

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

Vasodilatation und Blutdrucksenkung durch Aktivierung des Kaliumkanals $K_{Ca}3.1$ mit SKA-31 ist unabhängig von Connexin40

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Josephine Radtke
aus
Schwerin

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cornelis de Wit

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den: 04.06.2014

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Mikrozirkulation.....	1
1.1.1 Gefäßwandaufbau von Arteriolen.....	2
1.1.2 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF).....	4
1.1.3 Zellkopplung durch Gap Junctions.....	5
1.1.4 Kaliumkanäle	6
1.2 Therapie des Bluthochdruckes durch Kaliumkanalaktivatoren.....	10
1.2.1 $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ beeinflussen den Blutdruck.....	10
1.2.2 Bekannte Aktivatoren der $K_{Ca2.X}$ und $K_{Ca3.1}$	11
1.2.3 Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31).....	11
1.2.4 Einfluss von SKA-31 auf den Blutdruck.....	12
1.3 Fragestellung.....	13
1.3.1 Wirkung von SKA-31 in der Mikrozirkulation.....	13
1.3.2 Wirkung von SKA-31 auf Blutdruck und Herzfrequenz.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Versuchstiere.....	14
2.1.2 Substanzen und Lösungen.....	15
2.1.3 Anästhetika.....	15
2.1.4 Weitere Materialien und Geräte.....	16
2.2 Intravitalmikroskopie.....	18
2.2.1 Versuchsaufbau.....	18
2.2.2 Präparation der Versuchstiere.....	19
2.2.3 Versuchsablauf.....	22
2.2.4 Versuchsprotokolle	23
2.3 Telemetrische Messung der Hämodynamik.....	24
2.3.1 Versuchsaufbau.....	24
2.3.2 Präparation der Versuchstiere.....	24
2.3.3 Versuchsprotokolle.....	25
2.4 Datenverarbeitung.....	26
2.4.1 Datenauswertung.....	26
2.4.2 Statistik	27

3 Ergebnisse.....	28
3.1 SKA-31 induziert $K_{Ca}3.1$ -abhängig eine arterioläre Dilatation.....	28
3.1.1 Spezifität von SKA-31	28
3.1.2 Wirkung von SKA-31 bei Fehlen von Connexin40 im Endothel.....	30
3.1.3 Wirkung von SKA-31 auf die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation.....	32
3.2 Effekt von SKA-31 auf die Makrohämodynamik.....	36
3.2.1 Wirkung von SKA-31 auf den arteriellen Mitteldruck.....	36
3.2.2 Wirkung von SKA-31 auf die Herzfrequenz.....	39
4 Diskussion.....	42
4.1 Die SKA-31-induzierte Dilatation ist abhängig vom $K_{Ca}3.1$ Kanal.....	42
4.2 Die SKA-31-induzierte Dilatation ist unabhängig von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen.....	43
4.3 Connexin40 ist für die EDH-medierte SKA-31-induzierte Dilatation nicht relevant	44
4.4 Mögliche EDH-Mechanismen der Dilatation.....	45
4.4.1 Zusammenwirken von SKA-31 und Acetylcholin.....	46
4.5 Blutdruckabfall durch SKA-31	48
5 Zusammenfassung.....	51
6 Literaturverzeichnis.....	52
7 Anhang.....	62
7.1 Substanzen und Lösungen.....	62
7.2 Protokoll zur Reinigung der Transmitter.....	63
7.3 Publikationen und Kongressbeiträge.....	64
8 Danksagung.....	65
9 Lebenslauf.....	66

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADH	antidiuretisches Hormon
Ado	Adenosin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
Cx	Connexin
Cx40 ^{-/-}	Maus mit globaler Connexin40-Defizienz
Cx40 ^{fl/fl}	Maus, die homozygot für ein gefloxtes Connexin40 Gen ist
Cx40 ^{fl/fl} :TIE2-Cre	Maus mit endothelzellspezifischem Connexin40 Verlust
DCEBIO	5,6-Dichloro-EBIO
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	diastolischer Blutdruck (diastolic pressure)
1-EBIO	1-Ethyl-2-Benzimidazolinon
EDH	Endothelium-Derived Hyperpolarization
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
HF	Herzfrequenz
IK oder K _{Ca} 3.1	calciumabhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit
Indo	Indometacin
K _{Ca}	calciumabhängiger Kaliumkanal
kDa	Kilodalton
K _{IR}	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
K _V	spannungsabhängiger Kaliumkanal
L-NA	N ω -Nitro- <i>L</i> -Arginin
MAP	mittlerer arterieller Druck (mean arterial pressure)
NS309	6,7-Dichlor-1H-Indol-2,3-Dion-3-Oxim
PG	Prostaglandine
SKA-31	Naphtho[1,2- <i>d</i>]thiazol-2-ylamine
SNP	Natriumnitroprussid
SP	systolischer Blutdruck (systolic pressure)

