PDF-Version

Aus dem Institut für Physiologie

Abteilung Neurophysiologie

der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

Direktor: Prof. Dr. U.Heinemann

Dissertation

"Zur Modulation volumenaktivierter Chloridströme in Endothelzellen"

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Digitale Dissertation

Stephan Heinke

geb. am 20.8.1966 in Friedrichroda

Dekan: Prof. Dr. med. M.Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. U.Heinemann

2. Prof. Dr. B.Nilius

3. PD Dr.med. H.Kühnert

eingereicht: Februar 1998

Datum der Promotion: 18.8.1998

Abstrakt

Volumeninduzierte Chloridströme wurden bereits in einer Reihe von Zelltypen charakterisiert. In dieser Arbeit wurde die Modulation volumenaktivierte Chloridströme $I_{Cl,Vol}$ und der Signalweg zu ihrer Aktivierung untersucht. In Endothelzellen aus der Pulmonalarterie des Rindes (CPAE) wurden der Membranstrom unter Anwendung der 'patch clamp' - Technik und simultan dazu die Konzentration des freien intrazellulären Kalziums $[Ca^{2+}]_i$ gemessen.

1. Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ kalziumunabhängig erfolgt. In dieser Arbeit wurde $I_{Cl,Vol}$ unter Pufferung des $[Ca^{2+}]_i$ mit BAPTA und EGTA gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß freies intrazelluläres Kalzium in Konzentrationen niedriger als 50 nM zur Stromaktivierung notwendig ist. Bei einer höheren Konzentration verliert der Strom jedoch seine Kalziumabhängigkeit.
2. Chromoglycinsäure (CL) blockiert $I_{Cl,Vol}$ in Endothelzellen. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zu dem klassischen Chloridkanalblocker NPPB geringer (K_i=15mM) und sehr langsam (im Mittel 100 s). Damit sind die blockierenden Eigenschaften auch geringer ausgeprägt als z.B. auf $I_{Cl,Vol}$ und Hemmung der Serotoninsekretion in Mastzellen.
3. Weiterhin war die Rolle von durch Proteinphosphorylierung modulierten intrazellulären Signalwegen bei der Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ Gegenstand von Experimenten.
   Weder die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch direkte Applikation des Phorbolesters PMA noch deren Ab - Regulation durch 24-stündige Inkubation mit PMA hatten Einfluß auf die Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$. Auch Wortmannin, ein Inhibitor sowohl der MAP - Kinasen (und damit des Tyrosinkinase - assoziierten Rezeptor - Signalweges) als auch der PI3 - Kinase, zeigte keinen Effekt auf $I_{Cl,Vol}$. Der Aktivator der MAP - Kinasen und der fokalen Adhaesionskinase p125FAK , die Substanz Lysophosphatsäure (LPA), zeigte weder einen Effekt auf $I_{Cl,Vol}$, noch konnte damit ein Chloridstrom induziert werden.
   Die Induktion von HSP durch Applizierung von thermischem und chemischem Streß unter Inkubation bei bis zu 45 °C über 60 min und Einwirkung von 0,3 mM Natriumarsenit zeigte keinerlei Einfluß auf $I_{Cl,Vol}$. Es konnte auch keine Aktivierung eines Chloridstromes beobachtet werden.
4. Zur Untersuchung des Aktivierungsmechanismus von $I_{Cl,Vol}$ dienten Experimente unter gleichzeitiger Messung von $I_{Cl,Vol}$, Membrankapazität (C_M) und (jedoch zeitlich unabhängig voneinander) der Zellhöhe. Die Ergebnisse wurden an Hand dreier Modellvorstellungen zur Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ diskutiert.

Es bestand eine enge Korrelation zwischen Veränderungen der Zellhöhe und des aktivierten Stromes. Beide korrelieren jedoch nicht mit den Änderungen von C_M. Dabei änderte sich C_M bei einem Teil der Zellen praktisch nicht, d.h. geringer als 2% des Ausgangswertes vor Applikation hypotoner Lösung (n=17), bei den verbliebenen Teil zeigten sich deutliche Veränderungen von durchschnittlich 10,6 ± 0,9 % (± SEM, n=5). In letzterem Fall änderte sich jedoch immer zuerst $I_{Cl,Vol}$ und dann C_M. Nach Inhibierung des intrazellulären Vesikeltransports durch Brefeldin A war $I_{Cl,Vol}$ ohne signifikante Änderungen auslösbar. Unter Cycloheximid, einem Blocker der Proteinsynthese auf Transkribtionssebene, wurden keine spezifischen Veränderungen von $I_{Cl,Vol}$ beobachtet.

Auf jeden Fall ist C_M nicht der primäre Trigger für $I_{Cl,Vol}$. Die Aktivierung von volumeninduzierten Chloridströmen erfolgt nicht maßgeblich durch die Inkorporierung von Ionenkanal - Proteinen enthaltenden Membranvesikeln.

Schlagworte

- Chlorid-Kanäle
- Endothel
- patch clamp
- intrazelluläres Kalzium

Abstract

Volume-induced chlorid currents are characterised for many types of cells. I have investigated the modulation and activation of these currents. In cultered pulmonary artery endothelial cells (CPAE) patch clamp maesurements of membrane currents and simultaneous maesurements of free intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) were performed.

1. Until now, activation of $I_{Cl,Vol}$ was characterised as Calcium-independently. I maesured the current buffering $[Ca^{2+}]_i$ with the Calcium chelators BAPTA and EGTA. It could be observed, that $[Ca^{2+}]_i$ at concentrations less than 50 nM is required to activate $I_{Cl,Vol}$. At higher concentrations, there is no modulation by $[Ca^{2+}]_i$.
2. Sodiumchromoglycate (CL) blocks $I_{Cl,Vol}$ in endothelium cells. This effect is small (K_i=15mM) and slow (100 s) as compared of those of the classical chlorid channel blocker NPPB. Inhibitory effects of CL to $I_{Cl,Vol}$ in endothelial cells are weaker than to $I_{Cl,Vol}$ and to secretion of serotonin in mast cells.
3. The role of intracellular phosphorylation signal pathways on activation of $I_{Cl,Vol}$ was investigated. Neither activation of protein kinase C (PKC) throught direct application of the phorbol ester PMA nor down-regulation through preincubation with PMA had any effect on activation of $I_{Cl,Vol}$. Also Wortmannin, an inhibitor of MAP-kinases, failed to have significant effects on $I_{Cl,Vol}$. Lysophosphatic acid, wich activates MAP kinases as well as focal adhaesion kinase p125FAK, did not have any effect on $I_{Cl,Vol}$ or activated some chlorid current.
   Induction of heat shock proteins (HSP) through application of thermical or chemical stress (incubation under 45 °C over 60 min or with 0,3 mM Sodiumarsenit) had no effect on $I_{Cl,Vol}$ nor some activation of chlorid currents could be observed.
4. We have combined maesurements of currents with maesurements of membrane capacitance (C_M) and (but not simultaniously) of changes in cell height to study the activation mechanism of $I_{Cl,Vol}$.

The swelling-induced current is correlated with the changes in cell height. However, neither the changes in cell height nor $I_{Cl,Vol}$ were correlated with C_M. In some cells (n=17), there was no substantial change (less than 2%) in C_M. In the remaining 5 cells, changes in C_M are arround 10,6% ± 0,9% (average ± SEM). Thereby changes of C_M started allways after those of $I_{Cl,Vol}$.

Inhibition of vesicular transport by Brefeldin A did not affect $I_{Cl,Vol}$ significantly. The block of protein synthesis by Cyclophosphamid did not have specific effects on $I_{Cl,Vol}$.

It is concluded, that C_M is not the primary trigger for $I_{Cl,Vol}$. Its activation is not due to incorporation of ion channels by vesicle fusion.

Keywords

- chlorid currents
- endothelium
- patch clamp
- intracellular calcium

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT **1**

SCHLAGWORTE **1**

ABSTRACT **2**

KEYWORDS **2**

INHALTSVERZEICHNIS **1**

1. EINFÜHRUNG **2**

1. 1 VOLUMENAKTIVIERTE CHLORID - KANÄLE 2
1.2 AKTIVIERUNG VON $I_{CL,VOL}$ 2
1.3 FUNKTIONELLE ROLLE VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDSTRÖME 3
1.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG 6
1.5 PHARMAKOLOGIE VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDKANÄLE 7
1.6 MODULATION VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDSTRÖME 9
1.7 MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG 12
1.8. CHARAKTERISTIK VON VOLUMENAKTIVIERTEN CHLORIDSTRÖMEN IN ENDOTHELZELLEN 14

2. AUFGABENSTELLUNG **17**

3. MATERIALIEN UND METHODEN **19**

3.1. ZELLEN 19
3.2. LÖSUNGEN 19
3.3. 'PATCH CLAMP' - TECHNIK ZUR MESSUNG VON TRANSMEMBRANÄREN STRÖMEN 22
3.4. MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION 23
3.5.KAPAZITÄTSMESSUNGEN 25
3.6. MESSUNG DER ZELLHÖHE 26
3.7. STATISTIK 27

4. ERGEBNISSE **28**

4.1. DER EINFLUß INTRAZELLULÄREN KALZIUMS AUF VOLUMENAKTIVIERTE CHLORIDSTRÖME 28
4.2 EINFLUß VON CROMOGLYCINSÄURE AUF VOLUMENAKTIVIERTE CHLORIDSTRÖME IN ENDOTHELZELLEN 32
4.3 MODULATION VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDSTRÖME DURCH PHOSPHORYLIERUNGSREAKTIONEN 36
4.4 WERDEN VOLUMENINDUZIERTE CHLORIDSTRÖME DURCH INKORPORIERUNG EINES KANALPROTEINS AKTIVIERT ? 40

5. DISKUSSION **46**

5.1 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON OSMOLARITÄTSÄNDERUNGEN FÜR ENDOTHELZELLEN 46
5.2 DIE ROLLE DES INTRAZELLULÄREN KALZIUMS BEI DER MODULATION VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDSTRÖME 46
5.3 EINFLUß VON CHROMOGLYCINSÄURE AUF VOLUMENAKTIVIERTE CHLORIDSTRÖME IN ENDOTHELZELLEN 47
5.4 MODULATION VOLUMENAKTIVIERTER CHLORIDSTRÖME DURCH PHOSPHORYLIERUNG 47
5.5 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ZELLSCHWELLUNG UND MEMBRANSTROMAKTIVIERUNG 49

6. ZUSAMMENFASSUNG **55**

7. LITERATURVERZEICHNIS **57**

8. VERÖFFENTLICHUNGEN **63**

9. DANKSAGUNG **64**

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **65**

11. TABELLARISCHER LEBENSLAUF **66**

1. Einführung

1. 1 Volumenaktivierte Chlorid - Kanäle

Chloridkanäle sind Transportproteine mit hoher Selektivität für Cl^- - Ionen, die ubiquitär in Eukaryoten vorkommen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich Permeabilitätseigenschaften für verschiedene Anionen, Kinetik, Einzelkanal - Leitfähigkeit, Akivierungsmechanismen und Modulation (als umfassende Darstellung siehe: Nilius et al., 1996 (2)).

Volumenaktivierte Cl^- - Kanäle ($I_{Cl,VOL}$) wurden erstmals von Doroschenko und Neher (1991) als durch Zellschwellung induzierte Chloridströme in Chromaffinzellen beschrieben. Diese Chloridleitfähigkeit wurde in vielen weiteren verschiedenen Zellarten beobachtet: in einer Reihe von Endothelzellen (z.B. HUVEC, EA, CPAE) , Epithelzellen (A6, HeLa, KB3), Blutzellen (RBL-2H3, Jurkat) (Nilius et al., 1994; Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans, 1994) ,Osteoklasten (Kelly et al., 1994) wie auch in Neuronen und Muskelzellen (Sorota, 1992; Vandenberg et al., 1994). Weitere gemeinsame Eigenschaften von $I_{Cl,VOL}$ sind :

-auswärts gleichrichtend

-intrazelluläres ATP ist zur Aktivierung notwendig

-höher permeabel für Jodit als für Chlorid.

Das Vorhandensein volumenaktivierter Chloridströme ist eine Eigenschaft aller Zellen, wird jedoch während der Zellproliferation und Differenzierung stark verändert (Voets et al., 1997).

1.2 Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$

Eine Zellschwellung zur Aktivierung des Stromes kann durch eine hypotone Lösung (HTS) extrazellulär, eine hypertone Lösung intrazellulär oder durch eine Erhöhung des Drucks intrazellulär (z.B. via Mikropipette) induziert werden.

In den meisten bisher daraufhin getesteten Zelltypen ist die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ abhängig vom Vorhandensein intrazellulären ATP 's. Die Hydrolyse des ATP scheint jedoch dabei keine Rolle zu spielen, da nach Substitution des ATP mit hydrolysierbaren Analoga wie ATPgS, AMP-PNP oder AMP-PCP der Strom weiterhin aktivierbar war (Oike, Droogmans und Nilius, 1994 ; Jackson et al., 1994) .

In einigen Zellarten (Chromaffin-Zellen, Ehrlich Ascites Tumorzellen, Endothelzellen) konnte durch die intrazelluläre Applikation von GTPγS ein Chlorid-Strom mit einer sehr ähnlichen Charakteristik wie $I_{Cl,VOL}$ ohne Änderung des Zellvolumens aktiviert werden (Doroschenko, 1991; Doroschenko, Penner und Neher 1991; Doroschenko und Neher, 1992; Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans, 1994). GTPβS hingegen verhinderte oder verzögerte die Aktivierung dieses Stromes. GTPβS inhibierte

jedoch auch die G-Protein-abhängige Aktivierung von zytosolischer PLA 2 , das von Lehtonen und Kinnunen (1995) als Mechano- oder Volumensensor vorgeschlagen wurde.

In Ehrlich Ascites Tumorzellen könnte die Aktivierung des Lipoxygenase-Signalweges eine Rolle bei der Aktivierung von $I_{Cl, VOL}$ spielen. Durch Zellschwellung wird die PLA 2 aktiviert (Thoroed et al., 1994), dadurch werden Arachidonsäure und Eicosamide freigesetzt und via LTD 4 -Rezeptor $I_{Cl,VOL}$ induziert (Hoffmann und Dunham, 1995). Die Bildung des LTD4 könnte dabei durch PLA 2 als Volumensensor geschehen.

In einigen Zelltypen wurde eine Inhibierung von $I_{Cl,VOL}$ durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beschrieben, so in Zellen des proximalen Nieren-Tubulus von Rana temporaria und in HeLa-Zellen nach Überexpression des P-Glycoproteins durch Transfektion mit der entsprechenden cDNA (Hardy at al., 1995; Robson und Hunter, 1994).

Volumenaktivierte Chloridströme unterscheiden sich in der Inaktivierung bei positiven Haltepotentialen und in der Aktivierung bei negativen Haltepotentialen. Eine Ausprägung dieser Charakteristika zeigen vor allem polare Zellen. Die Inaktivierung wird durch niedrige pH-Werte extrazellulär verstärkt und durch den Austausch intrazellulärer organischer Anionen mit N-Methyl-D-Glukamin (NMDG) oder die extrazelluläre Applikation von ATP verzögert (Anderson et al., 1995). Weiterhin unterscheiden sich volumenaktivierte Chloridströme in Zeitverlauf und Amplitude nach repetitiven Applikationen von HTS (Nilius et al., 1994).

1.3 Funktionelle Rolle volumenaktivierter Chloridströme

1.3.1 Volumen - Regulation

Die wichtigste Funktion volumenaktvierter Chloridkanäle ist ihr Beitrag zur zellulären Volumenregulation. Das Zellvolumen verändert sich bei metabolischer Aktivität, Proteolyse, Glykolyse, während des Zellzyklus, bei Sekretion und Muskelaktivität. Unter pathophysiologischen Bedingungen verändert sich das Zellvolumen bei Ischämie, Azidose und im Rahmen von chronischen Stoffwechselstörungen wie Hyperglykämie (Banderali und Roy, 1992; McManus et al., 1995; Parker, 1993).

Einige Zellarten reagieren nach initialer Schrumpfung durch Erhöhung der Tonizität des extrazellulären Mediums mit einer regulatorischen Erhöhung des Zellvolumens ('Regulatory Volume Increase', RVI). In Endothelzellen geschieht das hauptsächlich durch Aktivierung eines Na^+ -K^+ - $2Cl^-$ - Kotransporters (O'Neil und Klein, 1992).

Wird das extrazelluläre Medium hypoosmolar, so schwellen die Zellen an. Auch hier zeigen einige Zelltypen eine Volumenregulation: nach initialer Schwellung erfolgt eine Verringerung des Zellvolumens, ein sogenannter 'Regulatory Volume Decrease' (RVD). Das geschieht durch einen Ausstrom von osmotisch aktiven Substanzen. Mehrere Mechanismen können zu diesem beitragen:

-Aktivierung des Bicarbonat - Ausstromes durch den '$HCO3^-$ - Cl^- - exchanger'

-Aktivierung eines K^+ - Cl^- - Kotranporters

-Aktivierung von Taurine - und Aminosäurenausstrom

- Koaktivierung von K^+ und Cl^- - Kanälen.

In der Folge strömt Wasser aus der Zelle und deren Volumen verringert sich (Deutsch und Chen, 1993). $I_{Cl,VOL}$ könnten auch einen Weg für den Ausstrom negativ geladener organischer Substanzen aus der Zelle darstellen. So ist bekannt, daß Aminosäuren, Polyole und Methylamine über einen Natrium - unabhängigen Transportweg aus der Zelle gelangen können. Für Taurin beispielsweise beträgt das Permeabilitätsverhältnis $P_{Taurin} : P_{Cl} = 0,2\text{-}0,3$ (Jackson und Strange, 1993; Banderali und Roy, 1992) .

Der minimal nötige Durchmesser der durch ein Kanalprotein gebildeten Pore müßte dazu 5,4-6,4 A° betragen (Arreola, 1995; Rasola et al., 1992). Das entspricht etwa den Ausmaßen eines auswärts gleichrichtenden Cl^- - Kanals, ist jedoch größer als ein GABA - aktivierter Cl^- - Kanal. Wegen ihrer wahrscheinlichen Funktion im Transport organischer, osmotisch aktiver Moleküle wurde deshalb der Name VSOAC (' volume - sensitive organic osmolyte channel ') für diese Leitfähigkeit vorgeschlagen (Jackson und Strange, 1995).

1.3.2 Einfluß auf Membranpotential und Konzentration intrazellulären Kalziums

Bei Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ wird das Membranpotential (MP) in Richtung des Umkehrpotentials für Cl^- verschoben. Da im Allgemeinen bei Zellschwellung eine Koaktivierung von K^+ und Cl^- - Kanälen erfolgt, resultiert ein MP zwischen deren Umkehrpotentialen. In Kardiomyozyten könnte $I_{Cl,Vol}$ an der Repolariation und unter pathologischen Bedingungen an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein (Zhang et al, 1993; Vandenberg et al., 1994; Zhou und Lab, 1994).

Eine Veränderung des MP bewirkt eine Veränderung der treibenden Kraft für extrazelluläres Kalzium zum Eintritt in die Zelle. Dieser Zusammenhang wurde erstmals durch Matthews et al. (1989) in Mastzellen beschrieben und ist möglicherweise für die Modulation von 'calcium-release activated calcium channels' (ICRAC) von Bedeutung. Diese können ebenfalls durch Zellschwellung aktiviert werden.

Auf die daraus resultierende Frage, inwieweit die Konzentration freien intrazellulären Kalziums die Funktion volumenaktivierter Cl^- - Kanäle moduliert, wird im Kapitel 2.1 dieser Arbeit näher eingegangen.

1.3.3 Proliferation

Ionenkanäle können die Zellproliferation modulieren. Als Mechanismen dazu wurden durch Dubois und Rouzaire-Dubois (1993) und Nilius und Droogmans (1994) der Einfluß auf das MP und damit auf die treibende Kraft für den Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zelle genannt (von den Autoren wird so auch der Zusammenhang zwischen Expression von Kaliumkanälen und Eintritt der Zellen in die Zellteilung am Punkt G1 - S des Zellzyklus erklärt). Auch volumenaktivierte Chloridkanäle können einen modulatorischen Einfluß auf die Zellproliferation ausüben. Sie sind in den meisten proliferierenden Zellen vorhanden.

Durch den Zusatz von Blockern volumenaktivierter Chloridkanäle (NPPB, IAA-94, DIDS, Tamoxifen, Flufenacinsäure) in das Kulturmedium wird die Proliferation von Endothelzellen und T-Lymphozyten gehemmt (Garnier et al., 1993; Voets et al., 1995; Schuhmacher et al., 1995). In BC3H1 und C2C12 - Myoblasten verringert sich die Stromdichte stark, wenn die Zellen nach Reduzierung der Serumkonzentration des Kulturmediums oder durch Zusatz von Wachstumsfaktoren in das Differenzierungsstadium übergehen (Voets et al., 1997).

Als Mechanismus dafür wird die Regulation des Zellvolumens durch Aktivierung von Chlorid - und Kaliumleitfähigkeiten angenommen (Block und Moody, 1990). So zeigen die von Deutsch und Lee (1988) beschriebenen Experimente mit T-Lymphozyten bei Zellproliferation eine Kofunktion von Chlorid - und Kaliumleitfähigkeiten als Mechanismen für den im Abschnitt 1.3.1 dieser Arbeit dargestellten RVD. Wie die Autoren ausführten, besitzen nichtproliferierende Zellen bereits eine schwellungsinduzierte Anionenleitfähigkeit, welche einen Beitrag zum RVD leisten kann. Eine entsprechende Kaliumleitfähigkeit wird jedoch erst nach Stimulierung der Proliferation exprimiert.

1.3.4 Kontrolle des pH

Die Funktion und Struktur der meisten Makromoleküle ist stark abhängig vom pH, dessen Regulation ist daher eine wichtige Eigenschaft lebender Zellen.

In den meisten Zellen wird der pH konstant auf 7.2 gehalten. Als Regulationsproblem steht dabei hauptsächlich die Kompensation von Erhöhungen der intrazellulären Protonenkonzentration. Das geschieht durch Transport der Protonen nach extrazellulär oder von Bicarbonat nach intrazellulär.

Diese Ionen werden von Transportmolekülen aktiv durch die Zellmembran transportiert. Sie nutzen dazu die Energie, die im transmembranären Natriumgradienten gespeichert ist.

Vier verschiedene Transportwege in Form transmembranärer Transportmoleküle sind bekannt (Alberts et al., 1994, Kap. 11, S. 518-522) :

- Na^+ - H^+ - Antiporter
- Na^+ - getriebener Cl^- - $HCO3^-$ - Antiporter
- Na^+ - $HCO3^-$ - Kotransporter
- Na^+ - unabhängiger Cl^- - $HCO3^-$ - Antiporter
- Ca^{2+} - H^+ - Antiporter

Die Cl^- - abhängigen Tranportmechanismen können bei Zellschwellung über eine lokale oder die gesamte Zelle betreffende Veränderung der Cl^- - Konzentration moduliert werden, da der Chloridstrom sehr hohe Ausmaße erreichen kann (20 - 100 pA/pF). Auch ein Efflux von $HCO3^-$ durch volumenaktivierte Chloridkanäle ist möglich (Woodbury und Miles, 1993). Von Livne und Hoffmann (1990) wurde beobachtet, daß der intrazelluläre pH bei Zellschwellung nach initialem Anstieg sich substantiell verringerte. Nach Block von $I_{Cl,Vol}$ konnte nur noch der initiale Anstieg beobachtet werden. Diese Verschiebung des pH stellt möglicherweise einen Mechanismus für die Inhibierung der Zellproliferation nach Block von $I_{Cl,\ Vol}$ wie im vorherigen Abschnitt beschrieben dar, da dadurch Zellzyklus - modulierende Kinasen inhibiert werden und die Zelle im G_0 / G_1 - Stadium des Zellzyklus' verharrt.

1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung

1.4.1 Messung des Stromes in ' whole cell ' - Konfiguration

Wird der durch die gesamte Zellmembran fließende volumenaktivierte Strom (‘whole cell' - Konfiguration) nach extrazellulärer Applikation einer hypotonen Lösung gemessen, so ergeben sich Stromdichten zwischen 2 und 100 pA/pF Membrankapazität. Die Zeit von der Applikation der hypotonen Lösung bis zur halbmaximalen Aktivierung des Stroms beträgt 30-120 s. Beide Parameter sind abhängig von Typ und Differenzierungsgrad der Zelle, wobei an undifferenzierten Zellen größere Ströme und eine schnellere Aktivierung beobachtet werden können (Nilius et al., 1994).

Charakteristika von $I_{Cl,VOL}$ sind weiterhin die Auswärts-Gleichrichtung, die höhere Permeabilität für Jodit als für Chlorid (SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^- > Gluconat) (Nilius, Sehrer und Droogmans, 1994) und die langsame Inaktivierung bei einem positivem Haltepotential (HP) von mehr als +40 mV. Zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheidet sich der zeitliche Verlauf dieser Inaktivierung.

Auf den Einfluß von pH und extrazellulären Kationen auf die Inaktivierung wurde bereits im Abschnitt 1.2 ('Aktivierung') hingewiesen.

