

**EINFLUSS DES PHOSPHODIESTERASE-TYP-5  
INHIBITORS SILDENAFIL AUF DEN  $\text{Ca}^{2+}$   
-AKTIVIERTEN  $\text{K}^+$ -KANAL MIT GROßER  
LEITFÄHIGKEIT IN HUMANEN ENDOTHELZELLEN**

**DÖRTE WIEBKE LÜDDERS**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Einfluss des Phosphodiesterase-Typ-5 Inhibitors Sildenafil  
auf den Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanal mit großer Leitfähigkeit  
in humanen Endothelzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dörte Wiebke Lüdders**  
aus Cloppenburg

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
**Medizinische Klinik I**  
**Abteilung für Kardiologie und Angiologie**  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Waldecker

Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 18.01.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Funktion des Endothels	5
1.2	Elektrophysiologie der Endothelzelle	6
1.2.1	Rolle von Calcium in der Endothelzelle	6
1.2.2	Ionenkanäle in der Endothelzelle	6
1.3	Der „second messenger“ cGMP	8
1.3.1	Funktion und Regulierung von cGMP in der Zelle	8
1.3.2	Abbau des cGMPs durch Phosphodiesterasen	9
1.3.3	PDE5 und sein spezifischer Inhibitor Sildenafil	9
1.4	Fragestellung	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Zellkultur	12
2.2	DIBAC Imaging	13
2.2.1	Vorbereitung der HUVEC	14
2.2.2	Messung	14
2.2.3	Datenauswertung	14
2.3	Patch-Clamp-Technik	15
2.3.1	Messkonfigurationen in der Patch-Clamp-Technik	16
2.3.2	Messtisch und mechanische Komponenten	17
2.3.3	Pipettenherstellung	18
2.3.4	Messgeräte und elektrische Signalverarbeitung	19
2.3.5	Lösungen und Perfusionsstoffe	20
2.3.6	Durchführung der Patch-Clamp-Messungen	21
2.3.7	Auswertung der Messergebnisse	22
2.4	Fura-2AM Imaging	24
2.4.1	Vorbereitung der HUVEC	24
2.4.2	Messung	24
2.4.3	Datenauswertung	25
2.5	cGMP-Radioimmunoassay	25
2.5.1	Gewinnung der Proben	25
2.5.2	Durchführung des RIA	26
2.6	Statistik	27

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Ergebnisse aus den Messungen des Membranpotential	28
3.1.1	Effekt von Sildenafil auf das endotheliale Zellmembranpotential	28
3.1.2	Einfluss des BK <sub>Ca</sub> auf die durch Sildenafil bedingten endothelialen Membranpotentialveränderungen	29
3.2	Patch-Clamp-Ergebnisse	30
3.2.1	Ionenkanalidentifizierung	30
3.2.2	Einfluss von Sildenafil auf den endothelialen BK <sub>Ca</sub>	34
3.2.3	Einfluss von 8-bromo-cGMP auf den endothelialen BK <sub>Ca</sub>	35
3.2.4	Einfluss von 8-bromo-cGMP auf den endothelialen BK <sub>Ca</sub> nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP	36
3.2.5	Einfluss von Rp-8-pCPT-cGMP auf den BK <sub>Ca</sub>	37
3.2.6	Einfluss von Sildenafil auf den BK <sub>Ca</sub> nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP	38
3.2.7	Einfluss von Sildenafil auf den BK <sub>Ca</sub> in der „inside-out“-Konfiguration	39
3.3	Einfluss von Sildenafil auf die zelluläre Ca <sup>2+</sup> -Homöostase	40
3.4	Einfluss von Sildenafil auf den cGMP-Spiegel in Endothelzellen	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1	Kanalcharakterisierung in HUVEC	45
4.2	Einfluss von Sildenafil auf den endothelialen BK <sub>Ca</sub> und die daraus resultierende Signaltransduktion in der Endothelzelle	46
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>

# 1. Einleitung

Die Einleitung gliedert sich in vier Abschnitte. Unter 1.1 wird kurz die Funktion des Endothels erläutert. Im nächsten Abschnitt 1.2 wird auf die Elektrophysiologie von Endothelzellen eingegangen, und im Abschnitt 1.3 wird die Rolle von cGMP als „second messenger“ erläutert. Im letzten Abschnitt 1.4 wird die eigentliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit vorgestellt.

## 1.1 Funktion des Endothels

Das Endothel ist eine einschichtige zellige Auskleidung der Blutgefäße. Es wurde ursprünglich für eine funktionslose Zellreihe gehalten, welche die Grenze zwischen Gefäßlumen und der vaskulären Media bildet. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Schicht eine zentrale Bedeutung in der Homöostase der Gefäßwand darstellt. Zur apikalen Seite hin ist es dem vorbeiströmendem Blut zugewandt und auf der basalen Seite hin Teil der Gefäßwand, sodass das Endothel die zellulären und humoralen Bestandteil zwischen diesen beiden Kompartimente reguliert [32,62].

Zu den wichtigsten physiologischen Aufgaben des Endothels gehören neben einer bedeutenden Barrierefunktion durch Regulation der Permeabilität die Regulierung des Gefäßtonus über Mediatorenausschüttung, die Aufrechterhaltung eines antithrombotischen und profibrinolytischen Zustands, die Kontrolle des Gefäßwachstums sowie die Vermittlung leukozytenadhäsiver Prozesse. Diese intakten Endothelfunktionen stellen die Voraussetzung einer physiologischen Organfunktion dar.

Verantwortlich für die Permeabilitätsänderungen des Endothels sind „tight junctions“ und „gap junctions“, die die eigentliche Barrierefunktion übernehmen. Als „Zell- Zell-Kontakte“ regulieren „tight junctions“ den Durchtritt von gelösten Stoffen und „gap junctions“ den Durchtritt von Ionen und kleinen Molekülen in Zellen und Gewebe vom Blut aus und umgekehrt [1,38].

Die Ausschüttung von Mediatoren regelt den Gefäßtonus. Hierbei wirken Substanzen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) oder ATP vasodilatierend. Ihre wichtigsten Gegenspieler sind das vasokonstriktive Thromboxan der Blutplättchen und das vom Endothel gebildete Endothelin. Thromboxan bewirkt, neben seinen vasokonstriktiven Eigenschaften, zusätzlich eine Aktivierung der intravasalen Gerinnung.

Weit wichtiger für die Aktivierung der intravasalen Gerinnung ist eine geschädigte Endothelschicht, da nur so die Interaktion von Gerinnungsfaktoren mit den aktivierenden Kollagenfasern der verletzten Gefäßwand ermöglicht wird.

Deshalb ist eine nicht vorgeschädigte, intakte Endothelschicht wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten Gefäßfunktion [27,54].

## **1.2 Elektrophysiologie der Endothelzelle**

### **1.2.1 Rolle von Calcium in der Endothelzelle**

Die Synthese und Freisetzung endothelialer Mediatoren und somit die Steuerung endothelialer Funktionen ist essenziell abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Reguliert wird die  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speicherorganellen, z.B. dem endoplasmatischen Retikulum, und durch extrazelluläres Calcium, welches von außen in die Zelle einströmt. Dieser auch als kapazitiver Calciumeinstrom bezeichnete Vorgang erfolgt vorwiegend passiv über einen nicht selektiven Kationenkanal, da Endothelzellen im Gegensatz zu glatten Muskelzellen nicht über spezifische, spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle verfügen [51,73].

Der Calciumeinstrom in die Endothelzelle ist vom Membranpotential abhängig. Kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, so wird der elektrochemische Gradient für Calcium („driving force“) erhöht, und Calcium kann in die Zelle einströmen. Determiniert wird dieses Membranpotential durch die Aktivität von  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Kanälen.

Diese Ionenkanäle steuern indirekt  $Ca^{2+}$ -abhängige Signaltransduktionswege in der Endothelzelle durch die Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  [24,45,56].

### **1.2.2 Ionenkanäle in der Endothelzelle**

Endothelzellen sind als nicht erregbare Zellen nicht in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren oder fortzuleiten. Das Membranpotential der Endothelzelle wird über die Aktivität von Ionenkanälen geregelt, womit es auf die Endothelfunktion Einfluss nehmen kann. Untereinander sind Endothelzellen über „gap junctions“ elektrochemisch gekoppelt. Zusätzlich besteht eine weitere elektrochemische Koppelung zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, durch die eine

wechselseitige Beeinflussung möglich ist [7,41,42]. Gesteuert wird das Membranpotential der Endothelzelle vor allem durch  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Kanäle.

Hiervon spielen folgende Ionenkanäle bei der Regulation des Membranpotentials der Endothelzelle eine Rolle:

*Kaliumkanäle:*

- einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ )
- ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) und
- Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ )

*Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal ( $K_{IR}$ ):*

Die Hauptaufgabe des ( $K_{IR}$ ) scheint die Stabilisierung des Membranpotentials zu sein. Eine Aktivierung des ( $K_{IR}$ ) bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran [50].

*ATP-abhängiger Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ):*

Unter physiologischen intrazellulären ATP-Konzentrationen ( $[ATP]_i$ ) ist dieser Kanal geschlossen. Er öffnet sich erst bei einer Verminderung der  $[ATP]_i$ . Dadurch wird der  $K_{ATP}$  aktiviert, wodurch ebenfalls eine Membranhyperpolarisation bewirkt wird [2,66].

*$Ca^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal ( $K_{Ca}$ ):*

Sie lassen sich aufgrund ihrer Leitfähigkeit in drei Typen einteilen:

1. mit geringer Leitfähigkeit („small conductance“ -  $SK_{Ca}$ ; Leitfähigkeit 10- 14 pS)
  2. mit mittlerer Leitfähigkeit („intermediate conductance“ -  $IK_{Ca}$ ; Leitfähigkeit 30- 80 pS)
  3. mit großer Leitfähigkeit („big conductance“ -  $BK_{Ca}$ ; Leitfähigkeit 100- 250 pS)
- [34]

*Chloridkanäle:*

- $Ca^{2+}$ - abhängige  $Cl^-$ -Kanäle
- $Cl^-$ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit
- volumenabhängige  $Cl^-$ -Kanäle

Unter physiologischen Bedingungen scheinen nur die volumenabhängigen  $Cl^-$ -Kanäle eine Rolle in Hinblick auf das Membranpotential zu haben. Sie besitzen eine Leitfähigkeit von 1- 5 pS und werden durch eine Zunahme des Zellvolumens, wie z.B. bei einer ödematösen Zellschwellung, aktiviert. Der Östrogen- Rezeptor- Modulator Tamoxifen kann die Aktivität dieser Ionenkanäle verringern, [51].

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal mit großer Leitfähigkeit ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird deswegen im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  ist auf der einen Seite ein spannungsabhängiger Kanal und auf der anderen Seite von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig. Durch Bindung von Calcium an der zytoplasmatischen Seite des Ionenkanals an den so genannten „Calcium-bowls“ wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanals erhöht [62]. Aufgrund seiner großen Leitfähigkeit bei gleichzeitig bestehender hoher Selektivität für  $\text{K}^+$ -Ionen ermöglicht der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  einen starken Kaliumausstrom aus der Zelle, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt [32,41]. Diese Hyperpolarisation erhöht in Endothelzellen den transmembranären Calciuminflux durch eine Erhöhung des elektrochemischen Gradienten für Calcium. Dadurch nimmt der Ionenkanal Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase und verstärkt sich selbst in seiner Aktivität. Daher ist es nahe liegend, dass über Modulation der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Aktivität calciumabhängige Stoffwechselwege beeinflusst werden können. Eine unspezifische Blockade dieses Ionenkanals kann mit Tetraethylammonium (TEA) und Charybdotoxin bewirkt werden [18]. Hoch selektiv wird dieser Ionenkanal durch das Skorpiongift Iberiotoxin (IBX) blockiert [17]. Durch die Anwendung von IBX ist es daher möglich, den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  von anderen Ionenkanälen abzugrenzen, da diese nicht durch IBX blockiert werden [17,22].

### **1.3 Der „second messenger“ cGMP**

#### **1.3.1 Funktion und Regulierung von cGMP in der Zelle**

Das zyklische Nukleotid Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) ist ein wichtiges intrazelluläres Signalmolekül, das durch Einwirkung von spezifischen Zyklasen unter Abspaltung von Pyrophosphat aus dem Nukleotid GTP (Guanosintriphosphat) entsteht [38].

cGMP ist ein wichtiger „second messenger“ in der Zelle, der z.B. Gefäßtonus, Hypertrophie, Proliferation und Apoptose reguliert. Weiterhin werden verschiedene Signalwege durch cGMP reguliert und moduliert, wie z.B. cGMP-abhängige Kinasen (PKG), cGMP-vermittelte Ionenkanäle, cGMP-regulierte Genexpression [14,36].

Das Ausmaß und die Dauer des cGMP-vermittelten Signals werden durch den Auf- und Abbau des cGMP-Moleküls bestimmt. Generiert wird cGMP durch die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und die rezeptorgebundene Guanylatzyklase (rGC). Hierbei

wird sGC durch NO und rGC durch natriuretische Peptide, wie z.B. das atriale natriuretische Peptid (ANP), aktiviert. Sowohl NO als auch ANP sind somit Voraussetzung für die Bildung von cGMP [5,53,64].

Das zur Aktivierung der Guanylatzyklen benötigte intrazelluläre NO wird in Endothelzellen vorwiegend durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet, die entweder durch die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase über einen Calmodulin-abhängigen Mechanismus, durch das „Heat shock Protein 90“ (hsp90) oder durch Protein-Phosphorylierung aktiviert wird [12,16,26].

### **1.3.2 Abbau des cGMPs durch Phosphodiesterasen**

Abgebaut wird das cGMP durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE). Die Aktivierung dieser Enzyme bewirkt eine Hydrolyse des cGMPs zu GMP und führt somit zu einer Reduktion des cGMP-Spiegels in der Zelle [11,69].

Zurzeit sind elf verschiedene PDEs bekannt. Unterschieden werden können diese PDEs:

- durch ihre genetische Struktur
- durch ihre Substratspezifität, da ein Teil der PDEs cAMP, ein anderer cGMP und ein dritter beide hydrolysiert.
- durch ihre kinetischen und sensitiven Eigenschaften gegenüber endogenen und pharmakologischen Regulatoren
- und durch ihre Gewebsspezifität [57,67,72].

Am Beispiel der PDE Typ 5 (PDE5) werden diese Eigenschaften detailliert erläutert, da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit einem spezifischen Inhibitor der PDE5 gearbeitet wurde.

### **1.3.3 PDE5 und sein spezifischer Inhibitor Sildenafil**

Die PDE5 gehört zu den Phosphodiesterasen, die in vielen unterschiedlichen Geweben vorkommt. Exprimiert wird die PDE5 im Lungengewebe, in glatten Muskelzellen, in Blutplättchen aber auch im Corpus cavernosum [57,67,74]. Die Expression der PDE5 in Endothelzellen wurde durch Sampson et al. immunhistochemisch nachgewiesen [61].

Vorwiegend wurde der Wirkmechanismus der PDE5 in der glatten Muskelzelle beschrieben. Der dort beschriebene Wirkmechanismus kann aufgrund der verschiedenen Zelltypen, und damit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften, nicht auf die Endothelzelle übertragen werden.

Die PDE5 ist eine substratspezifische Phosphodiesterase. Für glatte Muskelzellen ist bekannt, dass unter Basalbedingungen mit geringen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln cGMP vorwiegend durch die PDE5 hydrolysiert wird, weswegen diese auch cGMP-gebundene PDE genannt wird. Liegen dagegen höhere Calciumkonzentrationen in der glatten Muskelzelle vor, verändert sich die Aktivitätsrelation der intrazellulären PDEs. Es kommt dabei zur Verschiebung der durch aktive PDEs bewirkten cGMP-Hydrolyse von PDE5 in Richtung PDE Typ 1 [57].

Die Substratspezifität erklärt sich aus dem Aufbau der PDE5: Wie alle PDEs besteht die PDE5 aus einer von allen PDEs homologen katalytischen Domäne, die sich im N-Terminus hängenden regulatorischen Domänen unterscheiden.

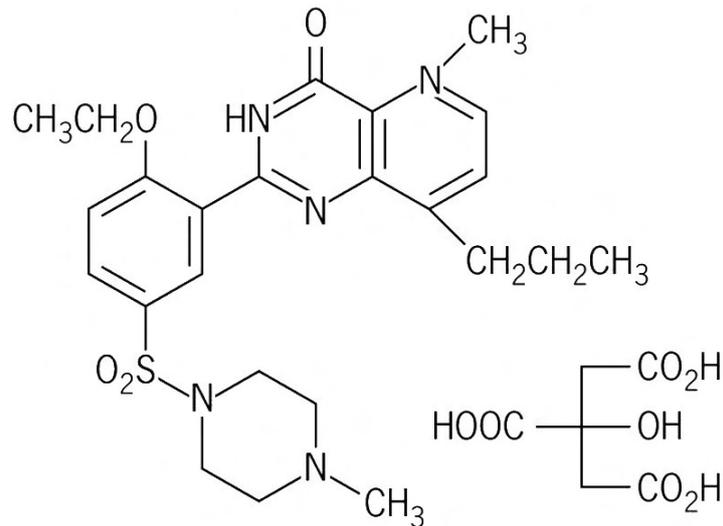
Bei der PDE5 ist als regulatorische Domäne die so genannte GAF-Domäne entdeckt worden. GAF steht für die Anfangsbuchstaben cGMP-regulierte Phosphodiesterase, verschiedene Adenylzyklen und den von Bakterien transkribierenden Faktor Eh1A. Bei der PDE5 wird die GAF-Domäne in zwei weitere Untereinheiten GAF A und GAF B unterteilt.

Zusätzlich wird die PDE5 in drei Isoformen differenziert, die PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3 genannt werden. Diese Isoformen unterscheiden sich am N-Terminus, gebildet durch unterschiedliche Aminosäurereste. Nach bisherigen Erkenntnissen sind diese Isoformen speziesspezifisch, wie z.B. die PDE5A3, die bis jetzt nur in humanem Gewebe gefunden wurde [37,57,65].

Reguliert wird die Aktivität der PDE5 durch einen cGMP / PKG-abhängigen Mechanismus. Es wird davon ausgegangen, dass cGMP an die GAF A Domäne der PDE5 bindet und sie somit in einen aktiven Zustand versetzt. So kann die PDE5 durch PKG phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Stabilisierung des gebundenen cGMP und sichert somit den aktiven Zustand des Enzyms [25,46,72].

Zusammenfassend lassen sich zwei Aktivitätszustände differenzieren: Auf der einen Seite den inaktiven Zustand und auf der anderen Seite den cGMP-gebundenen, aktiven Zustand. Der inaktive Zustand des Enzyms kann durch Bindung des cGMP direkt in einen aktiven Zustand umgeschaltet werden. Beide Konfigurationen des Enzyms sind reversibel. Sie haben neben unterschiedlichen Aktivitätskinetiken auch verschiedene inhibitorische Eigenschaften. So besitzt die cGMP-aktivierte PDE5 im Vergleich zu ihrem inaktiven Zustand eine größere Sensitivität gegenüber ihrem spezifischen Inhibitor Sildenafil [69,70].

Der spezifische Inhibitor Sildenafil bewirkt durch Blockierung der PDE5 eine Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Zelle [7]. Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Sildenafil mit cGMP wird davon ausgegangen, dass Sildenafil durch Interaktion an der katalytischen Seite der PDE5 die Bindung von cGMP an der allosterischen Seite stimuliert. Dabei wird die cGMP-bindende Seite der PDE5 nicht blockiert [48,67].



**Abbildung 1:** Strukturformel von Sildenafil aus Böhm et al [10].

#### 1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des PDE5-Inhibitors Sildenafil auf den Aktivitätszustand des endothelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanal mit großer Leitfähigkeit zu untersuchen und im Falle einer Modulation mögliche Mechanismen der Signaltransduktion zu erarbeiten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die verwendeten Endothelzellen (human umbilical cord vein endothelial cells, HUVEC) wurden aus humanen Nabelschnurvenen nach der Methode von Jaffe et al. isoliert, kultiviert und identifiziert [28].