1 Einleitung

Der Blutkreislauf dient der Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen ebenso wie dem Abtransport der aus dem Zellstoffwechsel resultierenden Metaboliten wie Kohlendioxid. Hierfür ist ein adäquater Perfusionsdruck (Blutdruck) erforderlich, der den konvektiven Transport ermöglicht. Ein dauerhaft erhöhter Blutdruck ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und erfordert eine therapeutische Intervention (1). Häufig ist die Einstellung eines normalen Blutdrucks nur mittels einer Kombination von Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen möglich. Einen neuen therapeutischen Ansatz in der Therapie des Bluthochdrucks könnte der $K_{Ca}3.1$ Kanal Aktivator Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) darstellen. Diese Substanz senkt den Blutdruck von Mäusen und Hunden (2,3). Es ist allerdings unklar, über welchen Mechanismus SKA-31 den Blutdruck senkt und ob interzelluläre Kanäle (Gap Junctions) hierbei eine Rolle spielen. Da der $K_{Ca}3.1$ Kanal in Gefäßzellen vorkommt, wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob SKA-31 den Blutdruck durch eine Gefäßerweiterung erniedrigt, ob SKA-31 den Blutdruck hypertensiver Tiere senken kann und ob hierfür Connexin40, ein Gap Junction Protein, erforderlich ist.

1.1 Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation bezeichnet das Stromgebiet des Kreislaufes, in dem die Organdurchblutung reguliert wird und der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe mittels Diffusion stattfindet. Funktionell sind in dieses Stromgebiet die Arteriolen, die Kapillaren sowie die postkapillären Venolen einzuordnen. Der Zusammenhang zwischen dem Gefäßdurchmesser und dem Blutdruck wird durch das Hagen-Poiseuille-Gesetz und das Ohmsche Gesetz verdeutlicht. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz ist der Strömungswiderstand (R) einer homogenen, laminar strömenden Flüssigkeit in einem Blutgefäß proportional zur Viskosität der Flüssigkeit (η) und der Länge des Gefäßes (l) und umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßinnendurchmessers (r) (4):

Hagen-Poiseuille-Gesetz:
$$R = \frac{8 * \eta * l}{\pi * r^4}$$

Einleitung

Die vierte Potenz des Gefäßdurchmessers im Hagen-Poiseuille-Gesetz verdeutlicht, dass bereits geringe Änderungen des Gefäßdurchmessers eine große Widerstandsänderung in der Mikrozirkulation zur Folge hat. Nach dem Ohmschen Gesetz ist der Blutfluss (I) proportional zum Druckunterschied (U) zwischen der arteriellen und venösen Seite und umgekehrt proportional zum peripheren Widerstand (R , Strömungswiderstand):

Ohmsches Gesetz:
$$I = \frac{U}{R}$$

1.1.1 Gefäßwandaufbau von Arteriolen

Die innerste Schicht der Arteriolen wird Tunica intima (Intima) genannt. Sie besteht aus Endothelzellen. Die darunter befindliche Tunica media wird von glatten Muskelzellen gebildet. Das Blutgefäß wird von der Tunica adventitia in der Umgebung verankert.

Das Endothel

Das Endothel ist eine einschichtige Zellschicht, die das Gefäß innen auskleidet. Die Endothelzellen in der Mikrozirkulation von Nagetieren sind etwa 95 - 140 μm lange und 7 μm breite Zellen (5), die in Richtung des Blutstromes ausgerichtet sind. Das Endothel reguliert die Gefäßweite und hat darüber einen Einfluss auf den Blutdruck. Die Regulation der Gefäßweite wird über die Abgabe der parakrin wirkenden, vasoaktiven Substanzen, Stickstoffmonoxid und Prostaglandine ermöglicht (6). Zudem kann eine Hyperpolarisation der Endothelzellen über Faktoren (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF) oder über eine direkte Kopplung von Endothelzellen und benachbarten Muskelzellen durch Gap Junctions übertragen werden (7), wodurch eine Vasodilatation ausgelöst wird.

