

**Bedeutung des Calcium-abhängigen Kaliumkanals mit hoher  
Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ) für die Interleukin-1 $\beta$ -induzierte Adhäsion von  
Monozyten an Endothelzellen**

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

vorgelegt von  
**Conrad Johannes Everhard Venker**  
aus Essen  
Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik und Poliklinik I  
Abteilung für Kardiologie und Angiologie  
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. A. Erdogan

Gutachter: Prof. Dr. T. Borggrefe

Tag der Disputation: 26.06.2013

## **Inhaltsverzeichnis:**

|          |                                                                                              |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b><u>Einleitung</u></b>                                                                     | <b>8</b>  |
| 1.1      | <u>Das Endothel: Anatomie und Funktion</u>                                                   | 8         |
| 1.2      | <u>Arteriosklerose und gestörte Endothelfunktion</u>                                         | 10        |
| 1.3      | <u>Elektrophysiologie des Endothels</u>                                                      | 12        |
| 1.4      | <u>Interleukin-1<math>\beta</math> und seine Bedeutung für die Arterioskleroseentstehung</u> | 14        |
| 1.5      | <u>Fragestellung</u>                                                                         | 16        |
| <b>2</b> | <b><u>Material und Methoden</u></b>                                                          | <b>17</b> |
| 2.1      | <u>Zellkultur</u>                                                                            | 17        |
| 2.1.1    | Zellisolation                                                                                | 17        |
| 2.1.2    | Zellidentifikation                                                                           | 17        |
| 2.1.3    | Zellkultivierung                                                                             | 18        |
| 2.2      | <u>Kultivierung</u>                                                                          | 18        |
| 2.2.1    | Kultivierung der HUVEC                                                                       | 18        |
| 2.2.2    | Kultivierung der U-937-Monozyten                                                             | 19        |
| 2.3      | <u>Messung des Membranpotentials</u>                                                         | 20        |
| 2.4      | <u>Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)</u>                                         | 20        |
| 2.5      | <u>Messung der NO-Synthese</u>                                                               | 21        |
| 2.6      | <u>Fura-2-Imaging für die Messung des intrazellulären Calciums</u>                           | 22        |
| 2.7      | <u>Adhäsionsversuch mittels Tritium-Thymidin-Uptake</u>                                      | 23        |
| 2.8      | <u>BCECF-Adhäsionsversuch</u>                                                                | 24        |
| 2.9      | <u>Facs-Scan-Analyse</u>                                                                     | 26        |
| 2.10     | <u>Statistik</u>                                                                             | 28        |
| <b>3</b> | <b><u>Ergebnisse</u></b>                                                                     | <b>29</b> |
| 3.1      | <u>Messung des Membranpotentials der HUVEC</u>                                               | 29        |
| 3.1.1    | Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf das Membranpotential                                  | 29        |
| 3.1.2    | Einfluß des BK <sub>Ca</sub> auf die IL-1 $\beta$ -induzierte Hyperpolarisation              | 30        |

|        |                                                                                                                                               |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2    | <u>Messung des intrazellulären Calciums in HUVEC</u> .....                                                                                    | 31 |
| 3.2.1  | Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf das intrazelluläre Calcium.....                                                                        | 31 |
| 3.2.2  | Einfluss des BK <sub>Ca</sub> und der NADPH-Oxidase auf den IL-1 $\beta$ -induzierten Anstieg des intrazellulären Calcium.....                | 32 |
| 3.3    | <u>Messung der NO-Synthese von HUVEC</u> .....                                                                                                | 33 |
| 3.3.1  | Einfluss von IL-1 $\beta$ und des BK <sub>Ca</sub> auf die zelluläre NO-Synthese.....                                                         | 33 |
| 3.4    | <u>Messung der reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)</u> .....                                                                                   | 35 |
| 3.4.1  | Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf die zelluläre ROS-Synthese.....                                                                        | 36 |
| 3.4.2  | Einfluss des BK <sub>Ca</sub> , des intrazellulären Calcium und der NADPH-Oxidase auf die Interleukin-1 $\beta$ -induzierte ROS-Synthese..... | 36 |
| 3.5    | <u>Messung der Adhäsion von U-937-Monozyten an HUVEC mittels Tritium-Thymidin-Uptake</u> .....                                                | 37 |
| 3.5.1  | Einfluss der Adhärenz von U-937-Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ .....                                           | 38 |
| 3.5.2  | Rolle des BK <sub>Ca</sub> bei der gesteigerten Adhäsion von U-937 Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ .....        | 38 |
| 3.6    | <u>Messung der Adhäsion von U-937 Monozyten an HUVEC mittels BCECF Adhäsionsassay</u> .....                                                   | 39 |
| 3.6.1  | Einfluss auf die monozytäre Adhäsion durch mit Interleukin-1 $\beta$ stimulierte HUVEC.....                                                   | 39 |
| 3.6.2  | Rolle des BKCA bei der gesteigerten Adhäsion an mit Interleukin-1 $\beta$ stimulierten HUVEC.....                                             | 40 |
| 3.7    | <u>Messung der zellulären Adhäsionsmoleküle I-CAM und V-CAM auf HUVEC mittels Durchflusszytometrie</u> .....                                  | 42 |
| 3.7.1. | Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls I-CAM.....                                        | 42 |
| 3.7.2  | Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf die Expression des zellulären Adhäsionsmoleküls V-CAM.....                                             | 42 |
| 4      | <u>Diskussion</u> .....                                                                                                                       | 45 |
| 5      | <u>Zusammenfassung</u> .....                                                                                                                  | 57 |

|          |                                              |           |
|----------|----------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b> | <b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....     | <b>59</b> |
| <b>7</b> | <b><u>Ehrenwörtliche Erklärung</u></b> ..... | <b>70</b> |
| <b>8</b> | <b><u>Danksagung</u></b> .....               | <b>71</b> |

### **Abkürzungsverzeichniss:**

|                  |                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| ATP              | Adenosintriphosphat                                    |
| BCECF-AM         | Biscarboxyethyl-5-carboxyfluorescein                   |
| BK <sub>Ca</sub> | Calciumaktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit |
| Cl <sup>-</sup>  | Chlorid                                                |
| CRP              | C-reaktives Protein                                    |
| DAF              | Diaminofluorescein                                     |
| DCF              | Dichlorofluorescein diacetat                           |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                       |
| DPI              | Diphenyliodonium                                       |
| EBM              | Endothelial Basal Medium                               |
| eNOS             | endotheliale NO-Synthase                               |
| FCS              | fetales Kälberserum                                    |
| HBC              | humane Knochenzellen                                   |
| HBSS             | Hank's Balanced Salt Solution                          |
| HUVEC            | humane, umbilikale venöse Endothelzellen               |
| Iberiotoxin      | IbTX                                                   |
| I-CAM            | interzelluläres Adhäsionsmolekül                       |
| IL-1r-1          | Interleukin-Rezeptor Typ 1                             |
| IL1-ra           | Interleukin1-Rezeptor Antagonist                       |
| IL-1 $\beta$     | Interleukin1- $\beta$                                  |
| K <sup>+</sup>   | Kalium                                                 |
| K <sub>ATP</sub> | ATP-abhängiger Kaliumkanal                             |
| K <sub>Ca</sub>  | Calciumaktivierter Kaliumkanal                         |
| K <sub>IR</sub>  | Kalium inward rectifier (Kaliumkanal)                  |
| LAF              | lymphocyte activating factor                           |
| LDL              | low density lipoprotein cholesterol                    |
| L-NMMA           | N-monomethyl-L-arginin                                 |
| LPC              | Lysophosphatidylcholin                                 |

|                                  |                                         |
|----------------------------------|-----------------------------------------|
| MCF                              | mononuclear cell factor                 |
| Na <sup>+</sup>                  | Natrium                                 |
| NaOH                             | Natriumhydroxid                         |
| NO                               | Stickstoffmonoxid                       |
| PBS                              | phosphatgepufferte Salzlösung           |
| PCR                              | Polymerase-Ketten-Reaktion              |
| pS                               | piko-Sievert                            |
| ROS                              | reactive oxygen species                 |
| SIRS                             | systemic inflammatory response syndrome |
| TLR                              | toll like receptor                      |
| TNF-alpha                        | Tumornekrosefaktor-alpha                |
| PTHrP                            | parathormon related peptide             |
| V-CAM                            | vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül  |
| VSMC                             | humane glatte Gefäßmuskelzellen         |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | intrazelluläres Calcium (Konzentration) |

## **1. Einleitung**

Die Einleitung gliedert sich in fünf Teile. Zunächst werden unter 1.1 Grundlagen zur Anatomie und Funktion des Endothels sowie unter 1.2 zur gestörten Endothelfunktion und deren Auswirkungen auf die Arterioskleroseentstehung erläutert.

Im Anschluß wird unter 1.3 die Elektrophysiologie des Endothels beschrieben und unter 1.4 das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  und dessen Rolle im endothelialen Entzündungsgeschehen vorgestellt.

Unter 1.5 wird die der Dissertation zugrundeliegende Fragestellung erörtert.

### **1.1 Das Endothel: Anatomie und Funktion**

Arterielle und venöse Blutgefäße zeigen grundsätzlich einen dreischichtigen Wandaufbau: Tunica externa (Adventitia), Tunica media und die Intima.

Die äußerste, dem Blut abgewandte Seite wird als Tunica externa oder auch Adventitia bezeichnet. Sie besteht aus kollagenem und elastischem Bindegewebe, welches das Gefäß mit dem Umgebungsgewebe verbindet. Nach innen schließt sich die Tunica media an, die aus zirkulär verlaufenden, glatten Muskelzellen besteht. Diese werden durch nervale und humorale Reize gesteuert und ermöglichen dem Gefäß die Dilatation oder Konstriktion.

Die Intima ist die innerste, dem Blut zugewandte Seite des Gefäßes. Sie besteht zum einen aus dem der Tunica media anliegenden Stratum subendotheliale, daß aus Fibroblasten, Leukozyten und Muskelzellen besteht. Zum anderen besteht sie aus dem Endothel. Hierbei handelt es sich um eine von Endothelzellen gebildete, einlagige Schicht. Die einzelnen Endothelzellen sind überlappend angeordnet und durch „tight junctions“, feste Verbindungen (Zonula adhaerens, Punctum adhaerens, Zonula occludens), miteinander verbunden. Die elektrische Kommunikation und der Stoffaustausch der benachbarten Endothelzellen erfolgt über sogenannte „gap junctions“. Hierbei handelt es sich um kanalbildende Proteinkomplexe, die aus Verbindungsproteinen, sogenannten Connexinen, bestehen und durch welche die die Zytoplasmakomponenten der einzelnen Zellen verbunden sind [1,2].

Die Funktion der Endothelzellen ist vielseitig. Sie bilden für bestimmte Stoffe eine physikalische Barriere, die den Blutstrom vom umliegenden Gewebe trennt. Für Stoffe, die das umliegende Gewebe benötigt, sind sie permeabel. Das Endothel ist also bedeutend für die selektive, lokale Gewebsversorgung, z.B. mit Energie und Sauerstoff sowie eine trennende Membran für Vorgänge wie z.B. die Osmose. Durch seine Lage zwischen Blut und glatter Gefäßmuskulatur spielt es eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Auch für die Blutgerinnung, Thrombozytenaggregation, Monozytenadhäsion und die Auslösung der Gerinnungskaskade ist es bedeutsam [2].

Für die vielfältigen Aufgaben muss die Endothelzelle zum einen mit zahlreichen Rezeptoren, zum anderen mit stimulierenden Funktionen ausgestattet sein. Sie reagiert auf physikalische Reize, wie Shear-Stress, Längen-, Blutdruck- und Flussveränderungen, ebenso wie auf chemische Reize, wie Hormone und Chemokine. Sie ist zudem endokrin, parakrin und autokrin aktiv, steht also in Kommunikation mit sich selbst, den direkten Nachbarzellen und weiter entfernt liegenden Zellen, indem sie eine Vielzahl von Botenstoffen produziert. Wesentliche Stoffe sind zum Beispiel Stickstoffmonoxid, natriuretisches Peptid, Prostaglandine, Endothelin, Angiotensin-konvertierendes Enzym und Adenosin-Triphosphat, die alle den Gefäßtonus regulieren, pro- und antithrombotische Substanzen wie von-Willebrand-Faktor, Heparansulfat, Prostacycline, Thrombin, Gerinnungsfaktor V, Protein C und Plasminogen, Plättchen-aktivierender Faktor, inflammatorische Substanzen wie Interleukine, Tumornekrosefaktor-alpha und Interferone [3,4]. Eine weitere wichtige Fähigkeit der Endothelzellen ist es, Adhäsionsmoleküle wie interzelluläre Adhäsionsmoleküle (I-CAM), vaskuläre zelluläre Adhäsionsmoleküle (V-CAM) und die Selectine zu exprimieren. Durch diese ist sie befähigt, in der Blutbahn transportierte Zellen, z.B. rollende Leukozyten, aus dem Blutstrom an sich zu binden. Adhäsionsmoleküle sind Glykoproteinrezeptoren und werden auf nahezu allen menschlichen Zellen exprimiert. [5].

Betrachtet man diese vielfältigen Funktionen und bedenkt, daß das Gefäßendothel des gesamten Körpers bei einem 70 kg schweren Mann etwa 1800g wiegt, aufgefaltet eine Fläche von 6 Tennisplätzen einnimmt und somit das größte zusammenhängende Organ des menschlichen Körpers darstellt, wird seine hervorgehobene Bedeutung im Organismus klar [4].

## **1.2 Arteriosklerose und gestörte Endothelfunktion**

Die Arteriosklerose ist eine chronische, progrediente Systemerkrankung der Arterien, bei der es zu einer pathologischen Veränderung der Gefäßwand kommt. Es zeigen sich Bindegewebsveränderungen, Einlagerungen von Cholesterin, Fettsäuren und Kalk, sowie Anhäufung von Kollagenen und Proteoglykanen, die zur Verhärtung und Verengung der Arterien führen [7].

In den westlichen Industriestaaten ist die Arteriosklerose mit ihren Folgeerkrankungen zur bedeutendsten Volkskrankheit geworden. So belegten 2006 bei den Frauen die chronisch-ischämische Herzkrankheit, die Herzinsuffizienz, der akute Myokardinfarkt und der Schlaganfall die Ränge 1-4 in der Todesursachenstatistik des Bundesgesundheitsamtes. Bei den Männern liegen auf Rang 1 und 2 die chronische ischämische Herzkrankheit und der Myokardinfarkt, auf Rang 4 und 6 die Herzinsuffizienz und der Schlaganfall [6]. Die Arteriosklerose stellt hiermit eine der größten medizinischen Herausforderungen Deutschlands und anderer Industriestaaten dar.

Zwei Thesen prägten das Bild der Arterioskleroseentstehung.

Ross, der erstmals 1976 sein Modell der „response to injury“ Theorie veröffentlichte [7]. Nach der These von Ross führen die Verletzungen des Endothels durch Trauma, Toxine, Viren, Bakterien und andere Antigen-Antikörperreaktionen zu einer Verletzung des Endothels, wodurch dieses zur Ausschüttung von Zytokinen stimuliert wird. Diese aktivieren Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie die Bildung von Schaumzellen. Gemeinsam stellen sie das pathophysiologische Korrelat der Plaque dar [7,8].

Nach der These von Goldstein und Brown führt die schnelle Aufnahme von oxidiertem LDL (low density lipoprotein cholesterin) in Makrophagen im subendothelialen Raum zur Entstehung der Arteriosklerose [9]. Neuere Betrachtungen von Faxon et al. gehen davon aus, daß die Arterioskleroseentstehung viele stark miteinander verknüpfte Prozesse beinhaltet. Hierzu gehören Lipidstoffwechselstörungen, Thrombozytenaggregation, endotheliale Dysfunktion, Inflammation, oxidativer Stress, Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen und genetische Faktoren [10].

Zum Teil auslösend für diese gestörten Funktionen sind die typischen, sogenannten vaskulären Risikofaktoren, zu denen Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, gestörter Lipidstoffwechsel, Bluthochdruck, genetische Faktoren und Adipositas gehören [11]. Durch diese kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer endothelialen Dysfunktion [12,5].

Ein Merkmal der endothelialen Dysfunktion zeigen die Experimente von Furchgott sehr deutlich: Durch das Fehlen von Endothelzellen kommt es zu einer paradoxen Vasokonstriktion bei der Gabe von Acetylcholin, welches in Anwesenheit von Endothelzellen zur Vasodilatation führt [20]. Die Endothelzelle kann also die Wirkung von Stoffen modulieren oder sogar umkehren. Ein weiteres Merkmal der endothelialen Dysfunktion ist, dass die Endothelzelle vermehrt Adhäsionsmoleküle wie Selectine, V-CAM und I-CAM an der dem Blut zugewandten Oberfläche exprimiert [5]. Diese wandern in die subendotheliale Matrix und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus, indem sie proinflammatorische Stoffe sezernieren, wie Zytokine, Interleukine, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), chemotaktische Proteine, Parathormon-related peptide (PTHrP) und andere [14,15]. Durch diese proinflammatorischen, also entzündungsaktivierenden Signale werden die Endothelzellen dazu angeregt, weitere Adhäsionsmoleküle und LDL-Rezeptoren zu exprimieren, die bedeutend im Rahmen des Cholesterinstoffwechsels sind. So entwickelt sich ein Kreislauf, in dem immer mehr Leukozyten und LDL in den subendothelialen Raum wandern. Dort und zum Teil schon im Blutstrom verändert sich das LDL durch Noxen, wie freie Radikale zum oxidierten LDL (oxLDL). Die Monozyten nehmen das oxLDL über sogenannte Scavenger-Rezeptoren auf [16,39]. Es entstehen „Schaum-Zellen“, die histologisch typisch für frühe atherosklerotische Läsionen sind. Sie verstärken das Inflammationsgeschehen zusätzlich und führen zur Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [16,17]. Der Kreislauf etabliert sich, und es entwickeln sich zunehmend Plaques, die T-Lymphozyten, Schaumzellen und glatte Gefäßmuskelzellen enthalten [38].

Entscheidend bei dieser Betrachtung ist, dass die genannten Risikofaktoren nur zu einem Teil für die Entstehung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht werden können. So findet man nur bei 50% der manifest Erkrankten eine Hypercholesterinämie [18].

Auch die Prävalenz traditioneller Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie ist bei Patienten mit koronarer oder peripherer arterieller Gefäßerkrankung nur gering höher als bei gleich alten Patienten ohne Erkrankung [19]. Zunehmend ist durch diese Erkenntnisse die Bedeutung des individuellen Inflammationsgeschehens bei der Arterioskleroseentstehung in den Vordergrund gerückt. Viele der inflammatorischen Substanzen, wie Interleukine, C-reaktives Protein (CRP) oder TNF-alpha sind aus diesem Grund Gegenstand aktueller Forschungen, die um den diagnostischen und therapeutischen Wert der vorangestellten Erkenntnisse bemüht sind.