Direkt nach der Abnabelung wurde frisch gewonnene Nabelschur gesäubert und auf mögliche Verletzungen untersucht. Danach wurde die Nabelschnurvene aufgesucht und zweimal mit 50 ml HEPES (PAA, Linz, Österreich) durchgespült. Wenn sich die Vene bei diesem Spülvorgang als dicht erwies, wurde sie am anderen Ende abgeklemmt. Im Anschluss daran wurde sie mit 0,025% Collagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die HUVECs aus ihrem Zellverband zu lösen. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Nabelschnurvene mit 30 ml HEPES gespült. Die Spüllösung wurde in einem 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, San Jose, USA) aufgefangen und zentrifugiert. Das nun erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml Endothelial Basal Medium (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Zuvor wurden folgende Aliquots (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) dem EBM zugegeben: 0,4% ECGS/H, Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml, basic Fibroblast Growth Factor 1 ng/ml; Amphotericin B 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20% fetales Kälberserum (FKS; PAA, Linz, Österreich). Anschließend wurden die Zellen auf ein mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtetes 25 cm<sup>2</sup> Plastikkulturschälchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit einem 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt bis zur Konfluenz inkubiert.

Um sicherzustellen, dass in der gewonnenen Primärkultur tatsächlich Endothelzellen isoliert wurden, wurde zunächst unter dem Lichtmikroskop ein kopfsteinpflasterartiges Wachstum der Zellen im Zellverband nachgewiesen („Cobblestone“-Phänomen). Zur sicheren Identifikation der Endothelzellen wurde eine Immunfluoreszenzmethode verwendet. Hierbei wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät, kultiviert und am nächsten Tag mit absolutem Methanol (Riedel de Haen, Seelze, Deutschland) bei -20°C fixiert. Danach erfolgte zuerst die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) und darauf folgend eine weitere Inkubation mit dem FITC gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-FITC; Dianova,

Hamburg, Deutschland) gegen den Primärantikörper. Unter einem Fluoreszenzmikroskop ließen sich nun die fluoreszenzmarkierten Endothelzellen identifizieren. Nach der Identifikation könnten die ausgesäten Zellen weiter kultiviert werden. Sobald die Primärkultur zu einem „Zellrasen“ gewachsen war, wurden die Endothelzellen in mit Gelatine vorbeschichteten 25 cm<sup>2</sup> Plastikkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt.

Als Nährmedium, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde, wurde das bereits beschriebene EBM verwendet. Jedoch wurde noch 10% FKS (PAA, Linz, Österreich) zugesetzt und auf die Gabe von Amphotericin B verzichtet.

Täglich wurden der morphologische Zustand und die Wachstumsdichte der Zellen sowie eine mögliche Kontamination durch Bakterien und Pilzen beurteilt. Zeigten die Zellen ein konfluentes Wachstum zu einem dichten Zellrasen, wurden sie passagiert, damit sie sich in ihrem Wachstum nicht gegenseitig hemmen. Hierzu wurden die Zellen in ihren Kulturflaschen zuerst mit Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; PAA, Pasching, Österreich) gespült, bevor sie circa zwei Minuten mit einer Trypsin- EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) im Brutschrank inkubiert wurden. Durch diesen Vorgang ließen sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen ablösen. Kontrolliert wurde dieser Vorgang unter einem Lichtmikroskop. Danach wurden die abgelösten Zellen in zuvor vorbereiteten 50 ml Röhrchen überführt und mit EBM versetzt, um das in der Zellsuspension enthaltene Trypsin zu inaktivieren. Für fünf Minuten folgte anschließend die Zentrifugation der Zellen bei 1200 rpm. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und in mit 0,2% Gelatine vorbeschichteten Kulturflaschen in einer Dichte von circa 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> erneut ausgesät.

Für die „Patch-Clamp“ Experimente wurden Zellen auf mit Gelatine vorbeschichtete 25 cm<sup>2</sup> Plastikpetrischalen ausgesät. Die Zellaussaat für die DIBAC- und Fura-2A-Messungen sowie für den Radioimmunoassay werden in den jeweiligen Abschnitten gesondert beschrieben.

## **2.2 DIBAC- Messungen**

Membranpotentialmessungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIBAC (bis-1,3 Dibutylbarbitursäure) durchgeführt. Die Kalibrierung der Messungen wurde in Anlehnung an die von Langheinrich und Daut beschriebenen Methodik vorgenommen [33].

### **2.2.1 Vorbereitung der HUVEC**

Die HUVEC wurden auf 24-well-Platten (Becton Dickinson, USA) ausgesät und bei 37°C kultiviert, bis sie konfluent bewachsen waren.

Zunächst wurden 5 mg DIBAC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in 9,678 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgelöst. Dies ergab eine Stocklösung von 1 mmol/l. Das Kulturmedium wurde von den Coverslips abgesaugt und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 µmol/l DIBAC inkubiert. Anschließend wurde die 24-well-Platte in den Multifunktionsplattenreader GENios (Tecan, Wien, Österreich) platziert.

### **2.2.2 Messung**

Die Messung erfolgte mit dem Multifunktionsplattenreader GENios.

Durch Hyperpolarisation wurde die Zellmembran für DIBAC permeabel und eine Fluoreszenzmessung in der Zelle möglich. Diese Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 535 nm gemessen. In unserer Arbeitsgruppe wurde nach der von Langheinrich und Daut beschriebenen Kalibrierung bei einer Veränderung des Membranpotentials von 1 mV eine DIBAC-Fluoreszenzintensitätsveränderung von 1,018% gemessen [31,33]. Die Messungen stellten somit relative Veränderungen in der DIBAC-Fluoreszenzintensität in mV in Relation zu der unbehandelten Kontrolle dar. Der Kontrollwert der Messung bestand aus Badlösung (siehe Abschnitt 2.2.5) und 0,5 µmol/l DIBAC und wurde als 100 % gesetzt. Der Blankwert aus der Messung stellte die Hintergrundstrahlung dar und wurde von allen gewonnenen Messergebnissen abgezogen. Er bestand aus reiner Badlösung ohne DIBAC.

Nach Zugabe von Stimulationslösungen wurden die Zellen über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 30 Sekunden gemessen.

Als Stimulationslösungen dienten: Sildenafil (Pfizer, Sandwich, U.K.) in verschiedenen Konzentrationen: 0,05 µmol/l, 0,1 µmol/l, 0,5 µmol/l, 1 µmol/l, 5 µmol/l Sildenafil und 100 nmo/l IBX (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

### **2.2.3 Datenauswertung**

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte computergesteuert. Dabei wurde die Software Magellan Standard 5.0 (Magellan Standard, Salzburg, Österreich)

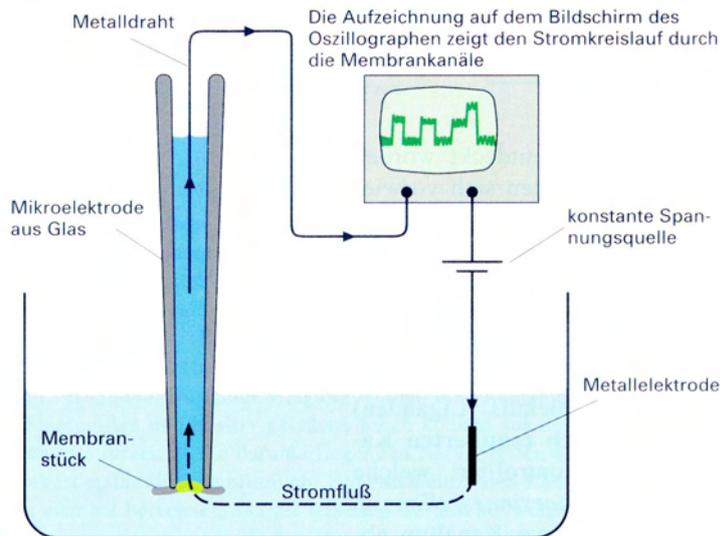
verwendet. Die bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessene Fluoreszenz wurde graphisch dargestellt.

### **2.3 Patch-Clamp-Technik**

Die Patch-Clamp-Technik ist die wohl meist verbreitete Methode in der Elektrophysiologie. Sie bietet die Möglichkeit, elektrische Ströme zu registrieren, welche durch einzelne oder durch die Gesamtheit der Ionenkanäle in einer Zelle fließen. Diese Ströme entstehen durch geladene Ionen, die durch die Zellmembran wandern.

1976 führten Neher und Sakmann erstmals Messungen dieser Art durch. Bei Ihren Untersuchungen stellten sie Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle biologischer Membranen dar [60]. Für ihre Arbeit erhielten sie 1991 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie [47,59].

Bei diesem Verfahren wird eine dünne, zugespitzte und hitzepolierte Glaspipette (Patchpipette) benutzt, um einen elektrischen Kontakt mit der Zelloberfläche herzustellen. Zuvor wird diese Glaspipette mit Pipettenlösung (s. Abschnitt 2.2.5) gefüllt und auf eine mit einem Verstärker verbundene chlorierte Silberdrahtelektrode aufgesetzt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Patchpipette nun an die Zelle herangefahren, und vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch diesen Vorgang wird bereits eine elektrische Abdichtung („seal“) mit einem Widerstand von ca. 50 M $\Omega$  herbeigeführt [23]. Durch vorsichtiges Ansaugen der Membran werden sehr hohe Widerstände im Gigaohmbereich („Gigaseals“) erreicht. Nach Erreichen des „Gigaseals“ wird der Unterdruck sofort wieder abgelassen. Durch den hohen Widerstand wird der Membranbereich, der sich nun unter der Öffnung der Glaspipette („Patch“) befindet, vom Hintergrundrauschen abisoliert. Dadurch können kleine Ströme im pA-Bereich, wie Ionenkanäle sie aufweisen, dargestellt werden. Die zu untersuchenden Zellen befinden sich in einem Kulturgefäß mit Badlösung, in die eine zweite Elektrode, die Badelektrode, eingetaucht ist. Die Badelektrode ihrerseits ist auch mit dem Verstärker verbunden, sodass nun zwischen diesen beiden Elektroden eine Spannung angelegt werden kann. Dadurch ist es möglich, den „Patch“ spannungsabhängig zu untersuchen, wobei durch eine geeignete Schaltung das Membranpotential konstant gehalten wird („Clamp“).



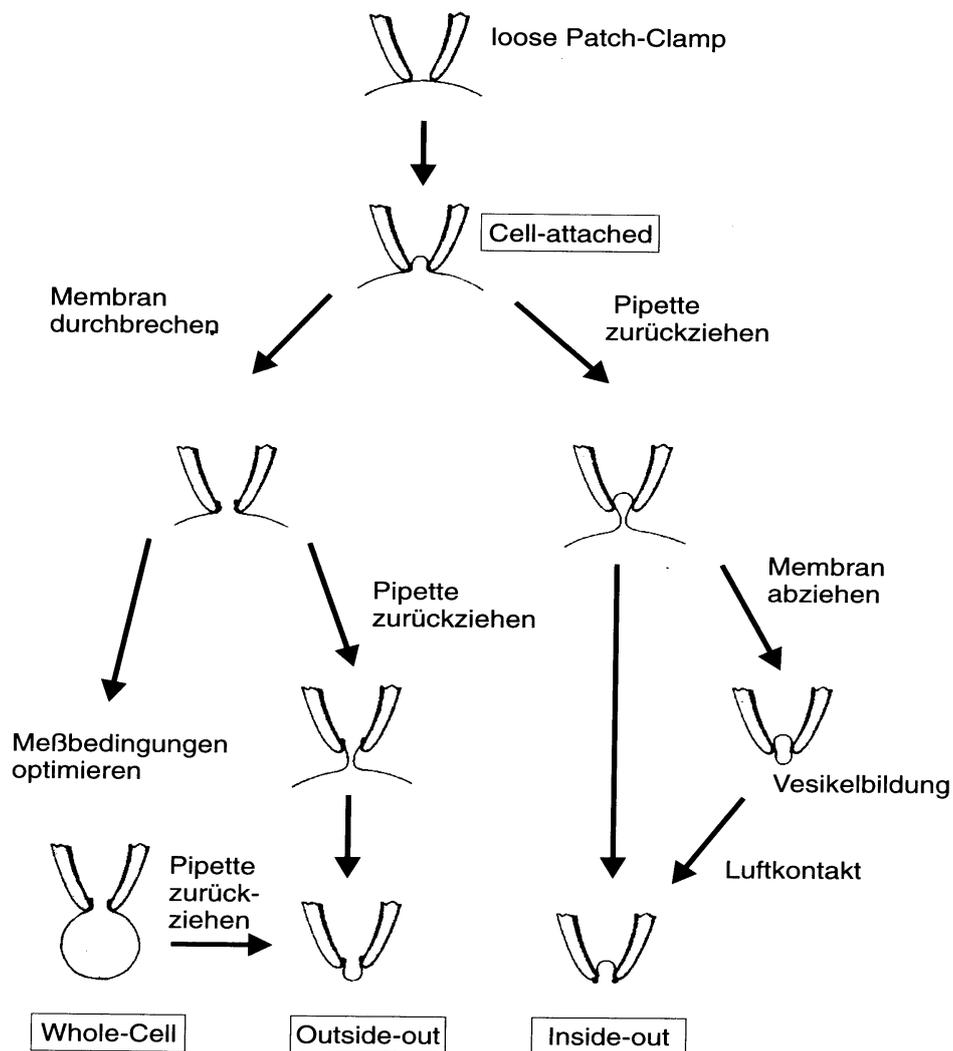
**Abbildung 2:** Stromkreislauf bei der Patch-Clamp-Messung aus Alberts et al. [1].

### 2.3.1 Messkonfigurationen in der Patch-Clamp-Technik

Die so erhaltene Ausgangssituation nennt man „cell-attached“-Konfiguration. Diese Ausgangskonfiguration ermöglicht die Messung von Einzelkanalableitungen sowie den Wechsel in weitere Patch-Clamp-Konfigurationen.

Durchbricht man durch ein kurzes Ansaugen das Membranstück unter der Patchpipette, resultiert eine „whole-cell“-Konfiguration, die einer intrazellulären Ableitung entspricht. Mit dieser Konfiguration lassen sich über die ganze Zellmembran fließende Ströme messen. Durch vorsichtiges Wegziehen der Pipette von der Zelle wird das sich unter der Pipettenöffnung befindliche Membranstückchen ausgerissen. Die Außenseite der Membran ist nun zur Badlösung gewandt, so dass einzelne, von intrazellulären Vorgängen unabhängige Ionenkanalströme gemessen werden können. Diese Konfiguration nennt sich „outside-out“-Konfiguration und gehört wie die „inside-out“-Variante zu den „excised-patches“. In die „inside-out“-Konfiguration gelangt man, indem man nach einem „cell-attached“-Patch die Pipette langsam von der Zelle abzieht und ein Membranstück ablöst, ohne dass sich der Sealwiderstand merklich verändert. Dadurch bildet sich aus dem Membranstück ein Vesikel, das durch Luftkontakt aufplatzt. Hingegen wird durch eine schnelle axiale Bewegung des Mikromanipulators in Richtung der Pipettenachse ein Stück aus der Zellmembran gerissen. In dieser Konfiguration zeigt die Innenseite der Zellmembran zur Badlösung. Es lassen sich nun die einzelnen Kanalströme ohne zytosolische

Komponenten messen. Einen schematischen Überblick über die verschiedenen Konfigurationen gibt Abbildung 3 wieder.



**Abbildung 3:** Übersicht über die Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik aus Hamill [20].

Zur Ionenkanalidentifikation wurde die Calciumabhängigkeit in „inside-out“ Konfiguration nachgewiesen. Die Versuche zur selektiven Ionenkanalblockade des  $BK_{Ca}$  mit Iberiotoxin wurden in der „outside-out“ Konfiguration durchgeführt. Die Patch-Clamp-Experimente zur Einzelkanalregistrierung unter Perfusion der verschiedenen Substanzen (Sildenafil, 8-bromo-cGMP, Rp8-pCPT-cGMP) wurden entweder in der „cell-attached“ oder „inside-out“ Konfiguration durchgeführt.

### 2.3.2 Messtisch und mechanische Komponenten

Geringste Bewegungen zwischen Zelle und Pipette stören die hochempfindlichen Patch-Clamp-Messungen. Deswegen musste der Messplatz von mechanischen

Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung abgeschirmt werden. Dies geschah mittels eines schwingungsgedämpften Tisches (Nr. 12010100, Science Products GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). In die Mitte dieses Tisches wurde ein inverses Mikroskop (DMIL, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit integrierter Videokamera zur Überwachung des Messbereiches auf einem Bildschirm platziert. Die 25 cm<sup>2</sup> Petrischalen mit den Zellen wurden in eine spezielle Halterung auf dem Kreutztisch eingespannt. Diese „Messkammer“ wurde durch einen eigenen Miniatur-Faraday'schen Käfig geschützt.

Auf der rechten Seite des Tisches befand sich ein für das „patchen“ der Zellen hydraulischer Mikromanipulator Modell WR-88 (Narishige Scientific Instruments Laboratory, Tokio, Japan), an dessen Spitze der Vorverstärker mit Pipettenhalter montiert war. Der Pipettenhalter war so gebaut, dass die Patchpipette sicher und stabil fixiert werden konnte. Zusätzlich war ein Anlegen von Unterdruck möglich und eine elektrische Verbindung zum Vorverstärker/ Verstärker wurde hergestellt.

Auf der linken Seite befand sich das Perfusionssystem. Hierzu gehörte ein elektrisch-piezoantriebener Mikromanipulator, mit dem die Perfusionspipette über einen weiteren Pipettenhalter in Position gebracht wurde. Die Perfusionspipette war mit einer Perfusionspumpe Modell SP 200i (WPI, Berlin, Deutschland) durch einen Schlauch mit einer die Perfusionslösung enthaltenden 5 ml Spritze verbunden.

Unter mikroskopischer Sicht konnten nun beide Pipetten in der Messkammer eingestellt werden.

Zum weiteren Schutz vor elektrischen Störungen wurde der gesamte Messplatz noch einmal mit einem zweiten Faraday'schen Käfig (maßangefertigter Eigenbau, Werkstatt Universitätsklinik Giessen) umgeben.

### **2.3.3 Pipettenherstellung**

Die Pipetten wurden nach der von Rae und Levis beschriebenen Methode hergestellt [55]. Vor dieser Herstellung für Patch-Clamp-Messungen sollte darauf geachtet werden, dass die Glasrohlinge staub- und fettfrei sind.

#### *Patch- Pipette:*

Direkt vor Gebrauch wurden die Patch-Clamp-Pipetten aus Borsilikatglaskapillaren - Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,0 mm - (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) in einem DMZ- Universal Mikropipettenpuller (WZ Zeitz Instrumente Vertriebs GmbH, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Die Glaskapillare wurde nun in

den Puller eingespannt, in der Mitte durch ein Glühfilament erhitzt und an den beiden eingespannten Kapillarenden durch gleichmäßigen Zug auseinander gezogen, so dass in zwei Arbeitsschritten Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$  entstand. Danach erfolgte in einem weiteren Schritt die Hitzepolierung der Spitzen der Patchpipetten. Bei den auf dieser Art hergestellten Pipetten ergaben sich Widerstände zwischen 5 und 10  $\text{M}\Omega$ .

#### *Perfusionspipette:*

Die Perfusionspipetten wurden aus Mikrohämatokritröhrchen mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm (Brand, Wertheim, Deutschland) ebenfalls mit dem Puller hergestellt. Der Öffnungsdurchmesser dieser Pipetten lag nach der Herstellung bei circa 250  $\mu\text{m}$ .

