

Einfluss von oxidiertem LDL und Lysophosphatidylcholin auf den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proliferation, NO- und Ca^{2+} -Homöostase humaner Endothelzellen

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

CHRISTOPH R W KUHLMANN

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 2004

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.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Einfluss von oxidiertem LDL und Lysophosphatidylcholin auf den
Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanal mit großer Leitfähigkeit und die daraus
resultierenden Auswirkungen auf die Proliferation, NO- und Ca²⁺-
Homöostase humaner Endothelzellen**

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

vorgelegt von Christoph Rüdiger Wolfram Kuhlmann
aus Wetzlar

Gießen 2003

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

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Waldecker

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Sandip Kanse

Tag der Disputation: 21.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 DIE ROLLE DES ENDOTHEL IN DER PATHOLOGIE DER ARTERIOSKLEROSE	5
1.2 IONENKANÄLE IN ENDOTHELZELLEN	7
1.3 FRAGESTELLUNG	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 ZELLKULTUR.....	10
2.1.1 Zellisolation.....	10
2.1.2 Zellidentifikation	11
2.1.3 Kultivierung	11
2.2 PATCH-CLAMP TECHNIK.....	12
2.2.1 Messplatz	14
2.2.2 Lösungen und Perfusionsstoffe	17
2.2.3 Durchführung der Patch-Clamp Experimente	18
2.2.4 Identifikation des BK _{Ca}	19
2.2.5 Auswertung der Patch-Clamp Experimente	20
2.3 FURA-2-IMAGING	20
2.4 ZELLPROLIFERATION	22
2.4.1 Zellzählung	22
2.4.2 [³ H]-Thymidin-Uptake	22
2.5 NO-MESSUNG.....	24
2.5.1 cGMP-RIA	24
2.5.2 Gewinnung der Proben.....	25
2.5.3 Durchführung des RIA	25
2.6 STATISTIK	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1 PATCH-CLAMP EXPERIMENTE	27
3.1.1 Ionenkanalidentifikation	27
3.1.2 Einfluss von oxLDL auf den endothelialen BK _{Ca}	31
3.1.3 Einfluss von LPC auf den endothelialen BK _{Ca}	33
3.1.4 IBX-Blockade der oxLDL-/LPC-induzierten Kanalaktivierung	35
3.1.5 Einfluss von oxLDL auf den BK _{Ca} nach Vorinkubation mit JTX-20	35
3.1.6 Einfluss von LPC auf den BK _{Ca} nach Vorinkubation mit JTX- 20.....	36
3.1.7 Einfluss von Acetylcholin auf den endothelialen BK _{Ca}	37
3.2 EINFLUSS VON OXLDL/LPC AUF DIE ZELLULÄRE CA ²⁺ -HOMÖOSTASE	38
3.3 PROLIFERATION.....	40
3.3.1 Zellzählung	40
3.3.2 Thymidin-Uptake.....	40
3.4 NO-MESSUNG.....	42
4. DISKUSSION	47
4.1 IDENTIFIKATION DES BK _{Ca} IN HUVEC.....	47
4.2 MODULATION DES BK _{Ca} DURCH OXLDL/LPC UND DER DARAUS RESULTIERENDE EINFLUSS AUF ENDOTHELIALE FUNKTIONEN	48

5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	59
7. LEBENSLAUF	71
8. DANKSAGUNG	73

1. Einleitung

Die Einleitung gliedert sich in drei Abschnitte. Unter 1.1 werden kurz die pathophysiologischen Grundlagen zur Arteriosklerose erläutert. Im nächsten Abschnitt 1.2 wird auf die Bedeutung von Ionenkanälen in Endothelzellen eingegangen und im Abschnitt 1.3 wird die eigentliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit vorgestellt.

1.1 Die Rolle des Endothels in der Pathologie der Arteriosklerose

Das Endothel kleidet als wesentlicher Bestandteil der Tunica intima die Blutgefäße aus und trennt das fließende Blut von der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Kultivierte Endothelzellen wachsen in einem dichten einschichtigen Zellverband („Monolayer“) und sind über Zell-Zell Kontakte („gap junctions“ und „tight junctions“) miteinander verbunden. Endothelzellen übernehmen eine Vielzahl von Funktionen in der Kontrolle der vaskulären Homöostase, z.B.: Transport und Metabolismus von verschiedenen Substanzen zwischen Blut und Intima, wodurch u. a. die Gewebshomöostase reguliert wird; Synthese von pro- und antithrombogen wirkenden Substanzen (Prostacycline, Thrombin, von Willebrand-Faktor, Plättchen-aktivierender Faktor, Heparansulfat, Protein C, Plasminogenaktivatoren); Amplifikation von entzündlichen und immunmodulatorischen Signalen, sowie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen für Leukozyten (z.B. ELAM-1, endothel leucocyte adhesion molecule); Umwandlung von Angiotensin I in die aktive Form Angiotensin II (dies geschieht v.a. in der Lungenstrombahn durch das membranständige Angiotensin Converting Enzyme); Steuerung des Gefäßtonus über die Ausschüttung von Mediatoren wie: Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin (PGI₂), Endothelin, ATP; Produktion und Sekretion von Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF) und schließlich noch die Fähigkeit LDL oxidativ zu modifizieren [5,30,67,71].

In der Pathogenese der Arteriosklerose nimmt das Gefäßendothel eine Schlüsselrolle ein. Nach der von Ross definierten „response to injury“ Hypothese steht am Anfang des Prozesses der Atherogenese die endotheliale Dysfunktion [70]. Die klassische Definition der endothelialen Dysfunktion nach Furchgott [17] beschreibt die Vasokonstriktion von Gefäßen bei Gabe von Acetylcholin [12]. Auch Drexler bezeichnet als endotheliale Dysfunktion einen Zustand in welchem Gefäße nicht

mehr adäquat bzw. paradox auf vasodilatierende Reize reagieren [13]. Bei der endothelialen Dysfunktion handelt es sich jedoch nicht nur um eine Imbalance zwischen Vasodilatation zu Vasokonstriktion. Als essentielle Aufgabe des Endothels geht vor allem auch der hemmende Effekt auf die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen verloren [70].

Die endotheliale Dysfunktion wird durch das chronische Einwirken von schädigenden Faktoren ausgelöst: Rauchen, Hyperlipidämie, Diabetes melitus, Hypertonie, Virusinfektion, bakterielle Toxine, oxidiertes LDL (oxLDL) und seinem Hauptbestandteil Lysophosphatidylcholin (LPC); Inflammation und andere immunologische Prozesse. So führt die chronische Exposition von oxLDL am Endothel zum Beispiel dazu, dass auf der Zelloberfläche vermehrt Monozyten, Makrophagen und T- Lymphozyten anhaften können. Diese Phagozyten können zwischen den Endothelzellen hindurch migrieren und in den subendothelialen Raum abwandern. Dort inkorporieren diese Zellen Cholesterin, welches im Rahmen der endothelialen Dysfunktion überschießend eingeschwemmt wird, und wandeln sich in Schaumzellen um. Diese Schaumzellen bilden zusammen mit glatten Muskelzellen die sog. „fatty-streaks“ aus denen sich die endgültigen arteriosklerotischen Plaques entwickeln [70]. Durch Vermehrung der Schaumzellen wachsen diese Plaques weiter an, wodurch das Endothel zusätzlich geschädigt wird. An den so geschädigten Endothelzellen können sich Thrombozyten anlagern und Wachstumsfaktoren wie PDGF sezernieren. Dieses PDGF sowie Wachstumsfaktoren aus Makrophagen regen ihrerseits glatte Gefäßmuskelzellen dazu an zu proliferieren und in die Intima einzuwandern, was zu einem weiteren Anwachsen des Plaques und einem Fortschreiten der Arteriosklerose führt. Am Ende dieser Kette steht der stenosierende, evtl. instabile fibröse Plaque, der bei Ruptur zum akuten Gefäßverschluss führen kann [4,23,70-72].

Die oben ausgeführten Erläuterungen zeigen, dass die Störung endothelialer Zellfunktionen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose spielt. Die Synthese und Freisetzung endothelialer Mediatoren und somit die Steuerung endothelialer Funktionen ist essentiell abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Die intrazelluläre Calciumhomöostase wird im Wesentlichen durch zwei Mechanismen reguliert. Zum einen kann intrazelluläres Calcium aus den intrazellulären Speicherorganellen (z.B. dem endoplasmatischen Retikulum) freigesetzt werden, zum anderen kann extrazelluläres Calcium in die Zelle

einströmen. Da Endothelzellen im Gegensatz zu glatten Muskelzellen nicht über spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle verfügen, erfolgt der Einstrom von extrazellulärem Calcium überwiegend passiv über nicht selektive Kationenkanäle [60,91]. Kommt es z.B. zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, so wird der elektrochemische Gradient für Calcium erhöht und Calcium kann in die Zelle einströmen. Dieser auch als kapazitiver Calciumstrom bezeichnete Calciuminflux ist somit abhängig vom Membranpotential. Das Membranpotential wird seinerseits durch die Aktivität von Ionenkanälen determiniert. Hieraus kann gefolgert werden, dass über die Aktivität von Ionenkanälen die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert wird und somit indirekt Calcium-abhängige Signaltransduktionswege von Ionenkanälen gesteuert werden [27,52,73].

1.2 Ionenkanäle in Endothelzellen

Endothelzellen werden allgemein als nicht erregbare Zellen betrachtet, da sie nicht in der Lage sind Aktionspotentiale fortzuleiten oder gar zu generieren. Das Membranpotential wird über die Aktivität von Ionenkanälen geregelt. Untereinander sind die Endothelzellen über brückenartige Verbindungen, sog. „gap junctions“ elektrochemisch gekoppelt. Ebenso besteht eine Verbindung mit den glatten Gefäßmuskelzellen, so dass das Membranpotential von Endothelzellen auch Einfluss auf die glatten Muskelzellen nimmt und umgekehrt [3,47,50].

An der Steuerung des Membranpotentials der Endothelzelle sind vor allem Kalium- und Chloridkanäle beteiligt. In der Literatur wird eine Vielzahl von endothelialen Kaliumkanälen beschrieben. Einfluss auf das Membranpotential nehmen der einwärtsgerichtete Kaliumkanal (K_{IR}), ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) und Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}). Die Hauptaufgabe des K_{IR} scheint in der Stabilisierung des Membranpotentials zu liegen. Eine Aktivierung des K_{IR} zum Beispiel durch Scherkräfte bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Der K_{ATP} ist bei physiologischen intrazellulären ATP-Konzentrationen ($[ATP]_i$) geschlossen. Er öffnet sich erst bei einer Verminderung der $[ATP]_i$, wie sie z.B. bei Energieverarmung der Zelle auftritt. Eine solche Aktivierung des K_{ATP} führt ebenfalls zu einer Membranhyperpolarisation [1,89]. Die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}), lassen sich aufgrund ihrer Leitfähigkeit in drei Typen einteilen: geringe Leitfähigkeit („small conductance“ - SK_{Ca} ; Leitfähigkeit 10-14 pS), mittlere Leitfähigkeit („intermediate

conductance“ - IK_{Ca} ; Leitfähigkeit 30-80 pS); große Leitfähigkeit („big conductance“ - BK_{Ca} ; Leitfähigkeit 100-250 pS) [40]. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Calcium-aktivierten Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}). Der BK_{Ca} ist in seiner Aktivität, wie der Name schon besagt, abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase. Der Grund hierfür liegt in dem Vorhandensein der so genannten „Calcium-bowl“, einer aus vier Segmenten bestehenden Bindungsstelle für Ca^{2+} Ionen auf der zytoplasmatischen Seite des Ionenkanalmoleküls. Die Bindung von Ca^{2+} an die „Calcium-bowl“ bewirkt eine Zunahme der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit [83]. Aufgrund seiner großen Leitfähigkeit bei gleichzeitig bestehender hoher Selektivität für K^+ -Ionen ermöglicht der BK_{Ca} einen starken Kaliumausstrom aus der Zelle, wodurch es zur Hyperpolarisation der Zellmembran kommt [36,46]. Auf diesem Wege wird wiederum der elektrochemische Gradient für Calcium erhöht, wodurch der Ionenkanal Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase nimmt und sich in seiner Aktivität selbst verstärkt. Es ist nahe liegend, dass über Modulation der BK_{Ca} Aktivität Calcium-abhängige Stoffwechselwege beeinflusst werden können. So konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass dieser Ionenkanal wesentlich an der Steuerung des Proliferationsverhaltens beteiligt ist [94]. Des Weiteren wurde eine Beteiligung des BK_{Ca} an der Steuerung des Gefäßtonus beschrieben [58,86]. Als physiologischer Aktivator des BK_{Ca} ist Bradykinin bekannt [60]. Eine Blockade dieses Ionenkanals kann unspezifisch mit TEA und Charybdotoxin bewirkt werden [20]. Hoch selektiv kann dieser Ionenkanal jedoch durch das Skorpiongift Iberiotoxin (IBX) blockiert werden [19]. Durch die Anwendung von IBX ist es daher möglich den BK_{Ca} von anderen Ionenkanälen abzugrenzen, da diese nicht durch IBX blockiert werden [19,25].

Chloridkanäle sind ebenfalls an der Regulierung des Membranpotentials beteiligt. Die Chloridkanäle unterteilen sich in drei Gruppen: Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle, Cl^- -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit sowie volumenabhängige Cl^- -Kanäle. Unter physiologischen Bedingungen scheinen nur die volumenabhängigen Cl^- -Kanäle eine Rolle zu spielen. Sie besitzen eine Leitfähigkeit von 1-5 pS und werden durch eine Zunahme des Zellvolumens, z.B. bei der ödematösen Zellschwellung aktiviert. Ein spezifischer Blocker dieser Ionenkanäle ist Tamoxifen, ein Östrogen-Rezeptor-Modulator [60].

1.3 Fragestellung

Ziel der Arbeit war zu ermitteln, in wie weit oxidiertes LDL und dessen Hauptbestandteil Lysophosphatidylcholin das Proliferationsverhalten sowie die Acetylcholin-induzierte NO-Synthese von Endothelzellen beeinflussen. Zudem sollte in diesem Zusammenhang die Rolle des Ca^{2+} -aktivierten K^+ Kanals mit großer Leitfähigkeit bei der Steuerung der Zellproliferation und NO-Bildung geprüft werden. Da diese beiden Zellfunktionen über Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden gesteuert werden, wurde zusätzlich der Einfluss von oxLDL und LPC auf die intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Endothelzellen wurden aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) nach der Methode von Jaffe et al. isoliert, identifiziert und kultiviert. Das Verfahren wird in 2.1.1 und 2.1.2 dargestellt [33].

2.1.1 Zellisolation

Die Nabelschnüre wurden nach der Abnabelung in einen sterilen Becher gegeben. Mit einer sterilen Kompresse wurde die Nabelschnur gesäubert und anschließend auf Verletzungen untersucht. Mit einer Knopfkanüle wurde die Nabelschnurvene aufgesucht und zweimal mit 50 ml HEPES (PAA, Linz, Österreich) durchgespült. Wenn sich die Vene bei diesem Spülvorgang als dicht erwies, konnte sie am anderen Ende abgeklemmt werden. Danach wurde die Vene mit 0.025% Collagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und im Brutschrank bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, um die humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) aus ihrem Zellverband zu lösen. Inzwischen wurde in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) 1 ml fetales Kälberserum (FKS; PAA, Linz, Österreich) vorgelegt. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnurvene mit 30 ml HEPES gespült. Die HUVEC enthaltende Spüllösung wurde in dem vorbereiteten Röhrchen aufgefangen und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Endothelial Basal Medium (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) inklusive der folgenden Aliquots (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland): 0.4% ECGS/H, Epidermal Growth Factor 0.1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml, basic Fibroblast Factor 1 ng/ml; Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20% FKS (PAA, Linz, Österreich) resuspendiert.

Die Zellen wurden abschließend auf ein mit 0.2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtetes 25 cm² Plastikkulturschälchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät.

2.1.2 Zellidentifikation

Die Identifikation der Zellen als Endothelzellen geschah zum einen durch lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie und zum anderen durch die Immunfluoreszenzmethode.

Im Lichtmikroskop hilft zur Identifikation das sog. „Cobblestone“- Phänomen: Endothelzellen bildeten einen kopfsteinpflasterartig angeordneten Monolayer. Fibroblasten oder glatte Muskelzellen hingegen imponieren als spindelförmige Zellen, die sich im Zellverband nicht als Monolayer, sondern als sich gegenseitig überlappende Zellgruppierung darstellen.

Bei Anwendung der Immunfluoreszenzmethode wurden die Zellen zunächst auf einem Deckglas ausgesät, kultiviert und mit Methanol bei -20°C fixiert. Es folgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen den von Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem fluoreszierenden Antikörper gegen den erstgenannten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland). Der von Willebrand-Faktor dient der Identifikation von Endothelzellen, da andere vaskuläre Zellen diesen Faktor nicht exprimieren. Unter dem Mikroskop kann man durch die Fluoreszenz des zweiten Antikörpers, der an den Anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörper bindet, die Zellen eindeutig als Endothelzellen identifiziert werden.

2.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung der HUVEC wurde in einem Brutschrank bei 37°C mit einem CO_2 -Anteil von 5% durchgeführt. Die Zellen wurden aus der Primärkultur in mit Gelatine vorbeschichteten 25 cm^2 Plastikkulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt, sobald diese zu einem „Zellrasen“ zugewachsen waren.

Als Nährmedium wurde das bereits unter 2.1.1 beschriebene EBM verwendet. Jedoch wurden nur 10% FKS zugesetzt. Außerdem wurde auf die Gabe von Amphotericin B verzichtet. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Eine Passagierung der Zellen wurde immer dann durchgeführt, wenn sie ihre Kulturflasche konfluent bewachsen hatten. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie kurzzeitig mit Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop konnte beobachtet werden wie die Zellen sich abkugeln, und von dem Boden der Kulturflaschen ablösen. Dieser Vorgang wurde durch die Gabe von FKS abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und in mit 0.2% Gelatine vorbeschichteten Kulturflaschen in einer Dichte von ca. 3000 Zellen/cm² erneut ausgesät.

Die Wachstumsdichte und die Zellmorphologie wurden täglich unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Eventuelle Kontaminationen mit Bakterien konnten so ebenfalls erkannt werden. Kulturgefäße, die sich als mikrobiell kontaminiert herausstellten, wurden verworfen.

Für die „Patch-Clamp“ Experimente wurden Zellen auf mit Gelatine vorbeschichtete 25 cm² Plastikpetrischalen ausgesät. Die Zellaussaat für die Zellproliferationsexperimente, den Radioimmunoassay und die Fura-2 Messungen wird in den jeweiligen Abschnitten gesondert beschrieben.

2.2 Patch-Clamp Technik

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik gelang es Neher und Sackmann 1976 erstmals Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle von biologischen Membranen zu untersuchen [76]. Für ihre Arbeit erhielten sie schließlich 1991 den Nobelpreis für Medizin [57,75].

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik ist es möglich, Ladungsträger, die die Membran einer Zelle durchqueren, zu messen. Eine vorne zugespitzte, hitzepolierte Glaspipette – im Weiteren als Patchpipette bezeichnet – wurde mit einem Mikromanipulator auf die Oberfläche einer Zellmembran aufgesetzt. Durch diesen Vorgang wurde bereits eine elektrische Abdichtung („seal“) mit einem Widerstand von ca. 50 MΩ herbeigeführt [24]. Bei sauberer Pipettenspitze konnten durch Anlegen eines leichten Unterdrucks Widerstände im Gigaohmbereich („Gigaseals“) erreicht werden. Nach Erreichen eines „Gigaseals“ wurde der Unterdruck wieder abgelassen. Der Membranbereich unter der Öffnung der Glaspipette („patch“) war nun durch diesen hohen Widerstand so gut vom Hintergrundrauschen abisoliert, dass kleine Ströme im pA-Bereich, wie sie Ionenkanäle aufweisen, dargestellt werden konnten.

Die Patchpipette wurde mit einer elektrolythaltigen Lösung (Patchpipetten-Lösung) gefüllt, in die ein chlorierter Silberdraht eintauchte, der seinerseits an den Verstärker angeschlossen war (für die Darstellung der Verschaltung vergleiche Abbildung 2). In die Badlösung, in der sich die Zellen befanden, tauchte ein weiterer chlorierter Silberdraht („Badelektrode“) ein, der ebenfalls an den Verstärker angeschlossen war. Zwischen Patchpipette und Badelektrode konnte nun eine Spannung angelegt werden, die es möglich machte, den „patch“ spannungsabhängig zu untersuchen, wobei durch eine geeignete Schaltung das Membranpotential konstant gehalten wurde („clamp“).

Diese Versuchsanordnung wird als „cell-attached“ Konfiguration bezeichnet. In dieser Konfiguration ist es möglich, einzelne Ionenkanäle zu untersuchen. Sie diente aber auch als Ausgangspunkt für einige andere Konfigurationen, die nachfolgend erläutert werden.

Legt man nach Ausbildung eines „Gigaseals“ wiederum einen starken Unterdruck an, so reißt der Membranfleck ein und die Patchpipette steht mit dem Zellinneren in Verbindung. Diese Konstellation wird als „whole-cell“ Konfiguration bezeichnet und ermöglicht es, Ströme zu messen, die über die gesamte Membran fließen. Eine weitere Möglichkeit, die „whole-cell“ Konfiguration zu erzielen, besteht in der Technik des „perforated“ Patches. Hier wird die Spitze der Patchpipette wie in den normalen Patch-Clamp Experimenten mit Pipettenlösung befüllt. Die restliche Pipette wird mit einer Amphotericin-B-haltigen Pipettenlösung versetzt. Das Amphotericin-B diffundiert in wenigen Minuten in die Pipettenspitze und kann dann an der „angepatchten“ Membran wirken. Die Membran wird unter der Einwirkung des Amphotericin-B perforiert, so dass ebenfalls eine „whole-cell“ Konfiguration erreicht wird.

