

**Verminderung der bFGF-vermittelten Endothelzellproliferation durch
nikotininduzierte Reduktion des endothelialen Einwärtsgerichteter
Kaliumstromes**

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

Vorgelegt von: Dipl. Phys. Wolfram Scharbrodt
aus Leverkusen

Gießen im Jahre 2002

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

Leiter: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Waldecker

Gutachter: PD Dr. Thomas Noll

Tag der Disputation: 10.02.2003

1. EINLEITUNG	4
2. DAS ENDOTHEL	5
2.1. Atherosklerose	7
2.2. Elektrophysiologie der Endothelzelle	8
2.2.1. Theoretische Grundlage	8
2.2.2. Das Ruhepotential	10
2.2.3. Überblick über die wesentlichen endothelialen Ionenkanäle	10
2.3. bFGF (basic Fibroblast Growth Faktor)	12
2.4. Nikotinwirkung	13
2.5. Ziel der Untersuchung und Vorgehensweise	15
3. METHODEN	16
3.1. Zellkultur	16
3.2. Die Patch-Clamp-Technik	16
3.2.1. Technische Voraussetzungen	17
3.2.2. Durchführung der Patch-Clamp-Messung	20
3.3. Proliferationsmessung	23
3.4. Statistik	23
4. ERGEBNISSE	24
4.1. Einwärtsgerichteter K^+ –Ströme in HUVEC	24
4.2. Der Effekt von Nikotin auf den K_{IR}-Kanal	26
4.3. Der Einfluß von bFGF (Basic fibroblast growth factor) auf den K_{IR}-Kanal	28
4.4. Simultane Perfusion der Zellen mit bFGF und Nikotin	29
4.5. Blockade der bFGF-induzierten Endothelzell-Proliferation durch Barium und Nikotin	30
5. DISKUSSION	33
6. ZUSAMMENFASSUNG	37
7. LITERATURVERZEICHNIS	39
8. LEBENS LAUF	43

1. Einleitung

Endothelzellen nehmen als Barriere zwischen Blut und Interstitium eine Vielzahl von Steuerungsaufgaben wahr. Dabei sind Endothelzellen mechanischen, hormonellen und chemischen Stimuli sowohl des Blutes als auch des Gewebes ausgesetzt. Zwei Stimuli wurden in der folgenden Arbeit auf elektrophysiologischer Ebene genauer untersucht. Zum einen wurde die Wirkung des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF, *basic Fibroblast Growth Factor*) und zum anderen von Nikotin auf den Einwärtsgerichteter K^+ -Kanal (K_{IR} , *Inward Rectifier K^+ -Channel*) untersucht. Dieser Kanal hat einen wesentlichen Anteil an der Regulierung des Membranpotentials der Endothelzellen und damit an der intrazellulären Calciumkonzentration und der intrazellulären calciumabhängigen Signaltransduktion. Von bFGF ist gezeigt worden, daß er die Zellproliferation fördert. Für Nikotin wurde nachgewiesen, daß es die Endothelfunktion nachhaltig beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit der K_{IR} Einfluß auf die durch bFGF vermittelte Zellproliferation hat und diese durch Nikotinwirkung am Ionenkanal moduliert werden kann.

Die Arbeit gliedert sich in vier Abschnitte. Im ersten Abschnitt wird ein Überblick über die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie der Endothelzellen gegeben. Im zweiten Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Meßverfahren vorgestellt. Die Meßergebnisse sind im dritten Teil der Arbeit dargestellt und werden im vierten Teil diskutiert.

2. Das Endothel

Die Wand der Blutgefäße besteht grundsätzlich aus drei Schichten: Aus der Tunica intima, der Tunica media, und der Tunica externa oder Adventitia. Die Adventitia besteht aus längsgerichteten Bindegewebeelementen, vornehmlich Kollagen Typ I (bei Venen auch glatte Muskelzellen), und verankert das Gefäß im umliegenden Gewebe. Die Media ist zirkulär strukturiert. Ihre Bestandteile sind glatte Muskelzellen, elastische Fasernetze und Kollagenfasern Typ II und III. Die Media hat direkten Einfluß sowohl auf den Blutfluß als auch auf den Blutdruck und unterliegt durch dort endende Nervenfasern dem Einfluß des vegetativen Nervensystems. Im Falle von Arterien wird die Media durch die Membrana elastica interna gegen die Intima abgegrenzt. Die Intima grenzt durch eine einlagige lückenlose Endothelschicht das fließende Blut gegen das Gefäß ab. Die longitudinal orientierten Endothelzellen haben eine spindelige Form und sind zwischen 25 µm und 50 µm lang, wobei die Zellen mit Hilfe von kontraktilelementen ihre Form variieren können (13). Untereinander verbunden sind die Endothelzellen durch tight-, adherens- und gap-junctions (25). Die Endothelzellen entstehen in der dritten Woche der embryonalen Entwicklung aus Randzellen in mesenchymalen Blutinseln, die sich zu Gefäßen vereinigen (24). Das Endothel nimmt eine Vielzahl von Steuerungsaufgaben bei der Interaktion zwischen zirkulierendem Blut, Gefäß und umliegendem Gewebe wahr. Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Steuerung der Gefäßpermeabilität kommt dem Endothel auch die Aufgabe des selektiven Transportes in das umliegende Gewebe zu. Da die Anforderungen an das Endothel in verschiedenen Organsystemen unterschiedlich sind, sind die Endothelzellen dem jeweiligen Gewebe angepaßt. Genetisch einheitlich führen die Umweltbedingungen zur Entwicklung verschiedener Phänotypen. Endothelialer von Willebrand Faktor wird beispielsweise maximal in pulmonalen Endothelien, aber kaum in Lebersinusoiden gebildet (3).

Endothelzellen setzen eine Vielzahl von Mediatoren frei, die sowohl in der direkten Umgebung der Zelle als auch in der Ferne wirken. Beispiele für Mediatoren sind das NO, das unmittelbar Einfluß auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur ausübt und der von Willebrand Faktor, der ausschließlich von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird und global die Bindung von Thrombozyten an Kollagenfasern steuert (16). Die Gerinnung wird zudem beeinflusst durch endotheliale Faktoren wie Prostacyclin, Heparin, *tissue-plasminogen-activator* (TPA), plasminogen aktivator inhibitor (PAI) und

Antithrombin III. Weitere Faktoren sind die biogenen Amine, Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren (40).

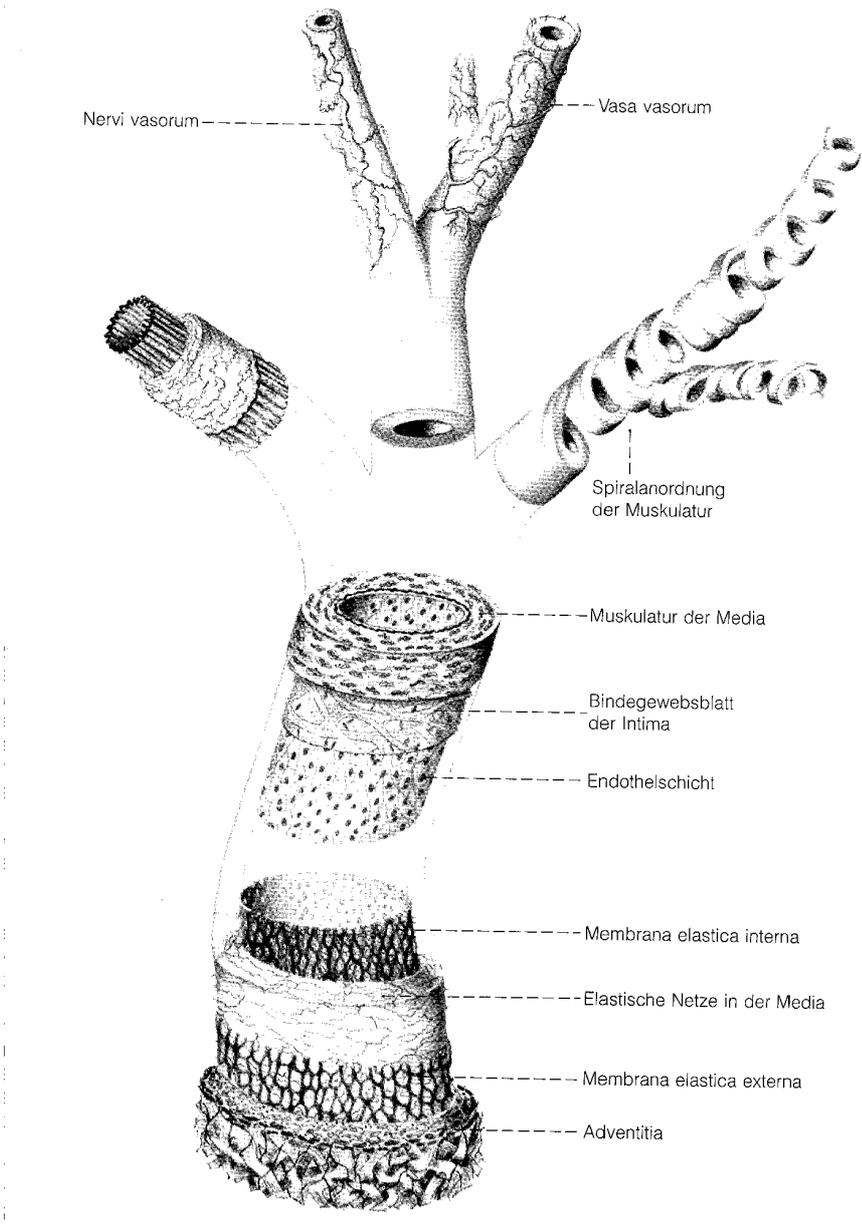


Abbildung 1: Schichtaufbau einer Arterie

2.1. Atherosklerose

Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und Hyperglykämie bedingen eine Schädigung der Endothelzellen. Dafür hat sich der Begriff der *Endothelialen Dysfunktion* eingebürgert. Hat sich die endotheliale Dysfunktion eingestellt, kommt es unter der Applikation von Acetylcholin nicht zur NO-vermittelten Gefäßrelaxation wie bei Gefäßen mit ungeschädigten Endothelzellen. Die auf die glatte Gefäßmuskulatur wirkende relaxierende Wirkung von NO ist weiterhin uneingeschränkt vorhanden wie die direkte relaxierende Wirkung von NO an isolierten Gefäßen zeigt, deren Endothel eine Dysfunktion aufweist. Es handelt sich offenbar um eine isolierte Endothelfunktionsstörung, die morphologischen atherosklerotischen Gefäßveränderungen vorausgeht (20). Eine weitere Folge ist die gesteigerte Permeabilität der Endothelzellschicht. Es kommt zum Ödem der Gefäßwand mit verstärktem Einbau von *Low Density Lipoprotein* (LDL), oxidiertem LDL und durch die verminderte physikalische und metabolische Barrierefunktion des Endothels zu direktem Einfluß vasokonstriktorisch wirkender Substanzen wie Serotonin, ADP, ATP, Thromboxan auf die glatten Gefäßmuskulzellen. Die Entstehung von Atherosklerose ist assoziiert mit einer lokal verminderten Bioverfügbarkeit von NO aufgrund endothelialer Dysfunktion (43). Verantwortlich ist zum einen eine verminderte Aktivität der intrazellulären, endothelialen NO-Synthetase, zum anderen ein gesteigerter Abbau des NO durch Radikale. Endprodukt dieses Abbauweges ist das toxisch wirkende Peroxynitrit. Dieser Abbauweg verläuft 3-5 mal schneller als der reguläre Abbau von Sauerstoffradikalen zu Wasserstoffperoxid und O₂. Zum großen Teil werden die Radikale vom Endothel selbst durch die NADH/NADPH-Oxidase und die NO-Synthetase bei Mangel des Co-Faktors Tetrahydrobiopterin gebildet (31). Beispiele für weitere gefäßprotektive Mechanismen, die durch die verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid gestört werden, sind die Thrombozytenaggregationshemmung, und die VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) Transskriptionshemmung. Zudem führt die verminderte NO-Verfügbarkeit zur Vasokonstriktion durch herabgesetzte cGMP Aktivierung in der glatten Muskulatur und zu einer Steigerung der Proliferationsrate der glatten Gefäßmuskulzellen. Die Endothelzellen exprimieren bei Dysfunktion auf ihrer Oberfläche verstärkt chemotaktischen Moleküle, die zur Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand führen und eine lokale Entzündungsreaktion fördern (26). Die Expression der

chemotaktischer Moleküle ICAM-1 (intra cellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 ist in Bereichen Artherosklerotischer Lesionen wie „*fatty streak lesions*“ deutlich erhöht (41).

Ein weiterer zur Atherosklerose führender Weg sind die als Folge erhöhter Blutflussgeschwindigkeiten verstärkt auftretenden Scherkräfte bei arterieller Hypertonie. An extrazellulären Domänen des K_{IR} angreifende Scherkräfte führen zur Aktivierung des Kanals und diese zur Phosphorylierung verschiedener Kinasen. Daneben wird G-Protein aktiviert und im weiteren Verlauf IBP (inhibitory binding protein) welches mit Hilfe der Promotorregionen scherkraftabhängiger Gene zur Expression von ICAM-1 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) führt. Weitere Genprodukte sind TPA (tissue plasminogen activator) und die NO-Synthase (42). Die Macrophagen phagozytieren LDL. Durch die folgende Interaktion zwischen den Makrophagen, dem Endothel und der glatten Muskulatur wird eine Vielzahl von Faktoren freigesetzt. Beispiele sind Sauerstoffradikale, Endothelin oder Wachstumsfaktoren, die zum Teil die endotheliale Dysfunktion fördern und auf Dauer in ihrem Zusammenwirken zur Entstehung atherosklerotischer Plaques führen.

