

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Nephrologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Joachim Hoyer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Untersuchung zur
pharmakologischen Aktivierung
arterieller $K_{Ca}3.1$ -Kanäle
durch
SKA-31

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-
Universität Marburg vorgelegt von
Tim Schultz (aus Lübeck)
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Ralf Köhler

1. Korreferent: Prof. Dr. Tim Plant

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Epidemiologie der arteriellen Hypertonie	10
1.2 Das Endothel	10
1.3 Endotheliale Vasodilatation	11
1.4 Stickstoffmonoxid (NO)	11
1.5 Prostazyklin (PGI₂)	12
1.6 EDHF	13
1.6.1 Membranpotenzial und Ionenkanäle des Endothels	16
1.6.2 Kaliumkanäle	17
1.7 Ca²⁺-sensitive K⁺-Kanäle (K_{CA})	17
1.7.1 K _{CA} 2.3 Kanal	19
1.7.2 K _{CA} 3.1 Kanal	20
1.7.3 Pharmakologische Beeinflussung von K _{CA} 2.3- und K _{CA} 3.1-Kanälen	22
1.7.3.1 Inhibierung	22
1.7.3.2 Aktivierung	22
2 Fragestellung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Chemikalien und Geräte	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Geräte	28
3.2 Tierhaltung, Tierzucht, Genotypisierung	29
3.2.1 Tierhaltung und Tierzucht	29
3.2.2 Genotypisierung der transgenen Mäuse	29
3.3 Experimente	31
3.3.1 Versuchsvorbereitung, Präparation der Tiere	31

3.3.2	Versuche am Druckmyographen	32
3.3.2.1	Versuchsaufbau	32
3.3.2.2	Versuchsablauf	33
3.4	Datenaufzeichnung	35
3.5	Lösungen	35
3.6	Datenauswertung	35
3.7	Statistische Analysen	36
3.8	Statistikprogramm	36
4	<i>Ergebnisse</i>	37
4.1	Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31	37
4.2	Induktion der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31:	44
4.3	Einfluss von SKA-31 auf die glattmuskuläre Funktion:	45
4.4	Reagibilitätsbereich der Versuchsgefäße	50
5	<i>Diskussion</i>	51
5.1	Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31	51
5.2	Induzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31	53
5.3	Einfluss von SKA-31 auf die glattmuskuläre Funktion	53
5.4	Pharmakologische Bedeutung von SKA-31:	54
5.5	Ausblick	55
	<i>Literaturverzeichnis</i>	56
	<i>Lebenslauf</i>	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer (Lübeck)</i>	67
	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer (Marburg)</i>	68
	<i>Danksagung</i>	69
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>

Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie spielt eine herausragende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen. Die für die Schädigung verantwortliche Höhe des Blutdrucks ist entscheidend vom totalen peripheren Widerstand des Gefäßsystems abhängig. Dieser wird hauptsächlich durch den Durchmesser der kleinen Arteriolen bestimmt.

Das Endothel nimmt mit Hilfe verschiedener Systeme Einfluss auf den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur. Neben der Synthese von Stickstoffmonoxid (No) und Prostazyklinen (PGI₂) scheint besonders die Übertragung einer Hyperpolarisation vom Endothel auf die glatte Muskulatur zur Induktion einer Relaxation der Widerstandsgefäße zu führen. Bei dieser noch nicht gänzlich verstandenen EDHF-Antwort bedingen sehr wahrscheinlich die calciumabhängigen Kaliumkanäle K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3 die initiale Hyperpolarisation des Endothels. In Patch-Clamp Untersuchungen, die von Sankaranarayanan et al. durchgeführt wurden, war das neu synthetisierte Riluzole-Derivat SKA-31 in der Lage den K_{Ca}3.1 Kanal mit einer EC₅₀ von 250 nM und den K_{Ca}2.3 Kanal mit einer EC₅₀ im unteren mikromolaren Bereich selektiv zu öffnen. Weiterhin zeigte sich nur ein geringer Einfluss auf andere Kanäle.

Ziel dieser Dissertation war es zu überprüfen, ob es mit SKA-31 möglich ist, durch selektive pharmakologische Modulation dieser Kanäle, die EDHF-Signalgebung zu verstärken und damit Vasodilatationsprozesse zu verbessern. Die Versuche wurden am Druckmyographen unter möglichst physiologischen Bedingungen an Arteriae carotis communis von K_{Ca}3.1 Wildtyp- und Knockoutmäusen durchgeführt. Die benötigten Tiere wurden im Rahmen der Dissertation gezüchtet und genotypisiert.

Die Untersuchungen der Gefäße zeigten, dass SKA-31 bei Anwesenheit des Kanals in der Lage ist mit einer EC₅₀ von 93 nmol/L die Vasodilatation signifikant zu potenzieren. Weiterhin war besonders eine Verstärkung der niedrigen, zur Vasodilatation verwendeten, Acetylcholin-Konzentrationen möglich. Ein Einfluss auf das Kontraktionsverhalten konnte nicht festgestellt werden, so dass von geringen Effekten an anderen Kanälen ausgegangen werden kann. Ebenfalls führte die alleinige Gabe der Substanz zu keiner Vasodilatation, was darauf hindeutet, dass SKA-31 den K_{Ca} 3.1 Kanal nicht öffnet, sondern viel mehr eine Schließung verhindert.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass SKA-31 in der Lage ist selektiv die EDHF-Antwort zu potenzieren.

In parallel zu dieser Dissertationsarbeit durchgeführten telemetrischen Blutdruckmessungen wurde festgestellt, dass bei Anwesenheit des Kanals ein signifikanter blutdrucksenkender Effekt durch SKA-31 unter normotensiven und hypertensiven Bedingungen erzielt werden kann. Es konnten keine negativen Effekte wie Toxizität oder eine Steigerung der Herzfrequenz festgestellt werden. Insgesamt zeigen die vorliegenden Befunde, dass SKA-31 über seine potenzierende Wirkung auf EDHF-vermittelte Vasodilatationsprozesse ein neues endothelspezifisches Antihypertensivum darstellen könnte.

Summary

Arterial hypertension plays an important role in the progress of cardiovascular disorders. The pressure level is directly addicted to the total peripheral resistance, which is determined by the diameter of the small arterioles.

The endothelium controls vascular tone by different pathways. But not only releasing nitric oxide (NO) and prostacyclin dilate the underlying smooth muscle cells. Also the hyperpolarization of the endothelium causes a hyperpolarization and relaxation. This endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) is not completely understood but the small-conductance calcium-activated channels $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ play an important role in the hyperpolarisation of the endothelium. Sankaranarayanan et al. demonstrate in electrophysiological patch-clamp studies that the Riluzole derivative SKA-31 is able to open $K_{Ca3.1}$ channels with an EC_{50} of 250 nM and the $K_{Ca2.3}$ channel with an EC_{50} in the low micromolar range.

This dissertation has the aim to investigate the pharmacological potency of SKA-31 in matters of amplifying the EDHF-answer. The studies were accomplished with Arteriae carotis communis and a pressure myographe system under physiological conditions. The needed $K_{Ca3.1}$ wildtype and knockout mice were reared and genotyped.

SKA-31 potentiated the endothelium-derived-hyperpolarizing-factor-mediated-dilation with an EC_{50} of 93 nmol/L. It also reduced the need concentration of acetylcholine, but the contraction behaviour was not affected by SKA-31. The sole injection showed no dilation effect, so it seems possible that SKA-31 inhibits the closing of $K_{Ca3.1}$. Parllel organized experiments showed that SKA-31 is able to lower blood pressure in normtensiv and hypertensive mice and had no effect to the heart rate or toxic attributes.

In summary SKA-31 shows the potential to be a new drug in the treatment of hypertension.

Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_i$	<i>Intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration</i>
<i>A.c.c.</i>	<i>Arteria carotis communis</i>
<i>ACh</i>	<i>Azetylcholin</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
Ba^{2+}	<i>Barium</i>
<i>bFGF</i>	<i>Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)</i>
Ca^{2+}	<i>Calcium</i>
$CaCl_2$	<i>Calciumchlorid</i>
<i>CaM</i>	<i>Calmodulin</i>
<i>CaMBD</i>	<i>Calmodulin-Bindungsdomäne</i>
<i>cGMP</i>	<i>cyclisches Guanosinmonophosphat</i>
<i>COX</i>	<i>Zyklooxygenase</i>
<i>DC-EBIO</i>	<i>5,6-Dichloro-1-Ethyl-2-benzimidazolon</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Desoxynukleosidtriphosphate</i>
<i>EBIO</i>	<i>1-Ethyl-2-benzimidazolon</i>
EC_{50}	<i>halbmaximale Effektivkonzentration</i>
<i>EET</i>	<i>Epoxyeicosatriensäure (epoxyeicosatrienoic acid)</i>
<i>EDHF</i>	<i>endothelialer hyperpolarisierender Faktor (endothelium derived hyperpolarizing factor)</i>
Ω	<i>Ohm</i>
<i>GTP</i>	<i>Guanosintriphosphat</i>
<i>IK-Kanäle</i>	<i>calciumsensitive Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (intermediate conductance potassium channels)</i>
IP_3	<i>Inositoltrisphosphat</i>
K^+	<i>Kalium</i>
<i>KCl</i>	<i>Kaliumchlorid</i>
K_{2P}	<i>zwei Porendomänen Kaliumkanäle</i>
K_{ATP}	<i>ATP-sensitive Kaliumkanäle (ATP sensitive potassium channels)</i>

Abkürzungsverzeichnis

K_{Ca}	<i>calciumsensitive Kaliumkanäle (calcium activated potassium channels)</i>
K_{IR}	<i>einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle (inward rectifier potassium channels)</i>
K_V	<i>spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage dependent potassium channels)</i>
$KO^{-/-}$	<i>Knock-out</i>
<i>L-MMA</i>	<i>L-Ng-Mono-Methyl-Arginin</i>
<i>L-NNA</i>	<i>N^G-Nitro-L-Arginin</i>
<i>MAP</i>	<i>mittlere arterielle Blutdruck</i>
Mg^{2+}	<i>Magnesium</i>
$MgCl_2$	<i>Magnesiumchlorid</i>
$MgSO_4$	<i>Magnesiumsulfat</i>
<i>mmHg</i>	<i>Torr (Millimeter-Quecksilbersäule)</i>
<i>mol/L</i>	<i>Molar</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)</i>
<i>n</i>	<i>Versuchszahl</i>
Na^+	<i>Natrium</i>
<i>NaCl</i>	<i>Natriumchlorid</i>
NaH_2PO_4	<i>Natriumdihydrogenphosphat</i>
<i>NaOH</i>	<i>Natriumhydroxid</i>
<i>NO</i>	<i>Stickstoffmonoxid, EDRF (endothelium derived relaxing factor)</i>
<i>NOS</i>	<i>Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
<i>NSCs</i>	<i>nicht selektive Kation Kanäle (nonselective cation channels)</i>
<i>p</i>	<i>Wahrscheinlichkeit</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)</i>
<i>PE</i>	<i>Phenylephrin</i>
PGI_2	<i>Prostazyklin</i>
<i>S</i>	<i>Sievert</i>
<i>SKA-31</i>	<i>Naphtho[1,2-a]thiazol-2-ylamine</i>
<i>Sk-Kanäle</i>	<i>calciumsensitive Kaliumkanäle geringer Leitfähigkeit (small conductance potassium channels)</i>

Abkürzungsverzeichnis

<i>SNP</i>	<i>Sodium Nitro Prussid</i>
<i>SOCs</i>	<i>durch Speicher aktivierte Kanäle (store operated calcium channels)</i>
<i>TRPs</i>	<i>transient rezeptoraktivierte Kanäle (transient receptor potential channels)</i>
<i>V</i>	<i>Volt</i>
<i>VEGF</i>	<i>endothelialer Gefäß Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)</i>
<i>VRACs</i>	<i>volumenregulierte Anion Kanäle (volume regulated anion channels)</i>
<i>WT^{+/+}</i>	<i>Wildtyp</i>

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Untereinheiten von K_{Ca} -Kanälen. Untereinheit aus sechs Transmembranuntereinheiten (S1–S6) und einer Kanalpore (P). _____ 17
- Abbildung 2: Phylogenetische Stammbaum der Ca^{2+} sensitiven K^+ -Kanäle _____ 18
- Abbildung 3: Darstellung der chemischen Struktur von SKA-31 und Riluzole. _____ 23
- Abbildung 4: Genotypisierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals mit Hilfe der PCR. _____ 30
- Abbildung 5: Beispiel für die Multiplex PCR der Versuchstiere. _____ 31
- Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus des Druckmyographen. _____ 33
- Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit der Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31. Die Vasodilatation wurde durch Acetylcholin (100 nmol/L) induziert und an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Wildtyp- ($n=7$) und Knockoutmäusen ($n=6$) in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L) durchgeführt. _____ 38
- Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermitteln Vasodilatation, bei permanenter An- ($n=10$) bzw. Abwesenheit ($n=7$) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Wildtypmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * $p < 0,05$ _____ 40
- Abbildung 9: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermitteln Vasodilatation, bei permanenter An- ($n=5$) bzw. Abwesenheit ($n=4$) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Knockoutmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * $p < 0,05$ _____ 41
- Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermitteln Vasodilatation, bei permanenter Anwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Wildtyp- ($n=10$) und Knockoutmäusen ($n=5$) in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * $p < 0,05$ _____ 42
- Abbildung 11: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermitteln Vasodilatation, bei permanenter Abwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Wildtyp- ($n=7$) und

- Knockoutmäusen (n=4) in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L). * p<0,05* _____ 43
- Abbildung 12: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- (n=10) bzw. Abwesenheit (n=7) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von K_{Ca}3.1 Wildtypmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 45
- Abbildung 13: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- (n=5) bzw. Abwesenheit (n=4) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von K_{Ca}3.1 Knockoutmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 46
- Abbildung 14: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- bzw. Abwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von K_{Ca}3.1 Wildtyp- (n=15) und Knockoutmäusen (n=11) in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 47
- Abbildung 15: Darstellung der maximalen, durch SNP induzierten, Vasodilatation und der maximalen, durch K 60 induzierten, Vasokonstriktion. Durchgeführt an A.c.c. von K_{Ca}3.1 Wildtypmäusen bei An- (n=10) bzw. Abwesenheit (n=7) von SKA-31 (200 nmol/L), in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 48
- Abbildung 16: Darstellung der maximalen, durch SNP induzierten, Vasodilatation und der maximalen, durch K 60 induzierten, Vasokonstriktion. Durchgeführt an A.c.c. von K_{Ca}3.1 Knockoutmäusen bei An- (n=5) und Abwesenheit (n=4) von SKA-31 (200 nmol/L), in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 49
- Abbildung 17: Darstellung des Gefäßreagibilitätsbereichs der A.c.c. von Wildtyp- (n=15) und Knockoutmäusen (n=11). Durchgeführt in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/) und Indomethazin (10 µmol/L).* _____ 50

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Hersteller</i>	28
<i>Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller</i>	28
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung der Standardbadlösung (PSS) sowie der KCl-Pufferlösung Alle Angaben in mmol/L</i>	35

1 Einleitung

1.1 *Epidemiologie der arteriellen Hypertonie*

Der Bluthochdruck spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Im Jahr 2000 waren ca. 972 Millionen Menschen weltweit von einer arteriellen Hypertonie betroffen. Dieses entspricht ca. 26% der erwachsenen Bevölkerung (Kearney et al. 2005). Derzeit werden lediglich 10-30% der Erkrankten befriedigend behandelt (Wolf-Maier et al. 2004). Eine Metaanalyse mit 61 prospektiven Studien konnte zeigen, dass bereits die Senkung des systolischen Blutdrucks um 2 mmHg die Schlaganfall-Sterblichkeit um 10% und das Risiko für eine koronare Herzkrankheit um 7% verringert (Lewington et al. 2002). Aus diesem Grund ist es wichtig, dass ein Hauptaugenmerk der modernen medizinischen Forschung auf dem Verständnis und der pharmakologischen Beeinflussung der Blutdruckregulation liegt.

