

***In vitro*-Analyse des Durchmessers zerebraler Arteriolen im
akuten Hirnschnitt der Maus unter der Wirkung von
Derivaten des oxidativen Hämabbaus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anna Schaeffgen
geboren am 14.03.1996 in Siegen

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Westerhausen, Jena
3. Prof. Dr. med. Jens P. Dreier, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung.....	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Subarachnoidalblutung.....	12
1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild.....	12
1.1.2 Verlauf und Komplikationen	13
1.2 Vasospasmus.....	14
1.2.1 Pathophysiologie.....	14
1.2.1.1 Inflammatorische Prozesse nach SAB	14
1.2.1.2 Verringerung der Stickstoffmonoxid-Verfügbarkeit	15
1.2.1.3 Hämoglobinabbauprodukte	15
1.2.2 Therapie.....	18
1.3 BK _{Ca} -Kanal	18
1.3.1 Kaliumkanäle zerebraler Arteriolen	18
1.3.2 Struktur des BK _{Ca} -Kanals.....	19
1.3.3 Regulation des Basaltonus	21
1.4 Beeinflussung des vaskulären Systems durch 20-HETE.....	23
1.5 Der BK _{Ca} -Kanalaktivator NS1619	25
1.6 Induktion der NO/cGMP-Signalkaskade durch Nahinfrarotillumination	28
2 Zielsetzung und Fragestellung.....	31
3 Materialien und Methoden	33
3.1 Versuchstiere	33
3.2 Genotypisierung	34
3.3 Artificielle Zerebrospinalflüssigkeit.....	36

3.4	Chemikalien.....	38
3.4.1	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit.....	38
3.4.2	Pharmakologische Substanzen.....	38
3.4.3	Hämabbauprodukte (HDPs).....	40
3.4.3.1	Gewinnung von Z-PDP A1/2 und Hämatinsäure	40
3.4.3.2	Z-BOX A und Z-BOX D.....	41
3.5	Präparation akuter Hirnschnitte	42
3.6	Mikroskopie	43
3.6.1	Mikroskopische Messung.....	43
3.6.2	Differentialinterferenzkontrast	44
3.6.3	Lichtabschirmung.....	44
3.6.4	Bestrahlung mit NIR-Licht	45
3.7	Versuchsdesign und Experimentalserien	45
3.8	Bestimmung des Gefäßdurchmessers	47
3.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	48
4	Ergebnisse	49
4.1	aCSF-Kontrollmessung an Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen	49
4.2	Vorspannung der Arteriolen mit L-NAME	50
4.3	Bestrahlung intrakortikaler Arteriolen mit Nahinfrarotlicht.....	51
4.4	Wirkung der Hämatinsäure.....	52
4.5	Wirkung von Z-BOX D	54
4.6	Wirkung von gemeinsam applizierten Z-PDP A1/2 und Z-BOX A	55
4.6.1	Mischapplikation von Z-PDP A1/2 (5 µM) und Z-BOX A (5 µM).....	56
4.6.2	Mischapplikation von Z-PDP A1/2 (0,5 µM) und Z-BOX A (0,05 µM)....	57
4.7	Wirkung von 20-HETE.....	58
4.8	Wirkung des 20-HETE-Synthese-Inhibitors HET0016	58
4.9	Effekt von HET0016 auf die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion.....	59

4.10	Effekt von NS1619 auf die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion.....	61
5	Diskussion	63
5.1	Methoden	63
5.1.1	Verwendung eines Mausmodells mit konventionellem Knockout.....	63
5.1.2	Präparation und Verwendung akuter Hirnschnitte der Maus.....	64
5.1.3	Auswertung des Gefäßinnendurchmessers	65
5.1.4	Vorspannung zerebraler Arteriolen mit L-NAME	67
5.1.5	Vitalitätsbeurteilung und vasokonstriktorisches Potenzial	69
5.2	Ergebnisse	70
5.2.1	NIR-Illumination bewirkt keinen gefäßerweiternden Effekt.....	71
5.2.2	Wirkung von HA und Z-BOX D auf den Gefäßdurchmesser	72
5.2.3	Fehlender additiver Effekt bei Mischapplikation von PDP und BOX	74
5.2.4	Regulierung des Durchmessers zerebraler Arteriolen durch 20-HETE .	75
5.2.5	NS1619 verhindert die vasokonstriktorische Wirkung von Z-PDP A1/2	79
6	Schlussfolgerung	80
7	Literaturverzeichnis	82
8	Danksagung.....	100
9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
5-HT	Serotonin
AA	<i>arachidonic acid</i> (Arachidonsäure)
Abb.	Abbildung
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> (artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit)
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Arg-213	Arginin-213
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca} -Kanal	spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit für Kaliumionen (<i>big conductance</i>)
BOXes	Bilirubinoxidationsendprodukte
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6J	Mausstamm aus dem <i>Jackson Laboratory</i>
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD	<i>charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil)
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i> (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> (Zerebrospinalflüssigkeit)
CYP	Cytochrom P450
DCI	<i>delayed cerebral ischemia</i> (verzögerte zerebrale Ischämie)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor(en)
DIC	<i>differential interference contrast</i> (differentieller Interferenzkontrast)
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum

E-Selektin	Endothel-Selektin
ET-1	Endothelin-1
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i> (Fluoreszenz-Erholung nach Photobleichung)
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	<i>hematinic acid</i> (Hämatinsäure)
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDP	<i>heme degradation product</i> (Hämabbauprodukt)
HO	Hämoxygenase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IAAC	Institut für Anorganische und Analytische Chemie
IbTX	Iberiotoxin
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IK _{Ca} -Kanal	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit für Kaliumionen (<i>intermediate conductance</i>)
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IMR	Intermembranraum
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IP ₃ R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat
K ⁺	Kaliumion
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _{Ca} -Kanal	kalziumgesteuerter Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KCNMA1	<i>potassium large conductance calcium activated channel subfamily M, alpha member 1</i>

KCNMB	<i>potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M, beta member</i>
K _{ir} -Kanal	einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal
KO	Knockout
K _v -Kanal	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
l	Liter
LED	<i>light-emitting diode</i> (lichtemittierende Diode)
LLLT	Low-Level-Lasertherapie
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methylester
LRRC	<i>leucine-rich repeat containing protein</i>
M	molar
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i> (Myosin-leichte-Ketten-Kinase)
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i> (Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase)
mm	Millimeter
mSlo1	<i>mouse Slo1</i>
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NIR	Nahinfrarot
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase, NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDPs	Propentdyopents
PKC	Proteinkinase C

PKG	Proteinkinase G
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RCK	<i>regulator of K⁺ conductance</i> (Regler der Kalium-Leitfähigkeit)
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SK _{Ca}	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit für Kaliumionen (<i>small conductance</i>)
Slo1	<i>slowpoke</i> (Gen für die α -Untereinheit des BK _{Ca} -Kanals)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TLT	transkranielle Lasertherapie
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPC6	<i>transient receptor potential cation channel subfamily C member 6</i>
TRPM4	<i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 4</i>
UV/Vis	<i>ultraviolet and visible</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSD	<i>voltage sensor domain</i> (Spannungssensordomäne)
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> (glatte Gefäßmuskelzelle)
Wdh.	Wiederholung
WT	Wildtyp
xg	x-fache Erdbeschleunigung

Zusammenfassung

Der zerebrale Vasospasmus stellt neben der Rezidivblutung und dem Hydrozephalus eine der häufigsten Komplikationen nach einer Subarachnoidalblutung (SAB) dar. Er tritt zwischen Tag 3 und 21 nach SAB auf, wobei sich ein Inzidenzgipfel zwischen Tag 5 und 7 zeigt. Symptomatisch wird der Vasospasmus in Form einer verzögerten zerebralen Ischämie (*delayed cerebral ischemia*), die sich in der Entwicklung fokaler neurologischer Defizite äußert. Derzeit stellt er in etwa 5 % der Fälle die primäre Todesursache nach einer SAB dar und trägt daher bei betroffenen Patienten zur Prognose bei. Die Möglichkeiten bei einem symptomatisch werdenden Vasospasmus zu intervenieren oder prophylaktische Maßnahmen zu ergreifen sind trotz intensiver Forschung weiterhin sehr begrenzt. Für die Entwicklung neuer und effizienter Therapiealternativen ist daher die weitere Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge beim Vasospasmus unabdingbar. In seiner Ätiologie rückten in den letzten Jahren vor allem die in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von SAB-Patienten nachgewiesenen Produkte des oxidativen Häm- und Bilirubin-Abbaus – darunter die Propentdyopents (PDPs) und Bilirubinoxidationsendprodukte (BOXes) – in den Vordergrund. Es zeichnet sich zunehmend ab, dass der gefäßverengende Effekt dieser Abbauprodukte über eine Hemmung des BK_{Ca}-Kanals vermittelt wird. Neben den Hämabbauprodukten konnte in der CSF von SAB-Patienten auch eine erhöhte Konzentration des Arachidonsäurestoffwechselprodukts 20-HETE festgestellt werden. Auch dieses übt einen hemmenden Effekt auf den BK_{Ca}-Kanal aus, dem daher eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des Vasospasmus zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Derivate des Häm- und Bilirubin-Abbaus separat oder in Kombination im Hinblick auf ihre Vasoaktivität untersucht. Darüber hinaus wurden pharmakologische Substanzen untersucht, die potenziell einer Gefäßverengung entgegenwirken könnten und somit für präventive Interventionen in Frage kommen würden. Im Hinblick auf eine nichtinvasive Therapieform wurde zusätzlich die in der Literatur beschriebene vasodilatative Wirkung von Nahinfrarot (NIR)-Licht überprüft. Für die Beantwortung dieser Fragestellungen wurde ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Vasoreaktivität intrakortikaler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus verwendet. Die zeitliche Änderung des Gefäßdurchmessers nach Substanzapplikation wurde mittels differentieller Interferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie bestimmt.

Die Einzelapplikation von Z-BOX D – einem neueren hypothetischen Mitglied der BOXes-Familie – und der beim Hämabbau anfallenden Hämatinsäure bewirkte bei Arteriolen in Hirnschnitten von Slo1-Wildtyp-Mäusen keine signifikante Änderung des Gefäßdurchmessers. Die gemeinsame Applikation von den vasokonstriktorisch wirkenden Z-BOX A und Z-PDP A1/2 bewirkte eine Gefäßverengung, die in ihrem Umfang aber nicht stärker ausgeprägt war als bei Einzelapplikation dieser Substanzen. Hingegen konnte der Einsatz der potenziell präventiv wirkenden pharmakologischen Substanzen NS1619, ein BK_{Ca}-Kanalaktivator, und HET0016, ein kompetitiver Inhibitor der 20-HETE-Synthese, die Z-PDP A1/2-induzierte Gefäßverengung verhindern. Somit scheint der endogene 20-HETE-Stoffwechsel ein entscheidender Faktor in der Ätiologie des Vasospasmus zu sein. Die Hemmung der 20-HETE-Synthese stellt daher einen vielversprechenden präventiven Therapieansatz bei der Behandlung des Vasospasmus dar. Auch der BK_{Ca}-Kanal ist nach wie vor aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Vasospasmusentstehung ein potenzieller Angriffspunkt für eine kausale Therapie, was durch den gezeigten präventiven Effekt von NS1619 bestätigt wurde. Die Bestrahlung der Arteriolen mit NIR-Licht zeigte dagegen keinen positiven Effekt auf den Gefäßdurchmesser. Ein möglicher therapeutischer Nutzen durch NIR-Bestrahlung kann basierend auf diesen Ergebnissen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht abgeleitet werden.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass Z-BOX D und die Hämatinsäure im Gegensatz zum endogenen 20-HETE-Stoffwechsel keine große Bedeutung bei der Entstehung des Vasospasmus haben und sich die Hämabbauprodukte in ihrem vasokonstriktorischen Effekt wahrscheinlich nicht gegenseitig verstärken. Die hier gewonnenen Ergebnisse bilden eine Grundlage für die Entwicklung kausal wirksamer therapeutischer Interventionen. Dabei sind Inhibitoren der 20-HETE-Synthese und Aktivatoren des BK_{Ca}-Kanals erfolgsversprechende Therapieansätze, die in künftigen Studien weiter erforscht werden sollten, um herauszufinden, ob der Einsatz dieser Substanzen auch potenziell beim Menschen möglich ist.

1 Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist definiert als eine akute arterielle Blutung in den mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum zwischen Arachnoidea und Pia mater (Sacco et al. 2013, Bendszus et al. 2016). Etwa 5 % aller Schlaganfälle werden durch eine SAB ausgelöst. Betroffen sind dabei vor allem Erwachsene in der 5. und 6. Dekade, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt (de Rooij et al. 2007, Petridis et al. 2017). Darüber hinaus sind Frauen etwas häufiger betroffen als Männer (de Rooij et al. 2007, Shea et al. 2007). Die weltweite Inzidenz wird derzeit mit etwa 9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner angegeben (de Rooij et al. 2007, Steiner et al. 2013). 12,4 % der Patienten sterben noch bevor sie das Krankenhaus erreichen (Huang und van Gelder 2002) und nur ein Drittel der überlebenden Patienten können ihrer ehemaligen Beschäftigung wieder vollständig nachkommen (Passier et al. 2011).

Die relevanteste Ursache einer SAB liegt mit etwa 85 % in der Ruptur eines Aneurysmas, einer arteriellen Gefäßaussackung. Aneurysmen der intrakraniellen Gefäße weisen überwiegend eine sakkuläre Form auf und treten vorzugsweise am Circulus arteriosus und seinen nahgelegenen Gabelungsstellen an der Hirnbasis auf (van Gijn et al. 2007, Bendszus et al. 2016). Dabei können genetisch bedingte Bindegewebserkrankungen, wie das Ehlers-Danlos-Syndrom (Pepin et al. 2000), oder erworbene Gefäßwandveränderungen, wie sie beispielsweise bei der Atherosklerose zu finden sind (Starke et al. 2013), für die Entstehung einer Gefäßaufweitung verantwortlich sein. Bluthochdruck, Rauchen, Alkohol- und Drogenmissbrauch stellen Risikofaktoren dar, die die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas begünstigen (Connolly et al. 2012).

1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Klinisch manifestiert sich die SAB in einem sogenannten „Vernichtungskopfschmerz“, der das Leitsymptom der SAB darstellt und unter anderem infolge der intrakraniellen Drucksteigerung ausgelöst wird (Dilli 2014). Begleitend können Nackensteifigkeit, Bewusstlosigkeit und neurologische Defizite, aber auch vegetative Symptome wie Blutdruckerhöhung, Übelkeit und Erbrechen auftreten (Fontanarosa 1989, Kundra et al. 2014). Bei 10-43 % aller Patienten zeigte sich der SAB vorausgehend bereits ein

starker Kopfschmerz, verursacht durch eine sogenannte Warnblutung (Polmear 2003). Diese ist bei noch unbehandeltem Aneurysma mit einem 10-fach erhöhten Risiko für eine frühe Rezidivblutung verbunden (Beck et al. 2006).

1.1.2 Verlauf und Komplikationen

Nach einer SAB stellen Rezidivblutung, zerebraler Vasospasmus und Hydrozephalus die drei Hauptkomplikationen dar. Sie gelten aufgrund ihrer Wichtigkeit als prognosebestimmend und treten mit einem charakteristischen Zeitprofil auf (Abb. 1).

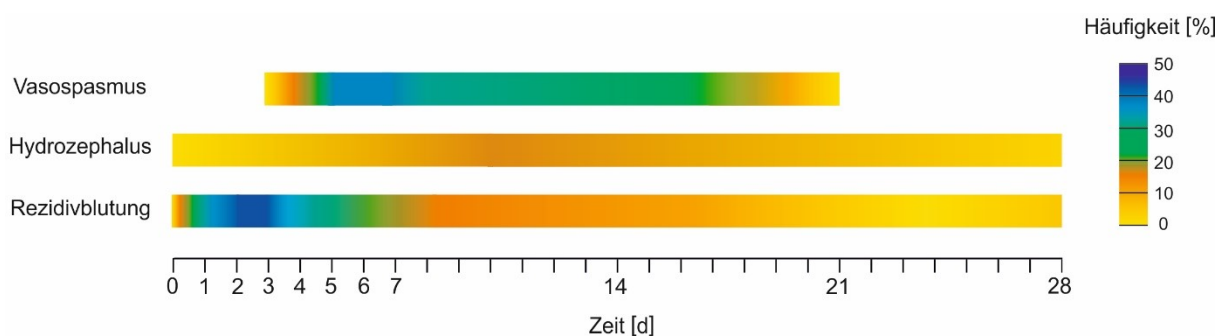


Abb. 1: Darstellung der Häufigkeit und des zeitlichen Auftretens der drei Hauptkomplikationen nach SAB (modifiziert nach Bendszus et al. 2016).

Die Rezidivblutung erreicht drei bis vier Tage nach dem Ereignis ihre maximale Häufigkeit (Bendszus et al. 2016). Das kumulative Risiko, eine erneute Blutung innerhalb der ersten 21 Tage zu erleiden, liegt bei 39 %, sofern das Aneurysma unbehandelt bleibt (Brilstra et al. 2002). Die Prognose ist schlecht, da 78 % der Patienten mit Rezidivblutung aufgrund dieser Komplikation versterben, sich im Wachkoma befinden oder schwere Behinderungen davontragen (Roos et al. 2000). Aufgrund dieser Tatsache sollte eine zeitnahe Behandlung des Aneurysmas angestrebt werden, um ein besseres klinisches Ergebnis zu erzielen (de Gans et al. 2002, Phillips et al. 2011, Steiner et al. 2013). Für die Behandlung stehen das mikrochirurgische Clipping und das endovaskuläre Coiling zur Verfügung. Kann das Aneurysma durch beide Methoden gleichwertig effektiv behandelt werden, sollte dem Coiling der Vorzug gegeben werden (Steiner et al. 2013). In Deutschland werden derzeit 66 % der Aneurysmen bei SAB endovaskulär behandelt (Janssen et al. 2017).

Der Hydrozephalus geht mit einer intrakraniellen Drucksteigerung einher und ist Folge einer eingeschränkten Liquorzirkulation und -resorption, die durch entstehende

Blutgerinnsel nach SAB hervorgerufen werden (Oyama und Criddle 2004). Er kann akut innerhalb der ersten 72 h, aber auch erst nach zwei Wochen auftreten (Chen et al. 2017), wobei die Inzidenz etwa 18 % beträgt (Lu et al. 2012). Bei 30 % der Betroffenen ist der Hydrozephalus innerhalb der ersten 48 h spontan reversibel, sodass keine spezifische Therapie erfolgen muss (Lu et al. 2012).

Der Vasospasmus tritt zwischen Tag 3 und 21 nach SAB auf, wobei sich ein Inzidenzgipfel zwischen Tag 5 und 7 zeigt (Corsten et al. 2001). Innerhalb der zweiten Woche nach Blutungsereignis lässt sich bei etwa 70 % der Patienten angiographisch ein Vasospasmus nachweisen, aber nur etwa 30 % der Patienten entwickeln einen symptomatischen Vasospasmus (Dorsch und King 1994), der sich als verzögerte zerebrale Ischämie (*delayed cerebral ischemia, DCI*) äußert. Diese ist durch die Entwicklung fokaler neurologischer Defizite wie Aphasien, Hemiparesen und Vigilanzstörung gekennzeichnet (Vergouwen et al. 2010) und stellt in 5 % der Fälle die primäre Todesursache nach SAB dar (Lantigua et al. 2015).

1.2 Vasospasmus

1.2.1 Pathophysiologie

Der Ätiologie des zerebralen Vasospasmus liegen verschiedene Theorien zugrunde. Insbesondere werden die Freisetzung potenzieller spasmogener Substanzen durch die Erythrozytenlyse und inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand als Hauptmechanismen diskutiert. Auch das Arachidonsäurestoffwechselprodukt 20-HETE nimmt bei der Vasospasmusentstehung eine entscheidende Rolle ein und wird in Abschnitt 1.4 näher behandelt.

1.2.1.1 Inflammatorische Prozesse nach SAB

Für die Annahme eines inflammatorisch verursachten Vasospasmus sprechen vor allem die Resultate von Liquoruntersuchungen: SAB-Patienten, die einen symptomatischen Vasospasmus entwickelten, wiesen eine signifikant höhere Konzentration von IL-6 und IL-8 an Tag 5 und 7 auf. Dabei scheint vor allem IL-6 von großer Relevanz zu sein, da es bei intrazisternaler Injektion im Tiermodell einen langanhaltenden vasokonstriktorisches Effekt zeigte (Osuka et al. 1998). Auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 (Kaynar et al. 2004) oder das E-Selektin

(Tanriverdi et al. 2005) waren in Liquorproben deutlich erhöht. Adhäsionsmoleküle sind Vermittler der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel, die den Leukozyten im Rahmen der inflammatorischen Reaktion die Extravasation ermöglichen (Muller 2002). Für das E-Selektin konnte zusätzlich ein Zusammenhang zwischen starker Konzentrationserhöhung und dem Auftreten eines Vasospasmus gefunden werden (Polin et al. 1998).

1.2.1.2 Verringerung der Stickstoffmonoxid-Verfügbarkeit

Eine Verengung des Gefäßlumens nach SAB führt in den betroffenen Bereichen zu erhöhten Scherkräften an der Gefäßwand, wodurch eine Stimulierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) induziert wird (Ignarro 2002). Dennoch kommt es zu einer Verringerung der NO-Verfügbarkeit, wodurch das Gleichgewicht zwischen Endothelin-1 (ET-1) und NO beeinträchtigt wird (Hirose et al. 1995). Hintergrund des NO-Mangels ist das zeitgleiche Auftreten einer Erhöhung an Hyperoxiden, was auf eine Entkopplung der eNOS schließen lässt und vermutlich die oxidative Stresssituation nach SAB weiter verschärft (Sabri et al. 2011). Auch kommt es in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) zu einem Konzentrationsanstieg des endogenen kompetitiven eNOS Inhibitors ADMA, der das Gleichgewicht zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Effektoren stört und mit dem Schweregrad des Vasospasmus korreliert (Jung et al. 2004). Auch Hämoglobin (Hb) nimmt Einfluss auf dieses Gleichgewicht: Indem NO durch freies Hämoglobin gebunden wird (NO-Scavenging), wird die NO-Verfügbarkeit verringert (Donadee et al. 2011, Helms et al. 2018). Ferner stimuliert Hb die ET-1-Produktion in Endothelzellen (Cocks et al. 1991). Dementsprechend ist ET-1 ebenfalls ein wichtiger Einflussfaktor, vor allem dadurch, dass eine erhöhte Liquorkonzentration mit dem Auftreten eines Vasospasmus assoziiert ist (Mascia et al. 2001, Thampatty et al. 2011).

1.2.1.3 Hämoglobinabbauprodukte

An der Entwicklung des Vasospasmus ist auch das durch die Erythrozytenlyse im subarachnoidalen Blutgerinnsel freigesetzte Lysat beteiligt (Osaka 1977, Peterson et al. 1990). Das Schlüsselmolekül bildet dabei das Hämoglobin: Es zeigt selbst vasoaktives Potenzial (Tanishima 1980) und stellt überdies das Ausgangsprodukt des enzymatisch gesteuerten Häm-Abbaus dar (Abb. 2). Das aus Hämoglobin freigesetzte

Häm reagiert zunächst über einen enzymatischen Weg zu Bilirubin. In einem ersten Schritt wird Häm durch die Häm-Oxygenase (HO) zu Biliverdin, CO und Eisen (Fe^{2+}) umgesetzt. (Clark und Sharp 2006). Es gibt zwei Isoenzyme der HO: die HO-2 wird konstitutiv insbesondere von Neuronen und Endothelzellen exprimiert, während die HO-1 als induzierbares Hitzeschockprotein hauptsächlich in der Mikroglia vorkommt (Sharp et al. 1999) und als Reaktion auf Häm (Turner et al. 1998) oder oxidativen Stress (Applegate et al. 1991) synthetisiert wird. Aus dem entstehenden Biliverdin wird mithilfe der Biliverdin-Reduktase anschließend Bilirubin gebildet (Clark und Sharp 2006).

Der weitere Bilirubinabbau erfolgt über einen nicht-enzymatischen oxidativen Weg zu den Abbauprodukten höherer Ordnung (Seidel et al. 2017), zu denen als Endprodukt die sogenannten Bilirubinoxidationsendprodukte (BOXes) zählen (Kranc et al. 2000, Pyne-Geithman et al. 2005, Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019b). Oxidativer Stress, erhöhte HO-1- und Bilirubinkonzentrationen stellen notwendige Bedingungen für die Bildung der BOXes dar und wurden in dieser Konstellation in der CSF von Vasospasmus-Patienten nachgewiesen (Pyne-Geithman et al. 2005). Die Bildung der BOXes erfolgt über Intermediate, den dipyrrolischen Propentdyopents (PDPs), von denen zwei Isomerenpaare bekannt sind (Abb. 2). Aus dem Isomerenpaar Z-PDP A1/2 leitet sich das Monopyrrol Z-BOX A und äquivalent dazu aus dem Isomerenpaar Z-PDP B1/2 das Monopyrrol Z-BOX B ab (Ritter et al. 2016). In Liquorproben von Patienten mit Vasospasmus konnten erhöhte Konzentrationen von PDPs und BOXes festgestellt werden (Joerk et al. 2019b). Sowohl die Monopyrrole Z-BOX A und Z-BOX B (Kranc et al. 2000, Clark et al. 2002, Joerk et al. 2014) als auch die Intermediate Z-PDP A1/2 und Z-PDP B1/2 weisen *in vitro* und *in vivo* vasokonstriktische Eigenschaften auf (Joerk et al. 2019b). Dabei zeigte sich eine BK_{Ca} -Kanalabhängigkeit der beobachteten Gefäßverengungen (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019b).

Beim oxidativen *in vitro*-Bilirubinabbau konnten neben den oben genannten Abbauprodukten auch die Monopyrrole Z-BOX C und die Hämatinsäure (*hematinic acid*, HA) isoliert werden, die sich von beiden Isomerenpaaren der PDPs ableiten können (Ritter et al. 2018). Z-BOX C zeigte im *in vitro*- und *in vivo*-Versuch BK_{Ca} -Kanal-abhängig ebenfalls vasokonstriktische Eigenschaften (Langguth 2019), während die Wirkung der Hämatinsäure noch ungeklärt ist und daher Gegenstand

dieser Arbeit sein soll. Z-BOX D als regioisomere Form von Z-BOX C konnte als Abbauprodukt bisher noch nicht nachgewiesen werden und stellt daher nach derzeitigem Kenntnissstand nur ein hypothetisches Mitglied der BOXes dar. Allerdings besteht die Möglichkeit, Z-BOX D auf synthetischem Wege zu erzeugen (Schulze et al. 2019), weshalb es ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein soll.

Insgesamt lässt sich über den Erklärungsansatz der Hämoglobinabbauprodukte insbesondere das zeitlich verzögerte Auftreten des Vasospasmus erklären, da die Bildung der vasokonstriktorisch wirksamen Produkte einen dem Vasospasmus vergleichbaren Zeitverlauf aufweist (Pyne-Geithman et al. 2005).

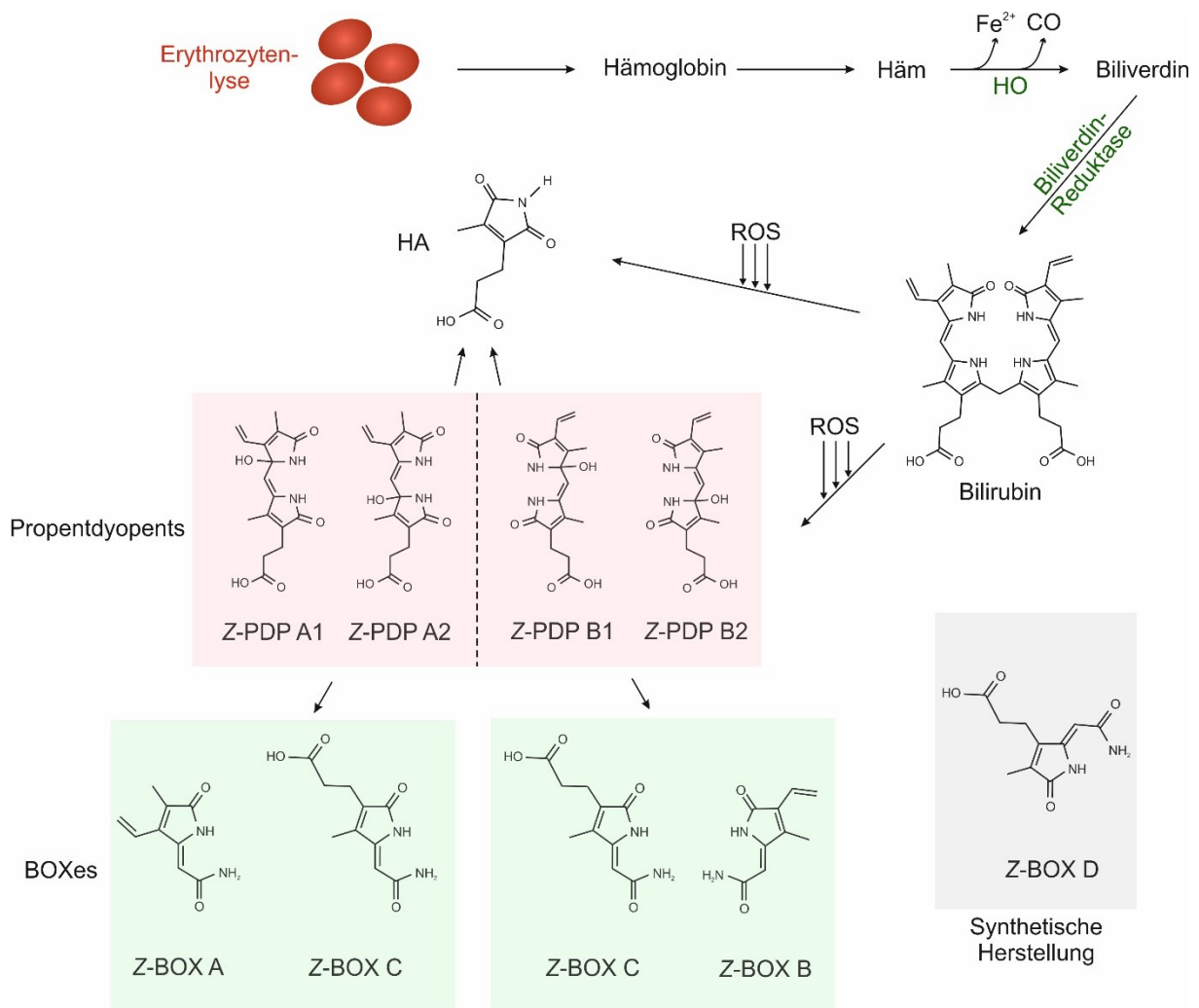


Abb. 2: Schematische Darstellung des Degradationsprozesses und der Entstehung der Hämabbauprodukte ausgehend von der erythrozytären Lyse. Zu den Abbauprodukten höherer Ordnung zählen die dargestellten PDPs, BOXes – mit Ausnahme von Z-BOX D – und die Hämätsäure (HA).

1.2.2 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten des Vasospasmus sind sehr begrenzt. Die orale Gabe des Dihydropyridin-Derivats Nimodipin (Nimotop®) alle 4 Stunden über einen Zeitraum von 21 Tagen ist derzeit die einzige gesichert wirkungsvolle Primärprophylaxe (Steinmetz 2012). Nimodipin verhindert den Kalziumeinstrom durch Blockade von spannungsabhängigen Kalziumkanälen vom L-Typ (Dihydropyridin-Rezeptor, DHPR). Insgesamt konnte durch eine Nimodipin-Therapie die Vasospasmusrate (Mijailovic et al. 2013), das Risiko zu versterben und das Auftreten sekundärer Ischämien (Dorhout Mees et al. 2007) reduziert werden. Dabei scheint vornehmlich die neuroprotektive Wirkung des Nimodipins (Raabe et al. 2005, Rabinstein et al. 2010) und die Verbesserung der pialen Kollateralisierung (Raabe et al. 2005) für die Erzielung eines besseren klinischen Ergebnisses ausschlaggebend zu sein. Allerdings muss bedacht werden, dass bei der Nimodipin-Therapie auch Nebenwirkungen wie Blutdrucksenkung, temporäre hepatobiliäre Störungen und gastrointestinale Störungen auftreten können (Raabe et al. 2005).

Für einen in Form einer DCI symptomatisch werdenden Vasospasmus wird aktuell zur Behandlung eine induzierte Hypertension empfohlen, die damit das bisherige Konzept der hypertensiven hypervolämischen Hämodilution im Sinne der „*Triple-H Therapy*“ ersetzt (Connolly et al. 2012, Bendszus et al. 2016). Eine prophylaktisch induzierte Hypervolämie hat klinisch keinen Zusatznutzen (Raabe et al. 2005), vielmehr wird die Erhaltung der Euvolämie als Prävention der DCI angestrebt (Connolly et al. 2012).

1.3 BK_{Ca}-Kanal

1.3.1 Kaliumkanäle zerebraler Arteriolen

In glatten Gefäßmuskelzellen von gesunden zerebralen Gefäßen werden vier Kaliumkanäle unterschieden: ATP-abhängige (K_{ATP}), einwärts-gleichrichtende (K_{ir}), spannungsgesteuerte (K_v) und kalziumgesteuerte (K_{Ca}) Kaliumkanäle (Faraci und Sobey 1998, Kamp et al. 2012). Kalziumgesteuerte Kaliumkanäle können aufgrund ihrer Kaliumleitfähigkeit aufsteigend in *small conductance* (SK_{Ca}), *intermediate conductance* (IK_{Ca}) und *big conductance* (BK_{Ca}) K_{Ca}-Kanäle eingeteilt werden. Die Aktivierung von SK_{Ca}- und IK_{Ca}-Kanälen erfolgt über an Calmodulin gebundenes Kalzium (Ca²⁺) und ist spannungsunabhängig (Xia et al. 1998, Fanger et al. 1999). Der

BK_{Ca}-Kanal (auch Maxi-K, Slo1, K_{Ca}1.1) hingegen kann durch Membrandepolarisation und/oder ansteigende intrazelluläre Kalziumkonzentrationen (Barrett et al. 1982) bzw. durch Mg²⁺ aktiviert werden (Yang et al. 2008).

1.3.2 Struktur des BK_{Ca}-Kanals

Der BK_{Ca}-Kanal ist aus einem Tetramer von α - und β -Heterodimeren aufgebaut (Shen et al. 1994, Garcia-Calvo et al. 1994), wobei die α -Untereinheit für die Bildung eines funktionalen Kanals maßgeblich ist (McManus et al. 1995).

Die α -Untereinheit wird durch das Slo1-Gen (kurz für slowpoke, auch KCNMA1) kodiert (Atkinson et al. 1991, Butler et al. 1993). Sie besteht aus 11 hydrophoben Segmenten, die sich in eine membrandurchspannende Kernregion (S0-S6) und eine im Zytoplasma liegende Schwanzregion (S7-S10) gliedern (Abb. 3).

Die Kernregion liegt am Amino-Terminus, der aufgrund der Expression des S0 Segments, welches für die Modulation der α - durch die β -Untereinheit erforderlich ist, extrazellulär liegt (Wallner et al. 1996). Die sich an das S0-Segment anschließenden Transmembransegmente S1-S4 bilden die Spannungssensordomäne (*voltage sensing domain*, VSD) (Ma et al. 2006), wobei der S4-Domäne aufgrund des Überschusses an drei positiven Ladungen – insbesondere einer am Arg-213 – eine besonders wichtige Rolle zukommt (Díaz et al. 1998, Yang et al. 2007a). Durch das folgende S5-S6-Linkersegment wird die Porenschleife gebildet (Hartmann et al. 1991) (Abb. 3).

