach Erreichen der maximalen Aktivierung konnte eine mittlere Stromdichte von $64,94 \pm 14,84$ pA/pF (n=6, bei +80 mV) gemessen werden. Dies entsprach einer statistisch signifikanten Erhöhung der Stromdichte (p < 0.05 oder p < 0.01, n=6) nach S ubstitution der Badlösungen (Abbildung 3.3.1. 9). D ie Z ugabe von 50 μ M T LCS z ur h ypotonen Badlösung bedingte eine starke Hemmung des Chloridstroms sowie eine Beschleunigung der Inaktivierungskinetik (Abbildung 3.3.1. 8C). 5 Minuten nachdem das Gallensalz zur hypotonen B adlösung p ipettiert w urde, betrug die mit tlere S tromdichte nur noch $38,46 \pm 13,24$ pA/pF (n=6, bei +80 mV). Dies entsprach einer Hemmung um 46 ± 9 % nach 5 -minütiger Exposition mit dem pr oapoptotischen G allensalz T LCS (Abbildung 3.3.1. 10). V erglichen mit den K ontrollexperimenten w ar di ese Hemmung statistisch signifikant (p < 0.05, be i + 80 mV, Abbildung 3.3.1. 10). Es konnte s omit g ezeigt werden, d ass T LCS a uch den dur ch H ypoosmolarität aktivierten Chloridstrom hemmt. Der Effekt war wiederum sowohl bei positiven als auch be i ne gativen M embranspannungen z u be obachten (p < 0.05 ode r p < 0.01, n=6). Dies gibt der IV-Graph in Abbildung 3.3.1. 9 wieder.

Um die Reversibilität des Effekts zu testen, wurde nach 5-minütiger Stimulation der Hepatozyten mit 50 μ M TLCS die Badlösung durch TLCS-freie hypotone Badlösung substituiert. Die E rgebnisse z eigten, d ass au ch d ie H emmung d es schwellungsaktivierten Chloridstroms e in r eversibler P rozess i st. Dies er klärt sich durch die erneute A ktivierung des Chloridstroms als Reaktion auf den "Wash-Out" des Gallensalzes aus der Badlösung. 5 Minuten nachdem TLCS aus der Messkammer entfernt wurde, konnte eine mittlere Stromdichte von 87,28 ± 25,67 pA/pF (n=4, bei +80 m V) g emessen werden. Dies en tsprach einer s tatistisch s ignifikanten Reaktivierung (p < 0,05, n=4) des Chloridstroms.

Die Hepatozyten der Kontrollexperimente zeigten zunächst die gleiche Reaktion auf die R eduktion der e xtrazellulären O smolarität. A uch hi er konnt e e ine s ignifikante Aktivierung (p < 0,01, n=5), von einer mittleren Stromdichte von $16,7 \pm 5,36$ pA/pF (n=5, bei +80 mV) unter hypertonen Bedingungen auf $48,47 \pm 7,55$ pA/pF (n=5, bei +80 mV) b ei ma ximaler A ktivierung unter h ypotonen Bedingungen, g emessen

werden (Abbildung 3.3.1. 9A Abbildung 3.3.1. 10A). Die Zugabe von 0,5 % DMSO zur Badlösung hatte keine Modifizierung des gemessenen Chloridstroms zur Folge. 5 Minuten na chdem D MSO z ur h ypotonen Badlösung pi pettiert w urde, konnte e in Strom mit einer mittlerer D ichte von $43,58 \pm 7,77$ pA /pF (n=5, be i + 80 m V) abgeleitet w erden (Abbildung 3.3.1. 9B). D ies e ntspricht k einer s ignifikanten Veränderung der Stromintensität durch das Lösungsmittel DMSO.



Abbildung 3. 3.1. 8: O riginalableitungen de s un ter (A) hy pertonen un d un ter (B) hy potonen Bedingungen s owie (C) 5 Minuten n ach Zugabe v on 50 μ M T LCS z ur hypotonen B adlösung aufgezeichneten C hloridstroms i n is olierten H epatozyten der R atte. D ie d urch S ubstitution d er Badlösung erzeugte Reduktion der extrazellulären Osmolalität führte zu einer schnellen Aktivierung des gemessenen Chloridstroms. Nach Erreichen der maximalen Aktivierung bewirkte die 5-minütige extrazelluläre S timulation mit T LCS eine R eduktion d er S tromamplitude u nd ei ne b eschleunigte Inaktivierung d es basalen Chloridstroms. (C) D as a ngelegte I V-Protokoll impliziert K lemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wird für eine Dauer von 500 ms gehalten.





Abbildung 3.3.1. 9: Die S trom-Spannungs-Beziehungs-Graphen repräsentieren die mittleren Stromdichten bei den angelegten Klemmspannungen (IV-Protokoll) in Hepatozyten unter hypertonen und hy potonen B edingungen m it a nschließender S timulierung mit (A) T LCS bz w. (B) D MSO (Kontrolle). D ie e rmittelten mittleren S tromdichten (pA/pF) wurden gegen d ie applizierten Klemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches Mittel + S EM). In b eiden V ersuchsreihen (A und B) hatte die Erniedrigung der extrazellulären Osmolalität eine statistisch signifikante Aktivierung des ge messen C hloridstroms z ur F olge (*p < 0, 05, **p < 0, 01). D ie Z ugabe v on T LCS, nach Erreichen der maximalen Aktivierung, bewirkte nach 5 Minuten eine signifikante Hemmung des zuvor gemessenen Chloridstroms (*p < 0, 05, **p < 0, 01, ***p < 0, 001). In den Kontrollexperimenten wurde nach Erreichen der maximalen Aktivierung des Chloridstroms unter hypotonen B edingungen DMSO (0,5 %) z ur B adlösung p ipettiert. D ie 5 -minütige E xposition z u d em Lösungsmittels hatte k einen Effekt a uf d ie S tromintensität d es schwellungsaktivierten C hloridstroms (sind ke ine * a ngegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).



Abbildung 3. 3.1. 10: (A) D as L iniendiagramm s tellt d ie m ittleren S tromdichten b ei + 80 m V b ei maximaler Aktivierung i n hypotoner B adlösung, nach 5 -minütiger E xposition z u T LCS (50 μ M) sowie 5 M inuten nach S ubstitution d er B adlösungen d urch T LCS-frei L ösung ("Wash-Out") dar (arithmetisches Mittel ± SEM). Es zeigte sich, dass die Stimulation der Hepatozyten mit 50 μ M TLCS eine starke Hemmung (45,81 ± 8,86 %, bei +80 mV, **p < 0,01, n=6) des aktivierten Chloridstroms zur F olge hatte. D er "Wash-Out" d es G allensalzes f ührte zu ei ner R eaktivierung d es ge messenen Chloridstroms (*p < 0, 05, n=4). (B) D as Säulendiagramm z eigt d ie p rozentuale H emmung des Chloridstroms (bei + 80 mV Klemmspannung) 5 M inuten na ch Zugabe von T LCS bzw. D MSO (Kontrolle) zur Badlösung (arithmetisches Mittel + SEM). TLCS hemmte den basalen Chloridstrom um 46 ± 9 % (p < 0,01, n=6).

Zusammenfassend konnt e beobachtet werden, dass a uch der dur ch hypoosmolare Stimulation aktivierte Chloridstrom durch 50 μ M TLCS stark gehemmt wurde. Dies geschah sowohl bei positiven als auch bei negativen Membranspannungen, sodass sowohl der Chloridinflux als auch der –efflux über die entsprechenden Chloridkanäle nach Exposition mit TLCS verringert werden können.

Die Z eitkonstanten der I naktivierung, τ_{off} , waren, ähnlich w ie unt er i sotonen Bedingungen, beeinflusst. Auch hier konnte eine deutliche Erniedrigung der τ_{off} -Werte nach Zugabe von TLCS gemessen werden. Eine 5-minütige Exposition hatte eine Reduktion von τ_{off} von 843,33 ± 394,28 m s (n=6) b ei +80 m V bz w. 588,6 ± 204,97 ms bei +100 mV (n=5) bei maximaler Aktivierung auf 91,6 ± 17,15 ms (n=6) bei +80 mV und 68,26 ± 4,02 ms (n=5) bei +100 mV zur Folge. Aufgrund der hohen Standartabweichungen konnte ke ine s tatistische S ignifikanz erreicht werden. Betrachtet man jedoch das Säulendiagramm in Abbildung 3.3.1. 11, ist eine deutliche Beschleunigung der potentialabhängigen Inaktivierung zu beobachten. Der Vergleich der D atensätze s timulierter H epatozyten und Kontrollzellen z eigte ei ne statistisch signifikante Reduktion (p < 0,01) von τ_{off} durch TLCS, sowohl bei +80 mV als auch bei +100 m V. In den Kontrollexperimenten wurden die τ_{off} -Werte von 1211,75 ± 352,52 m s (n=4) be i +80 m V und von 1561,2 ± 429, 3 m s (n=5) b ei +100 m V ermittelt. Abbildung 3.3.1. 13 zeigt die graphische Auswertung der ermittelten Werte in TLCS-stimulierten Hepatozyten und in Kontrollzellen.



Abbildung 3.3.1. 11: Das Säulendiagramm zei gt d ie Zeitkonstanten der Inaktivierung vor und 5 M inuten nach Zugabe von TLCS bzw. D MSO (Kontrolle) zur hy potonen B adlösung be i einer K lemmspannung von +80 mV und +100 mV (arithmetisches Mittel + S EM). D ie 5 -minütige Stimulation m it TLCS h atte e ine Beschleunigung de r pot entialabhängigen I naktivierung (**p < 0,01) bei Klemmspannungen von +80 mV und +100 mV zur Folge.

3.3.1.1 Der E ffekt v on i ntrazellulär appliziertem TLCS a uf de n ba salen Chloridstrom

Um zu untersuchen, ob die TLCS-induzierte Hemmung des Chloridstroms von der extra- oder von der intrazellulären Seite der Plasmamembran vermittelt wird, d.h. ob das G allensalz i n d ie Z elle t ransportiert w erden mu ss, um de n g ezeigten Effekt auszuführen, wurde T LCS (50 μ M) in di e Pipettenlösung gegeben. D ie "Whole-Cell"-Konfiguration w urde i n i sotoner Badlösung hergestellt. D ie TLCS-haltige Pipettenlösung strömte nun in die Zelle ein und vermischte sich mit dem Zytoplasma, sodass die H epatozyten intrazellulär mit d em G allensalz T LCS stimuliert w urden. Die Kontrollversuche wurden mit 0,5 % DMSO in der Pipettenlösung durchgeführt. In Abbildung 3.3.1. 12 sind d ie mittle ren S tromdichten, welche nach 5 -minütiger intrazellulärer Exposition abgeleitet wurden im IV-Graphen aufgetragen.



Abbildung 3.3.1. 12: Originalableitungen des unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms (A) na ch 5 M inuten intrazellulärer S timulation der H epatozyten mit T LCS (5 0 μ M) u nd (B) i n Kontrollzellen (0,5 % DMSO). Durch die Zugabe von 50 μ M TLCS zur Pipettenlösung wurden die Zellen intrazellulär m it dem G allensalz stimuliert. D iese Applikation h atte k eine M odifikation d er Amplitude ode r de r Charakteristika d es b asalen Chloridstroms z ur F olge. (C) D as a ngelegte I V-Protokoll im pliziert K lemmspannungen v on -120 mV bi s +100 mV i n S chritten von 20 mV. J eder dieser Impulse wird für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Stromintensität der TLCSbehandelten Zellen $(30,27 \pm 11,25 \text{ pA/pF}, n=8, \text{bei}+80 \text{ mV})$ und der Kontrollzellen $(32,46 \pm 8,3 \text{ pA} / \text{pF}, n= 10, \text{be} \text{ i} + 80 \text{mV})$ ermittelt w erden. Auch di e Originalableitungen, welche in Abbildung 3.3.1. 12 dargestellt s ind, zeigten k eine Modifikation der Amplitude und der Form des abgeleiteten C hloridstroms durch intrazelluläres TLCS.



Abbildung 3. 3.1. 13: D er Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert d ie unter i sotonen Bedingungen ge messenen C hloridströme i n Hepatozyten, w elche intrazellulär mit 5 0 μ M T LCS behandelt wurden und in Kontroll-Hepatozyten (0,5 % DMSO). Die dargestellten Ströme wurden 5 Minuten na ch E rstellung d er " Whole-Cell"-Konfiguration abgeleitet. D ie e rmittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden g egen di e a pplizierten K lemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). Die intrazelluläre Applikation von 50 μ M TLCS hatte keine signifikante V eränderung d es b asalen C hloridstroms i n H epatozyten zu r F olge (sind k eine * angegeben, u nterschieden sich d ie D atensätze b ei d en an gegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

In Übereinstimmung hiermit ergab die Berechnung der _{off}-Werte bei +80 mV und +100 m V ke ine s ignifikanten U nterschiede z wischen T LCS-behandelten Hepatozyten und K ontrollzellen (Abbildung 3.3.1. 14). 5 Minuten na ch Erstellung des " Whole-Cell"-Kontakts w urden i n den TLCS-behandelten Zellen die W erte $431,5 \pm 63,75$ ms (n=6, bei +80 mV) und $349,29 \pm 54,16$ ms (n=7, bei +100 mV) und in den Kontrollzellen die Werte $301,6 \pm 68,47$ ms (n=5, bei +80 mV) und $351,38 \pm 81,08$ ms (n=8, bei +100 mV) ermittelt (Abbildung 3.3.1. 14).



Abbildung 3. 3.1. 14: Das S äulendiagramm z eigt d ie Zeitkonstanten der I naktivierung nach 5 Minuten intrazellulärer Stimulation der Hepatozyten mit 50 µM TLCS b zw. DMSO (1 %, Kontrolle) bei +80 und +100 mV K lemmspannung. Die dargestellten W erte wurden 5 M inuten nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts be i +80 mV und +100 mV Klemmspannung abgeleitet (arithmetisches Mittel + SEM). Die Inaktivierungskinetik des basalen, unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms wurde durch die intrazelluläre Applikation d es G allensalzes nicht signifikant beeinflusst.

3.3.1.2 Der basale Chloridstrom nach 30 Minuten Stimulation mit TLCS

In de r l etzten V ersuchsreihe z um E ffekt von T LCS s ollte un tersucht w erden, welchen Einfluss eine S timulation von i ntakten H epatozyten a uf de n ba salen Chloridstrom ha t. H ierzu w urden zwölf Stunden al te H epatozyten, unter Zellkulturbedingungen (bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit), 30 Minuten mit 50 μ M T LCS inkubiert. D ie Zellen wurden anschließend in di e m it isotoner B adlösung gefüllte M esskammer üb erführt und e in "Whole-Cell"-Kontakt erstellt. M ittels di eser V ersuchsanordnung konnten nun Modifikationen de s Chloridstroms erfasst w erden, welche einer zytoplasmatischer S ignaltransduktion unterliegen.

Die Or iginalableitungen in Abbildung 3.3.1. 15 wurden dur ch A nlegen der IV Protokolle 5 Minuten nach E rstellen de s " Whole-Cell"-Kontakts in T LCSbehandelten (A) sowie in Kontrollzellen (B) abgeleitet. Wie deutlich zu erkennen ist, wurde auch hier eine Hemmung der Stromamplitude aufgezeichnet.



Abbildung 3. 3.1. 15: Originalableitungen des un ter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) nach 30 Minuten Vorinkubation mit 50 μ M TLCS unter Zellkulturbedingungen und (B) Kontrollzellen (30 Minuten 0,5 % DMSO). Die Ströme wurden 5 M inuten nach E rstellen d es "Whole-Cell"-Kontakts a bgeleitet. Die 30-Minuten-Vorinkubation mit 50 μ M TLCS hatte eine Hemmung der Stromamplitude des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

5 Minuten nachdem die Experimente gestartet wurden, konnte in TLCS-stimulierten Hepatozyten eine mittlere Stromdichte von $20,41 \pm 6,29$ pA/pF (n=6, bei +80 mV) und in Kontrollzellen von $30,34 \pm 6,74$ pA/pF (n=6, bei +80 mV) gemessen werden. Tendenziell konnt e s omit de r hemmende Effekt v on T LCS n ach ex trazellulärer Stimulation ohne V orinkubation (3.3.1.1) bestätigt w erden. Die s tatistische Auswertung mitte ls S tudent t -Test e rgab j edoch ke inen s ignifikanten Unterschied zwischen TLCS-vorinkubierten Zellen und Kontrollzellen.

Auch di e s pannungsabhängige Inaktivierung des C hloridstroms w ar i n dieser Versuchsreihe nicht signifikant verändert. Während in TLCS-stimulierten Zellen τ_{off} -Werte von 344,0 ± 57,12 ms (n= 4, be i +80 mV) und 227,00 ± 60,05 m s (n=4, be i +100 mV) ermittelt wurden, betrugen di ese in K ontroll-Hepatozyten 437,8 ± 67,05 ms (n=5, bei +80 mV) bzw. 328,0 ± 80,67 ms (n=6, bei +100 mV). Tendenziell ließ sich somit eine geringe B eschleunigung der Inaktivierung s owohl be i +80 mV als auch be i + 100 m V b eobachten. D ie s tatistische A uswertung e rgab j edoch ke ine signifikante M odifikation de r Inaktivierungskinetik na ch de r T LCS-Behandlung intakter Hepatozyten.



Abbildung 3.3.1. 16: Der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph repräsentiert die unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridströme in TLCS-stimulierten (50μ M) Hepatozyten und K ontroll-Hepatozyten (0,5% DMSO). Die frisch isolierten Zellen wurden zunächst 12 Stunden kultiviert und dann unter Zellkulturbedingungen mit 5 0 μ M T LCS f ür 30 M inuten in kubiert. D ie d argestellten Ströme wurden 5 M inuten n ach E rstellung de r " Whole-Cell"-Konfiguration a bgeleitet. D ie ermittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen die applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). Die Behandlung intakter Hepatozyten mit 50 μ M TLCS zeigte d ie T endenz d er R eduktion d er S tromintensität a ber k einen statistisch s ignifikanten Unterschied zur Stromintensität in den Kontrollzellen (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).



Abbildung 3. 3.1. 17: Das S äulendiagramm zeigt die Zeitkonstanten der Inaktivierung nach 30 Minuten Inkubation i ntakter H epatozyten mit 5 0μ ΜT LCS. Die dargestellten W erte w urden 5 Minuten nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontaks bei +80 mV und + 100 mV K lemmspannung abgeleitet (arithmetisches Mittel + SEM). Die Inaktivierungskinetik des b asalen, unter i sotonen Bedingungen gemessenen Chloridwurde d urch stroms diese Applikation des Gallensalzes nicht signifikant beeinflusst.

Zusammengefasst z eigten d ie v erschiedenen V ersuchsreihen, d ass d as proapoptotische Gallensalz TLCS in der Lage war sowohl den basalen als auch den schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten stark zu hemmen. Dieser Effekt wurde über extrazelluläre Komponenten der Plasmamembran vermittelt und bedurfte keinerlei z ytoplasmatischer S ignaltransduktion. Während na ch de r extrazellulären Stimulation ein sehr starker hemmender Effekt gemessen werden konnte, hatte die intrazelluläre A pplikation von T LCS keinerlei W irkung a uf de n ba salen Chloridstrom. D ie 30 -minütige Vorinkubation intakter Hepatozyten (unter Zellkulturbedingungen) mit dem proapoptotischen Gallensalz hatte keinen statistisch signifikanten E ffekt z ur F olge, z eigt j edoch t endenziell e ine R eduktion de r Stromintensität. Diese T endenz lässt s ich mit d er R eversibilität d es T LCS-Effekts erklären. Da die einzelnen Experimente der Versuchsreihe in einer Zeitspanne von 30 M inuten i n T LCS-freier B adlösung aufgezeichnet w urden, befanden s ich di e untersuchten Zellen zum Zeitpunkt der Messungen in unterschiedlichen Phasen der Reversibilität. D ies e rklärt weiterhin die hohe n Standardabweichungen des Mittelwerts in dieser Versuchsreihe.

