

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methode

Durch die Kombination von Patch-clamp-Untersuchungen und Einzelzell-RT-PCR-Analysen konnten in der vorliegenden Arbeit  $K_{Ca}$ -Kanäle der ACC der Ratte *in situ* sowohl funktionell als auch molekularbiologisch untersucht werden. Diese kombinierte Untersuchungstechnik wurde bisher nur zur Charakterisierung von Ionenkanälen neuronaler Zellen angewandt. Bei der Ratte wurden beispielsweise einwärtsrektifizierende  $K^+$ -Kanäle in Neuronen (Mermelstein et al., 1998), Kaliumkanäle im Ganglion des *N. trigeminus* (Seifert et al., 1999), spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle in Interneuronen und Pyramidenzellen des Hippocampus (Martina et al., 1998), ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle des Hippokampus (Zawar et al., 1999) und spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle in Motoneuronen des *Nucl. n. facialis* (Plant et al., 1998) untersucht. Spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle in retinalen Ganglienzellen (Henne et al., 2000) und die Schwannschen Zellen der Forelle (Rabe et al., 1998) wurden ebenfalls elektrophysiologisch und molekularbiologisch untersucht.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde diese Methode am Endothel humaner Mesenterialarterien etabliert (Köhler et al., 2000). Dadurch konnte in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht werden, ob eine veränderte Expression und Funktion von Ionenkanälen im neointimalen Endothel nach Ballondilatation vorliegt. Diese kombinierte Untersuchungstechnik ermöglicht also eine Charakterisierung endothelialer Ionenkanäle an sehr kleinen Gewebeproben und die Bestimmung von Ionenkanalexpressionsmustern bei kardiovaskulären Krankheitszuständen.

#### 4.1.1 Patch-clamp-Untersuchungen

Patch-clamp-Untersuchungen an Gefäßpräparationen mit intaktem Endothel wurden bislang nur in wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt (Hoyer et al., 1991, 1994; Marchenko & Sage, 1996, 2000; Papassotiriou et al., 2000; Manabe et al., 1995). In der eigenen Arbeitsgruppe gelang es erstmalig, endotheliale Kaliumkanäle am Endothel des Schweins und auch des Menschen *in situ* elektrophysiologisch zu charakterisieren (Hoyer et al., 1994, 1996, Köhler et

al., 2000). Die Methode konnte so weiterentwickelt werden, dass eine konstante *seal*-Rate unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen erreicht wurde und die *seal*-Bildung mit der Zellmembran des intakten Endothels unter mikroskopischer Sichtkontrolle erfolgen konnte. Dies ermöglichte tierexperimentelle Vergleichsuntersuchungen der Ionenkanäle bei kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. bei arterieller Hypertonie. Vergleichende Studien zur Funktion endothelialer Ionenkanäle nach Ballondilatation der ACC waren bisher nicht durchgeführt worden.

Bisher wurden endotheliale Kaliumkanäle hauptsächlich an isolierten und kultivierten EC untersucht (Baron et al., 1996; Rusko et al., 1995a, 1995b; Ling & O'Neil, 1992; Nilius & Riemann, 1990). Eine Reihe von Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten jedoch gezeigt, dass EC unter artefiziellen Zellkulturbedingungen einen Teil ihrer spezifischen Eigenschaften verlieren. So konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass kultivierte EC eine Verringerung der Funktion und Expression mechanosensitiver Ionenkanäle aufweisen (Köhler et al., 2001). Die Funktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle ging dabei sogar vollständig verloren. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht. So beschrieben Gorfien et al. (1993) einen Verlust typischer endothelialer Markerproteine wie den des von-Willebrand-Faktors. Unter Zellkulturbedingungen veränderte sich auch die Zellmorphologie der EC und spezifische Ionenkanalfunktionen gingen verloren (Davies et al., 1984; Gorfien et al., 1993; Barbee et al., 1994; Tracey & Peach, 1992).

In der vorliegenden Studie wurden die Endothelzellen also *in situ* und bei einer Temperatur von 37°C untersucht, um möglichst Veränderungen durch Zellisolation und -präparation zu vermeiden.

