

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der freien Universität Berlin
Medizinische Klinik IV
Endokrinologie und Nephrologie
(Leiter: Prof. Dr. W. Zidek)

**Erhöhte Expression und Funktion
 Ca^{2+} -aktivierter K^{+} -Kanäle im Endothel von
Mesenterialarterien
bei Patienten mit Kolonkarzinom**

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

Christiane Irma Degenhardt
Flensburg

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

Korreferent: Prof. Dr. G. Schultz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien
Universität Berlin

Promoviert am: 12.12.2003

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphorsäure
BK	Bradykinin
bp	Basenpaare
cAMP	Adenosin-3':5'-cyclophosphorsäure
[Ca ²⁺]	Kalziumionenkonzentration
cGMP	Guanosin-3':5'-cyclophosphorsäure
CLT	Clotrimazol
CTX	Charybdotoxin
ddNTP	Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle
EC ₅₀	Konzentration, bei der die Kanaloffenwahrscheinlichkeit halbmaximal ist
EDHF	endothelium-derived hyperpolarization factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-Aminoethylether-Tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
E _{Rev}	Umkehrpotential
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
hIK1	Gen des humanen K _{Ca} mit mittlerer (intermediate) Leitfähigkeit
HMAEC	humane Mesenterialarterien-Endothelzelle
hSlo	Gen der α -Untereinheit des humanen K _{Ca} mit hoher Leitfähigkeit
IbTX	Iberiotoxin
I _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter Strom
K _{Ca}	kalziumaktivierte Kaliumkanäle
K _D	Dissoziationskonstante

KON	Kontrollgruppe
MA	Mesenterialarterien
MK	humaner K_{Ca} mit hoher Leitfähigkeit, maxi K_{Ca}
MyHC	Myosin heavy chain, schwere Myosinkette
n.d.	nicht detektiert
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI ₂	Prostazyklin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sK	humaner K_{Ca} mit niedriger (small) Leitfähigkeit
TEA	Tetraethylamonium
T-Zelle	thymusabhängige Lymphozyten
VSMC	vascular smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle
vWF	von Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Patch-clamp-Konfigurationen und ihre Herstellung.....	23
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	24
Abb. 3a:	Eine einzelne EC wird mit der <i>Patchpipette</i> aus dem Endothel gelöst.....	35
Abb. 3b:	Unter Sichtkontrolle wird eine EC aus der Experimentierkammer gezogen.....	36
Abb. 4:	Gel mit vWF-Expression einzelner Endothelzellproben humaner Mesenterialarterien.....	37
Abb. 5:	Gel mit PCR-Amplifikaten einzelner HMAEC mit Ko-Expression von vWF und eNOS.....	38
Abb. 6:	Ganzzellstromableitung einer HMAEC eines Tumorpatienten mit Zellhyperpolarisation durch Ca^{2+} -Pipettenlösung.....	39
Abb. 7:	Ca^{2+} -aktivierte Ganzzellströme einer HMAEC eines Tumorpatienten in Abhängigkeit von der extrazellulären K^{+} -Konzentration.....	40
Abb. 8:	Ganzzellstromableitung einer HMAEC eines Tumorpatienten mit Inhibition durch CTX.....	41
Abb. 9:	Ganzzellstromableitung einer HMAEC mit Inhibition durch CLT.....	42
Abb. 10:	Gel mit K_{Ca} -Expression und korrespondierende Ganzzellstromableitungen einzelner HMAEC von Tumorpatienten.....	43
Abb. 11:	Membranpotential-Messungen mit Bradykinin-induzierter Hyperpolarisation.....	44
Abb. 12:	Membranpotential-Messungen mit Bradykinin-induzierter Hyperpolarisation und Inhibition durch CTX.....	45
Abb. 13:	Inhibition der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials durch CLT.....	46
Abb. 14:	Membranpotential-Messungen mit Bradykinin-induzierter Zellhyperpolarisation und Zugabe von IbTX.....	46
Abb. 15:	Korrelation des Membranpotentials mit dem Prozentsatz hIK-	

