

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Endothelzellen nach der Gefäßpräparation

Die Patch-clamp- und molekularbiologischen Untersuchungen wurden an intakten Endothelzellen (HMAEC) durchgeführt. Als Folge der oben beschriebenen enzymatischen Vorbehandlung mit Trypsin rundeten sich einzelne HMAEC von der luminalen Seite des Gefäßpräparates ab. Dieser Vorgang war unter dem Mikroskop deutlich zu beobachten. Die Zellen konnten mit der *Patchpipette* direkt erreicht, elektrophysiologisch untersucht und anschließend für molekularbiologische Analysen mechanisch von der Gefäßwand abgelöst werden (Abb.3).

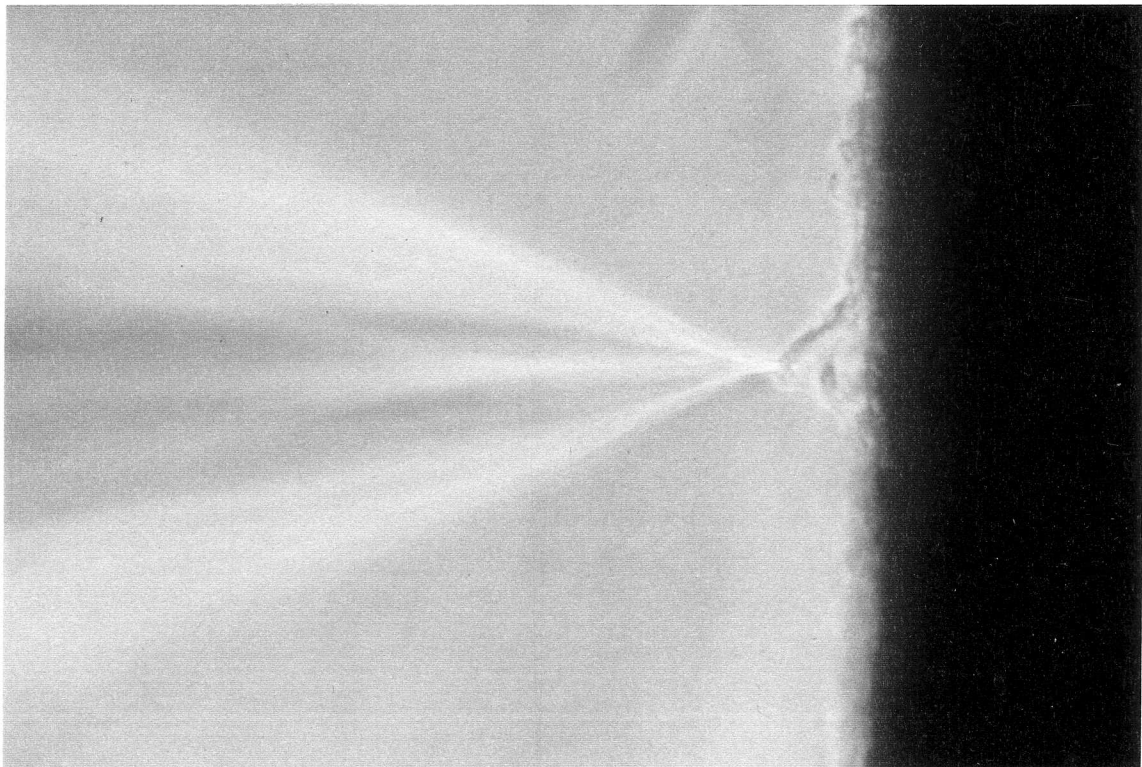


Abb. 3a: Eine einzelne EC wird mit der *Patchpipette* aus dem Endothel gelöst (Vergrößerung 320fach).

