

1 Einleitung

1.1 Endothelfunktionen

Das dem Gefäßlumen zugewandte Endothel bildet als einreihige Zellschicht eine permeable Grenzmembran zwischen dem extra- und intravasalen Raum. Es dient nicht nur als einfache Barriere zur Trennung von Blut und Gewebe, sondern stellt ein eigenständiges, stark differenziertes und metabolisch hochaktives Organ dar (BUSSE & FLEMING, 1993).

Neben der Funktion als selektive Permeabilitäts- und Diffusionsbarriere und des Stofftransportes beteiligt sich das Endothel auch an vielen immunologischen Prozessen wie der Antigenpräsentation. Es ist wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation und initiiert die Angiogenese und Gefäßreparatur, wobei es an der Regulation von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) mitwirkt (BUSSE & FLEMING, 1993; SCHIFFRIN, 1994; GRIENGLING & ALEXANDER, 1996).

Eine entscheidende Rolle spielt das Endothel bei der Kontrolle des Gefäßtonus durch Regulierung des Kontraktionszustandes der glatten Gefäßmuskulatur (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; BUSSE *et al.*, 1985; VANHOUTTE, 1988; BUSSE & FLEMING, 1993; POHL *et al.*, 1993).

1.2 Regulation des Gefäßtonus

Die Regulation des Gefäßtonus dient der Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutflusses, der auf der einen Seite wichtig für die systemische Blutdruckkontrolle und auf der anderen Seite für die Durchblutung der einzelnen Organe und Gewebe ist. Der Gefäßdurchmesser wird durch Kontraktion und Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur bestimmt. Durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion wird eine adäquate Perfusion distal gelegener

Gewebe gewährleistet und gleichzeitig die Gefäßwand vor einer Schädigung durch zu hohe hämodynamische Kräfte geschützt.

Hierfür muss das Endothel über Membranrezeptoren und -sensoren humorale und hämodynamische Reize aufnehmen. Zu diesen gehören Neurotransmitter und humorale Faktoren wie z.B. Acetylcholin, Adenosintriphosphat (ATP) und Bradykinin, welche die Endothelzellen (EC) über Rezeptoren mit nachfolgenden intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen stimulieren. Des Weiteren zählen hierzu hämodynamische Kräfte wie erhöhte Flussraten und intravasaler Druckanstieg, durch die die Wandschubspannung (*shear stress*) ansteigt und mechanosensitive Kanäle aktiviert werden (HOYER *et al.*, 1996). Durch Bildung und Freisetzung von vasoaktiven Lokalhormonen (Autakoide) verändert das Endothel nach Stimulation den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur. Die Mechanismen zur Sezernierung der Autakoide wie Stickstoffmonoxid (NO bzw. EDRF), Prostazyklin (PGI₂) oder der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF) durch die EC sind von intrazellulären Botenstoffen abhängig, in besonderem Maße von der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ([Ca²⁺]) (HIMMEL *et al.*, 1993). Diese für viele Endothelfunktionen wichtige intrazelluläre [Ca²⁺] wird wesentlich durch das Membranpotential und Ionenkanäle beeinflusst.

1.2.1 Humorale Endothelstimulation und Ionenkanäle

Die Stimulation des Endothels durch Neurotransmitter und humorale Faktoren (Bradykinin, Acetylcholin, ATP, Serotonin etc.) führt im Zusammenhang mit einem Anstieg der intrazellulären [Ca²⁺] zur Aktivierung endothelialer Ionenkanäle. Zunächst kommt es nach Rezeptorstimulation durch eine kurzfristige Inositoltrisphosphat-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums zu einem initialen Ca²⁺-Peak (ADAMS *et al.*, 1989; NILIUS *et al.*, 1997). Diesem folgt eine länger anhaltende Plateauphase der [Ca²⁺]-Erhöhung, die auf einem Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ durch Kationenkanäle in die EC beruht. Es ist noch nicht vollständig bekannt, über welche Kanäle der Ca²⁺-Einstrom erfolgt (NILIUS *et al.*, 1997). Beschrieben wurden sehr kleine Inositol-tetraphosphat-regulierte Ca²⁺-permeable Ionenkanäle (LÜCKHOFF & CLAPHAM, 1992; NEHER, 1992),

mechanosensitive nicht-selektive (LANSMAN *et al.*, 1987; POPP *et al.*, 1992; NILIUS *et al.*, 1993; HOYER *et al.*, 1996) und Ca^{2+} -selektive Kationenkanäle der TRP-Familie (VACA & KUNZE, 1994; HARTENECK *et al.*, 2000, KÖHLER *et al.*, 2001).