Die Elektrophysiologie der Endothelzellen, hat wie oben ausgeführt, einen deutlichen Einfluß sowohl auf die Funktion als auch die Physiologie und Pathophysiologie der Endothelzellen. Da im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung eines endothelialer Ionenkanal erfolgte, wird im Folgenden ein Überblick über die Elektrophysiologie der Endothelzelle gegeben.

2.2. Elektrophysiologie der Endothelzelle

2.2.1. Theoretische Grundlage

Die Grundlage des Membranpotentials ist die Konzentrationsdifferenz verschiedener Ionen zwischen Intra- und Extrazellularraum. Die zweite Komponente stellt die selektive Permeabilität der in der Membran enthaltenen Ionenkanäle dar. Auf die Ionen wirken zwei konkurrierende Potentialdifferenzen ein: Die elektrische Potentialdifferenz als Membranspannung und die chemische Potentialdifferenz. Resultat ist die treibende Potentialdifferenz, auch treibende Kraft genannt:

$$E = E_m - E_x$$

E : treibende Potentialdifferenz

E_m : elektrische Potentialdifferenz

E_x : chemische Potentialdifferenz

E_x ergibt sich dabei über die Nernst-Gleichung:

$$E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \frac{c_a}{c_i}$$

R : allgemeine Gaskonstante

T : absolute Temperatur

F : Faraday-Konstante

z : Ionenwertigkeit

c_a : Ionenkonzentration extrazellulär

c_i : Ionenkonzentration intrazellulär

Bei einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 120 mmol/l und einer extrazellulären von 4 mmol/l ergibt sich eine chemische Potentialdifferenz von -91 mV. Liegt an der Membran eine Spannung von 91 mV an, kommt es zu keinem Kaliumionenstrom, da $E=0$ gilt. Es wird in diesem Falle vom Kalium-Gleichgewichtspotential gesprochen. Bei niedrigeren Spannungen wird E positiv und es kommt zu einem Auswärtsstrom der Kaliumionen. Bei höheren Spannungen erfolgt ein Einwärtsstrom bei negativem E . Da das Zytosol und der Extrazellularraum nicht nur Kaliumionen enthalten, muß diesem bei der Membranpotentialermittlung Rechnung getragen werden. Näherungsweise wird diese Tatsache in der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berücksichtigt:

$$E_x = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \lg \frac{p_K \cdot [K_a] + p_{Na} \cdot [Na_a] + p_{Cl} \cdot [Cl_i]}{p_K \cdot [K_i] + p_{Na} \cdot [Na_i] + p_{Cl} \cdot [Cl_a]}$$

p_x : Permeabilität für das Ion X

Die Gleichung kann beliebig für zusätzliche Ionen erweitert werden. Durch die inverse Schreibweise für Cl⁻ mit der intrazellulären Cl⁻-Konzentration im Zähler wird der negativen Ladung des Chloridiones Rechnung getragen. Es wird offensichtlich, daß das Membranpotential in den seltensten Fällen den Wert eines Ionen-Gleichgewichtspotentiales annimmt. Folglich besteht ständig eine treibende Kraft für die Ionen. Daher kommt es

permanent zu Ionenströmen, wobei die Permeabilitäten im wesentlichen durch die Aktivität der Ionenkanäle bestimmt werden. Durch Variation der Permeabilitäten kann die Zelle ihr Membranpotential steuern. Dabei hält die Zelle mit Hilfe von Carriern und Pumpen ihre Homöostase aufrecht.

2.2.2. Das Ruhepotential

Die Endothelzellen gelten als nicht erregbar, da sie kein Aktionspotential generieren. Das Membranpotential ist variabel und zeigt eine bimodale Verteilung. Dafür verantwortlich sind dominante Kalium- oder Chloridströme. Im Falle der Kaliumströme liegt das Potential zwischen -60 und -70 mV. Dominieren die Chloridströme, vermindert sich das Potential auf -10 bis -40 mV. Via *Gap Junction* hat das Potential besonders in longitudinaler Richtung Einfluß auf die Endothelzellen der Nachbarschaft. J. Daut geht von einer regelrechten Synchronisation der Endothelzellpotentiale über die Länge von Gefäßen aus (30). Über *Gap Junctions* sind auch die glatten Gefäßmuskelzellen mit den Endothelzellen verbunden. Damit hat das Membranpotential der Endothelzellen Einfluß auf das Potential der glatten Muskelzellen und vice versa (6).

2.2.3. Überblick über die wesentlichen endothelialen Ionenkanäle

2.2.3.1. Der Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanal (K_{IR})

Im wesentlichen wurden in dieser Arbeit die pharmakologischen Wirkungen von Nikotin und bFGF auf diesen Kanal und die daraus resultierenden Folgen auf das Proliferationsverhalten der Endothelzellen ermittelt. Der K_{IR} wurde in einer Vielzahl verschiedener Endothelien nachgewiesen. Bei einer über das Kaliumgleichgewichtspotential hinausgehenden Hyperpolarisation kommt es zu einem massiven Kaliumstrom. Auf eine Depolarisation reagiert der Kanal mit einem minimalen Auswärtsstrom. Die Leitfähigkeit liegt zwischen 25 und 36 pS bei Verwendung einer isotonen Kaliumlösung, wobei sie proportional der Quadratwurzel der externen Kaliumkonzentration ist (34). Der Kanal ist mechanosensibel und kann mit Hilfe einer extrazelluläre Domäne die durch das zirkulierende Blut auftretenden Scherkräfte messen. Die Einwirkung der Scherkräfte führt zu einer Aktivierung des Kanals. Es folgt eine Hyperpolarisation und ein vermehrter Ca^{2+} Einstrom in die Zelle. Daraufhin werden eine Vielzahl weiterer Mediatoren wie Inositol Triphosphat, Prostaglandin, ICAM-1 oder *basic Fibroblast Growth Factor* vermehrt gebildet. Unmittelbar wird die Aktivität der

NO-Synthase und damit die NO-Freisetzung gesteigert. Als Folge relaxiert die glatte Gefäßmuskulatur (38). Der Kanal ist vermutlich G-Protein gekoppelt und kann durch Barium in niedrigen Konzentrationen spezifisch geblockt werden. Die Hauptaufgabe des Kanals liegt offenbar in der Stabilisierung des Membranpotentials. Da das Membranpotential unterhalb des Kaliumgleichgewichtspotentials liegt, führt eine Öffnung des Kanals zu einer Hyperpolarisation durch Kaliumausstrom. Eine Blockade führt folglich zur Depolarisation. Die Depolarisation als Folge der Kanalblockade kann mit Hilfe des K_{IR} -Kanalblockers Barium nachgewiesen werden (51). Barium wird auch in dieser Arbeit als Blocker des Ionenkanals genutzt.

2.2.3.2. Die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle

Calcium aktivierte Kaliumkanäle werden in drei Gruppen eingeteilt: In den Kanal mit geringer, mit mittlerer und mit hoher Leitfähigkeit

Exemplarisch gilt für den Calcium-aktivierten Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, daß er spezifisch durch das Skorpiongift Iberiotoxin geblockt werden kann. Ein Beispiel für einen Aktivator ist Bradykinin. Mit symmetrischer intra- und extrazellulärer Kaliumlösung ergibt sich im positiven Potentialbereich eine lineare Strom-Spannungsbeziehung und eine Leitfähigkeit von 150-250 pS. Direkten Einfluß auf die Kanalaktivität hat die intrazelluläre Calciumkonzentration. Die Aktivierung erfolgt G-Protein-vermittelt (47). Die Aktivierung des Kanales führt zu einer Membranhyperpolarisation.

2.2.3.3. Der ATP-abhängige Kaliumkanal

Dieser Kanal ist bei physiologischer intrazellulärer ATP-Konzentrationen geschlossen. Die Aktivierung des Kanals erfolgt bei niedrigen ATP-Werten und ist weitgehend spannungsunabhängig. Die Leitfähigkeit liegt mit symmetrischer intra- und extrazellulärer Kaliumlösung bei ca. 40 pS. Ein Blocker des Kanals ist Glibenclamid (32). Eine Möglichkeit der Kanalaktivierung ergibt sich durch die Blockade der Atmungskette mit NaCN und dem folgenden ATP-Abfall. Die Aktivierung des Kanales führt zur Membranhyperpolarisation.

2.2.3.4. Unselektive Kationen Kanäle

Agonisten dieser Kanäle sind Histamin, Bradykinin, ATP, Serotonin, Thrombin und ET-1. Die Aktivierung wird möglicherweise über G-Proteine vermittelt. Zellschwellung führt ebenso

zu einer Aktivierung der Kanäle wie ein intrazellulärer Calciumanstieg. Nachgewiesen wurden die Kanäle in mikrovaskulärem und makrovaskulären Endothelzellen. Die Kanäle sind leitfähig für Ca^{2+} , K^+ und Na^+ , wobei Permeabilitätsquotienten zwischen 0.2-0.6 für $P_{\text{Ca}}/P_{\text{K,Na}}$ ermittelt wurden. Die gemessenen Leitfähigkeiten liegen zwischen 20 und 44 pS und werden bei positiven Membranpotentialen maximal. Inhibitoren der Kanäle sind Ni^{2+} , Gd^{3+} , La^{2+} (32).

2.2.3.5. Die Chloridkanäle

Die Chloridkanäle werden in drei Gruppen eingeteilt. Die hochleitfähigen Cl^- -Kanäle, die volumenabhängigen Cl^- -Kanäle und die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle. Die hochleitfähigen Kanäle haben eine Leitfähigkeit von 113-400 pS und öffnen bei positiven Potentialen. Durch cAMP wird die Spannungsabhängigkeit zu kleineren Potentialen verschoben. Zinkionen blockieren die Kanäle (18).

Die volumenabhängigen Cl^- -Kanäle haben eine geringe Leitfähigkeit von 1-5 pS. Sie werden durch eine Zunahme des Zellvolumens aktiviert. Es besteht weder eine direkte Calcium- noch Spannungsabhängigkeit. Ein spezifischer Blocker für diese Kanäle ist Tamoxifen (33). Histamin, Thrombin und ATP führen zu einem intrazellulärem Calciumanstieg und somit zu einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle. Die Aktivierung ist offenbar G-Protein-vermittelt. Ein PKC-Anstieg inaktiviert die Kanäle. Die Kanäle zeigen eine Auswärtsverstärkung (32).

2.3. bFGF (basic Fibroblast Growth Faktor)

Bei bFGF handelt es sich um einen Heparin bindenden monomeren Wachstumsfaktor, der von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert wird; darunter sind Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Makrophagen. Das Molekulargewicht beträgt 16-18 kDa. Rezeptoren mit einer hohen Affinität konnten mittels Antikörper auf den Zellmembranen der Endothelzellen nachgewiesen werden. Sekretionsstimuli sind unter anderem: Hypoxie Entzündungen und Zellschäden. Eine entscheidende Rolle spielt der Wachstumsfaktor sowohl bei der Regeneration geschädigter Gefäßabschnitte als auch bei der Ausbildung von Kollateralen in ischämischen Bezirken. Nach Ligatur der Femoralarterie von Ratten konnte nach Infusionstherapie mit bFGF angiographisch eine signifikant höhere Ausbildung kollateraler Gefäße als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (56). Die intrakoronare Behandlung von Schweinen mit bFGF führte in infarziertem und nicht

infarziertem Gewebe zu einer erhöhten Ausbildung von Mikrogefäßen (4). Es konnte gezeigt werden, daß sowohl in mikro- als auch in makroskopischen Gefäßen durch bFGF die DNA-Synthese der Endothelzellen gesteigert wird. Durch bFGF wird sowohl die Replikation als auch die Migration der Endothelzellen gefördert. In einer Arbeit von Sato und Rifkin (46) wurden konfluente einlagige Zellschichten von Endothelzellen auf Glasplatten kultiviert. In der Folge wurde ein Teil des Endothels mit einer Rasierklinge weggeschabt. Es kam zur Transmigration der Endothelzellen in den denudierten Bereich. Diese Transmigration konnte durch die Kultur mit spezifisch gegen bFGF gerichteten Antikörpern verhindert werden. In einem Rattenmodell wurden Abschnitte der Carotis durch einen Ballonkatheter denudiert. Durch die Behandlung mit bFGF konnte die Reendothelialisierung deutlich gesteigert werden (27). Der Wachstumsfaktor wirkt offenbar auch autokrin ohne Externalisation auf die Endothelzellen. Werden Nuclei von Endothelzellen mit bFGF inkubiert, folgt die Stimulation der RNA Synthese (9). An der Oberfläche der Endothelzellen befinden sich niedrig- und hoch-affine bFGF-Rezeptoren. Die niedrig-affinen Rezeptoren führen zu einer Konformationsänderung des Wachstumsfaktors, der daraufhin an den hoch-affinen Rezeptor binden kann. Der hoch-affine Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase (10). Eine wichtige Enzymkaskade geht offenbar über die Aktivierung von RAS, RAF, und MAP, so daß es zur Transskription von Wachstumsgenen kommt und letztendlich zur mitogenen Antwort der Zelle. bFGF hat auch Einfluß auf die Elektrophysiologie der Endothelzellen. Der Wachstumsfaktor induziert eine Steigerung der Inositol-1,4,5-triphosphat-Konzentration. Diese führt zu einer Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum, welches den Calcium-aktivierten Kaliumkanal aktiviert (48). Die Folge ist eine Membranhyperpolarisation. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung des Kanales eine notwendige Voraussetzung zur bFGF-Vermittelten Induktion der mitogenen Antwort der Endothelzellen ist (56).