Einleitung

Die Muskelzellen

In Arteriolen bilden die glatten Muskelzellen einen einschichtigen Layer, in dem die Zellen zirkulär angeordnet sind. Eine Relaxation der Gefäßmuskelzellen kann durch Öffnen von Kaliumkanälen in der Zellmembran der Muskelzellen ausgelöst werden. Letzteres bedingt einen Kaliumausstrom, was eine Hyperpolarisation der Membran und einen Verschluss spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zur Folge hat. Dies reduziert die intrazelluläre Calciumkonzentration, woraus eine Vasodilatation resultiert (8).

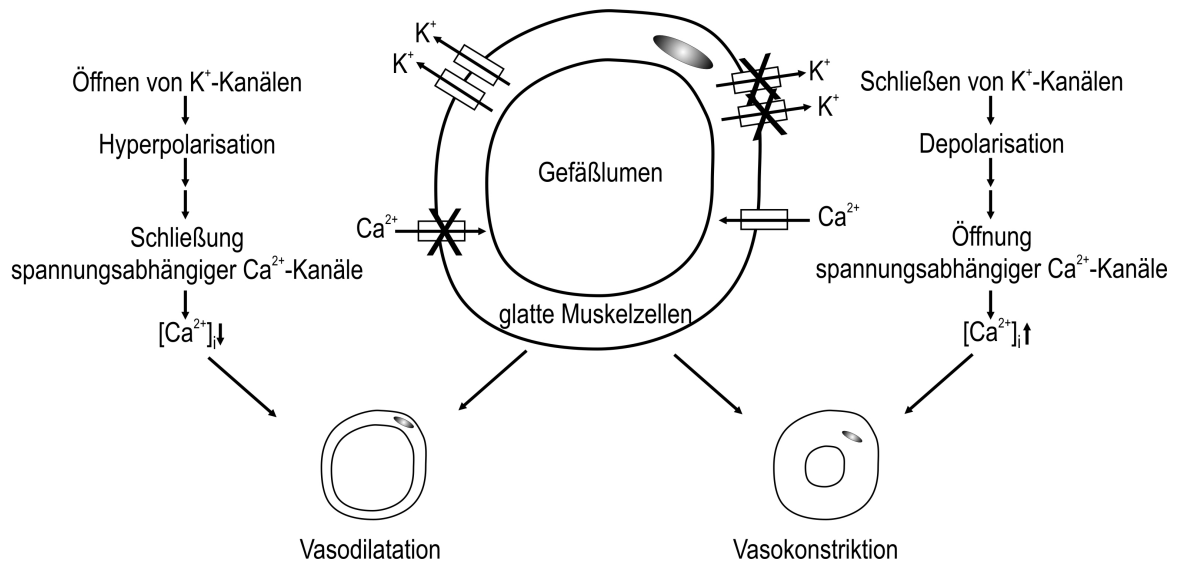


Abbildung 1.1 Vasodilatation und Vasokonstriktion mit beteiligten Kanälen. Eine Vasodilatation kann durch Öffnen von Kaliumkanälen der glatten Muskelzellen mit nachfolgender Hyperpolarisation ausgelöst werden. Dies induziert das Schließen von spannungsabhängigen Calciumkanälen mit einem Abfall des intrazellulären Calciums. Umgekehrt führt eine Depolarisation durch Schließen von Kaliumkanälen zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums induziert eine Vasokonstriktion. Abbildung modifiziert nach (8).

Einleitung

1.1.2 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)

Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Gefäßweite nach Stimulation durch Agonisten oder Schubspannung. Bereits 1980 wurde beschrieben, dass die Entfernung des Endothels bei der Präparation von Gefäßen zu einem Verlust der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation führt (9). Die hierbei beteiligte Substanz wurde als Stickstoffmonoxid identifiziert (10). Des Weiteren produziert das Endothel Prostaglandine, welche vasorelaxierend wirken (11), deren Einfluss auf den Gefäßtonus allerdings als gering eingeschätzt wird (12). Trotz Inhibition der Stickstoffmonoxid- und Prostaglandinsynthese mittels N ω -Nitro-L-Arginin und Indometacin kann durch Acetylcholin eine endothelabhängige Vasodilatation beobachtet werden. Da dies mit einer Hyperpolarisation einhergeht und endothelabhängig ist, wurde der Begriff des Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) geprägt (13,14). Hierbei handelt es sich um einen Faktor, der nicht Stickstoffmonoxid oder ein Prostaglandin ist und der zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran der umgebenden glatten Muskelzellen führt (15). Einige Studien weisen darauf hin, dass Cytochrom P450-generierte Arachidonsäure-Metaboliten, namentlich Epoxyeicosatriensäuren, als EDHF fungieren (16,17). H₂O₂ weist sowohl in Mäusen als auch in menschlichen Mesenterialgefäßen Eigenschaften des EDHF auf (18–20). Des Weiteren werden endogene Cannabinoide (21) und das C-Typ natriuretische Peptid (22) sowie Kaliumionen, die aus Endothelzellen freigesetzt werden, als EDHF in Betracht gezogen (23,24). NO selbst kann calciumabhängige Kaliumkanäle der Muskelzellen stimulieren und weist somit ebenfalls EDHF-Eigenschaften auf (25). Hieraus wird die Vielfalt von EDHF deutlich, weshalb eine gefäßbett- sowie speziesabhängige Verteilung unterschiedlicher EDHFs postuliert wird (15). Die Theorie, dass chemische Faktoren die Vasodilatation vermitteln, wurde in den letzten Jahren in Frage gestellt, da nachgewiesen wurde, dass Gap Junctions involviert sind (26–29). Diese Hypothese wird unterstützt, da sowohl eine Zunahme der Relevanz von EDH (12) als auch eine Zunahme der Anzahl von Gap Junctions zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit abnehmenden Gefäßdurchmesser zu beobachten ist (30).

Einleitung

1.1.3 Zellkopplung durch Gap Junctions

Gap Junctions sind interzelluläre Kanäle, die Ionen sowie Moleküle von bis zu 1 Kilodalton (kDa) durchtreten lassen und Zellen zu einer funktionalen Einheit koppeln können (31). Gap Junctions bestehen aus zwei Halbkanälen, den Connexonen (32). Diese befinden sich in benachbarten Zellmembranen und bilden durch Aneinanderdocken mit 30° Rotation eine interzelluläre Verbindung, die gegen den extrazellulären Raum abgeschlossen ist (33). Jedes Connexon ist aus Connexinproteinen (Cx) aufgebaut, die nach ihrer molekularen Masse in kDa bezeichnet werden (beispielsweise hat Cx40 ein Molekulargewicht von 40 kDa) und von denen jeweils 6 zirkulär angeordnet den transmembranären Halbkanal bilden (34). In Endothelzellen werden Cx37 und Cx40 (7,28,35–38) sowie in geringem Maße Cx43 exprimiert (39–43). In Gefäßmuskelzellen ist Cx43 das dominierende Connexin (28). Zur Untersuchung von Gap Junctions können Mäuse verwendet werden, die aufgrund einer genetischen Modifikation bestimmte Connexine nicht exprimieren. Sowohl Cx43 oder Cx45 defiziente Mäuse sind wegen Herz- und Gefäßmissbildungen nicht lebensfähig (44–47) und Tiere, die eine Defizienz für sowohl Cx37 als auch Cx40 aufweisen, haben vaskuläre Fehlbildungen (48,49) und versterben rasch nach der Geburt (48). Dies weist auf die Bedeutung von Connexinen für die kardiovaskuläre Entwicklung hin. Global Cx40^{-/-} Mäuse exprimieren kein Connexin40 (37,38,50–52) und sind aufgrund einer Störung des Angiotensin II-vermittelten negativen Feedbacks auf die Reninsekretion hypertensiv (52–55). Mäuse, die eine Connexin40 Defizienz in Endothelzellen aufweisen sind dagegen normoton (55). In diesen Tieren ist die endotheliale Fortleitung der Vasodilatation *in vivo* beeinträchtigt, was für eine funktionelle Bedeutung von Gap Junctions in Endothelzellen spricht (51,52). Gap Junctions können auch zwischen unterschiedlichen Zellschichten nachgewiesen werden. Am Übergang von Endothelzellen und glatten Muskelzellen werden diese Zellverbindungen als myoendotheliale Gap Junctions bezeichnet und setzen sich vor allem aus Connexin37 und Connexin40 zusammen (7,56,57). *In vivo* ist Connexin40 nicht an der Übertragung einer Membranpotentialänderung von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen beteiligt, da die lokale endothelabhängige Vasodilatation nicht beeinträchtigt ist (52). Ebenso ist die Vasodilatation in *in vitro* Versuchen bei isobarer Untersuchung unabhängig von Connexin40 (35), wogegen Connexin40 unter isometrischen Bedingungen *in vitro* zur Initiierung einer EDHF-Typ Dilatation benötigt wird (35,58).