Elektrophysiologisch ist nach Stimulation der EC die Aktivierung eines großen auswärtsgerichteten K^+ -Strom über kalziumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) nachweisbar, wodurch die Zelle hyperpolarisiert wird (JOHNS *et al.*, 1987; FICHTNER *et al.*, 1987; COLDEN-STANFIELD *et al.*, 1987 und 1990; NILIUS *et al.*, 1991 und 1997; RUSKO *et al.*, 1992; IKEUCHI *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1999). Die Zellhyperpolarisation ermöglicht aufgrund des erhöhten elektrochemischen Gradienten den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} (SCHILLING *et al.*, 1989; JACOB, 1990), der die kalziumabhängige Synthese vasodilatierender Substanzen wie NO, PGI_2 und EDHF stimuliert (LÜCKHOFF & BUSSE, 1990). Endotheliale Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle und Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle sind daher für die Synthese vasoaktiver Substanzen des Endothels von großer Bedeutung.

1.2.2 Hämodynamische Endothelstimulation und Ionenkanäle

Die beim Blutfluss auftretende Wandschubspannung (*shear stress*) führt zu einer flussinduzierten Vasodilatation (BUSSE *et al.*, 1985; POHL *et al.*, 1986; KUO *et al.*, 1990; NABEL *et al.*, 1990; BUSSE & FLEMING, 1993), durch die eine adäquate Blutversorgung der Gewebe gewährleistet und die Gefäßwand vor Schädigung durch zu hohe Scherkräfte geschützt wird (DAVIES, 1995; MELKUMYANTS *et al.*, 1995; HOYER *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird durch *shear stress* die Zellproliferation und Genregulationen der EC beeinflusst (FRANGOS *et al.*, 1985; DIAMOND *et al.*, 1989; LEVESQUE *et al.*, 1989; HSIEH *et al.*, 1991; RESNIK *et al.*, 1993). Der Signaltransduktionsmechanismus nach hämodynamischer Stimulation ist nicht so gut charakterisiert wie der nach humoraler Stimulation, aber auch hier spielt die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase und die Aktivierung von Ionenkanälen eine entscheidende Rolle. Als Mechanosensoren für *shear stress* fungieren u.a. endotheliale Ionenkanäle (LANSMAN *et al.*, 1987; POPP *et al.*, 1992; DAVIES, 1995; HOYER *et al.*, 1996). Die mechanische Stimulation durch erhöhte Flussraten und intravasalen Druckanstieg führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch diese

Kanäle (SHEN *et al.*, 1992; FALCONE *et al.*, 1993; HIMMEL *et al.*, 1993; NARUSE & SOKABE, 1993). Ebenso scheint der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel durch Freigabe von Ca^{2+} aus Ryanodin-sensitiven Speichern reguliert zu werden (HOYER *et al.*, 1998). Der Ca^{2+} -Einstrom über endotheliale mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle kann Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle ko-aktivieren (HOYER *et al.*, 1994). Durch den K^+ -Ausstrom wird die Zelle hyperpolarisiert (NAKACHE & GAUB, 1988; OLESEN *et al.*, 1988) und wie in Kapitel 1.2.1. beschrieben der weitere Ca^{2+} -Einstrom ermöglicht. Es liegt also ein positiver Rückkopplungsmechanismus vor (HOYER *et al.*, 1998). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stimuliert die Sezernierung vasodilatierender Substanzen und ist wiederum selbst an der Ionenkanalaktivierung beteiligt.

1.2.3 Vasoaktive Substanzen

Endotheliale Vasodilatoren

Wichtige kurzlebige endotheliale Vasodilatoren sind NO bzw. EDRF, PGI_2 und EDHF.

Stickstoffmonoxid

NO wird als der entscheidende Mediator vasaler Relaxation (PALMER *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1991; BUSSE & FLEMING, 1995) angesehen. NO wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin synthetisiert (MONCADA, 1976; PALMER *et al.*, 1988; NATHAN, 1993). Diese endotheliale Isoform der NO-Synthase ist membrangebunden und bindet in Abhängigkeit von Ca^{2+} reversibel Calmodulin (POLLOCK *et al.*, 1991; HECKER *et al.*, 1994). Die basale Synthese kann wie in Kapitel 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben durch humorale Substanzen (z.B. Thrombin, ATP) und verstärkte Wandschubspannung (POHL *et al.*, 1986; RUBANYI *et al.*, 1986) in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess gesteigert werden (LÜSCHER, 1990; NEWBY & HENDERSON, 1990; BUSSE *et al.*, 1993). Vom Endothel sezerniertes NO bindet in den VSMC der Gefäßwand an die zytosolische Guanylatzyklase, cGMP steigt intrazellulär an und aktiviert Proteinkinasen, wodurch weitere Phosphorylierungsschritte stattfinden. Durch diese werden unter anderem der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel reguliert und K^+ -Kanäle aktiviert (MACKIE *et al.*, 1986; MACMILLAN-CROW *et al.*, 1994). Die VSMC