Zieht man die Patchpipette in der „whole-cell“ Konfiguration vorsichtig zurück so erhält man einen sog. „excised-patch“ in diesem Fall in „outside-out“ Konfiguration. Die Betrachtung von einzelnen Ionenkanälen ist nun unabhängig von intrazellulären Vorgängen möglich.

Eine andere Form des „excised-patch“ stellt die „inside-out“ Konfiguration dar, die erreicht wird indem die Patchpipette aus der „cell-attached“ Konfiguration zurückgezogen wird. Bei der Herstellung eines „excised-patch“ kann es auch zu einer nicht erwünschten Vesikelbildung kommen. Zieht man die Patchpipette mit dem „patch“ aus der Badlösung an die Luft, so platzt das Vesikel auf und man erhält die

gewünschte Konfiguration. Einen schematischen Überblick über die verschiedenen Konfigurationen gibt die Abbildung 1 wieder.

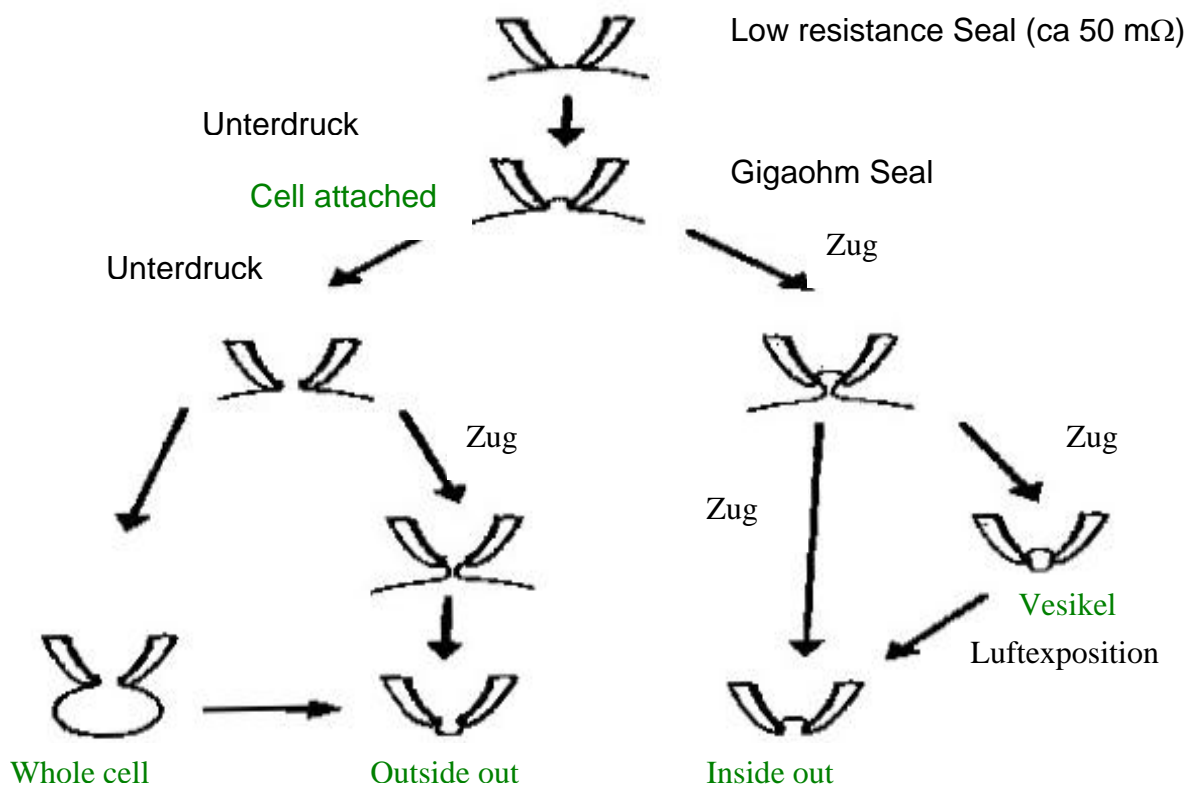


Abbildung 1: Übersicht über die Konfigurationen der Patch-Clamp Technik. In Anlehnung an Hamill [24].

Die Patch-Clamp Experimente zur Einzelkanalregistrierung unter Perfusion der verschiedenen Substanzen (oxLDL, LPC, Ach) wurden alle in der „cell-attached“ Konfiguration durchgeführt. Bei den Experimenten zur Ionenkanalidentifikation wurde die Calciumabhängigkeit in „inside-out“ Konfiguration nachgewiesen. Die Versuche zur selektiven Ionenkanalblockade des BK_{Ca} mittels Iberitoxin wurden in der „outside-out“ Konfiguration durchgeführt. Die Untersuchung zur selektiven IBX induzierten Blockade der durch oxLDL und LPC bewirkten Ionenkanalmodulation wurde ebenfalls in der „cell-attached“ Konfiguration durchgeführt.

2.2.1 Messplatz

Bei der Durchführung der Patch-Clamp Experimente wurde ein inverses Mikroskop (DMIL, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Das Mikroskop wurde auf einem speziellen schwingungsgedämpften Versuchstisch mit einer Arbeitsplatte aus Granit

und einer pneumatischen Regelung durch eine Doppelkammerdämpfung (Nr. 12010100, Science Products GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) platziert. Die 25 cm² Petrischalen mit den Zellen wurden in eine spezielle Halterung auf dem Kreutztisch eingespannt.

Bei der Herstellung der Pipetten für das Patch-Clamp Experiment wurde die von Rae und Levis beschriebene Methode angewendet [68]. Die Patch-Clamp Pipetten wurden 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) direkt vor Gebrauch hergestellt. Nachdem die Kapillare in den Puller eingespannt wurde, konnte sie in der Mitte durch ein Glühfilament erhitzt werden. An den beiden eingespannten Kapillarenden wurde ein gleichmäßiger Zug ausgeübt, so dass in zwei Arbeitsschritten Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von 1-2 µm entstanden. Die Spitzen der Pipetten wurden in einem weiteren Schritt noch in der Mikroforge des Pullers hitzepoliert. Bei den auf dieser Art hergestellten Pipetten ergaben sich Pipettenwiderstände zwischen 5 und 10 MΩ. Die Perfusionspipetten wurden ebenfalls mit dem Puller hergestellt. Als Rohlinge dienten hierbei Mikrohämatokritröhrchen mit einem Außendurchmesser von 1.5 mm (Brand, Wertheim, Deutschland). Der Öffnungsdurchmesser dieser Pipetten liegt bei ca. 250 µm. Die Annäherung von Perfusionspipette und Messpipette an die Zelle konnte durch das Mikroskop unter Sicht erfolgen. Unter Verwendung eines elektrisch-piezoangetriebenen Mikromanipulators wurde die Perfusionspipette in Position gebracht. Für das „patchen“ der Zellen wurde ein mechanischer Mikromanipulator Modell WR-88 (Narishige Scientific Instruments Laboratory, Tokio, Japan) benutzt. Die Pipetten wurden dabei jeweils in Pipettenhalter eingespannt, die an den Mikromanipulatoren befestigt wurden. Das Perfusionssystem bestand aus einer Perfusionspumpe Modell SP 200i (WPI, Berlin, Deutschland) in die eine 5 ml Spritze, die die Perfusionslösung enthielt, eingespannt wurde. An diese Spritze wurde ein Plastikschlauch angeschlossen, an dessen Ende die Perfusionspipette eingeschoben werden konnte. Die Perfusionspipette konnte dann in den Pipettenhalter eingespannt werden.

Um den Messplatz vor Störungen durch externe elektromagnetische Felder abzuschirmen, wurde eine geerdete Stahlplatte unter dem Mikroskop positioniert. Die „Messkammer“ wurde durch einen eigenen Miniatur-Faraday'schen Käfig geschützt.

Der gesamte Messplatz wurde noch einmal von einem zweiten Faraday'schen Käfig (Maßangefertigter Eigenbau, Werkstatt Universitätsklinik Giessen) umgeben.

Folgende Geräte wurden für die Durchführung und Aufzeichnung der Patch-Clamp Experimente verwendet: Patch / Whole Cell Clamp Amplifier, Modell L / M-EPC-7 (List-Electronics, Darmstadt, Deutschland); ein TEK 2211-2-Kanal Analog-/ Digitaloszilloskop (Tektronix, Karlsruhe, Deutschland); ein CED 1401 A / D Wandler (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK); 8-Pol low pass Bessel-Filter. Die Verschaltung der einzelnen Elemente ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

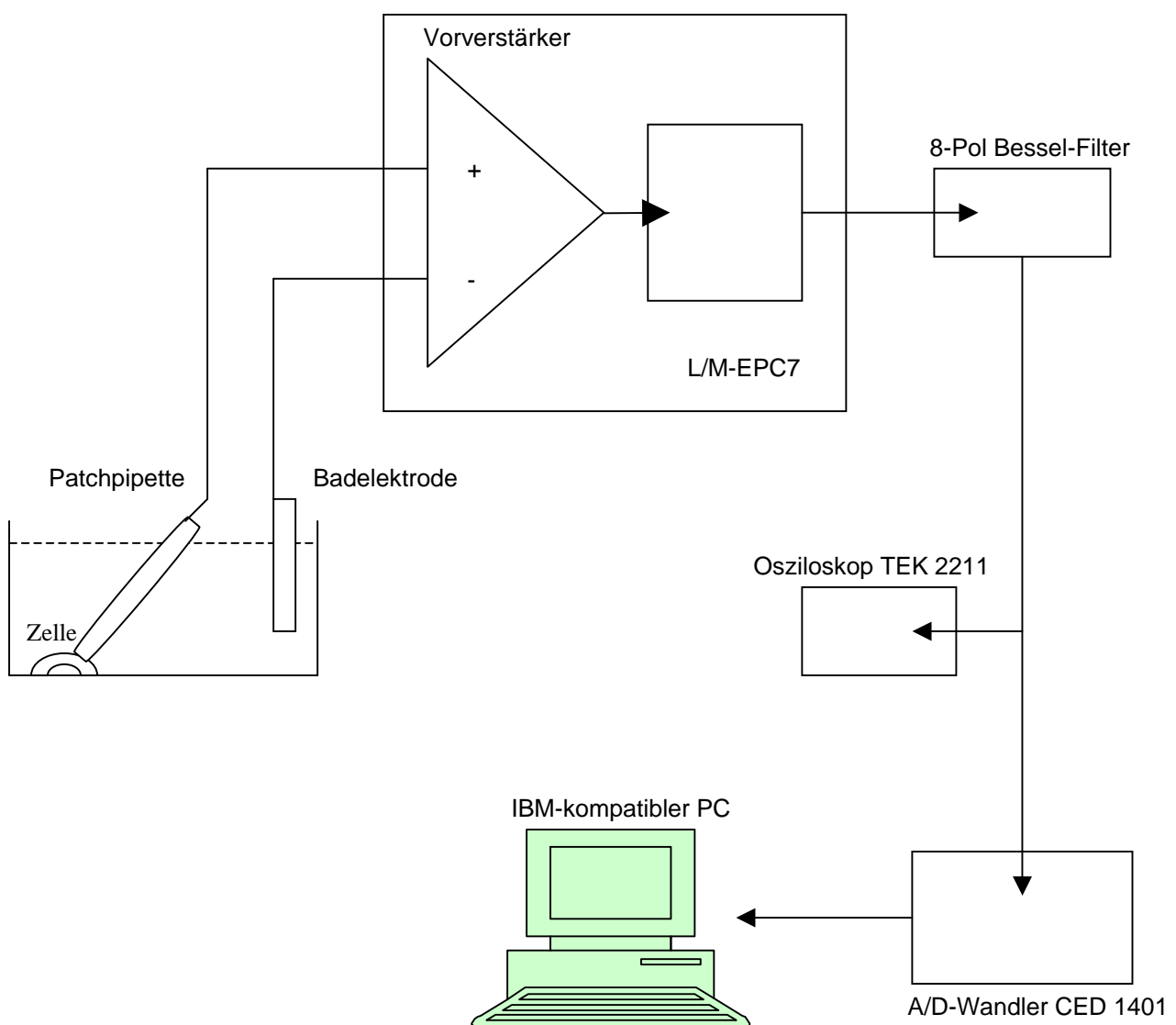


Abbildung 2: Schaltplan des Versuchsstandes.

Über die Patchpipette und eine Referenzelektrode (Badelektrode) wurden Spannungen an die Zellmembran angelegt, um die fließenden Ströme zu messen.

Zum Anlegen der Spannung und zur Aufnahme der Ionenströme diente der Verstärker (L/M-EPC7). Die gemessenen Ionenströme wurden mit dem A/D-Wandler digitalisiert und auf einem IBM-kompatiblen PC gespeichert. Um das Hintergrundrauschen zu verringern, ist der 8-Pol Bessel-Filter zwischengeschaltet worden. Die Analyse der gemessenen Ionenströme wurde mit der pClamp Software V 6.0 (Axon Instruments, Foster City, USA) durchgeführt.

2.2.2 Lösungen und Perfusionsstoffe

In diesem Abschnitt folgt eine Aufzählung aller für die Versuche verwendeten Lösungen. Versuchsbedingte Variationen von Kulturmedien sind bei der Beschreibung der jeweiligen Messmethode genannt. Alle Substanzen sind, wenn nicht anders angegeben in Aqua bidest gelöst.

Badlösung:

140 mmol/l NaCl, 5.5 mmol/l D-Glucose, 10 mmol/l Hepes, 5 mmol/l KCl, 0.5 mmol/l MgCl, 1.5 mmol/l CaCl, pH 7.3 (justiert durch die Zugabe von NaOH)

Für die jeweiligen Versuche wurden der Badlösung folgende Substanzen hinzugefügt:

oxLDL (Biotrend, Köln, Deutschland); anti oxLDL Rezeptor Antikörper JTX-20 10 µg/ml (Prof. Sawamura, Osaka, Japan); Ca²⁺ 10⁻⁴-10⁻⁷ mmol/l; LPC 20 µmol/l; 10 µg/ml; Acetylcholin (Ach) 1 µmol/l; Arginin (Arg) 1 mmol/l; Iberiotoxin (IBX) 100 nmol/l (alle Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Patchpipettenlösung:

110 mmol/l K-Aspartat, 5 mmol/l Hepes, 30 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl, 0.5 mmol/l EGTA, pH 7.2 (justiert durch die Zugabe von KOH)

2.2.3 Durchführung der Patch-Clamp Experimente

Eine Kulturschale mit HUVECs wurde aus dem Brutschrank entnommen. Nachdem das Medium abgesaugt worden war, folgten zwei Waschgänge mit warmer Badlösung (ca. 37°C), um eventuelle Reste der Nährlösung zu entfernen. Anschließend wurde die Schale mit ca. 5 ml warmer Badlösung gefüllt und auf dem Mikroskopisch in eine spezielle Halterung eingespannt. Mit einem Mikromanipulator wurde die Patchpipette in die Nähe einer geeigneten Zelle gebracht. Über die Pipettenhalterung war es möglich, die Druckverhältnisse im Pipetteninneren zu regulieren, so dass man beim Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung einen Überdruck erzeugen konnte, der ein Verstopfen der Pipette durch auf der Oberfläche der Badlösung schwimmende Partikel verhindern sollte. Der Überdruck wurde nach dem Eintauchen in die Badlösung wieder abgelassen, um mechanische Irritationen der Zellmembran zu vermeiden.

Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Spitze der Patchpipette soweit an die Zellmembran angenähert, bis der kontinuierlich gemessene Pipettenwiderstand anstieg. Durch kurzzeitiges Erzeugen eines Unterdrucks in der Pipette erhöhte sich der Widerstand in den Gigaohmbereich, so dass ein sog. „Gigaseal“ entstand. Eventuell vorhandene Leckströme sind bei Vorliegen eines Gigaseals (verwendet wurden nur solche Seals, die einen Widerstand $> 20 \text{ G}\Omega$ erreichten) vernachlässigbar gering.

Sobald einer oder mehrere Ionenkanäle in dem Membranfleck vorlagen, konnte mit der Messung begonnen werden. Die Ströme wurden analog auf dem Oszilloskop beobachtet und mittels AD-Wandler digitalisiert und für die spätere Auswertung gespeichert.

Zur Ermittlung der Strom-Spannungsbeziehung, aus der sich die Ionenkanal-Leitfähigkeit bestimmen lässt, wurde eine Spannungsreihe von + 20 mV bis + 120 mV (mit jeweiligen Spannungssprüngen von 20 mV) durchgeführt.

Für die Registrierung der Ionenkanalaktivität unter dem Einfluss der ausgewählten Substanzen (LPC, oxLDL und Ach) wurden Spannungen von + 80 mV und + 100 mV verwendet. Nach der Kontrollmessung ohne Applikation der jeweiligen Substanz wurde die Perfusionspipette mit Hilfe des zweiten Mikromanipulators an die Zelle herangefahren und mit der Perfusion begonnen. Eine Perfusionsgeschwindigkeit von 0,02 ml/h wurde gewählt, da bei höheren Geschwindigkeiten eine mechanische

Irritation („shear stress“) der Zellmembran nicht auszuschließen war (nichtveröffentlichte Beobachtung, Physiologisches Institut Universität Giessen). Die nächste Messung erfolgte eine Minute nach Perfusionsbeginn, sowie alle fünf Minuten nach Start der Perfusion für eine Messdauer von insgesamt 30 Minuten. Die Registrierung erfolgte für jede Spannung über ein Intervall von 30 Sekunden. Im Folgenden soll noch einmal die Identifikation der registrierten Ionenkanäle als BK_{Ca} detailliert erläutert werden.

2.2.4 Identifikation des BK_{Ca}

Zur Identifikation des BK_{Ca} dienen im Wesentlichen vier Charakteristika: das spannungsabhängige Verhalten des Ionenkanals, die Leitfähigkeit, die Aktivierung durch Calcium und die Blockade mit dem hochspezifischen BK_{Ca}-Blocker Iberitoxin. Die wesentlichen Punkte sollen im Weiteren noch einmal kurz dargestellt werden:

- Registrierung eines spannungsabhängigen Auswärtsstroms

Durch Anlegen einer positiven Spannung an den Membranfleck konnte ein Auswärtsstrom registriert werden, dessen Amplitude mit Steigerung der angelegten positiven Spannung zunahm. Hierbei wurde mit einer Spannung von +20 mV begonnen und in 20 mV-Sprüngen bis auf +100 mV gesteigert.

- Leitfähigkeitsbestimmung

Ein weiterer Bestandteil der Ionenkanalcharakterisierung und Identifizierung ist die Bestimmung der spezifischen Kanalleitfähigkeit. Mit Hilfe der pClamp Software V 6.0 (Fa. Axon Instruments, Foster City, USA) konnte die durchschnittlich durch den Ionenkanal geflossene Stromstärke errechnet werden. Aus den verwendeten Messungen wurden die Mittelwerte der Strom-Spannungswerte ermittelt. Auf diese Weise lässt sich ein Strom-Spannungsdiagramm für den unitären Ionenauswärtsstrom erstellen. Durch die so erhaltenen Punkte wird eine Regressionsgerade gelegt, die durch den Nullpunkt gehen sollte, da eine symmetrische Bad-/Pipettenlösung (140 nmol K⁺/l) verwendet wurde. Die Leitfähigkeit konnte durch Berechnung der Steigung ermittelt werden und ist charakteristisch für den BK_{Ca} in einem Bereich von 100-250 pS [28,62].

- Calcium- Abhängigkeit

Für die Ermittlung der Calcium-Abhängigkeit des gemessenen Ionenkanals wurden Patch-Clamp Messungen in der „inside-out“ Konfiguration durchgeführt. In dieser Konfiguration ließ sich eine Simulation von variablen intrazellulären Calcium-Konzentrationen erreichen, indem diese „patches“ mit Calciumlösungen der Konzentrationen 10^{-7} bis 10^{-4} mmol/l Ca^{2+} perfundiert wurden. Die Registrierung wurde bei einem Pipettenpotential von +80 mV durchgeführt.

- Iberiotoxin

Iberiotoxin blockiert exklusiv den BK_{Ca} durch direkte Bindung an der Außenseite des Ionenkanals, so dass die Pore durch welche die K^+ -Ionen fließen verschlossen wird [21]. Kommt es bei Applikation dieses Giftes an den Membranfleck zu einer Reduktion bzw. Aufhebung der Kanalaktivität, so handelt es sich um den BK_{Ca} , da Iberiotoxin hochselektiv an diesen K^+ -Kanal bindet

2.2.5 Auswertung der Patch-Clamp Experimente

Die in den übrigen Experimenten registrierten Ionenkanalaktivitäten wurden mit Hilfe der pClamp Software V 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) ausgewertet. Durch das Programm konnte die Öffnungswahrscheinlichkeit (NP_O) direkt berechnet werden. N steht dabei für die Anzahl der im „patch“ enthaltenen Kanäle, P_O für die Öffnungswahrscheinlichkeit des einzelnen Kanals. Da in einem „patch“ durchaus mehr als nur ein Ionenkanal vorhanden sein kann, ist es durchaus möglich, dass NP_O Werte > 1 annimmt.

