Medizinisches Universitätsklinikum Ulm
Abteilung Innere Medizin II
Leiter: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-A aktiviert kalziumaktivierte Kalium-Kanäle in humanen Venenendothelzellen in vitro

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Dr. med.
der
Medizinischen Fakultät
der
Universität Ulm

vorgelegt von
Jochen Bernhard Raithel
aus Ludwigshafen

2001

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre
1. Berichterstatter: PD. Dr. J. Waltenberger
2. Berichterstatter: PD. Dr. K. Föhr
Tag der Promotion: 26.04.2002

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungen iii

1 Einleitung 1

1.1 Allgemeine Einführung 1

1.2 Grundlagen der Angiogenese und Atherogenese 2

1.3 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) 4

1.4 Rolle des intrazellulären Kalziumspiegels 8

1.5 Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle 8

1.6 Carboxyamidotriazol (CAI) 12

1.7 Ziele der Arbeit 13

2 Material und Methoden 14

2.1 Zellkultur 14

2.1.1 Lösungen 14

2.1.2 Zellkultivierung 15

2.2 Patch-Clamp Experimente 17

2.2.1 Lösungen 17

2.2.2 Versuchsaufbau 18

2.2.3 Meßverfahren 21

2.2.4 Datenerfassung und –auswertung 26

2.3 Wachstumsversuche 27

2.4 Statistische Analyse 29

2.5 Votum der Ethikkommission 29

3 Ergebnisse 30

3.1 Patch-Clamp Experimente 30

3.1.1 Charakterisierung des BK-K_{Ca} - Kanals in HUVEC 31

3.1.2 Die Wirkung von VEGF auf den BK-K_{Ca}-Kanal in HUVEC 38

3.1.3 Die Wirkung von CAI auf die VEGF-induzierte Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC 44

3.2 Zellkulturversuche 47

3.2.1 VEGF-induzierte Proliferation von HUVEC 48

3.2.2 Beeinflussung der VEGF-Wirkung durch Iberiotoxin 51

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen und der Wachstumsversuche 52

4 Diskussion 53

4.1 Zellmaterial 54

4.2 Untersuchungstechniken 54

4.2.1 Patch-Clamp Technik 54

4.2.2 Zellkulturtechnik 55

4.3 BK-K_{Ca}-Kanal 56

4.4 VEGF/CAI 58

4.5 Signaltransduktion 62

4.5.1 Rolle von Ca^{2+} 62

4.5.2 Rolle des BK-K_{Ca}-Kanals 62

5 Zusammenfassung 65

Literatur 67

Danksagung 83

Abkürzungen

A-D-D-A	Analog-Digital-Digital-Analog
aFGF	saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BAEC	bovine Endothelzellen der Aorta
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BK-K_{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal großer Leitfähigkeit
CAI	Carboxyamidotriazol
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase
FCS	Fetales Kälberserum
Flt1	fms-like Tyrosinkinase
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IbTX	Iberiotoxin
IP_3	Inositoltriphosphat
kb	kilo Base(n)
K_{Ca}	kalziumaktivierter Kaliumkanal
K_d	die für die halbmaximale Wirkung notwendige Konzentration (hier: Konzentration einer Substanz (TEA), die den K_{Ca}-Kanal halbmaximal hemmt)
KDR	kinase insert domain-containing receptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n.s.	nicht signifikant
n	Anzahl unabhängiger Experimente
NO	Sickstoffmonooxid
NP_0	Gesamtoffenwahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepuffertes Kochsalz
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIP_2	Phosphatidylinositoldiphosphat
PLC-γ	Phospholipase C-γ
r^2	Pearson´scher Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TEA	Tetraethylammonium
TNF-α	tumor necrosis factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor-A / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-A (165 Aminosäure-Bausteine)
VPF	vascular permeability factor
TGF-β	transforming growth factor β

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Wachstumsfaktoren bestehen aus Polypeptidmolekülen und sind in der Lage, die Proliferation bestimmter Zelltypen mehr oder weniger spezifisch zu stimulieren. Dies kann auf dem Boden physiologischer als auch pathologischer Vorgänge geschehen. Von hohem Interesse sind hierbei Wachstumsfaktoren, die ihre Wirkung auf vaskuläre Umbauprozesse, speziell auf endotheliale Funktionen entfalten. Dies ist besonders im Hinblick auf eine in der Zukunft eventuell mögliche therapeutische Beeinflussung zu sehen.

Der hier untersuchte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein potenter Vertreter dieser Stoffgruppe. VEGF stimuliert die Proliferation und Migration von Endothelzellen, die beide entscheidende Schritte bei der Angio- wie auch bei der Atherogenese darstellen. Man weiß heute, daß VEGF an zellmembranständige Rezeptoren bindet und intrazelluläre Effekte über verschiedene Mechanismen ausübt. Diese Effekte resultieren u.a. in einer gesteigerten DNA-Synthese und einer konsekutiv erhöhten Zellteilungsrate. Inwieweit ionale Veränderungen, im besonderen die Elevation des intrazellulären Kalziumspiegels, dabei eine Rolle spielen, sollte mit Hilfe der Patch-Clamp Technik und zellbiologischen Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Durch die Anwendung der Patch-Clamp Technik in der elektrophysiologischen Forschung gelingt es heute, Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle darzustellen. Im Unterschied zur Mikroelektroden-Technik wird das untersuchte Gewebe nicht angestochen, sondern durch eine Glaselektrode nur berührt. Dabei bildet sich zwischen aufgesetzter Elektrode und Zellmembran eine Verbindung, die den darunter liegenden Membranfleck elektrisch und mechanisch isoliert. Dieser ist im Idealfall so klein, daß nur ein einzelner Ionenkanal enthalten ist. Vorteilhaft ist, daß mit der Patch-Clamp Technik Ströme und Potentiale einzelner Zellen abgeleitet werden können, ohne dadurch die Integrität der Zelle zu verletzen. Bei der Mikroelektroden-Technik, bei der eine Mikroelektrode in die Zelle eingestochen wird, ist dies nicht gewährleistet, die Beeinflussung intrazellulärer Stoffwechselvorgänge ist nicht auszuschließen und auch die Untersuchung einzelner Kanäle ist nicht möglich.

Um die intrazellulären Veränderungen des Kalziumspiegels nachweisen zu können, griff man neben Kalzium-Fluoreszenz-Messungen auch auf die Untersuchung von kalziumaktivierten Kaliumkanälen (K_{Ca}) zurück. Diese beeinflussen durch ihre Aktivität das Membranpotential und sind, wie viele Arbeiten zeigen, in verschiedenen Zellsystemen vorhanden. Teilweise sind sie auch

direkt an zellproliferativen Vorgängen beteiligt. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte die Existenz dieser Kanäle in den Endothelzellen der menschlichen Umbilikalvene durch die spezifische Spannungsabhängigkeit und Ionenleitfähigkeit sowie durch die Blockierbarkeit nachgewiesen werden. Inwieweit sich diese Vorgänge beeinflussen ließen, wurde mit der Applikation des Imidazolderivates Carboxyamidotriazol (CAI), einem Inhibitor der Angiogenese mit tumoristatischer Wirkung, untersucht. In Zellkulturversuchen wurden schließlich noch die makroskopischen Effekte von VEGF und Iberiotoxin an Hand der Zellvermehrung bzw. deren Inhibition gezeigt.

1.2 Grundlagen der Angiogenese und Atherogenese

Das Entstehen von Blutgefäßen stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Organentwicklung und Differenzierung während der Embryogenese (Hamilton et al. 1962) wie auch für die Wundheilung und die Regeneration von Organen (Folkman et al. 1987) dar.
Jedoch ist die Angiogenese auch bei einer Reihe pathologischer Prozesse beteiligt, wie z.B. bei der Tumorentstehung, der Rheumatoiden Arthritis (Folkman 1995), der Psoriasis (Detmar et al. 1994) und bei proliferativen Retinopathien (Adamis et al. 1994). Gerade die durch Neovaskularisationen sichergestellte, besonders gute Blutversorgung erlaubt Tumorzellen erst das oft sehr schnelle Wachstum und erleichtert das Aussenden von Metastasen (Folkman 1991).

Man konnte feststellen, daß zwischen der Dichte des Gefäßnetzes primärer Mamma-Karzinome und der Lymphknotenmetastasen wie auch der Überlebensrate eine Korrelation besteht (Vartanian u. Weidner 1994). Auch bei anderen Tumoren fand man einen Zusammenhang zwischen Vaskularisation und Invasivität (Macchiarini et al. 1992, Wakui et al. 1992).

Im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle (Ross 1993). Atherosklerotische Gefäßveränderungen wie z.B. die Intimaproliferation der Arterien führen zur koronaren Herzkrankheit, zu zerebraler Ischämie, zur arteriellen Verschlußkrankheit und zu verschiedenen Nierenerkrankungen, um nur die Wichtigsten zu nennen. Praktisch jedes Organ kann davon betroffen werden. Die daraus resultierende Ischämie im Versorgungsgebiet der jeweiligen Gefäße hat wiederum eine meist durch Wachstumsfaktoren getriggerte Stimulation der Angiogenese zur Folge. Die dabei entstehenden Kollateralen helfen, die entstandene Mangelversorgung zu verbessern (Schaper et al. 1996), reichen aber meist nicht für eine Normalisierung der Versorgung aus.

Bei der daraus entstehenden Notwendigkeit der Suche nach Regulatoren der Angiogenese und Atherogenese stieß man auf eine ganze Reihe von potenten Peptidfaktoren: Saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF), basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), transformierender Wachstumsfaktor-α (TGF-α), TGF-ß, Hepatozytenwachstumsfaktor, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Angiogenin, Interleukin-8 (IL-8), der hier untersuchte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und andere. Obwohl diese Moleküle Promotoren sowohl der Angiogenese als auch der Atherogenese sein können, ist es schwierig, das Wissen darüber für therapeutische Zwecke, sei es in agonistischer oder in antagonistischer Weise, zu nutzen.

Es liegen tierexperimentelle Studien vor, die auf eine mögliche positive Beeinflussung des Reendothelialisierungsprozesses nach PTCA oder auf eine Verbesserung der Ausbildung von Kollaterlalkreisläufen durch Wachstumsfaktoren hindeuten (Daut et al. 1988, Übersicht bei Hombach et al. 1995). Diese Studien setzen jedoch die systemische Applikation von Wachstumsfaktoren voraus, was Gefahren in sich birgt (Waltenberger 1997). Da die Wirkung von Wachstumsfaktoren nicht sehr spezifisch ist, beschränkt sich z.B. eine Stimulation der Angiogenese zum Zwecke der Kollateralenbildung nicht auf ein Infarktgebiet, sondern betrifft u.U. auch tumorinduzierte Neovaskularisationen. Auch eine verstärkte Atherosklerose durch den Proliferationsreiz auf glatte Muskelzellen läßt sich bei vielen Faktoren nicht ausschließen.

Eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, ist, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Reaktionskaskade an einer genau definierten Stelle der Signaltransduktion zu beeinflussen. Man nennt dieses Vorgehen deshalb Signaltransduktionstherapie (Levitzki 1994). Dazu ist aber ein detailliertes Wissen über die einzelnen Schritte der Signaltransduktion notwendig.

Man weiß bisher, daß dabei die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels ein wesentlicher Bestandteil ist. Dieser Effekt beruht bei Endothelzellen auf der Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (Berridge 1995) sowie auf dem erhöhten Einstrom von Kalzium durch geöffnete Kalziumkanäle. Die Entleerung aus intrazellulären Speichern wird im wesentlichen durch Inositoltriphophat, welches neben Diacylglycerol (DAG) aus der Spaltung von Phosphatidylinositol- Triphosphat (PIP_2)entsteht, bewerkstelligt. Außerdem läßt sich nach Wachstumsfaktor-Applikation eine Steigerung des intrazellulären pH-Wertes nachweisen, der auf der Aktivierung des zellmembranständigen Na^+/H^+-Antiports beruht (Soltoff et al. 1988, Molenaar et al. 1986). Auch die Proteinphosphorylierung durch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors selbst wird durch Wachstumsfaktoren beeinflußt. Wie diese Vorgänge jedoch genau dazu führen, daß nach Stunden z.B. die DNA-Synthese steigt und die Zellteilungsrate zunimmt, ist noch nicht geklärt.

1.3 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

VEGF ist ein potentes Mitogen für mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen in Arterien, Venen und Lymphgefäßen, wohingegen andere Zelltypen nicht bzw. kaum beeinflußt werden (Ferrara et al. 1989, Leung et al. 1989). Das 46-kDa schwere Molekül ist ein basisches, homodimeres Glykoprotein und gehört zur Familie der heparinbindenden Wachstumsfaktoren.

Es wird von einer 14kb großen Region (Tisher et al. 1991, Houck et al. 1991) auf Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al. 1996) codiert. Menschliches VEGF-A liegt in 4 Isoformen vor (Leung et al. 1989, Tisher et al. 1991, Houck et al. 1991), wobei $VEGF_{165}$ die am häufigsten vorkommende ist. $VEGF_{165}$ besteht aus 165 Aminosäuren und kann in einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen gefunden werden. $VEGF_{121}$ und $VEGF_{189}$ mit 121 bzw. 189 Aminosäuren sind ebenfalls relativ häufig (Tisher et al. 1991, Houck et al. 1991), wohingegen das Gen für $VEGF_{206}$ bisher nur in der cDNA fetaler Leberzellen nachgewiesen werden konnte. VEGF-A mit 165 Aminosäuren wird von verschiedenen Autoren auch als natives VEGF bezeichnet und hat von allen Isoformen die höchste Potenz, was die Stimulation des Endothelzellwachstums betrifft (Keyt et al. 1996). VEGF-C (Joukov et al. 1996) und VEGF-B (Olofsson et al. 1996, Grimmond et al. 1996) sind weitere, erst seit relativ kurzer Zeit bekannte Vertreter der VEGF Familie, spielen jedoch bisher in der Forschung eine untergeordnete Rolle.

VEGF stimuliert in vivo die Angiogenese (Takeshita et al. 1994) und in vitro das Wachstum von Endothelzellen (Conolly et al. 1989). Es konnte in dreidimensionalen in vitro Versuchen gezeigt werden, daß VEGF-A das Einwandern von Endothelzellen in Kollagen-Gele fördert und die Bildung konfluierender Endothelzellverbände sowie kapillarähnlicher Strukturen stimuliert (Pepper et al. 1992). An in Kollagen gebetteten Aortenringen der Ratte konnte man das Aussprossen von Endothelzellen beobachten (Nicosia et al. 1994). Auffallend im Hinblick auf die Zielzellen von VEGF-A ist dabei die relative Spezifität. Im Gegensatz dazu führen der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) oder der Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) nicht nur zum Sprossen von Endothelzellen sondern auch zu einer extensiven Proliferation von Fibroblasten (Nicosia et al. 1994), eine Stimulation der Atherogenese in vivo kann somit nicht ausgeschlossen werden.

VEGF wurde ursprünglich unter dem Namen vascular permeability factor (VPF) bekannt, da er in der Lage ist, die Durchlässigkeit der Hautgefäße des Meerschweinchens zu erhöhen (Senger et al. 1983, Conolly et al. 1989). Darüberhinaus erkannte man, daß die Zunahme der mikrovaskulären

Permeabilität einen entscheidenden Schritt in der Tumor- und Wundheilungs-assoziierten Angiogenese darstellt (Dvorak 1986, Dvorak et al. 1987). Das könnte bedeuten, daß die durch VEGF induzierte Leckage von Plasmaproteinen und die daraus resultierende Bildung von extravaskulären Fibrin-Gelen einen wichtigen Schritt im Prozeß des Endothelzellwachstums darstellt. Die erhöhte Permeabilität wurde akut nach direkter Applikation von VEGF bei Endothelzellen kleiner Venolen und Kapillaren gefunden und beruhte auf einer vermehrten Fenestration des Endothelzellverbandes (Roberts et al. 1995).

Ein weiterer Effekt von VEGF auf vaskuläres Endothel ist die Stimulation des Hexosetransports. Bei bovinen Endothelzellen der Aorta (BAEC) stieg der Hexosetransport nach Behandlung mit VEGF oder TNF-α signifikant an (Pekala et al. 1990). Dies dient möglicherweise zur Deckung des gesteigerten Energieverbrauchs während proliferativer oder entzündlicher Vorgänge.

In vitro führt VEGF zu einer dosisabhängigen Vasodilatation (Ku et al. 1993). Gibt man es wachen Ratten intravenös, so kommt es zu einer vorübergehenden Tachykardie, Hypotension und zu einer Abnahme des Herzminutenvolumens (Yang et al. 1996), was vor allem an dem verringerten venösen Rückstrom zum Herzen liegt. Man kann sich diese Effekte durch vom Endothel freigesetzte relaxierende Faktoren wie z.B. NO erklären, die allerdings ein intaktes Endothel voraussetzen. In vitro-Versuche am isolierten Rattenherzen zeigen bezüglich dessen Inotropie keine direkten Effekte (Yang et al. 1996). Allerdings haben auch andere proangiogene Faktoren wie der saure und der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF) ähnliche Wirkungen, auch sie führen zu einer NO-vermittelten Vasodilatation und Hypotension (Cuevas et al. 1996).

Hood et al. konnten an humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) in vitro zeigen, daß VEGF nicht nur die kurz- wie auch langfristige Produktion von Stickstoffmonooxid (NO) steigert, sondern auch zu einer intrazellulären Zunahme der Endothelzellen-Stickstoffmonooxid-Synthetase (ecNOS) führt. ecNOS und die sie codierende mRNA waren nach längerer (24 h) Behandlung mit VEGF signifikant erhöht (Hood et al. 1998), was die andauernde Erhöhung des NO-Spiegels erklärt. Dagegen läßt sich der bei den Experimenten gefundene anfängliche NO-Anstieg als Aktivierung der ecNOS durch den initialen Kalziumanstieg nach VEGF-Behandlung deuten (Hood et al. 1998). Die Hochregulation der ecNOS mRNA ist also nicht für den akuten, sondern für den andauernden Anstieg der VEGF induzierten NO-Produktion verantwortlich zu machen.

Auch bei der Regulation bestimmter Blutzellen läßt sich ein gewisser Einfluß von VEGF nachweisen, so wird z.B. die chemotaktische Aktivität von Monozyten erhöht (Clauss et al. 1990). Aber

auch das Immunsystem schwächende Mechanismen könnten von Wichtigkeit sein. So inhibiert VEGF die Ausreifung bestimmter antigen-präsentierender Zellen wie der dendritischen Zellen. Unreife Zellen werden also beeinflußt, reife hingegen nicht. Tumorwachstum könnte durch diesen Mechanismus eventuell erleichtert werden (Gabrilovich et al. 1996).

Bei der Regulation der Gen-Expression von VEGF sind der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe sowie mehrere Zytokine und Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Werden ruhende humane Keratinozyten Serum, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), TGF-β oder Keratinozyten-Wachstumsfaktor ausgesetzt, kommt es zu einer beträchtlichen Induktion der VEGF-mRNA Expression (Frank et al. 1995). Sinkt der Sauerstoffpatialdruck im Gewebe, so steigt die VEGF-mRNA Expression bei einer Vielzahl verschiedener Zelltypen stark an (Minchenko et al. 1994, Brogi et al. 1994). VEGF-mRNA findet man in großem Ausmaß sowohl in ischämischen, paranekrotisch liegenden neoplastischen Zellen (Shweiki et al. 1992) als auch nach Verschluß einer Koronararterie im Schweinemyokard. Letzteres muß in Zusammenhang mit der nach myokardialer Ischämie auftretenden Revaskularisation gesehen werden (Banai et al. 1994).

Beim Menschen bindet VEGF an mindestens zwei unterschiedliche Tyrosinkinase-Rezeptoren, Flt1 (de Vries et al. 1992) und KDR (Terman et al. 1992), auch als VEGF-Rezeptor 1 und 2 bezeichnet. Diese beiden Rezeptortypen findet man vor allem bei Endothelzellen (Millauer et al. 1993), so auch bei den hier untersuchten humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) (Waltenberger et al. 1994). Transfizierte Endothelzellen der Schweineaorta (PAEC), die diese Rezeptoren exprimieren, zeigen nach VEGF-Stimulation (1-10ng/ml) vielfältige Reaktionen, wie z.B. Veränderungen der Zellform oder erhöhten [^{3}H]Thymidin-Einbau, der als Indikator für die DNA-Synthese-Rate der Zelle herangezogen werden kann. Auch bei HUVEC konnten diese Effekte nachgewiesen werden, jedoch schon bei niedrigerer VEGF Konzentration. PAE Zellen, die weder Flt1 noch KDR exprimierten, blieben im Hinblick auf die oben genannten Veränderungen reaktionslos (Waltenberger et al. 1994). Inwieweit diese Vorgänge an den vielfältigen, VEGF-induzierten Effekten bei Endothelzellen beteiligt sind, ist nicht ganz geklärt und muß erst durch weitere Studien näher beleuchtet werden.

Indessen wurden mehrere Studien durchgeführt, bei denen die therapeutische Applikation von VEGF im Tiermodell sehr vielversprechend erschien, die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Im humanen Modell konzentrieren sich die Versuche vor allem auf Patienten mit myokardialer Ischämie und peripheren Vaskulopathien (Isner 1998, Isner 2000). Sowohl die Anwendung von rekombinantem humanen VEGF als auch von VEGF-kodierender DNA in einer klinischen Phase 1 Studie führten zu meßbaren, dosisabhängigen Effekten, die Kollateralenbildung sowie die myokardialen Perfusionswerte stiegen an (Tio et al. 1999, Hendel et al. 2000).

Tab. 1:Therapeutische Angiogenese durch Applikation von VEGF:

Verschiedene Tiermodelle mit regionaler Ischämie

↑ bedeutet Stimulation, ↓ bedeutet Reduktion

Ort der Applikation	Ergebnisse	Referenz
Kanninchenhinterlauf	Kollateralenentwicklung ↑ Kapillardichte ↑	Takeshita et al. (1994)
Hundeherz	Blutfluß durch Kollateralen ↑ Dichte der intramyokardialen Gefäßverteilung ↑	Banai et al. (1994)
Schweineherz	Myokardiale Funktion (Ejektionsfraktion) ↑ linksventrikuläre Infarktgröße ↓	Pearlman et al. (1995)
Schweineherz	Kollateralendichte ↑ Myokardialer Blutfluß ↑ Myokardiale Funktion↑	Harada et al. (1996)

1.4 Rolle des Kalzium-Spiegels

Die intra- und extrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase ist ein allgemeiner Regulator transmembranärer Vorgänge im Sinne der Signaltransduktion. Auch die Tumorinvasion oder die Metastasierung wie auch die Angiogenese werden davon beeinflußt (Kohn et al. 1995, Cole et al. 1994).

Es existieren mehrere Mechanismen, die an der Kontrolle des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels beteiligt sind. Der Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellulärraum wird durch

G-Protein- aktivierte Ca^{2+}-Kanäle (Brown et al. 1990),

Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+}-Kanäle,

Speicher-gesteuerte Ca^{2+}-Kanäle (store operated Ca^{2+} channels),

Spannungs-gesteuerte Ca^{2+}-Kanäle (voltage operated Ca^{2+} channels) (Felder et al. 1994) und unspezifische Ca-permeable Kationenkanäle

geregelt. Die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt Inositoltriphosphat (IP_3)-getriggert (Berridge 1995). Der intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel beeinflußt u.a. die Proliferation (Baran 1996), Apoptose (Preston et al. 1997) und Angiogenese (Kohn et al. 1995) sowie die Expression von Tumorgenen (Rodland 1997). Man geht deshalb davon aus, daß die Manipulation des Ca^{2+}-Haushalts der Zelle die Entwicklung und Verbreitung von Krebszellen wie auch die Angiogenese beeinflussen kann. Da Endothelzellen, Epithelzellen und mesenchymale Tumorzellen - Vorläuferzellen von Sarkomen - nicht erregbar sind und keine spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Kanäle besitzen, muß man einen nicht spannungsgesteuerten Mechanismus des Kalziumeinstroms in die Zelle annehmen (Adams 1989).

1.5 Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle

Als einer der am besten untersuchten Ionenkanäle gilt der Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanal, kurz K_{Ca} genannt. Bereits 1958 vermutete Gárdos eine Regulation der Kaliumpermeabilität durch Ca^{2+}-Ionen in humanen Erythrozyten (Gárdos 1958). 1978 postulierte Meech die Existenz einer Ca^{2+}-aktivierten K^+-Leitfähigkeit (Meech 1978). 1982 fand man konkrete Hinweise auf die Existenz von K_{Ca}-Kanälen (Methfessel et al. 1982).

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik konnte seither eine Vielzahl an unterschiedlichen K_{Ca}-Kanälen identifiziert werden (Blatz et al. 1987, Grissmer et al. 1993, Latorre et al.1989). Sie werden heute allgemein entsprechend ihrer Leitfähigkeit in drei Kategorien eingeteilt:

1. K_{Ca} großer Leitfähigkeit, auch als BK-K_{Ca} oder Maxi-K_{Ca} bezeichnet,
2. K_{Ca} mittlerer Leitfähigkeit, auch als IK-K_{Ca} bezeichnet und
3. K_{Ca} kleiner Leitfähigkeit, oder kurz SK-K_{Ca} genannt.

Eine Übersicht über die Einteilung der K_{Ca}-Kanäle unter Angabe möglicher Differenzierungskriterien ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab. 2: Einteilung der K_{Ca}-Kanäle anhand ihrer Leitfähigkeit unter Angabe charakteristischer Differenzierungskriterien (de-Allie et al. 1996, Grissmer et al. 1993, Hille 1992)

Abkürzungen: *BK-K_{Ca}* Ca^+-aktivierter K^+-Kanal großer Leitfähigkeit, *IK-K_{Ca}* Ca^+-aktivierter K^+-Kanal mittlerer Leitfähigkeit, *SK-K_{Ca}* Ca^+-aktivierter K^+-Kanal kleiner Leitfähigkeit, *TEA* Tetraethylammonium, *CTX* Charybdotoxin, *IBT* Iberiotoxin

Ionenkanaltyp	**Ionenkanalleitfähigkeit**	**Spannungsabhängigkeit**	**Pharmakologische Modulatoren**
BK-K_{Ca}	100-250 pS	*e*-fach*/9-15 mV	CTX, IBT, TEA
IK-K_{Ca}	20-80 pS	gering/nicht vorhanden	TEA, CTX, IBT
SK-K_{Ca}	4-18 pS	gering/nicht vorhanden	Apamin

**e*-fach ≈ 2,718-fach

Der BK-K_{Ca} der auf Einzelkanalebene am besten untersuchte K^+-Kanal, insbesondere im Hinblick auf biophysikalische Kanaleigenschaften und mögliche Gatingmechanismen (Barret et al. 1984, Blatz 1984, Magleby et al. 1983, Methfessel et al. 1982, Vergara et al. 1983).