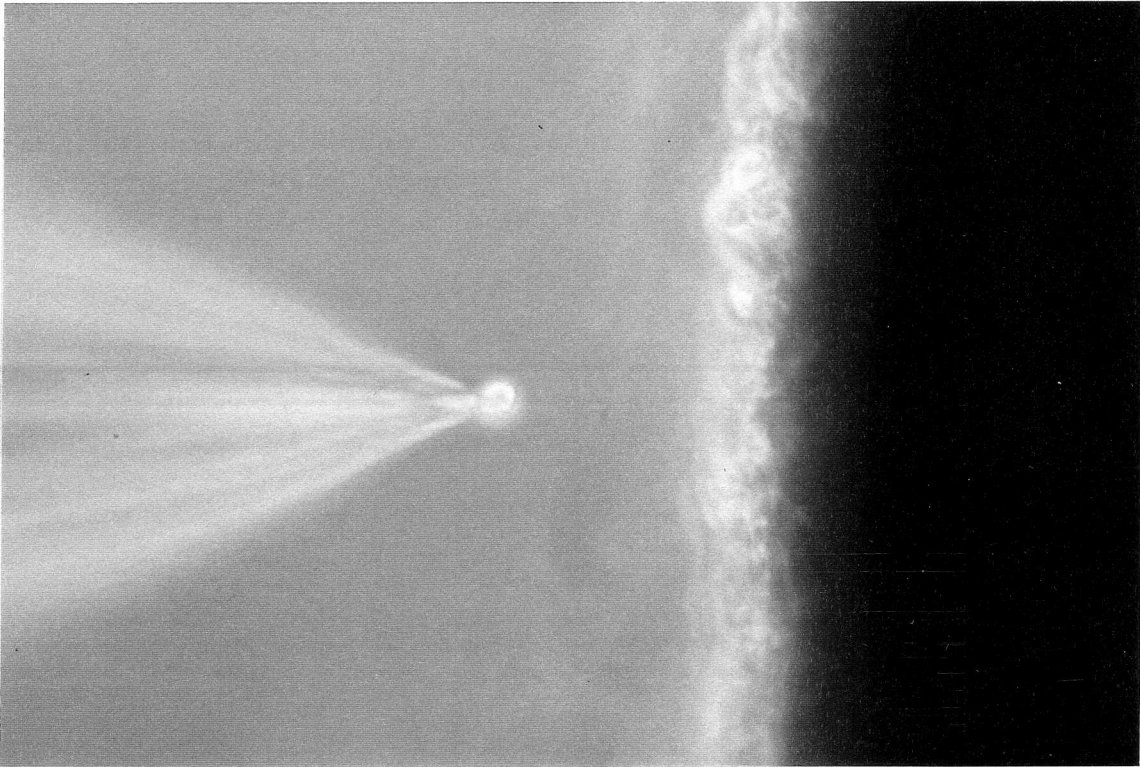


Abb. 3b: Unter Sichtkontrolle wird eine EC aus der Experimentierkammer gezogen.

## 3.2 Einzelzell-RT-PCR des intakten Endothels humaner Mesenterialarterien

### 3.2.1 Identifizierung der Endothelzellen

Insgesamt wurde die Genexpression von 180 einzelnen Endothelzellen frisch isolierter, intakter Mesenterialarterien analysiert. Als spezifischer Marker der RT-PCR-Produkte von Endothelzellen wurde die Genexpression des von Willebrand-Faktors (vWF) gewählt, welcher in 146 von 180 Proben (81%) erschien und somit eine hohe Ausbeute an Endothelzellen aufzeigte (Abb. 4).

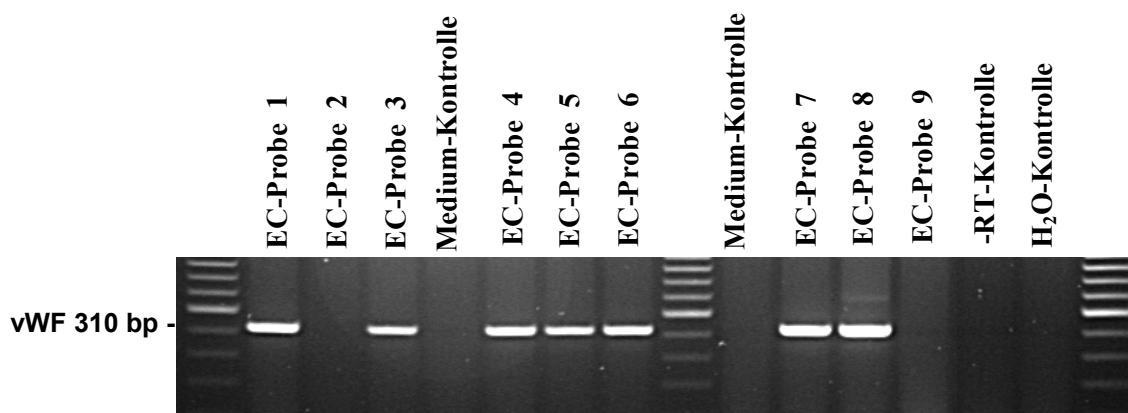


Abb. 4: Ethidiumbromid-gefärbtes Gel mit 9 verschiedenen einzelnen Endothelzellproben humaner Mesenterialarterien. Nachgewiesen wurde die Expression des von Willebrand-Faktors (vWF bei 310 Basenpaaren) mittels Einzelzell-RT-PCR. Als Negativkontrollen wurden Medium-, nicht revers transkribierte Zell- und Wasserproben in die PCR eingeschlossen.

Die 34 vWF-negativen Zellen ergaben keinerlei PCR-Produkte. Sie erklären sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den Verlust der HMAEC während der Überführung aus dem Experimentierbad in das RT-Reaktionsgefäß und lassen keine Kontamination mit anderen Zelltypen vermuten. Die Einzelzell-RT-PCR weist eine sehr hohe Sensitivität, jedoch auch eine große Vulnerabilität gegenüber kleinsten Kontaminationen auf. Jede minimale Verunreinigung mit nicht-endotheliale Zellmaterial könnte zu falsch-positiven RT-PCR-Signalen führen. Um solche systematischen Kontaminationen auszuschließen, enthielt jede fünfte Probe Medium aus der unmittelbaren Nähe der Gefäßoberfläche. Keine der insgesamt 48 Mediumkontrollen ergab ein positives PCR-Signal.

Als weiterer EC-Marker wurden Primer der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in der *Multiplex*-RT-PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt der eNOS konnte in 62 von 77 vWF-positiven Zellen (80%) nachgewiesen werden (in 81% der Proben von Karzinompatienten bzw. in 79% der Proben von der Kontrollgruppe) (Abb. 5).

Die Isolation glatter Gefäßmuskelzellen bzw. eine Kontamination mit mRNA geschädigter Muskelzellen wurde ausgeschlossen, indem bei jeder *Multiplex*-RT-

PCR auch die Expression von *Myosin-heavy-chain* (MyHC) als Marker für glatte Gefäßmuskelzellen überprüft wurde. Eine Expression von MyHC wurde in keiner Zellprobe nachgewiesen (0/180).