3.3.2 Tauroursodesoxycholat (TUDC)

3.3.2.1 Der Effekt v on ex trazellulär a ppliziertem TUDC auf de n basalen Chloridstrom

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Effekt des antiapoptotischen Gallensalzes Tauroursodesoxycholat (TUDC) auf d en basalen, unt er i sotonen Bedingungen charakterisierten, Chloridstrom (3.1) u ntersucht und be schrieben. Hierzu w urde zunächst de r " Whole-Cell"-Kontakt i n i sotoner B adlösung aufgebaut und der Chloridstrom bei Zeitpunkt 0' (0 Minuten TUDC), d.h. vor Zugabe von TUDC (50 μ M) z ur B adlösung, ab geleitet. Die Or iginalableitungen in Abbildung 3.3.2. 1A zeigen den bereits unter 3.1 beschrieben auswärts gleichrichtenden Chloridstrom. Die mittlere Stromdichte bei +80 mV betrug 28,75 ± 4,75 pA/pF (n=15).



Abbildung 3.3.2. 1: Originalableitungen des unter i sotonen B edingungen aufgezeichneten C hloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) vor und (B) 5 Minuten nach Zugabe von 50 μ M TUDC zu Badlösung. TUDC hatte eine Reduktion der Stromamplitude des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll impliziert Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wird für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Die Zugabe von 50 μ M TUDC zur Extrazellulärlösung hatte eine schnelle Hemmung des gemessenen C hloridstroms z ur F olge (Abbildung 3.3.2. 1B). 5 Minuten nach Zugabe des Gallensalzes war die mittlere Stromdichte bei +80 mV auf 18,53 ± 2,58 pA/pF (n=15) r eduziert. Nach 10-minütiger Exposition mit TUDC blieb di ese bei einem W ert von 18,59 ± 2,59 pA/pF (n=14) annähernd g leich. Bereits 15 M inuten nach Zugabe des Gallensalzes konnte ein Rückgang des Effekts verzeichnet werden. Die mittlere Stromdichte stieg auf 21,79 ± 3,26 pA/pF (n=11), womit sie jedoch noch deutlich unter jener vor Zugabe von TUDC lag.





Abbildung 3. 3.2. 2: Die S trom-Spannungs-Beziehungs-Graphen r epräsentieren d ie u nter i sotonen Bedingungen ge messenen Chloridströme i n (A) T UDC-stimulierten (50 μ M) H epatozyten und (B) Kontrollzellen (0,5 % D MSO). D ie ermittelten mittleren S tromdichten (pA/pF) wurden gegen d ie applizierten K lemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches M ittel + S EM). (A) Die Z ugabe von 50 μ M T UDC zur B adlösung hatte e ine s ignifikante Hemmung des z uvor gemessenen Chloridstroms zur F olge. D ieser E ffekt zei gte s ich jedoch au sschließlich bei p ositiven Klemmspannungen (*p < 0, 05, **p< 0, 01, n=11). (B) D ie Zugabe von D MSO z ur B adlösung (Kontrollexperimente) hatte keinen signifikanten Effekt auf den basalen Chloridstrom in Hepatozyten (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

Die maximale Hemmung (Abbildung 3.3.2. 3A) wurde somit, wie im Fall von TLCS, bereits n ach 5 -minütiger Stimulation mit TUDC erreicht (p < 0,05, n=15, be i +80 mV). Die prozentuale Reduktion der Stromintensität bei +80 mV K lemmspannung ist in Abbildung 3.3.2. 3B dargestellt und be trug 28 ± 6 % (n=15). Verglichen mit der TLCS-induzierten Hemmung des Chloridstroms (52 ± 9 %, n=11, be i +80 mV) ist jene TUDC-induzierte Hemmung statistisch signifikant geringer (p < 0,05).

Betrachtete man nun einzeln die Ströme bei den verschiedenen Klemmspannungen (-120 m V bi s + 100mV, s iehe IV-Protokoll), zeigte s ich, dass eine Hemmung de r Stromintensität nur bei positiven Potentialen auftrat (p < 0,01 bei +20 mV, +40 mV, +60 m V und +100 m V, p < 0,05 be i +80 m V). D er IV-Graph, d argestellt in Abbildung 3.3.2. 2A, zeigt d ie mittle ren S tromdichten, bei d en v erschiedenen Klemmspannungen, vor und na ch Zugabe von T UDC z ur Badlösung. E s w ird deutlich, da ss be i ne gativen K lemmspannungen ke in E ffekt gemessen w erden konnte. D ieses M erkmal unterscheidet d en T UDC-induzierten hemmenden Effekt deutlich von j enem TLCS-induzierten hemmenden Effekt, w elcher s owohl be i positiven als auch bei negativen Membranspannungen zu beobachten war.

Auch in den Kontrollexperimenten wurde zunächst der Chloridstrom am Zeitpunkt 0' a bgeleitet. E rwartungsgemäß konnt e erneut der z uvor charakterisierte auswärts gleichrichtende Chloridstrom gemessen werden. Dieser wies eine mitt lere S tromdichte von 27, $47 \pm 2,17$ pA/pF (n=14, bei +80 mV) auf (Abbildung 3.3.2. 1B). Die Zugabe v on D MSO hatte ke ine s ignifikante M odifizierung d er S tromdichte z ur Folge. So wurde 5 Minuten nach Zugabe von D MSO eine mittlere Stromdichte von 27,02 ± 3,83 pA/pF (n=14, bei +80 mV) gemessen. Die Stromdichte stieg über die Zeit der Messungen leicht, aber nicht statistisch signifikant, an. Nach 10- und 15-minütiger E xposition wurde eine mittlere Stromdichte von 30.76 ± 5.37 pA /pF (n=10, bei +80 mV) bzw. 38.21 ± 8.0 pA /pF (n=8, bei +80 mV) gemessen. Dies

zeigte, dass das Lösungsmittel DMSO alleine keinen Effekt auf den in dieser Arbeit untersuchten Chloridstrom hatte.



Abbildung 3.3.2. 3: (A) Das Säulendiagramm zeigt die mittleren Stromdichten bei +80 mV vor und nach Zugabe von 50 μ M TUDC zur isotonen Badlösung (arithmetisches Mittel + SEM). 5 Minuten nach der Zugabe von TUDC war der basale Chloridstrom bei +80 mV Klemmspannung signifikant gehemmt (*p < 0,05, n=14). Sowohl 10 als auch 15 Minuten Exposition mit dem Gallensalz führten tendenziell zu einer Reduktion der Stromintensität. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant. (B) Das S äulendiagramm z eigt di e pr ozentuale H emmung de s C hloridstroms (bei + 80 mV) n ach 5 - minütiger, e xtrazellulärer S timulation mit T UDC b zw. D MSO (Kontrolle, a rithmetisches M ittel + SEM). TUDC hemmte den basalen Chloridstrom bei +80 mV Klemmspannung um 28 ± 6 % (*p < 0,05).

Åhnlich des TLCS-Effekts hatte auch TUDC eine veränderte Inaktivierungskinetik des gemessenen Stroms zur Folge. Auch hier konnte eine deutliche Beschleunigung der potentialabhängigen Inaktivierung bei +80 mV und +100 mV Klemmspannung gemessen werden (Abbildung 3.3.2. 4). Während die Zeitkonstante der Inaktivierung bei + 100 mV vor Zugabe von T UDC zur Badlösung 692,93 \pm 128,36 m s (n=14) betrug, war diese 5 Minuten nach Zugabe des Gallensalzes auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Wertes, auf 378,48 \pm 61,19 ms (n=14), gesunken. Betrachtet man die Inaktivierungskinetik bei +80 mV (Abbildung 3.3.2. 4), ist auch hier eine deutliche Verringerung von τ_{off} zu erkennen. Bei + 80 m V K lemmspannung w urde vor der Stimulation mit TUDC ein τ_{off} -Wert von 1360,14 \pm 673,71 m s (n=14) ermittelt. 5 Minuten na ch Zugabe v on TUDC z ur E xtrazellulärlösung betrug dieser 721,26 \pm 187,14 ms (n=14). Die sehr hohe Standartabweichung bedingt, dass die statistische Auswertung keine Signifikanz ergab.

Die Berechnung von τ_{off} in de n K ontrollexperimenten lässt ke inen E ffekt dur ch DMSO erkennen. Während der Wert bei +100 mV Klemmspannung vor der Zugabe von TUDC (669,46 ± 139,55 ms, n=14) geringfügig höher war als 5 M inuten nach der Zugabe (496,81 ± 101,8 ms, n=12), lag der Wert bei +80 mV Klemmspannung nach Z ugabe (1013,83 ± 259,58 m s, n= 12) leicht unt er j enem b ei Zeitpunkt 0' (649,64 ± 112,11 m s, n=14). Alle ermittelten τ_{off} -Wert s ind in Abbildung 3.3.2. 4 graphisch dargestellt.



Abbildung 3. 3.2. 4: Das S äulendiagramm zeigt die Zeitkonstanten der Inaktivierung bei den Klemmspannungen + 80 mV un d + 100 mV, vor un d 5 M inuten n ach Zugabe vo n T UDC b zw. D MSO (Kontrolle) z ur B adlösung (arithmetisches M ittel + S EM). Die 5 minütige S timulation mit T UDC hatte e ine B eschleunigung der potentialabhängigen I naktivierung bei K lemmspannungen von + 80 mV und + 100 m V (*p < 0, 05, n=14) zur Folge.

3.3.2.2 Der Effekt v on i ntrazellulär a ppliziertem TUDC auf de n basalen Chloridstrom

Die folgende V ersuchsreihe s ollte, g enau w ie bereits f ür T LCS g etestet (3.3.1.1) klären, ob TUDC s einen E ffekt extrazellulär o der in trazellulär v ermittelt. H ierfür wurde d ie P ipettenlösung mit 5 0 μ M T UDC v ersetzt. S omit v ereinigten s ich Zytoplasma und P ipettenlösung di rekt n ach E rstellen des "Whole-Cell"-Kontakts, wodurch eine in trazelluläre Exposition d er P lasmamembran mit 50 μ M T UDC stattfand. Die Kontrollexperimente wurden mit 0,5 % DMSO in der Pipettenlösung durchgeführt.

Wie d as p roapoptotische G allensalz T LCS zeigte auch d as antiapoptotische Gallensalz T UDC k einen E ffekt nach intrazellulärer Applikation. Die dargestellten Originalableitungen (Abbildung 3.3.2. 5) wurden 5 Minuten nach E rstellen des "Whole-Cell"-Kontakts gemessen und zeigen in T UDC-stimulierten H epatozyten und Kontrollzellen eine ähnlich Amplitude und Form.



Abbildung 3.3.2. 5: Originalableitungen des unter i sotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms (A) nach 5 Minuten intrazellulärer Stimulation mit TUDC (50 μ M) und (B) in Kontrollzellen (0,5 % DMSO). Durch die Zugabe von 5 0 μ M TUDC zur P ipettenlösung wurden di e H epatozyten intrazellulär mit d em G allensalz s timuliert. D iese B ehandlung h atte keine M odifikation d er Amplitude oder der Charakteristika d es b asalen C hloridstroms zu r F olge. (C) D as an gelegte I V-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Der IV -Graph in Abbildung 3.3.2. 6 bestätigt, dass es zu keiner Modifikation der Stromstärke durch intrazelluläres TUDC kam. Die statistische Auswertung der Daten mittels S tudent t -Test ergab k eine s ignifikanten U nterschiede z wischen T UDC-behandelten Zellen und Kontrollzellen. Die mittlere Stromdichte lag in den TUDC-stimulierten Hepatozyten be i 23,07 \pm 2,84 pA /pF (n=9, be i + 80 m V) und i n de n Kontrollzellen bei 20,28 \pm 4,32 pA /pF (n=6, be i + 80 m V). Diese V ersuchsreihe

konnte zeigen, dass intrazellulär appliziertes TUDC im Vergleich zu extrazellulärem TUDC keinen Effekt auf die Stromstärke des basalen, unter i sotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms hatte. Somit konnte die Annahme bestärkt werden, dass der TUDC-induzierte hemmende Effekt auf de n C hloridinflux (bei p ositiven Klemmspannungen) von d er extrazellulären S eite d er Plasmamembran v ermittelt wird.



Abbildung 3 .3.2. 6: Der S trom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert d ie unter i sotonen Bedingungen ge messenen Chloridströme in (A) intrazellulär TUDC-stimulierten (50 μ M) Hepatozyten und (B) K ontroll-Hepatozyten (0,5 % DM SO). Di e dargestellten S tröme w urden 5 Minuten n ach E rstellen d er " Whole-Cell"-Konfiguration abgeleitet. D ie e rmittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen d ie a pplizierten K lemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches M ittel + S EM). D ie intrazelluläre Applikation v on T UDC hatte keine s ignifikante Veränderung des basalen Chloridströms zur Folge (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

Zusätzlich ergab die Berechnung von τ_{off} bei den Klemmspannungen +80 und +100 mV keine signifikanten Unterschiede in der Inaktivierungskinetik TUDC-behandelter Hepatozyten und K ontrollzellen. E s konn te j edoch di e T endenz e iner Beschleunigung der Inaktivierung des Chloridstroms beobachtet werden (Abbildung 3.3.2. 7). Die entsprechenden τ_{off} -Werte wurden mit 379,63 ± 23,64 m s (n=8) b ei

+80 mV und 362,33 ±45,25 ms (n=9) bei +100 mV in den TUDC-behandelten Zellen bzw. $402,20 \pm 42,90$ m s (n=5) bei +80 mV und 257.75 ± 63.42 ms (n=4) bei +100 mV in den Kontroll-Hepatozyten berechnet (Abbildung 3.3.2. 7).



Abbildung 3. 3.2. 7: D as Säulendiagramm z eigt d ie Z eitkonstanten der In aktivierung na ch intrazellulärer S timulation d er H epatozyten mit 50 μ M TUDC sowie i n Kontrollzellen. Die d argestellten Werte w urden 5 M inuten na ch "Whole-Cell"-Erstellen des Kontaks bei +80 mV und +100 mV Klemmspannung a bgeleitet (arithmetisches Mittel + SEM). Die Inaktivierungskinetik d es b asalen Chloridstroms wurde du rch di e intrazelluläre Stimulation mit TUDC nicht signifikant beeinflusst. Die Tendenz einer Beschleunigung der I naktivierung konnte jedoch beobachtet werden.

Es konnt e gezeigt w erden, d ass d ie T UDC-induzierte Hemmung des basalen Chloridstroms v on d er extrazellulären S eite d er Plasmamembran v ermittelt w urde. Da d er E ffekt von T UDC a uftrat, nachdem de r " Whole-Cell"-Kontakt a ufgebaut wurde, ka nn d avon a usgegangen w erde, d ass e s s ich hi erbei um e ine di rekte Interaktion d es G allensalzes mit extrazellulären S trukturen d er M embran h andelte. Eine zytoplasmatische S ignaltransduktion konnte w eitgehend a usgeschlossen werden. D iese E igenschaften wurden bereits für d en T LCS-induzierten E ffekt gezeigt (3.3.1). Die H emmung des C hloridstroms b ei positiven K lemmspannungen war nach TCLS-Stimulation s ignifikant s tärker (p < 0, 05) a ls na ch TUDC-Stimulation.

Der grundlegende Unterschied beider E ffekte bestand darin, dass TLCS auch bei negativen K lemmspannungen hemmend auf den C hloridstrom wirkte, T UDC hingegen ausschließlich bei positiven Potenzialen diesen Effekt zeigte.

3.3.3 Taurocholat (TC)

3.3.3.1 Der Effekt v on ex trazellulär a ppliziertem TC auf de n ba salen Chloridstrom

Wie auch bei den zuvor getesteten Gallensalzen TLCS und TUDC wurde zunächst extrazelluläre Effekt von Taurocholat (TC) ohne die B eteiligung der zytoplasmatischer S ignaltransduktion auf de n ba salen C hloridstrom unt ersucht. Taurocholat w irkt, im G egensatz z u T LCS und T UDC, w eder pro- noch antiapoptotisch. Die erste Ableitung des Stroms bei Zeitpunkt 0'r epräsentiert die Chloridströme über die Plasmamembran vor der Stimulation der Zellen mit TC (0 Minuten TC) (Abbildung 3.3.3. 1A). Di e Zugabe von 50µ M T C zur i sotonen Badlösung hatte keinen Einfluss auf den gemessenen Chloridstrom (Abbildung 3.3.3. 1B). Di e Originalableitungen, welche v or und 5 Minuten na ch d er Zugabe des Gallensalzes aufgezeichnet wurden s ind in Abbildung 3.3.3. 1 dargestellt. Diese zeigen, d ass ex trazelluläres T C keine M odifikation der Stromamplitude oder der Charakteristika des basalen Chloridstroms hervorrief. Die mittleren Stromdichten bei den verschiedenen Klemmspannungen (IV-Protokoll) sind im I V-Graph i n Abbildung 3.3.3. 2 gezeigt. Sowohl in den TC-behandelten Hepatozyten als auch in den Kontrollzellen konnt e der für Patch-Clamp-Experimente in der "Whole-Cell"-Konfiguration t ypische, nicht s ignifikante Anstieg d er S tromstärke mit f ortschreitender Experimentdauer beobachtet werden.



Abbildung 3. 3.3. 1: Originalableitungen des unter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) vor und (B) 5 Minuten nach Zugabe von 50 μ M T C zu r B adlösung. D ie ex trazelluläre Applikation v on T C h atte k eine M odifikation d er Amplitude oder der Charakteristika d es b asalen C hloridstroms z ur F olge. (C) D as a ngelegte I V-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.





Abbildung 3. 3.3. 2: Die S trom-Spannungs-Beziehungs-Graphen r epräsentieren d ie u nter i sotonen Bedingungen g emessenen C hloridströme i n (A) T C-stimulierten (50μ M) H epatozyten und (B) Kontroll-Hepatozyten (0,5 % DMSO). Die ermittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen die applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). (A) Die Zugabe von 50μ M TC zur B adlösung hatte keine s ignifikante V eränderung der S tromintensität des zuvor gemessenen C hloridstroms zur Folge. (B) D ie Zugabe von DMSO zur Badlösung (Kontrollexperimente) h atte eb enfalls k einen E ffekt (n=7) au f den b asalen C hloridstrom. In be iden Versuchsreihen wurde mit steigender Versuchsdauer eine stetig steigende Stromintensität gemessen. Dieser Anstieg der Stromdichte war nicht signifikant (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

Die initiale Stromdichten bei +80 mV Klemmspannung betrug vor Zugabe von TC 19,65 \pm 3,10 pA/pF (n=6). 5 Minuten nach der Zugabe von TC stieg diese leicht auf 19,27 \pm 2, 69 pA /pF (n=6). N ach 10 - bzw. 15 -minütiger E xposition e rreichte s ie Werte von 23,08 \pm 3,21 pA/pF (n=4) bzw. 26,54 \pm 3,71 pA/pF (n=4) (Abbildung 3.3.3. 2A). In den K ontrollzellen 1ag die mittlere Stromdichte im Zeitpunkt 0' be i 21,95 \pm 3,55 pA/pF (n=6, bei +80 mV). Diese stieg auf 23,94 \pm 3,20 pA/pF (n=6, bei +80 mV) n ach 5-minütiger, auf 25,91 \pm 3,98 pA/pF (n=5, bei +80 mV) na ch 10-minütiger und auf 30,67 \pm 4,20 pA/pF (n=4) nach 15-minütiger Exposition mit dem Lösungsmittel (isotone E xtrazellulärlösung) (Abbildung 3.3.3. 2B). Die statistische Auswertung d er D aten mitte 1s Student t -Test er gab, d ass es w eder bei de n Experimenten mit T C-Stimulation noch bei d en K ontrollexperimenten z u einem signifikanten Anstieg der Stromdichte über die Zeit kam. Dieser Anstieg kann mit der s pontanen A ktivierung de s C hloridstroms i n de r "Whole-Cell"-Konfiguration erklärt werden (Sarota, 1992, Hagiwara et al., 1992, Zhang und Lieberman, 1996, zur Übersicht Baumgartner und Clemo, 2003) und war nicht signifikant.