Die den Carboxy-Terminus bildenden Domänen S7-S10 sind intrazellulär gelegen und bilden je Untereinheit zwei tandemartige RCK-Domänen (*regulator of K⁺ conductance*, Regler der K⁺-Leitfähigkeit) aus, die sich in der tetrameren Kanalstruktur zu einem *gating ring* anordnen (Wu et al. 2010). Insgesamt konnten drei Ca²⁺-Bindungsstellen festgestellt werden. Die RCK1-Domäne beinhaltet eine hoch- und eine niedrig-affine Bindungsstelle für Ca²⁺ (Xia et al. 2002). Letztere wird durch Mg²⁺ reguliert (Shi et al. 2002, Wu et al. 2010) und stellt somit eine Möglichkeit dar, den BK_{Ca}-Kanal Ca²⁺-unabhängig zu aktivieren. Über Koordinierung des Mg²⁺-Kations zwischen VSD und RCK1 wird eine elektrostatische Interaktion zwischen Arg-213 der Transmembrandomäne S4 und dem gebundenen Mg²⁺ möglich, die zur Aktivierung des Kanals führt (Yang et al. 2007a, Yang et al. 2008). Die dritte Bindungsstelle – auch

als *calcium bowl* bezeichnet – befindet sich innerhalb der RCK2-Domäne und trägt zur Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals bei (Schreiber und Salkoff 1997, Bao et al. 2004, Wu et al. 2010).

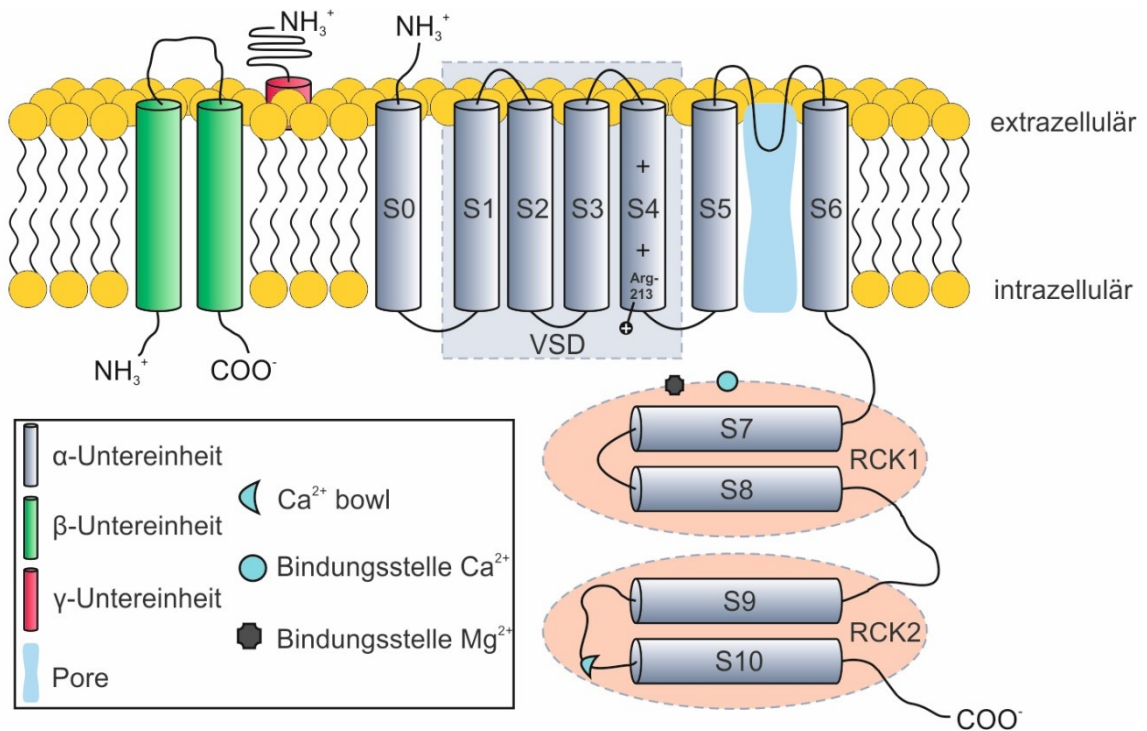


Abb. 3: Struktur des BK_{Ca}-Kanals. Dargestellt sind α-, β- und γ-Untereinheit. Die α-Untereinheit gliedert sich in eine membrandurchspannende Kernregion (S0-S6) und in eine im Zytoplasma liegende Schwanzregion (S7-S10), die zwei RCK-Domänen mit Bindungsstellen für Mg²⁺ und Ca²⁺ ausbildet. Die Transmembransegmente S1-S4 bilden die Spannungssensordomäne, während sich die Kanalpore zwischen den Segmenten S5 und S6 befindet. Die akzessorische β-Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen. RCK: regulator of K⁺ conductance; VSD: Spannungssensordomäne.

Die β-Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen mit intrazellulär gelegenen Amino- und Carboxy-Terminus und einer sie verbindenden extrazellulären Domäne (Knaus et al. 1994) (Abb. 3). Es gibt vier verschiedene Arten von β-Untereinheiten, die von den Genen KCNMB1-4 kodiert werden (Brenner et al. 2000a). Die Expression der Untereinheiten erfolgt im Gegensatz zur α-Untereinheit gewebespezifisch: β1-Untereinheiten werden primär in der glatten Muskulatur, β2- und β3-Untereinheiten unter anderem in der Niere und im Pankreas und β4-Untereinheiten fast ausschließlich in Geweben des zentralen Nervensystems exprimiert (Uebele et al. 2000, Behrens et al. 2000). Die β1-Untereinheit spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Membranpotentials in der glatten Muskulatur indem sie die Ca²⁺-Sensitivität der BK_{Ca}-Kanäle erhöht (McManus et al. 1995, Bao und Cox 2005).

Dadurch ist es dem BK_{Ca}-Kanal möglich, auf Ca²⁺-Ausschüttung mit Membranhypolarisation zu reagieren und so einer Vasokonstriktion entgegenzuwirken. BK_{Ca}-Kanälen von β 1-Knockout-Mäusen (KCNMB1^{-/-}) war diese kompensatorische Aktivierung aufgrund der verringerten Empfindlichkeit gegenüber der Ca²⁺-Ausschüttung nicht möglich, was letztendlich zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks führte (Brenner et al. 2000b).

Des Weiteren wurden vier verschiedene Proteine mit Leucin-reichen Wiederholungen (LRRC, *leucine-rich repeat containing protein*) als neue Familie der BK_{Ca}-Kanal γ -Untereinheiten klassifiziert. Sie werden ebenfalls gewebsspezifisch exprimiert und ermöglichen in nicht erregbaren Zellen bereits bei physiologischen Spannungen und Ca²⁺-Konzentrationen eine BK_{Ca}-Kanalaktivierung (Yan und Aldrich 2010, Yan und Aldrich 2012). Die γ 1-Untereinheit (LRRC26) wird in der zerebralen arteriellen Gefäßmuskulatur exprimiert und ist dort überwiegend in der Plasmamembran und in räumlicher Nähe zur α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals lokalisiert (Abb. 3). Durch einen LRRC26-Knockdown verringerte sich die Spannungs- und scheinbare Ca²⁺-Empfindlichkeit des BK_{Ca}-Kanals, was zu einer vermehrten intravaskulären druckinduzierten Vasokonstriktion führte. Dementsprechend ist die γ 1-Untereinheit an der Induktion der Vasodilatation beteiligt (Evanson et al. 2014).

1.3.3 Regulation des Basaltonus

Für die Konstanthaltung der Durchblutung eines Gewebes ist die myogene Autoregulation (Bayliss-Effekt) unerlässlich: Steigt der intravaskuläre Druck an, erfolgt zur Gegenregulierung eine Vasokonstriktion in Arterien und Arteriolen (Bayliss 1902).

Die Plasmamembran glatter Gefäßmuskelzellen wird infolge einer Drucksteigerung depolarisiert. Vermittelt wird diese Depolarisation durch Kationenkanäle der TRP (*transient receptor potential*) -Familie. Insbesondere TRPC6- und TRPM4-Kanäle scheinen für die druckinduzierte Vasokonstriktion zerebraler Arterien unerlässlich zu sein (Welsh et al. 2002, Reading und Brayden 2007, Brayden et al. 2008, Gonzales et al. 2014). Die Depolarisation hat die Aktivierung von DHPR zur Folge, sodass es zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle kommt (Knot und Nelson 1998). Der durch Bindung von Ca²⁺ an Calmodulin entstehende Ca²⁺-Calmodulin-Komplex bindet und aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (*myosin light chain kinase, MLCK*), sodass die

leichte Kette des Myosins phosphoryliert und somit aktiviert wird. Aus der Interaktion mit Aktin resultiert schlussendlich die Muskelkontraktion (Kamm und Stull 1985).

Durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Depolarisation der Membran werden zudem BK_{Ca} -Kanäle aktiviert (Brayden und Nelson 1992). Sie sind wichtiger Bestandteil des negativen Rückkopplungsmechanismus in der Regulation der druckinduzierten Vasokonstriktion: Durch ihre Aktivierung wird ein Kaliumausstrom aus der Zelle vermittelt, sodass es zur Hyperpolarisation der Membran kommt. Dies hat wiederum die Schließung der DHPR und die Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge (Hu und Zhang 2012) (Abb. 4). Darüber hinaus können BK_{Ca} -Kanäle der zerebralen Arterien durch sogenannte *calcium sparks*, die lokale Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration darstellen, aktiviert und somit eine Dilatation bewirkt werden. Die Freisetzung des Ca^{2+} erfolgt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und wird durch Öffnung von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) vermittelt (Nelson et al. 1995, Knot et al. 1998).

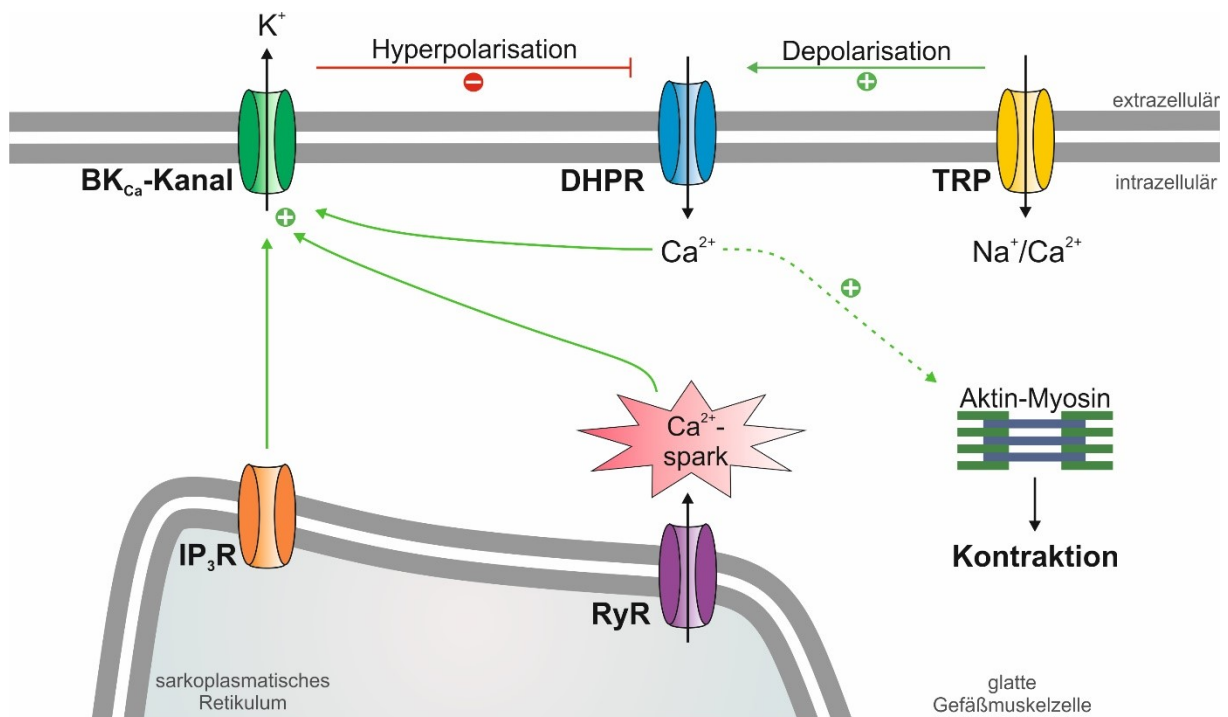


Abb. 4: Schematische Darstellung der Regulation des Basaltonus durch den BK_{Ca} -Kanal in der glatten Gefäßmuskulatur (modifiziert nach Ledoux et al. 2006). Die Erhöhung des intravasalen Drucks führt über eine Aktivierung von Kanälen der TRP-Familie zu einer Membrandepolarisation und nachfolgend zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (DHPR). Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird der BK_{Ca} -Kanal aktiviert und somit eine Hyperpolarisation bewirkt, die eine Schließung der DHPR zur Folge hat. IP_3R : Inositoltrisphosphat-Rezeptor; RyR : Ryanodin-Rezeptor; DHPR: Dihydropyridin-Rezeptor.

Des Weiteren kann Inositoltrisphosphat (IP_3) eine BK_{Ca} -Kanal Aktivierung bewirken. Durch Bindung von IP_3 an den ebenfalls im SR liegenden IP_3 -Rezeptor wird Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt, sodass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird (Yang et al. 2013). Im Gegensatz zum RyR scheint die Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals hier allerdings unabhängig vom aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} zu erfolgen: BK_{Ca} -Kanal und IP_3R sind vermutlich molekular gekoppelt, wodurch die IP_3R -Aktivierung die scheinbare Ca^{2+} -Sensitivität des BK_{Ca} -Kanals erhöhen kann (Zhao et al. 2010). Somit spielt der BK_{Ca} -Kanal als Kontrollelement in der Regulation des arteriellen Gefäßdurchmessers eine zentrale Rolle (Abb. 4).

An der druckinduzierten Vasokonstriktion ist ferner auch das Arachidonsäurestoffwechselprodukt 20-HETE beteiligt. Mit steigendem Druck kommt es zu einer Erhöhung der 20-HETE-Konzentration in zerebralen Arterien. Die Blockade seiner Synthese verhindert die druckinduzierte Konstriktion, weshalb 20-HETE offenbar ebenfalls an der Autoregulation des zerebralen Blutflusses beteiligt ist (Gebremedhin et al. 2000).

1.4 Beeinflussung des vaskulären Systems durch 20-HETE

20-HETE ist ein Produkt des Arachidonsäurestoffwechsels und entsteht bei der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure (AA) durch die Cytochrom-P450 (CYP)-Enzyme der Familien 4A und 4F (Harder et al. 1994, Roman 2002).

Nach einer SAB wurden in der CSF neben den Hämabbauprodukten auch erhöhte Konzentrationen an 20-HETE nachgewiesen, die mit einem schlechteren neurologischen Ergebnis assoziiert waren (Crago et al. 2011, Donnelly et al. 2015). Abgesehen von 20-HETE sind in der CSF auch Serotonin-Konzentrationen nach SAB erhöht. Serotonin (5-HT) führt über die Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2) mit folgender AA-Freisetzung zur vermehrten 20-HETE-Bildung (Cambj-Sapunar et al. 2003). Auch die verringerte Verfügbarkeit von NO ist ursächlich für die erhöhten 20-HETE-Konzentrationen. NO inhibiert CYP4A-Enzyme und damit die Produktion von 20-HETE. Der dadurch verursachte Konzentrationsabfall von 20-HETE führt zu einer Enthemmung von BK_{Ca} -Kanälen und somit zu einer Hyperpolarisation, die eine Vasodilatation begünstigt (Alonso-Galicia et al. 1997). Fällt dieser Effekt aufgrund des NO-scavenging durch das freie Hb oder durch die Destruktion von NO durch

Superoxide weg, wird eine Vasokonstriktion erleichtert (Sobey und Faraci 1998). Dabei begünstigt 20-HETE selbst über die Entkopplung der eNOS die Superoxid-Produktion (Cheng et al. 2008) (Abb. 5).

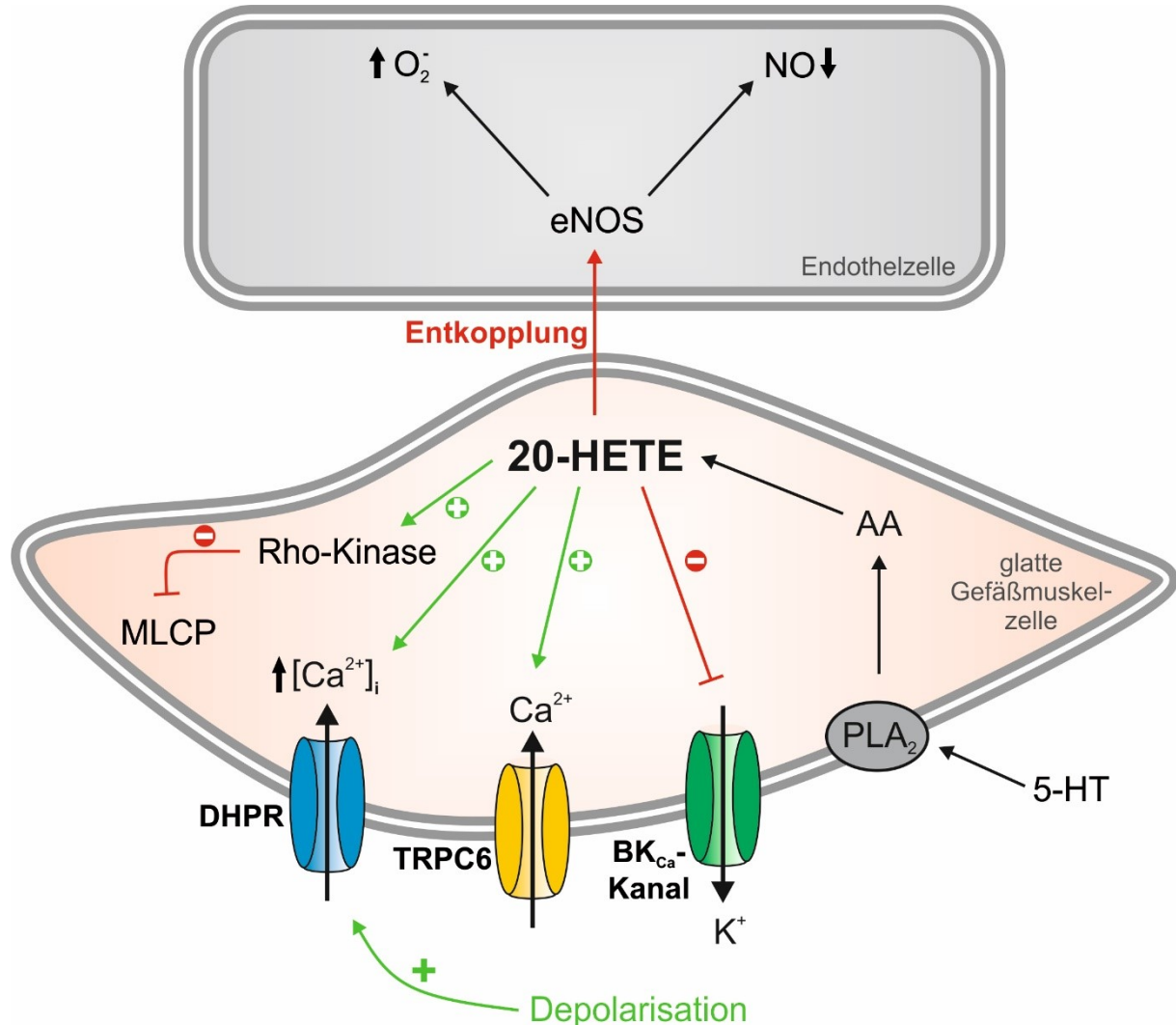


Abb. 5: Vermittlung der Vasokonstriktion durch 20-HETE (modifiziert nach Fan et al. 2016). Die Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) führt über die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) zur vermehrten 20-HETE-Synthese. 20-HETE hemmt den BK_{Ca}- und aktiviert den TRPC6-Kanal, wodurch eine Membrandepolarisation erfolgt, die zusätzlich neben der Aktivierung durch 20-HETE selbst den DHPR aktiviert. Weiterhin bewirkt 20-HETE über die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) eine Abnahme der NO-Konzentration. DHPR: Dihydropyridin-Rezeptor; 5-HT: Serotonin; MLCP: Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase.

Die durch 20-HETE eingeleitete Vasokonstriktion erfolgt über mehrere Wege, die final unter anderem zu einer Hemmung des BK_{Ca}-Kanals bzw. zu einer Aktivierung seiner Gegenspieler führt (Abb. 5). Zum einen steigert 20-HETE über die Erhöhung der PKC-

Aktivität den Gefäßtonus (Lange et al. 1997); die PKC reduziert dabei die Aktivität des BK_{Ca}-Kanals über einen Ca²⁺-abhängigen Mechanismus (Hristov et al. 2014). Zum anderen werden durch 20-HETE Kanäle wie der DHPR (Gebremedhin et al. 1998, Zeng et al. 2010) oder der TRPC6-Kanal aktiviert (Basora et al. 2003, Inoue et al. 2009). Weiterhin aktiviert 20-HETE die Rho-Kinase. Diese inaktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (*myosin light chain phosphatase*, MLCP), sodass die leichten Ketten des Myosins vermehrt phosphoryliert bleiben und die Ca²⁺-Sensitivität des kontraktile Apparats erhöht wird (Randriamboavonjy et al. 2003). Die Erhöhung der 20-HETE-Konzentration durch 5-HT stellt zusätzlich einen Weg dar, die Vasokonstriktion zu begünstigen. Im Sinne eines positiven Verstärkungsmechanismus erhöht 20-HETE die vasokonstriktorische Reaktion zerebraler Gefäße auf 5-HT (Cambj-Sapunar et al. 2003).

Da 20-HETE in der Regulation des vaskulären Systems eine entscheidende Rolle spielt, bestand ein Bestreben, Inhibitoren der 20-HETE-Synthese zu entwickeln, um seine Rolle – insbesondere in der Pathologie vaskulärer Erkrankungen – genauer bestimmen zu können. Dabei zeigte der Einsatz von HET0016, einem kompetitiven Inhibitor der 20-HETE-Synthese, eine potente Inhibition der ω -Hydroxylierung und auch eine gute Selektivität, da hier die CYP4A- und 4F-Isoformen gehemmt werden (Miyata et al. 2001).

1.5 Der BK_{Ca}-Kanalaktivator NS1619

Das Benzimidazolone NS1619 stellt in seiner Funktion als BK_{Ca}-Kanalöffner eine gute Möglichkeit dar, die Rolle und Pharmakologie des BK_{Ca}-Kanals umfassender begutachten zu können. Insbesondere die in der Literatur beschriebenen gewebeschützenden Eigenschaften, wie Kardioprotektion (Shi et al. 2007, Cao et al. 2011), Neuroprotektion (Gáspár et al. 2009, Piwońska et al. 2016) und Zytotoxikoprotektion (Chmielewska und Malińska 2011), machen diese Substanz interessant für die Forschung.

Die Wirkung von NS1619 besteht in einer Ca²⁺- und dosisabhängigen Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca}-Kanals und einer damit einhergehenden Hyperpolarisation der Zellmembran (Olesen et al. 1994, Lee et al. 1995, Holland et al. 1996, Kuhlmann et al. 2004) (Abb. 6). Die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals erfolgt dabei

vermutlich von intrazellulärer Seite, wobei das S6/RCK1-Linkersegment eine vielversprechende Zielstruktur darstellt (Gessner et al. 2012). Weiterhin weist das NS1619-Molekül eine hohe Lipophilie auf, die eine rasche Permeation der Membran ermöglichen würde (Olesen et al. 1994, Sheldon et al. 1997). Dennoch scheint die beschriebene BK_{Ca}-Kanalaktivierung nicht isolierter Vermittler des durch NS1619 induzierten relaxierenden Effekts zu sein. Vielmehr trägt auch die Verringerung des Ca²⁺-Einstroms durch Inhibition von DHPR zu diesem Effekt bei (Holland et al. 1996, Huang et al. 1997, Sheldon et al. 1997, Park et al. 2007) (Abb. 6). Auch konnte eine inhibitorische Wirkung auf spannungsabhängige K⁺-Kanäle (Edwards et al. 1994, Holland et al. 1996) und eine stimulierende Wirkung auf Ca²⁺-abhängige Chlorid-Kanäle (Saleh et al. 2007) beobachtet werden, wodurch das Wirkungsspektrum dieser Substanz zusätzlich erweitert wird. Dies hat allerdings auch eine Abnahme der Spezifität zur Folge.

Des Weiteren greift NS1619 über einen Endothel-vermittelten Mechanismus in den NO-Stoffwechsel ein (Abb. 6). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgt die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die mit einer vermehrten Bildung von NO einhergeht (Kuhlmann et al. 2004, Calderone et al. 2007, Vang et al. 2010, Łukasiak et al. 2016). Für die intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung werden zwei unterschiedliche Wege diskutiert: Einerseits wird der Anstieg in der Aktivierung endothelialer BK_{Ca}-Kanäle begründet. Infolge der dadurch ausgelösten Membranhypolarisation kommt es sekundär zu einem transmembranären Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär (Kuhlmann et al. 2004). Auf der anderen Seite wird angenommen, dass Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), also aus internen Speichern, freigesetzt wird (Łukasiak et al. 2016). Ca²⁺-vermittelt wird durch erhöhte NO-Bildung aus L-Arginin (Palmer et al. 1988) die NO-Signalkaskade induziert, weshalb neben der vermehrten NO-Synthese auch ein Konzentrationsanstieg von cGMP beobachtet werden kann (Kuhlmann et al. 2004). Sowohl cGMP, das über eine cGMP-abhängige Kinase (auch Proteinkinase G, PKG) wirkt (Fukao et al. 1999), als auch NO können die BK_{Ca}-Kanal-Aktivität erhöhen (Bolotina et al. 1994) (Abb. 6), was auf eine positive Rückkopplung der NO-Produktion schließen lässt (Brakemeier et al. 2003). Darüber hinaus wird angenommen, dass die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum der glatten Muskelzelle, teilweise zur

Membranhyperpolarisation durch die Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen beiträgt (Yamamura et al. 2001, Wrzosek 2014).

Zusammenfassend ist die unter anderem durch den BK_{Ca} -Kanal vermittelte endotheliale NO-Freisetzung zentraler Bestandteil des durch NS1619 bewirkten Effekts. Dabei scheint die Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen in Endothelzellen bedeutender zu sein als diejenige von BK_{Ca} -Kanälen in der glatten Gefäßmuskulatur (Calderone et al. 2007).

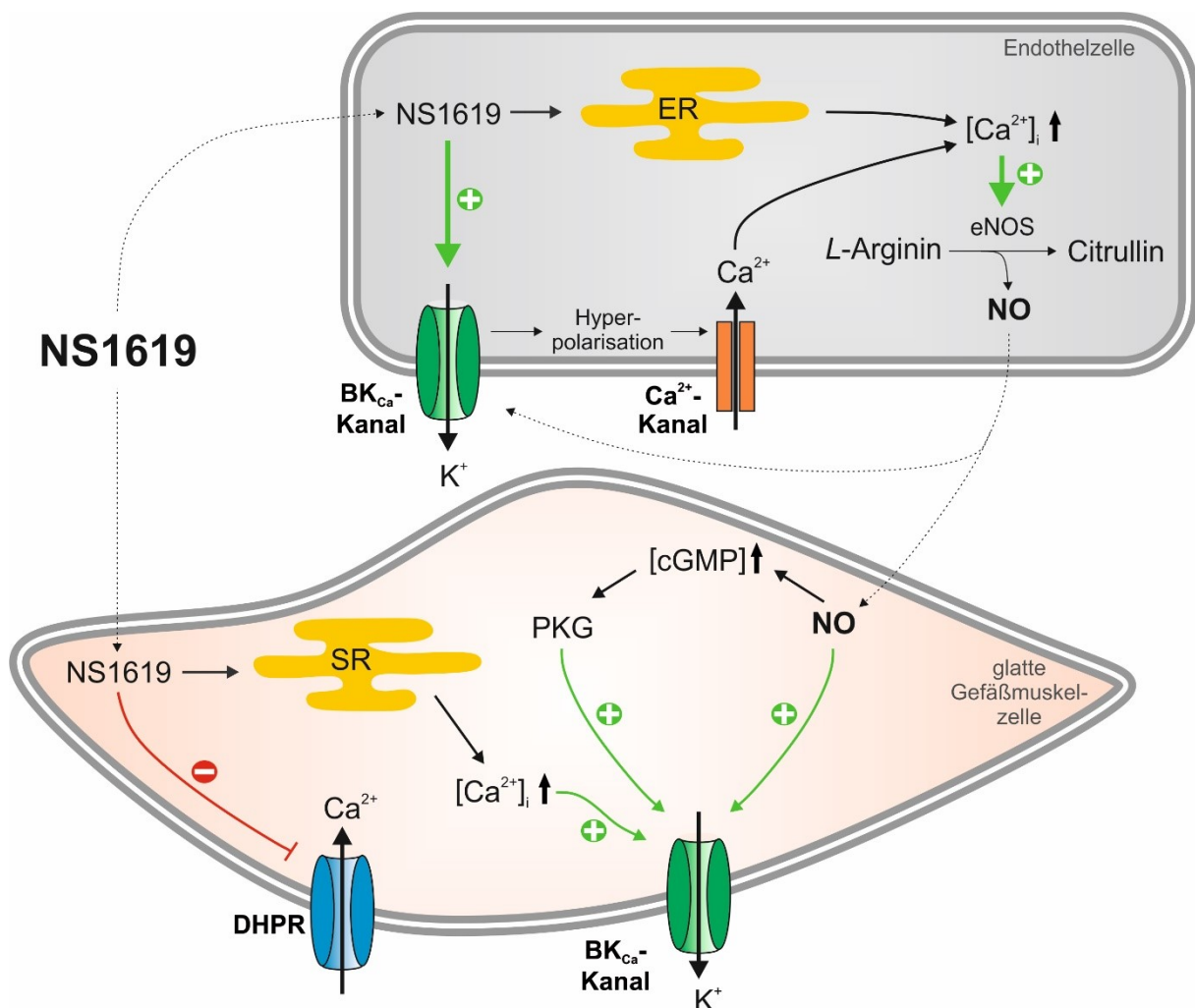


Abb. 6: Wirkungen von NS1619 auf Endothel- und glatte Gefäßmuskulaturzellen. Aufgrund seiner hohen Lipophilie kann das Molekül die Zellmembran durchdringen und den BK_{Ca} -Kanal direkt oder indirekt über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Stimulierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aktivieren. Darüber hinaus hemmt NS1619 beispielsweise den DHPR. ER: endoplasmatisches Retikulum; DHPR: Dihydropyridin-Rezeptor; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

1.6 Induktion der NO/cGMP-Signalkaskade durch Nahinfrarotillumination

Die Verwendung von Nahinfrarotlicht erfolgt unter anderem im Rahmen der Photobiomodulation (auch Low-Level-Lasertherapie, LLLT). Bei dieser Therapieform werden lichtemittierende Dioden (*light emitting diodes*, LEDs) oder Niedrigenergielaser, die Licht im Bereich des sichtbaren roten oder Nahinfrarot (NIR)-Licht emittieren, eingesetzt (Poyton und Ball 2011). In verschiedenen Studien konnten dabei im Tiermodell Effekte, wie etwa die Reduktion der Infarktgröße nach Myokardinfarkt (Ad und Oron 2001), die Verminderung von Reperfusionsschäden nach globaler Hirnischämie (Sanderson et al. 2018) und von neurologischen Defiziten nach Schlaganfall (Oron et al. 2006), beobachtet werden.

In der Vermittlung dieser Wirkungen scheint vor allem NO als *endothelium derived relaxing factor* eine zentrale Rolle zu spielen (Maegawa et al. 2000, Zhang et al. 2009). Es stimuliert die lösliche Guanylat-Zyklase, sodass vermehrt cGMP aus GTP gebildet wird. Durch die Erhöhung der Konzentration von cGMP, dem Vermittler der NO/cGMP-Signalkaskade, werden nachfolgend cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) aktiviert (Hofmann et al. 2000). Diese begünstigen durch Phosphorylierung zellulärer Proteine und der damit einhergehenden Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Relaxation der glatten Muskulatur (Lincoln 1983, Cornwell und Lincoln 1989, Francis et al. 2010) (Abb. 7).

Die Verringerung der Ca^{2+} -Konzentration kann zum einen über eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR infolge der Phosphorylierung des IP_3R assoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) (Schlossmann et al. 2000, Geiselhöringer et al. 2004) und zum anderen über die Schließung von DHPR erfolgen. Dabei wird die Schließung direkt über Phosphorylierung des Kanals selbst (Jiang et al. 2000, Yang et al. 2007b) und indirekt über die infolge der PKG-induzierten BK_{Ca} -Kanal-Aktivierung auftretenden Hyperpolarisation bewirkt (Robertson et al. 1993, Alioua et al. 1998, Fukao et al. 1999) (Abb. 7). Ein anderer Angriffspunkt der PKG ist die MLCP. Diese wird durch die Phosphorylierung aktiviert, sodass die leichte Kette des Myosins dephosphoryliert wird und somit die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparats abnimmt (Bolz et al. 2003, Wooldridge et al. 2004). Indirekt erfolgt die Beeinflussung der MLCP-Aktivität auch über die Hemmung des RhoA /Rho-Kinase-Weges und dem damit wegfallenden

inhibitorischen Effekt auf die MLCP (Seko et al. 2003, Dhaliwal et al. 2007, Weinmeister et al. 2008).

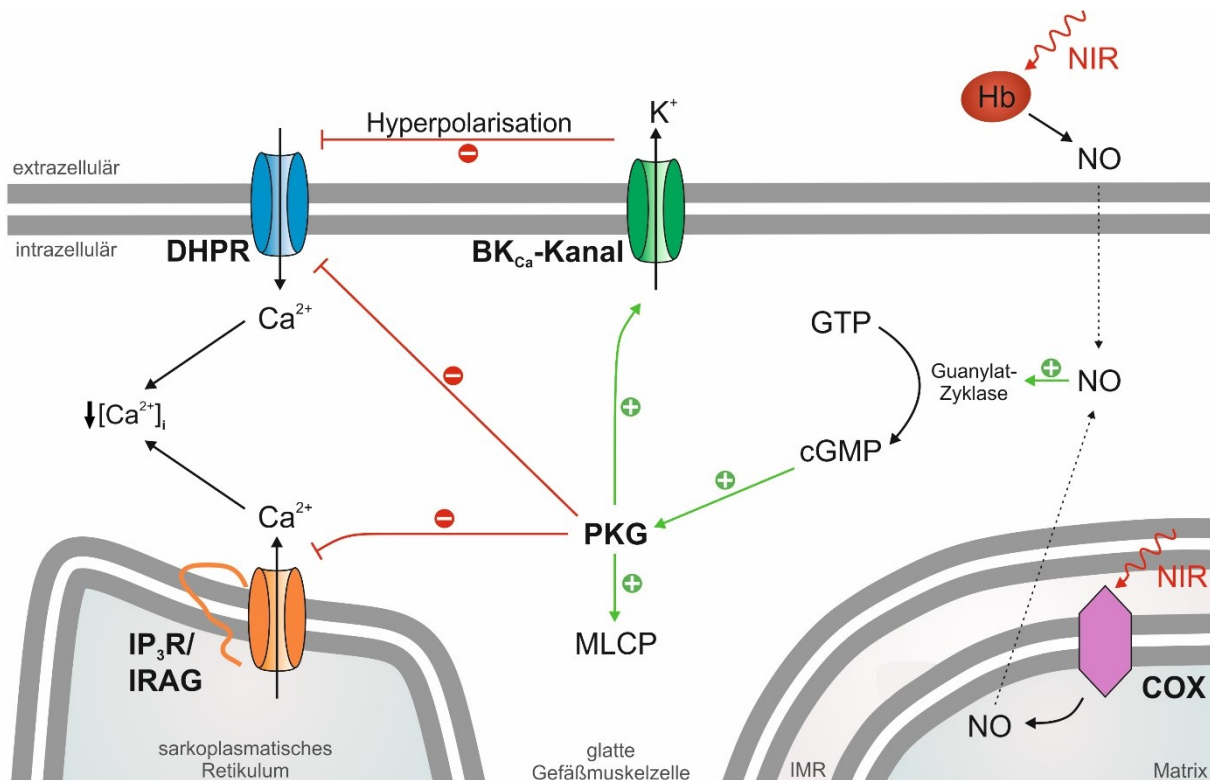


Abb. 7: Steigerung der NO-Verfügbarkeit durch die NIR-Bestrahlung. Durch Bestrahlung von Hämoglobin (Hb) und der Cytochrom-c-Oxidase (COX) wird die NO-Verfügbarkeit erhöht, was zu einer Steigerung der cGMP-Synthese führt. cGMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG), die über verschiedene Wege eine Vasodilatation bewirkt. DHPR: Dihydropyridin-Rezeptor; IP₃R: Inositoltrisphosphat-Rezeptor; IRAG: IP₃R assoziiertes cGMP-Kinase Substrat; MLCP: Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase; IMR: Intermembranraum.