1.4.2. Einzelkanal - Messungen

Aussagen zu Einzelkanal - Strömen von volumenaktivierten Chloridkanälen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt in nur geringem Umfang möglich, da es technisch äußerst schwierig ist, solche Einzelkanal-Aktivitäten zu messen.

Volumenaktivierte Chloridkanäle mit Einzelkanal-Leitfähigkeiten von 0,1 und 8 pS wurden in Ehrlich Aszites Tumor Zellen sowie in Zellen des Choroid-Plexus durch Christensen und Hoffmann (1992) beschrieben. Die Ermittlung von Einzelkanal-Leitfähigkeiten aus makroskopischen Strömen ergab Werte um 2 pS an Chromaffin-Zellen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten (Doroschenko und Neher, 1991; Kunzelmann et al., 1992; Lewis et al., 1993; Ho et al., 1994). Eine Überprüfung, ob die bereits bekannten Daten über die Permeabilität und der vermutete Porendurchmesser mit jenen der Einzelkanal-Leitfähigkeit übereinstimmen, ist bisher noch nicht im Detail erfolgt. Unter der Annahme einer niedrigen Einzelkanal-Leitfähigkeit kann eine Kanaldichte zwischen 10 und 60 Kanälen pro mm^2 Zellmembran abgeschätzt werden. Dieser Wert liegt wesentlich höher als bei allen anderen bekannten Ionenkanälen.

Auswärts gleichrichtende volumenaktivierte Chloridkanäle mit einer Leitfähigkeit von 20 - 90 pS wurden für Epithelzellen, Gliazellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Muskelzellen beschrieben (Jackson und Strange, 1995; Hoffmann und Dunham, 1995; Nilius et al., 1994).

Kanäle mit einer sehr großer Leitfähigkeit um 400 pS wurden in Kardiomyozyten (Coulombe und Coraboeuf, 1992) , solche mit 200 - 400 pS in Astrozyten (Jalonen, 1993) und Nierenepithelien (Schwiebert et al., 1994) beobachtet.

1.5 Pharmakologie volumenaktivierter Chloridkanäle

1.5.1 Übersicht

Eine Reihe klassischer Chloridkanal - Blocker wie DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure), SITS (4,4' -Acetamido -4' -Isothiocyano-stilben -2,2' -Disulfonsäure), 9-AC (9-Antrazencarboxylsäure), NPA (N-Phenylantrazillinsäure), IAA-94 (Indanyloacetsäure-94), DPC (Diphenylamin-2-Carboxylat) und MK-196 (3',5-Dichlorodiphenylaminocarboxylsäure) wirken nur in hohen Konzentrationen auf $I_{Cl, Vol}$.

Einige Substanzen haben blockierende Eigenschaften auf $I_{Cl, Vol}$ abhängig von der Art der Zellen: NPPB (5-Nitor-2-(3-phenyprophylamino)benzoesäure), Flufenamin-säure, Nifluminsäure 1,9-Dideoxyforskolin sowie Verapamil, Quinin, Tamoxifen, Furosemid und Gossypol (Szücs et al., 1995 (2)).

Inhibitoren der PLA2 - Synthese stellen wirksame Blocker von $I_{Cl, Vol}$ dar, so pBPB, RO 31-4639 und Cyclosporin A. Gleiches gilt für Ketokonazol, SKF-525A und Inhibitoren der Lipoxygenase (Jackson und Strange, 1995; Valverde et al., 1995; Hoffmann und Dunham, 1995).

Höhervalente Ionen wie Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Gd^{3+} und La^{3+} reduzieren ebenfalls die Amplitude von $I_{Cl,VOL}$ (Anderson et al., 1995). Auch mit hohen Konzentrationen von Nukleotiden konnte ein solcher Effekt in einer Reihe von Zellenarten beobachtet werden (Van Driesche et al., 1993).

An 'cultured pulmonary artery endothelium' (CPAE) wurde kürzlich gezeigt, daß Mibefradil, ein neuartiger Kalziumkanalblocker, neben dem Ca^{2+} - akivierten Cl^- - Kanal auch $I_{Cl,VOL}$ inhibiert (Nilius et al., 1997(2)).

1.5.2 Cromoglycinsäure als Blocker volumenaktivierter Chloridkanäle

Chloridkanäle scheinen eine wichtige Rolle in der Kontrolle sekretorischer Funktionen in Mastzellen zu spielen (Romanin, 1991). Diese Kanäle können in Mastzellen durch intrazelluläre Applikation von Cromolglycinsäure (CL , Chromolyn) geblockt werden, was die Vermutung nahelegt, es handelt sich um einen spezifischen Blocker von Anionen-Kanälen mittelgroßer Leitfähigkeit (Reinspecht et al., 1992).

Chromoglycinsäure ist ein Antiallergikum, das durch Hemmung der Mediatorfreisetzung aus Mastzellen ('Membranstabilisierung') wirken soll. Jedoch werden auch antagonistische Wirkungen auf den 'plateled activating factor' (PAF) beschrieben. Klinisch wird es lokal an Schleimhäuten des Auges und des Respirationstraktes appliziert , als Indikationen gelten die allergische Konjunktivitis oder die allergische Rhinitis. Es wirkt jedoch nur prophylaktisch, ein direkter therapeutischer Effekt besteht nicht (Forth, Henschler und Rummel, 1990).

Endothelzellen bilden als Grenzstruktur zwischen Blut und Gewebe im kappilären Stromgebiet eine wichtige Rolle in allen inflammatorischen Prozessen: jede Entzündung geht einher mit einer Kapillardilatation und einer Steigerung der Kapillarpermeabilität (Transsudation und Exsudation). Neben diesen akuten Reaktionen kommt es bei chronischen Enzündungen auch zur Gefäßneubildung. Neben ' vascular endothelial growth factor' (VEGF) wirkt vor allem der 'fibroblast growth factor' (FGF) stimulierend auf die Endothelproliferation, FGFb wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert. Wie von Sorota (1992) gezeigt wurde, scheint auch Zellschwellung eine Rolle bei Entzündungsprozessen zu spielen, was über die Beeinflussung der Proteinsynthese oder der Zellproliferation geschehen könnte.

1.6 Modulation volumenaktivierter Chloridströme

1.6.1 Modulation durch Phosphorylierung

Reversible Phosphorylierungen stellen die vorherrschende Strategie zur Aktivitätskontrolle von Proteinen in Eukaryoten dar. Auch einige Typen von Ionenkanälen können so in ihrer Funktion moduliert werden (Alberts et al., 1994 , Kap. 15, S. 752).

Bekannt ist bereits, daß intrazelluläres ATP zur Aktivierung und zur Verhinderung des 'run-down' von $I_{Cl,VOL}$ notwendig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Proteinkinase C (PKC) Chloridkanäle modulieren kann (Hardy at al., 1995; Robson und Hunter, 1994).

In Epithelzellen und Fibroblasten sind Tyrosinkinasen an der Aktivierung von volumenaktiverten Leitfähigkeiten beteiligt: Tyrosinkinase - Inhibitoren können eine schwellungsinduzierte Chloridleitfähigkeit unterdrücken, während Tyrosin - Phosphatase - Inhibitoren wie Vanadat sie potenzieren (Tilly et al., 1993) .

Unter den intrazellulären Signalproteinen, die an aktivierte Phosphotyrosine binden, gehören auch GTPase - aktivierende Proteine (GAP) und 'Guanine Nucleotide Releasing Proteins' (GNRP). GAP inaktivieren monomerische GTPasen der RAS - Familie, GNRP aktivieren sie. RAS wiederum aktiviert eine Serin / Threonin - Phosphorylierungskaskade, welche in einer Aktivierung von mitogen - aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) mündet. MAP-Kinasen können nicht nur über diesen Signalweg, sondern auch über die G - Protein - vermittelte Aktivierung der PKC aktiviert werden. Durch den MAP - Kinasen - Signalweg werden die zeitlich nur sehr kurz wirksamen Aktivitätsveränderungen der Tyrosin - Kinasen und der RAS - GTPasen in zeitlich länger wirksame Signale umgewandelt. Die MAP - Kinasen bilden zusätzlich eine Art gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl verschiedener extrazellulärer Signale, sie werden deshalb auch 'extracellular - signal - regulated - kinases' (ERK) genannt. Die aktivierte MAP - Kinase ist seinerseits Ausgangspunkt der Phosphorylierung einer großen Anzahl von anderen Proteinkinasen und von Gen - Regulatorproteinen wie JUN und Elk-1. (Alberts et al., 1994 ,Kap. 15, S. 759-770).

Kürzlich wurde ein Signalweg beschrieben, in dem mechanische Kräfte Adhaesionsproteine mit mechanosensorischen Eigenschaften wie Integrine aktivieren. Diese erzeugen dann intrazelluläre Signale zur Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$. (Seufferlein und Rozengurt, 1994; Richardson und Pearson, 1995; McLees et al., 1995). Ein weiterer Mechanismus könnte die direkte Aktivierung von Tyrosinkinasen durch einen neuartigen streßabhängigen Signalweg mit Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen ähnlich denen der Proteinkinase HOG1 in Hefepilzen sein (Galcheva-Gargova at al., 1994). Dieser Signalweg wird durch osmotischen, aber auch chemischen Streß oder Hitzeschock aktiviert (Rouse et al., 1994).

Zellen in Kultur reagieren auf eine breite Palette von Streßeinwirkungen mit der Synthese einer Gruppe von Proteinen, die in 2 Gruppen eingeteilt werden: Hitzeschockproteine (HSP) und Glukose - regulierende Proteine (GRP). Die HSP werden nochmals in 5 Subklassen eingeteilt und sind nicht nur

durch Wärmeeinwirkung, sondern auch durch eine Reihe chemischer und zytotoxischer Stoffe induzierbar. Den gemeinsamen Aktivator der unterschiedlichen Stressoren stellt dabei der ' heat-shock transcription factor ' (HSF) dar. Eine Konformationsänderung erlaubt ihm die Bindung an eine 'heat - shock - element' genannte DNA-Sequenz, die dadurch aktivierte Phosphorylierung des HSF aktiviert die Transkription der HSP - RNA. HSP dienen u.a. der Reparatur von DNA-Defekten und der Reorganisation der Sekundär- und Tertiärstruktur zellulärer Proteine (HSP 70). Sie hydrolysieren dabei z.T. ATP. Ihre Bildung geht mit einer allgemeinen Suppression der Proteinsynthese und einer Reorganisation des Zytoskeletts einher (Alberts et al., 1994 ,Kap 5, S. 214-215, Kap 6, S. 249-250; Yiu et al, 1993). Da es unter pathologischen Bedingungen wie Hypoxämie und Azidose zu Volumenänderungen der betroffenen Zellen kommt, ist auch eine Modulation von $I_{Cl,VOL}$ durch HSP möglich.

Auf die mögliche Rolle der Adhaesionskinase p125FAK in der Modulation von $I_{Cl,VOL}$ wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.6.2 Rolle des Zytoskeletts

Die bisher dazu veröffentlichten experimentellen Ergebnisse sind kontrovers. Die Depolymerisation von F-Aktin mit Cytochalasin B und C2 Clostridium-Toxin inhibierte die Aktivierung von $I_{Cl,\ Vol}$ in Bronchoepithelzellen, humanen embryonalen Skelettmuskelzellen und Myoblasten (Hug et al., 1995). Neben Zellschwellung konnte $I_{Cl,\ Vol}$ in Nierenepithelien auch durch die Zerstörung von F-Aktin-Filamenten aktiviert werden (Schwiebert et al., 1994). In PC12- Zellen konnte $I_{Cl,VOL}$ durch Depolymerisation des F-Aktin mit Cytochalasin B ebenfalls direkt aktiviert werden.

Auch Annexin II moduliert volumenaktivierte Chloridströme in CPAE. Die Proteinfamilie der Annexine gehören zu den Ca^{2+} - und Membran- Phospholipid-bindenden Proteinen. Sie binden ebenfalls an F-Aktin. Nach Interaktion mit dem Protein P11 bildet Annexin II ein Heterotetramer und tritt dann in Interaktion mit dem Zytoskelett. Es gibt Hinweise auf eine Funktion in der Signalübertragung vom und auf das Membran-assoziierte Zytoskelett. Nach intrazellulärer Applikation eines synthetischen Proteins Ac 1-14 (dieses ähnelt der Bindungsstelle des Annexin II für P11 und bindet dieses ebenfalls) konnte eine deutliche Reduktion des $I_{Cl,VOL}$ beobachtet werden, nicht jedoch nach Applikation eines veränderten Proteins Ac 1-14 mit stark reduzierter Affinität zu P11 (Nilius et al., 1996).

Experimente in HUVEC - Endothelzellen mit Modulation von F-Aktin und Tubulin konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Stabilisierung von F-Aktin mit Phalloidin, Depolymerisation mit Cytochalasin B , Polymerisation von Tubulin mit Taxol oder Depolymerisation mit Colcemid einerseits und Größe des HTS-induzierten Chloridstromes andererseits zeigen (Oike et al., 1994). Die Autoren gehen daher von einer direkten Aktivierung des Stromes durch die mechanische Spannung in der Zellmembran aus.

Eine Rolle bei der Modulation von $I_{Cl,VOL}$ könnte das Zytoskelett auch über Adhaesionsproteine wie Integrine ausüben. Integrine sind sowohl mechanische Verbindung zwischen Extrazellularmatrix und Zytoskelett als auch Rezeptor für Signale von der Extrazellularmatrix. Die Signalübertragung erfolgt über die 'fokale Adhaesionskinase' p125FAK . Sie ist eine Tyrosinkinase und wird durch das Binden von extrazellulärer Matrix an Integrine auf der Zelloberfläche reguliert.

p125FAK gehört damit zu den fokalen Kontakten, die die extrazelluläre Matrix mit intrazellulären Aktinfilamenten verbindet und benötigt zur Aktivierung intakte F-Aktin-Mikrofilamente. Sie aktiviert intrazelluläre Signalwege, die für die Proliferation, Differenzierung, Bewegung, Form und Orientierung von Zellen von Bedeutung sind. Eine Funktion als Sensor für auf eine Zelle einwirkende mechanische Kräfte und als Modulator für volumenaktivierte Chloridströme wird daher auch diskutiert (Defilippi et al., 1994; Seufferlein und Rozengurt, 1994; Alberts et al., 1994, Kap. 19, S. 998-999).

1.6.3 Modulation durch intrazelluläres Kalzium

Die Rolle intrazellulären Kalziums bei der Aktivierung volumenaktivierter Chloridströme ist noch nicht völlig aufgeklärt. Bekannt ist, daß eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ keine volumenaktivierten Chloridströme aktiviert (Nilius et al., 1992) und daß diese Ströme bei einem auf 50-100 nM gepuffertem $[Ca^{2+}]_i$ weiterhin aktivierbar bleiben (Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans, 1994). Volumenaktivierte Chloridkanäle waren in 'inside out' -Konfiguration (in der Öffnung einer Mikropipette befindet sich ein Stück Zellmembran, deren Außenseite zum Pipetten-Innenraum und deren Innenseite zur Badlösung der Messkammer gerichtet ist) nicht Kalzium-abhängig. Die pharmakologischen Eigenschaften und die Kinetik unterscheiden sich deutlich von jenen Ca^{2+} - aktivierter Chloridkanäle. So galt $I_{Cl,Vol}$ bisher als Ca^{2+} - unabhängig.

In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde dann jedoch gezeigt, daß Calmodulin-Antagonisten inhibitorische Effekte auf volumenaktivierte Ströme, so z.B. in HeLa-Zellen (Kirk und Kirk, 1994), oder allgemein auf Anionenleitfähigkeiten (Fuller et al., 1990) ausüben. Auch mit den in dieser Arbeit verwendeten 'cultured pulmonary artery endothelium' (CPAE) wurden solche Effekte mit dem Calmodulin-Antagonisten Trifluorparacin (TFP) beobachtet. Dies steht nicht im Widerspruch zu den genannten Ergebnissen, da die Ca^{2+} - Abhängigkeit bisher nicht direkt und über einen weiten Bereich von verschiedenen Ca^{2+} - Konzentrationen untersucht wurde.

1.6.4 Modulation durch Thrombin

In einer erst kürzlich erschienen Arbeit konnte der verstärkende Einfluß von Thrombin auf $I_{Cl,VOL}$ gezeigt werden (Manolopoulos et al., 1997). In einer Konzentration von 1 U/l erhöhte sich der durch 13% HTS bereits aktivierte $I_{Cl,Vol}$. Nach Aktivierung durch 28% HTS konnte jedoch kein Effekt des Thrombin mehr beobachtet werden. Weitere Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Effekt durch eine proteolytische Aktivierung des Thrombinrezeptors ausgelöst wird, aber Ca^{2+} - unabhängig ist. Ohne vorherige Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ konnte mit Thrombin kein Strom aktiviert werden.

1.7 Molekulare Charakterisierung

1.7.1 Das Molekül $I_{Cl,N}$

Die morphologische Charakterisierung von volumenaktivierten Chloridkanälen ist bisher noch nicht sicher gelungen. Eine Reihe von Molekülen wurde in Beziehung mit $I_{Cl, Vol}$ gebracht.

Das durch Paulmichl et al. (1992) erstmals beschriebene Molekül $I_{Cl,N}$ ($pI_{Cl,N}$) wurde in Mladin-Darby canine kidney - Zellen (MDCK) als 235-241 AS langes Protein (abhängig von der untersuchten Spezies) isoliert und als HTS-aktivierter Chloridkanal vorgeschlagen. Die Diskussion darum ist jedoch außerordentlich kontrovers.

Entsprechende mRNA wurde ebenfalls in PC12, RBL NIH 3T3 Fibroblasten und in Lungengewebe gefunden. In Expressions-Experimenten dieser RNA in Oozyten wurde ein auswärts-gleichrichtender Kanal mit Chlorid-Selektivität und Sensitivität zu den Cl- -Kanalblockern NPPB und DIDS beobachtet. Die Permeabilität sank in der Reihenfolge Thiocyanat >> Jodit > Bromid > Chlorid. Sie entspricht damit der typischen Permabilität von bei volumenregulatorischen Prozessen aktivierten Cl^- - Kanälen in Säugetierzellen. Die Kinetik für positive Haltepotentiale über +40 mV entspricht mit schneller Aktivierung und folgender langsamer Inaktivierung der Kinetik schwellungsaktivierter Cl^- - Kanäle in verschiedenen Epithelien. Ein wichtiges Indiz für einen Zusammenhang zu $I_{Cl,Vol}$ ist das Vorhandensein eines Nukleotidrezeptors an der extrazellulären Seite des Moleküls. So kann dieser Strom durch extrazelluläre Nukleotide geblockt werden, was prinzipiell auch beim volumenaktivierten Cl- - Strom in Endothelzellen (HUVEC) der Fall ist (Paulmichl et al., 1993).

Mit Anti-$I_{Cl,N}$ Antikörpern konnte der volumenaktivierte Choridstrom in nativen Xenopus-Oozyten geblockt werden. Damit kann dieser Kanal nicht mehr Säugetier-spezifisch sein.

Funktionell ergaben sich aber deutliche Unterschiede zwischen $I_{Cl,N}$ und $I_{Cl,VOL}$. Untersuchungen in CPAE zeigten zwar sowohl das Vorhandensein des Moleküls $pI_{Cl,N}$ als auch Übereinstimmungen in der Aktivierung und Pharmakologie beider Ströme. Jedoch die Inaktivierung bei Haltepotentialen > +50 mV und der blockierende Effekt von Azidothymidin (3'-Azidodesoxythymidin, AZT) und Aciclovir (9- [(2-Hydroxyethoxy)-methyl]-guanin) sind bei $I_{Cl,VOL}$ wesentlich geringer ausgeprägt als bei $I_{Cl,N}$ (Szücs et al., 1995 (2)). In Untersuchung des endogenen $I_{Cl,VOL}$ im Vergleich zum Strom nach Injektion von $pI_{Cl,N}$ RNA in Xenopus Oozyten zeigten sich ebenfalls deutliche Differenzen. Die Auswärts - Gleichrichtung des Stromes sowie unterschiedliche Permeabilitäten für NO_3^- und Cl^- waren bei $I_{Cl,N}$ mehr ausgeprägt als bei $I_{Cl,VOL}$. Weiterhin konnte $I_{Cl,N}$ im Gegensatz zu $I_{Cl,VOL}$ durch Cyclymat blockiert werden. Seine Kinetik bei Inaktivierung war pH - unabhängig. Der wichtigste Unterschied besteht jedoch darin, daß $I_{Cl,N}$ in Kollagenase - defollikollierten Oozyten bereits exprimiert, jedoch nicht durch extrazelluläre Hypotonie moduliert werden kann, während $I_{Cl,VOL}$ nicht in Kollagenase - defollikollierten Oozyten, sondern nur nach manueller Defollikulierung oder in follikelhaltigen Oozyten nach extrazellulärer Applikation von hypotoner Lösung beobachtet werden konnte (Ackermann et al., 1994; Krapivinsky et al., 1994; Voets et al., 1996). Es muß daher geschlußfolgert werden, daß $I_{Cl,N}$ und $I_{Cl,VOL}$ zwei

verschiedene Ströme sind.

Es existieren weiterhin Modellvorstellungen, in der dieses Molekül ein Regulatorprotein für volumenaktivierte Chloridkanäle und kein eigentliches Kanalprotein darstellt:

So wurde beobachtet, daß in MDCK und Oozyten dieses Protein hauptsächlich (zu 70-80%) zytosolisch vorliegt. Der Anteil der mikrosomalen (die Zellmembran beinhaltenden) Fraktion betrug nur weniger als 5% . Dieses Verhältnis änderte sich auch nicht, wenn die Messungen an mit HTS - stimulierten Zellen durchgeführt wurden.

Weiterhin interagierte das Protein mit anderen zytosolische Proteinen (einem 43kD und einem 72kD-Molekül). Diese Interaktion war auch noch nach Denaturierung durch Hitze oder SDS vorhanden. Das ist sehr ähnlich den Interaktionen anderer zytosolischer Proteine zu Calmodulin-Komplexen oder Bindungen über -SH2 / -SH3 determinierte AS-Sequenzen, wie sie auch in der Bindung von RAS an Rezeptor-Tyrosinkinasen im MAP-Signalweg zur Transkriptionsaktivierung vorkommen.

Und drittens zeigte das Molekül $pI_{Cl,N}$ keine Ähnlichkeiten zu anderen Chloridkanalmolekülen.

1.7.2 Der Chloridkanal ClC-2

ClC-2 gehört zur Gruppe der ClC - Chloridkanal-Familie. Als gemeinsame Struktur wurden 12 hydrophobe, transmembranär angeordnete Untereinheiten mit intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini vorgeschlagen. Funktionell bestehen zwischen den einzelnen Vertretern Unterschiede in Spannungsabhängigkeit, Anionenselektivität und Kinetik.

ClC-2 scheint ubiquitär vorzukommen, es wurde in allen daraufhin untersuchten Geweben und Zellinien nachgewiesen. Der Kanal ist unter physiologischen Bedingungen geschlossen und durch Hyperpolarisierung der Zelle unter -100 mV oder extrazellulärer Applikation hypotoner Lösung aktivierbar. Bei Expression des Kanals in Xenopus Oozyten ist dadurch ein Strom induzierbar, der eine Auswärts-Gleichrichtung und eine höhere Selektivität für Cl^- als für J^- zeigt. Damit unterscheidet er sich von anderen HTS-induzierten Chloridströmen (J^- > Cl^-). Am N - Terminus des Kanalproteins wurden eine essentielle und eine modulatorische Untereinheit spezifiziert. Als Vorstellung über deren Funktion wurde ein Modell entworfen, in dem die N-terminale, essentielle Untereinheit an eine bisher noch nicht identifizierte Region des Kanalproteins bindet und so den Kanal blockt. Hyperpolarisation oder Hypotonizität beendet die Inaktivierung des Kanals durch Auflösung dieser Bindung.

Wegen der Aktivierbarkeit durch Hypotonizität und dem nahezu ubiquitärem Vorkommen wurde ClC-2 als Kanalprotein schwellungsaktivierter Chloridströme in Säugetierzellen vorgeschlagen. Die Spannungs- und Zeitabhängigkeit sowie die Anionenselektivität unterscheiden sich jedoch deutlich z.B. von $I_{Cl, Vol}$ in CPAE , so daß dies sicher nicht zutrifft (Szücs et al., 1995 (2)).

Kürzlich wurde in Mandibulardrüsenzellen der Maus ein HTS-induzierter Strom beschrieben, dessen Anionenselektivität und Aktivierungsbedingungen dem des ClC-2 entsprechen (Dinudom et al.,1993).

So könnte ClC-2 zwar nicht ubiquitär, aber in einigen speziellen Zelltypen wie dem ebengenannten volumenaktivierte Chloridströme verursachen.