2.3 Fura-2-Imaging

Die Durchführung von Ca^{2+} -Messungen mittels FURA-2-Imaging wurde nach der bei Tsien et al. beschriebenen Methodik durchgeführt [90]. Die Zellen wurden auf mit Gelatine vorbeschichtete Glasplättchen („Coverslips“) ausgesät. Die HUVEC wurden für drei Tage in komplettem Nährmedium bei 37°C kultiviert bis die „Coverslips“ weitgehend konfluent bewachsen waren.

Zunächst wurden $50 \mu\text{g}$ FURA-2 (Mollecular Probes, Leiden, Niederlande) in $160 \mu\text{l}$ Dimethylsufoxid (DMSO; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgelöst. Von dieser

Stocklösung wurden 10 µl mit 1 ml Zellkulturmedium gemischt. Das Kulturmedium wurde von den „Coverslips“ abgesaugt. Die Zellen wurden nun für mindestens 60 Minuten mit FURA-2 inkubiert. Anschließend wurde der Coverslip aus der Petrischale entnommen und in die Messkammer eingesetzt. Als Kammermedium wurde HBSS mit 1.33 µmol/l CaCl₂ verwendet. Die Messungen erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland). FURA-2 bildet zusammen mit Ca²⁺ einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 340 und 380 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. 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 miteinander verrechnet, so dass die eigentlichen Daten eine Ratio aus 340 nm zu 380 nm darstellt. Nach einer Messzeit von 5 Minuten wurden die Zellen durch Zugabe von 10 µl Stimulationslösung in die Kammer angeregt. Als Stimulationslösung dienten:

1. 20 µmol/l LPC
2. 10 µg/ml oxLDL
3. 100 nmol/l IBX
4. 20 µmol/l LPC + 100 nmol/l IBX
5. 10 µg/ml oxLDL + 100 nmol/l IBX
6. HBSS als Kontrolle

Nach einer Gesamtmesszeit von 20 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-Farbstoff ausgebrannt wurde. Anschließend wurde noch einmal wie oben beschrieben gemessen. Die so erhaltene Intensität entspricht der Eigenintensität der Zellen ohne FURA-2 und wurde als Hintergrund von den während des eigentlichen Experiments gemessenen Lichtintensitäten subtrahiert.

2.4 Zellproliferation

Um die Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der HUVEC durch LPC bzw. oxLDL zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: zum einen die direkte Zellzählung mittels der Neubauer Kammer und zum anderen die Messung der [³H]-Thymidininkorporation. Die Stimulation erfolgte für beide Verfahren in sechs Gruppen:

1. 20 µmol/l LPC
2. 100 nmol/l IBX
3. 20 µmol/l LPC + 100 nmol/l IBX
4. 10 µg/ml oxLDL
5. 10 µg/ml oxLDL + 100 nmol/l IBX
6. Kontrollgruppe ohne Stimulation

Für die Messung der Proliferation wurden HUVEC der Passagen vier bis acht verwendet.

2.4.1 Zellzählung

Auf mit Gelatine vorbeschichteten 24-well-Platten (Becton Dickinson, USA) wurden in jede Vertiefung 10000 Zellen in 1 ml komplettem EBM mit 10% FKS ausgesät (Tag 0). Nach 24 h (Tag 1) folgte ein Umsetzen der Zellen auf ein FKS-freies EBM. Dieser Schritt sollte bewirken, dass die proliferierenden Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisiert werden. Nach weiteren 24 h (Tag 2) wurden die Zellen wieder auf 2% FKS haltiges EBM gesetzt und stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen gezählt (Tag 3). Dafür wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin-EDTA von den Plastikböden der wells abgelöst. Das Zelllysate wurde mit der Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, wobei für jede Vertiefung die Zellzahl vierfach bestimmt und anschließend aus diesen Werten der Mittelwert gebildet wurde.

2.4.2 [³H]-Thymidin-Uptake

Als zweite Methode zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurde die [³H]-Thymidininkorporation der HUVEC in Anlehnung an die bei Lindl und Heinloth

beschriebene Methode bestimmt [26,42]. Die Aufnahme von Thymidin durch die Zellen ist ein Proliferationsmarker auf DNA-Ebene. Eine vermehrte Synthese von DNA wird anhand einer vermehrten Aufnahme von [³H]-Thymidin registriert. Die Menge des aufgenommenen [³H]-Thymidin wurde mittels eines β -Counters (Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland) in counts per minute (cpm) gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Resultaten aus der Zellzählung wurden die Ergebnisse in % Proliferation angegeben, wobei die Kontrolle als 100 % festgelegt wurde.

Für die Messung der [³H]-Thymidininkorporation wurden 10000 Zellen pro Vertiefung in 500 μ l EBM mit 10 % FCS auf eine 24-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 h in serumfreies Medium umgesetzt. In Anlehnung an das von Heinloth et al verwendete Protokoll wurden die Zellen 22 h bevor sie mit tritiumhaltigem Medium versetzt wurden bereits vorstimuliert [18,26].

Nach Ablauf der Vorinkubation wurde das Medium ausgetauscht. Das neue Medium war ebenfalls serumfreies EBM, das mit 0.1 μ Ci/ml [³H]-methyl-Thymidin (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) versetzt wurde. Dem tritiumhaltigen Medium wurden ebenfalls die Stimulationssubstanzen in den oben genannten Konzentrationen zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 7 Stunden im 37°C Brutschrank bei 5% CO₂ wurde der Versuch abgestoppt: Zunächst wurde das Medium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 750 μ l HBSS gewaschen, bevor 250 μ l Trichloressigsäure 10% (TCA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben wurde. Mit der TCA wurde die DNA in den Zellen gefällt. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden in einen 4°C Kühlraum inkubiert. Als nächstes wurde die TCA aus den wells abgesaugt und die Zellen erneut mit 750 μ l HBSS gewaschen. Nach diesem Waschgang folgte die Messung des aufgenommenen [³H]-Thymidins. Dafür wurden die Zellen mit 250 μ l 1mol/l NaOH mit 0.01 Gewichtsprozent SDS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) lysiert und für 90 min in einem CO₂ freiem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Lysat in Szintivials überführt und mit 4 ml Szinticocktail aufgefüllt. Diese Proben wurden dann im β -Counter gemessen.

2.5 NO-Messung

Um den Einfluss von LPC und oxLDL auf die endotheliale Synthese von NO zu bestimmen wurde die durch Acetylcholin induzierte intrazellulär gebildete cGMP Konzentration mit einem cGMP-Radioimmunoassay (cGMP-RIA) gemessen. Das second messenger Molekül cGMP ist in seiner Bildung direkt von der NO Synthese der Zelle abhängig, so dass es als indirekter Nachweis für die NO Syntheserate der Zelle angesehen werden kann.

2.5.1 cGMP-RIA

Bei diesem Verfahren wird die NO Freisetzung indirekt über die Bildung des intrazellulären second messenger cGMP bestimmt. NO stimuliert seinerseits direkt die lösliche Guanylylcyclase, die für die Umwandlung von GTP in cGMP zuständig ist [81]. Der cGMP-Spiegel der Zellen wurde durch Verwendung eines [³H]-cGMP-RIA Kits (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt.

Der mögliche Einfluss von Sauerstoffradikalen, die durch die NAD(P)H-Oxidase gebildet werden, wurde mit Hilfe von Oligonucleotiden (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit 10 µmol/l Oligonucleotiden transfiziert. Gegen die p22-phox Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase wurden Antisenseoligonucleotide mit folgender Sequenz eingesetzt: 5'-phosphorothioate-GAT-CTG-CCC-CAT-GGT-GAG-GAC-C-phosphorothioate-3' [Heinloth 1999]. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen auch mit einem chemisch identischen Nonsenseoligonucleotid der folgenden Sequenz behandelt: 5'-phosphorothioate-CCA-GGA-GTG-GTA-CCC-CGT-CTA-G-phosphorothioate-3'. Die Nucleotide wurden in einer Konzentration von 10 µmol/l dem Kulturmedium hinzugefügt 24 h bevor die Zellen stimuliert wurden.

2.5.2 Gewinnung der Proben

In mit Gelatine vorbeschichtete 9.6 cm² Plastikpetrischalen wurden 60.000 Zellen in komplettem EBM ausgesät. Nach drei Tagen wurden die Zellen in sieben Gruppen stimuliert:

1. 1 mmol/l Arg
2. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach
3. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach + 20 µmol/l LPC
4. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach + 100 nmol/l IBX
5. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach + 20 µmol/l LPC + 100 nmol/l IBX
6. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach + 10 µg/ml oxLDL
7. 1 mmol Arg + 1 µmol/l Ach + 10 µg/ml oxLDL + 100 nmol/l IBX

Die Substanzen wurden in physiologischer Badlösung, die auch schon bei den Patch-Clamp Experimenten verwendet wurde, gelöst. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml HBSS gewaschen, bevor sie 30 min bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Substanzen inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Stimulationslösung abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 98% Ethanol (Riedel de Haen, Seelze Deutschland) auf den Petrischalen fixiert und über Nacht in einen 4°C Kühlraum gestellt, damit der Alkohol verdampfen konnte.

Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet. Zu diesem Zweck wurde in jede Schale 100 µl destilliertes Wasser gegeben und die Schale mit einem Cell-Scraper (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) abgeschabt. Die Suspension wurde für jedes Schälchen gesondert in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppis; Fa. Eppendorf, Hamburg Deutschland) überführt und für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde von dem Zellfragmente enthaltendem Pellet abpipettiert und als Probe in dem RIA weiterverarbeitet.

2.5.3 Durchführung des RIA

Alle Substanzen mit Ausnahme der Proben sind in dem [³H]-cGMP-Radioimmuniassay-Kit enthalten. Zunächst wurde aus der 8 pmol/l enthaltenden cGMP-Standard Lösung eine Verdünnungsreihe angefertigt, so dass sich cGMP-Lösungen der Konzentrationen 8; 4; 2; 1 und 0.5 pmol/l ergaben. Aus dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils zwei 1.5 ml Eppis mit 50 µl der Standard-Lösung

beschickt. Außerdem wurden je zwei 1.5 ml Eppis mit 50 μ l Puffer- bzw. mit 50 μ l Blank-Lösung gefüllt. Als letztes wurden aus jeder Probe 50 μ l entnommen und ebenfalls in 1.5 ml Eppis gegeben. Dieser Ansatz stand während des ganzen Versuches in einem Eisbad.

In jedes Eppis wurden darauf je 25 μ l Anti-cGMP-Antiserum und [3 H]-cGMP hinzupipettiert. Die Eppis wurden für wenige Sekunden gevortext und dann in ihrem Eisbad für 90 min in einen 4°C Kühlschrank gestellt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jedes Eppi mit 500 μ l eiskaltem Ammoniumsulfat befüllt, kurz gevortext und für 5 min zurück in das Eisbad gestellt. Nun konnten die Ansätze für 90 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 550 μ l destilliertem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 500 μ l in ein Szintivial überführt, und mit 4 ml Szinticocktail aufgefüllt. Die Szintivials konnten nun im β -Counter 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 folgenden statistischen Testverfahren: Friedman- und Nemenyi-Test. Für die Daten aus den übrigen Experimenten wurde eine multivariate Datenanalyse mittels des MANOVA-Tests durchgeführt [74]. Die Berechnungen erfolgten unter Zuhilfenahme des Computerprogramms SPSS für Windows (Version 5.0.2).

3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der in Kapitel 2 beschriebenen Versuche dargestellt werden. In 3.1 werden zunächst die Daten aus den Patch-Clamp Experimenten, in 3.2 die Ergebnisse aus den Messungen zu Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase, in 3.3 die Resultate der Proliferationsversuche und schließlich in 3.4 die Untersuchung der endothelialen NO Synthese gezeigt.

3.1 Patch-Clamp Experimente

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Patch-Clamp Experimente dargestellt. Zunächst wird auf die Identifikation des BK_{Ca} eingegangen. Es folgen dann die Resultate aus den Versuchen mit oxLDL, LPC und Acetylcholin.

3.1.1 Ionenkanalidentifikation

Zur Ionenkanalidentifikation wurden verschiedene Sachverhalte (Leitfähigkeit, Calciumabhängigkeit, Blockade durch Iberiotoxinperfusion, Spannungsabhängigkeit) betrachtet, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

- *Leitfähigkeitsmessung*

Die Bestimmung der Leitfähigkeit der gemessenen Ströme wurde anhand der Kontrollmessungen vor der Perfusion mit den jeweiligen Substanzen durchgeführt. Aus den jeweiligen Amplituden des unitären Stromes wurde eine Strom-Spannungsbeziehung erstellt. In Abbildung 3 sind diese Punkte, durch die anschließend noch eine Regressionsgerade gelegt wurde, dargestellt.

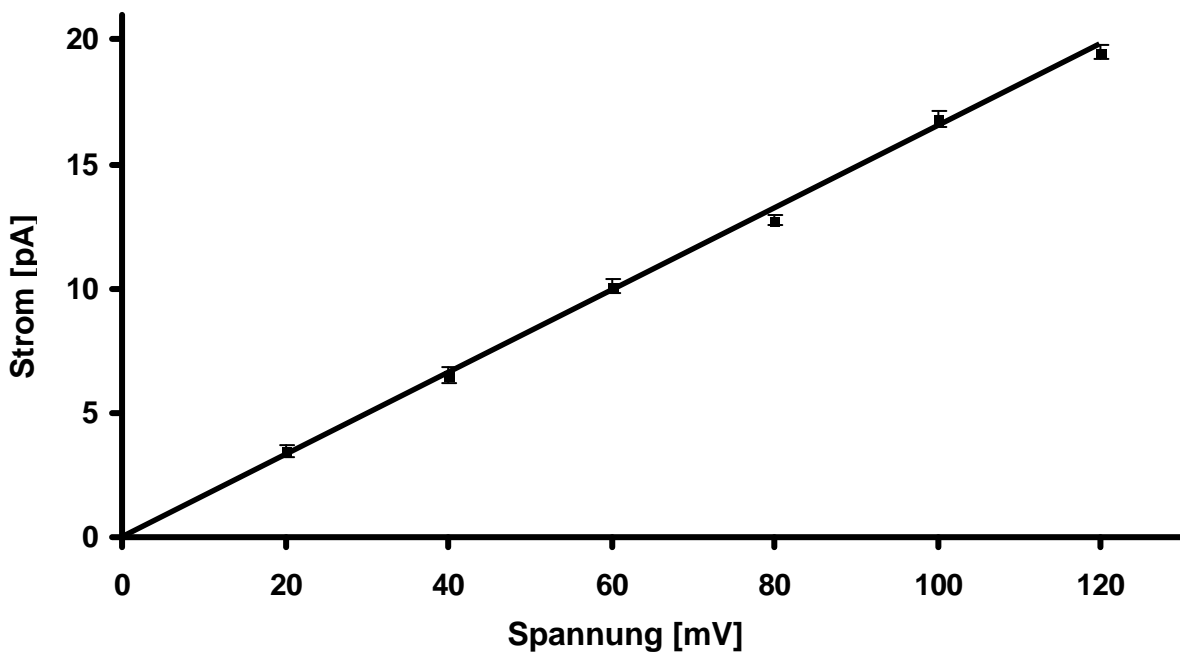


Abbildung 3: Strom-Spannungs-Beziehung zur Bestimmung der Leitfähigkeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Kontrollmessungen und der berechneten Regressionsgeraden.

Die Regressionsgerade belegt, dass das Strom-Spannungsverhältnis bei einer symmetrischen Kaliumkonzentration von 140 mmol/l linear ist. Aus der Steigung der Geraden errechnet sich eine mittlere Leitfähigkeit des BK_{Ca} von $170 \text{ pS} \pm 2,1 \text{ pS}$. Dieses Ergebnis entspricht dem durch andere Arbeitsgruppen beschriebenen Leitfähigkeits-Bereich von 100-250 pS für diesen Ionenkanal [28,62].

Die lineare Regressionsgerade geht durch den Nullpunkt, was der Beobachtung entspricht, dass bei einem Elektrodenpotential von 0 mV keine Aktivität des BK_{Ca} nachweisbar war.

- *Calciumabhängigkeit*

Für die Bestimmung der Calcium-Abhängigkeit wurden „inside-out patches“ mit Lösungen verschiedener Calciumkonzentration (10^{-7} mmol/l bis 10^{-4} mmol/l) perfundiert. Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration konnte die erwartete Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit erzielt werden. Unter Verwendung einer Boltzman Funktion konnte eine halbmaximale Aktivierung bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $10^{-5,7}$ mmol/l ermittelt werden. In Abbildung 4 ist dieser Sachverhalt grafisch dargestellt.

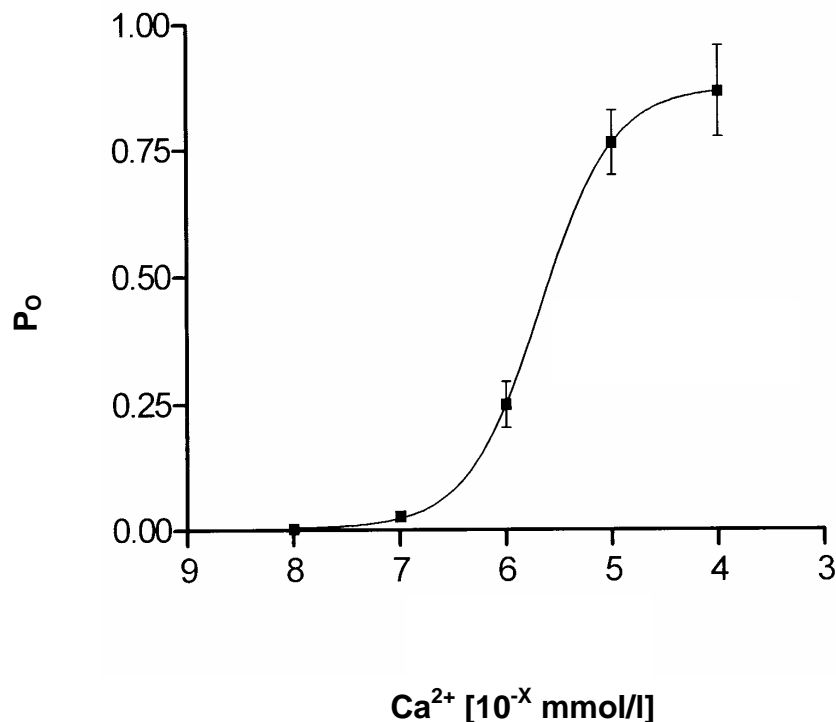


Abbildung 4: Ca^{2+} -Abhängigkeit des registrierten Kanals. Messung an $n = 5$ Zellen bei einem Pipettenpotential von +80 mV. Dargestellt sind Mittelwerte der Öffnungswahrscheinlichkeit \pm SEM. Die halbmaximale Aktivierung des Kanals findet sich bei einer Konzentration von $10^{-5,7}$ mmol/l Ca^{2+} .

- *Selektive Blockade durch IBX*

Als weitere Methode zur Identifizierung des BK_{Ca} , wurden Messungen in der „outside-out“ Konfiguration durchgeführt. Die „outside-out-patches“ wurden mit 100 nmol/l IBX- Lösung perfundiert, was zu der erwarteten Blockade des Ionenkanals führte. Eine solche Originalregistrierung ist in Abbildung 5 dargestellt.

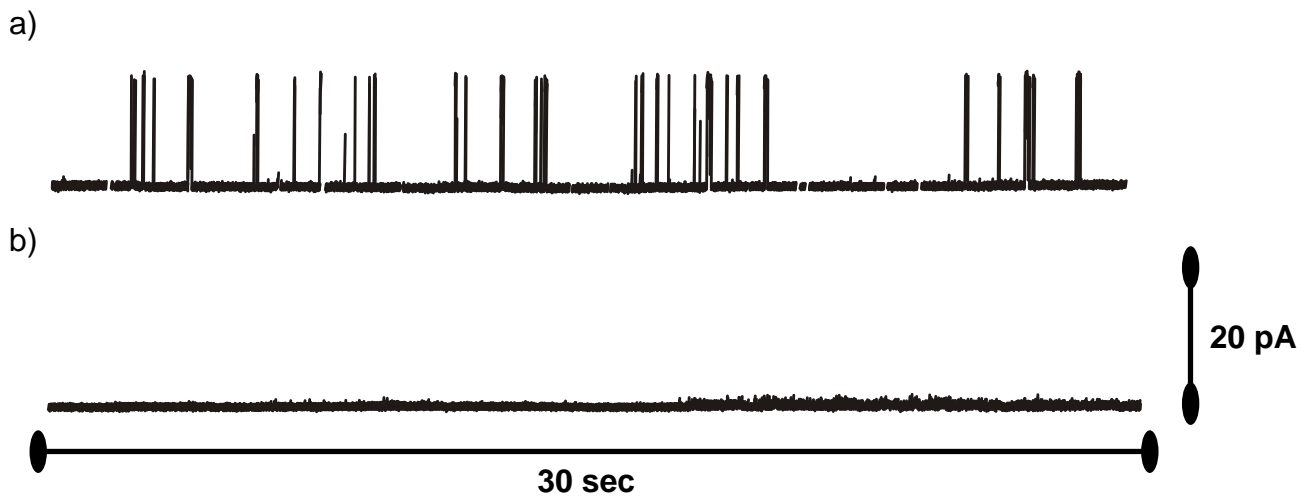


Abbildung 5: Selektive Blockade durch IBX. Originalregistrierung der BK_{Ca}-Aktivität unter Perfusion mit 100 nmol/l IBX in der „outside-out“ Konfiguration bei einem Pipettenpotential von +100 mV. In a) ist die Messung unter Kontrollbedingung vor Perfusionsbeginn, in b) 5 min nach Beginn der Perfusion mit IBX dargestellt.