### **2.3.4 Messgeräte und elektrische Signalverarbeitung**

#### *Messgeräte:*

Folgende Geräte wurden für die Durchführung und Signalverarbeitung der Patch-Clamp-Experimente verwendet:

- Patch / Whole Cell Clamp Amplifier, Modell L/M- EPC7 (List- Electronics, Darmstadt, Deutschland)
- TEK 2211-2-Kanal Analog- / Digitaloszilloskop (Tektronix, Karlsruhe, Deutschland)
- CED 1401 A/D- Wandler (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK)
- 8- Pol "low pass" Bessel- Filter (List- Electronics, Darmstadt, Deutschland)

#### *Elektrische Signalverarbeitung:*

Zwischen der Patchpipette und der als Referenzelektrode fungierenden Badelektrode konnten Ionenströme nach Anlegung einer Spannung mittels eines Verstärkers (L/M- EPC7) gemessen werden. Die gemessenen Ionenströme wurden mit dem A/D- Wandler digitalisiert und auf einem IBM- kompatiblen PC gespeichert. Um das Hintergrundrauschen zu verringern, wurde der 8-Pol Bessel-Filter zwischengeschaltet. Die Analyse der gemessenen Ionenströme wurde mit der pClamp Software V 6.0 (Axon Instruments, Foster City, USA) durchgeführt.

### 2.3.5 Lösungen und Perfusionsstoffe

Folgende Substanzen (alle von Fluka, Buchs, Schweiz) wurden in den Patch-Clamp-Experimenten verwendet und in destilliertem Wasser in Lösung gebracht:

Badlösung für die „cell-attached“ Konfiguration:

Substanz	Endkonzentration in mmol/l
NaCl	140
D-Glucose	5,5
HEPES	10
KCl	5
MgCl <sub>2</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub>	1,5

pH 7,3: justiert durch Zugabe von NaOH

Für die Messreihe wurden in die Badlösung folgende Substanzen zugegeben:

Ca<sup>2+</sup> 10<sup>-4</sup>-10<sup>-7</sup> mmol/l; IBX 100 nmol/l; 10 µmol/l Rp-8-pCPT-cGMP (alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Die Badlösung in dieser Zusammensetzung wurde in allen weiteren Experimenten verwendet.

Patchpipettenlösung für die „cell-attached“ Konfiguration:

Substanz	Endkonzentration in mmol/l
K- Aspartat	110
HEPES	5
KCl	30
MgCl <sub>2</sub>	1
EGTA	0,5

pH 7,2: justiert durch Zugabe von KOH

Badlösung für die „inside-out“ Konfiguration:

Substanz	Endkonzentration in mmol/l
KCl	140
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
Glucose	10
EGTA	1
CaCl <sub>2</sub>	0,89

pH 7,2: justiert durch Zugabe von KOH

Patchpipettenlösung für die „inside-out“ Konfiguration:

Substanz	Endkonzentration in mmol/l
KCl	140
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10

pH 7,4: justiert durch Zugabe von KOH

Perfusionslösungen:

Bei der Herstellung der Perfusionslösungen wurde in den Patch-Clamp-Versuchen Badlösung als Grundlage verwendet. Folgende Substanzen wurden hinzugegeben:

1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil und 0,5  $\text{mmol/l}$  8-bromo-cGMP (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

### 2.3.6 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen

Eine Kulturschale mit HUVEC wurde aus dem Brutschrank (Biocenter 2001, Biomedis, Gießen, Deutschland) genommen. Danach wurde das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit warmer Badlösung (37°C) gewaschen, um so eventuelle Reste der Nährlösung zu entfernen. Anschließend wurde die Schale mit ca. 3 ml warmer Badlösung gefüllt und in eine Halterung auf dem Mikroskoptisch eingespannt. Mit Hilfe eines elektrischen Mikromanipulators wurde die Perfusionspipette justiert, so dass der Perfusionsstrahl mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/h die Endothelzelle vollständig umhüllen konnte, ohne dass der „Seal“ zerstört wurde. Danach wurde über den Bildschirm eine vital aussehende Zelle ausgewählt und die Patchpipette vorsichtig mit dem hydraulischen Mikromanipulator herangefahren.

Da die Druckverhältnisse in der Pipette gezielt verändert werden könnten, wurde zum Eintauchen in die Badlösung ein leichter Überdruck angelegt, um ein Verstopfen der Pipette durch auf der Oberfläche schwimmenden Partikel zu verhindern. Bei Erreichen der ausgewählten Zelle wurde der Überdruck reduziert, damit die Zelle nicht unnötig mechanisch belastet wurde. Unter ständiger Kontrolle des Pipettenwiderstandes wurde die Patchpipette an die Zellmembran heranbewegt. Kam es zu einem Kontakt mit der Membran, wurde eine leichte Erhöhung des Pipettenwiderstandes beobachtet und die Stromkurvenamplitude auf dem Oszilloskop verringerte sich. Eine bildete sich eine flache Linie auf dem Oszilloskop, als kurzzeitig ein Unterdruck in der Pipette erzeugt wurde. Dies bedeutet, dass sich der Widerstand bis in den Gigaohmbereich erhöht hatte, so dass ein sog. „Gigaseal“

entstanden war. Verwendet wurden nur solche Seals, die einen Widerstand  $> 20 \text{ G}\Omega$  erreichten, da nur so eventuell vorhandene Leckströme beim Vorliegen eines Gigaseals bedeutungslos gering waren. Nach der Sealbildung wurde der Unterdruck abgelassen, um die Membran zu schonen und keine mechanosensitive Kanäle zu aktivieren. Bei der nun vorliegenden Konfiguration befand sich die Zelle in der „cell-attached“ Konfiguration. Durch Anlegen einer Spannung von  $+ 20 \text{ mV}$  bis zu  $+ 100 \text{ mV}$  ließen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle registrieren. Befanden sich nun im Membranbereich unter der Patchpipette ein oder mehrere solcher Kanäle, konnte die Messung beginnen. Die Ströme wurden analog auf dem Oszilloskop beobachtet, mittels A/D-Wandler digitalisiert und für die spätere Auswertung gespeichert.

Zur Ermittlung der Strom- Spannungsbeziehung, aus der sich die Leitfähigkeit der Ionenkanäle bestimmen ließ, wurde eine Spannungsreihe von  $+ 20 \text{ mV}$  bis  $+ 100 \text{ mV}$  durchgeführt. Die jeweiligen Spannungssprünge betragen  $20 \text{ mV}$ .

Im nächsten Schritt wurde unter dem Einfluss der ausgewählten Substanzen (Sildenafil, 8-bromo-cGMP) die Ionenkanalaktivität bei  $+ 100 \text{ mV}$  gemessen und registriert.

Vor Applikation der Testsubstanz wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Danach wurde die Perfusionspipette an die Zelle herangefahren und mit der Perfusion begonnen. Die nächsten Messungen erfolgten eine Minute nach Perfusionsbeginn sowie alle fünf Minuten - für einen Zeitraum von 30 Sekunden - nach Start der Perfusion für eine Messdauer von insgesamt 30 Minuten.

### **2.3.7 Auswertung der Messergebnisse**

#### *Kanalcharakterisierung:*

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den Messungen um den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) handelte, sollte der Ionenkanal als solcher identifiziert worden sein.

Als Charakteristika dienten folgende vier Merkmale:

1. das spannungsabhängige Verhalten
2. die Leitfähigkeit
3. die Aktivierung durch Calcium und
4. die Blockade durch den hochspezifischen  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Blocker Iberiotoxin (IBX)

Zu 1.:

Wurde an die angepatchte Zellmembran eine positive Spannung angelegt, konnte ein Auswärtsstrom von Ionen registriert werden, dessen Amplitude mit Steigerung der angelegten positiven Spannung zunahm.

Zu 2.:

Jeder Ionenkanal besitzt eine spezifische Kanalleitfähigkeit. Mit Hilfe der pClamp Software V 6.0 (Axon Instruments, Foster City, USA) konnte die durchschnittlich durch den Ionenkanal geflossene Stromstärke errechnet werden. Aus der Gesamtheit der Messungen wurden die mittleren Strom- Spannungswerte ermittelt. Auf diese Weise ließ sich ein Strom- Spannungsdiagramm für den unitären Ionenauswärtsstrom erstellen. Durch die so erhaltenen Punkte wurde eine Regressionsgerade gelegt, die durch den Nullpunkt gehen sollte, da eine symmetrische Bad-/ Pipettenlösung (140 mmol K<sup>+</sup>/l) verwendet wurde. Die Leitfähigkeit wurde durch Berechnung der Steigung ermittelt und ist charakteristisch für den BK<sub>Ca</sub> in einem Bereich von 100- 250 pS [23,50].

Zu 3.:

Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des gemessenen Ionenkanals wurde in der „inside-out“ Konfiguration der Patch-Clamp-Messungen ermittelt. In dieser Konfiguration ließ sich eine Kanalaktivierung mit variablen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen erreichen. Hierzu wurden die angepatchten Membranbereiche mit Calciumlösungen der Konzentrationen 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-4</sup> mmol/l Calcium perfundiert. Darauf folgte eine Registrierung bei einem Pipettenpotential von + 60 mV.

Zu 4.:

Iberitoxin ist ein selektiver Blocker des BK<sub>Ca</sub>. Es wird aus dem Gift des Skorpions *Buthus tamulus* gewonnen. Durch Applikation dieser Substanz an die angepatchte Zellmembran kommt es zu einer direkten Bindung des Toxins an die Außenseite des Ionenkanals. Dadurch wird die im nicht blockierten Zustand für K<sup>+</sup>-Ionen permeable Pore verschlossen [20]. Kommt es im Rahmen der hier durchgeführten Experimente zu einer Reduktion bzw. Aufhebung der Aktivität des zu untersuchenden Kanals, handelt es sich um den BK<sub>Ca</sub>.

### *Auswertung der Patch-Clamp Experimente:*

Die in den Experimenten registrierten Ionenkanalaktivitäten wurden mit Hilfe der pClamp Software V 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) ausgewertet. Mit diesem Programm konnte die Öffnungswahrscheinlichkeit ( $NP_O$ ) direkt berechnet werden. Hierbei steht N für die Anzahl der im „Patch“ enthaltenen Kanäle und  $P_O$  für die Öffnungswahrscheinlichkeit des einzelnen Kanals. Nimmt der  $NP_O$  Werte  $> 1$  an, ist in der Messung mehr als nur ein Ionenkanal vorhanden.

## **2.4 Fura-2 AM-Imaging**

$Ca^{2+}$ -Messungen mittels FURA-2 AM-Imaging wurde nach der von Tsien et al. beschriebenen Methodik durchgeführt [68].

### **2.4.1 Vorbereitung der HUVEC**

Die Zellen wurden auf mit Gelatine vorbeschichtete Glasplättchen („coverslips“) ausgesät. Die HUVEC wurden in komplettem Nährmedium bei  $37^\circ C$  kultiviert bis die „coverslips“ (Langenbrinck, Teningen, Deutschland) weitgehend konfluent bewachsen waren.

Zunächst wurden  $50 \mu g$  FURA-2 AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in  $50 \mu l$  DMSO aufgelöst. Von dieser Stammlösung wurden  $5 \mu l$  mit  $1 ml$  Zellkulturmedium gemischt. Das Kulturmedium wurde von den „coverslips“ abgesaugt. Die Zellen wurden nun für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur mit FURA-2 AM inkubiert. Anschließend wurde der „coverslip“ aus der Petrischale entnommen und in die Messkammer eingesetzt. Als Kammermedium wurde Badlösung verwendet.

### **2.4.2 Messung**

Die Messungen erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland). FURA-2 AM bildet zusammen mit  $Ca^{2+}$  einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von  $340$  und  $380 nm$  zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von  $510 nm$  gemessen. Nach einer Messzeit von fünf Minuten wurden die Zellen durch Zugabe von  $10 \mu l$  Stimulationslösung in der Kammer angeregt.

Als Stimulationslösung dienten:

- Badlösung als Kontrolle
- $1 \mu mol/l$  Sildenafil

- 100 nmol/l IBX
- 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil + 100 nmol/l IBX
- 100  $\mu\text{mol/l}$  Aminoethyldiphenyl Borat (2- APB, Calbiochem, Schwalbach, Deutschland)
- 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil + 100  $\mu\text{mol/l}$  2- APB

Nach einer Gesamtmesszeit von 35 Minuten wurde die Messung beendet und ein sog. „Photobleach“ durchgeführt, um die Intensität des Hintergrundes zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen für 15 Minuten mit Licht der Wellenlänge 340 nm bestrahlt, was zur Folge hatte, dass der noch in den Zellen vorhandene FURA-2 AM-Farbstoff ausgebleicht wurde. Anschließend wurde noch einmal wie oben beschrieben gemessen. Die so erhaltene Intensität entspricht der Eigenintensität der Zellen ohne FURA-2 AM und wurde als Hintergrund von den während der eigentlichen Experimente gemessenen Lichtintensitäten subtrahiert.

### **2.4.3 Datenauswertung**

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte computergesteuert. Dabei wurde das TILL photonics Imaging System (TILL photonics, Martinsried, Deutschland) verwendet. Die gemessene Fluoreszenz der beiden Wellenlängen wurde in Bezug gesetzt, so dass die eigentlichen Daten eine Ratio aus 340 nm zu 380 nm darstellen.

## **2.5 cGMP- Radioimmunoassay**

Bei diesem Verfahren wurde die Bildung des intrazellulären „second messenger“ cGMP bestimmt. Dieser „second messenger“ wird bei der Umwandlung von GTP in cGMP in der Zelle gebildet [38]. Der cGMP-Spiegel der Zellen wurde durch Verwendung eines [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-Radioimmunoassay Kits (RIA; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt.

### **2.5.1 Gewinnung der Proben**

In mit Gelatine vorbeschichteten 9,6 cm<sup>2</sup> Plastikpetrischalen wurden 60.000 Zellen in komplettem EBM ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen in acht verschiedenen Ansätzen stimuliert:

1. Badlösung als Kontrolle
2. 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil
3. 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil + 100 nmol/l IBX

4. 100 nmol/l IBX
5. 10  $\mu\text{mol/l}$  BAPTA (Calbiochem, Schwalbach, Deutschland)
6. 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil + 10  $\mu\text{mol/l}$  BAPTA
7. 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil + calciumfreie Lösung
8. calciumfreie Lösung

Die Substanzen wurden in Badlösung gelöst. Vor der 30 minütigen Inkubation des Ansatzes mit oben genannten Lösungen bei Raumtemperatur wurden die Zellen einmal mit 2 ml Badlösung gewaschen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Stimulationslösung abgesaugt und 500  $\mu\text{l}$  eiskaltes 98% Ethanol (Riedel de Haen, Seelze, Deutschland) auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen durch Lagern auf flüssigen Stickstoff für 30 Sekunden schockgefroren. Danach wurden die Zellschälchen aus dem Stickstoff entnommen, auf der Handfläche aufgetaut und mit einem Cell-Scraper (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) sorgfältig abgeschabt. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Um sicher zu gehen, dass auch wirklich alle Zellen überführt worden waren, wurde die Zellschale noch einmal mit weiteren 250  $\mu\text{l}$  Ethanol gespült und wiederum in das vorbereitete Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurde das so gewonnene Zelllysate bei 12000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In diesem Überstand befand sich das zu messende cGMP, das durch Verdampfen des Ethanols bei 30°C in einem Heizblock über Nacht von diesem getrennt und dann als Probe in dem RIA weiterverarbeitet wurde.

### **2.5.2 Durchführung des RIA**

Alle Substanzen mit Ausnahme der Proben sind in dem [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-RIA enthalten. Zunächst wurde aus der 8 pmol/l enthaltenden cGMP- Standardlösung gemäß Protokoll eine Verdünnungsreihe angefertigt, so dass sich cGMP-Lösungen der Konzentrationen 8 pmol/l, 4 pmol/l, 2 pmol/l, 1 pmol/l und 0,5 pmol/l ergaben. Aus dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 50  $\mu\text{l}$  der Standardlösung beschickt. Außerdem wurden je zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 50  $\mu\text{l}$  Puffer- bzw. mit 50  $\mu\text{l}$  Blanklösung gefüllt. Als letztes wurde auf jede Probe 50  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser gegeben und die Eppendorfgefäße gut gevortext, nachdem der Alkohol vollständig verdampft war. Dieser Ansatz stand während des ganzen Versuches in einem Eisbad.

In jedes Eppendorfgesäß wurden je 25 µl Anti-cGMP-Antiserum und [<sup>3</sup>H]-cGMP hinzupipettiert. Die Eppendorfgesäß wurden für wenige Sekunden gevortext und dann in einem Eisbad für 90 Minuten in einen Kühlschrank (+ 4°C) gestellt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jedes Eppendorfgesäß mit 500 µl eiskaltem, dem RIA-Kit entnommenen Ammoniumsulfat befüllt, kurz gevortext und für fünf Minuten zurück in das Eisbad gestellt. Danach wurden die Ansätze für 90 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 550 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 500 µl in ein Szintivial (Vail Pocto/ 6 ml, Packard, Groningen, Niederlande) überführt, und mit 4 ml Szinticoctail (Ultima Gold, Packard, Groningen, Niederlande) aufgefüllt. Die Szintivials konnten nun im β-Counter (1600 TR, Liquid Scintillation Analyzer, Canberra Packard, Frankfurt, Deutschland) gemessen werden.

Aus den Messergebnissen für die cGMP-Standards (0,5 pmol/l bis 8 pmol/l) wurde gemäß der Anleitung des Kits eine Eichgerade berechnet, von der die cGMP-Konzentrationen der Proben abgelesen werden konnten. Für die verschiedenen Messreihen wurden jeweils eigene Eichgeraden angefertigt.

## **2.6 Statistik**

Die erhobenen Daten repräsentieren grundsätzlich Mittelwerte aus mehreren Messreihen, die immer mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Zusätzlich ist noch der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Alle Aussagen zu Signifikanzniveaus für die Daten aus den Patch-Clamp-Messungen beruhen auf den statistischen Testverfahren „Friedman“ und „Nemenyi“. Für die Daten aus den übrigen Experimenten wurde eine Datenanalyse mittels der ANOVA durchgeführt [58]. Die Berechnungen erfolgten mit dem Computerprogramm SPSS für Windows (Version 10.0).

### **3. Ergebnisse**

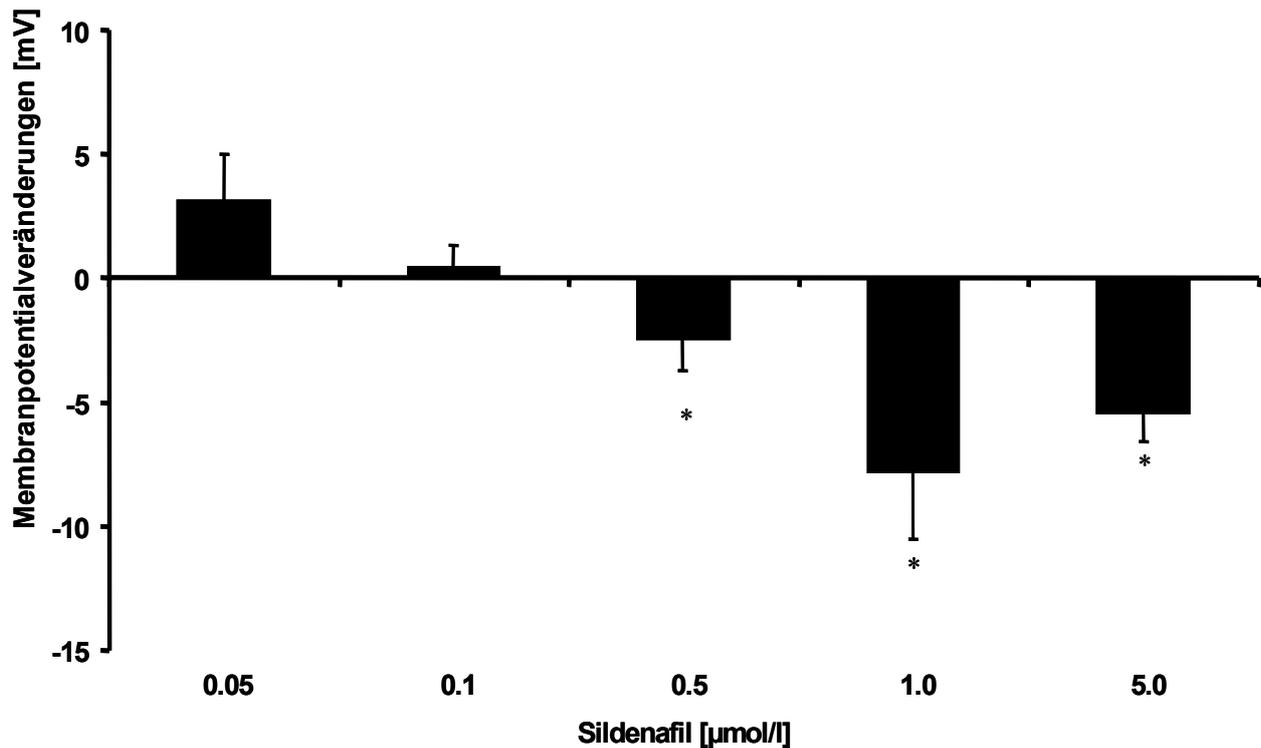
Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der in Kapitel 2 beschriebenen Versuche dargestellt. Zuerst werden die Daten aus den Membranpotentialmessungen, dann die aus den Patch-Clamp-Experimenten und darauf folgend die Ergebnisse aus den Messungen zur Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase dargestellt. Zum Schluss werden die Resultate aus den cGMP-Spiegel Bestimmungen aufgezeigt.