1.7.3 Das P-Glycoprotein

Das P-Glycoprotein (auch 'Multi Drug Resitance Protein', MDR-1) ist ein Mitglied der ABC-Transporter-Familie und transportiert aktiv hydrophobe Moleküle durch die Zellmembran nach extrazellulär. Bei Veränderungen des Zellvolumens soll es auch als volumenaktivierter Chloridkanal fungieren. Diese Rolle ist jedoch fraglich: bei Expressions-Experimenten mit MDR1 - mRNA und dem komplementärem Proteinprodukt in HeLa - Zellen und KB3 - Zellen konnte zwar eine HTS-aktivierte Chloridleitfähigkeit nachgewiesen werden, in nicht mit dieser mRNA transvektierten Zellen ließ sich jedoch kein quantitativer Zusammenhang zwischen HTS-induziertem Chloridstrom und Vinblastinsekretion durch MDR-1 oder dem Ausmaß der Expression (gemessen mit RT-PCR und immunozytochemisch) herstellen. Das gleiche Ergebnis erbrachten diese Experimente hinsichtlich MDR-2 (De Greef et al., 1995).

1.7.4 Phospholemman

Phospholemman , ein Molekül aus 72 Aminosäuren, wurde nach Überexpressions - Experimenten in Xenopus Oozyten ebenfalls als Chloridkanal vorgeschlagen. Jedoch ist zur Zeit noch unklar, ob es sich tatsächlich um einen Ionenkanal, einen spezifischen Aktivator eines Kanals oder einen unspezifischen und unphysiologischen Aktivator von Strömen in Oozyten handelt (Paulmichl et al., 1993; Jentsch, 1993; Pusch und Jensch, 1994) .

1.8. Charakteristik von volumenaktivierten Chloridströmen in Endothelzellen

In Endothelzellen wurden bisher 3 Klassen von Anionenkanälen beschrieben:

- $[Ca^{2+}]_i$-aktivierte Chloridkanäle (ClCa-Kanäle),

- spannungs- und cAMP- abhängige Kanäle ohne Modulation durch Ca^{2+} oder HTS

  (BCl-Kanäle) und

- volumenaktivierte Chloridkanäle (Cl vol -Kanäle , $I_{Cl, VOL}$).

In CPAE wurde kürzlich ein $[Ca^{2+}]_i$ - aktivierter Chloridstrom beschrieben. Er ist durch direkte Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ (z.B. durch die Ionophore Ionomycin oder durch direkte Beladung der Zelle via Pipette) und durch Stimulation mit ATP auslösbar, seine Aktivierung kann durch Ca^{2+} - Chelatoren wie BAPTA verhindert werden. Der Strom wird bei positivem HP langsam inaktiviert, bei negativem HP sehr schnell inaktiviert und zeigt eine starke Auswärts-Gleichrichtung. Er ähnelt damit sehr $I_{Cl,VOL}$,

jedoch ist die Auswärtsgleichrichtung wesentlich stärker ausgeprägt und die pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden sich. Beide Ströme sind koaktivierbar. Dieser Strom unterscheidet sich ebenfalls von Chloridkanälen der CIC-Familie (Nilius et al., 1997 (1); Nilius et al., 1997 (3)).

Die Charakterisik von $I_{Cl,VOL}$ in Endothelzellen ist durch Nilius, Sehrer und Droogmans (1994) beschrieben worden und soll folgend zusammenfassend dargestellt werden. Die wesentlichen Kennzeichen sind:

- Der Strom ist auswärts gleichrichtend.

- Er ist blockbar durch NPPB, Tamoxifen,Nifluminsäure,Nukleotide,Nukleoside und

- in wesentlich höheren Konzentrationen durch DIDS.

- Es erfolgt eine langsame, aber unvollständige Deaktivierung bei einem

  HP > +50 mV mit einer mittleren Zeitkonstante von 10.7 s bei +100 mV.

- Die Amplitude ist abhängig von dem Ausmaß der Osmolaritätsänderung.

- Der Schwellenwert liegt zwischen 5 und 10 % Hypotonie.

- Eine halbmaximale Aktivierung resultiert bei etwa 30% Hypotonie.

- Die Aktivierung erfolgt nach 30 bis 50 s Latenzzeit, erreichen des Maximums 50-150 s nach

  Beginn der HTS - Applikation. Der Effekt ist unter isotoner Lösung komplett reversibel.

- Der selbe Strom konnte im rupturierten Patch durch hypertone Pipettenlösung und durch positiven

  Druck auf die Pipette aktiviert werden.

- Die Kanäle sind selektiv für Anionen.

- Die relative Permeabibilität ist für $I^- > Cl^- > Br^- >$ Gluconat$^-$.

$I_{Cl,VOL}$ in Endothelzellen entspricht damit den gemeinsamen Kennzeichen volumenaktivierter Chloridströme. Daneben werden in vielen Zelltypen auch Kaliumleitfähigkeiten durch HTS induziert. Eine solche Leitfähigkeit spielt aber in CPAE-Endothelzellen keine Rolle (Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans, 1994).

CFTR (' Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator') - Kanäle mit geringer Leitfähigkeit und Regulation durch cAMP werden in Endothelzellen nicht exprimiert.

In einigen Zelltypen erfolgt nach initialer Schwellung durch Senkung der extrazellulären Tonizität ein regulatorische Volumensenkung ('Regulatory Volume Decrease' , RVD). Endothelzellen lassen jedoch einen solchen RVD vermissen, was mit fehlender Koaktivierung eines Kalium - Auswärtsstromes zu erklären ist (De Smet et al., 1994).

Eine spannungsabhängige Aktivierung besteht nicht. $I_{Cl,VOL}$ ist bereits im Ruhezustand der Zelle teilweise aktiviert. Dieser 'Ruhestrom' läßt sich durch Applikation ein hypertonen extrazellulären Mediums reduzieren.

2. Aufgabenstellung

Durch Zellschwellung aktivierte Chloridströme wurden erstmals an Chromaffinzellen beobachtet (Doroschenko und Neher, 1991). Diese Art von Strömen konnten in nahezu allen daraufhin untersuchten Zellarten nachgewiesen werden. Noch ist jedoch unklar, ob ihr Vorhandensein eine Eigenschaft jeder Zelle oder Ausdruck eines speziellen Funktions- oder Entwicklungsstadiums einer Zelle ist.

Volumenaktivierte Chloridkanäle wurden in einer breiten Palette von Zellarten in Stromkinetik und Pharmakologie charakterisiert, insbesondere in Endothelzellen (De Smet et al.,1994; Nilius Sehrer und Droogmans 1994; Nilius et al., 1994 (2), Oike et al., 1994). Auch zu ihrer funktionellen Rolle bei Volumenregulation, Proliferation, pH-Kontrolle und ihrem Einfluß auf das Membranpotential wurden eine Reihe von Hinweisen gesammelt (Jackson und Strange, 1995; Nilius et al., 1994; Anderson et al., 1994; Valverde et al., 1995; Hoffmann und Dunham, 1995). Ihre strukturelle Natur und der Signalweg zu ihrer Aktivierung sind jedoch noch nicht aufgeklärt. Auskünfte darüber würden auch zu einem noch besseren Verständnis ihrer Funktion beitragen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb in Untersuchungen zur Modulation und zum Aktivierungsmechanismus volumenaktivierter Chloridströme in Endothelzellen. Diese Aufgabenstellung wurde in folgende Teilaufgaben untergliedert:

Abhängigkeit volumenaktivierter Chloridströme von $[Ca^{2+}]_i$

Viele Funktionen von Endothelzellen werden durch transiente Erhöhungen intrazellulären Kalziums ($[Ca^{2+}]_i$) getriggert, so die Freisetzung von Boten - Substanzen in einer Reihe von interzellulären Signalwegen, so bei der Sekretion von PGI2, welches die Aggregation von Thrombozyten hemmt, oder der Synthese von EDRF, das u.a. eine Relaxation glatter Muskelzellen induziert (Newby und Henderson, 1990). Auch eine Reihe von Ionenkanälen in Endothelzellen werden direkt oder indirekt durch $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert, so nichtselektive Kationenkanäle (Popp und Gögelein, 1992). Erhöhungen des $[Ca^{2+}]_i$ aktivieren keine volumenaktivierten Chloridströme (Nilius et al., 1992). Es konnte jedoch ein inhibitorischer Effekt von Calmodulin - Antagonisten auf volumenaktivierte Chloridströme beobachtet werden (Kirk und Kirk, 1994). Eine Aufgabe dieser Arbeit bestand daher in Untersuchungen zur Aktivierbarkeit volumenaktivierter Chloridströme über einem sehr weiten Bereich von intrazellulären Kalziumkonzentrationen.

Modulation von $I_{Cl,VOL}$ durch Cromoglycinsäure

Eine Chloridleitfähigkeit ist in Mastzellen an der Kontrolle sekretorischer Funktionen beteiligt (Romanin, 1991). Diese Leitfähigkeit kann durch Cromoglycinsäure geblockt werden. Die Volumenerhöhung von Zellen scheint andererseits eine Rolle bei Entzündungsprozessen zu spielen (Sorota, 1992). Davon ausgehend bestand eine nächste Aufgabe in der Untersuchung der modulatorischen Effekte von Cromoglycinsäure auf volumenaktivierte Chloridströme in Endothelzellen.

Modulation von $I_{Cl,VOL}$ durch Tyrosinkinasen, Proteinkinase C und Calmodulin

Protein - Phosphorylierungen zählen zu den grundlegenden intrazellulären Regulationsmechanismen unterschiedlichster Zellfunktionen, so auch von Ionenkanälen. Von Hardy at al. (1995) sowie Robson und Hunter (1994) wurde gezeigt, daß die Proteinkinase C (PKC) Chloridleitfähigkeiten modulieren kann. Dabei handelte es sich jedoch nicht um volumenaktivierte Leitfähigkeiten. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine modulatorische Funktion von Tyrosinkinasen auf volumenaktivierte Chloridleitfähigkeiten (Tilly et al., 1993). Der Einfluß solcherartiger Regulationsmechanismen auf die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ in Endothelzellen war bisher noch unklar. Deshalb bestand eine weitere Aufgabe in der Untersuchung von $I_{Cl,Vol}$ unter Modulation der PKC, der Tyrosinkinasen selbst, der Tyrosinkinase - Aktivierung via Hitzeschockproteine sowie nachgeschalteter intrazellulärer Signalproteine wie der MAP - Kinasen.

Eine Modulation der MAP - Kinasen - vermittelten Transkriptionsaktivierung könnte auch unter der Hypothese, daß die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ durch eine vermehrte Synthese des Kanalproteins und dessen Inkorporation in die Membran von statten geht, einen Einfluß auf $I_{Cl,VOL}$ ausüben.

Zur Untersuchung der Rolle der fokalen Adheasionskinase p125FAK bei der Aktivierung von $I_{Cl,Vol}$ sollten zusätzlich Experimente mit Lysophosphatsäure (LPA) erfolgen. Für p125FAK wurde wegen ihrer Funktion als Signaltransduktor zwischen Extrazellularmatrix und intrazellulären Signalwegen auch eine Funktion als Osmosensor vorgeschlagen (Defilippi et al., 1994). LPA führt zu einer gesteigerten Tyrosin - Phosphorylierung an Isoformen der MAP - Kinasen. Es aktiviert aber auch die Tyrosin - Phosphorylierung an der fokalen Adhaesionskinase p125FAK unabhängig von der PKC und von intrazellulärem Kalzium (McLees et al., 1995).

Veränderung der Membrankapazität bei der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$

Weiterhin unbekannt ist die Art der Veränderungen in der Zellmembran, die zur Aktivierung der Chloridleitfähigkeit führt. Als attraktive Hypothese gilt die Vorstellung, es handele sich bei $I_{Cl,VOL}$ um ein Kanalprotein, daß primär vorwiegend zytosolisch vorliegt (Krapivinsky et al., 1994). Eine Aktivierung der Leitfähigkeit sollte dann durch die Inkorporation dieser Proteine in die Zellmembran erfolgen (Jackson und Strange, 1995; Hoffmann und Dunham, 1995).

Es stellte sich deshalb einerseits die Frage, inwieweit durch eine Inhibierung der Proteintranslation und der Vesikelinkorporation die Aktivierung volumenaktivierter Chloridleitfähigkeiten beeinflußt wird und andererseits ob Veränderungen in der Membrankapazität als Maß für die Membranoberfläche unter der Aktivierung volumenaktivierter Chloridleitfähigkeiten zu beobachten sind. Dazu sollten Messungen des volumenaktivierten Chloridstromes nach pharmakologischer Beeinfussung der Vesikelinkorporation sowie die simultane Messung des volumenaktivierten Chloridstromes und der Membrankapazität erfolgen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Zellen

Für die Experimente wurde die etablierte Endothelzelllinie CPAE (Cultured Pulmonary Artery Endothelium, ATCC CCL 209) genutzt; sie wurde 1979 initiiert. Die Zellen stammen vom Pulmonalarterien - Hauptstamm des Rindes (bos taurus).

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 370C , einer CO2 - Konzentration von 10% und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde DMEM (Gibco BRL Life Technologies, Paisly, Scottland) mit Zusatz von 20% FKS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 2 mmol/l L-Glutamin, 2 U/l Penicillin und 2 mg/ml Streptomycin verwendet. Das Medium wurde alle 48h gewechselt. Vor dem Aussäen auf Gelatin - beschichteten Kulturschalen wurden die Zellen durch Einwirkung von 0.5 g/l Trypsin in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Lösung über 180 s vom Boden der Kulturflasche abgelöst. In einem Zeitraum von 2-4 Tagen nach dem Aussäen wurden die Zellen dann für die Experimente genutzt. Es wurden nur nichtkonfluente Zellen verwendet.

3.2. Lösungen

Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 1 in ihrer Zusammensetzung aufgeführt. Der pH wurde in den NaCl-haltigen Lösungen mit 1M NaOH , in den KCl haltigen mit 100 mM KOH und in den CsCl haltigen mit 100 mM CsOH eingestellt. Die Osmolarität der fertigen Lösungen wurde mit einem Wescor-5500-Osmometer (Schlag-Instrumente, Gladbach, BRD) gemessen. Die Experimente zum Kapitel 2 (Phosphorylierung, BAPTA, Proteinsynthese) wurden mit einer Krebslösung höherer Osmolaritität durchgeführt, um Spontanschwellungen der Zellen zu verhindern.

Zu jeder hypotonen Lösung wurde durch Zugabe von Mannitol zusätzlich eine Lösung mit der Ausgangsosmolarität verwendet, um die gleiche Konzentrationsveränderungen von membranpermeablen Ionen bei Lösungswechsel während des Experiments auszuschließen.

Für alle Experimente zur Modulation von $I_{Cl,\ VOL}$ wurde anstatt der Standard - Pipettenlösung eine Pipettenlösung verwendet, in der Kalium durch Caesium ausgetauscht wurde (siehe Tabelle 1: Pipettenlösung mit 140 mmol Caesium). Dadurch wurden die Kaliumleitfähigkeiten blockiert. Obwohl das Caesium nur intern appliziert wurde, trat der gewünschte Effekt auch am einwärts - gleichrichtenden Kaliumkanal auf.

Zum Füllen der Pipettenspitze wurde in allen Experimenten jeweils eine Lösung verwendet, die der internen Lösung entsprach, jedoch kein ATP enthielt. Dadurch konnte eine Stimulierung der Zellen durch aus der Pipette diffundierendes ATP verhindert werden.

Tabelle 3.2.1: Verwendete Lösungen.

Name	Inhalt		Osmolarität	pH
Standardkrebslösung	140mM	NaCl		
	6mM	KCl,		
	1.5mM	CaCl2,		
	1.2mM	MgCl2		
	11.5mM	Hepes		
	10mM	Glukose	290 mOsm	7,3
HTS-1 (28%hypoton)	98 mM	NaCl		
	6mM	KCl,		
	1.5mM	$CaCl_2$,		
	1.2mM	$MgCl_2$		
	11.5mM	Hepes		
	10mM	Glukose	209 mOsm	7,3
Isotonische Lösung zur Lösung HTS-1	+ 86mM	Mannitol	290 mOsm	7,3
Krebslösung 325mOsm	150mM	NaCl		
	6mM	KCl,		
	1.5mM	$CaCl_2$,		
	1mM	$MgCl_2$		
	10mM	Hepes		
	10mM	Glukose	325 mOsm	7,3

HTS-2 (28%hypoton)	105mM	NaCl		
	6mM	KCl,		
	1.5mM	CaCl2,		
	1.2mM	MgCl2		
	11.5mM	Hepes		
	10mM	Glukose	234 mOsm	7,3
Isotonische Lösung zur Lösung HTS-2	+ 90mM	Mannitol	325mOsm	7,3
Standart-Pipettenlösung	40mM	KCl,		
	100mM	KAspartat,		
	2mM	MgCl2		
	10mM	Hepes		
	0,1mM	EGTA		
	4mM	Na2ATP	280 mOsm	7,2
Pipettenlösung mit 140 mval Caesium				
	40mM	CsCl,		
	100mM	CsAspartat,		
	2mM	MgCl2		
	10mM	Hepes		
	0,1mM	EGTA		
	4mM	Na2ATP	280 mOsm	7,2

Zur Perforation der Zellmembran im Bereich der Pipettenöffnung wurde die Pipettenspitze durch Kapillarkraft von der Spitze aus mit einer 0.4 mg ml-1 Nystatin enthaltende Pipettenlösung und der Rest der Pipette von deren Schaft her mit nystatinfreier Standard - Pipettenlösung gefüllt. Das Nystatin wurde von einer 100 g l^{-} 1 Stammlösung (in DMSO) entnommen, und nach Zusatz zu Pipettenlösung über 30s mit Ultraschall mikronisiert. Die Lösungen wurde täglich frisch hergestellt, um einen Aktivitätsverlust des Nystatin zu vermeiden.

BAPTA - tetracaesium (1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethan- N,N,N',N'-tetraacetsäure; Molecular Probes, Eugene, USA) wurde in H2O zu einer 100 mM Lösung bereitet und der Pipettenlösung zugesetzt , das nicht membranpermeable BAPTA-Acetometoxyester (BAPTA-AM; Molecular Probes, Eugene, USA) in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst.

Brefeldin A (BFA) (Sigma), von Penicillinum brefeldianum, wurde mit DMSO zu einer 42 mM Stammlösung bereitet. Angewendet wurde es in einer Konzentration von 525nM (6mg ml^{-1}).

Cycloheximid (4- [2- (3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]-2,6-piperi-dined ione, Sigma) wurde zu 3.55 mM (1mg ml-1) in H2O gelöst und mit einer Konzentration von 35,5 mM (10 mg ml- 1) im Experiment verwendet.

Wortmannin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 10 mM, hergestellt aus einer Lösung von 10 mM in DMSO, angewandt.

PMA (phorbol 12-myristate13-acetat , Sigma) wurde in Konzentrationen von 100-500 nM aus einer 1-3 mM DMSO-Lösung appliziert.

Natrium- Arsenite - Lösung 0,1 N (NaAsO2 , E.Merck, Darmstadt, BRD) wurde in einer Konzentration von 0,3 mM angewendet.

Die schnelle Applikation der verschiedenen Lösungen während der Experimente erfolgte über ein Applikationssystem mit 5 elektromagnetischen Ventilen und der Möglichkeit zur Microprozessor-unterstützten Steuerung. Die Mündung des Applikationssystems in der Experimentierkammer wurde vor jedem Experiment 3-5mm seitlich der zu untersuchenden Zelle positioniert. Simultan zur Zuführung von Lösungen erfolgte das Absaugen aus der Experimentierkammer, so blieb der Flüssigkeitsspiegel in der Experimentierkammer stabil. Das gesamte Applikationssystem wurde einmal täglich und nach jedem Wechsel der Lösung über 30 min mit Aqua bidestillata gespült. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur zwischen 20-22 °C durchgeführt.

3.3. 'patch clamp' - Technik zur Messung von transmembranären Strömen

Die Messung von transmembranären Ionenströmen erfolgte unter Nutzung der 'wohle cell' -Variante der durch Hamill at al. (1981) beschriebenen 'patch clamp'-Technik . Es wurden Glaspipetten mit Widerständen zwischen 5 und 10 MOhm verwendet. Zur Herstellung der 'whole cell' - Konfiguration wurde die Zellmembran nach Formung des 'seals' durch plötzlichen Unterdruck in der Pipette

rupturiert oder mit der Ionophore Nystatin (zur Anwendung siehe oben) perforiert.

Als Verstärker für den gemessenen Membranstrom diente ein EPC-7 (List Electronic, Darmstadt) oder ein EPC-9 (Heka Electronics, Lamprecht, Pfalz). Die Messwerte wurden in Echtzeit mit einer Abtastrate von 0,25 kHz digitalisiert, mit einem 100 Hz - Filter gefiltert und in einem PC gespeichert.

Als Protokoll für das Kommandopotential wurde standardmäßig eine Spannungsrampe genutzt. Diese war wie folgt strukturiert: von 0 mV zu einem Schritt über 1.2s bei -80mV und einem weiteren über 0.4 s bei -150 mV folgte eine lineare Rampe über 5.2 s von -150 zu + 100 mV, dann weiter mit 0 mV (Abbildung 3.3.1). Dieses Protokoll wurde alle 15 s wiederholt.

Die Messungen des Membranpotentials erfolgten im 'current clamp' Modus, die Messwerte wurden mit dem Programm 'FURA' auf dem zur Messung des $[Ca^{2+}]_i$ genutzten ATARI-Computersystems registriert. Für die Übertragung des MP-Wertes zum ATARI-System wurde der Analogausgang des EPC-9 genutzt.

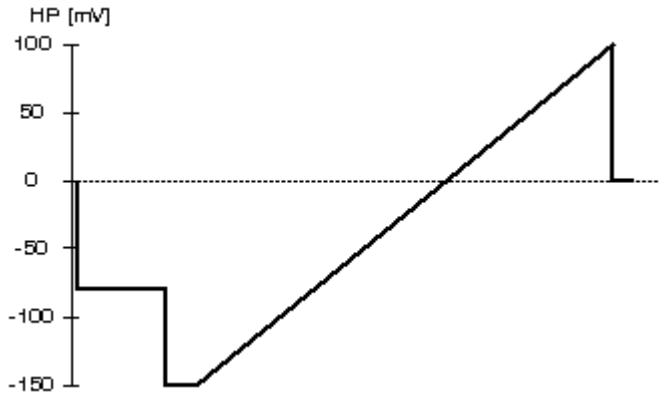

Abbildung 3.3.1: Aufbau der verwendeten Protokolls für das Kommandopotential (HP) in der Art einer Rampe. Die Zeitdauer für das Protokoll beträgt 6,8 Sekunden. Alle 15 Sekunden wurde das Protokoll wiederholt. Zwischen zwei Protokollen blieb das HP auf einem Wert von 0 mV.

3.4. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Die Zellen wurden mit 4 mM FURA 2 - AM (Molecular Probes, Eugene, USA) für 20 min bei Raumtemperatur und anschließend weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. In der AM-Form ist das FURA verestert und damit membranpermeabel. In der Zelle wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das unveresterte FURA ist nicht mehr membrangängig, auf diese Weise erfolgt eine Akkumulation des FURA in der Zelle (Grynkiewics at al., 1985). Die zweizeitige Inkubation wird durchgeführt, um eine gute Diffusion des FURA in die Zelle zu erreichen, gleichzeitig aber die Zeit zur Wirkung der Esterasen möglichst kurz zu halten. Denn während der Hydrolyse entstehen Aldehyde, die die Zelle schädigen können.

Nach der Inkubation wurden die Zellen 15 min mit Krebslösung gewaschen, um nicht hydrolysiertes FURA zu entfernen.

Das Messsystem für $[Ca^{2+}]_i$ basiert auf der Messung des durch FURA emmitierten Fluoreszenzsignals mit einem Photomultiplier (Hamamatsu, Japan). Das optische System besteht aus einem Invert-Mikroskop (Zeiss IM 10), einer Xenon-Leuchtquelle, einem Filterrad sowie Verstärker und Controller (Luigs & Neumann, BRD) für den Photomultiplier. Die Technik basiert auf einer Beschreibung durch Neher (1989). Die Zellen werden durch das Filterrad abwechselnd mit Licht der Wellenlängen 360 nm und 390 nm beleuchted. Das in den Zellen enthaltene FURA fluoresziert abhängig von der gebundenen Menge Kalzium. Diese ist abhängig von der Konzentration des freien Ca^{2+}_i in der zu messenden Lösung. Die Konzentration des freien Ca^{2+}_i wird wie folgt berechnet (Grynkiewics at al., 1985) :

$$[Ca^{2+}]_i = K_{eff} \cdot \frac{R - R_0}{R_1 - R} \qquad (1)$$

K_{EFF} ist die Bindungskonstante des FURA für Ca^{2+}, R_0 der Quotient aus den Intensitäten des Fluoreszenzsignals bei 360 und 390 nm bei einer nominalen Kalziumkonzentration von 0 mV , R_1 entspricht diesem Quotienten unter vollständiger Sättigung des FURA mit Ca^{2+}. Diese Werte werden während eines Kalibrierungsvorgangs mit entsprechenden Lösungen ermittelt. R stellt dann den genannten Quotienten bei Messung der Messprobe dar. Die Hintergrund-Fluoreszenz (Auto-Fluoreszenz) wird vor Beginn des Experiments in einem zellfreien Bereich der Meßkammer gemessen und später während des laufenden Experiments automatisch von den Messwerten subtrahiert.