1.2 *Das Endothel*

Als Endothel wird die einschichtige innere Grenzschicht der Blutgefäße bezeichnet. Das Endothel ist nicht nur eine bloße Trennschicht zwischen Blut und Gewebe sondern besitzt viel mehr eine Reihe wichtiger Funktionen. So reguliert es den Stoffaustausch, moduliert immunologische und inflammatorische Prozesse und besitzt eine entscheidende Rolle beim Ablauf der Blutgerinnung und der Angiogenese. Weiterhin steuert es den totalen peripheren Widerstand, in dem es den Kontraktionszustand der darunter liegenden glatten Gefäßmuskulatur reguliert. Auf diese Weise bildet es zusammen mit der Herzauswurfleistung und neuronal sympathetischer Aktivität eine Haupteinflussgröße des Blutdrucks und ist dafür mitverantwortlich, dass das Gewebe sauer- und nährstoffreiches Blut erhält.

Funktionseinschränkungen dieses Systems, die so genannte endotheliale Dysfunktion, führen häufig zu kardiovaskulären Erkrankungen.

1.3 Endotheliale Vasodilatation

Das Endothel induziert durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO, EDRF (endothelium derived relaxing factor)) und Prostacyclin (PGI_2) eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Furchgott & Zawadzki 1980, Moncada & Vane 1981, Pohl et al. 1986). Im Jahr 1982 wurde bereits gezeigt, dass ein weiterer Faktor, der durch eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Vasodilatation führt, existieren muss (De Mey et al. 1982). Er wurde zunächst als EDHF (endothelium derived hyperpolarising Factor) bezeichnet. Bisher konnte die genaue molekulare Natur der EDHF-vermittelten Vasodilatation nicht abschließend geklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei nicht um ein einzelnes Molekül, sondern vielmehr um eine Interaktion komplexer chemischer und elektrotonischer Vorgänge (Busse et al. 2002, Feletou & Vanhoutte 2006).

Im Weiteren soll nun auf die zur Vasodilatation führenden endothelialen Faktoren eingegangen werden.

1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Im Jahr 1980 wurde durch Robert Furchgott gezeigt, dass ein schnelllebiger und vom Endothel synthetisierter Faktor zur Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur führt. Der nach Stimulation durch Azetylcholin freigesetzte Stoff wurde zunächst als EDRF (endothelium derived relaxing factor) bezeichnet (Furchgott & Zawadzki 1980). Sieben Jahre später konnte gezeigt werden, dass es sich um das Gas Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro et al. 1987). Zur Freisetzung kommt es durch eine Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Endothel, die über den Ca^{2+} -Sensor Calmodulin zu einer Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) führt (Bredt et al. 1990). Sie bildet aus der Aminosäure L-Arginin die Produkte NO und L-Citrullin (Palmer et al. 1988). In der glatten Gefäßmuskelzelle bindet das Stickstoffmonoxid an die lösliche Guanylatzyklase und steigert die Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieses aktiviert cGMP-sensitive Proteinkinasen, deren Aktivität letztlich zu einem Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen. Auf diese Weise kommt es zu einer Reduktion der Aktivität der Myosin leichten Kettenkinase, was eine Relaxation der

kontraktilen Filamente Aktin und Myosin zur Folge hat (Carvajal et al. 2000, Rapoport et al. 1983).

Durch L-Arginin-Analoga (z.B. L-Ng-Mono-Methyl-Arginin, L-MMA) ist eine kompetitive Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase möglich. Diese Hemmung bewirkt eine Steigerung des Gefäßtonuses und des systemischen Blutdrucks (Rees et al. 1990).

Möglicherweise interagiert NO auch cGMP-unabhängig mit den Kaliumkanälen K_{ATP} , BK_{Ca} , K_{IR} und K_V und beeinflusst so direkt das Membranpotential der Myozyten (Feletou & Vanhoutte 2006).

1.5 Prostazyklin (PGI_2)

Bei der Prostazyklinsynthese wird zunächst durch die Ca^{2+} -abhängige Phospholipase A_2 Arachidonsäure aus Membranphospholipiden freigesetzt. Diese vierfach ungesättigten Fettsäuren dienen als Ausgangssubstanz für die durch die membrangebundene Zyklooxygenase (Cox) katalysierte Synthese der Prostazykline (Moncada & Vane 1981). Es sind zwei Isoformen dieses Enzyms bekannt. Die als Cox-1 bezeichnete Variante ist unter physiologischen Bedingungen vorhanden und im gesunden Gewebe aktiv. Die Cox-2 wird durch inflammatorische Prozesse aktiviert und synthetisiert Entzündungsmediatoren (Smith 1992).

In der glatten Gefäßmuskelzelle aktiviert Prostazyklin die Adenylatcyclase, die die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Der second-Messenger cAMP aktiviert wiederum Proteinkinasen, die analog zu cGMP regulierten Kinasen eine Relaxation des kontraktilen Apparats bewirken (Silbernagel S. et al. 2005).

Eine Hemmung der Zyklooxygenase ist durch nicht steroidale Antirheumatika (z.B. Indomethazin) möglich. Es findet sich jedoch kein Effekt auf den systemischen Blutdruck (Richard et al. 1990). Dies deutet daraufhin, dass Prostazykline besonders in der lokalen Vasodilatation, zum Beispiel bei Entzündungen, eine Rolle spielen.

1.6 EDHF

Die Feststellung, dass durch die vom Endothel synthetisierten Substanzen Stickstoffmonoxid und Prostazyklin eine Tonusabnahme der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt wird, war eine entscheidende Erkenntnis im Verständnis der vaskulären Regulation.

Es zeigte sich jedoch, dass trotz Blockade der NO-Synthase und der Zyklooxygenase eine durch das Endothel vermittelte Tonusabnahme der glatten Gefäßmuskulatur möglich ist. So wurde folglich postuliert, dass ein dritter endothelialer vasodilatierender Faktor vorhanden sein muss. Da die nicht NO und nicht PGI₂ medierte Vasodilatation mit einer Hyperpolarisation verbunden war, wurde der Faktor als „Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor“ (EDHF) bezeichnet (Feletou & Vanhoutte 1988).

Die sog. EDHF-vermittelte Vasodilatation ist besonders in kleinen Gefäßen ausgeprägt. In Arterien mit einem Durchmesser von unter 500 µm sind ca. fünfzig Prozent der Vasodilatation durch eine EDHF-Antwort vermittelt. In den Widerstandsgefäßen, den Arteriolen (< 100 µm), scheint sie sogar hauptsächlich für die Dilatation verantwortlich zu sein (Shimokawa et al. 1996).

Jedoch konnte trotz intensiver Forschung nicht eine einzelne Substanz identifiziert werden, die für dieses Phänomen verantwortlich ist. Es scheinen wohl vielmehr verschiedene voneinander unabhängige und auch interagierende diffusible Faktoren und Signaltransduktionssysteme zu existieren (Feletou & Vanhoutte 2006).

Im Folgenden werden die einzelnen Konzepte genauer vorgestellt und erläutert.

Einigkeit besteht darin, dass es sich bei dem einleitenden Schritt der EDHF-Antwort um einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i im Endothel handelt (Nilius & Droogmans 2001). Durch Agonisten (z.B. Azetylcholin) kommt es in den Endothelzellen zu einer G-Protein gekoppelten Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Johns et al. 1988, Cheung & Chen 1992, Fukao et al. 1995).

Ein weiterer Konsens besteht darin, dass eine endotheliale Hyperpolarisation notwendig ist, um die glatte Gefäßmuskulatur zu hyperpolarisieren.

Wahrscheinlich kommt es durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i zu einer Öffnung von Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanälen,

wodurch K^+ aus der Zelle strömt und sie hyperpolarisiert. Vieles deutet darauf hin, dass es sich bei den Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen um die Kanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ handelt (Köhler & Hoyer 2007). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Blockade von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ durch Inhibitorkombinationen (z.B. Charybdotoxin ($K_{Ca3.1}$) und Apamin ($K_{Ca2.3}$)) zu einer Hemmung der EDHF Antwort führt. Der ebenfalls in Gefäßen vorkommende Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanal $K_{Ca1.1}$ scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da eine spezifische Blockade durch Iberiotoxin zu keiner deutlichen Reduktion der EDHF-Antwort führt (Busse et al. 2002, Feletou & Vanhoutte 2006, Bychkov et al. 2002, Eichler et al. 2003, Köhler et al. 2001, Eichler et al. 2003).

Die nachgeschaltete Hyperpolarisierung der Muskelzellen senkt die Offenwahrscheinlichkeit von spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanälen (L-Typ-Kanälen) und induziert auf diese Weise ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wodurch die Calcium/Calmodulin-regulierte Myosinleichtkettenkinase inaktiviert wird und die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert (del Valle-Rodriguez et al. 2003, Itoh et al. 1992).

Es besteht jedoch Uneinigkeit darüber, wie die Hyperpolarisation der Endothelzellen auf die Muskelzellen fortgeleitet wird. Hierzu werden mehrere Erklärungsansätze diskutiert:

Eine Hypothese ist, dass eine direkte elektrische Kopplung zwischen Endothel und Muskelzellen durch so genannte myoendotheliale Gap Junctions besteht. Die übertragene Hyperpolarisation würde direkt zur Schließung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen führen und die Relaxation der Gefäßmuskelzellen induzieren. Hierfür spricht, dass dieser elektrotonische Kopplungsmechanismus in Gefäßen vieler verschiedener Spezies nachgewiesen werden konnte (Feletou & Vanhoutte 2006, Griffith 2004). Gap Junctions sind aus zwei Connexonen aufgebaut, die wiederum jeweils aus sechs Connexinen bestehen. Sie bilden einen Kanal, der eine direkte elektrische Kopplung zwischen zwei Zellen ermöglicht. Im Gefäßendothel wurden besonders häufig die Connexine 37 und 40 gefunden, in den glatten Muskelzellen scheint Connexin 43 zu überwiegen (Yeh et al. 1998).

Weitere Experimente zeigten, dass eine pharmakologische Blockade der Gap Junctions zu einer Abnahme oder kompletten Verhinderung der EDHF-Antwort führte. Weiterhin zeigten Mäuse, deren Gen für das Connexin 40 deletiert wurde, einen Bluthochdruck, der auf eine entgleiste Renin-Aktivität zurückzuführen ist (Wagner et al. 2007). Die EDHF vermittelte Antwort war hier jedoch in der Mikrozirkulation nicht gestört, was eine Beteiligung von Gap Junctions an der EDHF-vermittelten Vasodilatation in Zweifel zieht (Taylor et al. 1998, de Wit et al. 2000, de Wit et al. 2003, Griffith 2004, Kruger et al. 2002).

Eine weitere Theorie beschreibt die direkte Wirkung von K^+ -Ionen an der glatten Gefäßmuskulatur. Nach Stimulation des Endothels kommt es durch die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ zum Ausstrom von K^+ -Ionen in den Interzellularraum (Edwards et al. 1998). Diese leicht erhöhte, aber noch nicht spasmogen wirkende Konzentration führt zu einer Aktivierung von K_{IR} -Kanälen (einwärtsrektifizierende K^+ -Kanälen) und der Na^+/K^+ -ATPase in der Zellmembran der glatten Gefäßmuskelzellen. Auf diese Weise kommt es zur Hyperpolarisation (Nelson & Quayle 1995, Prior et al. 1998).

Der Stellenwert der Theorie ist bisher noch unklar, da in einigen Gefäßen eine EDHF-Antwort gezeigt werden konnte, jedoch der Nachweis einer K^+ induzierten Hyperpolarisation nicht möglich war (Edwards et al. 1999, Feletou & Vanhoutte 2006, Lacy et al. 2000).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das Endothel neben NO und PGI_2 weitere diffusible Moleküle synthetisiert, die an der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Hyperpolarisation führen.

In diesem Zusammenhang wurden in verschiedenen Studien die EETs (Epoxyeicosatriensäuren) beschrieben, die durch die Cytochrom P450 Epoxygenasen aus Arachidonsäure synthetisiert werden. An der glatten Gefäßmuskulatur öffnen sie $K_{Ca1.1}$ - Kanäle und führen zu einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur. Interessant ist, dass die Bedeutung der EETs für die Hyperpolarisation ebenfalls mit sinkendem Gefäßdurchmesser zunimmt (Campbell et al. 1996, Fisslthaler et al. 1999, Huang et al. 2005, Fleming & Busse 2006).

Campbell et al. konnten zeigen, dass durch Miconazol, ein Hemmstoff der Cytochrom-P450-Epoxygenase, eine Blockade der Hyperpolarisation und der

Relaxation möglich ist (Campbell et al. 1996). Weiterhin kann durch den EET-Antagonist 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (14,15-EEZE) die Tonusabnahme verringert werden (Gauthier et al. 2002). Auch eine direkte Relaxation war nach Campbell et al. durch direkte intravasale Applikation möglich. Diese konnte durch hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen und K^+ -Kanalinhibitoren wie Iberiotoxin inhibiert werden (Campbell et al. 1996). Weiterhin scheint es möglich, dass EETs nicht nur auf den $K_{Ca1.1}$ Kanal wirken, sondern über die Aktivierung von endothelialen TRPV4 Ca^{2+} -Kanälen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ im Endothel führen (Fleming & Busse 2006). In einer Vielzahl von Arterien konnte eine EET-vermittelte EDHF-Vasodilatation jedoch nicht beobachtet werden (Feletou und Vanhoutte, 2006).

Die große Anzahl von zum Teil sehr divergenten Befunden lässt daher verschiedene Erklärungsansätze zu und deutet insgesamt darauf hin, dass nicht ein einzelner Signalweg für die Kodierung der EDHF-Antwort verantwortlich ist. Vielmehr scheint es so zu sein, dass ein System von untereinander interagierenden Mechanismen existiert.

1.6.1 Membranpotenzial und Ionenkanäle des Endothels

Das Ruhemembranpotenzial der Endothelzellen ist gegenüber dem Blut und dem umgebenen Extrazellularraum negativ. Es besteht eine Spannungsdifferenz von ca. -40 mV.

Für die Aufrechterhaltung und Regulation des Membranpotenzials sind insbesondere Kaliumkanäle und möglicherweise Chloridkanäle verantwortlich (Nilius & Droogmans 2001), die mit ihrer Basalaktivität das Membranpotenzial ihrem jeweiligen negativen Gleichgewichtspotenzial annähern (Fransen et al. 1995, Nilius & Droogmans 2001).

Eine Membranhyperpolarisation, wie sie für die EDHF-Signalgebung wichtig ist, wird über die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen vermittelt. Im Folgenden wird nun auf die molekularen Eigenschaften dieser Kanäle genauer eingegangen.

1.6.2 Kaliumkanäle

Mit über 300 verschiedenen Kanälen bilden die Kaliumkanäle eine große Ionenkanalfamilie (Hille et al. 1999). Die Selektivität für K^+ -Ionen wird durch den in der zentralen Kanalpore sitzende Selektionsfilter gewährleistet. Er wird durch die Aminosäuresequenz TTVGYG beschrieben (Doyle et al. 1998, Roux 2005). Die Kanäle unterscheiden sich im Aufbau und der Lage ihrer Untereinheiten, so dass unterschiedliche Mechanismen sie aktivieren oder inaktivieren (Yellen 2002).

1.7 Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle (K_{CA})

Die Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanäle (K_{CA}) wurden 1958 in Erythrozyten erstmals beschrieben. Nach ihrer Aktivierung kam es zu einer Zellschrumpfung und einer Membranhyperpolarisation (Gardos 1958). Mittlerweile konnte ihr Vorhandensein in einer Vielzahl von Organen und Geweben nachgewiesen werden. Hierzu gehören das kardiovaskuläre System, die Skelettmuskulatur, das Nervensystem und verschiedene endokrine Gewebe (Vergara et al. 1998).

Die Kanäle sind aus Untereinheiten aufgebaut, die aus sechs hochkonservierten Transmembrandomänen bestehen (S1-S6) und intrazelluläre C- und N- Termini besitzen.