#### **3.1 Ergebnisse der Messungen des Membranpotentials**

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus den DIBAC-Messungen dargestellt. Zuerst werden die Resultate der Konzentrationsreihe von Sildenafil auf das Membranpotential gezeigt. Danach wird dargestellt, in wie weit der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  Einfluss auf die Membranpotentialveränderungen unter Sildenafil nimmt.

##### **3.1.1 Effekt von Sildenafil auf das endotheliale Zellmembranpotential**

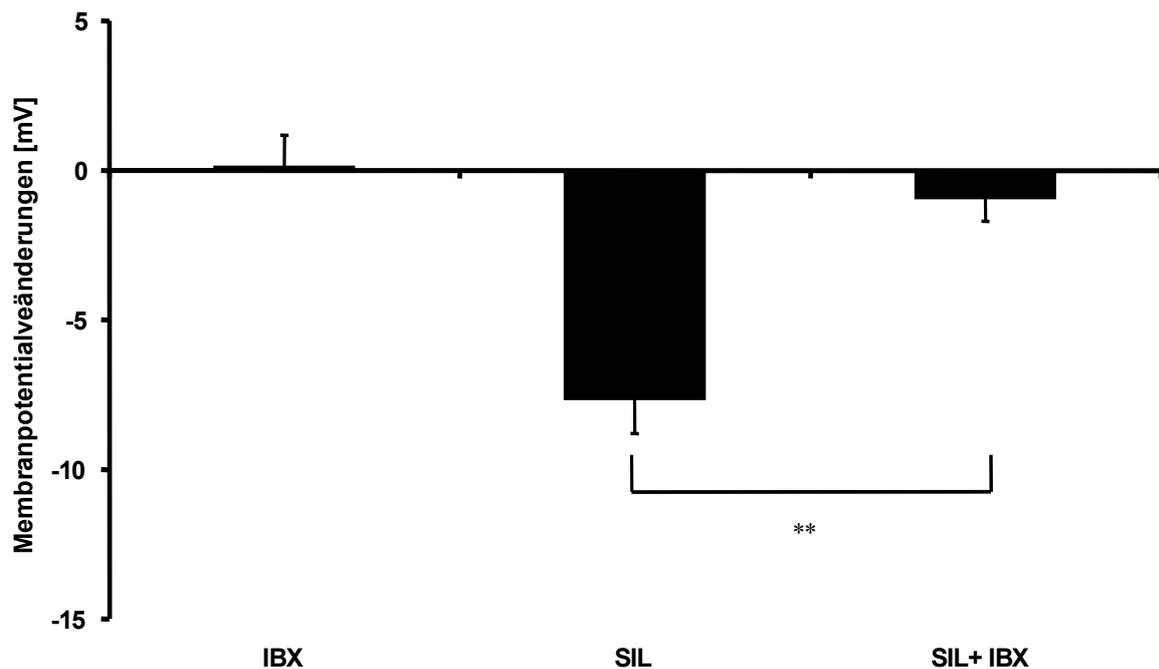
Um zu sehen, ob der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil Einfluss auf das endotheliale Membranpotential nimmt, wurde mit Hilfe des DIBAC-Imaging die Membranpotentialveränderungen von HUVEC nach Zugabe von Sildenafil in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es wurden folgende Konzentrationen von Sildenafil eingesetzt: 0,05  $\mu\text{mol/l}$ , 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$ . Nach Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  Sildenafil zeigte sich der deutlichste Effekt, so dass in allen nachfolgenden Experimenten diese Konzentration eingesetzt wurde. Diese Konzentrationsreihe ist in der folgenden Grafik dargestellt



**Abbildung 4:** Einfluss von Sildenafil in verschiedenen Konzentrationen auf das Membranpotential. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=20$ ;  $*p < 0.05$  vs. Kontrolle) dargestellt. Die Messdauer betrug für jede Konzentration 30 Minuten.

### 3.1.2 Einfluss des $BK_{Ca}$ auf die durch Sildenafil bedingten endothelialen Membranpotentialveränderungen

Bei einer Aktivierung des  $BK_{Ca}$  kommt es in der Regel zu einer Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran. Um zu untersuchen, ob die Membranpotentialveränderungen, die unter der Zugabe von Sildenafil gesehen wurden, eventuell durch den  $BK_{Ca}$  bedingt sind, wurde eine weitere DIBAC-Imaging Versuchsreihe durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von 100 nmol/l IBX der Effekt von Sildenafil auf das Membranpotential komplett aufgehoben werden konnte. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die endothelialen Membranpotentialveränderungen unter Sildenafil  $BK_{Ca}$  abhängig sind. Dies zeigt die Abbildung 5.



**Abbildung 5:** Einfluss von Sildenafil ( $1\mu\text{mol/l}$ ) nach Blockade des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  durch IBX auf das Membranpotential. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=20$ ;  $**p < 0,01$  vs. Kontrolle) dargestellt. Die Messdauer betrug 30 Minuten.

### 3.2 Patch-Clamp-Experimente

Im diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente dargestellt. Zunächst wird auf die Identifikation des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  eingegangen. Dann folgen die Resultate aus den Versuchen mit Sildenafil, 8-bromo-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMP.

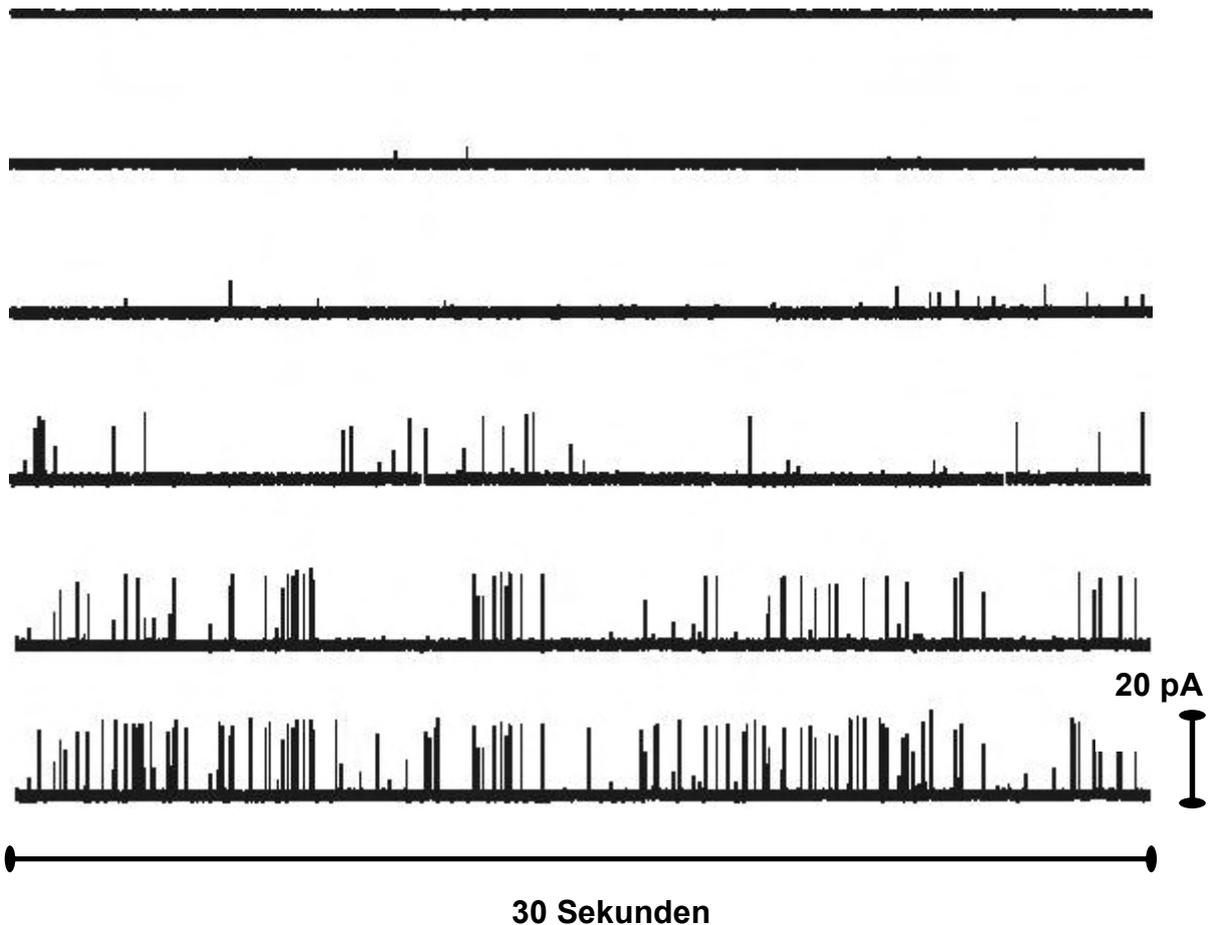
#### 3.2.1 Ionenkanalidentifikation

Die Ionenkanalidentifikation erfolgte durch Darstellung der vier charakteristischen Merkmale: Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeitsbestimmung, Calciumabhängigkeit und Blockade durch Iberiotoxinperfusion.

##### *Spannungsabhängigkeit:*

Als erstes den gemessenen Ionenkanal als  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  charakterisierendes Merkmal wurde die Spannungsabhängigkeit des Kanals untersucht. Hierbei wurde von einem

Pipettenpotential von 0 mV ausgehend eine Spannungssteigerung um jeweils + 20 mV bis zu einer Klemmspannung von + 100 mV durchgeführt und die Kanalaktivität registriert. Es zeigte sich, dass mit steigendem Pipettenpotential nicht nur die Amplitude des Ionenkanals, sondern auch dessen Aktivität, d.h. die Anzahl der Ionenkanalöffnungen pro Zeit, zunahm.



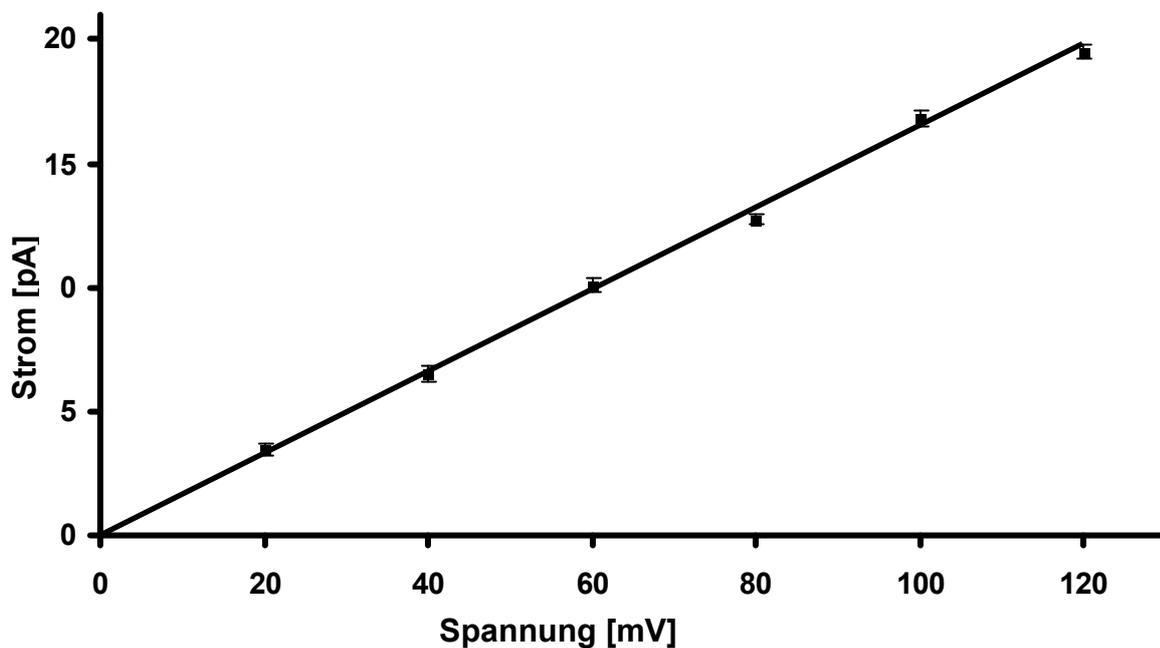
**Abbildung 6:** Spannungsabhängigkeit des  $BK_{Ca}$ . Registrierung der Kanalaktivität in der „cell-attached“-Konfiguration bei symmetrischer  $K^+$ -Konzentration bei einem Pipettenpotential von 0 mV (erste Reihe) bis 100 mV (letzte Reihe). Die Kanalregistrierung erfolgte in 20 mV Abständen.

*Leitfähigkeitsbestimmung:*

Vor der Perfusion mit der jeweiligen Substanz wurde anhand von Kontrollmessungen die Leitfähigkeit der gemessenen Ionenströme bestimmt. Aus den jeweils gemessenen Amplituden des unitären Stromes wurde eine Strom-

Spannungsbeziehung erstellt, und - wie in Abbildung 7 dargestellt - eine Regressionsgerade durch diese Punkte gelegt. Diese Regressionsgerade zeigt, dass das Strom-Spannungsverhältnis bei einer symmetrischen Kaliumkonzentration von 140 mmol/l linear ist. Wird die Steigung der Regressionsgeraden ermittelt, lässt sich die mittlere Leitfähigkeit des BK<sub>Ca</sub> berechnen. Es ergab sich ein Wert von 170 pS ± 2,1 pS.

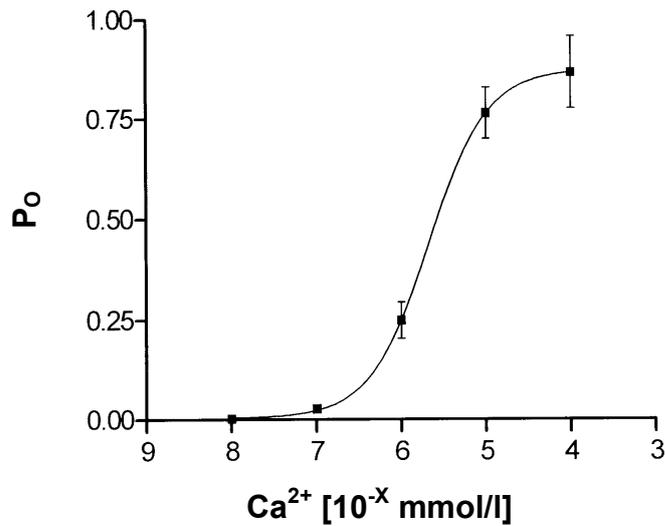
Dieses Ergebnis entspricht dem von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Leitfähigkeitsbereich von 100-250 pS für diesen Ionenkanal [23,50].



**Abbildung 7:** Strom-Spannungs-Beziehung zur Bestimmung der Leitfähigkeit. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus n= 7 Kontrollmessungen und der berechneten Regressionsgeraden.

#### *Calciumabhängigkeit:*

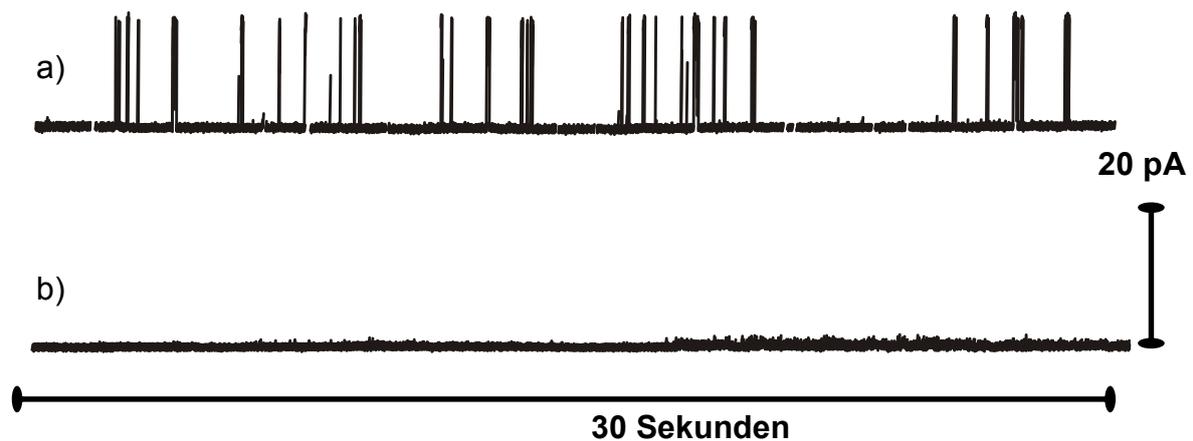
Die Calciumabhängigkeit wurde in der „inside-out“ Konfiguration mit verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationslösungen bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 10<sup>-7</sup> mmol/l bis 10<sup>-4</sup> mmol/l eingesetzt. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit erzielt wurde. Unter Verwendung einer Boltzman-Funktion wurde eine halbmaximale Aktivierung bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 10<sup>-5,7</sup> mmol/l ermittelt werden.



**Abbildung 8:** Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des registrierten Kanals. Messungen an n= 5 Zellen bei einem Pipettenpotential von + 80 mV. Dargestellt sind Mittelwerte der Öffnungswahrscheinlichkeit ± SEM. Die halbmaximale Aktivierung des Kanals findet sich bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 10<sup>-5.7</sup> mmol/l.

#### *Selektive Blockade durch IBX:*

Zum Schluss wurden Versuche zur Identifizierung des BK<sub>Ca</sub> anhand der selektiven Blockade des Kanals durch IBX durchgeführt. Hierzu wurde die „outside-out“ Konfiguration verwendet. Die „outside-out“ Patches wurden mit 100 nmol/l IBX-Lösung perfundiert. Dies führte zu der erwarteten Blockade des Ionenkanals.



**Abbildung 9:** Selektive Blockade durch IBX. Originalregistrierung der BK<sub>Ca</sub>-Aktivität unter Perfusion mit 100 nmol/l IBX in der „outside-out“ Konfiguration bei einem Pipettenpotential von + 100 mV. In a) ist die Messung unter Kontrollbedingung vor Perfusionsbeginn, in b) Fünf Minuten nach Beginn der Perfusion mit IBX dargestellt.