	positiver HMAEC	47
Abb. 16:	Expression von hIK1 im Endothel der Mesenterialarterien von Tumorpatienten und der Kontrollgruppe	48
Abb. 17:	Expression von hSlo im Endothel der Mesenterialarterien von Tumorpatienten und der Kontrollgruppe	49
Abb. 18:	Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation des Membranpotentials des Endothels der Mesenterialarterien von Tumorpatienten und der Kontrollgruppe	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Pipettenlösungen	25
Tab. 2:	Badlösungen	26
Tab. 3:	Primer und ihre Sequenzen	28
Tab. 4:	<i>Nested</i> -Primer und ihre Sequenzen	29
Tab. 5:	Charakteristika der einzelnen Patienten	31

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Endothelfunktionen.....	10
1.2	Regulation des Gefäßtonus.....	10
1.2.1	Humorale Endothelstimulation und Ionenkanäle.....	11
1.2.2	Hämodynamische Endothelstimulation und Ionenkanäle.....	12
1.2.3	Vasoaktive Substanzen	
	Endotheliale Vasodilatoren.....	13
1.3	Ca ²⁺ -abhängige K ⁺ -Kanäle (K _{Ca}).....	15
1.3.1	K _{Ca} mit hoher Leitfähigkeit (Maxi-K _{Ca} , MK _{Ca}).....	15
1.3.2	K _{Ca} mit intermediärer Leitfähigkeit (IK _{Ca}).....	16
1.3.3	K _{Ca} mit niedriger Leitfähigkeit (SK _{Ca}).....	17
1.3.4	Die Rolle von endothelialen Ionenkanälen bei der Angiogenese.....	17
1.4	Fragestellung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Untersuchungsmaterial.....	20
2.1.1	Präparation.....	20
2.1.2	Enzymatische Vorbehandlung.....	21
2.1.3	Kombination der Patch-clamp-Technik mit molekularbiologischen Nachweismethoden.....	21
2.2	Patch-clamp-Untersuchungen.....	21
2.2.1	Patch-clamp-Konfiguration.....	22
2.2.2	Patchpipetten und Elektroden.....	23
2.2.3	Apparativer Versuchsaufbau.....	24
2.2.4	Datenaufzeichnung.....	25
2.2.5	Datenauswertung.....	25
2.2.6	Lösungen.....	25
2.3	Molekularbiologische Untersuchungen.....	26

2.3.1	Gewinnung einzelner Endothelzellen	26
2.3.2	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	27
2.3.2.1	Reverse Transkription (RT)	27
2.3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.3.2.3	Sequenzierung	30
2.4	Tumorpatienten und Kontrollgruppe	31
2.5	Statistische Auswertung	32
2.6	Chemikalien	32
2.7	Geräte und Materialien	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Endothelzellen nach der Gefäßpräparation	35
3.2	Einzelzell-RT-PCR des intakten Endothels humaner Mesenterialarterien	36
3.2.1	Identifizierung der Endothelzellen	36
3.2.2	Expression kalziumaktivierter Kaliumkanäle (K_{Ca})	38
3.3	Elektrophysiologische Identifizierung von K_{Ca} in einzelnen HMAEC	39
3.3.1	Ganzzellstromableitungen	39
3.3.2	Blockersubstanzen	41
3.3.2.1	Charybdotoxin	41
3.3.2.2	Clotrimazol	41
3.3.2.3	Apamin	42
3.3.3	Vergleich von Patch-clamp- und RT-PCR-Ergebnissen auf der Einzelzellebene	42
3.3.4	Membranpotential-Messungen	44
	Inhibierung der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation	
3.3.4.1	Charybdotoxin	44
3.3.4.2	Apamin	45
3.3.4.3	Clotrimazol und Iberiotoxin	45

