

Aus der Medizinischen Klinik IV
Endokrinologie und Nephrologie
Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Zidek)

**Verminderte Expression und Funktion
Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle im neointimalen Endothel**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

Meike Kühn
Kronberg

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Hoyer

Korreferent: Prof. Dr. Plant

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.12.2003

Abkürzungen:

ACC	<i>Arteria carotis communis</i>
ACE	<i>Arteria carotis externa</i>
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
APA	Apamin
BCI	Ballonkatheterdilatation
BK	Bradykinin
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLT	Clotrimazol
CTX	Charybdotoxin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5`triphosphat
DTT	Dithiothreitol
1-EBIO	1-Ethyl-2-Benzimidazolinon
EC	Endothelzellen
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliales Isoenzym der NO-Synthase
ET _A -Rezeptor	Endothelin-Rezeptor A
ET _B -Rezeptor	Endothelin-Rezeptor B
IbTX	Iberiotoxin
IK _{Ca}	kalziumaktivierter Kaliumkanal mit intermediärer Leitfähigkeit
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₄	Inosiltetraphosphat
K _{Ca} -Kanal	kalziumaktivierter Kaliumkanal
K _D	Dissoziationskonstante
LDL	Lipoprotein geringer Dichte

MK _{Ca}	kalziumaktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, maxi K _{Ca}
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PGI ₂	Prostazyklin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>reverse Transkriptase</i>
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion
SK _{Ca}	kalziumaktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit
TEA	Tetraethylamonium
V _m	Membranpotential
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Funktion des Endothels	9
1.2	Rolle des Endothels bei der Regulation des Gefäßtonus	9
1.2.1	Endotheliale Vasodilatoren	10
1.2.2	Endotheliale Vasokonstriktoren	12
1.2.3	Gefäßregulation und endotheliale Ionenkanäle	13
1.3	Ca ⁺ -aktivierte Kaliumkanäle (K _{Ca} -Kanäle)	15
1.4	Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung.....	16
1.5	Endotheliale Dysfunktion von neointimalem Endothel	18
1.6	Modell der Neointimabildung	19
1.7	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Untersuchungsmaterial	21
2.2	Ballonkatheterdilatation	21
2.3	Gefäßpräparation	21
2.4	Patch-clamp-Untersuchungen	23
2.4.1	Versuchsaufbau	24
2.4.2	Stromaufzeichnung und Datenauswertung	26
2.4.3	Lösungen	27
2.5	Isolierung von einzelnen Endothelzellen	28
2.6	Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	28
2.7	Sequenzierung	32
2.8	Statistische Auswertung	33
2.9	Chemikalien	33
2.10	Materialien und Geräte	34

3	Ergebnisse.....	36
3.1	Elektrophysiologische Untersuchungen	36
3.1.1	Ganzzelleableitung	36
3.1.1.1	Native EC der kontralateralen ACC	36
3.1.1.2	Regeneriertes Endothel	41
3.1.2	Bestimmung des Membranpotentials	42
3.2	Einzelzell-RT-PCR in nativem und regeneriertem Endothel	46
4	Diskussion	50
4.1	Diskussion der Methode	50
4.1.1	Patch-clamp-Untersuchungen	50
4.1.2	Einzelzell-RT-PCR	51
4.2	Diskussion der Ergebnisse	52
4.2.1	Endotheliale K_{Ca} -Kanäle in der A.carotis communis der Ratte	52
4.2.2	Funktion und Expression von K_{Ca} -Kanälen im regenerierten Endothel	54
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	59
7	Danksagung	72

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Pipettenlösung	27
Tab. 2:	Badlösung	27
Tab. 3:	Verwendete Primer und ihre Sequenzen, jeweils <i>sense</i> und <i>antisense</i>	31

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Ionenkanäle und Endothelfunktion	10
Abb. 2:	Schematische Darstellung der kombinierten Patch-clamp-Untersuchungen und Einzelzell-RT-PCR.....	22
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Patch-clamp Konfigurationen	24
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	25
Abb. 5:	Exemplarische Ganzzellstromableitung einer isolierten EC der kontralateralen ACC vor und nach der Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen durch Ca^{2+} -Dialyse	37
Abb. 6a:	Inhibierung der Ca^{2+} -aktivierten hyperpolarisierenden Auswärtsströme durch Zugabe der spezifischen K_{Ca} -Kanalblocker	39
Abb. 6b:	Darstellung der konzentrationsabhängigen Blockade der K_{Ca} -Kanalströme	39
Abb. 7:	Steigerung der ACh-induzierten Kaliumströme durch den K_{Ca} -Öffner 1-EBIO..	40
Abb. 8:	Repräsentative Ganzzellstromableitungen von 5 nativen EC der kontralateralen ACC und 5 EC des regenerierten Endothels nach Ca^{2+} -Dialyse	41
Abb. 9:	Membranpotenzialmessungen der EC von nativem und regeneriertem Endothel in Ruhe und nach Zugabe von Acetylcholin	43
Abb. 10:	Vergleich der ACh-induzierten Änderung des Ruhemembranpotenzials in nativen und regenerierten Endothelzellen	43
Abb. 11:	Blockierung der ACh-induzierten Hyperpolarisation durch APA und CLT	44
Abb. 12:	Zunahme der ACh-induzierten Hyperpolarisation durch den K_{Ca} -Öffner 1-EBIO	45
Abb. 13:	Isolierung einer einzelnen Endothelzelle mit der Patchpipette	46
Abb. 14:	Repräsentative Abbildung einer Einzelzell-RT-PCR von 5 EC des nativen und 5 EC des regenerierten Endothels	47

- Abb. 15: Expression des IK_{Ca} bzw. des SK_{CA3} in den nativen EC der kontralateralen ACC (n=13) verglichen mit der Expression im regenerierten Endothel (n=8) 48
- Abb. 16: Expression der verschiedenen K_{Ca} -Subtypen in zwei eNOS positiven EC 49