- *Spannungsabhängigkeit*

Als letztes Merkmal, das den gemessenen Ionenkanal als BK_{Ca} charakterisiert, soll nun noch die Spannungsabhängigkeit des gemessenen Kanal aufgezeigt werden. In den Kontrollmessungen wurden ausgehend von einem Pipettenpotential von 0 mV in Spannungssteigerungen um jeweils +20 mV bis zu einer Klemmspannung von +100 mV die Kanalaktivität vor Beginn der Perfusion registriert. Eine solche Originalregistrierung zeigt die folgende Abbildung 6.

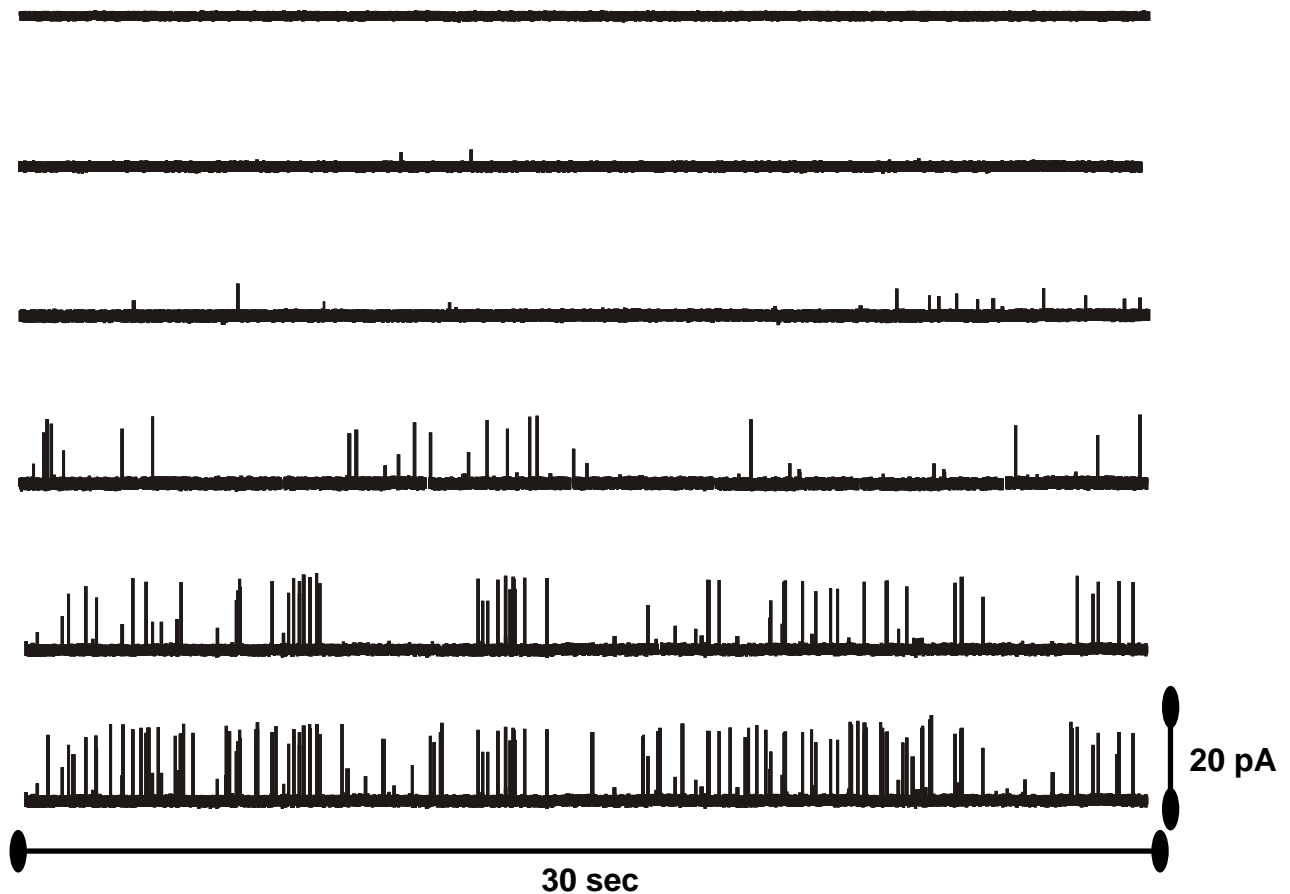


Abbildung 6: Spannungsabhängigkeit des BK_{Ca}. Registrierung der Kanalaktivität in der „cell-attached“ Konfiguration bei symmetrischer K⁺-Konzentration bei einem Pipettenpotential von 0 mV (erste Reihe) bis 100 mV (letzte Reihe).

Anhand der obigen Abbildung wird deutlich, dass mit steigendem Pipettenpotential nicht nur die Amplitude des Ionenkanals, sondern auch dessen Aktivität, d.h. die Anzahl der Ionenkanalöffnungen pro Zeit zunimmt.

3.1.2 Einfluss von oxLDL auf den endothelialen BK_{Ca}

In der „cell-attached“ Konfiguration wurde der Einfluss von oxLDL auf den BK_{Ca} untersucht. Die Messungen wurden mit Pipettenpotentialen von +80 mV und +100 mV durchgeführt, da die Ionenkanalaktivität in niedrigeren Spannungsbereichen zu gering war. In Abbildung 7 ist exemplarisch eine solche Messung bei einem Pipettenpotential von +100 mV dargestellt.

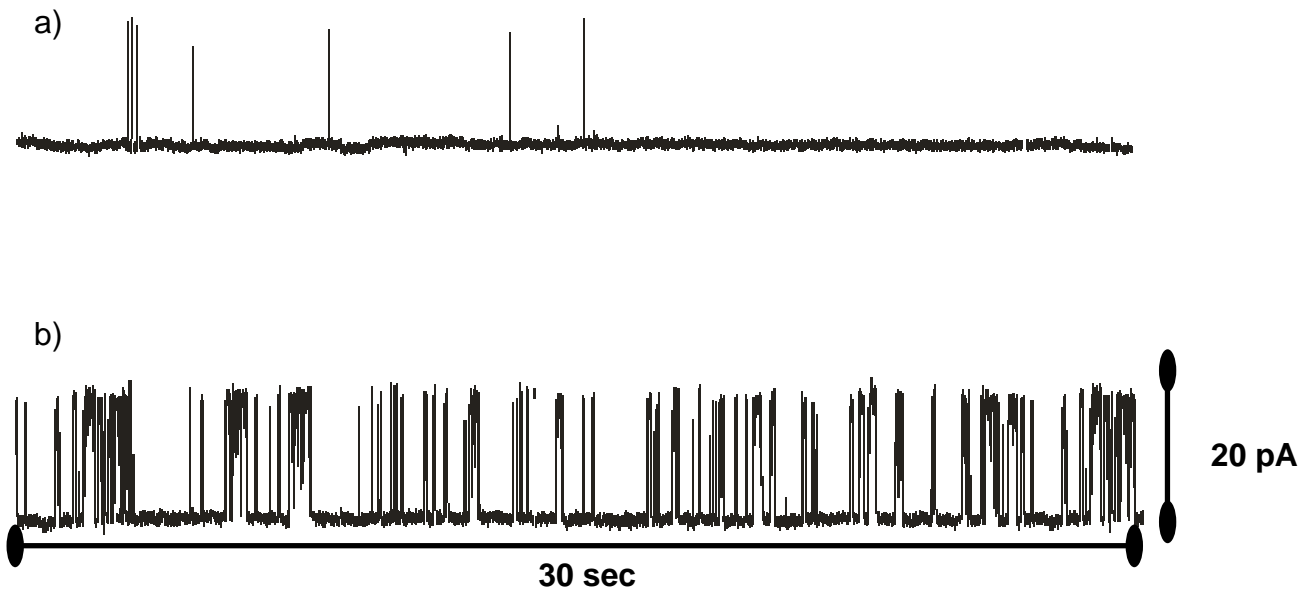


Abbildung 7: Einfluss von oxLDL auf die BK_{Ca}-Aktivität. Messung bei einem Pipettenpotential von + 100 mV in der „cell-attached“ Konfiguration. In a) ist die Kanalaktivität unter Kontrollbedingungen gezeigt, in b) während der Perfusion mit 10 µg/ml oxLDL-Perfusionslösung 15 Minuten nach Perfusionsbeginn.

In Abbildung 7 b ist eine deutliche Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} nach Zugabe von oxLDL zu erkennen. Die statistische Auswertung der patch-clamp Experimente unter Perfusion mit oxLDL zeigte bei einem Pipettenpotential von +100 mV einen signifikanten Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit (NP_o) von 0.000 ± 0.001 unter Kontrollbedingungen auf 0.026 ± 0.020 nach einer Perfusionsdauer von 15 Minuten. Dieser Anstieg hielt bis zur 30. Minute an. Die Messungen mit einem Pipettenpotential von +80 mV zeigten einen ähnlichen Verlauf. Auch hier kam es nach einer 15 minütigen Perfusion zu einem im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit von 0.000 ± 0.001 auf 0.028 ± 0.020 . Dieser Anstieg setzte sich auch bei Weiterführung der Perfusion fort. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 noch einmal graphisch zusammengefasst.

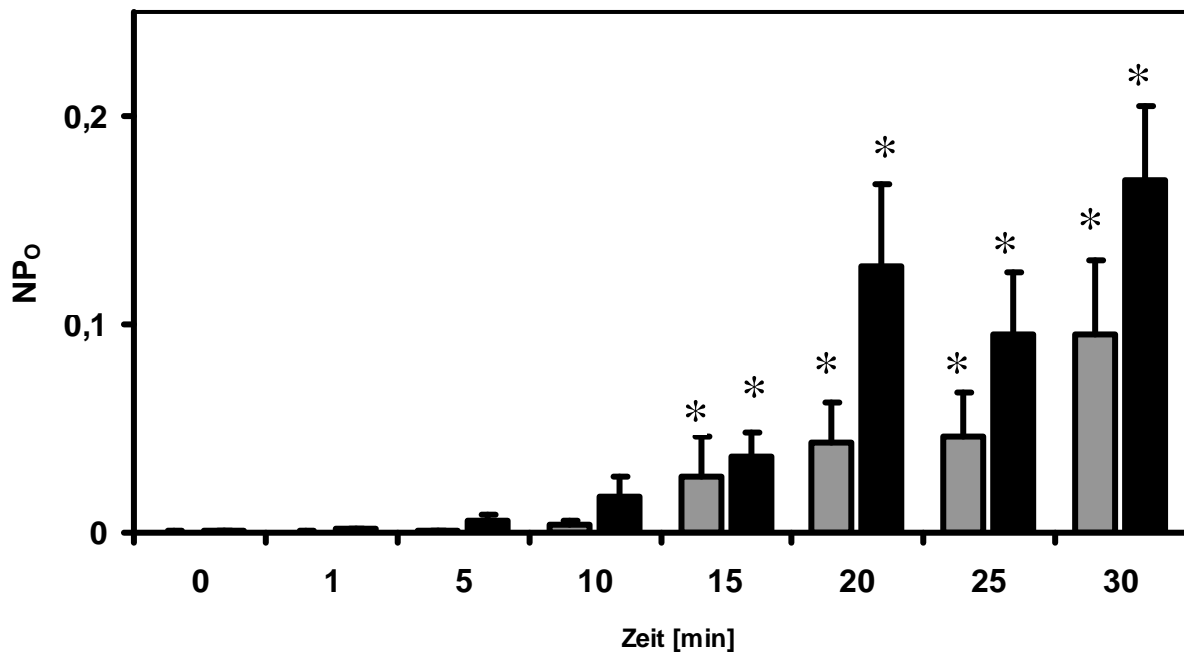


Abbildung 8: Öffnungswahrscheinlichkeit (NPo) des BK_{Ca} unter Einfluss von 10 µg/ml oxLDL-Perfusionslösung. Messung zu jedem Zeitpunkt mit Pipettenpotentialen von + 80 mV (grau) und + 100 mV (schwarz). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM; n=21; *p<0.05 vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

3.1.3 Einfluss von LPC auf den endothelialen BK_{Ca}

Da die oxLDL- Partikel zum größten Teil aus LPC bestehen liegt die Vermutung nahe, dass auch durch LPC eine Steigerung der Kanalaktivität des BK_{Ca} zu erreichen ist. Analog zu den Messungen mit oxLDL wurden Patch-Clamp Messungen unter Perfusion mit LPC in der „cell-attached“ Konfiguration bei einem Pipettenpotential von + 80 mV und + 100 mV durchgeführt. Diese erwartete Ionenkanalaktivierung stellte sich dann auch tatsächlich ein, so dass sich nach 15 Minuten andauernder Perfusion mit 20 µmol/l LPC eine im Vergleich zur nicht perfundierten Kontrolle signifikante Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} registrieren ließ. Eine Originalregistrierung ist in Abbildung 9 dargestellt.

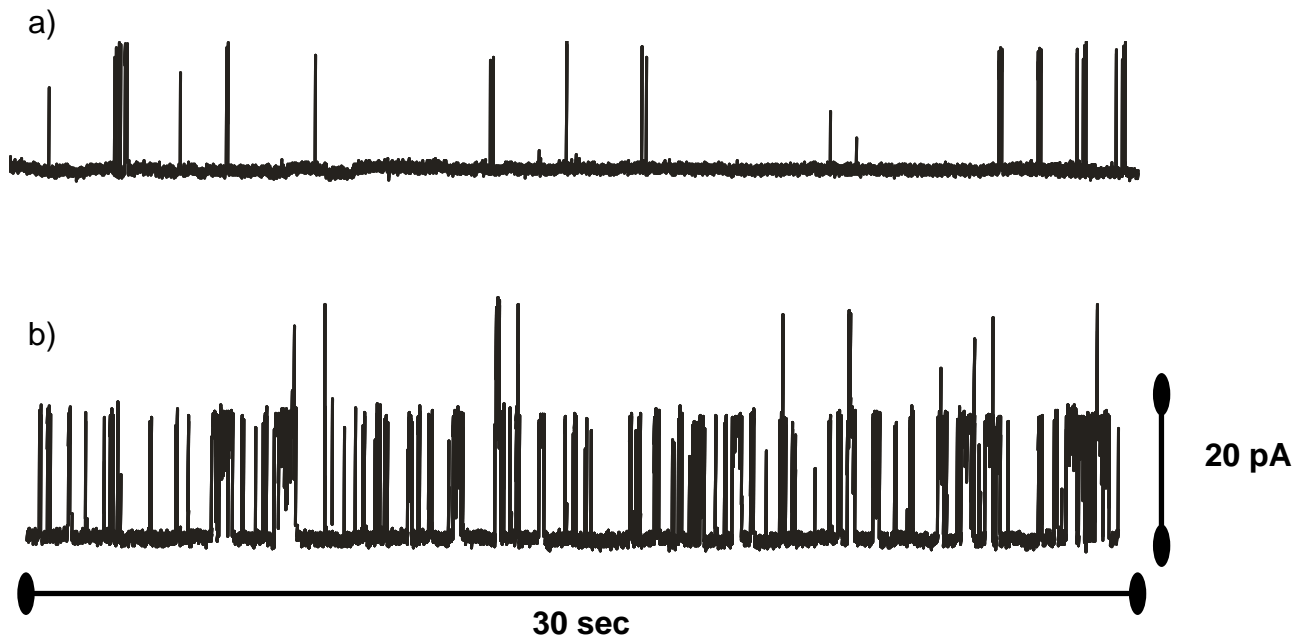


Abbildung 9: Einfluss von LPC auf die BK_{Ca}-Aktivität. Das Öffnungsverhalten des BK_{Ca} wurde bei einem Pipettenpotential von + 100 mV in der „cell-attached“ Konfiguration untersucht. In a) ist die Kanalaktivität unter Kontrollbedingungen gezeigt, in b) während der Perfusion mit 20 µmol/l LPC-Perfusionslösung 15 Minuten nach Perfusionsbeginn.

Im Einzelnen ergab sich nach 15 Minuten LPC Einwirkung bei einem Pipettenpotential von +80 mV eine Steigerung der NPo von 0.001 ± 0.001 (Kontrollbedingung) auf 0.052 ± 0.021 (LPC). Ähnliche Resultate konnten mit einem Pipettenpotential von +100 mV erzielt werden: 0.004 ± 0.002 (Kontrolle); 0.104 ± 0.036 (LPC Perfusion 15 Minuten). Die statistische Auswertung dieser Messreihe ergab nach 15 Minuten einen signifikanten Anstieg der BK_{Ca}-Öffnungswahrscheinlichkeit, die über 30 Minuten nachweisbar war. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist in Abbildung 10 dargestellt.

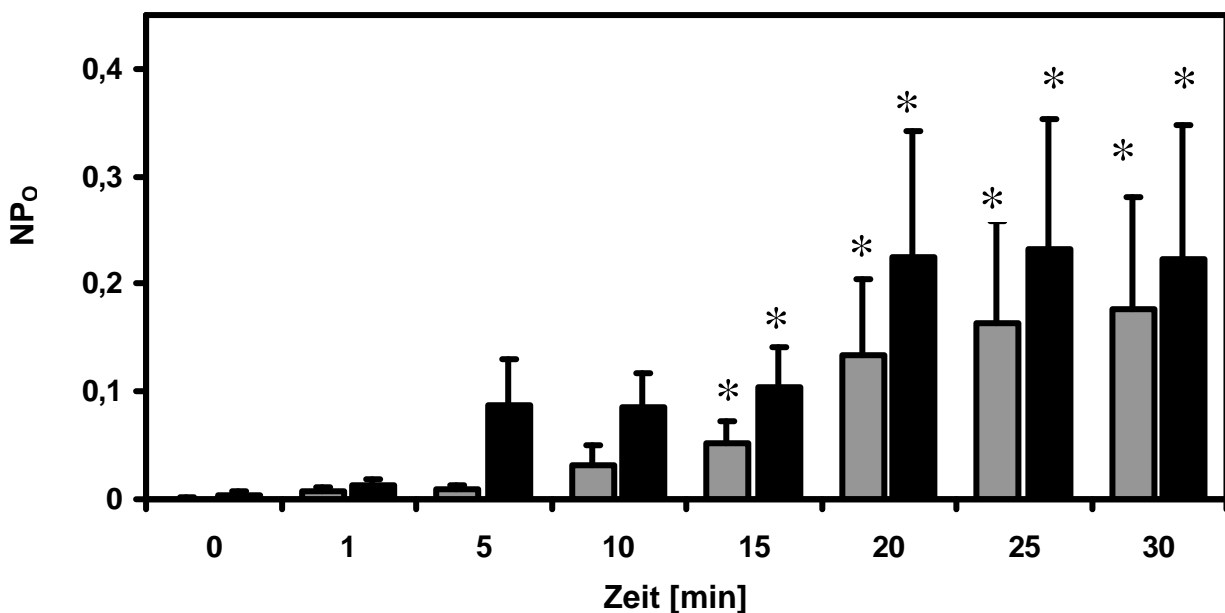


Abbildung 10: Öffnungswahrscheinlichkeit (NPo) des BK_{Ca} unter Perfusion mit LPC (20 µmol/l). Registrierung bei einem Pipettenpotential von +80 mV (grau) und +100 mV (schwarz). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM n=20; *p<0,05 vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

3.1.4 IBX-Blockade der oxLDL-/LPC-induzierten Kanalaktivierung

Um zu belegen, dass es sich bei dem unter oxLDL bzw. LPC Perfusion gemessenen Ionenkanal tatsächlich um den BK_{Ca} handelt, wurden zusätzliche Messungen durchgeführt bei denen der Patchpipettenlösung 100 nmol/l IBX zugefügt wurden. Nachdem festgestellt wurde, dass sich in den jeweiligen „patches“ der BK_{Ca} befindet wurde wie in den regulären Experimenten die Perfusion mit oxLDL bzw. LPC gestartet. Da IBX nach kurzer Einwirkzeit den BK_{Ca} komplett blockiert, konnte bereits 5 Minuten nach Beginn der Perfusion keine Ionenkanalaktivität mehr festgestellt werden. Dieser Zustand blieb konstant über die gesamte Messzeit von 30 Minuten bestehen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der oxLDL und LPC bewirkten Ionenkanalaktivitätssteigerung tatsächlich um den BK_{Ca} handelt.

3.1.5 Einfluss von oxLDL auf den BK_{Ca} nach Vorinkubation mit JTX-20

Zur Überprüfung der Hypothese, dass an der Ionenkanalaktivierung durch oxLDL der endotheliale Oberflächenrezeptor LOX-1 beteiligt ist, wurden Messungen unter oxLDL-Perfusion nach Vorinkubation mit JTX-20 (dem spezifischen inhibierenden

Antikörper gegen LOX-1) durchgeführt. Der Antikörper wurde dabei auch der Perfusionslösung hinzugefügt, um ein Auswaschen des Antikörpers durch den Perfusionsstrahl sicher auszuschließen.

Eine Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} durch kontinuierliche Perfusion mit oxLDL blieb wie erwartet aus. Zur Verdeutlichung dieser Messergebnisse sind in Abbildung 11 die Ergebnisse aus den Patch-Clamp Experimenten mit JTX-20 Vorinkubation den Resultaten aus den Versuchen ohne JTX-20 Vorbehandlung gegenübergestellt.