Zur Datenaufnahme und -Darstellung in Echtzeit wurde ein 8-Kanal Analog / Digital - Konverter (Labinterface LIH-12, Firma Heka, Lambrecht / Pfalz, BRD) in Verbindung mit einem ATARI Mega- 4 - PC genutzt. Damit konnten in Echtzeit mit einer Abtastrate von 2 Hz beide Fluoreszenzsignale (bei 360 und 390 nm), Pipettenstrom und Haltepotential digitalisiert, im ATARI-PC gespeichert und mit der errechneten freien $[Ca^{2+}]_i$ - Konzentration auf dem PC-Bildschirm dargestellt werden.

Zum Ausschluß von Artefakten durch externe Lichtquellen erfolgten die Messungen in einem verdunkelten Raum unter Rotlicht.

3.5.Kapazitätsmessungen

Für die Messung der Membrankapazität C_M wurden zwei verschiedene Messysteme angewendet. Es wurden die Änderungen von C_M als Ausdruck der Zellschwellung unter externer Applikation hypotoner Lösung untersucht.

A) System auf Basis der Applikation eines rechteckförmigen Gleichspannungsimpulses

Das EPC-9-System erlaubt die kontinuierliche Messung der Membrankapazität. Dabei wird über die Mikropipette nach Einstellung einer 'whole cell' Konfiguration ein rechteckförmiger 5 mV Gleichspannungsimpuls appliziert. Der dabei fließende Strom resultiert in seiner Summe aus der Ladung des 'Kondensators Zellmembran' und dem Stromfluß am seriellen Widerstand des Meßsystems R_S.

Aus der Zeitkonstante t dieser Stromantwort wird die Kapazität wie folgt berechnet:

(2) $$t = RS^* Cm$$

R_S wird aus dem Leckstrom, der am Ende des Impulses noch fließt ('Kondensator ist geladen'), errechnet. Softwaregestützt wird t durch einen stufenweisen Abgleich auf das gemessene Stromsignal bestimmt.

Zur Registrierung wurde die Möglichkeit genutzt, mit dem EPC-9 diesen Abgleich kontinuierlich hintereinander ausführen zu lassen. Die Abtastfrequenz ist nicht konstant, da der stufenweise Abgleich jeweils eine unterschiedlich lange Zeit in Anspruch nimmt ($0 < t < 30s$). Das Signal enthält einen relativ hohen Rauschanteil.

Die gemessenen Werte von R_S und C_m wurden automatisch über eine Analogschnittstelle des EPC 9 zum Analog - Digital - Wandler des Kalzium - Meßsystems übertragen und mit dem Programm FURA parallel zu den Intensitätswerten der Kalziummessung und zum gemessenen Membranstrom registriert.

B) System auf Basis der Applikation einer sinusförmigen Wechselspannung

Diese Methode basiert auf Messung von Höhe und zeitlicher Verschiebung des Stroms, der während eines sinusförmigen Wechselspannungsimpulses an einem Kondensator fließt. Der Vorteil der Messmethode gegenüber der des EPC-9-Systems liegt in stabiler Messfrequenz und exakteren Messergebnissen bei sich veränderndem Membranwiderstand.

Das in den hier vorgestellten Experimenten benutzte System wurde von Ing. Geert Raskin, Physiologisches Institut der KU Leuven, entwickelt. Es besteht aus folgenden Komponenten:

- einer externen Schaltung zur Erzeugung der Spannungsimpulse und zur Analog - Digital -

Wandlung von Strom und Haltepotential - Offset (beide Signale werden analog vom Patch-Clamp-Verstärker übertragen) basierend auf einem Signal Prozessor TMS 320 C 30 (Texas Instruments)

- einer DOS - basierten PC - Software zur Ausführung der Berechnungen und als Benutzerschnittstelle
- einer ISA - PC - Steckkarte zum Datenaustausch zwischen PC und externer Schaltung

Zwei sinusförmige Spannungsimpulse (240 und 360 Hz) mit einer Amplitude von 5 mV wurden alternativ an die Zellmembran appliziert. Strom und Spannung wurden unter Verwendung einer Multiplex - Schaltung mit einer Frequenz von 17280 Hz analog - digital - gewandelt . Dieser Aufbau erlaubt die Nutzung von nur einer Schaltung für die Verstärkung und Filterung beider Signale und minimiert so die Phasenverschiebung durch das Gerät.

Die Membrankapazität wurde auf der Basis eines Schaltungsmodells bestehend aus parallel angeordneter equivalenter Membrankapazität C_M und Membranwiderstand R_M und in Serie dazu der Serienwiderstand R_S errechnet. Diese Parameter können mit dem Messsystem 3 mal pro Sekunde ermittelt werden. Die Streuung der ermittelten Werte für C_M betrug bei Messungen an einer Simulationsschaltung weniger als 0,8 pF.

Der Wert für C_M wird vom PC zurück an die externe Schaltung übertragen und dort in ein analoges Gleichspannungssignal gewandelt. Dieses wird zum AD-Konverter des Kalzium-Messystems übertragen und mit dem Programm FURA parallel zu den Messwerten aus Kalziummessung und Strommessung registriert.

Das System arbeitete zufriedenstellend und wurde nach Ausreifung dem Erstgenannten vorgezogen. Die durch die unterschiedlichen Systeme ermittelten Kapazitätswerte gleicher Messobjekte unterschieden sich nicht. Dazu führten wir mehrere Serien von Probemessungen sowohl an einem eigens dazu ebenfalls von G.Raskin hergestellten Simulator als auch an Zellen unter realen Experimentierbedingungen (HTS-Applikation) durch.

Die Stromaktivierung und -deaktivierung wurde mit allen Systemen durch laufende Messung bei einem HP = +20 mV verfolgt und ebenfalls mit dem Programm FURA parallel zu C_M registriert.

3.6. Messung der Zellhöhe

Um Aussagen zu Volumenänderungen von Zellen zu gewinnen wurde ein System zur Messung der Zellhöhe verwendet. Es basiert auf der automatischen Fokussierung von fluoreszierenden Teilchen durch ein 'piezoelectric focusing device' (PIFOC). In die Messkammer mit den am Boden haftenden Zellen wird eine zusätzliche Lösung eingebracht, die fluoreszierenden Teilchen enthält. Ein Teil der Teilchen setzt sich am Boden der Kammer ab, ein anderer Teil auf der Oberfläche der Zellen. Unter mikroskopischer Kontrolle werden Teilchen auf Zelloberflächen und am Boden als Messpunkte für das

System festgelegt.

Bis zu 80 Zellen können so pro Experiment gleichzeitig vermessen werden. Unter dem Experiment wird der Abstand zwischen auf dem Boden der Kammer und auf der Oberfläche der Zellen abgelagerten Teilchen durch wechselnde Fokussierung mit Hilfe des PIFOC gemessen. Diese Distanz entspricht der Höhe der Zellen. Eine ausführliche Beschreibung des Systems wird durch Van Driesche et al. (1993) gegeben.

3.7. Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem PC-Programm ORIGIN für Windows, Version 3.7 (Microcal Software Inc. , Northhampton , MA, USA) ausgeführt, die Grafiken mit ORIGIN und GEODRAW angefertigt. Die Arbeit wurde mit dem Textsystem GEOWRITE editiert. GEODRAW und GEOWRITE sind Bestandteil der graphischen Benutzeroberfläche PC-Geoworks (Geoworks Inc. , Berkley, CA, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Der Einfluß intrazellulären Kalziums auf volumenaktivierte Chloridströme

Die Rolle intrazellulären Kalziums bei der Aktivierung volumenaktivierter Chloridströme ist noch nicht völlig aufgeklärt, jedoch galt $I_{Cl,VOL}$ bisher als Ca^{2+} - unabhängig (siehe Einleitung). Experimente zur direkten Untersuchung der Kalzium-Abhängigkeit von $I_{Cl,VOL}$ durch direkte Messung des $[Ca^{2+}]_i$ simultan zur Messung des volumenaktiverten Stromes mittels 'patch-clamp' - Technik unter Variation des $[Ca_{2+}]_i$ über einen weiten Bereich wurden bisher jedoch nicht durchgeführt.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Stromamplituden des HTS-induzierten Chloridstromes unter Kontrollbedingungen und nach Pufferung des intrazellulären Kalziums durch die Kalzium-Chelatoren BAPTA und EGTA gemessen. Dazu erfolgten Messungen mit zuerst lediglich perforiertem und nachfolgend rupturiertem 'patch' an jeweils ein und der selben Zelle. Nach Ruptur der Zellmembran im Bereich der Pipettenöffnung wurde die Zelle mit der Pipettenlösung durchströmt, welche unterschiedliche, mit BAPTA oder EGTA gepufferte Kalziumkonzentrationen enthielt. Weiterhin erfolgten Messungen nach Inkubation der Zellen mit BAPTA - AM.

4.1.1 Inkubation mit BAPTA-AM

BAPTA ist in der AM-Form verestert und damit lipophil und membranpermeabel. In der Zelle wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das unveresterte BAPTA ist nicht mehr membranpermeabel, auf diese Weise erfolgt unter Inkubation mit BAPTA eine Akkumulation in der Zelle. In dem hier vorgestellten Experimenten wurden die Zellen mit 50 mM BAPTA-AM über 1h durch Zusatz des Chelators in das Kulturmedium bei 37 °C inkubiert.

Der durch HTS induzierte Strom als Mittel von 5 Zellen betrug nach der Inkubation noch 6.2 $\pm$ 1.3 pA/pF. Ein Strom unter 28% HTS war also noch auslösbar, jedoch nach Inkubation deutlich reduziert. Die Ergebnisse im Vergleich mit Ladung via Pipette und Kontrollösung (enthält 0.1 mM EGTA) zeigt die Abbildung 4.1-1.

4.1.2 Messung unter Pufferung des intrazellulären Kalziums mit BAPTA und EGTA via Pipette

Während der Inkubation mit BAPTA-AM entstehen in der Zelle durch Spaltung des Esters Aldehyde, das Prinzip entspricht dem der Inkubation mit FURA (Grynkiewics at al., 1985). Um einen schädigenden Einfluß dieser Aldehyde auf die Zelle als auslösende Ursache für die Verminderung des volumenaktivierten Chloridstromes auszuschliessen, wurde das $[Ca]_i$ durch Diffusion der BAPTA enthaltenden Pipettenlösung via rupturierten 'patch' gepuffert. Der Pipettenlösung wurden dazu 5 mM BAPTA zugesetzt.

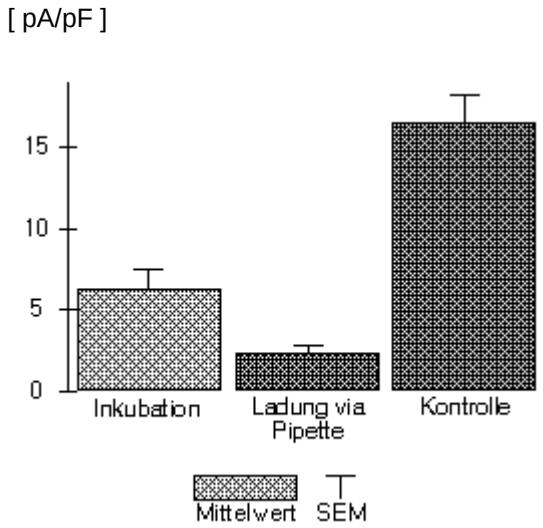

Abbildung 4.1-1: CPAE, mit 28% HTS induzierter Strom bei einem HP von -80 mV, Vergleich zwischen Inkubation mit 50 mM BAPTA-AM über 1h, Ladung via Pipettenlösung (enthält 5 mM BAPTA), und Kontrollösung (enthält 0.1 mM EGTA).

Die Konzentration mußte so hoch gewählt werden, da im Vergleich zur Inkubation mit BAPTA-AM keine Akkumulation des BAPTA erfolgt. Ganz im Gegenteil diffundiert das BAPTA durch die relativ kleine Öffnung der Pipette nur langsam in das Zytosol.

Die extrazelluläre Lösung enthielt 5 mM Cs^+. Der HTS-induzierte Strom wurde bei einem Haltepotential von -80 mV gemessen. Das entspricht nahezu dem Kalium-Umkehrpotential. Der Anteil von K^+ - Strömen ist daher nur minimal. Das Umkehrpotential des HTS-induzierten Stromes liegt mit -19 mV nahe dem errechneten Chlorid-Umkehrpotential von -23 mV.

Das Experiment lief wie folgt ab: Der 'patch' wurde zuerst mit der Ionophore Nystatin perforiert. So erzeugte Membranperforationen sind nur für monovalente Ionen permeabel. BAPTA-Moleküle sind zu groß, um durch die Membranperforationen zu diffundieren.

Danach erfolgte die erste Applikation von HTS. Nach Auswaschen wurde der 'patch' rupturiert. Das ist nach Nystatinperforation relativ leicht auszuführen. Ein Eindringen des Nystatins in das Innere der Zelle wird dabei als nicht kritisch angesehen, da der Wirkungsmechanismus des Nystatins auf der extrazellulären Bindung an Membransterole und folgende Bildung einer für monovalente Ionen permeable Pore beruht (Forth et al., S. 681-690). Die durch Diffusion des Stoffes durch die im Bereich der Pipettenöffnungung rupurierte Membran intrazellulär erreichte Konzentration ist wesentlich geringer als die in der Pipette. Für Nystatin (MW=979) kann die Zeitkonstante dafür mit der von Fura-Pentapotassium (MW=832) verglichen werden (154 s; Fabio et al.,1994). Die Messungen in den hier vorgestellten Experimenten erfolgten etwa 10-200s nach Rupturierung des 'patches'. Weiterhin ist der Anteil von Cholesterol an den Membranen intrazellulärer Kompartimente (3-6%) wesentlich geringer als in der Zellmembran (17-23%; Alberts et al., 1994; Kap.10, S.482).

In allen Messungen konnte mit Öffnung der Membran für BAPTA eine sofortige Verringerung des $[Ca^{2+}]_i$ auf Werte unter 10 nmol/l beobachtet werden, das $[Ca^{2+}]_i$ war jedoch noch messbar. Dieser Effekt ist am Beispiel einer Zelle in der Abbildung 4.1-2 D zu verfolgen. Nach der Rupturierung erfolgte eine weitere Applikation von HTS. Abbildung 4.1-2 A zeigt den Strom während des Experiments bei einem Haltepotential von -80 mV .

Der unter HTS maximal aktivierte Strom ist nach Beladung der Zelle mit BAPTA via Pipette und folgender starker Verringerung des $[Ca^{2+}]_i$ wesentlich geringer, die Zeit zu seiner maximalen Aktivierung länger als während der HTS-Stimulation bei perforiertem 'patch', d.h. unter physiologischem $[Ca^{2+}]_i$.

In der Zusammenfassung von 5 Experimente verringerte sich der Strom um folgende Beträge (Mittelwert / SEM): von 16.2 $\pm$ 2.1 pA / pF im Nystatin-perforierten 'patch' auf 2.2 $\pm$ 0.5 pA / pF nach Rupturierung. Die nach Rupturierung gemessenen Werte sind in Abbildung 4.1-1 im Vergleich zu Messungen nach Vorinkubation mit 50 mM BAPTA-AM über 1h und Kontrollmessungen mit Perforierung (Pipettenlösung mit 5 mM BAPTA , jedoch vor Rupturierung) dargestellt. Unter dem Einfluß von BAPTA kommt es kaum noch zur Aktivierung eines Stroms nach Applikation von HTS, und das unabhängig von der Art der Applikation des BAPTA.

Ein ähnlicher Effekt konnte in weiteren Experimenten beobachtet werden, in denen EGTA als Chelator des intrazellulären Kalziums verwendet wurde. Das EGTA wurde der Pipettenlösung zugesetzt, das Protokoll gleicht dem der Applikation von BAPTA via Pipette.

Es wurde jedoch wie folgt modifiziert: nach Formung eines Nystatin - perforierten 'patch' erfolgte die HTS-Applikation. War der HTS-induzierte Strom maximal aktiviert, so wurde der 'patch' rupturiert. Danach zeigte das $[Ca^{2+}]_i$ das gleiche Verhalten wie in den entsprechenden Experimenten mit BAPTA, es verringerte sich in wenigen Sekunden auf Werte nahe 0 nM. Daraufhin verringerte sich auch der aktivierte Strom, um trotz laufender HTS-Applikation nach etwa 1 min nahezu auf seinen Ausgangswert vor der HTS-Stimulation zu sinken (Daten nicht gezeigt).

Die starke Verringerung von $[Ca^{2+}]_i$ auf Konzentrationen unter 10 nmol/l sowohl durch BAPTA als auch durch EGTA verhinderte also die Aktivierung oder führte zu einer Inaktivierung von $I_{Cl,VOL}$.

Eine nächste Reihe von Experimenten sollte zeigen, inwieweit $[Ca^{2+}]_i$ volumenaktivierte Chloridströme moduliert. Mit rupturierten 'patches' unter Anwendung von Pipettenlösungen unterschiedlicher Kalziumkonzentration wurde $I_{Cl,VOL}$ gemessen. Dabei konnten in einem Konzentrationsbereich von 50 - 1000 nmol/l Ca^{2+} keine Veränderungen im maximal aktivierten Strom oder in der Kinetik von $I_{Cl,VOL}$ beobachtet werden. Das heißt, $I_{Cl,VOL}$ konnte bereits in Gegenwart von 50 nmol/l Ca^{2+} maximal aktiviert werden. Eine weitere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration veränderte die Stromamplitude nicht weiter.

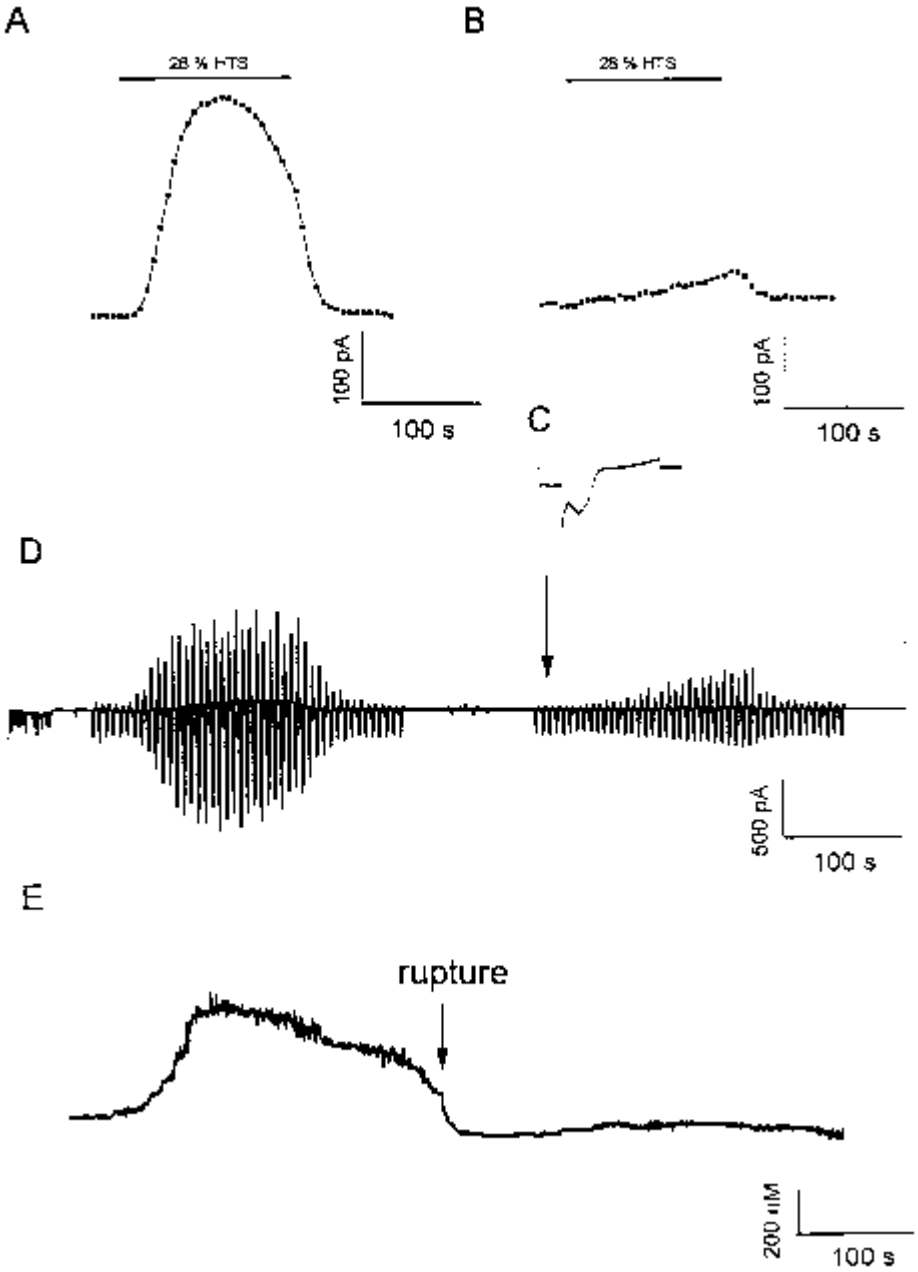

Abbildung 4.1-2: Experiment mit Applikation von 28% HTS beginnend unter Kontrollbedingungen bei Nystatin-perforiertem 'patch' (A). Nach Auswaschen Rupturierung, dadurch BAPTA-Beladung der Zelle via Pipettenlösung (enthält 5 mM BAPTA), dann erneute Applikation von 28% HTS (B).

A - Verlauf des Membranstromes bei einem HP von -80 mV.

B - Verlauf des Membranstromes bei einem HP von 0 mV.

C - Stromverlauf während einer HP-Rampe unmittelbar nach Rupturierung des patch' als Zeichen für einen weiterhin stabilen 'seal'.

D - Verlauf des $[Ca^{2+}]_i$ über das gesamte Experiment.

4.2 Einfluß von Cromoglycinsäure auf volumenaktivierte Chloridströme in Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Cromoglycinsäure (CL) auf volumenaktivierte Chloridströme in CPAE-Zellen untersucht. Die Abbildung 4.2-1C zeigt den Effekt von 100 mM CL auf den volumenaktivierten Strom an einer CPAE-Zelle. Der Strom verringert sich nur langsam , der volle Effekt ist erst nach etwa 100 s erreicht. Nach dem Auswaschen des CL erhöht sich der Strom ebenso langsam.

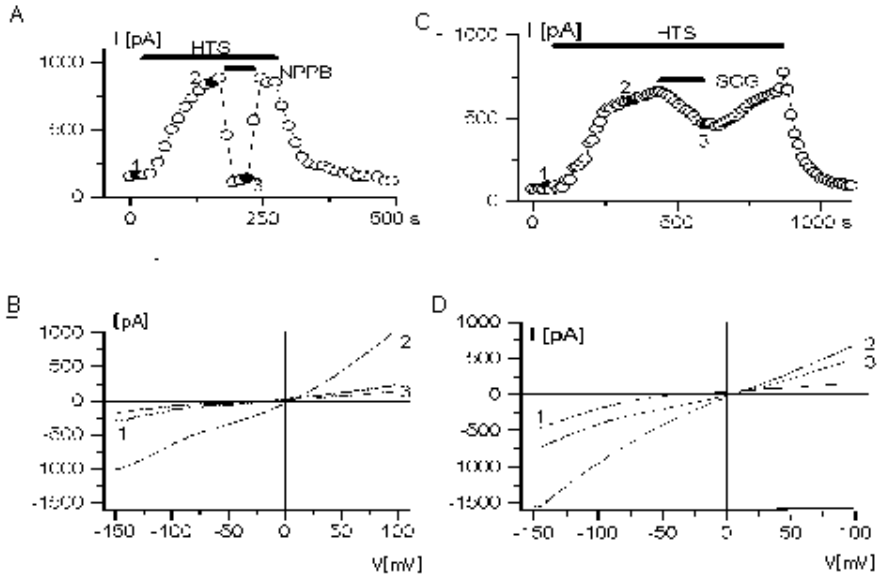

Abbildung 4.2-1: Effekt von NPPB (100 mM) und Cromoglycinsäure (CL , 100 mM) auf volumenaktivierte Chloridströme in CPAE. Zeitverlauf von Aktivierung und Deaktivierung des Stroms durch HTS, gemessen in einem HP-Fenster zwischen +90 und +100mV. Die Balken kennzeichnen den Zeitraum der Applikation von A) NPPB und C) SCL. Deutlich sichtbar der langsamere und geringergradige Effekt von SCL im Vergleich zu NPPB.

Die Nummern kennzeichnen den Zeitpunkt der Messung der in B) und D) dargestellten Strom-Spannungs-Kurven bei linearen Spannungsrampen. Der HTS-induzierte Strom hat hier ein Umkehrpotential von +7 mV (ECl = +9 mV).