### **1.3 Elektrophysiologie des Endothels**

Die in den Kapiteln 1.1 und 1.2 aufgeführten Aufgaben des Endothels werden durch verschiedene Prozesse reguliert. Als wesentlicher Faktor für die Regulation hat sich die Konzentration des intrazellulären Calciums  $[Ca^{2+}]_i$  gezeigt. Es existieren grundsätzlich zwei Möglichkeiten für die Zelle, die  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu regulieren. Zum einen können intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher, wie das endoplasmatische Retikulum, durch Ausschüttung oder Aufnahme zu einer veränderten  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zellinneren führen. Auch kann extrazelluläres  $Ca^{2+}$  passiv durch nicht-selektive Ionenkanäle einströmen [49,50]. Der passive Einstrom wird durch den elektrochemischen Gradienten der anderen Ionen, im wesentlichen Natrium ( $Na^+$ ), Kalium ( $K^+$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ), über der Zellmembran bestimmt. Eine Hyperpolarisation, also Negativierung der Spannungsdifferenz über der Zellmembran, führt zur Erhöhung der „driving-force“, dem elektrochemischen Gradienten für  $Ca^{2+}$ . Es resultiert ein Einstrom von  $Ca^{2+}$  in die Zelle. Die Verteilung der anderen intra- und extrazellulären Ionen bestimmt somit die Verteilung des  $[Ca^{2+}]_i$  [51].

Wesentlich für diese elektromechanische Kopplung sind die bereits beschriebenen „gap-junctions“. Sie ermöglichen eine über die Zellgrenze hinausgehende Veränderung der Ionenverteilung. Sie verbinden die Endothelzellen untereinander und auch die Endothelzellen mit den glatten Gefäßmuskelzellen. Durch sie werden die einzelnen zellulären Gefäßbestandteile zu einer funktionellen Einheit [53].

Die wichtigsten Ionenkanäle für die Bestimmung des Membranpotentials und hiermit des elektrochemischen Gradienten für  $\text{Ca}^{2+}$  sind diverse Natrium-, Kalium- und Chloridkanäle, von denen die Kaliumkanäle von wesentlicher Bedeutung für die vorliegende Arbeit sind und folgend näher erläutert werden. Drei Kaliumkanaltypen regulieren das endotheliale Membranpotential: Der einwärtsgerichtete Kaliumkanal  $\text{K}_{\text{IR}}$  (Kalium inward rectifier), der ATP-abhängige Kaliumkanal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (ATP=Adenosintriphosphat), und der calciumaktivierte Kaliumkanal  $\text{K}_{\text{Ca}}$ .

Der  $\text{K}_{\text{IR}}$  wird durch Scherkräfte aktiviert, die auf die Gefäßwand einwirken und er führt durch Öffnung zu einem Kaliumeinstrom, wirkt also der Hyperpolarisation entgegen [50]. Seine Wirkung ist bedeutend für das Ruhemembranpotential. Als „Kaliumsensor“ reagiert er bereits auf einen geringen Anstieg extrazellulärer Kaliumkonzentration mit Erhöhung der Konduktivität.

Der  $\text{K}_{\text{ATP}}$  wird durch Abfall des intrazellulären ATP aktiviert und führt bei Energiemangelzuständen über eine Öffnung zur Hyperpolarisation.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle werden in drei Typen nach Leitfähigkeit unterteilt: Geringe Leitfähigkeit („small conductance“ -  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , 10-14 pS), mittlere Leitfähigkeit („intermediate conductance“ -  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ , 30-80 pS) und große Leitfähigkeit („big conductance“ -  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , 100-250 pS) [50,53].

Alle Kanäle diesen Typs sind wesentlich für die Konzentration des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , indem sie die elektrochemische Triebkraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom modulieren. Der calciumabhängige Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), der zum Beispiel bei der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist, ist Gegenstand der folgenden Untersuchungen. Er ist hoch selektiv für Kalium, spannungsabhängig, und seine Leitfähigkeit wird durch einen Anstieg der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einen „calcium bowl“, eine Ankoppelungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ , erhöht [54]. Seine Wirkung kann durch verschiedene Hemmstoffe gut von den anderen  $\text{K}_{\text{Ca}}$  unterschieden werden. So sind alle  $\text{K}_{\text{Ca}}$  unselektiv durch Charybdotoxin zu hemmen, allein der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  ist hochspezifisch durch Iberitoxin (IbTX), ein Gift des Skorpions *Buthus Thammulus*, zu blockieren. IbTX setzt an der Zellaußenseite des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  reversibel an und führt zu einer Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit und der mittleren Öffnungszeit des Kanals [55,56].

#### **1.4 Interleukin-1 $\beta$ und seine Bedeutung für die Arteriosklerose-entstehung**

Interleukine sind zu den Zytokinen zählende Peptidhormone. Sie sind für die Kommunikation zwischen Leukozyten von wesentlicher Bedeutung, spielen aber auch eine wichtige Rolle bei anderen Zellen des Immunsystems. Hierbei ist Ihre Wirkung sehr variabel.

Die Interleukine werden nach der Reihenfolge Ihrer Entdeckung chronologisch nummeriert. Interleukin-1 wurde 1979 erstmals auf einem Zellbiologenkongress in der Schweiz beschrieben [22]. Es existieren zwei funktionell sehr ähnliche Formen, das Interleukin1- $\alpha$  und das Interleukin1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), die sich zwar auf Proteinebene stark unterscheiden, in der dreidimensionalen Molekülstruktur allerdings kaum [23].

IL-1 $\beta$  ist auf einem 1.6 kb grossen Teil der DNA codiert und besteht nach vollständiger Synthese aus 153 Aminosäuren. Im menschlichen Blut ist das Molekül in sehr geringen Konzentrationen und nur unter pathologischen Bedingungen zu finden, d.h. im physiologischen Zustand befindet sich IL-1 $\beta$  im Zytosol [32]. Produziert wird IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Monozyten, aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Langerhanszellen, Osteoklasten, Astrozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen [24,25]. Es konnten bisher 2 Rezeptoren identifiziert werden, an die IL-1 $\beta$  bindet. Der Interleukin-Rezeptor Typ 1 (IL-1r-1; CD121a) findet sich hauptsächlich auf T-Lymphozyten und auf Zellen der mesenchymalen Reihe. Der Rezeptor Typ 2 (IL-1r-2; CD 121b) findet sich auf B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und anderen Zellen der myelomonozytären Reihe. Hierbei unterscheidet sich die Rezeptordichte je nach Zelltyp von einigen Tausend bis ca 100.000 pro Zelle [26,27,28]. Die bisher bekannten Wirkungen auf den Rezeptor entsprechen denen der „toll like receptor“-Familie (TLR). Es wird der nukleäre Faktor NF $\kappa$ B aktiviert, der die Transkriptionen verschiedener pro-inflammatorischer Gene und Zytokine, inklusive IL-1 $\beta$  selbst, auslöst [36]. Um die Wirkung auf den Rezeptor zu blocken, existiert ein endogener, kompetitiver Antagonist, der Interleukin1-Rezeptor Antagonist (IL1-ra). Er blockiert direkt den Rezeptor und bindet und inaktiviert zusätzlich das IL-1 $\beta$  [29].

Die Sekretion von IL-1 $\beta$  wird auf verschiedenen Stufen reguliert. Ein Großteil der IL-1 $\beta$ -RNA wird erst durch die Vorstufe pro-Interleukin 1-beta (pro- IL-1 $\beta$ ), translatiert. Die Vorstufe wird durch das pro-Interleukin 1-beta (pro- IL-1 $\beta$ ), eine Kaspase (eine Protease), gespalten und damit aktiviert [31,32].

Die Wirkungen von IL-1 $\beta$  sind sehr vielfältig. So führt eine systemische Injektion geringer Mengen bei Menschen und Versuchstieren zum Beispiel zu Fieber, Blutdruckabfall, Tachykardie, Laktatazidose, Schlafstörungen, Aktivierung der hypothalamisch-adrenalen Achse und vielen weiteren Symptomen. [32]

Für eine Vielzahl pathologischer inflammatorischer Prozesse konnte eine Beteiligung der 4 Bestandteile, IL-1 $\beta$ , IL-1r, IL1-ra und ICE gezeigt werden. Hierbei wurde IL-1 $\beta$  zunächst von vielen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Akronymen, wie *lymphocyte activating factor* (LAF), Catabolin, *mononuclear cell factor* (MCF) und etlichen anderen benannt, bis 1984 durch Lomedico festgestellt wurde, dass die forschenden Arbeitsgruppen alle denselben Stoff untersuchten [38].

Bei folgenden Krankheitsbildern spielt IL-1 $\beta$  eine Rolle: Es führt zur Induktion wesentlicher pathologischer Prozesse beim *systemic inflammatory response Syndrome* (SIRS), bei dem es z.B. postoperativ oder bei starken Infektionen zu einer Fehlfunktion von Körperorganen kommt [37]; Das Fehlen des IL1-ra führt zur Ausbildung der rheumatoiden Arthritis [34]; Bei der Alzheimer-Erkrankung und Lewy-Body-Demenz aktiviert es die Produktion wesentlicher pathologischer Bestandteile [45]; Bei leukämischen Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) führt IL-1 $\beta$  zu einer Proliferation der hämatopoetischen Zellen [35]. IL-1 $\beta$  ist demnach sowohl bei akuten als auch chronischen Erkrankungen ein bedeutender Mediator.

Für die Entstehung der Arteriosklerose konnte an mehreren Stellen eine Beteiligung von IL-1 $\beta$  festgestellt werden. So findet sich der IL-1r auf verschiedenen, bei der Arterioskleroseentstehung beteiligten, vaskulären Zellen, wie glatten Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten. Makrophagen sind eine potente Quelle von IL-1 $\beta$ , besonders nach der Aktivierung zu Schaumzellen [44,45,46]. Endothelzellen und humane glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) werden durch erhöhten Shear-Stress zur Expression von IL-1 $\beta$  angeregt [40,41,42]. IL-1 $\beta$  stimuliert die Proliferation von

glatten Gefäßmuskelzellen und verstärkt die Wirkung von Wachstumsfaktoren [43]. Diese wiederum bewirken eine verstärkte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  und dem IL-1r [48]. IL-1 $\beta$  führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels für neutrophile Granulozyten [47].

Auch die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie I-CAM 1 und V-CAM 1 an Endothelzellen wird durch IL-1 $\beta$  aktiviert und ist wesentlich für die Anhaftung von Monozyten [5].

### **1.5 Fragestellung**

Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit ist es, die Bedeutung von IL-1 $\beta$  für die Arterioskleroseentstehung zu untersuchen. Es soll gezeigt werden, inwiefern IL-1 $\beta$  die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen steuert und welche Schritte zu der Adhäsion führen. Hierbei soll die Rolle des BK<sub>Ca</sub> an diesen Vorgängen herausgestellt werden.

Zunächst wird untersucht, ob IL-1 $\beta$  an HUVEC zu einer Hyperpolarisation führt, und ob der BK<sub>Ca</sub> hieran beteiligt ist. Auch werden die durch Stimulation verursachten Konzentrationsveränderungen typischer, bei erhöhtem Inflammationsgeschehen beteiligter Substanzen, wie Radikalen und Stickstoffmonoxid (NO) untersucht, um die Rolle des BK<sub>Ca</sub> bei ihrer Freisetzung herauszustellen. Die folgenden Experimente sollen beantworten, ob auch die  $[Ca^{2+}]_i$  durch IL-1 $\beta$  über den BK<sub>Ca</sub> verändert wird. Desweiteren wird mit zwei unterschiedlichen Adhäsionsversuchen die Auswirkung der Stimulation auf das Bindungsverhalten zwischen Endothelzellen und Monozyten untersucht. Abschließend soll geklärt werden, welche Adhäsionsmoleküle für diese Bindung entscheidend sind, und ob Ihre Expression vom BK<sub>Ca</sub> abhängig ist.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

Jaffe et al. beschrieben 1973 die hier verwendete Technik um menschliche Endothelzellen aus Nabelschnurvenen zu isolieren, zu identifizieren und zu kultivieren (HUVEC= humane, umbilikale venöse Endothelzellen) [56]. Im Folgenden werden diese Verfahren näher erläutert.

#### **2.1.1 Zellisolierung**

Die kurz nach der Geburt gewonnene Nabelschnur wird steril aufbewahrt, mit Kompressen gereinigt und auf Verletzungen und Abnormitäten untersucht. Die mit einer Knopfkanüle aufgesuchte Vene wird zweimal mit 50 ml Hepes (PAA, Linz, Österreich) gespült. Falls die Vene sich als undurchlässig für die Flüssigkeit herausstellt, wird sie an einem Ende abgeklemmt und dann mit 0,025% Collagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt. Dann wird sie im Brutschrank bei 37 °C über 20 Minuten inkubiert, um die Endothelzellen aus dem Zellverband zu lösen. Danach wird die Vene mit 30 ml Hepes gespült und die Flüssigkeit in einem mit 1 ml fetalem Kälberserum (FCS; PAA, Linz, Österreich) gefüllten 50 ml-Röhrchen (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) aufgefangen. Die Zellen werden anschließend in dem 50 ml-Röhrchen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das zurückgebliebene Zellpellet wird folgend mit 5 ml Endothelial Basal Medium (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) einschließlich folgender 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, 1 % Penicillin/Streptomycin und 20 % FKS (PAA, Linz, Österreich) versetzt und resuspendiert. Nun werden die Zellen auf einer mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichteten 25 cm<sup>2</sup>-Plastikkulturschale (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) verteilt.

### **2.1.2 Zellidentifizierung**

Zwei Verfahren werden zur Identifizierung der Endothelzellen herangezogen. Zum einen die lichtmikroskopische Betrachtung, zum anderen die Immunfluoreszenz.

Unter dem Lichtmikroskop wird die typische kopfsteinpflasterartige („Cobblestone“-Phänomen), einschichtige Verteilung der Endothelzellen genutzt, die eine gute Unterscheidung zu den spindelförmigen, sich gegenseitig überlappenden Muskelzellen und Fibroblasten erlaubt.

Die Identifizierung mit der Immunfluoreszenz bedarf zunächst der Aussaat und Kultivierung der Endothelzellen auf einem Deckglas und Fixierung mit Methanol bei -20°C. Folgend werden die Zellen mit Antikörpern gegen den von-Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) und mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen den von Willebrand-Antikörper (Ziege-Anti Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Da nur Endothelzellen den von Willebrand-Faktor exprimieren, ist somit eine eindeutige Identifizierung möglich [56].

## **2.2 Kultivierung**

### **2.2.1 Kultivierung der HUVEC**

Die HUVEC werden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in einem Brutschrank kultiviert. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers werden die Zellen aus der Primärkultur in eine mit Gelatine beschichtete Plastikkulturflasche (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Das unter 2.1.1 beschriebene endotheliale BasalmEDIUM (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland), diesmal mit 10% FCS (fetalem Kälberserum; PAA, Linz, Österreich), wird als Nährmedium in die Kulturflaschen gegeben und alle 2-3 Tage gewechselt. Ist die Zellschicht erneut konfluent, werden die Zellen passagiert, indem sie mit einer Inkubation mit Trypsin und EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst werden. Hierbei wird der richtige Moment der

Ablösung unter dem Lichtmikroskop visuell über die Ablösung und Abkuglung der Zellen bestimmt und mit FCS gestoppt. Dann werden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, Nährmedium hinzugefügt, die Zellen resuspendiert und abschließend in einer mit 0,2% Gelatine beschichteten Kulturflasche mit einer Dichte von 3000 Zellen /cm<sup>2</sup> ausgesät.

Täglich werden die Zellen lichtmikroskopisch auf Kontamination mit Bakterien oder Pilzen untersucht und bei eventueller Kontamination entsorgt.

Da die Zellen für die diversen Experimente unterschiedlich verdünnt werden, wird hierauf in den jeweiligen Kapiteln eingegangen.

### **2.2.2 Kultivierung der U-937-Monozyten**

Für die Adhäsionsversuche werden immortalisierte Monozyten der Tumorzelllinie U-937 verwendet. Die Monozyten werden in einem Nährmedium aus 15 ml RPMI, 10% FCS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin in einer 75 cm<sup>2</sup>-Plastikkulturflasche angesetzt. Es wird alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel vollzogen, indem die Monozyten in ein 50 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 15 ml Nährmedium resuspendiert wird. Zuletzt werden die Zellen erneut in Kulturflaschen ausgesät.

Sind die Monozyten konfluent gewachsen (ca. 5 Tage), werden die Monozyten auf 3-4 Flaschen aufgeteilt, indem die zentrifugierte und resuspendierte Zelllösung auf die Flaschen verteilt und anschliessend 15 ml RPMI hinzugefügt wird.

### **2.3 Messung des Membranpotentials**

Die Messung des Membranpotentials erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC (bis-1,3-dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Zunächst werden die HUVEC auf 24-Well-Platten (Becton, Dickinson, USA) aufgeteilt. Es folgt die Inkubation mit 0,5 µmol/l DiBAC bei 37°C unter Lichtausschluss über 15 Minuten. Anschließend erfolgt

die Zugabe der Stimulations- und Inhibitionssubstanzen in unterschiedlichen Gruppen. In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein. Die unstimulierte Kontrollmessung in der vierten Gruppe wurde mit 1 ml der Pufferlösung Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durchgeführt.

Die 24-Well-Platten werden nach 2 Minuten Vorlaufzeit in den Genios plate reader (Firma Genios Tecan) überführt und die Messung durchgeführt, indem die Fluoreszenz bei 475 nm Wellenlänge angeregt und die Emission bei 535 nm in Abständen von 1 Minute über einen Zeitraum von 12 Minuten gemessen wird. Es werden relative Zu- oder Abnahmen im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.4 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

Die Messung der ROS erfolgt nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (Dichlorofluorescein diacetat, Calbiochem, La Jolla, USA). Es werden, wie bei der Messung des Membranpotentials, die verschiedenen Messgruppen auf 24-well Platten aufgeteilt. Weiterhin erfolgt die Messung von Gruppen, die zusätzlich mit dem Inhibitor der NADPH-Oxidase, DPI (Diphenyliodonium, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), und dem NO-Synthese-Inhibitor L-NMMA (N-monomethyl-L-arginin, 300  $\mu$ mol/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), je einmal mit IL-1 $\beta$  stimuliert und einmal ohne IL-1 $\beta$  als Kontrolle, sowie eine gänzlich unstimulierte Kontrolle. Insgesamt werden folgende Gruppen gemessen:

In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein.

DPI (5  $\mu\text{mol/l}$ , Diphenyleneidonium Chloride; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen NADPH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und hemmt eine wichtige  $\text{O}_2$ -Quelle im Zellstoffwechsel. Durch die vierte Messung mit IL-1 $\beta$  und DPI kann also auf die Bedeutung der  $\text{O}_2$ -Radikalsynthese im IL-1 $\beta$ -induzierten Inflammationsgeschehen zurückgeschlossen werden. Die fünfte Messung dient wiederum dem Vergleich bei alleiniger Stimulation mit DPI. In der sechsten Messung wird zusätzlich zu IL-1 $\beta$  der unspezifische Inhibitor aller NO-Synthasen, L-NMMA (N-monomethyl-L-arginin, 300  $\mu\text{mol/l}$ , Sigma, Deisenhofen, Deutschland) genutzt, um die Bedeutung des hochreaktiven NO bei dem IL-1 $\beta$ -induzierten Inflammationsgeschehen herauszustellen. Die siebte Messung dient dem Vergleich zur alleinigen Stimulation mit L-NMMA. Die unstimulierte Kontrollmessung in der achten Gruppe wurde mit 1 ml der Pufferlösung Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durchgeführt.