hyperpolarisieren, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden inaktiviert, und die freie Ca^{2+} -Konzentration sinkt (WALSH *et al.*, 1995), wodurch die Kontraktionsabnahme und Gefäßerweiterung induziert wird (HASSID, 1986). Eine direkte Aktivierung der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle durch NO wurde postuliert (BOLOTINA *et al.*, 1994; KOH *et al.*, 1995). Die daraus resultierende Hyperpolarisation führe wiederum zur Relaxation. Zusätzlich aktiviert NO die Guanylatzyklase, hemmt die Plättchenaggregation und -adhäsion und wirkt inhibitorisch auf die Proliferation der VSMC (WALTER, 1989; RADOMSKI *et al.*, 1990).

Prostazyklin

Prostazyklin wird unter Beteiligung der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipase A_2 aus Arachidonsäure gebildet (HONG & DEYKIN, 1982). Die Produktion und Freigabe wird ebenfalls durch hämodynamische Kräfte (FRANGOS *et al.*, 1985) und humorale Faktoren (ALHENC-GELAS *et al.*, 1982) gesteigert, so auch durch NO. PGI_2 bindet an membranständige Rezeptoren der VSMC und wirkt über eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration vasodilatierend. Seine Bedeutung liegt in der lokalen Gefäßregulation und Hemmung der Thrombozytenaggregation, nicht in der Regulation des systemischen Blutdrucks (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989).

Endothelialer hyperpolarisierender Faktor

Durch die Freisetzung von EDHF werden in VSMC Kaliumkanäle aktiviert, wodurch über einen Kaliumausstrom eine Hyperpolarisation hervorgerufen wird. Die Hyperpolarisation führt zur Inaktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, das intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ sinkt, und die Gefäßmuskulatur relaxiert (WALSH *et al.*, 1995). EDHF wurde chemisch noch nicht eindeutig identifiziert. Als mögliche EDHF gelten Eikosanoide, die unter Beteiligung von Zytochrom P_{450} Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels sind (FELETOU & VANHOUTTE, 1996; RANDALL *et al.*, 1996; BRAILOIU *et al.*, 1998; MIURA & GUTTERMAN, 1998). Weiterhin zeigen neuere Untersuchungen, dass eine elektrotonische Kopplung von EC und VSMC die Übertragung einer endothelialen Hyperpolarisierung auf die VSMC ermöglicht und somit direkt diese in einer EDHF-ähnlichen Weise hyperpolarisiert (EDWARDS *et al.*, 1999).

1.3 Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (K_{Ca})

Über humorale Faktoren und hämodynamische Prozesse sind Kaliumkanäle in erheblichem Maße an der Regulation des Membranpotentials und der Ca^{2+} -Homöostase in den EC beteiligt, die nicht nur eine wichtige Rolle für die Vasodilatation spielen. Die Expression unterschiedlicher Kaliumkanäle variiert sehr stark unter den einzelnen Endothelzelltypen, möglicherweise auch aufgrund der unterschiedlichen Stadien im Zellzyklus. Unter Zellkulturbedingungen scheinen die meisten EC einwärts-rektifizierende K^+ -Kanäle zu exprimieren, die das Ruhemembranpotential aufrechterhalten (COLDEN-STANFIELD, 1990). Diese werden durch Hyperpolarisation oder *shear stress* aktiviert (HOYER *et al.*, 1991; JACOBS *et al.*, 1995). Daneben wird eine heterogene Gruppe K_{Ca} mit unterschiedlicher Leitfähigkeit, Ca^{2+} -Sensitivität, Spannungsabhängigkeit und Pharmakologie in stark variierender Dichte in verschiedenen EC-Klassen beschrieben, die alle das Membranpotential re- bzw. hyperpolarisieren und an der Gefäßregulation und anderen Endothelfunktionen wie Gefäßproliferation beteiligt sind (KOHN *et al.*, 1995; WIECHA *et al.*, 1998).

