

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen**

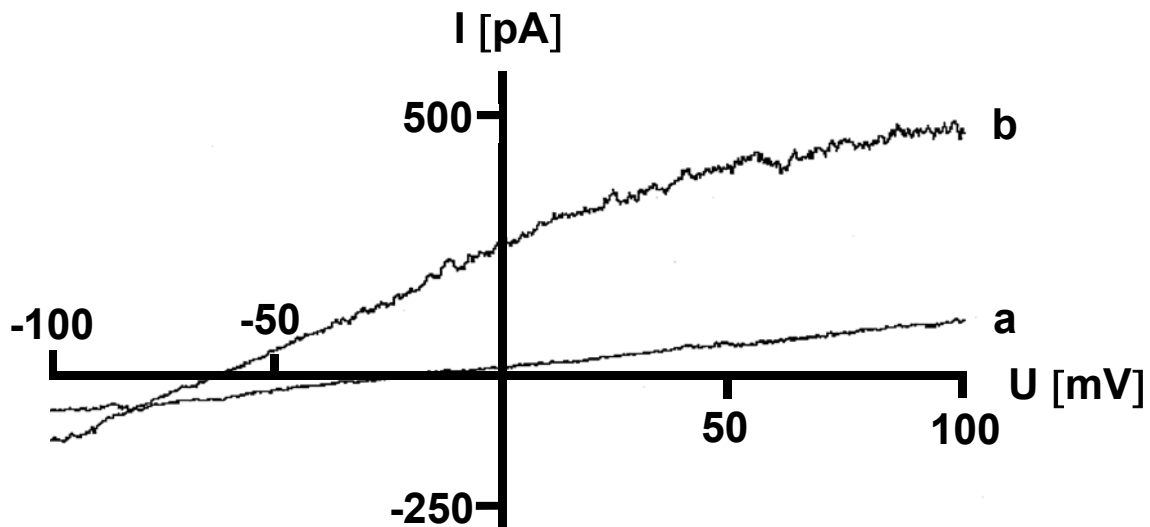
#### **3.1.1 Ganzzelleableitungen**

Um die Funktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle zu charakterisieren wurden zunächst Patch-clamp-Experimente in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Dabei wurden elektrisch nicht gekoppelte einzelne EC *in situ* untersucht. Zur Aktivierung der  $K_{Ca}$ -Kanäle wurden die Zellen mit einer Pipettenlösung dialysiert, die 3  $\mu\text{mol/l}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$  enthielt (siehe Material und Methoden).

##### **3.1.1.1 Native EC der kontralateralen ACC**

In 9 von 10 nativen EC der kontralateralen ACC konnte ein hyperpolarisierender Auswärtsstrom durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Dialyse aktiviert werden. Dieser Auswärtsstrom zeigte bei positiven Membranpotenzialen eine Einwärtsrektifizierung.

Das Umkehrpotenzial wurde aus der Strom-Spannungs-Kurve ermittelt. Es entsprach dem Schnittpunkt der Stromkurve mit der x-Achse. Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dialyse hyperpolarisierte die Zelle und das Umkehrpotenzial verschob sich auf Werte von  $-45 \pm 6$  mV (Abb. 5).



**Abb. 5: Exemplarische Ganzzellstromableitung einer isolierten EC der kontralateralen ACC vor und nach Aktivierung von  $K_{Ca}$ -Kanälen durch  $Ca^{2+}$ -Dialyse**

Zur Aktivierung der  $K_{Ca}$ -Kanäle enthielt die Pipettenlösung 135 mmol/l KCl sowie 3  $\mu$ mol/l freies  $Ca^{2+}$ . Im Bad befand sich eine NaCl-Lösung mit 3 mmol/l KCl. Die Ganzzellstrommessung wurde in der *whole-cell*-Konfiguration mit einer Spannungsrampe von  $-100$  mV bis  $+100$  mV durchgeführt.

Direkt nach dem Durchbrechen der Zellmembran zeigten sich geringe basale nichtselektive Zellströme (a). 15 Sekunden nach der  $Ca^{2+}$ -Dialyse der Zelle beobachtete man einen hyperpolarisierenden Auswärtsstrom, der bei positiven Membranpotenzialen leicht einwärtsrektifizierte (b).

Die Diskrepanz zwischen dem erwarteten Gleichgewichtspotenzial für Kalium von  $-89$  mV und dem gemessenen  $V_{rev}$  erklärt sich damit, dass der Hyperpolarisierung durch die gleichzeitige Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger nicht-selektiver depolarisierender Ströme entgegengewirkt wird (Nilius et al., 1997).

Die Stromdichte, bestimmt bei einem Haltepotenzial von 0 mV und bezogen auf die Zellkapazität, lag bei  $24 \pm 6$  pA/pF unter Verwendung einer Badlösung mit 4,5 mmol/l  $K^+$  und einer Pipettenlösung, die 140 mmol/l  $K^+$  enthielt.

### Blockersubstanzen und $K_{Ca}$ -Öffner

Ein Nachweis der verschiedenen Subtypen der  $K_{Ca}$ -Kanäle erfolgte durch Zugabe von Blockersubstanzen mit unterschiedlicher Spezifität für  $MK_{Ca}$ ,  $IK_{Ca}$  und  $SK_{Ca}$  (Abb. 6a, 6b).

### Apamin

Apamin (APA) ist ein Toxin der Honigbiene mit hoher Selektivität für den SK<sub>Ca</sub> (Blatz & Magelby, 1996; Grunnet et al., 2001).