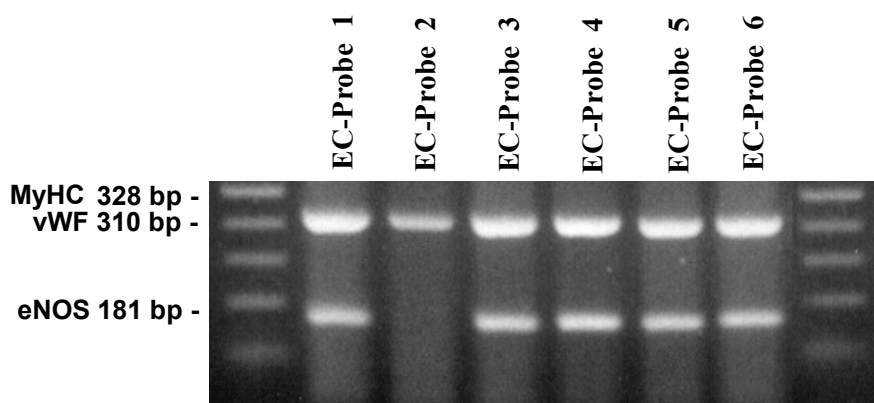


Abb. 5: Ethidiumbromid-gefärbtes Gel mit PCR-Amplifikaten einzelner HMAEC, in denen durch *Multiplex*-RT-PCR die Ko-Expression von vWF (310 bp) und eNOS (181 bp) zu erkennen ist. Eine Expression von MyHC (328 bp) wurde nicht festgestellt.

### 3.2.2 Expression kalziumaktivierter Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ )

Mittels der *Multiplex*-RT-PCR wurde die cDNA für die humanen  $K_{Ca}$ -Gene hIK1 und hSlo mit vWF ko-amplifiziert, um die Expression dieser Kanäle in den HMAEC nachzuweisen. In den Proben aller Patienten zeigte sich hIK1 als das überwiegend exprimierte  $K_{Ca}$ -Gen. Die hIK1-Expression wurde in 41 von 146 (28%) vWF-positiven Zellen detektiert, während die Expression des hSlo in nur 11 von 146 (7%) Zellproben nachgewiesen wurde. Interessanterweise zeigte sich dabei das hSlo-Signal nur in hIK1-positiven Zellen von Tumorpatienten.

Ein Gel mit der Expression von hIK1 und hSlo ist in der Abb. 10 zu sehen.

### 3.3 Elektrophysiologische Identifizierung von $K_{Ca}$ in einzelnen HMAEC

Vor den Einzelzell-RT-PCR-Analysen wurden Ganzzell-patch-clamp-Untersuchungen an elektrisch nicht gekoppelten einzelnen HMAEC durchgeführt, um die Kanalfunktionen von  $K_{Ca}$  zu charakterisieren. Teilweise konnten vor diesen Untersuchungen Membranpotential-Messungen stattfinden und die Regulation des Membranpotentials durch die Aktivität von  $K_{Ca}$  bestimmt werden.

#### 3.3.1 Ganzzellstromableitung

Zur Identifizierung der  $K_{Ca}$ -Ströme wurden die Zellen mit einer KCl-Pipettenlösung, die  $13 \mu\text{mol/l}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$  enthielt, dialysiert. In einem Teil der HMAEC führte dies zur Aktivierung eines hyperpolarisierenden  $\text{K}^+$ -Auswärtsstroms.

Das aus Strom-Spannungskurven ermittelte Umkehrpotential ( $E_{\text{Rev}}$ ) verschob sich in die Richtung des Kaliumruhepotentials. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $E_{\text{Rev}}$  lag in der Kontrollgruppe bei  $-39 \pm 5 \text{ mV}$  ( $n=7$ ) und in der Gruppe der Tumorpatienten bei  $-49 \pm 2 \text{ mV}$  ( $n=9$ ,  $P=0.08$ ) (Abb. 6).

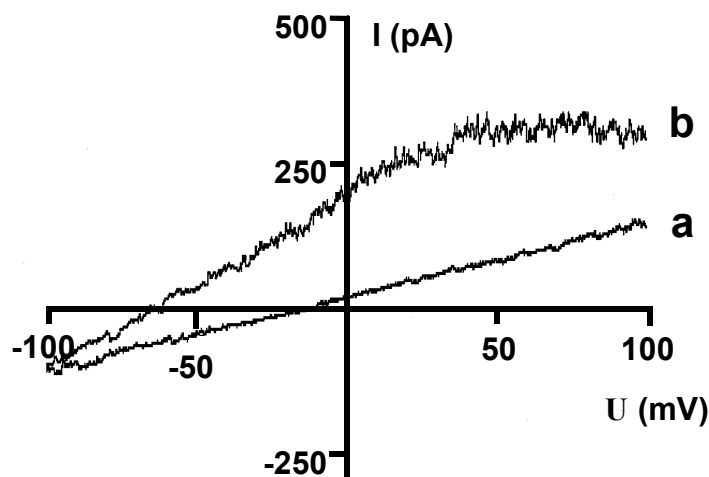


Abb. 6: Ganzzellstromableitung einer HMAEC eines Tumorpatienten. Der unstimulierte Ganzzellstrom a wurde direkt nach der Zellmembranruptur gemessen. Strom b zeigt die Zellhyperpolarisation 15 Sekunden später, die durch die Pipettenlösung mit  $13 \mu\text{mol/l}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$  und der damit verbundenen  $K_{Ca}$ -Aktivierung induziert wurde. (Pipettenlösung: KCl 135 mmol/l; Badlösung: KCl 4,5 mmol/l, NaCl 137 mmol/l).

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Zellstrom erwies sich als kaliumselektiv, da die Verschiebungen des Umkehrpotentials abhängig von der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration waren (Abb. 7).

In symmetrischen  $\text{K}^+$ -Lösungen zeigte sich darüber hinaus, dass der  $\text{K}^+$ -Strom in einem Spannungsbereich von  $-100$  bis  $+100$  mV leicht einwärts rektifiziert.