Die Berechnung von τ_{off} und die Auswertung de r Inaktivierungskinetik de r gemessenen C hloridströme z eigten, d ass d ie ex trazelluläre S timulation mit Taurocholat ke ine M odifikation de r Inaktivierungskinetik zur F olge ha tte. I n Abbildung 3.3.3. 3 sind die mittleren τ_{off} -Werte bei +80 und + 100 m V jeweils vor und 5 Minuten nach der Zugabe des Gallensalzes bzw. des Lösungsmittels (isotone Extrazellulärlösung) d argestellt. In allen F ällen is t d ieser W ert z u B eginn d es Experiments et was s chwächer al s n ach 5 -minütiger P rogression der E xperimente. Bei Zeitpunkt 0' (vor der Zugabe von TC) wurde τ_{off} mit 588,8 ± 107,7 ms (n=5) bei +80 mV und mit 516,17 ± 130,66 ms (n=6) bei +100 mV Klemmspannung ermittelt. Nach 5-minütiger Exposition zu 50 μ M TC lagen diese Werte bei 794,67 ± 250,63 ms (n=6, be i +80 mV) bzw. 572,00 ± 214.84 m s (n=6, be i +100 mV). B ei di esen Daten handelte es sich nicht um signifikant unterschiedliche Werte. Dies bedeutete,
dass a uch di e Inaktivierungskinetik de s untersuchten C hloridstroms v on 50μ M extrazellulär a ppliziertem Taurocholat n icht mo difiziert w urde. D ie K ontrollzellen zeigten äh nliche K inetiken, s odass au ch z wischen T C-stimulierten u nd Kontrollzellen nach 5-minütiger Progression der Experimente keine Unterschiede zu beobachten waren (Abbildung 3.3.3. 3).



Abbildung 3. 3.3. 3: Das S äulendiagramm zeigt die Zeitkonstanten der Inaktivierung bei +80 mV und +100 m V Klemmspannung, vo r und 5 M inuten nach Zugabe v on TC b zw. DMSO (Kontrolle) zu r Badlösung (arithmetisches M ittel + S EM). D ie 5 -minütige extrazelluläre E xposition mit T C hatte keine M odifizierung der potentialabhängigen I naktivierung z ur Folge.

3.3.3.2 Der E ffekt v on intrazellulär a ppliziertem TC a uf d en basalen Chloridstrom

Schließlich wurde auch für das Gallensalz Taurocholat die intrazelluläre Applikation getestet. Durch Zugabe des Gallensalzes zur Pipettenlösung (50 μ M) vermischte sich diese n ach Erstellen de s " Whole-Cell"-Kontakts mit d em Z ytoplasma der Hepatozyten, sodass eine intrazellulär Stimulation der Zellen mit 50 μ M Taurocholat stattfand. In de n K ontrollexperimenten w urde die Pipettenlösung ohne Z usatz verwendet.

Nach 5 Minuten in trazellulärer Exposition mit 50 μ M T C w urde eine mittle re Stromdichte von 21,29 \pm 2,14 pA/pF (n=31, bei +80 mV) und in den Kontrollzellen von 19,99 \pm 2,64 pA/pF (n=24, bei +80 mV) gemessen (Abbildung 3.3.3. 5). Dieser Strom zeigte in beiden Versuchsreihen erneut die biophysikalischen Charakteristika des I_{Cl,swell} (Abbildung 3.3.3. 4). Intrazelluläres TC hatte somit keinen Effekt auf den basalen, unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridstrom in Hepatozyten.



Abbildung 3.3.3. 4: Originalableitungen des unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms (A) 5 Minuten nach intrazellulärer Applikation von TC (50μ M) und (B) in Kontrollzellen. Durch die Zugabe von 50 μ M TC zur Pipettenlösung wurden die Hepatozyten intrazellulär mit dem Gallensalz stimuliert. Diese Behandlung hatte keine Modifikation der Amplitude oder den Charakteristika des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden mit $330,57 \pm 36,26$ ms (n=23) bei +80 mV und $256,73 \pm 25,41$ (n=27) bei +100 mV in TC-behandelten Hepatozyten und mit $329,73 \pm 33,94$ ms (n=18) bei +80 mV bzw. $242,10 \pm 31,2$ ms (n=20) bei +100 mV in de n K ontrollzellen b estimmt. D ie e rrechneten Z eitkonstanten w urden in ei nem Säulendiagramm aufgetragen und sind in Abbildung 3.3.3. 6 dargestellt. Es konnte



keine signifikante Modifizierung de r Inaktivierungskinetik du rch 50 μ M intrazelluläres Taurocholat ermittelt werden (Abbildung 3.3.3. 6).

Abbildung 3. 3.3. 5: Der S trom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert d ie u nter i sotonen Bedingungen ge messenen Chloridströme in (A) intrazellulär T C-stimulierten (50μ M) H epatozyten und (B) K ontroll-Hepatozyten. D ie d argestellten S tröme wurden 5 M inuten nach Erstellen der "Whole-Cell"-Konfiguration abgeleitet. Die ermittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen die applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithemisches Mittel + SEM). Die intrazelluläre S timulation mit 50 μ M TC ha tte ke ine s ignifikante Veränderung des b asalen Chloridstroms in Hepatozyten zur Folge (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander)



Abbildung 3. 3.3. 6: Das S äulendiagramm z eigt d ie Zeitkonstanten der Inaktivierung nach intrazellulärer Stimulation d er H epatozyten mit 50 µM TC sowie in Kontrollzellen. Die dargestellten W erte wurden 5 Minuten n ach Erstellen d es "Whole-Cell"-Kontaks bei +80 mV und +100 abgeleitet mV K lemmspannung (arithmetisches M ittel + S EM). Die Inaktivierungskinetik d es basalen, unter i sotonen B edingungen ge messenen Chloridstroms wurde durch intrazellulär a ppliziertes T C nicht signifikant beeinflusst.

3.4 CD95-Ligand: Der Effekt von C D95-Ligand auf die zuvor charakterisierten Chloridströme

In d iesem T eil der A rbeit s ollte e in w eiterer, in H epatozyten proapoptotischwirkender Faktor untersucht werden. Ähnlich wie das hydrophobe Gallensalz TLCS aktiviert auch C D95L die C D95-abhängige A poptose-Kaskade (siehe E inleitung). Diese Kaskade w ird durch ei nen s chnellen A nstieg d er i ntrazellulären Chloridkonzentration un d di e da rauf folgende A zidifizierung früher en dosomaler Kompartimente aktiviert. Es sollte nun untersucht werden, ob CD95L in der Lage ist, Chloridkanäle in d er P lasmamembran so zu modulieren, dass es t emporär z um Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration kommen kann. Hierzu wurden drei verschiedene S timulationsprotokolle a ngewandt: 1) die extrazelluläre S timulation nach Erstellen des "Whole-Cell-Kontaks, 2) die Vorinkubation intakter Hepatozyten für 30 M inuten und 3) die Vorinkubation intakter Hepatozyten für 16 - 24 S tunden (über Nacht).

3.4.1 Der Effekt v on extrazellulär a ppliziertem CD95-Ligand auf den basalen Chloridstrom

Die er ste V ersuchsreihe u ntersuchte d en extrazellulären Effekt de s T odesliganden auf de n b asalen C hloridstrom unter de m A usschluss z ytoplasmatischer S ignaltransduktion. Die z uvor kul tivierten (24 – 48 Stunden) H epatozyten w urden in die mit i sotoner B adlösung gefüllte M esskammer üb erführt, de r "Whole-Cell"-Kontakt aufgebaut und di e Chloridströme dur ch Anlegen des IV-Protokolls bei Zeitpunkt 0' abgeleitet. Die Originalableitungen sind in Abbildung 3.4. 1A dargestellt und zeigen den typischen, in Ratten-Hepatozyten gemessenen basalen Chloridstrom, welcher die Charakteristika des I_{Cl,swell} aufweist. 5 Minuten nach Zugabe von 100 n g/ml CD95L (+ 1 µg/ml E nhancer d es Liganden) konnt e ke ine V eränderung d er S tromstärke gemessen w erden (Abbildung 3.4. 1B). Beide A bleitungen (Abbildung 3.4. 1) zeigten sowohl in ihrer Amplitude als auch in den Charakteristika des Chloridstroms große Ähnlichkeit.



Abbildung 3. 4. 1: O riginalableitungen des u nter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten C hloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) vor und (B) 5 Minuten nach Zugabe von 100 n g/ml CD95L ($+1\mu g/ml$ Enhancer) zur Badlösung. Die Applikation von CD95L nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts hatte keine Modifikation der Amplitude o der d er Charakteristika d es basalen Chloridstroms zur F olge. (C) D as angelegte I V-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph (Abbildung 3.4. 2A) zeigt die b ei Experimenten in de r " Whole-Cell"-Konfiguration oft gemessene, s pontane Aktivierung des I_{CLswell} (Sarota, 1992, Hagiwara et al., 1992, Zhang und Lieberman, 1996, zur Ü bersicht Baumgartner und C lemo, 2003). So s tieg die mittle re Stromdichte von i nitialen 29,77 \pm 12,11 pA /pF (n=8) über 31,66 \pm 12,73 pA /pF (n=8) nach 5 Minuten und $37,90 \pm 15,59 \text{ pA/pF}$ (n=7) nach zehn Minuten auf 48,75 ± 25,01 pA/pF nach 15 Minuten Stimulation mit CD95L (Abbildung 3.4. 2A). Dieser Anstieg der Stromdichte über die Zeit war jedoch nicht statistisch signifikant und konnte ebenfalls in den Experimenten der Kontrollserie gemessen werden. Nach der Exposition mit de m E nhancer de s C D95-Liganden (Kontrolle) s tieg d ie mittle re Stromdichte e benfalls le icht, aber n icht signifikant an (Abbildung 3.4. 2B). Auch diese schwache Aktivierung k ann als Effekt des "Whole-Cell"-Kontakts z wischen Zelle und Pipette angenommen werden (Sarota, 1992, Hagiwara et al., 1992, Zhang und Lieberman, 1996, zur Übersicht Baumgartner und Clemo, 2003). Weiterhin muss beachtet werden, dass aufgrund der geringen Anzahl an Einzelexperimenten (n) nach zehn und 15 M inuten Exposition mit CD95L die Standardabweichungen sehr hoch waren. Dieser Umstand erklärt sich durch den nicht kontrollierbaren und nicht gewünschten A bbruch de s, Whole-Cell"-Kontakts vor B eendigung e ines Experiments. Die hohen Standardabweichungen ließen keine verlässliche Aussage über den Effekt des Todesliganden nach zehn und nach 15 Minuten zu.



Abbildung 3. 4. 2: Die S trom-Spannungs-Beziehungs-Graphen r epräsentieren d ie u nter i sotonen Bedingungen gemessenen Chloridströme in (A) CD95L-behandelten (100 ng/ml + 1 μ g/ml Enhancer) Hepatozyten und (B) K ontroll-Hepatozyten (1000ng E nhancer). D ie e rmittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen di e a pplizierten K lemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). (A) Die Zugabe von CD95L zur Badlösung hatte keine signifikante Veränderung der Stromintensität des zuvor gemessenen Chloridstroms zur Folge. (B) Die Zugabe des Enhancers z ur B adlösung (Kontrollexperimente) hatte e benfalls keinen E ffekt a uf den b asalen Chloridstrom. In beiden Versuchsreihen wurde mit fortschreitender Versuchsdauer eine leicht steigende Stromintensität gemessen. Dies kann mit der spontanen Aktivierung des Chloridstroms in der "Whole-Cell"-Konfiguration erklärt werden und war nicht signifikant (sind keine * angegeben, unterschieden s ich d ie D atensätze bei de n a ngegebenen K lemmspannungen nicht s tatistisch signifikant voneinander).

Obwohl bereits vor Zugabe des Liganden, d.h. nach Ableitung des Stroms in isotoner Badlösung und ohne Stimulation, hohe Standardabweichungen bei den Experimenten auftraten, waren die mittle ren Stromdichten vor und 5 Minuten nach Zugabe von CD95L bei allen Klemmspannungen annähernd gleich (Abbildung 3.4. 2A). Somit konnte gezeigt werden, dass eine 5-minütige Stimulation mit C D95L keinen Effekt auf den basalen Chloridstrom hatte, wenn keine zytoplasmatische Signaltransduktion zugelassen wurde.

Die z uvor g etesteten G allensalze TLCS und TUDC hingegen führten ihren E ffekt ohne die Beteiligung z ytoplasmatischer S ignaltransduktion aus. Der Maximaleffekt wurde in beiden Fällen bereits nach 5-minütiger Exposition erreicht.

Die Berechnung der Zeitkonstanten der Inaktivierung vor und 5 Minuten nach der Stimulation m it C D95L z eigte, da ss a uch d ie Inaktivierungskinetik von de r Stimulation n icht beeinflusst wurde. S o w urden vor de r Z ugabe von C D95L die Zeitkonstanten 472,2 \pm 113,12 m s (n=5, be i +80 mV) und 1102,2 \pm 1179,11 m s (n=6, bei +100 mV) ermittelt. 5 Minuten na ch der Zugabe d es T odesliganden z ur Badlösung betrugen diese 695,0 \pm 204,94 ms (n=7) bei +80 mV und 699,5 \pm 296,26 ms (n=7) bei +100 mV Klemmspannung. Die hohe S tandardabweichung bei +100 mV Klemmspannung in der Versuchsreihe der CD95L-Stimulation (Abbildung 3.4. 3, er sten b eiden S äulen) ließ k eine verlässliche Auswertung der D aten zu. Die bei +80 mV Klemmspannung ermittelten τ_{off} -Werte zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zu jenen der Kontrollexperimente (Abbildung 3.4. 3).

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit CD95L, unter Ausschluss zytoplasmatischer Signaltransduktion, keine V eränderungen der Stromstärke oder der Charakteristika des basal aktiven Chloridstroms in Hepatozyten hervorruft.



Abbildung 3. 4. 3: Das S äulendiagramm zei gt d ie Zeitkonstanten der I naktivierung be i + 80 mV un d +100 mV Klemmspannung, vor und 5 Minuten na ch Zugabe von 100 ng/ml CD95L (+1 μ g/ml E nhancer) bzw. n ur E nhancer (Kontrolle) z ur Badlösung (arithmetisches M ittel + SEM). D ie 5 -minütige E xposition der is olierten H epatozyten mit d em Todesliganden hatte k eine M odifizierung d er p otentialabhängigen Inaktivierung bei +80 mV und +100 mV zur Folge.

3.4.2 Der b asale C hloridstrom n ach 30 M inuten S timulation mit CD95-Ligand

Da es sich bei CD95L um einen an den Rezeptor bindenden Liganden handelt, lag die Annahme nahe, dass ein potentieller Effekt zytoplasmatischer Signaltransduktion bedarf. D a di es i n de r z uvor be schriebenen V ersuchsanordnung (3.4.1) ausgeschlossen wurde, sollte in einer weiteren Versuchsreihe der Effekt von CD95L nach V orinkubation i ntakter H epatozyten untersucht w erden. H ierzu w urden di e primären Hepatozyten unt er Z ellkulturbedingungen 30 M inuten mit 1 00 n g/ml CD95L (+ 1 µg/ml Enhancer d es Liganden) i nkubiert. Im A nschluss w urden di e Zellen in die mit isotoner Badlösung gefüllte Messkammer überführt, die "Whole-Cell"-Konfiguration erstellt und die Chloridströme mittels IV-Protokoll abgeleitet. Nach 5 Minuten w urde e rneut ge messen. Abbildung 3.4. 4 zeigt d ie Originalableitungen die 5 Minuten n ach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts in C D95Lstimulierten (A) und Kontrollzellen (B) aufgezeichnet wurden. Jene Kontrollzellen wurden unmittelbar vor der Messung 30 Minuten mit dem Enhancer des Liganden (1 µg/ml) in kubiert. Die Ableitungen (Abbildung 3.4. 4) zeigen, dass die Stimulation von i ntakten H epatozyten ei ne s tarke Aktivierung d es ba salen C hloridstroms zur Folge hatte.



Abbildung 3. 4. 4: Originalableitungen des u nter i sotonen B edingungen a ufgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten (A) nach 30 M inuten Vorinkubation mit 100 ng/ml CD95L ($+1\mu$ g/ml Enhancer) und (B) in Kontrollzellen (30 Minuten, 1 µg/ml Enhancer). Die Ströme wurden 5 Minuten n ach Erstellen des "W hole-Cell"-Kontakts abgeleitet. Die 30-minütige Vorinkubation mit CD95L hatte eine starke Aktivierung des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Der in Abbildung 3.4. 5 dargestellte IV-Graph zeigt eine deutlich höhere Stromdichte in CD95L-stimulierten Hepatozyten ($28,24 \pm 3,45 \text{ pA/pF}$, n=26, bei +80 mV) als in Kontrollzellen ($18,61 \pm 2,60 \text{ pA}/\text{pF}$, n=25, be i + 80mV). D iese Aktivierung war statistisch s ignifikant (p < 0,05) und wurde s owohl be i pos itiven a ls a uch be i negativen K lemmspannungen gemessen (Abbildung 3.4. 5). Die Stimulation der Hepatozyten mit CD95L bewirkte somit eine Erhöhung der Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran au sschließlich dann, wenn z ytoplasmatische S ignaltransduktion zugelassen wurde.



Abbildung 3. 4. 5: Der S trom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert di e unt er i sotonen Bedingungen gemessenen C hloridströme i n C D95L-stimulierten (100 ng/ ml + 1 μ g/ml E nhancer) Hepatozyten und K ontroll-Hepatozyten (1 μ g/ml E nhancer). D ie f risch isolierten Z ellen wurden zunächst 1 2 Stunden kultiviert und d ann unter Z ellkulturbedingungen für 3 0 M inuten mit d em Todesliganden inkubiert. D ie d argestellten Ströme wurden 5 M inuten nach E rstellen der "Whole-Cell"-Konfiguration a bgeleitet. D ie e rmittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen d ie applizierten Klemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches Mittel + SEM). D ie 30–minütige Inkubation intakter Hepatozyten mit CD95L hatte eine starke Aktivierung des basalen Chloridstroms zur F olge (*p < 0, 05). Diese Aktivierung konnte sowohl b ei p ositiven a ls a uch b ei ne gativen Klemmspannungen gemessen werden (sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).

Die Inaktivierungskinetik de s ge messen C hloridstroms w urde j edoch durch di e Stimulation m it C D95L nicht be einflusst. In den C D95L-stimulierten H epatozyten wurden die Zeitkonstanten der Inaktivierung be i +80 mV mit 408,67 \pm 49,63 m s (n=12) und bei +100 mV mit 489,82 \pm 102,85 ms (n=17) berechnet. Diese betrugen in den Kontrollzellen 448,35 \pm 61,86 (n=14) und 324,13 \pm 46,46 ms (n=15), bei +80 bzw. +100 mV Klemmspannung. In Abbildung 3.4. 6 sind die berechneten τ_{off} -Werte in e inem S äulendiagramm graphisch da rgestellt. B ei + 100 m V K lemmspannung konnte e ine 1 eichte Tendenz z u ei ner C D95L-induzierten ve rlangsamten Inaktivierung ve rzeichnet w erden. B ei + 80 m V hi ngegen s chien ke ine T endenz vorhanden zu sein. Die statistische Auswertung ergab bei beiden Klemmspannungen keine signifikanten Unterschiede in der Inaktivierungskinetik in CD95L-inkubierten Hepatozyten und in Kontrollzellen.



Abbildung 3. 4. 6: Das S äulendiagramm z eigt d ie Z eitkonstanten der I naktivierung bei + 80 m V und +100 mV K lemmspannung nach 30minütiger I nkubation in takter Hepatozyten mit 100 ng /ml CD95L $(+ 1 \mu g/ml E nhancer)$ und v on Kontrollzellen (1 µg /ml E nhancer). Die d argestellten W erte wurden 5 Minuten nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontaks bei +80 mV und +100 mV K lemmspannung ab geleitet (arithmetisches M ittel + S EM). D ie Inaktivierungskinetik d es basalen Chloridstroms in Hepatozyten wurde durch die 30 -minütige S timulation nicht s ignifikant b eeinflusst. B ei +100 mV lag eine leichte Tendenz zu einer ve rlangsamten I naktivierung vor. D iese war j edoch statistisch nicht signifikant.