Durch die Zugabe von 1 µmol/l APA wurde der Auswärtsstrom um 53±9 % blockiert (n=4, K<sub>D</sub> von 0,59±0,08 µmol/l).

### Charybdotoxin

Charybdotoxin (CTX) ist ein gereinigtes Toxin des Skorpions *Leirus quinquestratus*. Es ist ein spezifischer Blocker für Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Kaliumkanäle (Gimenez-Gallego et al., 1988) und inhibiert sowohl den intermediären (IK<sub>Ca</sub>) als auch den hoch leitenden Kanaltyp (MK<sub>Ca</sub>) (Miller et al., 1985; Pavebstädt et al., 1991).

Nach Zugabe von 100 nmol/l CTX reduzierte sich der Auswärtsstrom um 42 ± 11 % (n=5, K<sub>D</sub> von 7,0 ± 2 nmol/l).

### Clotrimazol

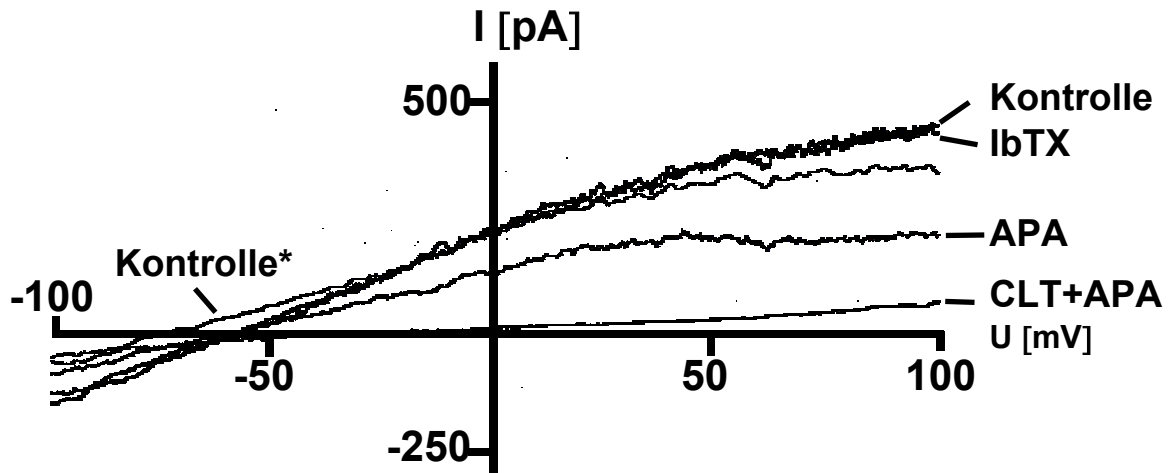
Clotrimazol (CLT) gilt als selektiver Inhibitor des IK<sub>Ca</sub> und blockiert in submikromolaren Konzentrationen nicht den MK<sub>Ca</sub> (Ishii et al., 1997; Jensen et al., 1999).

Die Zugabe von 1 µmol/l CLT bewirkte eine Verringerung des K<sup>+</sup>-Auswärtsstroms um 41 ± 9 % (n=4, K<sub>D</sub> von 48±9 nmol/l).

### Iberiotoxin

Iberiotoxin (IbTX), ein gereinigtes Toxin des Skorpions *Buthus tamulus*, gilt als selektiver Blocker des MK<sub>Ca</sub> (Galvez et al., 1990; Garcia et al., 1991). Die Zugabe von 100 nmol/l IbTX hatte jedoch keinen Einfluss auf die gemessenen Ströme (n=2).

Die Subtraktion der nicht CLT- und APA-sensitiven Ströme von der gesamten Stromantwort ergab, dass das Umkehrpotenzial der CLT- und APA-sensitiven Ströme bei -80 ± 2 mV lag. Dieser Wert liegt nahe dem theoretischen Umkehrpotenzial für K<sup>+</sup>-selektive Kanäle (-89 mV).

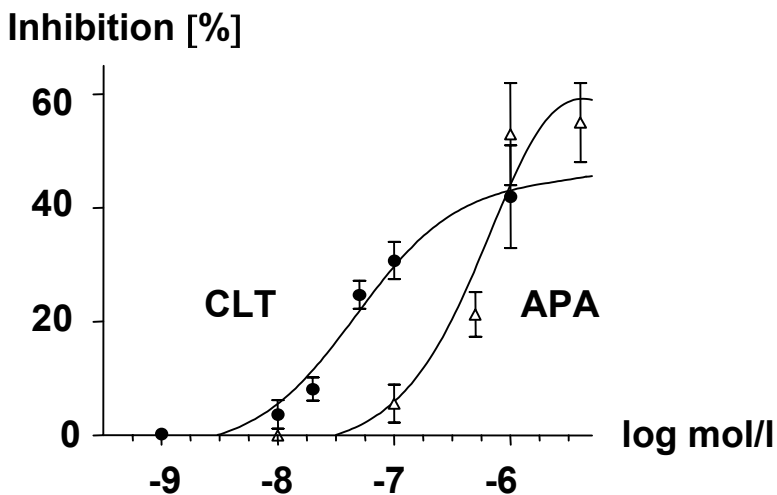


**Abb. 6a: Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten hyperpolarisierenden Auswärtsströme durch Zugabe der spezifischen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanalblocker**

Durch den Zusatz von  $1 \mu\text{l}$  APA in die Badlösung wurde eine deutliche Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten hyperpolarisierenden Auswärtsstroms hervorgerufen. Durch die Zugabe von  $1 \mu\text{l}$  APA und  $1 \mu\text{l}$  CLT wurde der hyperpolarisierende Auswärtsstrom nahezu vollständig inhibiert.