Alternativ zu dem beschriebenen klassischen *L*-Arginin-NOS-Weg gibt es darüber hinaus die Möglichkeit, NO über den Nitrat-Nitrit-NO-Stoffwechselweg zu generieren. Dieser wird insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, wenn die Aktivität der O₂-abhängigen NOS durch eine sinkende Sauerstoffkonzentration eingeschränkt wird, aktiv, sodass die NO-Produktion auch bei niedriger Sauerstoffkonzentration gewährleistet werden kann (Dweik et al. 1998, Østergaard et al. 2007, Lundberg et al. 2008). Nitrat wird mit Hilfe der bakteriellen Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert (Lundberg und Govoni 2004). Dieses kann dann unter anderem durch die Cytochrom-c-Oxidase (COX), die unter hypoxischen Bedingungen ihre optimale Wirksamkeit erreicht, zu NO reduziert werden (Castello et al. 2006, Ball et al. 2011). Des Weiteren können Desoxy-myoglobin oder Hämoglobin aufgrund ihrer Nitrit-Reduktase-Aktivität

zur NO-Produktion beitragen. Die Reaktion verläuft pH-Wert- und O₂-abhängig und kann somit die hypoxische Vasodilatation fördern (Cosby et al. 2003, Huang et al. 2005, Rassaf et al. 2007, Shiva et al. 2007).

Entstehendes NO kann dann durch Inhibition der COX die Atmungskette beeinflussen, sodass der Sauerstoffverbrauch reduziert werden kann (Cleeter et al. 1994, Sarti et al. 2000, Shiva et al. 2007). Da der COX-NO-Komplex lichtsensitive Eigenschaften aufweist (Boelens et al. 1982), dissoziiert bei der Bestrahlung mit Licht NO aus dem Komplex, wodurch die Inhibition der COX aufgehoben werden kann (Sarti et al. 2000) (Abb. 7). Des Weiteren konnte durch die Anwendung von Licht geringer Intensität die NO-Synthese über die COX und somit die NO-Verfügbarkeit gefördert werden (Ball et al. 2011). Auch der Einsatz von Nahinfrarotlicht konnte die NO-Verfügbarkeit erhöhen, indem vermehrt NO aus den nitrolysierten Formen des Hämoglobins und Myoglobins bereitgestellt wird (Lohr et al. 2009). Diese Gegebenheiten sind ein Hinweis darauf, dass vor allem NO, aber auch die COX aufgrund ihrer Lichtsensitivität bei der Vermittlung der durch die NIR-Bestrahlung induzierten Effekte involviert sind.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Der zerebrale Vasospasmus stellt als eine der häufigsten Komplikationen nach SAB einen prognosebestimmenden Faktor dar. Dennoch ist seine Ätiologie bisher nur in Ansätzen verstanden, was die Ableitung von effizienten und kausal wirkenden Therapieoptionen erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher bestimmte Derivate des Hämabbaus im Hinblick auf ihre Vasoaktivität und somit ihrer Bedeutung bei der Entstehung des Vasospasmus überprüft werden. Da in der CSF von SAB-Patienten die verschiedenen HDPs nebeneinander vorliegen und bisher nur Daten zur Einzelapplikation der verschiedenen HDPs und dem unspezifischen Bilirubinextrakt vorliegen (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019b), soll weiterhin die Mischapplikation definierter Konzentrationen von PDP und BOX erfolgen, um einen möglichen additiven Effekt dieser Substanzen zu eruieren. Neben den HDPs scheint auch das vasokonstriktorisch wirkende 20-HETE bei der Vasospasmusgenese eine Rolle zu spielen. Sowohl 20-HETE als auch die HDPs senken die Aktivität des BK_{Ca}-Kanals. Daher kommen für eine Prävention der Gefäßverengung pharmakologisch zum einen die Anwendung eines BK_{Ca}-Kanalaktivators (NS1619) und zum anderen eines Inhibitors der 20-HETE-Synthese (HET0016) in Frage. Ein anderer möglicher therapeutischer Ansatz, der eine Gefäßverengung vermindern könnte, besteht in der Verwendung von NIR-Licht im Rahmen der Photobiomodulation.

Die Messungen sollen *in vitro* an intrakortikalen Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Bestimmung der Änderung des Gefäßdurchmessers mittels DIC-Mikroskopie in Abhängigkeit von der Zeit. Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Führt die Einzelapplikation von Z-BOX D oder der Hämatinsäure zu einer Gefäßverengung und ist diese von der Expression des BK_{Ca}-Kanals abhängig?
- Führt die Mischapplikation von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A zu einer stärkeren Gefäßverengung im Vergleich zur Einzelapplikation dieser Substanzen?
- Kann durch Bestrahlung der Arteriolen mit NIR-Licht eine Vasodilatation induziert werden?
- Führt die Applikation von 20-HETE zu einer Gefäßverengung?
- Induziert HET0016 eine Vasodilatation?
- Können HET0016 und NS1619 die PDP-vermittelte Gefäßverengung verhindern?

Mithilfe der erhobenen Daten soll das Verständnis für die Ätiologie des zerebralen Vasospasmus verbessert werden, um kausal wirkende Therapieoptionen für seine Behandlung ableiten zu können.

3 Materialien und Methoden

In den folgenden Abschnitten wird der Versuchshergang detailliert beschrieben. Die Durchführung der Experimente erfolgte in der Arbeitsgruppe Biolumineszenz der Experimentellen Neurologie im Forschungszentrum Lobeda im Zeitraum von Oktober 2017 bis einschließlich August 2018.

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden zum einen C57BL/6J-Mäuse und zum anderen homozygote Slo1-Knockout (KO)- und Slo1-Wildtyp (WT)-Mäuse verwendet. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere ausgewählt, deren Lebensalter zwischen 20 und 30 Tagen lag.

Slo1-KO-Mäuse besitzen im Gegensatz zu den Slo1-WT-Mäusen einen nicht funktionsfähigen BK_{Ca}-Kanal. Grund hierfür ist eine gezielte Mutation der durch das mSlo1-Gen kodierten porenformenden α -Untereinheit durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Auf dem mSlo1-Gen befindet sich Exon 1, das die Translationsstartstelle und das für die Ausbildung eines funktionsfähigen Kanals notwendige Transmembransegment S0 enthält. Durch Flankierung mit *loxP*-Sequenzen, um ein konditionales Allel zu generieren, und anschließender Expression der Cre-Rekombinase erfolgte in diesem Tiermodell die Deletion von Exon 1, woraus ein funktionsunfähiger Kanal resultierte (Meredith et al. 2004).

Slo1-KO-Mäuse weisen im Vergleich zu ihren Slo1-WT-Geschwistern eine Wachstumsretardierung auf. Zudem sind für ihren Phänotyp Ataxie (Sausbier et al. 2004, Meredith et al. 2004), Inkontinenz (Meredith et al. 2004, Thorneloe et al. 2005), erworbener progressiver Hörverlust im Hochfrequenzbereich (Rüttiger et al. 2004), erhöhter Blutdruck (Sausbier et al. 2005) und bei männlichen Tieren eine erektile Dysfunktion (Werner et al. 2005) beschrieben. Darüber hinaus zeigten die Slo1-KO-Mäuse unserer Zucht Symptome einer Augentrockenheit und Entzündung des Augenlidapparats (Blepharitis).

Die Generierung von Versuchstieren resultierte aus der Verpaarung heterozygoter Mäuse. Die Haltung aller Tiere erfolgte als offene Käfighaltung bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 Stunden in vollklimatisierten Räumen der ZET Lobeda (Zentrale

Experimentelle Tierhaltung, Forschungszentrum Lobeda, Am Klinikum 1, 07747 Jena). Jedem Tier wurde dort ein Tieridentifikationscode zugewiesen. Wasser und Trockenpellets standen ad libitum zur Verfügung. Da es sich bei den Slo1-Mäusen um albinotische Tiere handelt, wurde in der Haltung eine Lichtintensität von 60 Lux nicht überschritten, um keine Retinaatrophie zu provozieren.

Die Organentnahmen waren gemäß der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken durch § 1 und § 4 Absatz 3 TierSchG legitimiert. Die geforderte Sachkunde gemäß Anlage 1 TierSchVersV in Verbindung mit § 4 Absatz 1 für die Durchführung der Anästhesie und Tötung des jeweiligen Tieres war gegeben.

3.2 Genotypisierung

Der Genotyp der Slo1-Mäuse wurde anhand einer Schwanzbiopsie initial in der zweiten Lebenswoche bestimmt und zusätzlich nach jedem Experiment verifiziert, wobei ein heterozygoter Genotyp zum Ausschluss vom Experiment führte. Alle Genotypisierungen folgten jeweils demselben Verfahren.

In einem ersten Schritt wurde die DNA aus der jeweiligen Schwanzbiopsie gewonnen. Dazu wurden der Biopsie 180 µl ATL (*tissue lysis buffer*) und 20 µl Proteinkinase K zugesetzt. In einer Zentrifuge folgte die Inkubation dieses Ansatzes bei 56 °C und 300 rpm für mindestens 1-3 h. Um die durch Proteinkinase K verursachte Lysereaktion anschließend zu stoppen, wurden 200 µl AL (*lysis buffer*) und 200 µl absoluter Ethanol hinzugefügt. Das erhaltene Lysat wurde für eine Minute bei 8000 xg zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Für diesen Schritt wurde das Lysat zuvor auf eine Trennsäule (QIAGEN DNA Isolation Kit) pipettiert. Um nachfolgend die Reinheit der DNA sicherzustellen, wurde die Säule zweimal mit 500 µl AW (*wash buffer*) in der Zentrifuge durchgespült und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Es folgte die Elution der DNA aus der Säule mittels Zugabe von 20 µl AE (*elution buffer*) und einminütiger Zentrifugation bei 8000 xg. Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde das Eluat bei +4 °C gelagert.

Anschließend konnte die PCR durchgeführt werden. Dafür wurden je aufgereinigter Probe zwei Ansätze mit dem Hintergrund angefertigt, dass sich die Primer für Slo1-WT- und -KO-Mäuse nicht kombinieren lassen. Eine Übersicht der Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tab. 1 zu finden.

Tab. 1: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze für WT- und KO-Tiere. Angaben des Volumens in μl .

Stoff	WT	KO
Gibco Wasser (QIAGEN)	2,7	2,7
5x Q-Puffer (QIAGEN)	2	2
10x Puffer (QIAGEN)	1	1
2,5 mM dNTPs (QIAGEN)	0,2	0,2
Primer Neo 5'	-	0,5
Primer RA 14025 3'	-	0,5
Primer Exon1 5'	0,5	-
Primer WT 3'	0,5	-
Taq-Polymerase (QIAGEN)	0,1	0,1

Nachfolgend sind die verwendeten Primersequenzen aufgeführt:

- Neo: 5'-ATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'
- RA 14025: 3'-CCTCAAGAAGGGGACTCTAAAC-5'
- Exon1: 5'-TTCATCATCTTGCTCTGGCGGACG-3'
- WT: 3'-CCATAGTCACCAATAGCCC-5'

Jedem Ansatz wurden jeweils 3 μl der DNA-Probe zugefügt. Anschließend erfolgte die PCR in einem Thermozykler (Biometra TRIO 48, Biometra GmbH, Göttingen). Der thermische Ablauf gliederte sich wie folgt:

Tab. 2: Angaben von Temperatur und Dauer für den thermischen Ablauf der PCR im Thermozykler.

	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	2min
2.	94 °C	30s
3.	55 °C	30s
4.	68 °C	2min (15 Wdh. ab 2.)
5.	94 °C	30s
6.	50 °C	30s
7.	68 °C	2min (30 Wdh. ab 5.)
8.	72 °C	5min
9.	16 °C	Pause

Nach abgelaufener PCR wurden die zwei getrennten Reaktionsansätze einer Schwanzbiopsie wiedervereinigt und eine Gelelektrophorese mit QIAxcel Advanced (QIAGEN) durchgeführt. Als Kartusche wurde ein QIAxcel DNA Screening Kit 2400 (QIAGEN) eingesetzt. In Abb. 8 ist eine Gelelektrophorese zu sehen, bei der man die unterschiedliche Bandenverteilung bei WT-, KO- und heterozygoten Tieren erkennen kann.

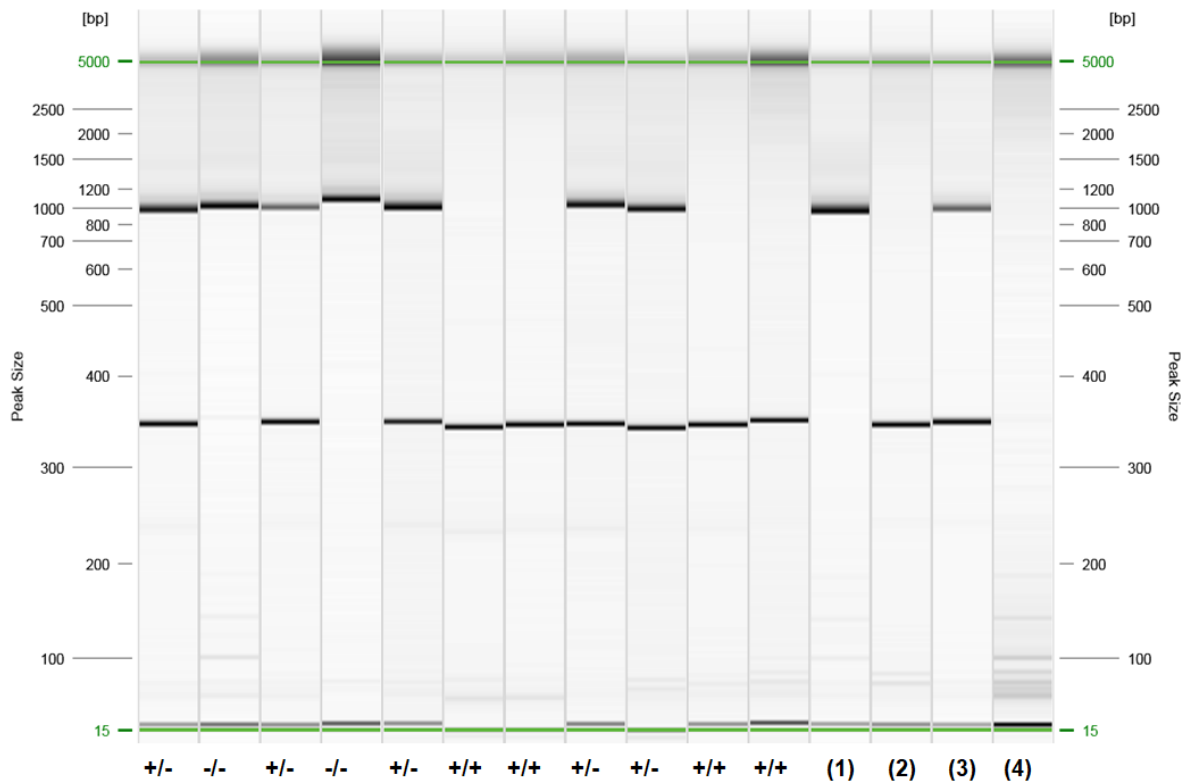


Abb. 8: Beispielbild einer Gelelektrophorese. Untersucht wurden hier 11 Biopsien, von denen fünf zu heterozygoten Tieren (+/-), zwei zu Knockout-Tieren (-/-) und vier zu Wildtypen (+/+) gehören. Rechts sind die vier Kontrollen zu sehen: KO (1), WT (2), heterozygot (3), Wasser (4). WT-Bande: 332bp; KO-Bande: 1000bp.

3.3 Artificielle Zerebrospinalflüssigkeit

Um physiologische Stoffwechselfvorgänge des Hirngewebes gewährleisten zu können, wurde eine artificielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) verwendet. Diese ist in ihrer Zusammensetzung auf die der natürlichen Zerebrospinalflüssigkeit abgestimmt und diente zudem als pH-Puffer. Zunächst wurde eine zehnfach konzentrierte aCSF-Stammlösung angesetzt, für die die Salze NaCl, KCl, NaHCO₃ und NaH₂PO₄, wie in Tab. 3 aufgeführt, abgewogen und in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) unter Rühren gelöst wurden. Das Endvolumen betrug 1 l.

Tab. 3: Herstellungsdaten für die aCSF-Stammlösung. Die Masse ist für ein Endvolumen von 1000 ml bestimmt.

Substanz	Konzentration (mM)	Masse _{1000 ml} (g)
NaCl	1250	73,050
KCl	40	2,982
NaHCO ₃	250	21,003
NaH ₂ PO ₄	12,5	1,725

Zudem wurden Stammlösungen von CaCl₂, MgCl₂ und Glukose angesetzt (Tab. 4). Diese wurden ebenfalls in ddH₂O gelöst, wobei das Endvolumen hier 100 ml betrug. Die Stammlösungen wurden in verschließbaren Gefäßen im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Tab. 4: Herstellungsdaten für CaCl₂⁻, MgCl₂⁻ und Glukose-Stammlösung. Die Masse ist für ein Endvolumen von 100 ml bestimmt.

Substanz	Konzentration (mM)	Masse _{100 ml} (g)
CaCl ₂	1000	14,702
MgCl ₂	1000	20,330
Glukose	2000	39,634

An jedem Versuchstag wurden aus diesen Stammlösungen die Präparationslösung und die Messlösung neu hergestellt. Die jeweiligen Anteile der Stammlösungen wurden wie in Tab. 5 aufgeführt mit ddH₂O unter Rühren auf das jeweilige Endvolumen aufgefüllt. In der Präparationslösung, die auf +4 °C heruntergekühlt wurde, erfolgte sowohl die Präparation als auch das Schneiden des Hirngewebes. Die Messlösung wurde nach Herstellung auf zwei Gefäße aufgeteilt. 200 ml dienten der Aufbewahrung der hinterher hergestellten Hirnschnitte und lagerten bei Raumtemperatur. 800 ml wurden in einem Wasserbad auf +34 °C erwärmt und für die Umspülung des jeweiligen Hirnschnitts während der mikroskopischen Messung bereitgestellt. Alle Lösungen wurden nach Herstellung durchgängig mit Carbogen (5% CO₂, 95% O₂) begast, wobei der pH-Wert einmalig nach 30-minütiger Begasung unter Zugabe von 1 M NaOH bzw. 2 M HCl auf 7,40 eingestellt wurde.

Tab. 5: Herstellungsdaten für die Präparations- und Messlösung. Das Endvolumen der Präparationslösung beträgt 500 ml, das der Messlösung 1000 ml. Angegeben ist jeweils das Volumen der aCSF-Stammlösung im oberen Abschnitt und der CaCl_2 -, MgCl_2 - und Glukose-Stammlösung im unteren Abschnitt, das hinzugefügt werden muss.

Substanz	Präparationslösung (500 ml)		Messlösung (1000 ml)	
	Konzentration (mM)	Volumen (ml)	Konzentration (mM)	Volumen (ml)
NaCl	125		125	
KCl	4		4	
NaHCO_3	25	50	25	100
NaH_2PO_4	1,25		1,25	
CaCl_2	0,5	0,25	2	2
MgCl_2	6	3	1	1
Glukose	10	2,5	10	5

3.4 Chemikalien

Es folgt eine Auflistung der benutzten Chemikalien mit Bezugsdaten und die Herstellungsschritte für die verwendeten Lösungen bei der mikroskopischen Messung.

3.4.1 Artificielle Zerebrospinalflüssigkeit

Die benötigten Chemikalien für die Herstellung der Stammlösungen und die Einstellung des pH-Wertes wurden von den folgenden Herstellern bezogen und bei Raumtemperatur gelagert:

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe): NaCl, MgCl_2 , Glukose, HCl

Merck KGaA (Darmstadt): NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , KCl, CaCl_2

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze): NaOH

3.4.2 Pharmakologische Substanzen

Nachfolgend findet sich eine Übersicht aller während der mikroskopischen Messung verwendeten Agenzien und ihre verwendete Endkonzentration. Mit Ausnahme von HET0016 (Biomol GmbH, Hamburg) wurden diese von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) bezogen.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Agenzien während der mikroskopischen Messung mit jeweiliger Endkonzentration.

Pharmakon	Endkonzentration
L-NAME	100 μ M
NS1619	30 μ M
HET0016	1 μ M
20-HETE	100 nM

Für die Herstellung der L-NAME-Lösung wurden in einem separaten Becherglas 5,4 mg des L-NAME-Pulvers, welches bei -20 °C gelagert wurde, in 200 ml warmer aCSF-Messlösung gelöst, sodass sich eine Konzentration von 100 μ M ergab. Zu jeder mikroskopischen Messung, bei der L-NAME verwendet wurde, wurde eine neue Lösung hergestellt. Von den Substanzen NS1619, HET0016 und 20-HETE wurden Stammlösungen angesetzt, von denen das für die entsprechende Endkonzentration notwendige Volumen in 30 ml L-NAME-Lösung oder bei Kombinationsversuchen in die bereits das Z-PDP A1/2 enthaltende L-NAME-Lösung (vgl. 3.4.3) pipettiert wurde. Die 30 ml wurden von den 200 ml der zuvor angesetzten L-NAME-Lösung entnommen.

Für die Herstellung einer 10 mmolaren NS1619-Stammlösung wurden 5 mg NS1619 in 1,380 ml 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt und bei +4 °C. Von dieser Stammlösung wurden 90 μ l pipettiert, um die Endkonzentration von 30 μ M zu erreichen. Für die Herstellung einer 40 mM HET0016-Stammlösung wurden 10 mg HET0016 in 1,212 ml 100%igen DMSO gelöst. Anschließend wurde die neu angesetzte Stammlösung bei +4 °C gelagert. Für das Erreichen der verwendeten Endkonzentration von 1 μ M wurden 0,75 μ l der Stammlösung pipettiert. In der 20-HETE-Stammlösung waren 10 μ g 20-HETE in 100 μ l Ethanol gelöst, sodass sich eine Konzentration von 100 μ g/ml ergab. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte bei -20 °C. Für eine Endkonzentration von 100 nM wurden 9,62 μ l der Stammlösung pipettiert.

Alle Stammlösungen wurden vor ihrer Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut und zusätzlich gevortext.

3.4.3 Hämabbauprodukte (HDPs)

Die Hämabbauprodukte Z-PDP A1/2, Z-BOX A, Z-BOX D und die Hämatinsäure wurden durch das Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena (IAAC) bereitgestellt. Die für die Experimente bestimmten Proben wurden dort abgewogen und in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß bei +4 °C gelagert. Die Menge jeder Probe war so bestimmt, dass durch die Zugabe von 30 ml L-NAME-Lösung (vgl. 3.4.2) die jeweils gewünschte Endkonzentration erreicht wurde (Tab. 7). Für die Kombinationsversuche waren Z-PDP A1/2 und Z-BOX A bereits gemeinsam in einem Reaktionsgefäß aliquotiert.

Tab. 7: Übersicht der verwendeten HDPs während der mikroskopischen Messung mit jeweiliger Endkonzentration.

Hämabbauprodukt	Endkonzentration HDP [μM]
Hämatinsäure	5
Z-BOX D	5
Z-PDP A1/2 + Z-BOX A	0,5 0,05
Z-PDP A1/2 + Z-BOX A	5 5
Z-PDP A1/2 + HET0016 oder NS1619	0,5

3.4.3.1 Gewinnung von Z-PDP A1/2 und Hämatinsäure

Die Gewinnung des Intermediates Z-PDP A1/2 erfolgte über die Degradation von Bilirubin. Zu Beginn wurden 5 g Bilirubin (8,6 mmol) für 24 h in 2,5 l 5 M NaOH suspendiert. Nachdem der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 7,5 eingestellt wurde, folgte die Zugabe von 50%iger H₂O₂-Lösung innerhalb von vier Stunden bis eine finale Konzentration von 1% erreicht wurde. Das entstandene Gemisch wurde für weitere 20 h gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion der BOXes durch Zugabe von Chloroform, um die bei diesem Prozess durch Oxidation entstandenen Abbauprodukte von Hämoglobin zu isolieren. Die zurückbleibende wässrige Phase enthielt die PDPs, die dann durch Festphasenextraktion (*hydrophilic lipophilic balanced* Kartuschen) weiter aufgereinigt wurden. Diese wurden mit 20% Acetonitril/Wasser eluiert, wobei zuvor mit Wasser gewaschen wurde. Nachfolgend erfolgte die Trocknung in einer Vakuum-Zentrifuge und die Einzelisomer-Isolation durch präparative

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Shimadzu LC-8A) mit einer HTEC C18-Säule (5 µm, 250 x 16 mm, Mackerey-Nagel) und SPD-10AV UV/Vis-Detektion bei 280 nm. Aufgrund der raschen Isomerisierung der Einzelisomere zu ihrem jeweiligen Konstitutionsisomer wurden die HPLC-Fractionen umgehend mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefroren. Abschließend erfolgte nochmals eine Trocknung. In diesem Zustand waren die gewonnenen Proben stabil, sodass die Einzelisomere in gewünschter Reinheit isoliert werden konnten (Ritter et al. 2016). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein äquimolares Gemisch, bestehend aus den Einzelisomeren Z-PDP A1 und Z-PDP A2, verwendet.

Die Gewinnung der Hämatinsäure erfolgte ähnlich dem Z-PDP A1/2 über die nicht-enzymatische oxidative *in vitro*-Degradation von Bilirubin mit H₂O₂. Mittels HPLC konnte die Substanz aus der H₂O-Fraktion der Festphasenextraktion isoliert werden (Ritter et al. 2018).

3.4.3.2 Z-BOX A und Z-BOX D

Für die Kombinationsversuche wurde neben Z-PDP A1/2 auch Z-BOX A benötigt. Im Gegensatz zu Z-PDP A1/2 wurde Z-BOX A auf synthetischem Weg erzeugt (Abb. 9), da durch die Degradation von Bilirubin nur kleine Mengen gewonnen werden können und die Aufreinigung zudem beschwerlich ist. Der synthetische Weg bietet hingegen den Vorteil eine höhere Ausbeute an Z-BOX A zu erzielen.

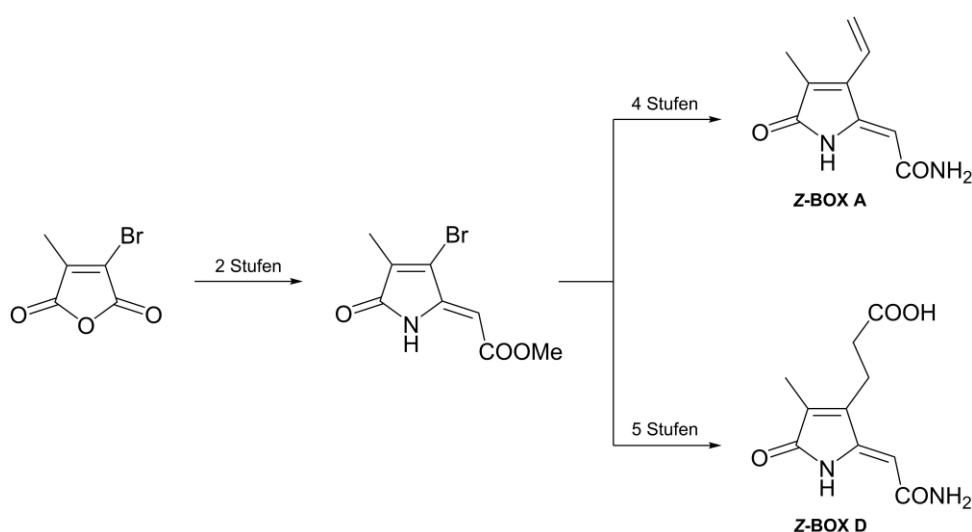


Abb. 9: Synthese von Z-BOX A (6 Schritte) und Z-BOX D (7 Schritte) ausgehend von 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion über das gemeinsame Zwischenprodukt Methyl (Z)-2-(3-bromo-4-methyl-5-oxo-1H-pyrrol-2(5H)-ylidene)acetat. Bereitgestellt durch Daniel Schulze (IAAC).

Die Synthese von Z-BOX A erfolgte in sechs Schritten ausgehend von 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion (Klopfleisch et al. 2013, Joerk et al. 2014). Auch Z-BOX D, dessen Effekt auf den Gefäßdurchmesser bisher noch nicht überprüft wurde, wurde auf synthetischem Wege über sieben Schritte, ebenfalls ausgehend von 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion, hergestellt (Schulze et al. 2019) (Abb. 9).

3.5 Präparation akuter Hirnschnitte

Zu Beginn wurde die Versuchsm Maus mit 0,3 bis 0,4 ml Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf) in einer Anästhesieglocke anästhesiert. Um eine ausreichende Narkosetiefe feststellen zu können, wurde zum einen der Stellreflex für den Bewusstseinsverlust und zum anderen der Zwischenzehenreflex als Maß der Schmerzempfindung überprüft. Anschließend wurde die Dekapitation vorgenommen und das Fell im Bereich des Schädeldachs entfernt. Es folgte die sofortige Überführung des Schädels in eine auf Eis gekühlte und mit kalter Präparationslösung befüllte Petrischale. Mittels einer Pinzette wurde die Fixierung des Schädels durch die Orbitae ermöglicht. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops wurde das Schädeldach mit einer Federschere zunächst entlang der Sutura sagittalis eröffnet. Weitere Schnitte wurden jeweils beidseitig entlang der Sutura coronalis und der Sutura lambdoidea gesetzt, sodass die Ossa parietalia nach lateral und das Os occipitale nach dorsal weggeklappt und schließlich entfernt werden konnten. Im nächsten Schritt wurde mithilfe eines Skalpell s kaudal das Zerebellum und rostral der Bulbus olfactorius vom frei präparierten Hirngewebe abgetrennt. Der nun gelöste Gehirnanteil konnte unter Verwendung eines kleinen Spatels aus dem Schädel herausgehoben werden, um dann frontalseitig mit Sekundenkleber (UHU GmbH & Co. KG, Bühl) auf einem gekühlten Probenhalter befestigt zu werden. Dieser wurde dann in die Wanne eines Mikrotoms mit vibrierender Klinge (LEICA VT1200 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) gesetzt, die unmittelbar nach dem Transfer ebenfalls mit kalter Präparationslösung befüllt wurde. Daraufhin konnten 350 µm dicke Koronalschnitte des Hirngewebes angefertigt werden. Für die Klinge wurde eine Vorschubgeschwindigkeit von 0,14 mm/s bei einer Amplitude von 1,0 mm benutzt. Die gewonnenen Hirnschnitte wurden aus der kalten Präparationslösung unverzüglich in die bei Raumtemperatur gelagerte Messlösung überführt, in der sie dann mindestens 30 min ruhten.

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Mikroskopische Messung

Für die Darstellung des Hirngewebes mit den im Fokus stehenden Arteriolen wurde die Transmissionsmikroskopie als bildgebendes Verfahren gewählt. Über den gesamten Messzeitraum lag der Hirnschnitt in einer lichtdurchlässigen Kammer, die kontinuierlich mit aCSF-Messlösung durchflossen wurde und sich im Strahlengang eines Durchlichtmikroskops Eclipse FN 1 (Nikon Instruments, Tokio, Japan) befand. Es wurde ein unendlich korrigiertes Wasserimmersionsobjektiv von Nikon mit einer 16-fachen Vergrößerung verwendet. Die numerische Apertur betrug bei einem Arbeitsabstand von 3,0 mm 0,80. Die Bilder der Arteriolen wurden durch eine CCD-Kamera (Hamamatsu CCD-Kamera, Modell C2400-77, Hamamatsu Photonics, Japan) aufgenommen und über einen Analog-Digital-Konverter (Hamamatsu Camera Controller C2400-60, Hamamatsu Photonics, Japan) digitalisiert. Anschließend wurden sie in die Messsoftware View Creator Pro (ADLINK, Taipei, Taiwan) bzw. iuVCR (Version 4.15.0.379, Ivan Uskov, iuLab) übertragen.

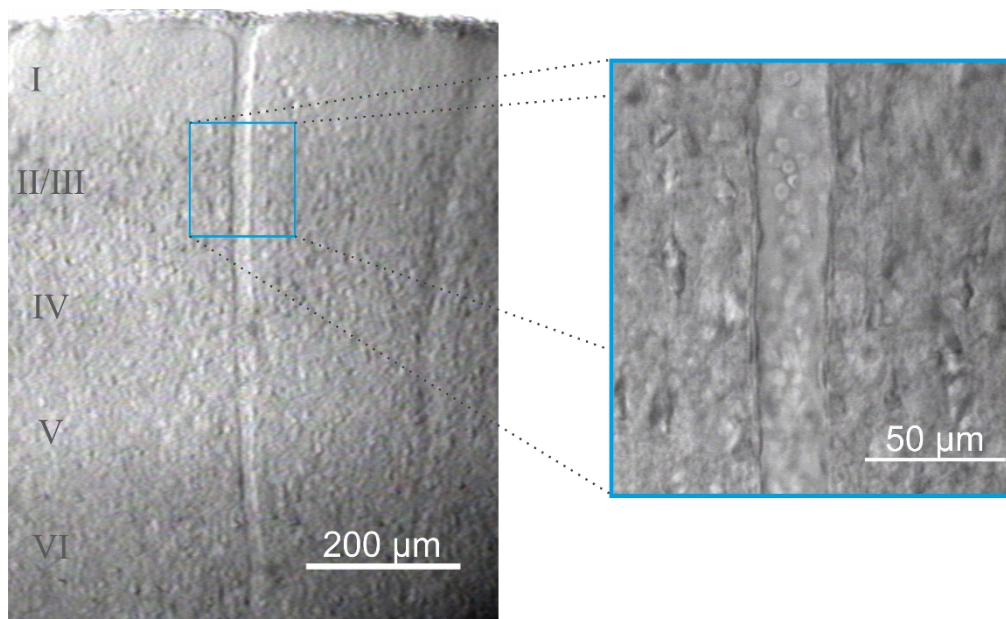


Abb. 10: Auswahl einer Arteriole in den Schichten II/III des visuellen Kortex' der Maus.

Die für die mikroskopische Messung genutzten Lösungen wurden der Kammer mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 4 ml/min mittels Peristaltikpumpe zugeführt und durchflossen einen Heizblock, um auf eine Temperatur von +32,5 °C erwärmt werden

zu können. Durch Verwendung der Messlösung und der kontinuierlichen Begasung blieben die Hirnschnitte durchschnittlich 6 h nach dem Schneiden vital.