Einleitung

1.1.4 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle in den Endothelzellen stellen einen entscheidenden initialen Schritt bei der Generierung einer endothelialen Hyperpolarisation im EDHF-Signalweg dar (59,60). Endothelzellen exprimieren neben calciumabhängigen Kaliumkanälen vom gering und intermediär-leitenden Typ auch einwärtsgerichtete (K_{IR}), ATP-sensitive (K_{ATP}) und spannungsaktivierte (K_V) Kanäle (8,61). Im Gegensatz dazu finden sich in den glatten Muskelzellen der Gefäße calciumabhängige Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit und ebenfalls K_{IR} -, K_{ATP} - und K_V -Kanäle (8).

Familie der calciumabhängigen Kaliumkanäle

Calciumabhängige Kaliumkanäle lassen sich phylogenetisch in zwei Gruppen einteilen. Einerseits Kanäle mit geringer (SK, small-conductance) bzw. intermediärer Leitfähigkeit (IK, intermediate-conductance), die auch K_{Ca2} bzw. K_{Ca3} genannt werden. Diese Kanäle werden von unterschiedlichen Genen kodiert, die nach dem HUGO Gene Nomenclature Committee als KCNN1-4 bezeichnet werden. In der zweiten Gruppe befindet sich der Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (BK, big-conductance), der auch $K_{Ca1.1}$ genannt und vom Gen KCNMA1 kodiert wird. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$ und $K_{Ca5.1}$ Kanäle (62), die aber nicht im vaskulären Gewebe gefunden werden.

Einleitung

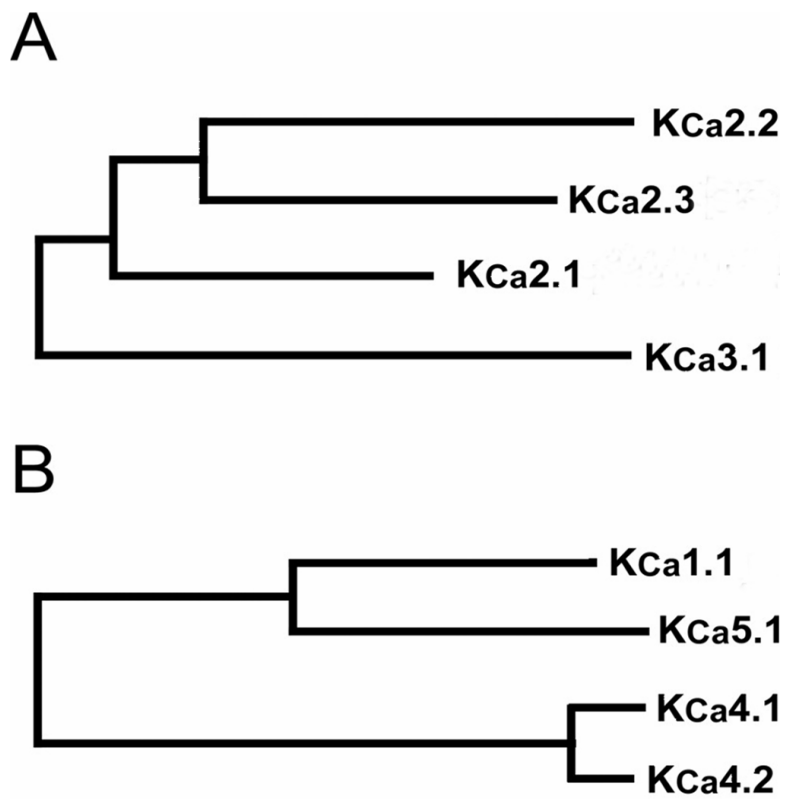


Abbildung 1.2 Phylogenetischer Stammbaum der calciumabhängigen Kaliumkanäle. Die Familie der calciumabhängigen Kaliumkanäle wird in zwei Gruppen unterteilt: **(A)** Kaliumkanäle mit geringer ($K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$, $K_{Ca2.3}$) und intermediärer Leitfähigkeit ($K_{Ca3.1}$) werden von Endothelzellen exprimiert (63–65) und sind an der endothelialen Hyperpolarisation beteiligt (66) **(B)** Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit ($K_{Ca1.1}$) sind spannungsabhängig und werden von glatten Muskelzellen exprimiert (67). Abbildung modifiziert nach (62).