Nach einer Vorlaufzeit von 2 Minuten wird über einen Zeitraum von 60 Minuten im Abstand von jeweils 5 Minuten im Genios plate reader (Firma Genios Tecan) gemessen. Die Wellenlängen der Anregung und Emission entsprechen denen der Membranpotentialmessung. Es werden relative Zu- oder Abnahmen der Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.5 Messung der NO-Synthese**

Die Messung der NO-Synthese erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAF (Diaminofluorescein, Calbiochem, La Jolla, USA) nach einer Inkubation über 60 Minuten. Es wird wiederum auf 24-Well-Platten aufgeteilt und im Genios plate reader (Firma Genios Tecan) gemessen, indem die Fluoreszenz bei 490 nm Wellenlänge angeregt und die Emission bei 535 nm in Abständen von 5 Minuten über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen wird. Die Messung beginnt nach einer Vorlaufzeit von 2 Minuten.

In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit

eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein. Die unstimulierte Kontrollmessung in der vierten Gruppe wurde mit 1 ml der Pufferlösung HBSS durchgeführt. Es werden relative Zu- oder Abnahmen im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.6 Fura-2-Imaging für die Messung des intrazellulären Calciums**

Die Messungen des intrazellulären Calciums erfolgt mittels der von Tsien et al. beschriebenen Fura-2-Imaging-Methode [68]. Hierfür werden die HUVEC auf mit Gelatine vorbeschichteten Glasplättchen aufgebracht und für drei Tage im Brutschrank bei 37°C im Nährmedium RPMI kultiviert, bis ein konfluenten „Zellrasen“ gewachsen ist. Im folgenden wird eine Lösung aus 50 µg Fura-2 (Fura-2-acetoxymethylester, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in 160 µl DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hergestellt. Aus dieser Lösung werden jeweils 10 µl mit 1 ml Zellkulturmedium gemischt und das Glasplättchen über 60 Minuten inkubiert. Anschliessend wird das Glasplättchen aus der Lösung entnommen und in die für die Messung vorgesehene Kammer verbracht. Als Zellmedium wird in der Kammer HBSS mit 1.33 µmol/l  $\text{CaCl}_2$  verwandt. Die Messungen erfolgen unter einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland).

Fura-2 ist ein Komplexbildner mit  $\text{Ca}^{2+}$  und wird bei einer Wellenlänge von 340 und 380 nm zur Fluoreszenz angeregt. Diese Fluoreszenz wiederum wird bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Die Datenerfassung und -Auswertung erfolgt computergesteuert mit dem TILL photonics Imaging-System (TILL photonics, Martinsried, Deutschland), nachdem der Messbereich so markiert wurde, daß allein die Intensitätsveränderungen der Fluoreszenz der einzelnen Zellen gemessen wird. Hierbei wurden die beiden Wellenlängen von 340 nm und 380 nm zu einer Ratio verrechnet. Die Coverslips wurden nach einer Messzeit von 10 Minuten mit der jeweiligen Stimulationslösung versetzt.

In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Um die Bedeutung des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe

zusätzlich mit dem selektiven  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein. Durch die vierte Messung mit IL-1 $\beta$  und DPI kann auf die Bedeutung der O<sub>2</sub>-Radikalsynthese im IL-1 $\beta$ -induzierten Inflammationsgeschehen zurückgeschlossen werden. Die fünfte Messung dient wiederum dem Vergleich bei alleiniger Stimulation mit DPI. Die unstimulierte Kontrollmessung in der achten Gruppe wurde mit 1 ml der Pufferlösung Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durchgeführt. Es wird insgesamt über einen Zeitraum von 35 Minuten gemessen. Anschliessend wird ein „Photobleach“ durchgeführt, indem die Zellen über 15 Minuten mit einer Wellenlänge von 340 nm bestrahlt werden. Hierdurch wird der FURA-2-Farbstoff ausgebrannt. Durch eine folgende Nachmessung kann die eigene Strahlintensität der einzelnen Zellen im Hintergrund bestimmt und von der im Experiment gemessenen abgezogen werden [57]. Es werden relative Zu- oder Abnahmen im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.7 Adhäsionsversuch mittels Tritium-Thymidin-Uptake**

Das Adhäsionsverhalten von U-937 an HUVEC wird mittels Tritium-Thymidin-Uptake gemessen. Thymidin wird bei der DNA-Synthese der Zelle benötigt und von ihr aufgenommen. Stellt man der Zelle radioaktiv markiertes Thymidin zur Verfügung, so wird es in die Zell-DNA eingebaut.

Tritium ( $^3\text{H}$ ) ist das schwerste Wasserstoffisotop und zerfällt unter Aussendung von schwacher  $\beta$ -Strahlung. Die von ihm emittierten Elektronen werden indirekt über einen beta-counter (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) quantitativ gemessen.

Zunächst wird eine mit konfluentem U-937-Zellrasen bewachsene T75-Flasche (Becton, Dickinson, USA) aus der aktuellen Passage verwendet. Nach Zentrifugation werden die Zellen mit 80 ml RPMI resuspendiert und dann für 18 Std. mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (2  $\mu\text{l}$ / 10 ml RPMI) versetzt. Danach werden HUVEC der zweiten bis vierten Passage in 24-Well-Platten (Becton Dickinson, USA) mit Endothelial Basal Medium (EBM; Promo Cell, Heidelberg,

Deutschland) ausgesät. Nach konfluentem Wachstum werden die Zellen in folgende Gruppen aufgeteilt und über 4 Stunden mit den jeweiligen Stimulantien inkubiert: In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein. Die unstimulierte Kontrollmessung in der vierten Gruppe wird mit 1 ml der Pufferlösung HBSS durchgeführt.

Die radioaktiv markierten Monozyten werden zentrifugiert und mit RPMI resuspendiert (2,5 ml RPMI pro 24-well-Platte mit HUVEC), anschließend 100  $\mu$ l der Suspension zu den am Kulturboden adhären HUVEC's gegeben. Nachdem den Monozyten 6 Stunden zur Adhäsion an die HUVEC gegeben werden, wird die Lösung vollständig entnommen. Durch zweimaliges Waschen mit je 250  $\mu$ l PBS werden nicht-adhären Monozyten entfernt. Der verbliebene Rest wird mit 250  $\mu$ l NaOH [0,1 M] lysiert, nach Ablösen vom Boden der 24-Well-Platten in sogenannte „Szintigraphie-Vials“ überführt und anschließend im beta-counter (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland), wie oben beschrieben, die Lichtemission gemessen. Es werden relative Zu- oder Abnahmen der Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.8 BCECF-Adhäsionsversuch**

Um die gesteigerte Adhäsion durch IL-1 $\beta$  und die Rolle des BK<sub>Ca</sub> in einem zweiten Verfahren zu bestätigen, wird ein statischer BCECF-Adhäsionsassay durchgeführt.

BCECF-AM (Biscarboxyethyl-5-carboxyfluorescein, Molecular Probes, Eugene, USA) ist ein fluoreszierendes, zellmembrangängiges Molekül. Indem die U-937-Monozyten mit BCECF beladen werden, kann nach den Stimulationsversuchen die Adhärenz an HUVEC gemessen werden.

Zunächst werden HUVEC auf 24-Well-Platten (Becton, Dickinson, USA) ausgesät. Pro well werden hierzu 0,25 Millionen Zellen benötigt. Die Zählung wird in der Neubaukammer unter dem Lichtmikroskop durchgeführt, und

anschließend wird je nach vorhandener Konzentration eine Verdünnung vorgenommen. Die HUVEC werden wie folgt über 4 Stunden im Brutschrank stimuliert. In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein.

DPI (5  $\mu$ mol/l; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen NADPH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und hemmt eine wichtige O<sub>2</sub>-Quelle im Zellstoffwechsel. Durch die vierte Messung mit IL-1 $\beta$  und DPI kann also auf die Bedeutung der O<sub>2</sub>-Radikalsynthese im IL-1 $\beta$ -induzierten Inflammationsgeschehen zurückgeschlossen werden. Die fünfte Messung dient wiederum dem Vergleich bei alleiniger Stimulation mit DPI. In der sechsten Messung wird zusätzlich zu IL-1 $\beta$  der unspezifische Inhibitor aller NO-Synthasen, L-NMMA (300  $\mu$ mol/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) genutzt, um die Bedeutung des hochreaktiven NO bei dem IL-1 $\beta$ -induzierten Inflammationsgeschehen herauszustellen. Die siebte Messung dient dem Vergleich zur alleinigen Stimulation mit L-NMMA. Die unstimulierte Kontrollmessung in der achten Gruppe wurde mit 1 ml der Pufferlösung Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durchgeführt.

Anschließend wird der Fluoreszenzfarbstoff BCECF (50  $\mu$ l) mit 20  $\mu$ l DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), das als Trägersubstanz für die Zellaufnahme dient, versetzt, über 15 Minuten unter Lichtabschluss eingefroren und dann in 15 ml RPMI gegeben.

Die konfluent gewachsenen U-937 in einer T75-Flasche (Becton Dickinson, USA) aus der aktuellen Passage werden zentrifugiert, in 5 ml RPMI, 5% FCS und 1% PS resuspendiert und verdünnt, bis sich 6,5 Millionen U-937 in 5ml RPMI befinden.

Für jede der 8 Stimulationsgruppen wird ein Falconröhrchen mit 5 ml der U-937 Lösung mit jeweils 1,5 ml der Lösung aus RPMI + BCECF versetzt und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationsphase werden zweimalig die Ansätze zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit

5 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) gespült und dann mit 6,5 ml RPMS versetzt. Das Medium der 24-Well-Platten mit den unterschiedlich stimulierten HUVEC wird verworfen und mit der Pipette je well 250 µl der U-937 Lösung hinzugegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation der Zellsuspension wird die Zellsuspension abgegossen. Die am Boden der Wells haftenden HUVEC sind nun mit den U-937-Monozyten adhärirt. Um nicht-haftende U-937 aus dem Well zu entfernen, wird dreimalig mit je 0,5 ml PBS pro Well gewaschen. Folgend werden die Zellen lysiert, indem 500 µl/well NaOH (1mol, Natriumhydroxid) zugegeben werden und hierdurch der Fluoreszenzfarbstoff BCECF freigesetzt wird. Da jeder mit BCECF beladene Monozyt die gleiche Menge des BCECF aufgenommen hat, kann über eine Fluoreszenzmessung im Genios plate reader ( Firma Genios Tecan) bei 340nm auf die Menge der adhärirten Monozyten zurückgeschlossen werden. Es werden relative Zu- oder Abnahmen der Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.9 Fluoreszenzmessung der Adhäsionsmoleküle I-CAM und V-CAM mittels Durchflussszytometrie**

Bei der Durchflussszytometrie passieren einzelne Zellen einen Laserstrahl. Die zurückgeworfenen Strahlen werden von einem Detektor eingefangen und gemessen. Durch dieses Verfahren können zum einen Zellarten, wie Monozyten und Lymphozyten, nach verschiedenen Charakteristika unterschieden werden. Zum anderen können zum Beispiel zellständige Adhäsionsmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern beladen werden und nachfolgend deren Häufigkeit auf der Zelloberfläche gemessen werden. Wir untersuchen mit dieser Methode die Expression von I-CAM (interzelluläres Adhäsionsmolekül) und V-CAM (vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül) der HUVEC. Diese werden in einer mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) beschichteten 25 cm<sup>2</sup>-Plastikpetrischale ausgesät. Nach konfluentem Wachstum wird das Nährmedium abgesaugt, die HUVEC 4 Stunden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>- Gehalt von 5% im Brutschrank inkubiert und in folgende Gruppen aufgeteilt:

In der ersten Gruppe erfolgt die alleinige Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Um die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> herauszustellen, wird in der zweiten Gruppe zusätzlich mit dem selektiven BK<sub>Ca</sub>-Blocker IbTX (100 nmol/l) stimuliert. Damit eine sekundäre, toxische Wirkung des IbTX ausgeschlossen werden kann, folgt in der dritten Versuchsgruppe eine Messung mit IbTX allein.

DPI (Diphenyleneidonium Chloride; 5  $\mu$ mol/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen NADPH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und hemmt eine wichtige O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Quelle im Zellstoffwechsel. Durch die vierte Messung mit IL-1 $\beta$  und DPI kann also auf die Bedeutung der O<sub>2</sub>-Radikalsynthese im IL-1 $\beta$ -induzierten Adhäsionsgeschehen zurückgeschlossen werden. Die fünfte Messung dient wiederum dem Vergleich bei alleiniger Stimulation mit DPI. In der sechsten Messung wird zusätzlich zu IL-1 $\beta$  der unspezifische Inhibitor aller NO-Synthasen, L-NMMA (300  $\mu$ mol/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) genutzt, um die Bedeutung des hochreaktiven NO bei IL-1 $\beta$  herauszustellen. Die siebte Messung dient dem Vergleich zur alleinigen Stimulation mit L-NMMA. In der achten Gruppe wird durch Zugabe des Ca<sup>2+</sup>-Chelators BAPTA (Bi-aminophenoxyethan, 10  $\mu$ mol/l; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) die Rolle des Ca<sup>2+</sup> bei der Stimulation und nachfolgend die alleinige Wirkung von BAPTA gemessen. Die Kontrollmessung wird mit 1 ml der Pufferlösung Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) durchgeführt. Alle Messgruppen werden zusätzlich in 3 Untergruppen aufgeteilt. In der ersten Untergruppe werden die HUVEC mit I-CAM (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA), in der zweiten Gruppe mit V-CAM (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) beladen. Als drittes folgt die unstimulierte Kontrollgruppe.

Die Inkubation wird durch Absaugen der Inkubationslösung und zweimaliges Spülen mit HBSS beendet. Nach Ablösen der HUVEC mit 4 ml Trypsin in EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) werden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Das Ablösen der Zellen wird durch Zugabe von 1 ml FCS gestoppt und die Zellen in 10 ml Röhrchen überführt. Die Petrischalen werden je zweimal mit 4 ml HBSS nachgewaschen und die restlichen anhaftenden Zellen in das Falconröhrchen überführt. Dann werden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen jeweils mit

1 ml RPMI resuspendiert. Die Zelllösungen werden in einer Neubaukammer gezählt und anschließend je nach Zelldichte mit RPMI versetzt, bis in jeder der Gruppen eine Dichte von 2.000.000 Zellen pro ml vorhanden sind. Je 100 µl der einzelnen Lösungen werden in eine 96-Well-Rundbodenplatte (Falcon, Beckton Dickinson, USA) überführt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das zurückbleibende Zellpellet gelockert. Unspezifische Bindungen werden, um Fehlmessungen zu vermeiden, mit 20 µl Immunglobulin (Octapharma, Lachen, Schweiz) abgefangen. Nun werden je 5 µl Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) gegen die zellulären Adhäsionsmoleküle in die jeweiligen Wells gegeben. Die 96-Well-Platte wird 30 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend werden die einzelnen Wells je dreimal mit der HBSS-Pufferlösung gewaschen. Die gleichen Schritte folgen nun mit einem fluoreszierenden Maus-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA), der sich an I-CAM und V-CAM bindet. Zur Messung wurde das Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) mit der Kontrollgruppe ohne zelluläre Adhäsionsmoleküle kalibriert. Die weiteren Gruppen werden nun mit cell-wash (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in die zum Durchflusszytometer passenden Glasröhrchen überführt [109]. Es werden relative Zu- oder Abnahmen der Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangswert gemessen.

## **2.10 Statistik**

Die dargestellten Daten sind grundsätzlich Ergebnisse aus Mittelwerten mehrerer Messreihen, die mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Zudem ist der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch den ANOVA-Test und einen anschließenden post-hoc-Tuckey-Test ermittelt, wobei Unterschiede von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurden. Die statistische Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows (Version 12.0).

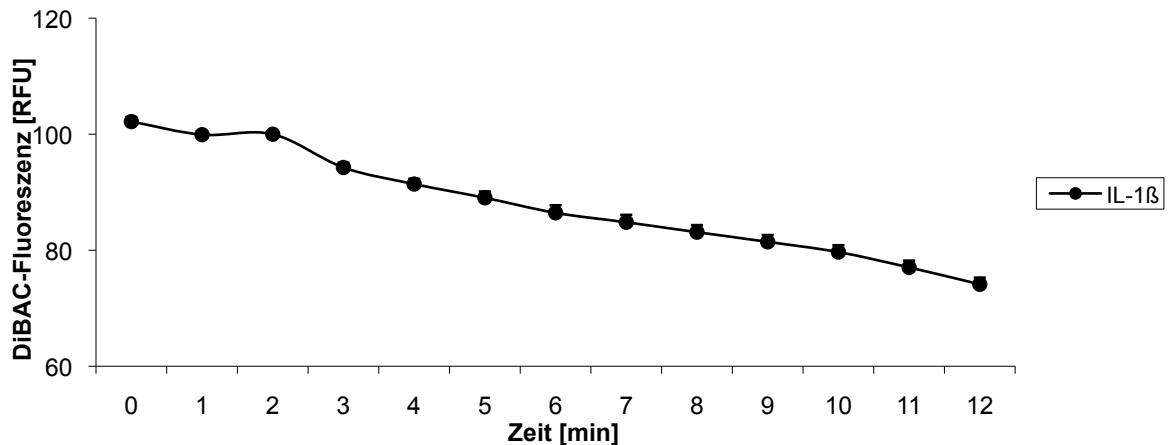
### **3. Ergebnisse**

Im Abschnitt 3.1 werden zunächst die Ergebnisse der Membranpotentialmessungen beschrieben, unter 3.2 die Ergebnisse der Messung des intrazellulären Calciums und folgend unter 3.3 die der NO-Messungen. Im Abschnitt 3.4 werden die Resultate der Radikalmessungen, anschließend im Abschnitt 3.5 der Adhäsionsversuch mit Monozyten durch den Tritium-Thymidin-Uptake und unter 3.6 mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF dargestellt. Im Abschnitt 3.7 wird auf die durchflusszytometrischen Messungen der Adhäsionsmoleküle I-CAM und V-CAM eingegangen.