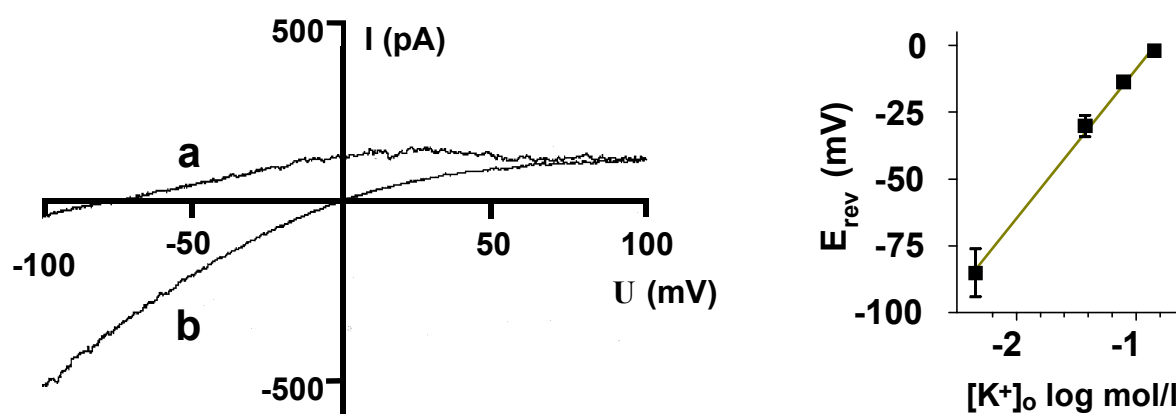


Abb. 7:  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Ganzzellstrom einer HMAEC eines Tumorpatienten mit einer  $4,5 \text{ mmol/l K}^+$ -Badlösung (a, links) und einer  $140 \text{ mmol/l K}^+$ -Badlösung (b, links). Umkehrpotentialverschiebungen waren abhängig von der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration (rechts). Jeder Punkt präsentiert ein Umkehrpotential von  $I_{\text{Ca}}$  bei bestimmten  $\text{K}^+$ -Konzentrationen, gemessen in HMAEC mit niedrigen nicht-selektiven und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Basalströmen.

Die Messungen der kalziumaktivierten  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Ströme, die bei einem Haltepotential von  $0 \text{ mV}$  und unter Verwendung einer Badlösung mit  $4,5 \text{ mmol/l K}^+$  und einer Pipettenlösung mit  $140 \text{ mmol/l K}^+$  durchgeführt wurden, ergaben bezogen auf die Zellkapazität Werte von  $12 \pm 2 \text{ pA/pF}$  in der Kontrollgruppe ( $n=7$ ) und  $16 \pm 4 \text{ pA/pF}$  in der Gruppe der Tumorpatienten ( $n=9$ ) ( $P=0.53$ ).

Die Zellkapazität der HMAEC, die durch Abgleich der kapazitiven Ströme errechnet wurde und als Maß für die Größe der Gesamtmembranfläche dient, unterschieden

sich in den untersuchten Gruppen nicht voneinander. Sie lagen in der Kontrollgruppe bei  $20 \pm 4$  pF (n=7) und in der Gruppe der Tumorpatienten bei  $22 \pm 2$  pF (n=9).

### 3.3.2 Blockersubstanzen

#### 3.3.2.1 Charybdotoxin

Charybdotoxin (CTX), das Toxin des Skorpions *Leirus quinquestriatus*, ist ein spezifischer Blocker von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanälen und inhibiert sowohl hK1 als auch MK (Abb. 8). Die Zellströme wurden in sechs Experimenten durch die Zugabe von 100 nmol/l CTX vollständig geblockt (n=6).

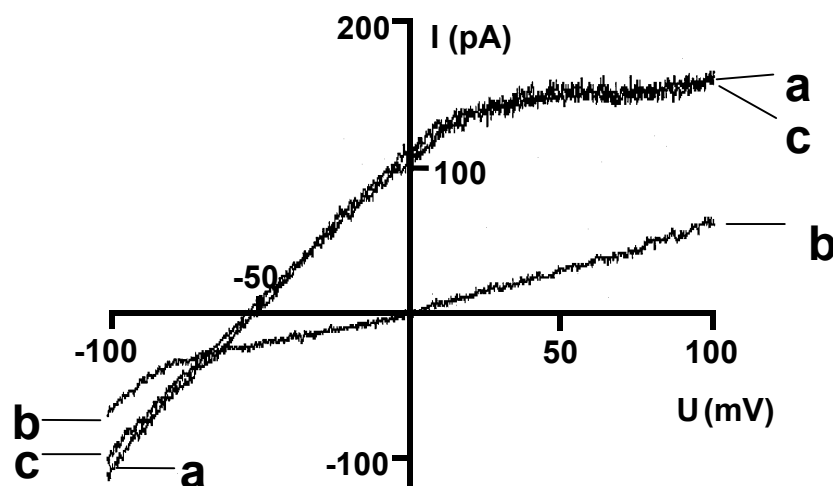


Abb. 8: Ganzzellstromableitung einer HMAEC eines Tumorpatienten. Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Auswärtsstroms durch CTX. a : in Abwesenheit von CTX, b : nach Zugabe von 100 nmol/l CTX und c : nach Auswaschen von CTX.

#### 3.3.2.2 Clotrimazol

Clotrimazol (CLT) ist ein selektiver Blocker von hK1. Die Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  reduzierte in drei Experimenten den Auswärtsstrom um 90% (Abb. 9).