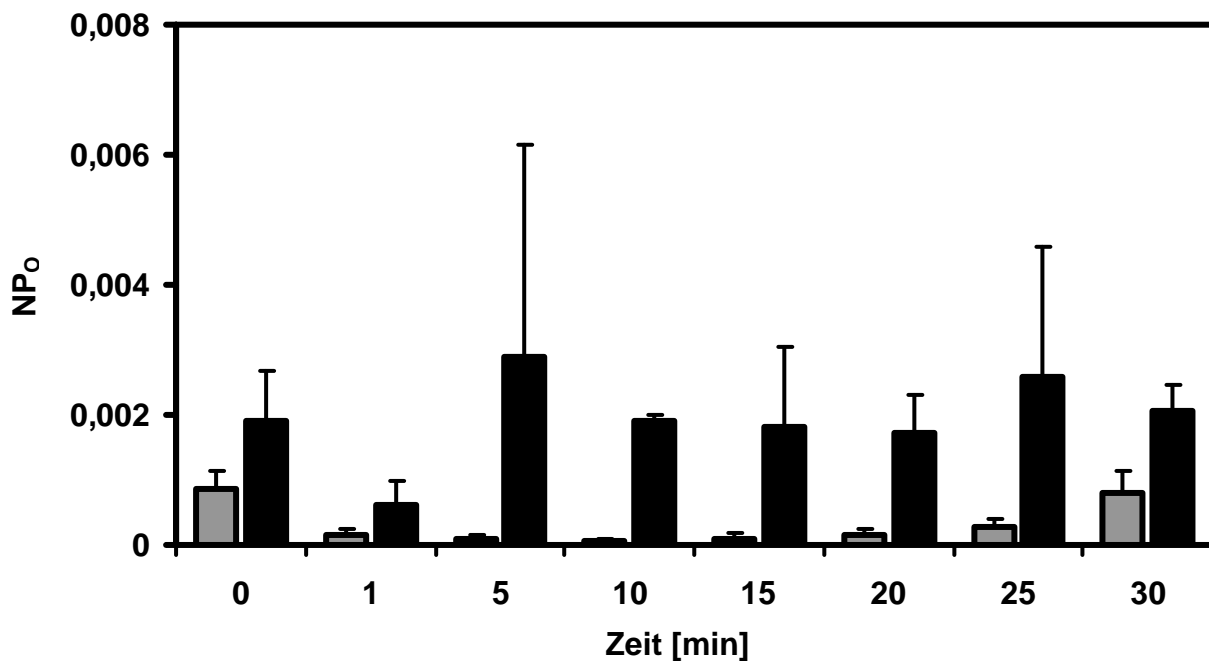


Abbildung 11: Blockade der oxLDL bedingten Aktivierung des BK_{Ca} durch JTX-20. Modulation der Öffnungswahrscheinlichkeit NPo (grau: 80mV; schwarz: 100 mV) durch oxLDL (10 µg/ml) nach Vorinkubation mit JTX-20 (10 µg/ml). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n=21; n.s. vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

3.1.6 Einfluss von LPC auf den BK_{Ca} nach Vorinkubation mit JTX- 20

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des BK_{Ca} durch oxLDL über den Rezeptor LOX-1 reguliert wird (siehe 3.1.5) stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus auch für die Wirkung von LPC auf den BK_{Ca} verantwortlich ist.

Tatsächlich zeigten sich bei diesen Patch-Clamp Messungen, die nach dem gleichen Prinzip durchgeführt wurden wie die Messungen mit oxLDL und Vorinkubation mit JTX-20, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} durch Perfusion mit LPC ausbleibt. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 12 grafisch dargestellt.

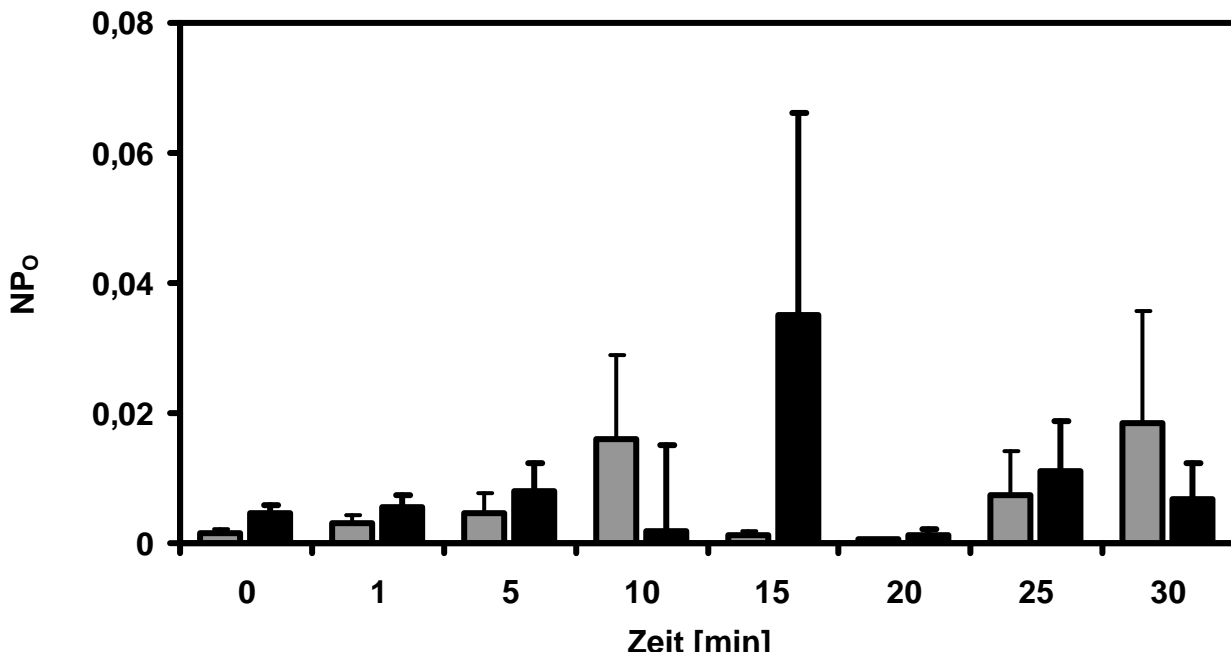


Abbildung 12: Blockade der LPC-induzierten Kanalaktivierung durch JTX-20. Modulation der Öffnungswahrscheinlichkeit NP_o (grau: 80 mV; schwarz 100 mV) durch LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) nach Vorinkubation mit JTX-20 (10 $\mu\text{g/ml}$). Die Daten repräsentieren Mittelwerten \pm SEM; $n=20$; n.s. vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

Diese Ergebnisse belegen, dass der endotheliale Rezeptor LOX-1 ein wichtiger Bestandteil des Signalweges ist, der zur Aktivierung des BK_{Ca} durch oxLDL und LPC führt.

3.1.7 Einfluss von Acetylcholin auf den endothelialen BK_{Ca}

Sakai zeigte bereits an Endothelzellen aus der Kaninchenaorta, dass der endotheliale BK_{Ca} durch Acetylcholin aktiviert wird [77]. Diese Messreihe soll lediglich untermauern, dass diese Beobachtung auch auf humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene übertragbar ist.

So konnte in den Patch-Clamp Untersuchungen wie erwartet bei einem Pipettenpotential von +100 mV bereits ab 10 Minuten kontinuierlicher Perfusion mit einer 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin-Perfusionslösung ein im Vergleich zur nicht perfundierten Kontrollmessung signifikanter Anstieg der Aktivität des BK_{Ca} registriert werden, der bis zur 30. Minute anhielt. Diese Messreihe ist in Abbildung 13 noch einmal im Zeitverlauf graphisch dargestellt.

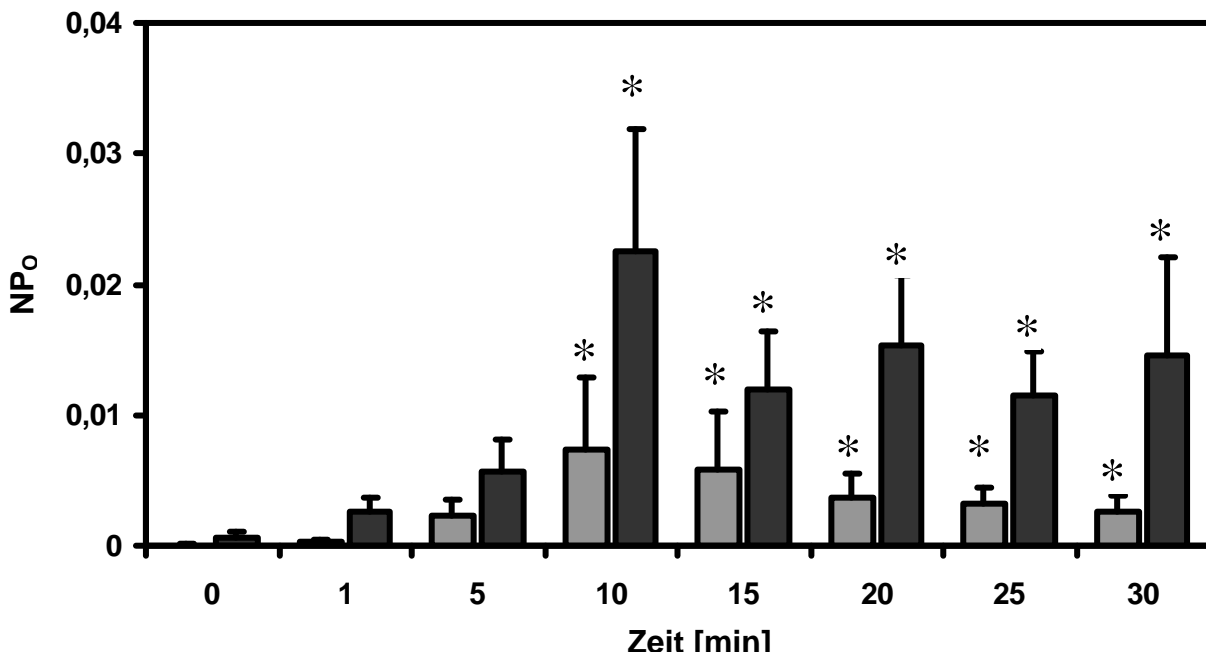


Abbildung 13: Einfluss von 1 µmol/l Acetylcholin auf die Aktivität des BK_{Ca}. Messung bei einem Pipettenpotential von +80 mV (grau) und + 100 mV (schwarz). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n=25; *p<0.05 vs. Kontrolle (Zeitpunkt 0 Minuten).

3.2 Einfluss von oxLDL/LPC auf die zelluläre Ca²⁺-Homöostase

Da die Aktivierung des BK_{Ca} in der Regel mit einer Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran einhergeht, ist die Möglichkeit für einen Ca²⁺-Influx in Form eines kapazitiven Einstroms von extrazellulären Ca²⁺ gegeben. Um die Beeinflussung der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase durch LPC und oxLDL zu erfassen, wurden intrazelluläre Calcium Messungen mit der Methode des FURA-2 Imaging vorgenommen.

Unter Gabe von 20 µmol/l LPC und 10 µg/ml oxLDL konnte ein schneller Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ 1 Minute nach Zugabe beobachtet werden. Diesem steilen Anstieg folgt ein zweiter flacherer Anstieg, der in ein Plateau übergeht. Der initiale Effekt auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ließ sich durch Vorinkubation der HUVEC mit 100 nmol/l IBX signifikant reduzieren. Die Daten sind in den Abbildungen 14 für oxLDL und in Abbildung 15 für LPC zusammengefasst.

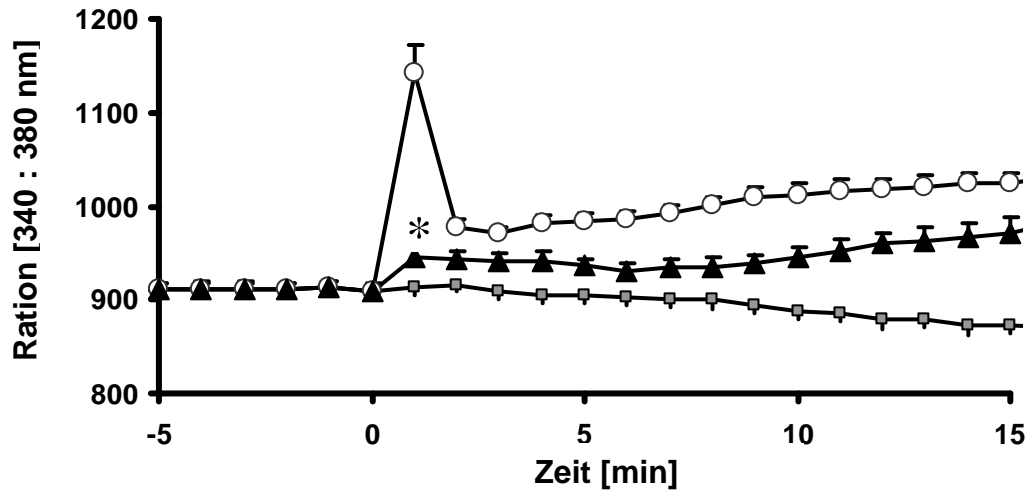


Abbildung 14: Einfluss von oxLDL auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration.

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$ oxLDL vs. oxLDL+IBX) dargestellt: Kontrolle (graue Quadrate) $n=75$; 10 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL (weiße Kreise) $n=74$; 10 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL + 100 nmol/l IBX (schwarze Dreiecke) $n=40$. Die Gabe von oxLDL erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Vorinkubation mit IBX wurde 5 Minuten vor Zugabe von oxLDL begonnen.

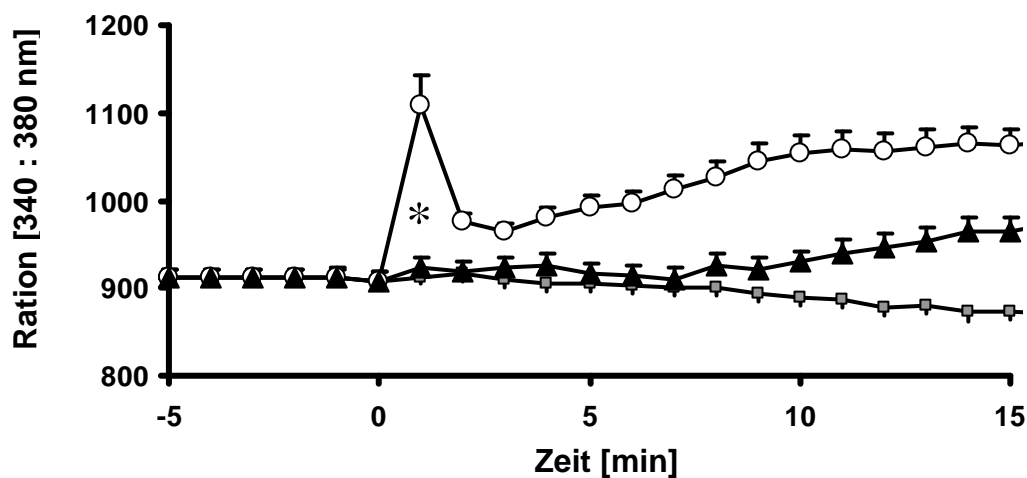


Abbildung 15: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch LPC.

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$ LPC vs. LPC+IBX): Kontrolle (graue Quadrate) $n=75$; 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC (weiße Kreise) $n=35$; 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC + 100 nmol/l IBX (schwarze Dreiecke) $n=39$ dargestellt. Die Gabe von LPC erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Vorinkubation mit IBX wurde 5 Minuten vor Zugabe von oxLDL begonnen.

3.3 Proliferation

Um die Beeinflussung des proliferativen Verhaltens der HUVEC durch LPC und oxLDL zu untersuchen, wurden zwei Verfahren angewendet: In einer quantitativen Zellzählung mittels Neubauerkammer sowie auf DNA-Ebene die Inkorporation von [³H]-Thymidin.

3.3.1 Zellzählung

Die Zellzählung wurde wie im Methodenteil ausführlich beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 3 ein signifikanter Anstieg der Zellzahl sowohl bei Stimulation mit LPC (20 µmol/l) als auch bei Stimulation mit oxLDL (10 µg/ml). Die Zellzahl nahm bei Stimulation mit LPC um 140 % und nach Zugabe von oxLDL um 131 % zu. Um einen möglichen Einfluss des Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanals auf diesen Effekt nachzuweisen, wurde gleichzeitig je eine Gruppe mit LPC bzw. oxLDL und IBX (100 nmol/l) stimuliert. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der durch LPC und oxLDL induzierten Zunahme der Zellzahl. Die alleinige Stimulation mit IBX zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied, so dass ein zytotoxischer Effekt von IBX ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

3.3.2 Thymidin-Uptake

Bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens mit Hilfe der [³H]-Thymidininkorporation zeigten sich tendenziell ähnliche Resultate wie bei der Zellzählung. Analog zu den Beobachtungen in der quantitativen Zellzählung konnte gezeigt werden, dass sowohl die mit LPC (20 µmol/l) als auch die mit oxLDL (10 µg/ml) stimulierte Gruppe signifikant mehr [³H]-Thymidin eingebaut hatte als die nicht stimulierte Kontrollgruppe. Dieser Effekt ließ sich analog zur Zellzählung bei gleichzeitiger Stimulation mit oxLDL/LPC und IBX (100 nmol/l) reduzieren. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, sind in Abbildung 17 die Ergebnisse in Prozent dargestellt, wobei die Kontrollgruppe als 100 % festgesetzt wird.

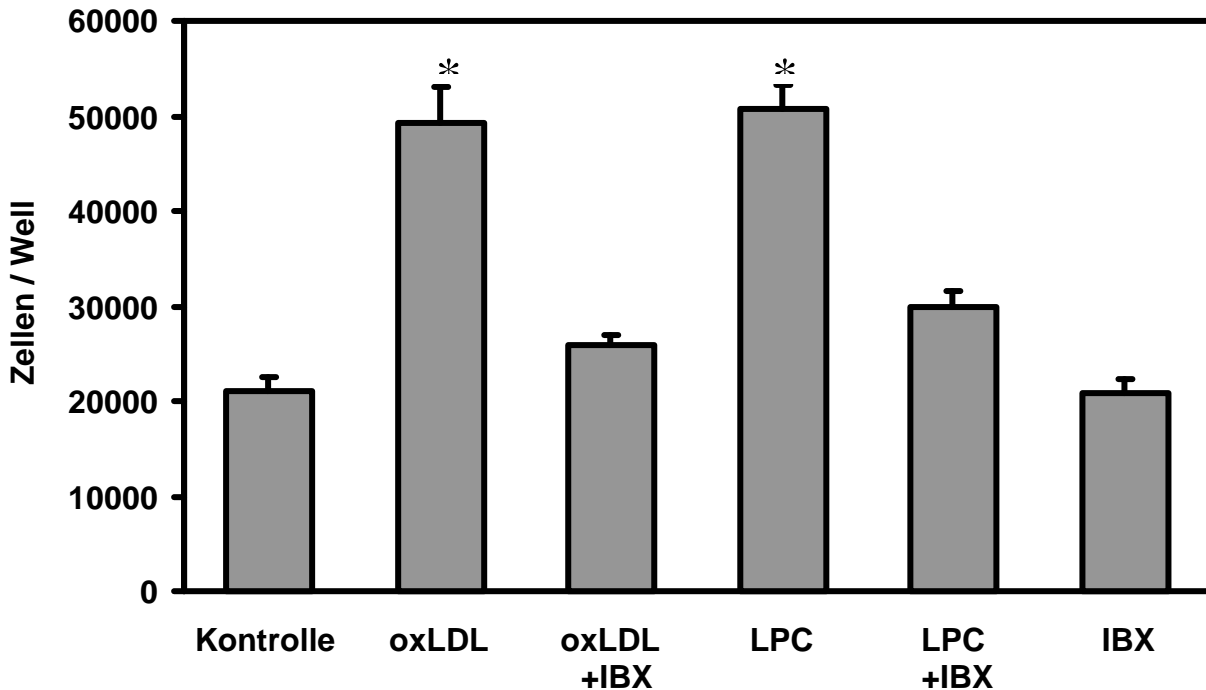


Abbildung 16: Bedeutung des BK_{Ca} für die oxLDL-/LPC-induzierte endotheliale Proliferation. Messung der Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch LPC (20 µmol/l), oxLDL (10 µg/ml) und IBX (100 nmol/l) mittels Zellzählung in der Neubauerkammer an Tag 3. n=12; *p<0.01 vs. Kontrolle. Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

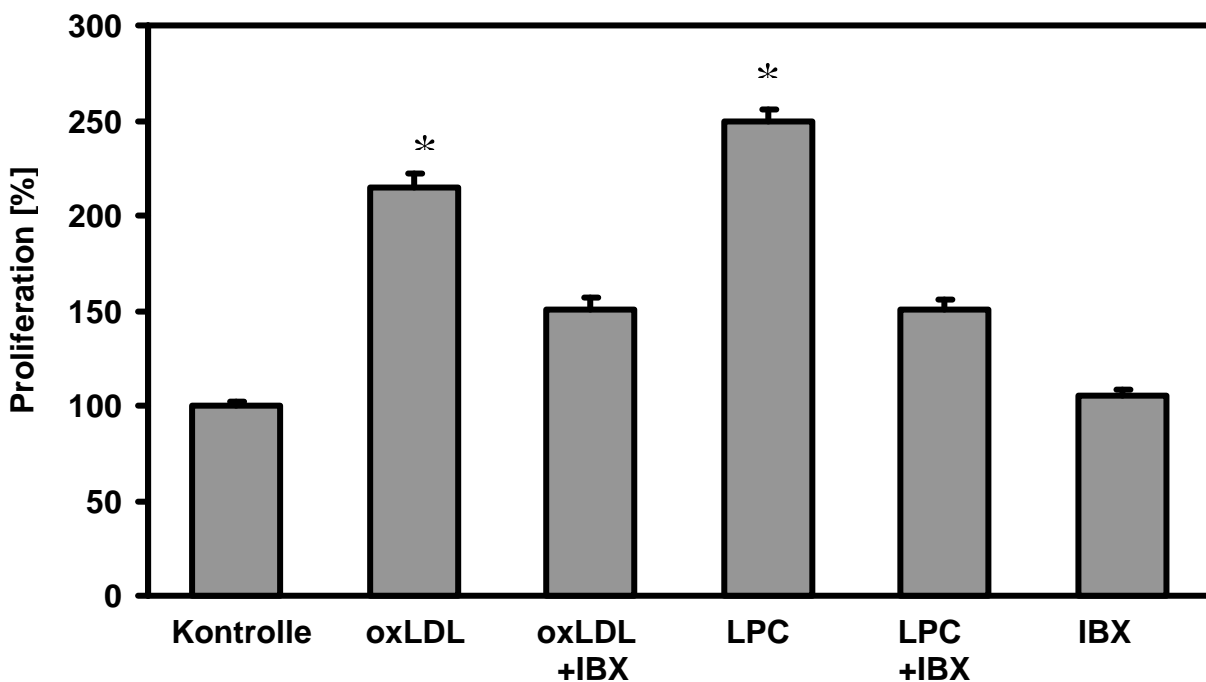


Abbildung 17: Rolle des BK_{Ca} bei der oxLDL-/LPC-induzierten Proliferation von HUVEC. Bestimmung der Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch oxLDL (10 µg/ml), LPC (20 µmol/l) und IBX (100 nmol/l) mittels Thymidin-Uptake n=12; *p<0.01 vs. Kontrolle. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

3.4 NO-Messung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen der Acetylcholin-induzierten NO-Produktion von HUVEC über Bestimmung des second messenger Moleküls cGMP mittels [³H]-cGMP-RIA dargestellt.