2.4. Nikotinwirkung

Nikotin zählt zu den wichtigsten Drogen unserer Gesellschaft. Jean Nicot, der Gesandte Katharinas von Medici am Hofe Portugals, ist als Förderer des Tabakanbaus der Namenspatron des Alkaloides. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wird Nikotin im wesentlichen durch Zigaretten aufgenommen. Bei dem Alkaloid handelt es sich um Pyridyl-N-Methylpyrrolidin mit der Summenformel: $C_{10}H_{14}N_2$

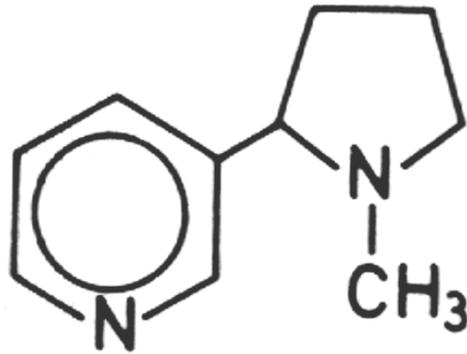


Abbildung 2: Strukturformel des Nikotinmoleküls

Nikotin ist mit dem dreiwertigen Stickstoffatom ein polares Molekül. Um trotz der Polarität eine rasche Diffusion in die Blutbahn zu erreichen, ist der Zigarettenrauch angesäuert (im Gegensatz zum basischen Zigarrenrauch) (17). Nach dem Rauchen mehrerer Zigaretten wird eine Plasmanikotinkonzentration zwischen 10^{-7} und 10^{-8} mol/l gemessen (32). Aus dem inhalierten Zigarettenrauch wird fast das gesamte Nikotin aufgenommen. Herz und Gehirn werden direkt nach der Lungenstrombahn erreicht und nach jedem Zug einer Konzentrationsspitze ausgesetzt. Da die Plasmakonzentrationen des Nikotins im venösen System ermittelt wurden, dürften nach Inhalation im arteriellen Blut der Coronar- und Cerebulararterien deutlich höhere Nikotinkonzentrationen auftreten. Im Zentralnervensystem werden nicotinerge Acetylcholinrezeptoren vermehrt in der Hippokampusregion als Teil des limbischen Systems gefunden (2). Es wurden in den Corpora mamillaria als weiterem Teil des limbischen Systems an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren acht verschiedene Subtypen der α und drei der β -Untereinheit charakterisiert (12). Diesen Rezeptoren im limbischen System ist die psychogene Wirkung des Nikotins zuzuschreiben. Gehäuft treten die Rezeptoren auch in den postsynaptischen Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems auf. Durch Nikotin wird die Norepinephrinwirkung verstärkt, so daß es zu einer Verstärkung der gefäßkonstringierenden Wirkung kommt (7). Zudem wurden Nikotinrezeptoren in den Synapsen zwischen Motoneuronen und Skelettmuskeln nachgewiesen, die analog zu einer Gruppe zentraler Nervenzellen zu einer Öffnung von Kationenkanälen für Na^+ und K^+ führen (28). Durch *in-situ-Hybridisierung* und Bindung von radioaktiv markiertem Epibatidine konnten an aortalen Endothelzellen des Menschen nikotinerge Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen werden. Epibatidine ist ein hoch affiner, spezifischer Ligand der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren. Die endothelialen Rezeptoren besitzen die Untereinheiten α_3 , α_5 , β_2

und β_4 (29). In einer anderen Arbeit wurden Acetylcholinrezeptoren mit den Untereinheiten α_3 und α_7 durch markierte Antikörper an Endothelzellen bronchialer Gefäße nachgewiesen (54). Auf die spannungsabhängigen Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskelzellen in Rattenschwanzarterien wirkt Nikotin im Konzentrationsbereich von 1-100 $\mu\text{mol/l}$ exzitatorisch und bei Konzentrationen zwischen 0.3-3 mmol/l inhibitorisch. Durch den Nikotinrezeptorantagonisten Dihydrobetaerythroidine wird der exzitatorische Effekt des Nikotins unterdrückt, nicht jedoch der inhibitorische (48).

2.5. Ziel der Untersuchung und Vorgehensweise

Ziel der Arbeit war zu ermitteln inwieweit bFGF und Nikotin, beides Faktoren, die wie oben ausgeführt, bei der Angiogenese beziehungsweise Entstehung der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen, die Funktion des K_{IR} modulieren. Zudem galt es zu klären, ob die Modulation des K_{IR} eine notwendige Voraussetzung zur Erzeugung einer durch bFGF induzierten mitogenen Antwort der Endothelzellen ist. Diese Fragen wurden durch *patch-clamp*- und Proliferationsmessungen geklärt.

Da sich in den *patch-clamp*-Messungen zeigte, daß Nikotin den K_{IR} ebenfalls moduliert ergab sich die weitere Frage, ob Nikotin analog zu den Proliferationsmessungen mit bFGF, die Proliferation der Endothelzellen beeinflusst.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die Endothelzellen (*human umbilical cord venes cells* HUVEC) werden aus menschlichen Nabelschnurvenen mit Hilfe von Collagenase isoliert (22). Die Lumina der Venen werden mit Collagenase D inkubiert (Boehringer, Mannheim, Deutschland). Mittels wiederholter Zentrifugation und Spülen der Zellen wird die Kollagenase ausgewaschen. Danach werden die Zellen in Kunststoffkulturgefäße gegeben, an deren Grund sie sich anheften. Als Kulturmedium dient Waymouth Medium (752/1 GIBCO BRL, Paisly, United Kingdom) versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, PAA, Linz, Österreich). Weitere Bestandteile des Kulturmediums sind Penicillin und Streptomycin (1%, GIBCO BRL, Paisly, United Kingdom), Glutamin (1%, Sigma, Deishofen, Deutschland) Kalium-Pyruvat (1%, Sigma, Deishofen, Deutschland), *endothelial cell growth faktor* (ECGF, 0.5%, Sigma, Deishofen, Deutschland). Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit einem CO₂ Gehalt von 5% in einem Inkubator. Die Identifikation der Endothelzellen erfolgte mit Floureszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen von Willebrand Faktor (Dakopatts, Hamburg, Deutschland). Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden ausgetauscht. Sowohl für die elektrophysiologischen als auch für die Proliferations-Messungen wurden Kulturen von der dritten bis zur siebten Passage verwendet.

3.2. Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik bietet die Möglichkeit, elektrische Ströme durch zelluläre Ionenkanäle zu messen. Dabei können Messungen der Ströme durch einzelne Kanäle oder die Gesamtheit der Kanäle einer Zelle erfolgen (19). E. Neher und B. Sakmann wurden für die Entwicklung dieser Methode 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

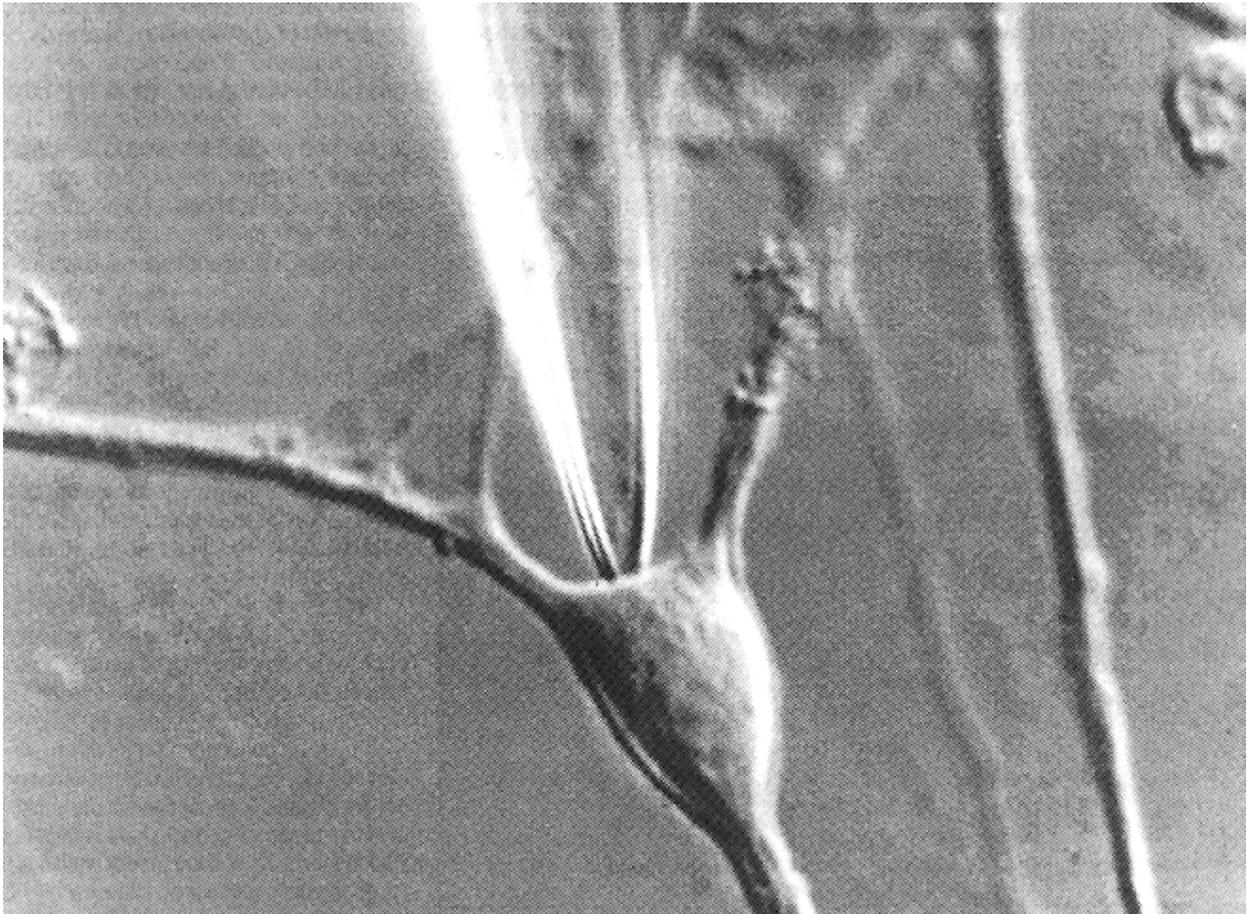


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt eine Zelle während einer Patch-Clamp-Messung. Im oberen Bildbereich ist die kontaktierende Glaskapillare sichtbar.

3.2.1. Technische Voraussetzungen

3.2.1.1. Der Messplatz

Der eigentliche Meßplatz ist der Objektträger im Strahlengang eines inversen Mikroskops. Dorthin wird das Kulturschälchen mit den Endothelzellen gestellt. Das Mikroskop steht auf einem schwingungsfrei gelagerten Luftkissentisch. In das Mikroskop ist eine Videokamera integriert, so daß der Meßbereich am Bildschirm überwacht werden kann. Auf der linken Seite des Mikroskops befindet sich ein mechanischer Dreiachs-Grobmanipulator, an dessen Spitze ein piezoelektrischer Dreiachs-Feinmanipulator angebracht ist. Die Manipulatoren dienen dazu, eine Perfusionspipette in die Nähe einer durch die Patchpipette kontaktierten Zelle zu bringen. Die Perfusionspipette ist über einen Schlauch mit einer 5 ml Spritze in einem Perfusor verbunden. Auf der rechten Seite befindet sich ebenfalls ein Dreiachs-Grobmanipulator. Mit ihm kann ein hydraulischer Dreiachs-Feinmanipulator bewegt werden.

An dessen Spitze ist der Vorverstärker mit Pipettenhalter montiert. Der Pipettenhalter ist so konstruiert, daß der Druck im Inneren der Pipette variiert werden kann. Dazu ist der Pipettenhalter über einen Schlauch mit einer 100 ml Glasspritze verbunden, über die der Druck ausgeübt wird. Mit Hilfe eines Dreiwegehahnes kann der eingestellte Druck fixiert werden.

3.2.1.2. Die Messelektroden

Zentral im Inneren des Pipettenhalters befindet sich ein mit AgCl beschichteter Silberdraht, der bis in das Innere der Pipette reicht. Dieser Draht stellt die Meßelektrode dar. Die zweite mit AgCl beschichtete Silberelektrode befindet sich im Kulturschälchen. Diese Grundelektrode und die Meßelektrode müssen regelmäßig elektrolytisch nachchloriert werden, um Offsetpotentiale zu minimieren. Dieses geschieht in einem 1mol KCl-Bad.