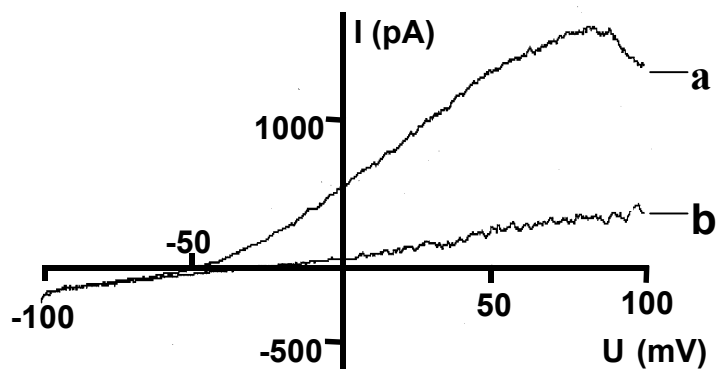


Abb. 9: Ganzzellstromableitung einer HMAEC. Der Strom in a wurde in Abwesenheit von CLT gemessen. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  CLT (b) zeigte sich eine Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Auswärtsstroms.

### 3.3.2.3 Apamin

Apamin ist ein spezifischer Inhibitor des *small conductance*  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (SK). Im Gegensatz zu der CTX- und CLT-Zugabe führte die Applikation von Apamin (100 nmol/l) in drei Experimenten zu keiner messbaren Inhibition der Kaliumströme.

### 3.3.3 Vergleich von Patch-clamp- und RT-PCR-Ergebnissen auf der Einzelzellebene

Im Anschluss an die Patch-clamp-Untersuchungen wurden Einzelzell-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass alle vWF-positiven Endothelzellen ( $n = 8$ ) mit einem einwärts-rektifizierenden kalziumabhängigen Kaliumstrom auch ein positives hIK1-RT-PCR-Signal zeigten (Abb. 10).

Ebenso zeigten sich in allen HMAEC von Tumorpatienten hSlo-RT-PCR-Signale, in denen vorher hSlo-verwandte Ganzzellströme gemessen worden waren (Abb. 10).