Kontrolle bezeichnet den gesamten Kontrollstrom, Kontrolle\* bezeichnet die Stromantwort nach Subtraktion der nicht CLT- und APA-sensitiven Ströme.

Die Zugabe von IbTX in die Badlösung hatte keinen messbaren Effekt auf die Stromantwort.

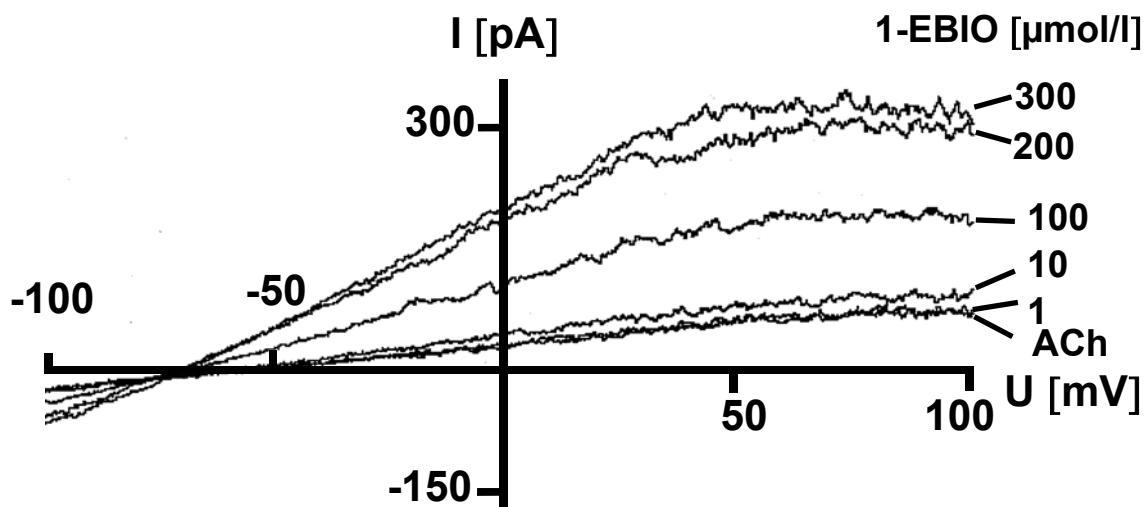


**Abb. 6b: Darstellung der konzentrationsabhängigen Blockade der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanalströme**

Die Abbildung zeigt die konzentrationsabhängige Blockade der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanalströme durch APA bzw. CLT in Prozent, gemessen bei einer Spannung von 50 mV.

### 1-EBIO

1-EBIO (1-Ethyl-2-Benzimidazolinon) ist ein Agonist kalziumaktivierter Kaliumkanäle und gilt als selektiv für  $IK_{Ca}$  und  $SK_{Ca}$  (Devor et al., 1996). Nach Zugabe von 1 bis 300  $\mu\text{mol/l}$  1-EBIO in die Badlösung konnte eine dosisabhängige Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumströme beobachtet werden. Die halbmaximale Aktivierung lag bei einer Konzentration von  $\sim 130 \mu\text{mol/l}$  (Abb.7).



**Abb. 7: Steigerung der ACh-induzierten Kaliumströme durch den  $K_{Ca}$ -Öffner 1-EBIO**

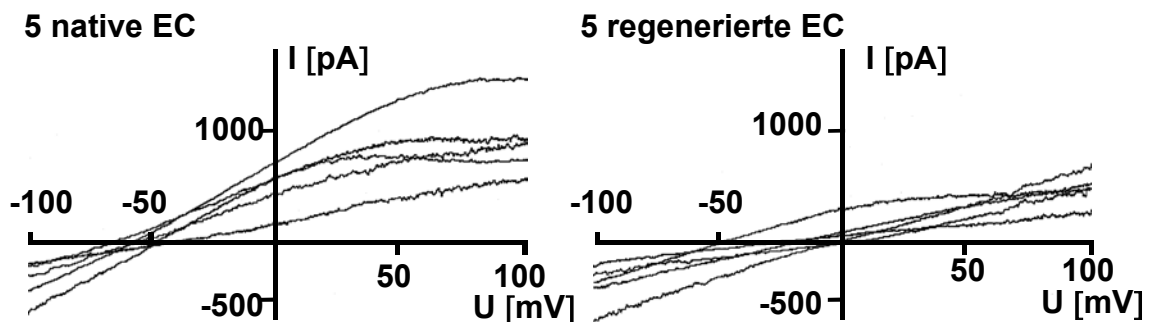
Nach der Zugabe von 1 bis 300  $\mu\text{mol/l}$  1-EBIO in die Badlösung wurde eine dosisabhängige Aktivierung der ACh-induzierten Kaliumströme beobachtet.

### 3.1.1.2 Regeneriertes Endothel

Die Zellen des regenerierten Endothels wurden analog zu den nativen EC der kontralateralen ACC durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Dialyse aktiviert. Ein hyperpolarisierender  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Strom konnte jedoch nur in 3 von 10 EC beobachtet werden.