Einleitung

Calciumabhängige Kaliumkanäle mit geringer und intermediärer Leitfähigkeit

$K_{Ca2.X}$ Kanäle und $K_{Ca3.1}$ werden aufgrund ihrer Leitfähigkeit von 5-10 und 20-40 pico Siemens als Kaliumkanäle mit geringer und intermediärer Leitfähigkeit bezeichnet (68,69). $K_{Ca2.X}$ Kanäle wurden im Atrioventrikularknoten, Myokard und zentralen Nervensystem nachgewiesen (70,71). Der $K_{Ca3.1}$ Kanal wird in roten und weißen Blutkörperchen exprimiert (72–74). Zudem wurde das Auftreten des intermediär leitenden calciumabhängigen Kaliumkanals in zahlreichen Epithelien und in Endothelzellen beschrieben (75). In Letzteren findet sich neben dem $K_{Ca3.1}$ Kanal vor allem der $K_{Ca2.3}$ (63–65). Der $K_{Ca3.1}$ Kanal vermittelt die Acetylcholin-induzierte Gefäßerweiterung (76), wogegen der $K_{Ca2.3}$ wahrscheinlich bei der Fluss-induzierte Vasodilatation beteiligt ist (66,77). Die Expression von gering und intermediär leitfähigen Kaliumkanälen steigt mit abnehmenden Gefäßdurchmesser (78), was auf eine zunehmende Bedeutung der Kanäle in der Mikrozirkulation hinweist. Im Gegensatz zu Endothelzellen werden diese Kanäle nicht in den glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert (79,80). Nach Aktivierung muskarinerger Rezeptoren in Endothelzellen durch Agonisten führt eine Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum zu einer Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle, sodass die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht wird (81,82). Von entscheidender Bedeutung ist, dass die Kanäle nicht spannungsabhängig sind, sodass sie bei einer einsetzenden Hyperpolarisation nicht sogleich wieder inaktiviert werden. Daher stellen calciumabhängige Kaliumkanäle mit geringer und intermediärer Leitfähigkeit einen attraktiven pharmakologischen Angriffspunkt dar, um das Membranpotential in Richtung des Gleichgewichtspotentials für Kaliumionen (Hyperpolarisation) zu verschieben (-89 mV) (15).

Werden diese Kanäle durch eine Kombination des $K_{Ca2.X}$ Blockers Apamin und eines $K_{Ca3.1}$ Blockers wie Charybdotoxin, Clotrimazol, TRAM-34 oder TRAM-39 inhibiert, wird die Agonist-induzierte Gefäßerweiterung deutlich beeinträchtigt (23,79,83–91). Es ist auch eine komplette Blockierung der EDHF-Vasodilatation durch alleinige $K_{Ca3.1}$ Kanal Inhibierung möglich (92–94). Dies zeigt, dass calciumabhängige Kaliumkanäle und vorrangig der $K_{Ca3.1}$ einen entscheidenden Anteil bei der Auslösung einer Agonist-induzierten Gefäßerweiterung haben. Dies wird durch *in vivo* Versuche in $K_{Ca3.1}$ defizienten Tieren unterstützt, die eine reduzierte EDHF Antwort nach Acetylcholin

Einleitung

aufweisen (76,95). Unklar ist, ob die durch Aktivierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals ausgelöste endotheliale Hyperpolarisation durch einen chemischen Faktor auf glatte Muskelzellen übertragen wird oder ob hierbei eine direkte Übertragung des Potentials über die myoendotheliale Kopplung durch Gap Junctions beteiligt ist.