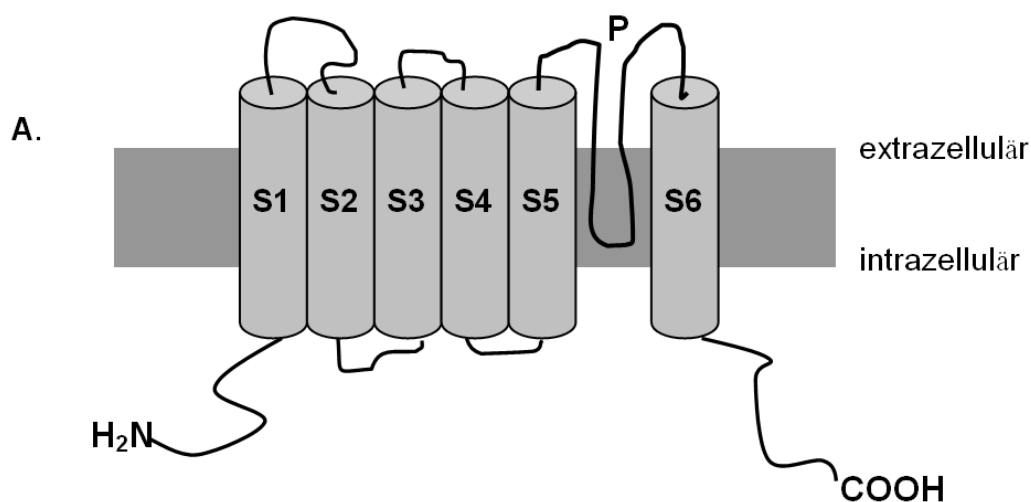


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Untereinheiten von K_{CA} -Kanälen. Untereinheit aus sechs Transmembranuntereinheiten (S1-S6) und einer Kanalpore (P).

Die Kanäle werden in zwei Hauptgruppen entsprechend des Grades ihrer phylogenetischen Verwandtschaft unterteilt: Hierbei bilden die $K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ die Gruppe der spannungsunabhängigen Kanäle und $K_{Ca1.1}$ und seine Subtypen die Gruppe der spannungsabhängigen Kanäle (Gutman et al. 2003).

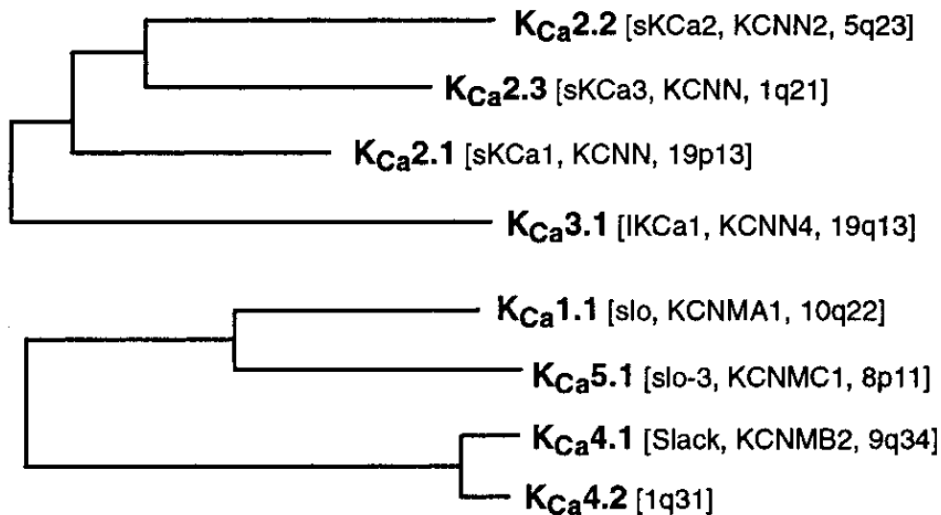


Abbildung 2: Phylogenetische Stammbaum der Ca^{2+} sensitiven K^+ -Kanäle

Gemeinsam ist den Kanälen, dass sie calciumabhängig sind. Jedoch ist der zugrunde liegende Modus ein unterschiedlicher. Während der $K_{Ca1.1}$ an seinem zytoplasmatischen C-Terminus eine Ca^{2+} -Bindungsstelle (Ca^{2+} -Bowl) besitzt, werden Kanäle der $K_{Ca2.x}$ -Familie und der $K_{Ca3.1}$ durch das Calcium bindende Calmodulin (CaM) aktiviert. Weiterhin unterscheiden sich die Kanäle in Ihrer Leitfähigkeit und in der Reaktion auf Agonisten und Inhibitoren (Horrigan et al. 1999, Barrett et al. 1982, Cox et al. 1997, Fanger et al. 1999, Ledoux et al. 2006, Liman et al. 1991).

Beim Menschen und bei Nagern konnte gezeigt werden, dass die $K_{Ca3.1}$ - und $K_{Ca2.3}$ -Kanäle vornehmlich im Endothel vorkommen, während beim Schwein neben $K_{Ca3.1}$ - und $K_{Ca2.3}$ - auch der $K_{Ca1.1}$ -Kanal vorhanden ist (Neylon et al. 1999, Bychkov et al. 2002, Köhler et al. 2001, Köhler et al. 2000). In den Gefäßmyozyten der verschiedenen Spezies kommt überwiegend der $K_{Ca1.1}$ -Kanal vor (Nelson & Quayle 1995).

Da sich diese Arbeit im Wesentlichen mit den Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanälen des Endothels beschäftigt, soll nun im Folgenden genauer auf die Kanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ eingegangen werden.

1.7.1 $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ Kanal

Die $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$ -Kanäle, die auch als SK-Kanäle (small-conductance channels) bezeichnet werden, sind die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle mit der niedrigsten Leitfähigkeit. Sie zeigen bei hohen extra- und intrazellulären Kaliumkonzentrationen eine Einzelleitfähigkeit von 4-14 pS.

Die Kanäle sind jeweils aus vier Untereinheiten aufgebaut, die wie oben (Abbildung 1) gezeigt, jeweils aus 6 Transmembrandomänen bestehen. Wie der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ Kanal besitzen sie keine Spannungsabhängigkeit. Hierfür ist wahrscheinlich das, gegenüber den strukturverwandten K_V -Kanälen veränderte, S4-Segment verantwortlich. Es besteht aus einer geringeren Anzahl und anders angeordneten positiven Aminosäuren (Köhler et al. 1996, Stocker 2004).

Obwohl keine Spannungsabhängigkeit vorliegt, besitzen die Kanäle einwärtsrektifizierende Eigenschaften, da bei positiver werdendem Membranpotenzial der Strom durch bivalente Kationen wie Mg^{2+} , Ba^{2+} und Ca^{2+} zunehmend gehemmt wird. Somit zeigen die Kanäle keine lineare Strom-Spannungs-Beziehung (Köhler et al. 1996, Soh & Park 2001, Xia et al. 1998).

Eine halbmaximale Aktivierung der $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$ -Kanäle findet bereits bei einer Ca^{2+} -Konzentration von ca. 300nM statt. Die Sensivität der Kanäle beruht jedoch nicht auf einer direkten Bindung des Ions, sondern wird durch Calmodulin (CaM) vermittelt. Die Ca^{2+} -Sensitivität der Kanäle entspricht daher der des Calmodulin. Dieses wird konstitutiv distal der Domäne S6 an der so genannten Calmodulin-bindenden Domäne (CaMBD) gebunden und induziert nach der Anlagerung von Ca^{2+} durch eine Konformationsänderung eine Öffnung der Kanalpore (Ledoux et al. 2006, Schumacher et al. 2004, Stocker 2004, Xia et al. 1998).

Eine Rolle bei der EDHF-vermittelten Vasodilation spielt wahrscheinlich der $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ -Kanal. Er kommt wie $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ im Endothel der Gefäße vor und ist wahrscheinlich zusammen mit diesem für die initiale Hyperpolarisation der EDHF-Antwort verantwortlich (Bychkov et al. 2002). Beim Menschen ist das für den Kanal

kodierende Gen (KCNN3) auf dem Chromosom 1q21.3 lokalisiert (Gutman et al. 2003).

Ein wichtiger Schritt im Verständnis der endothelialen $K_{Ca2.3}$ Funktion erfolgte im Jahr 2003 durch Taylor et al mit Hilfe von $K_{Ca2.3}$ -transgenen Mäusen (Bond et al. 2000, Taylor et al. 2003). In diesen Tieren ist die Gensequenz im Promotorbereich so verändert, dass es nach der Gabe von Doxyzyklin im Trinkwasser zu einer Hemmung der Kanalexpression kommt. In Abwesenheit von Doxyzyklin ist der Promotor hoch aktiv und es kommt zu einer ca. dreifachen Überexpression des Kanals. Die Überexpression des Kanals hatte eine tonische Hyperpolarisations des Endothels zur Folge, die der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion entgegenwirkte. Durch Doxyzyklin induzierte Unterdrückung der Kanalaexpression wurde dieser Effekt wieder aufgehoben. Die Überexpression des Kanals hatte jedoch keinen Einfluss auf den Blutdruck, wohingegen die Blockade der Expression einen Bluthochdruck induzierte, der sich nach Beendigung der Doxyzyklin-Gabe wieder normalisierte (Taylor et al. 2003). Diese Ergebnisse legten nahe, dass der $K_{Ca2.3}$ -Kanal eine Rolle bei der endothelvermittelten Vasodilatation spielt.

1.7.2 $K_{Ca3.1}$ Kanal

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal wurde zuerst 1958 in seiner Zellvolumen und Membranpotenzial regulierenden Funktion beschrieben (Gardos 1958). Aufgrund seiner Leitfähigkeit von 35 pS bezeichnete man ihn zunächst als IK (intermediate conductance) oder SK 4 (small conductance 4) (Logsdon et al. 1997). Der Kanal besteht wie $K_{Ca2.x}$ -Kanäle aus vier Untereinheiten, die jeweils aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind und mit dem N- und C- Terminus intrazellulär liegen.

Analog zu den $K_{Ca2.x}$ -Kanälen ist die Aktivierung durch Calmodulin mit einer EC_{50} von ca. 300 nM vermittelt (Ishii et al. 1997, Logsdon et al. 1997).

Beim Menschen ist das $K_{Ca3.1}$ -kodierende Gen (auch KCNN4 genannt) auf dem Chromosom 19q13.2 lokalisiert. Bei der Maus liegt es auf dem Chromosom 7A3. Es besteht aus neun codierenden Exons und weist eine über 50-prozentige Homologie zur SK-Genfamilie auf (Ishii et al. 1997, Logsdon et al. 1997).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine $K_{Ca3.1}$ -defiziente Mauslinie generiert (Si et al. 2006). In dem zugehörigen Gen wurde das für die Kanalpore kodierende Exon 4 durch die Sequenz

einer Neomycin-Resistenz ersetzt und so eine genetische Deletion des Kanals erreicht. Weiterhin zeigten funktionelle Untersuchungen an Erythrozyten, die normalerweise den $K_{Ca}3.1$ Kanal exprimieren in Western-Blot-Analysen das Fehlen des Proteins an.

Die homozygoten Knockouttiere ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) waren lebensfähig und zeugten mit ebenfalls homozygoten Partnern lebensfähigen Nachwuchs.

In Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten arteriellen Endothelzellen konnte ebenfalls das Fehlen der $K_{Ca}3.1$ Ströme gezeigt werden (Si et al. 2006). Weiterhin wurden Untersuchungen am Druckmyographen durchgeführt um den Effekt auf die EDHF-Antwort darzustellen. In diesen Untersuchungen dilatierten die Arteria carotis Communis der transgenen Tiere in Anwesenheit von Indomethazin und L-NNA (Blocker der COX bzw. der NOS) signifikant weniger, als die der Kontrollgruppe. In Abwesenheit von L-NNA und INDO zeigte sich in beiden Gruppen eine größere Vasodilation. Die Knockout-Gruppe ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) lag jedoch immer noch deutlich unter der Wildtypgruppe ($K_{Ca}3.1^{+/+}$). Im Gegensatz dazu hatte der genetische Knockout keinen Einfluss auf die $\alpha 1$ -vermittelte Vasokonstriktion der Gefäße.

Diese Ergebnisse zeigten also, dass der $K_{Ca}3.1$ Kanal eine wichtige Rolle bei der EDHF-Antwort spielt (Si et al. 2006). Darüber hinaus wiesen die Tiere eine milde Hypertonie auf, was auch auf eine Beteiligung der $K_{Ca}3.1$ -medierten EDHF-Komponente an der Blutdruckregulation schließen lässt. Das Mausmodell wurde in dieser Doktorarbeit für die Testung der Spezifität des hier vorgestellten $K_{Ca}3.1$ -Aktivators verwendet.

1.7.3 Pharmakologische Beeinflussung von $K_{Ca2.3}$ - und $K_{Ca3.1}$ -Kanälen

1.7.3.1 Inhibierung

Die Kanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ können durch eine Reihe von Substanzen selektiv inhibiert werden. Aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Sensitivität zu den einzelnen Stoffen, ist auf diese Weise eine Unterscheidung der Kanäle möglich.

Der $K_{Ca2.3}$ kann durch das 18-Aminosäuren große Bienengifttoxin Apamin, durch die Skorpiongifte Scyllatoxin und Tamapin sowie durch den sehr selektiven Nichtpeptidblocker UCL 1684 geblockt werden (Burgess et al. 1981, Rosa et al. 1998).

Zur Inhibierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals konnte aus der Ausgangssubstanz Clotrimazol der sehr spezifische und potente Blocker TRAM 34 synthetisiert werden. Weiterhin kann der $K_{Ca3.1}$ -Kanal durch das Skorpiongift Charybdotoxin unspezifisch inhibiert werden. (Ishii et al. 1997).

1.7.3.2 Aktivierung

Während die Inhibitoren nicht zwischen dem $K_{Ca2.3}$ und dem $K_{Ca3.1}$ kreuz reagieren, werden sie mit ähnlicher Potenz durch Benzimidazolone und Benzothiazole aktiviert.

Im Jahr 1996 konnte Devor et al. erstmals zeigen, dass 1-Ethyl-2-benzimidazolone (1-EBIO) $K_{Ca3.1}$ -Kanal Ströme in T84 Zellen induziert (Devor et al. 1996). Später wurde bestätigt, dass 1-EBIO klonierte $K_{Ca3.1}$ - Kanäle mit einer EC_{Ca} von 30 μ M und klonierte $K_{Ca2.x}$ Kanäle mit einer EC_{50} von 300 bis 450 μ M aktiviert (Wulff et al. 2007).

Um die Potenz weiter zu erhöhen entwickelte Singh et al. im Jahr 2001 5,6-Dichloro-1-Ethyl-2-benzimidazolone (DC-EBIO), dass $K_{Ca3.1}$ mit einer EC_{50} von 750 nM und $K_{Ca2.2}$ mit einer EC_{50} von 27 μ M aktiviert (Singh et al. 2001, Pedarzani et al. 2001). Weiterhin stellten Strøbæk 2004 das mit den genannten Substanzen strukturell verwandte NS309 vor. Es ist in der Lage $K_{Ca2.x}$ und $K_{Ca3.1}$ in submikromolaren

Konzentrationen mit einer EC_{50} von 30 nM ($K_{Ca2.x}$), bzw. 10 nM ($K_{Ca3.1}$) zu aktivieren. Es gilt daher als relativ selektiv für $K_{Ca3.1}$ Kanäle.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass NS309 in mikromolaren Konzentrationen auch Effekte auf andere Kanäle, wie den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, hat und muss daher als unspezifisch eingestuft werden (Morimura et al. 2006). Außerdem schließt seine extrem kurze Halbwertszeit die Verwendung bei vielen in-vivo Experimenten aus (Strobaek et al. 2004).

Mit dem Ziel einen $K_{Ca3.1}$ -Öffner mit hoher Affinität und Subtypenspezifität zu generieren, der auch für in vivo Experimente geeignet ist, entwickelten Wulf et al. die in dieser Doktorarbeit verwendete Substanz SKA-31 (Naphtho[1,2-a]thiazol-2-ylamine) (Abbildung 3 A) (Sankaranarayanan et al. 2009). Als Ausgangsstoff diente Riluzole (Abbildung 3 B), welches erstmals 1950 durch Domino et al. als zentrales Muskelrelaxant vorgestellt und später intensiv als Antikonvulsivum und Neuroprotektivum beforscht wurde (Domino et al. 1952). Heute ist Riluzole unter dem Handelsnamen Rilutek® als Medikament zur Behandlung der amyotrophen Lateralsklerose registriert. Riluzole ist aber ein sehr unspezifischer und wenig affiner Ionenkanalmodulator, da es neuronale Na^{+} -Kanäle mit einer Konzentration von 1-50 μ M inhibiert und K_{Ca2x} und $K_{Ca3.1}$ Kanäle mit einer EC_{50} von 10-20 μ M aktiviert (Debono et al. 1993, Duprat et al. 2000, Song et al. 1997, Zona et al. 1998, Cao et al. 2002, Grunnet et al. 2001).