Die gemessene Stromdichte der Zellen des regenerierten Endothels bei einem Haltepotenzial von 0 mV lag bei  $7 \pm 2$  pA/pF und war damit im Gegensatz zur kontralateralen Seite signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ).

Das Umkehrpotential war mit Werten von  $-23 \pm 3$  mV ebenfalls deutlich verringert ( $p < 0,05$ ). Bei den 3 Zellen, die einen hyperpolarisierenden Strom zeigten, betrug jedoch die Zellströme bei 0 mV  $15 \pm 5$  pA/pF und das Umkehrpotential lag bei  $-41 \pm 6$  mV. Diese Werte sind vergleichbar mit denen der nativen EC der kontralateralen ACC (Abb.8).



**Abb. 8: Repräsentative Ganzzellstromableitungen von 5 nativen EC der kontralateralen ACC und 5 EC des regenerierten Endothels nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Dialyse**

Im Vergleich zu den nativen EC (a) wurde im regenerierten Endothel (b) bei deutlich weniger EC ein hyperpolarisierender Auswärtsstrom nach Aktivierung der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Dialyse beobachtet.

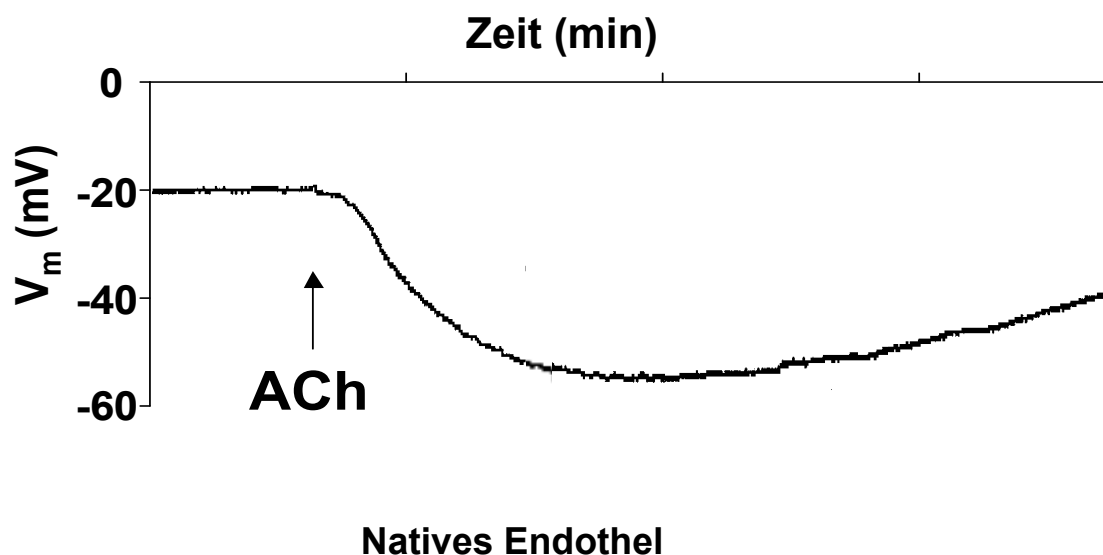
### 3.1.2 Bestimmung des Membranpotenzials

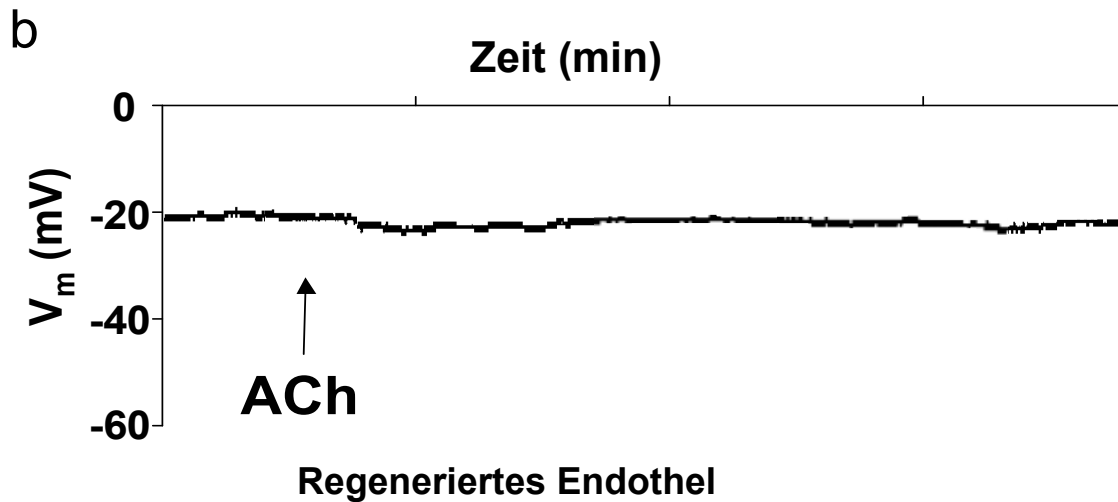
Um die Funktion der kalziumaktivierten Kaliumkanäle und ihre Bedeutung für die Regulation des Membranpotenzials ( $V_m$ ) weiter zu charakterisieren, wurden Messungen des Membranpotenzials im *current-clamp*-Modus durchgeführt. Dabei wurden elektrisch gekoppelte EC der intakten Endothelzellschicht sowohl des nativen als auch des regenerierten Endothels untersucht.