3.4.3 Der basale Chloridstrom nach 16 – 24 Stunden Stimulation mit CD95-Ligand

In ei ner w eiteren V ersuchsreihe w urde eine L angzeit-Stimulation der H epatozyten mit C D95L durchgeführt. H ierzu w urden di e Zellen unt er Zellkulturbedingungen über N acht (16 - 24 Stunden) mit d em T odesliganden (100 n g/ml) und de ssen Enhancer (1 µg/ml) inkubiert. In den K ontrollexperimenten wurden die Zellen ausschließlich mit dem Enhancer des Liganden (1 µg/ml) behandelt. Abbildung 3.4. 7 zeigt die ab geleiteten S tröme in C D95-stimulierten Hepatozyten (A) und Kontrollzellen (B), 5 Minuten nach E rstellen d es "Whole-Cell"-Kontakts, in F orm de r Originalableitungen. Diese weisen auf e ine A ktivierung d es ba salen C hloridstroms nach C D95L-Stimulation h in. Bei + 80 m V w urde in de n C D95L-stimulierten Hepatozyten e ine m ittlere S tromdichte von 34,6 1 ± 6,44 pA /pF (n=14) g emessen. Diese be trug i n d en K ontrollexperimenten l ediglich 22,67 ± 3,25 p A/pF (n=19). Obwohl d ie s tatistische A uswertung k eine s ignifikante E rhöhung d er mittle ren Stromdichte ergab, ist eine Tendenz der Aktivierung vorhanden (Abbildung 3.4. 8).



Abbildung 3. 4. 7: Originalableitungen des u nter i sotonen B edingungen au fgezeichneten Chloridstroms in isolierten Hepatozyten der Ratte (A) nach Inkubation über Nacht (16 - 24 Stunden) mit 100 n g/ml C D95L (+ 1 μ g/ml Enhancer) und (B) in Kontrollzellen (16 - 24 Stunden 1 μ g/ml Enhancer). Die Ströme wurden 5 Minuten nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts abgeleitet. Die Langzeit-Inkubation mit CD95L hatte eine Aktivierung des basalen Chloridstroms zur Folge. (C) Das angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.



Abbildung 3. 4. 8: Der S trom-Spannungs-Beziehungs-Graph r epräsentiert d ie unter is otonen Bedingungen gemessenen C hloridströme i n C D95L-stimulierten (100 ng/ml + 1 μ g/ml E nhancer) Hepatozyten und in Kontroll-Hepatozyten (1 μ g/ml E nhancer). Die frisch isolierten Zellen wurden zunächst 12 Stunden kultiviert und dann unter Zellkulturbedingungen über Nacht (16 - 24 Stunden) mit d em T odesliganden in kubiert. D ie dargestellten S tröme wurden 5 M inuten na ch E rstellen der "Whole-Cell"-Konfiguration abgeleitet. Die ermittelten mittleren Stromdichten (pA/pF) wurden gegen d ie a pplizierten K lemmspannungen (mV) a ufgetragen (arithmetisches M ittel + S EM). D ie Langzeit-Stimulation von intakten Hepatozyten mit CD95L zeigte die Tendenz einer Aktivierung des basalen Chloridstroms. Die statistische Auswertung zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Stromdichte von CD95L-behandelten Hepatozyten und Kontrollzellen (sind keine * angegeben, unterschieden s ich d ie D atensätze b ei d en a ngegebenen K lemmspannungen nicht s tatistisch signifikant voneinander).

Die ch arakteristische Inaktivierungskinetik d es ab geleiteten Chloridstroms w urde durch di e V orinkubation mit C D95L (16 – 24 S tunden) nicht be einflusst. D ie ermittelten τ_{off} -Werte sind in Abbildung 3.4. 9 graphisch dargestellt und wurden mit 436,50 ± 116,76 ms (n=4) bei +80mV bzw. 404,00 ± 92,11 ms (n=5) bei +100mV in CD95L-stimulierten H epatozyten und mit 513,58 ± 72,32 m s (n=12, be i + 80mV) bzw. 391,62 ± 50,18 ms (n=13 bei +100mV) in Kontroll-Hepatozyten berechnet. Die statistische A uswertung e rmittelte k einen signifikanten U nterschied in de n Inaktivierungskinetiken CD95L-stimulierter Hepatozyten und Kontrollzellen.



Abbildung 3. 4. 9: Das S äulendiagramm zeigt die Zeitkonstanten der Inaktivierung nach der Inkubation intakter Hepatozyten über N acht (16 - 24 Stunden) m it 100 ng/ml CD95L (+ 1 μ g/ml Enhancer) und Kontrollzellen (1 μ g /ml E nhancer). Die dargestellten Werte wurden 5 Minuten nach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontaks bei + 80 mV und + 100 mV K lemmspannung a bgeleitet (arithmetisches Mittel + SEM). Die Inaktivierungskinetik des basalen, C hloridstroms w urde in diesen Experimenten nicht beeinflusst.

3.4.4 Der schwellungsaktivierte Chloridstrom nach 16 – 24 Stunden Stimulation mit CD95-Ligand

Die l etzte V ersuchsreihe b eschäftigte s ich mit dem Einfluss von C D95L a uf de n schwellungsaktivierten Chloridstrom in Hepatozyten. D azu wurden di e über N acht (16 – 24 S tunden) mit C D95L i nkubierten Hepatozyten i n di e Messkammer überführt. Der "Whole-Cell"-Kontakt wurde in hypertoner Badlösung erstellt und die Chloridströme dur ch Anlegen des IV-Protokolls abgeleitet. W ie durch di e vorhergegangene Charakterisierung des untersuchten Chloridstroms zu erwarten war, wurde unt er h ypertonen B edingungen e in s ehr schwacher C hloridstrom ge messen (Abbildung 3.4. 10A, B). Dieser lag bei +80 m V Klemmspannung in den CD95Lstimulierten H epatozyten b ei einer mittleren S tromdichte von 10,73 \pm 1,96 pA /pF (n=28) und in den K ontrollzellen von 14.65 \pm 2.15 pA/pF (n=30). Die Substitution der h ypertonen Badlösung dur ch hypotone B adlösung f ührte a ugenblicklich z ur Aktivierung des Chloridstroms (Abbildung 3.4. 10C, D). Nach 5 Minuten wurde in den CD95L-stimulierten Z ellen e ine mittlere Stromdichte von 85,97 \pm 6,29 pA/pF (n= 18, bei +80 mV) gemessen. Diese lag in den K ontroll-Hepatozyten bei 68,71 \pm 6,21 pA/pF (n=23, bei +80 mV).



Abbildung 3. 4. 10: Originalableitungen des unter hy pertonen und un ter hy potonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms in CD95L-langzeitstimulierten Hepatozyten (16 – 24 Stunden, 100 n g/ml CD95L + 1 μ g/ml E nhancer) s owie in Kontrollzellen (16 - 24 Stunden 1 μ g/ml E nhancer). (A,B) Unter h ypertonen B edingungen wurde i n b eiden V ersuchsreihen e in s ehr s chwacher Chloridstrom gemessen. (C) 5 Minuten nach Reduktion der e xtrazellulären O smolalität konnte in C D95L-stimulierten Hepatozyten eine stärkere Aktivierung des Chloridstroms als (D) in den Kontrollzellen aufgezeichnet werden. (E,F) N ach Erreichen der maximalen Aktivierung des Chloridstroms waren jedoch k eine U nterschiede in d en Ableitungen d er b eiden V ersuchsreihen z u b eobachten. (C) D as angelegte IV-Protokoll implizierte Klemmspannungen von -120 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV. Jeder dieser Impulse wurde für eine Dauer von 500 ms gehalten.

Die statistische Auswertung ergab ausschließlich bei Klemmspannungen von -120 mV und von +100 mV signifikante Unterschiede (p < 0,05) in der Stromdichte von CD95L-stimulierten Hepatozyten und Kontrollzellen (Abbildung 3.4. 11). Berechnete man jedoch die prozentuale Aktivierung nach 5-minütiger Exposition mit hypotoner Badösung, konnt e ein s ehr starker C D95L-induzierter E ffekt aufgezeichnet w erden (Abbildung 3.4. 12). W ährend na ch R eduktion de r e xtrazellulären Osmolarität in den Kontrollzellen eine Aktivierung von $626 \pm 69 \%$ (n=30, bei +80 mV) gemessen wurde, b etrug diese in CD95L-behandelten Zellen 1213 \pm 156 % (n=18, bei +80 mV). Dies entspricht einer signifikant (p < 0,001) stärkeren Aktivierung de s C hloridstroms na ch der Stimulation mit 100 ng /ml C D95L. D ie prozentuale A ktivierung i n be iden Zellpopulationen i st i m B alkendiagramm i n Abbildung 3.4. 12 graphisch d argestellt. D ie S tromintensität b ei maximaler

Aktivierung war jedoch nicht verändert. Der Chloridstrom erreichte an diesem Punkt in C D95L-stimulierten Zellen s owie in d en K ontrollzellen in e twa d ie g leiche Intensität. In C D95L-behandelten H epatozyten w urde be i m aximaler A ktivierung eine mittlere Stromdichte von 116.21 \pm 12.19 pA/pF (n=7, bei +80 mV) gemessen. Diese lag in den Kontrollzellen bei einem Wert von 121,00 \pm 13,95 pA/pF (n=4, bei +80 mV).



Abbildung 3.4. 11: Der Strom-Spannungs-Beziehungs-Graph repräsentiert die unter hypertonen und hypotonen B edingungen gemessenen Chloridströme i n C D95L-langzeitstimulierten (100 n g/ml + 1000 ng/ml Enhancer) Hepatozyten und in Kontroll-Hepatozyten (1000 ng/ml Enhancer). Die frisch isolierten Z ellen wurden zunächst 12 Stunden kultiviert und dann unter Z ellkulturbedingungen über Nacht (16-24 S tunden) mit d em T odesliganden in kubiert. D ie d argestellten S tröme wurden unter hypertonen B edingungen und 5 Minuten nach Reduktion der extrazellulären O smolalität in CD95L-stimulierten s owie in K ontrollzellen a bgeleitet. Die e rmittelten mittleren S tromdichten (pA/pF) wurden gegen die applizierten Klemmspannungen (mV) aufgetragen (arithmetisches Mittel + S EM). Die Langzeit-Stimulation von intakten Hepatozyten mit CD95L hatte eine stärkere Aktivierung des basalen C hloridstroms z ur F olge. D iese A ktivierung konnte s owohl b ei p ositiven a ls a uch b ei negativen Klemmspannungen gemessen werden. Diese war jedoch nur b ei Klemmspannungen von +100 mV und -120 mV statistisch signifikant (*p < 0,05, sind keine * angegeben, unterschieden sich die Datensätze bei den angegebenen Klemmspannungen nicht statistisch signifikant voneinander).



Abbildung 3. 4. 12: Das S äulendiagramm zei gt d ie p rozentuale Aktivierung d es Chloridstroms (bei +80 mV) 5 M inuten nach der Reduktion d er ex trazellulären Osmolarität i n CD95L-langzeitstimulierten H eptozyten (16-24 Stunden, 100 n g/ml CD95L + 1 µg/ml Enhancer) und in Kontrollzellen (16-24 Stunden, 1 µg/ml Enhancer). Die S timulation mit dem Todesliganden führte nach 5minütiger E xposition m it hypotoner Badlösung z u einer stärkeren Aktivierung d es I CLswell (***p<0,001).

Wie au s Abbildung 3 .4. 13 deutlich w ird, konnt e ke ine CD95L-induzierte Veränderung der I naktivierungskinetik na ch Vorinkubation (16 - 24 S tunden) d er Zellen mit CD95L festgestellt werden. Die Zeitkonstante der Inaktivierung wurde 5 Minuten na ch E rstellen d er "W hole-Cell"-Konfiguration i n C D95L-behandelten Zellen mit 464,71 ± 111,43 m s (n=7) bei +80mV und 413,27 ± 99,76 m s (n=7) bei +100 mV berechnet. In den Kontrollzellen betrug τ_{off} 525,18 ± 92,48 m s (n=11) bei +80 mV bzw. 413,27 ± 99,76 m s (n=11) bei +100 mV Klemmspannung (Abbildung 3.4. 13).



Abbildung 3. 4. 13: Das S äulendiagramm zeigt d ie Zeitkonstanten d er I naktivierung nach d er I nkubation i ntakter H epatozyten über Nacht (16 - 24 Stunden) mit 100 ng/ml CD95L (+1 µg/ml E nhancer) un d i n Kontrollzellen (1 µg/ml E nhancer). Die dargestellten Werte wurden 5 Minuten nach Erstellen d es "Whole-Cell"-Kontaks be i +80 m V und + 100 mV K lemmspannung abgeleitet (arithmetisches M ittel + S EM). Die Inaktivierungskinetik des basalen, unter isotonen Bedingungen gemessenen Chloridstroms wurde nicht beeinflusst.

Zusammenfassend kon nte ge zeigt w erden, dass di e Stimulierung intakter Hepatozyten (Vorinkubation) mit C D95L eine s tärkere Aktivierung de s schwellungsaktivierten Chloridstroms, a ls A ntwort a uf die R eduktion de r extrazellulären O smolarität, zur F olge ha tte. Die S tromintensität bei ma ximaler Aktivierung des I_{Cl,swell} wurde jedoch nicht modifiziert.

4 Diskussion

4.1 Hepatozyten weisen einen ba sal a ktiven Chlo ridstrom auf, w elcher die bio physikalischen Cha rakteristika des schwellungsaktivierten Chloridstroms zeigt

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weisen Ratten-Hepatozyten (in primärer unter i sotonen B edingungen e inen a uswärts Zellkultur) gleichrichtenden Chloridstrom auf, welcher die biophysikalischen C harakteristika des schwellungsaktivierten Stroms, des I_{CL,swell}, aufweist. Diese schwellungsaktivierten Chloridströme könne n in de n m eisten Zelltypen erst na ch R eduktion de r extrazellulären O smolarität gemessen w erden und s ind unt er h ypertonen und isotonen Bedingungen sehr schwach bis gar nicht aktiv (Worrell et al., 1989, Solc und W ine, 1991, P aulmichl e t a l., 1992). In dieser A rbeit w urden v ergleichend HEK293 Phoenix-Zellen (human embryonal kidney) untersucht. Es zeigte sich, dass der in Hepatozyten basal aktive Chloridstrom in HEK293-Zellen kaum nachweisbar war. Die Reduktion der extrazellulären Osmolarität führte in Hepatozyten zu einer starken A ktivierung d es ba salen C hloridstroms. E rwartungsgemäß hemmte eine Erhöhung d er ex tarzellulären O smolarität d iesen C hloridstrom. W eitere Charakteristika d es I_{Cl,swells} sind e ine s chnelle A ktivierung und e ine l angsame, potentialabhängige I naktivierung (beschrieben durch τ_{off}) be i K lemmspannungen über +40 mV (Worrell et al., 1989, Solc und Wine, 1991, Paulmichl et al., 1992, zur Übersicht Nilius et al., 1996, Sardini et al., 2003). Auch der in dieser Arbeit unter isotonen Bedingungen gemessene Chloridstrom zeigte diese Merkmale. Weiterhin wurde über di e Zusammensetzung de r Intra- und E xtrazellulärlösung i n de n Experimenten di e A ktivierung von C a^{2+} und c AMP-abhängigen C hloridströmen unterdrückt. Es kann somit angenommen werden, dass es sich bei diesem Strom um eine basal aktive Form des schwellungsaktivierten Chloridstroms I_{Cl.swell} handelt.

Die R egulation des Zellvolumens i st e ine für Zellen e ssentielle F unktion, w elche ihnen bei V eränderungen der extrazellulären O smolarität e in konstantes V olumen und e ine geregelte in trazelluläre O smolytenzusammensetztung g arantiert (Chamberlin and Strange, 1989, Lang et al., 1998).

Da Hepatozyten große Mengen an Aminosäuren und anderen Nährstoffen aufnehmen und metabolisch sehr aktiv sind, unterliegen sie starken osmotischen Schwankungen (Häussinger et al., 1992, Häussinger und Lang, 1992, Wang und Wonderglam, 1993, Schliess und Häussinger 2005). Die Regulation des Zellvolumens ist hierbei auf eine schnelle V eränderung der C hloridleitfähigkeit d er P lasmamembran angewiesen (Wang und W onderglam, 1993, G raf und H äussinger, 1996, H addad et al., 1997). Als Antwort auf eine Zellschwellung erhöhen Hepatozyten diese um ein 30- bis 100-faches (Meng und Weinman, 1996, J ackson et al., 1996). V erschiedene G ruppen beschrieben ei nen s tarken, au swärts gleichrichtenden Chloridstrom in H epatozyten verschiedener S pezies (Ballarori et al., 1995, J ackson et al., 1996, M eng und Weinman, 1996, F eranchak et al., 2000) und in he patozellulären Zelllinien, z.B. AML12 (*mouse h epatocyte c ell l ine*, Wondergem et al., 2001) und H TC (*rat hepatoma cell line*, Bodily et al., 1997), unter hypotonen Bedingungen. Diese Ströme zeigten weitgehend s ehr ähnliche biophysikalische Eigenschaften, wie der in dieser Arbeit gemessene Chloridstrom (zur Übersicht Li und Weinman, 2002).

Die vorliegende Arbeit konnt e zeigen, dass is olierte Hepatozyten der R atte unter isotonen B edingungen e ine ba sal a ktive Form de s s chwellungsaktivierten Chloridsroms, $I_{Cl,swell}$, au fweisen. Die diesem Strom zugrundeliegenden Chloridkanäle könnten für die hohe Chloridleitfähigkeit der Hepatozytenmembran (Graf et al., 1987, Moule und McGivan, 1990) mitverantwortlich sein und somit eine, nicht nur in der Volumenregulation, wichtige physiologische Rolle in Hepatozyten übernehmen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Hydratationszustand der Zelle in vielen verschiedenen Prozessen, wie der A poptose (Schliess und H äussinger, 2002 und 2005, Reinehr et al., 2002, 2003 und 2006, Becker et al., 2007a, Stutzin et al., 2006), der Regulation des Zellzyklus (Schliess und Häussinger, 2002 und 2005, Koch et al., 1979, B ussolati et a l., 1996, Lang et a l., 1998 u nd 2000) des H ormonhaushalts (Häussinger et al., 19 92, Häussinger und Lang, 1992), und de r Proteolyse (Häussinger, 1996, vom D ahl und H äussinger, 1996, S chliess et a l., 2 001) eine regulatorische F unktion ha t. Ein t ieferes Verständnis de r vol umensensitiven Transportprozesse ist s omit für di e Physiologie und P athophysiologie de r Hepatozyten von großem Interesse. In de r vor liegenden A rbeit w urde der E ffekt verschiedener Gallensalze und de s T odesliganden C D95-Ligand au f d en b asalen sowie a uf de n s chwellungsaktivierten C hloridstrom im R ahmen d er Apopotose in Hepatozyten untersucht.

4.2 Die Chloridleitfähigkeit d er Plasmamembran im Rahmen der Gallensalz- und der CD95-Ligand-induzierten Apoptose in Hepatozyten

In isolierten Hepatozyten führen proapoptotische Stimuli wie CD95-Ligand (Reinehr et al., 2002, 2003a und 2008) und hydrophobe G allensalze, z.B. T aurolithocholat (Faubion et al., 1999, Sodeman et al., 2000 Reinehr et al., 2003b und 2005, Becker et al., 2007b), zu einer Aktivierung der CD95-abhängigen Apoptose. Eines der ersten Ereignisse in di eser Signalkaskade ist die Azidifizierung der frühen endosomalen Kompartimente. D ies i st b ereits w enige S ekunden nach d er G abe ei nes d er genannten Stimuli zu be obachten. W eiterhin konnte in vorhergegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass der Azidifizierung der frühen Endosomen ein Anstieg der zytoplasmatischen C hloridkonzentration vor rausgeht (Reinehr et al., 2006 und 2008, Becker et al., 2007b). Der Anstieg der Chloridkonzentration aktiviert die vakuoläre H^+ ATPase in der Endosomenmembran, welche dann den Abfall des p H_{ves} in den frühen Endosomen vermittelt (Moriyama und Nelson, 1997, Pazoles et al., 1980). Interessanterweise i st der C D95L-induzierte Anstieg de r C hloridkonzentration Caspase-abhängig (Reinehr et al., 2008) während jener TLCS-induzierte Anstieg dies nicht ist (Becker et al., 2007). Dies suggeriert, dass die Erhöhung des intrazellulären Chloridspiegels dur ch d ie verschiedenen S timuli unt erschiedlich um gesetzt w ird, dies jedoch letztendlich zum gleichen Effekt führt und in den gleichen Signalweg mündet.