3.2.1.3. Puller

Die Pipetten werden aus Hämatokritröhrchen (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) im Heizelement eines Pullers gezogen. Die Hämatokritröhrchen reißen dabei in der Mitte auseinander; es entstehen zwei Pipetten. Die Zugkräfte, Zugwege und Temperaturen sowie die Dauer und Zahl der einzelnen Schritte des Zugvorganges können variiert werden. Damit können sowohl die Patchpipetten mit einem Öffnungsdurchmesser im Bereich um $1\mu\text{m}$ als auch die deutlich größeren Perfusionspipetten gezogen werden. Die Patchpipetten haben damit einen Widerstand von ca. 2-3 M Ω . Nach dem eigentlichen Ziehen wird die jeweilige Pipettenspitze abermals der Temperatur des Platinheizdrahtes ausgesetzt. Dadurch erfolgt eine Glättung oder Politur der Pipettenränder.

3.2.1.4. Die elektrische Signalverarbeitung

Der Vorverstärker ist über Koaxialkabel mit dem eigentlichen Verstärker verbunden. Das analoge Signal des Verstärkers wird in einem nachgeschalteten AD-Wandler digitalisiert und in einen Meßrechner eingelesen. Die Software des Meßrechners ermöglicht neben der Speicherung und Verarbeitung der Meßwerte auch die Steuerung des Meßablaufes. Im Meßprogramm kann eine fixe Spannung zwischen dem Bad im Kulturschälchen und der Pipette eingestellt werden. Ein entsprechendes digitales Signal wird an den AD-Wandler und von diesem als Analogsignal an den Verstärker weitergegeben. Der Verstärker arbeitet als Signaleinheit und fixiert mit Hilfe des Vorverstärkers die Spannung zwischen Patchpipette und Bad (List patch-clamp-Verstärker, List Elektronik, Darmstadt, Deutschland). Die Spannung beträgt maximal 120 mV. Die resultierenden Ionenkanalströme liegen im Bereich

von ca. 200 pA. Der Vorverstärker wandelt mit einem Feldeffekttransistor das Stromsignal in ein Spannungssignal um. Dieses Signal wird verstärkt und digitalisiert an den Rechner geleitet. Wegen des geringen Betrages der Kanalströme müssen Störströme minimiert werden. Der gesamte Meßplatz ist daher elektrisch abgeschirmt und geerdet. Zudem ist im Verstärker ein 6-Pol Besse Filter enthalten.

3.2.1.5. Die Bad-, Pipetten-, und Perfusions-Lösungen

Das Kulturmedium, in dem die Zellen inkubiert werden, ist als Badlösung während der Messung nicht geeignet. Das Medium enthält eine Vielzahl verschiedener Verbindungen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Heparin oder Antibiotika. Sie haben unkontrollierbaren Einfluß auf die Zellphysiologie und die Ionenströme. Daher ist es bei Patch-Clamp-Messungen Standard, eine bis auf essentielle Bestandteile reduzierte Badlösung zu verwenden. In dieser Lösung können die Zellen über sechs Stunden ohne Einfluß auf die Kanaleigenschaften überleben.

3.2.1.6. Zusammensetzung

Die Ionenkonzentrationen sind den physiologischen Serumkonzentrationen angenähert. Zudem sind Glykose und ein Puffer enthalten.

Zusammensetzung der Badlösung:

NaCl 140 mmol/l
d-Glucose 5.5 mmol/l
HEPES 10 mmol/l
KCl 5 mmol/l
CaCl₂ 1.5 mmol/l
MgCl₂ 0.5 mmol/l

NaOH zur PH Einstellung von 7.3

In der Pipettenlösung sind die Ionenkonzentrationen den intrazellulären Konzentrationen angeglichen. Da bei den vorliegenden Messungen eine Verbindung zwischen Pipette und Zellinnerem hergestellt wird, ist zudem EGTA (Ethylen-glycol-bis-amino-ethylether-N-N-tetraacetat), ein Calciumkomplexbildner enthalten. Dieser verhindert, daß Calcium aus dem Glas der Pipette oder aus der Pipettenlösung in die Zelle strömen können und die intrazelluläre Calciumkonzentration artifiziell erhöht. Sowohl die Bad als auch die

Pipettenlösung werden mit NaOH beziehungsweise KOH auf einen pH-Wert von 7.3 eingestellt.

Zusammensetzung der Pipettenlösung:

K-Aspatat 110 mmol/l

KCl 30 mmol/l

MgCl₂ 1 mmol/l

Na₂ATP 4 mmol/l

EGTA 0.5 mmol/l

KOH zur pH-Einstellung von 7.2

Bei der Herstellung der Perfusionslösung dient die Badlösung als Grundlage. Zugesezt werden Nicotinatrat oder bFGF aus den jeweiligen Stammlösungen. Um die Stammlösungen zu erstellen, werden Nicotinatrat oder bFGF in Aqua-Bidest verdünnt. Da das Mischungsverhältnis von Stamm- und Badlösung 1:99 ist, kann von keiner wesentlichen Verschiebung der Ionenkonzentration zwischen Bad und Perfusionslösung gesprochen werden.

3.2.2. Durchführung der Patch-Clamp-Messung

Eine Kulturschale wird dem Inkubator entnommen. Danach wird das Medium verworfen. Es erfolgt die mehrfache Spülung der Kulturschale mit auf 37°C erwärmter Badlösung. Auf diese Weise werden abgetötete Zellen und Reste des Mediums entfernt. Zum Schluß wird die Schale mit 3ml Badlösung aufgefüllt und auf den Objektträger gestellt. Es folgt die Justierung der Perfusionspipette. Ziel ist die vollständige Umhüllung der Zelle mit dem Perfusionsstrahl, ohne daß die Messung durch zu große Kräfte auf die Zelle zunichte gemacht wird. Diese Position der Perfusionspipette ist reproduzierbar, so daß die Perfusionspipette bei nicht erfolgreicher Perfusion aus dem unmittelbaren Bereich der Messung entfernt werden kann. Dieses geschieht mit dem piezoelektrischen Feinmanipulator. Nun kann durch Bewegen des Objektisches eine geeignete Zelle ausgewählt werden. Die Zelle muß mehrere Kriterien erfüllen, die bei vitalen Zellen gegeben sind:

Die Zelle muß glatt berandet sein, darf keine granulären Veränderungen aufweisen und den Kontakt zum Grund der Kulturschale verloren haben. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist oftmals kein Ionenkanalstrom meßbar.

Sie darf nicht zu groß sein, da sonst der kapazitive Anteil die Messung dominiert.

Es muß sich um eine einzelne Zelle handeln. Zellcluster sind mit *Gap-Junctions* verbunden. Dieses führt dazu, daß nicht die Kanalströme einer einzelnen Zelle sondern eines Zellclusters gemessen würden. Zudem ist in diesen Fällen keine effektive Spannungskontrolle möglich.

In den Pipettenhalter wird eine mit Pipettenlösung gefüllte Pipette eingespannt und mit der angeschlossenen Spritze ein leichter Überdruck appliziert. Der Überdruck verhindert das Verschmutzen der Pipettenspitze beim Eintauchen in die Badlösung. Die Pipette wird daraufhin mit dem Grobmanipulator in die Nähe der Zelle gefahren. Mit Hilfe des Rechners wird nun eine Folge von Testpulsen generiert. Diese Spannungspulse führen zu einem Strom durch die Pipettenöffnung. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes berechnet das Meßprogramm daraus den Öffnungswiderstand der Pipette. Er sollte zwischen 2 und 3 M Ω liegen.

Nun wird mit dem Mikromanipulator die Pipette an die Zelle gefahren. Im Falle der Berührung steigt der Widerstand an, da die Pipettenöffnung gegen das Bad abgedichtet wird. Nun erfolgt die Applikation eines leichten Unterdruckes in der Hoffnung, daß sich ein „*Giga Seal*“ ausbildet. Von *Giga Seal* kann gesprochen werden, wenn der Widerstand zwischen Bad und Pipette auf mehrere G Ω angestiegen ist. In diesem Falle sind die Leckströme zwischen Bad und Pipette bei Anlage der Meßspannung gering (≤ 1 pA). Daher können Einzelkanalströme im höheren pA-Bereich gemessen werden. Bei der gegebenen Konfiguration handelt es sich um die *Cell-attached-Konfiguration*. Nun wird abermals ein Unterdruck erzeugt, durch den die Zellmembran im Bereich der Pipettenspitze zerrissen wird. Bleibt dabei die Abdichtung zwischen der Pipette und dem Bad erhalten, so handelt es sich um die *Whole-Cell-Konfiguration*. Alle Patch-Clamp-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden in dieser Konfiguration durchgeführt. In Abbildung 4 sind die *Cell-attached-* und *Whole-Cell-Konfiguration* dargestellt.

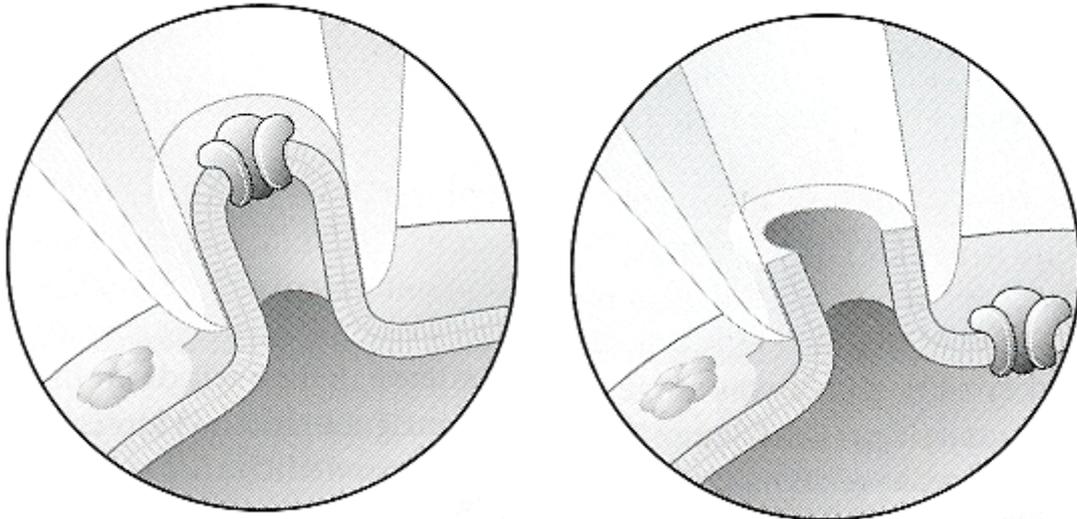


Abbildung 4: Membrankonfiguration bei *Cell-attached-* und *Whole-Cell-Konfiguration*

Da die Pipette mit dem Zellinneren verbunden ist, kann die Spannung zwischen dem Zellinneren und dem Bad variiert werden. Der resultierende Strom ist ein Summationsstrom über alle aktivierten Ionenströme der Zelle. Nun wird eine Kontrollmessung ohne Perfusion durchgeführt und anschließend die Perfusionspipette an die vorbestimmte Position in Zellnähe gefahren. Es erfolgt der Start der Perfusion mit einer Rate von 0.02 ml/h. Die weiteren Strommessungen erfolgen zu den im Meßprotokoll festgesetzten Zeiten.

3.2.2.1. Das Messprotokoll

Die Aufnahmezeit beträgt 5 kHz. Das Haltepotential ist dem physiologischen Membranpotential mit -20 mV angenähert. Gemessen wurde in 15 mV Schritten von -45 mV bis zu -120 mV. Der aus dem Spannungssignal resultierende Strom wurde 175 ms nach Beginn des Spannungspulses gemessen. Zu diesem Zeitpunkt hat der durch die Membrankapazität hervorgerufene Umladestrom keinen nennenswerten Einfluß mehr auf den Gesamtstrom.

3.3. Proliferationsmessung

Um die Proliferationsrate der HUVEC zu bestimmen, wurden konfluente HUVEC-Kulturen trypsinisiert (0.05% Trypsin und 5mmol/l EDTA in Ca^{2+} freier Lösung). 20000 Zellen wurden jeweils in ein Kulturschälchen gegeben. Die Grundfläche der Schälchen betrug jeweils 30 cm^2 . Am ersten Tag (Tag 0) wurden die Zellen im zuvor beschriebenen Medium mit 10ng/ml ECGF kultiviert. In den Folgetagen wurde das Medium modifiziert durch die Zugabe von 50 ng/ml bFGF und verschiedener Bariumkonzentrationen (10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$) oder 50 ng/ml bFGF und verschiedene Nikotin Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} mol/l). Pro Konzentration wurden acht Kulturschalen angelegt. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Zellzählung erfolgte an den Tagen fünf und sieben. Für die Zählung wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Grund der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden im Kulturmedium suspendiert und ein Teil der Suspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Aus jedem Kulturschälchen wurden vier Proben in die Zählkammer gegeben. Danach erfolgte eine Mittelwertbildung und die Errechnung der Gesamtzellzahl pro Kulturschale.

3.4. Statistik

Die Signifikanz der wiederholten K_{IR} -Messungen wurde mit dem Friedmann-Test bestimmt ($p < 0.05$; SPSS-Windows; Version 5.0.2). Die folgende multivariate Analyse der K_{IR} -Messungen erfolgte mit dem Nemenyi-Test (SPSS-Windows; Version 5.0.2). Die multivariate Analyse der Proliferationsmessungen wurde mit dem MANOVA-Test durchgeführt (SPSS-Windows; Version 5.0.2).