Die Einteilung dieser K_{Ca} erfolgt aufgrund der Leitfähigkeiten in drei Untergruppen (BLATZ & MAGLEBY, 1987), den *Maxi* oder *Big* K^+ -Kanal (MK_{Ca} , Gen: Slo) mit einer Leitfähigkeit von 100-300 pS, den *Intermediate* K^+ -Kanal (IK_{Ca} , Gen: IK1 oder sK4) mit 30-50 pS und den *Small* K^+ -Kanal (SK_{Ca} , Gene sK1-3) mit ~ 10 pS.

1.3.1 K_{Ca} mit hoher Leitfähigkeit (*Maxi*- K_{Ca} , MK_{Ca})

Der K_{Ca} mit hoher Leitfähigkeit wird in der vorliegenden Arbeit als **MK_{Ca}** bezeichnet, wenn elektrophysiologische Inhalte beschrieben werden, während das Genprodukt dieses Kanals im molekularbiologischen Zusammenhang **hSlo** genannt wird.

Maxi Kaliumkanäle besitzen eine hohe Selektivität für Kalium mit einem Permeabilitätsverhältnis von $P_{\text{K}} : P_{\text{Na}} = 1:0.01$ (LATORRE *et al.*, 1989; HOYER *et al.*, 1996). Ihre Aktivität wird durch die intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} und insbesondere durch das Membranpotential reguliert. Zusätzlich wird die Kanalaktivität durch die intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP beeinflusst. Agonisten, die die cAMP- und cGMP-Konzentration steigern, erhöhen

dadurch die Kanalaktivität. Ca^{2+} -Konzentrationen und Depolarisation der Zellmembran steigern die Offenwahrscheinlichkeit, K^+ strömt aus der Zelle heraus und diese re- bzw. hyperpolarisiert. Spezifisch inhibiert werden diese Kanäle durch TEA, Iberiotoxin, *d*-Tubocurarin und Charybdotoxin (BARRETT *et al.*, 1982; MILLER *et al.*, 1985; COOKE *et al.*, 1991; DAUT *et al.*, 1994; BARON *et al.*, 1996).

MK_{Ca} sind im vaskulären System in EC und in VSMC beschrieben worden (NILIUS & RIEMANN, 1990; HOYER *et al.*, 1994 und 1996; NELSON & QUALE, 1995). In den VSMC nehmen sie bedeutenden Einfluss auf den Kontraktionszustand der Myozyten (NELSON & QUALE, 1995), da ihre Aktivierung zur Hyperpolarisierung und dadurch zur Relaxation führt. In EC des Schweins wurde der MK_{Ca} mit Hilfe der Patch-clamp-Technik nachgewiesen (NILIUS & RIEMANN, 1990; RUSKO *et al.*, 1992; HOYER *et al.*, 1994). Auch hier spielt er eine wichtige Rolle für die Gefäßregulation. So konnten sowohl die Bradykinin-induzierte als auch die flussinduzierte Vasodilatation durch spezifische Blockade des MK_{Ca} inhibiert werden (COOKE *et al.*, 1991; HARDY *et al.*, 1998).

1.3.2 K_{Ca} mit intermediärer Leitfähigkeit (IK_{Ca})

IK_{Ca} wurden bisher weit weniger gut als der MK_{Ca} untersucht. Sie wurden aber in einigen verschiedenen Zelltypen beschrieben, in denen sie recht unterschiedliche Leitfähigkeiten zeigten. Der IK_{Ca} des Endothels ist Ca^{2+} -sensitiver als der endotheliale MK_{Ca} (LATORRE *et al.*, 1989), leicht einwärts-rektifizierend und insbesondere nicht spannungsabhängig. An Pankreaszellen konnte gezeigt werden, dass der hIK1 durch Charybdotoxin und Clotrimazol inhibiert wird, während er sich durch Apamin, Iberiotoxin und Ketokonazol praktisch gar nicht beeinflussen lässt (ISHII *et al.*, 1997). Des Weiteren wird er durch leicht-flüchtige Anästhetika wie Halothan, Enfluran, Isofluran und Sevofluran schnell und reversibel geblockt (NAMBA *et al.*, 2000).

1.3.3 K_{Ca} mit niedriger Leitfähigkeit (SK_{Ca})

Der *small-conductance* K_{Ca} mit einer Leitfähigkeit von etwa 10 pS (NILIUS *et al.*, 1997) wurde ebenfalls in EC beobachtet (SAKAI, 1990; GROSCHNER *et al.*, 1992; MARCHENKO

& SAGE, 1996). Er ist nicht spannungsabhängig und kann durch extrazelluläre nanomolare Konzentrationen von Apamin geblockt werden (BLATZ & MAGELBY, 1986; GROSCHNER *et al.*, 1992). Im Endothel der Rattenaorta wurden bislang zwei Typen mit Leitfähigkeiten von 9 und 18 pS in symmetrischer K^+ -Lösung (150 mM) und 2,8 bzw. 6,7 pS bei physiologischer extrazellulärer K^+ -Konzentration identifiziert (MARCHENKO & SAGE, 1996). Ebenso wie der IK_{Ca} ist der SK_{Ca} Ca^{2+} -sensitiver als der MK_{Ca} (LATORRE *et al.*, 1989), und seine Aktivierung hyperpolarisiert das Membranpotential (ISHII *et al.*, 1997).