Vorangegangene A rbeiten z eigten weiterhin, d ass das a ntiapoptotische Gallensalz Tauroursodesoxycholat (TUDC) und Taurocholat (TC), ei n G allensalz w elches weder p ro- noch a ntiapoptotisch w irkt, keinen Anstieg d er z ytoplasmatischen Chloridkonzentration, keine Azidifizierung der frühen endosomalen Kompartimente und s omit a uch ke ine Aktivierung de s C D95-abhängigen A poptose-Signalweges hervorrufen (Becker et al., 2007).

DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic ac id di sodium s alt) inhibiert Anionenkanäle, den HCO₃⁻/Cl⁻-Austauscher (Muallem et al., 1988, Zsembery et al., 2000) und de n N a⁺-abhängigen G allensalztransporter N tcp (*Na⁺-taurocholate cotransporting pe ptide*) (Anwer et a l., 1991) und he mmt na ch S timulation von Hepatozyten mit TLCS (Becker et al., 2007b) oder CD95L (Reinehr et al., 2008) die endosomale Azidifizierung. Dies lässt annehmen, dass der Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration und somit di e Aktivierung de s C D95-abhängigen Apoptose-Signalweges über Chloridströme über die Plasmamembran vermittelt werden könnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit über die Chloridleitfähigkeit der Hepatozyten-Plasmamembran n ach S timulation mit verschiedenen Gallensalzen sowie C D95L im K ontext de r he utigen K enntnisse übe r di e P hysiologie von Ionenkanälen und –transportern detailliert diskutiert.

4.2.1 TLCS, n icht aber T UDC u nd T C, hemmt den Chloridausstrom aus der Zelle, wodurch es zur Akkumulation von Chlorid im Hepatozyten kommt

Nach de r C harakterisierung de s ba salen und des schwellungsaktivierten Chloridstroms in Ratten-Hepatozyten sollte zunächst der Effekt des proapoptotischen Gallensalzes T aurolithocholat (TLCS) auf di ese Ströme unt ersucht werden. Hierzu wurden verschieden Versuchsreihen mit den folgenden TLCS-Stimulationen unter isotonen B edingungen durchgeführt: 1) d ie extrazelluläre S timulation, 2) d ie intrazelluläre S timulation und 3) d ie Stimulation durch eine V orinkubation (30 Minuten) mit 50 μ M T LCS. Der extrazelluläre E ffekt w urde weiterhin u nter schwellungsaktivierten, h ypotonen B edingungen gemessen. In a llen Experimenten lag eine symmetrische Chloridkonzentration vor.

In de r e rsten V ersuchsreihe zum extrazellulären E ffekt v ermischte sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung bevor TLCS zur Badlösung gegeben wurde. Dies bedeutete, dass alle zytoplasmatischen Komponenten wie "Second Messenger" stark verdünnt w urden und nicht m ehr i n i hrer p hysiologischen K onzentration und Lokalisation vor handen waren. S omit w urde i n di eser V ersuchsreihe d er di rekte Effekt von TLCS auf Komponenten der Plasmamembran oder auf die Chloridkanäle selbst unt ersucht. Eine B eteiligung z ytoplasmatischer S ignaltransduktion ka nn hierbei nahezu ausgeschlossen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass T LCS den basalen sowie schwellungsaktivierten Chloridstrom hemmt. Bereits 5 Minuten nach der Z ugabe des Gallensalzes zur Badlösung konnt e der Maximaleffekt gemessen werden. Eine Hemmung konnte sowohl bei positiven als auch bei negativen Klemmspannungen detektiert werden. Um das Ausmaß dieses Effekts zu quantifizieren, wurde die prozentuale Hemmung des Chloridstroms bei +80 m V Klemmspannung berechnet. Das positive Potential wurde ge wählt, da essich bei de munt ersuchten Strom um einen auswärts gleichrichtenden Chloridstrom handelt, welcher bei positiven Potenzialen stärker als bei den korrespondierenden n egativen Spannungen i st. Es zeigte s ich, da ss 50 μ M TLCS d en ba salen C hloridstrom um 52 \pm 9 % (p < 0,001, n= 11) hemmt. D as "Auswaschen" (*"wash-out"*) von TLCS aus der Badlösung mit Hilfe einer speziellen Perfusionsvorrichtung hob de n E ffekt de s G allensalzes innerhalb von 5 Minuten komplett auf. Die Stromintensität stieg sogar auf Werte oberhalb der vor der Zugabe von T LCS g emessenen W erte. D ies konnt e s owohl unt er i sotonen (basaler Chloridstrom) a ls a uch unt er h ypotonen (schwellungsaktivierter C hloridstrom) Bedingungen beobachtet werden und zeigt, dass der hemmende Effekt von TLCS ein sehr schneller Prozess ist, der in derselben Geschwindigkeit (5 Minuten) reversibel ist. Die R eversibilität d ieses E ffekts l ässt an nehmen, d ass d ieser n icht d urch d ie membranolytische Aktivität der amphiphilen Struktur der Gallensalze hervorgerufen wird (Attili et al., 1986, Schubert und Schmidt, 1988, zur Übersicht Garidel et al., 2007).

Weiterhin konnt e diese Arbeit zeigen, da ss die TLCS-induzierte Hemmung de s basalen Chloridstroms dosisabhängig ist. Dies konnte durch Experimente mit s tetig steigender TLCS-Konzentration (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M) ermittelt werden. D ie halbmaximale E ffektkonzentration der T LCS-induzierten Hemmung des basalen Chloridstroms betrug EC₅₀ = 31,7 μ M (*half m aximal effect concentration*). Eine vor angegangene S tudie m it E inzelzell-Fluoreszenz-Experimenten zeigte, dass mit s teigender TLCS-Konzentration (gezeigt für 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M) auch di e i ntrazelluläre C hloridkonzentration s owie die Azidifizierung der frühen Endosomen steigt (Becker et al., 2007). Somit steht dieses Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen der zuvor genannten Arbeit.

Ein Hauptcharakteristikum de s $I_{Cl,swell}$ ist di e pot entialabhängige Inaktivierung des Chloridstroms bei Klemmspannungen über +40 mV. Es konnte gezeigt werden, dass auch di e Inaktivierungskinetik be i +80 mV und +100 mV Klemmspannung du rch TLCS modifiziert wird. Hierzu wurden die Zeitkonstanten der Inaktivierung, τ_{off} , vor und 5 Minuten na ch Zugabe von T LCS b estimmt. E s z eigte s ich e ine s tarke Reduktion von τ_{off} . D ies be deutet e ine B eschleunigung de r Inaktivierung de s Chloridstroms durch T LCS. D ieser E ffekt war s owohl a uf d en basalen, unt er isotonen B edingungen ge messenen C hloridstrom a ls a uch auf j enen schwellungsaktivierten, unter h ypotonen B edingungen gemessenen S trom zu be obachten. A uch d ieser E ffekt w ar dosisabhängig. Die halbmaximale Effektkonzentration (EC₅₀) betrug hi erbei $1,79 \mu M$ (unter isotonen Bedingungen). Somit ist dieser Effekt viel sensitiver als der zuvor beschriebene hemmende Effekt auf die Stromintensität (EC₅₀ = 31,7 μ M). Ob die Reduktion von τ_{off} unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt und Einfluss auf die Kanaleigenschaften oder auf die Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran in der lebenden Z elle hat, ist schwer z u beurteilen, d a die Inaktivierung e in M erkmal i st, welches n ur b ei hohen Depolarisationen der Plasmamembran auftritt. Dieser Effekt ist dennoch wichtig zu untersuchen, da e ine V eränderung der C harakteristika e ines Ionenstroms auf ei ne Beeinflussung der getesteten Substanz auf die dem Strom zugrunde liegenden Kanäle hinweist. Es unterstützt somit die bereits genannte Hypothese, dass TLCS mit einer oder mehrerer Komponenten der Plasmamembran interagiert und es sich nicht um einen Effekt, hervorgerufen du rch di e membranolytische Aktivität d es stark hydrophoben Gallensalzes TLCS handelt (zur Übersicht Garidel et al., 2007, Thomas et al., 2008, P erez and Briz, 2009). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die T LCS-induziert Hemmung des b asalen C hloridstroms ü ber d ie ex trazelluläre Seite der Plasmamembran vermittelt wird. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Interaktion von TLCS mit einer (oder mehrerer) Komponente(n) der Plasmamembran schon bei sehr geringen Konzentrationen stattfindet, es aber höherer Konzentrationen bedarf um e inen ph ysiologischen E ffekt he rvorzurufen. Diese H ypothese w urde aufgestellt, nachdem ei ne Hemmung nach e xtrazellulärer S timulation d er Hepatozyten mit T LCS g emessen w erden kon nte. D a s ich i n de r "Whole-Cell"-Konfiguration die Pipettenlösung mit dem Zytoplasma der Zelle vereinigt und dieses ist es s ehr unw ahrscheinlich, da ss di e intrazelluläre stark ve rdünnt. Gallensalzkonzentration ausreichend wäre, um den Effekt zu induzieren. Weiterhin konnte eine Beteiligung von zytoplasmatischen Signalmolekülen ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass der Hemmung eine direkte Interaktion des Gallensalzmoleküls mit d er ex trazellulären L ipid-Protein-Schicht d er P lasmamembran zugrunde l iegen müsste. U m di ese H ypothese z u unt erstützen, wurden di e Hepatozyten in trazellulär mit T LCS s timuliert. In diesem Fall konnte k ein E ffekt gemessen werden, wodurch diese Annahme bestätigt werden konnte.

Aus d er Literatur is t bekannt, d ass G allensalze al s R ezeptor-bindende Signalmoleküle wirken können. So binden sie beispielsweise an den Transkriptionsfaktor F XR *(nuclear f arnesoid X r eceptor)* (Makishima et a l., 1999, P arks et a l., 1999) sowie an den G-Protein-gekoppelten G allensalz-Rezeptor T GR5 (Maruyama

et al., 2002, Kawamata et al., 2003, Keitel et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch s prechen gegen e ine s olche R ezeptorfunktion von T LCS. E in r ezeptorvermittelter Effekt b edarf d er B eteiligung z ytoplasmatischer Signaltransduktion. Dies wurde durch unsere Experimente bereits weitgehend ausgeschlossen. In diesem Fall könnt e m an e inen Effekt nur na ch V orinkubation intakter Z ellen und einer darauf folgenden Messung in de r "Whole-Cell"-Konfiguration de tektieren. Eine solche V orinkubation (30 M inuten) mit T LCS h atte in u nseren E xperimenten ebenfalls eine Hemmung des basalen Chloridstroms zur Folge. Dieser Effekt war jedoch s chwächer al s jener n ach extrazellulärer Stimulation unter A usschluss zytoplasmatischer S ignaltransduktion. Es ka nn davon a usgegangen w erden, da ss auch in dieser Versuchsreihe der direkte extrazelluläre Effekt gemessen wurde. Dies könnte da mit erklärt werden, da ss die T LCS-induzierte Hemmung reversibel ist, sodass de r T ransfer i n di e T LCS-freie B adlösung auch z um R ückgang de r Effektstärke führen müsste. Da die Experimente 0 bis 30 Minuten nach dem Transfer der Zellen in die TLCS-freie Badlösung durchgeführt wurden, wäre der Effekt von TLCS in den untersuchten Zelle sehr unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies würde auch die hohen Standardabweichungen in dieser Versuchsreihe erklären.

Im Allgemeinen kann eine Reduktion des Chloridflusses über die Plasmamembran durch folgende V eränderungen der K analeigenschaften auftreten: 1) Die Anzahl aktiver K analproteine in der Plasmamembran wird herabgesetzt, 2) das "Gating" wird zu Gunsten der geschlossenen Konformation des Kanalproteins verändert oder 3) die Leitfähigkeit der einzelnen Chloridkanäle *(single-channel conductance)* wird herabgesetzt.

Letzteres k ann b eispielsweise d urch ei ne k ompetitive o der n icht-kompetitive Hemmung der K analporen erzeugt werden. Linsdell und H anrahan konn ten bereits zeigen, d ass C FTR-Chloridströme in s tabil tr ansfizierten H amster-Oozyten (CHO, *chinese hamster ovary*) durch TLCS gehemmt werden. Auch hier trat der Effekt kurz nach der Zugabe des Gallensalzes au f, unterlag keiner S ignaltransduktion und w ar dosisabängig (Lindsell and Hanrahan, 1999). Die Autoren wählten TLCS als Substrat der A BC-Proteinfamilie *(ATP-binding c assette f amily)*, de m M RP1 *(multidrug resistance-associated protein 1)* und dem kanikulären MRP2 *(multidrug resistanceassociated protein 2)*, b eide mit der Funktion als A TP-abhängige P umpen für e ine große Anzahl organischer Anionen. Unter physiologischen Bedingungen sowie unter den E xperimentkonditionen der vor liegenden Arbeit s ind a uch G allensalze ne gativ geladen. Diverse Studien zeigten, dass große organische Osmolyte, wie z.B. Taurin, schwellungsaktivierte C hloridkanäle pa ssieren k önnen (Kirk et al., 1992, B oese et al., 1996). So ist b eispielsweise d er s chwellungsinduzierte T aurintransport s ensitiv für A nionenkanalblocker, wie D IDS. Der D urchtritt von T LCS dur ch di e de m basalen C hloridstrom unt erliegenden Kanäle würde ei ne V erschiebung d es Umkehrpotenzials hervorrufen. D er Influx de s e xtrazellulären, ne gativ g eladenen Gallensalzes würde ei nen au swärts ge richteten S trom be i 0 m V e rzeugen und da s Umkehrpotential würde sich in negative Bereiche verlagern. Dies konnte in keinem der dur chgeführten Experimente gemessen w erden. Somit k ann e ine k ompetitive Hemmung d er C hloridkanäle a usgeschlossen w erden. E ine ni cht-kompetetive Hemmung d urch d ie extrazelluläre A nlagerung de r T LCS-Moleküle an di e Kanalpore wäre jedoch möglich.

Eine Veränderung der Anzahl an aktiven Kanalproteien in der Plasmamembran kann in d iesem Fall auch ausgeschlossen w erden. D iese A rt von R egulierung würde zytoplasmatische Signaltransduktion beinhalten, welche zum Beispiel zur "de novo"-Synthese, D egradation, M odifikation ode r z ur Lokalisationsveränderung von Proteinen f ührt. D ie Beteiligung in trazellulärer S ignaltransduktion ist w enig wahrscheinlich.

Das "Gating" der betroffenen Kanalproteine könnte durch die Interaktion der TLCS-Moleküle mit d er e xtrazellulären Lipidschicht, mit d em Kanalprotein s elbst ode r einem membranständigen P rotein ode r P roteinkomplex, welcher d ie K analaktivität reguliert, mo difiziert w erden und somit den D urchtritt von C hlorid verringern. Welche Art der Interaktion dem gemessenen Effekt unterliegt, konnte mit denen in dieser A rbeit d urchgeführten P atch-Clamp-Experimenten nicht g enauer unt ersucht werden und muss Inhalt weiterführender Studien sein.

Es konnt e gezeigt w erden, d ass d ie T LCS-induzierte Hemmung des b asalen Chloridstroms über eine extrazelluläre Interaktion des Gallensalzes mit d er Protein-Lipid-Struktur d er P lasmamembran v ermittelt w ird u nd e s k einer in trazellulären Signaltransduktion bedarf.

Kann man nun den Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration und somit die Aktivierung der CD95-abhängigen A poptose mit der TLCS-induzierten Hemmung der ge messenen C hloridströme erklären? Das aus der Literatur bekannte R uhepotenzial von H epatozyten liegt z wischen -20 und -70 m V. Die Verschiedenheit dieser W erte lässt sich durch U nterschiede in der P räparationen der u ntersuchten Zellen und den angewandten Messmethoden in diesen Arbeiten erklären (Heller und Van der Kloot, 1974, Petzinger und Bigalke 1986, Graf et al., 1987, Sawanobori et al., 1989, W einman et al., 1989). Die in der vor liegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse könnten da rauf hinweisen, dass da s R uhepotenzial von H epatozyten negativer al s das Gleichgewichtspotenzial von C hlorid ist. Für di ese Hypothese müsste Chlorid im H epatozyten, wie e s ü blicherweise in E pithelzellen der F all ist (Hille, 2001), über dem Gleichgewicht verteilt sein. Unter Ruhebedingungen käme es zu e inem kont inuierlichen Chloridausstrom a us der Zelle. Eine H emmung dieses Ausstroms, wie s ie f ür T LCS gezeigt werden konnt e (Hemmung bei n egativen Klemmspannungen), könnte de mnach zur A kkumulation von C hlorid in der Z elle führen und die intrazelluläre Chloridkonzentration temporär ansteigen lassen.

Ein kontinuierlicher Influx von Chlorid in die Zelle könnte über elektrisch neutrale Transportersysteme, w ie d en Na⁺/K⁺/2Cl⁻ Kotransporter oder den Cl⁻/HCO₃⁻⁻ Austauscher, ve rwirklicht w erden. E rsterer vermittelt den E intritt von e inem Natrium-, e inem K alium- und zwei Chloridionen in die Zelle. H ierfür nu tzt er den elektrochemischen N atriumgradienten über die P lasmamembran, welcher d urch die Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) generiert w ird. D er el ektrochemische Gradient von N atrium und K alium w ird du rch di e A ktivität de r N a⁺/K⁺-ATPase ständig au frecht erhalten (zur Ü bersicht G amba, 2005). D er Kotransport von Chloridionen könnt e zu e iner e rhöhten C hloridkonzentration i m Z ytoplasma und somit zur Generierung eines Chloridgradienten führen. Die Hemmung des Ausstroms von Chlorid entlang dieses elekrtochemischen Gradienten könnte somit zum Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration führen.

Aus de r Literatur i st be kannt, da ss di e A ktivität de s $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransports wiederum dur ch di e $[Cl_i]$ reguliert w ird. Der A nstieg d er in trazellulären Chloridkonzentration inhibiert dessen A ktivität (Breitwieser et al., 1990, Robertson und Foskett, 1994, L ytle und Forbush, 1996, P utney et al., 1999). Man kann daher annehmen, dass der Anstieg von $[C\Gamma]_i$ ein schneller und temporärer Prozess ist. Dies konnte a uch i n de n P atch-Clamp-Experimenten de r vor liegenden A rbeit g ezeigt werden.

Weiterhin i st a uch e in C hloridkanal-unabhängiger M echanismus m öglich. D as proapoptotische G allensalz T LCS könnt e übe r di e M odifizierung von Kationenkanälen (Wehner, 1993) oder el ektrogene Kationen-Transportsysteme, wie des N atrium-abhängigen G allensalztransporters Nctp (Weinman et al., 1998), eine

Depolarisation der Hepatozytenmembran hervorrufen. Wenn dies der Fall ist und die Depolarisation da s G leichgewichtspotential von C hlorid i n pos itiver R ichtung übersteigt, käme es z u einem C hloridinflux i n de n H epatozyten. Eine H emmung dieses Einstroms, w ie e r i n di eser A rbeit ge messen w urde, würde d iesen z war verringern, aber nicht unterdrücken. Es könnte somit auch über eine Depolaristation der Plasmamembran zum Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration kommen.