Nach der Synthese von 55 Riluzole Derivaten wurde SKA-31 als potenzielle Substanz für in vivo Experimente identifiziert.

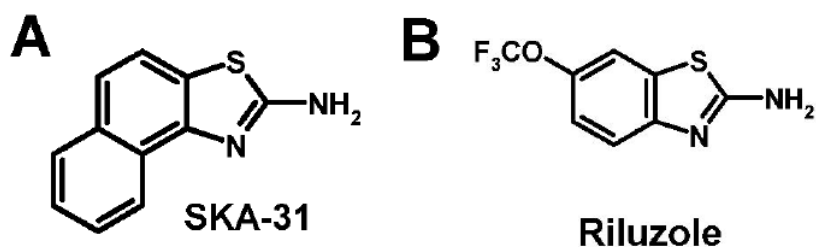


Abbildung 3: Darstellung der chemischen Struktur von SKA-31 und Riluzole.

A: SKA-31, B: Riluzole

In direktem Zusammenhang mit der vorliegenden Studie durchgeführte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe und der kooperierenden Arbeitsgruppe Prof. Wulff (Davis, Kalifornien) zeigten, dass SKA-31 native $K_{Ca3.1}$ Kanäle im

Mäusendothel bereits mit einer EC_{50} von 250 nM öffnet (Sankaranarayanan et al. 2009). Weiterhin aktiviert es $K_{Ca2.3}$ Kanäle mit einer EC_{50} im unteren mikromolaren Bereich bei ca. 1,5 μ M. Neben dieser gegenüber Riluzole ca. zehnfach gesteigerten Potenz hatte SKA-31 in der höchsten löslichen Konzentrationen keine nennenswerten aktivierenden oder blockierenden Effekte auf eine Reihe anderer Kanäle.

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass SKA-31 keine inhibitorischen Effekte auf Na^+ und Ca^{2+} Kanäle hatte und damit eine deutlich verbesserte Selektivität im Vergleich zu Riluzole und NS-309 aufweist (Sankaranarayanan et al. 2009).

2 Fragestellung

Die Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanäle vom $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ Typ sind wichtige Regulatoren der Endothelfunktion. Sie initiieren eine Hyperpolarisation der Zellmembran, die die EDHF-medierte Vasodilatation einleitet. Es ist vorstellbar, durch eine selektive pharmakologische Modulation dieser Kanäle die EDHF-Signalgebung zu verstärken und damit Vasodilatationsprozesse zu verbessern (Grgic et al. 2009, Feletou & Vanhoutte 2006).

Die bislang bekannten Aktivatoren der Kanäle weisen nur eine geringe Selektivität auf oder haben eine sehr kurze Halbwertszeit, die den Einsatz bei vielen Experimenten ausschließt (Wulff et al. 2007, Strobaek et al. 2004).

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Wirksamkeit und die Selektivität des neuen $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ Öffners SKA-31 auf die EDHF-vermittelte Vasodilatationen zu testen.

Hierzu sollten am Druckmyographen Messungen der EDHF-vermittelten Vasodilatation an Arteriae carotis communis von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ exprimierenden und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ defizienten Mäusen durchgeführt werden. Die für die Untersuchungen benötigten Tiere sollen gezüchtet und genotypisiert werden.

Es ergeben sich folgende spezifische Fragestellungen:

1. Kann durch den Kanalöffner SKA-31 eine Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation erzielt werden? Hierzu sollen die folgenden Versuchsreihen an den Arteriae carotis communis von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ Wildtyptieren durchgeführt werden. Im Anschluss soll durch analoge Experimenten an $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ Knockouttieren die Selektivität der Substanz überprüft werden.
 - a) In einer ersten Serie soll ein Dosiswirkungsprofil erstellt werden, das den Einfluss von SKA-31 auf eine durch Azetylcholin-induzierte Vasodilatation zeigt.
 - b) In einer zweiten Serie soll getestet werden, ob die alleinige Gabe von SKA-31 eine Vasodilatation induziert.
 - c) In einer dritten Serie soll gezeigt werden, welchen potenzierenden Einfluss die dauerhafte intravasale Anwesenheit SKA-31 in einer der

EC_{50} entsprechenden Konzentration auf steigende AzetylcholinKonzentration hat.

2. Hat SKA-31 einen Einfluss auf die glattmuskulären Funktionen der Arteria carotis communis? Hierzu sollen die folgenden Versuchsreihen an $K_{Ca}3.1$ -Wildtyp- und $K_{Ca}3.1$ -Knockout-Tieren durchgeführt werden.
 - a) In einer ersten Versuchsreihe soll für den Vasokonstriktor Phenylephrin ein Dosiswirkungsprofil bei intravasaler Ab- und Anwesenheit von SKA-31 erstellt werden.
 - b) In einer zweiten Versuchsreihe soll der Einfluss von SKA-31 auf die maximale, durch hohe extravasale Kaliumkonzentration induzierte, Vasokonstriktion untersucht werden.
 - c) In einer dritten Versuchsreihe soll der Einfluss von SKA-31 auf die maximale, durch SNP induzierte, Vasodilatation untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Herstellende Firma
<ul style="list-style-type: none"> • Azetylcholin • Indometacin • Nω-Nitro-L-Arginin (LNNA) • Phenylephrin • MOPS (4-morpholinepropanesulfonic acid) • Nitroprussid-Natrium (SNP) • CaCl₂ • NaCl • D-Glucose • KCl • Na-Pyruvat • Primer: <ul style="list-style-type: none"> ○ Kcnn4-forward-Primer ○ Exon4rev-Primer ○ Neorev-Primer 	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • SKA-31,(Naphtho[1,2-a]thiazol-2-ylamine) 	Heike Wulff, Davis, USA, frei überlassen
<ul style="list-style-type: none"> • Chlorwasserstoffsäure (HCL) • Diethylether 	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) • Agarose • Taq-Polymerase 	PeqLab, Erlangen, Deutschland

3 Material und Methoden

<ul style="list-style-type: none"> • MgCl₂ 	
<ul style="list-style-type: none"> • NaH₂PO₄ • MgSO₄ • NaOH 	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Hersteller

3.1.2 Geräte

Gerät	Herstellende Firma
<ul style="list-style-type: none"> • Pressure Myograph System P100 <ul style="list-style-type: none"> ○ Windows 95 Personal Computer ○ Sony XC73CE Kamera ○ Interface P100 ○ Pressure Tower ○ Axiovert 25 Mikroskop 	Fa. J.P. Trading I/S, Dänemark
<ul style="list-style-type: none"> • Mikrodisektionsbesteck: <ul style="list-style-type: none"> ○ S&T Vessel Forceps ○ Dumont Mirror Finish Forceps ○ Vannas Spring Scissors 	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Mikrodisektionsarbeitsplatz: <ul style="list-style-type: none"> ○ Stereomikroskop Stemi 2000 ○ Kaltlichtquelle KL 1500 electronic 	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Schott AG, Mainz, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Pipettenziehgerät DMZ-Universal-Puller 	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Cycler 	Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems
<ul style="list-style-type: none"> • Laborwaage Sartorius BP310P 	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller

3.2 Tierhaltung, Tierzucht, Genotypisierung

3.2.1 Tierhaltung und Tierzucht

Die für die Studie benötigten Tiere wurden in Standardkäfigen in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps Universität Marburg gehalten. Die Temperatur lag konstant bei $22(\pm 2)^\circ \text{C}$ und es wurde ein 12h Tag/Nacht-Zyklus simuliert. Zur Ernährung dienten Standardnagerkost und Wasser.

Die in den Experimenten verwendeten Knockoutmäuse ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) wurden in der eigenen Arbeitsgruppe erzeugt (Si et al. 2006). Bei diesen Tieren ist das für die Kanalpore kodierende Exon 4 des nativen $K_{Ca3.1}$ Gens durch eine um 160 Basenpaare längere Neomycin-Resistenz ersetzt. Diese Insertion führt zu einer Verschiebung des Leserasters, wodurch die Proteinbiosynthese des $K_{Ca3.1}$ Kanals nicht mehr möglich ist.

3.2.2 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Der Genotyp des $K_{Ca3.1}$ Kanals wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt.

Es wurden die folgenden Primer verwendet:

- Intron3forward: 5' - CTTTGGATCCAGATGTTTCTTGGTGTTAAG - 3'
- Exon4reverse: 5' - GCCACAGTGTGTCTGTGAGG - 3'
- Neoreverse: 5' - CGTGCAATCCATCCATCTTGTTC A - 3'

Der Intron3forward-Primer bindet an das vor dem Exon 4 liegende Intron, während der Exon4reverse-Primer spezifisch für Exon 4 ist. Der Neoreverse-Primer bindet an das in den $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Tieren einbrachte Neomycin-Resistenzgen (Selektionsmarker).

Die erwartete Produktlänge lag für das $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Knockout-Gen bei 320 Basenpaaren, für das entsprechende Wildtyp-Gen bei 160 Basenpaaren. Proben, die beide Banden zeigten, weisen auf einen heterozygoten Genotyp hin.

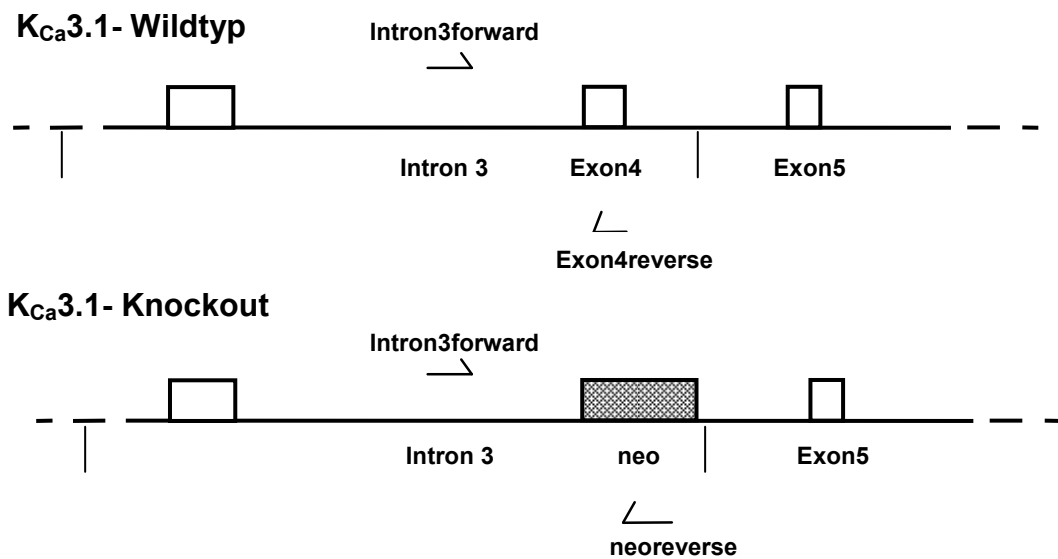


Abbildung 4: Genotypisierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals mit Hilfe der PCR. Lokalisation der Bindungsstellen der PCR-Primer Intron3forward, Exon4reverse, Neoreverse. Im $K_{Ca3.1}$ -Knockout-Gen wurde das Exon4 durch das längere Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt (hier als neo bezeichnet)

Die für die PCR verwendete Reaktionslösung bestand aus 1x PCR Reaktionspuffer, 1,75 mmol/L $MgCl_2$, 400 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0,4 $\mu\text{mol/L}$ von jedem Primer und 1.25 U Taq Polymerase (Fermentas). Zu 22,5 μl dieser Lösung wurden 2,5 μl Zelllysate gegeben.

Die Reaktion wurde mit einem Thermocycler mit den folgenden Temperaturschritten ausgeführt: Denaturierung (94°C für 3 min), 10 Zyklen (35 sek bei 94°C, 35 sek bei 58°C und 50 sek bei 72°C) gefolgt von 25 Zyklen (35 sek bei 94°C, 35 sek bei 58°C und 50 sek bei 72°C mit 5 sec Verlängerung in jedem Schritt) und einem abschließenden Extensions-Schritt (10 min at 72°C). Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1% Agarose-Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Fragmentlänge wurde mit Hilfe eines Größenstandards (DNA-Leiter 100bp) bestimmt. Als Negativkontrolle wurde bei jedem PCR-Experiment ein Leerwert, d.h. das Reaktionsgemisch ohne Zusatz von DNA, mit untersucht.

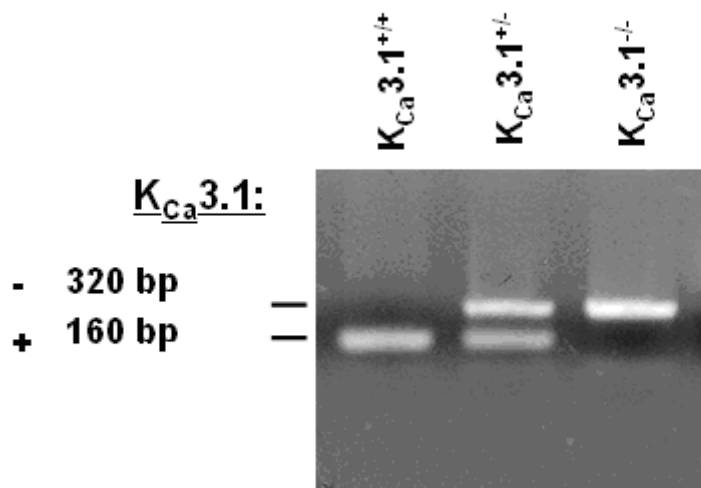


Abbildung 5: Beispiel für die Multiplex PCR der Versuchstiere. Oben sind die Genotypen des K_{Ca}3.1-Kanals der Versuchstiere aufgetragen. Mit + ist jeweils das Wildtypgen bezeichnet, mit – das K_{Ca}3.1-Knockoutgen. Zeigt sich nur eine Bande sind die Tiere homozygot, bei zwei Banden sind die Tiere heterozygot für den jeweiligen Kanal.

3.3 Experimente

3.3.1 Versuchsvorbereitung, Präparation der Tiere

Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere aus der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums in das Labor der Arbeitsgruppe gebracht. Nach Feststellung des Körpergewichts erfolgte die Tötung in tiefer Äthernarkose durch Entnahme des Herzens und Ausblutung.

Anschließend wurde der Hals der fixierten Tiere durch einen medialen Längsschnitt eröffnet und der Thymus und die Schilddrüse durch leichten seitlichen Zug entfernt. Nachfolgend wurde sich auf der rechten Halsseite vorsichtig bis ins Trigonum caroticum vorpräpariert und die Arteria carotis communis und der Nervus Vagus identifiziert. Nach Eröffnung des umgebenen Bindegewebes erfolgte mit einer mikrochirurgischen Schere, unter Vermeidung von Zugspannung, eine Abtrennung des Nervs. Um ein möglichst großes Präparat zu erhalten wurden das Gefäß an seinem Ursprung bzw. an der Aufteilung in Arteria carotis intern und externa

abgetrennt und entnommen. Im Anschluss erfolgte auf gleiche Weise die Entnahme der linken Arteria carotis communis.

Bis zur Untersuchung wurden die Gefäße in eine gepufferte, gekühlte Salzlösung (Tabelle 3) überführt und bei 8° C gelagert.

3.3.2 Versuche am Druckmyographen

Bei der Druckmyographie wird die Vasoreagibilität von kleinen Arterien unter nahezu physiologischen Bedingungen gemessen. Die Druckmyographie ermöglicht es, insbesondere die Interaktion zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur zu charakterisieren.

3.3.2.1 Versuchsaufbau

Die präparierte und blutleere Arteria carotis communis wurde unter dem Mikroskop im Experimentierbad auf zwei Mikroglaspipetten aufgezogen und durch Knoten aus chirurgischem Nahtmaterial befestigt. Die Pipetten ermöglichten einen Zu- und Abfluss durch das Gefäß, der aus höhenverstellbaren Flüssigkeitsbehältern gespeist wurde. Diese waren über Schläuche mit dem Experimentierbad verbunden und konnten einzeln stufenlos eingestellt werden, so dass regulierte Drücke und Flüsse möglich waren. Durch in der Einheit integrierte Drucksensoren konnte der Druck kontinuierlich gemessen und kontrolliert werden. Ebenfalls wurde die Temperatur konstant bei 37° C gehalten und mit Hilfe einer Sonde registriert. Das Bad wurde auf dem Mikroskopiertisch eines inversen Mikroskops (Axiovert 25, Zeiss) positioniert, sodass der Gefäßdurchmesser mit Hilfe des Programms VesselView 1.0® aufgezeichnet werden konnte. Die Software erhielt, über eine am Mikroskop installierte Videokamera, Echtzeitbilder des Gefäßes und zeigte neben dem ermittelten Gefäßdurchmesser in Mikrometern auch die Badtemperatur und den Druck am Zu- und Ablauf an.