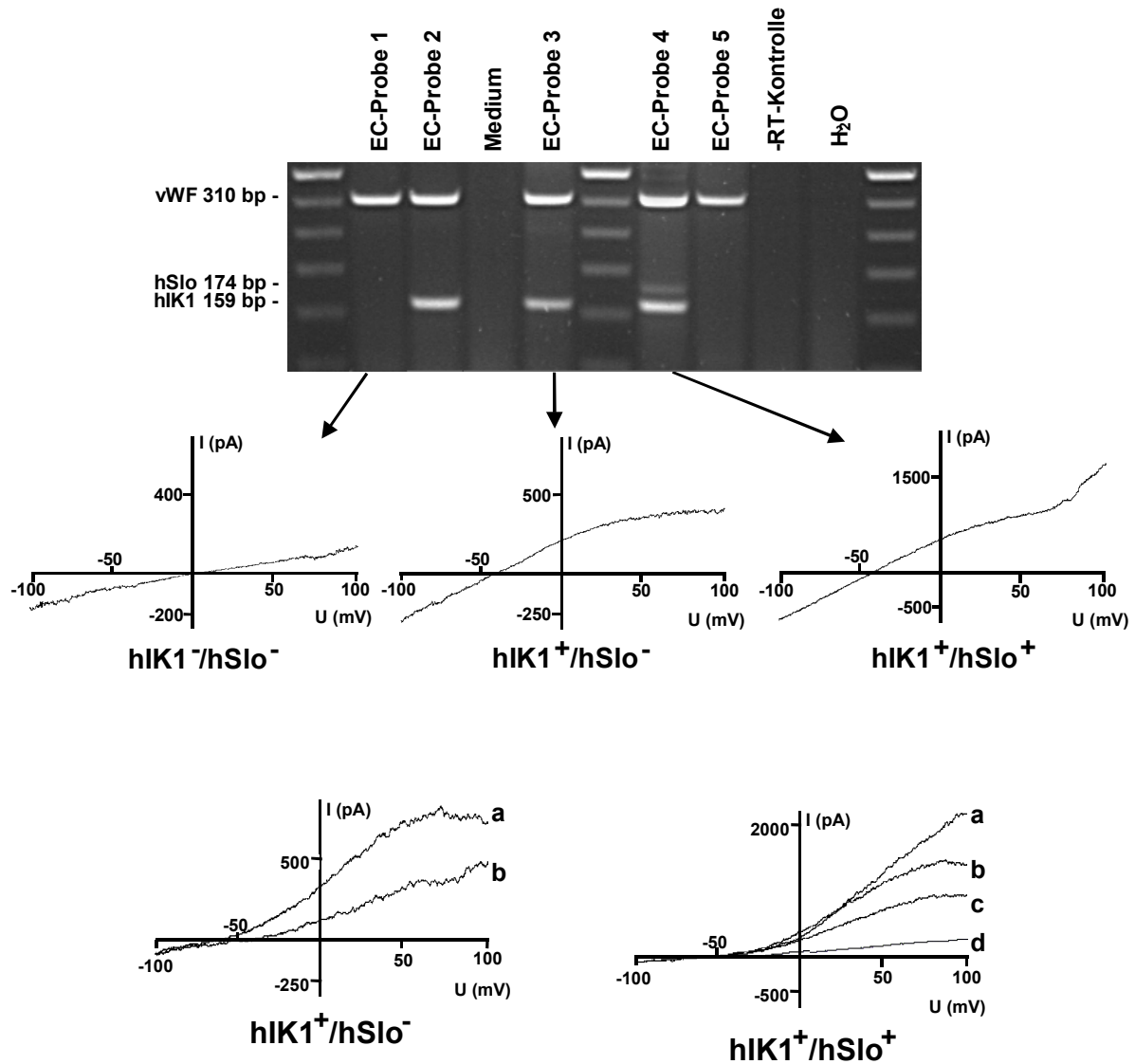


Abb. 10: Ethidiumbromid-gefärbtes Gel mit der Expression von  $K_{Ca}$  einzelner HMAEC der MA von Tumorpatienten (oben) mit korrespondierenden Ganzzellströmen (Mitte). Links zeigt sich eine negative hIK1-mRNA-Expression, in der Mitte eine positive hIK1- und eine negative hSlo-mRNA-Expression und rechts eine positive hIK1- und hSlo-mRNA-Expression, jeweils mit entsprechenden Strommessungen.  $K_{Ca}$ -Ströme einer anderen hIK1-positiven und hSlo-negativen HMAEC (unten links), vor (a) und nach (b) Zugabe von 100 nmol/l CLT und einer hIK1- und hSlo-positiven Zelle (unten rechts), vor (a) und nach (b) Zugabe von 100 nmol/l IbTX, gefolgt von 100 nmol/l (c) und 1 μmol/l (d) CLT.

### 3.3.4 Membranpotential-Messungen

In beiden Patientengruppen wurden Membranpotential-Messungen mit der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen *Current-clamp*-Methode durchgeführt, um die Funktionen der  $K_{Ca}$  für die Regulation des Membranpotentials zu charakterisieren. Dabei wurden das Ruhemembranpotential und die durch Agonisten hervorgerufene Zellhyperpolarisation in elektrisch gekoppelten HMAEC der intakten Gefäßwand ermittelt. Das Ruhemembranpotential unterschied sich mit  $-32 \pm 5$  mV in der Gruppe der Tumorpatienten nicht signifikant von der Kontrollgruppe mit  $-28 \pm 5$  mV.

Die extrazelluläre Zugabe von Bradykinin (100 nmol/l) führte in HMAEC beider Patientengruppen zu einer anhaltenden Hyperpolarisation des Zellpotentials (Abb. 11).

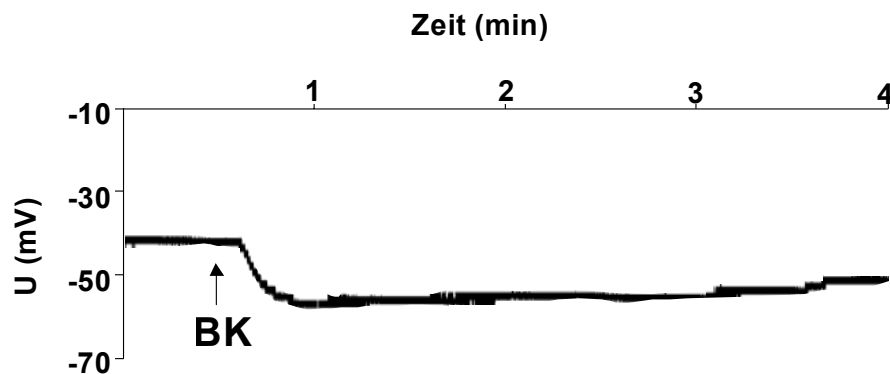


Abb. 11: Messungen des endothelialen Membranpotentials von einem Mesenterialgefäß eines Tumorpatienten. Durch Zugabe von 100 nmol/l Bradykinin hyperpolarisierte das Membranpotential.

### Inhibierung der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation

#### 3.3.4.1 Charybdotoxin

Die Verschiebungen des Membranpotentials waren durch die extrazelluläre Zugabe von 100 nmol/l CTX, einem Blocker von IK und MK, stets vollständig reversibel (n=9) (Abb. 12).

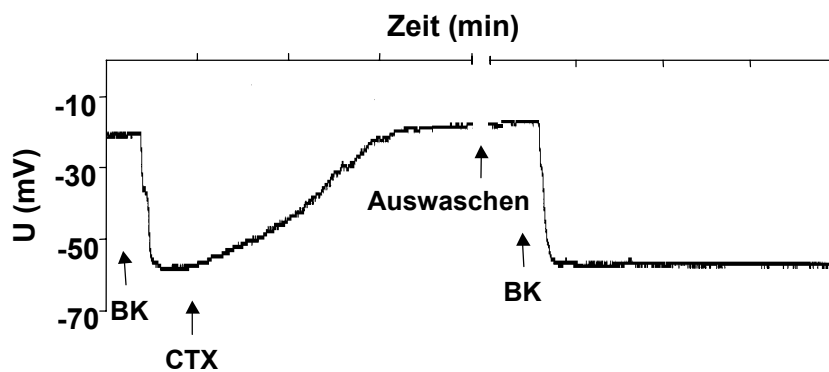


Abb. 12: Membranpotential-Messungen des Endothels. Die Hyperpolarisation des Zellpotentials durch Bradykinin wurde durch die Zugabe von 100 nmol CTX inhibiert, stellte sich aber nach erneuter Bradykinin-Gabe wieder ein.

### 3.3.4.2 Apamin

Die Zugabe von 100 nmol/l Apamin, einem spezifischen Inhibitor des  $SK_{Ca}$ , bewirkte im Gegensatz dazu keine Veränderung des Membranpotentials ( $n=5$ ).

### 3.3.4.3 Clotrimazol und Iberiotoxin

Um den jeweiligen Beitrag von  $hIK1$  und  $hSlo$  zur Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation des Endothels der Mesenterialarterien zu differenzieren, wurden die spezifischen Blocker CLT und IbTX eingesetzt. CLT inhibiert selektiv den  $hIK1$ . Durch die Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  CLT in vier Versuchen wurden Membranpotentialänderungen in gleichem Ausmaß unterdrückt wie durch die Beigabe von CTX, einem Blocker von IK und MK ( $n=4$ ) (Abb. 13).

