

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Biomembranen	1
1.2	Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.5	2
1.3	Adrenerge Rezeptoren in der Regulation des Gefäßtonus	4
1.4	Zielsetzung	7
2	Methoden	9
2.1	Methoden der Zellkultur	9
2.2	Modifizierung des Cholesteringehalts	10
2.3	Bestimmung des Cholesteringehalts	10
2.4	Bestimmung des Proteingehalts	12
2.5	Elektrophysiologie	12
2.5.1	Messungen von Ganzzellströmen	12
2.5.2	Einzelkanalmessungen	15
2.6	Bestimmung der oberflächenbezogenen Kapazität	15
2.7	Untersuchungen der Gefäßfunktion	17
2.8	Versuchstiere	21
2.9	Mikroskopische Methoden	22
2.9.1	Immunfluoreszenz	22
2.9.2	Elektronenmikroskopie	23
2.9.3	TIRF-Mikroskopie	23
2.9.4	Wasser-Immersionmikroskopie	24
2.10	Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Die Bedeutung des Cholesteringehalts der Zellmembran für die Funktion des Kaliumkanals Kv1.5	25
3.1.1	Modifizierung des Cholesteringehalts	25
3.1.2	Mikroskopische Beurteilung der Zellmembran	26
3.1.3	Absoluter Kaliumstrom	28
3.1.4	Untersuchung der unspezifischen Membranleitfähigkeit	31
3.1.5	Einzelkanalmessungen	32

3.1.6	Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 4-Aminopyridin	33
3.1.7	Untersuchung des Umkehrpotentials	34
3.1.8	Untersuchung der Membrankapazitäten	36
3.2	Die Bedeutung von Caveolin-1 für die Funktion adrenerger Rezeptoren	39
3.2.1	Charakterisierung der murinen A. saphena	39
3.2.2	Untersuchung der Funktion der α -Adrenozeptoren	41
3.2.3	Untersuchung der Funktion der β -Adrenozeptoren	44
3.2.4	β_3 -Adrenozeptor vermittelte Relaxation	50
4	Diskussion	54
4.1	Methoden zur Untersuchung der Bedeutung von Caveolen	54
4.1.1	Zerstörung durch Cholesterinmangel	54
4.1.2	Verwendung von KO-Mäusen	56
4.2	Regulationsmechanismen in Caveolen	56
4.2.1	Regulation von Proteinen durch Bindung an Caveolin-1	56
4.2.2	Regulation von Ionenkanälen durch Lipide	57
4.3	Untersuchung des Kaliumkanals Kv1.5	58
4.3.1	Untersuchungen zur Membrankapazität	58
4.3.2	Charakterisierung der Kanaleigenschaften	58
4.3.3	Bedeutung von Caveolen für die Regulation von Kv1.5	59
4.4	Untersuchungen zur Regulation des Gefäßtonus in Caveolin-1 KO-Mäusen	60
4.4.1	Regulation des Gefäßtonus	61
4.4.2	Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	61
4.4.3	Untersuchung der α -Adrenozeptoren	62
4.4.4	Untersuchung der β -Adrenozeptoren	63
4.4.5	Regulation des Gefäßtonus in Cav-1 KO-Mäusen	65
5	Zusammenfassung	67
6	Anhang	68
6.1	Reagentien und Geräte	68
6.1.1	Chemikalien	68
6.1.2	Kits und gebrauchsfertige Lösungen	69
6.1.3	Geräte	70
6.2	ausgewählte Strukturformeln	71
6.3	Abkürzungsverzeichnis	73
6.4	Eigenständigkeitserklärung	76
6.5	Publikationsliste	77
6.6	Danksagung	78

Abbildungsverzeichnis

1.1	Verschiedene Bereiche innerhalb der Zellmembran. links: Lipid Raft; Mitte: Membrangebiet mit durchschnittlichem Lipidgehalt; rechts: Caveola. Abb. in Anlehnung an [63]	2
1.2	Spannungsabhängiger Kaliumkanal. links: Schema einer α - (blau) und einer β -Untereinheit (rot); rechts: funktionsfähiger Kanal, Heteromer aus α - und β -Untereinheiten. Abb. in Anlehnung an [1]	3
1.3	Regulation des Muskeltonus in Gefäßmuskelzellen. Weitere Erklärungen im Text	6
2.1	Reaktionsgleichung für die Bestimmung des Cholesteringehalts	11
2.2	Pulsprotokolle für den Standard-Messpuls (links), Strom-Spannungskennlinien (Mitte) und das Umkehrpotential (rechts)	14
2.3	Prinzip der oberflächenbezogenen Membrankapazität. links: Kugel, 1 cm^2 der Kugeloberfläche entspricht 1 cm^2 Membranfläche; rechts: Zelle mit Membraneinstülpungen, 1 cm^2 der Kugeloberfläche entspricht mehr als 1 cm^2 Membranfläche	16
2.4	Draht-Myograph nach Mulvany: Das Gefäß wird zwischen zwei Drähten aufgespannt, die Untersuchungen finden unter isometrischen Bedingungen statt	18
2.5	Normalisierung: Der Schnittpunkt der passiven Dehnungskurve (schwarz) mit der Isobaren (rot) gibt den inneren Umfang an, bei dem das Experiment durchgeführt werden muss	19
2.6	Originalregistrierung eines Versuchs zur Relaxation über β -AR.	22
3.1	Cholesteringehalt der Zellmembranen bezogen auf den Gehalt der Membranen von Kontrollzellen	25
3.2	Lokalisation von Cav-1 in der Zellmembran. links: M β CD-behandelte Zellen, Mitte: Kontrollzellen, rechts: Cholesterin-beladene Zellen. oben: Tageslicht, unten: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Pfeile: ungleichmäßige Verteilung von Cav-1 innerhalb der Membran	26
3.3	Betrachtung von Caveolen mit der TIRF-Mikroskopie. links: Kontrollzellen, rechts: M β CD-behandelte Zellen	27