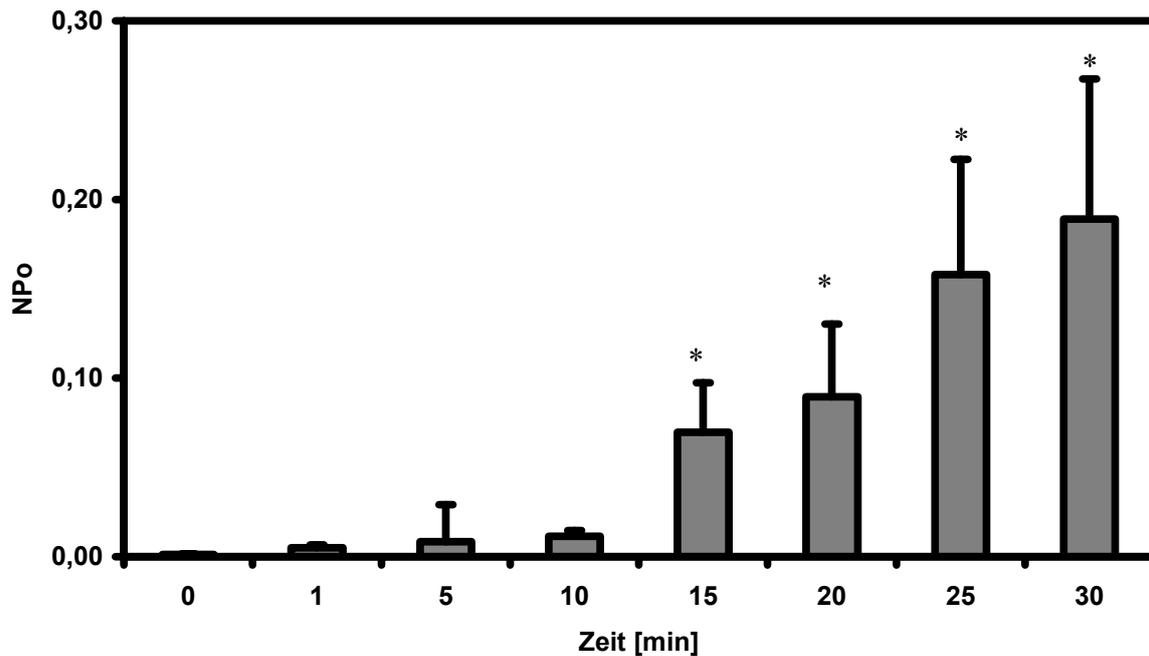
### 3.2.2 Einfluss von Sildenafil auf den endothelialen BK<sub>Ca</sub>

In der „cell-attached“ Konfiguration wurde der Einfluss von Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> untersucht. Die Messungen wurden mit einem Pipettenpotential von + 100 mV durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> nach Zugabe von Sildenafil. Die statistische Auswertung der Patch-Clamp-Experimente unter Perfusion mit Sildenafil zeigte bei einem Pipettenpotential von + 100 mV einen signifikanten Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit (NPo). Unter Kontrollbedingungen von NPo ( $0,001 \pm 0,001$ ) kam es nach einer Perfusionsdauer von 15 Minuten zu einer Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit auf  $0,070 \pm 0,028$ . Dieser Anstieg hielt bis zum Ende der Beobachtungszeit an. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 und 11 graphisch zusammengefasst.



**Abbildung 10:** Einfluss von Sildenafil auf die BK<sub>Ca</sub>-Aktivität.

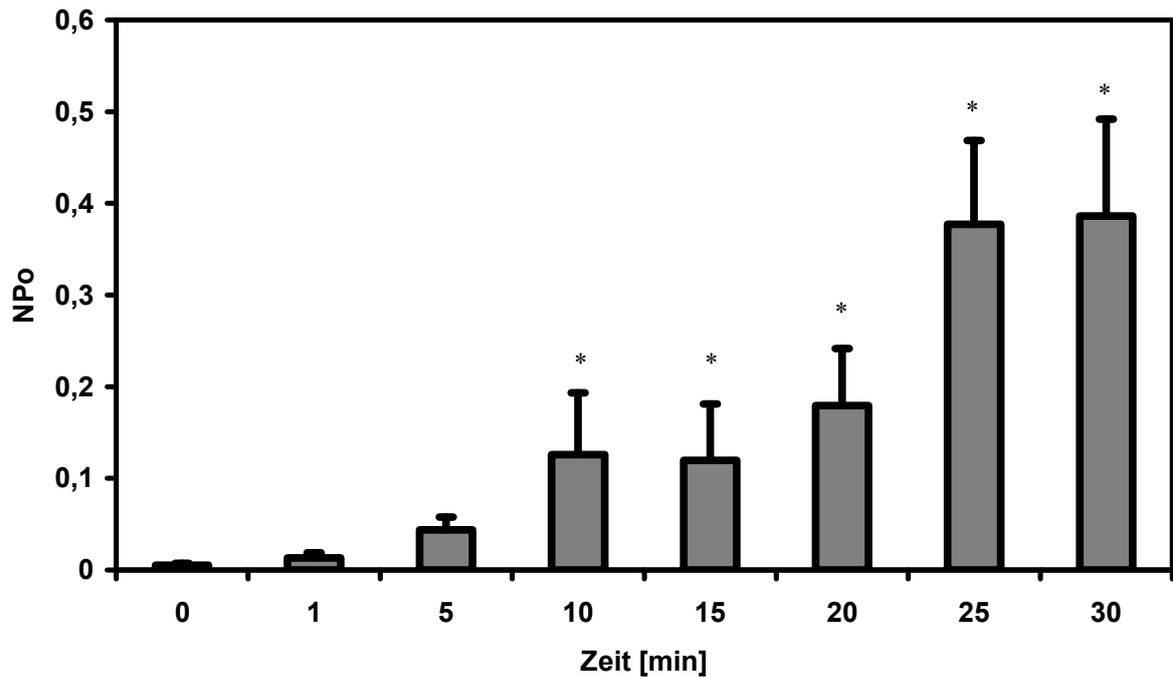
Das Öffnungsverhalten des BK<sub>Ca</sub> wurde bei einem Pipettenpotential von + 100 mV in der „cell-attached“ Konfiguration untersucht. Die obere Reihe zeigt die Kanalaktivität unter Kontrollbedingungen, die untere die Kanalaktivität während der Perfusion mit 1  $\mu$ mol/l Sildenafil- Lösung 15 Minuten nach Perfusionsbeginn.



**Abbildung 11:** Öffnungswahrscheinlichkeit (NPO) des BK<sub>Ca</sub> unter Perfusion mit Sildenafil (1 µmol/l). Registrierung bei einem Pipettenpotential von + 100 mV. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM n = 17; \*p < 0.05 vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

### 3.2.3 Einfluss von 8-bromo-cGMP auf den endothelialen BK<sub>Ca</sub>

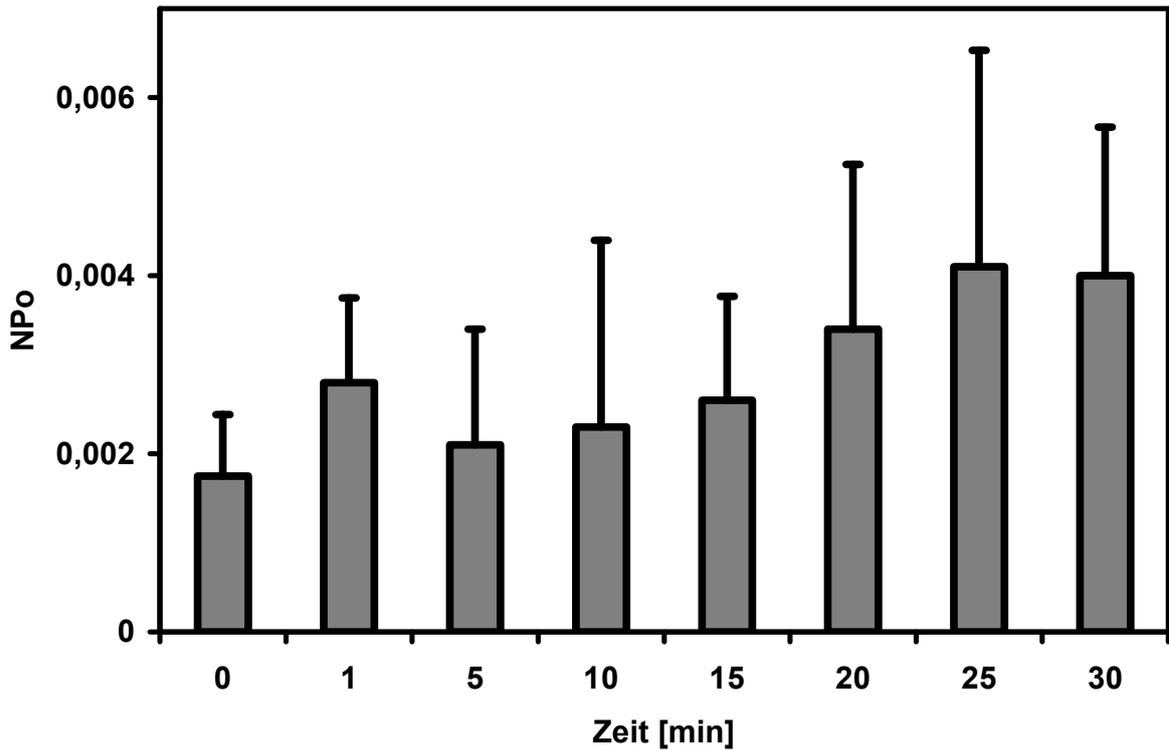
8-bromo-cGMP ist ein zellpermeables cGMP-Analogon. In vorherigen Studien an anderen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass cGMP den BK<sub>Ca</sub> aktiviert [3,4,6,15,25]. Analog zu den Messungen mit Sildenafil wurden Patch-Clamp-Messungen unter Perfusion mit 0,05 µmol/l 8-bromo-cGMP in der „cell-attached“ Konfiguration bei einem Pipettenpotential von + 100 mV durchgeführt. Im Vergleich zur nicht perfundierten Kontrollmessung ließ sich eine signifikante Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> nach zehn Minuten Perfusion registrieren. Im Einzelnen ergab sich nach zehn Minuten 8-bromo-cGMP Einwirkung bei einem Pipettenpotential von + 100 mV eine Steigerung der NPO von  $0,005 \pm 0,002$  (Kontrollbedingung) auf  $0,126 \pm 0,067$  (8-bromo-cGMP). Die statistische Auswertung dieser Messreihe ergab nach zehn Minuten einen signifikanten Anstieg der BK<sub>Ca</sub>-Öffnungswahrscheinlichkeit, die über 30 Minuten nachweisbar war. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** Öffnungswahrscheinlichkeit des  $BK_{Ca}$  unter Perfusion mit  $0,05 \mu\text{mol/l}$  8-bromo-cGMP bei einem Pipettenpotential von  $+100 \text{ mV}$  ( $n=12$ ;  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.2.4 Einfluss von 8-bromo-cGMP auf den endothelialen $BK_{Ca}$ nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP

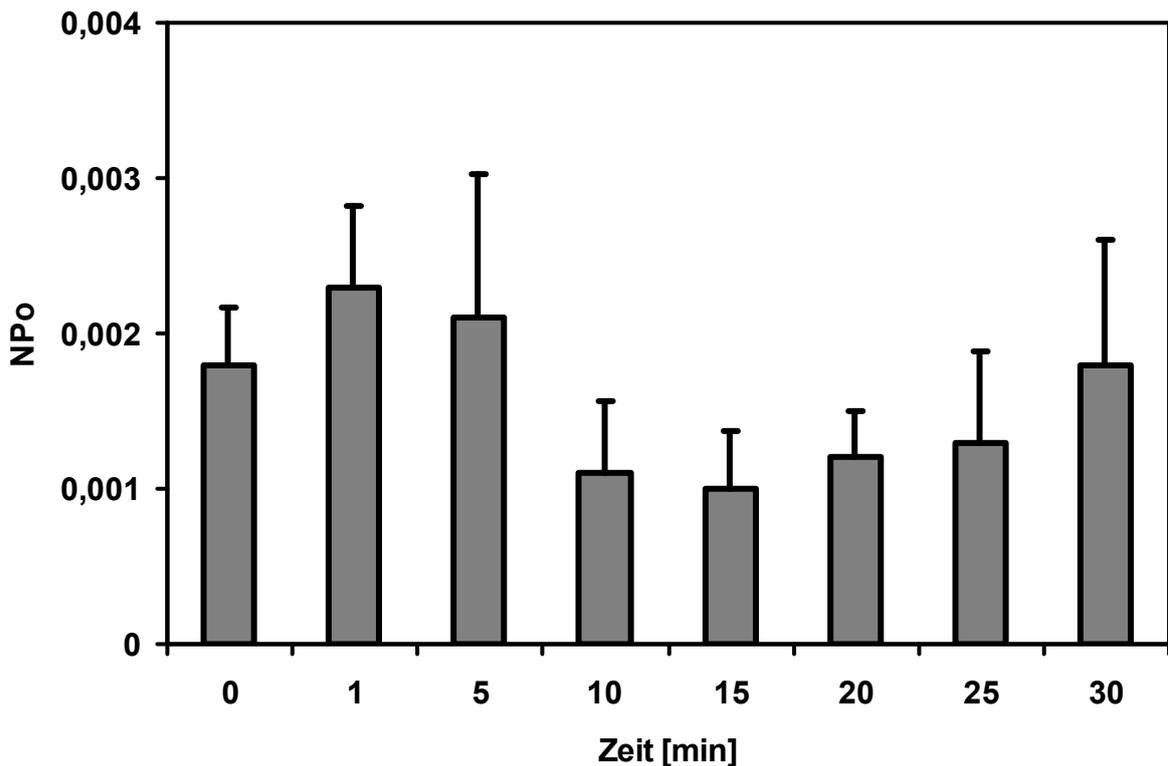
Nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP, einem Inhibitor der PKG, ließ sich während fortlaufender Perfusion mit 8-bromo-cGMP keine signifikante Steigerung der Kanalaktivität erzielen.



**Abbildung 13:** BK<sub>Ca</sub>-Aktivierung nach Vorinkubation von Rp-8-pCPT-cGMP während kontinuierlicher Perfusion mit 8-bromo-cGMP. Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt (n= 12; p= n.s.).

### 3.2.5 Einfluss von Rp-8-pCPT-cGMP auf den BK<sub>Ca</sub>

Wie in Abbildung 14 dargestellt, hat der PKG-Inhibitor Rp-8-pCPT-cGMP keinen Einfluss auf die Kanalaktivität im Vergleich zur Kontrollmessung, so dass ein Eigeneffekt auf die BK<sub>Ca</sub>-Aktivität ausgeschlossen werden kann.

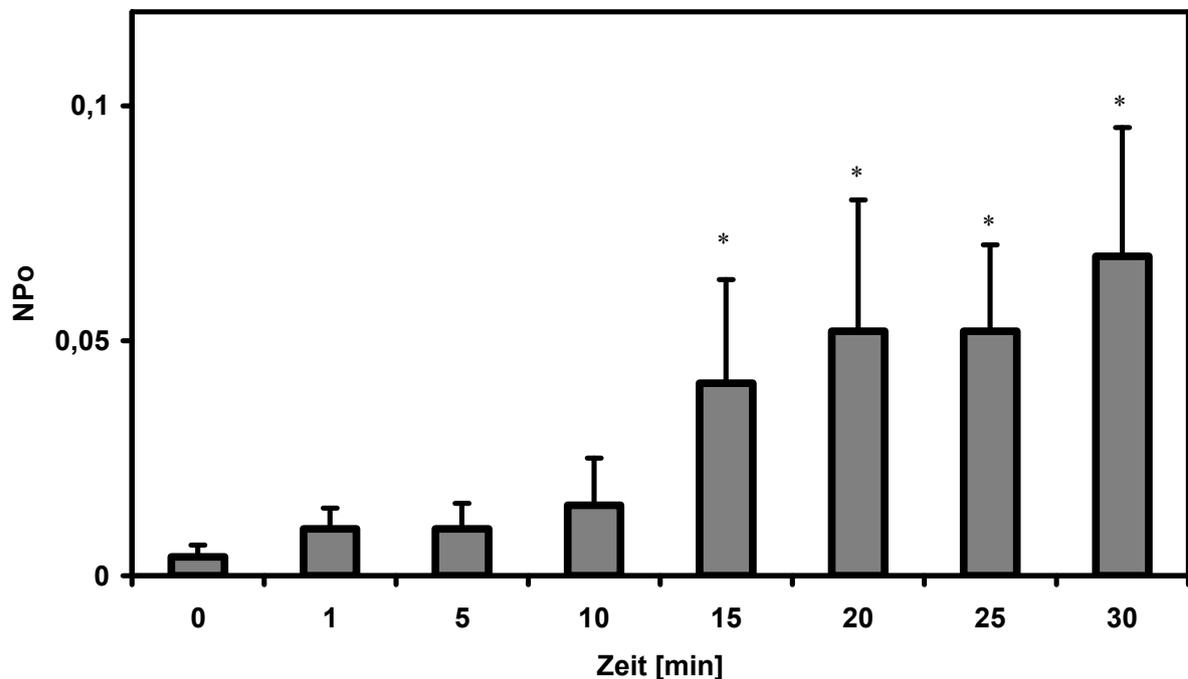


**Abbildung 14:** Einfluss von Rp-8-pCPT-cGMP auf den BK<sub>Ca</sub> (n= 12; p= n.s.). Es konnte kein signifikanter Unterschied der Kanalaktivität im Vergleich zur Kontrollmessung gezeigt werden.

### 3.2.6 Einfluss von Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP

Es ist bekannt, dass der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil den cGMP-Spiegel in der Zelle erhöht [9]. Somit könnte der durch Sildenafil vermittelte Anstieg des „second messenger“ cGMP ein möglicher Mediator in der Signalkaskade sein, die den BK<sub>Ca</sub> aktiviert. Deshalb wurden Patch-Clamp-Messungen mit Perfusion von Sildenafil nach Vorinkubation von 30 Minuten mit Rp-8-pCPT-cGMP durchgeführt. Es zeigte sich, dass Rp-8-pCPT-cGMP die Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> bei gleichzeitiger Perfusion mit Sildenafil im Vergleich zur Kontrollmessung vor Beginn der Sildenafilperfusion nicht signifikant reduziert (siehe Abbildung 15). Das Ergebnis der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> bei Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP war aber niedriger als bei der alleinigen Perfusion mit Sildenafil (NPO nach 30 Minuten Perfusion: Sildenafil  $0,189 \pm 0,078$ ; Sildenafil + Rp-8-pCPT-cGMP  $0,068 \pm 0,027$ ;  $p < 0,05$ ). Dies zeigt, dass der „second messenger“ cGMP die Sildenafil vermittelte

Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> beeinflusst. Möglicherweise gibt es noch weitere Signalwege, über die Sildenafil den BK<sub>Ca</sub> aktiviert.

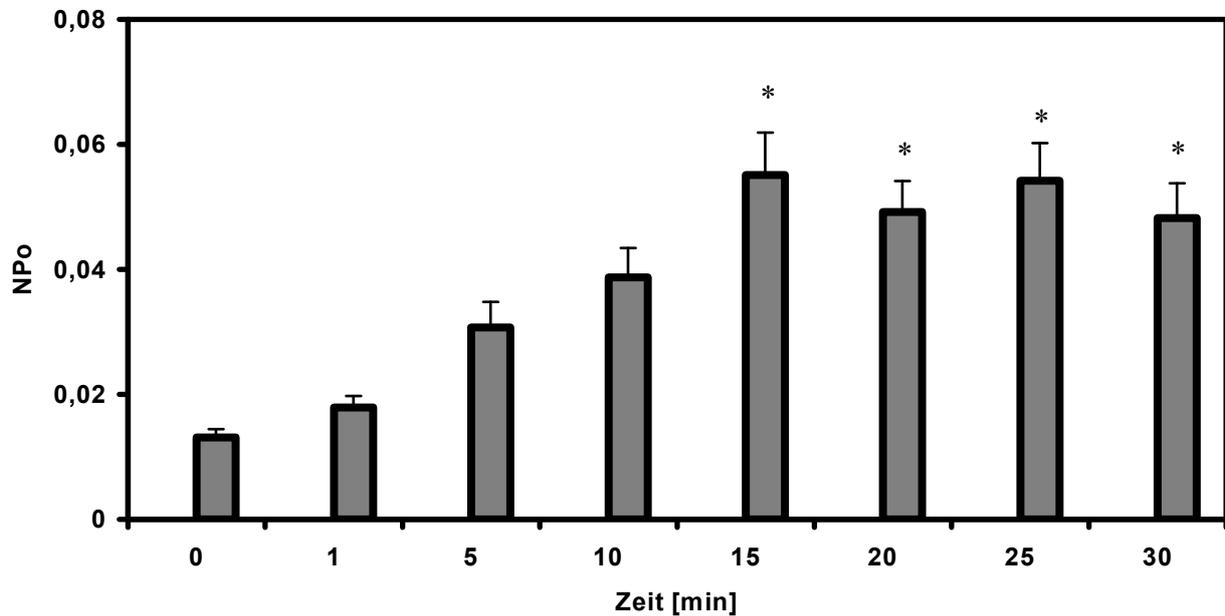


**Abbildung 15:** Einfluss von 1 µmol/l Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP. Die Messung erfolgte bei einem Pipettenpotential von + 100 mV. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM; n= 12; \*p<0.05 vs. Kontrolle.