Ein im Zuflussschenkel montierter Dreiwegehahn ermöglichte über ein weiteres Schlauchsystem die Applikation von zusätzlichen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Hierbei kam es zu keinen Änderungen des hydrostatischen Drucks, da sich die Flüssigkeitsspiegel der Zuflussbehälter auf gleicher Höhe befanden. Als

Bad und Pufferlösung wurde eine physiologische, saline Lösung (PSS-Lösung) mit dem pH-Wert 7,4 verwendet (Tabelle 3). Die Lösung enthielt bei allen Versuchen LNNA (300 $\mu\text{mol/L}$) zur Blockade der Stickstoffmonoxid-Synthase und Indomethazin (10 $\mu\text{mol/L}$) zur Blockade der Zyklooxygenase, so dass es sich bei der endothelvermittelten Vasodilatation hauptsächlich um die EDHF-Antwort handelte.

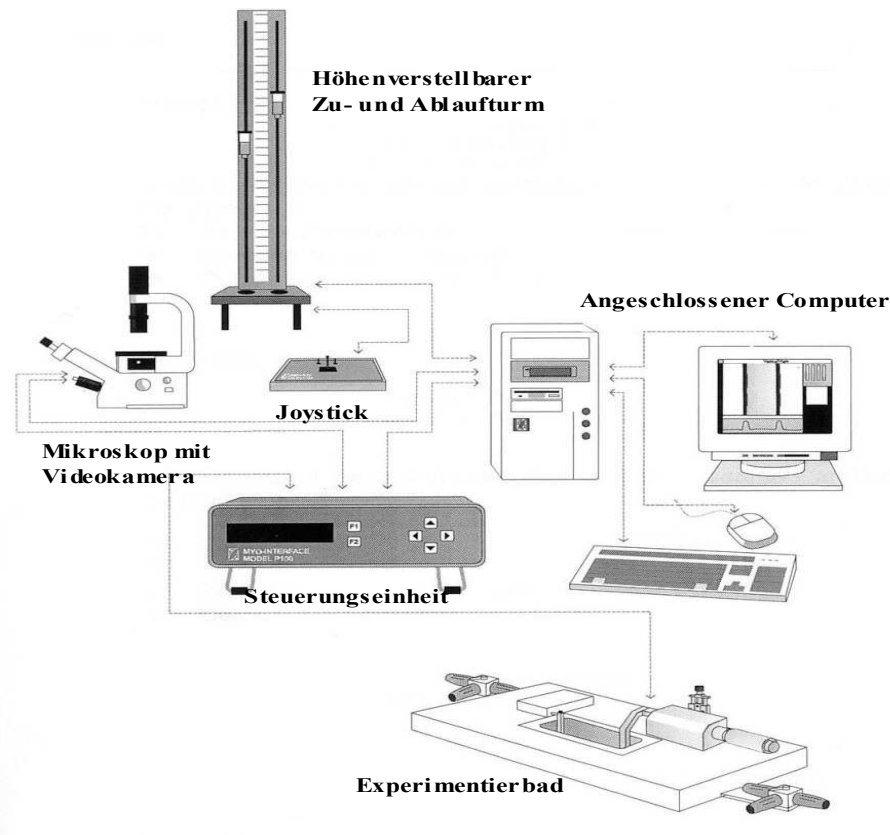


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus des Druckmyographen.
(nach: Pressure Myograph-Model P100 Bedienungsanleitung).

3.3.2.2 Versuchsablauf

Im ersten Versuchsprotokoll wurden Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockoutmäuse ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) verwendet. Nach der Vorbereitung des Systems wurde der Druck bei minimaler Durchflussrate von 0 auf 80 mmHg erhöht. In dieser Einstellung wurden die Gefäße 15 Minuten äquilibriert und anschließend durch das Pipitieren von Phenylephrin (1 $\mu\text{mol/L}$) in die Badlösung vorkontrahiert. Nachdem sich ein stabiler Gefäßdurchmesser eingestellt hatte, wurde die Flussrate von 0,03 ml/min auf 0,3 ml/min erhöht und mit der Messung der nicht NO- und nicht Prostazyklin-abhängige Vasodilatation begonnen.

Zunächst fand eine alleinige intravasale Applikation von Azetylcholin statt (ACh, 100 nmol/L). Hierauf folgten Co-Stimulationen, bei denen Azetylcholin (ACh, 100 nmol/L) zusammen mit aufsteigenden Konzentrationen SKA-31 (10 nmol/L; 50 nmol/L; 100 nmol/L; 200 nmol/L; 500 nmol/L und 1 μ mol/L) gegeben wurde. Die Substanzdurchflusszeit betrug jeweils 15 Sekunden.

Im Anschluss wurde die Badlösung durch eine 60 mmolare K^+ -Lösung ersetzt, um die maximale Vasokonstriktion zu bestimmen. Nachdem sich ein konstanter Gefäßdurchmesser eingestellt hatte, wurde das Bad ausgewaschen und erneut mit PSS-Lösung befüllt um durch Zugabe von Nitroprussid-Natrium (SNP, 10 μ mol/L) die maximale Vasodilatation zu bestimmen.

Im zweiten Versuchsprotokoll wurden die Experimente mit Wildtieren ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) analog zur ersten Serie begonnen. Nach Vorkontraktion und Flussinduktion fand jedoch nur eine alleinige Applizierung von SKA-31 (10 μ mol/L) für 15, 30 und 60 Sekunden statt.

Die Bestimmung der maximalen Vasokonstriktion und Dilatation erfolgte ebenfalls wie im vorherigen Versuchsprotokoll.

In der dritten Versuchsreihe wurden Wildtyp ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockouttiere ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) verwendet. Das System wurde vorbereitet und die Gefäße konnten sich ebenfalls bei einem Druck von 80 mmHg für 15 Minuten adaptieren. Nach dieser Zeit wurde bei der Hälfte der Versuchsgefäße die Pufferlösung im zuführenden Schenkel durch ein Perfusionsmedium ersetzt, das SKA-31 (200 nmol/L) enthielt. Anschließend wurde durch eine Druckdifferenz von 1 mmHg zwischen dem zuführendem und dem abführendem Schenkel ein leichter Fluss induziert, so dass das SKA-31 die Arteria carotis communis erreichte. Nachdem sich ein konstanter Gefäßdurchmesser eingestellt hatte, wurden die Gefäße durch die extravasale Gabe von steigenden Konzentrationen Phenylephrin (1 nmol/L; 10 nmol/L; 100 nmol/L; und 1 μ mol/L) kontrahiert. Nun wurde die Flussrate auf 0,3 ml/min erhöht und Azetylcholin in aufsteigenden Konzentrationen (1 nmol/L; 10 nmol/L; 100 nmol/L; 1 μ mol/L und 10 μ mol/L) intravasal für eine Minute appliziert. Zur weiteren Ermittlung des Kontraktionsverhaltens wurde im Anschluss Phenylephrin in höherer Konzentration (10 μ mol/L) in die Badlösung pipettiert und nachdem sich ein

konstanter Gefäßdurchmesser zeigte die Badlösung durch eine 60 mmolare K⁺-Lösung ersetzt, um die maximale Kontraktionsfähigkeit zu bestimmen.

Zum Abschluss eines Versuches fand ein erneuter Austausch der Badlösung gegen PSS-Lösung statt und die maximale Vasodilatation wurde durch die extravasale Gabe von Nitroprussid-Natrium (10 µmol/L; SNP) bestimmt.

3.4 Datenaufzeichnung

Mit Hilfe des Programms „Vessel View 1.0“ wurde die Änderung des Gefäßdurchmessers kontinuierlich aufgezeichnet.

3.5 Lösungen

	Standardbadlösung (PSS)	60 mM KCl-Puffer
NaCl	145,0	89,7
NaH ₂ PO ₄	1,2	1,2
KCl	4,7	60
MgSO ₄	1,2	1,2
CaCl ₂	2,0	2,0
Glucose	5,0	5,0
Pyruvat	2,0	2,0
MOPS	3,0	3,0
LNNA	0,3	0,3
Indomethazin	0,01	0,01

Tabelle 3: Zusammensetzung der Standardbadlösung (PSS) sowie der KCl-Pufferlösung Alle Angaben in mmol/L

3.6 Datenauswertung

Die in Mikrometern ermittelten Vasodilatationswerte und Vasokonstriktionswerte wurden auf die maximale Vasodilatation beziehungsweise die maximale Vasokonstriktion bezogen und damit normalisiert.

Die Spannweite der Gefäße wurde aus der Differenz der maximalen, durch SNP induzierten, Vasodilatation und der maximalen, durch K 60 induzierten, Vasokonstriktion ermittelt.

3.7 Statistische Analysen

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Um Unterschiede zwischen den Subgruppen herauszustellen wurden sie mit Hilfe des Student's T-Test miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei p-Werten <0.05 festgelegt.

3.8 Statistikprogramm

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003 der Firma Microsoft.

4 Ergebnisse

4.1 Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31

In der ersten Versuchsreihe wurde an Arteriae carotis communis von Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) die potenzierende Wirkung von SKA-31 (0,01 bis 1 $\mu\text{mol/L}$) auf die Azetylcholin (100 nmol/L, 15 Sekunden Substanzdurchflusszeit) bedingte und EDHF-vermittelte Vasodilatation untersucht.

Die Gefäße von Wildtyptieren ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) zeigten bei einer Co-Stimulation mit Azetylcholin (100 nmol/L) und den höchsten verwendeten SKA-31 Konzentrationen (200nmol/L, 500nmol/L und 1 $\mu\text{mol/L}$) eine Vasodilatation, die signifikant um das zwei- bis dreifache gegenüber der alleinigen Gabe von Azetylcholin (100 nmol/L) erhöht war. Die errechnete EC_{50} für SKA-31 lag bei 93 nmol/L. Bei der niedrigsten verwendeten Dosierung (10 nmol/L) zeigte sich keine signifikante Potenzierung der Gefäßerweiterung.

In den A.c.c. von Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) wurde durch SKA-31, in den Konzentrationen 0,01 bis 0,5 $\mu\text{mol/L}$, die EDHF-Antwort nicht potenziert. Bei der höchsten verwendeten Konzentrationen des Öffners (1 $\mu\text{mol/L}$) zeigte sich eine leichte Verstärkung der Antwort.

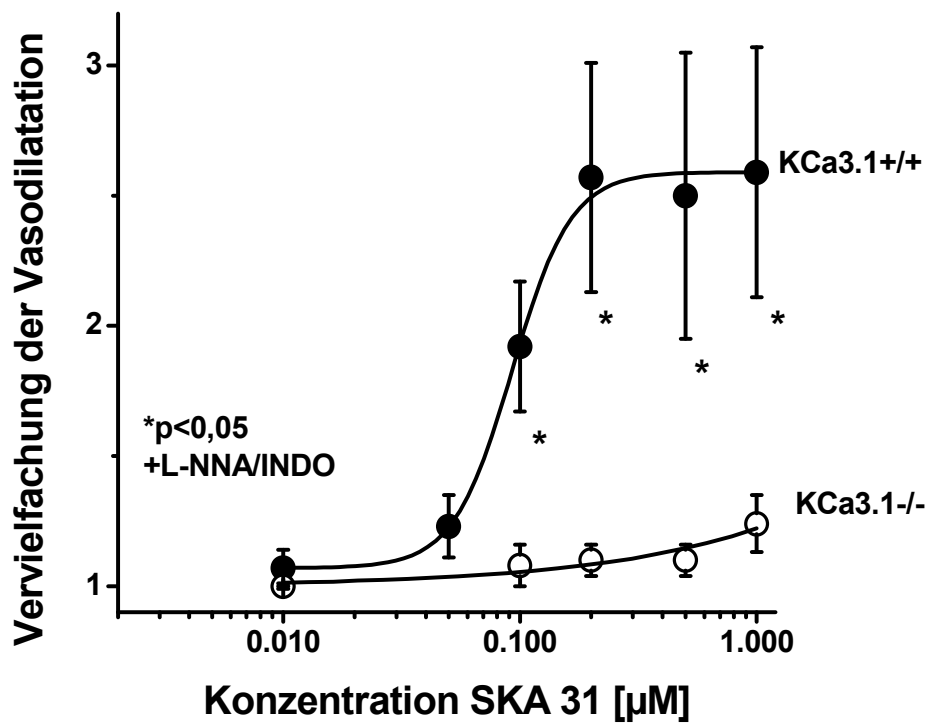


Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit der Potenzierung der EDHF- vermittelten Vasodilatation durch SKA-31. Die Vasodilatation wurde durch Acetylcholin (100 nmol/L) induziert und an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtyp- (n=7) und Knockoutmäusen (n=6) in Anwesenheit von L-NNA (300 µmol/L) und Indomethazin (10 µmol/L) durchgeführt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde an Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) untersucht, ob eine mehr der in vivo Situation entsprechende dauerhafte Perfusion mit SKA-31 (200 nmol/L) zu einer Änderung der Azetylcholin (1 nmol/L – 10 μ mol/L) bedingten Vasodilatation der Arteria carotis communis führt. Weiterhin sollte getestet werden, ob die Effekte durch SKA-31 möglicherweise mit der Zeit abnehmen. Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass eine längere Anwesenheit von SKA-31 andere Effekte auf den Kontraktionsstatus der glatten Gefäßmuskulatur hat.

Bei der alleinigen Applizierung von Azetylcholin (n=7) in der Konzentration 10 nmol/L zeigte sich keine Vasodilatation. Hingegen kam es bei den zusätzlich mit SKA-31 vorinkubierten und perfundierten Gefäßen (n=10) bereits zu einer signifikanten Öffnung von ca. 5 %. Ebenfalls dilatierten die mit SKA-31 aktivierten Gefäße bei der Gabe der nächst höheren Azetylcholin-Konzentration (100 nmol/L) signifikant stärker, als bei alleiniger Gabe des Stimulus. Die co-stimulierten Gefäße zeigten eine Erweiterung um ca. 35 %, die nur mit Azetylcholin perfundierten von ca. 24 %. Bei den höchsten verwendeten Azetylcholin-Konzentrationen (1 μ mol/L und 10 μ mol/L) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

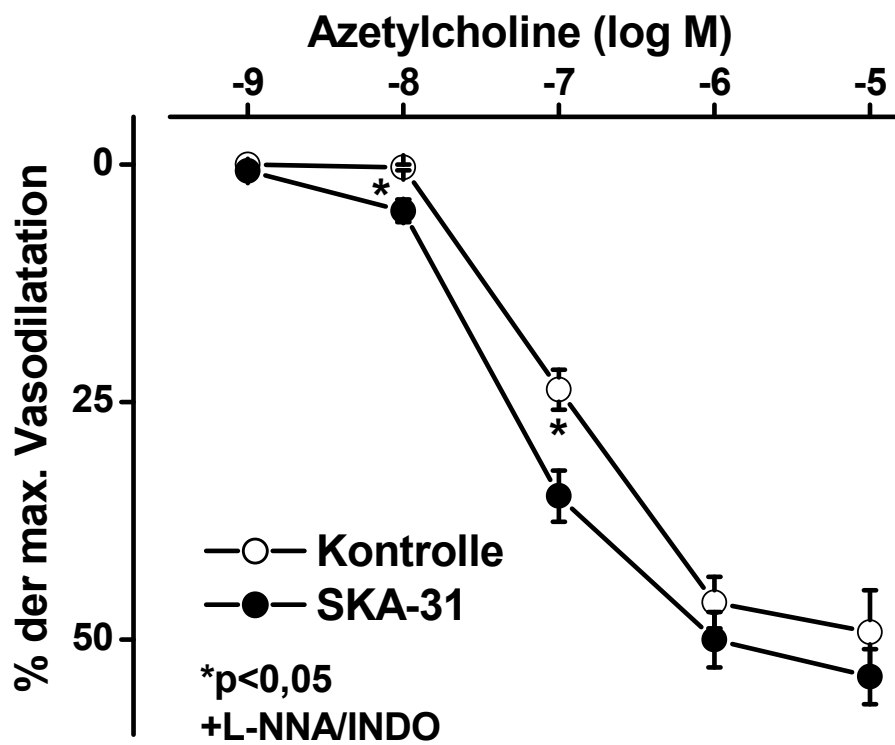


Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation, bei permanenter An- (n=10) bzw. Abwesenheit (n=7) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Wildtypmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * p<0,05

In einer weiteren Versuchsreihe wurde nicht an Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$), sondern an Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) untersucht, ob eine dauerhafte Perfusion mit 200 nmol/L SKA-31 zu einer Änderung der Azetylcholin bedingten Vasodilatation der Arteria carotis communis führt.