Zunächst erfolgte die Messung des Ruhemembranpotenzials. Dann wurden das Endothel mit 200 nmol/l Acetylcholin (ACh) stimuliert und die darauf folgende Hyperpolarisation ermittelt.

Im Endothel der kontralateralen ACC (n=10) betrug das Ruhemembranpotenzial  $-18 \pm 3$  mV. Acetylcholin bewirkte eine Hyperpolarisation auf Werte von  $-40 \pm 5$  mV ( $\Delta V_m -21 \pm 5$  mV). Dahingegen zeigte das regenerierte Endothel (n=7) eine geringe, nicht signifikant unterschiedliche Hyperpolarisation. Das Ruhemembranpotenzial von  $-23 \pm 3$  mV änderte sich nach Zugabe von ACh nur um  $-6 \pm 3$  mV ( $\Delta V_m$ ) auf Werte von  $-29 \pm 5$  mV ( $p < 0,05$ ).

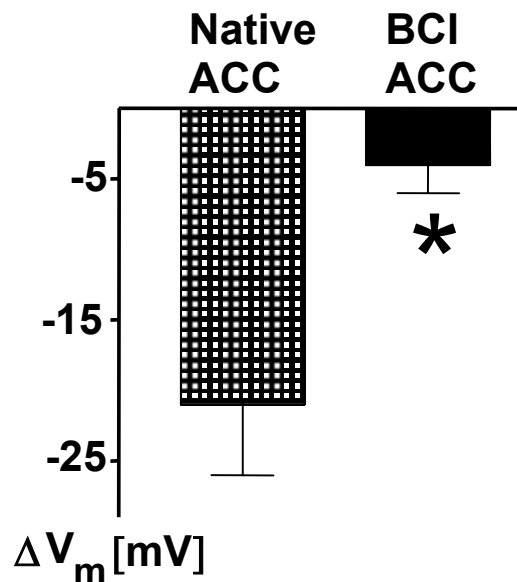
a





**Abb. 9: Membranpotenzialmessungen der EC von nativem und regeneriertem Endothel in Ruhe und nach Zugabe von Acetylcholin**

Das Membranpotenzial wurde im *current-clamp*-Modus an elektrisch gekoppelten Endothelzellen gemessen. Im Endothel der kontralateralen ACC erfolgte nach Zugabe von 100 nmol/l ACh eine deutliche Hyperpolarisation der Zelle (a). Im regenerierten Endothel veränderte sich das Ruhemembranpotenzial dagegen nach Zugabe von 100 nmol/l ACh nicht signifikant (b).



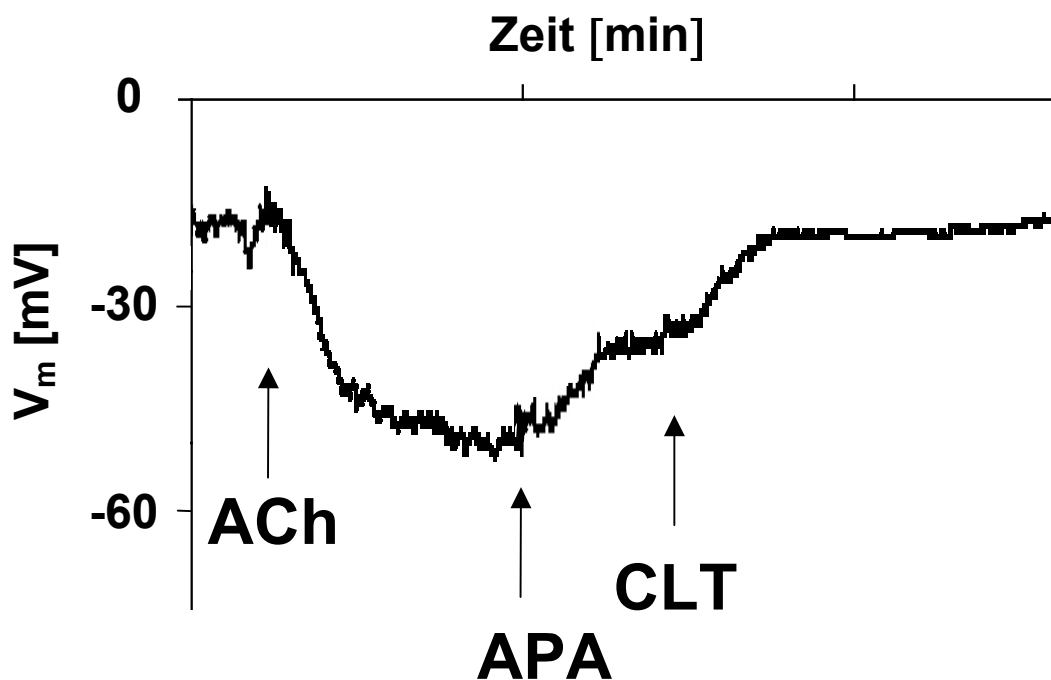
**Abb. 10: Vergleich der ACh-induzierten Änderung des Ruhemembranpotenzials in nativen und regenerierten Endothelzellen**

In den EC des regenerierten Endothels zeigte sich eine signifikant geringere ACh-induzierte Hyperpolarisation im Vergleich zu den nativen EC ( $p < 0,05$ ). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die beiden Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen.



### Blockersubstanzen und $K_{Ca}$ -Öffner

Die durch Acetylcholin induzierte Hyperpolarisation der nativen EC konnte durch die Zugabe von 100 nmol/l CTX und 1  $\mu$ mol/l APA (n=5) bzw. 1  $\mu$ mol/l CLT und 1  $\mu$ mol/l APA (n=3) vollständig inhibiert werden (Abb. 11).