Seither konnten K_{Ca}-Kanäle in zahlreichen Zellen, insbesondere in Endothelzellpräparationen gefunden werden. Eine Übersicht ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Die Aktivität von K_{Ca}-Kanälen kann durch ein breites Spektrum an Zellmetaboliten moduliert werden (Toro et al. 1991). Diese Modulationen können entweder direkt oder indirekt über G-Proteine, sekundäre Botenstoffe oder Phosphorylierung vermittelt werden.

Die besondere Bedeutung der K_{Ca}-Kanals liegt in der Kopplung seiner Kinetik an die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration (McManus 1991). Steigt die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration an, wird der Kanal aktiviert. Es kommt zu einem Efflux an K^+-Ionen mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zelle; dadurch kann der elektrochemische Gradient, der den Einstrom von Ca^{2+}-Ionen in die Zelle erleichtert, verstärkt werden (Lückhoff et al. 1990a, Lückhoff et al. 1990b, Vaca et al. 1996, Übersicht bei Nilius 1997). Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationen sind essentieller Bestandteil wichtiger endothelialer Zellprozesse, wie der Freisetzung von NO und der Synthese von Prostazyklinen (Lückhoff et al. 1990b, Übersicht bei Adams 1989). Aber auch für den durch Wachstumsfaktoren vermittelten Prozeß der Zellproliferation sind sie von zentraler Bedeutung (Übersicht bei Molenaar et al. 1986, Rozengurt 1986, Soltoff et al. 1988).

Bisherige Untersuchungen lassen auf eine bedeutende Rolle von K_{Ca}-Kanälen in der Zellantwort auf Stimulation durch einen Wachstumsfaktor schließen. Eine erhöhte Expression von K_{Ca}-Kanälen nach Mitogenstimulation konnte in T-Lymphozyten (Grissmer et al. 1993), ras-transformierenden Fibroblasten (Huang et al. 1993), sowie B-Lymphozyten (Partiseti et al.1992) nachgewiesen werden. In HeLa-Zellen konnte eine zellzyklusabhängige Alteration von K_{Ca}-Strömen über die Zellmembran gefunden werden (Takahashi et al. 1993). Diese läßt sich vermutlich auf eine variable Expression von K_{Ca}-Kanälen mit einem Maximum in der G_1-Phase des Zellzyklus zurückführen. Ähnliches wurde auch bei BK-K_{Ca}-Kanälen in Mausembryonen beobachtet (Day et al. 1993). In kortikalen Neuronen der Ratte kommt es nach Stimulation mit Neurotropin-3 und Nervenwachstumsfaktor ebenfalls zu einer Aktivierung von BK-K_{Ca}-Kanälen (Holm et al. 1997).

Tab. 3:Übersicht über die bis heute in Endothelzellen beschriebenen K_{Ca}-Kanäle und ihre Eigenschaften. Die mit * gekennzeichneten Leitfähigkeitswerte wurden unter physiologischen, alle übrigen Werte unter symmetrischen K^+-Konzentrationen bestimmt.

Abkürzungen: *BAEC* bovine aortale Endothelzellen, *ATP* Adenosintriphophat, *CTX Charybdotoxin, EC* Endothelzellen, *EEC* endokardiale Endothelzellen *HUVEC* humane Endothelzellen der Nabelschnurvene, *NTX* Noxiustoxin, *PAEC* Endothelzellen aus der Schweineaorta, *RAEC* Endothelzellen aus der Kanninchenaorta, *TBA* Tetrabuthylammonium, *TEA* Tetraethylammonium

Studie	**Zellart**	**Spannungsab-hängiges Verhalten**	**Leitfähigkeit γ (in pS)**	**Sonstiges**
Colden-Stanfield et al. 1990	BAEC	keine Angaben	38 (Einwärtsstrom) 16 (Auswärtsstrom)	blockierbar durch TBA, NTX, nicht durch TEA, Apamin
Fichtner et al.1987	BAEC	ja	150	keine Angaben
Groschner et al. 1992	PAEC	nein keine Angaben	9 * 150	blockierbar durchTBA keine Angaben
Hoyer et al. 1994	EEC	ja	192	keine Angaben
Ling et al.1992	BAEC	wenig ja	40 165	keine Angaben
Manabe et al. 1995	EEC Meer-schweinchen	keine Angaben keine Angaben	34 210	keine Angaben keine Angaben
Nilius et al. 1990	HUVEC	keine Angaben	170	Ca^{2+}-Abhängigkeit nicht explizit nachgewiesen
Rusko et al. 1992	RAEC	ja	220	blockierbar durch TEA, TBA, CTX
Sakai 1990	EC der thorakalen Aorta vom Kanninchen	nein	9	Auswärtsstrom, insensitiv gegenüber TEA, Apamin
Sauvé et al. 1988 Sauvé et al. 1990	BAEC	nein	40	aktivierbar durch ATP/ Bradykinin

1.6 Carboxyamidotriazol (CAI)

CAI ist ein synthetisch hergestelltes Molekül und besteht aus zwei Phenyl-Ringen sowie einer Triazol-Gruppe, die mit einer Carboxyl- und einer Amid-Gruppe substituiert ist.
CAI wurde erstmals 1994 von Kohn et al. als Inhibitor eines nicht spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Einstroms beschrieben (Kohn et al. 1994). Daneben werden die Freisetzung von Arachidonsäure und Produktion von Phophoinositolen verringert. Bei *in vitro* Versuchen mit humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) verringerte CAI unter anderem die Proliferation, die Adhäsion und die proteolytische Aktivität.

Im Tierexperiment führt die Präinkubation bestimmter Tumorzellen mit CAI nach Inokulation zu einer Verringerung der Bildung und des Wachstums experimenteller Lungenmetastasen (Kohn et al. 1992). Auch bei humanen Melanom- und Ovarialkarzinom Xenograft-Modellen fand man nach oraler Gabe von CAI ähnlich erfolgversprechende Effekte (Kohn et al. 1992).

In einer klinischen Phase I Studie erhielten Patienten mit fortgeschrittenen, therapierefraktären malignen Tumoren täglich oder jeden zweiten Tag CAI. Die Dosierung wurde so gewählt daß ein Plasmaspiegel von 1-10µM erreicht wurde, der Konzentration, die den Ca^{2+}-Einstrom und die Angiogenese *in vitro* wie auch *in vivo* inhibierte. Bei 49% der Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf konnte eine Stabilisierung erreicht werden (Kohn et al. 1996). Betroffen waren dabei v.a. Ovarial- und kolorektale Karzinome sowie Melanome und nicht kleinzellige Bronchial-Karzinome.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Kalzium im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt. Inwieweit CAI als Inhibitor des nicht spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Einstroms die Wirkung von VEGF auf die Zellproliferation wie auch auf ionale Vorgänge beeinflußt, soll die hier vorliegende Arbeit näher beleuchten.

1.7 Ziele der Arbeit

Wachstumsfaktoren sind in der Lage, vielfältige Mechanismen in ihren Zielzellen auszulösen. Inwieweit VEGF dabei die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene beeinflußt, sollte in Patch-Clamp Untersuchungen gezeigt werden. Ob der in klinischen Studien bereits eingesetzte Ca^{2+}-Einstromhemmer CAI diese Effekte verstärkt oder eher inhibiert, war Thema weiterer Patch-Clamp Versuche.

Schließlich wurden noch Zellkulturversuche durchgeführt, die zeigen sollten, wie VEGF auf das Wachstum der hier untersuchten Endothelzellen (HUVEC) wirkt. Mit einem spezifischen Hemmer des BK-K_{Ca}-Kanals, Iberiotoxin (IBT), sollte näher beleuchtet werden, inwiefern der BK-K_{Ca}-Kanal an diesen Vorgängen beteiligt ist und ob er die durch VEGF ausgelösten Effekte modulieren kann.

Im einzelnen sollten also folgende Fragen beantwortet werden:

- Inwieweit stimuliert VEGF die Proliferation von HUVEC ?
- Ist eine eventuell feststellbare Proliferation von HUVEC von der Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals abhängig ?
- Wie wird die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC durch VEGF verändert ?
- Inwieweit beeinflußt CAI die Effekte von VEGF in HUVEC ?
- Welche Rolle spielt der BK-K_{Ca}-Kanal bei der Signaltransduktion von VEGF in HUVEC ?
- Welche Bedeutung haben der intra- und extrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel bei der Wirkungsvermittlung von VEGF ?
- Ist eine Beeinflussung des BK-K_{Ca}-Kanals durch VEGF in HUVEC vom extrazellulären Ca^{2+}-Spiegel abhängig ?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Gewinnung, Isolierung und Kultivierung von humanen Endothelzellen der Umbilikalvene erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach normaler Geburt in Anlehnung an die von Jaffe et al. beschriebene Methode (Jaffe et al. 1973). Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Hera safe Fa. Heraeus/Fellbach) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen besaßen die typische Kopfsteinpflaster-Morphologie (Jaffe et al. 1973). Der Nachweis von Faktor VIII-Antigen mittels Immunfluoreszenz war positiv (Jaffe 1980).

2.1.1 Lösungen

Alle Zellkultur-Lösungen wurden steril mit Aqua ad iniectabilia (Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen) angesetzt und bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurden die Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

PBS (phosphate buffered saline)

137	mM	Natriumchlorid (NaCl) (Fa. Riedel de Haën, Seelze, Art.-Nr. 31434)
2,68	mM	Kaliumchlorid (KCl) (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 4936)
6,1	mM	Dinatriummonohydrogenphophat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \bullet 2\ H_2O$) (Fa. J.T. Baker B.V., Deventer, Holland, Art.-Nr. 0326)
1,47	mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 4873)

Der pH-Wert wurde mit 1 N Natronlauge (NaOH) (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 9137) auf 7,3 titriert.

Pen/Strep

10 000 U/ml Penicillin und 10 000 µl/ml Streptomycin (Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Art.-Nr. 15140-114)

Trypsin-EDTA-Lösung

0,05 % Trypsin (w/v) und 0,02 % EDTA (w/v) in PBS, Ca^{2+} und Mg^{2+} frei (Fa. Seromed ®, Berlin, Art.-Nr. L2143)

Endothelzellkulturmedium (Kulturmedium)
(maximal 2 Wochen aufbewahrt)
EBM Endothelzellbasalmedium (Fa. PromoCell, Heidelberg, Art.-Nr. C 2221)
0,01 % Gentamycin (50 mg/ml) (Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Art.-Nr. 15750-037)
0,5 % Glutamin (200mM) (Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Art.-Nr. 25030-024)
0,5 % Pen/Strep (v/v) (siehe oben)
10 % FCS (Fa. Bio Whittaker, Verviers, Belgien, Art.-Nr. 14601F); Inaktivierung des Komplementsystems durch Wärmebehandlung (bei 56 °C für 30 min)
0,4 % ECGS/Heparin (v/v) (Heparinanteil 22,5 mg/ml) (Fa. PromoCell, Heidelberg, Art.-Nr. C3014)

Endothelzellhungermedium (Hungermedium)
wie Endothelzellkulturmedium bis auf:
0,5 % FCS (siehe oben) anstelle 10 %
0,15 ‰ Heparin (75µl, 10000 IE/ml)

PBS/0,2 % EDTA-Lösung
0,2 g EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2\ H_2O$) (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. E-5134) wurden in 100 ml PBS (siehe oben) gelöst und anschließend steril filtriert.

2.1.2 Zellkultivierung

2.1.2.1 Kulturgefäße

Gefäße:
- Gewebekulturflaschen (Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen; Art.-Nr. 658175)
- 12-Loch-Platten (Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA; Falcon 3043)
- Petrischalen (Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen; Art.-Nr. 628160 mit Nocken, TC, 60/15 mm, Materialnummer 60005766)

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen gezüchtet. Für die Wachstumsversuche wurden die Zellen in 12-Loch-Platten, für die Patch-Clamp-Versuche in Petrischalen ausgesät. Um ein besseres Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, wurden alle Kulturgefäße mit Kollagen I beschichtet.

Reagenzien:

- Kollagen I (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. C-9791)
- PBS (siehe 2.1.1)
- Natronlauge (siehe 2.1.1)

Beschichtung der Kulturgefäße

Eine Stocklösung von 3 mg Kollagen wurde 1:100 mit PBS verdünnt und mit 5 µl/ml 1 N Natronlauge (NaOH) versetzt. Von dieser jeweils vor dem Beschichten frisch hergestellten Lösung wurden 5 ml pro Flasche, 2 ml pro Petrischale mindestens 30 min, maximal zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Die 12-Loch-Platten wurden mit jeweils 1 ml pro Loch beschichtet. Vor dem Aussäen der Zellen wurde der Überstand abgesaugt.

2.1.2.2 Kulturverfahren

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit Endothelzellkulturmedium inkubiert. Durch einen CO_2-Partialdruck von 5 % wurde das Kohlensäure-Puffersystem des Kulturmediums auf einen pH von 7,3 - 7,4 eingestellt und konstant gehalten. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

Sobald sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte, wurden die Zellen subkultiviert. Das Medium wurde aus den Kulturflaschen abgesaugt, kurz mit 5 ml PBS/0,2 % EDTA gespült und mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung etwa 5 min inkubiert, bis sich mikroskopisch alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Für die Subkultivierung wurden 4 - 5 Tropfen Zellsuspension in eine neue, mit Kollagen beschichtete Kulturflasche überführt und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Für die Patch-Clamp-Experimente wurden etwa 3 Tropfen dieser Suspension in beschichtete Petrischalen gegeben und mit 5 ml Kulturmedium versorgt.

Zum Aussäen in die 12-Loch-Platten wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium auf 10 ml verdünnt und bei 1200 Umdrehungen/min 3 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, resuspendierte man das Pellet in 5 ml Kulturmedium und entnahm von der neu entstandenen Suspension (Suspension B) 50 µl. Diese Menge verdünnte man mit 9,95 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung (siehe 2.1.1) auf 10 ml, also auf eine Verdünnung von 1:200, und bestimmte die Zellzahl mit Hilfe eines Durchflußzytometers (Fa. Schärfe Systems,

Reutlingen, Modell Casy 1). Aus diesem Ergebnis wurde die Menge an Kulturmedium bestimmt, die zur Verdünnung der Suspension B auf 50 000 Zellen / ml erforderlich ist. Anschließend wurden die 12-Loch-Platten mit dieser Suspension so beschickt, daß pro Loch 50 000 Zellen vorhanden waren.

2.2 Patch-Clamp Experimente

2.2.1 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua ad iniectabilia (Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen) angesetzt und bei 4 °C gelagert. Die Badlösung wurde vor Verwendung auf etwa 30 - 35 °C erwärmt.

Badlösung

140 mM Kaliumchlorid (KCl) (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 4936)

0,5 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \bullet 6\ H_2O$) (Fa. Janssen Chimica, Geel, Belgien, Art.-Nr. 19.753.62)

1,5 mM Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \bullet 2\ H_2O$) (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. C-7902)

10 mM HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$) (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. H-3375)

5,5 mM α-D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) (Fa. Janssen Chimica, Geel, Belgien, Art.-Nr. 1700833)

Die Einstellung des pH auf einen Wert von 7,4 erfolgte mit 1 N Kalilauge (KOH) (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 9108).

Pipettenlösung

140 mM Kaliumchlorid (siehe oben)

10 mM HEPES (siehe oben)

1 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat

1 mM EGTA ($C_{14}H_{24}N_2O_{10}$) (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. E-4378)

Die Einstellung des pH auf einen Wert von 7,3 erfolgte mit 1 N Kalilauge.

Perfusionslösungen

Die Perfusionslösungen wurden jeweils kurz vor den Patch-Clamp Versuchen frisch aus den bei -20 °C gelagerten Stammlösungen hergestellt:

- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF): 10 µg VEGF (Fa. Becton-Dickinson, Bedford, MA, Art.-Nr. 40104) in 100µl aqua dest. gelöst: 100 ng/µl;

davon 20 Portionen à 5 µl (Stammlösung 1); vor den Messungen wurde 1 Portion mit Badlösung auf 1 ml aufgefüllt (Stammlösung 2);

Für die Perfusion wurden 50 µl Stammlösung 2 zu 5 ml Badlösung gegeben. Die Endkonzentration betrug somit 10 ng/ml.

- Carboxyamidotriazol (CAI): 10 mM Stammlösung in DMSO, Endkonzentration 10 µM.
- Tetraethylammonium (TEA): Verdünnung von TEA mit Badlösung zu einer Endkonzentration von 30 µM, 300µM und 3 mM.

2.2.2 Versuchsaufbau

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur von etwa 20 °C durchgeführt.

2.2.2.1 Geräte

- schwingungsgedämpfter Arbeitstisch (Fa. Science Products GmbH, Frankfurt/Main, Art.-Nr. 12010100)
- inverses Lichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Modell Axiovert 10)
- Videokamera (Fa. JVC, Japan, Modell TK-S210)
- Videomonitor (Fa. JVC, Japan, Modell SW Monitor TM-122)
- dreiachsiger hydraulischer Mikromanipulator (Fa. Narishige, Tokio, Japan, Modell WR-88)
- motorisierter Mikromanipulator (Fa. Science Products GmbH, Frankfurt/Main, Modell DC 3001 mit Controllereinheit MS314)
- Verstärker mit Sonde (Fa. List-Electronic, Darmstadt, Modell L/M EPC-7)
- Analog-Digital-Wandler (Fa. Axon Instruments, Foster City, CA)
- Aufzeichnungs - und Bearbeitungssoftware pClamp 6.0.3 (Fa. Axon Instuments, Foster City, CA)
- Perfusorpumpe (Fa. WPI, Sarasota, USA, Modell SP200i)
- 8-Pol Tiefpaß Besselfilter (Eigenbau Universitätswerkstatt)

Um Vibrationen, die die Meßergebnisse verfälschen oder erst gar keine Messungen zulassen, zu vermeiden, wurde die gesamte Meßvorrichtung auf einem schwingungsgedämpften Arbeitstisch aufgebaut. Die einzige Verbindung zum feststehenden Teil des Arbeitstisches bestand in den Leitungen der Perfusionspumpe und der Mikromanipulatoren. Da diese sehr flexibel waren, konnte eine Schwingungsübertragung vernachlässigt werden.

Ein großer Faraday-Käfig half, insbesondere den empfindlichen Vorverstärker der Patch-Clamp Meßvorrichtung vor niederfrequenten elektromagnetischen Störungen abzuschirmen. Weiterhin waren alle an den Messungen beteiligten Geräte zusätzlich über niederohmige Kabel geerdet.

Die optische Ausstattung der Meßvorrichtung bestand aus einem inversen Licht-Mikroskop, einer Videokamera und einem Videomonitor. Das grobe Heranführen der Patchpipette sowie die Ausrichtung der Perfusions-pipetten erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle bei 200-facher Vergrößerung. Das Aufsetzten der Pipette auf die Zelloberfläche geschah unter Monitorkontrolle, da hier eine noch stärkere Vergrößerung ein exakteres Steuern der Patchpipette ermöglichte. Ein durch die eingeschaltete Beleuchtung geringfügig erhöhtes Hintergrundrauschen wurde während der Aufzeichnungen in Kauf genommen, um jederzeit die korrekte Position der Pipette kontrollieren zu können.

Mit Hilfe eines dreiachsigen hydraulischen Mikromanipulators wurde die Patchpipette bewegt. Der motorisierte Mikromanipulator diente zum Heranführen der Perfusionspipetten.

Zu Datenerfassung, -speicherung und -analyse wurde ein 586-PC mit einem Digidata-Board als Analog-Digital-Wandler verwendet. Sowohl die Aufzeichnung der Kanalaktivitäten als auch die Pulsgebung erfolgte rechnergesteuert mit Hilfe der Software pClamp 6.0.3. Um hochfrequentes Hintergrundrauschen zu vermindern, wurde vor den A-D-Wandler noch ein 8-Pol Tiefpaß Besselfilter mit einer Grenzfrequenz von 1024 Hz geschaltet.

Das Perfusionssystem bestand aus einer Perfusorpumpe, die durch Silikonschläuche mit den Perfusionspipetten aus Quarzglas verbunden war. Die Erdung der Perfusionslösung erfolgte mit Hilfe von in das Schlauchsystem zwischengeschalteten Metallröhrchen.

2.2.2.2 Funktioneller Aufbau

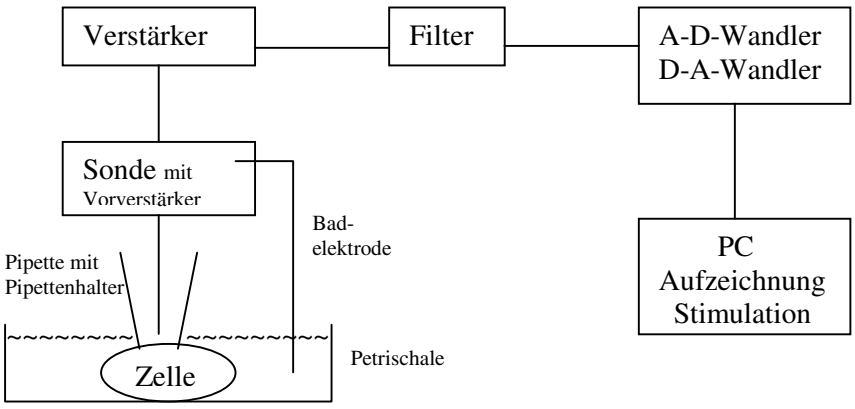

Abb. 1: Schematische Darstellung des Meßsystems

Die über den Vorverstärker amplifizierten Ströme wurden zum eigentlichen Verstärker und von dort zu einem 8-Pol-Tiefpaß Besselfilter mit einer Grenzfrequenz von 1024 Hz geleitet. Dies diente

der Verminderung hochfrequenter Störgeräusche. Der A-D-Wandler arbeitete mit einer Auflösung von 12 bit, die Aufnahmesoftware mit einer Samplingrate von 3 kHz.

2.2.2.3 Pipetten und Elektroden

- Patchpipetten aus Borsilikatglas (Länge 1060 mm, Innendurchmesser 1,00 mm, Wandung 0,25 mm, Fa. Hilgenberg, Malsfeld, Art.-Nr. 1152150)
- Mikroelektrodenpuller (DMZ-Universal Mikroelektrodenpuller, Fa. WZ Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, München)

Die Patchpipetten wurden aus Borsilikatglas, das mit einem Glasschneider auf die für das Pipettenziehgerät (siehe unten) geeignete Länge geschnitten wurde, hergestellt. Nach dem Ziehen wiesen die Pipetten Widerstände von 2 - 7 MΩ auf. Die mit ihnen erreichten Seals waren so gut, d.h. das Hintergrundrauschen so gering, daß eine Sylgardbeschichtung unnötig war. Mit Sylgard (Silikonkautschuk) bis kurz vor die Öffnung überzogene Pipetten zeichnen sich durch eine verringerte Pipetten-Bad Kapazität aus. Das Ziehen der Pipetten geschah mit Hilfe eines waagerechten, elektronischen Mikroelektrodenpullers mit Programmspeicherung, um eine gute Reproduzierbarkeit zu sichern. Die Abrundung der Pipettenspitzen („firepolishing“), die für die Bildung eines „seals“ notwendig ist (Neher 1982), erfolgte im Anschluß an die beiden Zieh-Vorgänge des Pullers automatisch. Anschließend wurden die Pipetten in Pipettenlösung (siehe 2.2.1) getaucht, damit sich die Spitze durch Kapillarkräfte mit Lösung füllte, die weitere Füllung erfolgte dann von der unbearbeiteten Seite. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch leichtes Beklopfen der Pipette zum Aufsteigen gebracht. Die so präparierte Pipette wurde in den Vorverstärker eingesetzt, so daß der chlorierte Silberdraht (siehe unten) in die Lösung tauchte.

Sowohl die Badelektrode als auch die Elektrode des Vorverstärkers bestanden aus einem chlorierten, 0,5 mm starkem Silberdraht. Die Chlorierung erfolgte durch Elektrolyse mit 3 M KCl-Lösung, wobei die zu chlorierende Elektrode am positiven Pol eines 6V-Gleichspannungsgerätes angeschlossen war. Der dabei entstandene graue Elektrodenüberzug aus Silberchlorid gewährleistet, daß der Widerstand konstant bleibt und daß Spannungen über dem Widerstand gleichmäßig abfallen können.

2.2.2.4 Applikation der Teststoffe

- 5 ml-Einwegspritzen (Fa. Becton Dickinson)
- über Sterilfilter (Minisart® sartorius, Porengröße 0,2 µm)

Die Perfusionslösungen wurden in sterilen 5 ml-Einwegspritzen aufgezogen und über Sterilfilter perfundiert. Die Perfusionsrate lag bei allen Versuchen bei 0,1 ml/h. Durch diese geringe Rate wurde ausgeschlossen werden, daß Kanäle durch mechanische Belastung der Zelloberfläche beeinflußt werden (Hoyer et al. 1994). Vor allen Versuchen wurde die Flußrate zusätzlich durch Perfusion einer Farbstofflösung optisch kontrolliert; es zeigte sich dabei ein konstanter Flüssigkeitsstrom, der die Zielzellen sehr sanft und zuverlässig umströmte. Um den mechanischen Einfluß dieses Flüssigkeitsstroms beurteilen zu können, wurden in jeder Meßreihe Kontrollen mit Perfusion von Badlösung durchgeführt. Auf die korrekte Füllung des Perfusionssystems (Schläuche und Pipetten) wurde vor Beginn jedes Versuchs geachtet, um eine unzuverlässige Perfusion auszuschließen.

2.2.2.5 Meßkammer

Alle Messungen erfolgten in den unter 2.1.2.1 beschriebenen Petrischalen, die mit etwa 5 ml Badlösung gefüllt waren. Die Petrischale wurde auf dem Mikroskoptisch befestigt und die Referenzelektrode in die Badlösung eingetaucht.
Für jede Messung wurde eine neue, noch nicht mit Testlösung kontaminierte Petrischale verwendet.