Im Gegensatz zu TLCS hatte das antiapoptotische Gallensalz Tauroursodesoxycholat (TUDC) s owie T aurocholat (TC), e in G allensalz, welches w eder A poptose induzieren kann noch der A poptose entgegenwirkt, keinen E ffekt auf den Chloridausstrom. D ie extrazelluläre Stimulation mit T UDC f ührte z u e iner s ignifikanten Hemmung des basalen Chloridstroms bei positiven Klemmspannungen. Wie bereits beschrieben, korrespondieren di e be i pos itiven M embranpotentialen g emessenen Ströme m it den E inwärtsströmen von C hlorid. D er A usstrom wurde s omit von TUDC nicht mo difiziert. Dieses E rgebnis s teht im E inklang mit der zuvor formulierten Hypothese, nach der die Hemmung des Chloridausstroms nach TLCS-Stimulation zur Akkumulation von Chlorid im Zytoplasma führt. Die intrazelluläre Stimulation mit TUDC zeigte keinen Effekt.

Nach Stimulation mit Taurocholat (TC) konnte in unseren Experimenten weder nach der ex trazellulären noch na ch der in trazellulären S timulation ein E ffekt g emessen werden. Wie bereits beschrieben, wurde auch mit denen im Vorfeld durchgeführten MQAE-Einzelzell-Fluoreszenz-Messungen kein Anstieg der intrazellulären Chloridkozentration nach T C-Behandlung gemessen (Becker e t a l., 2007b). In Ü bereinstimmung mit d er zuvor postulierten Hypothese führt TC nicht zur Blockierung des Chloridausstroms und f olglich a uch ni cht z ur A kkumulation von C hlorid i m Zytoplasma.

Zusammenfassend k onnte gezeigt werden, dass nur das proapoptotische Gallensalz TLCS in der Lage ist, den Chloridefflux über die untersuchten Chloridkanäle (Ca²⁺- und c AMP-aktivierte C hloridkanäle wurden ausgeschlossen) i n isolierten Hepatozyten der R atte zu hemmen. TUDC u nd T C, w elche k einen Anstieg d er intrazellulären C hloridkonzentration ve rmitteln und ke ine A poptose i nduzieren, zeigten ke inen E ffekt auf de n C hloridausstrom a us de r Zelle. T UDC he mmte de n basalen C hloridstrom I ediglich be i pos itiven M embranpotentialen. D ies be deutet, dass nur der Chloridinflux von TUDC gehemmt werden kann.

Der G allensalz-induzierte Effekt w ird extrazellulär und ohne i ntrazelluläre Signaltransduktion v ermittelt u nd u nterliegt s omit s ehr w ahrscheinlich e iner Interaktion de s G allensalzes mit e xtrazellulären B estandteilen d er P rotein-Lipid-Struktur der P lasmamembran oder einer ni cht-kompetitiven H emmung de r Kanalpore selbst. Die gemessene Hemmung des Chlorideffluxes aus der Zelle könnte zur A kkumulation vo n C hlorid im Z ytoplasma und s omit z ur A ktivierung de r CD95L-abhängigen Apoptose na ch TLCS-Stimulation führen. Im Einklang hiermit führt di e Behandlung mit T UDC und T C ni cht z um A nstieg de r i ntrazellulären Chloridkonzentration un d s omit a uch ni cht z ur Initiierung d es CD95-abhängigen

4.2.2 CD95-Ligand a ktiviert den b asalen C hloridstrom i n Hepatozyten, wodurch es zum erhöhten Einstrom von Chlorid in die Zelle kommt

Obwohl C D95 i n H epatozyten ha uptsächlich i m Z ytosol und nu r zu einem sehr geringen Anteil in der Plasmamembran lokalisiert ist (Sodeman et al., 2000), führt die S timulation v on Hepatozyten m it C D95-Ligand z ur A ktivierung d er CD95abhängigen Apoptose (Bennet et al., 1998, Graf et al., 2002, Reinehr et al., 2002 und 2003a). Der CD95L-induzierten Apoptose liegt ein komplexer Signalweg zugrunde, welcher wie jener Liganden-unabhängige, Gallensalz-induzierte Signalweg (Becker et al., 2007b), die Akkumulation von Chlorid im Zytoplasma und die darauf folgende Azidifizierung der frühen endosomalen Komparimente, als eine der ersten Ereignisse (Reinehr et al., 2008), beinhaltet. Beide genannten Ereignisse werden durch Caspase-8-Inhibitor oder Pan-Caspase-Inhibitor (Reinehr et al., 2008) stark gehemmt. Des Weiteren u nterdrückt DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disodium s alt), ein Inhibitor von Chloridkanälen und -austauschern (Muallem et al., 1988, Zsembery et al., 2000), die C D95L-induzierte e ndosomale A zidifizierung und alle da rauf folgenden Schritte des C D95-abhängigen A poptose-Signalwegs (Reinehr et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass die intrazelluläre Akkumulation von C hlorid über Caspase-8-abhängige Veränderungen der Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran vermittelt werden könnte.

In d iesem T eil d er Arbeit s ollte u ntersucht w erden, ob C D95L i n de r Lage i st, Chloridkanäle in der Plasmamembran isolierter Hepatozyten so zu verändern, dass es zu einer Akkumulation von Chlorid im Zytoplasma kommen kann. Die Stimulation is olierter H epatozyten mit C D95L (100 n g/ml) führte in uns eren Experimenten z u einer Aktivierung d es b asalen Chloridstroms. E s kon nte g ezeigt werden, dass diese Aktivierung einer intrazellulären Singaltransduktion und keinem direkten E ffekt, w ie für TLCS gezeigt (4.2.1), unterliegt. Die A ktivierung de s Chloridstroms konnt e somit nur na ch Vorinkubation intakter Z ellen b eobachtet werden. Demnach unterliegt der gemessene Effekt intrazellulärer Signaltransduktion, was für einen rezeptorvermittelten Liganden zu erwarten war. Dies liegt im Einklang mit der zuvor beschrieben Caspaseabhängigkeit (Reinehr et al., 2008).

Die extrazelluläre Stimulation mit C D95L unter A usschluss z ytoplasmatischer Signalmoleküle hingegen (Zugabe d es Liganden n ach Erstellen des "Whole-Cell"-Kontakts) hatte ke inen E influß a uf de n gemessenen C hloridstrom. W ie be reits beschrieben (Abschnitt 4.2.1), führte diese Art der Stimulation mit den Gallensalzen TLCS und TUDC z ur Hemmung des b asalen Chloridstroms. S omit k onnte di e Hypothese unt erstützt werden, da ss der TLCS- und der CD95L-induzierte Anstieg der intrazellulären Chloridkonzentration über verschiedene Mechanismen vermittelt werden.

Ein A nstieg d er C hloridleitfähigkeit d er P lasmamembran kann dur ch f olgende Modifikation he rvorgerufen w erden: 1) d ie A nzahl a ktiver K analproteine in d er Plasmamembran w ird e rhöht, 2) das "Gating" w ird z u G unsten de r geöffneten Konformation de s K analproteins ve rändert, 3) di e Leitfähigkeit de r e inzelnen Chloridkanäle *(single-channel c onductance)* wird e rhöht ode r 4) es k ommt z ur Aktivierung eines anderen Typs von Chloridkanälen.

Letzteres k ann w eitgehend au sgeschlossen w erden, d a CD95L-stimulierte Z ellen eine stärker Aktivierung nach Reduktion der extrazellulären Osmolarität zeigten. Die in d ieser A rbeit durchgeführten Experimente lassen ni cht z wischen den oben genannten P unkt e ins bis dr ei unterscheiden. Die g enauere U ntersuchung des Wirkmechanismus muss Inhalt weiterführender Studien sein.

Stützt m an s ich nun w ieder a uf di e f ür de n T LCS-Effekt pos tulierte H ypothese würde eine Aktivierung der untersuchten Chloridkanäle nicht zu einer intrazellulären Akkumulation von C hlorid f ühren. E ine s olche A ktivierung würde hi ngegen zu einem erhöhten Ausstrom von Chlorid aus der Zelle führen.

In der Literatur finden sich viele Anhaltspunkte, nach denen eine Aktivierung von CD95-Rezeptor in verschiedenen Zelltypen zur Depolarisierung der Plasmamembran führen kann. Im Falle einer durch CD95L induzierten Depolarisierung der Membran über da s Gleichgewichtspotential von C hlorid hi naus würde ein A ktivierung de r Chloridkanäle z u e inem e rhöhten E instrom von C hlorid i n di e Z elle führen. A uch dieser E ffekt könnt e s omit e inen t emporären Anstieg de r z ytosolischen C hloridkonzentration führen. Nolte et al. zeigten, d ass die S timulation von U -937 Z ellen *(human m yeloid c ell line)* mit C D95-spezifischen Antikörpern e ine D epolarisation der P lasmamembran induzieren kann und dass dieser Prozess C aspase-abhängig i st (Nolte et al., 2004). W ie bereits beschrieben, scheint die C aspase-Abhängigkeit e in signalspezifisches Merkmal z u s ein, da a ndere proapoptotische S timuli, w ie Gallensalze in Hepatozyten (Becker et al., 2007b) oder Arsentrioxid (As₂O₃) in U-937 Zellen (Nolte et al., 2004) nicht abhängig von einer Caspase-Aktivierung sind. Eine D epolarisation der P lasmamembran kann dur ch den erhöhten E instrom von Natrium- oder C alciumionen hervorgerufen werden. S omit kann spekuliert werden, dass CD95L zusätzlich Kationenkanäle oder –transporter aktiviert, welche in unseren

Experimenten nicht gemessen werden konnten. Folglich könnte die Aktivierung der Chloridkanäle zu ei nem e rhöhten C 1 -Einstrom und s omit zur in trazellulären Akkumulation von Chlorid führen.

In der Literatur findet man diverse Arbeiten, welche proapoptotische Liganden mit einer Veränderung der Ionenleitfähigkeit in Verbindung bringen. Sob eschrieben Nietsch et al. eine zweifache Erhöhung von Kaliumströmen und einen fünffachen Anstieg von Chloridströmen als frühe Ereignisse in der TNF (tumor necrosis factor)induzierten Apoptose in HCT (rat he patoma) Zellen. Die Autoren (Nietsch et al., 2000) folgern, dass die Aktivierung der Chloridkanäle zum Ausstrom von Chlorid führt und die Plasmamembran somit depolarisiert wird. Somit würde auch K⁺ die Zelle verlassen, womit es zu einem KCl Efflux käme. Der Verlust von os motisch aktivem K Cl würde mit dem Austritt von Wasser und dem Schrumpfen der Zelle, dem AVD (apoptostic volume de crease), einhergehen (Kerr et al., 1972, Maeno et al., 2000, N ietsch et al., 2000). Diese Theorie würde ab er nicht die Akkumulation von C hlorid i m Z ytoplasma e rklären. Der A nstieg d er in trazellulären C hloridkonzentration i st j edoch e in allgemeines Merkmal d er H epatozyten-Apoptose und tritt u nmittelbar n ach A pplikation verschiedener proapoptotischer Stimuli, w ie hydrophobe Gallensalze (Becker et al., 2007b), CD95L (Reinehr et al., 2008) oder Hyperosmolarität (Reinehr et al., 2006) auf. Des Weiteren führt die Stimulation mit dem pr oapoptotischen G allensalz T LCS ni cht z ur A ktivierung de s ba salen Chloridstroms, was in diesem Fall zu erwarten wäre. Somit kann spekuliert werden,

dass di e C D95L-induzierte A ktivierung e inen Einstrom v on C hlorid vermittelt, wodurch es zur Akkumulation von Chlorid im Zytosol kommt.

Szabò et al. konnten eine Aktivierung von Chloridkanälen in Jurkat T-Lymphozyten nach der Behandlung mit CD95-spezifischen Antikörpern zeigen. Sie vermuten, dass es sich bei den hier aktivierten Chloridkanälen um jene Kanäle handelt, welche auch am RVD *(regulatory volume de crease)* nach os motischer Schwellung beteiligt sind (Szabò et al., 1998). Beide Stimuli, Zellschwellung (Lepple-Wienhues et al., 1998) und C D95-Aktivierung (Szabò et a l., 1998) , werden übe r d ie Src–ähnliche Tyrosinkinase (*sarcoma-like kinase*) Lck⁵⁶ vermittelt, welche in Lymphozyten durch Ceramide ak tiviert wird und z ur H emmung des N a⁺/H⁺-Austauschers und de r Aktivierung e ines auswärts gleichrichtenden Chloridstroms f ührt. Auch i n de r CD95L-induzierten Apoptose in Hepatozyten kommt es zur Bildung von Ceramiden, welche wiederum die Src-Kinase Yes aktivieren (Becker et al., 2007a und b, Reinehr et al., 2004 und 2008). Es könnt e also a uch hi er z u e iner H emmung des Na⁺/H⁺-Austauschers und zur Aktivierung eines auswärts gleichrichtenden Stroms kommen. Letzteres konnte, wie beschrieben, in dieser Arbeit gemessen werden.

Die v erminderte A ktivität des N a^+/H^+ -Austauschers könnt e e ine i ntrazelluläre Akkumulation von H^+ zur Folge haben, welche zur Hemmung von Kaliumkanälen in der P lasmamembran f ühren ka nn. Die H emmung von K aliumkanälen kann eine Depolarisierung der P lasmamembran auslösen, welche einen E instrom von Chlorid über di e C D95L-aktivierten C hloridkanäle nach s ich z iehen w ürde. Dieser Mechanismus könnte die DIDS-Sensitivität des Chloridanstiegs erklären (Muallem et al., 1988), welche be reits i n M QAE-Fluoreszenz E xperimenten g ezeigt werden konnte (Reinehr et al., 2008).

Der z uvor diskutierte Mechanismus übe r d ie B ildung von C eramiden, di e Aktivierung von Yes u nd de r da rauf folgenden F ormierung d es D ISC *(death inducing signal complex)*, welche eine Caspase-8 Aktivierung zur Folge hat, würde den autoamplifizierenden Mechanismus der CD95-Aktivierung (Reinehr et al., 2008) unterstützen und d en gemessenen Anstieg des ba salen C loridstroms in di esen Kontext einfügen (Becker et al., 2007a und b, Reinehr et al., 2002, 2003a und 2008). Die nach der 16 – 24-stündiger Vorinkubation mit CD95L untersuchten Hepatozyten, zeigten die Tendenz einer Aktivierung des basalen Chloridstroms. Da die Zellen für die M essungen i ntakt s ein m üssen, sind di e h ier unt ersuchten Zellen jene, w elche sich für d ie Z eit d er S timulation (16–24 h) dem a poptotischen Z elltod e ntziehen

konnten. Es könnte sein, dass die Autoamplifikation des CD95L-Signals (Reinehr et al., 2008) in diesen Zellen notwendig war um die Apoptose einzuleiten und dass es somit in diesen Z ellen erst n ach e iner r elativ la ngen S timulation mit C D95L z ur Iniziierung de r C D95-abhängigen A poptose kom mt. I nteressanterweise z eigten CD95L-stimulierte Hepatozyten e ine v erstärkte Reaktion au f d ie R eduktion de r extrazellulären O smolarität. S o konnte ei ne s tärkere Aktivierung des s chwellungs-aktivierten C hloridstroms 5 Minuten nach dem hypotonem S chock g emessen werden. D ies b estätigt erneut, d ass e s s ich be i de m unt er i sotonen B edingungen gemessenen Chloridstroms, welcher durch CD95L aktiviert wird, tatsächlich um eine basal aktive Form des I_{CL,swell} handelt.

Da dur ch di e Stimulation mit C D95L eine Aktivierung der dem $I_{Cl,swell}$ zugrunde liegenden I onenkanäle s tattfand, können m ehr C hloridionen z ur s elben Z eit di e Plasmamembran passieren.

5 Zusammenfassung

Proapoptotische S timuli w ie C D95-Ligand (CD95L) und h ydrophobe G allensalze, z.B. T aurolithocholat (TLCS), induzieren i n H epatozyten i nnerhalb w eniger Sekunden e inen A nstieg de r i ntrazellulären C hloridkonzentration ($[\cCl]_i$), w elcher als e rstes E reignis im A poptose-Signalweg v ermutet w ird. Welche E reignisse z ur Akkumulation von Chlorid i n de r Zelle f ühren, war noc h völ lig unk lar und i st Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Aus di esem G runde s ollte unt ersucht w erden, i) ob T LCS und CD95L di e Chloridleitfähigkeit der Plasmamembran von H epatozyten s o modifizieren können, dass e s z u e inem A nstieg de r i ntrazellulären C hloridkonzentration kom mt, ii) o b TUDC u nd T C e inen Einfluss a uf d ie C hloridleitfähigkeit d er P lasmamembran haben und w enn j a, o b und w ie s ich di e E ffekte unt erscheiden, i ii) w elche Mechanismen de n pot entiellen M odifikationen z ugrunde l iegen und iv) w elche Unterschiede sich zwischen TLCS- und CD95L-induziertem Effekt feststellen lassen. Zur A bleitung d er C hloridströme ü ber d ie P lasmamembran is olierter H epatozyten der R atte b ediente m an s ich d er P atch-Clamp-Technik i n de r "Whole-Cell"-Konfiguration. Ca²⁺- und cAMP-abhängige Chloridströme wurden ausgeschlossen.

Es k onnte g ezeigt w erden, d ass u nstimulierte H epatozyten ei ne b asal ak tive F orm des s chwellungsaktivierten C hloridstroms, $I_{Cl,swell}$, au fweisen, welcher d urch ei ne Auswärtsgleichrichtung, e ine s chnelle A ktivierung, eine pot entialabhängige Inaktivierung bei Potentialen über +40 mV sowie eine Aktivierung unter hypotonen und eine R eduktion unter h ypertonen Bedingungen gekennzeichnet ist. In HEK293 Phoenix-Zellen ist dieser Strom signifikant schwächer.

TLCS h emmt r eversibel sowohl de n basalen w ie au ch d en s chwellungsaktivierten Chloridstrom, wobei es nicht zu einer zytoplasmatischen Signaltransduktion kommt, sondern d er E ffekt ü ber ei ne Interaktion d es G allensalzes m it e xtrazellulären Strukturen d er P lasmmembran v ermittelt w ird. Hier i st b eispielsweise eine n ichtkompetitive Hemmung der Kanalpore möglich. Weiterhin konnte eine beschleunigte Inaktivierungskinetik ge messen w erden, w elche ve rmutlich ke ine ph ysiologische Bedeutung h at, a ber de n E ffekt auf die b eteiligten C hloridkanäle ve rstärkt. B eide Effekte s ind dos isabhängig. D ie T LCS-induzierte H emmung b etraf s owohl de n Chloridinflux a ls a uch d en –efflux. Im Gegensatz zu T LCS hatten T UDC und T C keinen Effekt auf den Chloridausstrom. TUDC hemmt lediglich den Chlorideinstrom in d ie Z elle. Auch d ieser E ffekt wurde von d er ex trazellulären S eite d er P lasmamembran und ohne Beteiligung zytoplasmatischer Signaltransduktion vermittelt.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Ruhepotenzial von H epatozyten n egativer a ls das G leichgewichtspotenzial von Chlorid i st. F ür di ese H ypothese m üsste C hlorid i m H epatozyten übe r d em Gleichgewicht verteilt sein. Ein kontinuierlicher Chloridinflux könnte über elektrisch neutrale Transportsysteme, wie den $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter, vermittelt werden. Unter Ruhebedingungen käme es somit zu einem kontinuierlichen Chloridefflux. Die TLCS-induzierte H emmung dieses A usstroms könnte s omit z ur A kkumulation von Chlorid in der Zelle führen.

CD95L h atte e ine A ktivierung d es b asalen C hloridstroms z ur F olge, der e iner, wahrscheinlich C aspase-8-abhängigen, z ytoplasmatischen S ignaltransduktion unterliegt. Eine D epolarisation de r P lasmamembran, übe r di e A ktivierung von Kationenkanälen oder –transportsystemen (z.B. Na⁺/H⁺-Austauscher) und der darauf folgende CI⁻-Influx, über die nun aktivierten Chloridkanäle, sind als Auslöser für die CD95L-induzierte Chloridakkumulation in der Zelle wahrscheinlich.

Somit unt erscheiden sich TLCS- und CD95L-induzierter Anstieg der $[Cl^-]_i$ klar in ihren Mechanismen, münden aber letztlich in den gleichen Apoptose-Signalweg.