3.4	Korrelation von Membranpotentialveränderungen und der Expression des hIK1 und hSlo	47
3.5	Vergleichsuntersuchung der Expression von K_{Ca} in Patientengruppen	48
3.5.1	Expression von K_{Ca}	48
3.5.2	Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation	49
4	Diskussion	51
4.1	Zur Methodik	51
4.2	Elektrophysiologische Untersuchung von K_{Ca}	53
4.2.1	Ganzzellstromableitungen	53
4.2.2	Membranpotential-Messungen am intakten Endothel	55
4.2.3	Vergleich der elektrophysiologischen Ergebnisse der Patientengruppen	56
4.3	Molekularbiologische Untersuchung von K_{Ca}	56
4.3.1	Identifizierung der Endothelzellen	56
4.3.2	Expression von K_{Ca} und deren Korrelation mit Membranpotentialveränderungen	57
4.4	Funktion und Expression von K_{Ca} bei Tumorpatienten	58
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung	76
8	Lebenslauf und Publikationen	77

5 Zusammenfassung

Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle (K_{Ca}) nehmen eine bedeutende Rolle in der Kontrolle endothelialer Funktionen wie der Regulation des Gefäßtonus und der Zellproliferation ein. In der vorliegenden Studie wurde eine Methode für die Einzelzell-RT-PCR-Analyse in Kombination mit der Patch-clamp-Technik etabliert, um die Expression und Funktion von K_{Ca} einzelner Endothelzellen innerhalb des Zellverbandes von intakten humanen Mesenterialarterien (MA) *in situ* zu charakterisieren. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit geprüft, ob sich die K_{Ca}-Expression und -Funktion im Endothel in erkranktem Gewebe verändert, wofür ein Vergleich der MA von Patienten mit einem Adenokarzinom des Kolons (Tumorpatienten) und der einer Kontrollgruppe mit inaktiver Divertikulitis durchgeführt wurde.

Mittels kombinierter Patch-clamp-Messungen und molekularbiologischen Untersuchungen konnten K_{Ca}-Ströme identifiziert und charakterisiert werden, die auf der Expression des K_{Ca}-Gens hIK1 beruhten. Die Expression und Funktion von hIK1 war jedoch auf eine Subpopulation der Endothelzellen beschränkt. Dieses heterogene Funktions- und Expressionsprofil könnte auf eine Spezialisierung einzelner Zellen innerhalb der Endothelzellschicht hindeuten.

In den Endothelzellen der Tumorpatienten war die hIK1-Expression signifikant um das Zweieinhalbfache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Ausschließlich bei Tumorpatienten und lediglich in hIK1-positiven Zellen konnte zusätzlich der MK_{Ca} elektrophysiologisch nachgewiesen und eine dazu korrespondierende Expression des K_{Ca}-Gens hSlo detektiert werden. Die Expression der beiden Kanäle könnte miteinander gekoppelt sein.

Die erhöhte K_{Ca}-Expression in den HMAEC der Tumorpatienten führte zu einer 2,7-fach gesteigerten Bradykinin-induzierten endothelialen Hyperpolarisation des Membranpotentials im Vergleich zur Kontrollgruppe, so dass wiederum eine Korrelation von RT-PCR- und Patch-clamp-Daten zu erkennen war. Die Hyperpolarisation wurde nur durch Blockade des hIK1 und nicht des MK beeinflusst.

Die gesteigerte Expression und Funktion von K_{Ca} lässt eine veränderte Funktion des Endothels in MA von Tumorpatienten annehmen und könnte eine wichtige Rolle bei

Angiogeneseprozessen spielen und möglicherweise einen neuartigen therapeutischen Angriffspunkt bilden.

7 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Joachim Hoyer sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung, die anregenden und hilfreichen Diskussionen und die Durchsicht des Manuskriptes danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralf Köhler, der die tägliche Betreuung dieser Arbeit mit großem Einsatz geleistet hat. In jeder noch so kritischen Situation hat er mit immer neuen Ideen und Hilfestellungen geduldig zum Gelingen dieser Arbeit, aber auch zur freundschaftlichen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. N. Runkel (Abteilung für Chirurgie des UK Benjamin Franklin) möchte ich für die Zusammenarbeit und Bereitstellung von humanen Kolonresektaten zur Entnahme von Mesenterialarterien danken.

Danken möchte ich auch Meike Kühn für die intensive und gute Zusammenarbeit und den ständigen Motivationsaufbau bis zum Vollenden dieser Arbeit.