### 3.2.7 Einfluss von Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> in der „inside-out“ Konfiguration

Ein weiterer Signalweg, über den Sildenafil den BK<sub>Ca</sub> aktivieren könnte, ist die direkte Aktivierung des Kanals. Um diese direkte Kanalaktivität zu messen, wurden Patch-Clamp-Messungen in der „inside-out“ Konfiguration durchgeführt. Unter Perfusion mit 1 µmol/l Sildenafil in der „inside-out“ Konfiguration zeigte sich bei einem Pipettenpotential von + 100 mV eine Steigerung der Ionenkanalaktivität. Nach 15 Minuten Sildenafil- Einwirkung kam es zu einer Steigerung der NPo von  $0,013 \pm 0,001$  (Kontrollbedingungen) auf  $0,055 \pm 0,007$  (Sildenafil „inside-out“ Konfiguration). Die statistische Auswertung dieser Messreihe ergab einen signifikanten Anstieg der BK<sub>Ca</sub>-Öffnungswahrscheinlichkeit, die über 30 Minuten nachweisbar war. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den gemessenen Werten von Sildenafil aus der „cell-attached“-Versuchsreihe, so zeigt sich, dass die hier gewonnenen Ergebnisse etwa viermal niedriger sind (NPo nach 30 Minuten Perfusion: Sildenafil („cell-attached“)

0,0189 ± 0,078; Sildenafil („inside-out“) 0,048 ± 0,006; p<0.05 „cell-attached“ vs. „inside-out“). Die Zusammenfassung dieser Daten aus der „inside-out“ Konfiguration ist in Abbildung 16 zu sehen.

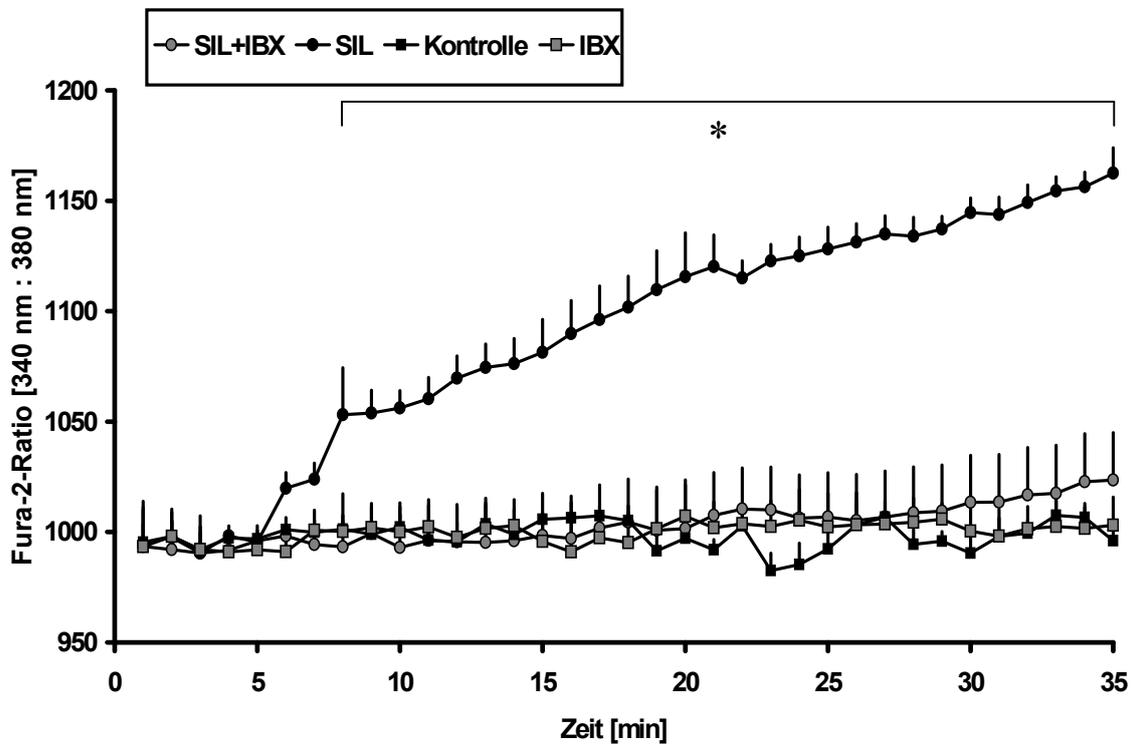


**Abbildung 16:** Messung der BK<sub>Ca</sub> Aktivität in der „inside-out“ Konfiguration nach kontinuierlicher Perfusion von 1 µmol/l Sildenafil. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, n= 10;\*p= 0.05 vs. Kontrolle.

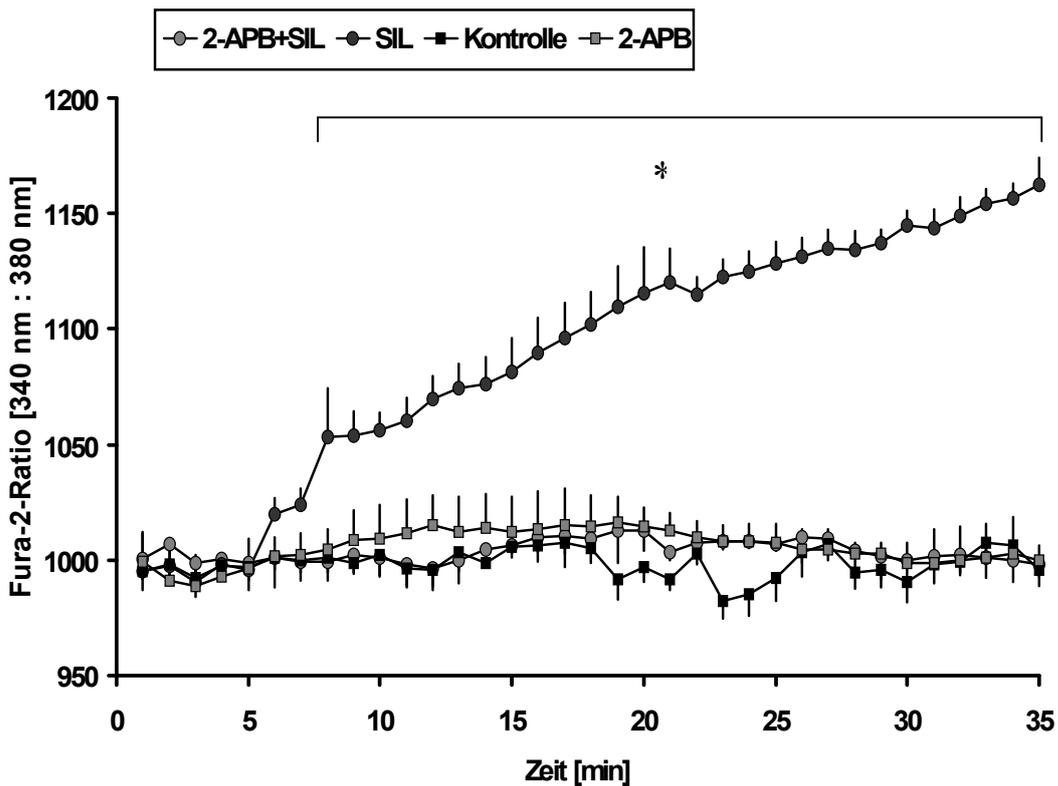
### 3.3 Einfluss von Sildenafil auf die zelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase

Bei einer Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> kommt es in der Regel zu einer Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran. Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines Ca<sup>2+</sup>-Influx in Form eines kapazitiven Einstroms von extrazellulären Calcium. Um die Beeinflussung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch Sildenafil zu erfassen, wurden intrazelluläre Calciummessungen mit der Fura-2A-Methode durchgeführt. Nach Zugabe von 1 µmol/l Sildenafil wurde ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> nach acht Minuten beobachtet. Dieser Effekt auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ließ sich durch Vorinkubation der HUVEC mit 100 nmol/l IBX signifikant reduzieren. Um zu zeigen, dass es sich tatsächlich um einen kapazitiven Einstrom von extrazellulären Ca<sup>2+</sup> handelt, wurden die Zellen mit 100 µmol/l 2-APB vorinkubiert. Nach fünf Minuten Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von Sildenafil, und es wurde erneut gemessen. Es zeigte sich, dass 2-APB durch Blockierung des extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Influx die zuvor gemessenen Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch Sildenafil

aufheben konnte. Diese Daten sind in den Abbildungen 17 und 18 graphisch zusammengefasst.



**Abbildung 17:** Einfluss von Sildenafil auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle) dargestellt. Die Gabe von Sildenafil erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Vorinkubation mit IBX wurde fünf Minuten vor Zugabe von Sildenafil begonnen ( $n = 30$ ;  $p = n.s.$ ).



**Abbildung 18:** Extrazellulär bedingter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach Zugabe von Sildenafil. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$  vs. Kontrolle) dargestellt. Die Gabe von Sildenafil erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Vorinkubation mit 2-APB erfolgte fünf Minuten vor Zugabe von Sildenafil ( $n = 30$ ;  $p = \text{n.s.}$ ).

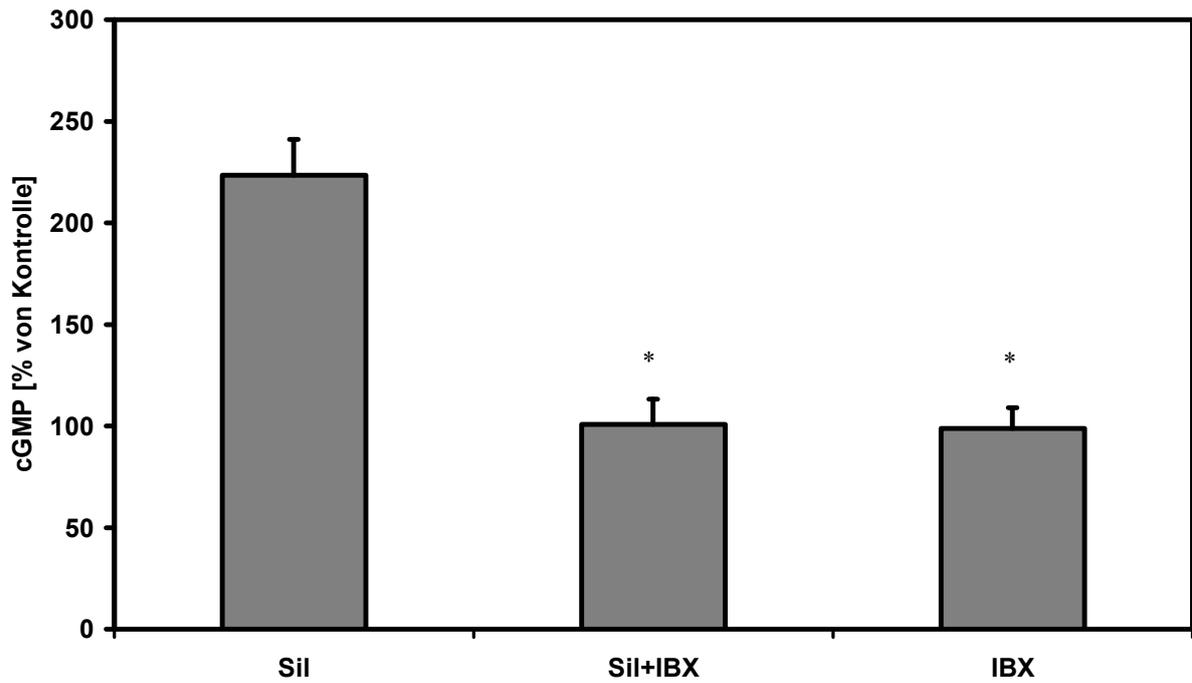
### 3.4 Einfluss von Sildenafil auf den cGMP-Spiegel in Endothelzellen

Mittels eines [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-RIA wurden die cGMP-Spiegel in HUVEC bestimmt. In der Kontrollgruppe, auf die sich alle weiteren Messungen beziehen, wurde die basale Bildung von cGMP gemessen. Wie aus der Literatur bekannt ist, erhöht der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil den cGMP-Spiegel in der Zelle [9].

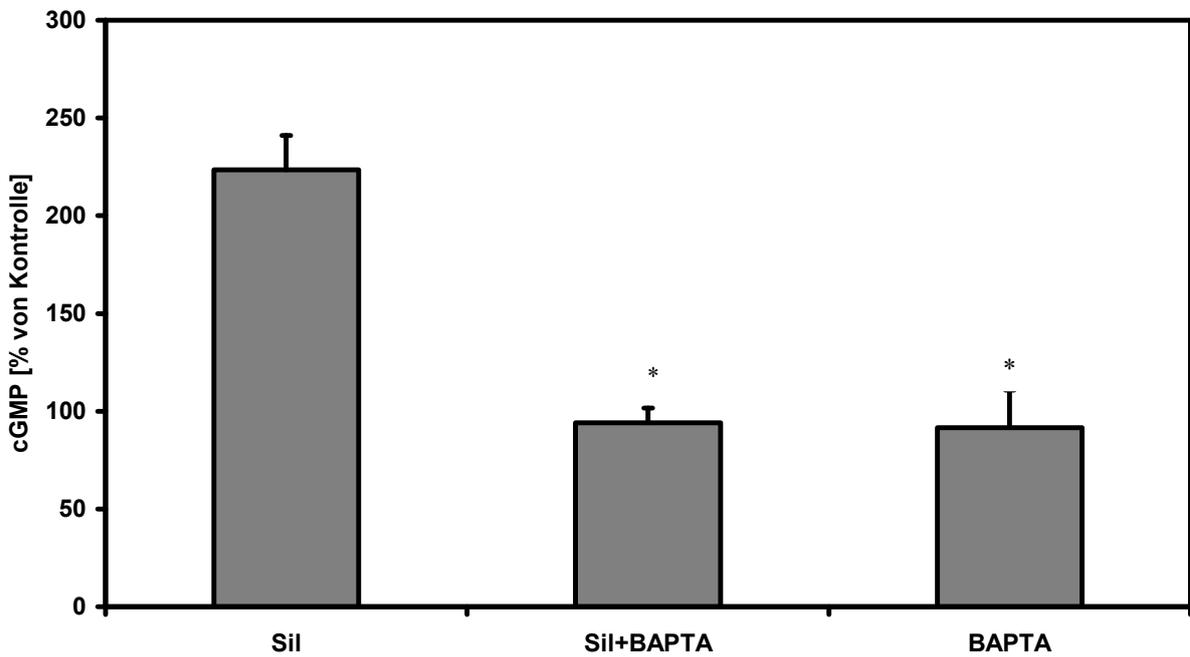
Nach Stimulation mit  $1 \mu\text{mol/l}$  Sildenafil kam es zu einem signifikanten Anstieg des cGMP-Levels in den Endothelzellen auf 223,5% gegenüber dem Kontrollwert. Dieser Anstieg ließ sich durch den selektiven  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Blocker Iberiotoxin um 122,6% reduzieren. Um zu zeigen, dass die Erhöhung des cGMP-Spiegels von Sildenafil Calcium abhängig ist, wurde der Calciumchelator BAPTA eingesetzt. Durch diese Inhibierung konnte der durch Sildenafil induzierte cGMP Anstieg um 129,5% gesenkt werden.

Nun stellte sich die Frage, woher die Zellen das Calcium beziehen, um den cGMP-Spiegel intrazellulär zu erhöhen. Hierzu wurde zum einen  $\text{Ca}^{2+}$ -reduzierte Lösung und zum anderen der extrazelluläre Calciumblocker 2-APB eingesetzt [6]. Sowohl durch  $\text{Ca}^{2+}$ -reduzierte Lösung (109 %) als auch durch 2-APB (115 %) konnte der durch Sildenafil induzierte cGMP-Anstieg reduziert werden.

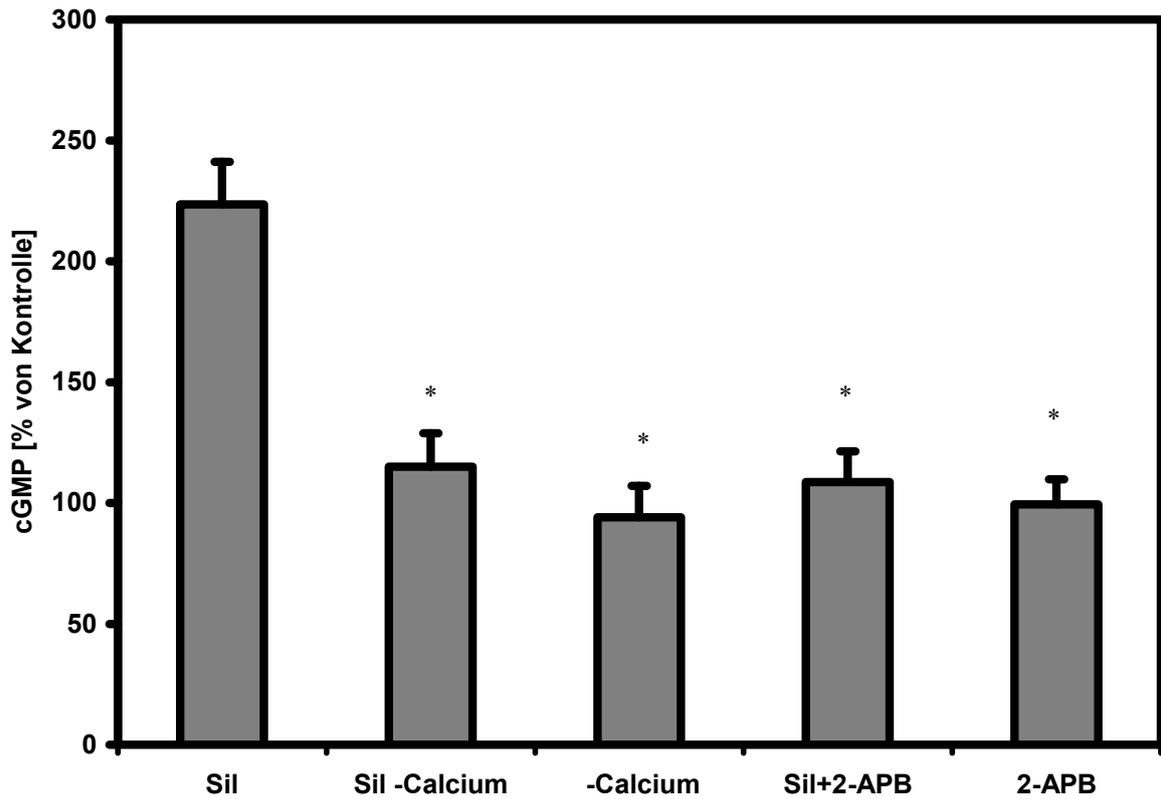
Diese Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (19- 21) dargestellt.



**Abbildung 19:** Reduzierung des Sildenafil vermittelten cGMP-Anstiegs nach Inhibierung des BK<sub>Ca</sub> mit IBX. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt ± SEM (n= 10; \*p= 0.05 vs. Sildenafil).



**Abbildung 20:** Messung der cGMP-Spiegel in der Zelle nach Stimulation mit 1 µmol/l Sildenafil und nach Vorinkubation mit BAPTA. Daten sind als Mittelwerte dargestellt ± SEM (n= 10; \*p= 0.05 vs. Sildenafil).