2.2.3 Meßverfahren

Bei der Durchführung der Patch-Clamp Experimente wurde nach der von Hamill (Hamill et al.1981) beschriebenen Technik vorgegangen.

2.2.3.1 Patch-Clamp Technik

Das Prinzip der Patch-Clamp Technik besteht darin, daß man einen Membranfleck („Patch“) vom Rest der Zelloberfläche elektrisch isoliert und somit Vorgänge, die in diesem Patch ablaufen, gezielt beobachten kann. Man erreicht dies, indem man eine Glaspipette auf die Zelloberfläche aufsetzt und somit einen im Durchmesser 2 µm großen Membranfleck elektrisch isoliert. Je besser der Kontakt zwischen dem Öffnungsring der Pipette und der Zellmembran ist, desto geringer sind die entstehenden Leckströme und desto höher der Widerstand. Der Widerstand eines solchen „seals“ beträgt bis zu 10 Gigaohm und ist notwendig, um kleine Stromänderungen in dem untersuchten Patch registrieren zu können. Solche Stromänderungen werden im Idealfall nur durch das Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen erzeugt.

<u>Zellmaterial</u>

Es wurden nur Zellen der Passage 10 bis 13 untersucht. Die letzte Subkultivierung der zu untersuchenden Zellen erfolgte jeweils 1 - 2 Tage zuvor. Damit war gewährleistet, daß die Zellen gut am Boden der Petrischalen angewachsen, aber noch nicht konfluent waren. Für die

Experimente wurden nur mittelgroße Zellen verwendet, die mit ihren Zellausläufern keine anderen Zellen berührten (Goldsmith et al. 1984). Traten nach längerer Verweilzeit der Zellen unter dem Mikroskop (>30 - 60 min) Vakuolen im Zytoplasma auf, wurden die Zellen verworfen. Als Kontaktstelle von Pipettenspitze und Zelle wurde immer der Bereich über dem Zellkern gewählt, da die Endothelzellen an dieser Stelle am dicksten waren und sich am besten der Pipettenspitze anpassen konnten.

Vorgehen

Nachdem die frisch hergestellte und mit Pipettenlösung gefüllte Pipette im Pipettenhalter festgeschraubt war, wurde über ein angeschlossenes Schlauchsystem ein leichter Überdruck in der Pipette erzeugt. Dieser verhinderte, daß sich beim Eintauchen der Pipetten in die Badlösung Verunreinigungen festsetzten und die Seal-Bildung erschwerten. Sobald die Pipettenspitze in Zellnähe war, wurde der Überdruck abgelassen.

Eventuell vorhandene Offsetpotentiale zwischen den beiden Elektroden wurden nun über den Verstärker auf Null abgeglichen. Anhand des über die Badlösung zwischen Referenzelektrode und Pipette fließenden Stroms konnte der Widerstand der Pipette bestimmt werden, der dazu nötige Testpuls vorgegebener Spannung wurde softwaregesteuert generiert. Beim Berühren der Zelle nahm dieser Testpuls etwa um den Faktor 4 ab, was die korrekte Position der Pipette anzeigte. Legte man nun einen leichten Unterdruck von etwa 10 – 20 cm H_2O an die Pipette an, so bildete sich im Idealfall nach wenigen Sekunden ein Gigaseal. Bildete sich sofort ein seal oder dauerte dies länger als etwa 10 - 15 Sekunden, war der seal in der Regel schlecht haltbar und brach kurze Zeit später zusammen.

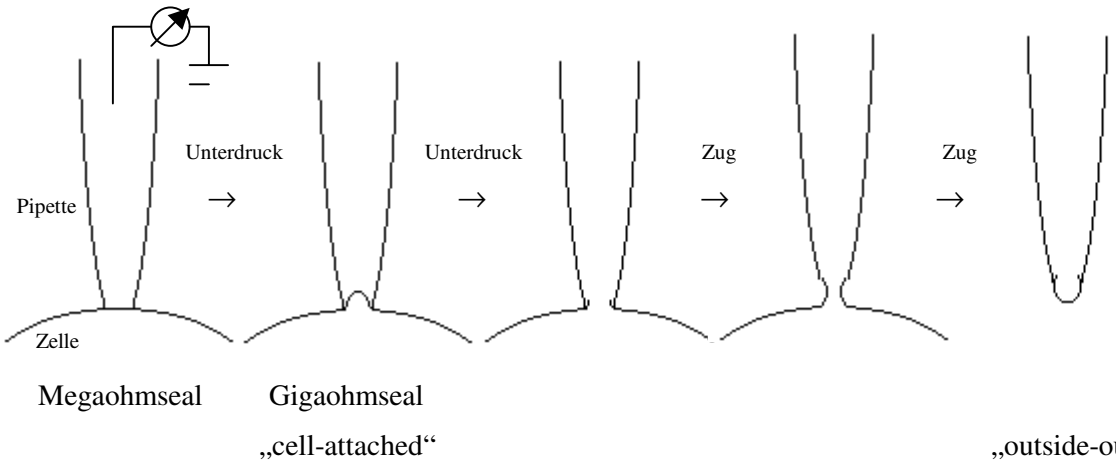

Abb. 2: Meßkonfigurationen der Patch-Clamp Technik nach Hamill et al. (Hamill et al. 1981). Nähere Erläuterungen im Text

Durch bloßes Aufsetzten der Patchpipette auf die Zelloberfläche entstand lediglich ein Megaohmseal, die Leckströme waren zu groß, um Einzelkanalöffnungen registrieren zu können. Erst das kurze Anlegen des Unterdruck ließ einen Gigaohmseal in „cell-attached"-Konfiguration entstehen. Dies war die Konfiguration, in der die Kanalcharakteristiken des BK-K_{Ca}-Kanals sowie die Wirkungen von VEGF und CAI untersucht wurden, da die Zelle und vor allem das Zellinnere intakt blieben; die Signaltransduktion konnte somit weitgehend unbeeinflußt ablaufen.

Legte man nun in diesem Modus einen kurzen, etwas stärkeren Unterdruckimpuls an, so führte dies zu einem Zerreißen der Zellmembran unter der Pipettenspitze. Zog man nun die Pipette mit dem Mikromanipulator ein wenig zurück, so bildete sich an der Pipettenspitze ein kleines Membranvesikel. Man erkannte dies daran, daß der kurzfristig beim Zurückziehen der Pipette entstandene Leckstrom wieder stark abfiel und sich ein neuer seal mit umgekehrter Stromrichtung bildete. Die Oberfläche des Vesikels wurde nun durch die ehemalige Zellmembranaußenseite gebildet, die zytoplasmatische Seite war nun dem Pipetteninneren zugewandt. Dies bedeutete zwar eine unphysiologische Elektrolytverteilung, ermöglichte aber die Untersuchung von Stoffen, die Ionenkanäle direkt von der extrazellulären Membranseite beeinflussen. Der hier zu Beschreibung der Kanalcharakteristik benutzte Stoff Tetraethylammonium (TEA) gehört zu dieser Gruppe. Er blockiert u.a. den BK-K_{Ca}-Kanal von der Außenseite der Zellmembran. Eine Beeinflussung des Kanals im „cell-attached" Modus mit Hilfe einer Perfusion um die Zelle ist also nicht möglich, man müßte die Pipettenlösung mit TEA versetzen. Eine genaue, zeitlich differenzierte Beobachtung der Änderung der Kanalaktivität wäre dann aber nicht möglich.

Strommessung

Die mit der Patch-Clamp Technik meßbaren Ströme setzen sich aus mehreren Komponenten zusammen: Der zu messende Strom durch im Patch gelegene offene Kanäle, der Hintergrundstrom über die Patchmembran ohne Einzelkanalströme und Leckströme zwischen Glaspipette und Zellmembran. Für den Hintergrundstrom kommen z.B. elektrogene Ionenpumpen, Ströme durch ständig offene Ionenkanäle und Ströme durch Kanäle, die zu klein sind, um als Einzelkanalereignisse zu imponieren, in Frage. Einzelkanalströme können also nur sichtbar gemacht werden, wenn sich der Öffnungszustand eines Kanals ändert und der Strom durch den geöffneten Kanal im Patch größer ist als die Summe aus dem Hintergrundstrom und dem Leckstrom.

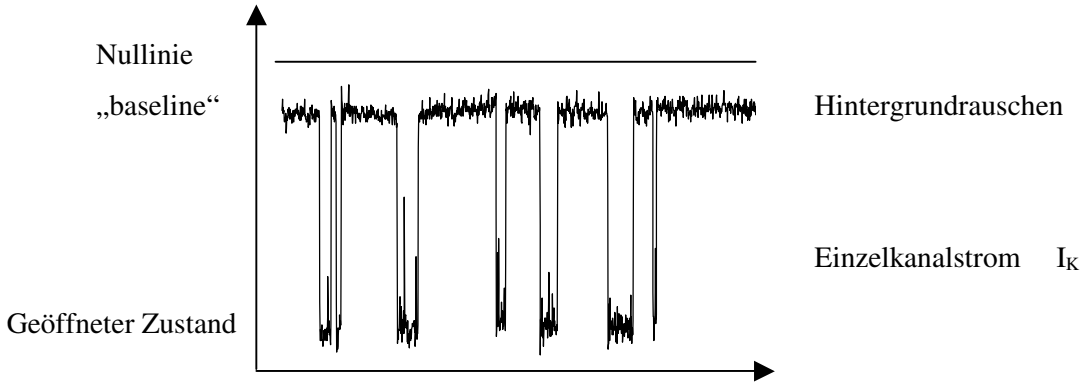

Abb. 3: Beispiel einer Strommessung; auf der Abszisse ist die Zeit t, auf der Ordinate der Strom I aufgetragen. Ist der Kanal geöffnet, mißt man den Einzelkanalstrom I_K, im geschlossenen Zustand nur den oben beschriebenen Leckstrom und Hintergrundstrom. Beides führt dazu, daß die „Baseline“, der Strom, der im geschlossenen Zustand registriert wurde, nicht mit der eigentlichen Nullinie zusammenfällt.

Um die verschiedenen Kanaleigenschaften zu bestimmen, wurde der Strom bei einer Klemmspannung von -60, -80, -100 und -120 mV gemessen. Die Klemmspannung setzt sich dabei aus der Differenz von Ruhemembranpotential und Pipettenpotential zusammen. Das Ruhemembranpotential konnte bei den Versuchen bei 0 mV liegend angenommen werden, da Zytoplasma und extrazelluläre Lösung im Hinblick auf ihre Ionenverteilung symmetrisch waren. Aus der bekannten Spannung und dem gemessenen Strom (= Kanalamplitude) läßt sich dann nach dem Ohmschen Gesetz die Leitfähigkeit des untersuchten Kanals bestimmen.

Die Experimente, die unter Perfusion von Testlösungen abliefen, wurden bei einem konstanten Potential von -80 mV durchgeführt und dauerten bis zu 20 min.

2.2.3.2 Perfusion

Vor der Applikation von Testlösungen wurde 1 - 2 min mit Kontrolllösung (Badlösung) vorperfundiert, um die Ausgangskanalaktivität zu bestimmen. Anschließend wurde die Perfusionspipette gewechselt und Testlösung appliziert. Diese Technik erlaubte das Untersuchen von bis zu 4 verschiedenen Lösungen an einem Patch. Das Membranpotential wurde bei allen Messungen auf 80 mV eingestellt.

Perfusion mit VEGF / CAI

VEGF und CAI wurden, nachdem 1 - 2 min mit Kontrolllösung vorperfundiert wurde, konstant bis zum Abbruch der Aufzeichnung appliziert. Dies geschah durch ein Perfusionssystem, das aus 2 Pipetten bestand, die durch den Mikromanipulator jeweils vor die zu messende Zelle gefahren werden konnten. Da das Volumen der Badlösung verhältnismäßig groß war (~ 5 ml) und der Patch sicher vom Perfusionstrom umspült wurde, konnte eine Beeinflussung der Messungen durch den Wachstumsfaktoreintrag in die Badlösung auf ein Minimum werden (das perfundierte Volumen betrug bei einer 20-minütigen Messung 33 µl). Die Konzentration von VEGF in der Testlösung betrug 10 ng/ml, die von CAI 10 µM. Um den Verlauf beurteilen zu können, wurden die Messungen in 1-minütige Intervalle aufgeteilt und einzeln ausgewertet.

Perfusion mit TEA

TEA wurde in drei verschiedenen Konzentrationen perfundiert: 30 µM, 300µM und 3 mM. Die Perfusion erfolgte mit einem System aus vier Pipetten, wobei die vierte Badlösung als Kontrolle enthielt. Die jeweils 40 s dauernden Messungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt, da die TEA-Wirkung reversibel ist.

1. 40 s Perfusion mit Badlösung
2. 40 s Perfusion mit TEA-Lösung 30 µM
3. 40 s Perfusion mit Badlösung
4. 40 s Perfusion mit TEA-Lösung 300 µM
5. 40 s Perfusion mit Badlösung
6. 40 s Perfusion mit TEA-Lösung 3mM

Dieser Zyklus wurde bis zum Abbruch der gesamten Messung wiederholt. Für die Bestimmung des mittleren Stroms wurden jeweils die Mittelwerte aus 40 s gebildet. Um den relativen Abfall des mittleren Stroms unter TEA-Perfusion zu untersuchen, wurden die Mittelwerte der Kontroll-messungen (unter Badperfusion) vor und nach der TEA-Perfusion mit dem Mittelwert der TEA-Perfusion selbst verglichen.

2.2.4 Datenerfassung und -auswertung

Die in den verschiedenen Konfigurationen gemessenen Ströme wurden mit 50mV/pA verstärkt, durch einen 8-Pol-Tiefpaß Besselfilter geleitet und anschließend digitalisiert. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte auf Festplatte, die Analyse wurde offline durchgeführt. Beides geschah mit Hilfe der Software pClamp 6.03 (Axon Instruments, Foster City, CA).

2.2.4.1 Ermittlung der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit (NP_0)

Die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 wurde als Maß für die Aktivität der im Patch liegenden Ionenkanäle herangezogen. Ihre Bestimmung erfolgte für jede Minute der Messung, bei einer Meßdauer von 15 min erhielt man also 15 Werte. Für NP_0 gilt dabei: $NP_0 = \Sigma\, n\, t_n / T$, wobei n die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle, t_n die Zeit, in der n Kanäle geöffnet sind und T die Gesamtbeobachtungszeit ist. Es wird also die Gesamtdauer aller beobachteter Kanalöffnungen des zu untersuchenden Kanaltyps zur Gesamtbeobachtungszeit in Relation gesetzt.

Dazu mußte man je ein Niveau für den geschlossenen und für einen oder mehrere offene Zustände in der Software festlegen. Mit Hilfe dieser Angaben ermittelte dann die Software eine idealisierte, rechteckförmige Kurve, die nur noch aus Kanalöffnungen und -schließungen bestand. Bei hoher Offenwahrscheinlichkeit konnte man anhand der Überlagerungen von Öffnungen erkennen, ob im Patch mehrere Kanäle vorhanden waren.

Fehler können bei der Schwellenanalyse (Colquhoun et al. 1995) dadurch auftreten, daß Hintergrundströme die Schwelle überschreiten können und als Kanalöffnung gewertet werde. Da der hier untersuchte BK-K_{Ca}-Kanal jedoch eine hohe Leitfähigkeit besitzt, konnte die Schwelle bei 50 % der Kanalamplitude festgelegt werden, wobei die Amplitude des Hintergrundrauschens immer zwischen 5 und 30 % der Kanalamplitude lag. Ein anderes Problem stellen sehr kurze Kanalöffnungen dar. Durch die analoge Filterung der Meßdaten ist es möglich, daß kurze Kanalöffnungen die Schwelle nicht erreichen und somit nicht gewertet werden, auch wenn die Sampling Frequenz des Aufzeichnungssystems an sich groß genug wäre. Zwischen diesen beiden Argumenten mußte ein Kompromiß gefunden werden, der schließlich in der Schwellenfestlegung bei 50 % seinen Ausdruck fand.

2.2.4.2 Ermittlung der mittleren Kanalamplitude

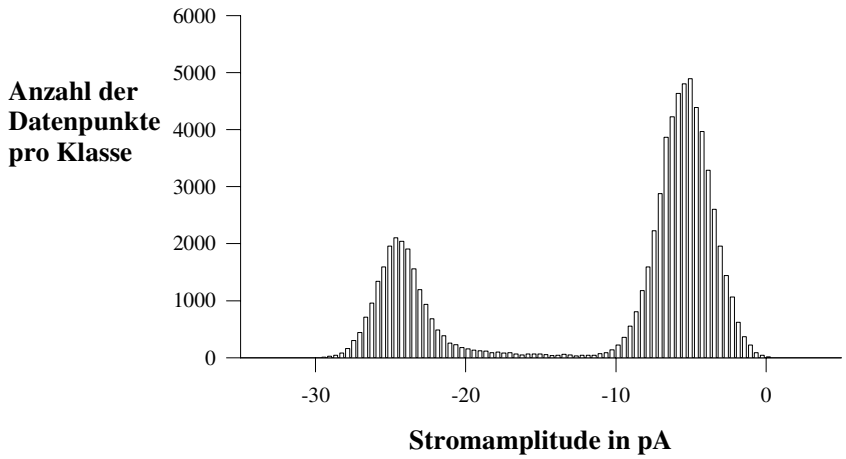

Abb. 4: Amplitudenhistogram aller digitalisierten Punkte einer 59 s dauernden Original-Messung bei –80 mV. Die Einzelkanalamplitude entspricht dem Abstand der Maxima. Das Maximum bei etwa -5 pA entspricht der „Baseline“, das Maximum bei etwa -24 pA dem geöffneten Zustand eines BK-K_{Ca}-Kanals, somit ergibt sich eine Kanalamplitude von 19 pA. Die Klassenbreite der Stromamplitude (sog. „bin-Weite“) liegt hier bei 0,4 pA.

2.3 Wachstumsversuche

Um das Wachstum unter Testfaktoreinfluß beurteilen zu können, wurden die Endothelzellen über einen Zeitraum von 8 Tagen im Brutschrank mit den jeweils zu untersuchenden Kombinationen aus Kulturmedium und Testfaktor inkubiert. Am Tag der Testfaktorzugabe sowie 2, 4 und 6 Tage danach wurden die Zellen mit einem Zellcounter (siehe 2.1.2.2) ausgezählt. Es kamen dabei Zellen der Passage 2 - 11 zum Einsatz, d.h. Zellen die 2 - 11 Mal subkultiviert wurden.

Testlösungen

- VEGF-Lösung: 10 µg VEGF (Fa. Becton-Dickinson, Bedford, MA, Art.-Nr. 40104) in 100µl aqua dest. gelöst, davon verschieden verdünnte Stocklösungen.
- Iberiotoxin-Lösung: 0,05 mg Iberiotoxin (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, Art.-Nr. I-2141) in 500 µl aqua dest. gelöst, davon verschieden verdünnte Stocklösungen.

Verfahren

2 Tage vor Testfaktorzugabe wurden die Zellen auf die 12-Loch-Platten ausgesät, so daß pro Loch 50 000 Zellen vorhanden waren (siehe 2.1.2.2).

Einen Tag vor Testfaktorzugabe - die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt wieder fest am Flaschenboden angewachsen - wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch Hungermedium (siehe 2.1.1) ersetzt, wodurch der wachstumsstimulierende Effekt bestimmter Stoffe in fetalem Kälberserum sowie durch endothelial cell growth supplement (ECGS) auf ein Minimum reduziert wurde.

Am Tag der Testfaktorzugabe wurde ein Loch pro Platte nach dem Absaugen des Hungermediums mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung etwa 5 min inkubiert, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Von der entstandenen Suspension wurden 500 µl entnommen, mit 9,5 ml NaCl-Lösung verdünnt und im Durchflußzytometer ausgezählt. Von jeder Probe wurden im Zellzähler 6 Subproben entnommen, jeweils die Zellzahl bestimmt und das Ergebnis als Mittelwert ausgegeben. Dieser Wert stellte später die Ausgangszahl zur Berechnung der relativen Zellvermehrung dar.

Es wurden pro Kulturflasche 2 Versuchsreihen mit jeweils 3 Platten durchgeführt (siehe Tab. 4):

- Inkubation mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen
- Inkubation mit verschiedenen Iberiotoxin- und gleichbleibenden VEGF-Konzentrationen

Tab. 4 Verteilung der Konzentrationen bei den Versuchen mit VEGF und VEGF/Iberiotoxin
Die Angaben beziehen sich jeweils auf eine 12-Loch-Platte

Konzentrationen von VEGF			
3 Löcher mit 30 ng/ml	3 Löcher mit 10 ng/ml	3 Löcher mit 1 ng/ml	3 Löcher Kontrolle (kein VEGF)

Konzentrationen von Iberiotoxin (VEGF konstant in allen Löchern 10 ng/ml)			
3 Löcher mit 0,1 µM	3 Löcher mit 0,05 µM	3 Löcher mit 0,01 µM	3 Löcher Kontrolle (kein Iberiotoxin)

2.4 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwerte ± mittlerer Standardfehler angegeben, um eine Vergleichbarkeit mit bisher veröffentlichten Studien zu erleichtern.

Da durch die aufwendigen Untersuchungsverfahren keine hohen Fallzahlen zu erreichen waren, wurde die analytisch statistische Auswertung auf die Kanalaktivierungsversuche durch Perfusion mit VEGF beschränkt. Es kam dabei der Student´s t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung, da die Mittelwerte einer Variablen in zwei Gruppen verglichen werden sollten. Als Grundvoraussetzung wurde die annähernde Normalverteilung der gruppenbezogenen Meßwerte gefordert. Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit $< 0,05$ (p-Wert) wurde als statistisch signifikant gewertet.

2.5 Votum der Ethikkommission

Die für die hier aufgeführte Arbeit notwendigen Versuche mit Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) wurden von der Ethikkommission der Universität Ulm unter dem Aktenzeichen 152-96 genehmigt. Der Titel des Antrags lautet „Untersuchung der Signaltransduktionswege im Athero- und Angiogeneseprozeß an menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene“.

3. Ergebnisse

3.1 Patch-Clamp Experimente

Alle im folgenden geschilderten Experimente wurden an Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC), Passage 7 - 13 durchgeführt. HUVEC wachsen im Gegensatz zu glatten Muskelzellen und Fibroblasten als Monolayer (Jaffe et al. 1973), d.h. lediglich zweidimensional. Beginnt der Zellrasen dichter zu werden, was man auch als Konfluenz bezeichnet, sinkt die Proliferationsrate (sog. Kontaktinhibition). Um auszuschließen, daß die Zellen sich bereits im Stadium eines reduzierten Wachstums befanden, wurde streng darauf geachtet, nur bestimmte Zellen für die Experimente zu verwenden:

- Die Zellen berührten mit ihren Ausläufern keine anderen Zellen,
- die Zellen waren von mittlerer Größe,
- eine gewisse Erhabenheit des Zelleibs im Bereich des Nukleus (der Stelle an der die Patch-Pipette aufgesetzt wurde) war erkennbar und
- die Zellen zeigten keine Anzeichen von Überalterung (z.B. beginnende Vakuolenbildung).

Zellen, die weniger als 7 Mal passagiert wurden, zeigten bei wiederholten Seals (>20 Versuche) keine Kanalaktivität. Da auch bei einer Depolarisation um 80 mV keine größeren Kanäle sichtbar wurden, war es wahrscheinlich, daß die hier untersuchten HUVEC der Passage < 7 keine oder nur in sehr geringem Ausmaß aktive BK-K_{Ca}-Kanäle exprimieren. Zellen der Passage 14 und höher zeigten meist eine schlechte Seal-Haltbarkeit, Messungen mußten aufgrund des fallenden Seal-Widerstandes frühzeitig beendet werden.

Alle Messungen bis auf die Kanalblockversuche mit TEA wurden im Verlauf mehrerer Monate mit einem Abstand bis zu einem halben Jahr durchgeführt. Es wurde dabei stets auf die Konstanz der Verfahrensweise geachtet, um die Reliabilität der Ergebnisse gewährleisten zu können. Es zeigte sich dabei, daß die erzielten Ergebnisse auch bei längerem Abstand der Versuche reproduzierbar waren.

3.1.1 Charakterisierung des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC

Zur Charakterisierung des BK-K_{Ca}-Kanals wurden nach Latorre (Latorre et al. 1989) folgende Eigenschaften näher untersucht:

a) die Kanalamplitude,
b) die Leitfähigkeit,
c) die Spannungsabhängigkeit und
d) die Blockierbarkeit durch Tetraethylammonium (TEA).

Die Untersuchungen a) bis c) wurden in cell-attached Konfiguration, die Blockierbarkeit durch TEA im outside-out Modus durchgeführt. Dabei zeichneten sich die in letztgenannter Konfiguration erlangten Seals durch eine gute Haltbarkeit und geringes Hintergrundrauschen aus. Dies kann man darauf zurückführen, daß eventuelle Vibrationen des Versuchsaufbaus nicht mehr die Kontaktstelle von Pipette und Zelle stören konnten. Da man die outside-out Konfiguration jedoch erst aus einem etablierten cell-attached-Seal heraus erreichen kann, waren dazu überdurchschnittlich viele Versuche notwendig.

Leitfähigkeit und Kanalamplitude

Die Leitfähigkeit eines Ionenkanals ist ein Maß für die Leichtigkeit, mit der einzelne Ionen den Kanal passieren können. Sie ist nach dem Ohmschen Gesetz als Kehrwert des Widerstandes definiert. Es sind also sowohl der Stromfluß als auch die Potentialdifferenz als treibende Kraft von Bedeutung.

Das Membranpotential ist als Differenz von angelegtem Pipettenpotential (bei den hier durchgeführten Versuchen -60 mV bis -120 mV) und Ruhemembranpotential definiert. Da das Ruhemembranpotential zum allergrößten Teil von der intra- und extrazellulären Kaliumverteilung abhängt, kann man durch die Kaliumkonzentration in Bad- und Pipettenlösung das Ruhemembranpotential bestimmen. Da alle Messungen unter symmetrischer Kaliumverteilung (K^+-Konzentration 140 mM) erfolgten, kann man davon ausgehen, daß das Ruhemembranpotential bei etwa 0 mV lag, das Membranpotential also dem negativen Pipettenpotential gleichzusetzen war. Ohne angelegte Spannung waren die Kaliumströme über der Zellmembran gleich Null, da keine treibende Kraft vorhanden war, die einen Stromfluß erzeugen konnte. Man nennt dieses Potential, an dem keine Nettoströme fließen, auch Umkehrpotential (Rusko et al. 1992, Fichtner et al. 1987). Die praktische Bestimmung gestaltet sich bei niedrigen Ca^{2+}-Spiegeln in der cell-attached-Konfiguration jedoch schwierig, da bei einem Membranpotential von 40 mV und weniger kaum

bzw. keine Kanalaktivitäten beobachtet werden können und Strommessungen dann nicht möglich sind.