#### **4.1.2 Einzelzell-RT-PCR**

Expressionsanalysen einzelner EC der Ratte *in situ* wurden bislang nicht durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einzelne EC mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR *in situ* zu analysieren. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den geernteten Zellen um EC handelt, wurde die Expression der endothelspezifischen eNOS in einer multiplex PCR detektiert. Da die einzelnen EC nur sehr geringe Mengen an mRNA enthielten, wurde eine sehr sensitive „nested“ PCR durchgeführt. Eine Kontamination wurden anhand regelmäßig durchgeführter

Medium- und Wasserkontrollen ausgeschlossen. Somit konnte sichergestellt werden, dass selektiv die mRNA einer einzelnen Endothelzelle gewonnen und spezifisch analysiert wurde.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

In den durchgeführten Experimenten ist es gelungen, am intakten Endothel der ACC der Ratte  $K_{Ca}$ -Kanäle mit intermediärer ( $IK_{Ca}$ ) und niedriger Leitfähigkeit ( $SK_{Ca}$ ) elektrophysiologisch zu charakterisieren und die Expression dieser Kanäle mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR nachzuweisen. Ferner konnte im regenerierten Endothel, das sich sechs Wochen nach der Ballondilatation gebildet hatte, gezeigt werden, dass eine verminderte Expression und Funktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle zu einer gestörten endothelialen Vasoregulation solcher Gefäße führt.

Mehrere Arbeitsgruppen hatten bereits an verschiedenen Tiermodellen phänotypische und funktionelle Veränderungen des regenerierten Endothels zeigen können (Shimokawa et al., 1987, 1989; Borg.Capra et al., 1997, Thollon et al., 1999; Fournet-Bourguignon et al., 2000). So beobachteten Shimokawa et al. (1989) eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation in den Koronararterien des Schweins. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob die Dysfunktion des neugebildeten Endothels auf eine gestörte Funktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle zurückgeführt werden kann.

### 4.2.1 Endotheliale $K_{Ca}$ -Kanäle in der *A. carotis communis* der Ratte

#### Ganzzelleableitungen

Bei *in situ* Patch-clamp-Experimenten konnten in den nativen EC der kontralateralen ACC durch  $Ca^{2+}$ -Dialyse der Zelle hyperpolarisierende Auswärtsströme induziert werden. Dabei verschob sich das Umkehrpotential in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotenzials, was auf eine Aktivierung von  $K_{Ca}$ -Kanälen schließen lässt. Die gemessenen Ströme zeigten in Bezug auf ihre Kalziumabhängigkeit, Einwärtsrektifizierung, Unabhängigkeit der Kanalaktivität vom Membranpotential und die selektive Blockade durch APA und CLT die Charakteristika des  $SK_{Ca}$  bzw.  $IK_{Ca1}$  (Ishii et al., 1997; Kohler et al., 1996).

Die beobachteten CLT-sensitiven Ströme hatten elektrophysiologische Eigenschaften wie sie für den  $IK_{Ca1}$  kürzlich in humanen EC (Köhler et al., 2000), humanen Lymphozyten (Logsdon et al., 1997; Ghanshani et al., 2000), humanen Pankreaszellen (Ishii et al., 1997) und humanen Fibroblasten (Pena et al., 1999) beschrieben worden sind. Die APA-sensitiven Ströme entsprachen dem  $K_{Ca}$ -Kanal mit niedriger Leitfähigkeit und zeigten vergleichbare Charakteristika wie die des  $SK_{Ca}$ , der in neuronalen Gehirnzellen der Ratte beobachtet werden konnte (Köhler et al., 1996). Die Steigerung der  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Ströme durch den selektiven Kanalöffner 1-EBIO weist auf das Vorhandensein von  $IK_{Ca}$  und  $SK_{Ca}$  hin. Eine Aktivierung des  $MK_{Ca}$  konnte nicht nachgewiesen werden. Auch der hochselektive Blocker des  $MK_{Ca}$  IbTX bewirkte keine messbare Veränderung der Zellströme.