**Abbildung 21:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der durch cGMP bedingten cGMP-Levels in der Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n= 10; \*p= 0.05 vs. Sildenafil).

## 4. Diskussion

In 4.1 sollen zunächst die Ergebnisse der Ionenkanalidentifikation diskutiert werden. Der folgende Abschnitt 4.2 erläutert den Einfluss von Sildenafil auf den endothelialen  $BK_{Ca}$  und die daraus resultierende Signaltransduktion in der Endothelzelle.

### 4.1 Kanalcharakterisierung in HUVEC

Um sicher zu stellen, dass es sich bei dem untersuchten Ionenkanal tatsächlich um den  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanal handelt, wurden Versuche zur Kanalcharakterisierung durchgeführt.

Zuerst wurde das spannungsabhängige Verhalten der untersuchten Kanäle nachgewiesen. Die Versuche zeigten, dass es bei einem Spannungsanstieg im positiven Spannungsbereich zu einer Zunahme der Öffnung und einer Zunahme der Amplitude der Ionenkanäle kam [45].

Die durchschnittliche Leitfähigkeit des untersuchten Kanals lag bei 170 pS. Dies entspricht laut Literatur [23] für den Referenzbereich des  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals mit großer Leitfähigkeit bei einer symmetrischen  $K^+$ -Konzentration von 140 mmol/l in Bad- und Perfusionslösung [56].

Als dritter Schritt wurde die Calciumabhängigkeit als weiteres Charakteristikum des  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals untersucht. In der „inside-out“ Konfiguration konnte gezeigt werden, dass es mit Zunahme der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Perfusionslösung zu einer Steigerung der Kanalaktivität kam. Dieses Verhalten entspricht ebenfalls den bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des  $BK_{Ca}$  und identifiziert ihn als solchen [29,43,45].

Zum Schluss konnte durch Blockade des  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals mit dem hochspezifischen Kanalblocker Iberitoxin in der „outside-out“ Konfiguration gezeigt werden, dass der Kanalblocker an der äußeren Seite des Kanals wirkt und somit den Kanal in seiner Aktivität blockiert. Nach einer Perfusion mit Iberitoxin kam es nach etwa 6- 9 Minuten zu einer vollständigen Inhibierung des  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals. Diese Daten stimmen mit in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zur Blockade des  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals überein [13,17,20,22]. Galvez et al. z.B. konnten zeigen, dass es nach fünf Minuten kontinuierlicher Perfusion mit Iberitoxin in der „outside-out“ Konfiguration zu einer erheblichen Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit des  $BK_{Ca}$  kam [17].

Anhand dieser Ergebnisse konnte der Ionenkanal als  $BK_{Ca}$  eindeutig identifiziert werden.

## 4.2 Der Einfluss von Sildenafil auf den endothelialen BK<sub>Ca</sub> und die daraus resultierende Signaltransduktion in der Endothelzelle

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit Hilfe des DIBAC-Imaging untersucht, ob der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil Einfluss auf das endotheliale Membranpotential nimmt. Hierzu wurden die HUVEC mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIBAC inkubiert, da bei einer Hyperpolarisation der Endothelzelle die Zellmembran für DIBAC permeabel wird und somit eine durch DIBAC bedingte Fluoreszenzmessung in der Zelle möglich wird. In der durchgeführten Messreihe mit verschiedenen Konzentrationen von Sildenafil ergab sich der deutlichste Effekt bei Zugabe von 1 µmol/l Sildenafil, so dass bei allen nachfolgenden Experimenten diese Konzentration eingesetzt wurde. Aufgrund der unter physiologischen Bedingungen zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran führenden Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> der Endothelzelle schloss sich an diese Messreihe eine zweite an [49,50]. In dieser wurde untersucht, ob die unter Zugabe von Sildenafil gesehenen Veränderungen des Membranpotentials eventuell durch den BK<sub>Ca</sub> bedingt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von 100 nmol/l IBX, einem hochspezifischen Inhibitor des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals, der Effekt von Sildenafil auf das Membranpotential deutlich reduziert werden konnte. Dies verdeutlicht, dass Veränderungen des endothelialen Membranpotentials durch Sildenafil BK<sub>Ca</sub>-abhängig sind. Im nächsten Schritt wurden deshalb elektrophysiologische Versuche mit dem BK<sub>Ca</sub> in Form von Patch-Clamp-Versuchen an HUVEC durchgeführt.

Die physiologische Relevanz des BK<sub>Ca</sub> bzw. das Vorhandensein dieses Kanals in Endothelzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Arbeitsgruppen wie z.B. Nilius et. al. sowie Brakemeier et. al. konnten den Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanal in frisch isolierten Endothelzellen nachweisen [10,50]. Andere Autoren vertreten hingegen die Ansicht, dass dieser Kanal nicht in frisch isolierten Endothelzellen exprimiert wird und das Phänomen seines Vorhandenseins auf der Kultivierung der Endothelzellen beruht [19].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der „cell-attached“ Konfiguration bei einer Perfusion der Zellmembran mit 1 µmol/l Sildenafil zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des BK<sub>Ca</sub> in HUVEC kam. Dieses Ergebnis konnte zuvor nur an anderen Zelltypen, nicht jedoch an Endothelzellen, gezeigt werden. Thebaud et al. wiesen nach, dass Sildenafil bei einer Konzentration von 10 µmol/l den BK<sub>Ca</sub> in glatten Muskelzellen des Ductus arteriosus aktiviert und dieser Effekt durch Gabe von Iberiotoxin aufgehoben werden kann [71]. An aus humanen Corpus

cavernosum isolierten glatten Muskelzellen konnte dagegen gezeigt werden, dass Sildenafil alleine nicht in der Lage war, den BK<sub>Ca</sub> zu aktivieren. Nur durch parallele Perfusion des NO-Donor SIN-1 kam es zu einer Aktivitätsregistrierung [35]. Es stellte sich im Rahmen dieser Arbeit daher die Frage, welchen Signalweg Sildenafil zur Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durchläuft. Ein möglicher Weg scheint die Aktivierung des Ionenkanals durch den „second messenger“ cGMP zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass die alpha- Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals mit großer Leitfähigkeit Substrat der cGMP-abhängigen Protein Kinase-1-alpha ist [25]. Diese alpha-Untereinheit des Kanals wird laut Fukao et al. durch die PKG phosphoryliert, wodurch der BK<sub>Ca</sub> aktiviert wird. Das Substrat der PKG in der Zelle ist cGMP und somit Voraussetzung für die beschriebene Phosphorylierung [15]. Der Phosphodiesterasehemmer Sildenafil erhöht durch Inhibierung der PDE5 den cGMP-Spiegel in der Zelle [9]. Dies scheint ein möglicher Signalweg zur Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> zu sein. Aufgrund dieser Datenlage wurden mit dem cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. In diesen konnten die Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durch 8-bromo-cGMP sowie die Aufhebung dieses Effektes durch den PKG-Inhibitor Rp-8-pCPT-cGMP demonstriert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Wirkung von Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> in Endothelzellen PKG vermittelt sein kann. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Sildenafil bedingte Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> nach Vorinkubierung der Zellen mit Rp-8-pCPT-cGMP signifikant reduziert wurde. Dieses Resultat zeigt, dass auch in Endothelzellen die Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals PKG vermittelt und somit mit den Ergebnissen von Aliouo et al. und Fukao et. al. in ihren Versuchen an Oozyten bzw. an glatten Muskelzellen der HEK-Zelle vergleichbar ist [3,15].

Da aber die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> nach Vorinkubation mit Rp-8-pCPT-cGMP und anschließender Perfusion mit Sildenafil um etwa die Hälfte niedriger war als bei alleiniger Perfusion mit Sildenafil, stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob noch weitere Signalwege der Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durch Sildenafil bestehen.

In diesem Zusammenhang könnte ein zweiter Signalweg eine durch Sildenafil bewirkte direkte Aktivierung des Kanals sein. Um dies zu testen, wurden in der „inside-out“ Konfiguration Patch-Clamp-Messungen mit Sildenafil durchgeführt. Diese Konfiguration ermöglicht die direkte Messung einer Kanalaktivierung, wobei ein zytosolischer Signalweg - wie z.B. über eine PKG- induzierte Phosphorylierung des

BK<sub>Ca</sub> - ausgeschlossen wird. Die dargestellten Resultate zeigen, dass Sildenafil in HUVEC den BK<sub>Ca</sub> direkt aktivieren kann, ohne von einem zytosolischen Signalweg abhängig zu sein. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den Messwerten von Sildenafil aus der „cell-attached“ Versuchsreihe zeigte sich, dass die hier gewonnenen Ergebnisse etwa viermal niedriger waren. Daraus lässt sich schließen, dass die PKG- induzierte Aktivierung des Kanals nicht unterschätzt werden darf. Die Beobachtung, dass Sildenafil in Endothelzellen den BK<sub>Ca</sub> direkt aktiviert, könnte eventuell ein zellspezifisches Phänomen sein. Die Arbeitsgruppe Lee und Kang wies nach, dass es zu keiner direkten Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals in glatten Muskelzellen aus dem Corpus cavernosum des Menschen kam [35]. Im Widerspruch dazu haben die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse gezeigt, dass es neben einer PKG-induzierten Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> in einem anderen Zelltyp, den Endothelzellen, auch eine direkte Aktivierung dieses Kanals durch Sildenafil gibt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in HUVEC zwei nachweisbare Signalwege existieren, über die Sildenafil eine Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> bewirkt.

Unter physiologischen Bedingungen verursacht die Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> in der Endothelzelle eine Hyperpolarisierung der Zellmembran und erhöht somit den elektrochemischen Gradienten für einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle [49,50]. Anhand in dieser Arbeit beschriebener Daten konnte gezeigt werden, dass Sildenafil durch eine Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> eine Hyperpolarisierung der Zellmembran verursacht. Deshalb war es zusätzlich wichtig zu klären, ob Sildenafil auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel Einfluss nimmt und ob Sildenafil über einen Calcium vermittelten Weg mit dem BK<sub>Ca</sub> interagiert.

Anhand der Fura-2 AM Fluoreszenzmessungen konnte ein durch Sildenafil vermittelter langsamer intrazellulärer Calciumanstieg in der Endothelzelle gemessen werden. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit dem Ca<sup>2+</sup>-anfärbenden Farbstoff Fura-2 AM beladen und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Vorherig veröffentlichte Daten von Pauvert et al. demonstrierten andere Effekte von Sildenafil auf die intrazelluläre Calciumhomoöstase. Diese Autoren zeigten, dass Sildenafil durch ATP und Endothelin-1 induzierte Oszillationen antagonisiert, aber keinen Einfluss auf eine durch Caffein-bedingte Konzentrationsänderung des intrazellulären Calciums hat [52]. Diese Arbeitsgruppe kam deshalb zu dem Schluss, dass Sildenafil den intrazellulären Calciumspiegel nicht beeinflusst. Aber auch hier ist es nicht möglich, die Daten exakt zu vergleichen, da Pauvert et al. Versuche an glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien der Ratte durchgeführt haben. Zusätzlich

untersuchte diese Arbeitsgruppe nur das durch Agonisten vermittelte Calciumsignal und nicht den alleinigen Effekt von Sildenafil auf die Zelle. Kuhlmann et al. dagegen konnten zeigen, dass eine Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Kanals in Endothelzellen einen intrazellulären Calciumanstieg bewirkte. Dieses Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein [30].

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit darlegt werden, dass der Calciumanstieg durch Sildenafil  $BK_{Ca}$ -abhängig ist. Eine Vorinkubation der Zellen mit dem hochspezifischen  $BK_{Ca}$ -Inhibitor IBX führte zu einer Blockierung des Effektes. Nach Nilius et al. hat eine Erhöhung der  $BK_{Ca}$ -Aktivität ihrerseits eine Hyperpolarisierung der Zellmembran zur Folge, so dass es auf diesem Wege zu einem kapazitiven Einstrom von extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen über die Membran in das Zellinnere kommt [49,50]. Dieser Einstrom extrazellulären Calciums führt wiederum dazu, dass der Kanal weiterhin vermehrt aktiviert wird, da ständig neues  $Ca^{2+}$  in die Zelle gelangt. Auch Lückhoff et al. beschrieben in ihren Arbeiten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Hyperpolarisation der Zellmembran und der Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen gibt. Dies führt zu Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels [39,40]. Diese Erkenntnis erklärt den in den FURA-2 AM Messungen nachgewiesenen Calciumanstieg durch Sildenafil als auch dessen Inhibierung durch IBX. Somit sind die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit denen von Lückhoff et al. und Nilius et al. vereinbar.

Um zu zeigen, dass es sich bei diesen Ergebnissen, wie bei Nilius et al. beschrieben, tatsächlich um einen extrazellulären Calciumeinstrom in die Zelle handelt, wurden in den Versuchsreihen für diese Arbeit Calciummessungen mit 2-APB, ein Inhibitor des kapazitiven Calciuminflux, durchgeführt [8]. Nach Vorinkubation der Zellen mit 2-APB konnte der durch Sildenafil vermittelte Calciumanstieg gehemmt werden.

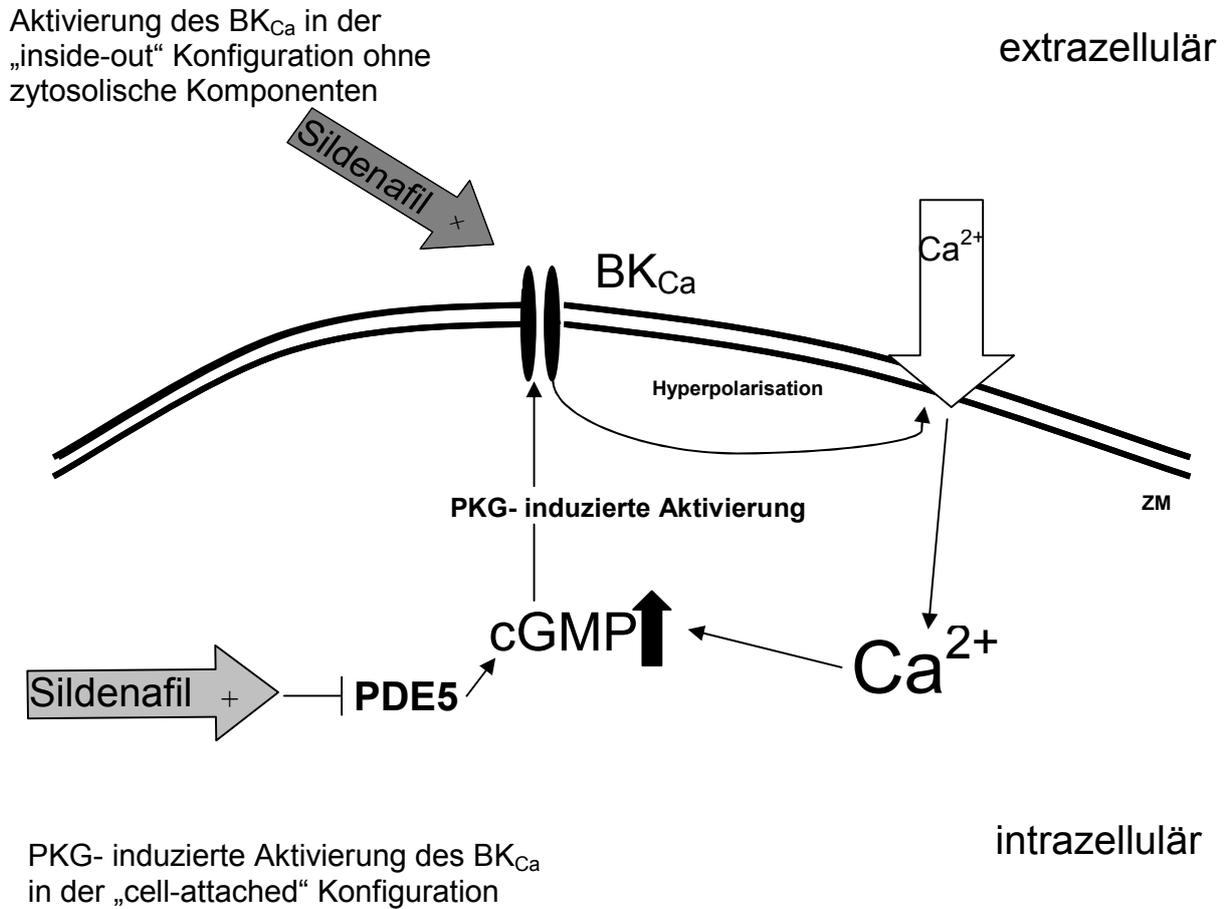
Wie aus der Literatur bekannt ist, erhöht Sildenafil als PDE5 Inhibitor den cGMP-Spiegel in der Zelle und ermöglicht so eine Vasorelaxation der glatten Muskelzelle [9,46,74]. Die Ergebnisse des cGMP-RIA der vorliegenden Arbeit stimmen somit mit der Literatur überein. Es konnte bestätigt werden, dass Sildenafil in der Endothelzelle den cGMP-Spiegel erhöht.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der cGMP-vermittelte Anstieg durch Sildenafil durch Inhibierung des  $BK_{Ca}$  gehemmt werden konnte. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Resultaten der Patch-Clamp-Experimente, kann daraus geschlossen werden, dass der cGMP-Anstieg in der Endothelzelle auf einen  $BK_{Ca}$ -abhängigen Signalweg basiert. Zusätzlich konnte

dargestellt werden, dass der cGMP-Anstieg durch Sildenafil calciumabhängig ist, da der Effekt durch den intrazellulären Calciumchelator BAPTA blockiert werden konnte. Auch bewirkten eine Reduktion des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und eine Inhibierung des transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch 2-APB einen Abfall der durch Sildenafil erhöhten cGMP-Konzentration in der Zelle. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass Sildenafil den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  aktiviert und dadurch die intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt. Dies zieht einen extrazellulären Calciumeinstrom nach sich, der den cGMP-Spiegel in der Zelle erhöht und somit wiederum den Kanal aktiviert. Teilweise werden diese Ergebnisse durch die schon oben diskutierten Arbeiten von Nilius et al. und Lückhoff et al. belegt [39,40,49,50].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass Sildenafil in HUVEC den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  über zwei Wege aktiviert. Zum einen über einen PKG-induzierten Signalweg und zum anderen über eine direkte Aktivierung des Kanals ohne zytosolische Komponenten. Diese Aktivierung führt zu einer Membranhyperpolarisierung, die einen transmembranären Calciumeinstrom nach sich zieht und somit eine Erhöhung des cGMP Spiegels in kultivierten humanen Endothelzellen bewirkt.

Diese Ergebnisse sind im folgenden Schaubild graphisch zusammen gefasst.



**Abbildung 22:** Einfluss von Sildenafil auf den BK<sub>Ca</sub> in HUVEC

- Erläuterungen: **BK<sub>Ca</sub>**: Ca<sup>2+</sup>- aktivierter K<sup>+</sup>- Kanal mit großer Leitfähigkeit  
**ZM**: Zellmembran  
**Ca<sup>2+</sup>**: Calcium  
**cGMP**: zyklisches Guanosin-3',5'- Monophosphat  
**PDE5**: Phosphodiesterase-Typ5  
**PKG**: Protein-Kinase G

## 5. Zusammenfassung

Sildenafil ist ein bekannter Phosphodiesterasehemmer, der den cGMP-Spiegel in der Zelle erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Sildenafil auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanal mit großer Leitfähigkeit ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) in humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) untersucht und ob cGMP in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt.

Die Membranpotentialveränderungen unter Sildenafil wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIBAC gemessen. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt mit einem Maximum bei 1  $\mu\text{mol/l}$ . Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik („cell-attached“ Konfiguration) konnte gezeigt werden, dass Sildenafil eine signifikante Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  bewirkt. Auch konnte gezeigt werden, dass das zellpermeable cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  aktiviert und dieser Effekt durch den PKG- Inhibitor Rp-8-pCPT-cGMP aufgehoben werden konnte. Um zu untersuchen, ob Sildenafil PKG- vermittelt den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  aktiviert, wurden simultane Messungen mit Rp-8-pCPT-cGMP durchgeführt. Die durch Sildenafil vermittelte  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Aktivierung wurde durch den PKG-Inhibitor reduziert. In der „inside-out“ Konfiguration konnte eine direkte Aktivierung des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  durch Sildenafil gezeigt werden. Anhand eines cGMP-Radioimmunoassays wurde die durch Sildenafil induzierte Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Endothelzelle gemessen. Dieser Effekt ließ sich durch den selektiven Inhibitor des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  Iberiotoxin aufheben.