Im Strom - Spannungs - Diagramm (Abbildung 4.2-1 D) ist die Aktivierung eines Stromes mit einem Umkehrpotential von +7mV zu sehen, was fast dem errechnetem Umkehrpotential für Chlorid in diesen Experimenten (+9 mV) entspricht. Dieser Strom wird durch 100 mM CL also nur teilweise geblockt. In Kontrast dazu tritt der Effekt von NPPB in der gleichen Konzentration sehr schnell ein (nach weniger als 20 s) , der volumenaktivierte Strom wird fast vollständig geblockt (Abbildung 4.2-1 A, B). CL blockt also den volumenaktivierten Chloridstrom an Endothelzellen im Vergleich zum Effekt von NPPB nur geringgradig und langsam. Ähnliche Ergebnisse wurden unter extrazellulärer Applikation von Nedocromil, einem CL-Analogon, beobachtet (keine Abbildung).

In weiteren Experimenten wurde die Aktivierung des volumeninduzierten Chloridstroms unter Anwesenheit von CL bereits vor Applikation der hypotonen Lösung beobachtetet. Die Zeit für eine halbmaximale Aktivierung des Stromes war unter 100 mM CL wesentlich verlängert: von 148 $\pm$ 10 s (n=6) unter Kontrollbedingungen auf 253 $\pm$ 25 s (n=6).

Zur Quantifizierung des Effektes wurde die Amplitude des HTS-induzierten Stromes unter CL geteilt durch jene ohne CL und als Funktion der CL-Konzentration dargestellt. Die Punkte wurden nach folgender Gleichung ermittelt:

$$I_{a,norm} = \frac{1}{1+\frac{[CL]}{K_i}} \qquad (3)$$

K_i stellt die CL-Konzentration für halbmaximalen Block dar , [CL] die Konzentration von CL. Der Wert von K_i beträgt im besten Fit 310 $\pm$ 70 mM. Typische Messungen dazu unter verschiedenen CL-Konzentrationen zeigt Abbildung 4.2-2.

Der für K_i ermittelte Wert zeigt eine geringere Sensitivität des volumenaktivierten Chloridstromes auf CL in Endothelzellen als jener in Mastzellen (Reinspecht et al., 1992).

Es wurden ebenfalls Experimente unter intrazellulärer Applikation von CL durchgeführt. Dazu wurde das CL der Pipettenlösung zugesetzt und die Zelle via rupturierten Patchs mit CL beladen. Im Gegensatz zur extrazellulären Applikation betrug K_i hier nur 5-10 mM. Die Abbildung 4.2-3 A zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes intrazellulär applizierten CL auf den volumenaktivierten Strom an 3 verschiedenen Zellen, der volumenaktivierte Strom wurde nach Subtraktion des Stroms vor HTS durch die Membrankapazität dividiert. Einen Vergleich der Effekte bei intra- und extrazellulärer Applikation erlaubt Abbildung 4.2-3 B.

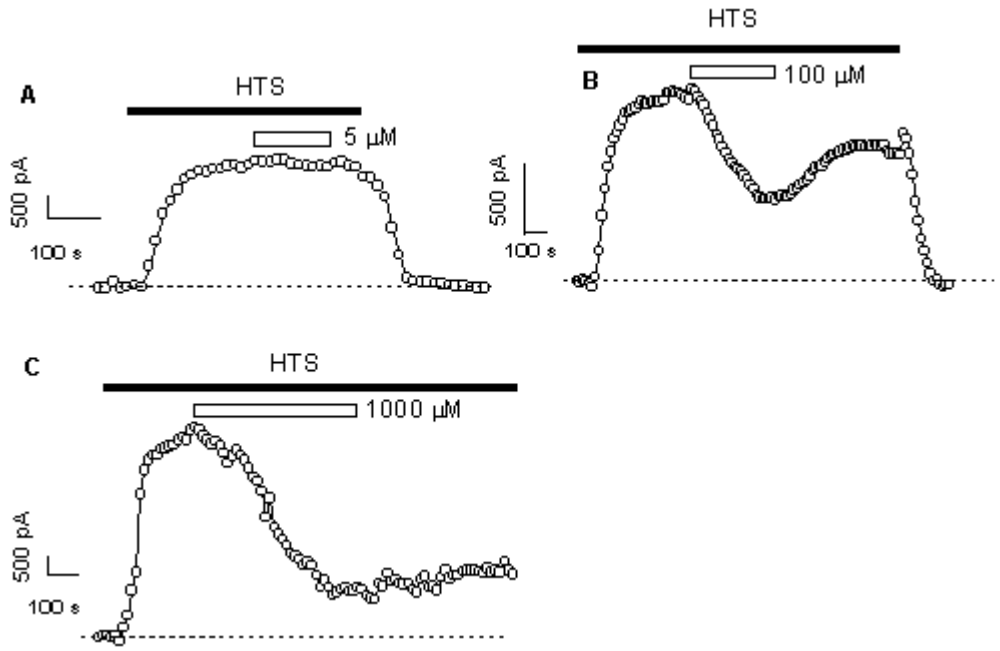

Abbildung 4.2-2: Effekt von extrazellulär appliziertem CL auf den HTS - induzierten Strom am Beispiel von 3 CPAE. Der helle Balken markiert die CL - Applikation.
A - 5 µM CL
B - 100 µM CL
C - 1000 µM CL.

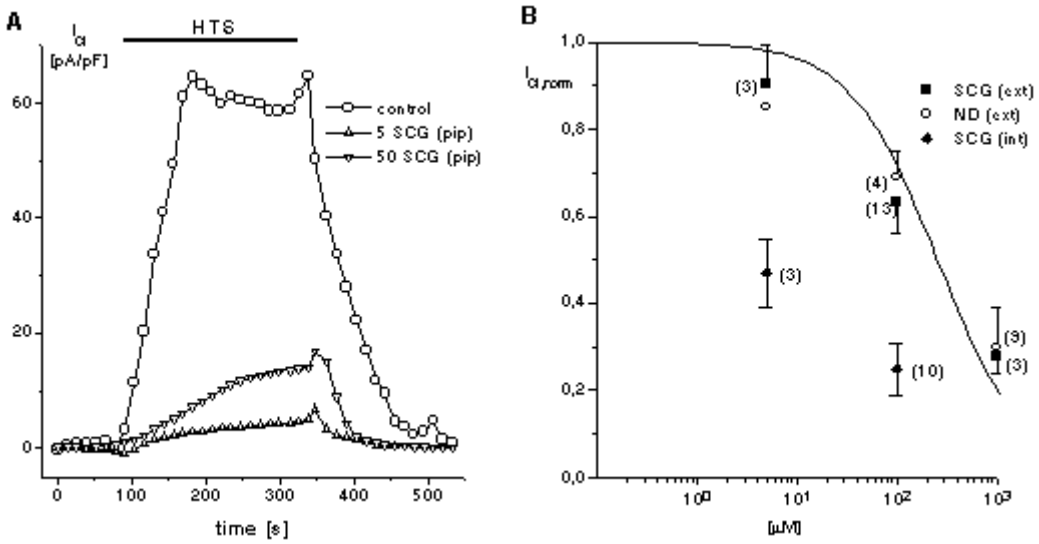

Abbildung 4.2-3: Effekte von intra- und extrazellulär applizierter CL, der Strom wurde in einem HP-Fenster von 90-100 mV gemessen.
A - Effekte intrazellulär applizierter CL auf den HTS - induzierten Strom an 3 verschiedenen CPAE. Die Y-Achse stellt den Strom nach Subtraktion des Stromes vor HTS-Applikation dividiert durch die Membrankapazität dar.
B - Vergleich der Effekte intra- und extrazellulär applizierter CL bzw. Nedocromils (ND). Der Strom wurde wie unter (A) normalisiert.

In Abbildung 4.2-4 sind die Ergebnisse eines Experimentes aufgezeigt, in dem nach Rupturierung mit 5 mM CL in der Pipettenlösung repetitiv mit HTS stimuliert wurde. Mit der Zeitspanne nach Rupturierung verringerte sich der HTS-induzierte Strom erheblich, um nach 14 min einen konstanten Wert zu erreichen.

Die Zeitkonstante dazu beträgt 140 s und ist vergleichbar mit der Diffusion des Salzes Fura-Pentapotassium (MW=832) aus der Pipettenlösung durch die Öffnung eines rupurierten Patches in die Zelle, die Zeitkonstante dafür beträgt 154s (Fabio et al.,1994).

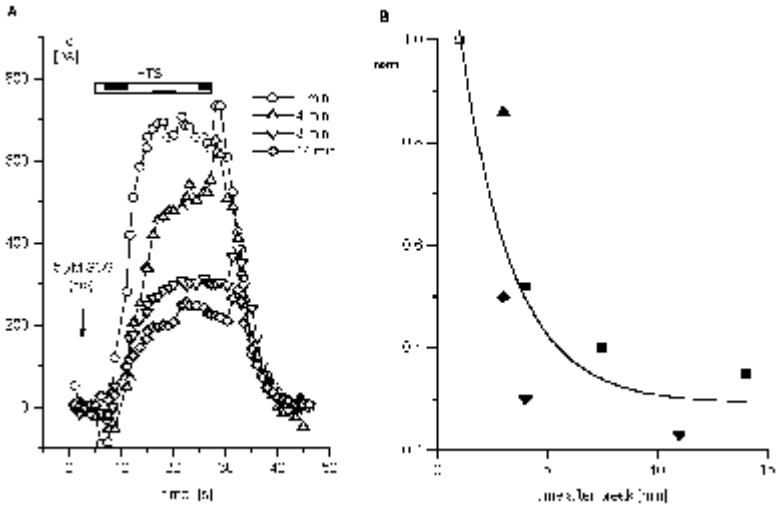

Abbildung 4.2-4: Volumenaktivierter Strom bei intrazellulärer Applikation von Cromoglycinsäure (CL), gemessen in einem HP-Fenster zwischen +90 und +100 mV: A - bei repetitiver Applikation von HTS nach Rupturierung des Patches zeigt der HTS-induzierte Strom eine zeitabhängige Verringerung bis 14min nach Ruptur, die in diesem Ausmaß unter Kontrolbedingungen nicht zu beobachten war. B - Maximale Stromantwort auf HTS normalisiert durch den Strom bei erster HTS-Applikation als Funktion der Zeit nach Rupturierung (n=3). Die Kurve zeigt den exponentiellen Fit mit einer Zeitkonstante von 140s.

Das Diffundieren des CL durch den rupturierten Patch scheint der limitierende Schritt bei der Wirkung von CL intrazellulär zu sein. Diese Ergebnisse sowie die Tatsache, daß auch sehr hohe Konzentrationen von CL nur relativ geringe Effekte zur Folge haben lassen vermuten, daß CL seinen eigentlichen Wirkungsort intrazellulär hat und bei extrazellulärer Applikation erst langsam durch die Membran diffundiert.

Zur Klärung dieser Vermutung diente folgendes Experiment: Die Zellen wurden im Kulturmedium bei 37 ^{o}C über 120 min mit 100 mM CL inkubiert, danach das CL ausgewaschen. Die HTS-induzierten Stöme waren geringer als in den Kontrollzellen: 12 $\pm$ 3 pA/pF (n=3) im Vergleich zu 37 $\pm$ pA/pF (n=7) in der Kontrolle. Jedoch stieg der Strom unter HTS nach sehr langer Auswaschzeit mit CL - freier Lösung auf 21$\pm$ 4 pA/pF (n=3) an . Das wiederum spricht gegen eine Diffusion des CL nach intrazellulär.

4.3 Modulation volumenaktivierter Chloridströme durch Phosphorylierungsreaktionen

4.3.1 Modulation von Tyrosinkinasen

Volumenaktivierte Chloridströme sind in ihrer Charakteristik und zunehmend auch in ihrer Funktion untersucht. Die Mechanismen ihrer Aktivierung und ihre Modulation sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Reversible Phosphorylierungen stellen die vorherrschende Strategie zur Aktivitätskontrolle von Proteinen in Eukaryoten dar. Die im folgenden dargestellten Experimente sollten untersuchen, inwieweit solche Mechanismen auch bei der Modulation volumenaktivierter Chloridströme eine Rolle spielen. Dazu wurde der Einfluß von an verschiedensten Punkten in bereits bekannte intrazelluläre Signalwege (siehe Einleitung) eingreifenden Stoffe auf volumenaktivierte Chloridströme in CPAE untersucht .

Durch Tilly et al. (1993) konnten Veränderungen an Ionenleitfähigkeiten durch Tyrosinkinase - induzierte Prozesse dokumentiert werden. In den hier beschriebenen Experimenten wurde sowohl die Tyrosinkinase inhibiert als auch Tyrosinkinase - induzierte Subprozesse direkt beeinflußt, da einige dieser Subprozesse wie z.B. der MAP - Kinase - Signalweg auch durch G - Protein - gekoppelte Rezeptoren induziert werden können (Cook et al., 1993; Winitz et al., 1993).

Herbimycin A ist ein Tyrosinkinase - Inhibitor (Uehara et al., 1989; June et al., 1990). Weder nach direkter Applikation noch nach Vorinkubation über 48h beeinflußte Herbimycin A in einer Konzentration von 1 mM den HTS - induzierten Chloridstrom (Daten nicht gezeigt).

Lysophosphatsäure (LPA) ist ein G - Protein - Agonist und führt dadurch zu einer gesteigerten Tyrosin - Phosphorylierung und Aktivierung der p42 - Isoform der MAP - Kinasen in der Endothelzell - Linie EAhy 926 (McLees et al., 1995). LPA induziert aber auch die Tyrosin - Phosphorylierung an der fokalen Adhaesionskinase p125FAK unabhängig von der PKC und von intrazellulärem Kalzium.

Es wurde der Effekt von 1 mM LPA nach Applikation auf CPAE - Zellen in isotoner Lösung untersucht. Weder nach 15 min noch nach 30 min Applikationsdauer wurde ein Chloridstrom induziert. Nach darauffolgender Applikation von hypotoner Lösung konnte ein Chloridstrom aktiviert werden, der dem unter Kontrollbedingungen entsprach. LPA beeinflußte also die Aktivierung des $I_{Cl,VOL}$ nicht.

Wortmannin blockt die Aktivierung von MAP - Kinasen in einer Reihe von Zelltypen (Ferby et al., 1994; Cross et al., 1994; Welsh et al., 1994) und greift so zentral in die Tyrosinkinase - induzierte Aktivierung der Transkription ein. Weiterhin inhibiert es die Phosphatidylinositol-(PI)-3-kinase (Arkaro und Wymann, 1995; Kanai et al., 1993), welche an Aktin - Elemente des Zytoskeletts koppelt. Wortmannin wurde in einer Konzentration von 10 mM über 6 und 12 min nach maximaler Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ appliziert. In keinem der Protokolle konnte ein sicherer Effekt auf $I_{Cl,VOL}$ beobachtet werden (Abbildung 4.3.1), die registrierten Unterschiede in den Mittelwerten des HTS-induzierten Stromes sind statistisch nicht signifikant.

Neben der MAP - Kinasen - Phosphorylierungskaskade wurde ein weiterer Tyrosinkinase - induzierter intrazellulärer Signalweg auf seine Rolle bei der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ hin untersucht. Dieser wird durch die p70 s6k - Kinase induziert. Sie kann selektiv durch Rapamycin inhibiert werden (Chung et al., 1992; Kuo et al., 1992; Price et al., 1992). Rapamycin wurde in einer Konzentration von 0,1 mM über 10 - 25 min nach maximaler Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ appliziert. Es konnte keinerlei Veränderungen in der Höhe des Stromes registriert werden.

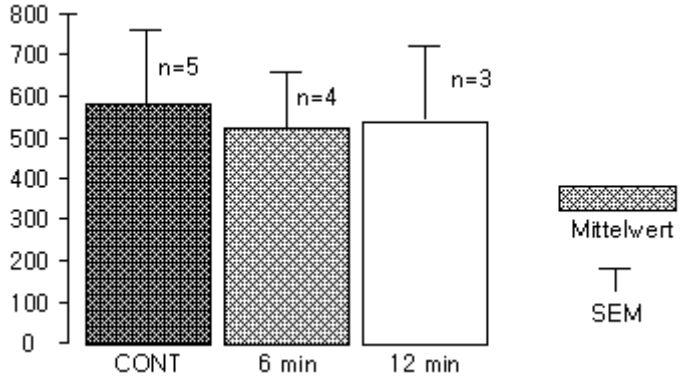

Abbildung 4.3-1: HTS-induzierte Ströme [pA] unter Kontrollbedingungen sowie nach 6 und 12 min Inkubation mit 10 mM Wortmannin.

4.3.2 Modulation durch streßinduzierte Phosphorylierungsreaktionen

Unter chemischem und thermischem Stress kommt es zu einer Phosphorylierung des 'heat-shock transcribtion factor' (HSF); dadurch wird die Synthese von Hitzeschockproteinen (HSP) induziert. Um einen möglichen Einfluß dieses Vorgangs oder der dadurch gebildeten HSP auf $I_{Cl,VOL}$ festzustellen, wurden CPAE - Zellen chemischem und thermischem Stress ausgesetzt und nachfolgend der volumenaktivierte Strom mit Hilfe der 'patch clamp' -Technik untersucht. Simultan wurde die Konzentration des intrazellulären Kalziums gemessen (siehe dazu 'Materialien und Methoden').

Chemischer Streß zur Induzierung von HSP wurde durch Natriumarsenit erzeugt und damit dem Vorgehen von Yiu et al. (1993) und Levinson et al. (1980) gefolgt. Natriumarsenit induziert die Bildung aller HSP-Subtypen von HSP32 bis HSP110 (Yiu et al, 1993). Es wurden 0.3 mM Natriumarsenit über 30 min und länger appliziert. Ein Einfluß auf die Größe oder den Zeitverlauf des HTS-induzierten Strom konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.3.2 A,B).

Zur Applikation von thermischem Stress in Form eines Hitzeschocks wurden die Zellen über 25 oder 60 min bei 42 bis 45 °C inkubiert. Wiederum war keinerlei Effekt auf $I_{Cl,VOL}$ sichtbar, auch nach 60 min 45 °C waren weder in Zeitverlauf der Aktivierung noch in Strom - Spannungs - Kurve Veränderungen

sichtbar (Abbildung 4.3.2 C).

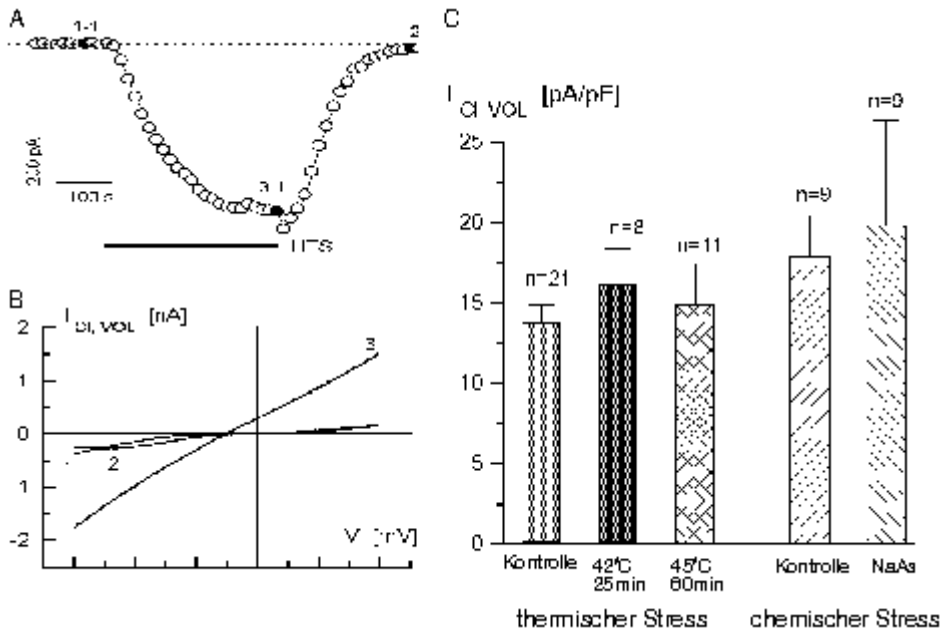

Abbildung 4.3.2: HTS-induzierte Ströme nach Hitze - und chemischem Streß, gemessen bei - 80 mV Haltepotential.

A, B - Aktivierung und Deaktivierung durch 28% HTS induzierten Stromes in einer Zelle nach Inkubation bei 45 OC über 60 min vor dem Experiment. Die ausgefüllten Marker in A repräsentieren die Messpunkte der Strom - Spannungs - Kurven in B vor - (1), nach maximaler Aktivierung des HTS induzierten Stromes (2) und nach Auswaschen der HTS (3).

C - Vergleich der durch 28% HTS induzierten Ströme nach thermischer Stresseinwirkung unter Kontrollbedingungen und nach 25 min 42°C und 60 min 45°C sowie nach chemischem Stress unter Kontrollebedingungen und nach Inkubation mit 0,3 mM Natriumarsenit (NaAs) über 30 min.

Es bestehen keine statistisch signifikanten Differenzen.

4.3.4. Modulation durch die Proteinkinase C

Den Ausgangspunkt für diese Experimente stellte die Arbeit von Hardy et al. (1995) dar. In ihr wurde die Regulation von volumenaktivierten Chloridströmen durch die PKC via Phosphorylierung des MDR - P - Glycoproteins gezeigt. PMA ist unmittelbar nach Kontakt ein Aktivator der PKC, bei Inkubation über mehrere Stunden kommt es dann zu einer Abregulation der PKC - Aktivität (Hardy at al., 1995).

Unter direkter Applikation des PMA wurden selbst mit Konzentrationen von 0.5 mM keinerlei Effekte beobachtet (Abbildung 4.3-3). Auch eine Abregulierung der PKC - Aktivität durch Inkubation der Zellen mit 200 nM PMA über 24 h bewirkte keine Änderung des volumenaktivierten Chloridstromes. Jedoch zeigten 4 von 13 Zellen nach repetitiver Applikation von HTS einen verstärkten 'run-down' (Abbildung 4.3-4).

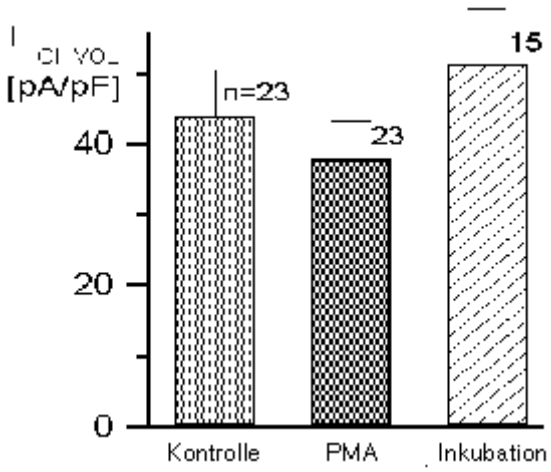

Abbildung 4.3-3: Statistischer Vergleich der durch 28% HTS induzierten Ströme bei -80 mV HP unter Kontrollbedingungen , nach PMA - Applikation (ab maximalem HTS - induziertem Strom 0,2 - 0,5 mM über 2-8 min) und nach Inkubation mit 0,1 und 0,2 mM über 24h

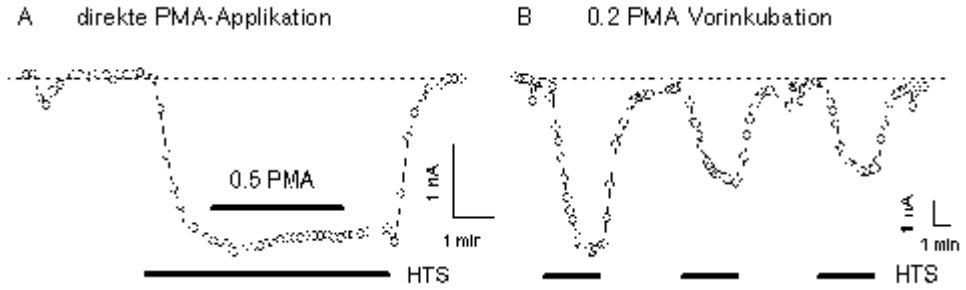

Abbildung 4.3-4:Zwei Messungen von durch 28% HTS induzierten Strömen bei -80 mV Haltepotential. A - Applikation von 0,5 mM PMA nach maximaler Aktivierung des volumenaktivierten Stromes. B - repetitive Applikation von 28% HTS nach Inkubation mit 0,2 mM PMA über 24h.

4.4 Werden volumeninduzierte Chloridströme durch Inkorporierung eines Kanalproteins aktiviert ?

4.4.1 Änderungen der Membrankapazität bei der Aktivierung volumeninduzierter Chloridströme

Bei Exposition von Endothelzellen zu hypotoner Lösung wird eine Schwellung der Zelle und ein auswärts gleichrichtender Chloridstrom induziert. Der Aktivierungsmechanismus dieses Stroms ist noch nicht bekannt. Es wurde eine Theorie dazu vorgeschlagen, nach der eine Veränderung des Zellvolumens die Inkorporation von Kanalproteinen triggert. Diese Kanalproteine müßten dann primär überwiegend zytosolisch und nur zum Teil membrangebunden vorliegen und eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit besitzen.

Wenn die Proteine vom endoplasmatischen Retikulum (ER) nach ihrer Bildung von Vesikeln umhüllt werden und die Inkorporation in die Zellmembran durch die Fusion dieser Vesikel mit der Zellmembran erfolgt, dann müßten Änderungen der Membrankapazität C_M mit der Aktivierung des Chloridstroms korrelieren.