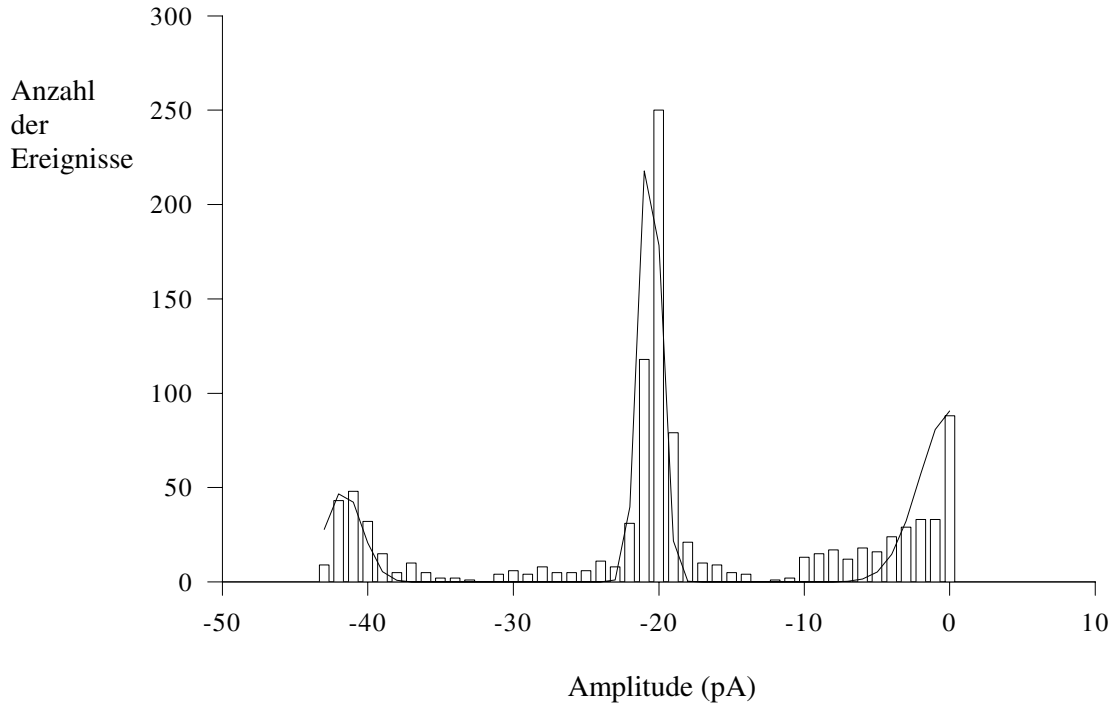

Abb. 5: Amplitudenhistogramm für die in Abbildung 7 gezeigte Messung bei 120 mV Membranpotential. Die Klassenbreite der Stromamplitude (bin-Weite) beträgt 1,0 pA. Anhand von drei Gaußschen Normalverteilungskurven sind die Mittelwerte für die jeweiligen Amplitudenlevel sowie die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet worden. Das Amplitudenlevel des Leckstromes beträgt hier 0 ± 2,090 pA, das der ersten Kanalebene 20,605 ± 0,725 pA und das der zweiten 41,659 ± 1,275 pA. Für die Kanalamplitude des ersten Levels ergibt sich also ein Wert von 20,605 pA, für die zweite 21,054 pA. Die Differenz dieser theoretisch gleich großen Werte läßt sich durch die näherungsweise Analyse der Meßdaten erklären.

Die Ionenkanalleitfähigkeit läßt sich ermitteln, indem man die Kanalstromamplitude gegen das Membranpotential aufträgt (siehe Abb. 6). Paßt man an die dabei erhaltenen Meßpunkte eine Kurve an, so gibt deren Steigung die Leitfähigkeit des Ionenkanals für das jeweilige Membranpotential an. Wie man in Abb. 6 erkennen kann, nehmen die der Leitfähigkeit zugrundeliegenden Kanalamplituden bei wachsendem Membranpotential zu.

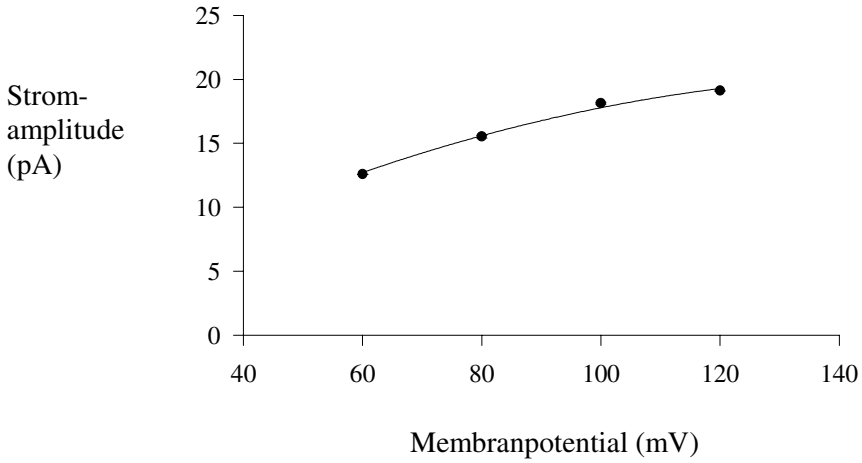

Abb. 6: Darstellung der Ionenkanalleitfähigkeit der in Tab. 5 / Messung 6 genannten Aufzeichnung. Bei einem Membranpotential größer als 60 mV kann man eine Abnahme des Stromzuwachses erkennen. Die dargestellte Kurve wurde durch Regression 2. Ordnung nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt. Die Leitfähigkeit des Kanals beträgt bei einem Membranpotential von 60 mV etwa 166 pS .

Tab. 5: Übersicht über die in 6 Messungen gefundenen Ionenkanalleitfähigkeiten bei einem Membranpotential von 60 mV. Um die Leitfähigkeitswerte zu bestimmen, wurde eine Regression zweiter Ordnung nach der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Die Angaben gelten für symmetrische Kaliumverteilung (K^+ 140 mM). Die 6. Messung ist in Abb. 9 wiedergegeben.

Messung	Leitfähigkeit in pS (bei 60 mV)
1	171
2	177
3	168
4	165
5	156
6	166
Mittelwert ± SD	167 pS ± 7 pS

Spannungsabhängigkeit

BK-K_{Ca}-Kanäle sind spannungsabhängig. Dies läßt sich aus einer Änderung der Kanalkonformation in Abhängigkeit vom Membranpotential erklären (Latorre et al. 1989). Bei zunehmender Depolarisation stieg die Kanaloffenwahrscheinlichkeit an, sowohl die Anzahl und Dauer der Kanalöffnungen nahm zu (siehe Abb. 7).

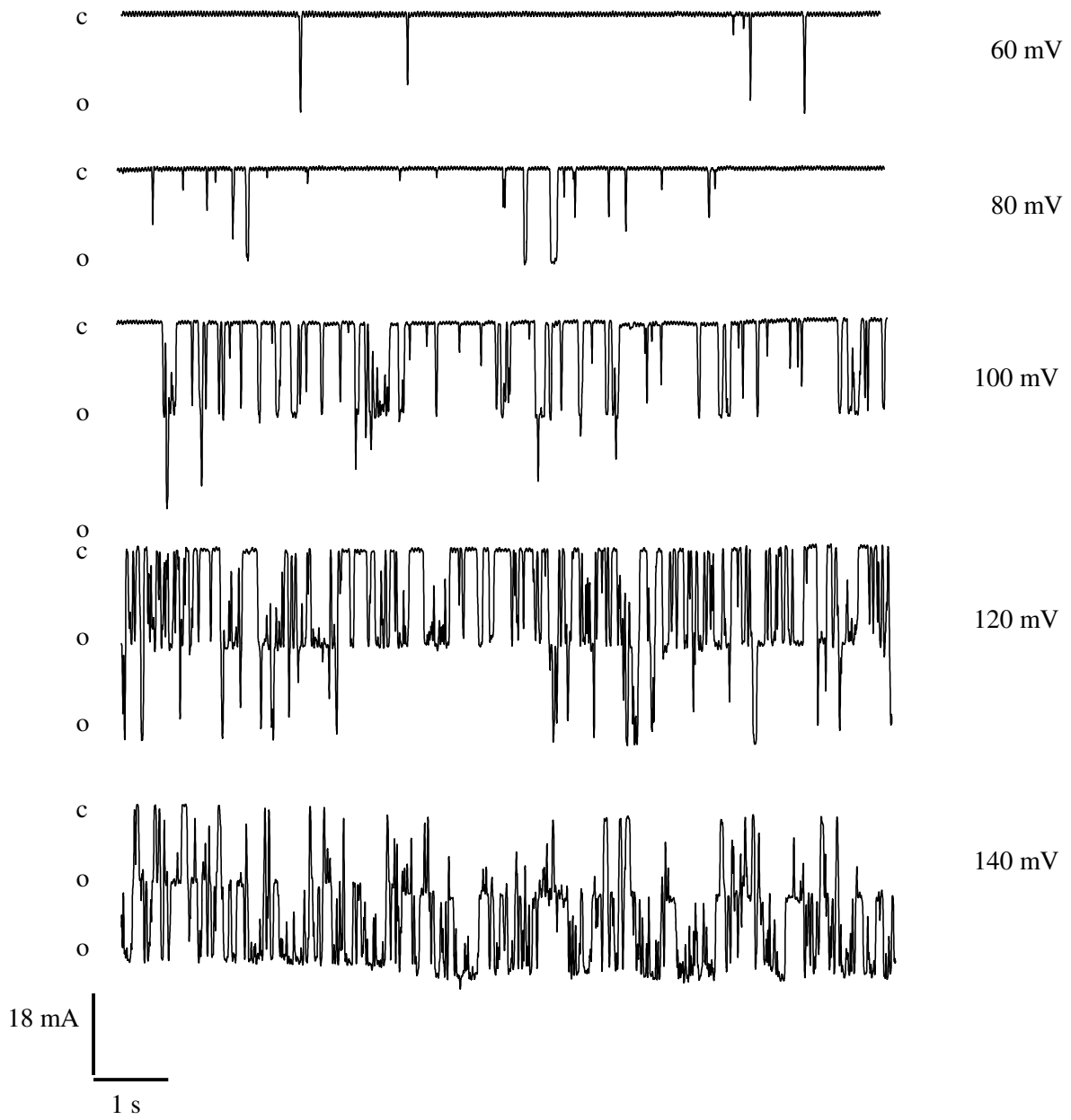

Abb. 7: Kanalaktivität eines cell-attached patches in HUVEC (Passage 13) bei verschiedenen Membranpotentialen (Originalaufzeichnung). Mit zunehmender Depolarisation steigt die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit (NP_0) stark an: 0,007 bei 60 mV, 0,015 bei 80 mV, 0,074 bei 100 mV, 0,240 bei 120 mV und 0,220 bei 140 mV. Die dargestellte Beobachtungszeit betrug 10 s, die intra-/extrazelluläre Kaliumverteilung war symmetrisch. Bei einem Membranpotential von 120 mV kann man 2 aktive Kanäle erkennen. Bei 140 mV deutet die schwankende Baseline (bei c) auf die hohe Belastung des eals durch die angelegte Spannung hin. Die Kanalamplituden liegen im Bereich von 16 - 21 mA. o = offener, c = geschlossener Zustand (baseline).

Da die Versuche unter niedriger intrazellulärer Ca^{2+}-Konzentration (~ 10^{-8} - 10^{-9} M) durchgeführt wurden, war die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit im Bereich zwischen 0 mV und 60 mV Membranpotential so gering (Cui et al 1997), daß eine statistische Auswertung nicht sinnvoll gewesen wäre.

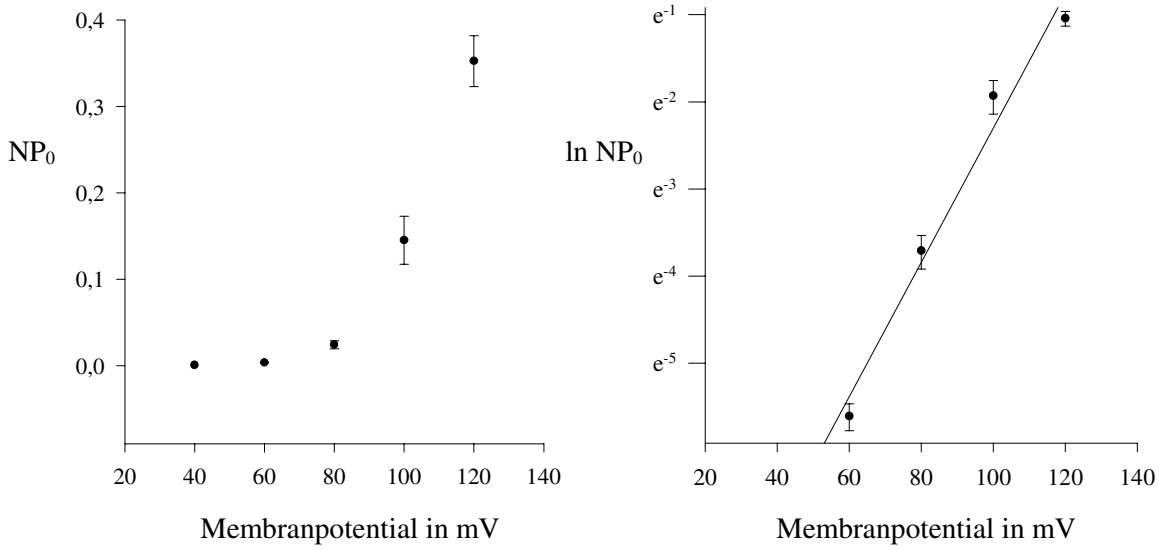

Abb. 8: Spannungsabhängigkeit der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 eines Ionenkanals im Bereich zwischen 60 und 120 mV Membranpotential (n = 6). Die Untersuchungen wurden in Badlösung ohne Perfusion durchgeführt (K^+ symmetrisch bei 140 mM). Man kann den linearen Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und dem natürlichen Logarithmus der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit (ln NP_0) erkennen (Singer et al. 1987). Die in der Abbildung rechts eingezeichnete Regressionsgerade wurde nach der least square Methode bestimmt. Die für sie gültige Gleichung lautet: y = 0,077x - 10,003 (r^2=0,98804). Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtoffenwahrscheinlichkeiten aus 6 patches und die dazugehörigen SEM.

Um die logarithmische Spannungsabhängigkeit K des untersuchten Ionenkanals zu bestimmen, wurde der Kehrwert der Steigung der in Abb. 8 eingezeichneten Gerade berechnet (Singer et al. 1987). Ein *e*-facher Anstieg der Kanaloffenwahrscheinlichkeit ergab sich dabei für eine Potentialdifferenz von 13,0 mV.

<u>Blockade durch Tetraethylammonium (TEA)</u>

Tetraethylammonium ist ein Hemmstoff des K_{Ca}-Kanals großer und mittlerer Leitfähigkeit (de-Allie et al. 1996, Grissmer et al. 1993, Hille 1992). Rusko et al. (Rusko et al. 1991) zeigten an Endothelzellen der Kaninchenaorta, daß TEA die Kanalaktivität entscheidend beeinflußt. In den

hier vorliegenden Versuchen mit HUVEC inhibierte TEA den Auswärtsstrom durch die untersuchten Kanäle. Daraus kann man schließen, daß es sich dabei um K_{Ca}-Kanäle und nicht um andere Kanäle mit großer Leitfähigkeit wie z.B. Cl_{Ca}-Kanäle, die von TEA nicht inhibiert werden, handelt. Die Hemmung der Kanalaktivität erfolgte in einer festen Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Da TEA den Ionenkanal von der extrazellulären Seite beeinflußt, erfolgten die Messungen, wie in 2.2.3.1 beschrieben, in outside-out Konfiguration. Die verwendete Perfusionsrate lag bei 0,1 ml/h.

In allen 6 Messungen war ein Rückgang der Kanalaktivitäten unter TEA-Perfusion zu verzeichnen, wohingegen eine vollständige Blockierung mit den verwendeten Konzentrationen nicht erzielt wurde.

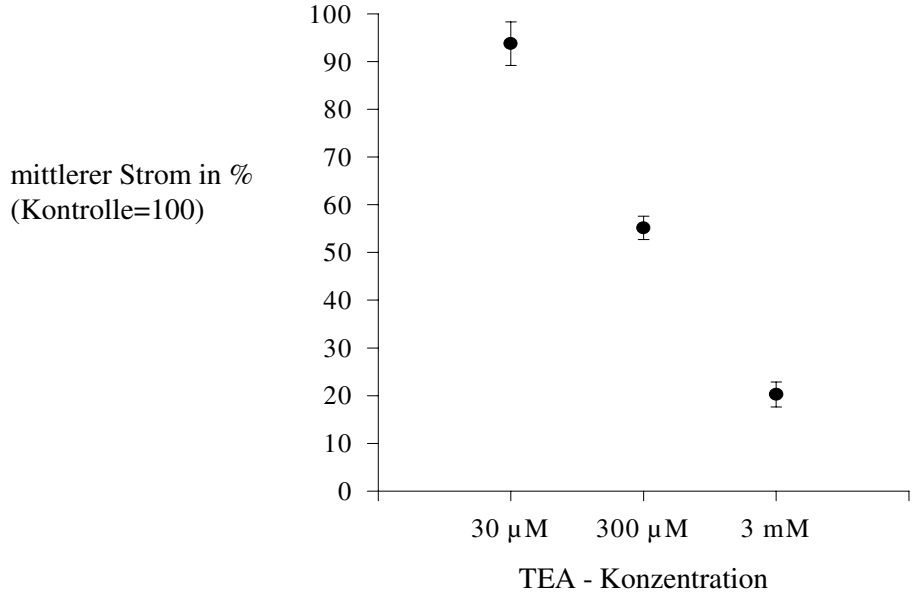

Abb. 9: Effekt von Tetraethylammonium (TEA) auf den mittleren Strom von BK-K_{Ca}-Kanälen in HUVEC. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus dem Verhältnis des durchschnittlichen mittleren Stroms unter TEA- und Kontrollperfusion dar (n = 6, ±SEM). Man kann erkennen, daß der mittlere Strom durch TEA dosisabhängig inhibiert wird. Bei einer Konzentration von 3 mM sinkt die Kanalaktivität auf etwa 20 % des Wertes unter Kontrollperfusion. In den immer wiederkehrenden Zyklen konnte gezeigt werden, daß auch nach längerer Messung die Kanalaktivität unter Badperfusion wieder auf den Ausgangswert zurückgeht, d.h. die TEA-Wirkung reversibel ist.

Die für die halbmaximale Hemmung notwendige Konzentration K_d wurde folgendermaßen berechnet (Hill-Koeffizient n = 1):

$$I_{rel} = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{K_d} \right)^n}$$

mit I_{rel} relativer Strom, der bei TEA-Perfusion im Vergleich zu Kontrollperfusion fließt

K_d halbmaximale Hemmkonzentration von TEA

n Hill-Koeffizient (n=1)

x Konzentration von TEA

Die halbmaximale Hemmkonzentration K_d lag bei 427 µM TEA.

Zusammenfassend lassen sich für die untersuchten Ionenkanäle folgende Angaben machen:

1. Die untersuchten Kanäle besitzen eine hohe Leitfähigkeit von 167 pS bei 60 mV Membranpotential.
2. Die Kanalamplitude beträgt 16pA bis 21 pA.
2. Die Kanalaktivität ist vom angelegten Pipettenpotential und somit vom Membranpotential abhängig und steigt bei zunehmender Depolarisation.
3. Die Blockierung der Kanalaktivität durch Zugabe von Tetraethylammonium auf die extrazelluläre Seite ist möglich. Die halbmaximale Hemmkonzentration lag bei 427 µM TEA.

Die den Aufzeichnungen zugrundeliegenden Ionenkanäle sind somit als BK-K_{Ca}-Kanäle klassifizierbar.

3.1.2 Die Wirkung von VEGF auf den BK-K_{Ca}-Kanal in HUVEC

VEGF ist ein potentes Mitogen für Endothelzellen in Arterien, Venen und Lymphgefäßen (Ferrara et al. 1989). Sowohl Proliferation als auch Migration werden durch VEGF stimuliert. Den ersten Schritt in der Signaltransduktionskaskade stellt dabei die Bindung an zellmembranständige Rezeptoren dar (de Vries et al. 1992, Terman et al. 1992).

Inwieweit dabei ionale Veränderungen bei besonderer Berücksichtigung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels eine Rolle spielen und inwieweit der BK-K_{Ca}-Kanal daran beteiligt ist, sollten die im folgenden beschriebenen Experimente klären helfen.

In Abb. 10 kann man erkennen, daß die Kanalaktivität unter VEGF-Perfusion stark ansteigt. Da die Messungen in cell-attached Konfiguration durchgeführt wurden, läßt sich die direkte Beeinflussung des untersuchten Kanals durch VEGF ausschließen. Der seal, der den Membranfleck unter der Pipettenspitze elektrisch vom Rest der Zelloberfläche isoliert, verhindert auch die Permeation von (VEGF-) Molekülen (Hamill et al. 1981). Der Wirkung auf den BK-K_{Ca}-Kanal muß also eine Veränderung intrazellulärer Bedingungen zugrunde liegen.

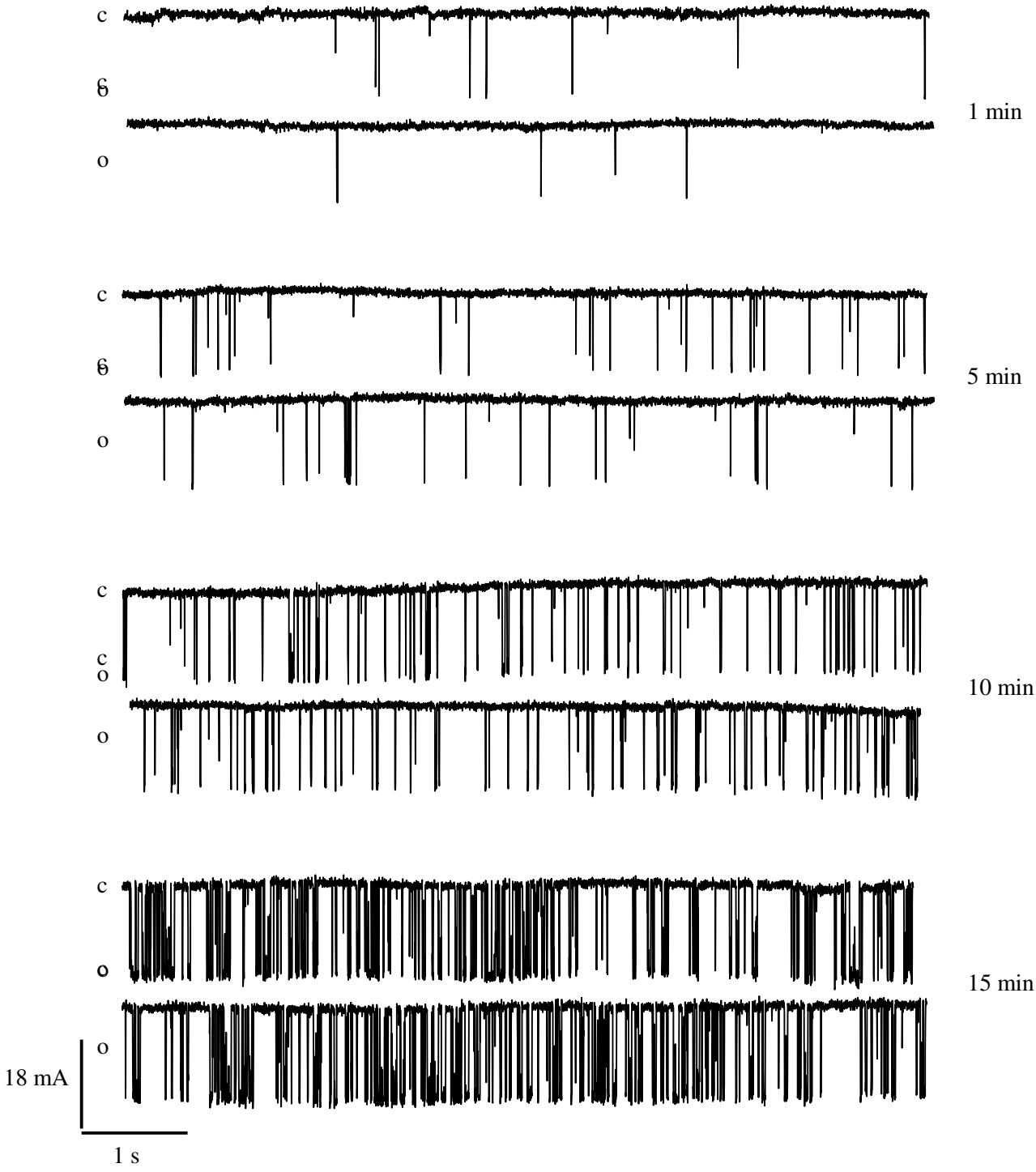

Abb. 10: Originalaufzeichnung eines Patches unter VEGF-Perfusion (10 ng/ml). Nach einer Minute Perfusion mit Kontrollösung (Badlösung) wurde die Perfusion mit VEGF und die Aufzeichnung gestartet. Angegeben ist jeweils die Zeit nach Beginn der Testperfusion, die gezeigte Ausschnittsdauer beträgt je 15 s. Man erkennt, daß die Kanalaktivität unter laufender Perfusion mit VEGF-Lösung (Konzentration 10 ng/ml) zunimmt. Die Aufzeichnung wurde bei 80 mV Membranpotential durchgeführt. o = offener, c = geschlossener Zustand (baseline).