Für die Messung wurden Arteriolen-Abschnitte gewählt, die in den Schichten II/III des visuellen Kortex' lagen und einen Innendurchmesser zwischen 15 und 40 μm hatten (Abb. 10). Darüber hinaus wurde die Dicke der Gefäßwand betrachtet, um Arteriolen von Venolen zu unterscheiden.

3.6.2 Differentialinterferenzkontrast

Um Gefäßwände und umliegendes Gewebe im ungefärbten Hirnschnitt im Hinblick auf die spätere Auswertung besser abgrenzen zu können, wurde zur Kontraststeigerung der differentielle Interferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC) verwendet.

Für dieses Verfahren wird durch einen Polarisator erzeugtes, linear polarisiertes Licht genutzt. Dieses wird mithilfe eines Prismas in zwei getrennte Lichtanteile geteilt, deren Polarisations Ebenen senkrecht zueinanderstehen. Aufgrund von Unterschieden in den lichtbrechenden Eigenschaften innerhalb des Präparates kann es zu abweichenden Phasenverzögerungen der paarigen Lichtanteile kommen. Die Lichtanteile werden nach Durchlaufen des Objektivs durch ein weiteres Prisma wiedervereinigt. Kommt es zu keiner Phasenverzögerung, befindet sich das wiedervereinigte Licht wieder in der vom Polarisator vorgegebenen Polarisations Ebene und wird durch den nachgeschalteten Analysator blockiert. Phasenverzögerte Lichtanteile sind nach Wiedervereinigung hingegen elliptisch polarisiert und können den Analysator teilweise durchdringen. Auf diese Weise wird die Wahrnehmung von Helligkeitsunterschieden ermöglicht, sodass ungefärbte Präparate kontrastreich dargestellt werden können (Wegerhoff 2015).

3.6.3 Lichtabschirmung

Da BOXes, PDPs, Hämatinsäure und NS1619 lichtinstabil sind, musste hier besonders auf die Lichtabschirmung des Arbeitsbereiches geachtet werden. Für die 90-minütige Substanzapplikation wurde zum einen der die Substanzlösung beinhaltende Messzylinder mit Aluminiumfolie ummantelt und zum anderen der mikroskopische Arbeitsbereich abgedunkelt. Die einzige Lichtquelle war somit die Halogenlampe des Mikroskops, die nur für die Aufnahme eines Bildes im 5-Minuten-Intervall für wenige

Sekunden angeschaltet wurde. So konnte die Lichteinwirkung auf ein Minimum reduziert werden.

3.6.4 Bestrahlung mit NIR-Licht

Um einen möglichen gefäßerweiternden Effekt durch NIR-Bestrahlung nachvollziehen zu können, erfolgte nach Aufnahme der Kontrollbilder die kontinuierliche Beleuchtung des Hirnschnitts mit einer Wellenlänge zwischen 850 und 950 nm. Dies wurde durch Zwischenschaltung eines Bandpassfilters in den Lichtpfad des Mikroskops erreicht. Als Lichtquelle wurde die Halogenlampe (100 W, 12 V) des Mikroskops verwendet. Mit Hilfe eines Laser Power Meters (LabMax-TOP, Coherent, Santa Clara, USA) wurde die Bestrahlungsintensität auf 7,2 mW/cm² eingestellt.

3.7 Versuchsdesign und Experimentalserien

Um eine Vergleichbarkeit der Messungen untereinander zu gewährleisten, wurde stets nach einem etablierten und vorher festgelegten Zeitprotokoll vorgegangen (Abb.11). Alle Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 145 min, wobei alle 5 min eine Aufnahme des jeweils ausgewählten Gefäßabschnitts gemacht wurde. Jede Messung begann mit einer Kontrollphase, bei der der jeweilige Hirnschnitt über 10 min nur mit aCSF-Messlösung umspült wurde. Mit diesem Schritt erfolgte die Sicherstellung der Durchmesserstabilität des ausgewählten Gefäßes, die für die weitere Messung unerlässlich ist.

Für die aCSF-Kontrollmessung und die NIR-Messung an Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen wurde über den gesamten Messzeitraum von 145 min ausschließlich aCSF-Messlösung zugeführt (Abb. 11A). Für die L-NAME-Kontrollmessung – ebenfalls an Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen – schloss sich an die Kontrollphase eine 135-minütige Umspülung des Hirnschnitts mit L-NAME-Lösung an (Abb. 11A).

Bei Messungen an Hirnschnitten von Slo1-Mäusen (Abb. 11B/C) folgte der Kontrollphase eine 45-minütige L-NAME-Phase, um die Gefäße vorzuspannen. Daran anschließend wurde der Hirnschnitt über 90 min mit der zu untersuchenden Substanzlösung umspült. Die Endkonzentrationen der darin enthaltenen Substanz bzw. Substanzen für die jeweilige Versuchsreihe lassen sich aus Abb. 11 entnehmen. Da Z-BOX D und die HA noch nicht an Hirnschnitten untersucht wurden, wurden neben

den Slo1-WT- auch Slo1-KO-Mäuse verwendet (Abb. 11B). Dadurch sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die HA oder Z-BOX D Vasoaktivität zeigen und ob diese von der Expression des BK_{Ca}-Kanals abhängig ist. Bezüglich des Genotyps wurden diese Versuche einfach verblindet durchgeführt, sodass der Genotyp dem Experimentator nicht bekannt war.

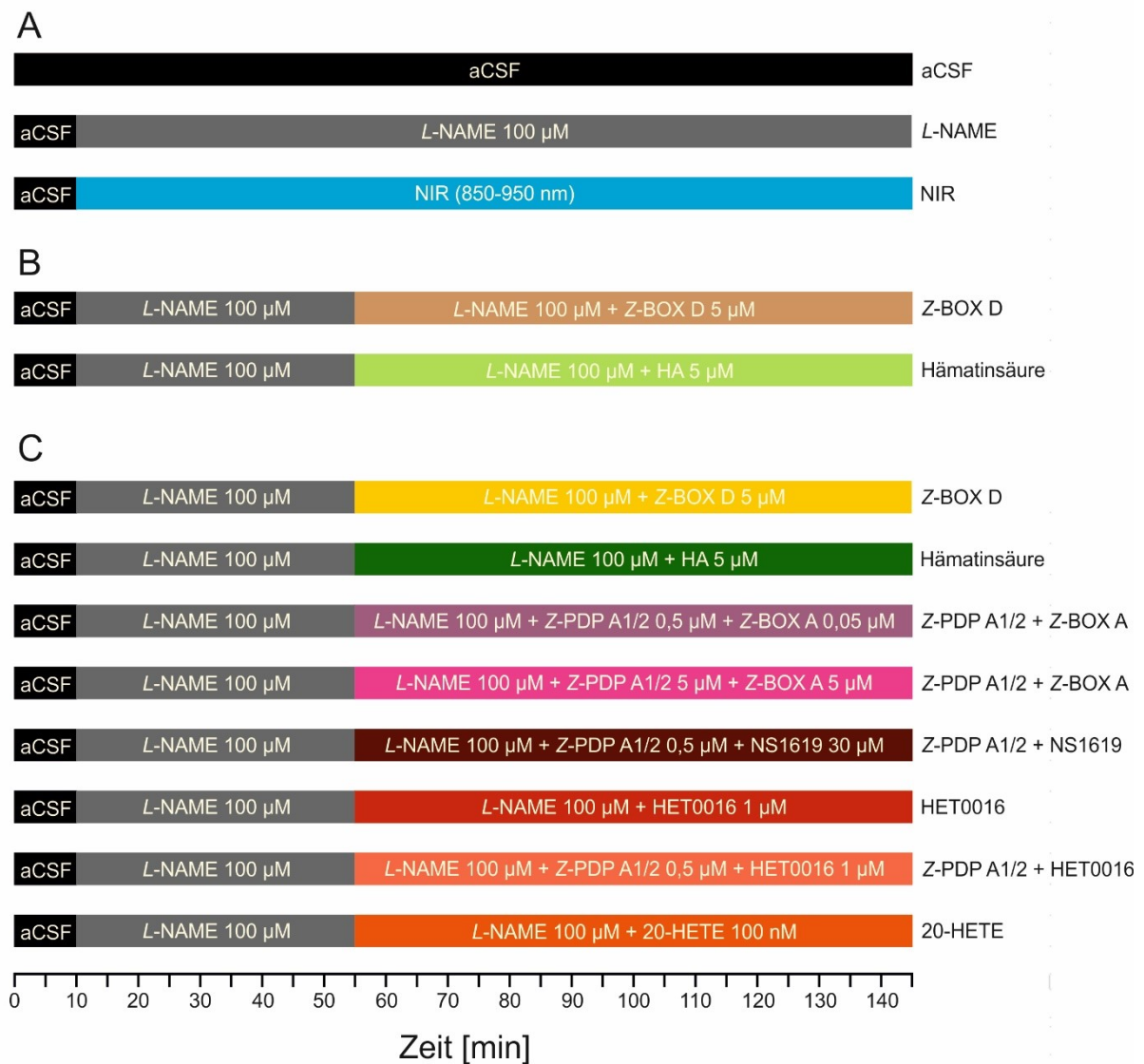


Abb. 11: Schematischer Ablauf der Experimentalserien. Es wurden C57BL/6J-Mäuse (A), Slo1-KO-Mäuse (B) und Slo1-WT-Mäuse (C) verwendet. Allen Experimenten gleich ist die 10-minütige Umspülung mit aCSF-Messlösung zur Aufnahme der Kontrollbilder.

Voraussetzung für den Einschluss einer Messung in die Studie war, dass der Hirnschnitt über den Messzeitraum stabil und vital blieb. Folglich führte ein Auftreten von spontaner, starker und anhaltender Dilatation bzw. Kontraktion >10% innerhalb von 10 min zum Abbruch und Ausschluss der jeweiligen Messung von der Studie.

Weiterhin stellten das Anschwellen des Hirngewebes, was sich in einer zunehmenden Unschärfe des mikroskopischen Bildes äußerte, und eine negative Vitalitätskontrolle mit 10 μl einer Noradrenalin (NA)-Stammlösung am Ende einer jeden Messung Ausschlusskriterien dar. Für die NA-Stammlösung wurden 2 mg NA (Merck KGaA, Darmstadt) in 2 ml NaCl gelöst und bei +4 °C aufbewahrt. Die Kontrolle wurde als negativ gewertet, wenn eine Gefäßverengung nach Zugabe von NA ausblieb.

3.8 Bestimmung des Gefäßdurchmessers

Ziel der Messungen war es, die zeitabhängige Änderung des Gefäßdurchmessers darstellen zu können. Dafür wurde alle 5 min eine Aufnahme des ausgewählten Gefäßabschnitts gemacht. Für die Auswertung wurden diese Aufnahmen in das Programm ImageJ (Version 1.51j8, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) geladen. Anschließend wurde die Fläche über eine Gefäßlänge von 50 μm bestimmt, wobei die innere Gefäßwand als begrenzende Struktur diente (Abb. 12). Die erhaltenen Flächen wurden auf die Referenzwerte der Kontrollbilder normiert. Für die Experimente mit Slo1-Mäusen bildeten die Mittelwerte von Minute 45 bis 55 die Referenzwerte, bei den C57BL/6J-Mäusen dienten die gemittelten ersten 10 Minuten als Referenzwert.

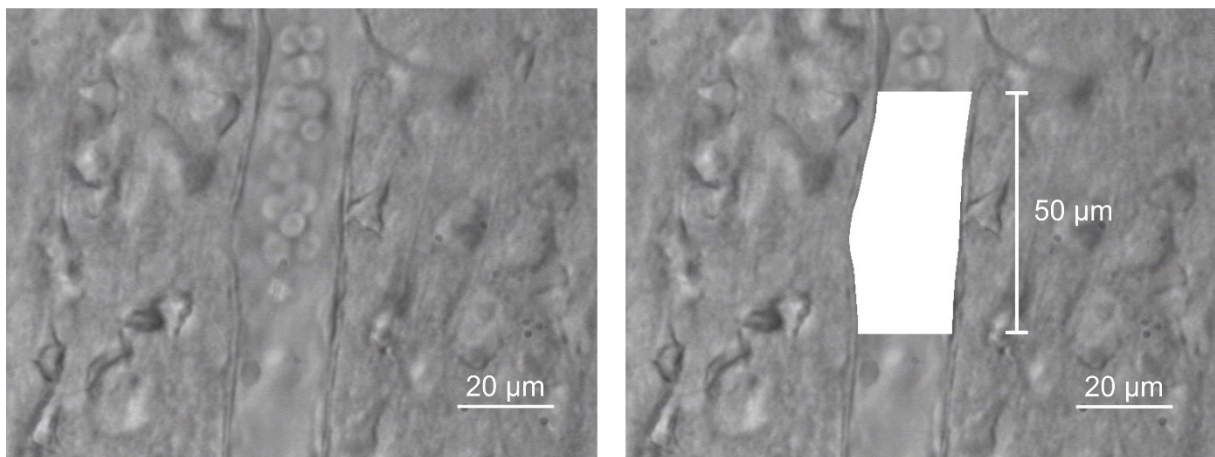


Abb. 12: Aufnahme einer Arteriolen in der Schicht II/III des visuellen Kortex' der Maus (links). Im Gefäßlumen sind Erythrozyten zu erkennen. Rechts ist für dieselbe Arteriolen eine Flächenkalkulation mit dem Programm ImageJ dargestellt. Die Fläche (hier weiß markiert) wurde entlang der inneren Gefäßwand auf einer Länge von 50 μm bestimmt.

3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) genutzt. Für die Überprüfung der Nullhypothese H_0 „Es gibt keinen Unterschied in der Änderung des arteriolen Durchmessers zwischen den Versuchsgruppen“ wurde ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, wobei eine Normalverteilung der Daten angenommen wurde. Hierfür wurden die Werte der letzten 10 min (135-145 min) gemittelt und Unterschiede sowohl zwischen den Versuchsgruppen als auch zu den L-NAME- bzw. aCSF-Kontrollwerten auf statistische Signifikanz überprüft. Für die L-NAME-Kontrollwerte bei KO- und WT-Mäusen wurde auf bereits erhobene Daten zurückgegriffen (Joerk et al. 2019b). Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt. Die Signifikanzstufen waren durch den p-Wert folgendermaßen voneinander abgegrenzt:

*	$p < 0,05$	signifikant
**	$p < 0,01$	hoch signifikant
***	$p < 0,001$	höchst signifikant

Alle Mittelwerte sind mit ihrer \pm Standardabweichung, die in den Diagrammen durch einen Fehlerbalken dargestellt wurde, angegeben. In den Liniendiagrammen stellen die grau hinterlegten Kurvenscharen die zeitliche Veränderung des Durchmessers der jeweiligen Einzelexperimente dar. In den Punktdiagrammen werden die Mittelwerte der Einzelexperimente durch Rauten dargestellt. Die Markierungen oberhalb der Punktdiagramme stellen Vergleiche zwischen der durch die HDP induzierten Durchmesseränderung und der jeweiligen Kontrollgruppe dar. Die Anzahl der verwendeten Hirnschnitte ist mit dem Parameter n gekennzeichnet. Da pro Versuchstier nur eine Messung durchgeführt wurde, ist die Anzahl der gemessenen Gefäße mit der der verwendeten Versuchstiere gleichzusetzen.

Die graphische Darstellung der Diagramme und Abbildungen in dieser Arbeit wurden mithilfe des Programmes CorelDraw X5 (Version 15.0.0.486, Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 aCSF-Kontrollmessung an Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen

Um stabile Versuchsbedingungen zu etablieren und um auszuschließen, dass die Arteriolen während der Umspülung mit aCSF-Messlösung bereits mit Durchmesseränderungen unter Kontrollbedingungen reagieren, wurden zunächst ausschließlich Messungen mit aCSF-Messlösung durchgeführt.

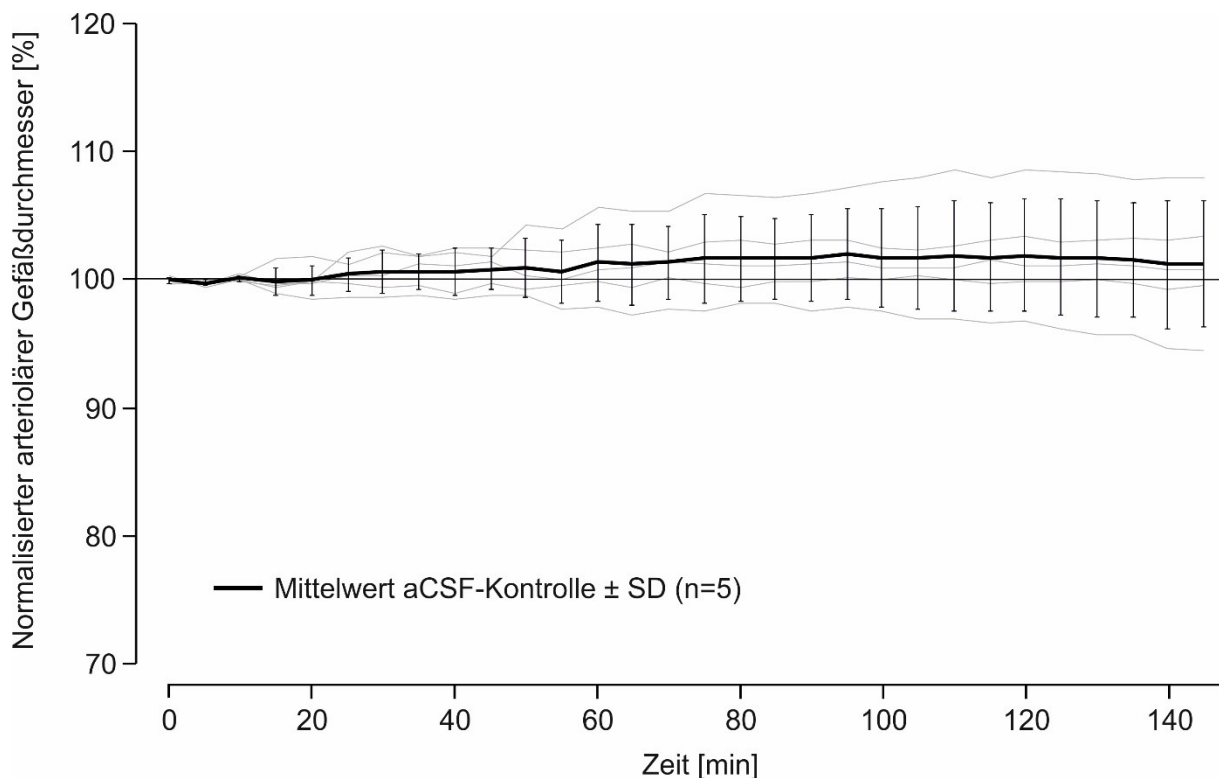


Abb. 13: Änderung des normalisierten arteriolaren Durchmessers während der Umspülung des Hirnschnitts mit aCSF-Messlösung in Abhängigkeit von der Zeit.

Über den gesamten Messzeitraum von 145 min blieb der Durchmesser der Arteriolen stabil, sodass sich der mittlere arteriolarer Durchmesser am Ende des Messzeitraums nicht signifikant um $+1 \pm 4,8\%$ vom Ausgangswert unterschied ($n = 5$; $p = 0,53$; Abb. 13). Mit dieser Experimentalserie konnte gezeigt werden, dass die Hirnschnittexperimente unter stabilen und kontrollierbaren Bedingungen durchgeführt werden können und somit sichergestellt ist, dass die in den folgenden Experimentalserien gemessenen vasoaktiven Substanzeffekte nicht durch Veränderung des arteriolarer Durchmessers unter Kontrollbedingungen überlagert werden.

4.2 Vorspannung der Arteriolen mit L-NAME

Um der Relaxation der Gefäße aufgrund des fehlenden Blutdrucks *in vitro* entgegenzuwirken, erfolgte eine Vorspannung der Gefäße mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME. Nach Aufnahme des 10-minütigen Intervalls unter Kontrollbedingungen mit aCSF-Messlösung folgte die Zuführung einer 100µmolaren L-NAME-Lösung über 135 min. Innerhalb der ersten 40 min nach Einwaschung veränderte der mittlere Gefäßdurchmesser sich nicht und verblieb auf dem Ausgangsniveau. Nach Minute 50 beginnend zeigte die Auswertung eine Gefäßdurchmesserabnahme, die am Ende der Messung $-4 \pm 6,7\%$ betrug ($n = 6$; Abb. 14). Diese unterschied sich weder vom Ausgangswert ($p = 0,18$) noch von der aCSF-Kontrolle ($p = 0,17$) signifikant.

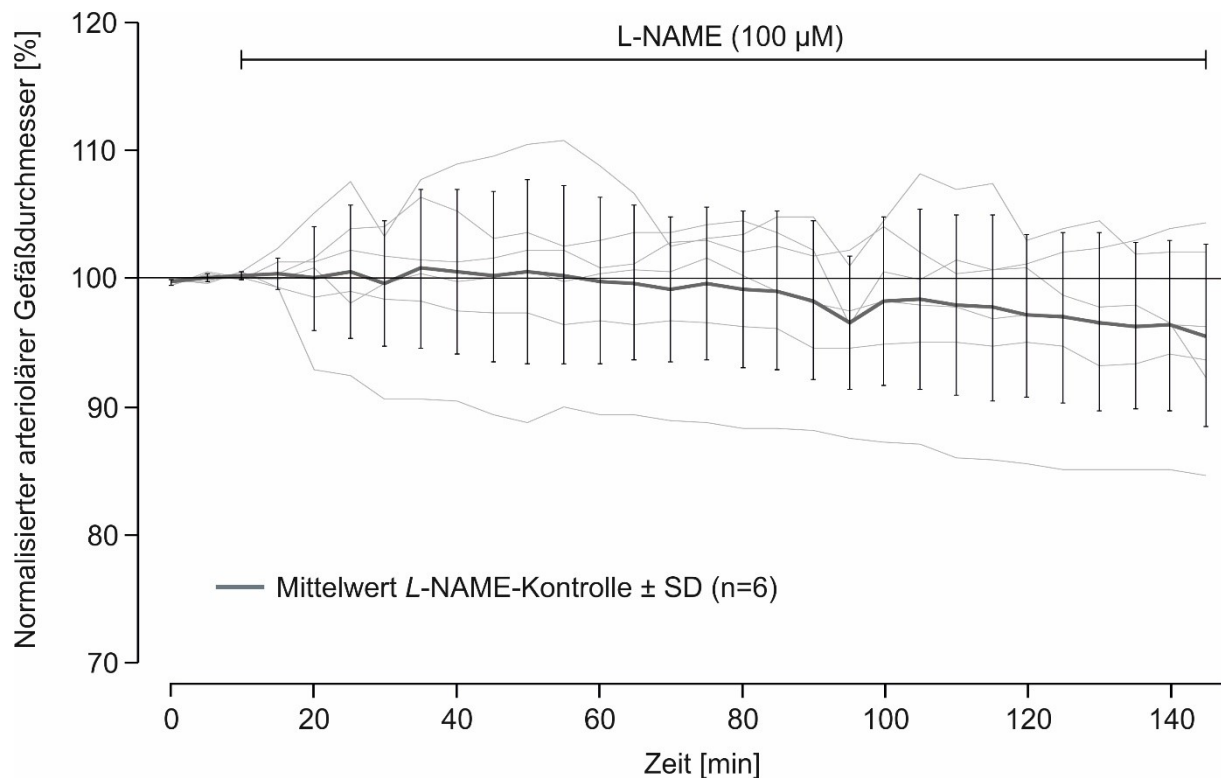


Abb. 14: Änderung des normalisierten arteriolaren Durchmessers nach 135-minütiger Umspülung des Hirnschnitts mit L-NAME-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit.

4.3 Bestrahlung intrakortikaler Arteriolen mit Nahinfrarotlicht

Um einen in der Literatur beschriebenen gefäßerweiternden Effekt von Nahinfrarotlicht zu untersuchen, wurden die Arteriolen in Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen über 135 min mit Nahinfrarotlicht in einem Wellenlängenbereich zwischen 850 und 950 nm bestrahlt. Dabei wurden die Hirnschnitte über die gesamte Messung nur mit aCSF-Messlösung umspült. Von einer Vorspannung der Arteriolen mit L-NAME wurde bei diesen Experimenten abgesehen, um den NO-Stoffwechsel nicht im Vorhinein pharmakologisch zu beeinflussen. Der mittlere arterioläre Durchmesser zeigte über den gesamten Messzeitraum keine starken Veränderungen und unterschied sich am Ende der Messung um $-2 \pm 2,7\%$ vom Ausgangswert ($n = 5$; Abb. 15). Im Vergleich zur aCSF-Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,17$; Abb. 16).

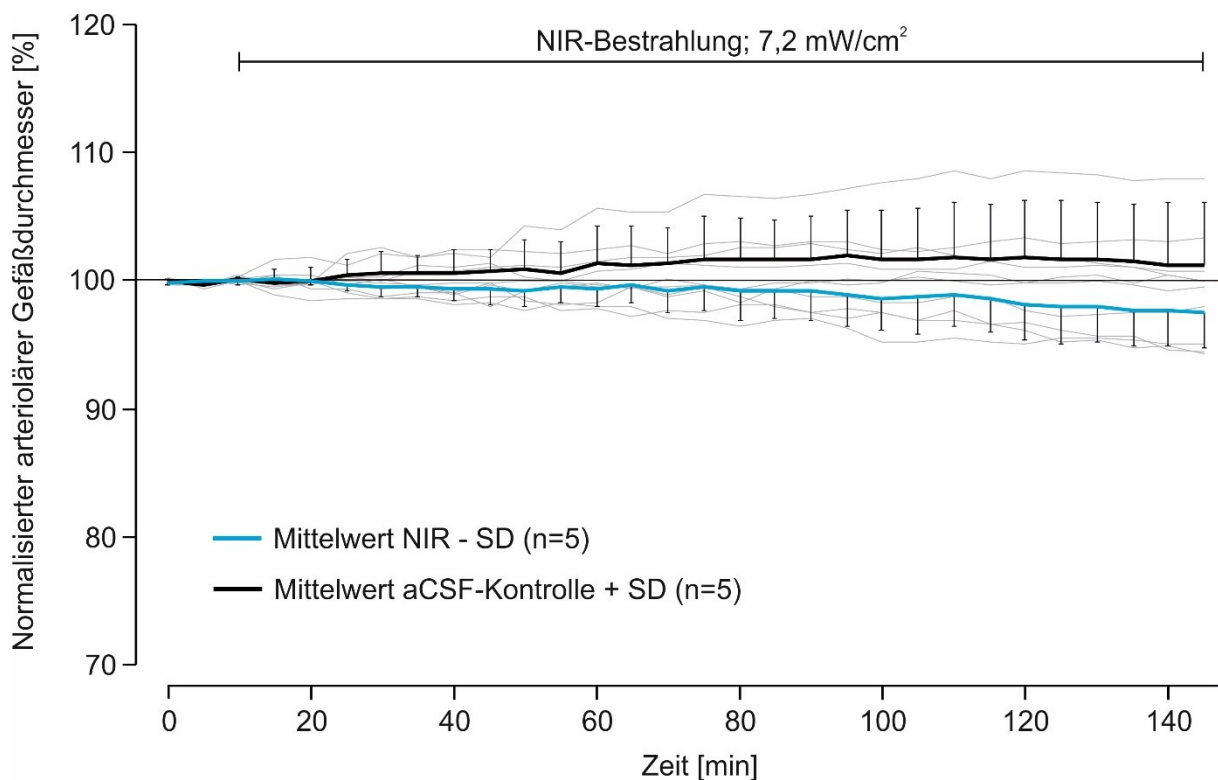


Abb. 15: Zeitliche Änderung des normalisierten arteriolaren Durchmessers unter NIR-Bestrahlung [$7,2 \text{ mW/cm}^2$; 850-950 nm] im Vergleich zur aCSF-Kontrollmessung.

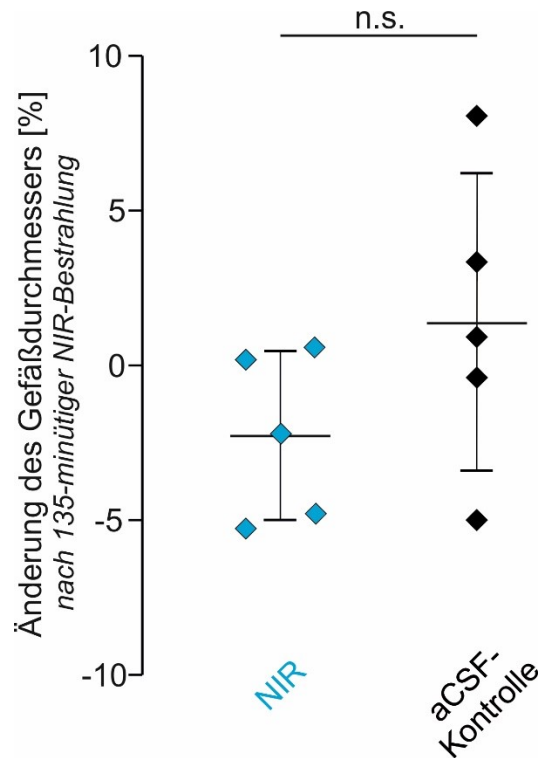


Abb. 16: Vergleich der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach NIR-Bestrahlung und aCSF-Kontrolle.

4.4 Wirkung der Hämaminsäure

Für die Untersuchung eines vasoaktiven Effektes der Hämaminsäure wurden sowohl Hirnschnitte von Slo1-WT- als auch von Slo1-KO-Mäusen verwendet, um Rückschlüsse auf eine mögliche BK_{Ca}-Kanal-abhängige Gefäßreaktion schließen zu können. Bei den KO-Mäusen blieb der Gefäßdurchmesser stabil und unterschied sich mit einer Änderung um $-1 \pm 4,2\%$ ($n = 6$; Abb. 17) am Ende des Messzeitraums signifikant von der L-NAME-KO-Kontrolle ($p = 0,02$; Abb. 18). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den WT-Mäusen nach 90-minütiger Umspülung des Hirnschnittes mit HA eine Gefäßverengung, die 20 min nach Substanzapplikation einsetzte und sich kontinuierlich bis zu einer Durchmesserabnahme um $-7 \pm 8,5\%$ ($n = 7$; Abb. 17) fortsetzte. Diese bei WT-Mäusen beobachtete Änderung des Durchmessers erwies sich allerdings sowohl im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle ($p = 0,63$; Abb. 18) als auch zur Slo1-KO-Gruppe ($p = 0,21$; Abb. 18) als nicht signifikant.

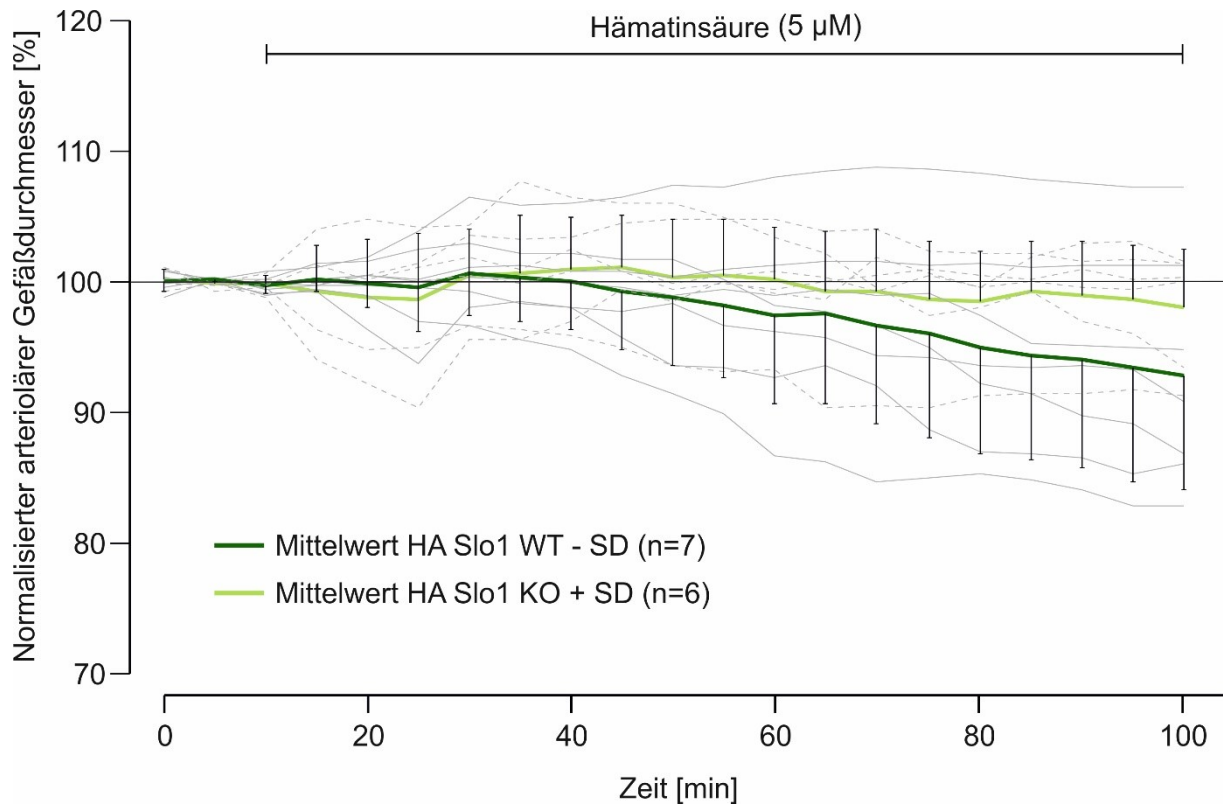


Abb. 17: Darstellung der Änderung des normalisierten arteriolen Durchmessers bei Slo1-WT- und Slo1-KO-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit. Die gestrichelten Kurven stellen die einzelnen Messungen bei Slo1-KO-Mäusen dar. Die durchgezogenen Linien zeigen die Einzelexperimente von Slo1-WT-Mäusen.

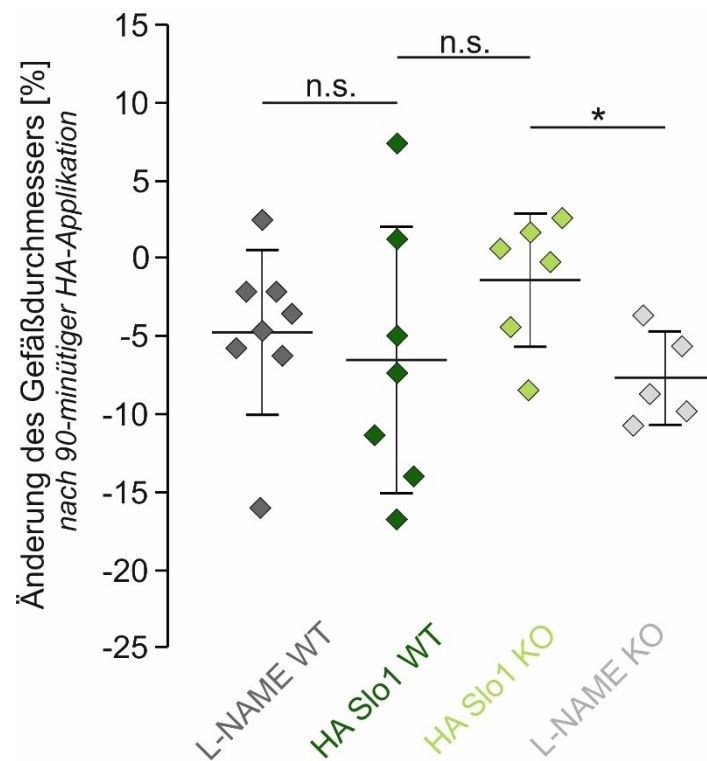


Abb. 18: Vergleich der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach Applikation von 5 μ M HA bei Slo1-WT- bzw. Slo1-KO-Mäusen und L-NAME Kontrolle.