Die Gruppe der nur mit L-Arginin (Arg; 1mmol/l) stimulierten Zellen stellt die basale Bildung von NO dar. Als Kontrollgruppe, auf die alle weiteren Messungen bezogen sind, wurde neben Arg als Substrat der NO-Synthase (NOS) Acetylcholin (Ach; 1 µmol/l) zugesetzt.

Ach bewirkte eine signifikante Steigerung der cGMP-Spiegel auf 811 ± 153.7 fmol/well, die durch IBX (100 nmol/l) auf 168 ± 11.83 fmol/l signifikant gesenkt wurde. Die Kombination von Ach mit oxLDL (10 µg/ml) und LPC (20 µmol/l) erbrachte ebenfalls eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion der cGMP-Spiegel auf einen Wert von 221 ± 49.88 fmol/l (oxLDL) und 100 ± 19.17 fmol/well (LPC). Der BK_{Ca} scheint an dieser Reduktion der cGMP-Spiegel durch oxLDL und LPC jedoch keinen Anteil zu haben, da eine gleichzeitige Inkubation mit IBX und oxLDL/LPC keine signifikanten Unterschiede erbrachte. Diese Resultate sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

Die Arbeitsgruppe um Cominacini konnte zeigen, dass die Menge an intrazellulärem NO durch oxLDL dadurch reduziert wird, dass über die NAD(P)H-oxidase Radikale produziert werden [10]. Aus diesem Grunde wurden in weiteren Experimenten HUVEC mit Anti- und Non-senseoligonucleotiden gegen die NAD(P)H-oxidase transfiziert, um den Einfluss von oxLDL und LPC auf die Acetylcholin-induzierte NO-Synthese ohne Beteiligung der NAD(P)H-oxidase zu untersuchen.

Der Transfektionserfolg wurde dabei auf funktioneller Ebene belegt. Dabei wurden durch Dr. Matthias Schäfer aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig Universität Giessen intrazelluläre Messungen der Produktion freier Radikale mit einem DCF-Fluoreszenz-Imaging durchgeführt. Die Resultate dieser Kontrolluntersuchung sind in Abbildung 19 dargestellt.

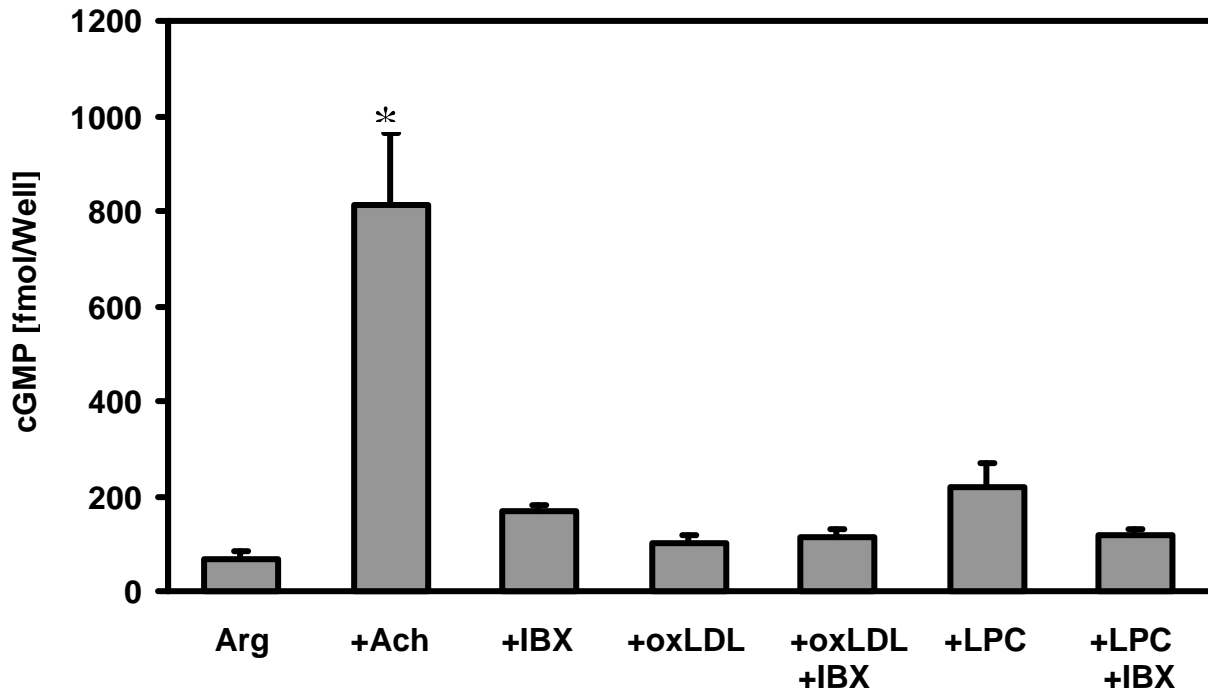


Abbildung 18: Einfluss von oxLDL/LPC auf die BK_{Ca} -abhängige Ach-stimmulierte NO-Synthese in HUVEC.

Messung intrazellulärer cGMP-Spiegel nach Stimulation mit Ach (1 $\mu\text{mol/l}$), IBX (100 nmol/l), oxLDL (10 $\mu\text{g/ml}$) und LPC (20 $\mu\text{mol/l}$), sowie der basalen NO-Produktion durch alleinige Gabe des NOS-Substrates Arg (1 mmol/l). Alle Resultate sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt $n=10$; * $p<0.01$.

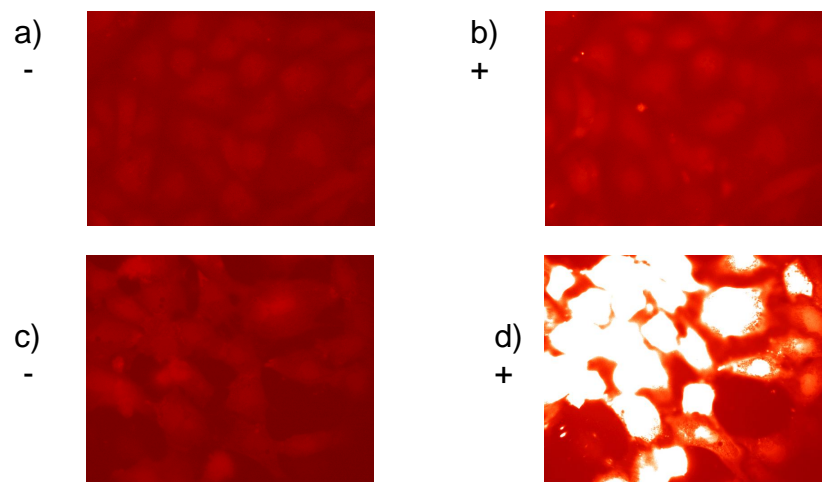


Abbildung 19: Einfluss von Antisense- und Nonsense-oligonucleotiden gegen die NAD(P)H-oxidase auf die Produktion von Radikalen in HUVEC.

Die Bilder in a) und b) zeigen Antisense- in c) und d) Nonsense-transfizierte Zellen ohne (linke Spalte -) und mit (rechte Spalte +) Radikalbildung auslösenden Stimulus.

Die oben gezeigten mikroskopischen Bilder belegen, dass die Transfektionsstrategie erfolgreich war, da die Radikalbildung durch Transfektion mit

Antisenseoligonucleotiden verhindert werden konnte. Als „Gegenkontrolle“ wurden HUVEC mit Nonsenseoligonucleotiden transfiziert, die chemisch identisch mit Antisenseoligonucleotiden sind, jedoch ist die Reihenfolge vom 5'- zum 3'-Ende vertauscht. Die Nonsense-transfizierten Zellen zeigen bei Stimulation eine starke Radikalbildung, die in den obigen Bildern durch einen Fluoreszenzanstieg zu sehen ist.

Nachdem sichergestellt war, dass das Transfektionsprotokoll erfolgreich ist wurden cGMP-Messungen an transfizierten HUVEC vorgenommen unter den gleichen Bedingungen wie bei den nicht transfizierten Zellen.

Die Stimulation mit Acetylcholin führte in den transfizierten Zellen zu analogen Ergebnissen (antisense: 821 ± 51.7 fmol cGMP/well; nonsense 807 ± 52.03 fmol cGMP/well) wie in nicht transfizierten HUVEC. Bei oxLDL und LPC führte die Ausschaltung der NAD(P)H-oxidase durch Antisenseoligonucleotide dazu, dass die cGMP-Spiegel noch über die mit Acetylcholin erzielten Werte anstiegen. Bei Antisensetransfektion lagen die Ergebnisse bei 1266 ± 41.66 fmol cGMP/well für oxLDL und bei 1254 ± 58.97 fmol cGMP/well für LPC. Diese Effekte ließen sich jeweils durch gleichzeitige Stimulation mit IBX signifikant reduzieren. Die Nonsensetransfektion erbrachte auf die Wirkung von oxLDL und LPC keinen Unterschied in den cGMP-Konzentrationen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen. Die Ergebnisse aus den cGMP-RIA mit transfizierten Zellen sind in Abbildung 20 und 21 zusammengestellt.

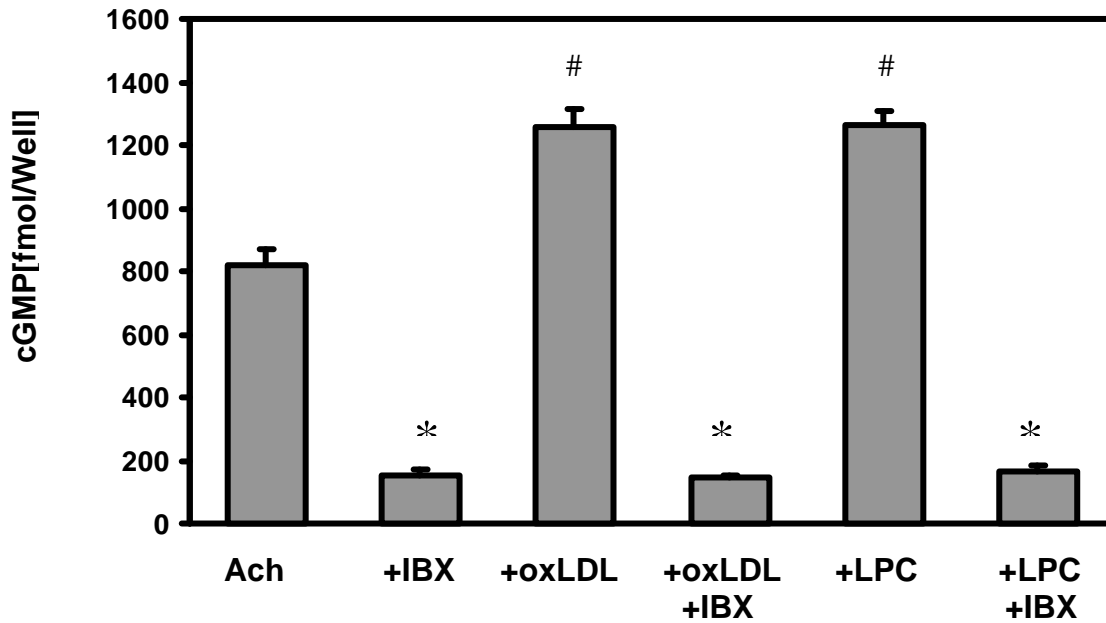


Abbildung 20: Messung der cGMP-Spiegel an Antisense-transfizierten HUVEC. Einfluss von oxLDL (10 µg/ml), LPC (20 µmol/l) und IBX (100 nmol/l) auf Ach-induzierte [cGMP] unter Ausschaltung der NAD(P)H-oxidase mit antisense Oligonucleotiden. Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM; n=10; *p<0.01 vs. ohne IBX; #p<0.01 vs. Ach.

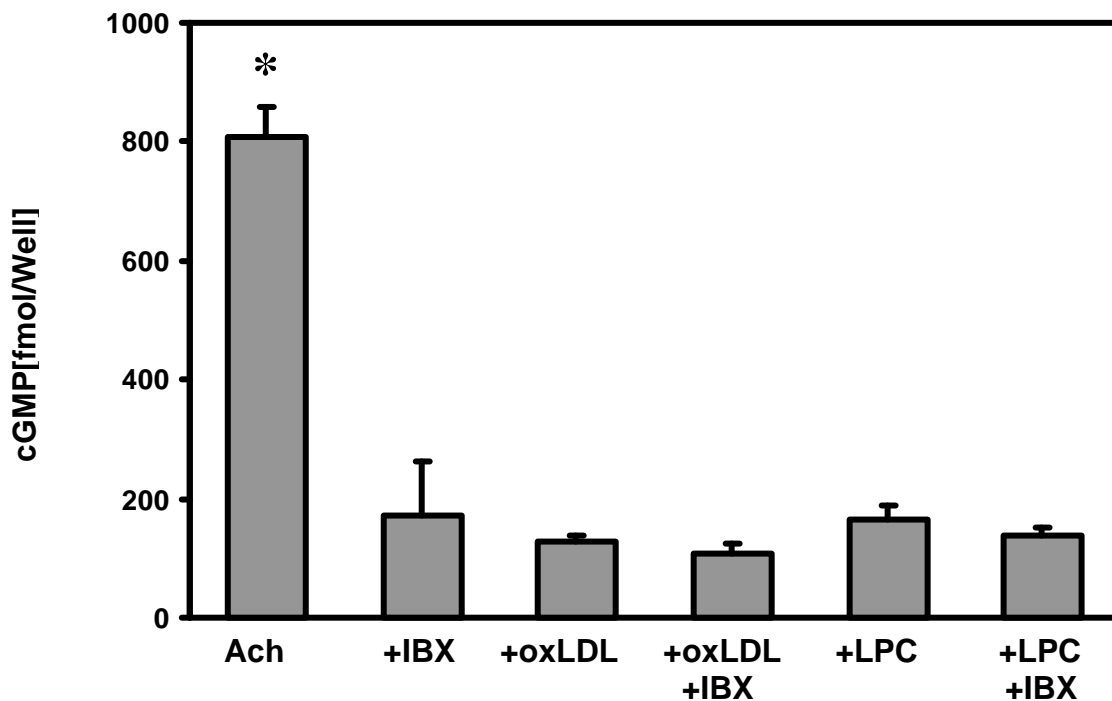


Abbildung 21: Messung der cGMP-Spiegel an Nonsense-transfizierten HUVEC. Einfluss von oxLDL (10 µg/ml), LPC (20 µmol/l) und IBX (100 nmol/l) auf die Ach-induzierte [cGMP] in nonsense transfizierten HUVEC. Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM; n=10; *p<0.01.

Die Ergebnisse aus den Experimenten an transfizierten HUVEC unterstreichen nochmals die regulatorische Bedeutung des BK_{Ca} für die NO-Synthese.

4. Diskussion

In 4.1 sollen zunächst kurz die Ergebnisse der Ionenkanalidentifikation diskutiert werden. Der folgende Abschnitt 4.2 erläutert die Beeinflussung des Kanals durch die atherogenen Lipide oxLDL und LPC und den daraus resultierenden Folgen für die endotheliale Proliferation und NO-Synthese. Dabei sollen die gewonnenen Erkenntnisse vor dem dazugehörigen klinischen Hintergrund betrachtet werden.

4.1 Identifikation des BK_{Ca} in HUVEC

Die Ergebnisse aus den Patch-Clamp Experimenten zeigen eindeutig, dass es sich bei dem in den kultivierten HUVEC gemessenen Ionenkanal um einen Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanal mit großer Leitfähigkeit handelt. Die aus den Kontrollmessungen bestimmte Leitfähigkeit des untersuchten Ionenkanals beträgt 170 ± 2.1 pS, bei Registrierung der Ionenkanalaktivität in der „cell-attached“ Konfiguration mit einer symmetrischen K⁺-Konzentration von 140 mmol/l in Bad- und Pipettenlösung. In der Literatur wird für die Leitfähigkeit des BK_{Ca} ein Bereich von 100-250 pS angegeben, so dass auch die Bestimmung der Leitfähigkeit den gemessenen Ionenkanal als BK_{Ca} kennzeichnet [28,60,62].

Als weiteres Charakteristikum des BK_{Ca} dient der Nachweis der Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals. Diese ist anhand einer Originalregistrierung, die in Abbildung 6 zu sehen ist, sehr gut zu erkennen. Nicht nur die Häufigkeit der Kanalöffnung und deren Dauer steigen mit zunehmendem Pipettenpotential an, sondern auch die Amplitude des Kanals nimmt an Größe zu. Dieses Phänomen wird für den BK_{Ca} durch Methfessel et al. beschrieben [52].

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Calciumabhängigkeit des Ionenkanals in der „inside-out“ Konfiguration demonstrieren die Zunahme der Aktivität mit ansteigender Ca²⁺ Konzentration in der Perfusionslösung. Dieses Verhalten des registrierten Ionenkanals entspricht ebenfalls den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des BK_{Ca} [37,49,52]. Die Tatsache, dass der Ionenkanal durch ansteigende Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert wird kennzeichnet den Ionenkanal zusätzlich als BK_{Ca} [73]. Komplettiert wird die Ionenkanalcharakterisierung durch die Iberiotoxin-Messungen. Das Skorpiongift Iberiotoxin ist in der Literatur von diversen Autoren als ein

hochspezifischer Blocker des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanals mit großer Leitfähigkeit beschrieben worden [7,19,21,25]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen in der „outside-out“ Konfiguration mit der 100 nmol/l Iberiotoxin enthaltenden Perfusionslösung zeigen das typische Bild einer kompletten Blockade des Kanals im Vergleich zu „normaler“ Aktivität in der Kontrollmessung ohne Perfusion.

Die hier erläuterten Ergebnisse aus den Experimenten zur Ionenkanalidentifikation zeigen eindeutig, dass es sich bei dem untersuchten Kanal um den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit handelt.

4.2 Modulation des BK_{Ca} durch oxLDL/LPC und der daraus resultierende Einfluss auf endotheliale Funktionen

Die Perfusion der Zellmembran von HUVEC mit dem atherogenen Lipid oxLDL bzw. einem Hauptbestandteil LPC führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} . Der exakte Mechanismus, der dieser Aktivierung zugrunde liegt, ist noch unbekannt. Eine direkte Wirkung der Substanzen an der Außenseite des Ionenkanalproteins ist unwahrscheinlich, da diese durch das Glas der Patchpipette in „cell-attached“ Konfiguration vor der von extrazellulär durchgeführten Perfusion mit LPC bzw. oxLDL abgeschirmt ist. Die Stoffe müssen also entweder von der Endothelzelle aufgenommen werden, oder von außen einen intrazellulären Signalweg anstoßen können, bevor die Aktivität des Ionenkanals beeinflusst werden kann. Der Weg, auf dem oxLDL in die Zelle kommt bzw. intrazelluläre Signalwege beeinflusst, ist weitestgehend aufgeklärt. Die Arbeitsgruppe von Sawamura identifizierte 1997 einen Rezeptor für oxLDL (LOX-1), der von Endothelzellen auf der Oberfläche exprimiert wird [35,51,79]. Ein neutralisierender Antikörper gegen diesen Rezeptor (JTX-20) konnte ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe entwickelt werden. Für LPC ist ein solches Rezeptormolekül jedoch nicht bekannt. Stoll et al. konnten jedoch nachweisen, dass LPC von Endothelzellen aufgenommen wird, ohne jedoch einen exakten Mechanismus aufzeigen zu können [87]. Aoyama et al. haben beschrieben, dass der Rezeptor für oxLDL nicht nur durch die Inkubation von Endothelzellen mit oxLDL, sondern auch durch Inkubation mit LPC vermehrt exprimiert wird [2]. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass LPC ebenfalls den Rezeptor LOX-1 an der Endothelzelle nutzen könnte. Im

Folgenden wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den BK_{Ca} unter Perfusion mit den beiden atherogenen Lipiden zu registrieren und gleichzeitig den Rezeptor LOX-1 zu blockieren. Eine Vorinkubation der Zellen für 2 Stunden mit dem anti-LOX-1 Antikörper JTX-20 -der von Prof. Sawamura zur Verfügung gestellt wurde- reichte aus, um den Rezeptor komplett zu blockieren. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Patch-Clamp Messungen unter Perfusion mit oxLDL an JTX-20 vorinkubierten HUVEC gezeigt werden, da die unter alleiniger Perfusion mit oxLDL registrierte signifikante Steigerung der Ionenkanalaktivität ausblieb. Das auf diese Weise geprüfte Patch-Clamp Setup wurde anschließend mit LPC-Perfusion durchgeführt. Eine signifikante Aktivierung des BK_{Ca} , wie sie unter Einwirkung von LPC alleine festgestellt wurde, blieb wiederum aus. Eine Wirkung von LPC auf Endothelzellen über den Rezeptor LOX-1 ist aufgrund dieser Beobachtungen als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Rezeptor-Bindungsuntersuchungen, die eine direkte Bindung des LPC Moleküls an den LOX-1 Rezeptor hätten nachweisen können, stehen noch aus.