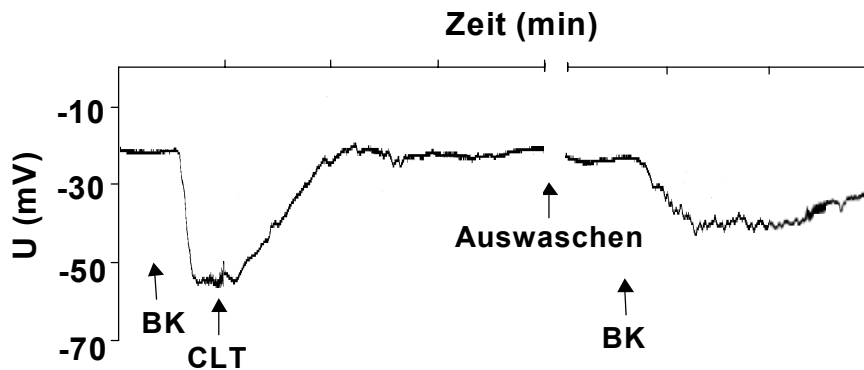


Abb. 13: Membranpotential-Messungen des Endothels. Vollständige Inhibition der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials durch Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  CLT, die wiederum durch Bradykinin reversibel war.

Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe von 100 nmol/l Iberiotoxin, einem selektiven Inhibitor des MK, in vier Versuchen keinen Effekt auf die durch Bradykinin hervorgerufene Hyperpolarisation, obwohl dieser Kanal in den entsprechenden HMAEC von Tumorpatienten exprimiert wurde (Abb. 14).

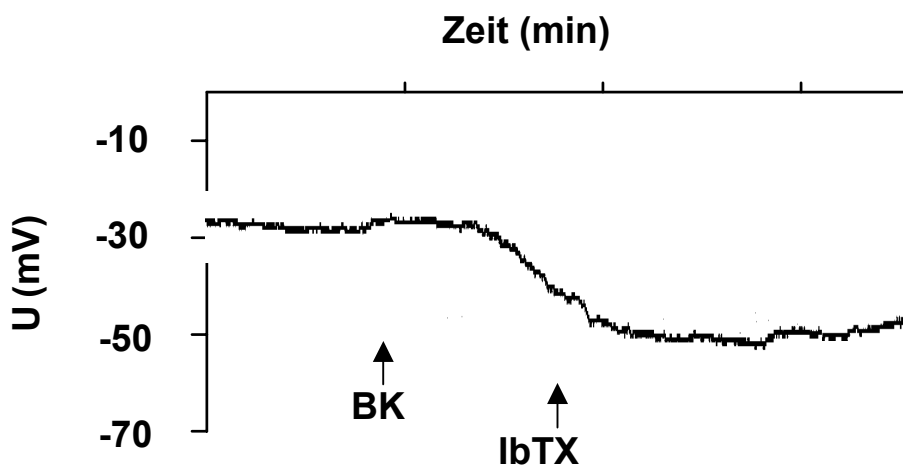


Abb. 14: Membranpotential-Messungen des Endothels. Die Bradykinin-induzierte Zellhyperpolarisation konnte durch Zugabe von 100 nmol/l IbTX nicht inhibiert werden.

### 3.4 Korrelation von Membranpotentialveränderungen und der Expression des hIK1 und hSlo

Der durch die RT-PCR ermittelte Prozentsatz von hIK1-exprimierenden Endothelzellen pro Gefäßpräparat wurde mit der Fähigkeit zur Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation verglichen, um einen funktionellen Zusammenhang zwischen den elektrophysiologischen und RT-PCR-Daten herzustellen. Der Grad der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation korrelierte signifikant mit der Anzahl an hIK1-positiven Zellen, die von dem jeweiligen Gefäßschnitt geerntet wurden (Abb. 15).

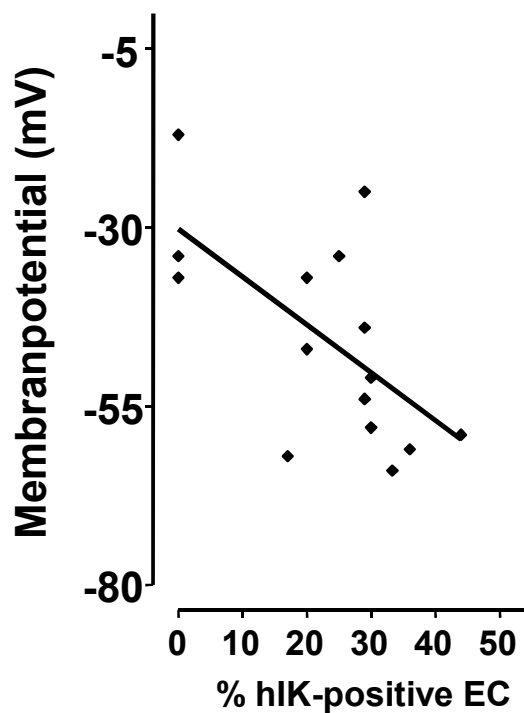


Abb. 15: Korrelation des Membranpotentials mit dem Prozentsatz hIK-positiver HMAEC.  $P < 0,01$ ; Korrelations-Koeffizient  $r^2 = 0,40$ ; Steigung  $-0,68 \pm 0,23$

### 3.5 Vergleichsuntersuchung der Expression von $K_{Ca}$ in Patientengruppen

#### 3.5.1 Expression von $K_{Ca}$

Die Expression von  $K_{Ca}$  der Mesenterialarterien von Patienten mit einem Adenokarzinom des Kolons wurden mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Die Expression des hIK1 und des hSlo in einzelnen HMAEC von Mesenterialarterien von acht Tumorpatienten und sieben Patienten der Kontrollgruppe wurde ermittelt. Es zeigte sich eine signifikante ( $P < 0,05$ , Mann-Whitney U-test) Erhöhung an hIK1-positiven HMAEC in den Mesenterialarterien der Karzinom-Patienten (35%; SEM = 4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (14%; SEM = 5) (Abb. 16).