4.5 Wirkung von Z-BOX D

Um die Fragestellung zu beantworten, ob Z-BOX D eine vasogene Eigenschaft aufweist und ob diese von der Expression des BK_{Ca}-Kanals abhängig ist, wurden Arteriolen in Hirnschnitten von Slo1-WT- bzw. Slo1-KO-Mäusen untersucht. Nach Applikation einer 5 µmolaren Z-BOX D-Lösung verringerte sich der mittlere Gefäßdurchmesser bei Experimenten mit Hirnschnitten von Slo1-WT-Mäusen fortlaufend. Am Ende der Messung ergab sich eine Abnahme des Durchmessers um $-9 \pm 5,9\%$ ($n = 6$; Abb. 19). Im Vergleich zu Slo1-KO-Mäusen, bei denen der Durchmesser nur geringfügig um das Ausgangsniveau schwankte ($0 \pm 1,9\%$, $n = 4$; Abb. 19), war diese Gefäßverengung signifikant ($p = 0,02$, Abb. 20). Der statistische Vergleich zwischen der WT-Gruppe und der L-NAME-Kontrolle zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,22$; Abb. 20), während der Vergleich zwischen der KO-Gruppe und der L-NAME-Kontrolle einen signifikanten Unterschied zeigte ($p = 0,003$; Abb. 20).

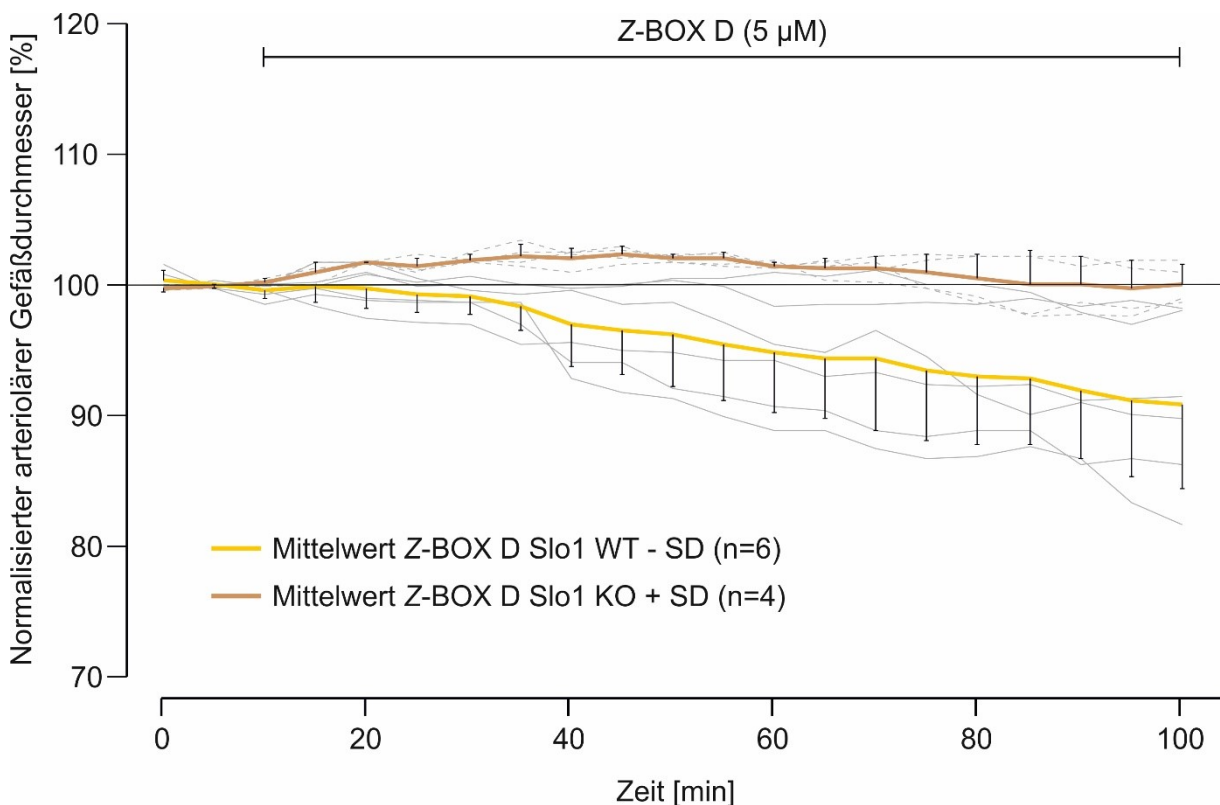


Abb. 19: Vergleich der zeitlichen Änderung des normalisierten arteriölen Durchmessers von Slo1- WT- bzw. Slo1-KO-Mäusen nach Applikation von 5 µmolarem Z-BOX D. Die gestrichelten Linien stellen die Einzelerperimente der Slo1-KO-Gruppe dar. Die durchgezogenen Linien stellen die Einzelerperimente der Slo1-WT-Gruppe dar.

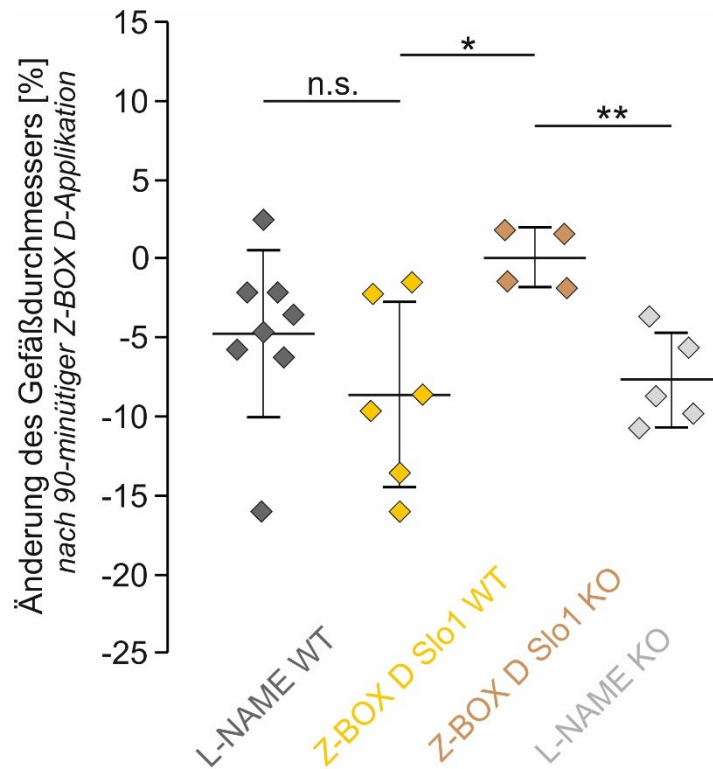


Abb. 20: Prozentuale Veränderung des Gefäßdurchmessers nach 90-minütiger Applikation von 5 µM Z-BOX D bei Hirnschnitten von Slo1-WT- bzw. Slo1-KO-Mäusen im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle.

4.6 Wirkung von gemeinsam applizierten Z-PDP A1/2 und Z-BOX A

Die Vasoaktivitäten der Einzelisomere der PDP- und BOX-Gruppe wurden in vorangehenden Studien ausführlich charakterisiert. Bislang unbeantwortet blieb die Frage nach möglichen additiven vasokonstriktorisches Effekten. Um dies zu überprüfen, wurden Z-PDP A1/2 und Z-BOX A gemeinsam appliziert. Die Zuführung von 0,5 µM Z-PDP A1/2 gemeinsam mit 0,05 µM Z-BOX A führte zu einer kontinuierlichen Durchmesserabnahme, sodass sich der mittlere arterioläre Durchmesser am Messende um $-12 \pm 7,4\%$ verringerte ($n = 7$; Abb. 21). Die Applikation von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A mit einer Konzentration von jeweils 5 µM führte ebenfalls zu einer kontinuierlichen Durchmesserabnahme. Diese fiel mit einer Abnahme des Durchmessers um $-8 \pm 5,4\%$ am Messende allerdings geringer aus ($n = 4$; Abb. 21). Auf diese beiden Messreihen soll nachfolgend ausführlicher eingegangen werden.

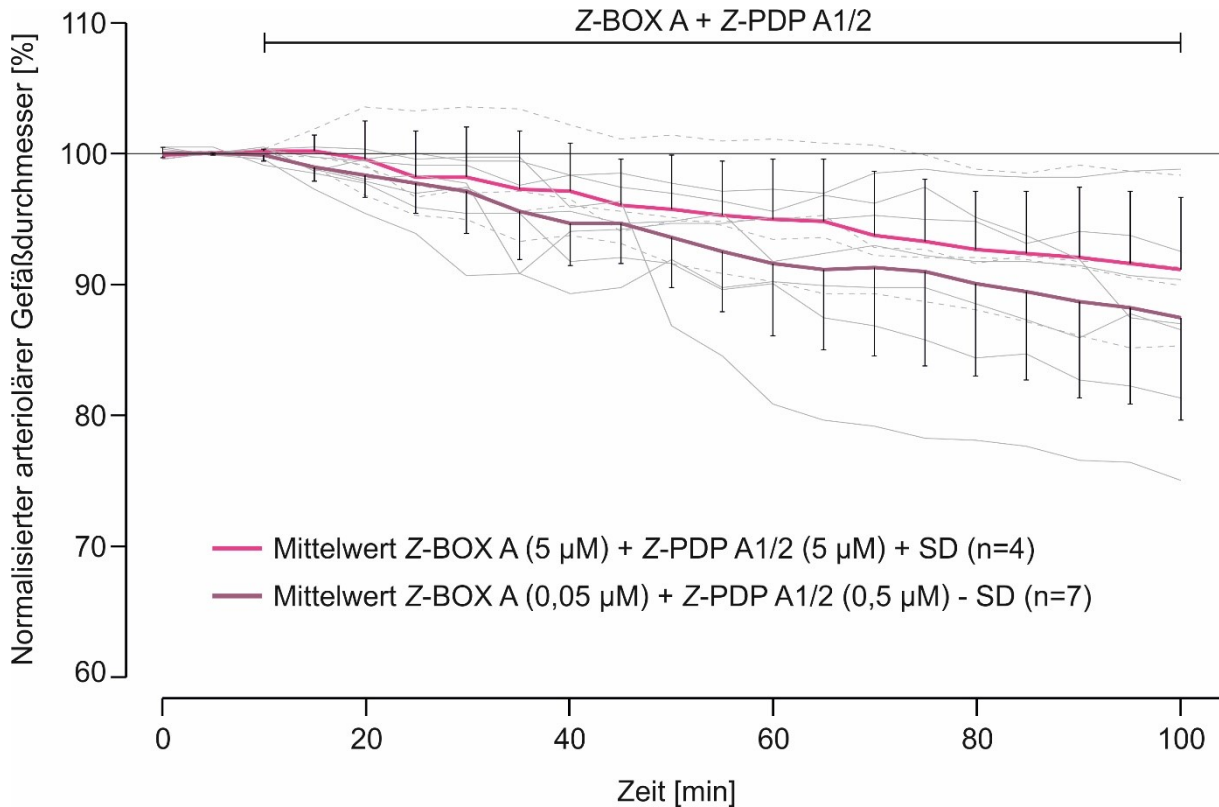


Abb. 21: Zeitabhängige Änderung des normalisierten arteriölen Durchmessers nach gemeinsamer Applikation von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen. Die gestrichelten Linien stellen die Einzelerperimente von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A mit einer Konzentration von jeweils $5 \mu\text{M}$ dar. Die durchgezogenen Linien stellen die Einzelerperimente von $0,5 \mu\text{M}$ Z-PDP A1/2 mit $0,05 \mu\text{M}$ Z-BOX A dar.

4.6.1 Mischapplikation von Z-PDP A1/2 ($5 \mu\text{M}$) und Z-BOX A ($5 \mu\text{M}$)

Bereits vorher durchgeführte Experimente mit der Einzelapplikation sowohl von $5 \mu\text{M}$ Z-BOX A als auch von $5 \mu\text{M}$ Z-PDP A1/2 zeigten für beide Substanzen einen signifikanten vasokonstriktorisches Effekt. Dieser äußerte sich in einer Abnahme des Durchmessers um $-12 \pm 4,6\%$ ($n = 6$, Abb. 22A) bei alleiniger Z-PDP A1/2 und um $-13 \pm 2,5\%$ ($n = 6$, Abb. 22A) bei alleiniger Z-BOX A-Applikation (Joerk et al. 2019b). Vergleicht man die mittleren arteriölen Durchmesser nach 90-minütiger Inkubation zeigte sich zwischen Versuchen der Kombination aus Z-PDP A1/2 und Z-BOX A und denen der Einzelapplikationen von Z-PDP A1/2 ($p = 0,24$; Abb. 22A) bzw. Z-BOX A ($p = 0,09$; Abb. 22A) kein signifikanter Unterschied. Auch der Vergleich zwischen Ergebnissen der Mischapplikation und der L-NAME-Kontrolle wies keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,29$; Abb. 22A).

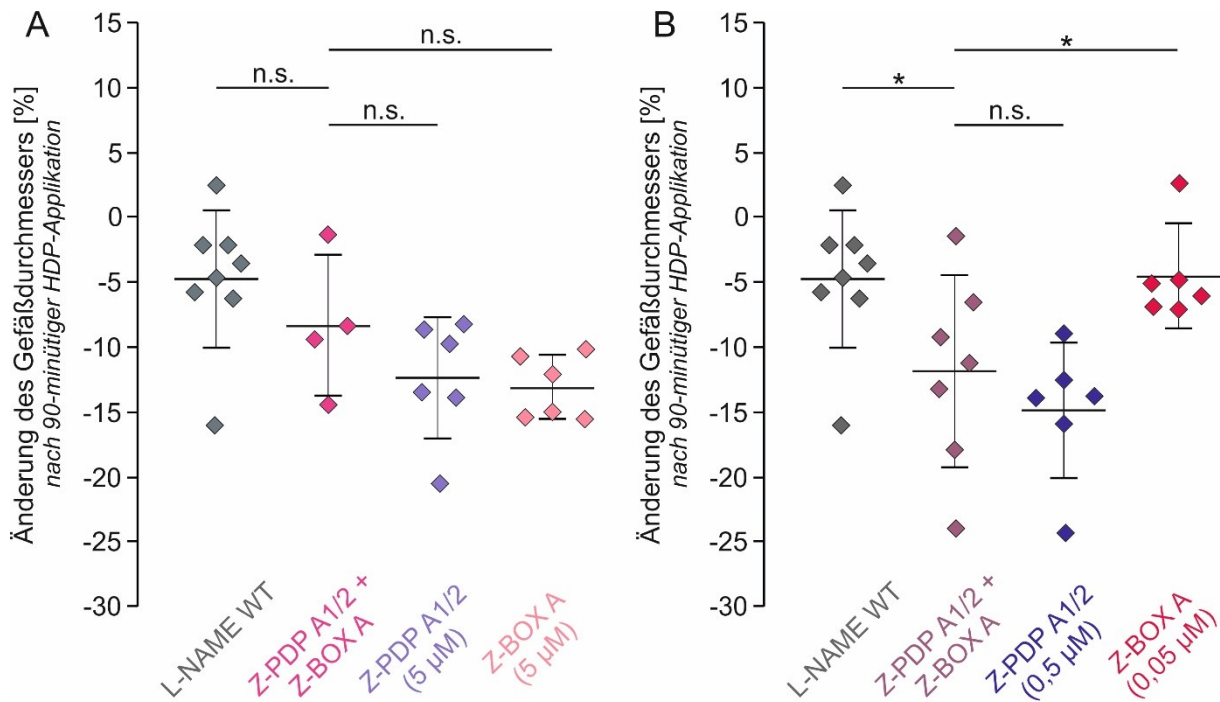


Abb. 22: Vergleich der prozentualen Veränderung des Gefäßdurchmessers nach Einzel- und Mischapplikation von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A und L-NAME-Kontrolle. A: Mischapplikation von Z-PDP A1/2 und Z-BOX A mit einer Konzentration von jeweils 5 µM und Einzelapplikation beider Substanzen ebenfalls mit 5 µM. B: Mischapplikation von 0,5 µM Z-PDP A1/2 und 0,05 µM Z-BOX A im Vergleich zur Einzelapplikation beider Substanzen in dieser Konzentration.

4.6.2 Mischapplikation von Z-PDP A1/2 (0,5 µM) und Z-BOX A (0,05 µM)

Vorherige Experimente zeigten, dass die Einzelapplikation von 0,5 µM Z-PDP A1/2 eine signifikante Gefäßverengung von $-15 \pm 5,2\%$ ($n = 6$; Abb. 22B) und die Einzelapplikation von 0,05 µM Z-BOX A ($n = 6$; Abb. 22B) eine nicht signifikante Gefäßverengung von $-5 \pm 3,6\%$ bewirkte (Langguth 2019). Im Vergleich zur Mischapplikation zeigte sich für die Einzelapplikation von 0,5 µM Z-PDP A1/2 kein signifikanter Unterschied ($p = 0,43$; Abb. 22B), während sich im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle ($p = 0,049$, Abb. 22B) und zur Einzelapplikation von 0,05 µM Z-BOX A ($p = 0,048$, Abb. 22B) ein signifikanter Unterschied ergab.

4.7 Wirkung von 20-HETE

Um zu überprüfen, ob 20-HETE im Hirnschnittmodell einen verengenden Effekt auf den Durchmesser vorgespannter Arteriolen hat, wurde der Messkammer eine 100nmolare 20-HETE-Lösung über 90 min zugeführt. Der Gefäßdurchmesser blieb nach Applikation nahezu stabil, sodass sich am Messende im Mittel eine Änderung um $+2 \pm 3,0\%$ ($n = 5$, Abb. 23) ergab. Diese Durchmesseränderung ist im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle signifikant ($p = 0,026$; Abb. 26B).

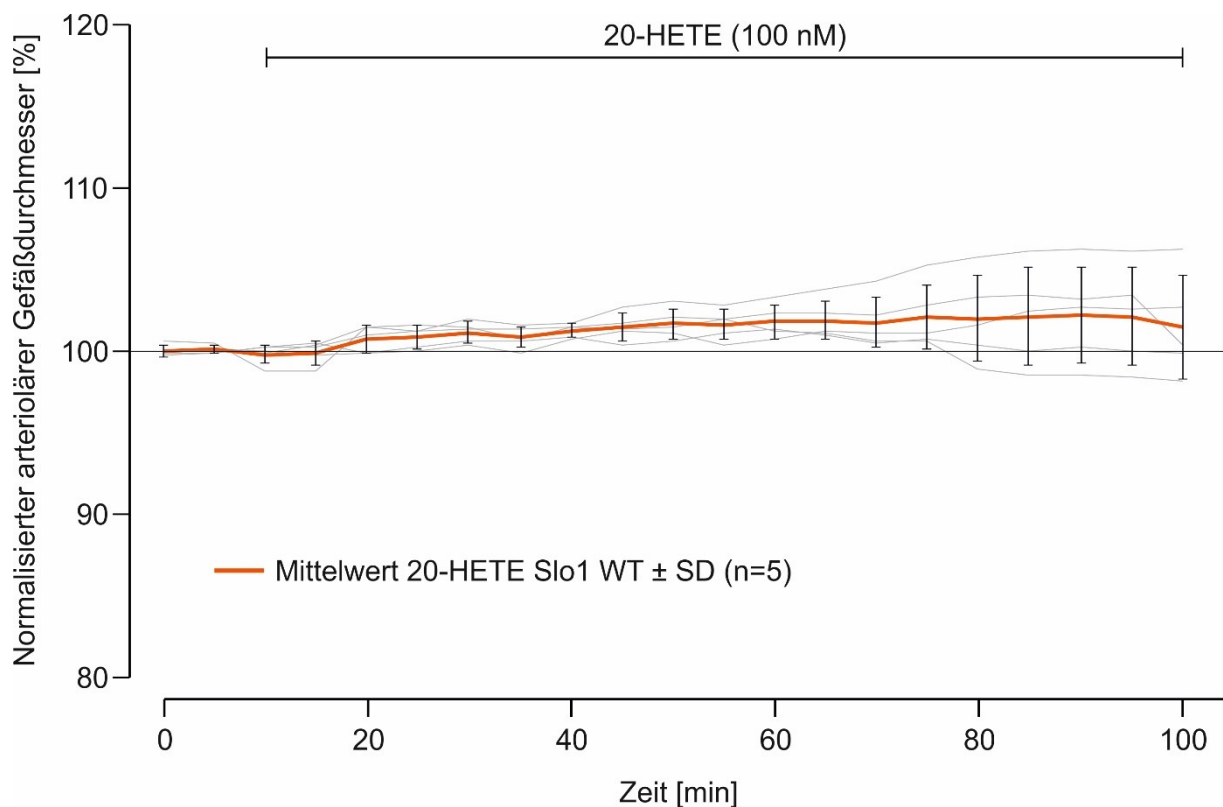


Abb. 23: Änderung des normalisierten arteriolaren Durchmessers nach Applikation von einer 100nmolaren 20-HETE-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit.

4.8 Wirkung des 20-HETE-Synthese-Inhibitors HET0016

HET0016 greift in den 20-HETE-Metabolismus ein, indem es die 20-HETE synthetisierenden Enzyme hemmt. Um einen möglichen präventiven Effekt auf die Entstehung der HDP-induzierten Vasokonstriktion zu untersuchen, wurde HET0016 zunächst als Einzelsubstanz und in einem zweiten Schritt in Kombination mit Z-PDP A1/2 appliziert (vgl. 4.9). Unter der Applikation einer 1µmolaren HET0016-Lösung blieb der arteriolarer Durchmesser nahezu unverändert und unterschied sich am Ende der Messung um $+2 \pm 2,9\%$ ($n = 4$, Abb. 24) vom Ausgangswert. Im

Vergleich zur *L*-NAME-Kontrolle ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,031$; Abb. 26A).

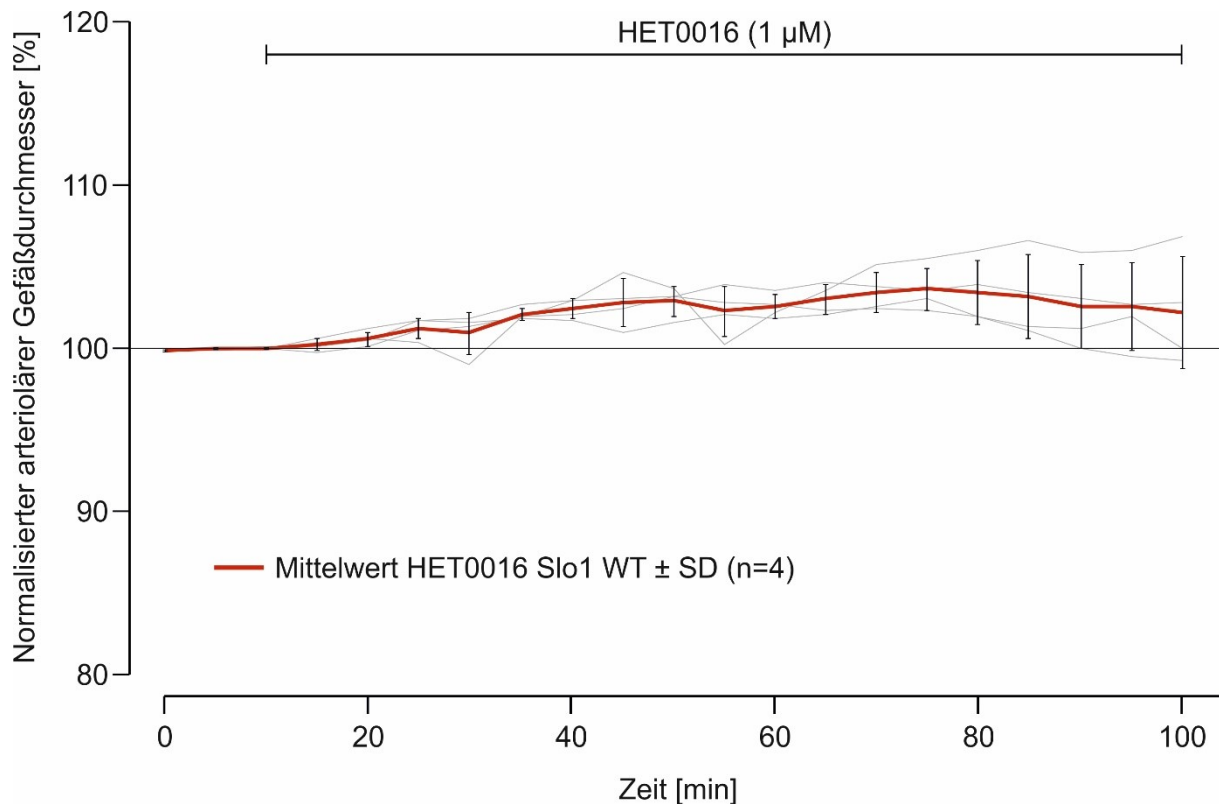


Abb. 24: Änderung des normalisierten arteriölen Gefäßdurchmessers unter Zugabe einer 1 μ molaren HET0016-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit.

4.9 Effekt von HET0016 auf die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion

Für die Betrachtung des Einflusses des 20-HETE-Synthese-Inhibitors HET0016 auf die vasokonstriktorisches Eigenschaften von Z-PDP A1/2 wurden beide Substanzen zeitgleich vorgespannten Arteriolen über 90 min zugeführt. Die Auswertung ergab zunächst eine stetige Zunahme des Gefäßdurchmessers innerhalb der ersten 45 min bis zu einer Änderung um $+4 \pm 1,5\%$. Danach verringerte sich der Durchmesser über das restliche Messintervall wieder leicht und erreichte am Messende eine mittlere Änderung um $+2 \pm 4,3\%$ ($n = 6$; Abb. 25). Im statistischen Vergleich zu der *L*-NAME-Kontrolle ($p = 0,02$; Abb. 26A) und verglichen mit der in vorherigen Experimenten beobachteten Vasokonstriktion nach Einzelapplikation von Z-PDP A1/2 (Langguth 2019) ($p < 0,001$; Abb. 26A) ist diese geringe Durchmesserzunahme signifikant. Verglichen mit der Einzelapplikation von 1 μ M HET0016 zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,89$, Abb. 26A).

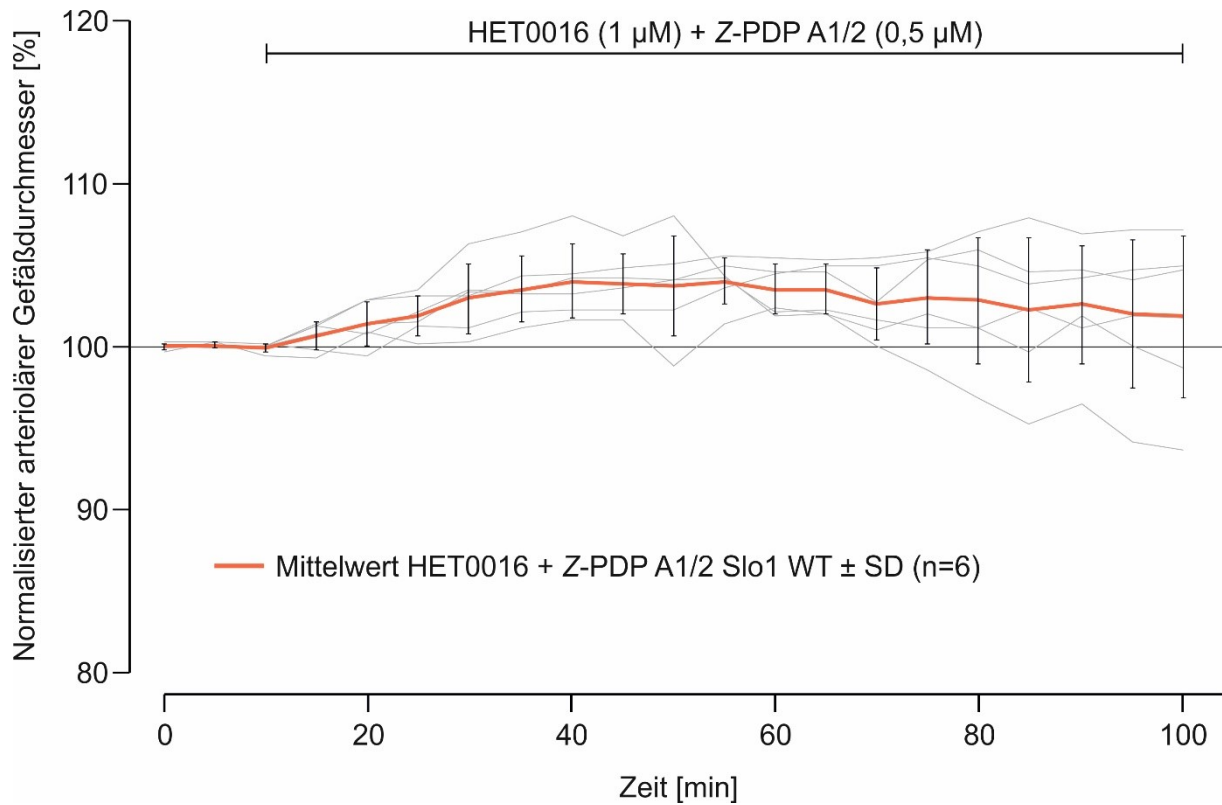


Abb. 25: Zeitabhängige Änderung des normalisierten arteriölen Durchmessers nach Mischapplikation von HET0016 ($1 \mu\text{M}$) und Z-PDP A1/2 ($0,5 \mu\text{M}$).

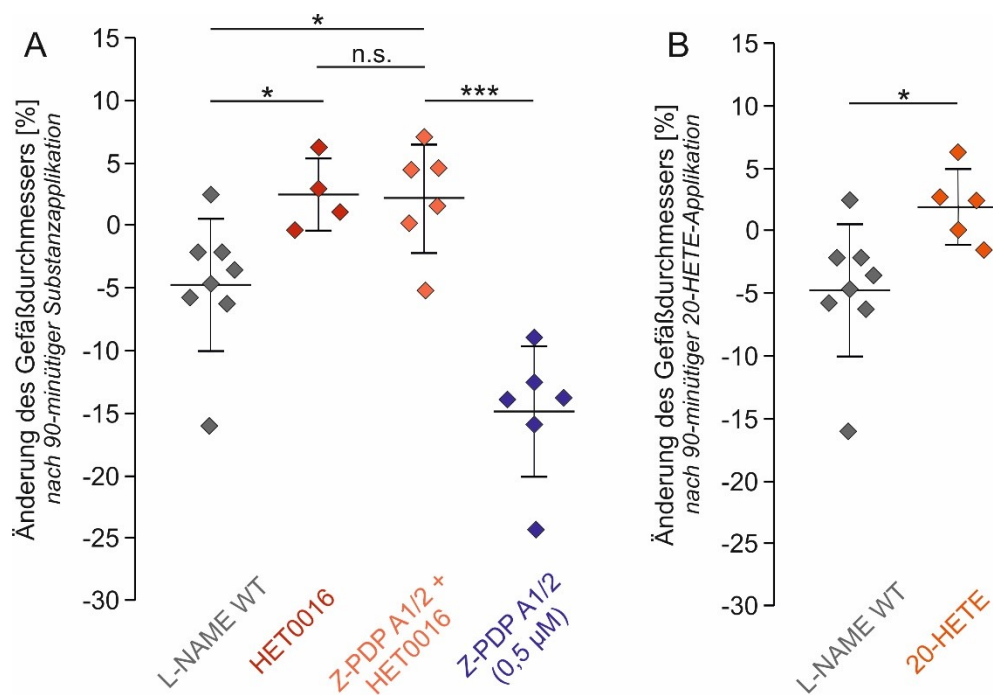


Abb. 26: Vergleich der prozentualen Veränderung des Gefäßdurchmessers nach 90-minütiger Substanzapplikation im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle.

A: Einzelapplikation von HET0016 ($1 \mu\text{M}$) und Z-PDP A1/2 ($0,5 \mu\text{M}$); Mischapplikation von HET0016 ($1 \mu\text{M}$) und Z-PDP A1/2 ($0,5 \mu\text{M}$).

B: Applikation von 20-HETE (100 nM).

4.10 Effekt von NS1619 auf die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion

Um zu untersuchen, ob der BK_{Ca} -Kanal-Aktivator NS1619 den vasokonstriktorischen Effekt von Z-PDP A1/2 verringern oder sogar verhindern kann, wurden beide Substanzen zeitgleich appliziert. Dies führte im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle zu einer signifikanten Durchmesserzunahme ($p < 0,01$; Abb. 28) von $+4 \pm 2,0\%$ ($n = 6$; Abb. 27) am Messende. Verglichen mit den Messungen nach Einzelapplikation von Z-PDP A1/2, die zu einer Gefäßdurchmesserabnahme von $-15 \pm 5,2\%$ führten (Langguth 2019), ergab sich ebenso ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Abb. 28), während der Vergleich mit der Einzelapplikation von NS1619 (Joerk et al. 2019b) keinen signifikanten Unterschied zeigte ($n = 4$; $p = 0,08$; Abb. 28).

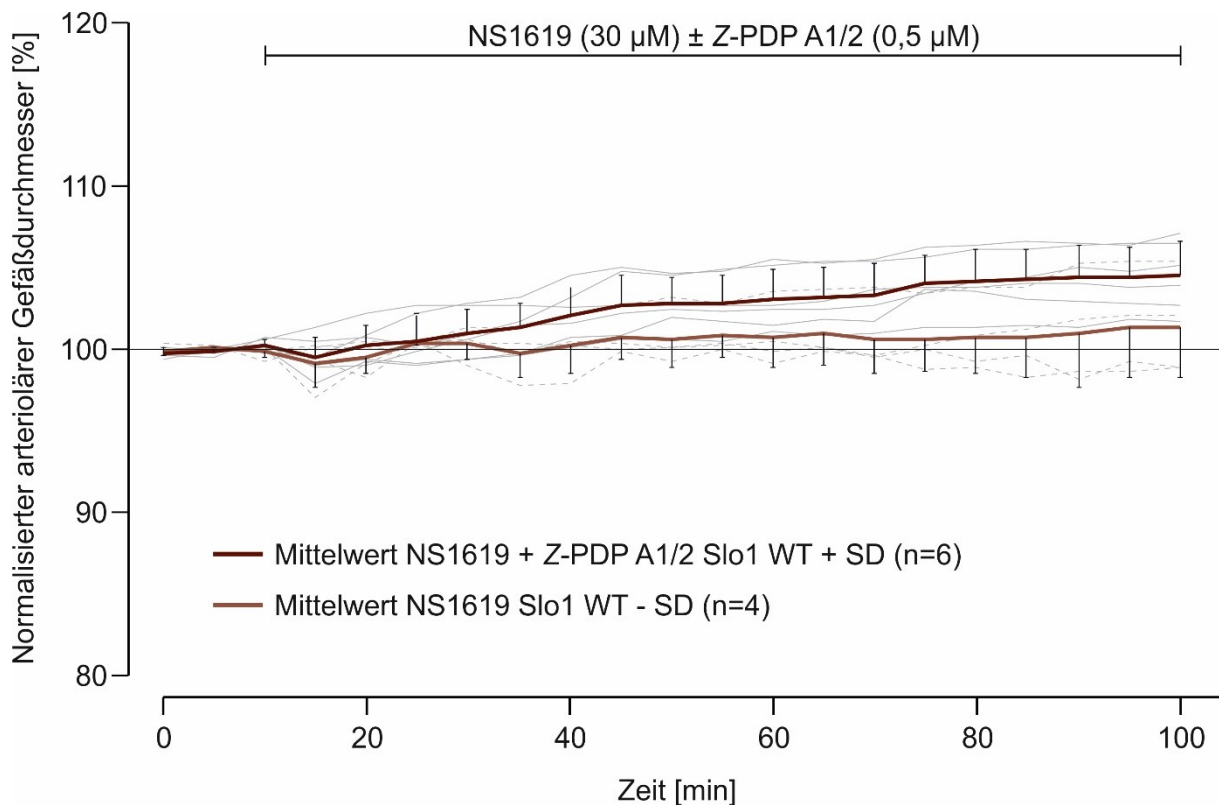


Abb. 27: Zeitliche Änderung des normalisierten arteriölen Gefäßdurchmessers nach gemeinsamer Applikation von NS1619 (30 μ M) und Z-PDP A1/2 (0,5 μ M) im Vergleich zur Einzelapplikation von NS1619. Die gestrichelten Linien stellen die Einzelerperimente der NS1619-Versuchsreihe dar. Die durchgezogenen Linien stellen die Einzelerperimente der NS1619-Z-PDP A1/2-Versuchsreihe dar.