Die Zunahme der Kanalaktivität läßt sich über die Angabe der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit, die für die jeweiligen Beobachtungszeiträume gilt, objektivieren. Für die in Abb. 10 gezeigte Aufzeichnung wurden folgende Werte ermittelt:
Für die erste Perfusionsminute mit VEGF: $NP_0 = 0{,}002$, nach 5 Minuten $NP_0 = 0{,}013$, nach 10 Minuten $NP_0 = 0{,}088$ und nach 15 Minuten $NP_0 = 0{,}291$. Die Daten sind graphisch in Abb. 11 dargestellt.

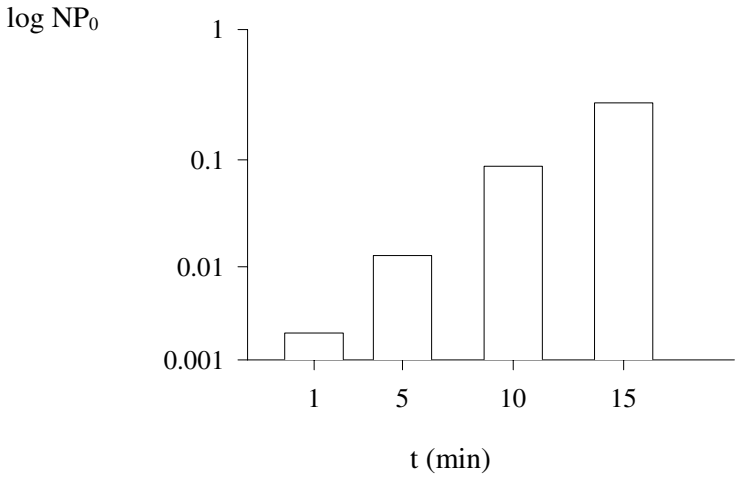

Abb. 11: Verlauf der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 für die in Abb. 10 in Ausschnitten gezeigte Messung. NP_0 nimmt über den gesamten Meßzeitraum hinweg zu. Gegenüber der Ausgangsaktivität ist der Wert bei 15 min um das mehr als 100-fache gesteigert. Derart hohe Aktivitätszunahmen waren jedoch eher die Ausnahme. Im Mittel lag die Erhöhung von NP_0 im Bereich von 30 - 40 fach.

Da sich während der 18 minütigen Messung nur Kanalöffnungen auf der ersten Ebene zeigten, war die Kanalanzahl im Patch höchstwahrscheinlich 1. Die Wahrscheinlichkeit, daß es im Falle von 2 BK-K_{Ca}-Kanälen im Patch nie zu einer gleichzeitigen Öffnung gekommen wäre, also zu Kanalöffnungen in zwei Ebenen, ist äußerst gering. In anderen Messungen zeigten sich bei einem Membranpotential von 80 mV häufig auch mehrere Kanäle, was aber bei der Berechnung von NP_0 berücksichtigt wurde.

Um auszuschließen, daß die ermittelten Effekte durch andere Faktoren als durch die Zugabe von Testfaktoren hervorgerufen wurden, erfolgte eine Reihe von Kontrollversuchen. Diese bestanden darin, daß Experimente im exakt gleichen Modus wie später durchgeführt wurden, nur mit dem Unterschied, daß anstelle von Testfaktor lediglich Kontrollösung perfundiert wurde. Diese bestand

aus Badlösung und enthielt keine Wirkstoffe. Dabei zeigte sich in allen 8 Messungen in cell-attached Konfiguration vergleichbare Ergebnisse. Die Zunahme der Kanalaktivität betrug zu jedem Zeitpunkt der Perfusion bis zu deren Ende nach mindestens 15 min nie mehr als im Mittel Faktor 1,8 der Ausgangsaktivität zu Beginn der Messung. Dies ist im Vergleich zur Aktivitätszunahme unter VEGF-Perfusion, die nach 15 min mehr als 30-fach ist, gering. In Abb. 12 sind die Ergebnisse dieser Kontrolluntersuchungen graphisch wiedergegeben.

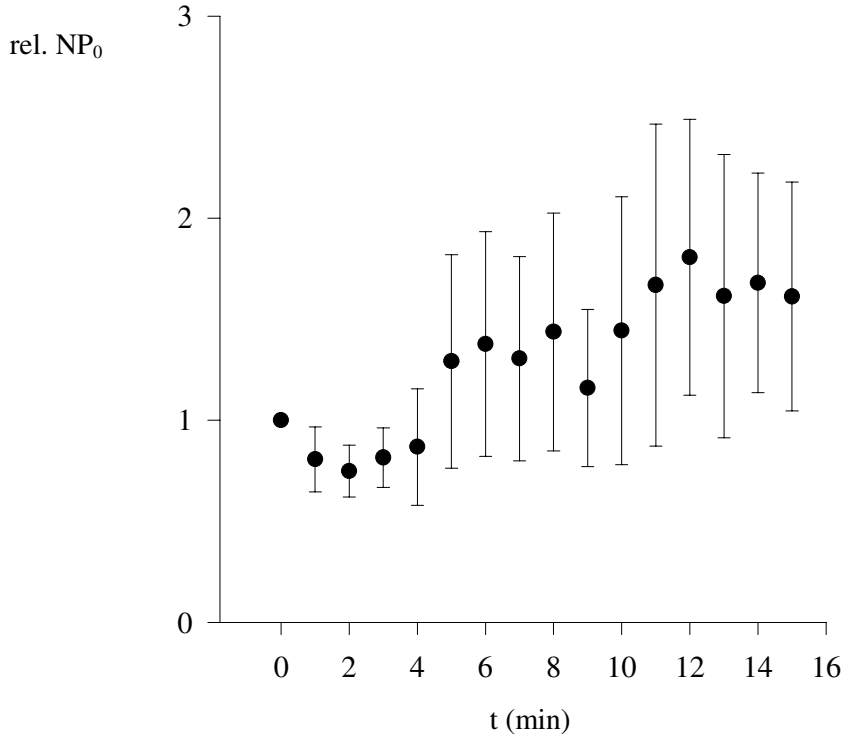

Abb. 12: Kontrollmessungen unter Perfusion mit Kontrollösung (Badlösung). In 8 cell-attached Patches wurde die Veränderung der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 im Verhältnis zur Ausgangsaktivität (1. Perfusionsminute) bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± SEM.

In Abb. 12 ist der zeitliche Verlauf der ermittelten Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 aus 8 Messungen graphisch dargestellt. Da die Ausgangswerte für die absolute Gesamtoffenwahrscheinlichkeit im Bereich von 0,02 und 0,07 lagen, wurden nicht die Absolutwerte aufgetragen, sondern die relativen Werte bezogen auf die Ausgangsoffenwahrscheinlichkeit unter Perfusion mit Kontrollösung (Badlösung). Da die Ausgangsaktivität als 1 definiert wurde, kann man den Aktivitätsverlauf gut beurteilen.

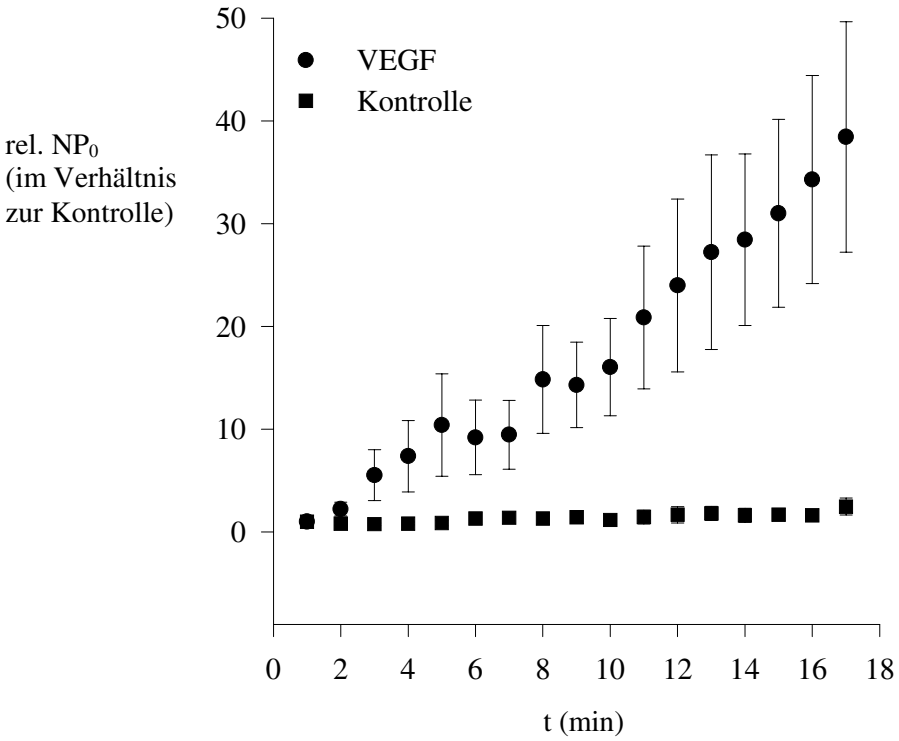

Abb. 13: Veränderung der Kanalaktivität unter VEGF-Perfusion im Verhältnis zur Kontrolle. Zur Auswertung kamen Messungen in cell-attached Konfiguration bei einem Membranpotential von 80 mV. Die Kreise repräsentieren die Perfusion mit VEGF-Lösung (Konzentration 10 ng/ml), die Quadrate die Perfusion mit Kontrollösung. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± SEM aus 11 Messungen für die Experimente mit VEGF sowie die Mittelwerte ± SEM aus 8 Messungen für die Kontrolle. Die SEM der Kontrolle sind teilweise kleiner als die Symbole.

VEGF in einer Konzentration von 10 ng/ml stimulierte die Aktivität des K_{Ca}-Kanals in HUVEC mehr als 30-fach im Vergleich zur Kontrolle (nach 15 min Perfusion). Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich für alle Messungen ≥ 3 min.

Um die Frage zu klären, ob die beobachteten Effekte von VEGF vom Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle, d.h. vom extrazellulären Ca^{2+}-Spiegel abhängig sind, wurden Versuche mit nahezu Ca^{2+}-freier extrazellulärer Lösung durchgeführt. Der Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle wurde somit deutlich vermindert.

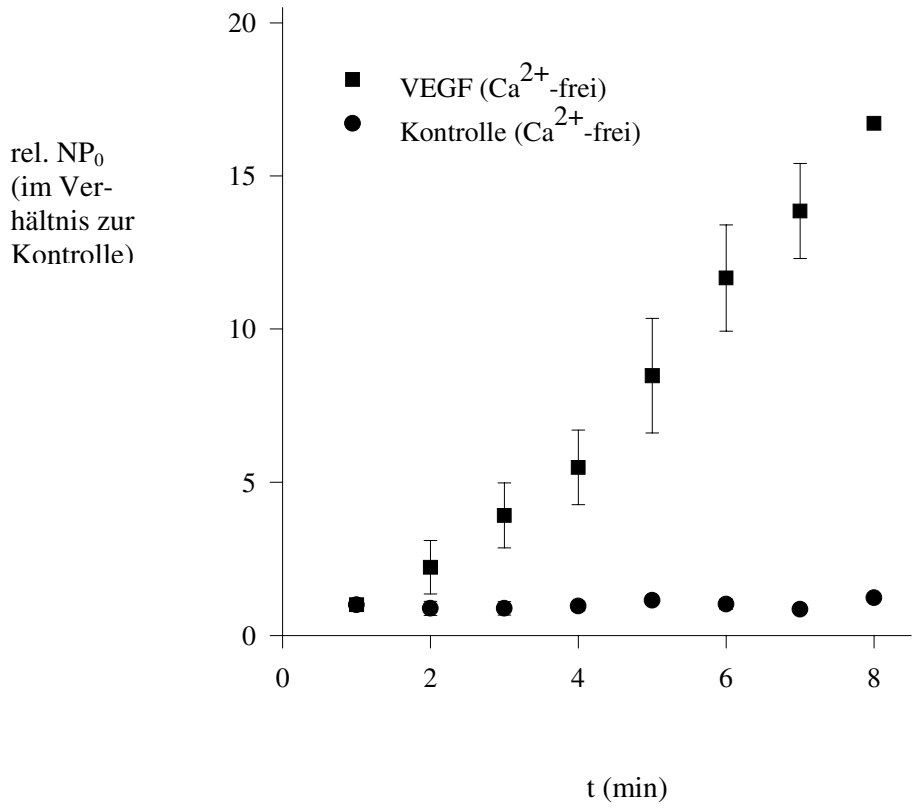

Abb. 14: Änderung der VEGF-induzierten BK-K_{Ca}-Kanalaktivität in HUVEC in Ca^{2+}-freier Lösung. In 7 Messungen im cell-attached-Modus wurde VEGF (10ng/ml) bei einem Membranpotential von 80 mV mit einer Rate von 0,1 ml/h perfundiert. Sowohl die Bad- als auch die Perfusionslösung waren nahezu Ca^{2+}-frei (kein EDTA-Zusatz). Die Perfusion mit Badlösung (Kontrolle) erfolgte ebenfalls Ca^{2+}-frei. Die SEM sind teilweise kleiner als die Symbole.

Man erkennt, daß VEGF die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC auch in nominell Ca^{2+}-freiem Medium erhöht. Der Anstieg der Kanalaktivität nach 8 Minuten Perfusion unterscheidet sich nicht von den Werten der Experimente mit extrazellulärem Ca^{2+} (Steigerung um den Faktor 15 –17).

3.1.3 Die Wirkung von CAI auf die VEGF-induzierte Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanal in HUVEC

Carboxyamidotriazol ist ein neuartiger Ca^{2+}-Blocker. Er inhibiert sowohl den Ca^{2+}–Einstrom in die Zelle (Kohn et al 1994) als auch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Der intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel beeinflußt u.a. die Proliferation (Baran 1996), die Apoptose (Preston et al. 1997) sowie dieAngiogenese (Kohn et al. 1995). Da VEGF als Modulator des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel bekannt ist, lag es nahe, die Rolle des Ca^{2+} in der Signaltransduktion von VEGF mit Hilfe eines Ca^{2+}-Blockers wie CAI zu untersuchen. Die unter 3.1.2 beschriebene Aktivitätszunahme des BK-K_{Ca}-Kanals unter Perfusion mit VEGF sollte dabei als Bezugsgröße dienen.

Zusammenfassend sollten folgende Fragen durch die Experimente mit CAI geklärt werden:

1. Beeinflußt CAI die von VEGF hervorgerufene Aktivitätssteigerung des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC ?
2. Beeinflußt CAI allein die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals ?

Um Frage 1. zu klären, wurde in 12 Patch-Clamp Versuchen VEGF und CAI simultan perfundiert. VEGF lag in einer Konzentration von 10 ng/ml, CAI in einer Konzentration von 10 µM vor. Es zeigte sich dabei eine Aktivitätszunahme des BK-K_{Ca}-Kanals, die mit der alleinigen Perfusion von VEGF vergleichbar war. Nach 8 min zeigt sich ein Anstieg von NP_0 im Bereich von Faktor 15. CAI konnte die Aktivitätssteigerung des BK-K_{Ca}-Kanals durch VEGF bei gleichzeitiger Applikation nicht verringern, nach 20-minütiger Präinkubation jedoch beinahe aufheben.

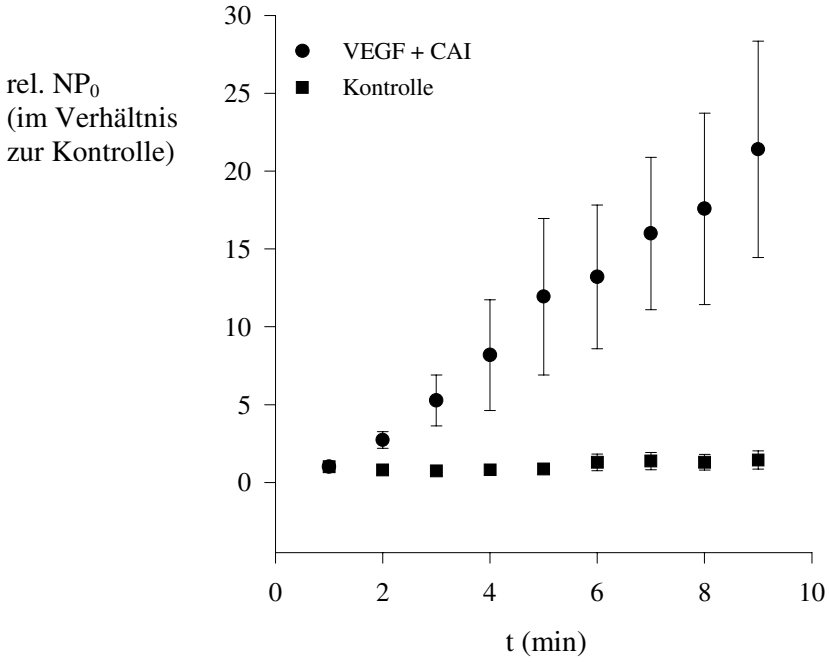

Abb. 15: Einfluß von gleichzeitiger Perfusion mit CAI und VEGF auf die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC im Vergleich zu Kontrolle. Es wurden 12 Untersuchungen in cell-attached Konfiguration durchgeführt. VEGF wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml, CAI mit 10 µM gleichzeitig perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 0,1 ml/h, das Membranpotential 80 mV. Es zeigte sich eine Zunahme der relativen Gesamtoffenwahrscheinlichkeit, die mit der alleinigen Perfusion von VEGF vergleichbar ist. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus den 12 Messungen. In der ersten Meßminute wurde Kontrollösung (Badlösung) perfundiert.

Da sich in Ca-Fluoreszenzmessungen (Fura2) ebenfalls zeigte, daß CAI das VEGF-induzierte Ca-Signal nur nach Vorinkubation von 20 min hemmte (Faehling et al./ Manuskript eingereicht), wurden Zellen vor den Patch-Clamp-Experimenten 20 Minuten mit CAI präinkubiert.

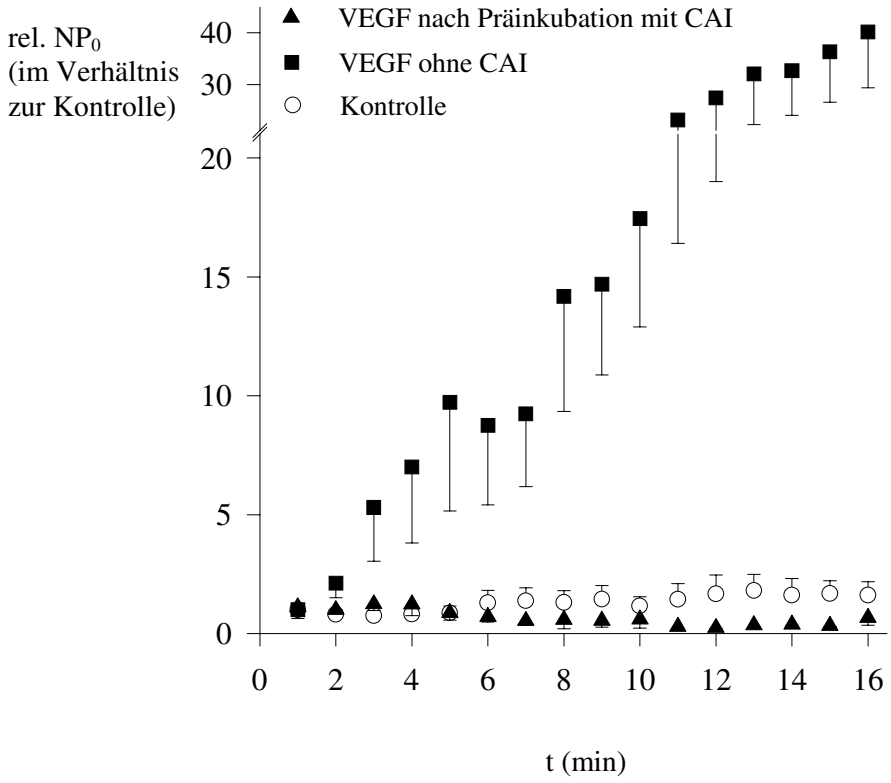

Abb. 16: Änderung der VEGF-induzierten BK-K_{Ca}-Kanalaktivität in HUVEC durch Präinkubation mit CAI. Nach 20-minütiger Präinkubation mit CAI (10µM) wurde VEGF mit 10 ng/ml perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 0,1 ml/h, das Membranpotential 80 mV, die Messungen erfolgten im cell-attached Modus (n=8). Dargestellt sind die Gesamtoffenwahrscheinlichkeiten für die Perfusion von VEGF nach Präinkubation (Dreicke) und ohne Präinkubation (Quadrate) sowie für die Perfusion mit Badlösung (Kreise).

Die Präinkubation der Zellen mit CAI in einer Konzentration von 10 µM bewirkt das Ausbleiben der VEGF-induzierten Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC: Die Perfusion mit VEGF (10 ng/ml) hat keinen Anstieg der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit zur Folge. Nicht vorbehandelte Zellen zeigen dagegen einen deutlichen Anstieg der Kanalaktivität unter Perfusion mit VEGF.

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob CAI allein die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals verändert. Dazu wurden 11 Messungen in cell-attached Konfiguration durchgeführt. Wie Abb. 17 zeigt, erhöhte sich die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals unter CAI-Perfusion.

Die Aktivitätszunahme lag nach 10 Minuten um den Faktor 8 - 9, war also geringer als bei gleichzeitiger Perfusion mit VEGF.

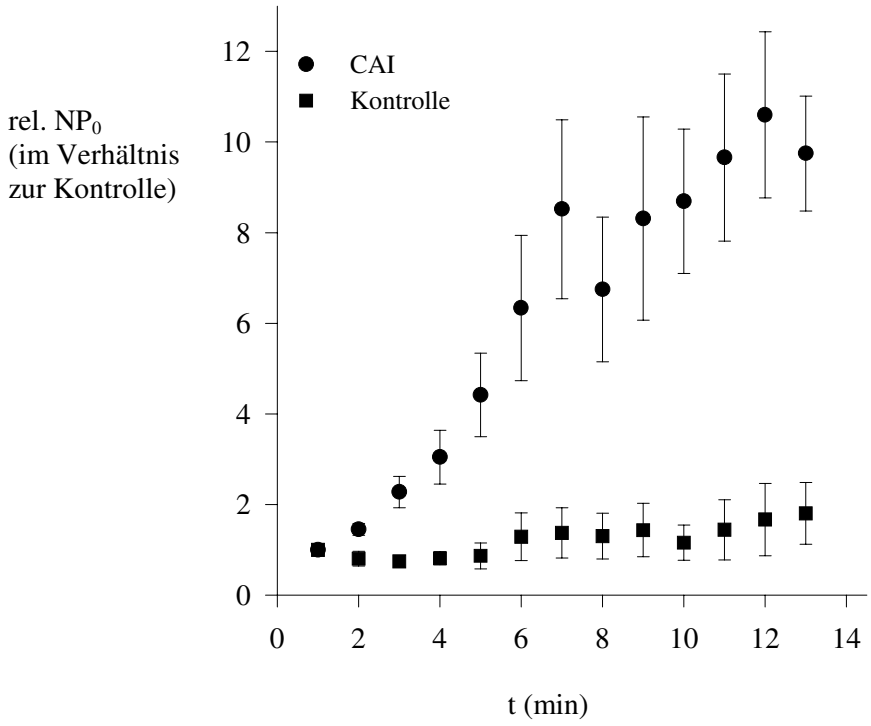

Abb. 17: Einfluß von CAI auf die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC im Vergleich zu Kontrolle. In 11 Messungen im cell-attached Modus wurde CAI mit 10 µM perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 0,1 ml/h, das Membranpotential 80 mV. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler, in der ersten Meßminute wurde Kontrollösung (Badlösung) perfundiert. Die Zunahme der relativen Gesamtoffenwahrscheinlichkeit war geringer als bei der gleichzeitigen Perfusion von VEGF und CAI

3.2 Zellkulturversuche

Die proliferationssteigernde Wirkung von VEGF auf Endothelzellen ist in der Literatur von mehreren Autoren beschrieben worden (Ferrara et al. 1989, Leung et al. 1989, Conolly et al. 1989, Keyt et al. 1996). Inwieweit dies auch für die hier untersuchten humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene gilt, sollte in Zellkulturversuchen geklärt werden. Um zu entscheiden, ob der BK-K_{Ca}-Kanal dabei eine Rolle spielt, wurden weitere Zellkulturversuche durchgeführt.

3.2.1 VEGF-induzierte Proliferation von HUVEC

Um die proliferationsstimulierende Wirkung von VEGF auf die hier untersuchten HUVEC zu überprüfen und zu quantifizieren, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dazu wurden HUVEC nach einem definierten Schema mit verschiedenen Konzentrationen von VEGF inkubiert und zu festgelegten Zeitpunkten in einem Zellcounter ausgezählt (siehe 2.1.2.2). Die untersuchten Zellen waren vor den einzelnen Experimenten 2 - 11 mal passagiert worden. Die Zellen einer Generation wurden mit VEGF-Lösungen verschiedener Konzentration (1, 10 und 30 ng/ml) inkubiert. Um sicherzustellen, daß die applizierten Testlösungen über die lange Dauer jedes einzelnen Experiments (8 Tage) ihre Wirkung entfalteten, wurden an jedem Meßtag, also jeden 2. Tag, die Testlösungen der nicht ausgezählten Proben erneuert. In Abb. 18 sind die in 7 Versuchen gewonnenen Ergebnisse wiedergegeben.

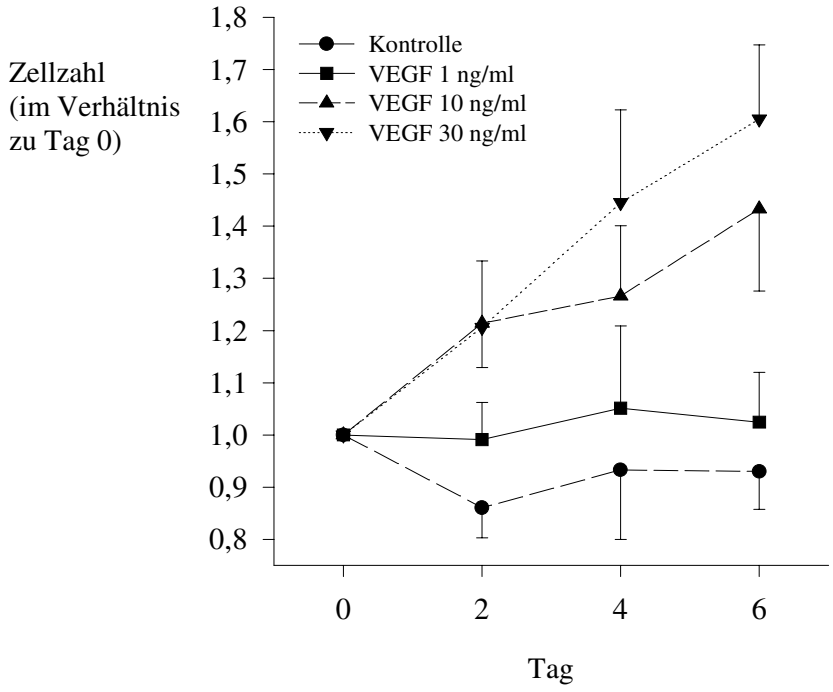

Abb. 18: VEGF-stimulierte Proliferation von HUVEC im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden in 7 unabhängigen Versuchen ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzählung vor der Testfaktor-Applikation (Tag 0), sowie nach 2, 4 und 6 Tagen unter VEGF-Exposition (Tag 2 - 6). Anstelle der absoluten Zellzahl ist jeweils das Verhältnis zur Kontrollzählung an Tag 0 angegeben, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes wieder.