Verschiedentlich wurde die Wirkung von oxLDL und LPC auf die intrazelluläre Ca^{2+} Homöostase bereits untersucht [31,38,41,53,88,96]. Die Ergebnisse waren jedoch zum Teil widersprüchlich: Miwa et al. und Kugiyama et al. beschreiben eine Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} unter dem Einfluss von LPC, wohingegen Su et al., Leung et al. und Inoue et al. einen LPC induzierten Ca^{2+} -Anstieg feststellten. Für oxLDL kommen Zhao et al. zu dem Resultat, dass es unter der Wirkung von oxLDL zu einer Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} kommt. Aus diesem Grunde wurden eigene Ca^{2+} Messungen mit Hilfe des Fura-2-Imaging durchgeführt, um verlässliche Aussagen über den Einfluss von oxLDL und LPC auf die endotheliale Ca^{2+} -Homöostase in den hier verwendeten HUVEC treffen zu können. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit dem Ca^{2+} anfärbenden Farbstoff Fura-2 AM beladen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine Zugabe von oxLDL bzw. LPC resultierte jeweils in einem biphasischen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} . Der frühe steile Anstieg des Calciums entspricht vermutlich einer Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Bei dem flacheren späten Anstieg handelt es sich wahrscheinlich um einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} . Der Ursprung dieses biphasischen intrazellulären Ca^{2+} Anstiegs wurde nicht genauer untersucht. In der Arbeit von Schäfer et al. wurden ebenfalls Ca^{2+} Messungen an Endothelzellen durchgeführt [80]. Dabei wurden biphasische Erhöhungen des intrazellulären Ca^{2+} festgestellt, die

in ihrem Muster und Verlauf mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Verläufen übereinstimmen. Darüber hinaus identifizierte Schäfer in seinen Experimenten die Quellen, aus denen die intrazelluläre Ca^{2+} Steigerung bewirkt wurde [80]. Er kam zu dem Ergebnis, dass der frühe steile Ca^{2+} Peak auf einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und der späte flache Ca^{2+} Anstieg auf einem Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} beruht.

Aufgrund der bisher gezeigten Ergebnisse kann die folgende Hypothese zur Aktivierung des BK_{Ca} durch oxLDL bzw. LPC formuliert werden:

OxLDL und LPC bewirken eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, die eine vermehrte Öffnung des BK_{Ca} bewirkt. Diese Ionenkanalaktivierung verursacht eine Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran, was einen vermehrten transmembranären Ca^{2+} -Einstrom zur Folge hat, der wiederum eine Steigerung der BK_{Ca} -Aktivität verursacht.

Dieser sich selbst unterhaltende Kreislauf ist in Abbildung 22 dargestellt.

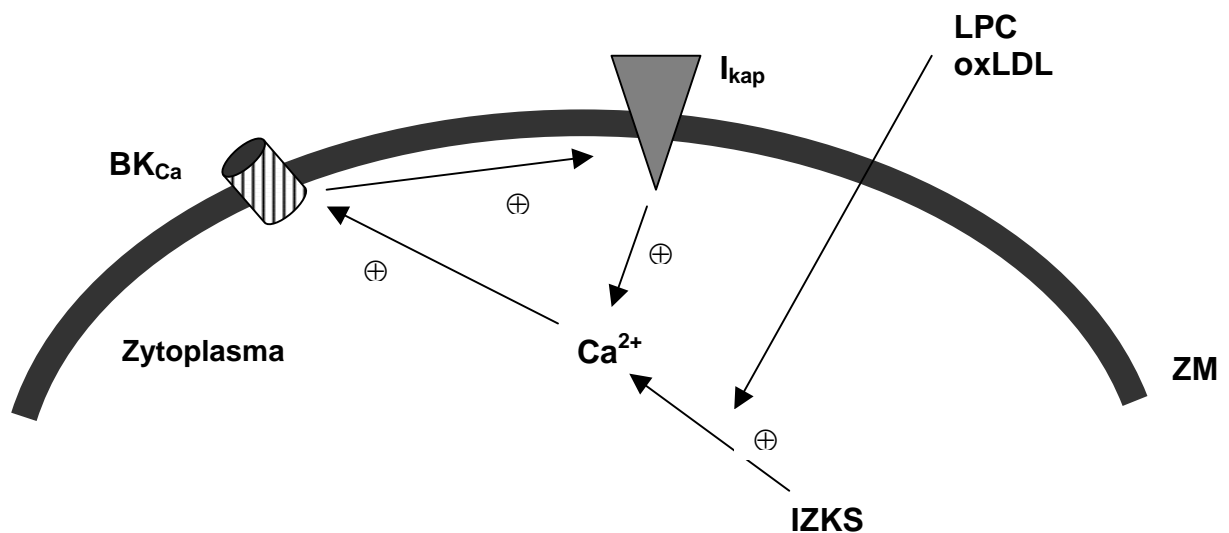


Abbildung 22 : Rolle von Ca^{2+} bei der Aktivierung des BK_{Ca} in HUVEC.

Intrazelluläre Ca^{2+} Speicher (IZKS), kapazitiver Kalziueinstrom (I_{kap}), Zellmembran (ZM).

Diese erstmalig aufgestellte Hypothese lässt sich wie folgt begründen: In den FURA-2 Fluoreszenz Messungen konnte gezeigt werden, dass LPC und oxLDL in den Endothelzellen eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium aus den Speicherorganellen (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat, usw.) bewirkt. Diese Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels aktiviert den BK_{Ca} durch die intrazelluläre Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die intrazellulären Anteile des

Ionenkanalproteins („calcium bowl“), wodurch der Kanal aktiviert wird [83]. Nach Nilius et al. hat eine solche 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 [59,60]. Dieser Ca^{2+} Influx entspricht der hier gemessenen späten flach ansteigenden Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} . Dieser Einstrom von extrazellulärem Calcium führt wiederum dazu, dass der Kanal weiterhin vermehrt aktiviert wird, da ständig neues Ca^{2+} in die Zelle gelangt.

Eine Vorinkubation der Zellen mit dem hochspezifischen BK_{Ca} -Inhibitor IBX führte dazu, dass der frühe Ca^{2+} -Peak blockiert wurde und der späte Anstieg reduziert wurde. Das Wegfallen des ersten steilen Anstiegs beruht vermutlich darauf, dass es durch die IBX Blockade in der Vorinkubationsphase zu einer relativen Depolarisation der Zellmembran kommt. Messungen des endothelialen Membranpotentials, die diesen IBX-Effekt nachweisen würden, stehen noch aus. Diese relative Depolarisation durch IBX könnte dadurch entstehen, dass der BK_{Ca} als Gegenspieler für depolarisierende Chlorid Kanäle wegfällt und es somit zu einer Verschiebung des elektrischen Gleichgewichts der Zellmembran kommt [60]. Daraus ergibt sich der Schluss, dass die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ebenfalls indirekt an den BK_{Ca} gekoppelt ist. Der späte Ca^{2+} -Anstieg ist direkt an die Aktivierung des Ionenkanals gekoppelt, da er durch die Hyperpolarisation der Zellmembran bedingt ist, welche bei Blockade des BK_{Ca} vermindert ist. Der Zusammenhang zwischen Hyperpolarisation der Zellmembran durch die Aktivierung von K^+ -Kanälen und den Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels wurde bereits von Lückhoff et al. beschrieben [44,45,59,60]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten aus den FURA-2 Messungen sind gut mit den Ergebnissen von Lückhoff zu vereinbaren. Die Hypothese, dass die Aktivierung des BK_{Ca} durch LPC bzw. oxLDL über einen intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} bewirkt wird, ist folglich als sehr wahrscheinlich anzunehmen.

Neben den Wirkungsmechanismen von oxLDL und LPC direkt am BK_{Ca} sollten im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit auch endotheliale Zellfunktionen untersucht werden, die von der Aktivität des BK_{Ca} beeinflusst werden bzw. von denen vermutet wird, dass sie durch den BK_{Ca} moduliert werden. Dabei wurden das endotheliale Proliferationsverhalten und die Acetylcholin-induzierte Produktion von NO untersucht. Die Tatsache, dass der BK_{Ca} Einfluss auf das Proliferationsverhalten hat, ist bereits

in anderen Arbeiten beschrieben worden [59-62,94]. Für oxidiertes LDL und für LPC sind ebenfalls Proliferationsstudien durchgeführt worden mit z.T. widersprüchlichen Ergebnissen. Rikitake et al. kamen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass die endotheliale Proliferation durch LPC gehemmt wird [69]. Heinloth et al. fanden jedoch in ihren Experimenten heraus, dass die Proliferation von Endothelzellen durch LPC stimuliert wird [26]. Für oxLDL liegt da ein einheitlicheres Bild in der Literatur vor. Im Bereich niedriger Konzentrationen kommt es unter dem Einfluss von oxLDL zu einer vermehrten Proliferation, in höheren Konzentrationen ist dieser Effekt rückläufig und in sehr hohen Konzentrationen wird sogar Apoptose induziert [8,18,26]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proliferationsstudien kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl mit oxLDL (10 µg/ml) als auch mit LPC (20 µmol/l) eine signifikante Steigerung des Proliferationsverhaltens induziert werden konnte. In den Proliferationsuntersuchungen mit oxLDL wurde eine Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, obwohl in der Literatur ein maximaler Effekt für eine Konzentration von 5 µg/ml beschrieben wurde [26]. Eine Konzentrationsreihe zeigte in unseren Experimenten jedoch einen maximalen Effekt von oxLDL auf die Proliferation bei einer Konzentration von 10 µg/ml. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die angewendeten Oxidationsverfahren zur Gewinnung von oxLDL aus nativem LDL variieren. In den durchgeführten Experimenten zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens sollte ein Einfluss des BK_{Ca} durch eine gleichzeitige Inkubation mit dem BK_{Ca}-Blocker IBX nachgewiesen werden. Tatsächlich konnte der durch oxLDL bzw. LPC erreichte Effekt durch IBX signifikant reduziert werden. Um einen möglichen zytotoxischen Effekt auszuschließen wurden HUVEC alleine mit IBX inkubiert. In dieser Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied, so dass eine Zytotoxizität durch IBX ausgeschlossen werden kann.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Proliferationsverhaltens mit Hilfe der quantitativen Zellzählung in der Neubauerkammer sowie auf DNA-Ebene mit der Messung der Thymidininkorporation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Proliferationsinduktion durch oxLDL und LPC von der Aktivität des BK_{Ca} beeinflusst wird. Heinloth et al. führten die Steigerung der endothelialen Proliferation durch oxLDL bzw. LPC auf eine vermehrte Bildung von Radikalen durch die NAD(P)H-Oxidase zurück [26]. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen BK_{Ca}-Aktivierung und NAD(P)H-Oxidase abhängiger Radikalfreisetzung besteht ist unbekannt.

Als weitere endotheliale Funktion wurde die Acetylcholin-induzierte Synthese von NO betrachtet. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass oxLDL und LPC eine verminderte Synthese von NO in Endothelzellen bewirkt. Dies wurde zunächst dadurch belegt, dass diese beiden atherogenen Lipide eine verminderte Antwort von Gefäßen bzw. Gefäßsegmenten auf vasorelaxierende Substanzen (z.B. Acetylcholin, Bradykinin) bewirkte [16,32,38,43,48,55,66,85,96]. Später wurde dieser Sachverhalt auch in der Zellkultur durch direkte Messung von NO bestätigt [9,15,53,56]. Trotz der Vielzahl der Publikationen wurde ein wichtiger Aspekt bis jetzt jedoch noch nicht beleuchtet: Besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit und der Verminderung der endothelialen NO Synthese? Hinweise darauf, dass die NO Produktion durch den BK_{Ca} beeinflusst werden kann, lassen sich in der Literatur finden [11,86]. In den hier gezeigten Experimenten konnte im cGMP-RIA nachgewiesen werden, dass die durch Acetylcholin vermittelte NO Synthese – indirekt über Bestimmung des second messengers cGMP – signifikant reduziert werden kann, wenn die Zellen gleichzeitig mit IBX inkubiert werden. Die Wirkung von Acetylcholin auf den BK_{Ca} ist an Endothelzellen von Kaninchen bereits gezeigt worden [77,93]. Der Nachweis, dass diese Tatsache auch für die hier verwendeten HUVEC zutrifft, ist durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Patch-Clamp Messungen unter Perfusion mit Acetylcholin erbracht worden. Auch an HUVEC zeigte sich in Übereinstimmung mit den Resultaten an Kaninchen Endothelzellen ein signifikanter Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} . Aus den eben beschriebenen Resultaten lässt sich folglich der Schluss ziehen, dass die durch Acetylcholin vermittelte Steigerung der NO Produktion durch eine Aktivierung des BK_{Ca} - und der damit verbundenen Membranhyperpolarisation, die einen Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} mit sich bringt- induziert wird, da eine Blockade dieses Kanals mit dem hochspezifischen Blocker IBX eine signifikante Reduktion der NO Synthese bewirkt [5,44,82]. Für die Bradykinin-induzierte NO Synthese ist ein ähnlicher Effekt über die Modulation des SK_{Ca} beschrieben worden [22].

Da sowohl LPC als auch oxLDL die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals ebenfalls steigern, wäre eine Steigerung der NO Produktion zu erwarten gewesen, auch wenn diese Tatsache zunächst widersprüchlich erscheint. Eine solche Erhöhung der endothelialen NO Synthese konnte in den hier durchgeführten Experimenten jedoch nicht nachgewiesen werden. Es kam vielmehr zu einer

signifikanten Reduktion der gemessenen NO Bildung, was aus den oben angeführten Publikationen zur Wirkung von oxLDL und LPC auf die Vasoregulation ja auch zu erwarten war. Der BK_{Ca} scheint also bei der Verminderung der NO Produktion in HUVEC durch oxLDL bzw. LPC keine Rolle zu spielen. Eine Aufklärung des Mechanismus, wie atherogene Lipide in den vaskulären NO Haushalt eingreifen, steht weiterhin aus. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Arbeit von Kikuta et al. in der gezeigt wird, dass sowohl oxLDL als auch LPC den Arginin Transport in die Endothelzellen hinein vermindert [34]. Aus der verminderten Arginin Aufnahme resultiert eine Substratverarmung der NO Synthase. Eine Reduktion des gebildeten NO ist daraus die logische Konsequenz. Als Erklärung für die von uns ermittelten Resultate kann man diese Arbeit jedoch nicht heranziehen, da die Inhibition der Arginin Aufnahme erst mit wesentlich höheren als die von uns verwendeten oxLDL und LPC Konzentrationen erreicht wurden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit liefert die Arbeit von Freeman et al. in welcher der Einfluss von LPC auf Pertussistoxin sensitive G-Proteine und deren Beteiligung an der endothelialen NO Produktion betrachtet wird [15]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Störung eines Pertussistoxin-sensitiven Signalwegs eine Reduktion der NO Synthese von Endothelzellen mit sich bringt, wobei LPC eine Entkopplung von G-Protein und Rezeptor bewirkt. Diese Erkenntnisse werden durch eine frühere Publikation von Flavahan et al. unterstützt [14]. Allerdings muss auch angemerkt werden, dass Freeman et al. zu dem Ergebnis kamen, dass LPC die endotheliale Produktion von Radikalen nicht steigert. Heinloth et al. weisen dagegen eindeutig nach, dass LPC die Freisetzung von Radikalen in Endothelzellen steigert [26]. Aufschlussreichere Erkenntnisse liefern die Arbeiten von Cominacini et al. Dort wurde festgestellt, dass die endotheliale NO-Synthese durch oxLDL keinesfalls vermindert wird, da die NOS unter dem Einfluss von oxLDL weiterhin unvermindert L-Arginin in L-Citrullin umsetzt. Allerdings kommt es zu einer Reduktion der intrazellulären NO-Konzentration, die zeitlich mit einer vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) vor allem Superoxid (O_2^-) zusammenfällt [9,10]. Cominacini et al. kommen zu dem Schluss, dass O_2^- mit NO eine chemische Reaktion eingeht, in der Peroxynitrit ($ONOO^-$) gebildet wird, was zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO führt. Zu ähnlichen Erkenntnissen kommen auch Ignarro und Ohara et al. [29,65]. Offen bleibt bei dieser Arbeit jedoch die exakte Lokalisierung der Quelle, von welcher die Radikale gebildet werden. Ausgeschlossen werden sowohl die Xanthinoxidase, und

die Cyclooxygenase, als auch die eNOS, die ebenfalls zur Bildung von Radikalen fähig ist. Für wahrscheinlich wird die Radikalproduktion durch die NAD(P)H-Oxidase gehalten [10]. Vor diesem Hintergrund wurden die Messungen der NO-Produktion an Oligonucleotid-transfizierten Zellen durchgeführt. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Ausschaltung der NAD(P)H-oxidase abhängigen Radikalbildung durch antisense Oligonucleotide gegen die p22phox-Untereinheit der NAD(P)H-oxidase sogar zu einer signifikanten Steigerung der gemessenen oxLDL-/LPC-induzierten cGMP-Spiegel führt. Dieser Effekt ließ sich durch die Zugabe von IBX komplett blockieren. Diese experimentellen Befunde bestätigen die Ergebnisse von Cominacini et al. insofern, dass die Radikalbildung durch die NAD(P)H-Oxidase als Ursache für eine intrazelluläre Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit angenommen werden kann. Außerdem wird die oben aufgestellte Hypothese, dass der BK_{Ca} an der Regulation der NO-Synthese direkt beteiligt ist, noch weiter bestärkt, da die durch oxLDL und LPC vermehrte cGMP-Bildung in antisense-transfizierten Endothelzellen vollkommen durch den hoch selektiven BK_{Ca} Blocker Iberiotoxin inhibiert wurde.

Unter klinischen Aspekten lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen folgenden Schlüsse zum Krankheitsgeschehen der Arteriosklerose ziehen. OxLDL und LPC bewirken auf zellulärer Ebene eine Reduktion der durch Acetylcholin stimulierten NO-Wirkung. In vivo zeigt sich dieses Phänomen am arteriosklerotischen Patienten in dem Bild der endothelialen Dysfunktion, indem beispielsweise die Koronararterien nicht bzw. paradox auf vasodilatorische Reize reagieren [13,78,84,92] Diese fehlende Dilatationsfähigkeit limitiert die physiologische Reagibilität der Koronararterien, und ist somit Ausdruck der in dieser Arbeit nachgewiesenen oxLDL/LPC-induzierten, verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Die gezeigten Versuchsergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Erkenntnisse von Cominacini et al., die diesen Effekt von oxLDL auf die vermehrte Radikalbildung durch die NAD(P)H-Oxidase zurückführen [9].

Die durch oxLDL und LPC induzierte Steigerung der endothelialen Proliferation kann unter klinischen Gesichtspunkten bedeutsam werden. Die Proliferation der Endothelzellen kann arteriosklerotische Plaques destabilisieren [54]. Untersuchungen von O'Brien et al. haben gezeigt, dass es in arteriosklerotischen Plaques zu einer deutlichen Zunahme neu entstandener Mikrogefäße kommt [64]. Diese Gefäße sind außerordentlich fragil und reißen daher sehr schnell ein, wodurch

es zu einer Infarzierung der Plaques kommt [54]. Diese plötzliche Volumenzunahme zieht eine Destabilisierung der arteriosklerotischen Plaques nach sich [64]. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass die Modulation des BK_{Ca} bei der oxLDL-/LPC- induzierten Proliferation eine wichtige Rolle spielen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen auf einen völlig neuartigen Mechanismus im Prozess der Arterioskleroseentstehung hin, der erstmalig die Beteiligung eines Ionenkanals als Teil des Signaltransduktionsweges beinhaltet. Die Regulation des BK_{Ca} durch oxLDL und LPC greift dabei in endotheliale Zellfunktionen (Proliferation und NO-Bildung) ein, die von großer klinischer Relevanz sind.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von oxidiertem LDL (oxLDL) und dessen Hauptbestandteil Lysophosphatidylcholin (LPC) auf den Ca^{2+} -aktivierten K^+ Kanal mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}), die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und Acetylcholin-induzierte NO-Bildung in humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) untersucht. Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik konnte gezeigt werden, dass oxLDL und LPC eine signifikante Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} bewirken. Dieser Effekt wurde über den endothelialen Oberflächenrezeptor für oxLDL LOX-1 vermittelt. Mit Hilfe des Fura-2-Imaging wurden Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen. Sowohl oxLDL als auch LPC bewirkten einen biphasischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die frühe, steil ansteigende Komponente konnte durch Vorinkubation mit dem selektiven BK_{Ca} Inhibitor IBX signifikant reduziert werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die folgende Hypothese aufstellen: oxLDL und LPC bewirken eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was eine Aktivierung des BK_{Ca} zur Folge hat. Diese Steigerung der Ionenkanalaktivität bewirkt eine Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran, so dass extrazelluläres Ca^{2+} transmembranär in die Zelle einströmen kann. Diese Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirkt eine weitere Verstärkung der BK_{Ca} -Aktivität. Durch Zellzählung und Messung der $[\text{H}^3]$ -Thymidin Inkorporation wurde der Einfluss von oxLDL/LPC auf das endotheliale Proliferationsverhalten untersucht. Beide Substanzen bewirkten eine signifikante Steigerung der Proliferation. Dieser Effekt ließ sich durch gleichzeitige Gabe von IBX signifikant reduzieren. Die Ach-induzierte NO-Synthese wurde mit einem cGMP-Radioimmunoassay (cGMP-RIA) analysiert. In vorausgegangenen Patch-Clamp Messungen konnte eine signifikante Steigerung der BK_{Ca} Aktivität durch Ach in HUVEC nachgewiesen werden. In den cGMP-RIAs bewirkte eine Blockade des BK_{Ca} mit IBX eine signifikante Reduktion der Ach-induzierten cGMP-Spiegel. Eine Reduktion der cGMP-Spiegel wurde ebenfalls durch oxLDL/LPC bewirkt, obwohl beide Substanzen den BK_{Ca} aktivieren. Dieser Effekt konnte auf eine vermehrte Radikalbildung durch die NAD(P)H-oxidae zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass oxLDL und LPC die Aktivität des BK_{Ca} in HUVEC steigern. Die oxLDL/LPC-induzierte Aktivierung des BK_{Ca} beeinflusst endotheliale Zellfunktionen (NO-Produktion, Proliferation), welche ihrerseits wichtige Bestandteile in der Pathophysiologie der Arteriosklerose sind.