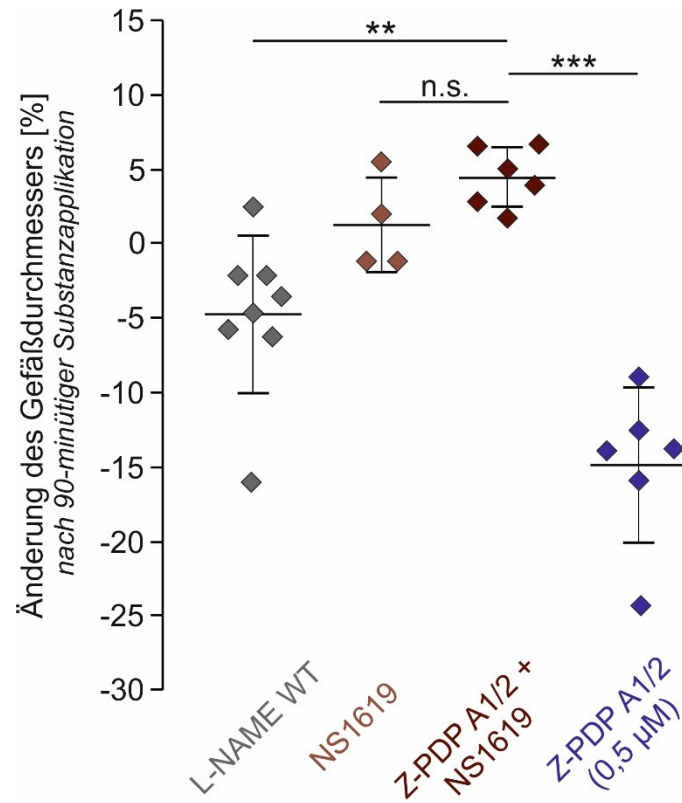


Abb. 28: Vergleich der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach Einzelapplikation von NS1619 (30 µM) und Z-PDP A1/2 (0,5 µM) sowie der Mischapplikation von NS1619 gemeinsam mit Z-PDP A1/2 und der L-NAME-Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Verwendung eines Mausmodells mit konventionellem Knockout

Der Modellorganismus Maus bietet mehrere Vorteile, aus denen sich seine Verwendung in der Forschung ergibt. Erstens lassen sich aufgrund der Ähnlichkeit zum menschlichen Genom Aussagen über den Pathomechanismus verschiedener Erkrankungen – in dieser Arbeit insbesondere des Vasospasmus – treffen. Zweitens besteht die Möglichkeit, einen gezielten Gendefekt (Knockout, KO) zu generieren, durch den die Funktion des jeweiligen Genprodukts im Organismus genauer bestimmt werden kann. Darüber hinaus wurde berücksichtigt, dass in anderen Studien auf dem Gebiet der SAB-Forschung hauptsächlich Mäuse und Ratten verwendet wurden, sodass der Einsatz von Mäusen eine Vergleichbarkeit gewährleistet.

Bei dem hier verwendeten Modell eines konventionellen KOs wurde das für die α -Untereinheit codierende Gen (Slo1) dauerhaft inaktiviert; infolgedessen ist der BK_{Ca}-Kanal bei Slo1-KO-Mäusen nicht funktionsfähig. Dadurch ist es möglich, Rückschlüsse auf seine Funktion bei der Vermittlung einer Gefäßreaktion nach Substanzapplikation zu ziehen und somit seine Relevanz bei der Vasospasmus-Entstehung genauer zu bestimmen. Allerdings hat der konventionelle KO den Nachteil, dass der Organismus Kompensationsmechanismen entwickeln kann, durch die BK_{Ca}-Kanal-abhängige Effekte maskiert werden. Ferner kann durch die ubiquitäre Expression des BK_{Ca}-Kanals (vgl. 1.3) nicht ausgeschlossen werden, dass auch solche Kanäle außerhalb der glatten Gefäßmuskulatur einen Beitrag zu den vorgefundenen Ergebnissen leisten.

Um das Problem einer Kompensation durch den Organismus zu umgehen, ist es denkbar, einen spezifischen BK_{Ca}-Kanal-Inhibitor, wie das Iberiotoxin (IbTX), zu einem definierten Zeitpunkt einzusetzen. Günstig ist dabei zusätzlich, dass dem IbTX eine gewisse Gewebsspezifität zugeschrieben wird, denn es inhibiert vornehmlich BK_{Ca}-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur, die die β_1 -Untereinheit exprimieren. Hingegen macht die in Neuronen und Astrozyten exprimierte β_4 -Untereinheit die dortigen BK_{Ca}-Kanäle unempfindlich gegenüber IbTX (Meera et al. 2000, Gebremedhin et al. 2003). Allerdings muss bei Versuchen mit IbTX seine geringe Gewebegängigkeit bedacht

werden, die eine effektive Wirkung am Zielort einschränken kann (Sprossmann et al. 2009).

Daher würde die Verwendung eines konditionalen KO-Modells, bei dem das Slo1-Gen zeitkontrolliert und gewebspezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur inaktiviert wird (SM-BK-KO, *smooth muscle specific BK_{Ca} channel KO*), eine bessere Lösung darstellen. Durch die zeitlich-kontrollierte Induktion des KOs können Kompensationsmechanismen, wie beispielsweise die Herunterregulierung der Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR), vermindert werden. So zeigten SM-BK-KO-Tiere im Vergleich zu Slo1-KO-Tieren aufgrund der fehlenden Entwicklung kompensatorischer Reaktionen einen stärker ausgeprägten Inkontinenz-Phänotyp (Sprossmann et al. 2009). Da der KO ausschließlich in der glatten Gefäßmuskulatur erfolgt, lassen sich überdies spezifischere Aussagen zur Funktion der VSMC-BK_{Ca}-Kanäle treffen. Zusammenfassend könnten also die Limitationen des konventionellen KOs durch einen konditionalen KO überwunden werden, sodass Effekte, die durch eine mögliche Anpassung des Organismus unerkannt bleiben, demaskiert werden.

5.1.2 Präparation und Verwendung akuter Hirnschnitte der Maus

Lebensdauer und Stabilität der Hirnschnitte sind wesentlich von der Qualität der Präparation abhängig. Um diese daher möglichst präzise und fehlerfrei durchführen zu können, wurden Mäuse mit einem Lebensalter zwischen 20 und 30 Tagen aufgrund der noch unvollständigen Ossifikation der Schädelkalotte verwendet. Weitere Gründe, die für eine Verwendung juveniler Mäuse sprechen, sind die erhöhte Ischämietoleranz des Gewebes und die bessere Vergleichbarkeit zu vorherigen Versuchsreihen, bei denen ebenfalls Jungtiere verwendet wurden.

Bei der Präparation und dem Schneiden der Hirnschnitte wurde in dieser Arbeit kalte Präparationslösung (+4 °C) verwendet, um den zellulären Metabolismus zu verlangsamen und somit das Zellüberleben zu fördern. Weiterhin wird das Schneiden aufgrund der zunehmenden Festigkeit des Hirngewebes erleichtert (Edwards et al. 1989). Huang et al. konnten allerdings zeigen, dass annähernd physiologische Temperaturen (~ +34 °C) bei der Präparation der Schnitte vorteilhaft sein können, sofern die vertikale Auslenkung der Klinge beim Schneiden unter 0,5 µm liegt. So konnte die Schnittqualität insbesondere bei älteren Mäusen (> 2,5 Monate) verbessert

werden, während sich bei juvenilen Mäusen (< P20), deren Schnitte bereits eine gute Ausgangsqualität aufwiesen, keine Verbesserung zeigte (Huang und Uusisaari 2013). Daher sollte für die Herstellung von Hirnschnitten – speziell erwachsener Mäuse – die Verwendung physiologischer Temperaturen erwogen werden. Als Voraussetzung gilt dabei jedoch, dass die Klinge keinerlei strukturelle Defekte aufweist und nahezu ohne Abweichung horizontal vibriert. Kann dies nicht gewährleistet werden, wird nach wie vor die Präparation bei eiskalter Temperatur empfohlen, da das Gewebe hier gegenüber mechanischem Schaden widerstandsfähiger zu sein scheint (Ankri et al. 2014). Folglich stellt die Verwendung kalter Präparationslösung bei der Herstellung von Hirnschnitten weiterhin eine Möglichkeit dar.

5.1.3 Auswertung des Gefäßinnendurchmessers

Es gibt unterschiedliche Methoden, den Gefäßinnendurchmesser anhand der aufgenommenen Bilder manuell zu bestimmen. Eine Möglichkeit besteht in der Durchführung einer Linienauswertung. Dazu wird der Innendurchmesser in definierten Abständen entlang des Gefäßverlaufs gemessen und diese Werte pro Aufnahme gemittelt (Zonta et al. 2003). Dies wurde zur Veranschaulichung für eine Aufnahme durchgeführt (Abb. 29a). Es wurden drei Messpunkte ausgewählt: Anfangs- und Endpunkt wurden zum besseren Vergleich mit den Außengrenzen der Flächenkalkulation über 50 µm gleichgesetzt, der dritte Messpunkt lag in der Mitte beider Messpunkte. Die Genauigkeit der auf diese Weise erhaltenen Werte ist allerdings eingeschränkt, da sich der Innendurchmesser einer Arteriole aufgrund der unterschiedlichen Anordnung und Anzahl glatter Gefäßmuskelzellen nicht gleichmäßig über die Gesamtlänge des Gefäßes ändert. Diese Unregelmäßigkeiten können von der Linienauswertung nicht gut nachvollzogen werden. Eine genauere und daher zu bevorzugende Methode stellt die Bestimmung der Durchmesseränderung auf Grundlage einer Flächenkalkulation, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde (vgl. 3.8), dar. Dabei wurde in jedem Einzelbild die Fläche innerhalb der inneren Gefäßwand ausgehend von einem definierten Bildpunkt auf einer Länge von 50 µm bestimmt (Abb. 29b). Die Wahl der Länge begründet sich unter anderem darin, dass Gefäße oftmals nicht über ihre Gesamtlänge in einer Ebene dargestellt werden können und eine Auswertung damit nicht gut durchführbar ist.

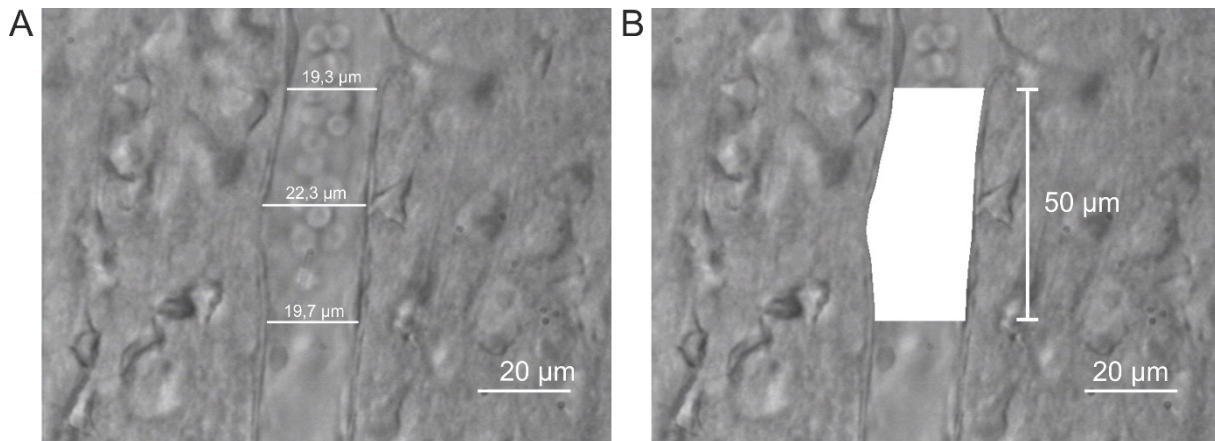


Abb. 29: Möglichkeiten der Bestimmung des Gefäßinnendurchmessers (Modifizierung von Abb. 12, vgl. 3.8)

A: Linienauswertung anhand von drei ausgewählten Punkten. Der gemittelte Durchmesser beträgt $20,4 \mu\text{m}$.

B: Flächenkalkulation über $50 \mu\text{m}$ für dasselbe Gefäß. Der ermittelte Durchmesser beträgt hier $20,7 \mu\text{m}$.

Als Alternative kann der Durchmesser auch indirekt anhand der Perfusionsgeschwindigkeit mithilfe der Fluoreszenz-Erholung nach Photobleichung (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*) bestimmt werden. Dabei wird die Fluoreszenz eines Fluoreszenzfarbstoffs in einem bestimmten Bereich durch einen kurzen Laserpuls zerstört. Um diese Methode anwenden zu können, müssen die Arteriolen im Hirnschnitt zunächst kanüliert werden, damit eine konstante Perfusion gewährleistet werden kann. Anschließend können sie mit einer Fluoreszenzfarbstoff-Lösung (z.B. mit Alexa 488) perfundiert werden. Der im Interesse stehende Bereich der jeweiligen Arteriole wird dann einem kurzen Laserpuls ausgesetzt, wodurch eine Ausbleichung in diesem Abschnitt bewirkt wird. Durch die konstante Perfusion strömen dann wieder Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs in den Bereich ein, wodurch sich die Fluoreszenz wieder erhöht. Über die Aufnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit – vor, während und nach dem Laserpuls – wird die axiale Geschwindigkeit ermittelt, über die dann die Änderung des arteriolären Durchmessers abgeschätzt werden kann. (Kim und Filosa 2012). Allerdings hat diese Methode eine größere Manipulation des Hirnschnitts zur Folge und es muss beachtet werden, dass der Laserpuls $<20\text{ms}$ dauert, da es sonst zur lokalen Erhitzung kommen kann (De Los Santos et al. 2015). Da die Arteriolen für die Experimente nicht kanüliert wurden, lässt sich diese Messmethode nicht auf den in dieser Arbeit dargestellten Versuchsaufbau übertragen. Allerdings könnte sie allein im Hinblick auf das Problem der fehlenden Perfusion im Hirnschnittmodell, das im folgenden Abschnitt diskutiert wird, eine mögliche

Weiterentwicklung für spätere Versuchsreihen darstellen, die dann eine relativ zuverlässige und objektive Auswertung zulässt.

5.1.4 Vorspannung zerebraler Arteriolen mit L-NAME

Eine limitierende Eigenschaft des *in vitro*-Modells stellt das Fehlen des unter physiologischen Bedingungen vorhandenen intravaskulären Blutdrucks und damit der Autoregulation zerebraler Gefäße dar (vgl. Abschnitt 1.3.3). Als Folge nimmt der myogene Tonus ab und Arteriolen im Hirnschnitt gehen in einen relaxierten Zustand über. In diesem Zustand zeigte selbst die Applikation des BK_{Ca}-Kanalinhinhibitors IbTX keine Wirkung, obwohl eine Kontraktion aufgrund der Blockade von BK_{Ca}-Kanälen erfolgen müsste. Daher wurde zur Imitierung des myogenen Tonus der NOS-Inhibitor L-NAME eingesetzt. Bei den auf diese Weise vorgespannten Arteriolen konnte schließlich die dem IbTX zugeschriebene vasokonstriktorische Wirkung bestätigt werden (Joerk et al. 2014). L-NAME inhibiert die drei Isoenzyme der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) – die endotheliale (eNOS), neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS) – woraus eine Verringerung der NO-Verfügbarkeit resultiert (Furfin et al. 1997). Nachfolgend nimmt die Aktivität der NO/cGMP-Signalkaskade ab, wodurch eine Vorspannung der Gefäße aufgrund des verringerten Potenzials zur Relaxation erreicht wird (vgl. 1.6). Da die NO-Verfügbarkeit auch nach einer SAB abnimmt, stellt L-NAME weiterhin eine gute Möglichkeit dar, diese Stoffwechsellage nachzuvollziehen.

Allerdings konnte in einzelnen Versuchen bei der Anwendung von L-NAME auch der gegenteilige Effekt, also eine Vasodilatation, beobachtet werden. Diese paradoxe Wirkung lässt sich im Rahmen der neurovaskulären Kopplung erklären, die den Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und zerebraler Durchblutung darstellt. Dabei wird vor allem eine Beteiligung von Astrozyten vermutet (Zonta et al. 2003), da diese in engem Kontakt sowohl zu Neuronen als auch zu Blutgefäßen stehen (Attwell et al. 2010). Neuronale Aktivität führt in Neuronen über einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu einer Aktivierung der nNOS mit folgender NO-Freisetzung (Attwell et al. 2010). Im Astrozyten führt sie ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die eine Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) und somit die Produktion von Arachidonsäure (AA) bewirkt. Nachfolgend werden vasoaktive Metabolite der AA gebildet, zu denen unter anderem das

vasokonstriktorisch wirkende 20-HETE (Mulligan und MacVicar 2004) und die vasodilatativ wirkenden EETs (Alkayed et al. 1996) gehören (Abb. 30).

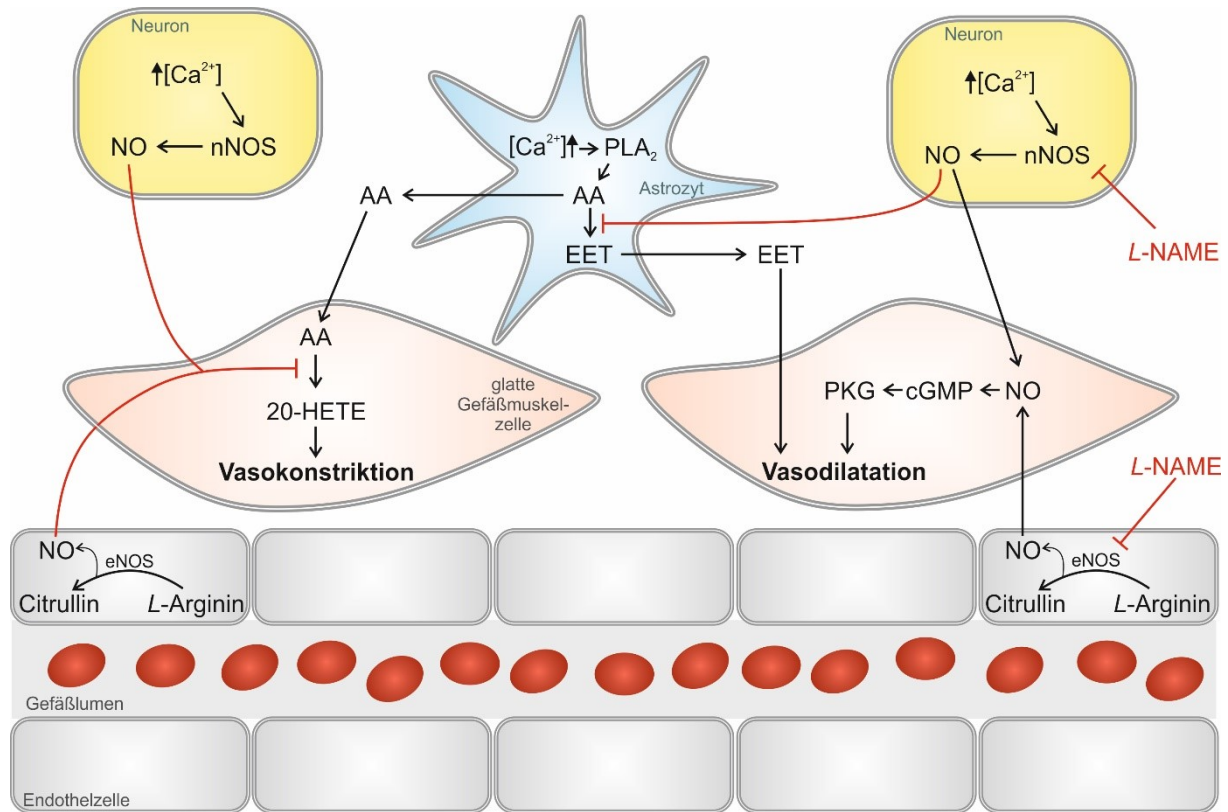


Abb. 30: Schematische Darstellung der Vermittlung von Vasokonstriktion (links) und Vasodilatation (rechts) für die Regulierung des zerebralen Blutflusses (modifiziert nach Attwell et al. 2010). Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten führt zu einer Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2), was eine Produktion der Arachidonsäure (AA) bewirkt. Diese kann in der glatten Gefäßmuskulzelle zum vasokonstriktorisch wirkenden 20-HETE oder im Astrozyten zu den vasodilatativ wirkenden EETs umgesetzt werden. In Neuronen führt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung der nNOS mit folgender NO-Synthese. Durch L-NAME werden sowohl die endotheliale (eNOS) als auch die neuronale (nNOS) Stickstoffmonoxid-Synthase gehemmt, was zu einer Abnahme der NO-Konzentration und folglich der Aktivität des cGMP/PKG-Weges führt.

Es wird angenommen, dass der NO-Spiegel bestimmt, ob die neuronale Aktivität zu einer Vasodilatation oder Vasokonstriktion führt (Metaea und Newman 2006). NO hemmt neben der 20-HETE-Produktion durch die ω -Hydroxylase (Alonso-Galicia et al. 1997) auch die EET-Produktion durch die Epoxygenase (Udosen et al. 2003), wobei letztere sensitiver für die Hemmung durch NO zu sein scheint (Metaea und Newman 2006). Folglich wird bei hohen NO-Konzentrationen vor allem die EET-Produktion

gehemmt, sodass eine Vasokonstriktion begünstigt wird. Umgekehrt würde die Inhibition der EET-Produktion bei niedrigen NO-Konzentrationen abnehmen, sodass vermehrt EETs gebildet werden, die eine Vasodilatation begünstigen (Metea und Newman 2006). Betrachtet man also die paradoxe Wirkung von *L*-NAME vor dem Hintergrund dieses Konzepts, scheinen neuronale Aktivität und NO-Ausgangskonzentration, die im Hirnschnittmodell nicht standardisiert werden können, wesentliche Einflussfaktoren bei dieser Beobachtung zu sein.

Neben *L*-NAME stellen der Thromboxan A₂-Agonist U-46619 (Lovick et al. 2004, Girouard et al. 2010) und Prostaglandin F_{2α} (Blanco et al. 2008) Alternativen für die Vorspannung von Gefäßen dar. Ihr Einsatz sollte vor allem dann erwogen werden, wenn bei einem zu beobachtenden Effekt die Involvierung des NO-Stoffwechsels vermutet wird und die Verwendung von *L*-NAME aufgrund seiner Einflussnahme auf die NO-Konzentration damit ungeeignet ist.

5.1.5 Vitalitätsbeurteilung und vasokonstriktorisches Potenzial

Voraussetzung für eine adäquate physiologische Gefäßreaktion ist die Vitalität des Hirnschnitts, die erfahrungsgemäß innerhalb der ersten 6 h nach Präparation als gut bezeichnet werden kann. Diese Zeitspanne bezeichnet man auch als die typische Lebensdauer eines Hirnschnitts. Messungen von Hirnschnitten, deren Lebensdauer deutlich kürzer war, wurden mithilfe der zuvor definierten Ausschlusskriterien erkannt und somit nicht in die Experimentalserie eingeschlossen. Zu diesen Kriterien gehörten während der Messung das Anschwellen des Hirnschnitts oder eine starke Vasodilatation/Vasokonstriktion der untersuchten Arteriole >10 % innerhalb von 10 min. Da diese Kriterien bei Absterben des Hirnschnittpräparats nicht obligatorisch auftreten müssen, wurde die Vitalität am Ende jeder Messung zusätzlich durch Applikation von Noradrenalin (NA) in die Messkammer überprüft. NA erhöht über die Stimulation der α₁-Rezeptoren die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und induziert dadurch eine Vasokonstriktion (Berridge 2008). Bei bereits stark geschädigten Hirnschnitten kann diese Reaktion nicht beobachtet werden. Folglich führte ein negatives Ergebnis der Kontrolle zum Ausschluss der Messung, während ein positives Ergebnis aufgrund des vitalen Gewebes eingeschlossen wurde.

Insbesondere bei der NA-Kontrolle ließ sich bei Arteriolen intakter Hirnschnitte ein unterschiedlich starkes vasokonstriktorisches Potenzial feststellen, welches unter anderem vom sehr variablen Aufbau der glatten Gefäßmuskulatur abhängig ist (Win et al. 2014). Um einen solchen Unterschied zwischen Gefäßen bei der Auswertung zu berücksichtigen, wurde bei Draht-Myographie-Experimenten vor der eigentlichen Messung die maximale Wandspannung der Arteria cerebri media der Ratte bestimmt und die später gemessenen Werte auf diesen Wert normiert. Dazu wurden unter anderem eine depolarisierende Kaliumlösung und NA verwendet. In der sich anschließenden Auswaschperiode konnte der Gefäßtonus wieder zu seinem Ausgangsniveau zurückkehren (Joerk et al. 2019a). Im Hirnschnittmodell lässt sich diese Methode jedoch nicht realisieren, da hier die Möglichkeit fehlt, eine standardisierte Ruhespannung der Arteriolen sicherzustellen.

Eine Annäherung an die Bestimmung der maximalen vasokonstriktorisches Kraft eines Gefäßes könnte über die Aufnahme mehrerer NA-Kontrollbilder am Messende erfolgen. Beginnend mit der Applikation einer definierten Menge NA könnte über einen Zeitraum von 5 min jede Minute ein Bild aufgenommen werden. Nach Auswertung würde dann die stärkste beobachtete Kontraktion den Referenzwert darstellen, auf den die Normierung der zuvor erhobenen Daten erfolgt. Dadurch könnten sich große Abweichungen der Durchmesseränderung zwischen den Gefäßen untereinander relativieren und eine bessere Vergleichbarkeit erreicht werden. Für zukünftige Experimente sollten daher mehrere Aufnahmen am Messende erstellt werden und die Auswertung zum einen wie bisher und zum anderen nach dem oben gemachten Vorschlag durchgeführt werden. Durch eine Gegenüberstellung der erhaltenen Werte kann dann die mögliche Integrierung dieses zusätzlichen Schritts in den Versuchsablauf überprüft werden.

5.2 Ergebnisse

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass der Versuchszeitraum aufgrund der Lebensdauer der Hirnschnitte auf 145 min begrenzt war. Dementsprechend können lediglich Kurzzeiteffekte der Gefäßreaktion beschrieben und beurteilt werden.

5.2.1 NIR-Illumination bewirkt keinen gefäßerweiternden Effekt

Die Hypothese, dass die kontinuierliche Nahinfrarot (NIR)-Bestrahlung der Arteriole und des umgebenden Hirngewebes eine Dilatation bewirkt, konnte nicht bestätigt werden. Bei dem Wirkmechanismus des NIR-Lichts wurde nicht von einer direkten Beteiligung der BK_{Ca}-Kanäle ausgegangen, sodass bei solchen Versuchen die Verwendung der Slo1-Mauslinie zunächst nicht erforderlich war. Vielmehr wurde vermutet, dass bei der Vermittlung der Vasodilatation vorwiegend NO als Schlüsselmolekül beteiligt ist. Diese Annahme wurde auch dadurch gestützt, dass in vorherigen Versuchen, die L-NAME für die Vorspannung der Arteriolen benutzten, kein vasodilatatorischer Effekt durch NIR-Bestrahlung ausgelöst werden konnte (Sommer 2017). Daher wurde bei der Durchführung der Messungen von einer vorherigen Manipulation des NO-Stoffwechsels durch L-NAME abgesehen. Die dadurch fehlende Vorspannung könnte allerdings auch eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer Vasodilatation sein. Durch den fehlenden myogenen Tonus befinden sich die Gefäße bereits in einem dilatierten Zustand, sodass eine weitere Dilation nicht oder nur vermindert stattfinden kann (Jakovcevic und Harder 2007).

Der Einsatz von NIR als Therapieform bei zerebralen Erkrankungen begründet sich vor allem in seiner Eigenschaft, Gewebe gut durchdringen zu können, da die Absorption von Photonen durch Wasser und Hämoglobin bei Wellenlängen zwischen 700 und 1300 nm minimiert ist (Jobsis 1977). Im Rahmen der transkraniellen Lasertherapie (TLT) konnte durch Bestrahlung des Kopfes von Probanden durch einen Laser im NIR-Bereich eine Erhöhung der oxidierten COX festgestellt werden (Wang et al. 2017), woraus geschlossen werden kann, dass Licht im NIR-Bereich den Hirnmetabolismus beeinflussen kann. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass sich die TLT nach ischämischem Schlaganfall vorteilhaft auf das neurologische Ergebnis auswirken kann (Lampl et al. 2007, Zivin et al. 2009). Demzufolge könnte auch eine Bestrahlung des Kopfes mit Wellenlängen im NIR-Bereich nach SAB erwogen werden. Die Vorteile einer solchen Therapie sind naheliegend: sie ist nichtinvasiv, nichtmedikamentös und reversibel (Sanderson et al. 2018). Aufgrund dieses therapeutischen Potenzials sollten die Experimente daher optimiert und weiterverfolgt werden. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob durch die Verwendung von L-NAME-Alternativen, die eine Vorspannung der Gefäße über einen NO-unabhängigen Mechanismus erzielen, eine Vasodilatation ermöglicht wird. Zu

diesem Zweck könnte beispielsweise der Thromboxan A₂-Agonist U-46619 eingesetzt werden (vgl. Abschnitt 5.1.4). Diese Ergebnisse könnten helfen, eine Grundlage für den möglichen Nutzen der NIR-Bestrahlung zu untersuchen.

5.2.2 Wirkung von HA und Z-BOX D auf den Gefäßdurchmesser

Die Hämatinsäure ist ein bereits bekanntes, bei der *in vitro*-Degradation von Bilirubin entstehendes Nebenprodukt (Ritter et al. 2018). Sie wurde bisher aber noch nicht am Hirnschnittmodell getestet. Das neuere und daher ebenfalls noch nicht getestete Z-BOX D ist ein hypothetisches Hämabbauprodukt und wurde auf synthetischem Wege erzeugt. Es stellt als Regioisomer von Z-BOX C neben den bisher getesteten BOXes (vgl. 1.2.1.3) ein weiteres Mitglied der BOXes-Familie dar (Abb. 2). Durch Versuchsreihen mit HA bzw. Z-BOX D sollte überprüft werden, ob diese Substanzen – ähnlich den bisher untersuchten PDPs und BOXes – eine vasokonstriktorische Wirkung aufweisen und somit einen Beitrag bei der Entstehung des Vasospasmus leisten könnten. Da die bisherigen Ergebnisse von Experimenten mit PDPs und BOXes eine Wirkung über den BK_{Ca}-Kanal nahelegen (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019b), wurden sowohl Slo1 WT- als auch Slo1 KO-Mäuse verwendet, um zusätzlich eine mögliche Abhängigkeit der zu beobachtenden Gefäßreaktion von der Expression des BK_{Ca}-Kanals zu überprüfen. Sofern eine Wirkung über den BK_{Ca}-Kanal erfolgt, müsste dann die Gefäßreaktion von KO-Tieren geringer ausfallen. Da weder Z-BOX D noch die HA zuvor unter diesen Experimentalbedingungen eingesetzt wurden, erfolgte eine Abnahme von Proben mit jeweils 500 µl zu Beginn der Applikation (55 min) und am Ende der Messung (145 min) (Abb. 31).

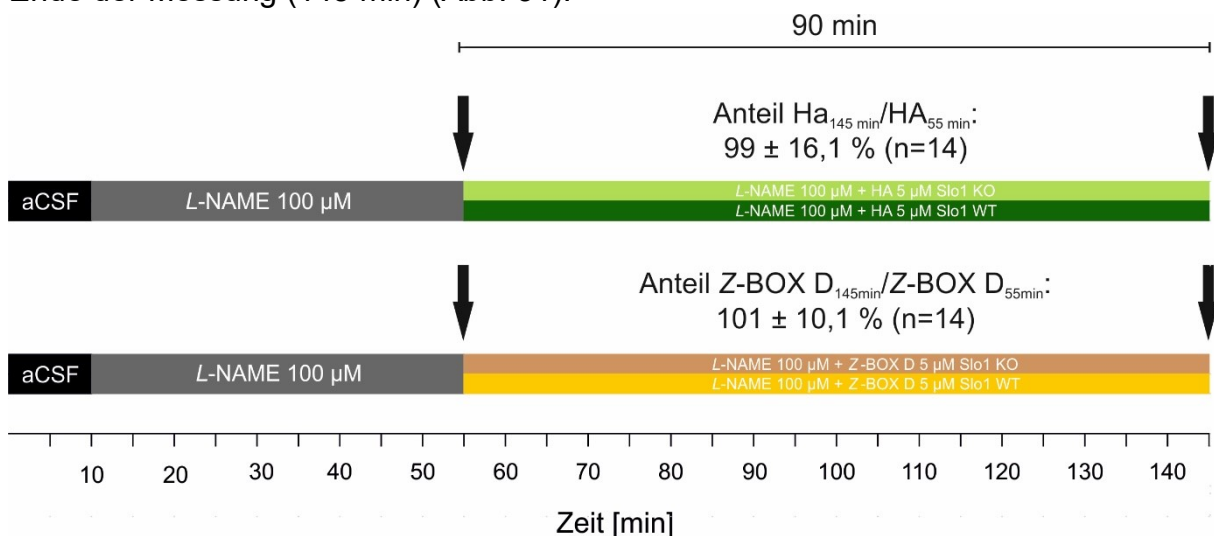


Abb. 31: Probenentnahme und Anteil der jeweiligen Substanz nach 90-minütiger Messung. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Probenentnahme. Die Applikation begann bei Minute 55.

Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert, um post-experimentelle Veränderungen zu vermeiden. Die Analyse erfolgte durch Marcel Ritter (IAAC, Jena) und zeigte, dass die Stabilität der HA und des Z-BOX D unter den vorherrschenden Bedingungen gewährleistet war (Abb. 31), sodass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Instabilität der Substanzen weitestgehend ausgeschlossen war.

Die Applikation der HA bewirkte bei WT-Mäusen keine signifikante Vasokonstriktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zur KO-Gruppe konnte die Nullhypothese nicht widerlegt werden, da sich die Vasoaktivität beider Gruppen nicht signifikant unterschied, obwohl die gemittelte Durchmesserabnahme bei WT-Mäusen größer war. Bei der Applikation von Z-BOX D zeigte sich ein ähnliches Bild: Bei WT-Mäusen konnte keine signifikante Vasokonstriktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Allerdings unterschied sich hier die Gefäßreaktion von WT- und KO-Gruppe signifikant, was eine Interaktion von Z-BOX D mit dem BK_{Ca} -Kanal vermuten lässt.