Bei einer VEGF-Konzentration von 1 ng/ml im Kulturmedium war nur eine minimale Proliferation der Endothelzellen zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml, die auch bei den Patch-Clamp-Experimenten angewandt wurde und noch ausgeprägter bei 30 ng/ml war eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu erkennen. Die maximale Zunahme wurde bei einer VEGF-Konzentration von 30 ng/ml an Tag 6 gefunden und belief sich auf etwa 160 % des Ausgangswertes von Tag 0. Berücksichtigt werden muß dabei, daß die Zellzahl der Kontrolle sogar leicht rückläufig war. Dies ist dadurch zu erklären, daß im Hungermedium nicht alle ausgesäten Zellen überlebten.

Nachdem sich die von verschiedenen Autoren gezeigte proliferationssteigernde Wirkung von VEGF auch für die hier untersuchten HUVEC bestätigte, sollte geklärt werden, ob der BK-K_{Ca}-Kanal an der Signaltransduktion von VEGF beteiligt ist. Diese Frage war Grundlage der in 3.2.2 beschriebenen Versuche.

Die differenzierte Auswertung der bei den Experimenten mit VEGF (ohne Kanalblocker) erhobenen Daten ließ jedoch auch eine Aussage darüber zu. So wurde das gemessene Kollektiv nach dem Zellalter in zwei Gruppen eingeteilt, eine Gruppe a) von Zellen höherer Passage (Passage 8-11) und eine Gruppe b) von Zellen niedriger Passage (Passage 2-5). Grundlage dieses Vorgehens war die Tatsache, daß sich in den Patch-Clamp-Experimenten bei HUVEC der Passage 6 und weniger keine aktiven BK-K_{Ca}-Kanäle fanden. Geht man nun davon aus, daß die Zellen der Gruppe b), also der Passage 2-5, keine aktiven BK-K_{Ca}-Kanäle enthielten, so müßten diese Zellen im Falle der Beteiligung des Kanals an der zu Proliferation führenden Signaltransduktionskakade anders reagieren als die Zellen der Gruppe a), die diesen Kanal sicher besitzen. In anderen Worten, ist der BK-K_{Ca}-Kanal zur Wirkungsvermittlung von VEGF notwendig, so muß sein Fehlen die Effekte von VEGF beeinflussen. Als Testgröße für diese Effekte wurde wiederum die Zunahme der Zellzahl gewählt.

Um dies zu untersuchen, wurden aus den in Abb. 18 gezeigten 7 Versuchen drei Meßreihen höherer Passage (8, 10 und 11) sowie 4 Meßreihen niedriger Passage (2, 3, 4 und 5) zu Gruppen zusammengefaßt. Ausgewertet wurden die Daten, die man an Tag 6, also nach 6 Tagen Exposition gegenüber VEGF verschiedener Konzentrationen erhielt. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

Tab. 6: VEGF-stimulierte Proliferation von HUVEC im Vergleich zur Kontrolle anhand eines Einzelexperimentes. Angegeben ist die absolute Zellzahl x 10^4 vor der Testfaktor-Applikation (Tag 0), sowie nach 2, 4 und 6 Tagen unter VEGF-Exposition (Tag 2 - 6), dann jeweils der Konzentration von VEGF zugeordnet. Die Konzentration von VEGF ist in ng/ml angegeben.

Konz. VEGF	Zellzahl Tag 0	Zellzahl Tag 2	Zellzahl Tag 4	Zellzahl Tag 6
0	3,35	2,98	3,97	3,38
1		3,30	3,81	3,77
10		4,05	4,78	5,57
30		4,26	4,97	6,64

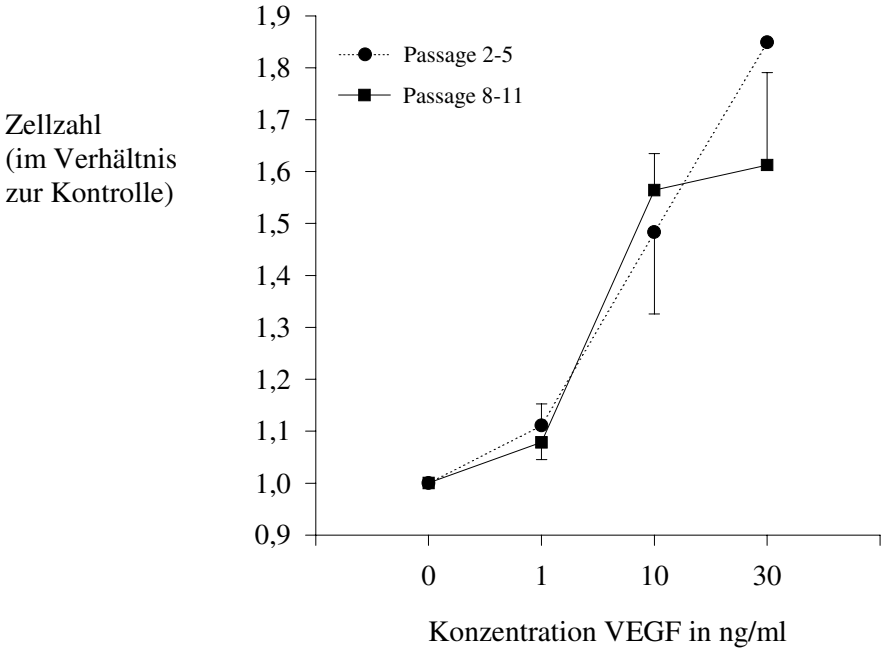

Abb. 19: Vergleich der proliferationsstimulierenden Wirkung von VEGF auf Zellen höherer und Zellen niedriger Passage. Dargestellt ist die Veränderung der Zellzahl der Proben, die 6 Tage VEGF-Lösungen verschiedener Konzentrationen ausgesetzt waren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM wiedergegeben. Der Fehlerbalken der gepunkteten Kurve bei einer Konzentration von VEGF = 30 ng/ml ist kleiner als das Symbol. Für die Gruppe „Passage 2-5“ wurden 4 Meßreihen, für die Gruppe „Passage 8-11“ 3 Meßreihen zusammengefaßt und ausgewertet.

Aus der Grafik kann man ablesen, daß HUVEC, die in Patch-Clamp Untersuchungen BK-K_{Ca}-Kanalaktivität zeigten (Passage 8-11) nicht schneller proliferierten als Zellen, die keine BK-K_{Ca}-

Kanalaktivität aufwiesen (Passage 2-5). Eine entscheidende Rolle des BK-K_{Ca}-Kanals bei der proliferationssteigernden Wirkung von VEGF war somit unwahrscheinlich. Um diese Feststellungen weiter abzusichern, wurden die unter 3.2.2 geschilderten Versuche mit Iberiotoxin durchgeführt.

3.2.2 Beeinflussung der VEGF-Wirkung durch Iberiotoxin

Im folgenden sollte der Frage nach einer möglichen Beteiligung des BK-K_{Ca}-Kanals an der proliferationsfördernden Wirkung von VEGF in HUVEC nachgegangen werden. Dazu wurde in den oben beschriebenen Wachstumsversuchen zusätzlich zu VEGF eine zweite Testsubstanz hinzugegeben. Da VEGF die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals erhöhte (siehe 3.1.2), wurde ein Stoff gewählt, der eben diesen Kanal blockiert. Würde der Kanal bei der Signaltransduktion von VEGF eine entscheidende Rolle spielen, so müßte seine Blockierung die VEGF-induzierte Wirkung modulieren oder gar aufheben. Als Testsubstanz bot sich dabei Iberiotoxin, ein spezifischer Blocker des BK-K_{Ca}-Kanals (Garcia et al. 1991) an, als Testgröße für die VEGF-induzierte Wirkung wurde wie in 3.2.1 die Zellzahl gewählt. Die Inkubation mit Testfaktoren und die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach einem definierten Schema (siehe 2.3).

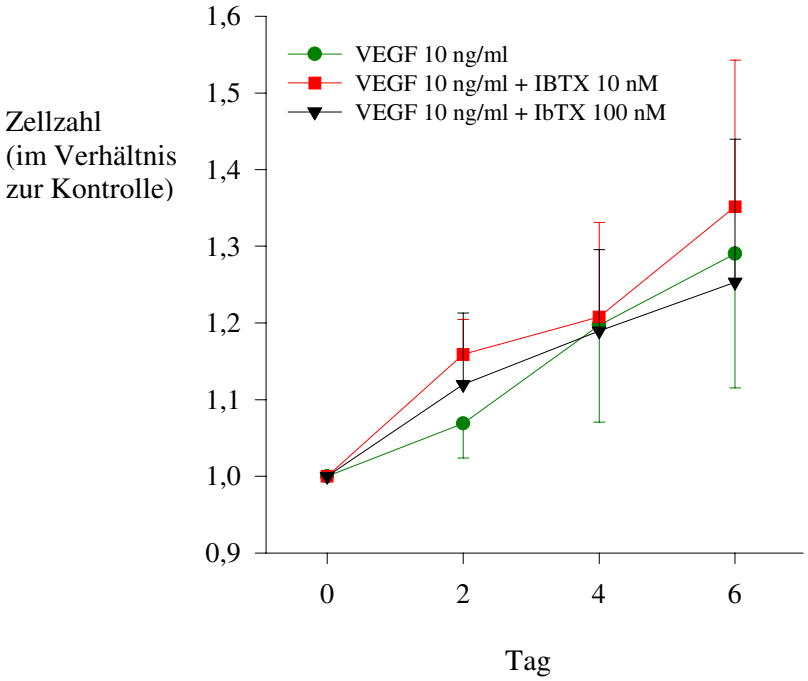

Abb. 20: Einfluß von Iberiotoxin auf die VEGF-induzierte Proliferation von HUVEC. Zur Auswertung kamen die Werte aus 7 Versuchen, Passage 4 - 11. Bei gleichbleibender VEGF-Konzentration wurden zwei Konzentrationen von Iberiotoxin (10 nM und 100 nM) getestet und mit der Kontrolle ohne Iberiotoxin verglichen. Bei allen Versuchen betrug die Konzentration an VEGF 10 ng/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Man kann in Abb. 20 erkennen, daß die Werte für die Zellen, die nur VEGF ausgesetzt waren, kaum von denen differieren, die zusätzlich mit Iberiotoxin inkubiert waren. Auf eine direkte Wirkung von Iberiotoxin bezüglich der Zunahme der Zellzahl lassen die Ergebnisse nicht schließen. Da die Schwankungsbreite bei den Versuchen im Vergleich zu den Proliferationsstudien mit VEGF allein relativ groß war (siehe Fehlerbalken), kann man eine Beeinflussung der durch VEGF induzierten Effekte nicht völlig ausschließen. Eventuell doch vorhandene Effekte müssen jedoch von geringem Ausmaß sein.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen und der Wachstumsversuche

- VEGF stimuliert dosisabhängig das Wachstum von HUVEC. Die Zunahme der Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit VEGF lag bei einer Konzentration von 10 ng/ml um den Faktor 1,43, bei einer Konzentration von 30 ng/ml um den Faktor 1,6.
- VEGF stimuliert die Proliferation von Zellen höherer Passage (8-11) ebenso wie die von niedriger Passage (2-5). Die dabei zu verzeichnenden Unterschiede waren nicht signifikant.
- Iberiotoxin in verschiedenen Konzentrationen inhibierte die VEGF-induzierte Proliferation in HUVEC nicht.
- VEGF in einer Konzentration von 10 ng/ml erhöhte die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC um das etwa 15-fache im Vergleich zur Kontrolle (nach 8 min Perfusion) bzw. um mehr als das 30-fache nach 15 min Perfusion. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Perfusion mit Kontrollösung und VEGF ergab sich für alle Messwerte ab 3 Minuten nach Versuchsbeginn.
- Die gleichzeitige Perfusion von VEGF (10ng/ml) und CAI (10 µM) erhöht die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 der im Patch vorhandenen Kanäle um den Faktor 15 (nach 8 min Perfusion). Es zeigte sich somit eine Aktivitätszunahme des BK-K_{Ca}-Kanals, die mit der alleinigen Perfusion von VEGF vergleichbar war.
- Die alleinige Perfusion von CAI in einer Konzentration von 10 µM führt zu einer geringeren Aktivitätszunahme des BK-K_{Ca}-Kanals im Bereich von Faktor 6-7.
- 20 Minuten Präinkubation mit CAI führt zu einem vollständigen Ausbleiben der VEGF-induzierten Aktivitätszunahme des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC.
- Die primäre Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals unter Perfusion mit VEGF ist unabhängig vom extrazellulären Ca^{2+}-Gehalt: sowohl in Ca^{2+}-enthaltender als auch nahezu Ca^{2+}-freier extrazellulärer Lösung führt VEGF zu vergleichbarer Zunahme der Kanalaktivität.

4. Diskussion

4.1 Zellmaterial

Die Untersuchung von Endothelzellen hat in den letzten 2 Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Zuge der Erkenntnis, daß bei praktisch allen kardiovaskulären Erkrankungen Endothelzellen eine Rolle spielen, sind die Endothelien des Menschen Gegenstand verschiedenster Experimente geworden. Da der Versuch, Endothelzellen *in vivo* zu untersuchen meist an der schlichten Nichtdurchführbarkeit und der kaum möglichen Standardisierung vieler Experimente scheiterte, begann diese Entwickung erst in größerem Maße, als es möglich wurde, Endothelzellen zu kultivieren. Begründer dieser Technik war Jaffe (Jaffe et al. 1973). Ihm gelang es, humane Endothelzellen der Nabeschnurvene zu isolieren und zu kultivieren.

Da jedoch alle *in vitro* Experimente letztendlich die Situation *in vivo* klären helfen sollen, stellt sich die Frage, inwieweit die gefundenen Ergebnisse auf einen lebenden Gesamtorganismus übertragen werden können. Endothelzellen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, je nach Herkunft und Umweltbedingungen können sie sehr differierende Eigenschaften besitzen (Hammersen et al. 1985). Die Frage, ob Endothelzellen in Kultur spezifische Eigenschaften verlieren und dafür andere hinzutreten, kann nie bis in letzter Konsequenz geklärt werden (Gerritsen 1987). Es ist deshalb nur in Ausnahmefällen möglich, Ergebnisse direkt auf Endothelzellen anderen Ursprungs oder gar auf Vorgänge *in vivo* zu übertragen.

In allen in der hier vorliegenden Studie dargestellten Untersuchungen wurden menschliche Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) verwendet. Sie nehmen hinsichtlich der oben genannten Problematik eine Sonderstellung ein. Obwohl es sich bei ihnen definitionsgemäß um venöse Endothelzellen handelt, führen sie sauerstoffreiches, arterielles Blut. Sie stellen ein geeignetes Modell dar, um Vorgänge wie z.B. die Angiogenese besser verstehen zu lernen (Jaffe et al. 1973). Müller konnte zeigen, daß HUVEC eine verläßliches Modell zur Untersuchung von Endothelzellen darstellen. Die gefundenen Eigenschaften in Kultur lassen sich mit denen im Organmodell und in der nativen Nabelschnur vergleichen (Müller et al. 1999). Weiterhin ist es einfach, die Zellen in Kultur als HUVEC zu identifizieren. Ihre Gestalt und ihr Wachstumsverhalten als Monolayer (Jaffe et al. 1973), sowie die Expression von Faktor VIII-Antigen (Jaffe 1980), lassen eine zuverlässige Abgrenzung zu anderen Zellen wie z.B. glatten Muskelzellen zu. Faktor VIII-Antigen wird sonst nur bei Megakaryozyten und Thrombozyten gefunden (Hoyer et al. 1973).

4.2 Untersuchungstechniken

4.2.1 Patch-Clamp Technik

In der hier vorliegenden Arbeit sollte u.a. der BK-K_{Ca}-Kanal charakterisiert und die Wirkung von VEGF und CAI auf ihn untersucht werden. Da die letzteren Experimente an das Vorhandensein intakter Zellen gebunden waren, wurde die Patch-Clamp Technik (Hamill et al. 1981) in cell-attached Konfiguration gewählt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Einzelkanalströme aufzuzeichnen, ohne die Zelle zu verletzen, wie es bei der Mikroelektrodentechnik üblich war. Dadurch gelingt es, zwischen verschiedenen Ionenkanälen zu differenzieren und ihr Verhalten bei intaktem Zellstoffwechsel zu beobachten. Durch den bei der Gigaseal-Technik (Hamill et al. 1981) erreichbaren sehr hohen Widerstand zwischen Pipettenelektrode und Badlösung an der Kontaktstelle von Glaspipette und Zellmembran ist es möglich, sehr kleine Kanäle im Bereich von wenigen pA zu untersuchen. Da der hier untersuchte BK-K_{Ca}-Kanal eine hohe Leitfähigkeit von über 150 pS hatte, war das Signal/Rauschverhältnis auch bei einem Hintergrundrauschen von 2-3 pA immer noch gut und ließ sich mit Angaben aus der Literatur vergleichen. Auf eine Verwendung von Sylgard, um die Pipetten-Bad Kapazität herabzusetzen, wurde deshalb verzichtet.

Durch das Aufsetzen der Glaspipette auf die Zellmembran wird ein kleiner Membranfleck elektrisch und stofflich vom Rest der Zellaußenseite getrennt. Dadurch kann man eine Spannung an den untersuchten Membranfleck anlegen (voltage clamp), ohne das Ruhemembranpotential der gesamten Zelle wesentlich zu beeinflussen, die Zelle bleibt also „elektrisch“ und vom Stoffwechsel her intakt. Weiterhin erlaubt die stoffliche Abtrennung eine indirekte Untersuchung der im patch gelegenen Kanäle. Veränderungen der Kanäle oder ihrer Aktivität können im wesentlichen nur durch intrazelluläre Vorgänge wie z.B. die Übertragung von Informationen durch second messenger erfolgen. Eine direkte Wirkung auf die untersuchten Kanäle läßt sich somit ausschließen. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, daß alle Veränderungen in Echtzeit beobachtet und aufgezeichnet werden können, die Ergebnisse also nicht einfach die Summe aller in einem bestimmten Zeitraum abgelaufenen Ereignisse sind.

Jedoch beinhaltet die Patch-Clamp Technik auch gewisse Unsicherheitsfaktoren, die durch sorgfältige Versuchsplanung und -durchführung vermindert werden können. Wird z.B. in cell-attached Konfiguration gemessen und gleichzeitig Testfaktor perfundiert, so können durch die Perfusion oder durch Vibrationen des Versuchstisches auf die Badlösung übertragene Schwingungen die Kontaktstelle zwischen Glaspipette und Zellmembran belasten. Die daraus resultierenden Scherkräfte können Kanäle aktivieren und somit einen Effekt der perfundierten Testsubstanz vortäuschen. Cooke konnte zeigen, daß Scherkräfte einen K^+-Kanal in Endothelzellen aktivierten, es wurde sogar vermutet, daß es sich dabei um einen K_{Ca}-Kanal handelte (Cooke et al. 1991). Diese als „stretch-activated

channels“ bezeichneten Kanäle können demnach einen Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle bewirken und somit K_{Ca}-Kanäle aktivieren. Um dieses Risiko zu minimieren, erfolgte die Perfusion in der vorliegenden Arbeit möglichst schonend mit einer niedrigen Flußrate von 0,1 ml/h und einem gewissen Abstand von der untersuchten Zelle. Dieser wurde so gewählt, daß die Perfusionslösung die Zelle sanft erreichte. In den Kontrollen mit Perfusion einer wirkstoffreien Testlösung zeigte sich nur eine sehr geringe Erhöhung der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit der Kanäle im patch (Faktor 1,6 bis 1,7). Bei Messungen in outside-out Konfiguration, die zur Ermittlung der Blockierbarkeit der gefundenen Kanäle herangezogen wurde, blieb das natürliche Zellmilieu nicht erhalten, da ein Membranstück aus der Zelle herausgerissen wurde.

4.2.1 Zellkulturtechnik

Endothelzellkulturen stellen heute die wichtigste Möglichkeit dar, endotheliale Eigenschaften zu untersuchen. Es ist jedoch bekannt, daß diese Eigenschaften durch die Art der Kultur beeinflußt werden. So wurde für Gefäße des Rindes beschrieben, daß sich im Lauf der mehrmaligen Subkultivierung mannigfache Veränderungen des Zellstoffwechsels feststellen lassen; die Prostazyklinfreisetzung war nach Passagierung hoch variabel und die Aktivität des Angiotensin konvertierenden Enzyms sank sogar. Die Zellteilungsrate hingegen stieg nach Subkultivierung an und Zellen, die sich in der G2-Phase befanden, traten nach Subkultivierung wieder in den Zellzyklus ein (Goldsmith et al. 1984). Diese Veränderungen ließen sich nicht auf die bei der Subkultivierung angewandte Technik der Trypsinierung zurückführen.

Für die hier untersuchten HUVEC konnten Jaffe et al. (Jaffe et al. 1973) zeigen, daß die Morphologie der Zellen über eine längere Kulturzeit konstant blieb. Sie wuchsen auch nach 5 Monaten und mehrfacher Subkultivierung als große, polygonale Zellen, die Zellränder waren gut abgrenzbar und das typische Wachstumsverhalten als Monolayer blieb erhalten. Auch in der hier vorliegenden Studie blieben diese morphologischen Eigenschaften erhalten. Die beschriebene Prominenz im Bereich des Zellkerns wie auch das Auftreten von Bläschen im Zytoplasma konnte in meinen Experimenten ebenfalls gefunden werden. Letztere Eigenschaft der Zellen fiel besonders dann auf, wenn die Zellen über einen längeren Zeitraum (>30 min) mit Badlösung versetzt auf dem Mikroskoptisch lagerten. Um zu vermeiden, daß diese im Lauf der Zeit zunehmenden Zytoplasmaveränderungen eventuell die Patch-Clamp Messungen beeinträchtigen könnten, wurden für die Auswertung nur Experimente verwendet, bei denen sich die Zellen nicht länger als 45 min auf dem Mikroskoptisch befanden. Dies wurde insbesondere aus der Tatsache heraus berücksichtigt, daß das Auftreten dieser Bläschen auch auf einen beginnenden Zelluntergang hinweisen könnte; dies hätte die Untersuchungen mit VEGF und CAI, die eine intakte Zelle voraussetzten, ad absurdum geführt.

Die Studie von Jaffe et al. von 1973 wurde jedoch in verschiedenen Arbeiten im Lauf der Jahre relativiert. So konnte nachgewiesen werden, daß HUVEC auch schon nach wenigen Zellpassagen (4-5) morphologische Veränderungen, Polymorphismen, eine Reduktion der NOSynthase und eine Abnahme der DNA-Synthese aufweisen können (Aznar-Salatti et al. 1990, Kroll und Waltenberger, Gimbrone et al. 1974). Letzteres Phänomen wurde hauptsächlich dann beobachtet, wenn die Zellen untereinander in Kontakt traten, das Wachstum also als konfluent bezeichnet werden konnte. In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen mit VEGF und Iberiotoxin wurde deshalb besonders darauf geachtet, daß die Proliferation der Zellen in ihren Kulturgefäßen nicht durch die Konfluenz beeinträchtigt wurde. Dies geschah durch die Aussaat einer definierten, geringen Anzahl an Zellen, ein Konfluentwerden des Zellrasens vor dem Auszählen wurde auf diese Weise vermieden.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden HUVEC der Passage 2-14 verwendet. Bei den Wachstumsversuchen zeigten sich in der VEGF-stimulierten Proliferationsrate keine wesentlichen Unterschiede zwischen Zellen höherer Passage (8-11) und Zellen niedriger Passage (2-5). In den Patch-Clamp Experimenten stellte sich jedoch heraus, daß die Exprimierung des BK-K_{Ca}-Kanals durch die Subkultivierung beeinflußt wird. In Zellen der Passage 6 und weniger konnten auch nach mehreren Dutzend Patchversuchen keine aktiven BK-K_{Ca}-Kanäle gefunden werden. Erst in Passagen > 6 traten sie mehr oder weniger zahlreich in Erscheinung, wobei zwischen Passage 11 und 13 bei meinen Versuchen ein Optimum lag. Dies deutet einerseits darauf hin, daß die Subkultivierung die Exprimierung aktiver BK-K_{Ca}-Kanäle induziert, andererseits, daß der bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials - zumindest bei jüngeren Zellen - eine eher untergeordnete Rolle spielt. Dies läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß BK-K_{Ca}-Kanäle lediglich ein kulturbedingtes Phänomen sind. In verschiedenen Modellen konnten BK-K_{Ca}-Kanäle in Primärkultur nachgewiesen werden (Li et al. 1999, Hoyer et al. 1994) Unter Berücksichtigung all dieser teils in eigenen Experimenten, teils in Literaturstellen gefundenen Ergebnisse eignen sich HUVEC als Modell zur Untersuchung von Endothelzellen. Die daraus gewonnen Einsichten in das Verhalten von Endothelzellen *in vitro* lassen sich jedoch nur bedingt Schlüsse auf die Situation *in vivo* zu.