Abstract

Aim of this study was to analyse the effect of oxLDL and its major component lyophosphatidylcholine (LPC) on endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}) and its contribution to oxLDL/LPC-mediated changes of proliferation and production of NO. The patch-clamp technique was used to study the behavior of BK_{Ca} in human endothelial cells of umbilical cord veins (HUVEC). OxLDL/LPC caused a significant increase of BK_{Ca} activity, whereas preincubation of HUVEC with an antibody against the endothelial oxLDL-receptor LOX-1 abolished BK_{Ca} activation. Changes of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were measured by means of Fura-2 imaging. A biphasic increase of intracellular Ca^{2+} after application of oxLDL/LPC was observed. The early component of this Ca^{2+} increase was blocked by the BK_{Ca} inhibitor iberiotoxin (IBX). These results can be summarized in the following hypothesis: oxLDL/LPC cause an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resulting in an activation of BK_{Ca} . Increased BK_{Ca} activity causes a membrane hyperpolarization. This hyperpolarization is followed by a transmembrane Ca^{2+} entry, further increasing BK_{Ca} -activity. Cell counts and ^3H -thymidine-incorporation were used to analyse proliferation. Endothelial proliferation was significantly increased by oxLDL/LPC. IBX blocked this proliferative response. Synthesis of NO was measured by means of ^3H -cGMP-radioimmunoassay. Acetylcholine-induced NO synthesis was significantly decreased by IBX. Interestingly, oxLDL/LPC significantly decreased acetylcholine-induced NO synthesis if the production of superoxide was not blocked by antisense oligonucleotides against the NAD(P)H-oxidase.

The presented data demonstrate that oxLDL/LPC activate BK_{Ca} , which plays an important role in oxLDL/LPC-mediated endothelial proliferation. Acetylcholine-induced NO synthesis is modulated by BK_{Ca} , whereas the reduction of acetylcholine-induced NO-synthesis by oxLDL/LPC is related to an increase in superoxide production. This study shows a new mechanism in the pathophysiology of atherosclerosis.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adams DJ.**; Ionic Channels in Vascular Endothelial Cells; Trends in Cardiovascular Medicine 4:18-26 (1994)
2. **Aoyama T., Fujiwara H., Masaki T., Sawamura T.**; Induction of lectin-like oxidized LDL Receptor by oxidized LDL and Lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells; Journal of Molecular Cellular Cardiology 31: 2101-2114 (1999)
3. **Beny J.**; Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries; Pflügers Archiv 433: 364-367 (1997)
4. **Böcker W., Denk H., Heitz P.**; Pathologie; Urban und Schwarzenberg Verlag (1999)
5. **Busse R., Fichtner H., Lückhoff A., Kohlhardt M.**; Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells; American Journal of Physiology 255: H965-H969 (1988)
6. **Busse R., Mülsch A., Flemming I., Hecker M.**; Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium; Circulation 87: 18-25 (1993)
7. **Candia S., Garcia M. L., Latorre R.**; Mode of Action of Iberiotoxin, a potent Blocker of the Large Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel; Biophysical Journal 63: 583-590 (1992)
8. **Claisse C., Edeas M., Chaouchi N., Chalas J., Capel L., Kalimoutou S., Vasquez A., Lindenbaum A.**; Oxidized LDL induce apoptosis in HUVEC but not in the endothelial cell line EA.hy 926; Atherosclerosis 147: 95-104 (1999)

-
9. **Cominacini L., Pasini AF., Garbin U., Davoli A., Tosetti ML., Campagnola M., Rigoni A., Pastorino A. M., Lo Cascio V., Sawamura T.;** Oxidized Low-Density Lipoprotein (ox-LDL) Binding to ox-LDL Receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular Reactive Oxygen Species; *Journal of Biological Chemistry* 275: 12633-12638 (2000)

 10. **Cominacini L., Rigoni A., Pasini AF., Garbin U., Davoli A., Campagnola M., Pastorino A. M. Lo Cascio V., Sawamura T.;** The binding of oxidized Low-Density Lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL Receptor-1 reduces intracellular concentration of nitric oxide in endothelial Cells through an increased production of Superoxide; *Journal of Biological Chemistry* 276: 13750-13755 (2001)

 11. **Demirel E., Rusko J., Laskey RE., Adams DJ., Breemen van C.;** TEA inhibits Ach-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to vascular tone; *American Journal of Physiology* 267: H1135-H1141 (1994)

 12. **De Meyer GRY., Herman GH.;** Vascular Endothelial Dysfunction; *Progress in Cardiovascular Disease* 39 (4): 325-342 (1997)

 13. **Drexler H., Hornig B.;** Endothelial Dysfunction in Human Disease; *Journal of Molecular Cellular Cardiology* 31: 51-60 (1999)

 14. **Flavahan NA.;** Lysophosphatidylcholine modifies G protein-dependent signaling in porcine endothelial cells; *American Journal of physiology* 264: H722-H727 (1993)

 15. **Freeman JE., Kuo WY., Drenger B., Barnett TN., Levine MA., Flavahan NA.;** Analysis of Lysophosphatidylcholine-induced Endothelial Dysfunction; *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 28: 345-352 (1996)

-
16. **Froese DE., McMaster J., Man RYK., Choy PC., Kroeger EA.;** Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: Impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor; *Molecular and Cellular Biochemistry* 197: 1-6 (1999)
17. **Furchgott RF., Zawadzki JV.;** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; *Nature* 288 (5789): 373-376 (1980)
18. **Galle J., Heinloth A., Wanner C., Heermeier K.;** Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress; *Kidney International* 59: 120-123 (2001)
19. **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: 11083-11090 (1990)
20. **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)
21. **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: 6719-6727 (1992)
22. **Groschner K., Graier WF., Kukovetz WR.;** Activation of a small-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel contributes to bradykinin-induced stimulation of nitric oxide synthesis in pig aortic endothelial cells; *Biochimica et Biophysica Acta* 1137: 162-170 (1992)

-
- 23. Haller H.;** Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium; 273-286, in Born V. R., Schwartz C. J.; Vascular Endothelium -Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities; Schattauer Verlag (1997)
- 24. 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)
- 25. 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 (4): 425-436 (1995)
- 26. Heinloth A., Heermeier K.; Raff U., Wanner C., Galle J.;** Stimulation of NADPH Oxidase by Oxidized Low-density Lipoprotein induces Proliferation of Human Vascular Endothelial Cells; Journal of the American Society of Nephrology 11 (10): 1819-1825 (2000)
- 27. Himmel H., Whorton AR., Strauss HC.;** Intracellular Calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells; Hypertension 21: 112-127 (1993)
- 28. Hille B.;** Ionic Channels of Excitable Membranes; second Edition 1992; Sinauer associates inc; publishers; Sunderland, Massachusetts: S121-127 (1992)
- 29. Ignarro LJ.;** Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Annu Reviews in Pharmacology and Toxicology 30: 535-560 (1990)
- 30. Inagami T., Naruse M., Hoover R.;** Endothelium as an endocrine Organ; Annual Reviews in Physiology 57: 171-189 (1995)
- 31. Inoue N., Hirata K., Yamada M., Hamamori Y., Matsuda Y., Akita H., Yokoyama M.;** Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. Circulation Research 71: 1410-1421 (1992)

-
- 32. Jacobs M., Plane F., Bruckdorfer KR.;** Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta; *British Journal of Pharmacology* 100: 21-26 (1990)
- 33. 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: 2745-2756 (1973)
- 34. Kikuta K., Sawamura T., Miwa S., Hashimoto S., Masaki T.;** High-affinity Arginine Transport of bovine aortic endothelial Cells is impaired by Lysophosphatidylcholine; *Circulation Research* 83: 1088-1096 (1998)
- 35. Kita T., Kume N., Yokode M., Arai H., Horiuchi H., Moriwaki H., Minami M., Kataoka H., Wakatsuki Y.;** Oxidized-LDL and atherosclerosis. Role of LOX-1; *Annals of the New York Academie of Science* 902: 95-100 (2000)
- 36. Knaus HG., Eberhart A., Koch RO., Munujos P., Schmalhofer WA., Warmke JW., Kaczorowski GJ., Garcia ML.;** Characterization of Tissue-expressed Alpha Subunits of the High Conductance Ca^{2+} - Activated K^{+} Channel; *Journal of Biological Chemistry* 270 (38): 22434-22439 (1995)
- 37. Kolb HA.;** Potassium Channels in Excitable and Non-excitable Cells; *Reviews in Physiology Biochemistry and Pharmacology* 115: 52-79 (1990)
- 38. Kugiyama K., Kerns SA., Morisset JD., Roberts R., Henry PD.;** Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins; *Nature* 344: 160-162 (1990)
- 39. Kugiyama K., Ohgushi M., Sugiyama S., Murohara T., Fukunaga K., Miyamoto E., Yasue H.;** Lysophosphatidylcholine inhibits surface receptor-mediated intracellular signals in endothelial cells by a pathway involving protein kinase C activation. *Circulation Research* 71: 1422-1428 (1992)

-
40. **Latorre R., Oberhauser A., Labarca P., Alvarez O.**; Varieties of Calcium-Activated Potassium Channels; *Annual Review of Physiology* 51: 385-399 (1989)
41. **Leung YM., Xion Y., Ou YJ., Kwan CY.**; Perturbation by lysophosphatidylcholine of membrane permeability in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells; *Life Science* 63: 965-973 (1998)
42. **Lindl T., Bauer J.**; Zell- und Gewebekultur-Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen; 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1989)
43. **Liu SY., Lu X., Choy S., Dembinski TC., Hatch GM., Mymin D., Shen X., Angel A., Choy PC., Man RYK.**; Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: relationship to endothelium dependent relaxation; *Cardiovascular Research* 28: 1476-1481 (1994)
44. **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: 94-99 (1990)
45. **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- 311 (1990)
46. **Maggleyby 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)
47. **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)

-
- 48. Mangin EL., Kugiyama K., Nguy JH., Kerns SA., Henry PD.;** Effects of Lysolipids and oxidatively modified Low Density Lipoproteins on endothelium dependent relaxation of Rabbit Aorta; *Circulation Research* 72: 161-166 (1993)
- 49. McManus OB.;** Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium; *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 23: 537-560 (1991)
- 50. Mehrke G., Pohl U., Daut J.;** Effects of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium; *Journal of Physiology* 439: 277-299 (1991)
- 51. Metha JL., Li DY.;** Identification and autoregulation of receptor for oxLDL in cultured human coronary artery endothelial cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248: 511-514 (1998)
- 52. 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)
- 53. Miwa Y., Hirata K., Kawshima S., Akita H., Yokoyama M.;** Lysophosphatidylcholine inhibits receptor- mediated Ca^{2+} Mobilization in intact endothelial Cells of Rabbit Aorta; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17: 1561-1567 (1997)
- 54. Modifi R., Crotty TB., Mc Carthy P., Sheehan SJ., Mehigan D., Keaveny TV.;** Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease; *British Journal of Surgery* 88: 941-944 (2001)
- 55. Murohara T., Kugiyama K., Ohgushi M., Sugiyama S., Ohta Y., Yasue H.;** LPC in oxidized LDL elicits vasoconstriction and inhibits endothelium dependent relaxation; *American Journal of Physiology* 267: H2441-H2449 (1994)

-
- 56. Myers PR., Wright TF., Tanner MA., Ostlund RE.;** The effects of native LDL and oxidized LDL on ERDF-bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium; *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 124: 672- 683 (1994)
- 57. Neher E.;** Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation (Nobel Vortrag); *Angewandte Chemie* 104: 837-843 (1992)
- 58. Nelson MT., Quayle JM. ;** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle ; *American Journal of Physiology* 268: C799-C822 (1995)
- 59. Nilius B.;** Regulation of transmembrane calcium fluxes in endothelium; *News in Physiological Sciences* 6: 110-114 (1991)
- 60. Nilius B., Droogmans G.;** Ion channels and their functional role in vascular endothelium; *Physiological Reviews* 81: 1415-1459 (2001)
- 61. Nilius B., Droogmans G.;** A role for K⁺ channels in cell proliferation; *News in Physiological Sciences* 9: 105-110 (1994)
- 62. Nilius B., Viana F., Droogmans G.;** Ion Channels in Vascular Endothelium; *Annual Reviews in Physiology* 59: 145-170 (1997)
- 63. Nilius B., Wohlrab W.;** Potassium Channels and Regulation of Proliferation of Human Melanoma Cells; *Journal of Physiology* 445: 537-548 (1992)
- 64. O'Brien ER., Garvin MR., Dev R., Stewart DK., Hinohara T., Simpson JB., Schwartz SM.;** Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques; *American Journal of Pathology* 145: 883-894 (1994)
- 65. Ohara Y., Peterson TE., Harrison DG.;** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of Clinical Investigation* 91: 2546-2551 (1993)

-
- 66. Ohgushi M., Kugiyama K., Fukunaga K., Murohara T., Sugiyama S., Miyamoto E., Yasue H.;** Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium- dependent relaxation by oxidatively modified LDL; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 13: 1525-1532 (1993)
- 67. Quasching T., Ruschituka FT., Maier W., Lüscher TF.;** Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten; *Internist* 41: 355-362 (2000)
- 68. Rae JL., Levis RA.;** Glass Technology for Patch Clamp Electrodes; *Methods in Enzymology* 207: 66-92 (1992)
- 69. Rikitake Y., Kawashima S., Yamashita T., Ueyama T., Ishido S., Hotta H., Hirata K., Yokoyama M.;** Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated Kinase-Pathway; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20: 1006-1012 (2000)
- 70. Ross R.;** The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update; *New England Journal of Medicine* 314 (8): 488-500 (1986)
- 71. Ross R.;** The Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective for the 1990s; *Nature* 362: 801-809 (1993)
- 72. Rubanyi GM.;** The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease; *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22: 1-14 (1993)
- 73. 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: 601-621 (1992)
- 74. Sachs L.;** *Angewandte Statistik*, 10. Auflage 2002; Springer Verlag, Heidelberg; Deutschland (2002)

-
75. **Sackmann B.**; Elementare Ionenströme und synaptische Übertragung (Nobel-Vortrag); *Angewandte Chemie* 104: 844- 856 (1992)
76. **Sackmann B., Neher E.**; *Single- Channel Recording*; second edition 1985, Plenum Press, New York, USA (1985)
77. **Sakai T.**; Acetylcholine induces Ca^{2+} -dependent K^+ Currents in Rabbit Endothelial Cells; *Japanese Journal of Pharmacology* 53: 235-246 (1990)
78. **Sanders M.**; *Molecular and Cellular Concepts in Atherosclerosis*; *Pharmacological Therapy* 61: 109-153 (1994)
79. **Sawamura T., Kume N., Aoyama T., Moriwaki H., Hoshikawa H., Aiba Y., Tanaka T., Miwa S., Katsura Y., Kita T., Masaki T.**; An endothelial receptor for oxidized low- density lipoprotein; *Nature* 386: 73-77 (1997)
80. **Schäfer M., Bahde D., Bosche B., Ladilov Y., Schäfer C., Piper HM., Noll T.**; Modulation of early $[Ca^{2+}]_i$ rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C; *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology* 280: 1002-1010 (2001)
81. **Schmidt HHHW., Lohmann S. M., Walter U.**; The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action; *Biochimica et Biophysica Acta* 1178: 153-175 (1993)
82. **Schini-Kerth VB., Vanhoutte PM.**; Nitric Oxide Synthases in Vascular Cells; *Experimental Physiology* 80: 885-905 (1995)
83. **Sreiber M., Salkoff L.**; A novel calcium sensing domain in the BK channel; *Biophysical Journal* 73: 1355-1363 (1997)
84. **Schwartz SM., de Blois D., O'Brien ERM.**; The Intima-Soil for Atherosclerosis and Restenosis; *Circulation Research* 77: 445-465 (1995)

-
- 85. Simon BC., Cunningham LD., Cohen RA.;** Oxidized Low-density lipoproteins cause contraction and inhibit Endothelium dependent Relaxation in the Pig Coronary Artery; *Journal of Clinical Investigation* 86: 75-70 (1990)
- 86. Stoen R., Lossius K., Persson AA., Karlsson JO.;** Relative significance of the nitric oxide (NO)/cGMP pathway and K⁺ channel activation in endothelium-dependent vasodilation in the femoral artery of developing piglets. *Acta Physiol Scand* 171: 29-35 (2001)
- 87. Stoll LL., Oskasson HJ., Spector AA.;** Interaction of lysophosphatidylcholine with aortic endothelial cells; *American Journal of Physiology* 262: H1853-H1860 (1992)
- 88. Su Z., Ling Q., Guo ZG.;** Effects of lysophosphatidylcholine on bovine aortic endothelial cells in culture. *Cardioscience* 6: 31-37 (1995)
- 89. Takeda K., Klepper M.;** Voltage-Dependent and Agonist-activated Ionic Currents in Vascular Endothelial Cells: A Review; *Blood Vessels* 27: 169-183 (1990)
- 90. Tsien R., Pozzan T.;** Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with quin2; *Methods in Enzymology* 172: 230-262 (1980)
- 91. Vargas FF., Caviedas PF., Grant DS.;** Electrophysiological characteristics of cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells; *Microvascular Research* 47 (2): 153-165 (1994)
- 92. Vita JA., Treasure CB., Nabel EG., Mc Lenachan A., Fish RD., Yeung A. C., Vekstein VI., Selwyn AP., Ganz P.;** Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease; *Circulation* 81: 491-497 (1990)
- 93. Wang X., Chu W., van Breemen C.;** Potentiation of acetylcholine-induced responses in freshly isolated rabbit aortic endothelial cells; *Journal of Vascular Research* 33: 414-424 (1996)

-
- 94. Wiecha J., Münz BM., Wu Y., Noll T., Tillmanns H., Waldecker B.;** Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor; *Journal of Vascular Research* 35: 363-371 (1998)
- 95. Zhao L., Tackett R. L.;** Oxidized Low-Density Lipoprotein inhibits Acetylcholine-induced Vasorelaxation and increases 5-HAT-induced Vasoconstriction in isolated human Saphenous Vein; *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284: 637-643 (1997)
- 96. Zhao B., Ehringer WD., Dierichs R. and Miller FN.;** Oxidized low-density lipoprotein increases endothelial intracellular calcium and alters cytoskeletal f-actin distribution. *European Journal of Clinical Investigation* 27: 48-54 (1997)

7. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Christoph Rüdiger Wolfram Kuhlmann
Geburtsdatum: 01.10.1975
Geburtsort: Wetzlar
Familienstand: verheiratet mit Sandra Kuhlmann, geborene Thomae
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1982-1986 Grundschule in Waldgirmes
1986-1992 Lahntalschule in Atzbach
1992-1995 Goetheschule in Wetzlar

Zivildienst

1995- 1996 Zivildienst im Pflegebereich OP im Kreiskrankenhaus Wetzlar

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. Bernd Waldecker und bei Herrn Dr. Johannes Wiecha dafür, dass ich in Ihrer Arbeitsgruppe meine Arbeit durchführen durfte.

Herrn Dr. Johannes Wiecha danke ich vor allem für die theoretische und methodische Betreuung.

Mein Dank gilt weiterhin der DFG für die Bereitstellung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 534. Herrn Prof. Dr. Dr. Piper möchte ich an dieser Stelle für die konstruktive Kritik bei den Berichterstattungsseminaren danken.

Herrn Dr. Matthias Schäfer danke ich für die Unterstützung bei den fluoreszenzmikroskopischen Messungen, und außerdem für das „offene Ohr“, das er mir so häufig zur Verfügung gestellt hat.

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

Meiner Mit-Doktorandin Frau Astrid Most und Frau Fang Li danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Patch-Clamp Technik.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines Studiums.

Mein größter Dank gilt meiner Frau, die mich immer wieder aufgemuntert hat, wenn es im Labor nicht so gut lief.

Erklärung

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
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-491-8



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 9 1 7