Eine Erklärung für die fehlenden Signifikanzen könnte in der zum Teil hohen Standardabweichung der einzelnen Experimentalgruppen zu finden sein. Die starke Streuung der Durchmesserwerte der Einzelexperimente lässt sich unter anderem durch das unterschiedliche vasokonstriktorische Potenzial der Arteriolen erklären (vgl. 5.1.5). Des Weiteren induzierte auch *L*-NAME bereits eine unterschiedlich starke Vasoaktivität, sodass auch die Kontrollgruppe am Ende der 145 min eine hohe Streuung aufwies (Joerk et al. 2019b, Langguth 2019). Betrachtet man weiterhin die Struktur der HA ist auffällig, dass im Vergleich zu anderen vasoaktiven HDPs die Amid-Gruppe fehlt (Abb. 2). Hou et al. vermuteten bereits, dass die Amid-Gruppe für die Inhibition des BK_{Ca} -Kanals erforderlich sein könnte. Für die BOXes wird angenommen, dass sie sich zwischen den Transmembransegmenten und der RCK1-Domäne positionieren und so den geschlossenen Zustand des Kanals stabilisieren. Als möglicher Teil einer Bindungsstelle für Z-BOX A und Z-BOX B könnte dabei die Sequenz $^{329}\text{RKK}^{331}$ im Linkersegment zwischen dem Transmembransegment S6 und der RCK1-Domäne fungieren. Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass durch eine Dreifach-Mutation der $^{329}\text{RKK}^{331}$ -Sequenz lediglich die Zugänglichkeit der BOXes zu einer möglichen anderen unbekanntem Bindungsstelle verändert wird (Hou et al. 2011). Geht man von einem Modell aus, bei dem es eine Bindungsstelle für die BOXes bzw. auch andere HDPs wie die HA am BK_{Ca} -Kanal gibt, könnte die Amid-Gruppe essenziell

für die Vermittlung einer Kanalwirkung sein. Da allerdings bisher nicht sicher festgestellt werden konnte, ob und wie sie eine Herabsetzung der BK_{Ca}-Kanalaktivität tatsächlich bewirken, bleibt die Frage des Zusammenhangs zwischen Struktur und Aktivität weiterhin offen. Bei der Beurteilung von Z-BOX D muss darüber hinaus beachtet werden, dass es möglicherweise kein direktes Produkt des oxidativen Abbaus von Bilirubin oder der PDPs, sondern ein hypothetisches Abbauprodukt von Häm ist und bisher nur synthetisch hergestellt werden konnte. Ob es daher überhaupt wie die anderen BOXes, die unter anderem auch in der menschlichen Galle nachgewiesen werden konnten (Seidel et al. 2017, Ritter et al. 2018), im Körper entstehen kann, konnte noch nicht bestätigt werden. Ungeachtet dessen lassen die hier erhobenen Messwerte aber vermuten, dass weder die HA noch Z-BOX D entscheidend zu einer Gefäßverengung beitragen können.

5.2.3 Fehlender additiver Effekt bei Mischapplikation von PDP und BOX

Bisher wurde im *in vitro*-Modell nur die Einzelapplikation der PDPs und BOXes geprüft. Dabei zeigte sich, dass Z-BOX A, im Gegensatz zum Z-PDP A1/2, in solchen Konzentrationen, in denen es in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Patienten mit SAB nachgewiesen wurde, keine signifikante Vasokonstriktion verursacht (Joerk et al. 2019b). Da im Liquor von Patienten mit einer SAB beide Substanzklassen immer nebeneinander vorliegen, wurden Z-BOX A und Z-PDP A erstmals zeitgleich appliziert, um die Frage nach einer möglichen Verstärkung der vasokonstriktorischen Wirkung durch Interaktion dieser Substanzen zu beantworten. Aufgrund der zuvor durchgeführten Experimente, die bereits eine BK_{Ca}-Kanal-abhängige Wirkung von Z-BOX A und Z-PDP A zeigten, wurde bei den Versuchen auf die Verwendung von Slo1 KO-Mäusen verzichtet. Es wurden zwei Experimentalgruppen gebildet, die sich jeweils in der Wahl der Konzentrationen unterschieden.

Orientierend an den gemessenen Konzentrationen im Patientenliquor (Joerk et al. 2019b) wurde in der ersten Experimentalgruppe die Konzentration des Z-BOX A auf 0,05 µM und die von Z-PDP A auf 0,5 µM festgelegt. Auf diese Weise konnte die im Patientenliquor vorherrschende Situation näherungsweise nachgebildet werden. Die Applikation beider Substanzen führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Vasokonstriktion, die in ihrer Stärke größer als bei Einzelapplikation von 0,05 µM Z-BOX A, aber etwas geringer als bei Einzelapplikation von 0,5 µM Z-PDP A

war. Dementsprechend muss in dieser Konstellation ein additiver Effekt verneint werden. Bei der zweiten Experimentalgruppe wurde die Konzentration für beide Substanzen auf jeweils 5 μM festgelegt, die in vorherigen Experimenten jeweils eine signifikante Vasokonstriktion induzierte (Joerk et al. 2019b). Die hier beobachtete Gefäßverengung fiel geringer aus als bei der ersten Experimentalgruppe und unterschied sich zudem nicht signifikant von der Kontrollgruppe und den Einzelapplikation beider Substanzen mit 5 μM , sodass auch hier ein additiver Effekt verneint werden muss.

Die Stärke der Vasokonstriktion orientierte sich bei der ersten Experimentalgruppe an der durch die Einzelapplikation von Z-PDP A1/2 bewirkten Vasokonstriktion. Daher lässt sich von diesen Ergebnissen Z-PDP A1/2 als Vermittler der Gefäßreaktion ableiten, was auch durch die 10-fach höhere Konzentration erklärt werden könnte. Geht man von einer einzigen Bindungsstelle am Kanal aus (vgl. Abschnitt 5.2.2), wäre es möglich, dass beide Substanzen um sie konkurrieren, wobei Z-PDP A1/2 dann bevorzugt gebunden wird. Für die zweite Experimentalgruppe lässt sich solch eine Aussage nicht ableiten. Eine additive Wirkung kann hingegen für beide Gruppen ausgeschlossen werden.

5.2.4 Regulierung des Durchmessers zerebraler Arteriolen durch 20-HETE

Es gibt zunehmende Evidenz, dass 20-HETE einen ätiologischen Faktor bei der Vasospasmusgenese darstellt. So wurden erhöhte 20-HETE-Konzentrationen in der CSF von SAB-Patienten nachgewiesen (Crago et al. 2011, Donnelly et al. 2015) und es konnte gezeigt werden, dass 20-HETE ein potenter Vasokonstriktor von Mikrogefäßen ist, indem es die BK_{Ca} -Kanal-Aktivität herabsetzt (Zou et al. 1996). Weiterhin ist die Expression von CYP4A-Proteinen, die an der Bildung von 20-HETE beteiligt sind, in Arteriolen höher als in Arterien. Dieser Zusammenhang gilt auch für 20-HETE, sodass sich seine Produktion invers proportional zum Gefäßdurchmesser ändert (Marji et al. 2002). Daher war es Ziel, die Rolle von 20-HETE in der Regulation zerebraler Arteriolen zu untersuchen.

In bisherigen Studien wurden bei der 20-HETE-Applikation Konzentrationen zwischen 1 und 100 nM verwendet (Gebremedhin et al. 1998, Zeng et al. 2010), sodass sich bei dieser Versuchsreihe für eine Konzentration von 100 nM entschieden wurde. Die

Applikation von 20-HETE führte allerdings entgegen der Hypothese zu keiner Vasokonstriktion. Ursache dafür könnte die Vorinkubation mit *L*-NAME sein: Durch den sinkenden NO-Spiegel erfolgt eine Enthemmung der CYP4A, was zu einer vermehrten endogenen 20-HETE-Synthese führt (Oyekan et al. 1999). Befindet sich die Konzentration nun bereits an einer Sättigungsgrenze, kann die exogene Zufuhr von 20-HETE keinen zusätzlichen Effekt bewirken. Wang et al. konnten zeigen, dass durch *L*-NAME eine Steigerung der 20-HETE-Synthese in Mikrogefäßen der Niere erfolgt (Wang et al. 2003) (Abb. 32B). Um daher den Einfluss des endogenen 20-HETE-Stoffwechsels genauer zu untersuchen, wurde HET0016, ein kompetitiver Inhibitor der 20-HETE-Synthese, eingesetzt (Miyata et al. 2001). Die IC_{50} für die Bildung von 20-HETE aus AA in humanen renalen Mikrosomen liegt bei etwa 9 nM (Sato et al. 2001), sodass die hier verwendete Konzentration von 1 μ M eine adäquate Hemmung gewährleistete. Der Gefäßdurchmesser verblieb nach Applikation annähernd auf seinem Ausgangsniveau, was vermuten lässt, dass durch die Senkung der endogenen 20-HETE-Synthese und damit -Konzentration einer *L*-NAME-vermittelten Vasokonstriktion entgegengewirkt wurde (Abb. 32C). Dieser enge Zusammenhang zwischen 20-HETE und NO-Stoffwechsel konnte auch schon in vorherigen Studien belegt werden. So wurde durch die Inhibition der 20-HETE-Synthese eine vasodilatatorische Antwort auf NO vermindert, was sich folgendermaßen erklären lässt: Durch die bereits stattfindende Hemmung der 20-HETE-Synthese kann durch NO keine bedeutend größere Minimierung der 20-HETE-Konzentration erfolgen. Da dieses unter anderem auch BK_{Ca} -Kanäle hemmt, kann folglich auch keine vermehrte Vasodilatation über eine abnehmende Hemmung der Kanäle erfolgen (Alonso-Galicia et al. 1997). Im Umkehrschluss wird angenommen, dass die vasokonstriktorische Antwort zerebraler Gefäße infolge des NO-Scavenging durch Hb, wie es bei der SAB geschieht, zum Teil durch den Anstieg der 20-HETE-Synthese bewirkt wird (Abb. 32D), wodurch eine vermehrte BK_{Ca} -Kanal-Blockierung mit folgender VSMC-Depolarisation erfolgt (Takeuchi et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 20-HETE über eine Entkopplung der eNOS und der damit einhergehenden Senkung des NO-Spiegels zu einer endothelialen Dysfunktion beiträgt (Cheng et al. 2008).

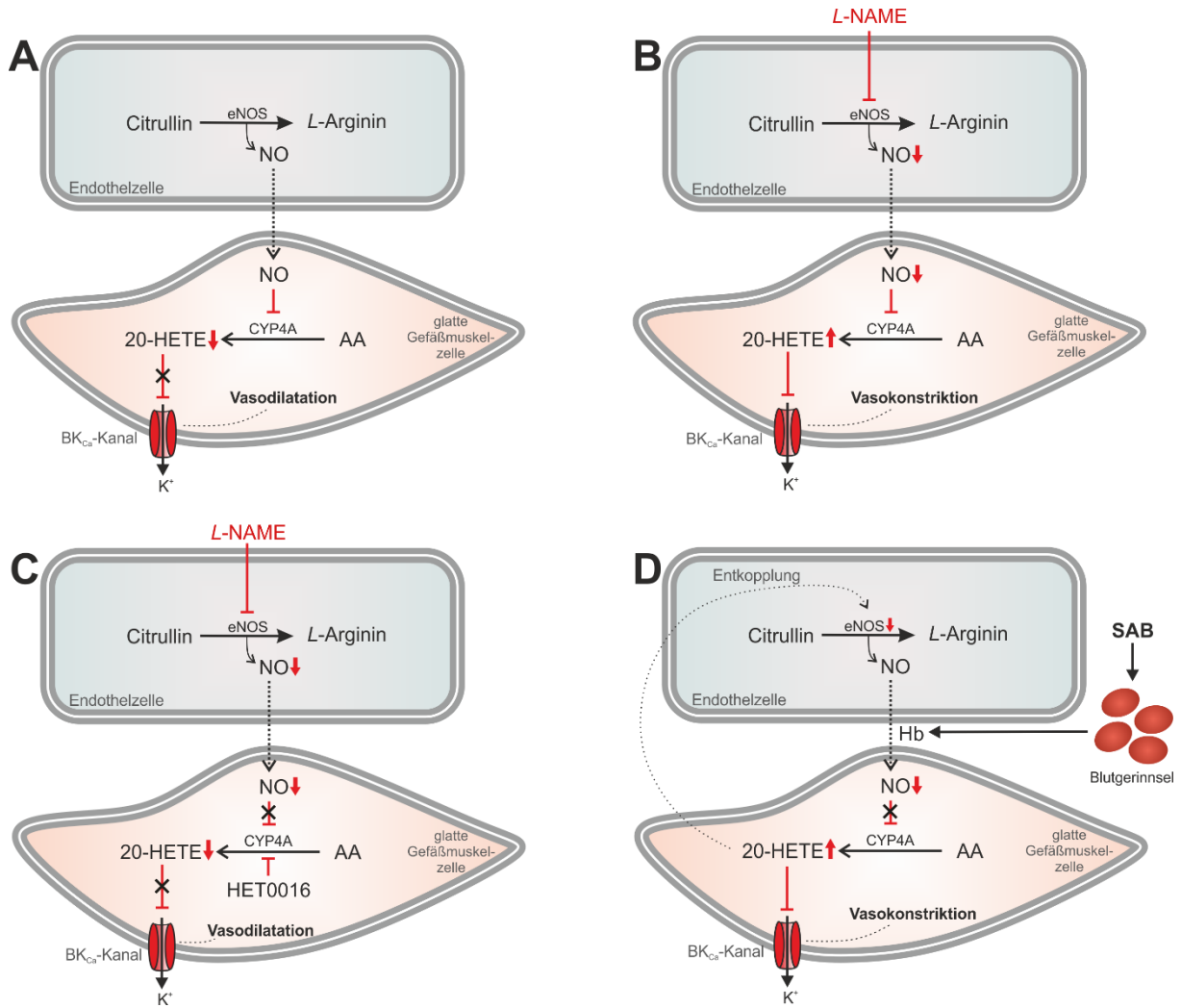


Abb. 32: Zusammenspiel von 20-HETE- und NO-Stoffwechsel bei der Vermittlung einer Gefäßreaktion.

A: NO führt über eine Hemmung der 20-HETE-Synthese zu einer Entthemmung des BK_{Ca}-Kanals und somit zu einer Begünstigung der Vasodilatation.

B: Durch L-NAME wird die NO-Verfügbarkeit gesenkt, was zu einer Entthemmung des 20-HETE-synthetisierenden Enzyms führt. Durch eine erhöhte 20-HETE-Konzentration wird der BK_{Ca}-Kanal gehemmt und eine Vasokonstriktion begünstigt.

C: Die durch L-NAME verursachte vermehrte 20-HETE-Synthese kann durch HET0016 unterbunden werden, sodass keine Hemmung des BK_{Ca}-Kanals erfolgt und die Vasodilatation begünstigt wird.

D: Bei einer SAB ist die NO-Verfügbarkeit unter anderem aufgrund des NO-Scavengings durch Hämoglobin (Hb) vermindert. Dadurch wird eine Synthese von 20-HETE begünstigt, sodass die Vasokonstriktion durch Hemmung des BK_{Ca}-Kanals erleichtert wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es denkbar, vor der exogenen 20-HETE-Applikation eine HET0016-Inkubation des Hirnschnitts vorzunehmen. Geht man davon aus, dass sich die 20-HETE-Konzentration unter L-NAME an einer Sättigungsgrenze befindet, würde durch den Inhibitor eine Abnahme der 20-HETE-Konzentration bewirkt werden.

Folglich könnte die exogene Zufuhr von 20-HETE einen zusätzlichen Effekt haben. Für diesen Versuchsansatz müsste allerdings der Messzeitraum erweitert werden, wobei die begrenzte Lebensdauer des Hirnschnitts beachtet werden muss. Um sichere Aussagen bezüglich des 20-HETE-Stoffwechsel erlangen zu können, sollte ein solches Experiment durchgeführt werden. Auch könnte man in Betracht ziehen, die Vorspannung durch U-46619 (vgl. Abschnitt 5.1.4) vorzunehmen. Dadurch könnte überprüft werden, ob der sinkende NO-Spiegel unter L-NAME tatsächlich Ursache für den ausbleibenden Effekt von exogen zugeführten 20-HETE ist.

Da sowohl 20-HETE als auch HDPs in der CSF von SAB-Patienten erhöht waren, erfolgte in einem weiterführenden Versuchsansatz die gemeinsame Applikation von HET0016 und Z-PDP A1/2, um eine mögliche Abhängigkeit der durch die HDPs verursachten Vasokonstriktion vom 20-HETE-Stoffwechsel zu untersuchen. Da eine Vasokonstriktion – wie sie bei der Einzelapplikation von Z-PDP A1/2 beobachtet wurde – verhindert wurde, ist eine Involvierung des 20-HETE-Stoffwechsels bei der Vermittlung der HDP-Vasoaktivität anzunehmen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die HDPs – ähnlich dem Angiotensin II und ET-1 (Tsai et al. 2011, Hoopes et al. 2015) – die Synthese und Freisetzung von 20-HETE stimulieren.

Im Hinblick auf die hier erhobenen Daten kann bestätigt werden, dass 20-HETE bei der Vasospasmusgenese nach SAB einen einflussreichen Faktor darstellen könnte, der sich vor allem aus dem Zusammenspiel mit dem NO-Stoffwechsel, aber auch mit den HDPs ergibt. Bisherige Therapieansätze beschäftigen sich bereits mit der Möglichkeit die verringerte NO-Verfügbarkeit nach SAB zu behandeln. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe des NO-Donators Molsidomin ergänzend zu Nimodipin eine signifikant geringere Häufigkeit von Vasospasmus-assoziierten Infarkten und ein signifikant besseres neurologisches Ergebnis im Vergleich zur Monotherapie mit Nimodipin erzielt (Ehlert et al. 2016). Die Hemmung der 20-HETE-Synthese könnte ebenfalls eine Therapiemöglichkeit darstellen, deren potenzieller Einsatz sich bisher aber nur auf das Tiermodell beschränkt. So konnte in parallel zu dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Studien die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion durch HET0016 ebenfalls verhindert werden (Joerk et al. 2019b). Weiterhin konnte durch den Einsatz des potenten und selektiven 20-HETE-Synthese Inhibitors TS-011 (Miyata et al. 2005) ein induzierter Vasospasmus rückgängig gemacht werden (Takeuchi et al. 2005, Hacein-Bey et al. 2006).

5.2.5 NS1619 verhindert die vasokonstriktorische Wirkung von Z-PDP A1/2

Bisherige Versuchsreihen zeigten, dass die durch Hämabbauprodukte induzierte Gefäßreaktion vorwiegend BK_{Ca}-Kanal-abhängig erfolgt (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019b). Daher wurde vermutet, dass eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals der HDP-induzierten Vasokonstriktion entgegenwirken könnte. Um dieser Hypothese nachzukommen, wurde NS1619 – ein im Rahmen dieses Versuchsaufbau bereits eingesetzter BK_{Ca}-Kanalaktivator (Sommer 2017, Joerk et al. 2019b) – zeitgleich mit Z-PDP A1/2 appliziert. Tatsächlich konnte auf diese Weise eine durch Z-PDP A1/2-induzierte Vasokonstriktion verhindert werden. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in parallel zu dieser Arbeit laufenden *in-vivo* Studien (Joerk et al. 2019b). Fraglich ist allerdings, ob dieser Effekt gänzlich durch die Aktivierung der BK_{Ca}-Kanäle erfolgte oder ob andere unspezifische Nebeneffekte dieser pleiotrop-wirkenden Substanz einen Einfluss ausüben. Hierbei wird insbesondere die Inaktivierung der DHPR diskutiert, die eine spezifische Beurteilung der BK_{Ca}-Kanal-Funktion bei Verwendung von NS1619 nur eingeschränkt erlauben würde (Park et al. 2007). Weiterhin bewirkt NS1619 eine Erhöhung der NO-Konzentration. Ob die dafür notwendige intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung über den BK_{Ca}-Kanal oder über Freisetzung aus dem ER bewirkt wird (vgl. 1.5), ist noch nicht abschließend geklärt. Um daher genauere Aussagen über diese Mechanismen und die Beteiligung des BK_{Ca}-Kanals treffen zu können, ist es notwendig einen spezifischeren Aktivator einzusetzen, der unspezifische Nebeneffekte weitestgehend minimiert und dadurch auch für den therapeutischen Einsatz geeignet wäre. Dafür kommen beispielsweise NS11021 (Bentzen et al. 2007, Bentzen et al. 2014) oder NS19504 (Nausch et al. 2014), die neben der größeren Spezifität auch eine höhere Potenz aufweisen, in Frage. Die klinische Relevanz bleibt aber trotz der Weiterentwicklung der BK_{Ca}-Kanal-Aktivatoren und einer großen Anzahl an präklinischen und grundlagenerforschenden Studien unklar. Dies könnte vor allem an der schlechten Selektivität der Substanzen liegen, den ubiquitär exprimierten BK_{Ca}-Kanal *in vivo* gewebsspezifisch anzusteuern. Daher sollten bei der Entwicklung solcher Substanzen die regulatorischen Untereinheiten des BK_{Ca}-Kanals aufgrund ihrer gewebsspezifischen Exprimierung mit einbezogen werden, um die pharmakologische Ansteuerung spezifizieren zu können (Giraldez 2017). Insbesondere eine neuere Familie der BK_{Ca}-Kanal-Aktivatoren – die GoSlo-SR-Familie – zeigt hierbei großes Potenzial (Roy et al. 2012, Large et al. 2015, Kshatri et al. 2017).

6 Schlussfolgerung

Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die Bestrahlung von intrakortikalen Arteriolen mit NIR-Licht entgegen der Hypothese und unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu keiner Dilatation führt, was vermutlich in der fehlenden Vorspannung der Gefäße begründet liegt. Da sie aber eine nichtinvasive und sichere Therapieoption bieten könnte, sollten aufbauende Versuche unter optimaleren Bedingungen durchgeführt werden, um das Potenzial dieser Therapieform für den Einsatz beim Vasospasmus genauer zu eruieren.

Weder die Hämaminsäure noch Z-BOX D führten im *in vitro*-Modell zu einer signifikanten Änderung des Gefäßdurchmessers im Beobachtungszeitraum. Dabei zeigt sich zumindest bei Z-BOX D eine Abhängigkeit der Gefäßreaktion von der Expression des BK_{Ca}-Kanals. Insgesamt ist aber anzunehmen, dass die Bedeutung dieser beiden Substanzen bei der Vasospasmusentstehung aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als gering einzustufen ist.

Die erstmals durchgeführte Mischapplikation von Z-PDP A1/2 aus der Gruppe der PDPs und Z-BOX A aus der Gruppe der BOXes zeigte im Vergleich zur Einzelapplikation dieser beiden Substanzen keinen stärkeren vasokonstriktorisches Effekt. Demzufolge muss für den hier verwendeten Versuchsaufbau ein additiver Effekt zwischen diesen in der CSF von SAB-Patienten nebeneinander vorkommenden Substanzen verneint werden.

Weiterhin zeigen die Versuchsergebnisse, dass der endogene 20-HETE-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle bei der Gefäßregulation spielt und somit auch bei der Vasospasmusgenese einen einflussreichen Faktor darstellen könnte. Dabei scheint vor allem das Zusammenspiel mit dem NO-Stoffwechsel und den HDPs ausschlaggebend zu sein. So konnte der 20-HETE-Synthese-Inhibitor HET0016 im *in vitro*-Versuch die Z-PDP A1/2-vermittelte Vasokonstriktion verhindern. Auch der BK_{Ca}-Kanalaktivator NS1619 konnte diese Vasokonstriktion verhindern, sodass die präventive Wirkung von HET0016 und NS1619 *in vitro* bestätigt werden konnte. Diese Beobachtung wurde auch bereits in parallel durchgeführten *in vivo*-Versuchen gemacht, was die Bedeutsamkeit dieser präventiven Therapieansätze weiter stärkt. Daher sollten die Versuche zu den BK_{Ca}-Kanalaktivatoren und den 20-HETE-Synthese-Inhibitoren ausgeweitet werden, um das Wirkungsprofil einschließlich der

unerwünschten Wirkungen dieser Substanzen näher bestimmen zu können. Nur so kann herausgefunden werden, ob diese bisher rein Forschungs-assoziierten Substanzen auch potenziell für den Einsatz am Menschen in Frage kommen.

7 Literaturverzeichnis

- Ad N, Oron U. 2001. Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 80 (2-3):109-116.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. 1998. The Large Conductance, Voltage-dependent, and Calcium-sensitive K⁺ Channel, Hslo, Is a Target of cGMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Vivo. *J Biol Chem*, 273 (49):32950-32956.
- Alkayed NJ, Narayanan J, Gebremedhin D, Medhora M, Roman RJ, Harder DR. 1996. Molecular Characterization of an Arachidonic Acid Epoxygenase in Rat Brain Astrocytes. *Stroke*, 27 (5):971-979.
- Alonso-Galicia M, Drummond HA, Reddy KK, Falck JR, Roman RJ. 1997. Inhibition of 20-HETE Production Contributes to the Vascular Responses to Nitric Oxide. *Hypertension*, 29 (1 Pt 2):320-325.
- Ankri L, Yarom Y, Uusisaari MY. 2014. Slice It Hot: Acute Adult Brain Slicing in Physiological Temperature. *J Vis Exp*, (92):e52068.
- Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. 1991. Induction of Heme Oxygenase: A General Response to Oxidant Stress in Cultured Mammalian Cells. *Cancer Res*, 51 (3):974-978.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. 1991. A Component of Calcium-Activated Potassium Channels Encoded by the *Drosophila slo* Locus. *Science*, 253 (5019):551-555.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468 (7321):232-243.
- Ball KA, Castello PR, Poyton RO. 2011. Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: Implications for phototherapy. *J Photochem Photobiol B*, 102 (3):182-191.
- Bao L, Cox DH. 2005. Gating and Ionic Currents Reveal How the BK_{Ca} Channel's Ca²⁺ Sensitivity Is Enhanced by its β 1 Subunit. *J Gen Physiol*, 126 (4):393-412.
- Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH. 2004. Mapping the BK_{Ca} Channel's "Ca²⁺ bowl": Side-chains Essential for Ca²⁺ Sensing. *J Gen Physiol*, 123 (5):475-489.
- Barrett JN, Magleby KL, Pallotta BS. 1982. PROPERTIES OF SINGLE CALCIUM-ACTIVATED POTASSIUM CHANNELS IN CULTURED RAT MUSCLE. *J Physiol*, 331:211-230.
- Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD. 2003. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) Activates Mouse TRPC6 Channels Expressed in HEK293 Cells. *J Biol Chem*, 278 (34):31709-31716.
- Bayliss WM. 1902. ON THE LOCAL REACTIONS OF THE ARTERIAL WALL TO CHANGES OF INTERNAL PRESSURE. *J Physiol*, 28 (3):220-231.
- Beck J, Raabe A, Szelenyi A, Berkefeld J, Gerlach R, Setzer M, Seifert V. 2006. Sentinel Headache and the Risk of Rebleeding After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, 37 (11):2733-2737.

- Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschütz R, Pongs O. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel β subunit family. *FEBS Lett*, 474 (1):99-106.
- Bendszus M, Jung C, Hacke W, Unterberg A. 2016. Intrakranielle arterielle Aneurysmen und Subarachnoidalblutungen. In: Hacke W, Hrsg. *Neurologie*. Vierzehnte Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 283–300.
- Bentzen BH, Olesen SP, Rønn LC, Grunnet M. 2014. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol*, 5:389.
- Bentzen BH, Nardi A, Calloe K, Madsen LS, Olesen SP, Grunnet M. 2007. The Small Molecule NS11021 Is a Potent and Specific Activator of Ca^{2+} -Activated Big-Conductance K^+ Channels. *Mol Pharmacol*, 72 (4):1033-1044.
- Berridge MJ. 2008. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*, 586 (21):5047-5061.
- Blanco VM, Stern JE, Filosa JA. 2008. Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294 (6):H2855-2863.
- Boelens R, Rademaker H, Pel R, Wever R. 1982. EPR STUDIES OF THE PHOTODISSOCIATION REACTIONS OF CYTOCHROME *c* OXIDASE-NITRIC OXIDE COMPLEXES. *Biochim Biophys Acta*, 679 (1):84-94.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368 (6474):850-853.
- Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G, Pohl U. 2003. Nitric Oxide-Induced Decrease in Calcium Sensitivity of Resistance Arteries Is Attributable to Activation of The Myosin Light Chain Phosphatase and Antagonized by the RhoA/Rho Kinase Pathway. *Circulation*, 107 (24):3081-3087.
- Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Köhler R, Hoyer J. 2003. Modulation of Ca^{2+} -activated K^+ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int*, 64 (1):199-207.
- Brayden JE, Nelson MT. 1992. Regulation of Arterial Tone by Activation of Calcium-Dependent Potassium Channels. *Science*, 256 (5056):532-535.
- Brayden JE, Earley S, Nelson MT, Reading S. 2008. TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) CHANNELS, VASCULAR TONE AND AUTOREGULATION OF CEREBRAL BLOOD FLOW. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35 (9):1116-1120.
- Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. 2000a. Cloning and Functional Characterization of Novel Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel β Subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem*, 275 (9):6453-6461.
- Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. 2000b. Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 407 (6806):870-876.

- Brilstra EH, Algra A, Rinkel GJ, Tulleken CA, van Gijn J. 2002. Effectiveness of neurosurgical clip application in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 97 (5):1036-1041.
- Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. 1993. mSlo, a Complex Mouse Gene Encoding "Maxi" Calcium-Activated Potassium Channels. *Science*, 261 (5118):221-224.
- Calderone V, Martelli A, Testai L, Martinotti E, Breschi MC. 2007. Functional contribution of the endothelial component to the vasorelaxing effect of resveratrol and NS 1619, activators of the large-conductance calcium-activated potassium channels. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 375 (1):73-80.
- Cambj-Sapunar L, Yu M, Harder DR, Roman RJ. 2003. Contribution of 5-Hydroxytryptamine_{1b} Receptors and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid to Fall in Cerebral Blood Flow After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, 34 (5):1269-1275.
- Cao Y, Zhang SZ, Zhao SQ, Bruce IC. 2011. The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel contributes to cardioprotection by limb remote ischemic preconditioning in rat. *Life Sci*, 88 (23-24):1026-1030.
- Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab*, 3 (4):277-287.
- Chen S, Luo J, Reis C, Manaenko A, Zhang J. 2017. Hydrocephalus after Subarachnoid Hemorrhage: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*, 2017:8584753.
- Cheng J, Ou JS, Singh H, Falck JR, Narsimhaswamy D, Pritchard KA, Jr., Schwartzman ML. 2008. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid causes endothelial dysfunction via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294 (2):H1018-1026.
- Chmielewska L, Malińska D. 2011. Cytoprotective action of the potassium channel opener NS1619 under conditions of disrupted calcium homeostasis. *Pharmacol Rep*, 63 (1):176-183.
- Clark JF, Sharp FR. 2006. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (10):1223-1233.
- Clark JF, Reilly M, Sharp FR. 2002. Oxidation of Bilirubin Produces Compounds That Cause Prolonged Vasospasm of Rat Cerebral Vessels: A Contributor to Subarachnoid Hemorrhage-Induced Vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (4):472-478.
- Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345 (1):50-54.
- Cocks TM, Malta E, King SJ, Woods RL, Angus JA. 1991. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol*, 196 (2):177-182.

- Connolly ES, Jr., Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, Hoh BL, Kirkness CJ, Naidech AM, Ogilvy CS, Patel AB, Thompson BG, Vespa P. 2012. Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 43 (6):1711-1737.
- Cornwell TL, Lincoln TM. 1989. Regulation of Intracellular Ca^{2+} Levels in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. REDUCTION OF Ca^{2+} BY ATRIOPEPTIN AND 8-BROMO-CYCLIC GMP IS MEDIATED BY CYCLIC GMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE. *J Biol Chem*, 264 (2):1146-1155.
- Corsten L, Raja A, Guppy K, Roitberg B, Misra M, Alp MS, Charbel F, Debrun G, Ausman J. 2001. CONTEMPORARY MANAGEMENT OF SUBARACHNOID HEMORRHAGE AND VASOSPASM: THE UIC EXPERIENCE. *Surg Neurol*, 56 (3):140-150.
- Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, 3rd, Gladwin MT. 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*, 9 (12):1498-1505.
- Crago EA, Thampatty BP, Sherwood PR, Kuo CW, Bender C, Balzer J, Horowitz M, Poloyac SM. 2011. CSF 20-HETE is associated with delayed cerebral ischemia and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 42 (7):1872-1877.
- de Gans K, Nieuwkamp DJ, Rinkel GJ, Algra A. 2002. Timing of Aneurysm Surgery in Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review of the Literature. *Neurosurgery*, 50 (2):336-342.
- De Los Santos C, Chang CW, Mycek MA, Cardullo RA. 2015. FRAP, FLIM, and FRET: Detection and Analysis of Cellular Dynamics on a Molecular Scale Using Fluorescence Microscopy. *Mol Reprod Dev*, 82 (7-8):587-604.
- de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. 2007. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78 (12):1365-1372.
- Dhaliwal JS, Casey DB, Greco AJ, Badejo AM, Jr., Gallen TB, Murthy SN, Nossaman BD, Hyman AL, Kadowitz PJ. 2007. Rho kinase and Ca^{2+} entry mediate increased pulmonary and systemic vascular resistance in L-NAME-treated rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293 (5):L1306-1313.
- Díaz L, Meera P, Amigo J, Stefani E, Alvarez O, Toro L, Latorre R. 1998. Role of the S4 Segment in a Voltage-dependent Calcium-sensitive Potassium (hSlo) Channel. *J Biol Chem*, 273 (49):32430-32436.
- Dilli E. 2014. Thunderclap Headache. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 14 (4):437.
- Donadee C, Raat NJ, Kanas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, Zhao X, Liu C, Reynolds H, Azarov I, Frizzell S, Meyer EM, Donnenberg AD, Qu L, Triulzi D, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. 2011. Nitric Oxide Scavenging by Red Blood Cell Microparticles and Cell-Free Hemoglobin as a Mechanism for the Red Cell Storage Lesion. *Circulation*, 124 (4):465-476.

- Donnelly MK, Crago EA, Conley YP, Balzer JR, Ren D, Ducruet AF, Kochanek PM, Sherwood PR, Poloyac SM. 2015. 20-HETE is associated with unfavorable outcomes in subarachnoid hemorrhage patients. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35 (9):1515-1522.
- Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J. 2007. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):Cd000277.
- Dorsch NW, King MT. 1994. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part I: Incidence and effects. *J Clin Neurosci*, 1 (1):19-26.
- Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, Erzurum SC. 1998. Nitric Oxide Synthesis in the Lung. Regulation by Oxygen through a Kinetic Mechanism. *J Clin Invest*, 101 (3):660-666.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. 1989. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch*, 414 (5):600-612.
- Edwards G, Niederste-Hollenberg A, Schneider J, Noack T, Weston AH. 1994. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BK_{Ca} channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 113 (4):1538-1547.
- Ehlert A, Schmidt C, Wölfer J, Manthei G, Jacobs AH, Brüning R, Heindel W, Ringelstein EB, Stummer W, Pluta RM, Hesselmann V. 2016. Molsidomine for the prevention of vasospasm-related delayed ischemic neurological deficits and delayed brain infarction and the improvement of clinical outcome after subarachnoid hemorrhage: a single-center clinical observational study. *J Neurosurg*, 124 (1):51-58.
- Evanson KW, Bannister JP, Leo MD, Jaggar JH. 2014. LRRC26 is a Functional BK Channel Auxiliary γ Subunit in Arterial Smooth Muscle Cells. *Circ Res*, 115 (4):423-431.
- Fan F, Ge Y, Lv W, Elliott MR, Muroya Y, Hirata T, Booz GW, Roman RJ. 2016. Molecular mechanisms and cell signaling of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular pathophysiology. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21:1427-1463.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J. 1999. Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance K_{Ca} Channel, *IKCa1*. *J Biol Chem*, 274 (9):5746-5754.
- Faraci FM, Sobey CG. 1998. Role of Potassium Channels in Regulation of Cerebral Vascular Tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (10):1047-1063.
- Fontanarosa PB. 1989. Recognition of Subarachnoid Hemorrhage. *Ann Emerg Med*, 18 (11):1199-1205.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. 2010. cGMP-dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol Rev*, 62 (3):525-563.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. 1999. Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Activates Cloned BK_{Ca} Channels Expressed in Mammalian Cells by Direct Phosphorylation at Serine 1072. *J Biol Chem*, 274 (16):10927-10935.