Auch konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Zelle calciumabhängig ist. Mit dem FURA-2AM Fluoreszenzfarbstoff wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der Endothelzelle nach Stimulation mit Sildenafil gemessen. Sildenafil bewirkte einen  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der Zelle.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass Sildenafil den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  aktiviert. Hierbei spielen sowohl der „second messenger“ cGMP als auch eine direkte Aktivierung des Kanals eine Rolle. Zusätzlich bewirkt die durch Sildenafil bedingte Aktivierung des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels.

## Abstract

Sildenafil is known as potent inhibitor of phosphodiesterase type-5 (PDE5), thereby increasing intracellular cGMP-levels. The present study was performed to examine whether Sildenafil modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ -channels with large conductance ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) and to assess the role of cGMP in this context.

Changes of the endothelial cell membrane potential were analysed using the fluorescence dye DIBAC. The patch-clamp-technique (cell-attached- and inside-out configuration) was used to study  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  in cultured endothelial cells derived from human umbilical cord veins (HUVEC). cGMP-levels were analyzed using a cGMP-radioimmunoassay. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentrations were measured using Fura-2A fluorescence-imaging.

Sildenafil caused a dose-dependent (0.005- 5  $\mu\text{mol/l}$ ) hyperpolarization of endothelial cells with a maximum at a concentration of 1  $\mu\text{mol/l}$ . After 15 minutes of continuous perfusion with Sildenafil a significant increase of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  open-state-probability was observed.  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  was activated by the cell permeable cGMP-analogue 8-bromo-cGMP. This effect was significantly reduced by the PKG-inhibitor Rp-8-pCPT-cGMP. To test whether the effect of Sildenafil is also mediated by activation of PKG, Rp-8-pCPT-cGMP and Sildenafil were simultaneously applied. Sildenafil-induced NPo was reduced by the PKG-inhibitor. Measurements using the inside-out configuration demonstrated that Sildenafil directly activates  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . A cGMP-radioimmunoassay was used to determine the role of this direct  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -activation on Sildenafil-induced intracellular cGMP-levels which depended on an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -influx. The highly selective  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -inhibitor Iberiotoxin significantly reduced the effect of Sildenafil on cGMP-levels.

The results of the present study demonstrate that Sildenafil activates  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  in HUVEC by a mechanism which involves cGMP. Another way for Sildenafil-induced  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -activation is a direct channel interaction. The activation of the  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  is responsible for the Sildenafil-induced increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 6. Literatur

1. **Albert B, Bray D, Johnson A, Lexis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Lehrbuch der molekularen Zellbiologie; 2., korrigierte Auflage 2001, Wiley- VCH Verlag Weinheim; Deutschland (2001)
2. **Adams DJ.** Ionic Channels in Vascular Endothelial Cells. Trends in Cardiovascular Medicine 4: 18-26 (1994)
3. **Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L.** The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. Journal of Biochemical Chemistry 273: 32950-6 (1998)
4. **Barman SA, Zhu S, Han G, White RE.** cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. American journal of physiology 284: 1004-11 (2003)
5. **Beavo JA, Bruton LL.** Cyclic nucleotide reseach—still expanding after half a century. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3: 710-8 (2002)
6. **Begg M, Mo FM, Offertaler L, Batkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G.** G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca<sup>2+</sup>- dependent K<sup>+</sup> current. Journal of Biological Chemistry 278: 46188-94 (2003)
7. **Beny J.** Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries. Pflügers Archiv 433: 364-7 (1997)
8. **Bishara NB, Murphy TV, Hill MA.** Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongine C. British Journal of Pharmacology 135: 119-28 (2002)
9. **Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C.** Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific

phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. International Journal of Impotence Research 8: 47-52 (1996)

**10. Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Kohler R, Hoyer J.** Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. Kidney International 64: 199-207 (2003)

**11. Buhimschi CS, Garfield RE, Weiner CP, Buhimschi IA.** The presence and funktion of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. American Journal of Obstetrics and Gynecology 190: 268-74 (2004)

**12. Busse R, Mulch A.** Calcium –dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. Federation of European Biochemical Societies Letters 265: 133-6 (1990)

**13. Candia S, Garcia ML, Latorre R.** Mode of Action of Iberiotoxin, a potent Blocker of the Large Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel. Biophysical Journal 63: 583-90 (1992)

**14. Friebe A, Koesling D.** Regulation of nitric oxide- sensitive guanylyl cyclase. Circulation Research 93: 96-105 (2003)

**15. Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD;** Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. Journal of Biochemical Chemistry 274: 10927-35 (1999)

**16. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC.** Post- translation control of endothelial Nitric Oxide Synthase: Why isn't Calcium/ Calmodulin enough? Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 299: 818-24 (2001)

**17. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reube JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML.** Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the High Conductance Calcium- Activated- Potassium

Channel from venom of the scorpion *Buthus Tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11083-90 (1990)

**18. Garcia ML, Kaus HG, Munujos P, Slaughter RS, Kaczorowski GJ.** Charybdotoxin and its Effects on Potassium Channels. *American Journal of Physiology* 269: C1-10 (1995)

**19. Gauthier KM, Liu C, Popovic A, Albarwani S, Rusch NJ.** Freshly isolated bovine coronary endothelial cells do not express the BKCa channel gene. *Journal of Physiology* 545: 829-36 (2002)

**20. Giangiacomo KM, Garcia ML, McManus OB.** Mechanism of Iberiotoxin Block of the Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel from Bovine Aortic Smooth Muscle. *Biochemistry* 31: 6719-27 (1992)

**21. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv* 391: 85-100 (1981)

**22. Harvey AL, Vatanpour H, Rowan EG, Pinkasfeld S, Vita C, Menez A, Martin-Eauclaire MF.** Structure- activity studies on scorpion toxins that block potassium channels. *Toxicon* 33: 425-36 (1995)

**23. Hille B.** *Ionic Channels of Excitable Membranes; Second Edition;* Sinauer Associates Inc; Sunderland, Massachusetts, pp 121-7 (1992)

**24. Himmel H, Whorton AR, Strauss HC.** Intracellular Calcium, currents, and stimulus- response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21: 112-27 (1993)

**25. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J.** Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of Cell Science* 113: 1671-6 (2000)

**26. Igarashi J, Michel T.** More sweetness than light? A search for the cause of diabetic vasculopathy. *Journal of Clinical Investigation* 108: 1425-7 (2001)

27. **Inagami T, Naruse M, Hoover R.** Endothelium as an endocrine organ. *Annual Reviews in Physiology* 57: 171-89 (1995)
28. **Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG, Minick CR.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins- identification by morphological and immunological criteria. *Journal of Clinical Investigation* 52: 2745-56 (1973)
29. **Kolb HA.** Potassium Channels in Excitable and Non-excitable Cells. *Reviews in Physiology Biochemistry and Pharmacology* 115: 52-79 (1990)
30. **Kuhlmann CRW, Ludders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenkohler U, Neumann T, Tillmanns H, Erdogan A.** Lysophosphatidylcholine- induced modulation of Ca(2+)- activated K(+)channels contributes to ROS- dependent proliferation of cultured human endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 36: 675-82 (2004)
31. **Kuhlmann CRW, Trumper JR, Abdallah Y, Ludders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenkohler U, Neumann T, Walther S, Piper HM, Tillmanns H, Erdogan A.** The K+- channel opener NS1619 increases endothelial NO- synthesis involving p42/p44 MAP-kinase. *Thrombosis and Haemostasis* 92: 1099-107 (2004)
32. **Landmesser U, Hornig B, Drexler H.** Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis. *Circulation* 109: II27-33 (2004)
33. **Langheinrich U, Daut JH.** Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea- pig heart induced by K+ channel openers and glucose deprivation. *Journal of Physiology* 502: 397-408 (1997)
34. **Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O.** Varieties of Calcium- Activated Potassium Channels. *Annual Review of Physiology* 51: 385-99 (1989)
35. **Lee SW, Kang TM.** Effect of nitric oxide on the Ca<sup>2+</sup>- activated potassium channels in smooth muscle cells of the human corpus cavernosum. *Urological Research* 29: 359-65 (2001)

- 36. Lincoln TM, Dey N, Sellak H.** Invited review: cGMP- dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of applied Physiology* 91: 1421-30 (2001)
- 37. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister- Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA, Ferguson K.** Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP- binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 17: 139-47 (1998)
- 38. Löffler, Petrides.** *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage; Springer Verlag Heidelberg; (1998)
- 39. Lückhoff A, Busse R.** Activators of Potassium channels enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv of Pharmacology* 342: 94-9 (1990)
- 40. Lückhoff A, Busse R.** Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium- derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Archiv* 416: 305-11 (1990)
- 41. Maggley KL, Pallotta BS.** Calcium Dependence of Open and Shut Interval Distributions from Calcium- activated Potassium Channels in Cultured Rat Muscle. *Journal of Physiology* 344: 585-604 (1983)
- 42. Manabe K, Ito H, Matsuda H, Noma A, Shibata Y.** Classification of ion channels in the luminal and abluminal membranes of guinea- pig endocardial endothelial cells. *Journal of Physiology* 484.1: 41-52 (1995)
- 43. McManus OB.** Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 23: 537-60 (1991)
- 44. Medina P, Segarra G, Torondel B, Chuan P, Domench C, Vila JM, Lluch S.** Inhibition of neuroeffector transmission in human vas deferens by sildenafil. *British Journal of Pharmacology* 131: 871-4 (2000)

- 45. Methfessel C, Boheim G.** The Gating of Single Calcium- Dependent Potassium Channels is described by an Activation/ Blockade Mechanism. *Biophysics of Structure and Mechanism* 9: 35-60 (1982)
- 46. Murthy KS.** Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP- dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochemical Journal* 360: 199-208 (2001)
- 47. Neher E.** Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation (Nobel Vortrag); *Angewandte Chemie* 104: 837-43 (1992)
- 48. Nicholson CD, Challiss RA, Shahid M.** Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends in pharmacological sciences* 12: 19-27 (1991)
- 49. Nilius B.** Regulation of transmembrane calcium fluxes in endothelium; *News in Physiological Sciences* 6: 110-4 (1991)
- 50. Nilius B, Viana F, Droogmans G.** Ion Channels in Vascular Endothelium. *Annual Reviews in Physiology* 59: 145-70 (1997)
- 51. Nilius B, Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological Reviews* 81: 1415-59 (2001)
- 52. Pauvert O, Lungnier C, Keravis T, Mathan E, Rousseau E, Savineau JP.** Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology* 139: 513-22 (2001)
- 53. Pilz RB, Casteel DE.** Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circulation Research* 93: 1034-46 (2003)

- 54. Quasching T, Ruschituka FT, Maier W, Lüscher TF.** Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten. Internist 41: 355-62 (2000)
- 55. Rae JL, Levis RA.** Glass Technology for Patch Clamp Electrodes. Methods in Enzymology 207: 66-92 (1992)
- 56. Rusko J, Tanzi F, Breemen van C, Adams DJ.** Calcium- activated-Potassium Channel in native Endothelial Cells from Rabbit Aorta: Conductance,  $Ca^{2+}$  Sensitivity and Block. Journal of Physiology 455: 601-21 (1992)
- 57. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt K, Beavo JA.** Cyclic GMP Phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. Circulation Research 93: 280-91 (2003)
- 58. Sachs L.** Angewandte Statistik, 10. Auflage 2002; Springer Verlag, Heidelberg; Deutschland (2002)
- 59. Sakmann B.** Elementare Ionenströme und synaptische Übertragung (Nobel-Vortrag). Angewandte Chemie 104: 844-56 (1992)
- 60. Sakmann B, Neher E.** Single- Channel Recording; second edition 1985, Plenum Press, New York, USA (1985)
- 61. Sampson LJ, Hinton JM, Garland CJ.** Evidence for expression and function of phosphodiesterase type 5 (PDE-V) in rat resistance arteries. British Journal of Pharmacology 132: 13-7 (2001)
- 62. Schwarzacher SP.** Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. Journal für Kardiologie 9: 121-4 (2002)
- 63. Screiber M, Salkoff L.** A novel calcium sensing domain in the BK channel. Biophysical Journal 73: 1355-63 (1997)

- 64. Serra PA, Rocchitta G, Delogu MR, Migheli R, Taras MG, Mura MP, Esposito G, Miele E, Desole MS, Miele M.** Role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway and extracellular environment in the nitric oxide donor- induced increase in dopamine secretion from PC12 cells: a microdialysis in vitro study. *Journal of Neurochemistry* 86: 1403-13 (2003)
- 65. Stacey P, Rulten S, Dapling A, Phillips SC.** Molecular cloning and expression of human cGMP- binding cGMP- specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247: 249-54 (1998)
- 66. Takeda K, Klepper M.** Voltage- Dependent and Agonist- activated Ionic Currents in Vascular Endothelial Cells: A Review. *Blood Vessels* 27: 169-83 (1990)
- 67. Thompson WJ.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology biochemistry and function. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 51: 13-33 (1991)
- 68. Tsien R, Pozzan T.** Measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  with quin2. *Methods in Enzymology* 172: 230-62 (1980)
- 69. Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD.** Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by Sildenafil and related compounds. *Molecular Pharmacology* 56: 124-30 (1999)
- 70. Turko IV, Francis SH, Corbin JD.** Potential role of conserved amino acid in the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5)\*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 6460-6 (1997)
- 71. Thébaud B, Michelakis E, Wu XC, Harry G, Hashimoto K, Archer SL.** Sildenafil reverses  $O_2$  Constriction of the rabbit ductus arteriosus by inhibiting type 5 phosphodiesterase and activating  $BK_{Ca}$  channels. *Pediatric Research* 52: 19-24 (2001)

- 72. Ückert S, Kütke A, Stief CG, Jonas U.** Phosphodiesterase isoenzymes as pharmacological targets in the treatment of male erectile dysfunction. *World Journal of Urology* 19: 14-22 (2001)
- 73. Vargas FF, Caviedas PF, Grant DS.** Electrophysiological characteristics of cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Microvascular Research* 47: 153-65 (1994)
- 74. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P.** Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effect of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelets function, and contractile response of trabeculae carnae and aortic rings in vitro. *American Journal of Cardiology* 83: 3C-12C (1999)

## 7. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Dörte Wiebke Lüdders  
Geburtstag: 04.03.1979  
Geburtsort: Cloppenburg  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1985-1989 Paul- Gerhard- Schule (Grundschule), Cloppenburg  
1989-1991 Orientierungsstufe Cappelner Damm, Cloppenburg  
1991-1998 Clemens- August- Gymnasium, Cloppenburg

### Studium

4/1999 Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität Gießen  
3/2001 Ärztliche Vorprüfung  
3/2002 1. Staatsexamen  
4/2004 2. Staatsexamen  
10/2004- 10/2005 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Gießen  
1. Tertial: Innere Medizin  
2. Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe  
3. Tertial: Chirurgie  
11/2005 3. Staatsexamen

### Stipendium

3/2003- 6/2004 Stipendium im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 534  
„Biologische Grundlagen der vaskulären Medizin“

## Publikationen

Kuhlmann CRW, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Tillmanns H, Erdogan A. Lysophosphatidylcholine induced modulation of  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channels contributes to ROS dependent proliferation of cultured human endothelial cells. J Mol Cell Cardiol 2004; 36: 675-82

Kuhlmann CRW, Li F, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J, Erdogan A. Dose dependent activation of  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channels by ethanol contributes to improved endothelial functions. Alcohol Clin Exp Res 2004; 28: 1005-11

Kuhlmann CRW, Trümper JRFC, Abdallah Y, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Walther S, Piper HM, Tillmanns H, Erdogan A. The  $K^+$ -channel opener NS1619 increases endothelial NO-synthesis involving p42/p44 MAP-kinase. Thromb Haemost 2004; 92: 1099-107

Kuhlmann CRW, Schaefer CA, Kosok C, Abdallah Y, Walther S, Lüdders DW, Neumann T, Tillmanns H, Schäfer C, Piper HM, Erdogan A. Quercetin induced induction of NO/cGMP pathway depends on  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels-induced hyperpolarization mediated  $Ca^{2+}$ - entry in cultured human endothelial cells. Plant Med 2005; 71: 520-4

Erdogan A, Schaefer CA, Schäfer M, Lüdders DW, Stockhausen F, Abdallah Y, Schäfer C, Most AK, Tillmanns H, Piper HM, Kuhlmann CRW. Magatoxin inhibits VEGF- induced hyperpolarization, proliferation and nitric oxide production of human endothelial cells. J Vasc Res 2005; 42: 68-76

Lüdders DW, Münz BM, Li F, Rückleben S, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J, Erdogan A, Schaefer CA, Kuhlmann CRW. Role of cGMP in sildenafil- induced activation of endothelial  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. J cardiovasc pharmacol – in press (2006)

## Abstracts

Münz BM, Lüdders DW, Schaefer CA, Schäfer C, Erdogan A, Waldecker B. Die Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> ist ein wesentliches Bindeglied in der NO-Freisetzung durch Sildenafil in HUVEC. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 2003

Kuhlmann CRW, Lüdders DW, Schäfer M, Schäfer C, Abdallah Y, Most AK, Backenköhler U, Piper HM, Tillmanns H, Erdogan A. Inhibierung der VEGF-induzierten endothelialen Proliferation durch Blockade Margatoxin-sensitiver K<sup>+</sup> Kanäle. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 2004

Kuhlmann CRW, Schäfer M, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Tillmanns H, Erdogan A. Ca(2+)- activated K(+) channels contribute to Lysophosphatidylcholine-induced endothelial dysfunction. 74<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Sevilla, 2004

Kuhlmann CRW, Trümper JRFC, Abdallah Y, Schaefer CA, Lüdders DW, Piper HM, Tillmanns H, Erdogan A. The potassium channel opener NS1619 increases endothelial NO-synthesis involving p42/p44 MAP-kinase. 9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, Mainz, 2004

Lüdders DW, Stockhausen FP, Schaefer CA, Kuhlmann CRW, Erdogan A. Die Rolle von Ca<sup>2+</sup>- aktivierten K<sup>+</sup> Kanälen bei VEGF-/ bFGF- induzierter Proliferation humaner Endothelzellen. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 2005

Kuhlmann CRW, Fehsecke A, Lüdders DW, Schaefer CA, Erdogan A. Hepatocyte Growth Factor induzierte endotheliale Proliferation ist abhängig von NO, Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup> Kanälen und der p42/p44 MAP Kinase. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 2005

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernd Waldecker und bei Herrn Dr. med. Ali Erdogan dafür, dass ich in Ihrer Arbeitsgruppe meine Arbeit durchführen durfte.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Johannes Wiecha für die Herstellung des Kontaktes zur Firma Pfizer, die mir freundlicherweise den Wirkstoff Sildenafil zur Verfügung gestellt hat.

Mein Dank gilt weiterhin der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Bereitstellung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 534.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Schäfer und Herrn Dr. med. Yaser Abdallah danke ich für die Unterstützung bei den fluoreszenzmikroskopischen Messungen und die immer gute Atmosphäre in ihrer Arbeitsgruppe.

Bei Frau Christina Frey- Krug und Frau Gudrun Pfeiffer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bewältigung der alltäglichen Laborprobleme.

Auch möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranten und Herrn Dr. med. Christian Schaefer für ihre Unterstützung und tollen Atmosphäre in unserem Labor bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Christoph Kuhlmann bedanken, der mich während meiner Arbeit betreute und immer viele gute Ideen eingebrachte, für die ich sehr dankbar bin.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für die großzügige Unterstützung während meines Studiums.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Michael für seine unendliche Geduld beim Korrektur lesen dieser Arbeit.

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5129-7



9 783835 195129 7