4. Ergebnisse

4.1. Einwärtsgleichrichter K^+ –Ströme in HUVEC

Um die K_{IR} -Kanalströme (*Inward Rectifier K^+ -currents*) zu messen, wurden, von einem Haltepotential von -20 mV ausgehend, Spannungen zwischen -45 mV und -120 mV appliziert. Die Spannungsschritte betragen -15 mV. Gemessen wurde in der *whole-cell*-Konfiguration. Bei dieser Methode konnte im wesentlichen zwischen zwei verschiedenen Zelltypen unterschieden werden. Der erste Zelltyp wird von einem durch Öffnung der K_{IR} -Kanäle hervorgerufenen Strom dominiert. Dieser Strom ist schon mehrfach beschrieben worden (15,21,36,40). In Abbildung 5 ist exemplarisch eine *whole-cell* Messung bei dominierenden Kaliumkanälen dargestellt. Der charakteristische Spannungsverlauf wurde nach einer Aufnahmezeit von 175 ms bestimmt und aus 10 Einzelmessungen gemittelt.

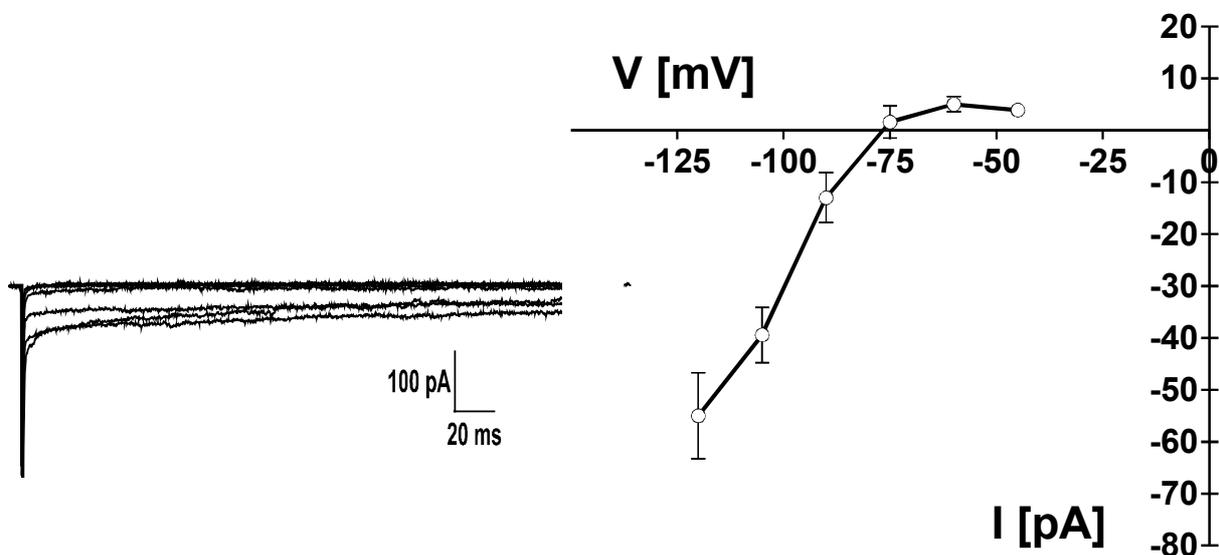


Abbildung 5: K_{IR} -Ströme in K^+ -Typ Endothelzellen.

Bei einer Spannung von -120 mV zeigen die Kanäle eine schnelle Inaktivierung. Das Gleichgewichtspotential der Zellen lag bei -78 ± 8 mV bei einer Zellzahl von zehn Zellen. Das erwartete Gleichgewichtspotential von K^+ mit -83 mV liegt annähernd bei dem gemessenen

Gleichgewichtspotential der Zellen. Diese Zellen werden K^+ -Typ Endothelzellen genannt. Die andere Zellgruppe zeigt Einwärtsströme, mit einer davon abweichenden Strom-Spannungs-Beziehung. Das Gleichgewichtspotential dieser Zellgruppe variierte zwischen -30 und -40 mV. Daher ist zu erwarten, daß neben Kaliumströmen weitere Ionenströme einen wesentlichen Beitrag zum Gleichgewichtspotential liefern. Dominierend dürften in diesen Fällen überwiegend Cl^- -Ströme sein (32). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit einem dominierenden Einwärts- K_{IR} -Strom untersucht.

Eine typische Eigenschaft der K_{IR} -Kaliumströme ist deren hoch affine Blockierung durch extrazelluläres Barium. Um sicher die Existenz der dominierenden K_{IR} -Ströme nachzuweisen, wurden zur Badlösung 10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Barium gegeben. Damit ergab sich eine dosisabhängige und potentialabhängige Blockade der in der *Whole-Cell-Patch-Clamp* Technik ermittelten Einwärtsströme. Die Strom-Spannungs-Beziehung dieser Messung ist in Abbildung 6 wiedergegeben.

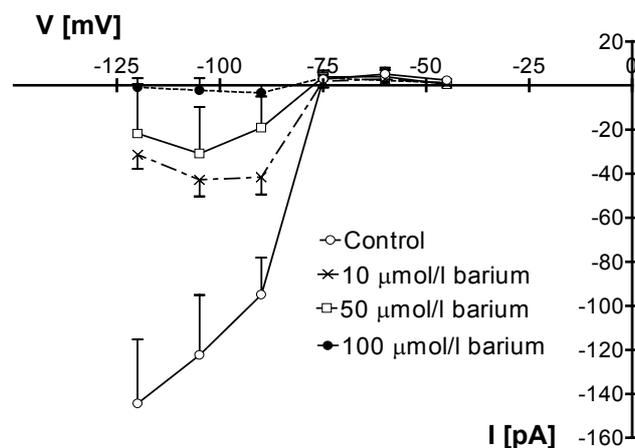


Abbildung 6: Blockade der K_{IR} -Ströme durch Perfusion mit Barium der Konzentratione 10, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Barium.

Wie von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, wird auch bei diesen Messungen der K_{IR} -Strom bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Barium vollständig geblockt (15,32). Mit Auswaschversuchen konnte die Reversibilität der Blockade gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7 wiedergegeben. Die Perfusion mit Barium erfolgte für 3 min, die wash-out-Zeit betrug 2 min.

Es wurden wieder Messungen von -45 bis -120 mV durchgeführt bei einer Schrittgröße von -15 mV und einem Haltepotential von -20 mV.

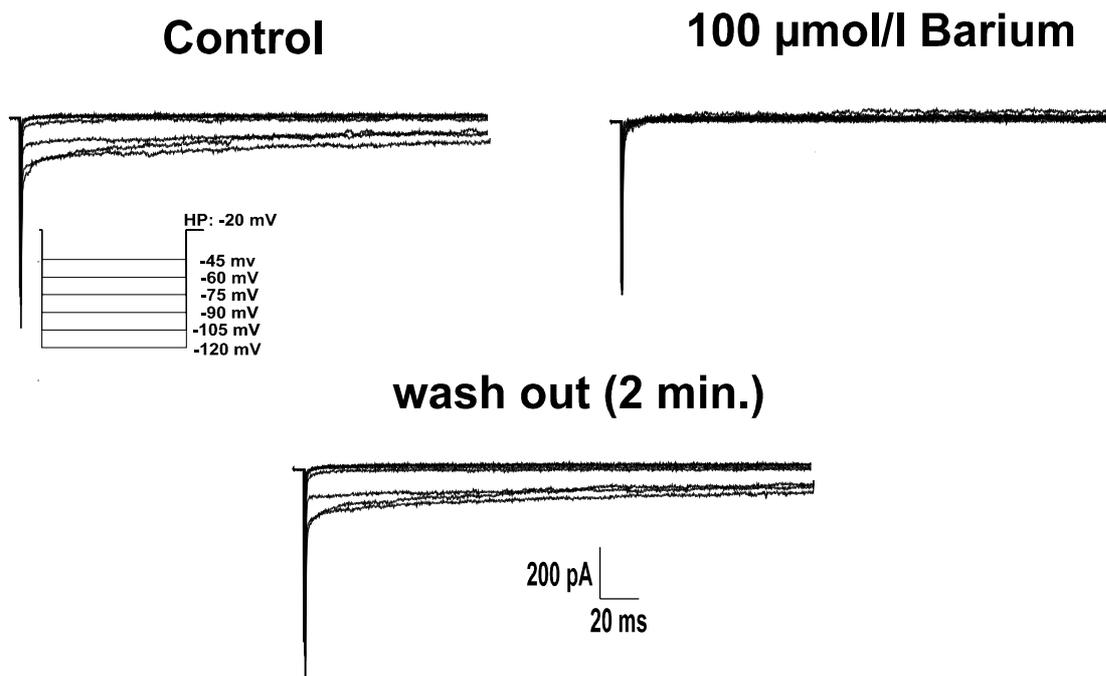


Abbildung 7: Wash-out-Versuch

4.2. Der Effekt von Nikotin auf den K_{IR} -Kanal

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Nikotin in verschiedenen Konzentrationen auf die Leitfähigkeit des IR ermittelt. Gemessen wurde der Nikotineinfluß bei Konzentrationen zwischen 10^{-9} mol/l und 10^{-5} mol/l. Eine signifikante Reduktion des Stromes wurde bei einer Konzentration höher als 10^{-7} mol/l festgestellt. Die Stromverminderung zeigte sich bei Perfusionszeiten über einer Minute und einem Testpotential von -90 mV bis -120 mV. Eine charakteristische Messung und die zusammengefaßten Daten für eine Nikotinkonzentration von 10^{-6} mol/l sind in Abbildung 8 A-C wiedergegeben. In Teil A der Abbildung ist exemplarisch eine Messung initial und 1 min nach Applikation von 10^{-6} mol/l Nikotin aufgezeigt. In Teil B ist die Strom-Spannungs-Beziehung gemittelt über 8 Einzelmessungen wiedergegeben. Teil C zeigt den zeitlichen Verlauf der Stromreduktion bei

kontinuierlicher Perfusion der Zellen mit 10^{-6} mol/l Nikotin ($n=8$, $P<0.01$) und einer Spannung von -90 mV.

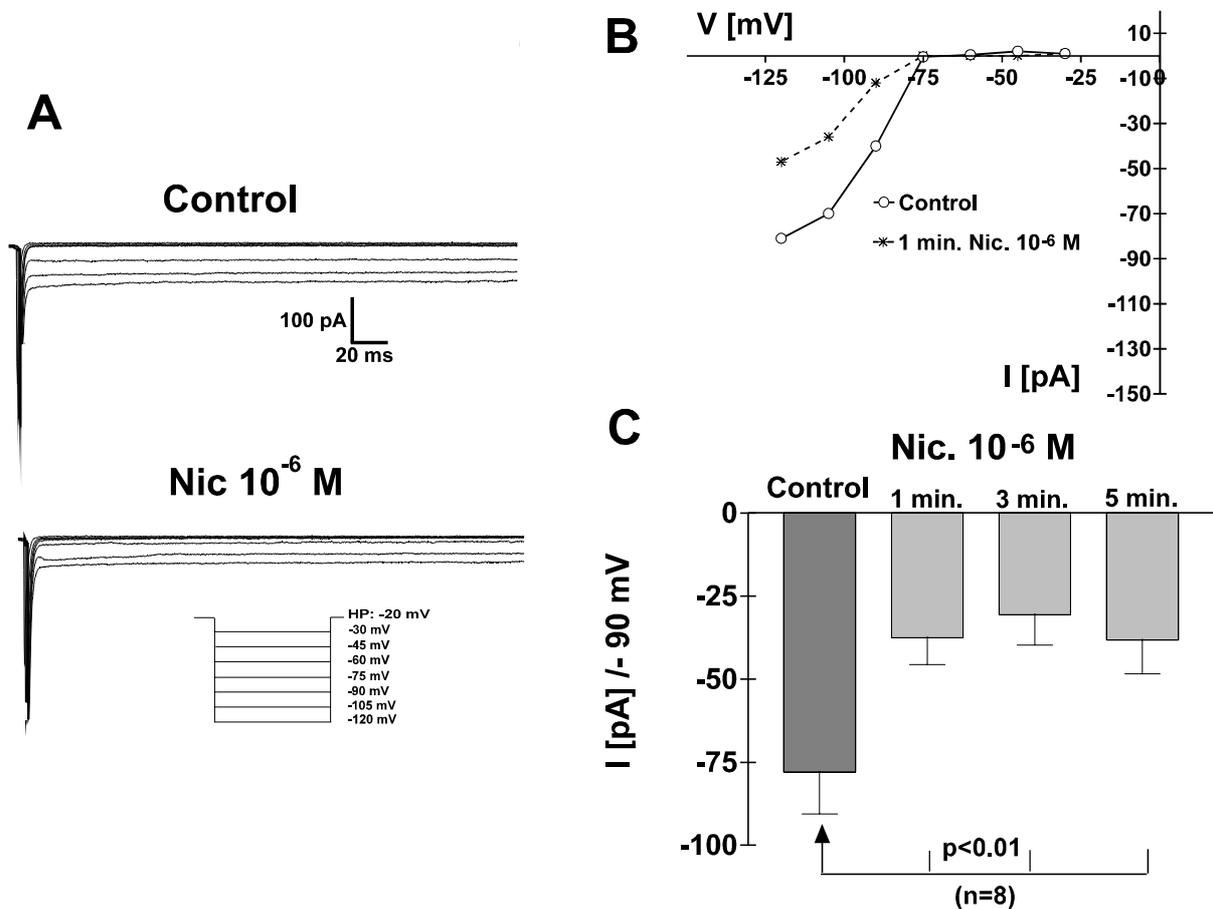


Abbildung 8: Effekt von Nikotin auf die K_{IR} -Ströme

Bei der höchsten Nikotinkonzentration von 10^{-5} mol/l ergab sich eine Stromreduktion von 56% bei einer Testspannung von -90 mV ($n=8$; $p<0.01$).