- Furfine ES, Carbine K, Bunker S, Tanoury G, Harmon M, Laubach V, Sherman P. 1997. POTENT INHIBITION OF HUMAN NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE BY N^G-NITRO-L-ARGININE METHYL ESTER RESULTS FROM CONTAMINATING N^G-NITRO-L-ARGININE. *Life Sci*, 60 (20):1803-1809.
- Garcia-Calvo M, Knaus HG, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Kempner ES. 1994. Functional unit size of the charybdotoxin receptor in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11):4718-4722.
- Gáspár T, Domoki F, Lenti L, Katakam PV, Snipes JA, Bari F, Busija DW. 2009. Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res*, 1285:196-207.
- Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER, Harder DR. 1998. Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca²⁺ current. *J Physiol*, 507 (Pt 3):771-781.
- Gebremedhin D, Yamaura K, Zhang C, Bylund J, Koehler RC, Harder DR. 2003. Metabotropic Glutamate Receptor Activation Enhances the Activities of Two Types of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Rat Hippocampal Astrocytes. *J Neurosci*, 23 (5):1678-1687.
- Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, Narayanan J, Falck JR, Okamoto H, Roman RJ, Nithipatikom K, Campbell WB, Harder DR. 2000. Production of 20-HETE and Its Role in Autoregulation of Cerebral Blood Flow. *Circulation Research*, 87 (1):60-65.
- Geiselhöringer A, Werner M, Sigl K, Smital P, Wörner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J. 2004. IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo j*, 23 (21):4222-4231.
- Gessner G, Cui YM, Otani Y, Ohwada T, Soom M, Hoshi T, Heinemann SH. 2012. Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (9):3552-3557.
- Giraldez T. 2017. The GoSlo family of BK channel activators: A no-go for γ subunits? *Channels (Austin)*, 11 (2):89-90.
- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. 2010. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (8):3811-3816.
- Gonzales AL, Yang Y, Sullivan MN, Sanders L, Dabertrand F, Hill-Eubanks DC, Nelson MT, Earley S. 2014. A PLC γ 1-Dependent, Force-Sensitive Signaling Network In The Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Sci Signal*, 7 (327):ra49.
- Hacein-Bey L, Harder DR, Meier HT, Varelas PN, Miyata N, Lauer KK, Cusick JF, Roman RJ. 2006. Reversal of Delayed Vasospasm by TS-011 in the Dual Hemorrhage Dog Model of Subarachnoid Hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27 (6):1350-1354.
- Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan J, Jefcoat C, Falck JR, Campbell WB, Roman R. 1994. Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol*, 266 (5 Pt 2):H2098-2107.
- Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA, Tagliatela M, Joho RH, Brown AM. 1991. Exchange of Conduction Pathways Between Two Related K⁺ Channels. *Science*, 251 (4996):942-944.

- Helms CC, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. 2018. Erythrocytes and Vascular Function: Oxygen and Nitric Oxide. *Front Physiol*, 9:125.
- Hirose H, Ide K, Sasaki T, Takahashi R, Kobayashi M, Ikemoto F, Yano M, Nishikibe M. 1995. The role of endothelin and nitric oxide in modulation of normal and spastic cerebral vascular tone in the dog. *Eur J Pharmacol*, 277 (1):77-87.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10):1671-1676.
- Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. 1996. Effects of the BK_{Ca} channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 117 (1):119-129.
- Hoopes SL, Garcia V, Edin ML, Schwartzman ML, Zeldin DC. 2015. Vascular Actions of 20-HETE. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 120:9-16.
- Hou S, Xu R, Clark JF, Wurster WL, Heinemann SH, Hoshi T. 2011. Bilirubin oxidation end products directly alter K⁺ channels important in the regulation of vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):102-112.
- Hristov KL, Smith AC, Parajuli SP, Malysz J, Petkov GV. 2014. Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel regulation by protein kinase C in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306 (5):C460-470.
- Hu XQ, Zhang L. 2012. Function and regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today*, 17 (17-18):974-987.
- Huang J, van Gelder JM. 2002. THE PROBABILITY OF SUDDEN DEATH FROM RUPTURE OF INTRACRANIAL ANEURYSMS: A META-ANALYSIS. *Neurosurgery*, 51 (5):1101-1107.
- Huang S, Uusisaari MY. 2013. Physiological temperature during brain slicing enhances the quality of acute slice preparations. *Front Cell Neurosci*, 7:48.
- Huang Y, Lau CW, Ho IH. 1997. NS 1619 activates Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*, 325 (1):21-27.
- Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. 2005. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest*, 115 (8):2099-2107.
- Ignarro LJ. 2002. NITRIC OXIDE AS A UNIQUE SIGNALING MOLECULE IN THE VASCULAR SYSTEM: A HISTORICAL OVERVIEW. *J Physiol Pharmacol*, 53 (4 Pt 1):503-514.
- Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y, Ito Y. 2009. Synergistic Activation of Vascular TRPC6 Channel by Receptor and Mechanical Stimulation via Phospholipase C/Diacylglycerol and Phospholipase A₂/ω-Hydroxylase/20-HETE Pathways. *Circ Res*, 104 (12):1399-1409.
- Jakovcevic D, Harder DR. 2007. Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. *Curr Top Dev Biol*, 79:75-97.

- Janssen H, Berlis A, Lutz J, Thon N, Brückmann H. 2017. State of Practice: Endovascular Treatment of Acute Aneurysmal SAH in Germany. *AJNR Am J Neuroradiol*, 38 (8):1574-1579.
- Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, Wray D. 2000. Regulation of Cloned Cardiac L-type Calcium Channels by cGMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem*, 275 (9):6135-6143.
- Jobsis FF. 1977. Noninvasive, Infrared Monitoring of Cerebral and Myocardial Oxygen Sufficiency and Circulatory Parameters. *Science*, 198 (4323):1264-1267.
- Joerk A, Seidel RA, Walter SG, Wiegand A, Kahnes M, Klopffleisch M, Kirmse K, Pohnert G, Westerhausen M, Witte OW, Holthoff K. 2014. Impact of Heme and Heme Degradation Products on Vascular Diameter in Mouse Visual Cortex. *J Am Heart Assoc*, 3 (4).
- Joerk A, Müller JJ, Seidel RA, Sommer C, Günther M, Wiegand A, Pohnert G, Frahm C, Westerhausen M, Holthoff K, Schwab M, Witte OW, Rupprecht S. 2019a. Vasoconstrictory response of cerebral mouse and rat arteries to heme and heme degradation products. *J Cereb Blood Flow Metab*, eingereicht.
- Joerk A, Ritter M, Langguth N, Seidel RA, Freitag D, Herrmann KH, Schaefgen A, Ritter M, Günther M, Sommer C, Braemer D, Walter J, Ewald C, Kalff R, Reichenbach JR, Westerhausen M, Pohnert G, Witte OW, Holthoff K. 2019b. Propentdyopents as Heme Degradation Intermediates Constrict Mouse Cerebral Arterioles and Are Present in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Subarachnoid Hemorrhage. *Circ Res*, 124 (12):e101-e114.
- Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM. 2004. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 101 (5):836-842.
- Kamm KE, Stull JT. 1985. THE FUNCTION OF MYOSIN AND MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE PHOSPHORYLATION IN SMOOTH MUSCLE. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 25:593-620.
- Kamp MA, Dibué M, Schneider T, Steiger HJ, Hänggi D. 2012. Calcium and Potassium Channels in Experimental Subarachnoid Hemorrhage and Transient Global Ischemia. *Stroke Res Treat*, 2012:382146.
- Kaynar MY, Tanriverdi T, Kafadar AM, Kacira T, Uzun H, Aydin S, Gumustas K, Dirican A, Kuday C. 2004. Detection of soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in both cerebrospinal fluid and serum of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 101 (6):1030-1036.
- Kim KJ, Filosa JA. 2012. Advanced *in vitro* approach to study neurovascular coupling mechanisms in the brain microcirculation. *J Physiol*, 590 (7):1757-1770.
- Klopffleisch M, Seidel RA, Görls H, Richter H, Beckert R, Imhof W, Reiher M, Pohnert G, Westerhausen M. 2013. Total Synthesis and Detection of the Bilirubin Oxidation Product (Z)-2-(3-Ethenyl-4-methyl-5-oxo-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-ylidene)ethanamide (Z-BOX A). *Org Lett*, 15 (17):4608-4611.

- Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M, Swanson R. 1994. Primary Sequence and Immunological Characterization of β -Subunit of High Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel from Smooth Muscle. *J Biol Chem*, 269 (25):17274-17278.
- Knot HJ, Nelson MT. 1998. Regulation of arterial diameter and wall $[\text{Ca}^{2+}]$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol*, 508 (Pt 1):199-209.
- Knot HJ, Standen NB, Nelson MT. 1998. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall $[\text{Ca}^{2+}]$ in cerebral arteries of rat via Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *J Physiol*, 508 (Pt 1):211-221.
- Kranc KR, Pyne GJ, Tao L, Claridge TD, Harris DA, Cadoux-Hudson TA, Turnbull JJ, Schofield CJ, Clark JF. 2000. Oxidative degradation of bilirubin produces vasoactive compounds. *Eur J Biochem*, 267 (24):7094-7101.
- Kshatri AS, Li Q, Yan J, Large RJ, Sergeant GP, McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA. 2017. Differential efficacy of GoSlo-SR compounds on $\text{BK}\alpha$ and $\text{BK}\gamma_{1-4}$ channels. *Channels (Austin)*, 11 (1):66-78.
- Kuhlmann CR, Trümper JR, Abdallah Y, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Walther S, Piper HM, Tillmanns H, Erdogan A. 2004. The K^+ -channel opener NS1619 increases endothelial NO-synthesis involving p42/p44 MAP-kinase. *Thromb Haemost*, 92 (5):1099-1107.
- Kundra S, Mahendru V, Gupta V, Choudhary AK. 2014. Principles of neuroanesthesia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 30 (3):328-337.
- Lampl Y, Zivin JA, Fisher M, Lew R, Welin L, Dahlof B, Borenstein P, Andersson B, Perez J, Caparo C, Ilic S, Oron U. 2007. Infrared Laser Therapy For Ischemic Stroke: A New Treatment Strategy: Results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). *Stroke*, 38 (6):1843-1849.
- Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D. 1997. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-induced Vasoconstriction and Inhibition of Potassium Current in Cerebral Vascular Smooth Muscle Is Dependent on Activation of Protein Kinase C. *J Biol Chem*, 272 (43):27345-27352.
- Langguth N. 2019. Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lantigua H, Ortega-Gutierrez S, Schmidt JM, Lee K, Badjatia N, Agarwal S, Claassen J, Connolly ES, Mayer SA. 2015. Subarachnoid hemorrhage: who dies, and why? *Crit Care*, 19:309.
- Large RJ, Kshatri A, Webb TI, Roy S, Akande A, Bradley E, Sergeant GP, Thornbury KD, McHale NG, Hollywood MA. 2015. Effects of the novel BK (K_{Ca} 1.1) channel opener GoSlo-SR-5-130 are dependent on the presence of $\text{BK}\beta$ subunits. *Br J Pharmacol*, 172 (10):2544-2556.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. 2006. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology (Bethesda)*, 21:69-78.
- Lee K, Rowe IC, Ashford ML. 1995. NS 1619 activates BK_{Ca} channel activity in rat cortical neurones. *Eur J Pharmacol*, 280 (2):215-219.

- Lincoln TM. 1983. Effects of Nitroprusside and 8-Bromo-Cyclic GMP on the Contractile Activity of the Rat Aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 224 (1):100-107.
- Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. 2009. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 47 (2):256-263.
- Lovick TA, Brown LA, Key BJ. 2004. Neuronal activity-related coupling in cortical arterioles: involvement of astrocyte-derived factors. *Exp Physiol*, 90 (1):131-140.
- Lu J, Ji N, Yang Z, Zhao X. 2012. Prognosis and treatment of acute hydrocephalus following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Clin Neurosci*, 19 (5):669-672.
- Łukasiak A, Skup A, Chlopicki S, Łomnicka M, Kaczara P, Proniewski B, Szewczyk A, Wrzosek A. 2016. SERCA, complex I of the respiratory chain and ATP-synthase inhibition are involved in pleiotropic effects of NS1619 on endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 786:137-147.
- Lundberg JO, Govoni M. 2004. INORGANIC NITRATE IS A POSSIBLE SOURCE FOR SYSTEMIC GENERATION OF NITRIC OXIDE. *Free Radic Biol Med*, 37 (3):395-400.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7 (2):156-167.
- Ma Z, Lou XJ, Horrigan FT. 2006. Role of Charged Residues in the S1-S4 Voltage Sensor of BK Channels. *J Gen Physiol*, 127 (3):309-328.
- Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. 2000. Effects of Near-Infrared Low-Level Laser Irradiation on Microcirculation. *Lasers Surg Med*, 27 (5):427-437.
- Marji JS, Wang MH, Laniado-Schwartzman M. 2002. Cytochrome *P*-450 4A isoform expression and 20-HETE synthesis in renal preglomerular arteries. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283 (1):F60-67.
- Mascia L, Fedorko L, Stewart DJ, Mohamed F, terBrugge K, Ranieri VM, Wallace MC. 2001. Temporal Relationship Between Endothelin-1 Concentrations and Cerebral Vasospasm in Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, 32 (5):1185-1190.
- McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, Leonard RJ. 1995. Functional Role of the β Subunit of High Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Neuron*, 14 (3):645-650.
- Meera P, Wallner M, Toro L. 2000. A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (10):5562-5567.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW. 2004. Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel. *J Biol Chem*, 279 (35):36746-36752.
- Metea MR, Newman EA. 2006. Glial Cells Dilate and Constrict Blood Vessels: A Mechanism of Neurovascular Coupling. *J Neurosci*, 26 (11):2862-2870.

- Mijailovic M, Lukic S, Laudanovic D, Folic M, Folic N, Jankovic S. 2013. Effects of Nimodipine on Cerebral Vasospasm in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Treated by Endovascular Coiling. *Adv Clin Exp Med*, 22 (1):101-109.
- Miyata N, Taniguchi K, Seki T, Ishimoto T, Sato-Watanabe M, Yasuda Y, Doi M, Kametani S, Tomishima Y, Ueki T, Sato M, Kameo K. 2001. HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br J Pharmacol*, 133 (3):325-329.
- Miyata N, Seki T, Tanaka Y, Omura T, Taniguchi K, Doi M, Bandou K, Kametani S, Sato M, Okuyama S, Cambj-Sapunar L, Harder DR, Roman RJ. 2005. Beneficial Effects of a New 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Synthesis Inhibitor, TS-011 [*N*-(3-chloro-4-morpholin-4-yl) Phenyl-*N'*-hydroxyimidoformamide], on Hemorrhagic and Ischemic Stroke. *J Pharmacol Exp Ther*, 314 (1):77-85.
- Muller WA. 2002. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab Invest*, 82 (5):521-533.
- Mulligan SJ, MacVicar BA. 2004. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, 431 (7005):195-199.
- Nausch B, Rode F, Jørgensen S, Nardi A, Korsgaard MP, Hougaard C, Bonev AD, Brown WD, Dyhring T, Strøbæk D, Olesen SP, Christophersen P, Grunnet M, Nelson MT, Rønn LC. 2014. NS19504: A Novel BK Channel Activator with Relaxing Effect on Bladder Smooth Muscle Spontaneous Phasic Contractions. *J Pharmacol Exp Ther*, 350 (3):520-530.
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. 1995. Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Calcium Sparks. *Science*, 270 (5236):633-637.
- Olesen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J. 1994. Selective activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol*, 251 (1):53-59.
- Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A, Zhang C, Sadeh M, Lampl Y, Streeter J, DeTaboada L, Chopp M. 2006. Low-Level Laser Therapy Applied Transcranially to Rats After Induction of Stroke Significantly Reduces Long-Term Neurological Deficits. *Stroke*, 37 (10):2620-2624.
- Osaka K. 1977. Prolonged vasospasm produced by the breakdown products of erythrocytes. *J Neurosurg*, 47 (3):403-411.
- Østergaard L, Stankevicius E, Andersen MR, Eskildsen-Helmond Y, Ledet T, Mulvany MJ, Simonsen U. 2007. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293 (5):H2894-2903.
- Osuka K, Suzuki Y, Tanazawa T, Hattori K, Yamamoto N, Takayasu M, Shibuya M, Yoshida J. 1998. Interleukin-6 and Development of Vasospasm after Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 140 (9):943-951.
- Oyama K, Criddle L. 2004. Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Crit Care Nurse*, 24 (5):58-60, 62, 64-57.
- Oyekan AO, Youseff T, Fulton D, Quilley J, McGiff JC. 1999. Renal cytochrome P450 ω -hydroxylase and epoxygenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. *J Clin Invest*, 104 (8):1131-1137.

- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333 (6174):664-666.
- Park WS, Kang SH, Son YK, Kim N, Ko JH, Kim HK, Ko EA, Kim CD, Han J. 2007. The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca²⁺ channels in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 362 (1):31-36.
- Passier PE, Visser-Meily JM, Rinkel GJ, Lindeman E, Post MW. 2011. Life Satisfaction and Return to Work After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 20 (4):324-329.
- Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. 2000. CLINICAL AND GENETIC FEATURES OF EHLERS-DANLOS SYNDROME TYPE IV, THE VASCULAR TYPE. *N Engl J Med*, 342 (10):673-680.
- Peterson JW, Roussos L, Kwun BD, Hackett JD, Owen CJ, Zervas NT. 1990. Evidence of the role of hemolysis in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 72 (5):775-781.
- Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, Steiger HJ. 2017. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arztebl Int*, 114 (13):226-236.
- Phillips TJ, Dowling RJ, Yan B, Laidlaw JD, Mitchell PJ. 2011. Does Treatment of Ruptured Intracranial Aneurysms Within 24 Hours Improve Clinical Outcome? *Stroke*, 42 (7):1936-1945.
- Piwońska M, Szewczyk A, Schröder UH, Reymann KG, Bednarczyk I. 2016. Effectors of large-conductance calcium-activated potassium channel modulate glutamate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 76 (1):20-31.
- Polin RS, Bavbek M, Shaffrey ME, Billups K, Bogaev CA, Kassell NF, Lee KS. 1998. Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 89 (4):559-567.
- Polmear A. 2003. Sentinel headaches in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: what is the true incidence? A systematic review. *Cephalalgia*, 23 (10):935-941.
- Poyton RO, Ball KA. 2011. Therapeutic Photobiomodulation: Nitric Oxide and a Novel Function of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase. *Discov Med*, 11 (57):154-159.
- Pyne-Geithman GJ, Morgan CJ, Wagner K, Dulaney EM, Carrozzella J, Kanter DS, Zuccarello M, Clark JF. 2005. Bilirubin production and oxidation in CSF of patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25 (8):1070-1077.
- Raabe A, Beck J, Berkefeld J, Deinsberger W, Meixensberger J, Schmiedek P, Seifert V, Steinmetz H, Unterberg A, Vajkoczy P, Werner C. 2005. Empfehlungen zum Management der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung. *Zentralbl Neurochir*, 66 (2):79-91.
- Rabinstein AA, Lanzino G, Wijdicks EF. 2010. Multidisciplinary management and emerging therapeutic strategies in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet Neurol*, 9 (5):504-519.

- Randriamboavonjy V, Busse R, Fleming I. 2003. 20-HETE-Induced Contraction of Small Coronary Arteries Depends on the Activation of Rho-Kinase. *Hypertension*, 41 (3 Pt 2):801-806.
- Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. 2007. Nitrite Reductase Function of Deoxymyoglobin: Oxygen Sensor and Regulator of Cardiac Energetics and Function. *Circ Res*, 100 (12):1749-1754.
- Reading SA, Brayden JE. 2007. Central Role of TRPM4 Channels in Cerebral Blood Flow Regulation. *Stroke*, 38 (8):2322-2328.
- Ritter M, Neupane S, Seidel RA, Steinbeck C, Pohnert G. 2018. *In vivo* and *in vitro* identification of Z-BOX C - a new bilirubin oxidation end product. *Org Biomol Chem*, 16 (19):3553-3555.
- Ritter M, Seidel RA, Bellstedt P, Schneider B, Bauer M, Görls H, Pohnert G. 2016. Isolation and Identification of Intermediates of the Oxidative Bilirubin Degradation. *Org Lett*, 18 (17):4432-4435.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. 1993. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 265 (1):C299-303.
- Roman RJ. 2002. P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function. *Physiol Rev*, 82 (1):131-185.
- Roos YB, de Haan RJ, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M. 2000. Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in The Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 68 (3):337-341.
- Roy S, Akande AM, Large RJ, Webb TI, Camarasu C, Sergeant GP, McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA. 2012. Structure-Activity Relationships of a Novel Group of Large-Conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) Channel Modulators: The GoSlo-SR Family. *ChemMedChem*, 7 (10):1763-1769.
- Rüttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Köpschall I, Pfister M, Münkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rüscher A, Ruth P, Knipper M. 2004. Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) α -subunit but not the BK β 1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (35):12922-12927.
- Sabri M, Ai J, Knight B, Tariq A, Jeon H, Shang X, Marsden PA, Loch Macdonald R. 2011. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):190-199.
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV. 2013. An Updated Definition Of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44 (7):2064-2089.
- Saleh SN, Angermann JE, Sones WR, Leblanc N, Greenwood IA. 2007. Stimulation of Ca²⁺-Gated Cl⁻ Currents by the Calcium-Dependent K⁺ Channel Modulators NS1619 [1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one] and Isopimaric Acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 321 (3):1075-1084.

- Sanderson TH, Wider JM, Lee I, Reynolds CA, Liu J, Lepore B, Tousignant R, Bukowski MJ, Johnston H, Fite A, Raghunayakula S, Kamholz J, Grossman LI, Przyklenk K, Hüttemann M. 2018. Inhibitory modulation of cytochrome c oxidase activity with specific near-infrared light wavelengths attenuates brain ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep*, 8 (1):3481.
- Sarti P, Giuffré A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Brunori M. 2000. Nitric Oxide and Cytochrome c Oxidase: Mechanisms of Inhibition and NO Degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 274 (1):183-187.
- Sato M, Ishii T, Kobayashi-Matsunaga Y, Amada H, Taniguchi K, Miyata N, Kameo K. 2001. Discovery of a *N'*-hydroxyphenylformamidine Derivative HET0016 as a Potent and Selective 20-HETE Synthase Inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 11 (23):2993-2995.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P. 2004. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (25):9474-9478.
- Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M, Ruth P. 2005. Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel-Deficient Mice. *Circulation*, 112 (1):60-68.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, 404 (6774):197-201.
- Schreiber M, Salkoff L. 1997. A Novel Calcium-Sensing Domain in the BK Channel. *Biophys J*, 73 (3):1355-1363.
- Schulze D, Traber J, Ritter M, Görls H, Pohnert G, Westerhausen M. 2019. Total syntheses of the bilirubin oxidation end product Z-BOX C and its isomeric form Z-BOX D. *Org Biomol Chem*, 17 (26):6489-6496.
- Seidel RA, Claudel T, Schleser FA, Ojha NK, Westerhausen M, Nietzsche S, Sponholz C, Cuperus F, Coldewey SM, Heinemann SH, Pohnert G, Trauner M, Bauer M. 2017. Impact of higher-order heme degradation products on hepatic function and hemodynamics. *J Hepatol*, 67 (2):272-281.
- Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. 2003. Activation of RhoA and Inhibition of Myosin Phosphatase as Important Components in Hypertension in Vascular Smooth Muscle. *Circ Res*, 92 (4):411-418.
- Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. 1999. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci*, 22 (3):97-99.
- Shea AM, Reed SD, Curtis LH, Alexander MJ, Villani JJ, Schulman KA. 2007. CHARACTERISTICS OF NONTRAUMATIC SUBARACHNOID HEMORRHAGE IN THE UNITED STATES IN 2003. *Neurosurgery*, 61 (6):1131-1138.

- Sheldon JH, Norton NW, Argentieri TM. 1997. Inhibition of Guinea Pig Detrusor Contraction by NS-1619 Is Associated with Activation of BK_{Ca} and Inhibition of Calcium Currents. *J Pharmacol Exp Ther*, 283 (3):1193-1200.
- Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP, North RA. 1994. Tetraethylammonium block of *Slowpoke* calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch*, 426 (5):440-445.
- Shi J, Krishnamoorthy G, Yang Y, Hu L, Chaturvedi N, Harilal D, Qin J, Cui J. 2002. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*, 418 (6900):876-880.
- Shi Y, Jiang MT, Su J, Hutchins W, Konorev E, Baker JE. 2007. Mitochondrial Big Conductance K_{Ca} Channel and Cardioprotection in Infant Rabbit Heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50 (5):497-502.
- Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. 2007. Deoxymyoglobin Is a Nitrite Reductase That Generates Nitric Oxide and Regulates Mitochondrial Respiration. *Circ Res*, 100 (5):654-661.
- Sobey CG, Faraci FM. 1998. SUBARACHNOID HAEMORRHAGE: WHAT HAPPENS TO THE CEREBRAL ARTERIES? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 25 (11):867-876.
- Sommer C. 2017. Neue Therapieoptionen bei zerebralem Vasospasmus? Einfluss von NS1619 und Nahinfrarotillumination auf den Gefäßdurchmesser zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Bachelorarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, Sausbier M. 2009. Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *Febs j*, 276 (6):1680-1697.
- Starke RM, Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, Koch WJ, Dumont AS. 2013. The Role of Oxidative Stress in Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Curr Neurovasc Res*, 10 (3):247-255.
- Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G. 2013. European Stroke Organization Guidelines for the Management of Intracranial Aneurysms and Subarachnoid Haemorrhage. *Cerebrovasc Dis*, 35 (2):93-112.
- Steinmetz H. 2012. Spontane Subarachnoidalblutung. *Nervenarzt*, 83 (6):785-793.
- Takeuchi K, Miyata N, Renic M, Harder DR, Roman RJ. 2006. Hemoglobin, NO, and 20-HETE interactions in mediating cerebral vasoconstriction following SAH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290 (1):R84-89.
- Takeuchi K, Renic M, Bohman QC, Harder DR, Miyata N, Roman RJ. 2005. Reversal of delayed vasospasm by an inhibitor of the synthesis of 20-HETE. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (5):H2203-2211.
- Tanishima T. 1980. Cerebral vasospasm: contractile activity of hemoglobin in isolated canine basilar arteries. *J Neurosurg*, 53 (6):787-793.

- Tanriverdi T, Sanus GZ, Ulu MO, Tureci E, Uzun H, Aydin S, Kaynar MY. 2005. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of E-selectin in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Braz J Med Biol Res*, 38 (11):1703-1710.
- Thampatty BP, Sherwood PR, Gallek MJ, Crago EA, Ren D, Hricik AJ, Kuo CW, Klamerus MM, Alexander SA, Bender CM, Hoffman LA, Horowitz MB, Kassam AB, Poloyac SM. 2011. Role of Endothelin-1 in Human Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Associations with Vasospasm and Delayed Cerebral Ischemia. *Neurocrit Care*, 15 (1):19-27.
- Thorneloe KS, Meredith AL, Knorn AM, Aldrich RW, Nelson MT. 2005. Urodynamic properties and neurotransmitter dependence of urinary bladder contractility in the BK channel deletion model of overactive bladder. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289 (3):F604-610.
- Tsai IJ, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ, Barden A. 2011. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis is increased in human neutrophils and platelets by angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300 (4):H1194-1200.
- Turner CP, Bergeron M, Matz P, Zegna A, Noble LJ, Panter SS, Sharp FR. 1998. Heme Oxygenase-1 Is Induced in Glia Throughout Brain by Subarachnoid Hemoglobin. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (3):257-273.
- Udosen IT, Jiang H, Hercule HC, Oyekan AO. 2003. Nitric oxide-epoxygenase interactions and arachidonate-induced dilation of rat renal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285 (5):H2054-2063.
- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R. 2000. Cloning and Functional Expression of Two Families of β -Subunits of the Large Conductance Calcium-activated K^+ Channel. *J Biol Chem*, 275 (30):23211-23218.
- van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. 2007. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 369 (9558):306-318.
- Vang A, Mazer J, Casserly B, Choudhary G. 2010. Activation of endothelial BK_{Ca} channels causes pulmonary vasodilation. *Vascul Pharmacol*, 53 (3-4):122-129.
- Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijndicks EF, Muizelaar JP, Mendelow AD, Juvela S, Yonas H, Terbrugge KG, Macdonald RL, Diringer MN, Broderick JP, Dreier JP, Roos YB. 2010. Definition of Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage as an Outcome Event in Clinical Trials and Observational Studies: Proposal of a Multidisciplinary Research Group. *Stroke*, 41 (10):2391-2395.
- Wallner M, Meera P, Toro L. 1996. Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca^{2+} -sensitive K^+ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (25):14922-14927.
- Wang MH, Wang J, Chang HH, Zand BA, Jiang M, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M. 2003. Regulation of renal CYP4A expression and 20-HETE synthesis by nitric oxide in pregnant rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285 (2):F295-302.
- Wang X, Tian F, Reddy DD, Nalawade SS, Barrett DW, Gonzalez-Lima F, Liu H. 2017. Up-regulation of cerebral cytochrome-c-oxidase and hemodynamics by transcranial infrared laser stimulation: A broadband near-infrared spectroscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37 (12):3789-3802.

- Wegerhoff R. 2015. Mikroskopische Verfahren: Relieferzeugende Kontrastmethoden. In: Mulisch M, Welsch U, Hrsg. Romeis Mikroskopische Technik. Neunzehnte Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 15-17.
- Weinmeister P, Lukowski R, Linder S, Traidl-Hoffmann C, Hengst L, Hofmann F, Feil R. 2008. Cyclic Guanosine Monophosphate-dependent Protein Kinase I Promotes Adhesion of Primary Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol Biol Cell*, 19 (10):4434-4441.
- Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. 2002. Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone Of Resistance Arteries. *Circulation Research*, 90 (3):248-250.
- Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT. 2005. Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol*, 567 (Pt 2):545-556.
- Win Z, Vrla GD, Steucke KE, Sevcik EN, Hald ES, Alford PW. 2014. Smooth muscle architecture within cell-dense vascular tissues influences functional contractility. *Integr Biol (Camb)*, 6 (12):1201-1210.
- Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ, Haystead TA. 2004. Smooth Muscle Phosphatase Is Regulated *in Vivo* by Exclusion of Phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by Phosphorylation of Serine 695 in Response to Cyclic Nucleotides. *J Biol Chem*, 279 (33):34496-34504.
- Wrzosek A. 2014. The potassium channel opener NS1619 modulates calcium homeostasis in muscle cells by inhibiting SERCA. *Cell Calcium*, 56 (1):14-24.
- Wu Y, Yang Y, Ye S, Jiang Y. 2010. Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca^{2+} -gated K^+ channel. *Nature*, 466 (7304):393-397.
- Xia XM, Zeng X, Lingle CJ. 2002. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 418 (6900):880-884.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395 (6701):503-507.
- Yamamura H, Ohi Y, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. 2001. BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*, 132 (4):828-834.
- Yan J, Aldrich RW. 2010. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature*, 466 (7305):513-516.
- Yan J, Aldrich RW. 2012. BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (20):7917-7922.
- Yang H, Hu L, Shi J, Delaloye K, Horrigan FT, Cui J. 2007a. Mg^{2+} mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (46):18270-18275.
- Yang H, Shi J, Zhang G, Yang J, Delaloye K, Cui J. 2008. Activation of Slo1 BK channels by Mg^{2+} coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nat Struct Mol Biol*, 15 (11):1152-1159.
- Yang L, Liu G, Zakharov SI, Bellinger AM, Mongillo M, Marx SO. 2007b. Protein Kinase G Phosphorylates $Ca_v1.2 \alpha_{1c}$ and β_2 Subunits. *Circ Res*, 101 (5):465-474.

- Yang Y, Li PY, Cheng J, Cai F, Lei M, Tan XQ, Li ML, Liu ZF, Zeng XR. 2013. IP₃ decreases coronary artery tone via activating the BK_{Ca} channel of coronary artery smooth muscle cells in pigs. *Biochem Biophys Res Commun*, 439 (3):363-368.
- Zeng Q, Han Y, Bao Y, Li W, Li X, Shen X, Wang X, Yao F, O'Rourke ST, Sun C. 2010. 20-HETE increases NADPH oxidase-derived ROS production and stimulates the L-type Ca²⁺ channel via a PKC-dependent mechanism in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299 (4):H1109-1117.
- Zhang R, Mio Y, Pratt PF, Lohr N, Warltier DC, Whelan HT, Zhu D, Jacobs ER, Medhora M, Bienengraeber M. 2009. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol*, 46 (1):4-14.
- Zhao G, Neeb ZP, Leo MD, Pachuau J, Adebisi A, Ouyang K, Chen J, Jaggar JH. 2010. Type 1 IP₃ receptors activate BK_{Ca} channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *J Gen Physiol*, 136 (3):283-291.
- Zivin JA, Albers GW, Bornstein N, Chippendale T, Dahlof B, Devlin T, Fisher M, Hacke W, Holt W, Ilic S, Kasner S, Lew R, Nash M, Perez J, Rymer M, Schellinger P, Schneider D, Schwab S, Veltkamp R, Walker M, Streeter J. 2009. Effectiveness and Safety of Transcranial Laser Therapy for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 40 (4):1359-1364.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6 (1):43-50.
- Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ. 1996. 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal arterioles. *Am J Physiol*, 270 (1):R228-237.

8 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte, dem Leiter der Hans-Berger-Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena, sowie Herrn Prof. Dr. Knut Holthoff für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser außerordentlich spannenden Arbeit in der Experimentellen Neurologie des Forschungszentrums Lobeda.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alexander Jörk, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für meine zahlreichen Einfälle und Fragen hatte. Ich bedanke mich für die konstruktive Kritik und die Unterstützung während der gesamten Laborzeit und der Schreibphase und für den ein oder anderen Plausch am Gang, der den Laboralltag abwechslungsreich machte.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der AG Bioluminescence Imaging PD Dr. Knut Kirmse, Tom Floßmann, Chuanqiang Zhang und Jürgen Graf für die freundliche Aufnahme in die AG und für die Hilfsbereitschaft, meine Fragen bezüglich der Laborarbeit bestmöglich zu beantworten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Marcel Ritter (IAAC) und Daniel Schulze (IAAC) für die Synthese, Bereitstellung und Nachanalyse der HDPs und für die Beantwortung all meiner chemischen Fragen.

Ebenfalls danke ich den technischen Assistentinnen der Experimentellen Neurologie, insbesondere Frau Ina Ingrisch für die Durchführung der PCR-Genotypisierung.

Für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium bedanke ich mich beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF).

Besonders danken möchte ich meiner Mitbewohnerin Michaela Weis, die mir sowohl in guten als auch in schlechten Zeiten jederzeit zur Seite stand und so auch die stressigsten Phasen ihre schönen Seiten hatten. Auch danke ich Valerie Scherwietes für die schönen Gespräche und die Zuversicht, dass es immer eine Lösung geben wird.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken, die immer für mich da war und mich in all meinen Entscheidungen unterstützte.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff,

Dr. med. Alexander Jörk,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

26.01.2022

Anna Schaeffgen