#### **3.1 Messung des Membranpotentials der HUVEC**

##### **3.1.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf das Membranpotential**

Das Membranpotential hat einen starken Einfluss auf die Regulation der Endothelzelle. Im folgenden Versuch wird der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf das Membranpotential von HUVEC untersucht. Die Veränderung des Membranpotentials wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC (1  $\mu$ mol/l) gemessen. Unter Einwirkung des IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) kommt es zu einer signifikanten Reduktion der DiBAC-Fluoreszenz auf 74% im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Stimulation (n=3; p<0,05 vs. Kontrollgruppe). Dies entspricht einer durch IL-1 $\beta$  hervorgerufenen Hyperpolarisation der Zelle. In der folgenden Abbildung 1 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb.1: Messung des Membranpotentials von HUVEC mittels DiBAC nach Stimulation mit IL-1 $\beta$**

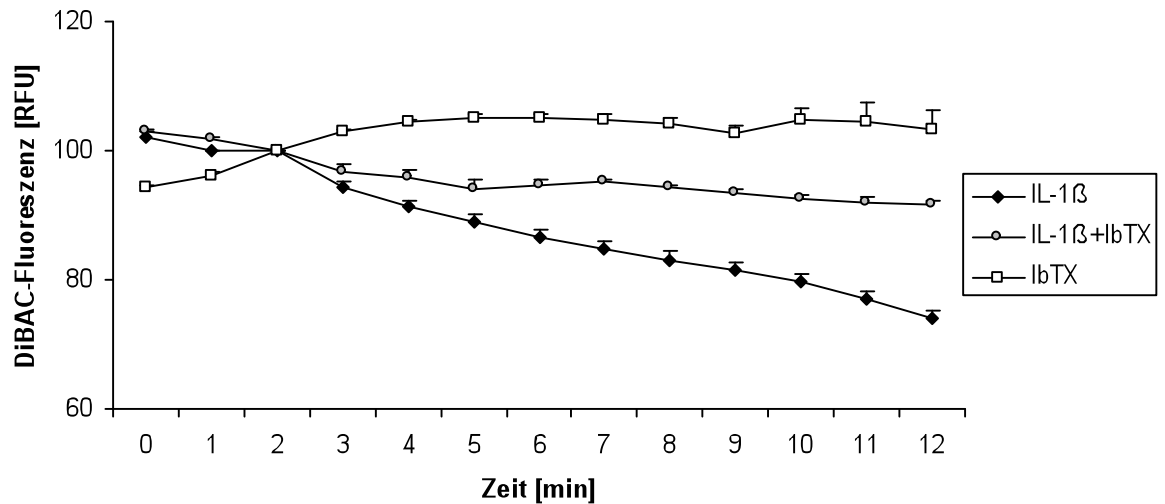
Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC inkubierten Zellen werden mit IL-1 $\beta$  stimuliert und das Membranpotential gemessen. IL-1 $\beta$  führt zu einer Hyperpolarisation von 74% im Vergleich zur Kontrollmessung.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt

n=3, \* p < 0.05 vs control; DiBAC [1  $\mu$ mol/l], IL-1 $\beta$  [10 ng/ml]

### 3.1.2 Einfluß des BK<sub>Ca</sub> auf die IL-1 $\beta$ -induzierte Hyperpolarisation

Im folgenden Versuch werden die mit DiBAC beladenen Zellen zum einen mit IL-1 $\beta$ , zum anderen mit IL-1 $\beta$  und dem Inhibitor des BK<sub>Ca</sub>, IbTX stimuliert. Aufgrund der selektiven Hemmung des BK<sub>Ca</sub> durch IbTX kann eine Aussage über dessen Beteiligung bei der Hyperpolarisation getroffen werden. Wie unter 3.1.1 gezeigt, führt IL-1 $\beta$  [10ng/ml] zu einer Hyperpolarisation der HUVEC von 74% im Vergleich zur Kontrolle. Diese wird durch den BK<sub>Ca</sub>-Inhibitor IbTX signifikant verringert. Wird sowohl mit IL-1 $\beta$ , als auch mit IbTX stimuliert, beträgt die über DiBAC-Fluoreszenz gemessene Hyperpolarisation 91% der Kontrolle (n=3; p<0,05 vs. Kontrollgruppe). Die durch IL-1 $\beta$  induzierte Hyperpolarisation der HUVEC ist also abhängig vom BK<sub>Ca</sub>. Eine Stimulation mit IbTX allein führt zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodaß eine toxische Wirkung bezüglich der Membranpotentialauswirkung ausgeschlossen ist. In der folgenden Abbildung 2 sind die bei der Messung erhobenen Daten graphisch dargestellt.



**Abb.2: Einfluss des BKCa auf die durch IL-1 $\beta$  induzierte Hyperpolarisation von HUVEC**

Die HUVEC werden vor Stimulation mit IL-1 $\beta$  mit dem spezifischen BK<sub>Ca</sub>-Inhibitor IbTX inkubiert, die Hyperpolarisation wird durch Blockade des BK<sub>Ca</sub> auf 91% der Kontrolle reduziert.

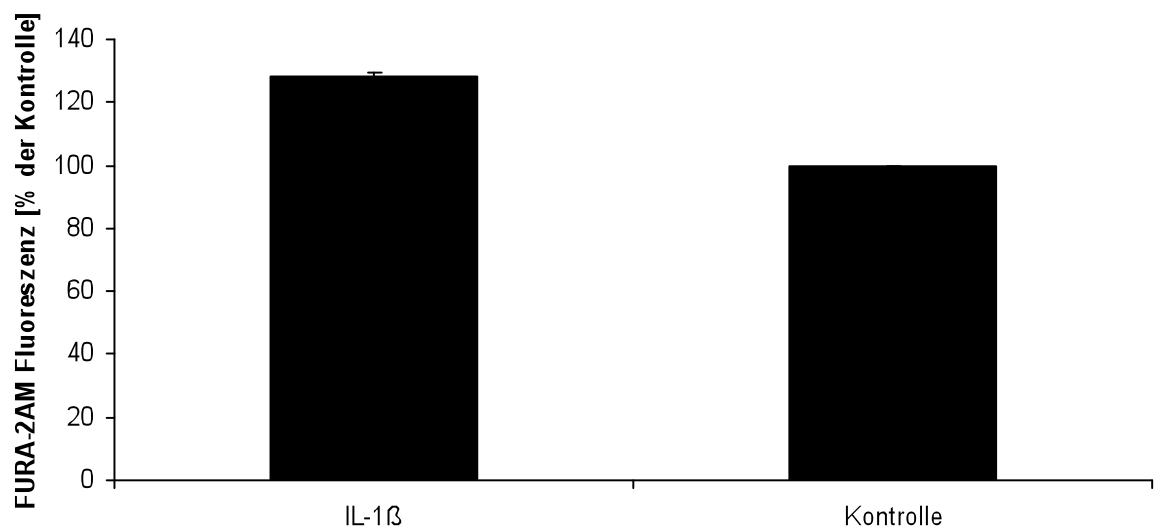
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=5; \* p < 0.05 IL-1 $\beta$  vs control, # p < 0.05 IL-1 $\beta$  + IbTX vs IL-1 $\beta$ ; DiBAC [1  $\mu$ mol/l], IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l]

### 3.2 Messung des intrazellulären Calciums in HUVEC

#### **3.2.1 Einfluss von Interleukin-1 $\beta$ auf das intrazelluläre Calcium**

Nun wird untersucht, ob Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führt. Die Messungen des intrazellulären Calciums werden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2AM durchgeführt. Durch Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  kann eine signifikante Steigerung der Fura-2AM-Fluoreszenz, also des intrazellulären Calciums, von 128 % im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 35 Minuten gemessen werden. IL-1 $\beta$  hat demzufolge einen Einfluss auf die Konzentration des intrazellulären Calciums. In der folgenden Abbildung 3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb.3: Messung des intrazellulären Calciums in HUVEC mit FURA-2AM nach Stimulation mit IL-1 $\beta$**

Die HUVEC werden nach Inkubation mit FURA-2AM mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums von 128% im Vergleich zur Kontrolle.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=5; \* p < 0.05 vs control; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml]

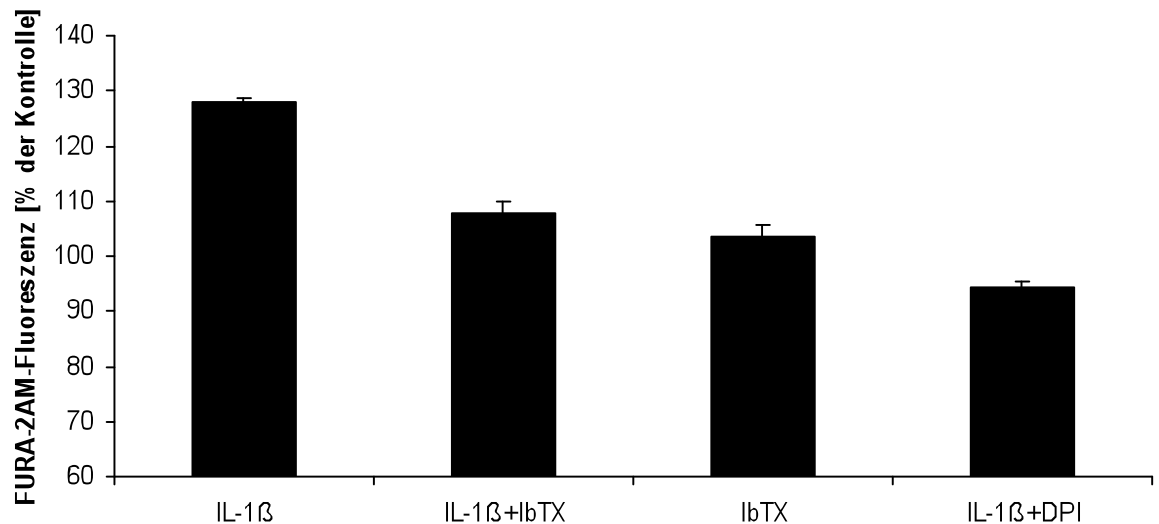
### 3.2.2 Einfluss des BK<sub>Ca</sub> und der NADPH-Oxidase auf den IL-1 $\beta$ -induzierten Anstieg des intrazellulären Calciums

Da IL-1 $\beta$  zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führt, wird zunächst untersucht, inwiefern hierbei der BK<sub>Ca</sub> eine Bedeutung hat. Im folgenden Versuch werden die mit FURA-2AM beladenen Zellen zum einen mit IL-1 $\beta$ , zum anderen mit IL-1 $\beta$  und IbTX stimuliert. Die durch IL-1 $\beta$  induzierte Steigerung des intrazellulären Calciums auf 128% der Kontrolle, gemessen nach 35 Minuten, kann durch IbTX signifikant auf 107% gesenkt werden, ist also abhängig vom BK<sub>Ca</sub>. Auch kann gezeigt werden, daß die Stimulation mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor DPI und IL-1 $\beta$  ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des intrazellulären Calciums, im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-1 $\beta$ , auf 94% der Kontrolle führt. Die alleinige Stimulation mit IbTX

beziehungsweise DPI führt zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß der IL-1 $\beta$ -induzierte Anstieg des intrazellulären Calciums abhängig vom BK<sub>Ca</sub> und der NADPH-Oxidase ist.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 4 graphisch dargestellt.



**Abb.4: Einfluss des BK<sub>Ca</sub> und der NADPH-Oxidase auf den IL-1 $\beta$ -induzierten Anstieg des intrazellulären Calciums in HUVEC**

Der durch IL-1 $\beta$  induzierte Anstieg des intrazellulären Calciums von 128% der Kontrolle ist durch IbTX und DPI hemmbar, also abhängig vom BK<sub>Ca</sub> und der NADPH-Oxidase.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, Messzeitpunkt nach 35 Minuten.

n=8; \* p <0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l], DPI [5  $\mu$ mol/l]

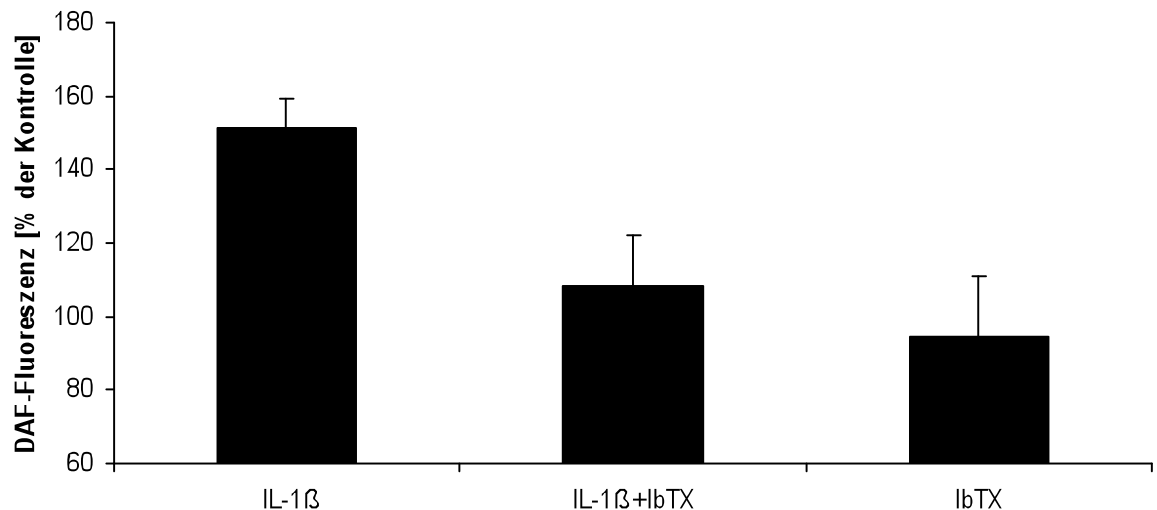
### **3.3 Messung der NO-Synthese von HUVEC**

#### **3.3.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ und des BK<sub>Ca</sub> auf die zelluläre NO-Synthese.**

Einige Autoren, zum Beispiel Rosenkranz et al. [69] beschreiben einen Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die endotheliale NO-Synthese. Die Messung der NO-Synthese erfolgt mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DAF nach 60 Minuten Stimulationszeit. Durch Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  konnte eine signifikante Steigerung der DAF-Fluoreszenz auf 151% im Vergleich zur

Kontrolle gemessen werden, also eine deutliche Erhöhung der NO-Konzentration.

Auch beschreiben Rosenkranz et al einen Einfluss des intrazellulären Calciums auf die IL-1 $\beta$ -induzierte NO-Synthese. In meinen Experimenten konnte ich aufzeigen, daß die IL-1 $\beta$ -induzierte Steigerung des NO durch zusätzliche Gabe von IbTX signifikant reduziert werden kann, also abhängig vom BK<sub>Ca</sub> ist, der ja entscheidenden Einfluss auf die Calciumhomöostase hat. Eine alleinige Gabe von IbTX erbrachte keine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle. In der folgenden Abbildung 5 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb.5: Einfluss des BK<sub>Ca</sub> auf die IL-1 $\beta$ -induzierte NO-Synthese von HUVEC**

IL-1 $\beta$  führt zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthese auf 151% der Kontrolle. Durch gleichzeitige Inhibition des BK<sub>Ca</sub> mit IBX beträgt die Steigerung lediglich 108% der Kontrolle.

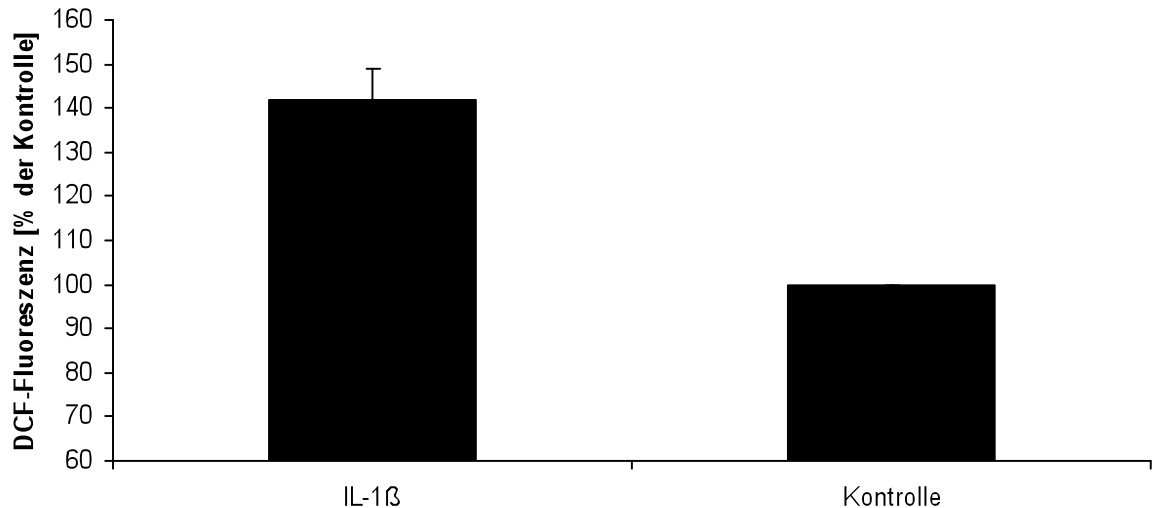
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, Messzeitpunkt nach 60 min.

n=5; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l]

### **3.4 Messung der reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)**

#### **3.4.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die zelluläre ROS-Synthese**

Die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies ist ein wesentlicher Faktor der endothelialen Dysfunktion. Untersuchungen zeigen zum Beispiel für das inflammatorische Thrombin eine Aktivierung der ROS-Synthese [66]. Um die Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die ROS-Synthese zu untersuchen, erfolgte eine Messreihe mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF. Die Messungen erfolgten nach 15 Minuten. Durch Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  konnte eine signifikante Steigerung der DCF-Fluoreszenz von 141% im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. IL-1 $\beta$  ist also ein weiterer Aktivator der ROS-Synthese. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 6 graphisch dargestellt.



**Abb.6: Messung der ROS-Synthese mittels DCF nach Stimulation mit IL-1 $\beta$**

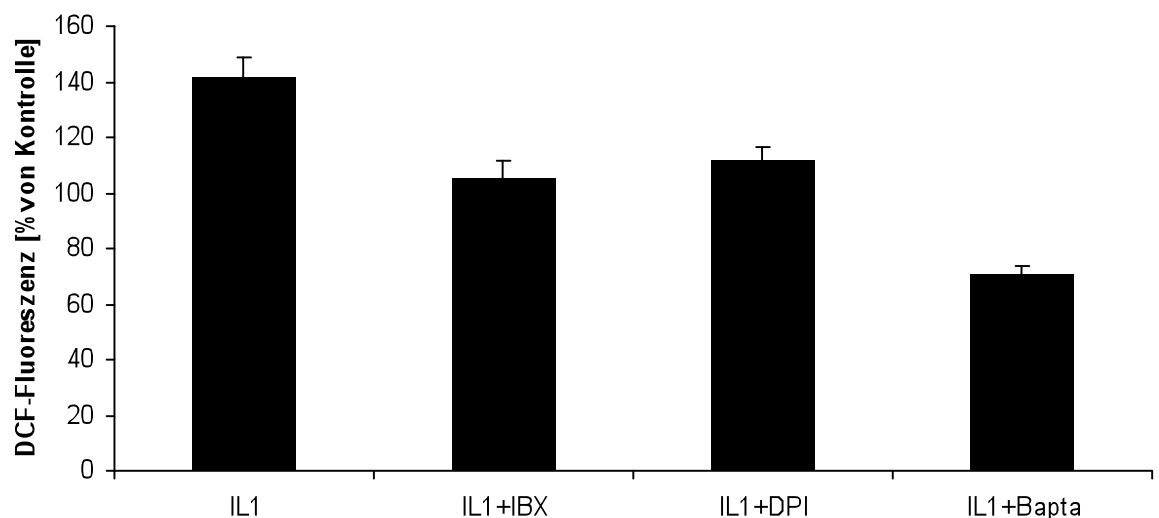
IL-1 $\beta$  führt zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Synthese auf 141% im Vergleich zur Kontrolle.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, Messzeitpunkt nach 60 min

n=5; \* p <0.05 vs control; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml]

### 3.4.2 Einfluss des $BK_{Ca}$ , des intrazellulären Calciums und der NADPH-Oxidase auf die IL-1 $\beta$ -induzierte ROS-Synthese

Da IL-1 $\beta$  zu einer Steigerung der ROS führt, interessiert nun, wie sie zustande kommt. Werden die HUVEC sowohl mit IL-1 $\beta$ , als auch mit IbTX stimuliert, zeigt sich eine signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ -induzierten ROS-Synthese auf 105%. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  und DPI erfolgt eine signifikante Reduktion auf 111% im Vergleich zur IL-1 $\beta$ -stimulierten Kontrollgruppe. Die IL-1 $\beta$ -induzierte ROS-Synthese ist also abhängig vom  $BK_{Ca}$  und von der NADPH-Oxidase. Auch konnte ich zeigen, dass die Bindung von intrazellulärem Calcium mittels BAPTA zu einer ebenfalls signifikanten Reduktion der ROS-Synthese auf 70% führt. Die Messung erfolgt 60 Minuten nach Stimulation. Die alleinige Gabe von IbTX, DPI und BAPTA erbringt keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Abbildung 7 graphisch dargestellt.