#### Membranpotenzialmessungen

Die ACh-induzierte Hyperpolarisation des Endothels konnte durch die Kombination von APA und CTX vollständig blockiert werden. Der  $K_{Ca}$ -Kanalöffner 1-EBIO verstärkte dosisabhängig die Zellhyperpolarisation, dagegen erbrachte IbTX keinen Effekt auf das Membranpotenzial. Diese Ergebnisse zeigen, dass die agonisten-induzierte Hyperpolarisation im Endothel der ACC durch  $K_{Ca}$ -Kanäle von intermediärer und geringer Leitfähigkeit vermittelt wird. Im Gegensatz dazu beschrieben Marchenko & Sage in einer Studie am Endothel der Rattenaorta, dass durch die Zugabe von CTX die ACh-induzierte Hyperpolarisation inhibiert wurde, jedoch die Zugabe von APA keinen Effekt hatte (1996). Im intakten Endothel der humanen Mesenterialarterie wurde die agonisten-induzierte Hyperpolarisation durch CTX gehemmt und APA bewirkte keine Veränderung (Köhler et al., 2000). In einigen Endothelarten scheint auch der  $K_{Ca}$ -Kanal mit hoher Leitfähigkeit eine entscheidende Rolle in der Agonisten-induzierten Hyperpolarisation zu spielen. So wurde beispielsweise im Endothel der Koronararterie des Schweins durch Bradykinin der  $MK_{Ca}$  aktiviert, mit daraus folgender Hyperpolarisation (Baron et al., 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression und die Funktion der verschiedenen Subtypen von  $K_{Ca}$ -Kanälen in den unterschiedlichen Endothelarten und auch bei den verschiedenen Tierspezies erheblich variieren können.

### Einzelzell-RT-PCR

Mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die einzelnen EC *in situ* sowohl das Gen für den IK<sub>Ca</sub>1 als auch das Gen für den SK<sub>Ca</sub>3 exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde für den SK<sub>Ca</sub>1 und den SK<sub>Ca</sub>2 keine Genexpression detektiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die K<sub>Ca</sub>-Subtypen mit niedriger (SK<sub>Ca</sub>3) und intermediärer (IK<sub>Ca</sub>1) Leitfähigkeit die agonisten-induzierte endotheliale Hyperpolarisation in der ACC der Ratte vermitteln.

Bisher konnte eine Expression des SK<sub>Ca</sub>3 in den neuronalen Zellen und in den Skelettmuskelzellen der Ratte nachgewiesen werden (Kohler et al., 1996). Dort vermittelt dieser Kanal die Nachhyperpolarisation. Die Expression des IK<sub>Ca</sub>1 wurde in humanen Lymphozyten (Logsdon et al., 1997; Ghanshani et al., 2000) und humanen Fibroblasten (Pena & Rane, 1999) beobachtet. In einer vor kurzem durchgeführten Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte an humanen EC der Mesenterialarterie gezeigt werden, dass der IK<sub>Ca</sub>1 die endotheliale agonisten-induzierte Hyperpolarisation vermittelt (Köhler et al., 2000). Die K<sub>Ca</sub>-Kanäle mit geringer (SK<sub>Ca</sub>) und hoher (MK<sub>Ca</sub>) Leitfähigkeit scheinen in diesen Gefäßen keine Rolle zu spielen.

#### **4.2.2 Funktion und Expression von K<sub>Ca</sub>Kanälen im regenerierten Endothel**

Im Gegensatz zum nativen Endothel wurde im regenerierten Endothel eine stark verminderte agonisten-induzierte Hyperpolarisation beobachtet. Auch die kalziumaktivierten hyperpolarisierenden K<sup>+</sup>- Auswärtsströme waren im Vergleich zu den nativen EC deutlich geringer. Korrespondierend hierzu ergab die Einzelzell-RT-PCR-Analyse, dass die Expression von IK<sub>Ca</sub>1 und SK<sub>Ca</sub>3 im regenerierten Endothel signifikant erniedrigt war. Daraus lässt sich schließen, dass das regenerierte Endothel eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Hyperpolarisation hat, die auf eine im Gegensatz zum nativen Endothel erniedrigte Expression der K<sub>Ca</sub>-Kanäle zurückzuführen ist.