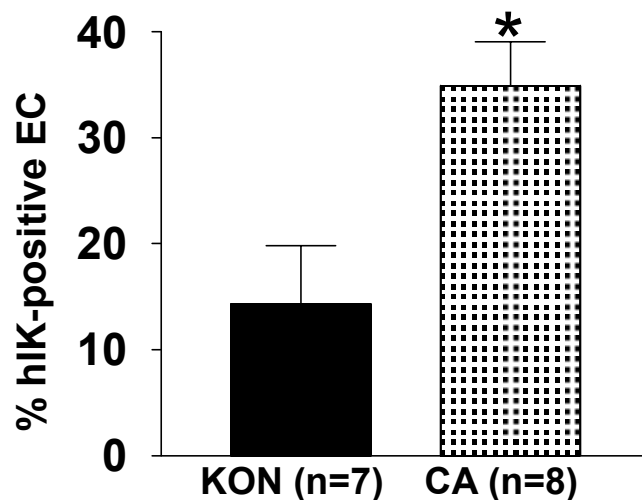


Abb. 16: Expression von hIK1 im Endothel der Mesenterialarterien von Tumorpatienten (CA, n = 8) und einer Kontrollgruppe (KON, n = 7). Der Prozentsatz an hIK1 jedes Gefäßes wurde mit Hilfe positiver hIK1-RT-PCR-Signale der einzelnen HMAEC ermittelt. \* $P < 0,05$

Eine hSlo-Expression konnte ausschließlich in HMAEC von Tumorpatienten (13%) nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe dieser  $K_{Ca}$  nicht zu finden war (Abb. 17).

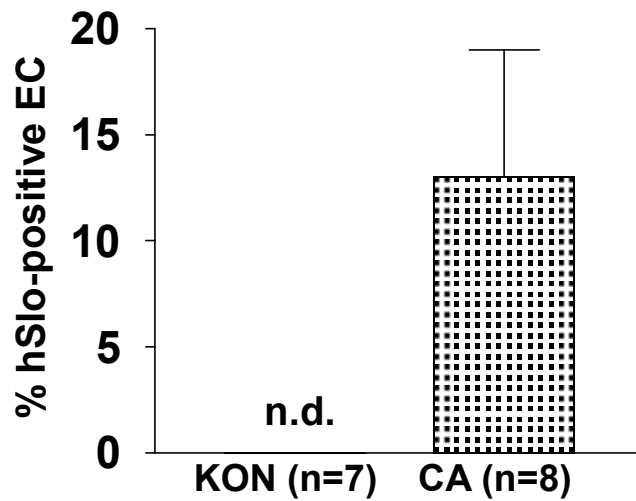


Abb. 17: Expression von hSlo im Endothel der MA von Tumorpatienten (CA, n = 8) und von Patienten der Kontrollgruppe (KON, n = 7), ermittelt durch positive hSlo-RT-PCR-Signale einzelner Endothelzellen. In der Kontrollgruppe wurden keine positiven Signale detektiert.

Außerdem wurde der hSlo nur in hIK1-positiven HMAEC gefunden.

### 3.5.2 Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation

Das Ruhemembranpotential war zwischen beiden Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich (s.3.3.4.). Der Grad der durch extrazelluläre Zugabe von 100 nmol/l Bradykinin induzierten Hyperpolarisation war jedoch bei den Tumorpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Das Membranpotential hyperpolarisierte nach Zugabe von 100 nmol/l Bradykinin um  $-22 \pm 4$  mV in der Gruppe der Tumorpatienten im Vergleich zu  $-8 \pm 3$  mV ( $P < 0.05$ ) in der Kontrollgruppe (Abb. 18).

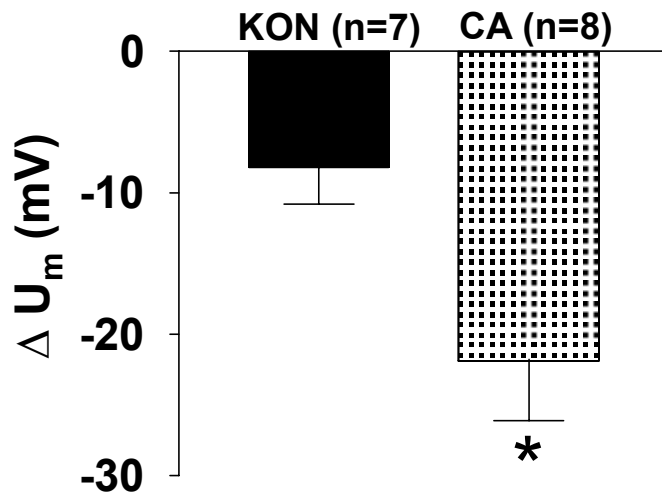


Abb. 18: Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation des Membranpotentials des Endothels der Mesenterialarterien von Tumorpatienten (CA, n = 8) und von Patienten der Kontrollgruppe (KON, n = 7). Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$