Die Dosis-Wirkungskurve ist in Abbildung 9 wiedergegeben und weist eine halbmaximale Konzentration (EC_{50}) von $10^{-7.2}$ mol/l Nikotin auf. Die Auswirkung auf den Strom wurde 1 min nach Beginn der Perfusion mit Nikotin ermittelt. Die Messpunkte wurden durch eine sigmoide Funktion angepasst.

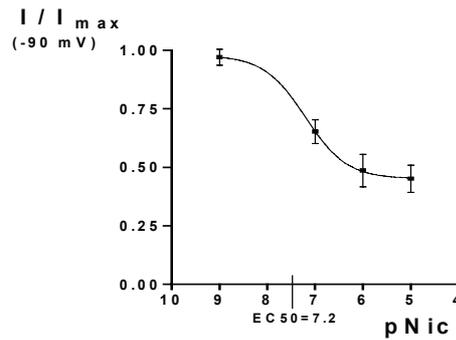


Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurve 1 min nach Beginn der Perfusion mit Nikotin.

4.3. Der Einfluß von bFGF (Basic fibroblast growth factor) auf den K_{IR} -Kanal

Wie weiter oben ausgeführt, spielt bFGF eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und der vaskulären Regeneration. Im folgenden wird der Effekt des Heparin-bindenden Wachstumsfaktors auf den IR K-Kanal analysiert. Bei einer Applikation von 50 ng/ml bFGF zeigte sich nach 3 Minuten eine signifikante Steigerung des IR K-Stromes. Die Testpotentiale lagen dabei zwischen -90 und -120 mV ($n=18$; $p<0.05$). Eine typische Messung ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Die zweite Messung erfolgte 3 min nach Perfusion mit 50 ng/ml bFGF.

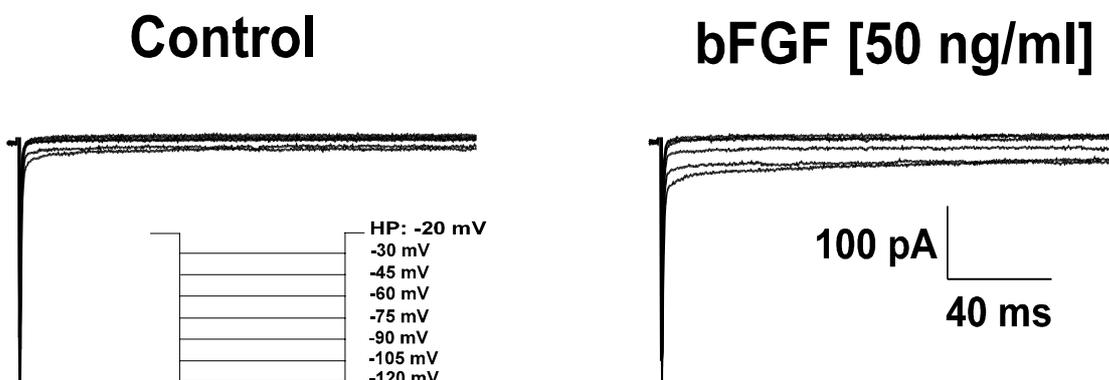


Abbildung 10: Ströme vor und 3 min nach Beginn der Perfusion mit 50 ng/ml bFGF

In Abbildung 11 ist die Strom-Spannungs-Beziehung vor und 3 min nach Applikation von 50 ng/ml bFGF aufgezeigt. Um auszuschließen, daß ein weiterer Einwärtsstrom durch bFGF aktiviert wird, wurden die Zellen mit einer Kombination aus 50 ng/ml bFGF und 100µmol/l Barium perfundiert. Barium als spezifischer Blocker des IR K-Kanals blockierte die gesamten Einwärtsströme (n=8; p=n.s.). Wäre ein Teil der durch bFGF ausgelösten Einwärtsströme nicht durch IR K-Kanäle ausgelöst, hätte trotz der Applikation von Barium ein Einwärtsstrom auftreten müssen. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß ein weiterer Einwärtsstrom außer dem IR K-Strom durch bFGF ausgelöst wird.

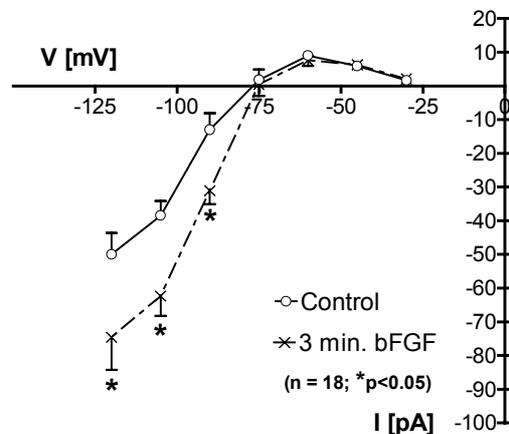


Abbildung 11: Strom-Spannungs-Beziehung vor und 3 min nach Beginn der Perfusion mit 50 ng/ml bFGF. Der Darstellung liegen 18 Einzelmessungen zugrunde.

4.4. Simultane Perfusion der Zellen mit bFGF und Nikotin

Da sich zeigte, daß bFGF den IR-Strom signifikant verstärkt und Nikotin zu einer signifikanten Verminderung des Stromes führt, stellt sich die Frage, zu welchen Einwärtsströmen die kombinierte Perfusion der Zellen mit Nikotin und bFGF führt. Aus diesem Grund wurden die Zellen simultan mit 50 ng/ml bFGF und 10^{-5} mol/l Nikotin perfundiert. Eine Minute nach Beginn der Perfusion zeigte sich trotz der Perfusion mit bFGF eine signifikante Reduktion des IR K-Stromes, die bis zur fünften Minute zunahm. Der Strom wurde bei einer Testspannung von -90 mV um 40% reduziert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 12 dargestellt.

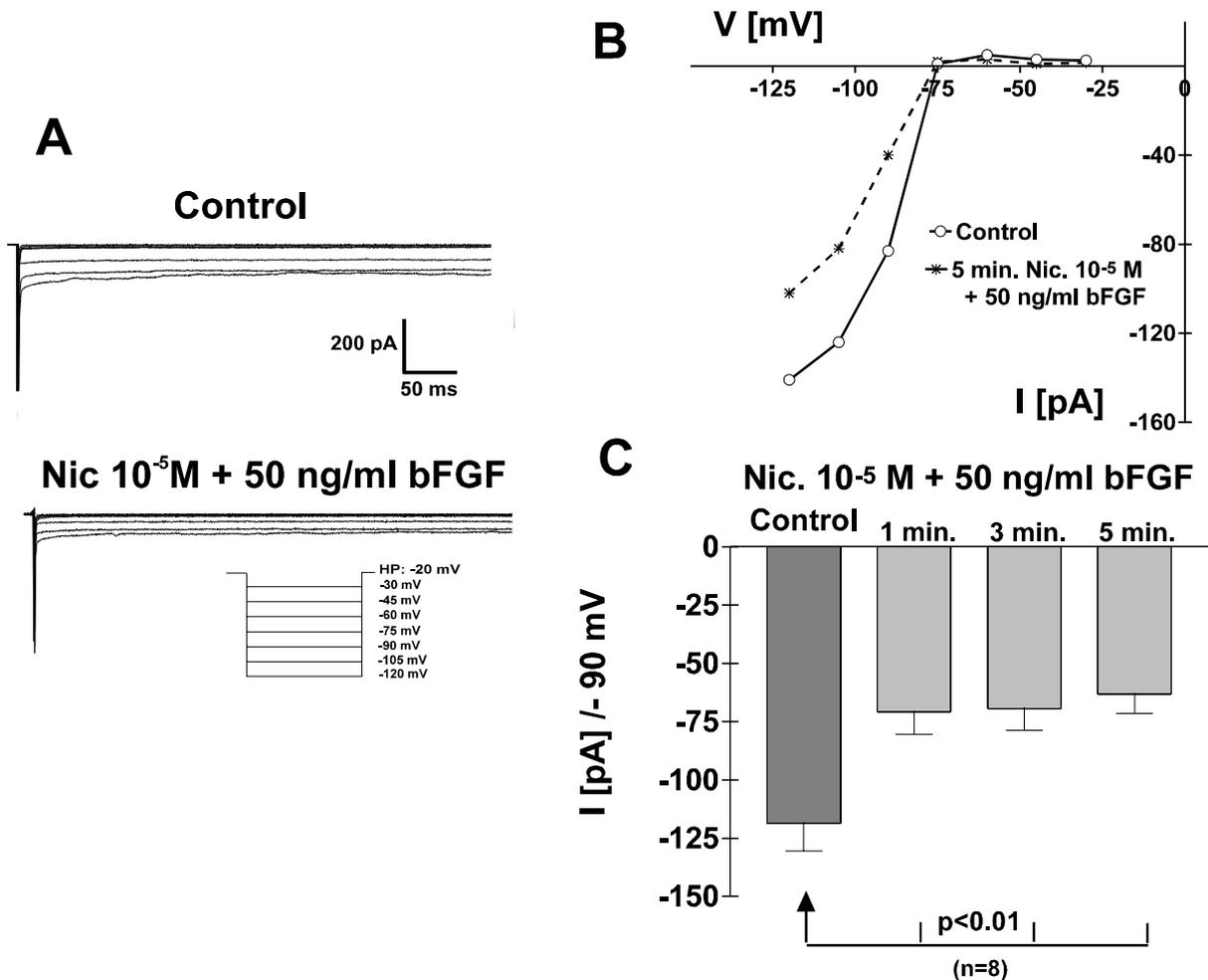


Abbildung 12: Effekt der simultanen Perfusion mit bFGF und Nikotin auf K_{IR} -Kanäle.

In Teil A der Abbildung ist eine direkt durchgeführte Kontrollmessung und eine Messung 5 min nach Beginn der simultanen Perfusion mit 10^{-5} mol/l Nikotin und 50 ng/ml bFGF wiedergegeben. Teil B zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung. In Teil C ist der zeitliche Verlauf der Stromreduktion bei kontinuierlicher Perfusion der Zellen mit 10^{-5} mol/l Nikotin und 50 ng/ml bFGF dargestellt (n=8, P<0.01).

4.5. Blockade der bFGF-induzierten Endothelzell-Proliferation durch Barium und Nikotin

Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, daß bFGF K_{IR} -Ströme induziert. Um zu zeigen, ob diese Kanalströme Einfluß auf die Proliferationsrate der Zellen haben, wurde die bFGF-induzierte Zellproliferationsrate unter Inkubation mit Barium und Nikotin ermittelt. Initial wurden 20000 Zellen pro Kulturschale inkubiert und die Zellzahl mit der Neubauer

Zählkammer am fünften und siebten Tag bei Inkubation mit verschiedenen Kulturmedien ermittelt. Analog zu den elektrophysiologischen Messungen wurden wie beschrieben zum Standardkulturmedium Barium in den Konzentrationen 10^{-5} mol/l, 5×10^{-5} mol/l und 10^{-4} mol/l sowie Nikotin in den Konzentrationen von 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l und 10^{-5} mol/l hinzugegeben. Bei Zugabe von bFGF zum Kulturmedium ergab sich die erwartete exponentielle Zunahme des endothelialen Zellwachstums. Sowohl die Zugabe von Barium als auch die Zugabe von Nikotin zum mit bFGF-versehenen Kulturmedium ergaben eine dosisabhängige Verminderung der durch bFGF-induzierten Zellproliferation. Bei einer Bariumkonzentration von 10^{-4} mol/l, bei welcher der K_{IR} -Kanal vollständig blockiert, zeigt sich nach fünf Tagen eine 40 % ($n=5$; $p<0.01$) Reduktion der bFGF vermittelten Zellvermehrung. Am siebten Tag ergibt sich eine Reduktion um 55 % ($n=5$; $p<0.01$). Eine Bariumkonzentration von 50 μ mol/l führte am fünften Tag zu einer signifikanten Reduktion um 32 % ($n=5$; $p<0.01$) und am siebten Tag zu einer Reduktion um 47 % ($n=5$; $p<0.01$). In Abbildung 13 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Die Zellzahl gibt die Zahl der Zellen pro Kulturschälchen an.