Bei Exposition von Endothelzellen zu hypotoner Lösung fielen zwei Reaktionstypen hinsichtlich der Veränderung der Membrankapazität auf (Abbildung 4.4-1).

Die Mehrzahl der Zellen reagierte nach extrazellulärer Applikation einer 28% hypotonen Lösung bei einem Haltepotential von +20 mV mit der Aktivierung eines Stroms, jedoch ohne eine Veränderung von C_M, d.h. die Veränderung von C_M waren geringer als 2% der Membrankapazität unter isotoner Lösung (Gruppe 1, Abbildung 4.4.1, A1-C1). Die durchschnittliche Änderung von C_M betrug zusammengefasst für 17 Zellen 1,1 ± 0,2 % des initialen Wertes vor Beginn der Zellschwellung. Es ist offensichtlich, daß für diese Zellen die Aktivierung des Stroms nicht mit der Veränderung von C_M korreliert.

In den verbleibenden 5 Zellen konnte jedoch eine Vergrößerung der Membrankapazität beobachtet werden (Gruppe 2, Abbildung 4.4.1, A2-C2). Diese betrug jedoch niemals mehr als 14 % des initialen Wertes, auch nicht, wenn eine 50% hypotone Lösung appliziert wurde. Für diese Gruppe erhöhte sich C_M im Mittel um 10,6 ± 0,9 %.

Die Korrelation zwischen Strom und Membrankapazität für die jeweiligen Experimente sind in Abbildung 4.4.1, C1 und C2 dargestellt. Deutlich sichtbar ist, daß die Aktivierung des Stroms wie auch seine Deaktivierung nach Rückkehr zu isotoner Lösung den Veränderungen von C_M vorrausgeht. Es besteht daher kein Hinweis für eine Aktivierung oder Deaktivierung des Stroms durch Veränderungen der Membrankapazität.

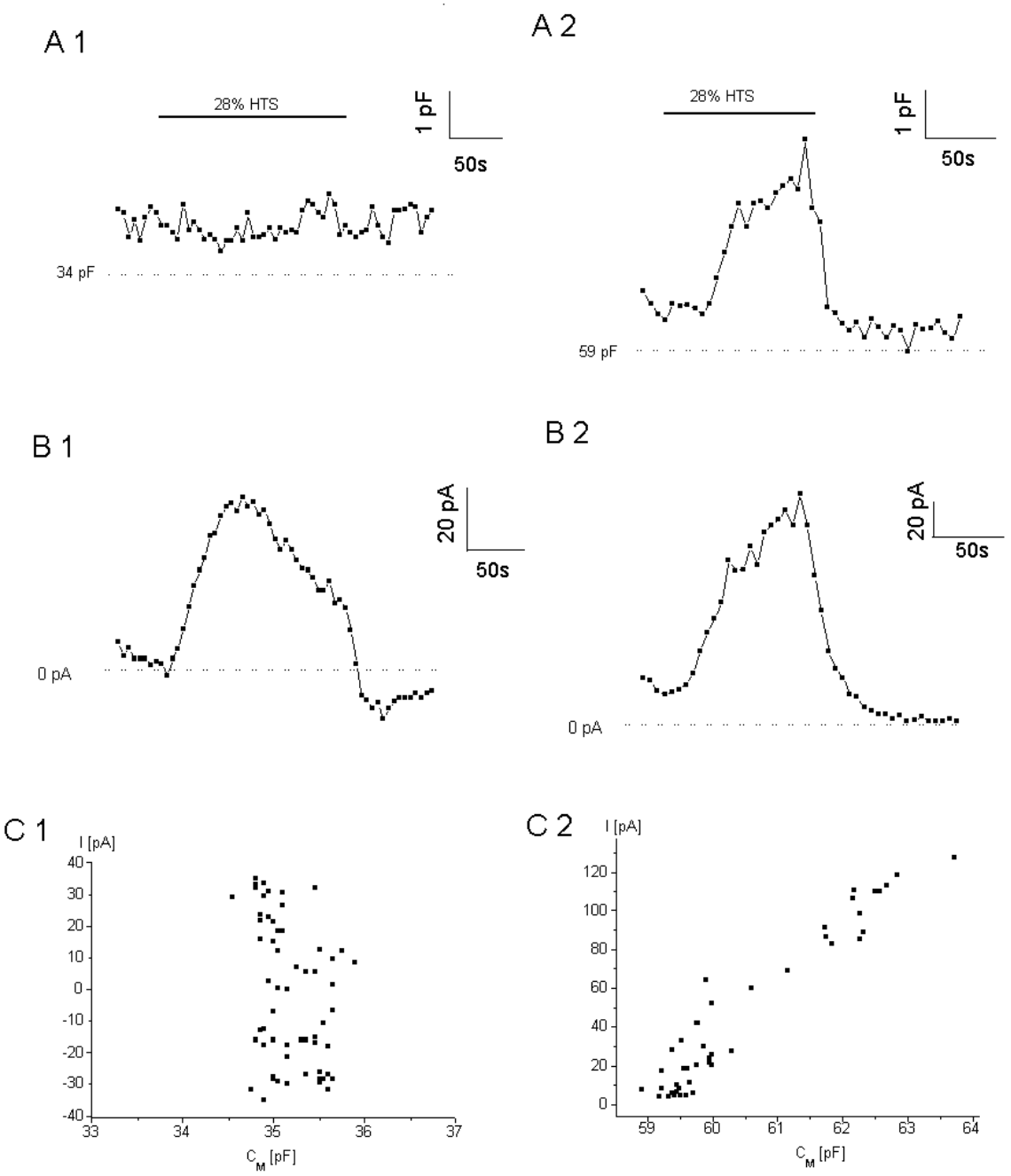

Abbildung 3.1-1: Vergleich der unterscheidlichen Reaktionen auf 28% HTS mit und ohne Veränderung der Membrankapazität am Beispiel zweier Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von 10 folgenden Punkten.(A) zeigt die Stromveränderungen bei +20 mV HP, (B) das Verhalten der Membrankapazität im selben Experiment. In (C) wurde der Strom aus B als Funktion der Kapazität aus A dargestellt.

4.3.2 Der volumenaktivierte Strom korreliert mit den Veränderungen des Zellvolumens

Als Maß für das Zellvolumens wurden die Veränderungen der Zellhöhe gemessen, die durch Lösungen mit einer um 10, 28 und 50% reduzierten Osmolarität induziert worden waren. Die Zellhöhe in isotoner Lösung entspricht einem Wert von 100%.

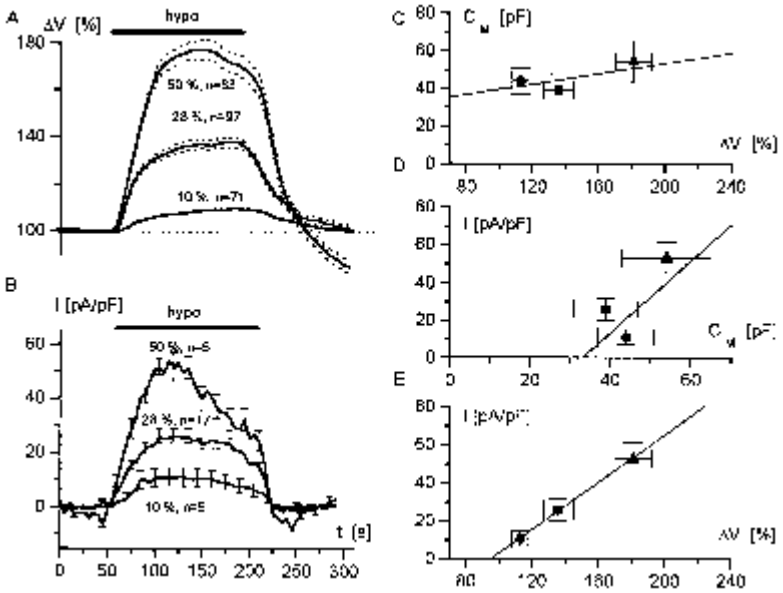

Abbildung 4.4.2: Änderungen in Zellvolumen, Membrankapazität und volumen-aktiviertem Strom an CPAE unter Applikation von 10%, 28% und 50 % HTS.
A : Veränderung des Zellvolumens nach Normalisierung durch die Ausgangswerte unter isotoner Lösung. Darstellung als Mittelwert (durchgehende Linie) ± SEM (gepunktete Linie).
B : Ionenstrom, gemessen bei einem HP von +20 mV unter den selben Osmolaritäten wie in A (Mittelwert ± SEM, Messfrequenz 1 Hz).
C-E : Korrelation zwischen Änderungen in Zellvolumen, volumenaktiviertem Strom und C_M. Die Messungen erfolgten unter 10 (Kreise), 28 (Quadrate) und 50% HTS (Dreiecke). Es besteht eine enge Korrelation zwischen Änderungen im Zellvolumen und volumenaktiviertem Strom. Jedoch korreliert weder C_M mit dem Zellvolumen noch der volumenaktivierte Strom mit C_M .

In parallel dazu durchgeführten Experimenten wurde der volumenaktivierte Strom für die selben Osmolaritäten bei einem HP von +20 mV gemessen. Dieses Haltepotential wurde gewählt, weil es ausreichend weit vom Cl^- - Umkehrpotential entfernt ist um einen hohen Chloridstrom zu induzieren und gleichzeitig eine zuverlässige Ermittlung von C_M zu gestatten. Bei negativeren Potentialen wird der Strom durch die Annäherung an das Cl^- - Umkehrpotential und seine auswärtsgleichrichtende Kinetik geringer, während die hohe Membranleitfähigkeit bei positiveren Potentialen zu einem hohen Fehler bei der Ermittlung von C_M führt.

Das Verhältnis zwischen den gemessenen Parametern Strom, Volumenänderung und Membrankapazität sind in der Abbildung 4.1-2 dargestellt. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen

Volumenänderung und Strom (r= 0,99 ± 0,11 , Mittelwert ± Standartabweichung) . Jedoch korreliert C_M weder mit den Veränderungen des Zellvolumens (r=0,64 ± 0,84) noch mit denen des Stromes (r=0,59 ± 3,83) . Während der Zellschwellung kam es also nicht zwingend zu Veränderungen der Membrankapazität. Es ist jedoch berechtigt, diesen Strom als volumenaktivierten Strom $I_{Cl,\ VOL}$ zu bezeichnen.

4.4.2. Proteinstoffwechsel und volumenaktivierte Chloridströme

Es wurden die Effekte von Brefeldin A (BFA) und Cycloheximid, Modulatoren des Proteinstoffwechsels, auf volumenaktivierte Chloridströme an CPAE - Zellen untersucht.

BFA greift an zwei Stellen in den Proteinstoffwechsel ein: Erstens stoppt es den Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi - Apparat und erhöht gleichzeitig den Rückfluß von Vesikelmaterial in die umgekehrte Richtung unter Substanzverlust des Golgi-Apperates. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Ausbildung von Mikrotubuli zwischen 'transitional elements' genannten und funktionell zwischen ER und Golgi - System lokalisierten Zellkompartimenten. Der Prozeß ist sensitiv für Änderungen der zellulären ATP - Konzentration. Zweitens sind auch dem Golgi-Apparat nachgelagerte Prozesse im Proteinstoffwechsel, darunter vor allem Exozytoseleistungen, blockiert. Der grundlegende Mechanismus aller dieser Veränderungen ist die Inhibierung einer GDT - GTP - Austauschreaktion an einem ARF genannten Protein, wodurch die Ausformung von Vesikeln an deren Donormembran geblockt wird. Die Effekte von BFA am Golgi - System sind reversibel und beeinflussen die originäre Proteinsynthese nicht. (Lippincott-Schwartz et al., 1990; Pelham, 1991; Alberts et al., 1994 , Kap 13, S. 604, 642). Nach Inkubation einer Zelle mit BFA können zytosolisch vorliegende Proteine nicht mehr in die Zellmembran inkorporiert und neue funktionsfähige Proteine nicht mehr gebildet werden. Es wäre daher eine Verringerung des volumenaktivierten Chloridstromes bereits bei der ersten HTS - Applikation zu erwarten.

Es wurde der maximal durch 28% HTS aktivierbare Strom einer Gruppe von Zellen nach 2h Inkubation mit 6 mg/ml BFA mit dem einer Kontrollgruppe von Zellen ohne BFA - Inkubation verglichen. Die Kontrollgruppe wurde 2h mit der gleichen DMSO - Konzentration inkubiert, wie sie in der BFA - Gruppe verwendet wurde. Die beiden Gruppen unterschieden sich damit nur im Zusatz von BFA. Die Inkubation fand in Kulturmedium unter Kulturbedingungen, wie im Abschnitt 'Materialien und Methoden' beschrieben, statt. Nach 2h Inkubation wurden die Zellen im Meßstand installiert. Sämtliche im Meßstand verwendeten Lösungen hatten die gleichen BFA- bzw. DMSO - Konzentration wie das Kulturmedium während der Inkubation.

Der durch HTS induzierte Strom wurde aus der Differenz zwischen Maximalstrom unter HTS und dem Mittelwert des Stromes vor Applikation und nach Auswaschen von HTS errechnet. Dieser Wert wurde als Normalisierung durch die Membrankapazität dividiert. Die Messungen des Membranstroms erfolgten bei einem Haltepotential von -80 mV, um den Einfluß von Kaliumleitfähigkeiten auszuschließen (das entspricht nahezu dem errechneten Umkehrpotential für K^+ von -79,6 mV).

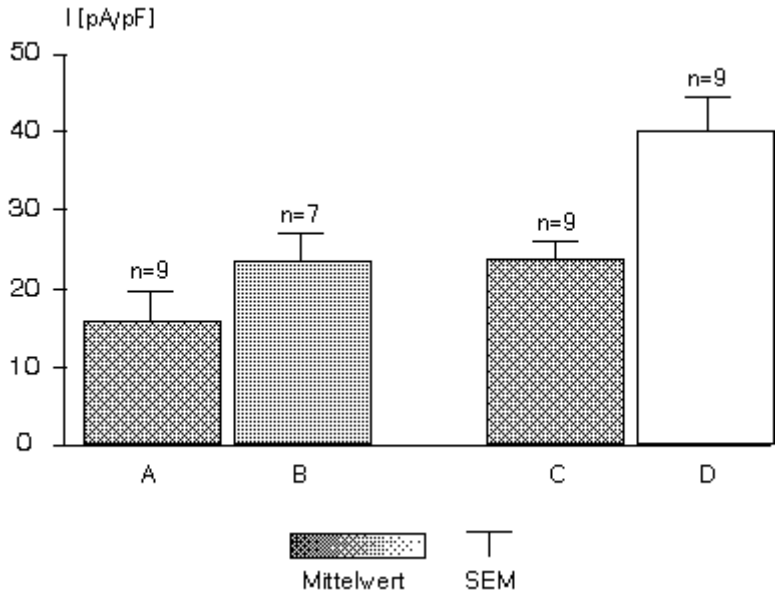

Abbildung 4.4.3: Durch 28% HTS aktivierter Strom unter BFA und Cycloheximid. Die Messung des Stromes erfolgte bei einem Haltepotential von -80mV, danach erfolgte als Normalisierung eine Division durch die Membrankapazität.
A - nach 2 h Inkubation mit 6 mg/ml BFA,
B - DMSO - Kontrollgruppe zu den BFA - Experimenten.
C - nach Inkubation mit Cycloheximid 10 mg/ml,
D - Kontrollgruppe zu den Cycloheximid - Experimenten.

Nach Inkubation mit BFA betrug der volumenaktivierte Strom (Mittelwert ± SEM) 15.2 ± 3,95 pA/pF (n=9) und in der Kontrollgruppe 23,1 ± 3,37 pA/pF (n=7). Damit bestehen zwischen den Mittelwerten beider Gruppen kein signifikanter Unterschied (p=0,1675). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4.3 dargestellt.

Auch bei wiederholter HTS - Applikation war $I_{Cl,VOL}$ weiterhin auslösbar mit einer nur gering niedrigeren Amplitude , ohne Unterschied zu den Kontrollmessungen.

Zur Kontrolle dieses Resultats wurden in weiteren Experimenten CPAE - Zellen mit Cycloheximid inkubiert. Diese Substanz blockiert reversibel die Proteinsynthese durch Hemmung der Transkription in zytosolischen Ribosomen von Eukaryoten durch Block der Peptidbindung nach Ankopplung einer neuen Aminosäure an der tRNA (Alberts et al., 1994 , Kap 6 ,S 240).

Wie in den BFA - Experimenten wurden zwei Gruppen von Zellen gebildet, eine davon wurde mit Cycloheximid 10 mg/ml im Meßstand bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Beginn der Applikation von HTS betrug die mittlere Inkubationszeit 55 min (minimal 20 min, maximal 85 min). Die Messung des Stromes erfolgte bei einem HP von -80 mV, die Errechnung des durch HTS aktivierten Stromes erfolgte wie in den eben beschriebenen Experimenten mit BFA.

Der normalisierte HTS - induzierte Strom betrug (Mittelwert ± SEM) 23,6 ± 2.25 pA/pF in der Cycloheximid - Gruppe und 40,1 +/- 4.08 pA/pF in den Kontrollmessungen. Im unpaaren T-Test ergibt sich eine signifikante Differenz zwischen den Mittelwerten (p=0,00268). Dabei sind jedoch die nicht normalisierten Ströme fast gleich (1601 ± 297,0 pA bzw. 1657 ± 306,9 pA) , erst bei Normalisierung wird die Signifikanzschwelle erreicht. Der Effekt entsteht also durch die unterschiedlichen Zellgrößen: die durchschnittliche Membrankapazität der Zellen in der Cycloheximid - Gruppe ist wesentlich größer als die der Zellen in der Kontrollgruppe (71.7 pF im Vergleich zu 39.6 pF). Die Zeit zwischen Aussäen der Zellen in die Kulturschalen und Durchführung des Experimentes ist zwischen den beiden Gruppen mit 4,1 Tagen (Cycloheximid) bzw. 3,3 Tagen (Kontrolle) nur geringfügig und nicht signifikant unterschiedlich.

5. Diskussion

5.1 Physiologische Bedeutung von Osmolaritätsänderungen für Endothelzellen

Außer Tubuluszellen der Niere sind alle Zellen von Vertebraten in vivo von einem Milieu stabiler Osmolarität (290 mOsm) umgeben. Jedoch müssen vor allem wachsende und proliferierende Zellen oder solche mit sekretorischen Leistungen sich mit Osmolaritätsänderungen auseinandersetzen. Veränderte Konzentrationen von Makromolekülen und Aminosäuren sowie längerfristige Änderungen des MP verursachen Veränderungen der intrazellulären Osmolarität. Weiterhin können lokale Anisotonizitäten extrazellulär nicht ausgeschlossen werden, so z.B. bei mechanischer Verletzung eines Gefäßes. Die möglichen physiologischen Funktionen volumenaktivierter Chloridströme wurden in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich dargestellt. Osmolaritätsveränderungen sind daher für Endothelzellen physiologisch bedeutsam. Wahrscheinlich geht die Bedeutung volumenaktivierter Chloridströme aber über den Rahmen der Osmolaritätsveränderungen hinaus, z.B. bei Scherstreß und anderen Aktivierungen von Endothelzellen unter isotonischen Bedingungen.

5.2 Die Rolle des intrazellulären Kalziums bei der Modulation volumenaktivierter Chloridströme

Aus den Ergebnissen von Nilius et al. (1992) und Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans (1994) wurde bisher geschlossen, daß volumenaktivierte Chloridströme kalziumunabhängig aktiviert werden. Diese Aussage galt für ein $[Ca^{2+}]_i$ von 50 nM und höher (eine ausführliche Darstellung dessen erfolgte bereits in der Einleitung). Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente zeigen, daß intrazelluläres Kalzium zur Aktivierung volumenaktivierter Chloridkanäle notwendig ist. Die Mindestkonzentration ist niedriger als 50 nM. Bei höherem $[Ca^{2+}]_i$ verliert der Strom jedoch seine Sensitivität für intrazelluläres Kalzium. Eine Schwellenkonzentration von $[Ca^{2+}]_i$ ist also zur Aktivierung des Chloridstromes durch HTS nötig, er wird jedoch nicht durch Kalzium moduliert.

Diese Ergebnisse würden vordergründig eine Beteiligung von Calmodulin am Signalweg zur Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ nahe legen; das ist jedoch sehr wahrscheinlich nicht der Fall. Zwar konnte mit den Calmodulin-Antagonisten Tamoxifen und Trifluorparazin (TFP) $I_{Cl,VOL}$ blockiert werden, jedoch bildete sich dieser Effekt schnell und vollständig nach dem Auswaschen zurück. Dies spricht gegen einen Effekt via Calmodulin. Weiterhin blieb nach Inkubation mit KN-62, einem Inhibitor der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ unbeeinflusst (Szücs et al., 1995). Zudem liegen Konzentrationen von unter 50 nM noch unter der Affinität von Calmodulin.

Das Protokoll zur Ladung des BAPTA via Pipette wurde in ähnlicher Form mit EGTA wiederholt. Diese Experimente führten zu genau der gleichen Aussage wie jene mit BAPTA. Gleichzeitig konnte wiederum gezeigt werden, daß eine wesentliche Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ über 50 nM hinaus keine Erhöhung von $I_{Cl,VOL}$ bewirkt. Unspezifische Wirkungen des BAPTA in der Zelle als Ursache des beobachteten Effektes können daher ausgeschlossen werden.

5.3 Einfluß von Chromoglycinsäure auf volumenaktivierte Chloridströme in Endothelzellen

In Mastzellen wurde nach intrazellulär applizierter Chromoglycinsäure (CL) eine Blockierung von Chloridkanälen in der selben Konzentration beobachtet, mit der CL auch die Serotonin - Sekretion hemmt (Reinspecht et al., 1992). Der Chloridkanal - Blocker NPPB zeigte ebenfalls einen blockierenden Effekt auf Chloridkanäle und Mediatorsekretion. NPPB blockiert jedoch auch eine Reihe anderer Leitfähigkeiten.

In den in Kapitel 4.2 dargestellten Experimenten wurde der Effekt extrazellulär applizierten CL's auf ein anderes Chloridkanal - Modell, den volumenaktivierten Chloridstrom in Endothelzellen, untersucht. Auch hier konnte ein blockierender Effekt des CL auf die Chloridleitfähigkeit beobachtet werden.

Der beobachtete Effekt war, verglichen mit dem anderer Blocker dieser Leitfähigkeit wie NPPB, sehr langsam. Bis zur vollständigen Ausbildung des Effektes vergingen etwa 100s. Ein halbmaximaler Block resultierte bei einer Konzentration K_i = 15 mM. Diese liegt wesentlich höher als für die von Reinspecht et al. (1992) dargestellten intrazellulären Effekte an Mastzellen.

Chromoglycinsäure gilt als membranimpermeabel. Es kann daher ausgeschlossen werden, daß eine Permeation des CL nach extrazellulärer Applikation die Ursache für diese Diskrepanz sein kann. Eine indirekte Wirkung über eine Botensubstanz ist wahrscheinlicher.

5.4 Modulation volumenaktivierter Chloridströme durch Phosphorylierung

Der Signalweg zwischen extrazellulärer Applikation von hypotoner Lösung und Aktivierung des Chloridstromes ist noch weitgehend unklar. Folgende Indizien lassen einen intrazellulären Regulationsmechanismus vermuten:

So ist zur Aktivierung und zur Verhinderung des 'run - down' von $I_{Cl,VOL}$ intrazelluläres ATP notwendig (Nilius, Oike, Zahradnik und Droogmans, 1994). Weiterhin existieren Beispiele über die Induktion von Tyrosinphophorylierungen durch hypotone Lösung (Tilly et al., 1993). Es ist ebenfalls bekannt, daß eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) volumenaktivierte Chloridströme modulieren kann (Hardy et al., 1995; Robson und Hunter,1994).

Im Kapitel 4.3 dieser Arbeit wurde der modulierende Effekt von Phosphorylierungsreaktionen und Aktivierung der PKC auf volumenaktivierte Chloridströme in CPAE - Zellen untersucht. In den vorgestellten Experimenten modulierte weder die Aktivierung der PKC durch PMA noch deren Ab - Regulierung mit der gleichen Substanz den volumenaktivierten Chloridstrom. Das entspricht den Resultaten anderer Untersucher, die in nicht transvektierten Zellen keine Veränderung von $I_{Cl,\ VOL}$ nach Modulation der PKC beobachten konnten (Hardy at al., 1995). Nach Überexpression des P - Glykoproteins durch transiente Transfektion mit der korrespondierenden cDNA konnte aber eine solche Modulation beobachtet werden. Allerdings existierte kein Zusammenhang zwischen Expression des P - Glycoproteins und $I_{Cl,\ VOL}$ in Endothelzellen (De Greef et al., 1995). Im Kontrast dazu stehen

Ergebnisse an Zellen des proximalen Tubulus von Rana temporaria, in denen $I_{Cl,VOL}$ durch die PKC modulierbar war (Robson und Hunter, 1994).