4.3 BK-K_{Ca}-Kanal

Der BK-K_{Ca}-Kanal gilt heute als einer der am besten untersuchten Ionenkanäle überhaupt. Die meisten Studien untersuchten dabei den BK-K_{Ca}-Kanal in Skelettmuskelzellen, aber auch in Endothelzellen wurde seine Existenz mehrfach nachgewiesen (Fichtner et al.1987, Groschner et al. 1992, Hoyer et al. 1994, Ling et al.1992, Manabe et al. 1995, Nilius et al. 1990, Rusko et al. 1992). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der BK-K_{Ca}-Kanal in HUVEC identifiziert und charakterisiert.
Die auffallendste Eigenschaft des BK-K_{Ca}-Kanals ist, wie sein Name schon sagt, die außerordentlich große Leitfähigkeit. Sie wird für die symmetrische K^+-Verteilung mit Werten von 150 bis zu 300 pS

für verschiedene Zelltypen angegeben (Gribkoff et al. 1997, Latorre et al. 1989, Ling et al. 1992). Diese Angaben stimmen mit den in der hier vorliegenden Studie gefundenen Ergebnissen bei HUVEC überein. Die dabei erkennbare Abnahme der Leitfähigkeit bei zunehmendem Membranpotential wird auch in der Literatur beschrieben (Hille et al. 1978, Cox et al. 1997). Ein Erklärungsversuch könnte darin bestehen, daß der Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle durch die Depolarisation gebremst wird und somit die intrazelluläre Ca^{2+}-Bindung des Kanals vermindert wird. Auffällig ist, daß der BK-K_{Ca}-Kanal trotz seiner hohen Leitfähigkeit eine hohe Selektivität für K^+-Ionen besitzt (Nilius et al. 1990).

Einen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität des Kanals, d.h. auf die Anzahl und Dauer der Kanalöffnungen, haben das Membranpotential und der intrazelluläre Ca^{2+}-Spiegel. Erhöht man künstlich den Ca^{2+}-Spiegel an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, indem man Zellen in inside-out Konfiguration untersucht, kann über den Ca^{2+}-Wert in der Badlösung die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit der Kanäle verändert werden. Bei einem Membranpotential von 20 mV lag die Ca^{2+}-Konzentration, die den BK-K_{Ca}-Kanal in Endothelzellen der Kaninchenaorta halbmaximal aktiviert, bei 1 µM (Rusko et al. 1992). Da in der hier vorliegenden Studie jedoch HUVEC in cell-attached Konfiguration untersucht wurden, konnten bei einer intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration von etwa 10^{-9} - 10^{-8} M bei 20 mV Membranpotential keine Kanalöffnungen beobachtet werden; erst ab etwa 40 mV war dies gelegentlich und ab 60 mV fast regelmäßig möglich. Diese Abhängigkeit der Kanalaktivität vom Membranpotential wurde zuerst für Skelettmuskelzellen nachgewiesen (Latorre et al. 1982, Palotta et al. 1981) und ist Ca^{2+}-unabhängig (Cui et al. 1997). Die Offenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals in Slelettmuskelzellen steigt durch eine Depolarisation im Bereich von 12 bis 14 mV e-fach an (Daut et al. 1993), was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie an HUVEC deckt; hier wurde ein Wert von 13,0 mV ermittelt.

Eine weitere wichtige Möglichkeit, Kanäle zu identifizieren und zu charakterisieren, stellt ihre Blockierung durch spezifische Hemmstoffe dar. Dazu gehören vor allem Toxine, deren Moleküle mit hoher Spezifität an die Kanalproteine binden. Ein unspezifischer Blocker für K^+-Kanäle ist Tetraethylammonium (TEA) (Langton et al. 1991, Villaroel et al. 1988). Es inhibierte auch in den hier durchgeführten Versuchen die Aktivität der untersuchten Kanäle; die Konzentration K_d, die bei der Perfusion für den halbmaximalen Block benötigt wurde, lag bei 450 µM TEA. Ein spezifischerer Blocker des BK-K_{Ca}-Kanals ist Iberiotoxin (IbTX), das Gift des Skorpions Buthus tamulus (Galvez et al. 1990). Sowohl TEA als auch Iberiotoxin sind reversible Kanalblocker. Für TEA konnte dies in den im vorigen Kapitel beschriebenen Patch-Clamp Experimenten bestätigt werden, für Iberiotoxin fanden sich ähnliche Ergebnisse (Faehling et al. 2001).

Der BK-K_{Ca}-Kanal wurde durch die durchgeführten Experimente eindeutig als solcher identifiziert. Die gefundenen Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur überein (Fichtner et al. 1987,

Rusko et al. 1992, Gribkoff et al. 1997), womit die weitverbreitete Existenz des BK-K_{Ca}-Kanals auch für die hier untersuchten HUVEC nachgewiesen wurde. Da auch HUVEC höherer Passage durch VEGF stimulierbar sind, eignen sie sich als Modell zur Untersuchung der Interaktion zwischen VEGF und K_{Ca}-Kanal.

4.4 VEGF/CAI

In der vorliegenden Studie wurden Zusammenhänge zwischen ionalen Vorgängen und der VEGF-stimulierten Proliferation von HUVEC näher untersucht. Dazu wurden die Reaktionen des BK-K_{Ca}-Kanals auf Perfusion mit VEGF und CAI in Ca^{2+}-freier und Ca^{2+}-enthaltender Badlösung sowie unter Präinkubation mit CAI beobachtet. In Zellkulturversuchen wurde das Wachstum von HUVEC unter VEGF-Stimulation und Blockade des BK-K_{Ca}-Kanals durch Iberiotoxin überprüft. Es zeigte sich dabei, daß Perfusion mit VEGF-Lösung in einer Konzentration von 10 ng/ml die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals in HUVEC stark erhöht. Diese Aktivitätserhöhung läßt sich nicht durch einen direkten Einfluß von VEGF auf den Kanal erklären, da der im Membranpatch gelegene Bereich durch den Seal isoliert war; VEGF-Moleküle konnten nicht direkt an die Kanalproteine gelangen. Dem beobachteten Effekt müssen also andere Ursachen zugrunde liegen. So wird diskutiert, daß VEGF, nachdem es an die zellmembranständigen Rezeptoren Flt-1 (de Vries et al. 1992) und KDR (Terman et al. 1992) in bovinen Endothelzellel der Aorta gebunden hat, das Enzym Phospholipase C-γ durch Tyrosin-Phosphorylation aktiviert (Guo et al. 1995, Wu et al. 1999). Dieses membranständige Enzym spaltet aus Phospholipiden der Zellmembran Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin ab. IP_3 bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und könnte somit den untersuchten BK-K_{Ca}-Kanal aktivieren. Durch die sich leerenden intrazellulären Ca^{2+}-Speicher werden Speicher-gesteuerte (store-operated) Ca^{2+}-Kanäle in der Zellmembran aktiviert und es kommt zum Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle (Parekh et al. 1997, Gribkoff et al. 1997). Diese beiden Veränderungen des Ca^{2+}-Gehaltes der Zelle konnten als biphasisches Ca^{2+}- Signal in Fluoreszenz-Untersuchungen nach Stimulation mit VEGF (Faehling et al., unveröffentliche Daten) und nach Stimulation mit vasoaktiven Substanzen, die NO freisetzen konnten, nachgewiesen werden (Adams et al. 1989). Der andere durch PLC-γ enstehende second messenger Diacylglycerin steigert seinerseits die Aktivität der Ca^{2+}-abhängigen Proteinkinase C (PKC). Dieses Enzym scheint an der Wirkungsvermittlung von VEGF wesentlich beteiligt zu sein. Wellner zeigt, daß die PKC-Inhibitoren Staurosporin und Calphostin C die Proliferation von HUVEC reduzieren; eine künstlich herbeigeführte, spezifische Downregulation der PKC-alpha und der PKC-zeta blockierten sogar das Wachstum der Endothelzellen (Wellner et al. 1999).

Ein weiterer Weg, wie VEGF seine Wirkung auf Endothelzellen entfaltet, ist die Aktivierung des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) (Kroll und Waltenberger 1998, Papapetropoulos et al. 1997, Ziche et al. 1997, Murohara 1998). Papapetropoulos zeigt für HUVEC, daß nach 24-stündiger

Inkubation mit VEGF der zelluläre Gehalt an endothelialer NO Synthetase (eNOS) sowie die Freisetzung von Sickstoffmonoxid (NO) angestiegen waren (Papapetropoulos et al. 1997). Nach nur kurzer VEGF-Exposition wurde lediglich ein Anstieg von NO nachgewiesen. Mit der Freisetzung von NO eng verbunden ist die Aktivierung der Guanylatzyklase, deren Produkt, cGMP mit der Erhöhung von NO auch angestiegen war. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird dadurch klar, daß die Applikation eines Inhibitors der eNOS (L-Nitroarginin Methylester [L-NAME]) die VEGF-induzierte Proliferation reduzierte. Diese Wachstumsinhibition durch L-NAME wies Ziche auch am Kaninchenmodell nach (Ziche et al. 1997), die Applikation eines Hemmers der Guanylatzyklase hatte ebenfalls eine Reduktion der Proliferations-rate zur Folge. Direkt infundiertes VEGF entfaltete seine Wirkung in einer Studie von Tilton ebenfalls NOS-abhängig. Durch einen Inhibitor der NOS wurde der VEGF-induzierte Abfall des Blutdrucks, des Herzminutenvolumens und der Ejektionsfraktion bei anästhesierten Ratten blockiert (Tilton et al. 1999). Weiterhin wird die endotheliale NOS durch die PLC-vermittelte Aktivierung der Phosphokinase C bzw. den ansteigenden intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel stimuliert (Wu et al. 1999).

Eine unmittelbare Wirkung von VEGF auf die Kanalproteine wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Versuchsanordnung ausgeschlossen. Die dichte Verbindung zwischen Glaspipette und Zellmembran ließ keinen nennenswerten Stoffaustausch zu. Dies ist insofern wichtig, als in mehreren Studien bestätigt wurde, daß VEGF die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals über Phosphorylation bzw. Dephosphorylation der Kanalproteine verändert (Prevarskaya et al. 1995, White et al. 1993, Esguerra et al. 1994). Tyrosinphosphatase-Inhibitoren erhöhen die Aktivität und Tyrosinkinase-Inhibitoren reduzierten die Aktivität des BK-K_{Ca}-Kanals. Neben der Inhibition des BK-K_{Ca}-Kanals reduzierte in einer Studie von Guo der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein auch die Proliferation von bovinen Endothelzellen der Aorta (Guo et al. 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, daß die bekannte proliferations-stimulierende Wirkung von VEGF auch für die hier untersuchten HUVEC gilt. Nach Inkubation mit VEGF zeigte sich ein deutlicher, dosisabhängiger Anstieg der Zellzahl. Diese Ergebnisse entsprechen den Angaben in der Literatur (Ferrara et al. 1997, Risau 1997). Die Blockierung des BK-K_{Ca}-Kanals durch Iberiotoxin hatte bei den Experimenten keinen Einfluß auf das VEGF-induzierte Wachstum der Endothelzellen, was gegen eine direkte Beteiligung des BK-K_{Ca}-Kanals an der proliferationsstimulierenden Wirkung von VEGF spricht (siehe 4.5.2). In einer Studie von Wiecha wurde die Rolle des BK-K_{Ca}-Kanals in der bFGF-vermittelten Proliferation von HUVEC jedoch als bedeutend beschrieben (Wiecha et al. 1998). Applikation von 0,1 µM Iberiotoxin reduzierte die bFGF-stimulierte Proliferation, wobei auch hier keine komplette Inhibition des Wachstums erreicht werden konnte. Eine Möglichkeit, diese Diskrepanz zu erklären, sind die unterschiedlichen verwendeten Wachstums-faktoren. VEGF und das in der Studie von Wiecha verwendete bFGF haben nicht nur ein

unterschiedliches Wirkspektrum, sondern scheinen auch in ihrer Signaltransduktion nicht direkt vergleichbar (Ziche et al. 1997). So vermittelten die NO-Synthetase und die Guanylatzyklase in dieser Studie die Aktivität von VEGF, aber nicht von bFGF.

Die bisher dargestellten Möglichkeiten der VEGF-induzierten Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals deuten also auf Ca^{2+}-abhängige Mechanismen wie die Aktivierung der Phospholipase C-γ und der Ca^{2+}-abhängigen endothelialen NOS (Hood et al.1998) sowie auf Ca^{2+}-unabhängige Wege wie die Phosphorylation/Dephosphorylation der Kanalproteine hin. Um die Ca^{2+}-Abhängigkeit der VEGF-induzierten BK-K_{Ca}-Kanal Aktivierung zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Studie Carboxyamidotriazol (CAI) zusammen mit VEGF perfundiert. CAI ist ein Inhibitor eines nicht spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Einstroms (Kohn et al. 1994) und beeinflußt die Tumorinvasion, die Metastasierung wie auch die Angiogenese (Kohn et al. 1995, Cole et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde in Patch-Clamp Versuchen an HUVEC CAI in einer Konzentration von 10 µM zusammen mit VEGF (Konz. 10 ng/ml) und allein perfundiert. Bei der gleichzeitigen Perfusion zeigte sich keine Beeinflussung der VEGF-induzierten Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals. Dies ist in Anbetracht der Tatsache, daß CAI den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle hemmt, unerwartet, da der BK-K_{Ca}-Kanal durch den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} definitiv aktiviert wird. Die naheliegendste Erklärung ist, daß der VEGF-induzierte intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg durch CAI nicht sofort vermindert wird. Eine direkte Blockierung der Ca^{2+}-Kanäle in der Zellmembran ist dadurch unwahrscheinlich, vielmehr muß an eine Beeinflussung intrazellulärer Vorgänge gedacht werden. Dazu wurden in einem weiteren Experiment Zellen mit 10 µM CAI 20 Minuten präinkubiert. Dies verhinderte die Aktivierung des BK-K_{Ca}-Kanals komplett. In Ca^{2+}-Fluoreszenz Messungen konnte Faehling zusätzlich nachweisen, daß CAI sowohl die durch VEGF ausgelöste Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als auch den nachfolgenden Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle inhibiert (Faehling et al., unveröffentliche Daten). Das deutet darauf hin, daß CAI proximal der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wirkt.

Auch für die in einer anderen Arbeit untersuchte Hemmung der HIV-induzierten Transkription in Jurkat T-Zellen zeigte sich, daß erst nach längerer Präinkubation mit CAI maximale Effekte erzielt werden konnten (Yasui et al. 1997). In einer Studie von Gusovsky fand sich eine Hemmung der Phospholipase C-γ in Hamster-Ovarialzellen durch einen Tyrosinkinase-Inhibitor, durch CAI und durch den Entzug extrazellulären Kalziums (Gusovsky et al. 1992). Durch die Hemmung der Phospholipase C-γ und das Fehlen von IP_3 ließe sich die Hemmung der Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern und konsekutiv die Verminderung des Ca^{2+}-Einstroms durch speicher-gesteuerte (store-operated) Ca^{2+}-Kanäle erklären. Die Inhibition der Tyrosinkinase-Aktivität durch CAI wurde auch für HUVEC nachgewiesen (Masiero et al. 1997). Die Hemmung des Ca^{2+}-Einstroms kann also sowohl durch die Hemmung der Phospholipase C-γ als auch durch die direkte Tyrosinkinase-Inhibition erklärt werden.

Für die Wichtigkeit des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels spricht in diesem Fall auch, daß 10 µM CAI die Proliferation von HUVEC auf Kollagen IV völlig verhinderte (Alessandro et al. 1996). Die durch CAI ausgelöste Wachstumshemmung von Endothelzellen ist jedoch nicht VEGF-spezifisch, auch die Effekte von bFGF und von in Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren werden beeinflußt (Masiero et al. 1997). Im Tierexperiment führt die Präinkubation bestimmter Tumorzellen mit CAI nach Inokulation zu einer Verringerung der Formation und des Wachstums experimenteller Lungenmetastasen (Kohn et al. 1992). Auch bei humanen Melanom- und Ovarialkarzinom Xenograft-Modellen fand man nach oraler Gabe von CAI ähnliche Effekte (Kohn et al. 1992). Die Sensibilität gegenüber CAI ist in verschiedenen Zellinien jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. So sind Fibroblasten bezüglich der Proliferationsinhibition mit einer ED_{50} von 0,06 µg/ml gegenüber einer Tumorzellinie mit einer ED_{50} von 3 µg/ml erheblich empfindlicher (Hupe et al. 1990). In einer klinischen Phase I Studie erhielten Patienten mit fortgeschrittenem, refraktärer Tumorerkrankung täglich oder jeden zweiten Tag CAI in einer Dosis, die zu einem Plasmaspiegel von 1-10µM (im Mittel 2,3µM) führte, der Konzentration, die den Ca^{2+}-Einstrom und die Angiogenese *in vitro* wie auch *in vivo* inhibierte und auch in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Bei 49% der Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf konnte eine Stabilisierung erreicht werden (Kohn et al. 1996). Die so erzielte Wirkung läßt sich hauptsächlich durch die Inhibition der tumorinduzierten Angiogenese erklären, insbesondere da in hypoxischen Geweben, wie sie Tumoren oft darstellen, eine Erhöhung von angiogen wirkenden Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF nachgewiesen wurde (Kim et al. 1993, Millauer et al. 1996, Plate et al. 1992).

In Patch-Clamp Versuchen, in denen CAI in einer Konzentration von 10 µM ohne gleichzeitige Perfusion von VEGF appliziert wurde, stieg die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit NP_0 der im Patch liegenden Kanäle ebenfalls an, jedoch in deutlich geringerem Maße als unter VEGF-Perfusion. Da die direkte Beeinflussung der Kanäle durch die Versuchsanordnung weitestgehende ausgeschlossen werden konnte (Isolation des Membranflecks unter der Pipettenspitze), kam eine Veränderung der Kanalproteine oder der Konformation des Kanaleingangs als Erklärung nicht in Frage. In Ca^{2+}-Fluoreszenz-Messungen wurde eine passagere Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels nachgewiesen (Faehling, nichtveröffentlichtes Datenmaterial).

4.5 Signaltransduktion

4.5.1 Rolle von Ca^{2+}

Kalzium kommt bei der Signaltransduktion von VEGF eine wesentliche Bedeutung zu.

Der durch VEGF ausgelöste intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg in HUVEC wird einer Studie von Cunningham zufolge nur über die KDR-Aktivierung vermittelt und nicht über den VEGF-Rezeptor Flt-1. Antikörper gegen KDR blockierten die Ca^{2+}-Mobilisation völlig, wohingegen das Binden von VEGF an Flt-1 keine Ca^{2+}-Antwort zur Folge hatte (Cunningham et al. 1999).

Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels kann sowohl in Fluoreszenz-Untersuchungen beobachtet werden (Faehling et al., unveröffentliche Daten), als auch in den hier durchgeführten Versuchen anhand der Aktivierung des BK-K_{CA}-Kanals. Um dabei die Herkunft des Ca^{2+} zu klären, wurden die Patch-Clamp-Versuche unter VEGF-Perfusion in analoger Weise wiederholt, jedoch in nominell Ca^{2+}-freiem extrazellulären Medium. Unter VEGF-Stimulation zeigte sich wiederum eine Aktivierung des BK-K_{CA}-Kanals, vergleichbar mit den Versuchen in Ca^{2+}-haltigem Medium. Dieses Resultat läßt zusammen mit den Ergebnissen der Versuche mit CAI den Schluß zu, daß der primäre intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg nach Stimulation mit VEGF nicht durch den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, sondern durch Ausstrom aus intrazellulären Speichern hervorgerufen wird.

4.5.2 Rolle des BK-K_{Ca}-Kanals

Die Aktivierung von BK-K_{CA}-Kanälen führt zu einem auswärtsgerichteten K^+-Strom und hat somit eine hyperpolarisierende Funktion auf die Zelle (Bae et al. 1999). Dadurch wird der elektrochemische Gradient verändert und die treibende Kraft für den Ca^{2+}-Einstrom nimmt zu.

Die Rolle des K_{Ca}-Kanals bei der Signaltransduktion von VEGF ist noch weitgehend unbekannt und war deshalb ein wesentlicher Bestandteil der hier dargestellten Untersuchungen. In der Vergangenheit wurde gezeigt, daß Fibroblasten, die den Rezeptor für epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) tragen, durch EGF-Applikation proliferierten. Blockierte man die K^+-Kanäle der Zellen mit Charybdotoxin, so führte dies zu einer Inhibition der Zellproliferation (Magni et al. 1991). Die dabei beeinflußten K^+-Kanäle waren jedoch Spannungs- und second messenger-gesteuerte K^+-Kanäle, die Ergebnisse lassen sich also weder vom Zellmaterial und Kanaltyp, noch vom verwendeten Wachstumsfaktor auf die hier vorliegende Arbeit übertragen. Hier wurde nämlich gezeigt, daß der K_{Ca}-Kanal - wenn überhaupt - nur eine untergeordnete Rolle bei der VEGF-stimulierten Proliferation von HUVEC spielt. So führte die Inkubation von HUVEC mit Iberiotoxin nicht zu einer Verringerung der VEGF-induzierten

Proliferation. Da Iberiotoxin den BK-K_{Ca}-Kanal spezifisch inhibiert (Garcia et al. 1991), hätte bei den benutzten hohen Wirkstoffkonzentrationen eine Beeinflussung der Proliferation sichtbar werden müssen. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, daß sich Zellen höherer Passage (8-11) in ihrem VEGF-induzierten Wachstumsverhalten nicht von Zellen niedriger Passage (2-5) unterschieden. Zellen niedriger Passage zeigten in wiederholten Patch-Clamp Experimenten keine BK-K_{Ca}-Kanalaktivität, woraus geschlossen wurde, daß jüngere HUVEC (Passage <7) keine aktiven BK-K_{Ca}-Kanäle exprimierten. Die sich dabei stellende Frage, ob die Existenz von BK-K_{Ca}-Kanälen in Endothelzellen ein kulturbedingtes Phänomen darstellt, wurde durch Li und Hoyer beantwortet (Li et al. 1999, Hoyer et al. 1994). Sowohl in mikrovaskulären Endothelzellen des menschlichen Gehirns als auch in Endothelzellen des Schweineendokards wurden Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle in Primärkultur nachgewiesen.

Das in den hier durchgeführten Versuchen gesehene vergleichbare Wachstumsverhalten von HUVEC unabhängig von der Existenz aktiver BK-K_{Ca}-Kanäle spricht gegen eine direkte Beteiligung des BK-K_{Ca}-Kanals an der VEGF-induzierten Endothelzellproliferation. Derartige Ergebnisse wurden auch in anderen Zellsystemen gefunden. So konnte Karamsetty die typischen Reaktionen von pulmonalen Arterienringen der Ratte auf Hypoxie durch Blockade der K_{Ca}-Kanäle mit Tetraethylammonium (TEA) und Charybdotoxin nicht verhindern. Weder die initiale Kontraktion, noch die folgende Relaxation wurden beeinflußt (Karamsetty et al. 1998).

Die in 4.4 beschriebene Aktivierung der NOS und der Anstieg von NO durch VEGF führen zu einer Aktivierung der Guanylatzyklase. Der dadurch erhöhte cGMP-Spiegel wiederum aktiviert u.a. den BK-K_{Ca}-Kanal durch eine cGMP-abhängige Proteinkinase (Robertson et al. 1993, Tanigushi et al. 1993). In Gefäßmuskelzellen der Lunge wurde sowohl die Wirkung von NO als auch deren Abhängigkeit von der Guanylatzyklase gezeigt (Peng et al. 1996); durch Blockierung der cGMP-Produktion bzw. deren Wirkung wurde die Aktivierung des K_{Ca}-Kanals inhibiert. Bolotina wies in Versuchen nach, daß exogenes wie natives NO den BK-K_{Ca}-Kanal aktivieren. Dies gelang in cell-free patches sogar ohne die Beteiligung von cGMP (Bolotina et al. 1994). Diese Ergebnisse werden jedoch teilweise durch eine Studie von Haburcák (Haburcák et al. 1997) widerlegt. Dabei zeigt sich, daß durch einen NO-Donator freigesetztes NO den BK-K_{Ca}-Kanal in HUVEC nicht aktivieren konnte. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich u.U. durch das unterschiedliche Zellmaterial und dadurch, daß in einer Studie NO direkt und in der anderen ein NO-Donor (SNOC) verwendet wurde, erklären. SNOC ist dafür bekannt, daß es den pH-Wert und somit die freie Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle modulieren kann.

Aus den aufgeführten eigenen und den in verschiedenen anderen Studien gewonnen Ergebnissen kann man erkennen, daß K_{Ca}-Kanäle und der BK-K_{Ca}-Kanal im besonderen von vielfältigen Faktoren beeinflußt werden und selbst unterschiedlichste Effekte auslösen können. Ein Rolle im Sinne eines einheitlichen Wirkmechanismus in verschiedenen Zelltypen scheint er somit nicht zu spielen, für die proliferationsvermittelnde Wirkung von VEGF in HUVEC-Zellkulturen im speziellen ist er von untergeordneter Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren stellen den wichtigsten Faktor in der Regulation vaskulärer Umbauprozesse dar. Dies kann auf dem Boden physiologischer als auch pathophysiologischer Vorgänge geschehen. So ist die Angiogenese während der Embryonalentwicklung eng an die Stimulation durch Wachstumsfaktoren gebunden. Bei der Wundheilung, bei Reendothelialisierungsvorgängen z.B. nach Koronarangioplastie aber auch bei der tumorinduzierten Angiogenese spielen sie eine wichtige Rolle. Ein im Bezug auf die Beeinflussung endothelialer Funktionen sehr potenter und wichtiger Faktor ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Es ist seit einigen Jahren bekannt, daß VEGF seine Wirkung entfaltet, indem es als ersten Schritt an die zellmembranständigen Rezeptoren KDR (kinase insert domain-containing receptor) und Flt-1 (fms-like Tyrosinkinase 1) bindet. Verschiedene noch größtenteils unbekannte Mechanismen führen schließlich u.a. zu einer Steigerung der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und zur Zellproliferation.