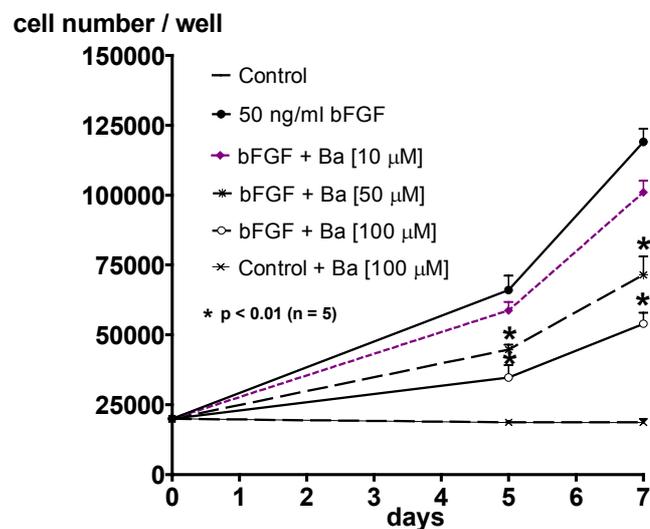


Abbildung 13: Verminderung der bFGF-induzierten Zellproliferation durch Barium sowie Kontrollmessungen im reinen Kulturmedium oder im Kulturmedium mit bFGF versetzt.

Bei der Inkubation mit Nikotin ergab sich am siebten Tag eine signifikante Reduktion der durch bFGF induzierten Zellproliferation. Wurden die Zellen mit Nikotin der Konzentration 10^{-6} mol/l inkubiert, trat eine Reduktion um 13 % auf ($n=8$; $p<0.01$). Unter Einwirkung von Nikotin der Konzentration 10^{-5} zeigte sich eine Reduktion um 17 % ($n=8$; $p<0.01$). Um einen

direkten zytotoxischen Effekt des Bariums oder Nikotins auszuschließen, wurden die HUVEC ohne bFGF zum einen mit dem Kulturmedium und 10^{-4} mol/l Barium, zum anderen mit dem Kulturmedium und 10^{-5} mol/l Nikotin inkubiert. Die Vergleichsgruppe waren Zellen, die im Standardkulturmedium ohne Nikotin oder Barium inkubiert wurden. Weder beim Barium ($n=5$; $p=n.s.$), noch beim Nikotin ($n=8$; $p=n.s.$) zeigten sich Veränderungen im Zellwachstum oder vermehrter Zelltod. Damit ergab sich aus den Messungen kein Anhalt für einen zytotoxischen Effekt bei einer Nikotinkonzentration von 10^{-5} mol/l oder einer Bariumkonzentration von 10^{-4} mol/l. Abbildung 14 stellt die Ergebnisse dar.

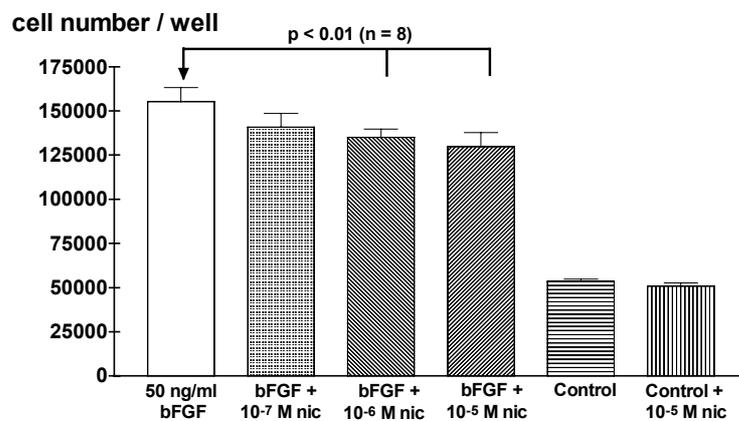


Abbildung 14: Zellzahl nach 7-tägiger Inkubation der Zellen mit bFGF und Nikotin sowie der Kontrollen im reinen Kulturmedium oder mit Nikotin versetzt inkubiert.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, daß die K_{IR} -Ströme durch den Wachstumsfaktor bFGF und das Alkaloid Nikotin moduliert werden. Ein weiteres Ziel war zu zeigen, daß die Modulation dieses Ionenstromes zu einer Veränderung der durch den Wachstumsfaktor bFGF vermittelten Zellproliferation führt. Bei den patch-clamp-Messungen an den kultivierten HUVEC zeigte sich eine bimodale Verteilung der Einwärtsströme, analog des bimodalen Gleichgewichtspotentials der Zellen. Die bimodale Verteilung des Gleichgewichtspotentials wurde von Voets et al (51) und Mehrke et al (30) beschrieben. Zum einen wurden Zellen mit dominierenden K_{IR} -Stömen gefunden, welche von anderen Arbeitsgruppen (5,21,35,39) ausgiebig identifiziert und charakterisiert wurden. Zum anderen zeigten sich HUVEC mit einem Gleichgewichtspotential von -40 mV bis -30 mV, welche die Vermutung nahelegen, daß auch andere als die K_{IR} -Kanäle zum Membranpotential in der zweiten Zellgruppe wesentlich beitragen. Chlorid- und nicht spezifische Anionenströme sind nach den Experimenten von Voets et al (51) und Himmel et al (21) im wesentlichen verantwortlich für das Gleichgewichtspotential dieser Gruppe. Da der besondere Schwerpunkt dieser Arbeit auf den Eigenschaften des K_{IR} -Kanals lag, wurden im weiteren HUVECs vom K-Typ untersucht. Um sicherzustellen, daß es sich bei den gefundenen Einwärtsströmen tatsächlich um K_{IR} -Stöme handelt, wurden die Zellen mit Barium perfundiert.

Barium ist ein hoch-affiner Blocker des K_{IR} -Kanals. Es zeigt sich eine dosisabhängige und spannungsabhängige Blockierung des K_{IR} -Kanals. Den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (Beckerath et al (5)) (Voets et al (51)) analog zeigt sich bei einer Bariumkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ eine vollständige Blockade des K_{IR} -Kanals. Barium ist kein selektiver Blocker des K_{IR} -Kanals, jedoch ist für die Blockade weiterer Ionenkanäle, wie den ATP-sensitiven Kaliumkanal oder den Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanal eine deutlich höhere Bariumkonzentration notwendig (23,44). Daher kann bei den angewandten niedrigen Bariumkonzentrationen von einer relativen Spezifität für den K_{IR} -Kanal ausgegangen werden. Nach der Beendigung der Perfusion der Zellen mit Barium kommt es zu Reaktivierung der K_{IR} -Kanäle, das heißt die Blockade ist komplett reversibel. Werden die HUVEC mit bFGF perfundiert, ergibt sich eine signifikante Steigerung des Einwärtsstromes. Um sicherzustellen, daß bFGF tatsächlich den K_{IR} -Kanal der Zellen vom K^+ -Typ aktiviert, wurden die Zellen simultan mit bFGF und $100 \mu\text{mol}$ Barium perfundiert. Es kam zu einem vollständigen Block der Einwärtsströme. Da es im Rahmen der Meßgenauigkeit zu keinem erneuten Anstieg der

Einwärtsströme kam, konnte damit gezeigt werden, daß bFGF ausschließlich K_{IR} -Kanäle aktiviert. Im weiteren sollte der Einfluß des Nikotins, das das Potential hat die Endothelfunktion zu verändern (50,57), auf die K^+ -Einwärtsströme ermittelt werden. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion des K_{IR} -Stromes mit einer ED_{50} von $10^{-7.2}$ mol/l Nikotin.

Die erhebliche Steigerung des K_{IR} -Stromes unter der Wirkung von bFGF wirft die Frage auf, ob diese Stromsteigerung ein früher Schritt bei der Aktivierung der Zellproliferation ist. Zudem stellt sich die Frage, ob die Aktivierung des K_{IR} -Stromes zur Steigerung der Proliferationsrate der Zelle notwendig ist. Um diese Fragen zu klären, wurden Zellproliferationsmessungen mit bFGF, Barium und Nikotin in denselben Konzentrationen wie in den elektrophysiologischen Messungen durchgeführt. Die Proliferationsmessungen zeigten einen engen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des K_{IR} -Kanals und der Proliferationsrate der Zellen. Analog zur Blockade der K_{IR} -Kanäle in den elektrophysiologischen Messungen, führten Nikotin und Barium zu einer Verminderung der durch bFGF vermittelten Zellproliferation. Die Perfusion mit einer Bariumlösung von 100 μ mol/l führte zu einer vollständigen Blockade des K_{IR} -Stroms, aber nicht zur vollständigen Blockade der bFGF-vermittelten Zellproliferation. Der Grund könnte darin liegen, daß nur ein Teil der Zellen in der Kultur dem K-Typ angehört und bei dem anderen Teil der Zellen Nikotin oder Barium nur zu einer beschränkten Blockade der Einwärtsströme führt. Zudem ist die Aktivierung des K_{IR} -Stromes nicht die einzige Verbindung zwischen der bFGF Rezeptoraktivierung und der mitogenen Antwort der Zelle (11,53). Albaugh et al konnten bei der Inkubation von HUVEC mit Nikotin ebenfalls eine signifikante Senkung der Endothelzellproliferation zeigen. Zudem wiesen sie eine erhöhte TNF- α Produktion unter Nikotineinfluß nach, die ebenfalls Einfluß auf die Proliferationsrate der Zellen hat. Inkubation mit TNF- α -Antikörpern milderte die nikotininduzierte Verringerung der Proliferationsrate ab (1). Ein direkter zytotoxischer Effekt des Nikotins oder Bariums in den untersuchten Konzentrationen konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da die Inkubation der Zellen mit 100 μ mol/l Barium oder 10^{-5} mol/l Nikotin in der Proliferationsrate gegenüber dem Standardmedium keine signifikanten Unterschiede zeigte. Die bei den vorgestellten Messungen verwandten Nikotinkonzentrationen entsprechen denen, die im Plasma von Rauchern vorgefunden werden (8,45). Nach Inhalation des Nikotins in der Lunge passiert das Alkaloid auf direktem Wege die Koronararterien und die cerebralen Gefäße. Danach setzt eine zunehmende venöse Durchmischung ein, die zu einer Herabsetzung der Nikotinkonzentration

führt. In den cerebralen- oder Koronararterien dürften die Konzentrationen von 10^{-6} mol/l Nikotin noch weit überschritten werden, da die in der Literatur angegebenen Nikotinkonzentrationen im venösen Blut ermittelt wurden. Villablanca konnte zeigen, daß analog zu den vorgestellten Ergebnissen bei Nikotinkonzentrationen höher als 10^{-6} mol/l sich die Endothelproliferation verminderte bei gleichzeitiger Reduktion der DNA-Synthese. Bei Konzentrationen kleiner als 10^{-8} mol/l zeigte sich eine Steigerung der Proliferationsrate (50). Da die Blockade der K_{IR} -Kanäle sowohl mit dem spezifischen Blocker Barium als auch Nikotin zu einer Verminderung der bFGF-induzierten Endothelproliferation führte, ist die Aktivierung des K_{IR} -Kanals offenbar von essentieller Bedeutung zur Steigerung der Endothelproliferationsrate. Direkt zytotoxische Effekte der Blocker bei den verwendeten Konzentrationen erscheinen unwahrscheinlich: Es wurden Zellen mit Nikotin oder Barium ohne bFGF kultiviert. Die Vergleichskultur waren ohne Blocker und bFGF-kultivierte Zellen. Es ergab sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Neben dem K_{IR} -Kanal sind weitere Kanäle bekannt, deren Blockade an Endothelzellen zu einer Senkung der bFGF-vermittelten Zellproliferation führen. Sowohl für den Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanal als auch für den volumen-sensitiven Cl^- -Kanal (52) konnte dieses Verhalten gezeigt werden. Dieses Verhalten scheint aber nicht auf Endothelzellen beschränkt zu sein. Die Proliferation von menschlichen Melanomzellen wird in Anwesenheit von Blockern des *delayed-rectifier*-Kalium Kanals vermindert (37). Die Bedeutung bFGF-vermittelten Zellproliferation bei Gefäßschäden wurde in Experimenten von Lindner et al (27) aufgezeigt: Bei Ratten, deren Carotiden durch Ballondilatation denudiert wurden, zeigte sich eine deutliche Beschleunigung der Reendothelialisierung unter einer bFGF-Infusionstherapie. Von Bedeutung ist diese Beschleunigung der Reendothelialisierung durch bFGF sicherlich nicht nur bei großflächigen Endothelschäden .

Aufgrund der Ergebnisse erscheint wahrscheinlich, daß bei Rauchern aufgrund der durch Nikotin herabgesetzten bFGF-vermittelten Proliferationsrate der Endothelzellen denudierte Gefäßabschnitte verzögert reendothelialisiert werden, und damit der Entstehung der Arteriosklerose Vorschub geleistet wird. Da durch den Nikotineinfluß die proliferative Wirkung des bFGF vermindert wird, kann angenommen werden, daß bei Rauchern nach PTA oder PTCA die Reendothelialisierung verzögert geschieht. Folgen wären lokal ein erhöhtes Thromboserisiko und eine Förderung der Bildung arteriosklerotischer Plaques. Weiterhin ist davon auszugehen, daß Nikotin durch seine antiproliferativen Eigenschaften die Kollateralisation und Angiogeneese in minderversorgten Gewebereichen vermindert.

Bei physiologischen Membranpotentialen der Endothelzellen kommt es zu einem Kaliumausstrom über den K_{IR} -Kanal. Dieser Strom führt zu einer Hyperpolarisation der Zellen. Durch die Blockade des Kanals vermindert sich die Hyperpolarisation der Zelle und als Folge der Ca^{2+} -Einstrom. Da die NO-Produktion calciumabhängig ist, kommt es möglicherweise zu einer Verminderung der NO-Produktion durch Nikotin. Die Folge wäre eine nikotininduzierte Gefäßkonstriktion. Dem entgegen wirkt die durch Nikotin induzierte Aktivierung der isolierten NO-Synthase, wobei dabei die Voraussetzung die Diffusion des polaren Moleküls in die Zelle ist (49).