Auch die Experimente mit Modulation des Tyrosinkinase - assoziierten Rezeptor - Signalweges mit Wortmannin zeigten keinerlei Einfluß auf $I_{Cl,VOL}$ in CPAE. Die Hypothese über die Einbeziehung der MAP - Kinasen in die Modulation von $I_{Cl,VOL}$ konnte somit nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis wiederspricht scheinbar den Resultaten von Tilly et al. (1993). Dort wurde in der Zellinie 'human intestinal 407' die Triggerung der Tyrosinkinase - Aktivität durch einen hypotonen Schock beschrieben. In deren Folge kam es zu einer Aktivierung der MAP - Kinasen - Phosphorylierungskaskade. Letztlich wurde der Umkehrschluß (Hemmung der MAP - Kinasen bewirkt eine Verringerung von $I_{Cl,VOL}$) jedoch auch durch diese Autoren nicht experimentell belegt.

Die Ursache könnte darin liegen, daß durch HTS eine Aktivierung der MAP - Kinasen und des Chloridstromes erfolgt, beide Vorgänge aber unabhängig voneinander induziert werden.

Eine attraktive Hypothese zum Aktivierungsmechanismus von $I_{Cl,VOL}$ ist eine Funktion von Integrinen als Mechanosensoren, z.B. für eine zunehmende Spannung in der Zellmembran unter Zellschwellung. Integrine sind eine Klasse transmembranärer Proteine, die Moleküle der extrazellulären Matrix am intrazellulären Zytoskelett verankern. Dort binden sie an Talin und a-Aktin. Ihre Funktion ist nicht nur mechanischer Natur, sie dienen auch als Mediatorelemente für Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett und sind an der Ausbildung der Zellform und Zellorientierung beteiligt.

Eine Aktivierung von Integrinen via Matrix führt zu Phosphorylierungsreaktionen an Tyrosinkinasen ähnlich der Funktionsweise von Wachstumsfaktor - Rezeptoren (Alberts et al., 1994, Kap.19, S. 995-999). Die Kenntnisse darüber sind noch gering. So erfolgt als frühzeitiger Schritt eine Aktivierung von p125FAK durch Tyrosin - Autophosphorylierung (Richardson und Parson, 1995). Es gibt Indizien dafür, daß nach Zelladhaesion eine PI-3-Kinase an das aktivierte p125FAK bindet. Wortmannin blockiert irreversibel die PI-3-Kinase. LPA führt zu einer gesteigerten Tyrosin - Phosphorylierung an Isoformen der MAP - Kinasen, aber auch an der fokalen Adhaesionskinase p125FAK unabhängig von der PKC und von intrazellulärem Kalzium (McLees et al., 1995). Der fehlende Einfluß von Wortmannin und LPA auf die Modulation von $I_{Cl,VOL}$ ergibt aber keinen Hinweis auf eine Einbeziehung von Integrinen in den Mechanismus zur Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$.

Der direkte Effekt der verwendeten Substanzen wurde im Rahmen der vorgestellten Experimente nicht untersucht. Eine solche Testung und anschließende Messung via 'patch clamp' wäre jedoch auch nicht möglich gewesen. Es existieren jeweils eine Anzahl von Veröffentlichungen über die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen. LPA aktiviert die p42 - Isoform der MAP-Kinase in Endothelzellen, diese Aktivierung war deutlich reduzierbar durch die Applikation von PMA (McLees et al., 1995). Zudem beeinflusste ein PKC-Inhibitor-Peptit (PKC19-31-Inhibitor) den volumenaktivierten Chloridstrom in CPAE nicht (Daten nicht gezeigt). Wortmannin blockiert die Aktivierung von MAP-Kinasen in Skelettmuskelzellen (Cross et al., 1994). Eine prinzipielle Unwirksamkeit der verwendeten Substanzen in CPAE ist daher sehr unwahrscheinlich (C. de Greef, L. Raymakers; persönliche Mitteilung).

Insgesamt sind Effekte durch Modulation von Tyrosinkinasen experimentell nicht immer sicher auszulösen. So schließen negative Untersuchungsergebnisse ein Vorliegen entsprechender Signalwege nicht völlig aus (Alberts et al., 1994, Kap. 15, S. 733, 770; Nilius und Voets, persönliche Mitteilung).

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen war der Einfluß neu entdeckter Phosphorylierungsreaktionen im Zusammenhang mit der Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP). Dabei wird die Transkription von einer Subklasse von MAP - Kinasen induziert, die sich von den klassischen MAP - Kinasen unterscheiden (Rouse et al., 1994) . Einer der bestuntersuchtesten Vertreter der entsprechenden Proteinkinasen ist HOG1. Dieses Protein ist z.B. für die Adaptierung von Saccharomyces cerevisiae an osmotischen Streß notwendig (Brewster, 1993).

Weder unter chemischem Streß durch 0,3 mM Natriumarsenit noch unter Hitzeeinwirkung von bis zu 45 0C über 60 min konnte eine Veränderung des volumenaktivierten Chloridstromes beobachtet werden. Auch wurde kein Chloridstrom primär durch diese Vorgehensweise induziert.

Die Bildung von HSP auf osmotischen Stress hin wurde bisher noch nicht untersucht. Die Induktion von Hitzeschockproteinen hat somit keinen Einfluss auf die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$. Volumenaktivierte Chloridströme scheinen nicht in die Reaktion auf o.g. Stressoren eingebunden zu sein. Unter osmotischem Stress ist eine Bildung von HSP unabhängig von der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ aber denkbar. Dazu können die hier beschriebenen Experimente jedoch keine Aussage liefern.

Ein direkter Nachweis über die Bildung der HSP in CPAE konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geführt werden. Die Bildung von HSP durch Hitzeinwirkung wurde bei einer großen Reihe von Zelltypen nachgewiesen. In den verwendeten Konzentrationen / Temperaturen werden in Pulmonalarterien - Endothelzellen des Schaafes und in anderen Zelltypen sicher HSP induziert (Wong et al., 1996; Yiu et al, 1993). Die Vorgehensweisen zu ihrer Induktion entsprachen jenen dieser Autoren und Levinson et al. (1980).

Die Hitzeeinwirkung wurde über einen weiten Bereich abgestuft erhöht bis auf Temperaturen und Inkubationsdauern, die die Zellen nahezu sichtbar schädigten. Eine Unwirksamkeit des Vorgehens hinsichtlich Bildung von HSP erscheint daher sehr unwahrscheinlich.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen bleibt zu formulieren, daß kein Hinweis für eine Beteiligung der untersuchten Phosphorylierungsreaktionen und Signalwege an der Modulierung volumenaktivierter Chloridströme in CPAE ergab.

5.5 Zusammenhang zwischen Zellschwellung und Membranstromaktivierung

5.5.1 Modellvorstellungen

Unter der Applikation von HTS kommt es zu einer Veränderung des Zellvolumens. Da die

Zellmembran nicht permeabel für einen Großteil der osmotisch aktiven Substanzen im Zellinneren ist, kann sich der Konzentrationsgradient an diesen Stoffen unter externem hypoosmolarem Milieu nicht ausgleichen. Wasser strömt in die Zelle, deren Volumen erhöht sich. Wie verändert sich dabei die Membran und auf welchem Wege sind Strom und zelluläre Volumenveränderung miteinander verknüpft? Dazu existieren 3 Modellvorstellungen:

1) Das 'Entfaltungsmodell' geht davon aus, daß die Membran keine straff gespannte Umhüllung der Zelle darstellt, sondern 'gefaltet' ist und nicht unter mechanischer Spannung steht. Nach diesem Modell wäre eine Erhöhung des zellulären Volumens bis zu einem bestimmtem Grade durch Entfaltung der Zellmembran möglich.

Als auslösendes Signal für die Aktivierung von Strömen kommt in diesem Modell eine mechanische Dehnung der Membran nicht in Frage. Als Trigger dafür wäre jedoch die Verdünnung von Enzymen, Substraten und Signalstoffen in der Zelle oder die direkte Vermittlung durch Osmosensoren möglich.

2) Im 'Stretchmodell' wird die Membran mechanisch gedehnt und erlaubt nur unter massiver Druckerhöhung eine Volumenzunahme der Zelle. In Zusammenhang mit dieser Modellvorstellung können die in der Membran auftretenden Kräfte als Signal zur Stromaktivierung diskutiert werden. Da schon bei geringen Osmolaritätsänderungen Stromaktivierungen auftreten, müßte bei den zum Teil sehr großen Volumenänderungen ein sehr hoher Druck wirken. Jedoch zeigten eine große Zahl von Experimenten keinerlei Beeinträchtigung der Membranintegrität (stabil niedriges $[Ca^{2+}]_i$, stabiler 'seal').

3) Das 'Vesikelmodell' geht von der Vorstellung aus, daß unter dem hypotonen Stimulus Chloridkanal - Proteine (eventuell in Vesikeln eingehüllt) via Exozytose in die Membran eingebaut und so die Proteine in die Membran inkorporiert werden.

Ein Indiz für diese Vorstellung sind die Ergebnisse mit Überexpressions - Experimenten von $I_{Cl,N}$ (Paulmichl et al., 1992). Dieses Molekül liegt zu 70% zytosolisch vor und steht in ursächlichem Zusammenhang mit der Aktivierung von Strömen sehr ähnlicher Charakteristik wie die volumenaktivierter Chloridströme (Paulmichl et al., 1993; Krapivinsky et al., 1993). Diese Thematik wurde in der Einleitung ausführlicher dargestellt.

Messungen von Einzelkanal - Strömen und Rauschanalysen von Membranströmen an C6 - Gliom - Zellen ließen ein Modell für die Natur des Kanalproteins ähnlich dem einer Ionophore vorschlagen. Grund dazu war die Beobachtung, daß bei Aktivierung des volumenaktivierten Stromes nicht die Öffnungswahrscheinlichkeit der in der Membran vorhandenen Kanäle steigt. Statt dessen wird davon ausgegangen, daß die Kanäle nur in den Zuständen 'ständig offen' und 'ständig geschlossen' vorliegen. Eine Stromaktivierung käme dann durch Zunahme von Kanälen im Zustand 'ständig offen' in der Membran zu Stande. Die Inkorporation eines überwiegend zytosolisch lokalisierten Kanalproteins in die Membran bei Aktivierung des Stromes wäre eine attraktive Hypothese dazu (Hoffmann und Dunham, 1995).

5.5.2 Veränderungen der Membrankapazität unter hypotoner Lösung

Es wurden im Kapitel 4.4 dieser Arbeit Änderungen der Membrankapazität (C_M) als Ausdruck der zellulären Volumenerhöhung unter HTS registriert. Die Stromaktivierung und -deaktivierung wurde durch laufende Messung bei einem HP = +20 mV verfolgt und parallel zur Membrankapazität registriert.

Unter 10 % HTS zeigte keine Zelle Veränderungen von C_M über das dem Meßsystem eigene Rauschen hinaus. Allerdings wurde auch kein bis ein nur sehr geringer Strom aktiviert.

Unter 28 und 50% HTS konnten die Zellen hinsichtlich der beobachteten Veränderungen von C_M in zwei Gruppen eingeteilt werden. In einigen Fällen wurde eine Zunahme von C_M registriert, in anderen erfolgte trotz deutlicher Stromaktivierung keine Änderung von C_M. War jedoch eine Erhöhung der Membrankapazität sichtbar, so erfolgte erst die Strom- und folgend die Kapazitätsänderung.

Die Meßwerte zu Veränderungen der Zellhöhe als Maß für die Veränderung des Zellvolumens zeigen dagegen in allen Zellen schon bei 10 % HTS Vergrößerungen, bei 28% HTS um fast ein Drittel der Ausgangshöhe.

Es besteht somit eine enge Korrelation zwischen Veränderungen des Zellvolumens und des Stromes. Aber weder die Veränderungen des Zellvolumens noch der volumenaktivierte Chloridstrom korrelieren mit der Veränderung der Membrankapazität. Die Inkorporation von Vesikeln oder von Kanalproteinen während der Volumenänderung unter HTS ist daher unwahrscheinlich. Diese Resultate an Endothelzellen entsprechen jenen an Jurkat - T - Lymphozyten (Ross et al., 1994) und an Hepatozyten der Ratte (Graf et al., 1995).

Die Kanaldichte liegt bei einer Einzelkanalleitfähigkeit von 1-2 pS bei 10-60 Kanälen µm- 2. Bei einer Zelloberfläche von etwa 5000 μm^2 entspräche das 50.000 bis 300.000 inkorporierten Kanälen pro Zelle (Nilius et al., 1996). Legt man z.B. die Größe präsynaptisch gebildeter sekretorischer Vesikel für Azetylcholin von d=50 nm zu Grunde (27, Kap. 13, S.631), müßte sich die Zelloberfläche um bis 393 - 2358 μm^2 vergrößern. Das entspricht einer Oberflächen- und damit Kapazitätszunahme von 0,8 - 4,7%. Die bei einigen Zellen beobachtete Zunahme der Membrankapazität liegt damit im theoretisch möglichen Bereich. Das verwendete Meßsystem ist empfindlich genug, um die rechnerisch mögliche Kapazitätszunahme zu detektieren.

Die Zunahme von CM bei einigen Experimenten zeigt, daß die Veränderung von C_M nicht der primäre Trigger für die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ ist. Denn zuerst wurde der Strom aktiviert und folgend kam es zu einer Zunahme von C_M. Es kann jedoch allein durch diese Resultate nicht ausgeschlossen werden, daß nach einer Aktivierung von bereits in der Membran vorhandenen Kanälen eine zusätzliche Inkorporation von Kanalproteinen erfolgt.

5.5.3 Einfluß der Proteinsynthese auf volumenaktivierte Chloridströme

Zur Untersuchung dessen wurden die Zellen mit Brefeldin A (BFA) inkubiert und der volumenaktivierte

Strom mit dem einer Kontrollgruppe verglichen. Die Mittelwerte des durch HTS induzierten Stromes von der BFA - Gruppe und der Kontrollgruppe waren nicht signifikant unterschiedlich.

Weitere Experimente unter Beeinflussung der Proteinsynthese wurde mit Cycloheximid durchgeführt. Dieser Stoff blockiert reversibel die Proteinsynthese durch Hemmung der Transkription in zytosolisch lokalisierten Ribosomen von Eukaryoten durch Block der Peptidbindung nach Ankopplung einer neuen Aminosäure an der tRNA (Alberts et al., 1994 , Kap 6, S 240).

Nach Inkubation mit 10 mg/ml Cycloheximid war der HTS-induzierte Chloridstrom signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Dies trifft jedoch nur auf die normalisierten Meßwerte, das heißt nach Division der Meßwerte durch die Membrankapazität zu. Die nicht normalisierten Ströme sind nahezu gleich (Durchschnitt ± SEM : 1601 ± 297,0 pA bzw. 1657 ± 306,9). Die Signifikanzschwelle wird erst bei Normalisierung erreicht. Die durchschnittliche Membrankapazität der Zellen, die mit Cycloheximid inkubiert wurden, war nahezu doppelt so groß als die der Kontrollmessungen. Der Effekt kommt also nur durch unterschiedliche Membrankapazitäten zustande.

Zwar wurde von einigen Autoren unter Cycloheximid eine Zunahme der Zellgröße bechrieben, jedoch trat dieser Effekt erst nach Tagen auf. Als Ursache dafür werden ein Einfluß auf die Apoptosis durch verminderte Synthese von Regulatorproteinen genannt (Fabio et al,, 1994). Bei der vergleichsweisen kurzen Inkubationszeit mit Cycloheximid in meinen Experimenten ist die unterschiedliche Zellgröße damit jedoch nicht erklärbar.

Die durchschnittliche Zeit, zu der die Zellen nach dem Aussäen gemessen wurden, ist mit 4.1 (Cycloheximid) bzw. 3.3 Tagen (Kontrolle) nur geringfügig und nicht signifikant unterschiedlich. Als Erklärung bleibt lediglich eine subjektive unterschiedliche Auswahl der Zellen im Experiment.

Zusammengefasst reduziert rein statistisch betrachtet Cycloheximid den volumenaktivierten Chloridstrom in CPAE. Brefeldin A hat keinen signifikanten Effekt auf $I_{Cl,Vol}$.

Solche einschneidenden Eingriffe in den Proteinstoffwechsel und die Fusion von Membranvesikeln würden bei Annahme des Inkorporierungsmodells nicht nur schwach signifikante, sondern dramatische Veränderungen von $I_{Cl,VOL}$ erwarten lassen. Diese blieben jedoch aus. Eindeutigere Ergebnisse würden Experimente erwarten lassen, in denen an einer Zelle Kontrollmessungen und Messungen unter Applikation von BFA erfolgen. Ein solches Vorgehen dauert jedoch wesentlich länger, als eine Zelle ohne Beeinträchtigung der Membranintegrität toleriert. Lediglich eine Tonizitätsänderung vor dem Start der Experimente in Verbindung mit einem sehr langsamen Abbau der Kanalmoleküle ließe die vorgestellten Ergebnisse dann noch erwarten. Doch waren die Zellen keinerlei hypoosmolarer Lösung vor den Experimenten ausgesetzt. Die Aktivierung wie die in den meisten Fällen fast exakt auf das Ausgangsniveau mündende Deaktivierung des Membranstromes erfolgten darüber hinaus im Zeitraum weniger Minuten, entsprechend schnell müßten Inkorporation und Inaktivierung vor sich gehen.

Bei wiederholter Applikation von HTS war bis auf eine geringe Verminderung von Applikation zu Applikation keine Veränderung der Stromantwort sichtbar. Diese unterschied sich nicht im Vergleich zu

Messungen unter Kontrollbedingungen. Wenn ein Teil der Kanalproteine bereits vor Applikation hypotoner Lösung inkorporiert wäre, so müßte unter BFA oder Cycloheximid zumindest bei repetitiver HTS - Applikation eine deutliche Abnahme von $I_{Cl,VOL}$ zu beobachten sein. Das war keineswegs der Fall.

Eine unspezifische Schädigung der Zellen unter Cycloheximid ist daher wesentlich wahrscheinlicher die Ursache des beobachteten Effektes. Die Konzentrations-abnahme eines hypothetischen Regulatorproteins kann als Ursache der Verminderung von $I_{Cl,Vol}$ unter Cycloheximid allerdings nicht ausgeschlossen werden.

5.5.4 Zuordnung der Ergebnisse zu den Modellvorstellungen

Zur Diskussion der 3 Modelle zum Zusammenhang zwischen Zellschwellung und Stromaktivierung - Stretch, Auffaltung und Vesikelinkorporation - ist daher folgendes zu bemerken:

Die Zellen schwellen unter HTS in hohem Maße an. Die Aktivierung der Chloridleitfähigkeit und eine Änderung von C_M sind nicht aneinander geknüpft. Eine Reihe von Zellen können Anschwellen und gleichzeitig eine Chloridleitfähigkeit aktivieren, ohne Veränderungen von C_M zu zeigen. Eine Inkubation mit Cycloheximid oder Brefeldin A führt nicht zu erwarteten Veränderungen des volumenaktivierten Chloridstromes. Daher ist das Modell 3 unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer soeben erschienen Arbeit, in der an Hepatozyten eine Aktivierung HTS - induzierter Kalium- und Chloridleitfähigkeiten ohne Änderungen der Membrankapazität gezeigt werden konnte (Graf at al., 1995). Auch diese Autoren lehnen das Inkorporationsmodell ab. Da im Zeitverlauf der Aktivierung und Deaktivierung nach Inkubation mit BFA und Cycloheximid keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten bestand, ist auch eine zusätzliche Inkorporation von Kanalproteinen nach der Aktivierung von bereits in der Membran vorhandenen Kanälen unwahrscheinlich.

Da in einer Reihe von Zellen unter deutlicher Stromaktivierung keine Zunahme der Membrankapazität beobachtet werden konnte, erscheint das 'Auffaltungsmodell' am Mechanismus für die Zellschwellung unter HTS beteiligt zu sein.

In Experimenten zur Rolle des Zytoskeletts bei der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ konnten in Endothelzellen keine Effekte nach Alterierung von intrazellulären Filamenten auf $I_{Cl,VOL}$ beobachtet werden (Oike et al., 1994). Auch die Phosphorylierung der fokalen Adhaesionskinase p125FAK durch LPA und die Inhibierung der in der Signalkette folgenden PI-3-Kinase durch Wortmannin im Rahmen zeigten, wie in dieser Arbeit dargestellt, keinen Einfluß auf $I_{Cl,VOL}$. In einer Reihe von anderen Zellen konnte jedoch $I_{Cl,VOL}$ nach Manipulationen am Zytoskelett moduliert werden (Schwiebert et al., 1994; Hug et al., 1995). Diese Thematik wurde bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt. Insgesamt scheint dem Zytoskelett keine zentrale Rolle bei der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ zuzukommen. Das 'Strechmodell' ist damit sicher nicht der zentrale Triggermechanismus.

Die Tatsache, daß volumenaktivierte Ströme auch durch positiven Druck auf die Pipette ausgelöst

werden können und die doch ebenfalls vorhandenen Beobachtungen von Kapazitätserhöhungen unter HTS in einigen Zellen lassen den Schluß zu, daß es sich insgesamt um eine Kombination aus Auffaltung und, wenn auch mit geringerem Gewicht, Stretch handelt.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Modulation volumenaktivierte Chloridströme $I_{Cl,VOL}$ und der Signalweg zu ihrer Aktivierung untersucht. Dazu wurden in Endothelzellen aus der Pulmonalarterie des Rindes (CPAE) die Membranströme unter Anwendung der 'patch clamp' - Technik und simultan dazu die Konzentration des freien intrazellulären Kalziums $[Ca^{2+}]_i$ gemessen.

1. Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ kalziumunabhängig erfolgt. In dieser Arbeit wurde $I_{Cl,VOL}$ unter Pufferung des $[Ca^{2+}]_i$ mit BAPTA und EGTA gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß freies intrazelluläres Kalzium in Konzentrationen niedriger als 50 nM zur Stromaktivierung notwendig ist. Bei einer höheren Konzentration verliert der Strom jedoch seine Kalziumabhängigkeit.

Für die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ ist also eine permissive Konzentration intrazellulären Kalziums notwendig, der Strom wird jedoch nicht durch $[Ca^{2+}]_i$ moduliert. Eine Rolle von Calmodulin bei der Aktivierung des Stroms ist sehr unwahrscheinlich, da ein $[Ca^{2+}]_i$ von kleiner als 50 nM dafür zu gering ist.

2. Es wurde der Effekt von Chromoglycinsäure (CL) auf $I_{Cl,VOL}$ untersucht. CL blockiert $I_{Cl,VOL}$ in Endothelzellen. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zu dem klassischen Chloridkanalblocker NPPB geringer (K_i=15mM) und sehr langsam (im Mittel 100 s). Damit sind die blockierenden Eigenschaften auch geringer ausgeprägt als z.B. auf $I_{Cl,Vol}$ und Hemmung der Serotoninsekretion in Mastzellen.

3. Weiterhin war die Rolle von durch Proteinphosphorylierung modulierten intrazellulären Signalwegen bei der Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ Gegenstand von Experimenten. Dazu wurde der Einfluß verschiedener in solche Reaktionen eingreifenden Substanzen untersucht.

Weder die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch direkte Applikation des Phorbolesters PMA noch deren Ab - Regulation durch 24-stündige Inkubation mit PMA hatten Einfluß auf die Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$. Auch Wortmannin, ein Inhibitor sowohl der MAP - Kinasen (und damit des Tyrosinkinase - assoziierten Rezeptor - Signalweges) als auch der PI3 - Kinase, zeigte keinen Effekt auf $I_{Cl,VOL}$. Der Aktivator der MAP - Kinasen und der fokalen Adhaesionskinase p125FAK , die Substanz Lysophosphatsäure (LPA), zeigte weder einen Effekt auf $I_{Cl,Vol}$, noch konnte damit ein Chloridstrom induziert werden.

Es wurde auch der Einfluß von Hitzeschockproteinen (HSP) auf $I_{Cl,VOL}$ untersucht. Die Induktion von HSP wird über eine neu entdeckte Subklasse von MAP - Kinasen signalvermittelt, deren bestuntersuchtester Vertreter HOG1 in saccharomyces cerevisiae für die Adaptierung an osmotischen Streß notwendig ist. Die Applizierung von thermischem und chemischem Streß durch Inkubation bei bis zu 45 °C über 60 min und Einwirkung von 0,3 mM Natriumarsenit zeigte keinerlei Einfluß auf $I_{Cl,Vol}$. Es konnte auch keine Aktivierung eines Chloridstromes beobachtet werden.

Insgesamt ergab sich für keinen der untersuchten durch Proteinphosphorylierung gesteuerten Signalwege ein modulatorischer Einfluß auf $I_{Cl,VOL}$.