3.4	Originalregistrierungen des Kaliumstromes: Aktivierungspotentiale von -70 bis $+70$ mV	29
3.5	Charakterisierung des Stroms durch Kv1.5-Kanäle. oben links: Strom bei $+50$ mV, oben rechts: Strom-Spannungs-Kennlinien, unten: Aktivierungskurven	30
3.6	Originalregistrierungen des Kaliumstromes in Negativkontrollzellen: Aktivierungspotentiale von -70 bis $+70$ mV; links: Kontrollbedingungen; rechts: nach Cholesterinentzug. Keine der Zellen weist einen Kaliumstrom auf.	31
3.7	Untersuchung der Einzelkanalaktivität von Kv1.5. links: Strom-Spannungs-Kennlinien, rechts: Originalregistrierungen des Stroms von Kontrollzellen (oben) und M β CD-behandelten Zellen	32
3.8	Blockade des Kaliumstroms mit 4-AP. Originalregistrierungen einer M β CD-behandelten Zelle (oben links), einer Kontrollzelle (oben rechts) und einer Zelle nach Beladen mit Cholesterin (unten). Jeweils Strom bei $+50$ mV vor (schwarz) und nach Zugabe von $0,3$ mM 4-AP (rot)	33
3.9	Blockade des Kaliumstroms mit 4-AP. Konzentrations-Wirkungskurven für Kontrollzellen (schwarz), M β CD-behandelte Zellen (rot) und Cholesterin-beladene Zellen (blau)	34
3.10	Umkehrpotentiale der Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration der Badlösung	35
3.11	Untersuchung der Membrankapazitäten: links: Kapazität der gesamten Zellen, rechts: oberflächenbezogene Membrankapazität unter isotonen (300 mOsm) und stark hypotonen Bedingungen (100 mOsm)	37
3.12	Normalisierung des absoluten Stromes auf die Kugeloberfläche der Membran, berechnet aus dem Radius der Zellen.	38
3.13	Elektronenmikroskopische Aufnahmen glatter Gefäßmuskelzellen der A. saphena von WT- (links) und Cav-1 KO-Mäusen: Pfeile weisen auf Caveolen	39
3.14	Dicke der Gefäßwände der A. saphena von WT- (rot) und Cav-1 KO-Mäusen (orange). Die Gefäße der KO-Tiere sind hypertroph.	40
3.15	Vordehnungs-Antwort-Kurven an einem Gefäß einer WT- (links) und einer KO-Maus (rechts). oben: Messwerte, unten: aktive Antwort des Gefäßes.	41
3.16	Konzentrations-Wirkungskurven für Noradrenalin an Aa. saphenae von WT- (rot) und Cav-1 KO-Mäusen (orange) in Anwesenheit von 1 μ M Propranolol und 3 μ M Cocain. links: Kontrollbedingungen, rechts: in Anwesenheit von 1 μ M Prazosin. Kurven bei höheren als den untersuchten Konzentrationen wurden extrapoliert.	42

3.17	oben: Wandspannung der Arterien von WT- (rot) und KO-Mäusen (orange) unter Kontrollbedingungen, nach Gabe von $10\mu\text{M}$ NA, in Anwesenheit von $3\mu\text{M}$ Cocain und nach Waschen mit Cocain-haltiger Badlösung. unten: Effekt von $1\mu\text{M}$ Prazosin. Die Arterien der KO-Tiere relaxieren, an denen der WT-Tiere tritt dieser Effekt nicht auf.	43
3.18	Wandspannung bei 60mM KCl vor und nach Gabe von $30\mu\text{M}$ SNP: rot: Gefäße der WT-Tiere, orange: Gefäße der Cav-1 KO-Mäuse	44
3.19	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von WT- (gefüllte Quadrate) und Cav-1 KO-Mäusen (offene Quadrate): KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen. links: Darstellung der absoluten Messwerte, rechts: Relaxation in Prozent (Wandspannung nach Gabe von SNP \equiv 100% Relaxation)	45
3.20	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von WT-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei Blockade der β_1 -AR (rot) und bei Blockade der β_2 -AR (blau). Darstellung wie in Abb. 3.19	46
3.21	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von WT-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei kombinierter Blockade der β_1 - und β_2 -AR (grün) sowie bei Blockade aller β -AR (orange). Darstellung wie in Abb. 3.19	46
3.22	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von Cav-1 KO-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei Blockade der β_1 -AR (rot) und bei Blockade der β_2 -AR (blau). Darstellung wie in Abb. 3.19	49
3.23	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von Cav-1 KO-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei kombinierter Blockade der β_1 - und β_2 -AR (grün) sowie bei Blockade aller β -AR (orange). Darstellung wie in Abb. 3.19	49
3.24	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von WT-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei kombinierter Blockade der β_1 - und β_2 -AR (grün) sowie bei Blockade der β_3 -AR (violett). Darstellung wie in Abb. 3.19	51
3.25	β -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von Cav-1 KO-Mäusen: KWK für Isoprenalin unter Kontrollbedingungen (schwarz), bei kombinierter Blockade der β_1 - und β_2 -AR (grün) sowie bei Blockade der β_3 -AR (violett). Darstellung wie in Abb. 3.19	51
3.26	β_3 -AR-vermittelte Vasodilatation an Gefäßen von WT- (gefüllte Quadrate) und Cav-1 KO-Mäusen (offene Quadrate): KWK für BRL 37344 unter Kontrollbedingungen (blau) sowie bei Blockade der β_3 -AR (rot). Darstellung wie in Abb. 3.19	52