1.3.4 Die Rolle von endothelialen Ionenkanälen bei der Angiogenese

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in großem Maße über speicheroperierte Kationen-Kanäle, mechanosensitive Kationen-Kanäle und sekundär über hyperpolarisierende K^+ -Kanäle reguliert. Eine wichtige Rolle spielt die Aktivität der K_{Ca} , die durch die Hyperpolarisation der Zelle die elektrochemische Triebkraft für einen Ca^{2+} -Einstrom bereitstellen. Die Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sich an der Regulation der Sekretion von Wachstumsfaktoren wie PDGF oder TGF- β , des Umbaus des Zytoskeletts und der Genexpressionkontrolle (BUSSE & FLEMING, 1993; COLE *et al.*, 1994; NILIUS, 1998). Während der Angiogenese wirken die endothelialen Ionenkanäle und die Ca^{2+} -Homöostase an der Gefäßbildung mit Endothelzellproliferation, -migration und -aussprossung als Antwort auf angiogenetische Faktoren mit (KOHN *et al.*, 1995; WIECHA *et al.*, 1998). An kultivierten Endothelzellen zeigte sich eine Beteiligung speichergesteuerter Ca^{2+} -permeabler Kanäle an endothelialen Formveränderungen bzw. an der Endothelzellproliferation (MOORE *et al.*, 1998). Durch Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms konnte die Zellproliferation und die Tubulusformation gehemmt werden (KOHN *et al.*, 1995).

1.4 Fragestellung

K_{Ca} spielen insbesondere über die Regulation des Membranpotentials und der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase eine wichtige Rolle in der Kontrolle endothelialer Funktionen wie der Regulation des Gefäßtonus. Welche Rolle diese Kanäle bei der Zellproliferation spielen, wurde bisher nicht näher untersucht bzw. fast ausschließlich unter künstlichen Zellkulturbedingungen betrachtet. Durch Zellisolation und Kulturbedingungen verändern sich jedoch die Eigenschaften von EC und die hoch differenzierte Funktionalität des Endothels in Blutgefäßen kann nicht genau wiedergeben werden.

Wir etablierten eine Methode für Einzelzell-RT-PCR in Kombination mit der Patch-clamp-Technik zur Charakterisierung der K_{Ca} einzelner Endothelzellen von intakten humanen Mesenterialarterien (HMAEC). Diese Kombination erlaubt eine simultane Analyse der Genexpression und der Ionenkanalfunktionen *in situ*, ohne dass Veränderungen durch Zellisolation und –kultur auftreten. Es ist noch nicht bekannt, welche K_{Ca} -Subtypen tatsächlich *in situ* im Endothel exprimiert werden, daher erschien es uns sinnvoll, einen molekularbiologischen und funktionellen Nachweis von K_{Ca} am intakten Endothel zu bringen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die Expression und Funktion K_{Ca} bei Tumorerkrankungen verändert. Es konnte an T-Lymphozyten gezeigt werden, dass K_{Ca} die Zellproliferation regulieren (LOGSDON *et al.*, 1997; JENSEN *et al.*, 1999). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Kanäle auch eine Rolle bei der Endothelzellproliferation im Rahmen von angiogenetischen Prozessen spielen. In dieser Arbeit wurde daher eine Vergleichsstudie zwischen den EC aus dem tumornahen Gefäßbaum der Mesenterialarterien von Patienten mit einem Adenokarzinom des Kolons (Tumorpatienten) und den HMAEC einer Kontrollgruppe aus Patienten, bei denen aufgrund einer vorhergegangenen unspezifischen Darmentzündung bei Divertikelbildung (Divertikulitis) eine Kolonresektion vorgenommen wurde, durchgeführt.

Es ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

1. Welche K_{Ca} können in den HMAEC mit der Patch-clamp-Technik nachgewiesen werden?
2. Welche K_{Ca} -Gene werden in diesen Zellen exprimiert?
3. Korrelieren die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungsmethoden?
4. Bestehen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Adenokarzinom des Kolons in der Funktion und Expression von K_{Ca} ?