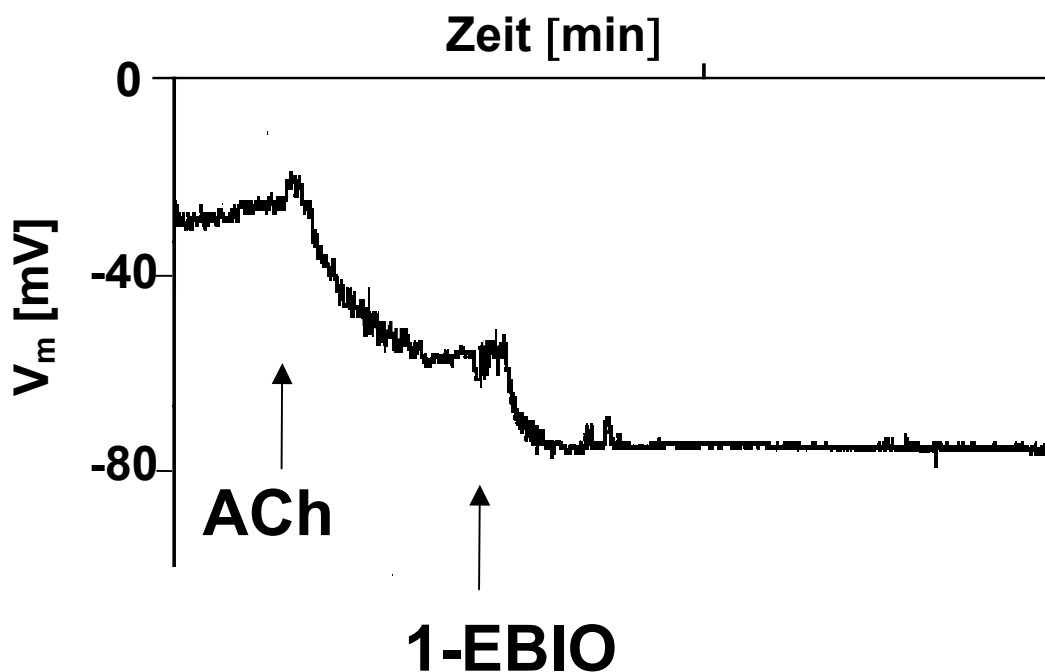


**Abb. 11: Blockierung der ACh-induzierten Hyperpolarisation durch APA und CLT**

Nach Zugabe von 100 nmol/l ACh wurde zunächst eine Hyperpolarisation der Zellmembran hervorgerufen. Durch Hinzufügen von 1  $\mu$ mol/l APA und 1  $\mu$ mol/l CLT in die Badlösung wurde diese Hyperpolarisation vollständig inhibiert und das Membranpotenzial ging auf Werte des Ruhemembranpotenzials zurück.

Dagegen hatte das Hinzufügen von 100 nmol/l IbTX (n=3), einem spezifischen Blocker des  $MK_{Ca}$ , keinen Einfluss auf die ACh-induzierte Hyperpolarisation. Dies deutet darauf hin, dass die Hyperpolarisation des Endothels nach Zugabe von ACh durch Aktivierung von CTX/CLT-sensitiven  $IK_{Ca}$  und AP-sensitiven  $SK_{Ca}$  vermittelt wird.

Die Zugabe des  $K_{Ca}$ -Öffners 1-EBIO bewirkte eine Verstärkung der Zellhyperpolarisation um  $-17 \pm 5$  mV (n=4; Abb. 12).