Bei der zusätzlichen Perfusion mit SKA-31 kam es zu keiner Verstärkung der insgesamt deutlich schwächeren Azetylcholin-induzierten Vasodilatation ($n=5$). Vielmehr war bei einer Azetylcholinkonzentration von 100 nmol/L die Amplitude in Abwesenheit von SKA-31 ($n=4$) stärker als bei kontinuierlicher Anwesenheit von SKA-31. Die co-stimulierten Gefäße öffneten sich um 2%, die allein mit Azetylcholin perfundierten um 11,3%. In den höheren und den niedrigen Konzentrationen war zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied sichtbar.

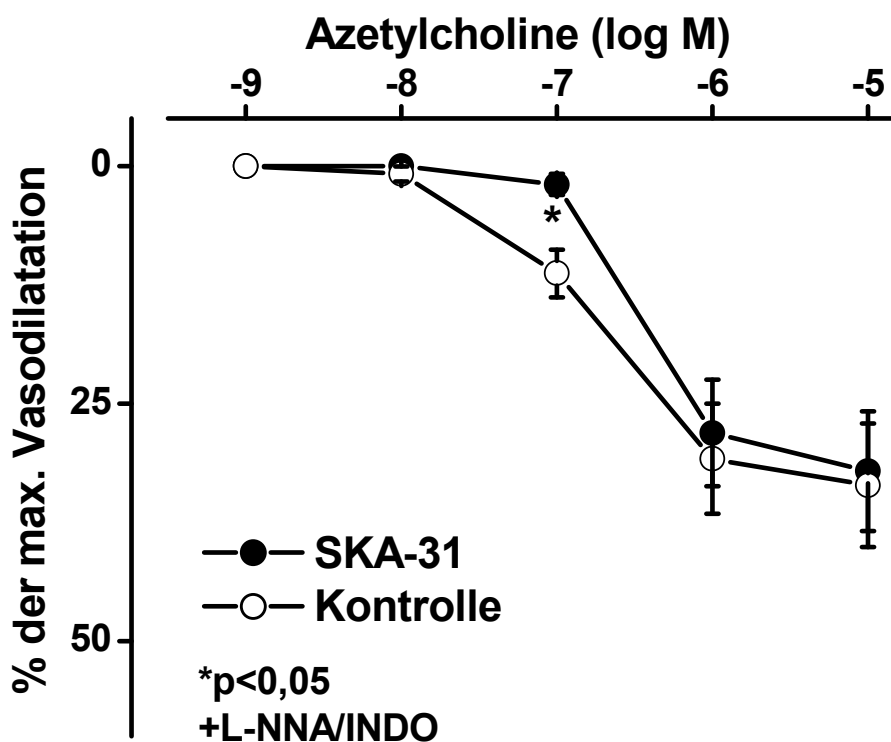


Abbildung 9: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation, bei permanenter An- ($n=5$) bzw. Abwesenheit ($n=4$) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Knockoutmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * $p<0,05$

Weiterhin wurde die EDHF-vermittelten Vasodilatation von Wildtyp- ($K_{Ca}3.1^{+/+}$)(n=10) und Knockouttieren ($K_{Ca}3.1^{-/-}$)(n=5) bei Anwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L) im Perfusionsmedium verglichen. Bei fast allen verwendeten AzetylcholinKonzentrationen (10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L und 10 μ mol/L) dilatieren die Gefäße der Wildtyp-Tiere signifikant stärker als die der Knockout-Tiere. In den höheren verwendeten Konzentrationen (1 μ mol/L und 10 μ mol/L) war die Gefäßerweiterung fast doppelt so groß. Bei der niedrigsten verwendeten AzetylcholinKonzentration (1 nmol/L) kam es bei beiden Versuchsgruppen zu keiner signifikanten Vasodilatation.

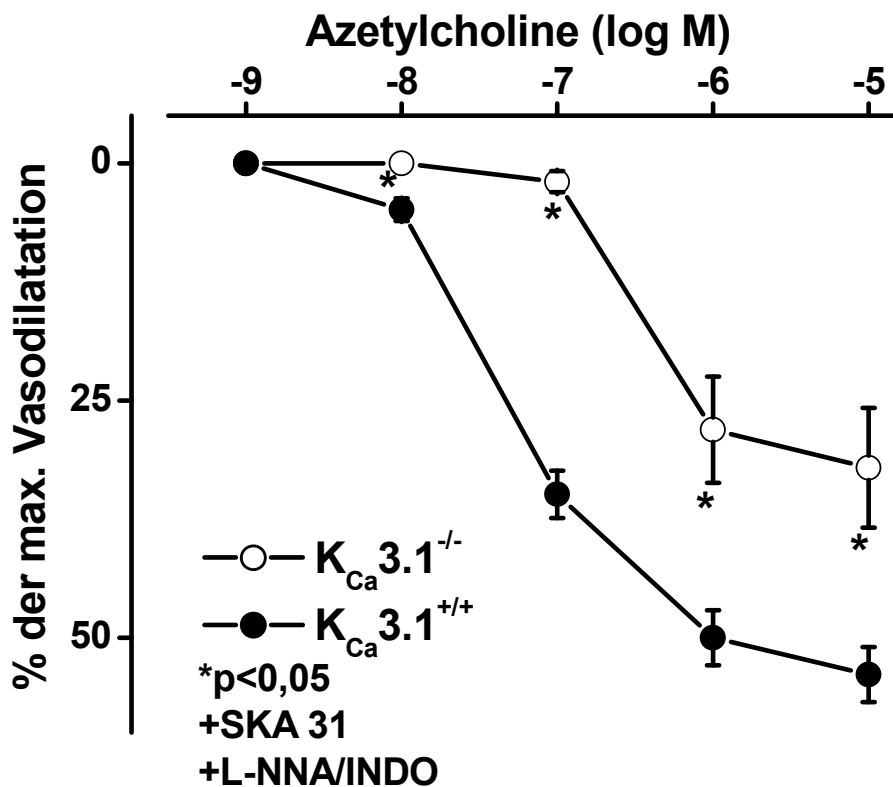


Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation, bei permanenter Anwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtyp- (n=10) und Knockoutmäusen (n=5) in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * p<0,05

Ebenfalls wurde die EDHF-vermittelten Vasodilatation von Wildtyp- ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) (n=7) und Knockouttieren ($K_{Ca}3.1^{-/-}$)(n=4) in Abwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L) im Perfusionsmedium untersucht. Die höheren verwendeten AzetylcholinKonzentrationen (100 nmol/L, 1 μ mol/L und 10 μ mol/L) zeigten eine Dilatation der WildtypTiergefäÙe, die signifikant stärker als die der Knockouttiere war (1 nmol/L). Bei den niedrigen Konzentrationen (1 nmol/L und 10 nmol/L) kam es bei beiden Versuchsgruppen zu keiner Vasodilatation.

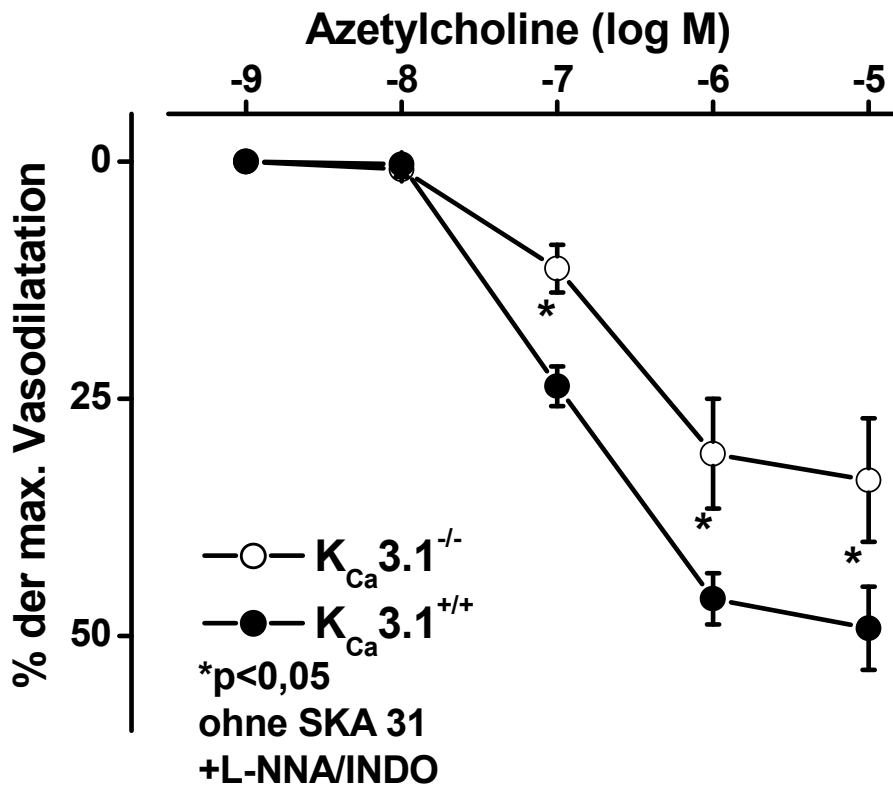


Abbildung 11: Konzentrationsabhängigkeit der Azetylcholin induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation, bei permanenter Abwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtyp- (n=7) und Knockoutmäusen (n=4) in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L). * p<0,05

4.2 Induktion der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31:

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob es durch die alleinige Applikation von SKA-31 (1 $\mu\text{mol/L}$) zu einer EDHF-vermittelten Vasodilatation kommt.

Bei einer Durchflusszeit von 15(n=2), 30 (n=2) und 60 (n=2) Sekunden kam es bei Wildtyptieren ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{+/+}$) zu keiner Vasodilatation.

4.3 Einfluss von SKA-31 auf die glattmuskuläre Funktion:

In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die dauerhafte Perfusion mit SKA-31 (200 nmol/L) einen Einfluss auf die Phenylephrin (1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L) bedingte Vasokonstriktion der Wildtypmäuse ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) hat. Bei keiner der getesteten Konzentrationen kam es durch die Perfusion mit SKA-31 zu einer Änderung des Kontraktionsverhaltens. Bei Stimulation mit (n=10) und ohne (n=7) SKA-31 kontrahierten die Gefäße erstmals ab einer Phenylephrin Konzentration von 10 nmol/L um ca. 12%, bei einer Konzentration von 100 nmol/L um ca. 44 % und bei einer Konzentration von 10 μ mol/L um ca. 81% der maximal möglichen Kontraktionsbreite.

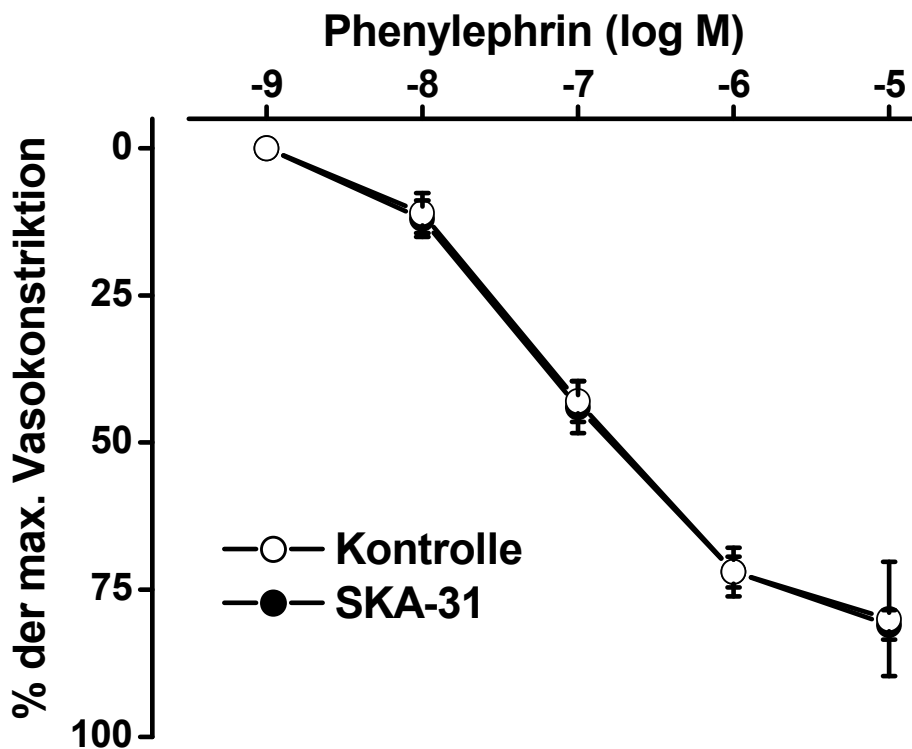


Abbildung 12: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- (n=10) bzw. Abwesenheit (n=7) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtypmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L).

In der zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die dauerhafte Perfusion mit SKA-31 (200 nmol/L) einen Einfluss auf die Phenylephrin (1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L) bedingte Vasokonstriktion der Knockoutmäuse (KCa3.1^{-/-}) hat. Es kam ebenfalls bei keiner der getesteten Konzentrationen durch die Perfusion mit SKA-31 zu einer Änderung des Kontraktionsverhaltens. Bei Stimulationen mit (n=5) und ohne (n=4) SKA-31 kontrahierten die Gefäße erstmals ab einer Phenylephrin-Konzentration von 10 nmol/L um ca. 12%, bei einer Konzentration von 100 nmol/L um ca. 45 % und bei einer Konzentration von 10 μ mol/L um ca. 81% der maximal möglichen Konzentration.

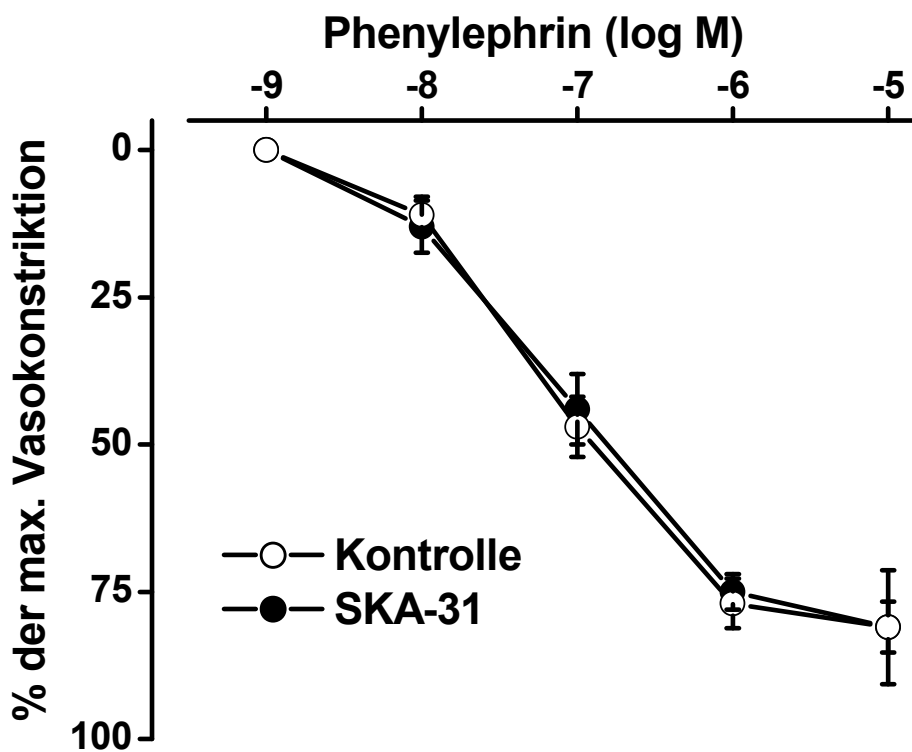


Abbildung 13: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- (n=5) bzw. Abwesenheit (n=4) von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von KCa3.1 Knockoutmäusen in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L).