Zu diesen Mechanismen gehören kalziumunabhängige Mechanismen wie die Phosphorylation/Dephosphorylation der Kanalproteine sowie kalziumabhängige Mechanismen wie die Aktivierung der Phospholipase C-γ und der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthetase (NOS). Dem intrazellulären Kalziumspiegel scheint dabei eine besondere Bedeutung zuzukommen, praktisch alle Vorgänge, die mit einer Zellproliferation verbunden sind, sind auch an die Erhöhung des Kalziumniveaus der Zelle gekoppelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der kalziumaktivierte Kaliumkanal großer Leitfähigkeit (BK-K_{Ca}-Kanal) in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) ab Passage 7 aufwärts exprimiert wird. Die dabei gefundenen Werte für die Spannungsabhängigkeit, die Leitfähigkeit und die Blockierbarkeit durch Tetraethylammonium (TEA) stimmten mit Literaturangaben überein. In Perfusionsuntersuchungen stieg die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des Kanals nach 15 Minuten um den Faktor 30 im Vergleich zur Kontrolle an, dies auch bei nominell kalziumfreier extrazellulärer Lösung. Die aus der Literatur bekannte proliferationssteigernde Wirkung von VEGF auf Endothelzellen konnte ebenfalls bei den hier untersuchten HUVEC nachgewiesen werden. In Zellkulturversuchen stieg die Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit VEGF auf 160 % der Zellzahl zu Beginn des Experimentes an. Um die Kalziumabhängigkeit der VEGF-vermittelten Erhöhung der Gesamtoffenwahrscheinlichkeit des BK-K_{Ca}-Kanals und der Zellproliferationsrate weiter zu untersuchen, wurde der antiproliferative Wirkstoff Carboxyamidotriazol (CAI) hinzugezogen. CAI ist für seine tumoristatischen Eigenschaften bekannt und durchlief bereits eine klinische Phase I Studie. Die hier durchgeführten Versuche zeigten, daß die bekannte kalziuminhibitorische Wirkung erst nach Präinkubation auftritt, worauf auch in verschiedenen anderen Arbeiten hingewiesen wurde.

Um die Rolle des BK-K_{Ca}-Kanals in der VEGF-induzierten Proliferation von HUVEC zu klären, erfolgten Wachstumsversuche, bei denen mit VEGF inkubierte Zellen zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen eines spezifischen BK-K_{Ca}-Kanal-Blockers, Iberiotoxin, versetzt wurden. Dabei ließ sich kein Zusammenhang zwischen Blockierung des Kanals und Wachstumsrate der Zellen erkennen. Auch zeigten jüngere HUVEC, die - wie sich in den Patch-Clamp Experimenten herausstellte- keine aktiven BK-K_{Ca}-Kanäle exprimierten, im Vergleich zu älteren Zellen kein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Daraus kann man folgern, daß der BK-K_{Ca}-Kanal bezüglich der proliferationsstimulierenden Wirkung von VEGF eine untergeordnete Rolle spielt, somit VEGF zwar den BK-K_{Ca}-Kanal aktiviert, der Kanal selbst aber an der Signaltransduktion nur eingeschränkt beteiligt ist. Eine Beteiligung des BK-K_{Ca}-Kanals an anderen VEGF-Wirkungen wie z.B. der Migration ist jedoch möglich.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse weisen auf die Komplexität der an der Signaltransduktion von VEGF beteiligten Vorgänge hin. Eine einfache therapeutische Blockierungsmöglichkeit wird dadurch relativ unwahrscheinlich. Die vielfältigen Möglichkeiten, die sich in der Beeinflussung einzelner Schritte der Signaltransduktionskaskade von Wachstumsfaktoren bieten, lassen jedoch berechtigte Hoffnung für eventuell in der Zukunft mögliche spezifische und nebenwirkungsarme therapeutische Maßnahmen zu.

Literaturverzeichnis

1. Adamis, AP et al.: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative retinopathy. Amer J Ophthal 118:445-450 (1994).

2. Adams DJ, Barakeh J, Laskey R, van Breemen C: Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. The FASEB Journal 3: 2389-2400 (1989).

3. Alessandro R, Masiero L, Liotta LA, Kohn EC: The role of calcium in the regulation of invasion and angiogenesis. In Vivo 10:153-160 (1996)

4. Bae YM, Park MK, Lee, SH, Ho WK, Earm YE: Contribution of Ca^{2+}-activated K^+ channels and non-selective cation channels to membrane potential of pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit. J Physiol (Lond) 514:747-758 (1999)

5. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia. Implications for coronary angiogenesis. Cardiovasc Res 28:1176-1179 (1994)

6. Baran I: Calcium and cell cycle progression: possible effects of external pertubations on cell proliferation. Biophys J 70:1189-1213 (1996)

7. Barret TB, Gajdusek CM, Schwartz SM, McDougall JK, Benditt EP: Expression of the sis gene by endothelial cells in culture and in vivo. Proc. Natl Acad Sci USA 81:6772-6774 (1984)

8. Berkman RA, Merill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH: Expression of the vascular permeability/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. J Clin Invest 91:153-159 (1993)

9. Berridge MJ: Calcium signalling and cell proliferation. Bio Essays 17:491-500 (1995)

10. Berridge MJ: Insositol triphosphate and calcium signalling. Ann NY Acad Sci 766:31-43 (1995)

11. Bezanilla F, Stefani E: Voltage dependent gating of ionic channels. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23:819 – 846 (1994)

12. Blatz AL, Magleby KL: Calcium-activated potassium channels. Trends Neurosci 10:463-467 (1987)

13. Blatz AL, Magleby KL: Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. J Gen Physiol 84:1-23 (1984)

14. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, and Cohen RA: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. Nature. 368:850-853 (1994)

15. Brock TA, Dvorak HF, and Senger DR: Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca^{2+} and von Willebrand factor release in human endothelial cells. Am J Pathol 138:213-221 (1991)

16. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM: Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. Circulation 90:649-652 (1994)

17. Brown AM, Birnbaumer L: Ionic channels and their regulation by G-protein subunits. Annu Rev Physiol 52:197-213 (1990)

18. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Conolly JL, Schnitt SJ: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and ist receptors in breast cancer. Hum Pathol 26:86-91 (1995)

19. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and ist receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer Res 53:4727-4735 (1993)

20. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familetti PC, Pan Y-C, Olander JV, Conolly DT, Stern D: Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med 172:1535-1545 (1990)

21. Colden-Stanfield M, Schilling WP, Possani LD, Kunze DL: Bradykinin-induced potassium current in cultured bovine aortic endothelial cells. J Membr Biol 116:227-238 (1990)

22. Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, and Kunze DL: Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. Circ Res 61:632-640 (1987)

23. Cole K, Kohn EC: Calcium-mediated signal transduction: biology, biochemistry, and therapy. Cancer Met Rev 13:33-41 (1994)

24. Colquhoun D, Sigworth FJ: Fitting and statistical analysis of single-channel records. In: Sakman B, Neher E (Hrsg) Single-channel recording, 2. Aufl, Plenum Press, New York, S. 483 - 587 (1995)

25. Conolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J: J Clin Invest 84:1470-1478 (1989)

26. Conolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J: Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem 254:20017-20024 (1989)

27. Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, and Dzau VJ: Flow activates an endothelial potassium channel to release endogenous nitrovasodilator. J Clin Invest 88:1663-1671 (1991)

28. Cox DH, Cui J, Aldrich RW: Separation of gating properties from permeation and block in mslo large conductance Ca-activated K^+ channels. J Gen Physiol 109:633-646 (1997)

29. Cuevas P, Garcia-Calvo M, Carceller F Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Munoz-Willery I, Martinez-Coso V, Lamas S, Gimenez-Gallego G: Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. Proc Natl Acad Sci USA 93:11996-12001 (1996)

30. Cui J, Cox DH, Aldrich RW: Intrinsic voltage dependence and Ca^{2+} regulation of mslo large conductance Ca-activated K^+ channels. J Gen Physiol 109:647-673 (1997)

31. Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Bjercke R, Brock TA: KDR activation is crucial for VEGF165-mediated Ca^{2+} mobilization in human umbilical vein endothelial cells. Am J Physiol 276:176-181 (1999)

32. Daut J, Mehrke G, Nees S, Newman WH: Passive electrical properties and electrogenic sodium transport of cultured guinea-pig coronary endothelial cells. J Physiol 402:237-254 (1988)

33. Daut J, Standen NB, Nelson MT: The role of membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. J Cardiovasc Electrophysiol 5:154-181 (1994)

34. Daut J: Coming closer: Structure and function of calcium-activated K^+ channels in coronary arteries. J Phyiol 502:469 (1997)

35. Day ML, Pickering SJ, Johnson MH, Cook DI: Cell-cycle control of a large conductance K^+ channel in mouse early embryos. Nature 365:560-562 (1993)

36. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 255:989-991 (1992)

37. De-Allie FA, Bolsover SR, Nowicky AV, Strong PN: Characterisation of Ca^{2+}-activated $^{86}RB^+$ fluxes in rat C6 glioma cells: a system for identifying novel IK_{Ca}-channel toxins. Br J Pharmacol 117:479-487 (1996)

38. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvoral HF: Overexpression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med 180:1141-1146 (1994)

39. Diserbo M, Fatome M, Verdetti J. Activation of Large Conductance Ca $^{2+}$-Activated K^+ channels in N1E- 115 Neuroblastoma Cells by Platelet-Activating Factor. Biochemical and Biophysical Research Communications 218:745-748 (1996).

40. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM: Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. Lab Invest 57:673-686 (1987)

41. Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing: N Engl J Med 315:1650-1658 (1986)

42. Esguerra M, Wang J, Foster CD, Adelman JP, North RA, and Levitan IB: Cloned Ca^{2+}-dependent K^+ channel modulated by a functionally associated protein kinase. Nature 369: 563-565 (1994).

43. Faehling M, Koch ED, Raithel J, Trischler G, Waltenberger J: Vascular endothelial growth factor-A activates Ca^{2+}- activated K^+ channels in human endothelial cells in culture. Int J Biochem Cell Biol 33:337-346 (2001)

44. Felder CC, Singer-Lahat D: Voltage-independent calcium-channels. Regulation by receptors and intracellular calcium stores. Biochem Pharmacol 48:1997-2004 (1994)

45. Ferrara N, Davis-smyth T: The bioloby of vascular endothelial growth factor. Endocrine Rev 18:4-25 (1997).

46. Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161:851-858 (1989)

47. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor. European Journal of Cancer 14:2413-2422 (1996).

48. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor. Trends Cardiovasc Med 3:244-250 (1993)

49. Fichtner H, Fröbe U, Busse R, and Kohlhardt M: Single nonselective cation channels and Ca^{2+}activated K^+ channels in aortic endothelial cells. J Membr Biol 98:125-133 (1987).

50. Fleming I, Fisslthaler B, and Busse R: Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. Circ Res 76:522-529 (1995).

51. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. Science 235:442-447 (1987)

52. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med. 1:27-31 (1995).

53. Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? J Natl Cancer Inst 82:4-6 (1991)

54. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalg DG, Werner S: Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. J Biol Chem 270:12607-12613 (1995)

55. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HAT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone D: Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nature Med 2:1096-1103 (1996)

56. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, and Garcia ML: Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion Buthus tamulus. J Biol Chem 265:11083-11090 (1990).

57. Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vazquez J, Kaczorowski GJ: Use of toxins to study potassium channels. J Bioenerg Biomembr 23:615-646 (1991)

58. Gárdos G: The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. Biochem Biophys Acta 30:653-654 (1958)

59. Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J: Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. J Cell Biol 60:673-684 (1974)

60. Gribkoff VK, Starrett JE, and Dworetzky SI: The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels. Adv Pharmacol 37:319-348 (1997).

61. Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD: Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression Levels, calcium dependence, ion selectivity and pharmacology, J Gen Physiol 102:601-630 (1993)

62. Groschner K, Graier WF, Kukovetz WR: Activation of a small-conductance Ca^{2+}-dependent K^{+} channel contributes to bradykinin-induced stimulation of nitric oxide synthesis in pig aortic endothelial cells. Biochem Biophys Acta 1137:162-170 (1992)

63. Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 269:3440-3450 (1985).

64. Guo D, Jia Q, Song H-Y, Warren RS, Donner DB: Vascular endothelial growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. J Biol Chem 270:6729-6733 (1995).

65. Gusovsky F, Lueders JE, Kohn EC, and Felder C: Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C-γ. J Biol Chem 268:7768-7772 (1993).

66. Haburcák M, Wei L, Viana F, Prenen J, Droogmans G, and Nilius B: Calcium-activated potassium channels in cultured endothelium are not directly modulated by nitric oxide. Cell Calcium 21:291-300 (1997).

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

68. Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW: Human Embryology. William & Wilkins, Baltimore (1962)

69. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Bonow RO: Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. Circulation 101:118-121 (2000)

70. Hille B: Ionic channels of exitable membranes. 2. Aufl, Sinauer Associates Inc. Sunderland, S. 122 (1992)

71. Holm NR, Christophersen P, Olesen SP, Gammeltoft S: Activation of calcium-dependent potassium channels in rat brain neurons by neurotropin-3 and nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 94:1002-1006 (1997)

72. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M: Rezidivstenose nach Koronarangioplastie. Z Kardiol 84:5-21 (1995)

73. Hood HF, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ: VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. Am J Physiol 274:1054-1058 (1998).

74. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 5:1806-1814 (1991)

75. Hoyer J, Distler A, Haase W, and Gögelein H: Ca^{2+} influx through stretch-activated cation channels activates maxi K^+ channels in porcine endocardial endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 91:2367-2377 (1994).

76. Hoyer LW, de Santos RP, Hoyer JR: Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microskopy. J Clin Invest 52:2737-2744 (1973)

77. Huang Y, Rane SG: Single channel study of a Ca^{2+}-activated K^+ current associated with ras-induced cell transformation. J Physiol 461:601-618 (1993)

78. Hupe DJ, Behrens ND, and Boltz R: Anti-proliferative activity of L-651,582 correlates with calcium-mediated regulation of nucleotide metabolism at phosphoribosyl pyrophosphate synthetase. J Cell Physiol 144:457-466 (1990).

79. Hupe JD, Boltz R, Cohen CJ, Felix J, Ham E, Miller D, Soderman D, and van Skiver D: The inhibition of receptor-mediated and voltage-dependent calcium entry by the antiproliferative L-651,582. J Biol Chem 266:10136-10142 (1991).

80. Isner JM: Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. Adv Drug Deliv Rev 30:185-197 (1998).

81. Isner JM: Angiogenesis: a "beakthrough" in cardiovascular medicine. J Invasive Cardiol: 12 Suppl A: 14a-7a (2000).

82. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, and Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 52:2745-2756 (1973).

83. Jaffe EA: Culture of human endothelial cells. Transplant Proc 12, Suppl 1:49-53 (1980)

84. Kamouchi M, Touet D, de Greef C, Droogmans G, Eggermont J, and Nilius B: Functional effects of expression of hslo Ca^{2+} activated K^+ channels in macrovascular endothelial cells. Cell Calcium 22:497-506 (1997).

85. Karamsetty MR, Wadsworth RM, Kane KA: Effect of K^+ channel blocking drugs and nitric oxide synthase inhibition in rat pulmonary artery rings. J Auton Pharmacol 18:49-56 (1998)

86. Keyt B, Berleau L, Nguyen H, Heinshon H, Chen H, Vandlen R, Ferrara N: The carboxyl-terminal domain (111-165) of VEGF is critical for mitogenic potency. J Biol Chem 271:7788-7795 (1996)

87. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HJ, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 362: 841-844 (1993)

88. Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, and Liotta LA: Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci USA 92:1307-1311 (1995).

89. Kohn EC, Liotta LA: Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. Cancer Res 55:1856-1862 (1995)

90. Kohn EC, Reed E, Sarosy G, Christian M, Link CJ, Cole K, Figg WD, Davis PA, Jacob J, Goldspiel B, and Liotta LA: Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. Cancer Res 56:569-573 (1996)

91. Kohn EC, Sandeen MA and Liotta LA: In vivo efficacy of a novel inhibitor of selected signal transduction pathways including calcium, arachidonate, and inositol phosphates. Cancer Res 52:3208-3212 (1992).

92. Kroll J, Waltenberger J: VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). Biochem Biophys Res Commun 252:743-746 (1998)

93. Kolb HA: Potassium channels in exitable and non-exitable cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol 115:51-91 (1990)

94. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock T: Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. Am J Physiol 265: 586-592 (1993)

95. Langton PD, Nelson MT, Huang Y, et al.: Block of calciu-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethyammonium ions. Am J Physiol 260:927-934 (1991)

96. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O: Varieties of Calcium-activated potassium channels. Annu Rev Physiol 51:385-399 (1989)

97. Latorre R, Vergara C, Hidalgo C: Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+}-dependent K^{+} channel from tranverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 77:7484-7486 (1982)

98. Lerche H, Fahlke Ch, Iaizzo PA, Lehmann-Horn F: Characterization of the high-conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channel in adult human skeletal muscle. Pflügers Arch – Eur J Physiol 429:738-747 (1995)

99. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309 (1989)

100. Levitzki A: Signal-transduction therapy: A novel approach to disease management. Eur J Biochem 226:1-13 (1994)

101. Li L, Bressler B, Prameya R, Dorovini-Zis K, Van Breemen C: Agonist stimulated calcium entry in primary cultures of human cerebral microvascular endothial cells. Microvasc-Res 57:211-226 (1999)

102. Ling BN, O´Neill WC: Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-permeable ion channels in aortic endothelial cells. Am J Physiol 263:1827-1838 (1992)

103. Lückhoff A, Busse R: Activators of potassium channels enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 342:94-99 (1990)

104. Lückhoff A, Busse R: Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by membrane potential. Pflügers Arch 416:305-311 (1990)

105. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA: Relation of neovascularization to metastasis of non small-cell lung carcinoma. Lancet 340:145-146 (1992)

106. Magleby KL, Palotta BS: Burst kinetics of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. J Physiol 344:605-623 (1983)

107. Magleby KL, Palotta BS: Calcium dependence of open and shut interval distributions from calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. J Physiol 344:585-604 (1983)

108. Magni M, Meldolesi J, and Pandiella A: Ionic events induced by epidermal growth factor. Evidence that hyperpolarization and stimulated cation influx play a role in the stimulation of cell growth. J Biol Chem 266:6329-6335 (1991).

109. Manabe K, Ito H, Matsuda H, Noma A, Shibata Y: Classification of ion channels in the luminal and abluminal membranes of guinea-pig endocardial endothelial cells. J Physiol 484:41-52 (1995)

110. Masiero L, Figg WD, and Kohn EC: New anti-angiogenesis agents: review of the clinical experience with carboxyamido-triazole (CAI), thalidomide, TNP-470 and interleukin-12. Angiogenesis 1:23-35 (1997).

111. McManus OB: Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. J Bioenerg Biomembr 23:537-560 (1991)

112. Meech RW: Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. Ann Rev Biophys Bioeng 7:1-18 (1987)

113. Methfessel C, Boheim G: The gating of single calcium-activated potassium channels is described by an activation/blockade mechanism. Biophys Struct Mech 9:35-60 (1982)

114. Millauer B, et al: Dominant negative inhibition of Flk-1 supresses the growth of many tumors in vivo. Cancer Res 56:1615-1620 (1996)

115. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 72:835-846 (1993)

116. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. Lab Invest 71:374-379 (1994)

117. Molenaar WH, Defize LHK, De Laat SW: Ionic signalling by growth factor receptors. J Exp Biol 124:359-373 (1986)

118. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, and Isner JM: Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest 101:2567-2578 (1998)

119. Neher E: Unit conductance studies in biological membranes. Techniques in cellular physiology 121:1-16 (1982)

120. Neylon CB, Avdonin PV, Larsen MA, and Bobik A: Rat aortic smooth muscle cells expressing charybdotoxin-sensitive potassium channels exhibit enhanced proliferative responses. Clin Exp Pharmacol Physiol 21:117-120 (1994)

121. Nicosia RF, Nicosia SY, Smith M: Vascular endothelial growth factor, platelet derived growth factor and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. Am J Pathol 145:1023-1029 (1994)

122. Nilius B, Riemann D: Ion channels in human endothelial cells. Gen Physiol Biophys 9:89-111 (1990)

123. Nilius B, Viana F, and Droogmans G: Ion channels in vascular endothelium. Ann Rev Physiol 59:145-170 (1997)

124. Palotta BS, Magleby K: Single channel recordings of Ca^{2+}-activated K^+ currents in rat muscle cell culture. Nature 293:471-474 (1981)

125. Papapetropaulos A, García-Cardena G, Madri JA, and Sessa WC: Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest 100:3131-3139 (1997)

126. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, and Sessa WC: Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest 100:3131-3139 (1997).

127. Parekh AB, and Penner R: Store depletion and calcium influx. Physiol Rev 77:901-930 (1997)

128. Partiseti M, Choquet D, Diu A, Korn H: Differential regulation voltage- and calcium-activated potassium channels in human B-lymphozytes. J Immunology 148:3361-3368 (1992)

129. Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Conolly D: Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. J Biol Chem 265:18051-18054 (1990)

130. Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS: Regulation of Ca^{2+}-activated K^+ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. J Appl Physiol 81:1264-1272 (1996)

131. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun 189:824-831 (1992)

132. Plate KH, Beier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature 359: 845-848 (1992)

133. Preston GA, Barrett JC, Biermann JA, Murphy E: Effects of alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression. Cancer Res 57:537-542 (1997)

134. Prevarskaya NB, Skryma RN, Vacher P, Daniel N, Djiane J, and Dufy B: Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. J Biol Chem 270:24292-24299 (1995).

135. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. Nature 386:671-674 (1997)

136. Roberts WG, Palade G: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci 108:2369-2379 (1995)

137. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT: cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. Am J Physiol 265:299-303 (1993)

138. Rodland KD, Wersto RP, Hobson S, Kohn EC: Thapsigargin-induced gene expression in non-exitablecells is dependent on calcium influx. Mol Endocrinol 11:281-291 (1997)

139. Ross R: The pathogenesis of atherosklerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362:801-809 (1993)

140. Ross R: The pathogenesis of atherosklerosis-an Update. N Engl J Med 314:488-500 (1986)

141. Rozengurt E: Early signal in the mitogenic response. Science 234:161-166 (1986)

142. Rusko J, Tanzi F, van Breemen C, Adams DJ: Calcium-Activated Potassiums channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca^{2+} sensitivity and block. J Physiol 455, 601-621 (1992)

143. Sakai T: Acetylcholine induces Ca^{2+}-dependent K^+ currents in rabbit endothelial cells. Jpn J Pharmacol 53:235-246 (1990)

144. Sauvé R, Chahine M, Tremblay J, Hamet P: Single-channel analysis of the electrical response of bovine aortic endothelial cells to bradykinin stimulation: contribution of a Ca^{2+}-dependent K^+ channnel. J Hypertension 8:193-201 (1990)

145. Sauvé R, Parnt L, Simoneau C, Roy G: External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K^+ channel in cultured bovine aortic endothelial cells. Pflügers Arch 412:469-481 (1988)

146. Schaper W, Ito WD: Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. Circ Res 79:911-919 (1996)

147. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, and Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219:983-985 (1983)

148. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359:843-845 (1992)

149. Singer JJ, Walsh JV: Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch clamp technique. Pflügers Arch 408:98-111 (1987)

150. Smits A, Herrmannsson M, Nistér M, Karnushina I, Helden C-H, Westermark B, Funa K: Rat capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. Growth Factors 2:1-8 (1989).

151. Soltoff SP, and Cantley LC: Mitogens and ion fluxes. Ann Rev Physiol 50:207-223 (1988).

152. Takahashi A, Yamaguchi H, Miyomato H: Change in K^+ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique. Am J Physiol 265:328-336 (1993)

153. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearny M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: J Clin Invest 93:662-670 (1994)

154. Tanigushi J, Furukawa KI, Shigekawa M: Maxi K+ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. Pflügers Arch 423:167-172 (1993)

155. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P: Identificationof the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor Biochm Biophys Res Commun 187:1579-1586 (1992)

156. Tilton RG, Chang KC, LeJeune WS, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR: Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:689-696 (1999)

157. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearny M, Esakof DD, Isner JM, Symes JF: Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. Hum Gene Ther 10:2953-60 (1999)

158. Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silve M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J: The human gene for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 266:11947-11954 (1991)

159. Toro L, Stefani E. Calcium Activated K^+ Channels: Metabolic Regulation. J Bioenerg Biomembr 23:561-576 (1991)

160. Vaca L, Licea A, Possani LD: Modulation of cell membrane potential in cultured vascular endothelium. Am J Physiol 270:819-824 (1996)

161. Vartanian RK, Weidner N: Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. Am J Pathol 144:1188-1194 (1994)

162. Vergara C, Latorre R: Kinetics of Ca^{2+}-activated K^+-channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca^{2+} and Ba^{2+} Blockade. J Gen Physiol 82:543-568 (1983)

163. Villaroel A, Alvarez O, Oberhauser A, et al. : Probing a Ca^{2+}-activated K^+ channel with quarternary ammonium ions. Pflügers Arch 413:118-126 (1988)

164. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. Circulation 93:1493-1495 (1996)

165. Wakui S, Furusato M, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshito I, Asano K , Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S: Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone metastasis: a morphometric study. J Pathol 186: 257-262 (1992)

166. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin C-H: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 269:26988-26995 (1994).

167. Waltenberger J: Modification of growth factor action. Implications for the treatment of cardiovascular diseases. Circulation 96:4083-4095 (1997).

168. Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, Haller H: The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:178-185 (1999)

169. Wiecha J, Reineker K, Reitmayer M, Voisard R, Hannekum A, Mattfeldt T, Waltenberger J, Hombach V: Modulation of Ca^{2+}- activated K^{+} channels in human vascular cells by insuline and basic fibroblast growth factor. Growth Horm IGF Res 8:175-181 (1998)

170. White RE, Lee AB, Shcherbatko AD, Lincoln TM, Schonbrunn A, and Armstrong DL: Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. Nature. 361:263-266 (1993)

171. Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ: Role of phospholipase C, proteinkinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. Am J Physiol 276:535-542 (1999)

172. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Keyt B, Rerrara N, Ross J, Jin H: Effect of VEGF on hemodynamics and cardiac performance. J Cardiovasc Pharmacol 27:838-844 (1996)

173. Yasui H, Butscher W, Caohen M Spriggs N, Wersto R, Kohn EC, Liotta L, and Gardner K: Selective inhibition of mitogen-induced transactivation of the HIV long terminal repeat by carboxyamidotriazole. Calcium influx blockade represses HIV-1 transcriptional activation. J Biol Chem 272:28762-28770 (1997)

174. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, and Bicknell R: Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor induced angiogenesis. J Clin Invest 99:2625-2634 (1997)

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Martin Faehling für die Unterstützung bei meiner Promotionsarbeit und die stets gewissenhafte Betreuung, sowohl über die Zeit der Experimente als auch darüber hinaus bedanken.

Frau Gerlinde Trischler danke ich für Ihre fachliche wie auch menschliche Hilfe im Labor, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Für die große Geduld und Unterstützung sowie den festen Glauben an mich danke ich Diana Anders.