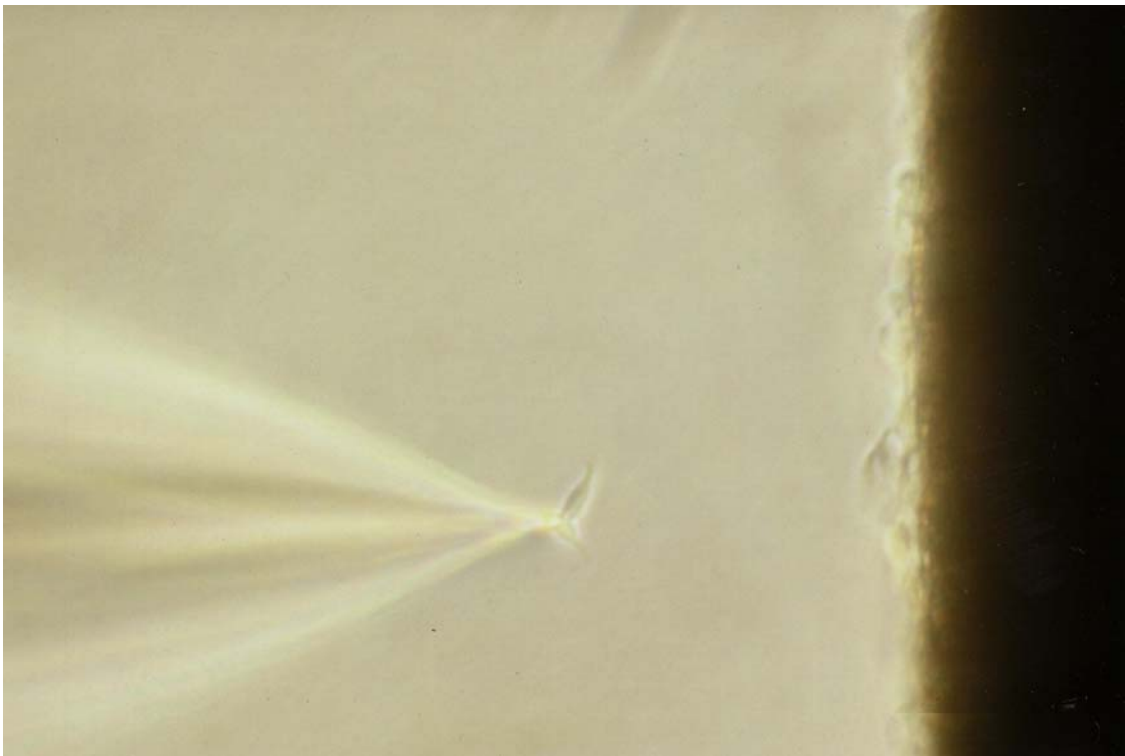


**Abb. 12: Zunahme der ACh-induzierten Hyperpolarisation durch den  $K_{Ca}$ -Öffner 1-EBIO**

Das Experiment wurde im *current-clamp*-Modus durchgeführt. Nach Zugabe von 100 nmol ACh in die Badlösung wurde eine Membranhyperpolarisation beobachtet, die sich nach Zugabe von 100  $\mu$ mol/l 1-EBIO deutlich steigerte.

### 3.2 Einzellzell-RT-PCR in nativem und regeneriertem Endothel

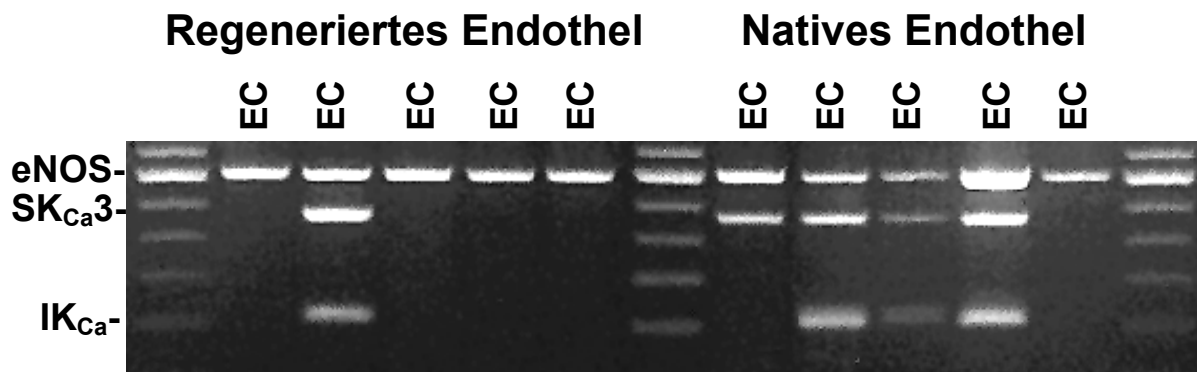
Zusätzlich zu den Patch-clamp-Experimenten wurde an den Zellen des nativen und des regenerierten Endothels die Expression der verschiedenen  $K_{Ca}$ -Kanäle mit Hilfe einer Einzellzell-RT-PCR nachgewiesen. So konnten an den EC sowohl die Funktion als auch die Expression dieser Kanäle gemessen werden. Wir isolierten insgesamt 119 EC der kontralateralen ACC von 13 verschiedenen Versuchstieren. Zum Vergleich wurden von dem regenerierten Endothel 67 Zellen von 8 verschiedenen Versuchstieren untersucht.



**Abb. 13: Isolierung einer einzelnen Endothelzelle mit der Patchpipette (320-fache Vergrößerung)**

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den geernteten Zellen um Endothelzellen handelte, wurde mit Hilfe der *multiplex*-PCR Technik bei jeder Zellprobe die Expression der endothelspezifischen eNOS detektiert. Zellproben, die keine PCR-Signale für eNOS zeigten, wurden in die statistische Auswertung nicht einbezogen. Von den geernteten Proben konnte bei 43% des nativen bzw. 54% des regenerierten Endothels ein eNOS-Signal nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden zur Kontrolle 15 Mediumproben untersucht, von denen keine ein PCR-Produkt enthielt.