6. Zusammenfassung

Einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (K_{IR} -Kanäle) steuern mit ihren die Zelle dominierenden Ionenströmen das Ruhepotential der Endothelzellen. Über die Steuerung des Ruhepotentials haben sie auch einen wesentlichen Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit auf viele calciumabhängige Prozesse wie die Steuerung der Zellpermeabilität und die Stickstoffmonoxid- (NO) Produktion. Es stellte sich die Frage, inwieweit dieser Kanal an der durch bFGF induzierten Endothelproliferation beteiligt ist. Von Interesse war auch, ob Nikotin als weitverbreitete Zivilisationsdroge das Verhalten der K_{IR} -Kanäle und als Folge die bFGF-induzierte Zellproliferation stört. Als Modell wurden aus Nabelschnüren gewonnene Endothelzellen (*Human Umbilical Cord Vein Cells*) verwendet und das Kanalverhalten mit der *patch-clamp*-Technik durch *whole-cell* Messungen ermittelt.

Bei den elektrophysiologischen Messungen zeigten sich zwei Subtypen der Zellen. Bei der einen Zellgruppe kam es nach Perfusion mit 100 μmol Barium zum vollständigen Erliegen des Einwärtsstromes bei angelegten negativen Membranspannungen. Die zweite Gruppe zeigte einen Reststrom. Das Gleichgewichtspotential der ersten Zellgruppe lag dicht beim Kaliumgleichgewichtspotential, da diese Zellgruppe offenbar vom K_{IR} -Kanal dominiert wird. Bei der zweiten Gruppe mit einem deutlich niedrigeren Gleichgewichtspotential muß neben den K_{IR} -Strömen von einer großen Zahl weiterer Einwärtsströme ausgegangen werden. Chloridströme dürften in diesem Falle großen Anteil an den Einwärtsströmen haben. In weiteren elektrophysiologischen Messungen wurden lediglich die Zellen der ersten Gruppe untersucht. Die Perfusion der Zellen mit 50 ng/ml bFGF bewirkte einen signifikanten Anstieg des K_{IR} -Stromes ($n=18$, $p<0.01$). Bei der simultanen Perfusion mit 50 ng/ml bFGF und 100 μmol Barium kam es zur vollständigen Blockade des K_{IR} -Stromes. Die Perfusion der Zellen mit Nikotin der Konzentration 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l ergab eine dosisabhängige Reduktion des K_{IR} -Stromes mit einer ED_{50} von $10^{-7.2}$ mol/l Nikotin. Die simultan mit Nikotin der Konzentration 10^{-5} mol/l und bFGF der Konzentration 50 ng/ml perfundierten Zellen zeigten weiterhin eine signifikante Reduktion des K_{IR} -Stromes ($n=8$, $p<0.01$).

Im weiteren wurde die Bedeutung der durch bFGF hervorgerufenen Kanalaktivierung auf die Proliferationsrate der Endothelzellen untersucht. Die Zellen wurden mit bFGF und dem spezifischen K_{IR} -Kanalblocker Barium oder bFGF und Nikotin inkubiert. Nach 7 Tagen zeigte sich sowohl bei Bariumkonzentrationen von 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$, $p<0.01$) als auch bei Nikotinkonzentrationen von 10^{-6} und 10^{-5} mol/l ($n=8$, $p<0.01$) eine Verminderung der

Proliferationsrate. Direkt zytotoxische Effekte durch diese Substanzen konnten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Messungen zeigen, daß offenbar die Aktivierung des K_{IR} -Kanals ein notwendiger Schritt zur bFGF vermittelten Steigerung der Proliferationsrate ist. Nikotin vermindert in Konzentrationen, wie sie im Serum von Rauchern gefunden werden, die endotheliale Proliferationsrate und damit die Regenerationsfähigkeit geschädigter Gefäße. Zudem dürfte Nikotin auf direktem Wege durch Blockade des K_{IR} -Kanals zu einer Störung der Calciumhaushaltes der Zellen aufgrund der Veränderung des Membranpotentials führen.

7. Literaturverzeichnis

1. Albaugh G, Kann B, Strande L. Nicotine induces endothelial TNF- α expression, which mediates growth retraction in vivo. *J Surg. Res* 2001;2:381-384
2. Alkondon M, Albuquerque E. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1993, 265:1455-1473
3. Bahnak B, Wu Q, Coulombel L. Expression of von Willebrand Factor in porcine vessels: heterogeneity at the level of von Willebrand Factor mRNA. *J Cell Physiol* 1989;138:305-310
4. Battler A, Scheinowitz M, Bor A. Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22:2001-2006
5. Beckerath von M, Dittrich M, Klieber H, Daut J. Inwardly rectifying K⁺ channels in freshly dissociated coronary endothelial cells from guinea-pig heart. *J Physiol.*1996;491:357-365
6. Beny J. Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries. *Pflüg Arch* 1997; 433:364-367
7. Black C, Ning H, Peter C. Effect of nicotine on vasoconstrictor and vasodilator responses in human skin vasculature. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001;281:R1097-R1104
8. Blanche D, Bouthillier D, Davignon J. Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalisation by Aspirin. *Arteriosclerosis.* 1992;93:179-188
9. Bouche G, Gas N, Prats H. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0 to G1 transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6770-6774
10. Brindele N. Growth factors in endothelial regeneration. *Cardiov Res* 1993;27:1162-1172
11. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogens and signal transduction. *Cell* 1991;64:281-302
12. Conti-Fine B, McLane K, Raftery M. The nicotinic acetylcholine receptor: Structure and autoimmune pathologie. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29:69-123
13. De Clerck F, De Brabander M, Neels H, Van de Velde V, Direct evidence for the contractile capacity of endothelial cells. *Thromb Res* 1981;23:505-520
14. Dubois J, Sioufi A, Müller P. Pharmacokinetics and bioavailability of nicotine in healthy volunteers following single and administration of different doses of transdermal nicotine systems. *Exp Clin Pharmacol* 1989;11,3:187-195

15. Elam T, Lansman J. The role of Mg^{2+} in the inactivation of inwardly rectifying K^+ channels in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol.* 1994;103:549-581
16. Ewenstein B. Vascular biology of v. Willebrand factor. *Vascular Endothelium.* Hsg. Born Schwartz. Schattauer. 1997;107
17. Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag 1988;801-808
18. Groschner K, Kukovetz W. Voltage sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells. *Pflügers Arch* 1992;421:209-217
19. Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B. Improved patch-clamp-techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100
20. Harrison D, Freiman P, Armstrong M, Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ Res* 1987;61:II74-80
21. Himmel H, Rasmusson R, Strauss H. Agonist-induced changes of $[Ca^{2+}]_i$ and Membrane currents in single bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994;267:C1338-C1350
22. Jaffe E, Nachmann J, Becker C, Minick R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins-identification by morphological and immunological criteria. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-2756
23. Katnik C, Adams D. An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *J Physiol* 1995;485:595-606
24. Langmann J. Medizinische Embryologie. Thieme 1984;193
25. Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme 1985;194
26. Li H, Cybusky M, Gimbrone M, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Throm* 1993;13(2):197-204
27. Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest* 1990;85:2004-2008
28. Lodish, Berk, Zipursky. *Molecular Cell Biology.* WM Freeman and Company 1998 Chapter 21
29. Mack Lin K, Maus A, Pereira E. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287:435-439
30. Mehrke G, Pohl U, Daut J. Effects of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium. *J Physiol.* 1991;439:277-299

31. Münzel T. Freie Sauerstoffradikale und Atherogenese. Supplementum 1, Z f. Kardiol. 1999;88,2
32. Nilius B, Felix V, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 1997;49:145-169
33. Nilius B, Oike M, Zahradnik I, Droogmann G. Activation of a Cl current by hypotonic volume increase in human endothelial cells. *J Gen Physiol*. 1994;103:787-805
34. Nilius B, Riemann D. Ion channels in human endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* 1990;9:89-112
35. Nilius B, Schwarz G, Droogmans G. Modulation by histamine of an inwardly rectifying potassium channel in human endothelial cells. *J Physiol*. 1993;472:359-371
36. Nilius B, Viana F, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 1997;59:145-170
37. Nilius B, Wohlrab W. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*. 1992;445:537-548
38. Olsen S, Clapham D, Davies P. Hemodynamic shear stress activates a K current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988;331:168-170
39. Pennefather P, Decoursey T. A scheme to account for the effects of Rb⁺ and K⁺ on inward rectifier K channels of bovine artery endothelial cells. *J Gen Physiol* 1994;103: 549-581
40. Pober J, Cotran R. Cytokins and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 1990;70:427-451
41. Poston R, Haskard D, Coucher J, Gall N. Expression of intracellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992;140:665-673
42. Resnick N, Gimbrone M. Haemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 1993; 9:4591-4595
43. Ross R, Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;4:714-719
44. Rusko J, Tanzi F, Breemen van C, Adams D. Calcium-activated potassium channels in active endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J Physiol*. 1992;455:601-621
45. Russel M, Raw M, Taylor C, Feyerabend C, Saloojee Y. Blood nicotine and carboxyhemoglobin levels after rapid smoking aversion therapy. *J Consult Clin Psychol.* 1978;46:1423-1431
46. Sato Y, Bifkin D. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DANN synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1199-1205
47. Soltoff S, Cantley L. Mitogens and ion fluxes. *Annu Rev Physiol* 1988;50:207-223

48. Tang G, Hanna S, Wang R. Effect of nicotine on K channel currents in vascular smooth muscle cells from rat tail arteries. *Eur J Pharmacol* 1999;364:247-254
49. Tonnessen B, Sverson S, Hurt R. Modulation of nitric-oxide synthase by Nicotine. *J Pharm Exper Ther* 2000;295:601-606
50. Villablanca A. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vivo. *J Appl Physiol.* 1998;84:2089-2098
51. Voets T, Droogmans G, Nilius B. Membrane currents and the resting membrane potential in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol.* 1996;497:95-107
52. Voets T, Szücs G, Droogmans G, Nilius B. Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflügers Arch.* 1995;431:132-134
53. Walenberger J. Modulation of growth factor action: Implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulatin.* 1997;96:4083-4094
54. Wang Y, Pereira E, Maus A. Human Bronchial Epithelial and endothelial cells express α_7 , nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 60:1201-1209
55. Wiecha J, Münz B, Wu J, Noll T, Tillmanns H, Waldecker B. Blockade of Ca-aktivated K channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor. *J Vasc Res* 1998;35:363-371
56. Yang H, Deschenes M, Ogilvie R, Terjung R. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circ res* 1996;79:62-69
57. Zidovetzki R, Chen P, Fisher M, Hofman F. Nicotine increases plasminogen activator inhibitor-1 production by human brain endothelial cells via protein kinase c-associated pathway. *Stroke.* 1999;30:651-655

8. Lebenslauf

Name: Wolfram Scharbrodt
geboren: 20. Juli 1967 in Leverkusen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Religion: evangelisch

Ausbildung:

1974-1978 Waldschule, Leverkusen
1978-1980 Gemeinschaftsschule J. Dott-Straße, Leverkusen
1980-1984 Städtische Gemeinschaftsschule am Karl-Maria-von-Weber-Platz, Leverkusen
1984-1987 Landrat-Lucas-Schule, Leverkusen
Mai 1987 Abitur

Okt. 1987 - Nov. 1993 Studium der Physik an der Universität zu Köln
Oktober 1992: Beginn der Diplomarbeit
Nov. 1993: Abschluss des Physikstudiums mit Diplom

Thema der Diplomarbeit: „Druckabhängige Röntgendiffraktometrie und EXAFS-Messung an ternären Europium-Pnictiden“

Jan. 1994 - März 1994: Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am II. Physikalischen Institut der Universität zu Köln

April 1994: Beginn des Medizinstudiums an der Justus-Liebig-Universität Gießen
März 1996: Physikum
April 1996: Beginn einer Doktorarbeit auf dem Gebiet der Zellulären Elektrophysiologie in der Abteilung für Kardiologie der Universität Gießen
März 1997: Erstes Staatsexamen
April 1999: Zweites Staatsexamen
Mai 2000: Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

01. Juli 2000 Beginn der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Neurochirurgischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen
01. Jan. 2002 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Gießen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernd Waldecker danken, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit im Rahmen der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe für zelluläre Elektrophysiologie zu erstellen.

Besonderer Dank gebührt Dr. med. Johannes Wiecha für die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit, die vielen Anregungen, die interessanten Diskussionen und die Einführung in Theorie und Praxis der Patch-Clamp-Messung an Endothelzellen.

Dr. med. Jongjian Wu möchte ich für die anregenden Diskussionen und die praktische Unterstützung bei den Proliferationsmessungen danken.

Für die Hilfe und die vielen Tipps bei der Durchführung der Zellkultur gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Piper und seiner Arbeitsgruppe.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Astrid für ihre Geduld, die sie mir bei der Erstellung dieser Arbeit entgegenbrachte sowie bei meinen Eltern für ihre langjährige Unterstützung.