**Abb.7: Einfluss des  $BK_{Ca}$ , der NADPH-Oxidase und des intrazellulären Calciums auf die IL-1 $\beta$ -induzierte ROS-Synthese**

Der  $BK_{Ca}$ , gehemmt durch IbTX, führt zu einer Reduktion auf 105%, die Hemmung der NADPH-Oxidase zu einer Reduktion auf 111%, die Bindung des intrazellulären Calciums auf 70% der nicht-stimulierten Kontrollgruppe.

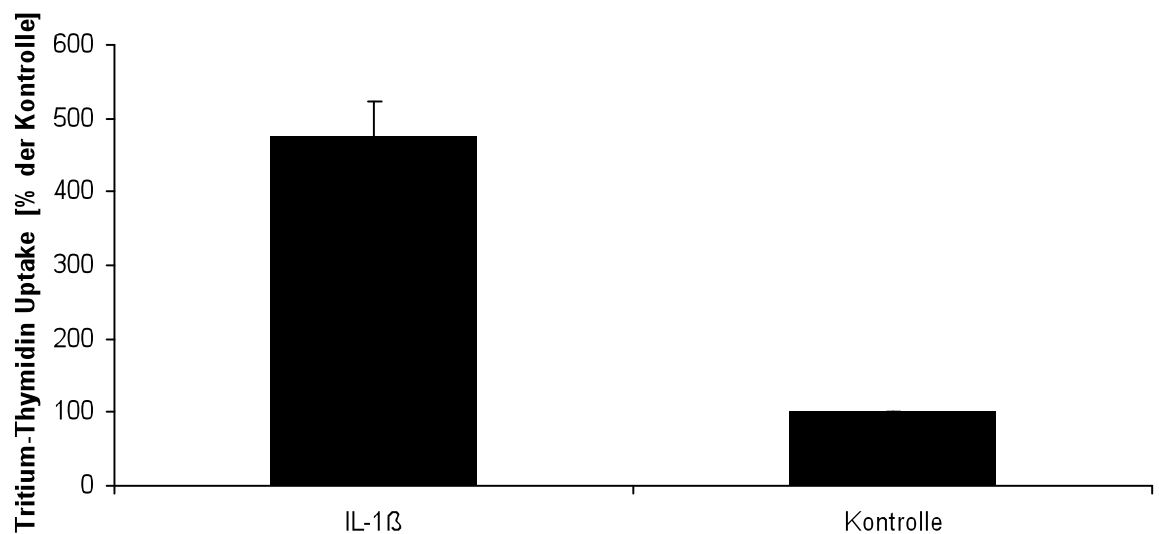
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, Messzeitpunkt nach 60 min.

n=5; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l] DPI [5  $\mu$ m], BAPTA [10  $\mu$ mol/l]

### **3.5 Messung der Adhäsion von U-937-Monozyten an HUVEC mittels Tritium-Thymidin-Uptake**

#### **3.5.1 Einfluss der Adhärenz von U-937-Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit IL-1 $\beta$**

Bei der Arterioskleroseentstehung ist die monozytäre Adhäsion an Endothelzellen ein bedeutender Schritt. In den folgenden Versuchen wird die von anderen Autoren gezeigte Adhäsionssteigerung durch IL-1 $\beta$  bestätigt und die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> unter 3.5.2 in diesem Geschehen herausgestellt. Die Messung der Adhäsion von U-937 an HUVEC erfolgt mittels Tritium-Thymidin-Uptake nach einer Inkubation von 4 Stunden. Es wird gezeigt, daß die Stimulation von HUVEC mit IL-1 $\beta$  zu einer deutlich gesteigerten Adhäsion von 476 % im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 8 graphisch dargestellt.



**Abb.8: Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die monozytäre Adhäsion durch Stimulation der HUVEC im Tritium-Thymidin-Uptake**

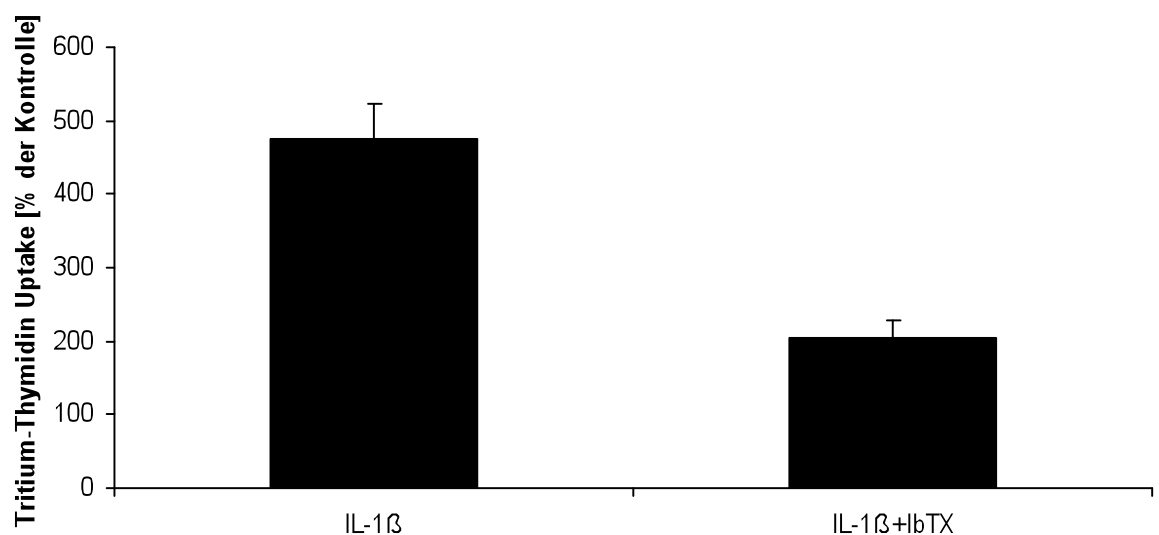
IL-1 $\beta$  führt zu einer signifikanten Adhäsionssteigerung auf 476% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p <0.05 vs control; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml]

### 3.5.2 Rolle des BK<sub>Ca</sub> bei der gesteigerten Adhäsion von U-937-Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit IL-1 $\beta$

Die vorangestellte Erkenntnis der gesteigerten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ist gut etabliert. Im folgenden Versuch wird dargestellt, dass der BK<sub>Ca</sub> wesentlichen Einfluss auf dieses Geschehen hat. Wird der BK<sub>Ca</sub> durch Gabe von IbTX blockiert, wird die Adhäsionssteigerung der HUVEC von 476% auf 204% der Kontrolle supprimiert. Diese neue Rolle des BK<sub>Ca</sub> weist auf eine Bedeutung bei der Signaltransduktion der durch IL-1 $\beta$  induzierten Adhäsion hin. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die alleinige Gabe von IbTX erbrachte mit 103 % keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb.9: Einfluss des BK<sub>Ca</sub> auf die IL-1 $\beta$ -induzierte Adhäsion von U-937 Monozyten an HUVEC im Tritium-Thymidin Uptake**

Durch Hemmung des BK<sub>Ca</sub> mit IbTX wird die Adhäsionssteigerung durch IL-1 $\beta$  auf 204 % der unstimulierten Kontrolle gesenkt.

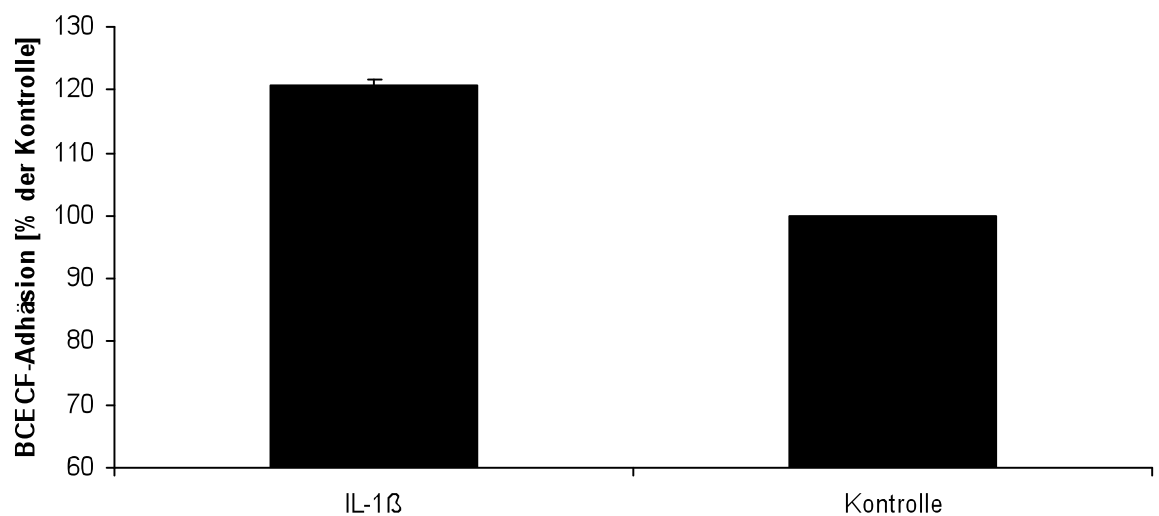
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX[100 nmol/l]

### **3.6 Messung der Adhäsion von U-937-Monozyten an HUVEC mittels BCECF-Adhäsionsassay**

#### **3.6.1 Einfluss auf die monozytäre Adhäsion durch mit Interleukin-1 $\beta$ stimulierte HUVEC**

Bereits im vorangestellten Versuch wird die Adhäsionssteigerung durch IL-1 $\beta$  von U-937-Monozyten an HUVEC gezeigt. Im folgenden Versuch wird mittels einer zweiten Methode das Resultat bestätigt. Die Messung mittels BCECF erfolgt nach einer Inkubation von 4 Stunden. Es wird gezeigt, daß die Stimulation von HUVEC mit IL-1 $\beta$  zu einer signifikant gesteigerten Adhäsion von 120% im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 10 graphisch dargestellt.



**Abb.10 : Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die monozytäre Adhäsion im BCECF-Adhäsionsassay nach Stimulation der HUVEC**

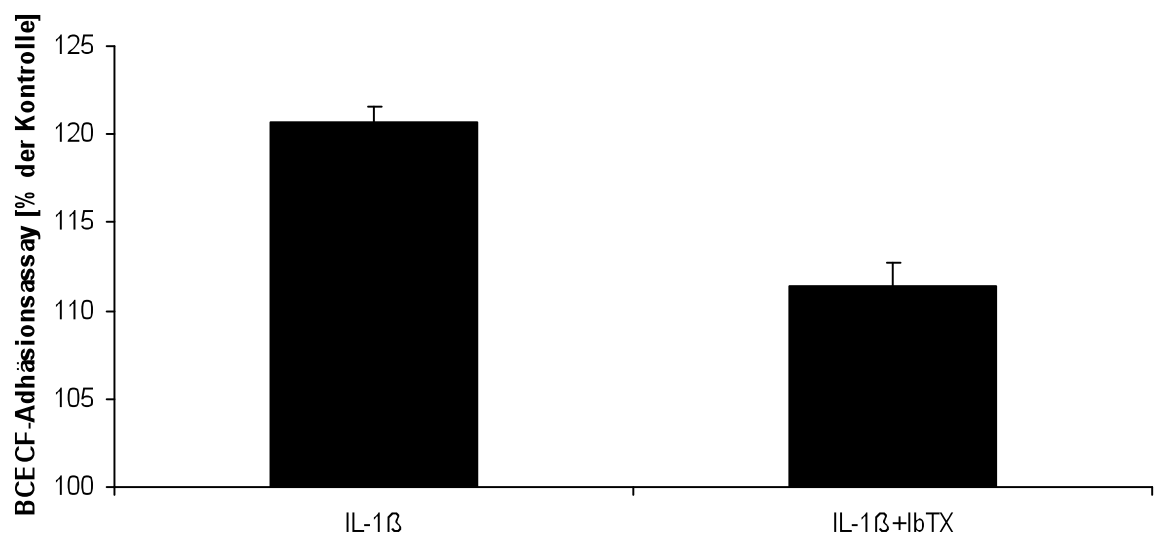
IL-1 $\beta$  führt zu einer signifikanten Adhäsionssteigerung auf 120% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p <0.05 vs control; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml]

### 3.6.2 Rolle des $BK_{Ca}$ bei der gesteigerten Adhäsion an mit IL-1 $\beta$ stimulierten HUVEC

Es wird gezeigt, daß die durch IL-1 $\beta$  induzierte Adhäsionssteigerung von U-937-Monozyten an HUVEC durch IbTX signifikant auf 111% der unstimulierten Kontrolle reduziert wird, also abhängig ist vom  $BK_{Ca}$ . Hiermit wird das aus dem BCECF-Adhäsionsassay ermittelte Resultat bestätigt. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 11 graphisch dargestellt. Die alleinige Gabe von IbTX erbrachte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb.11: Messung der Adhäsion von U-937-Monozyten an mit IL-1 $\beta$ -stimulierten HUVEC mittels BCECF-Adhäsionsassay; Einfluss des  $BK_{Ca}$**

Durch Hemmung des  $BK_{Ca}$  mit IbTX wird die Adhäsionssteigerung von 120% auf 111% der Kontrolle gesenkt.

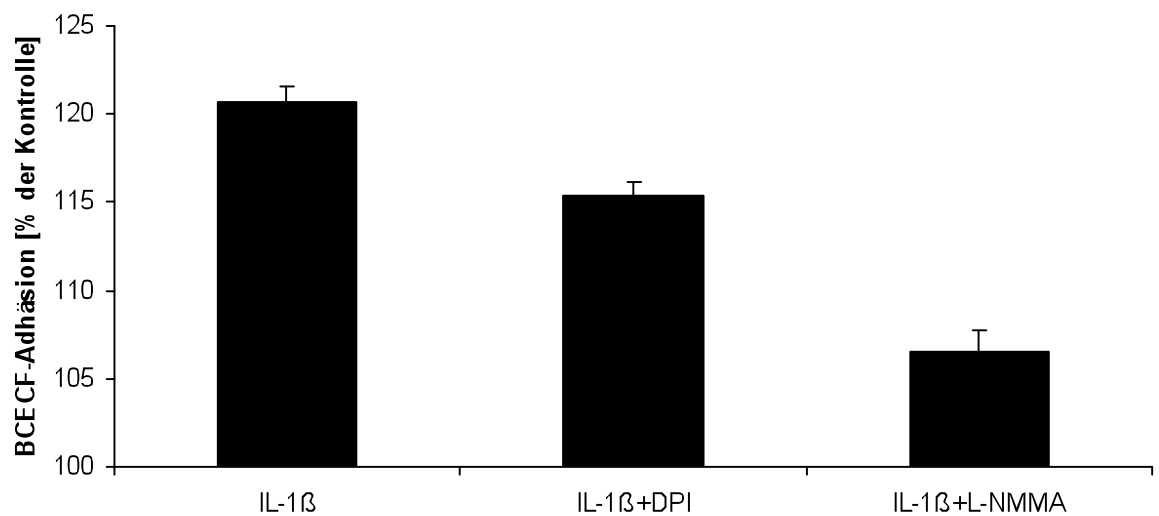
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p <0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l]

### 3.6.3 Rolle der NADPH-Oxidase und der endothelialen NO-Synthase bei der IL-1 $\beta$ induzierten Adhäsion von Monozyten

Die NADPH-Oxidase und die endotheliale NO-Synthase sind Enzyme, denen in der Arterioskleroseentstehung eine wesentliche Rolle durch Bildung von Radikalen zukommt. Im Folgenden wird Ihre Bedeutung im Rahmen der IL-1 $\beta$ -

induzierten Adhäsionssteigerung mit dem BCECF-Adhäsionsassay untersucht. Es wird gezeigt, daß die Steigerung der Adhäsion durch IL-1 $\beta$  durch den NADPH-Oxidase-Hemmstoff DPI signifikant auf 115 % der Kontrolle gesenkt werden kann. Der eNOS-Inhibitor L-NMMA führt zu einer Senkung der Adhäsion auf 106 % der Kontrollmessung. Sowohl die NADPH-Oxidase, als auch die eNOS scheinen bei der IL-1 $\beta$ -induzierten Adhäsionssteigerung beteiligt zu sein. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 12 graphisch dargestellt. Die alleinige Gabe von DPI oder L-NMMA führte zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb.12: Messung der Adhäsion von U-937-Monozyten an mit IL-1 $\beta$  stimulierten HUVEC mittels BCECF-Adhäsionsassay; Einfluss der NADPH-Oxidase und der eNOS**

Durch Hemmung der NADPH-Oxidase mit DPI wird die Adhäsionssteigerung durch IL-1 $\beta$  auf 115%, bei Hemmung der eNOS durch L-NMMA auf 106 % der Kontrolle reduziert.