**Abb. 14: Repräsentative Abbildung einer Einzelzell-RT-PCR von 5 EC des nativen und 5 EC des regenerierten Endothels**

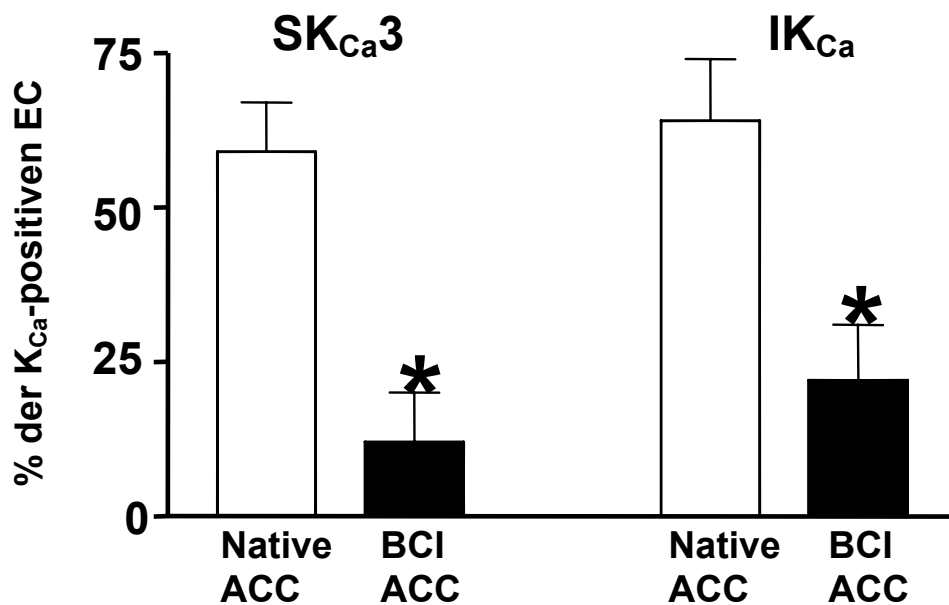
Dargestellt ist ein ethidiumbromidhaltiges Elektrophoresegel. Mit Hilfe einer *multiplex*-RT-PCR wurde die Expression der eNOS, des IK<sub>Ca</sub><sup>+</sup> und des SK<sub>Ca3</sub> detektiert. An beiden Seiten und in der Mitte wurde eine DNA-Leiter aufgetragen.

### IK<sub>Ca</sub>

Die Expression des IK<sub>Ca</sub> lag bei den EC der kontralateralen ACC bei  $64 \pm 10$  % (n=13). Dahingegen konnte im regenerierten Endothel dieser Kanal nur in  $22 \pm 9$  % (n=8) der eNOS positiven Zellen detektiert werden. Die Expression des IK<sub>Ca</sub> war also signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ).

### SK<sub>Ca</sub>

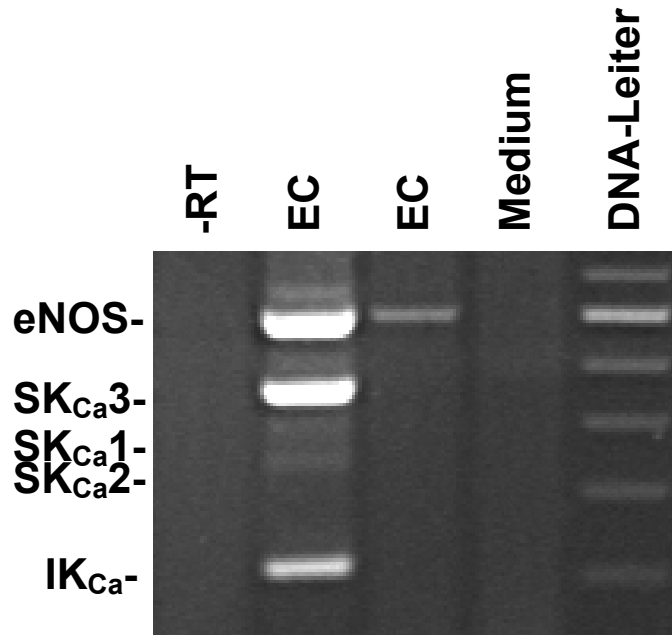
Die Expression des SK<sub>Ca</sub>3 wurde in  $58 \pm 8$  % (n=13) der kontralateralen EC und in nur  $12 \pm 8$  % (n=8) der regenerierten EC nachgewiesen. Auch hier lag also eine signifikante Verminderung der Expression vor ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 15: Expression des IK<sub>Ca</sub> bzw. SK<sub>Ca</sub>3 in den nativen EC der kontralateralen ACC (n=13) verglichen mit der Expression im regenerierten Endothel (n=8)**

Die Werte sind jeweils als Prozentwerte der eNOS exprimierenden Zellen angegeben und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der Expression in den EC des regenerierten Endothels sowohl für den IK<sub>Ca</sub> ( $p < 0,05$ ) als auch für den SK<sub>Ca</sub>3 ( $p < 0,01$ ).

Die anderen Subtypen des SK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca1</sub> und SK<sub>Ca2</sub> wurden weder in den kontralateralen noch den regenerierten EC exprimiert. (Abb.2c)



**Abbildung 16: Expression der verschiedenen K<sub>Ca</sub>-Subtypen in zwei eNOS positiven EC**

Dargestellt ist ein ethidiumbromidhaltiges Elektrophoresegel. Mit Hilfe einer *multiplex*-RT-PCR wurde die Expression der eNOS, des IK<sub>Ca</sub> und der SK<sub>Ca1</sub>, SK<sub>Ca2</sub> und SK<sub>Ca3</sub> detektiert. Als Negativkontrolle wurden eine Mediumprobe und eine -RT-Probe mituntersucht.

In den Zellproben der kontralateralen ACC, die kein Signal für eNOS zeigten, konnten der SK<sub>Ca3</sub> und der IK<sub>Ca</sub> nur in  $8 \pm 4$  % und  $3 \pm 2$  % der Proben detektiert werden. In den eNOS-negativen Zellproben von den ballondilatierten Gefäßen ließ sich der IK<sub>Ca</sub> in keiner Probe nachweisen und der SK<sub>Ca3</sub> nur in  $1 \pm 1$  % der Proben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von SK<sub>Ca3</sub> und IK<sub>Ca</sub> stark mit dem Vorhandensein der eNOS verbunden ist und damit auf eine erfolgreiche Gewinnung der mRNA der EC schließen lässt.