6 Abstract

In hepatocytes, proapoptotic stimuli such as CD95 ligand (CD95L) and hydrophobic bile acids, e.g. taurolithocholylsulfate (TLCS), lead within seconds to an increase of the cytosolic chloride concentration ($[C\Gamma]_i$), which is thought to be the initial trigger for CD95-dependent a poptosis pa thway. The bile s alts T aurocholate (TC) and tauroursodeoxycholate (TUDC) do not increase $[C\Gamma]_i$. The upstream events leading to the accumulation of chloride within the c ell are s till unknow n. The aim of the present s tudy w as to i nvestigate i) if the TLCS- and C D95L-induced cytosolic chloride i ncrease i s du e t o a m odification of t he plasma membrane c hloride conductance, and if and how it can be distinguished from those given by TLCS, iii) which are the mechanisms underlying the potential modifications on the chloride flux and iv) if there are differences in the TLCS- and CD95L-induced effect. Therefore patch-clamp e xperiments in the w hole-cell configuration w ere p erformed. The hepatocytes us ed in t his s tudy were freshly i solated from m ale rats and hol d i n primary cell culture.

Unstimulated hepatocytes e xhibit under i sotonic c onditions a ba sal f orm of t he swelling-activated ch loride cu rrent, $I_{Cl,swell}$. T his cu rrent i s ch aracterized b y an outward r ectification, a f ast a ctivation, a p otential-dependent i nactivation a t potentials more positive than +40 mV, it becomes activated by hypotonic conditions and i nhibited b y h ypertonic c onditions, r espectively. In H EK293Phoenix c ells, a human renal cell line, this current was significantly weaker under isotonic conditions. TLCS was able to inhibit the basal as well as the swelling-activated chloride current in a r eversible ma nner, w ith a ma ximum in hibition a lready after 5 min utes. Additionally, an a cceleration of t he pot ential-dependent i nactivation w as de tected, but w e s uppose t hat t his e ffect has no ph ysiological r elevance, but s upports t he presence of t he e ffect b y T LCS. Both effects were d ose-dependent. T he c urrent inhibition w as d etectable a t p ositive a s w ell as at n egative m embrane p otentials, representing the influx and efflux of chloride, respectively.

In c ontrast, th e a ntiapoptotic b ile a cid TUDC only i nhibited t he chloride i nflux. Interestingly, the b ile ac ids ach ieve their effects from the extracellular s ide of the plasma membrane without requirement of any cytoplasmatic signal transduction. As an example, a non-competitive in hibition without pass-over of the bile acid c ould
cause this effect. TC, a bile acid which do not effect apoptosis in hepatocytes, did not affect the basal chloride current in our experiments.

Our da ta c ould be easily e xplained pos tulating t hat i n he patocytes t he r esting membrane potential is more negative than the reversal potential of chloride. For this hypothesis c hloride h ave t o be distributed a bove t he e quilibrium. Therefore, t here would be an efflux of chloride under resting conditions. Hence, an inhibition of the efflux b y T LCS co uld l ead t o an accu mulation of c hloride w ithin t he c ell. A continuous e ntrance o f chloride i nto t he cell c ould be r ealized b y e lectro ne utral transport s ystems, s uch a s t he N $a^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter. Furthermore, a c hloride channel-independent mechanism is possible.

The d eath l igand C D95L a ctivates t he b asal ch loride cu rrent. A s ex pected f or a receptor-binding l igand, C D95L a ffects t he c urrent only when s ignal t ransduction could oc cur. It i s v ery l ikely t hat an c aspase-dependent de polarisation of t he plasmamembrane du e t o m odifications of c ation c hannels or t ransporter s ystems, such as the Na^+/H^+ -exchanger, with simultaneous activation of chloride channels, as observed in this study, leads to an anhanced influx of chloride.

Therefore, t he T LCS- and C D95L-induced i ncrease of t he c ytosolic c hloride concentration u nderlies d ifferent m echanisms that f inally le ad in to the s ame apoptosis pathway.

7 Literaturverzeichnis

Adams DH, Eksteen B. (2006) Aberrant hom ing of m ucosal T cells and extraintestinal ma nifestations o f in flammatory b owel d isease. *Nature R eviews Immunology* 6:244-251.

Ackerman M J, Krapivinsky G B, G ordon E, K ravivinsky L, C lapham D C. (1994) Characterisation of a native swelling-induced chloride current, I_{Cl.swell}, and its regulatory protein pI(Cln), in Xenopus oocytes. *Japan Physiol.* 44:17-24.

Al-Awqati Q. (1995) Chloride channels of intracellular organells. *Cell Biol.* 7:504-508.

Alvarez-Leefmans FJ, Gamiño SM, Giraldez F, Noguerón I. (1988) Intracellular chloride r egulation i n a mphibian dor sal r oot g anglion ne urones s tudied with i on-selective microelectrodes. *J. Physiol.* 406:225-246.

Anwer MS, Branson A U, A tkinson JM. (1991) Mechanisms of i nhibition of hepatic bi le acide upt ake b y amiloride and 4,4' -diisothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene (DIDS). *Biochem. Pharmacol.* 42:135-141.

Anwer MS, Engelking LR, Nolan K, Sullivan D, Zimniak P, Lester R. (1988) Hepatotoxic bi le aci ds i ncrease cytosolic C a^{2+} activity of is olated r at h epatocytes. *Hepatology 8:887-891*.

Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305–1308.

Ashkenazi A. (2002) Targeting de ath and de coy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer 2:420-430.*

Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. (1986) Bile acidinduced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses 19:57-69.*

Ballarori N, Truong AT, Jackson PS, Strange K, Boyer JL. (1995) ATP depletion and inactivation of an ATP-sensitive taurine channel by classic ion channel blockers. *Mol. Pharmacol.* 48:472-476.

Banderali U, Roy G. (1992) Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am. J. Physiol. 263:1200-1207.*

Barnhart B C, Alappat EC, P eter ME. (2003) The C D95 t ype I/type II model. *Semin. Immunol.* 15:185-193.

Baumgartner C M, C lemo H F. (2003). Swelling-activated ch loride ch annels in cardiac ph ysiology a nd pa thophisiology. *Progress i n B iophysics and M olecular Biology* 82:25-42.

Becker S, Reinehr R, Graf D, vom Dahl S, Häussinger D. (2007a) Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 19:89-98.

Becker S, Reinehr R, G rether-Beck S, E berle A, Häussinger D. (2007b) Hydrophobic bile salts trigger ceramide formation through endosomal acidification. *Biol. Chem.* 388:185-196.

Bennet M, MacDonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. (1998) Cell s urface t rafficking o f F as: a r apid m echanism of p53 -mediated a poptosis. *Science 282:290-293*.

Bodily K, Wang Y, Roman R, Sostman A, Fitz JG. (1997) Characterization of a swelling-activated anion c oductance i n hom ozygous t yping c ell h epatoma c ells. *Hepatology 25:402-410.*

Boese S H, Wehner F, K inne RKH. (1996) Taurin permeation through s wellingactivated an ion conductance i n r at IMCD i n primary culture. *Am. J. Physiol.* 271:498-507.

Bormann J, **Hamill OP**, **Sakmann B**. (1987) Mechanism of a nion p ermeation through channels g ated b y glycin and gamma-aminobutric a cid i n m ouse c ultured spinal neurons. *J. Physiol.* 385:243-286.

Bormann J. (2000) The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci. 21:16-19.*

Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7972-7976.*

Bradbury NA, Jilling T, Kirk KL, Bridges RJ. (1992) Regulated endocytosis in a chloride secretory epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.* 262:752-759.

Breitwieser G E, Altamirano AA, Ru ssell JM. (1990) Osmotic s timulation of $Na^+/K^+/Cl^-$ -cotransport i n *squid* giant a xon i s [Cl]_i dependent. *Am. J. P hysiol.* 258:749-753.

Brenner S. (1974) New directions in molecular biology. Nature 248:785-787.

Briz MJ, Perez O. (2009) Bile-acid-induced c ell i njury and protection. *World J*. *Gastroenterol.* 15:1677-1689.

Bussolati O, Uggeri J, Belletti S, Dallasta V, Gazzola GC. (1996) The stimulation of N $a^+/K^+/2CI^-$ -cotransport and of system AS for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during cell cycle. *FASEB J. 10:920-926*.

Chamberlin M E, Strange K. (1989) Anisosmotic c ell v olume r egulation: a comparative view. *Am. J. Physiol. 257:159-173.*

Cohen GM. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. 326:1-16.

Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer 2:647–656.*

Deveraux Q L, Reed J C. (1999) IAP family proteins: suppressors of a poptosis. *Genes Dev.13:239–252.*

Eberle A, Reinehr R, Becker S, Keitel V, Häussinger D. (2007) CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. *Apoptosis 4:719-729*.

Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol P athol.* 35:495–516.

Esteller A. (2008) Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol.* 14:5641-5649.

Fahlke C, Knittle T, Gurnett CA, Campbell KP, George AL JR. (1997) Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels. J. Gen. Physiol 109:93-104.

Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. (1999) Toxic bi le s alts i nduce r odent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J. Clin. Invest. 103:137-145.

Faundez V, Hartzell HC. (2004) Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci. STKE 233:re8*

Feranchak AP, Fitz JG, Roman RM. (2000) Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. J. Hepatol. 33:174-182.

Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. (2006) Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J. Memb. Biol. 209:43-58.*

Friedman S L. (1993). The cellular basis of hepatic fibrosis. N. Engl. J. Med. 328:1828-1835.

Friedman S L, Roll J F, B oyles J, B issell D M. (1985) Hepatic lip ocytes: the principal collagen producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. A cad. Sc i. USA* 82:8681-8685.

Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. (1999) Mutational analysis demonstrates that C IC-4 and C IC-5 d irectly m ediate p lasma membrane currents. *J B iol. Chem.* 74:896-902.

Frings S, **Reuter D**, **Kleene S F. (2000)** Neuronal C a²⁺-activated C l⁻- channels: homing in on an elusive channel species. *Prog. Neurobiol.* 60:247-289.

Furukawa T, Ogura T, Katayama Y, Hiraoka M. (1998) Characteristics of rabbit ClC-2 c urrent e xpressed i n *Xenopus* oocytes a nd i ts c ontribution t o volume regulation. *Am. J. Physiol. 274:500-512.*

Gamba G. (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* 85:423–493.

Garidel P, Hildebrand A, Knauf K, Blume A. (2007) Membranolytic activity of bile salts: in fluence of biological membrane properties and composition. *Molecules* 12:2292-2326.

Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. (2005) Apoptosis in liver diseases: detection and therapeutic applications. *Med. Sci. Monit.* 11:337-345.

Geerts A. (2001) History, he terogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21:311-335.

Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. (2002) Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 122:1411-1427.

Graf J, Häussinger D. (1996) Ion t ransport in he patocytes: m echanisms a nd correlation to cell volume, hormon actions and metabolism. *J. Hepatol.* 24:53-77.

Graf J, Henderson R M, K rumpholz B, B oyer JL. (1987) Cell m embrane and transepithelial voltages and resistance in isolated rat hepatoyte couplets. *J. Membr. Biol.* 95:241-254.

Green DR, Reed JC. (1998) Mitochondria and apoptosis. Science 281:1309-1312.

Grisham JW, Nopanitaya W, Compagno J, Nägel AE. (1978) Scanning electron microscopy of n ormal r at liv er: the s urface s tructure of its c ells a nd tissue components. *Am. J. Anat.* 144:295-321.

Gründer S, Thiemann A, Pusch M, Jentsch TJ. (1992) Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature 360:759-62*.

Gschwentner M, Susanna A, Schmarda A, Laich A, Nagl UO, Ellemunter H, Deetjen P, Frick J, Paulmichl M. (1996) ICln: a chloride channel paramount for cell volume regulation. J. Allergy Clin. Immunol. 98:98-101.

Guicciardi ME, Gores GJ. (2005) Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut 54:1024-1033*.

Haddad P, Beck JS, Boyer JL, Graf J. (1991) Role of chloride ions in liver cell volume regulation. *Liver Physiol.* 261:340-348.

Hagiwara N, M asuda H, S hoda M, I risawa H. 1992 Stretch-activated an ion currents of rabbit cardiac myocytes. J. Physiol. 456:285-302.

Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Häussinger D. (1991a) Interactions between cell volume and hepatic nitrogen metabolism. *Contrib. Nephrol.* 92:175-81.

Hallbrucker C, vom D ahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D. (1991b) Modification of liver cell volume by insulin and glucagon. *Pflugers Arch.* 418:519-521.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patchclamp t echniques f or h igh-resolution cu rrent recording f rom cel ls an d cel l-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70.

Häussinger D, Lang F. (1991) Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071:331-350.

Häussinger D, Lang F. (1992) Cell volume and hormone action. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:371-373.

Häussinger D, Hallbrucker C, Saha N, Lang F, Gerok W. (1992) Cell volume and bile acid excretion. *Biochem. J.* 288:681–689.

Häussinger D. (1990a) Nitrogen me tabolism in liv er: s tructural a nd functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* 267:281-290.

Häussinger D, Hallbrucker C, vom D ahl S, Lang F, Gerok W. (1990b) Cell swelling inhibits proteolysis in perfused rat liver. *Biochem. J.* 272:239-42.

Häussinger D. (1996) The r ole o f c ellular h ydration in the r egulation o f cel l function. *Biochem. J.* 313:697-710.

Häussinger D, F. Schliess. (1999) Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 255:551-555.*

Heller P, Van d er K loot W. (1974) Transmembrane pot entials i n guinea-pig hepatocytes. *J Physiol.* 243:577-598.

Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature 407:685-687.

Heuman DM, Mills AS, McCall J, H ylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. (1991) Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile acid salts. *Gastroenterology 100:201-211*.

Higgins C F. (2001) ABC transporters: ph ysiology, s tructure and m echanism: an overview. *Res. Microbiol. 152:205-210.*

Hille B. (2001) Channels of Excitable Membranes. 3rd edition Sinauer Associates Inc.

Hoffmann E K, Lambert I H. (1983) Amino a cid t ransport a nd cell vol ume regulation in Ehrich ascites tumour cells. *J. Physiol.* 338:613-625.

Hofmann A F. (1990) Bile a cid s ecretion, b ile flow and b iliary lip id secretion in human. *Hepatology 12:17-22*.

Itoh N, Nagata S. (1993) A novel protein domain requiered for apoptosis. J. Biol. Chem. 268:10932-10937.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, N agata S. (1991) The pol ypeptide e ncoded by the cDNA for hum an cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell 66:233-243*.

Jackson PS, Churchwell K, Ballatori N, Boyer JL, Strange K. (1996) Swellingactivated anion conductance in s kate hepatocytes b y cell C 1 and A TP. *Am*. *J. Physiol.* 270:57-66.

Jackson P S, Morrison R, S trange K. (1994) The vol ume-sensitive or ganic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding: *Am. J. Physiol.* 267:1203-1209.

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

Jones AL, Schmucker DL, Renston RH, Murakami T. (1980) The architecture of bile s ecretion. A morphological perspective of physiology. *Dig. Dis. Sci.* 25:609–629.

Junqueira K, Carneiro J. (1984) Histologie. Springer Verlag, Berlin, Deutschland.

Katz NR. (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J. Nutr. 122:843-849.*

Kawamata YR, Fujii M, Hosoya M, Harada H, Yoshida M, Miwa S, Fukusumi Y, Habata T, Itoh Y, Shintani S, Hinuma Y, Fujisawa M, Fujino. (2003) A G-protein-coupled receptor responsive to bile acids. J. Biol. Chem. 278:9435-9440.

Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, Rupprecht C, Görg B, Selbach O, Häussinger D, Kubitz R. (2007) The G-protein c oupled bile s alt receptor T GR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 45:695-704.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue. *Br. J. Cancer 26:239-257*.

Kidd JF, Thorn P. (2000) Intracellular Ca^{2+} and Cl^{-} channel activation in secretory cells. *Annu. Rev. Physiol.* 62:493-513.

Kirk K, Ellory JC, Young JD. (1992) Transport of organic substrates via a volumeactivated channel. J. Biol. Chem. 267:23475-23478. Koch KS, Leffert H L.(1979) Increased s odium in flux is n ecessary to initiate r at hepatocyte proliferation. *Cell 18:153-163*.

Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, R icker K, Wol f F, O tto M, Z oll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ. (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257:797-800.

Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. (2007) CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352:410-417.

Kordes C, Sawitza Iris, Häussinger D. (2008) Canonical Wnt signaling maintains the q uiescent s tage of hepatic s tellate cel ls. *Biochem. Biophys. R es. Commun.* 367:116–123.

Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, J entsch T J. (2001) Loss of t he C lC-7 c hloride c hannel l eads t o osteopetrosis in mice and man. *Cell 104:205-215*.

Kremer A E, Rust C, Eichhorn P, Beuers U, Holdenrieder S. (2009) Immunemediated liver di seases: pr ogrammed cell de ath ligands and c irculating a poptotic markers. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 9:139-156.

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

Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Leppie-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E. (2000) Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell. Physiol. Biochem.* 10:417-428.

Lavrik I N, Golks A , Kr ammer PH. (2005) Caspases: p harmacological manipulation of cell death. J. Clin. Invest. 115:2665-2672.

Lepple-Wienhues A, Szabò I, Laun T, Kaba NK, Gulbins E, Lang F. (1998) The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. J. Cell Biol. 141:281-286.

Lewis CA, Ahmed Z, Faber DS. (1991) A characterization of glycineric receptors present in cultured rat medulla neurons. J. Neurophysiol. 66:1391-1303.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998) Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell 94:491-501*.

Li X, Weinman SA. (2002) Chloride channels and hepatocellular function: prospect for molecular identification. *Annu. Rev. Physiol.* 64:609-633.

Lindsell P , Hanrahan JW. (1999) Substrates of multidrug r esistance-associated proteins bl ock t he c ystic f ibrosis t ransmembrane c onductance r egulator chloride channel. *Br. J. Pharmacol. 126:1471-1477.*

Lindstrom J, Anand R, Peng X, Gerzanich V, Wang F, Li Y. (1995) Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann. NY Acad. Sci.* 757:100-116.

Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, T hakker R V. (1996) A c ommon m olecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature 379:398-399*.

Locksley R M, Killeen N, L enardo MJ. (2001) The T NF a nd T NF r eceptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487–501.

Lowe G, Gold GH. (1993) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory cells. *Nature 366:283-286*.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature 432:* 307-15.

Lytle C, Forbush B 3rd. (1996) Regulatory phosphorylation of the secretory Na⁺-K+-2Cl⁻-cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl⁻. *Am. J. Physiol. 270:437-448.*

Maduke M, Pheasant D J, Miller C. (1999) High-level expression, f unctional reconstitution, and quaternary structure of a procaryotic CLC-type chloride channel. *J. Gen. Physiol.* 114:713-722.

Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. (2000) Normotonic cell shrinkage be cause of d isordered vol ume r egulation i s a n e arly p rerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9487-9492.

Majhi PR, B lume A. (2002) Temperature-induced mic elle v esicle tr ansition in DMPC-SDS and DMPC-DTAB mix tures studied by calorimetry and dynamic light scattering. *J. Phys. Chem.* 106:10753-10763.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284:1362-1365.

Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. (2002) Identification of a membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun. 298:714-719.*

Mayer ML. (1985) A cal cium-activated ch loride current g enerates the af terpolarisation of rat sensory neurons in culture. J. Physiol. 364:217-239.

Meier P J. (1995) Molecular m echanisms of hepatic b ile s alt tr ansport f rom sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol. 269:801-812*.

Meijer AJ, Gimpel JA, Deleeuw GA, Tager JM, Williamson JR. (1975) Role of urea s ynthesis f rom a mmonia b y i solated r at he patocytes of anion t ranslocation across the mitochondrial membrane in the regulation. *J. Biol. Chem.* 250:7728-7738.

Meng LJ, Wang P, Wolkoff AW, Kim RB, Tirona RG, Hofmann AF, Pang KS. (2002) Transport of s ulfated, a midated bi le a cid, s ulfolithocholyltaurine, i nto r at hepatocytes is mediated by Oatp1 and Oatp2. *Hepatology 35:1031-1040*.

Meng X J, Weinman S A. (1996) cAMP- and s welling-activated c hloride conductance in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. 271:112-120.*

Middleton R E, Pheasant D J, Mi ller C. (1994) Purification, reconstitution, a nd subunit composition of a voltage-gated chloride channel from Torpedo electroplax. *Biochemestry* 33:13189-13198.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799–1805.