Diese Interpretation der Ergebnisse wurde auch durch Gefäßfunktionsmessungen gestützt, die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass die ACh-induzierte Vasodilatation bei den durch Ballondilatation geschädigten Gefäßen im Vergleich zu den nativen Gefäßen signifikant verringert war. Die Kombination von APA und CTX

fürhte in den nativen Gefäßen zu einer deutlichen Verminderung der Vasodilatation, sie wurde aber nicht vollständig unterdrückt. Im Gegensatz dazu bewirkten diese beiden Substanzen in den ballondilatierten ACC keine messbare Veränderung der Vasodilatation und der selektive  $K_{Ca}$ -Öffner 1-EBIO hatte ebenfalls keinen nachweislichen Effekt auf das Gefäßlumen (Köhler et al., 2001). Bei den durch Ballondilatation geschädigten Gefäßen führt die verminderte Expression von  $K_{Ca}$ -Kanälen also nicht nur zu einer verminderten agonisten-induzierten endothelialen Hyperpolarisation, sondern reduziert auch die Fähigkeit zur agonisten-induzierten Vasodilatation. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Aktivität von  $K_{Ca}$ -Kanälen, wie in der Einleitung bereits beschrieben, die elektrochemische Triebkraft für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom erhöht und damit die Synthese und Freisetzung endothelialer Vasodilatoren fördert (Adams et al., 1989; Lückhoff & Busse, 1990; Nilius et al., 1997; Vaca et al., 1996). Dieser Mechanismus ist im regenerierten Endothel durch die Verminderung der  $K_{Ca}$ -Kanäle gestört. Eine verminderte Freisetzung des endothelialen Vasodilators NO im durch Ballondilatation geschädigten Endothel ist auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden (Fournet-Bourguignon, 2000). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die endotheliale Hyperpolarisation über *myoendotheliale junctions* direkt auf die VSMC übertragen wird und dort durch Schließung spannungsaktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle eine Vasodilatation hervorruft (Edwards et al., 1999; von der Weid et al., 1993). Dieser Weg der Signaltransduktion könnte also ebenfalls durch die Dysfunktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle beeinträchtigt sein.

Da durch die Blockade von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  die Ach-induzierte Vasodilatation allerdings nur teilweise inhibiert wurde, stellt die endotheliale Hyperpolarisation nicht die einzige Grundlage der agonisten-induzierten Vasodilatation dar. Vermutlich werden trotz der fehlenden Hyperpolarisation noch Vasodilatoren wie NO und Prostacyclin in den EC synthetisiert.

Eine verminderte ACh-induzierte Vasodilatation nach Ballondilatation wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen, beispielsweise in der A. iliaca des Kaninchens, beschrieben (Hamon et al., 1994; Weidinger et al., 1990). Die Tatsache, dass die ACh-induzierte endothelabhängige Vasodilatation im Gegensatz zu den nativen Gefäßen so stark erniedrigt war, deutet allerdings darauf hin, dass im regenerierten Endothel außer den  $K_{Ca}$ -Kanälen noch andere Mechanismen gestört sein könnten. Dies entspricht auch den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. In der Koronararterie des Schweins zeigte sich einige Wochen nach Ballondilatation in den

Endothelzellen eine verminderte Aktivität von G-Proteinen (Borg-Capra, 1997) und eine verminderte NO-Synthese (Fournet-Bourguignon, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verminderte Expression und Funktion der  $K_{Ca}$ -Kanäle zumindest teilweise an der verschlechterten Funktion des neugebildeten Endothels nach Ballondilatation ursächlich beteiligt ist.  $K_{Ca}$ -Kanäle könnten möglicherweise als ein neuer Angriffspunkt in der pharmakologischen Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen betrachtet werden.