Weiterhin zeigten Wildtyp- und Knockoutmäuse bei keiner der getesteten Phenylephrin-Konzentrationen (1nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L) einen Unterschied im Kontraktionsverhalten.

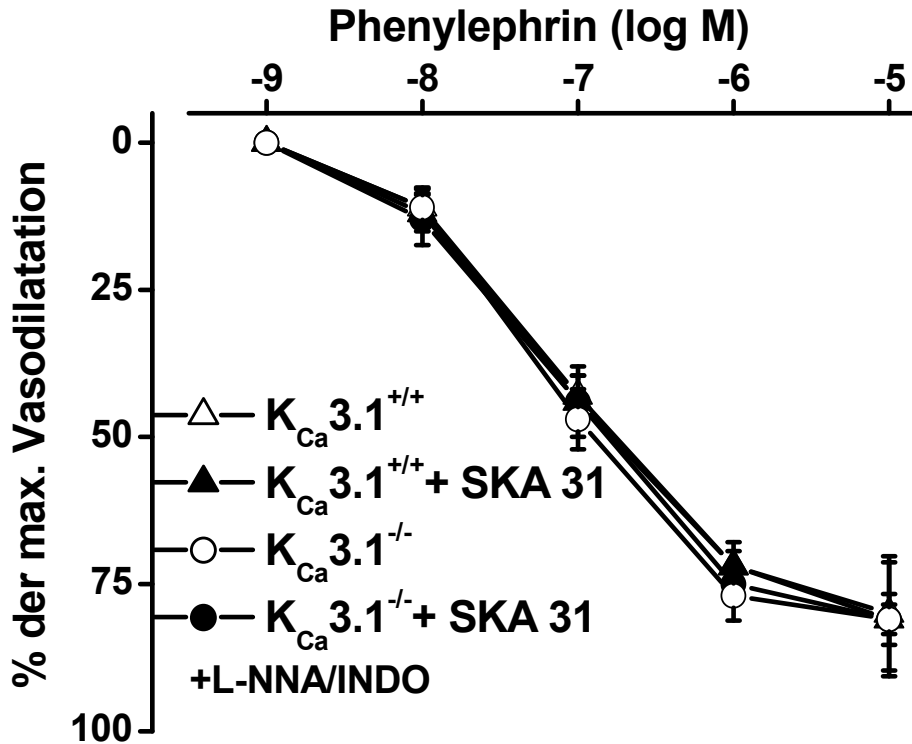


Abbildung 14: Konzentrationsabhängigkeit der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion, bei dauerhafter An- bzw. Abwesenheit von SKA-31 (200 nmol/L). Durchführung an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtyp- (n=15) und Knockoutmäusen (n=11) in Anwesenheit von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde an Wildtypmäusen ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) die maximale, durch Nitroprussid-Natrium ($10 \mu\text{mol/L}$; SNP) induzierte, Vasodilatation untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Sowohl die nur durch SNP ($n=7$) stimulierten, als auch die zusätzlich mit SKA-31 (200 nmol/L)($n=10$) perfundierten Gefäße zeigten eine maximale Vasodilatation von ca. $448 \mu\text{m}$ bzw. $452 \mu\text{m}$.

Ebenfalls wurde die maximale, durch Kalium (K60) induzierte, Vasokonstriktion untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die ohne Zusatz ($n=7$) durchgeführten Versuche zeigten eine maximale Kontraktion von ca. $321 \mu\text{m}$, die mit SKA-31 (200 nmol/L)($n=10$) perfundierten Gefäße von $302 \mu\text{m}$.

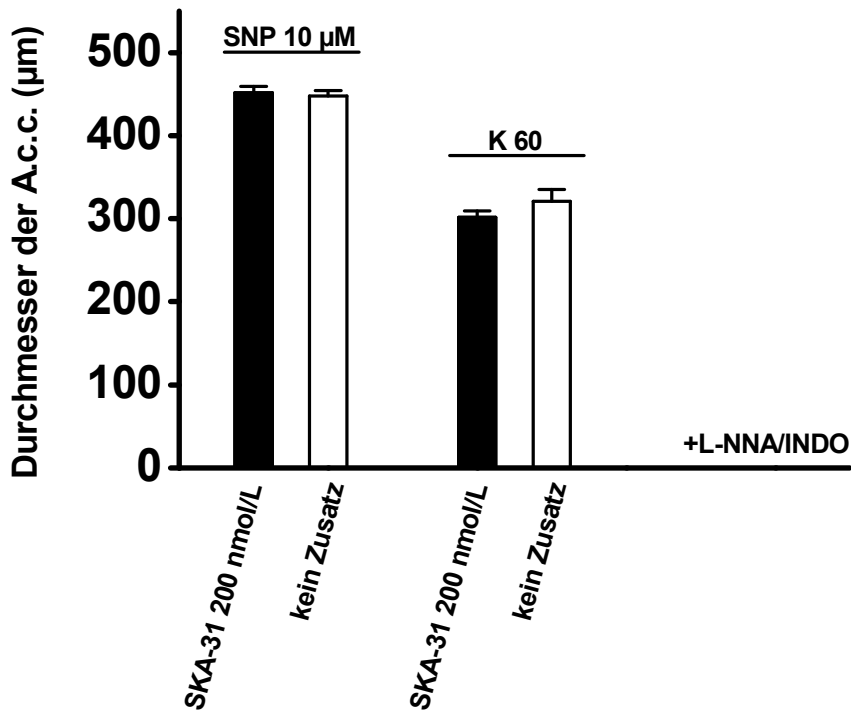


Abbildung 15: Darstellung der maximalen, durch SNP induzierten, Vasodilatation und der maximalen, durch K 60 induzierten, Vasokonstriktion. Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca}3.1$ Wildtypmäusen bei An- ($n=10$) bzw. Abwesenheit ($n=7$) von SKA-31 (200 nmol/L), in Anwesenheit von L-NNA ($300 \mu\text{mol/L}$) und Indomethazin ($10 \mu\text{mol/L}$).

Weiterhin wurde auch an Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) die maximale, durch Nitroprussid-Natrium (10 $\mu\text{mol/L}$; SNP) induzierte, Vasodilatation untersucht. Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Sowohl die nur durch SNP (n=4) stimulierten, als auch die zusätzlich mit SKA-31 (200 nmol/L)(n=5) perfundierten Gefäße, zeigten eine maximale Vasodilatation von ca. 483 μm bzw. 482 μm .

Ebenfalls wurde die maximale, durch Kalium (K60) induzierte, Vasokonstriktion untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die ohne Zusatz (n=4) durchgeführten Versuche zeigten eine maximale Kontraktion von ca. 347 μm , die mit SKA-31 (200 nmol/L)(n=10) perfundierten Gefäße von 335 μm .

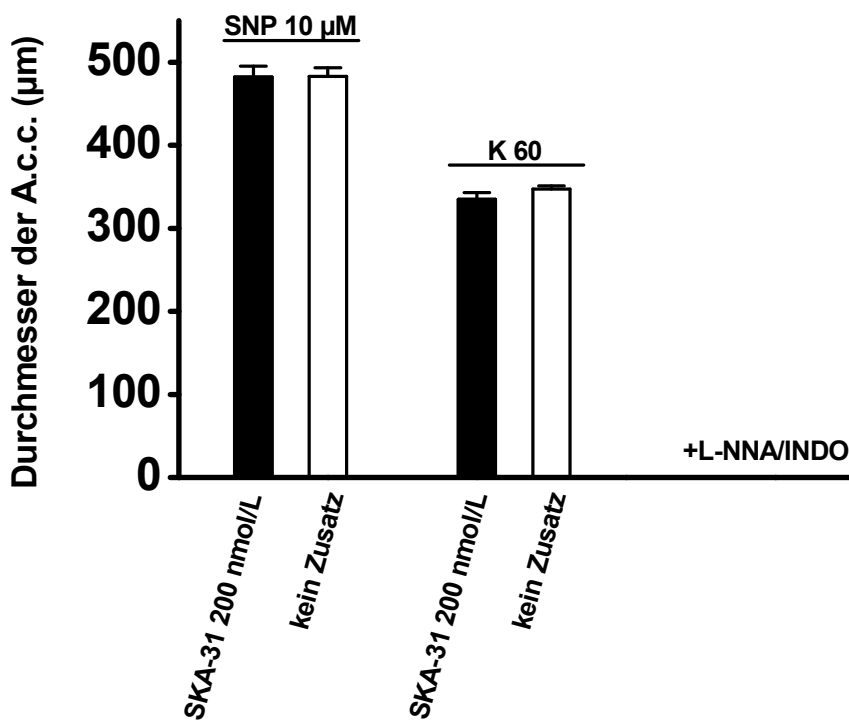


Abbildung 16: Darstellung der maximalen, durch SNP induzierten, Vasodilatation und der maximalen, durch K 60 induzierten, Vasokonstriktion. Durchgeführt an A.c.c. von $K_{Ca3.1}$ Knockoutmäusen bei An- (n=5) und Abwesenheit (n=4) von SKA-31 (200 nmol/L), in Anwesenheit von L-NNA (300 $\mu\text{mol/L}$) und Indomethazin (10 $\mu\text{mol/L}$).

4.4 Reagibilitätsbereich der Versuchsgefäße

Der ermittelte Gefäßreagibilitätsbereich der Arteriae carotis communis lag bei den Wildtyptieren ($K_{Ca3.1}^{+/+}$)(n=15) bei 141 μm . Bei den Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$)(n=11) bei 142 μm . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

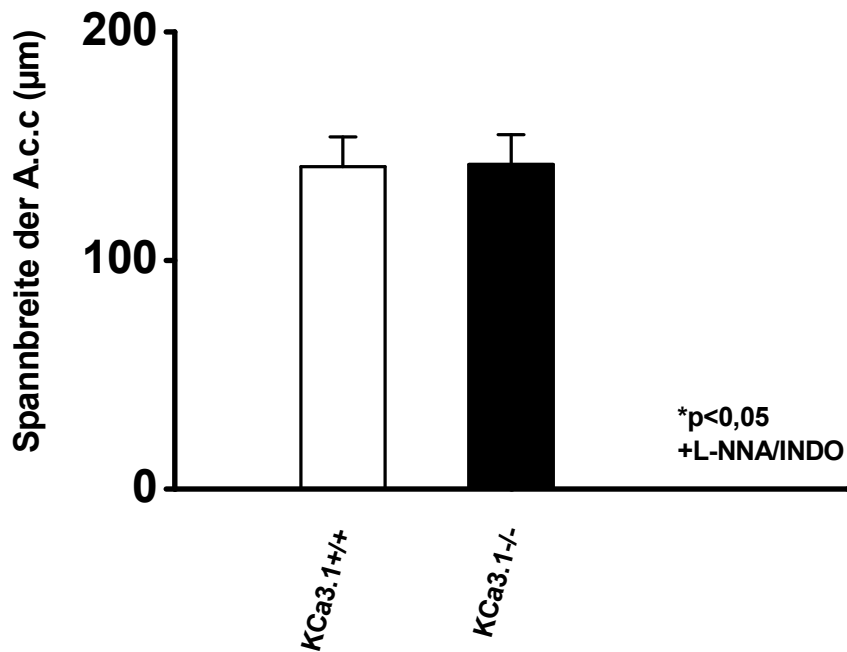


Abbildung 17: Darstellung des Gefäßreagibilitätsbereichs der A.c.c. von Wildtyp- (n=15) und Knockoutmäusen (n=11). Durchgeführt in Anwesenheit von L-NNA (300 $\mu\text{mol/l}$) und Indomethazin (10 $\mu\text{mol/L}$).

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluss des neuen $K_{Ca3.1}$ Kanalöffners SKA-31 auf die EDHF-vermittelte Vasodilatation und die glattmuskuläre Funktion zu untersuchen.

Die EDHF-Antwort ist neben NO und PGI_2 der dritte Hauptweg der endothelvermittelten Vasodilatation und eine selektive Öffnung des $K_{Ca3.1}$ Kanals könnte den Ansatzpunkt für eine neue Strategie zur Blutdrucksenkung darstellen (Feletou & Vanhoutte 2006, Sankaranarayanan et al. 2009).

Im Speziellen sollte an A.c.c. von Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) der Einfluss von SKA-31 auf die durch Azetylcholin induzierte Vasodilatation untersucht werden. Ebenfalls war es Ziel zu überprüfen, ob SKA-31 einen Einfluss auf die durch Phenylephrin und hohe Kaliumkonzentration induzierte Vasokonstriktion hat.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass SKA-31 die EDHF-vermittelte Vasodilatation deutlich potenziert und eine hohe Selektivität für den $K_{Ca3.1}$ Kanal besitzt. Auf die glattmuskuläre Funktion bestand kein Einfluss.

5.1 Potenzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass durch SKA-31 bei Co-Stimulation mit Azetylcholin die EDHF-vermittelte Vasodilatation von Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) um das ca. 2,5-fache potenziert wird. Bei Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) kam es hingegen erst ab einer ca. zehnmal höheren SKA-31 Konzentration (1 $\mu\text{mol/L}$) zu einer minimalen Potenzierung der Gefäßerweiterung.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass SKA-31 in der Lage ist, eine Azetylcholin induzierte und EDHF-vermittelte Vasodilatation bei Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) zu potenzieren. Weiterhin sprechen sie für eine hohe Selektivität von SKA-31, da es nur bei Anwesenheit des $K_{Ca3.1}$ Kanals zu einer deutlichen Potenzierung der Vasodilatation kommt. Die für eine halbmaximale Potenzierung nötige EC_{50} lag bei 93 nmol/L. Sie ist somit noch etwas geringer als die durch Sankaranarayanan et al. in Patch-Clamp Untersuchungen ermittelte EC_{50} für SKA-31 (Sankaranarayanan et al. 2009). So scheint es möglich, dass bereits eine Teilaktivierung der $K_{Ca3.1}$ Kanäle

ausreichend ist, um eine maximale Potenzierung der EDHF-Antwort zu induzieren. Ebenfalls decken sich die Untersuchungen an Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) mit den genannten Patch-Clamp Versuchen. In diesen konnte gezeigt werden, dass mikromolare SKA-31 Konzentrationen $K_{Ca2.x}$ Kanäle aktivieren. Diese sind wahrscheinlich ebenfalls in der Lage die EDHF-Antwort zu verstärken und möglicher Weise für die hier gezeigte geringe Potenzierung bei $K_{Ca3.1}$ Knockouttieren verantwortlich (Sankaranarayanan et al. 2009, Feletou & Vanhoutte 2006, Brähler et al. 2009).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde SKA-31 (200 nmol/L) permanent mit dem Perfusionsmedium appliziert. Diese Experimente, die mehr einer in-vivo Situation entsprechen, zeigten bei Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) eine signifikante Potenzierung, der durch niedrige Azetylcholin-Konzentrationen (10 nmol/L und 100 nmol/L) induzierten und EDHF-vermittelten Vasodilatation. Bei Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) kam es hingegen bei gleichem Versuchsaufbau zu keiner Potenzierung der EDHF-Antwort.

Diese Resultate bestätigen nicht nur die potenzierende Wirkung von SKA-31, sondern zeigen auch, dass besonders die niedrigen Konzentrationen eines vasoaktiven Faktors verstärkt werden. Weiterhin war bei einer Azetylcholin-Konzentration von 10 nmol/L nur mit SKA-31 eine signifikante Vasodilatation möglich. Dieses deutet darauf hin, dass eine Sensitivierung der EDHF-Antwort stattfindet und die für eine Vasodilatation benötigten Konzentrationen eines vasoaktiven Faktors sinken.

Die Befunde der mit Knockouttieren ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) durchgeführten Versuche bestätigen erneut, dass SKA-31 eine hohe Selektivität für den $K_{Ca3.1}$ Kanal besitzt.

Es sei hier jedoch angemerkt, dass die genaue Wirkungsweise von SKA-31 am Kanal noch nicht gänzlich verstanden wird und die Bindungsstelle von SKA in weiteren Studien noch definiert werden muss (Sankaranarayanan et al. 2009).