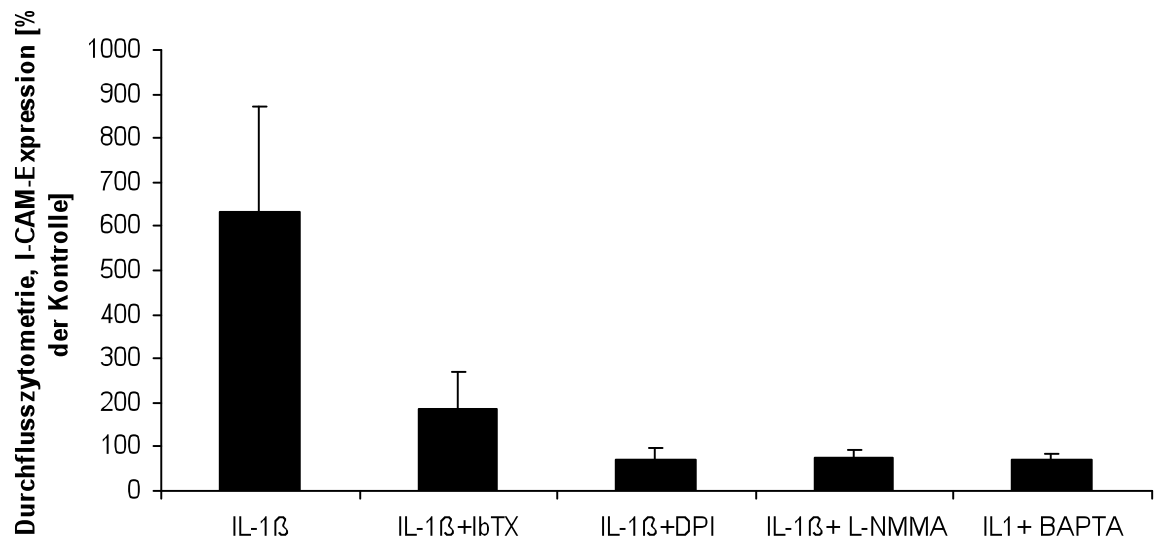
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], DPI [5  $\mu$ m], L-NMMA [300  $\mu$ mol/l]

### **3.7 Messung der zellulären Adhäsionsmoleküle I-CAM und V-CAM auf HUVEC mittels Durchflusszytometrie**

#### **3.7.1. Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls I-CAM**

Die Bedeutung zellulärer Adhäsionsmoleküle für die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ist gut etabliert [80]. Die Messung des Einflusses von IL-1 $\beta$  auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls I-CAM erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Durch Stimulation der HUVEC mit IL-1 $\beta$  kann eine Steigerung der Expression von I-CAM im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Diese Steigerung konnte durch IbTX signifikant reduziert werden. Auch eine Hemmung der NADPH-Oxidase durch DPI führte zu einer starken Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten Expression, ebenso wie die Hemmung der eNOS durch L-NMMA und der Bindung des intrazellulären Calciums durch den Calciumchelator BAPTA. Die alleinige Gabe von IBX, DPI, L-NMMA sowie BAPTA brachte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle und wird in der Abbildung nicht gezeigt. Die Untersuchung zeigt, daß die in den Vorversuchen nachgewiesene IL-1 $\beta$  induzierte Adhäsionssteigerung zumindest teilweise über das interzelluläre Adhäsionsmolekül I-CAM ermöglicht wird. Hierbei scheint der BK<sub>Ca</sub> ebenso eine Rolle zu spielen, wie die Radikalbildner NADPH-Oxidase und eNOS, sowie das intrazelluläre Calcium. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Abbildung 13 graphisch dargestellt.



**Abb.13: Messung der IL-1 $\beta$  induzierten I-CAM-Expression von HUVEC; Einfluss des BK<sub>Ca</sub>, der NADPH-Oxidase, der eNOS und des intrazellulären Calciums**

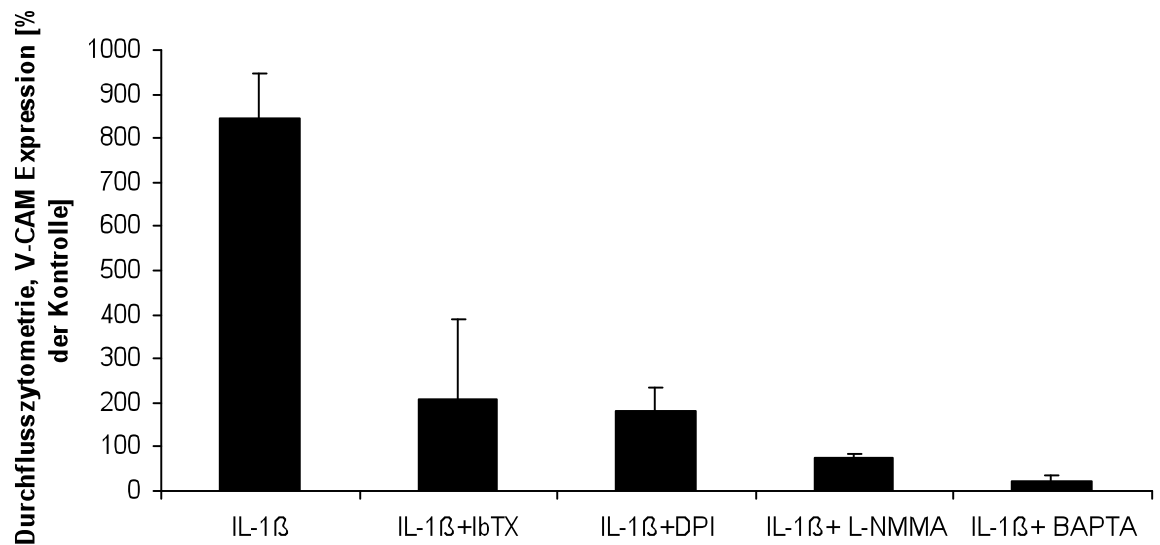
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX [100 nmol/l] DPI [5  $\mu$ m], BAPTA [10  $\mu$ mol/l], L-NMMA [300  $\mu$ mol/l]

### 3.7.2 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression des zellulären Adhäsionsmoleküls V-CAM

Durch Stimulation der HUVEC mit IL-1 $\beta$  konnte eine signifikante Steigerung der Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls V-CAM im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Diese Steigerung konnte durch IbTX signifikant reduziert werden. Auch eine Hemmung der NADPH-Oxidase durch DPI führte zu einer starken Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten Expression, ebenso die Hemmung der eNOS durch L-NMMA und Bindung des intrazellulären Calciums durch den Calciumchelator BAPTA. Die Untersuchung bestätigt, daß die in den Vorversuchen gezeigte IL-1 $\beta$ -induzierte Adhäsionssteigerung auch über das vaskuläre zelluläre Adhäsionsmolekül V-CAM ermöglicht wird. Hierbei scheint der BK<sub>Ca</sub> ebenso eine Rolle zu spielen, wie die Radikalbildner NADPH-Oxidase und eNOS, sowie das intrazelluläre Calcium. Die alleinige Gabe von IBX, DPI, L-NMMA

sowie BAPTA brachte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle und wird in der folgenden Abbildung nicht gezeigt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Abbildung 11 graphisch dargestellt.



**Abb. 14: Messung der IL-1 $\beta$ -induzierten V-CAM-Expression von HUVEC; Einfluss des BK<sub>Ca</sub>, der NADPH-Oxidase, der eNOS und des intrazellulären Calciums**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

n=3; \* p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs IL-1; IL-1 $\beta$  [10 ng/ml], IbTX[100 nmol/l] DPI [5  $\mu$ m], BAPTA [10  $\mu$ mol/l], L-NMMA [300  $\mu$ mol/l]

#### **4. Diskussion**

In den letzten drei Jahrzehnten wissenschaftlicher Forschung stellte sich zunehmend heraus, daß das Gefäßendothel nicht allein die Funktion hat, Blut in der Gefäßstrombahn zu halten, sondern viele regulatorische Funktionen wahrnimmt. Es trägt im physiologischen Zustand dazu bei, den Vasotonus zu regulieren und Zellen des Immunsystems über an der Zelloberfläche exprimierte Adhäsionsmoleküle anzulocken und zwischen den Endothelzellen in den subendothelialen Raum passieren zu lassen. Hiermit ermöglicht es der Endothelzelle, die im Blut zirkulierenden Immunzellen an den Ort des Körpers gelangen zu lassen, an dem sie benötigt werden, zum Beispiel bei einer lokalen Entzündungsreaktion, bei der Leukozyten am Ort des Geschehens für die Abwehrreaktion benötigt werden.

Auch an der Entstehung der Arteriosklerose ist das Endothel beteiligt. Hier kommt es durch Ablagerungen im subendothelialen Raum zu einer Stenosierung, Verhärtung und Veränderung der Oberflächenstruktur der Gefäßwand (Plaquebildung). Diese ist das pathophysiologische Korrelat der in der westlichen Welt am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen, wie dem Herz- oder Hirninfarkt [6]. Verschiedene Faktoren, wie z.B. erhöhter Scherstress bei arterieller Hypertonie, inhalative toxische Stoffe und auch eine hohe Konzentration an körpereigenen, entzündungsfördernden Molekülen wie Zytokinen führen zu einer überschießenden, unkontrollierten Reaktion des Endothels. Eines der potentesten Zytokine ist das Interleukin-1 $\beta$  [15,32]. Es wird von verschiedenen Zellen produziert, wie z.B. Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen und wirkt auf die meisten Zellen ein, die im inflammatorischen Geschehen eine Rolle spielen. Die Bedeutung des Endothels in der Arterioskleroseentstehung konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden [32,47]. Insbesondere ist hier eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen zu erwähnen, die zur Bindung von Monozyten aus dem Blut an das Endothel führt [5]. Diese Monozyten wandern in den subendothelialen Raum ein und stellen nach Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin, welches gemeinsam mit anderen Faktoren zum Zelltod führt, das Korrelat der arteriosklerotischen Plaque dar [16,38]. Der exakte Signaltransduktionsweg, über den IL1- $\beta$  zur Expression von

Adhäsionsmolekülen führt, bedarf noch weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine Möglichkeit besteht in der Steigerung des intrazellulären Calciums [64].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle eines für die Regulation des intrazellulären Calciums wichtigen Kaliumkanals, des calciumabhängigen Kaliumkanals mit hoher Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ), bei der IL-1 $\beta$ -induzierten Arterioskleroseentstehung durch gesteigerte Adhäsion von Monozyten an das Endothel zu untersuchen. Es wurden in diesem Rahmen Erkenntnisse über die Auswirkung von IL-1 $\beta$  auf das Membranpotential, das intrazelluläre Calcium, die Radikalbildung, die NO-Synthese, die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen an HUVEC (humanen umbilikalen venösen Endothelzellen) und die daraus folgende Adhäsion von Monozyten an HUVEC gewonnen.

Zunächst eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse zur Verdeutlichung: IL-1 $\beta$  führt über eine Aktivierung des  $BK_{Ca}$  der HUVEC zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Dieser Hyperpolarisation folgt ein Anstieg des intrazellulären Calciums unter Beteiligung des  $BK_{Ca}$  und der NADPH-Oxidase. Auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) ist durch IL-1 $\beta$  induzierbar und abhängig vom  $BK_{Ca}$ . Hierbei haben bei der Bildung von ROS die NADPH-Oxidase und das intrazelluläre Calcium eine wichtige Bedeutung. Bei der Adhäsion von Monozyten an HUVEC spielen IL-1 $\beta$  und der  $BK_{Ca}$  eine wesentliche Rolle. Diese gesteigerte Adhäsion wird durch die zellulären Adhäsionsmoleküle I-CAM und V-CAM vermittelt.

Der durch IL-1 $\beta$  induzierte Anstieg des intrazellulären Calciums scheint also, abhängig vom  $BK_{Ca}$ , zu einer V-CAM und I-CAM-vermittelten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen zu führen.

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen eine deutliche Hyperpolarisation der HUVEC durch Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Es existieren bisher keine Veröffentlichungen über den Einfluss von IL-1 $\beta$  auf das Membranpotential von endothelialen Zellen. Bekannt ist, dass IL-1 $\beta$  bei einer Vielzahl humaner und animaler Zellen zu einer Hyperpolarisation führt. Salter et al. zeigten in ihren

Versuchen eine IL-1 $\beta$ -induzierte Hyperpolarisation bei humanen Knochenzellen (HBC), bei der die Aktivierung des SK<sub>Ca</sub> beteiligt ist [58]. Tabarean et al. beschrieben eine durch IL-1 $\beta$  hervorgerufene Hyperpolarisation in hypothalamischen Neuronen von Mäusen, hervorgerufen durch eine Aktivierung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle [59].

Gegenstand unserer Untersuchungen war der BK<sub>Ca</sub>. Er spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Membranpotentials und der Konzentration des intrazellulären Calciums und wird von den meisten, frisch isolierten, kultivierten Endothelzellen exprimiert [50]. Kommt es zu seiner Aktivierung, so strömt Kalium aus der Zelle. Die resultierende Hyperpolarisation ist treibende Kraft für den Calciumeinstrom, also der Erhöhung des intrazellulären Calciums.

Kuhlmann et al. und Wiecha et al. konnten den BK<sub>Ca</sub> auf HUVEC eindeutig mittels der patch-clamp-Technik identifizieren. So konnte die für den BK<sub>Ca</sub> typische Leitfähigkeit von 100-250 pS gezeigt werden, der Nachweis der Spannungsabhängigkeit und eine calciumabhängige Zunahme der Aktivität [60]. Komplettiert wird die Ionenkanalcharakterisierung durch die Messungen mit Iberiotoxin (IbTX). Das Skorpiongift IbTX ist in der Literatur von diversen Autoren als ein hochspezifischer Blocker des BK<sub>Ca</sub> beschrieben worden und ermöglicht somit, den Kanal selektiv zu untersuchen [50,55].

Unsere Untersuchungen konnten eine Beteiligung des BK<sub>Ca</sub> an der durch IL-1 $\beta$ -induzierten Hyperpolarisation von HUVEC aufzeigen. Auch für andere proinflammatorische Substanzen konnte eine Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> an HUVEC nachgewiesen werden. Kuhlmann et al. dokumentierten mit der patch-clamp-Methode eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> durch ox-LDL und Lysophosphatidylcholin (LPC), die wesentlich an der Arterioskleroseentstehung beteiligt sind [60]. Die Erkenntnis einer Beteiligung von Kaliumkanälen bei der durch inflammatorisch wirkende Substanzen ausgelösten Hyperpolarisation ist insgesamt gut etabliert.

Es existieren mehrere bekannte Aktivierungsprinzipien des BK<sub>Ca</sub>. Der Mechanismus der Kanalaktivierung durch IL-1 $\beta$  ist unklar. Denkbar ist zum einen die direkte Aktivierung über IL-1 $\beta$  oder die indirekte Aktivierung über Erhöhung des intrazellulären Calciums und Aktivierung des Kanals über Besetzung des „Calcium-bowl“, der BK<sub>Ca</sub>-eigenen, intrazellulären

Calciumbindungsstelle. Bekannt ist weiterhin die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK<sub>Ca</sub> durch Änderung des Membranpotentials [72,65].

Der Anstieg des intrazellulären Calciums ist ein wesentlicher Bestandteil vieler in der Zelle ablaufender Signalkaskaden und wird durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst. Die Regulation des elektrochemischen Gradienten wird über Ionenkanäle wie den BK<sub>Ca</sub> gesteuert. Durch seine Aktivierung kommt es zu einer Hyperpolarisation, die treibende Kraft ist für den Einstrom des Calciums in die Zelle [58].

Die durchgeführten Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff FURA-2AM zeigen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums auf 128 % der Kontrolle zum Zeitpunkt 35 Minuten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ . Dieser Anstieg kann durch Blockade des BK<sub>Ca</sub> mit IbTX weitestgehend inhibiert werden. Eine Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durch IL-1 $\beta$  ist also maßgebend für den Anstieg des intrazellulären Calciums durch Einstrom von extrazellulären Calciums. Sowohl die IL-1 $\beta$ -induzierte Hyperpolarisation, als auch seine Abhängigkeit vom BK<sub>Ca</sub> werden in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Noch zu klären ist, wie es zur Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> kommt.

Untersuchungen mit anderen Stimulantien, wie z.B. mit Apigenin, von Erdogan et al. zeigen einen vom BK<sub>Ca</sub> abhängigen Anstieg des intrazellulären Calciums mit einem Calcium-Peak nach etwa 1 Min. und einer folgenden, flacheren Plateauphase [86]. Es wird gezeigt, daß der erste, steile Anstieg durch Xestospongin C, einem potentem Hemmer des Inositoltriphosphat-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des endoplasmatischen Retikulums, unterbunden wird. Schlussfolgernd wird ein Mechanismus postuliert, der über eine Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum über Inositoltriphosphat zu einer Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> führt.

Bei der Stimulation mit IL-1 $\beta$  konnte dieser steile Anstieg nicht gefunden werden. Es ist zu vermuten, daß die Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durch einen anderen Mechanismus, unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum hervorgerufen wird.

Chang et al. konnten in Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 zeigen, das IL-1 $\beta$  zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums in renalen Mesangiumzellen führt [64]. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums,

gemessen mit FURA-2AM, über Aktivierung des IL-1r durch IL-1 $\beta$  in Astrozyten wird von Pita et al. beschrieben [61]. Benedetti et al. konnten eine direkte Erhöhung des intrazellulären Calciums durch die IL-1 $\beta$ -Wirkung am IL-1-r bei See-Brassen zeigen, dies allerdings in Versuchen mit Säugetierzellen nicht bestätigen [62]. Der Mechanismus der Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> durch IL-1 $\beta$ , der zur Erhöhung des intrazellulären Calciums führt, ist nicht eindeutig zu benennen und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Weiterhin zeigen meine Untersuchungen, daß der Anstieg des intrazellulären Calciums durch Blockade der NADPH-Oxidase unterbunden wird. Dies deckt sich nicht mit den von Brakemeier et al. veröffentlichten Ergebnissen ihrer Experimente an Schweineendothel, die keinen Zusammenhang zwischen ROS-Synthese und durch den BK<sub>Ca</sub> induziertem Ca<sup>2+</sup> Anstieg fanden [87]. Wie der von mir gezeigte Zusammenhang zwischen der NADPH-Oxidase und dem Anstieg des intrazellulären Calciums zustande kommt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Qinghua et al. konnten nachweisen, daß es bei humanen aortalen Endothelzellen zu Oszillationen des intrazellulären Calciums durch Histamin-induzierte Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt. Diese Oszillationen werden auf eine erhöhte Empfindlichkeit des endoplasmatischen Retikulums auf Inositoltriphosphat, durch ROS bedingt, zurückgeführt. Auch diesen Mechanismus werden wir noch weiter untersuchen müssen. Der Zusammenhang zwischen ROS und dem intrazellulären Calcium ist zum einen bezüglich des pathophysiologischen Geschehens interessant, zum anderen wird von einigen Autoren auch eine Rolle der ROS in der physiologischen Signaltransduktion postuliert [74].

Reaktive Sauerstoffspezies, kurz ROS sind eine Familie sauerstoffhaltiger Moleküle. Die Erkenntnis, daß ihre Anhäufung in aeroben Zellen wesentlich zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion und somit arteriosklerotischer Prozesse beiträgt, ist seit einigen Jahren gut etabliert [15,16].

Es existieren verschiedene Quellen der endothelialen ROS, z.B. die mitochondriale Atmung, der Arachidonsäuremetabolismus, Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen, Xanthin-Oxidasen und die NADH/NADPH-Oxidasen.

Besonders für die NADH/NADPH-Oxidasen existieren zahlreiche Untersuchungen, die eine Aktivierung durch z.B. Cytokine zeigen [16].

Meine DCF-Fluoreszenz-Untersuchungen lassen einen starken Anstieg der ROS nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  auf ca. 140% der Kontrolle nach 60 Minuten erkennen. Durch Reduktion der IL-1 $\beta$ -induzierten ROS-Synthese mittels DPI konnte ich nachweisen, dass diese auf die NADPH-Oxidase zurückzuführen ist. Da die IL-1 $\beta$ -induzierte ROS-Produktion trotz Inhibierung der NADPH-Oxidase immer noch 10% über der Kontrolle liegt, werden möglicherweise auch weitere ROS-Produzenten durch IL-1 $\beta$  aktiviert.