4. Zur Untersuchung des Aktivierungsmechanismus von $I_{Cl,VOL}$ dienten Experimente unter gleichzeitiger Messung von volumenaktiviertem Strom und Änderung der Membrankapazität (C_M). Zusätzlich (jedoch zeitlich unabhängig voneinander) erfolgten Messungen der Zellhöhe. Die Ergebnisse wurden an Hand dreier Modellvorstellungen zur Aktivierung von $I_{Cl,VOL}$ diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, daß eine enge Korrelation zwischen Veränderungen der Zellhöhe und des aktivierten Stromes besteht. Beide korrelieren jedoch nicht mit den Änderungen von C_M. Dabei zeigten sich zwei Reaktionstypen. Bei einem Teil der Zellen änderte sich C_M praktisch nicht, d.h. geringer als 2% des Ausgangswertes vor Applikation hypotoner Lösung (n=17), bei den verbliebenen Teil zeigten sich deutliche Veränderungen von durchschnittlich 10,6 ± 0,9 % (± SEM, n=5). In letzterem Fall änderte sich jedoch immer zuerst $I_{Cl,Vol}$, und dann C_M. Nach Inhibierung des intrazellulären Vesikeltransports durch Brefeldin A war $I_{Cl,Vol}$ weiterhin und ohne signifikante Änderungen auslösbar. Unter Cycloheximid, einem Blocker der Proteinsynthese auf Transkribtionssebene, wurden keine spezifischen Veränderungen von $I_{Cl,VOL}$ beobachtet.

Bei Applikation von hypotoner Lösung erhöht sich also das Zellvolumen, nicht immer aber auch die

Membrankapazität. Auf jeden Fall ist C_M nicht der primäre Trigger für $I_{Cl,VOL}$. Die Aktivierung von volumeninduzierten Chloridströmen erfolgt nicht maßgeblich durch die Inkorporierung von Ionenkanal - Proteinen enthaltenden Membranvesikeln.

7. Literaturverzeichnis

Ackermann MJ, Krapivinsky GB, Gordon EA, Krapivinsky LD, Clapham DC (1994). Characterisation of a native swelling induced chloride current, I-Cl.swell, and its regulatory protein, pI(Cln), in Xenopus oocytes. Japanese Journal of Physiology *44:* S17-S24

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New York.

Anderson J W, Jirsch J D, Fedida D (1995). Cation regulation of anion current activated by cell swellign in two types of human epithelial cancer cells. Journal of Physiology (London) *483*: 549-557.

Arkaro A, Wymann M P (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3 kinase - inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5 -triphosphate in neutrophil responses. Biochemical Journal *296: 297-301.*

Arreola J, Melvin J E, Begenisich T (1995). Volume activated chloride channels in rat parotid acinar cells. Journal of Physiology (London) *484: 677-687.*

Banderali U, Roy G (1992). Anion channels for aminoacids in MDCK cells. American Journal of Physiology *263: C1200-1207.*

Block ML, Moody WJ (1990). A voltage dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. Science *247: 1090-1092*

Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC, (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science *259:1760-1763*.

Christensen O, Hoffmann EK (1992). Cell swelling activates K^+ and Cl^- channels as well as non-selective stretch-activated cation channels in Ehrlich ascites tumor cells. Journal of Membrane Biology *129: 13-36*

Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J (1992). Rapamycin FKBP specifically blocks growth - dependent activation of ansd signalling by the 70 kd S6 protein kinases. Cell *69: 1227 - 1236.*

Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F (1993). RapV12 - antagonizes Ras - dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in rat -1-fibroblasts.
EMBO Journal *12: 3475 - 3584*

Coulombe A, Coraboeuf E (1992). Large conductance chloride channels of newborn rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media.
Pflügers Archiv - European Journal of Physiology *422: 143-150*

Cross DAE, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P (1994). The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insuline-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between RAS and RAF. Biochemical Journal *303: 21-26.*

Defilippi P, Bozzo C, Volpe G, Romano G, Venturino M, Silengo L, Tarone G (1994). Integrin-mediated signal transduction in human endothelial cells: analysis of tyrosine phosphorylation events. Cell-Adhes-Commun. *1994 Apr; 2(1): 75-86*

De Greef C, Sehrer J, Viana F, Van Acker K, Eggermont J, Mertens L, Raeymaekers L, Droogmans G, Nilius B (1995). Volume-activated chloride currents are not correlated with P-glycoprotein expression. Biochem. J. *307: 713-718*

De Smet P, Oike M, Droogmans G, Van Driesche W, Nilius B (1994). Responses of endothelial cells to hypotonic solutions: lack of regulatory volume decrease. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *428: 94-96*

Deutsch C, Lee S C (1988). Cell volume regulation in lymphocytes. Renal Physiology and Biochemistry *3-5: 260-276.*

Deutsch C, Chen LQ (1993). Heterologous expression of specific K+-channels in T-lymphozytes - functional consequences for volume regulation. Proc Nat Acad Sci USA *90, 10036-10040*

Dinudom A, Young JA, Cook DI (1993). Na^+ and Cl^- - conductances are controlled by cytosolic Cl^- concentration in the intralobular duct cells of mouse mandibular glands. Journal of Membrane Biology *135: 289-295.*

Doroschenko P (1991). Second messenger mediating of chloride current by intrazellular GTPgS in bovine chromaffin cells. Journal of Physiology (London) *436: 725-738.*

Doroschenko P,Neher E (1991). Volume-sensitive chloride conductance in bovine chromaffin cell membrane. Journal of Physiology (London) *449: 197-218.*

Doroschenko P, Penner R, Neher E (1991). A novel chloride conductance in the membrane of bovine chromaffin cells activated by intrazellular GTPgS. Journal of Physiology (London) *436: 711-724.*

Doroschenko P, Neher E (1992). Volume sensitive conductance in bovine chromaffin cell membrane. Journal of Physiology (London) *449: 197-218.*

Dubois J M, Rouzaire-Dubois B (1993). Role of potassium channels in mitogenesis. Prog. Biophys. Mol. Biol. *59: 1-21.*

Fabio R, Zanetti A, Sironi M, Poletarutti N, Lanfrancone L, Dejana E, Colotta F (1994). Inhibition of anchorage-dependent cell speading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. The Journal of Cell Biology *127: 537-546.*

Ferby I M, Waga I, Sakanaka C, Kume K, Shimizu T (1994). Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation induced by platelet-activating factor in guinea pig neutrophils. Journal of Biological Chemistry *269: 30485-30488.*

Forth W, Henschler D, Rummel W (1990). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag; Mannheim, Wien, Zürich.

Fuller CM, Ismailow I I, Keeton A, Benos DJ (1994). Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca2+/calmodulin - dependent protein kinase II. Journal of Biological Chemistry *269: 26642-26650.*

Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu I-H, Davis RJ (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammilian cells. Science *265: 806-808.*

Garnier M, Mesange F, Dupont MA, Gas N, Zanibellato C, Bayard F, Faye JC (1993). Ligands of the antiestrogen binding site block endothelial cell proliferation reversibly. Experimental Cell Research *205: 191-194*

Graf J, Rupnik M, Zupancic G, Zorek R (1995). Osmotic swelling of hepatocytes increases membrane conductance but not membrane capacitance. Biophysical Journal *68: 1359-1363.*

Grynkiewics G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. Journal of Biological Chemistry *260: 3440-3450.*

Hamill OP, Marty A, Neher E,Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *391: 85-100.*

Hardy S P, Goodfellow HR, Valverde MA, Gill DR, Sepulveda FV, Higgins CF (1995). Protein kinase C - mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoproteine regulates cell volume activated chloride channels. EMBO-Journal *14: 68-75.*

Hoffmann EK, Dunham PB (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. International Review of Cytology *161: 173-262.*

Hug T, Ecke T, Koslowsky D, Greger R, Kunzelmann K (1995). Actin dependent activation of ion conductances in bronchial epithelial cells.
Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *429: 682-690*

Ho MWY, Duszyk M, French AS (1994). Evidence that channels below 1 pS cause the volume-sensitive chloride conductance in T84 cells. Biochimica Biophysica Acta *1191: 151-156*

Jackson P S, Strange K (1993). Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. American Journal of physiology *265: C1489-1500.*

Jackson P S, Morrison R, Strange K (1994). The volume sensitive organic osmolyte channel VSOAC is regulated by non-hydrolytic ATP-bonding. American Journal of Physiology *264: C 1203-C1209.*

Jackson P S, Strange K (1995). Single channel properties of a volume-sensitive anion conductance. Current activation occurs by abrupt switching of closed channels to an open state. Journal of General Physiology *105: 643-660.*

Jalonen T (1993). Single channel characteristics of the large conductance anion channel in rat cortical astrocytes primary culture. Glia 9: *227-237*

Jentsch Th J (1993). Chloride channels. Current Opinions in Neurobiology *3: 316-321.*

June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T - cell - receptor - mediated signal transduction. Procedings of National Academy of Science of the USA *87: 7722-7726.*

Kanaï F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y (1993). Insulin stimulated Glut4 translocation is relavant to the phosphopyrlation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. Biochemical Biophysical Research Communication *195: 762-768.*

Kelly MEM, Dixon SJ, Sims SM (1994). Outwardly rectifying chloride current in rabbit osteoclasts is activated by hypoosmotic stimulation. Journal of Physiology (London) *475: 377-389*

Kirk J, Kirk K (1994). Inhibition of volume-activated I- and taurine efflux from HeLa cells by P-Glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. Journal of Biological Chemistry *269: 29389-29394*

Krapivinsky GB, Ackermann MJ, Gordon EA,Krapivinsky LD, Clapham DE (1994). Molecular Charakterisation of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell 76: 439-48*

Kunzelmann K, Kubitz R, Krolik M, Wart R, Greger R (1992). Small conductance chlorid channels in HT29 cells: activation by Ca2+, hypotonic cell swelling and 8-Br-cGMP. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *421: 238-246*

Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan, WM, Blenis J, Crabtree GR (1992). Rapamycin selectivly inhibits interleukin -2 activation of p70 S6 kinase. Nature *358: 70-73.*

Lehtonen J Y A, Kinnunen P J (1995). Phospholipase A as a mechanosensor. Biophysical Journal *68: 1888-1894.*

Levinson W, Oppermann H, Jackson J (1980). Transition series metals and sulfohydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eucaryotic cells. Biochimica et Biophysica Acta *606: 170-180.*

Lewis R S, Ross P E, Cahalan M D (1993). Chloride channels activated by osmotic stress in T-Lymphocytes. Journal of General Physiology *101: 801-826*

Lippincott-Schwartz J, Donaldson J G, Schweizer A, Bergner E G, Hauri H P, Yuan L C, Klausner R D (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of Brefeldin A suggests an ER recycling pathway. Cell *60: 821-836.*

Livne A, Hoffmann E K (1990). Cytoplasic acidification an activation of Na^+ - H^+ -exchange during regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumour cells. Journal of Membrane Biology *114: 153-157*.

Manolopoulos GV, Prenen J, Droogmans G, Nilius B (1997). Thrombin potentiates volume-activated chloride currents in pulmonary artery endothelial cells.
Pflügers Archiv - European Journal of Physiology *433: 845-847*

Matthews G, Neher E, Penner R (1989). Chloride conductance activated by external agonists and internal messengers in rat peritoneal mast cells. Journal of Physiology (London) *418: 131-144.*

McLees A, Graham A, Malarkey K, Gould D W, Plevin R (1995). Regulation of Lysophosphatidic acid stimulated tyrosine phosphorylation of mitogen - activated protein kinase by protein-kinase-C and pertussis-toxin dependent pathways in the endothelial cell line EAhy 926.
Biochemical Journal *307: 743-748.*

McManus M L, Churchwell KB, Strange K (1995). Regulation of cell volume in health and disease. New England Journal of Medicine *333: 1260-1266*

Neher E (1989). Combined Fura-2 and patch clamp measurements in rat peritoneal mast cells. In 'Neuromuskular Junction', eds. Sellin LC, Libelius R, Thesleff S, Elsvier Science Publishers, Amsterdam, S 65-76.

Newby AC, Henderson AH (1990). Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. Annu-Rev-Physiol *52: 661-674.*

Nilius B, Schwartz G, Oike M, Droogmans G (1992). Histamine-activated, non-selective cation currents and $Ca2^{+}$ - transients in endothelial cells from human umbilical vein. Pfluegers Archiv - European Journal of Physioly *424: 285-293*

Nilius B , Sehrer J, Viana F, De Greef C, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G (1994). Volume - activated Cl- currents in different mammilian non-excitable cell types; Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *428: 364-371*

Nilius B, Sehrer J, Droogmans G (1994). Permeation Properties and modulation of volume-activated Cl- - currents in human endothelial cells. British Journal of Pharmacoly *112:1049-1056*

Nilius B, Oike M, Zahradnik I, Droogmans G (1994). Activation of a Cl^{-} -current by hypotonic volume increase in human endothelial cells. Journal of General Physiology *103: 787-805*

Nilius B, Droogmans G (1994). A role for K+ - channels in cell proliferation. NIPS *9: 105-110.*

Nilius B, Gerke V, Prenen J, Szücs G, Heinke S, Weber K, Droogmans G (1996). Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry *271 : 30631-30636.*

Nilius B, Eggermont J, Voets T, Droogmans G (1996). Volume activated Cl- - channels. Gen Pharmacol 1996; *27: 67-77*

Nilius B, Prenen J, Szücs G, Wei L, Tanzi F, Voets T, Droogmans G (1997). Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. Journal of Physiology *498.2: 381-396.*

Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, Viana F, Voets T, Droogmans G (1997). Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of $Ca2^{+}$ - and volume-activated Cl- channels in macrovascular endothelial cells. British Journal of Pharmacology *121, 547-555.*

Nilius B, Szücs G, Heinke S, Voets T, Droogmans G (1997). Multiple types of chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. Journal of Vascular Research; im Druck.

Oike M,Schwarz G, Sehrer J, Jost M, Gerke V, Weber K, Droogmans G, Nilius B (1994). Cytoskeletal modulation of the response to mechanical stimulation in human vascular endothelial cells. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *428: 569-576.*

Oike M, Droogmans G, Nilius B (1994). Volume dependent chloride currents are dependent of intracellulare ATP. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology *427: 184-186.*

O'Neil WC, Klein JD (1992). Regulation of vascular endothelial cell volume by Na+ -K+ - 2Cl- - cotransport. American Journal of Physioly *264, C136-C145*

Parker JC (1993). In defense of cell volume? American Journal of Physioloy *265: C1191-C1200*

Paulmichl M, Li Y, Wickman K,Ackermann M, Peralta E, Clapham D (1992). New mammilian chloride channel identified by expression cloning. Nature *356: 238-241.*

Paulmichl M, Gschwentner M, Woll E, Schmarda A, Ritter M, Kanin G, Ellemunter H, Waitz W, Deetjen P (1993) . Insigth into the structure-function relation of chloride channels . Cell Physiology and Biochemistry *3: 374-387*

Pelham H (1991). Multiple targets for Brefeldin A. Cell *67:449-451.*

Popp R, Gögelein H (1992). A calcium and ATP sensitive nonselective cation channel in the antiluminal membrane of rat cerebral capillary cells.Biochimia et Biophysica Acta *1108: 59-66*

Price, DJ, Grove, JR, Calvo, V, Avruch, J, Bierer, BE (1992). Rapamycin - induced inhibition of the 70 kd S6 protein kinase. Science *257: 973 - 976*.

Pusch M, Jentsch Th J (1994). Molecular Physiology of voltage-gated chloride channels. Physiological Reviews *74, 813-827*

Reinspecht M, Pecht I, Schindler H, Romanin C (1992). Potent block of chloride channels by antiallergic drugs. Biochemistry and Biophysics Research Communication *188: 957*

Richardson A, Pearson JT, (1995). Signal transduction trough integrins: a central role for focal adhaesion kinase?. BioEssays *17: 229-236*.

Robson L, Hunter M (1994). Role of cell volume and protein kinase C in regulation of a Cl-conductance in single proximale tubule cells of Rana temporaria. Journal of Physiology (London) *480: 1-7*.

Romanin C, Reinspecht M, Pecht I, Schindler H (1991). Immunologically activated chloride channels involved in degranulation of rat mucosal mast cell,. EMBO J *10, 3603*

Ross PE, Garber SS, Cahalan MD (1994). Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T lymphocytes during osmotic swelling. Biophys. J. *66, 169-178*

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994). A novel kinase cascade triggerd by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell *78: 1027-1037.*

Schuhmacher PA, Sakkelaropoulos G, Phipps DJ, Schlichter LC (1995). Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes. Journal of Membrane Biology *145: 217-232*.

Schwiebert EM, Mills JW, Stanton BA (1994). Actin Based Cytosceleton Regulates a Chlorid Channel and Cell volume in a Renal Cortical Collecting Duct Cell Line. Journal of Biological Chemistry *269: 7081-7089*

Seufferlein T, Rozengurt E (1994). Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhaesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. Journal of Biological Chemistry *269: 9345-9351*.

Sorota S (1992). Swelling induced chlorid-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole cell patch-clamp method. Circulation Research *70:679*

Szücs G, Heinke S, De Greef, Ch, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B (1995). The volume-activated chloride current in endothelial cells from bovine pulmonary artery is not modulated by phosphorylation. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *431, 540-548.*

Szücs G, Buyse G, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B (1995). Characterisation of volume activated chloride currents in endothelial cells from bovine pulmonary artery. J Membrane Biol. *149, 189-197*.

Tilly B C, Van den Berghe N, Tertoolen LGJ, Edixhoven M J, De Jonge H R (1993). Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. Journal of Biological Chemistry *268: 19919-19922.*

Thoroed SM, Lambert IH, Hansen HS, Hoffmann EK (1994). Cell swelling stimulates the Ca 2^+ - sensitive phospholipase A 2 in Ehrlich ascites tomour cells. Acta Physiologica Scandinavia *151: 25 A.*

Uehara Y, Murakami Y, Sugimoto Y, Misuno S (1989). Mechanism of reversion of Rous sarcoma virus transformation by herbimycin A: reduction of total phosphotyrosine levels due to reduced tyrosine kinase activity and increased turnover of p60-Vscr1. Cancer Research *49: 780 - 785*.

Valverde M A, Hardy S P, Sepulveda F V (1995). Chloride channels: a state of flux. Faseb Journal *9: 509-515*.

Van Driesche W, De Smet P, Raskin G (1993). An automatic monitoring system for epthelial cell heigth. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *425, 164-171*

Vandenberg J I, Yoshida A, Kirk K, Powell T (1994). Swelling-activated and Isoprenaline-activated chloride currents in Guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology. Journal of General Physiology *104: 997-1017*.

Voets T, Szücs G, Droogmans G, Nilius B (1995). Blockers of volume activated chloride currents inhibit endothelial cell proliferation.
Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology *431(1): 132-134*.

Voets T, Buyse G, Tytgat J, Droogmans G, Eggermont J, Nilius B (1996). The chloride current induced by expression of the protein pICln in Xenopus oocytes differs fromm the endogenous volume - sensitive chloride current. Journal of Physiology *495.2: 441-447*.

Voets T, Wei L, De Smet P, Van Drische W, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B (1997). Downregulation of volume-activated Cl- currents during muscle differentiation. American Journal of Physiology *272: C 667 - C 674*.

Welsh GI, Foulstone EJ, Young S W, Tavaré J M, Proud CG (1994). Wortmannin inhibits the effect of insulin and serum on the activities of glycogen sythase kinase-3 and mitogen activated protein kinase. Biochemical Journal *303: 15-20*.

Winitz S, Russell M, Qian NX, Gardner A, Dwyer L, Johnson GL (1993). Involvment of Ras and Raf in G1 - coupled acetycholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen - activated protein (MAP) kinase kinase and MAP - kinase. Journal of Biological Chemistry *268: 19196-19199*

Wong HR, Mannix RJ, Rusnak JM, Boota A, Zar H, Watkins SC, Lazo JS, Pitt BR (1996):
The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells .
American Journal of Respiratory cell and molecular Biology; *15 (6) : 745-751* .

Woodbury JW, Miles PR (1993). Anion conductance of frog muscle membranes: one channel, two kinds of pH dependence. The Journal of General Physiology *62: 324-353*.

Yiu-Kay Lai, Chi-Hsiu Shen, Ting-Jen Cheng, Ming-Ching Hou, Wen-Chuan Lee (1993). Enhanced phosphorylation of a 65 kDa protein is associated with rapid induction of stress proteins in 9L rat brain tumor cells. Journal of Cellular Biochemistry *51: 369-379*.

Zhang J, Rasmusson RL, Hall SK, Liebermann M (1993). A chlorid current associated with swelling of cultured heart cells. Journal of Physiology (London) *472: 801-820*

Zhou BY, Lab MJ (1994). Chloride manipulation reduces stretch-induced ventricular ectopics in isolated guinea-pig hearts. Journal of Physiology (London) *476: 55P*

8. Veröffentlichungen

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse flossen in folgende Veröffentlichungen ein :

Heinke S, Szücs G, Droogmans G, Nilius B (1995). Inhibition of volume activated chloride currents in endothelial cells by cromolyn. British Journal of Pharmacology 115: 1393-1398.

Heinke S, Raskin G, De Smet P, Droogmans G, Van Driesche W, Nilius B (1997). Simultaneous measurement of membrane capacitance and whole cell currents during cell swelling in macrovascular endothelium. Cell Physiol Biochem 7: 19-24

Szücs G, Heinke S, De Greef, Ch, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B (1995). The volume-activated chloride current in endothelial cells from bovine pulmonary artery is not modulated by phosphorylation. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology 431, 540-548.

Szücs G, Heinke S, Droogmans G, Nilius B (1996). Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular Ca^{2+} concentration. Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology 431, 467-469.

Nilius B, Gerke V, Prenen J, Szücs G, Heinke S, Weber K, Droogmans G (1996). Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry 271 : 30631-30636.

Weitere Veröffentlichungen:

Nilius B, Sehrer J, Heinke S, Droogmans G (1995). Ca^{2+} - release and activation of K^+ and Cl^- - currents by extracellular ATP in distal nephron epithelial cells. American Journal of Physiology 269:C376-84

Hoffmann M, Heinke S, Leder U, Masri-Zada A, Kühnert H, Müller S (1996). Diastolische linksventrikuläre Relaxationsstörung und Herzfrequenzvariabilität - Marker zur Identifizierung von Patienten mit Risiko für den plötzlichen Herztod. Z Kardiol 85, Suppl 2: 237

Heinke S, Hoffmann M, Leder U, Masri-Zada A, Kühnert H, Müller S (1997). Der Zusammenhang zwischen Ausbildung komplexer ventrikulärer Arrhythmien und Fibrosierung des Myokards bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Z Kardiol 86, Suppl 2: 350

9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Bernd Nilius (Institut für Physiologie der KU Leuven). Er weckte das Interesse am Fachgebiet Elektrophysiologie in mir und ermöglichte mir einen einjährigen Arbeitsaufenthalt an der KU Leuven, während dessen auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erarbeitet wurden. Unter seiner Federführung entstanden die experimentellen Resultate und mit großem persönlichen Einsatz begleitete er das Entstehen dieser Dissertation. Seine Person und die Tätigkeit in seiner Arbeitsgruppe prägten in mir wesentliche Wert- und Moralvorstellungen.

Prof. Geza Szücs (Universität Debrecen) stand mir mit seinem fachlichen und persönlichen Rat jederzeit zur Seite. Prof. Guy Droogmans, Dr. Felix Viana und Thomas Voets wie auch alle anderen Kollegen halfen mir bei vielen Problemen und schufen ein sehr konstruktives und freundschaftliches Arbeitsklima. Gert Raskin entwickelte eine hochwertige Technik zur Kapazitätsmessung und adaptierte sie mehrfach nach unseren Wünschen. Unter der engagierten Mithilfe von Patrick De Smet entstanden die Messungen der Zellhöhe.

Meine Frau Viola unterstützte mich sehr, Ihr Verständnis und Ihre Tolleranz waren ein wesentlicher Grundstein für diese Arbeit.

Während der experimentellen Tätigkeit erhielt ich ein Stipendium der KU Leuven. Ich bedanke mich bei Prof. R.Casteels für seine Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Heinemann, der mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit seine konstruktive und uneigennützige Hilfe zu Teil werden lies.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die Dissertationsarbeit "Zur Modulation volumenaktivierter Chloridströme in Endothelzellen" von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Stephan Heinke

11. Tabellarischer Lebenslauf

	Stephan Heinke
	Friedrich-Ebert-Str. 8
	99096 Erfurt
geboren am:	20.08.1966
Geburtsort:	Friedrichroda (Kreis Gotha),
Nationalität:	deutsch,
Staatsangehörigkeit :	Bundesrepublik Deutschland;
Familienstand:	verheiratet
Ehefrau:	Viola Heinke, geb. Selle
Kinder:	Sarah Heinke
Mutter:	Elke Heinke, geb. Josellies
Vater:	Peter Heinke
Bildungsweg	
1973-85	Schulbesuch
1985	Abschluß des Abiturs an der 'Salzmannschule Schnepfenthal' mit 'Auszeichnung';
10/85-4/87	Grundwehrdienst;
5/87-8/88	Vorpraktikant an der Chirurgischen Klinik Waltershausen, Qualifizierung zum Facharbeiter für Krankenpflege;
9/88-8/94	Medizinstudium von 1988 bis 1990 an der Universität Leipzig, von 1990 bis 1994 an der Medizinischen Hochschule Erfurt (Ausbildung seit 1.1.1994 zur Friedrich-Schiller -Universität Jena gehörig);
9/94-9/95	Stipendium am Physiologischen Institut der Katholischen Universität Leuven (Belgien) in der Arbeitssgruppe von Prof. Bernd Nilius.
seit 10/95	Tätigkeit als Arzt an der Klinik 3 für Innere Medizin (Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin) der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Erfurt, den 8.2.98