Beim Vergleich der an Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) durchgeführten Experimente zeigt sich eine deutlich stärkere Vasodilatation bei Anwesenheit des Kanals.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass der $K_{Ca3.1}$ Kanal bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation eine entscheidende Rolle spielt. Denn wird er nicht in den

Endothelzellen exprimiert, kommt es zu einer deutlich abgeschwächten EDHF-vermittelten Vasodilatation (Feletou & Vanhoutte 2006, Si et al. 2006).

5.2 Induzierung der EDHF-vermittelten Vasodilatation durch SKA-31

Die alleinige Applizierung von steigenden SKA-31 Konzentrationen führte bei Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) zu keiner Induktion einer EDHF-vermittelten Vasodilatation.

Dieses deutet darauf hin, dass SKA-31 den $K_{Ca3.1}$ Kanal nicht per se öffnet, sondern vielmehr nach einer primär Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung eine Schließung verhindert und den Kanal anschließend offen hält. Diese Modulation des Kanal-Gatings würde bei physiologischer Stimulation zu einer stärkeren und auch temporal längeren Hyperpolarisation des Endothels führen.

5.3 Einfluss von SKA-31 auf die glattmuskuläre Funktion

In den durchgeführten Versuchen kam es bei Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) durch SKA-31 zu keiner Änderung der endothelunabhängigen und durch Nitroprussid-Natrium bedingten Vasodilatation. Dieses deutet darauf hin, dass SKA-31 keinen Einfluss auf NO-abhängige Signalkaskaden hat.

Auch hatte die Anwesenheit von SKA-31 keinen Einfluss auf die durch spasmogene Kaliumkonzentrationen induzierte Vasokonstriktion. Da diese auf einer durch Depolarisation induzierten Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur beruht, kann hier auch davon ausgegangen werden, dass SKA-31 diese Ca^{2+} -Kanäle nicht moduliert. Dieses unterstreicht weiter die These, dass die Verstärkung der Vasodilatation endothelvermittelt ist und auf der Potenzierung endothelialer $K_{Ca3.1}$ Kanäle beruht. Hierfür spricht ebenfalls der Nebenbefund, dass die Deletion des $K_{Ca3.1}$ Kanals zu keiner Änderung der Gefäßreagibilität führte.

Bei der Untersuchung des Vasokonstriktionsverhaltens von Wildtyp- ($K_{Ca3.1}^{+/+}$) und Knockoutmäusen ($K_{Ca3.1}^{-/-}$) mit steigenden Konzentrationen Phenylephrin zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei An- und Abwesenheit von SKA-31. Es kann

also davon ausgegangen werden, dass SKA-31 keinen Einfluss auf die α_1 -Adrenozeptor vermittelte Signalkaskade der Vasokonstriktion hat. Ebenfalls scheint der $K_{Ca}3.1$ Kanal hier keine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SKA-31 und der $K_{Ca}3.1$ Kanal keinen Einfluss auf die glattmuskuläre Funktion der A.c.c. haben. Hieraus kann geschlossen werden, dass der $K_{Ca}3.1$ Kanal keine Bedeutung für die glattmuskuläre Funktion hat. Weiterhin zeigen sie eine hohe Selektivität des Öffners SKA-31, der wahrscheinlich keinen Einfluss über andere Kanäle nimmt.

5.4 Pharmakologische Bedeutung von SKA-31:

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass SKA-31 sehr selektiv, durch seine Wirkung auf endotheliale $K_{Ca}3.1$ -Kanälen, die EDHF-vermittelte Vasodilatation potenziert. Demnach ist es vorstellbar, dass über eine Verstärkung der EDHF-vermittelten Vasodilatation auch eine Blutdrucksenkung erzielt werden kann.

Hierzu wurden parallel zu der vorliegenden Studie telemetrische Blutdruckmessungen durchgeführt (Sankaranarayanan et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine singuläre i.p. Injektion von SKA-31 (10 mg/Kg) bei Wildtypmäusen ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) um 4 mmHg für 24 Stunden senkt. Weiterhin bestand eine Dosisabhängigkeit, so dass die i.p. Injektion einer höheren Konzentration SKA-31 (30 mg/Kg) zu einer Absenkung des MAPs um 6 mmHg führte. Bei Knockoutmäusen ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) war hingegen keine signifikante Blutdrucksenkung zu beobachten. Jedoch zeigte sich eine tendenzielle Blutdruckerniedrigung bei der hohen verwendeten Dosis (30 mg/Kg SKA-31). Dies ist wahrscheinlich auf die Wirkung von hohen SKA-31 Serumkonzentrationen an $K_{Ca}2.3$ Kanälen zurückzuführen und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Dissertation (Feletou & Vanhoutte 2006, Grgic et al. 2009).

Da diese Befunde dafür sprechen, dass SKA-31 zur Behandlung des Bluthochdrucks eingesetzt werden kann, wurden zur Unterstützung der These Versuche an hypertensiven Wildtypmäusen ($K_{Ca}3.1^{+/+}$) durchgeführt. Nachdem die Tiere den Vasokonstriktor Angiotensin erhalten hatten, konnte der MAP durch SKA-31 (30 mg/Kg) um 12 mmHg gesenkt werden.

Bei den Injektionen kam es zu keiner Erhöhung der Herzfrequenz und sie waren nicht mit Zeichen einer Toxizität behaftet (Sankaranarayanan et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass SKA-31 als Öffner des $K_{Ca}3.1$ Kanals, zur Blutdrucksenkung in vivo verwendet werden kann. Hierbei ist er sehr selektiv und zeigte bisher keine negativen Eigenschaften, die einen Einsatz ausschließen würden.

5.5 Ausblick

Die durch SKA-31 induzierte Blutdrucksenkung könnte somit eine neuartige endothelspezifische Behandlung der essentiellen arteriellen Hypertonie darstellen. Des Weiteren ist es vorstellbar, dass SKA-31 auch bei anderen kardiovaskulären Pathologien, bei denen eine verminderte Funktion des NO-Vasodilatationssystems und des EDHF-Systems vorliegt, eingesetzt werden könnte.

Eine weitere Therapieoption ergibt sich dadurch, dass SKA-31 neben der Affinität zu $K_{Ca}3.1$ Kanälen, in höheren Dosen auch eine Affinität zu $K_{Ca}2x$ Kanälen besitzt.

Die $K_{Ca}2x$ gelten hier als Zielstrukturen, da sie hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert werden und eine Rolle bei der Nachhyperpolarisation spielen. Es scheint somit möglich, dass SKA-31, wie die $K_{Ca}2x$ Kanalöffner EBIO und NS309, in der Lage ist, neuronale Impulse zu reduzieren (Pedarzani et al. 2001, Pedarzani et al. 2005). Es könnte somit eventuell als neues Medikament für Funktionsstörungen, wie zum Beispiel Epilepsie, Ataxie und neuropatische Schmerzen eingesetzt werden (Wulff et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnte das Anticonvulsant Screening Programm des US National Institute of Health im Mausmodell zeigen, dass SKA-31 vor Anfällen schützt (Köhler et al. 2010, Sankaranarayanan et al. 2009).

Literaturverzeichnis

- Barrett JN, Magleby KL, Pallotta BS. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol* 331:211-30
- Bond CT, Sprengel R, Bissonnette JM, Kaufmann WA, Pribnow D et al. 2000. Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, SK3. *Science* 289(5486):1942-6
- Brähler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wolfle SE, Busch C et al. 2009. Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation* 119(17):2323-32
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295):768-70
- Burgess GM, Claret M, Jenkinson DH. 1981. Effects of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. *J. Physiol* 317:67-90
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* 23(8):374-80
- Bychkov R, Burnham MP, Richards GR, Edwards G, Weston AH et al. 2002. Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF. *Br. J. Pharmacol.* 137(8):1346-54
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. 1996. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 78(3):415-23

- Cao YJ, Dreixler JC, Couey JJ, Houamed KM. 2002. Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. *Eur. J. Pharmacol.* 449(1-2):47-54
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell Physiol* 184(3):409-20
- Cheung DW, Chen G. 1992. Calcium activation of hyperpolarization response to acetylcholine in coronary endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12:S120-S123
- Cox DH, Cui J, Aldrich RW. 1997. Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol* 110(3):257-81
- De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. 1982. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222(1):166-73
- de Wit C, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O et al. 2000. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ. Res.* 86(6):649-55
- de Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U. 2003. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 13(2):169-77
- Debono MW, Le GJ, Canton T, Doble A, Pradier L. 1993. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 235(2-3):283-9
- del Valle-Rodriguez A, Lopez-Barneo J, Urena J. 2003. Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *EMBO J.* 22(17):4337-45

- Devor DC, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. 1996. Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Am. J. Physiol* 271(5 Pt 1):L775-L784
- Domino EF, UNNA KR, KERWIN J. 1952. Pharmacological properties of benzazoles. I. Relationship between structure and paralyzing action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 105(4):486-97
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM et al. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360):69-77
- Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57(5):906-12
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. 1998. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396(6708):269-72
- Edwards G, Feletou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, Weston AH. 1999. Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 128(8):1788-94
- Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S et al. 2003. Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 138(4):594-601
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K et al. 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J. Biol. Chem.* 274(9):5746-54
- Feletou M, Vanhoutte PM. 1988. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 93(3):515-24

- Feletou M, Vanhoutte PM. 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26(6):1215-25
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR et al. 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401(6752):493-7
- Fleming I, Busse R. 2006. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension* 47(4):629-33
- Fransen PF, Demolder MJ, Brutsaert DL. 1995. Whole cell membrane currents in cultured pig endocardial endothelial cells. *Am. J. Physiol* 268(5 Pt 2):H2036-H2047
- Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. 1995. Evidence for selective inhibition by lysophosphatidylcholine of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 116(1):1541-3
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-6
- Gardos G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 30(3):653-4
- Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, Reddy YK, Bondlela M et al. 2002. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ. Res.* 90(9):1028-36
- Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Kohler R. 2009. Endothelial Ca⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 157(4):509-26

- Griffith TM. 2004. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br. J. Pharmacol.* 141(6):881-903
- Grunnet M, Jespersen T, Angelo K, Frokjaer-Jensen C, Klaerke DA et al. 2001. Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology* 40(7):879-87
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA et al. 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 55(4):583-6
- Hille B, Armstrong CM, MacKinnon R. 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat. Med.* 5(10):1105-9
- Horrigan FT, Cui J, Aldrich RW. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents in the absence of Ca(2+). *J. Gen. Physiol* 114(2):277-304
- Huang A, Sun D, Jacobson A, Carroll MA, Falck JR, Kaley G. 2005. Epoxyeicosatrienoic acids are released to mediate shear stress-dependent hyperpolarization of arteriolar smooth muscle. *Circ. Res.* 96(3):376-83
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61(6):866-79
- Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94(21):11651-6
- Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H. 1992. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J. Physiol* 451:307-28

- Johns A, Freay AD, Adams DJ, Lategan TW, Ryan US, van BC. 1988. Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 Suppl 5:S119-S123
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365(9455):217-23
- Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV et al. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273(5282):1709-14
- Köhler R, Brakemeier S, Kuhn M, Behrens C, Real R et al. 2001. Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ. Res.* 89(2):174-9
- Köhler R, Degenhardt C, Kuhn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. 2000. Expression and function of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ. Res.* 87(6):496-503
- Köhler R, Hoyer J. 2007. The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models. *Kidney Int.* 72(2):145-50
- Köhler R, Kaistha BP, Wulff H. 2010. Vascular KCa-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 14(2):143-55
- Kruger O, Beny JL, Chabaud F, Traub O, Theis M et al. 2002. Altered dye diffusion and upregulation of connexin37 in mouse aortic endothelium deficient in connexin40. *J. Vasc. Res.* 39(2):160-72
- Lacy PS, Pilkington G, Hanvesakul R, Fish HJ, Boyle JP, Thurston H. 2000. Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 129(3):605-11

- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology. (Bethesda.)* 21:69-78
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360(9349):1903-13
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. 1991. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* 353(6346):752-6
- Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. 1997. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272(52):32723-6
- Moncada S, Vane JR. 1981. Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 294(1072):305-29
- Morimura K, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. 2006. Voltage-dependent Ca²⁺-channel block by openers of intermediate and small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in urinary bladder smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.* 100(3):237-41
- Nelson MT, Quayle JM. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol* 268(4 Pt 1):C799-C822
- Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. 1999. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ. Res.* 85(9):e33-e43
- Nilius B, Droogmans G. 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 81(4):1415-59

- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333(6174):664-6
- Pedarzani P, McCutcheon JE, Rogge G, Jensen BS, Christophersen P et al. 2005. Specific enhancement of SK channel activity selectively potentiates the afterhyperpolarizing current I(AHP) and modulates the firing properties of hippocampal pyramidal neurons. *J. Biol. Chem.* 280(50):41404-11
- Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D et al. 2001. Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276(13):9762-9
- Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8(1):37-44
- Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. 1998. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K⁺ channels. *Cardiovasc. Res.* 37(3):780-90
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. 1983. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306(5939):174-6
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101(3):746-52
- Richard V, Tanner FC, Tschudi M, Luscher TF. 1990. Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am. J. Physiol* 259(5 Pt 2):H1433-H1439
- Rosa JC, Galanakis D, Ganellin CR, Dunn PM, Jenkinson DH. 1998. Bis-quinolinium cyclophanes: 6,10-diaza-3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-diquinolinacyclodecaphane (UCL 1684), the first nanomolar, non-peptidic

- blocker of the apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J. Med. Chem.* 41(1):2-5
- Roux B. 2005. Ion conduction and selectivity in K⁽⁺⁾ channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:153-71
- Sankaranarayanan A, Raman G, Busch C, Schultz T, Zimin PI et al. 2009. Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa₂ and KCa_{3.1} potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. *Mol. Pharmacol.* 75(2):281-95
- Schumacher MA, Crum M, Miller MC. 2004. Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex. *Structure.* 12(5):849-60
- Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R et al. 1996. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28(5):703-11
- Si H, Heyken WT, Wolfle SE, Tysiac M, Schubert R et al. 2006. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circ. Res.* 99(5):537-44
- Silbernagel S., Pape H.C., Klinke R. 2005. *Physiologie*, pp. 122-126. Georg Thieme Verlag KG.
- Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. 2001. Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296(2):600-11

- Smith WL. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol* 263(2 Pt 2):F181-F191
- Soh H, Park CS. 2001. Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys. J.* 80(5):2207-15
- Song JH, Huang CS, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. 1997. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282(2):707-14
- Stocker M. 2004. Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(10):758-70
- Strobaek D, Teuber L, Jorgensen TD, Ahring PK, Kjaer K et al. 2004. Activation of human IK and SK Ca²⁺-activated K⁺ channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim. Biophys. Acta* 1665(1-2):1-5
- Taylor JH, Andrew TC, Evans WH, Tudor MG. 1998. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18-alpha glycyrrhetic acid. *British Journal of Pharmacology* 125(1):1-3
- Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE et al. 2003. Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.* 93(2):124-31
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(3):321-9
- Wagner C, de WC, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, Schweda F. 2007. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ. Res.* 100(4):556-63

- Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S et al. 2004. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 43(1):10-7
- Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM, Shakkottai V. 2007. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr. Med. Chem.* 14(13):1437-57
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T et al. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395(6701):503-7
- Yeh HI, Rothery S, Dupont E, Coppin SR, Severs NJ. 1998. Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. *Circ. Res.* 83(12):1248-63
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419(6902):35-42
- Zona C, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G. 1998. Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience* 85(3):931-8

Verzeichnis der akademischen Lehrer (Lübeck)

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Lübeck:

Busch, De Wit, Eggers, Hartmann, Hilgenfeld, Jelkmann, Klinger, Mesters, Pagel,
Peters, Schmielau, Weiss, Westermann

Verzeichnis der akademischen Lehrer (Marburg)

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff,
Eberhart, Görg, Grimm, Gudermann, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kaltenborn, Kann,
Klose, Köhler, Kroll, Lohoff, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Neubauer, Oertel,
Plant, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Sekundo, Stiller, Stempel,
Vogelmeier, Voigt, Werner, Wulf, Zemlin, Zettl

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Köhler zunächst für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas. Herrn Prof. Dr. Joachim Hoyer möchte ich für die großzügige Bereitstellung von Raum und Labormaterial danken, die für meine Arbeit nötig waren.

Schließlich möchte ich Ihnen für die überaus gute Betreuung und das sehr angenehme Arbeitsklima im Labor, bei den Auswertungen der Ergebnisse und beim Erstellen dieser schriftlichen Arbeit besonders danken.

Mein abschließender und größter Dank gilt meinen Eltern.