Dongli et al. konnten in retinalen Pigmentzellen ebenfalls eine NADPH-abhängige Steigerung der ROS-Synthese durch IL-1 $\beta$  zeigen. Allerdings fiel an den retinalen Zellen die ROS-Steigerung mit ca. 115% im Vergleich zur Kontrolle wesentlich geringer aus [72]. De Keulenaer et al. zeigten eine Aktivierung der NADPH-Oxidase an glatten Gefäßmuskelzellen durch TNF- $\alpha$  und eine Aktivierung durch auf Endothelzellen ausgeübten Shear-Stress [65]. Holland et al. konnten eine Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Thrombin nachweisen [66].

Auch zeigen meine Untersuchungen, daß der Anstieg der ROS durch eine Komplexbildung des intrazellulären Calciums mit BAPTA unterbunden wird. Schaefer et al. fanden eine Abhängigkeit der Cyanid-induzierten ROS-Synthese bei HUVEC vom intrazellulären Calcium, welches durch Aktivierung des BK<sub>Ca</sub> erhöht war. Dies wird als Hinweis auf eine Beteiligung der mitochondrialen ROS-Synthese gewertet [73]. Granfeldt et al. postulieren an neutrophilen Granulozyten einen Mechanismus, bei dem neben dem kapazitativen Calciumeinstrom in die Zelle zusätzlich La<sup>2+</sup> und La<sup>3+</sup>-sensitive Calciumkanäle an der Aktivierung der intrazellulären NADPH-Oxidase beteiligt sind [88]. Der bereits oben beschriebene Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Calcium und reaktiven Sauerstoffspezies wird erneut aufgezeigt. Neben der NADPH-Oxidase scheinen auch andere ROS-Produzenten eine Rolle zu spielen.

Die von mir beschriebenen Ergebnissen reihen sich in die Erkenntnisse über die Bedeutung von IL-1 $\beta$  und seine Auswirkung auf die Calcium-induzierte ROS-Synthese durch die NADPH-Oxidase gut ein. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Calcium und der Bildung

reaktiver Sauerstoffspezies nicht vollständig geklärt und größtenteils spekulativ. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß hier eine wechselseitige Beeinflussung vorliegt.

Neu ist die Erkenntnis der Bedeutung des  $BK_{Ca}$  in diesem Geschehen. Es existieren meines Wissens keine Veröffentlichungen, die auf eine Rolle des  $BK_{Ca}$  bei der IL-1 $\beta$ -induzierten ROS-Produktion hinweisen. Somit wird in dieser Arbeit erstmals dieser Zusammenhang beschrieben.

Stickstoffmonoxid wird von vielen verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen, Monozyten, Neuronen und Hepatozyten produziert. Seine Synthese wird in allen Zellen gleichermaßen durch das Enzym NO-Synthase gewährleistet. Hierbei wird NO durch Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt. Das endothelial synthetisierte NO trägt zur systemischen und lokalen Vasodilatation bei, die Teil einer durch IL-1 $\beta$  herbeigeführten, inflammatorischen Reaktion ist, z.B. beim septischen Schock [67]. Bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion kommt es bei der endothelialen NO-Synthase (eNOS) z.B. durch Abwesenheit von L-Arginin, dem Grundsubstrat, aus dem NO synthetisiert wird sowie anderen Faktoren, wie Mangel an Tetrahydrobiopterin, das die eNOS als Cofaktor benötigt, zu einer Entkopplung. Die Entkoppelung führt dazu, daß die eNOS anstelle von NO ROS produziert, wie  $O^{2-}$  und  $H_2O_2$  [84]. Unsere Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF zeigen eine potente Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch IL-1 $\beta$  auf circa 150 % der Kontrolle. Dies deckt sich mit den von Rosenkranz et al. beschriebenen Ergebnissen an HUVEC [69]. Er zeigte zusätzlich, daß die durch Zytokine induzierte Steigerung des endothelialen NO durch die eNOS abhängig ist vom intrazellulären Calcium. Da in unseren Untersuchungen die Hemmung des  $BK_{Ca}$ , welcher ja entscheidenden Anteil an der Regulation des intrazellulären Calciums hat, zu einer Reduktion des durch IL-1 $\beta$  herbeigeführten NO-Anstiegs führt, ist ein Zusammenhang plausibel. Allerdings zeigen andere Veröffentlichungen durchaus heterogene Erkenntnisse. So finden Suzschek et al. bei der Aktivierung durch andere proinflammatorische Zytokine, wie TNF-alpha bei aortalen Endothelzellen von Ratten eine von Calcium unabhängige Aktivierung der NO-Synthase [70]. Diese Differenzen können zum einen auf die

unterschiedlichen Zellen zurückzuführen sein, zum anderen auf die Verwendung eines anderen Zytokins.

Wie bereits erwähnt, kann die eNOS z.B. bei Substratmangel von L-Arginin ROS synthetisieren. Da wir in unseren DAF-Messungen lediglich die endotheliale NO-Synthese untersuchen und nicht die ROS-Produktion, kann der Anteil der eNOS bei der ROS-Produktion nicht klar herausgestellt werden. In Anbetracht der Beobachtungen der zitierten Veröffentlichungen kann ihre Beteiligung bei der ROS-Synthese aber vermutet werden [68,69]. Interessanterweise zeigten Brakemeier et al. [87], daß der BK<sub>Ca</sub> durch NO aktiviert, durch ROS aber dosisabhängig inaktiviert wird. Cooke et al.[71] zeigten auch durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Aktivierung des BK<sub>Ca</sub>. Ob es sich hier um einen selbst unterhaltenden Zyklus zwischen ROS und NO mit dem BK<sub>Ca</sub> handelt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sein.

In der frühen Phase der Arterioskleroseentstehung kommt es durch verschiedene Faktoren zur gesteigerten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Ross sprach bereits in den achtziger Jahren die „response to injury“ Theorie [8]. Diese besagt, daß die Arteriosklerose Resultat verschiedenartiger Zellverletzungen ist, wie zum Beispiel des Scherstress, durch zirkulierende, das Endothel schädigende Substanzen, durch Diabetes mellitus, Nebenprodukte des Zigarettenrauches, Cholesterin, etc.. All diese schädigenden Faktoren führen zu einem gesteigerten Inflammationsgeschehen, welches die Zelle dazu veranlaßt, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren [5]. Die gesteigerte Adhäsion führt zum „rolling“ der Leukozyten; die Monozyten verlangsamen am Endothel ihre Geschwindigkeit und werden an der Endotheloberfläche fixiert. Anschließend wandern sie zwischen den Endothelzellen hindurch in den subendothelialen Raum. Dort nehmen sie oxidierte LDL-Partikel über Scavenger-Rezeptoren auf. Die gewebständigen Makrophagen bilden sich zu Schaumzellen aus, die Korrelat der später entstehenden arteriosklerotischen Plaque sind [7,8,16].

Entscheidender Faktor ist das individuelle Inflammationsgeschehen, welches wahrscheinlich dafür verantwortlich ist, das es Patienten gibt, die trotz vieler vaskulärer Risikofaktoren wenig bis keine Arteriosklerose haben und daß einige Patienten mit geringem vaskulären Risikoprofil an starker

Arteriosklerose leiden. Einer der bedeutendsten inflammatorischen Substrate ist das Zytokin IL-1 $\beta$ .

Mit zwei unterschiedlichen Methoden konnten wir die Bedeutung des IL-1 $\beta$  für die Adhäsionssteigerung zeigen. Bei einer Tritium-Thymidin-Uptake konnten wir eine um das Vielfache gesteigerte Adhäsion sehen (470% der Kontrolle). In einem BCECF-Adhäsionsassay konnte mit ca. 120 % die signifikante Zunahme bestätigt werden. Verschiedene Autoren fanden ebenfalls eine durch IL-1 $\beta$ -induzierte Adhäsionssteigerung: Michael et al. fanden eine Adhäsionssteigerung von U-937 an HUVEC um das etwa 5-fache nach IL-1 $\beta$  Stimulation über 4 Stunden mit 5 U/ml in einem Indium-Oxine Adhäsionsassay [75]. Auch Kukreti et al. zeigten eine ähnlich hohe Steigerung der Adhäsion durch IL-1 $\beta$  mit einer Konzentration von 0,1ng/ml nach Inkubation von HUVEC über 4 Stunden [89].

Auch lassen meine Experimente erkennen, daß die gesteigerte Adhäsion durch Blockade des BK<sub>Ca</sub> mit IbTX zu inhibieren ist. Im Tritium-Thymidin-Uptake-Experiment zeigte sich eine Reduktion der Adhäsion von ca. 470% der Kontrolle auf ca. 200% der Kontrolle. Bei dem BCECF-Adhäsionsassay zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion. Erstmalig kann ich hier die Rolle des BK<sub>Ca</sub> in der IL-1 $\beta$ -induzierten Adhäsion aufzeigen.

Im BCECF-Adhäsionsassay konnte ich zusätzlich nachweisen, daß die IL-1 $\beta$ -induzierte Adhäsionssteigerung durch Blockade der NADPH-Oxidase und Blockade der eNOS zu supprimieren ist. Hierbei scheint die eNOS eine größere Rolle zu spielen als die NADPH-Oxidase. Für die ROS ist eine Steigerung der Adhäsion beschrieben. Lynch et al. zeigten eine durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöste Adhäsionssteigerung von polymorphonukleären Neutrophilen an HUVEC um das 2,5-fache. Hierbei war die gesteigerte Adhäsion hauptsächlich abhängig von ICAM-1 [77]. Es existieren keine Veröffentlichungen, die eine durch NO induzierte Adhäsionssteigerung beschreiben. Da in unseren Versuchen der Anteil der eNOS an der Adhäsionssteigerung stärker als der Anteil der NADPH-Oxidase zu sein scheint, ist zu vermuten, das die eNOS zum Zeitpunkt des Experimentes teilweise entkoppelt war und zusätzlich ROS produziert hat, die wiederum zur Adhäsionssteigerung führten. Auch führen die zum Beispiel von der NADPH-Oxidase produzierten Radikale zu einer Verkürzung der Halbwertszeit des NO

[78]. Da bei unseren Radikalmessungen mit DCF keine Inhibition der eNOS erfolgte, kann der Anteil der ROS-Synthese nicht dargestellt werden und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Das oben beschriebene „rolling“ der Monozyten und die folgende Adhärenz an der Endotheloberfläche werden durch die Synthese zellulärer Adhäsionsmoleküle ermöglicht. Nach ihrer Expression auf der dem Gefäßlumen zugewandten Zelloberfläche führen zunächst die Selectine zu einer primären, lockeren Anbindung der durch den Blutfluss angetriebenen Monozyten. Es folgt die feste Adhäsion, die durch die zellulären Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM hervorgerufen wird. Sie sind Gegenstand meiner Untersuchungen [5]. Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Arterioskleroseentstehung konnte von Davies et al. gezeigt werden, die in Biopsaten menschlicher, arteriosklerosebetroffener Koronararterien ICAM-1 in nahezu 100% der betroffenen Gefäße und VCAM-1 in ca. 30% der Plaques fanden [79].

In meinen Untersuchungen zeige ich mittels einer Durchflußzytometrie, daß IL-1 $\beta$  zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 auf HUVEC von über 600% führt. Dustin et al. fanden eine Expressionssteigerung auf das drei- bis sechsfache nach Stimulation über 4 Stunden bei einer IL-1 $\beta$ -Konzentration von 10 U/ml auf dermalen Fibroblasten [76]. Chen et al. beobachteten in ihren Versuchen eine Expressionssteigerung durch IL-1 $\beta$  [10ng/ml] von ca. 140% der Kontrolle in einer PCR [80]. Ich zeige weiterhin, daß die Expressionssteigerung durch IL-1 $\beta$  abhängig ist vom intrazellulären Calcium, von der Radikalbildung durch die NADPH-Oxidase und der eNOS. Alle drei Inhibitoren führen zu einer signifikanten Reduktion der ICAM-1-Expression. Barnett et al. beobachteten in HUVEC eine calciumabhängige ICAM Expression nach Stimulation mit LPS [82]. Sharma et al. konnten ebenfalls eine Reduktion des ICAM-1 durch Inhibierung der NADPH-Oxidase mit DPI an Thyreozyten zeigen [81]. Radisavljevic et al. beschreiben eine Abhängigkeit der ICAM-1 Expression von der NO-Synthese bei mikrovaskulären Hirnendothelzellen über eine Phosphatidylinositol-3-Kinase abhängige-Kaskade [83]. Erstmalig wird durch diese Versuche die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> für die Expression des ICAM-1 aufgezeigt.

Bei der Messung des V-CAM-1 mit der Durchflußzytometrie findet sich eine Steigerung durch IL-1 $\beta$  auf das Achtfache der Kontrolle. Auch Marui et al. konnten eine deutliche Expressionssteigerung von V-CAM auf RNA-Ebene nachweisen [84]. Carlos et al. beobachteten in einem ELISA, daß V-CAM-1 auf unstimulierten Zellen nicht, nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  aber nahezu überall auf HUVEC zu finden ist [85]. Interessanterweise fanden Marui et al. zusätzlich einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Radikalen und der V-CAM-Expression. So konnten sie mit dem Antioxidans PDTC eine signifikante Reduktion des IL-1 $\beta$ -induzierten V-CAM-Anstiegs erreichen. Dies deckt sich mit dem von uns gefundenen Ergebnis, daß die Radikalreduktion durch Blockierung mit der NADPH-Oxidase stark zu reduzieren ist. Auch Erdogan et al. sahen bei einer Stimulation von HUVEC mit LPS, einem weiteren, stark proinflammatorischen Zytokin, das die gesteigerte Expression von V-CAM durch Hemmung der NADPH-Oxidase zu unterbinden ist. Auch sieht er eine Abhängigkeit vom intrazellulären Calcium, die sich mit den von uns gefundenen Ergebnissen deckt [86]. Die Hemmung der V-CAM-1-Synthese durch Blockade der eNOS ist, wie bereits oben beschrieben, vermutlich auf die Radikalproduktion durch Entkoppelung zurückzuführen. Die von uns beschriebenen Ergebnisse decken sich gut mit denen anderer Autoren. Hierbei ist die Erkenntnis, daß es durch proinflammatorische Substrate, wie IL-1 $\beta$ , zu einer über zelluläre Adhäsionsmoleküle hervorgerufenen Adhäsionssteigerung kommt, gut etabliert. Auch die Rolle von Radikalen und des intrazellulären Calciums ist vielfach beschrieben. Bei der Bedeutung der eNOS finden sich keine ähnlichen Beschreibungen anderer Autoren. Auf der einen Seite wäre eine Beteiligung von NO möglich, in Anbetracht der Tatsache, das NO eher einen der Arteriosklerose entgegenwirkenden Effekt hat aber unwahrscheinlich. Da sich die Ergebnisse des BCECF-Adhäsionsassays und der FACS-Analyse bezüglich der Hemmung der eNOS aber decken, ist eine Wirkung wahrscheinlich. Ursächlich könnte der bereits beschriebene Effekt der Radikalproduktion durch eine entkoppelte eNOS sein. Weiterhin muß die Wechselwirkung der ROS und des NO in Betracht bezogen werden. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, die den Anteil der eNOS an der Radikalproduktion aufzeigen.

Völlig neu ist die von mir beschriebene Rolle des BK<sub>Ca</sub> bei der IL-1 $\beta$ -induzierten Adhäsion von Monozyten an HUVEC. Wesentlich scheint seine bedeutende Wirkung in der Homöostase des intrazellulären Calciums zu sein, welches Auslöser für etliche intrazelluläre Signalkaskaden ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte seine Rolle bereits in einigen Regelkreisläufen aufgezeigt werden [60,63]. Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß der BK<sub>Ca</sub> über die Regulation des intrazellulären Calciums wesentlichen Einfluss auf das Inflammationsgeschehen hat. Ein Resultat ist die hierdurch hervorgerufene monozytäre Adhäsion an Endothelzellen. Unklar verbleibt der Aktivierungsweg des BK<sub>Ca</sub> durch IL-1 $\beta$ . Denkbar sind unterschiedliche Mechanismen, begonnen bei der direkten Aktivierung am BK<sub>Ca</sub> und diverse indirekte Möglichkeiten, wie eine durch den IL-1-Rezeptor ausgelöste Kaskade, die den Kanal aktiviert. Auch hier müssen weitere Untersuchungen folgen, wie zum Beispiel die Blockierung des IL-1-Rezeptors mit einem Antagonisten.

Die Ergebnisse zeigen, daß der BK<sub>Ca</sub> ein wesentlicher Baustein inflammatorischer Signalkaskaden ist. Erstmals wird in dieser Arbeit die Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> bei der IL-1 $\beta$ -induzierten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen gezeigt und stellt damit eine neue Grundlagenerkenntnis dar. Eine mögliche klinische Konsequenz aus diesen Ergebnissen muß Gegenstand weiterer Forschung sein. So könnte eine medikamentöse Inhibition des BK<sub>Ca</sub> zur einer Reduktion der Arterioskleroseentstehung führen. Eine vollständige Hemmung mit IbTX erscheint aufgrund der bekannten toxischen Effekte nicht aussichtsreich. Weitere Substanzen müssen hinsichtlich einer differenzierteren Modulation des Kanals und der beschriebenen Regelkreise getestet werden. Auch weist diese Arbeit auf die Notwendigkeit hin, ein zunehmendes Verständnis für die Kopplung von elektrischen und chemischen Abläufen in der Zelle zu gewinnen.

## **5. Zusammenfassung:**

Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre weisen auf eine wesentliche Bedeutung des zellulären Inflammationsgeschehens bei der Entstehung der Arteriosklerose hin. Die Bildung von Radikalen und Einwanderung von Monozyten aus der Blutstrombahn in den subendothelialen Raum sind entscheidende Schritte. Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  ist einer der Aktivatoren dieses Inflammationsgeschehens. Es führt zu einer vermehrten zellulären Radikalbildung und zur Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die das Einwandern der Monozyten ermöglichen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung des Calcium-abhängigen Kaliumkanals mit hoher Leitfähigkeit (BK<sub>Ca</sub>) auf Endothelzellen in diesem Geschehen herauszustellen. Durch eine Veränderung des elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran beeinflusst er die intrazelluläre Calciumhomöostase.

In einer DiBAC-Fluoreszenz-Messung wurde bei Stimulation von HUVEC (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen) mit Interleukin-1 $\beta$  eine Hyperpolarisation der Zellmembran gemessen, die durch den selektiven BK<sub>Ca</sub>-Inhibitor Iberiotoxin verringert wurde. In einer FURA-2AM-Messung wurde fluoreszenzmikroskopisch ein folgender Anstieg des intrazellulären Calciums nachgewiesen, der vom BK<sub>Ca</sub> abhängig war. Auch wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen DCF und DAF ein Einfluss des Kanals auf die Interleukin-1 $\beta$ -induzierte zelluläre NO-Synthese und Radikalbildung über die NADPH-Oxidase gezeigt. Der Anstieg des intrazellulären Calciums, der Radikalen und des NO führten zu einer vom BK<sub>Ca</sub> abhängigen Adhäsionszunahme von U-937-Monozyten an HUVEC. Dies wurde in einem BCECF-Adhäsionsassay und einer Tritium-Thymidin-Uptake –Untersuchung ermittelt. Durchflusszytometrisch konnte nachgewiesen werden, dass die zellulären Adhäsionsmoleküle I-CAM-1 und V-CAM-1 für die gesteigerte Adhäsion verantwortlich sind, auch dieses abhängig vom BK<sub>Ca</sub>.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Interleukin-1 $\beta$  über den BK<sub>Ca</sub> zu einer Hyperpolarisation von HUVEC führt. Dieser folgt über eine Veränderung des elektrochemischen Gradienten ein Anstieg des intrazellulären Calciums, das die Synthese von NO und Radikalen aktiviert. Eine über I-CAM-1 und V-CAM-1 vermittelte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ist die Folge.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die wesentliche Bedeutung des BK<sub>Ca</sub> für diese Signalkaskade herausgestellt.