Morales A, Nguyen Q T, Miledi R. (1994) Electrophysiological p roperties o f newborn and adult rat spinal c ord glycin r eceptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3097-9101.*

Moriyama N, Nelson Y. (1997) The pur ified A TPase f rom c hromaffin g ranule membranes is an anion-dependent proton pump. J. Biol. Chem. 262:9175-9180.

Motta P M. (1984) The three-dimensional mic roanatomy of the liver. *Archivum Histologicum Japonicum*. 47:1-30.

Moule S K, McGivan JD. (1990) Regulation of the plasma membrane potential in hepatocytes: mechanism a nd p hysiological s ignificance. *Biochim. Biophys. Acta. 1031:383-397.*

Muallem S, Blissard D, Cragoe EJ Jr, Sachs G. (1988) Activation of the NA^+/H^+ and CI^-/HCO_3^- exchanger by stimulation of acid secretion in the parietal cell. *J. Biol. Chem. 263:14703-14711.*

Mukhopadhyay S, Maitra U. (2004) Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Science* 87:1666-1683.

Murer H, Hopfer U, Kinne R. (1976) Sodium/proton a ntiport i n br ush-bordermembrane v esicles is olated f rom r at s mall in testine a nd k idney. *Biochem. J.* 154:597-604.

Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. Cell 88:355-365.

Nietsch HH, Roe MW, Fiekers JF, Moore AL, Lidofski SD. (2000) Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor- α : role in liver cell death. *J. Biol. Chem.* 275:20556–20561.

Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:73–87.

Nilius B, Sehrer J, D roogmans G. (1994a) Permeation properties and modulation of vol ume-activated C l⁻ currents in human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 112:1049-1056.

Nilius B, Oike M, Zahradnik I, Droogmans G. (1994b) Activation of a CF current by hypotonic stress in human endothelia cells. J. Gen. Physiol. 103:787-805.

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

Nilius B, Droogmans G. (2003) Amazing c hloride c hannels: on ove rview. *Acta. Physiol. Scand.* 177:119-147.

Nishida T, Gatmaitan Z, Che M, Arias IM. (1991) Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6590-6594*.

Nolte F, Friedrich O, Rojewski M, Fink RHA, Schrezenmeiera H, Korpera S. (2004) Depolarisation of the plasma membrane in the arsenic trioxide (As2O3)- and anti-CD95-induced apoptosis in myeloid cells. *FEBS Letters 578:85–89*.

Oehm A Behrmann I, Falk W, P awlita M, Maier G, Klas C, L i-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 c ell s urface a ntigen, a member of the t umor ne crosis f actor/nerve g rowth factor receptor superfamily. Sequence identity with the F as antigen. J. Biol. Chem. 267:10709-10715.

Oiki S, Kubo M, Okada Y. (1994) Mg²⁺ and ATP-dependence of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.* 44:77-79.

Okada Y. (2006) Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity. *Contrib. Nephrol. 152:9-24.*

Opferman J T, Korsmeyer S J. (2003) Apoptosis in t he de velopment a nd maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4:410–415.

Orlowski J, **Grinstein S.** (2004) Diversity of the mammalian s odium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447:549-565.

Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ. (2001) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻- channel by its R domain. *J. Biol. Chem.* 276:7689-92

Owens D F, B oyce L H, D avis M B, Kriegstein A R. (1996) Excitatory G ABA responses i n embryonic and n eonatal cortical slices d emonstrated b y gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J. Neurosci.* 16:6414-6423.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284:1365-1368.

Pasquini L, Petrucci E, Riccioni R, Petronelli A, Testa U. (2006) Sensitivity and resistance o fh uman cancer cel ls t o T RAIL: m echanisms and t herapeutical perspectives. *Cancer Therapy* 4:47-72.

Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. (1998) Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin. Liver Dis.* 18:105-114.

Paulmichl M, Li Y, Wickman K, Ackerman M, Peralta E, Clapham D. (1992) New m ammalian ch loride ch annel i dentified b y expression c loning. *Nature*. *356:238-41*.

Paumgartner G, **Beuers U**. (2002) Ursodeoxycholic a cid i n c holestatic l iver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology*. 36:525-31.

Pazoles CJ, Creutz CE, Pollard HB. (1980) Evidencefor direct coupling of proton and anion transport in chromaffin granules. *Ann. NY Acad. Sci.* 358:354-355.

Perez MJ, **Briz O**. (2009) Bile-acid-induced c ell i njury and protection. *World J*. *Gastroenterology 15:1677-1689*.

Petzinger E B igalke H. (1986) Microelectrode m easurement o f c ell m embrane potential in is olated h epatocytes attached t o c ollagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 863:318-324.

Pfeiffer F, Graham D, Betz H. (1982) Purification by a ffinity chromatography of the glycin receptor of rat spina cord. J. Biol. Chem. 257:9389-9393.

Pusl T, **Beuers U**. (2006) Ursodeoxycholic a cid t reatment of vanishing bile d uct syndromes. *World J. Gastroenterol.* 12:3487-3495.

Putney LK, Vibat CR, O'Donnell ME. (1999) Intracellular Cl⁻ regulates Na⁺-K⁺- 2Cl⁻-cotransport a ctivity i n hum an t rabecular m eshwork cel ls. *Am. J. Physiol.* 277:373–383.

Quinton P M. (1990) Cystic f ibrosis: a d isease in e lectrolyte t ransport. FASEB Letters 4:2709-2717.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 4:138–144.

Ramadori G, **Moriconi F**, **M** alik I, **D** udas J. (2008) Physiology a nd pathophysiology of liver in flammation, damage and repair. *J. Physiol. Pharmacol.* 59:107-117.

Rappaport A M. (1976) The m icrocirculatory acinar concept o f n ormal and pathological hepatic structure. *Beitr. Pathol. 157:215-243.*

Rappaport AM. (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc. Res. 6:212-228.*

Reichling D B, K yrozis A , Wan g J, MacDermott A B. (1994) Mechanisms of GABA and glycin d epolarization-induced c alcium t ransients i n r at do rsal h orn neurons. *J. Physiol.* 476:411-421.

Reinehr R, Becker S, Braun J, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2006) Endosomal a cidification and a ctivation of N ADPH o xidase i soforms a re ups tream events in hyerosmolarity-induced hepatocyte a poptosis. *J. Biol. Chem. 281:23150-23166.*

Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2004) Involvment of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127:1540-1557.

Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2002) Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes to ward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology 36:602-614*.

Reinehr R, **Häussinger D**. (2007) CD95 a ctivation i n t he l iver: i on f luxes a nd oxidative signaling. *Arch. Biochem. Biophys*. *462*:124-131.

Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003a) Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF r eceptor a ssociation a nd t yrosine phos phorylation o f C D95 a s prerequisites f or C D95 m embrane t rafficking a nd D ISC f ormation. *FASEB J*. *17:731-733*.

Reinehr R, Graf D, Häussinger D. (2003b) Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves e pidermal g rowth f actor r eceptor-dependent C D95 t yrosine phosphorylation. *Gastroenterology 125:839-853*.

Reinehr R, **Sommerfeld A, K eitel V**, **G rether-Beck S**, **Häussinger D**. (2007) Amplification of CD95 activation by caspase 8-induced endosomal acidification in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 283:2211-2222.

Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Bile s alt-induced a poptosis i nvolves N ADPH ox idase isoform a ctivation. *Gastroenterology 129:2009-2031*.

Renehan A G, Booth C , Potten C S. (2001) What is a poptosis, and why is it important? *BMJ 322:1536–1538*.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.

Robertson MA, Foskett JK. (1994) Na⁺ transport pa thways i n s ecretory a cinar cells: membrane cross talk mediated by $[Cl^-]_i$. *Am. J. Physiol.* 267:146-156.

Rockey D C, Maher J J, Jar nagin WR , G abbiani G , F riedman SL . (1992) Inhibition of r at he patic l ipocyte activation in cu lture b y interferon-gamma. *Hepatology 16:776–784*. **Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. (1998)** Ursodeoxycholic acid ma y in hibit d eoxycholic a cid-induced a poptosis b y m odulating mitochondria transmembrane potential and reactive oxigen species. *Mol. Med.* 4:165-178.

Russell JM. (2000) Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. *Physiol. Rev.* 80:211-276.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004) Toxic p roteins r eleased f rom m itochondria i n c ell de ath. *Oncogene* 23:2861–2874.

Sardini A, Amey JS, Weylandt KH, Nobles M, Valverde MA, and Higgins CF. (2003) Cell vol ume r egulation and s welling-activated chloride c hannels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1618:153-162.

Sarota S. (1992) Swelling-induced chloride-sensitive current in canine artrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method. *Circ. Res.* 70:679-687.

Sawanobori T, Takanashi H, Hiraoka M, Iida Y, Kamisaka K, Maezawa H. (1989) Electrophysiological properties of is olated r at liver c ells. J. Cell. Physiol. 139:580-585.

Sawitza I, Kordes C, Reister S, Häussinger D. (2009) The niche of stellate cells within the rat liver. *Hepatology 50:1617-1624*.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer P H, P eter ME . (1998) Two C D95 (APO-1/Fas) s ignaling pa thways. *EMBO J.* 17:1675-1687.

Schliess F, Häussinger D. (2005) The cellular hydration state: role in apoptosis and proliferation. *Signal Transd. 6:297-302*.

Schliess F, Häussinger D. (2002) The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol. Chem.* 383:577-583.

Schliess F, vom Dahl S, Häussinger D. (2001) Insulin resistance by loop diuretics and hyperosmolarity in perfused rat liver. *Biol. Chem.* 382:1063-1069.

Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. (1990) Hepatic injury induced by bile salts correlation. *Hepatology 12:1216-1221*.

Schreiber R, Zhang F, Häussinger D. (1996) Regulation of vesicular pH in liver macrophages and parenchymal c ells b y a mmonia and a nisotonicity as a ssessed b y fluorescein isothiocyanate–dextran fluorescence. *Biochem. J.* 315:385-392.

Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B. (1998) Substrate specificity of the rat liver Na⁺-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am. J. Physiol.* 274:370-375. Schubert R, Schmidt K H. (1988) Structural changes in v esicle m embranes and mixed mic elles of v arious lip id c ompositions a fter b inding of di fferent bile s alts. *Biochemistry* 27:8787-8794.

Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, S anjad S A, T aylor C M, Pilz D, B rem A, T rachtman H, G riswold W, Richard GA, John E, Lifton RP. (1997) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17:171-178.

Smith CA, Farrah T, Goodwin R G. (1994) The T NF receptor s uperfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962.

Smyth M J, Godfrey D I, T rapani JA . (2001) A fresh l ook a t t umor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol. 2:293–299.*

Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ. (2000) Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by i ncreasing cell s urface t rafficking of Fas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278:992-999.

Solc C K, Wine JJ. (1991) Swelling-induced a nd de polarization-induced C 1⁻- channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am. J. Physiol. 261:658-674*.

Stieger B, O'Neill B, M eier PJ. (1992) ATP-dependent bi le-salt tr ansport in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. *Biochem. J.* 284:67-74.

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

Stutzin A, **Hoffmann E K. (2006)** Swelling-activated i on c hannels: f unctional regulation in cell swelling, proliferation and apoptosis. *Acta. Physiol. 187:27-42.*

Sulston JE . (1976) Post-embryonic d evelopment i nt he ve ntral c ord of *Caenorhabditis elegans. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 275:287-297

Suzuki M, Morita T, Iwamoto T. (2006) Diversity of Cl⁻ channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:12-24.

Szabò I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. (1998) Tyrosine ki nase-dependent a ctivation of a c hloride c hannel i n C D95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6169-6174.

Szücs G, Buyse G, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. (1996) Characterisation of vol ume-activated c hloride c urrents i n e ndothelia c ells f rom bovi ne pul monary artery. J. Membr. Biol. 149:189-197.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845–853.

Thomas C, **Pellicciari R**, **Pruzanski M**, **Auwerx J**, **S choonjans K**. (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:678-93.

Tseng GN. (1992) Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: ev idence for a volume-sensitive CT channel. *Am. J. Physiol. C ell P hysiol.* 262:1056-1068.

Vom Da hl S, **Häussinger D**. (1996) Nutritional s tate a nd s welling-induced inhibition of proteolysis in perfused rat liver. J. Nutr. 126:395-402.

Wake K. (1971) "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat. 132:429-462.*

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signalling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17:331-367.

Wang J. Reichling DB, Kyrozis A, MacDermott AB. (1994) Developmental loss of GABA- and glycin-induced depolarization and Ca^{2+} transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *Eur. J. Neurosci. 6:1275-1280*.

Wang K, Wondergem R. (1993) Redistribution of hepatocyte intracellular chloride during L-alanine uptake. *J. Membr. Biol.* 135:237–244.

Wehner F. (1993) Taurocholate d epolarizes r at h epatocytes i n primary culture by increasing cell membrane Na⁺ conductance. *Pflugers Arch.* 424:145-151.

Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA. (1998) Bile acid uptake via the human apical s odium-bile acid co transporter i s e lectrogenic. J. Biol. Chem. 273:34691-34695.

Weinman SA, Graf J, B oyer JL. (1989) Voltage-driven, t aurocholate-dependent secretion in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 256:826-832.

Wheeler H O. (1972) Secretion of bile a cids by the liver and their r ole in the formation of hepatic bile. *Arch. Intern. Med.* 130:533–541.

Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der SP, McCuskey RS. (1985) The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology 5:683-692*.

Wondergem R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Conner TD, Houser M, Ecay T W, Ferslew K E. (2001) Blocking s welling-activated chloride cu rrent inhibits mouse liver cell proliferation. *J. Physiol.* 532:661–672.

Worrell RT, Butt AG, Cliff WH, Frizzell RA. (1989) A volume-sensitive chloride conductance in human colonic cell line T84. *Am. J. Physiol. 256:1111-1119*.

Xiong H, Li C, Garami E, Wang Y, Ramjeesingh M, Galley K, Bear CE. (1999) ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J. Membr. Biol.* 167:215-21. Zhang J, Lieberman M. (1996) Chloride conductance is a ctivated by membrane distention of cultured chick heart cells. *Cardiovasc. Res. 32:168-179.*

Zsembery A, **Strazzabosco M**, **Graf J**. (2000) Ca^{2+} -activated C I channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion. *FASEB J.* 14:2345-2356.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette
	AML 12	Mouse hepatocytes cell line
	APAF	Apoptotic protesase activating factor
	ASM	Acidic sphingomyelinase
	ATP	Adenosine triphosphate
	ATPase	Adenosine triphosphatase
	AVD	Apoptosis volume decrease
	AVD	Apoptotic volume decrease
B	Bax	Bcl-2-associated X protein
	Bcl-2	B-cell lymphoma 2
	Bid	BH3 interacting domain death agonist
	BSA	Bovines Serumalbumin
	Bsep	Bile salt export pump
С	cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
	Caspase	Cysteine-aspartat protease
	CD95L	CD95-Ligand
	CD95	CD95-Rezeptor (Fas, APO-1)
	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
	СНО	Chinese hamster ovary
	$[Cl^-]_i$	Intrazelluläre Chloridkonzentration
D	DIDS	4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disodium salt
	DISC	Death inducing signal complex
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonuleic acid
E	EC 50	Half maximum effect concentration
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EGFR	Epidermal growth factor receptor
	EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-
		Tetraacetat
F	FADD	Fas-associated death domain
	FCS	Fetal calf serum
	FXR	Nuclear farnesoid X receptor

G	GABA	y-aminobutric acid receptor
Н	HEK	Human embryonal kidney
	HTC	Rat hepatoma cell line
Ι	IAP	Inhibitor of apoptosis protein
L	LGIC	Ligand-gated chloride channels
Μ	MP	Membranpotenzial
	MQAE	[N-(ethoxy carbony lmethyl)-6-methoxy quinolinium
		bromide
	MRP	Multidrug resistence-associated protein
	MSD	Membrane spanning domain
Ν	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
	NBP	Nucleotide binding domain
	NCC	Na ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter
	Nctp	Na ⁺ -taurocholate cotransporting peptide
	NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter
	NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid
0	Oatp	Organic anion transporter
Р	PBC	Primäre Biläre Cholangitis
	РКС	Protein kinase c
R	ROS	Reactive oxygen species
S	Scr	Sarcoma
	SEM	Standard error of the mean
Т	TC	Taurocholat
	TLCS	Taurolithocholat
	TNF	Tumor necrosis factor
	TUDC	Tauroursodesoxycholat
U	U-937	Human myeloid cell line
V	VRAC	Volume regulated anion current

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2007 bis April 2010 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf im Rahmen des SFB 575 "Experimentelle Hepatologie" in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Markus Paulmichl am Department of Biomolecular Science and Biotechnology der Universität Mailand angefertigt. Allen, die mich hierbei unterstützt haben, möchte ich meinen großen Dank aussprechen. Besonders hervorheben möchte ich folgende Personen:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger für die Aufnahme in seine K linik und das i ntegrierte G raduiertenkolleg d es S FB 575, das i nteressante Thema und s eine kritische B egutachtung, sowie die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes in Mailand.

Ich da nke Herrn P rof. Dr. Markus P aulmichl f ür d ie B ereitstellung d es gut eingerichteten A rbeitsplatzes und di e f reundschaftliche Atmosphäre an s einem Institut. W eiterhin da nke i ch i hm f ür di e E inführung i n di e E lektophysiologie und seine gute und professionelle Betreuung auf diesem Gebiet.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich sehr Herrn Prof. Dr. William Martin.

Frau Dr. Silvia Dossena möchte ich großen Dank aussprechen dafür, dass sie mir die Methode des "Patch-Clamp" so professionell und zugleich herzlich beigebracht hat und mir jederzeit für Fragen und Problembehandlungen zur Seite stand.

Herrn P D Dr. Roland R einehr da nke i ch f ür seine s ehr gute w issenschaftliche Betreuung und seine ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Von g anzem Herzen d anke i ch m einer F amilie, g anz be sonders m einer M utter Angelika, für die liebvolle und uneingeschränkte Unterstützung und d ass ihr immer an mich glaubt. Das gesamte Studium und die nun ge folgte Promotion wären ohne euch nicht möglich gewesen. Danke! Nicht z uletzt, danke ich meinen be sten F reundinnen Theresa, A nna, T atjana, Michaela und meinem Freund Denis dafür, dass ihr immer für mich da seid. Es ist schön, dass es euch gibt, ihr seid toll!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten/Informationen:

Name:	Sarah Funke
Geburtsdatum:	17.08.1982
Geburtsort:	Düsseldorf
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig

Schulische Laufbahn:

1988 – 1992	Gemeinschaftsgrundschule Erich-Müller-Strasse
1992 - 1998	Realschule Benrath Wimpfenerstrasse
1998 – 2001	Abitur an der Gesamtschule Kikweg, Heidelberger Strasse

Akademischer Werdegang:

Okt. 2001 – Feb. 2007	Diplomstudiengang der Biologie an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf mit der Ausrichtung: Molekularbiologie, Genetik, Entwicklungsbiologie
	Vierwöchige Studienreise mit Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn an die Ostküste Australiens
	Diplomarbeit am Institut für Pathologie zum Thema: "Untersuchungen zur Expression von Daxx und seinen Varianten in malignen Tumoren des Menschen" Gesamtnote "sehr gut"
Apr. 2007 – Nov. 2010	Promotion an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitäts- klinikums Düsseldorf unter der Leitung von Herrn. Prof. Dr. med. Dieter Häussinger. Mitglied des integrierten Graduiertenkollegs des SFB 575 "Experimentelle Hepatologie"

Juli 2007 – Juli 2010 Forschungsaufenthalt am Department of Biomolecular Science and Biotechnology an der Universität Mailand.

Thema der Dissertation: "Der Effekt von Gallensalzen und CD95-Ligand auf Chloridkanäle isolierter Hepatozyten der Ratte".

11 Versicherung

Ich v ersichere, d ass i ch d ie v orliegende A rbeit o hne f remde H ilfe s elbstständig verfasst und nur di e angegebenen Q uellen und Hilfsmittel be nutzt ha be. W örtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den

(Sarah Funke)