### **Abstract:**

Numerous publications in the last years show a considerable impact of inflammatory cellular action being involved in development of atherosclerosis. Determining steps are the synthesis of radicals and immigration of monocytes into the subendothelial layer. One of the main activators of inflammation is the cytokine Interleukin-1 $\beta$ . It induces increase of cellular radicals and expression of endothelial adhesion molecules that permits adhesion and immigration of monocytes.

Aim of this study was to investigate the effect of the calcium dependent potassium channel with large conductancy (BK<sub>Ca</sub>) in Interleukin-1 $\beta$  induced inflammation. The BK<sub>Ca</sub> influences intracellular calcium homeostasis by changing the electrochemical gradient of the endothelial cell membrane.

In a DiBAC-fluorescence assay I measured an Interleukin-1 $\beta$ -induced hyperpolarisation of HUVEC (human umbilical cord vein), that was decreased by the highly selective BK<sub>Ca</sub> inhibitor Iberitoxin. Subsequently a BK<sub>Ca</sub> dependent increase of intracellular calcium was observed in a FURA-2AM fluorescence microscope assay. I also monitored an influence of the BK<sub>Ca</sub> on the Interleukin-1 $\beta$ -induced NO-synthesis and production of radicals by NADPH Oxidase. The increase of intracellular calcium, radicals and NO results in a BK<sub>Ca</sub> dependent adhesion of U-937 monocytes to HUVEC. This was detected in BCECF-adhesions assay and a Tritium thymidine uptake. With a fluorescent activated cell sorter (FACS) I demonstrated that cellular adhesion molecules I-CAM-1 and V-CAM-1 are responsible for the BK<sub>Ca</sub> dependent increase of adhesion.

In conclusion it was shown that Interleukin-1 $\beta$  induces a BK<sub>Ca</sub> dependent hyperpolarisation of HUVEC. This is followed by an increase of intracellular calcium by a change of the electrochemical gradient. This again induces synthesis of NO and radicals. The result is an I-CAM-1 and V-CAM-1 induced adhesion of monocytes to the endothelial surface. This publication is the first showing the important role of BK<sub>Ca</sub> for this signaling cascade.

## **6. Literaturverzeichnis:**

1. Benninghoff, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1, 15. Auflage, Urban und Schwarzenberg (1994)
2. Junqueira, C, Histologie, 6. Auflage, Springer (2005)
3. Quaschnig, T., Ruschitzka, F.T., Maier, W., Lüscher, T.F.: Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten; Der Internist 41:355-362 (2000)
4. Inagami, T., Naruse M., Hoover R.: Endothelium as an endocrine Organ; Annual Reviews in Physiology 57: 171-189 (1995)
5. Blankenberg, S., Barbaux, S., Tiret, L.: Adhesion molecules and atherosclerosis; Atherosclerosis 170: 191-203 (2003)
6. Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Häufige Todesursachen, Kapitel 1.4.2; Gesundheit in Deutschland (2006)
7. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s; Nature 362 (6423): 801-809 (1993)
8. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis – an update; N Engl J Med 314 (8): 488-500 (1986)
9. Goldstein, L. J., Brown, M.S.: Annual Review of Biochemistry; 52: 223-261 (1983)
10. Faxon, D., Fuster, V., Loscalzo, J.: Atherosclerotic Vascular Disease Conference, Writing Group III: Pathophysiology; Circulation 109:2617-2625 (2004)
11. Anderson, K.M., Odell, P.M., Wilson, P.W.F., Kannel, W.B.: Cardiovascular disease risk profiles; Am Heart J; 12: 293-298 (1990)

12. Lüscher, T.F.: Vascular protection: current possibilities and future perspectives; Int J Clin Pract Suppl; 117: 3-6 (2001)
13. Li, H., Cybusky, M., Gimbrone, M., Libby P.: An artherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium; Arterioscler Throm 13 (2): 197-204 (1993)
14. Jonason, L., Holm, J., Hansson, G.K.: Regional accumulation of T-cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque; Arteriosclerosis; 6: 131-138 (1986)
15. Ito, T., Ikeda, U.: Inflammatory cytokines and cardiovascular Disease; Curr Drug targets Inflamm Allergy; 2: 257-265 (2003)
16. Linton, M. F., Fazio, S.: Macrophages, Inflammation and atherosclerosis; Int J Obes Relat metab Disord; 21; S35-40 (2003)
17. Leskinen, M.J., Kovanen, P.T.: Regulation of smooth muscle cell growth, function and death by activated mast cells; Biochem Pharmacol; 66:1493-1498 (2003)
18. Euroaspire: A European Society of Cardiology survey for secondary prevention of coronary heart disease events; Eur Heart J; 18:1569-1582 (1997)
19. Greenland, P., Knoll, M.D., Stammler, J.: Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events; JAMA 290:891-897 (2003)
20. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of smooth muscle by acetylcholine; Nature 288:373-6 (1980)
21. Drexler, H., Hornig, B.: Endothelial Dysfunction in Human disease; J Mol Cell Cardiol; 31:51-60 (1999)

22. Giovine, F.S., Duff, G.W.: Interleukin 1: the first interleukin; *Immunol today*; 11(1):13-20 (1990)
23. Mosley, B. et al: Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 84: 4572-4576 (1987)
24. Brazel, D. et al: Interleukin-1, characterization of the molecule, functional activity, and clinical implications; *Biotechnology Therapeutics*; 2: 241-267 (1991)
25. di Giovine, F.S. and Duff GW: Interleukin 1: the first interleukin. *Immunology Today*; 11: 13-20 (1990)
26. Bomsztyk, K et al.: Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86: 8034-8038 (1989)
27. Chizzonite, R. et al.: Two high affinity interleukin 1 receptor represent separate gene products; *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86: 8029-8033 (1989)
28. Dower, S.-K. et al.: Biology of the IL1 receptor; *Journal of Investigative Dermatology* 94: 68s-75s (1990)
29. Hirsch, E., Irikura, M., Paul, S., Hirsh, P.: Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11008-11013 (1996)
30. Bowie, A., O'Neill, L.A.: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products; *Journal of Leukocyte Biology*; 67: 4 508-514 (1998)
31. Thornberry, N.A., Molineaux, S.M.: Interleukin-1{beta} converting enzyme: A novel cysteine protease required for IL-1{beta} production and implicated in programmed cell death; *Protein Science*, 4:1 3-12 (1995)

32. Dinarello, C.A.: Biologic basis for Interleukin1 in disease; *Blood*; 87: 6 2095-2147 (1996)
33. Sue, T., Ling, L. Yuekui, L. Barger, W.: Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies; *Journal of Neuroinflammation*, 3:5 10.1186/1742-2094-3-5; (2006)
34. Reiko, H., Shinobu, S. Yoichiro, I.: Development of Chronic Inflammatory Arthropathy Resembling Rheumatoid Arthritis in Interleukin 1 Receptor Antagonist-deficient Mice; *The Journal of Experimental Medicine*, 191:, 313-320 (2000)
35. Murohashi, I. Tohda, S., Aoki, N.: Expression of interleukin 1 beta receptors on blast cells in acute myeloblastic leukemia: comparison with interleukin 1 beta proliferative activity; *Cancer Res.* 49(12):3431-5 (1989)
36. Vidal-Vanaclocha, F., Dinarello, C.A.: Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases; *Cancer Res.*; 54(10):2667-72 (1994)
37. Dinarello, C. A., Gelfand, J. A.: Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome; *Journal of American medical association*; Vol. 269 No. 14 (1993 )
38. Lomedico, P.T., Gubler, U., Mizel, S.B.: Cloning and expression of murine Interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*; *Nature*; 5;312(5993):458-62 (1984)
38. Jonasson, L., Holm J., Skalli O.:Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque; *Arteriosclerosis*;(2):131-8 (1986)
39. Yamada, Y., Hamakubo T., Kodama T.: Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system; *Cell Mol Life Sci.*; (7):628-40 (1998)

40. Libby, P., Ordovas, J.M., Dinarello CA: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells; *Am J Pathol*; 124:179 (1986)
41. Libby, P., Ordovas, J.M., Birinyi, L.K., Dinarello CA: Inducible Interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells; *J Clin Invest*; 78:1432 (1986)
42. Sterpetti, A.V., Cucina, A., Stipa, S.: Shear stress increases the release of Interleukin-1 and Interleukin-6 by aortic endothelial cells; *Surgery* 114:91 (1994)
43. Ross, R., Masuda, J., Raines, E.W., Gowin, A.M., Katsuda, S., Sato H: Localization of PDGFB protein in macrophages in all phases of atherogenesis; *Science*; 248: 1009 (1990)
44. Ku, G., Thomas, C.E., Akeson, A.L., Jackson, R.L.: Induction of Interleukin-1 expression from human peripheral blood monocytederived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid; *J Biol Chem* 267:14183; (1992)
45. Thomas, C.E., Jackson, R.L., Ohleiler, D.F., Ku, G.: Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce Interleukin-1 release from human blood mononuclear cells; *J Lipid Res*; 35:417, (1994)
46. Ku, G., Doherty, N.S., Schmidt, L.F., Jackson, R.L., Dinerstein, R.J.: Ex vivo lipopolysaccharide-induced Interleukin-1 secretion from murine peritoneal macrophages inhibited by probucol, a hypocholesterolemic agent with antioxidant properties; *FASEB J*; 4: 1645 (1990)
47. Moser, R., Schleiffenbaum, B., Groscurth, P., Fehr, J.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage; *J Clin Invest*; 83:444 (1989)

48. Uronen-Hansson, H., Allen, M.L., Höiden-Guthenberg, I., Fryklund, L., Klein, N.: Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood; *Growth Horm IGF Res.*; Oct;13(5):282-6 (2003)
49. Vargas F.F., Caviedas P.F., Grant D.S.: Electrophysiological characteristics of cultured human vein endothelial cells; *Microvasc Res* 47 (2): 153-165 (1994)
50. Nilius B., Droogmans G.: Ion channels and their functional role in vascular endothelium; *Physiol Rev* 81: 1415-1459 (2001)
51. Himmel H., Whorton A.R., Strauss H.C.: Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells; *Hypertension* 21: 112-127 (1993)
52. Beny, J.: Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries; *Pflugers Arch* 433: 364-367 (1997)
53. Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., Alvarez, O.: Varieties of calcium-activated potassium channels; *Annu Rev Physiol* 51: 385-399 (1989)
54. Screiber, M., Salkoff L.: A novel calcium sensing domain in the BK channel; *Biophysical Journal* 73: 1355-1363; (1997)
55. Galvez, A., Gemenez-Gallego G., Reube J.P., Roy-Contancin L., Feigenbaum R., Kaczorowski G.J., Garcia M.L.: 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; (1993)

56. Jaffe, E.A., Nachmann R.L., Becker C.G., Minick C.R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins-identification by morphological and immunological criteria; J Clin Invest 52: 2745-2756 (1973)
57. Tsien, R., Pozzan T.; Measurement of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  with quin2; Methods in Enzymology 172; 230-262 (1980)
58. Salter, DM, Wallace, WH, Caldwell, H.: Human bone cell hyperpolarization response to cyclical mechanical strain is mediated by an Interleukin-1beta autocrine/paracrine loop. J Bone Miner Res. Sep;15(9):1746-55 (2000)
59. Tabarean, V.H., Bartfai, A.: Interleukin-1 induces hyperpolarisation and modulates synaptic inhibition of preoptic and hypothalamic neurons; Neuroscience 141 (2006)
60. Kuhlmann, C.R., Gast, C, Li, F, Wiecha, J.: Cerivastatin activates endothelial calcium activated potassium channels and thereby modulates endothelial nitric oxide production and cell proliferation <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034088> J Am Soc Nephrol. Apr;15(4):868-75 (2004)
61. Pita, I., Jelaso, A.M., Ide, C.F.: IL-1beta increases intracellular calcium through an IL-1 type 1 receptor mediated mechanism in C6 astrocytic cells. Int J Dev Neurosci. 1999 Dec;17(8):813-20
62. Benedetti, I.: Evolution of cytokine responses: IL-1beta directly affects intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism., Cytokine. Apr;34(1-2):9-16 (2006)
63. Erdogan, A., Kuhlmann, C. R. W: Apigenin-induced nitric oxide production involves calcium-activated potassium channels and is responsible for antiangiogenic effects; Journal of Thrombosis and Haemostasis 5 (8) 1774–1781 (2007)

64. Won, J.: Activation in Human Mesangial Cells Is Mediated through Intracellular Calcium but not ROS: Effects of Silymarin, *Nephron Exp Nephrol* (2006)
65. De Keulenaer, G.W., Alexander, R.W., Ushio-Fukai, M., Ishizaka, N., Griendling, K.K.: Tumour necrosis factor  $\alpha$  activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J.* (1998)
66. Holland, J.A., Meyer, J.W., Chang, M.M., O'Donnell, R.W., Johnson, D.K., Ziegler, L.M.: Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* (1998)
67. Ohlsson, K., P. Bjork, M., Bergenfeldt, R. K., Hageman, R. C., Thompson. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin Shock; *Nature* (1990)
68. Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B.S., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998)
69. Rosenkranz-Weiss, William, Sessa, C.: Regulation of Nitric Oxide Synthesis by Proinflammatory Cytokines in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Elevations in Tetrahydrobiopterin Levels Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Specific Activity; *Cardiobiology Program, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale* (2003)
70. Suzschek, C., H. Rothe, K. Fehsel, J. Enczmann, and V. Kolb-Bachofen: Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. *J. Immunol.* (1993)
71. Cooke, J.P., Rossitch, E., Andonn, et al: Flow activates and endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator may be one major mechanism; *J Clin Invest* 88:1663–1671, (1991)

72. Dongli, Yang, A., Susan, G. Elner, A., Zong-Mei Bian, A., Gerd O. Till: Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells *Experimental Eye Research* 85 (2007)
73. Schaefer, C.A., Kuhlmann, C.R., Weiterer, S., Fehsecke, A., Abdallah, Y., Schaefer, C., Schaefer, M.B., Mayer, K., Tillmanns, H.: Statins inhibit hypoxia-induced endothelial proliferation by preventing calcium-induced ROS formation. *Atherosclerosis*, Apr;185(2):290-6 (2006)
74. Qinghua, H., Gemin Zheng, L., Zweier, Roy C. Ziegelstein: NADPH Oxidase Activation Increases the Sensitivity of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Stores to Inositol 1,4,5-Trisphosphate in Human Endothelial Cells; *Journal of Biological chemistry*; Vol. 275, No. 21, Issue of May 26, pp. 15749–15757, (2000)
75. Michael, P., Jordan, S., Pober, M., Elyse Wheeler, Ramzi, S.: Interleukin I Acts on Cultured Human Vascular Endothelium to Increase the Adhesion of Polymorphonuclear Leukocytes, Monocytes and Related Leukocyte Cell Lines Vascular Pathophysiology Laboratory, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School (2002)
76. Dustin, M., Rothlein, R., Springer, T.: Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1); *J Immunol* (1988)
77. Lynch, D.F. Jr, Hassen, W., Clements, M.A., Wright, G.L. Jr: Serum levels of endothelial and neural cell adhesion molecules in prostate cancer; *Prostate* Aug 1;32(3):214-20 (1997)
78. Konishi, H., Wu, J., Cooke J.P.: Chronic exposure to nicotine impairs cholinergic angiogenesis; *Vasc Med*. Feb;15(1):47-5 (2010)
79. Davies, M.J., Gordon, J.L., Gearing, A-J., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D., Kyriakopoulos, A.: The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. Nov;171(3):223-9(1993)

80. Chen, H., Liu, C., Sun, S., Mei, Y., Tong, E.: Cytokine-induced cell surface expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. J Tongji Med Univ. ;21(1):68-71.(2001)
81. Sharma, R., Traore, K., Trush, M.A., Rose, N.R., Burek, C.L.: Intracellular adhesion molecule-1 up-regulation on thyrocytes by iodine of non-obese diabetic.H2(h4) mice is reactive oxygen species-dependent. Clin Exp Immunol. (2008)
82. Biffl, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A., Barnett, C.: Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. J Surg Res. Jun;63(1):328-32.(1996)
83. Radisavljevic, Z., Avraham, H., Avraham, S,: Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. J Biol Chem. Jul 7;275(27):20770-4.(2000)
84. Marui, N., Offermann, M.K., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C.A., Ahmad, M., Alexander, R.W., Medford, R.M.: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest. Oct;92(4):1866-74.(1993)
85. Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R., et al.: Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. Blood. Sep 1;76(5):965-70.(1990)

86. Erdogan, A., Schaefer, M.B., Kuhlmann, C.R., Most, A., Hartmann, M., Mayer, K., Renner, F.C., Schaefer, C., Abdallah, Y., Hoelschermann, H., Schaefer, C.A.: Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels is involved in lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*. Jan;190(1):100-5. Epub 2006 Apr 4.(2007)
87. Brakemeier, S., Eichler, I. Knorr, A.: Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species *Kidney International*, Vol. 64 (2003)
88. Granfeldt, D., Harbecke, O., Björstad, A., Karlsson, A.: Neutrophil secretion induced by an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rise and followed by whole-cell patch-clamp recordings occurs without any selective mobilization of different granule populations. *J Biomed Biotech* 2006(2):97803. (2006)
89. Kukreti, S., Konstantinos, K.: Molecular Mechanisms of Monocyte Adhesion to Interleukin-1 $\beta$ - Stimulated Endothelial Cells Under Physiologic Flow Conditions *Blood*, 11 4104-4111. (1997)

## **7. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.

Conrad Johannes Everhard Venker

## **8. Danksagung**

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

Vorab möchte ich Herrn Prof. Dr. Harald Tillmanns für die Möglichkeit danken, dass ich in seiner Abteilung bzw. Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit erstellen durfte.

Ich danke auch Herrn Priv-Doz. Dr. Ali E. Erdogan für die Übertragung des Themas, die fachlichen Ratschläge, die Bereitstellung von Geräten und Laborräumen und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Schaefer für die intensive praktische und theoretische Betreuung während der gesamten Durchführung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau cand. med. Annett Fehsecke für ihre Geduld bei der Einarbeitung in verschiedenste Labortechniken bedanken.

Bei Frau Gudrun Pfeiffer und Frau Christina Frey-Krug bedanke ich mich für die Unterstützung im Labor.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Der größte Dank gilt meiner Frau Antje und meiner Familie, insbesondere meinem verstorbenen Vater für den Rückhalt und die langjährige Unterstützung in jeglicher Art.