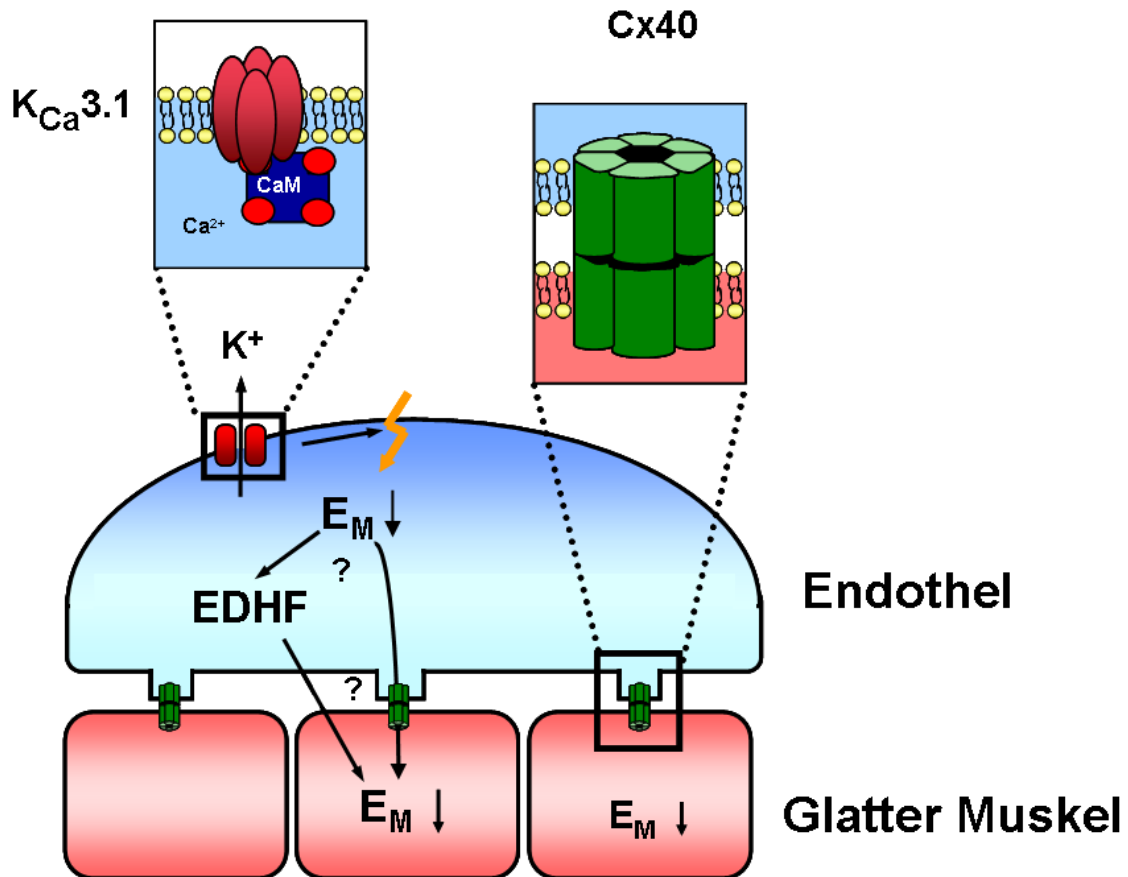


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Gefäßwand mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Der $K_{Ca3.1}$ Kanal löst eine endotheliale Hyperpolarisation (Negativierung des Membranpotentials E_M) aus, welche direkt über Gap Junctions bestehend aus Connexinen oder mittels eines Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) auf glatte Muskelzellen übertragen werden könnte. Die Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führt zu einer Vasodilatation.

1.2 Therapie des Bluthochdruckes durch Kaliumkanalaktivatoren

1.2.1 $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ beeinflussen den Blutdruck

Da calciumabhängige Kaliumkanäle eine große Bedeutung in Widerstandsgefäßen haben, liegt die Vermutung nahe, dass die Funktion dieser Kanäle den Blutdruck moduliert. Mäuse mit einer Defizienz des Kaliumkanals mit intermediärer Leitfähigkeit haben einen erhöhten Blutdruck im Vergleich zu Wildtypmäusen (66). Eine Blutdruckmessung über einen Zeitraum von 24 Stunden ergab eine Erhöhung des mittleren arteriellen Druckes von $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Mäusen auf 115 ± 2 mmHg im Vergleich zu Wildtypmäusen, die 108 ± 1 mmHg aufwiesen (76). Auch Mäuse, bei denen der SK3 Kanal mit geringer Leitfähigkeit nach Gabe von Doxycyclin nicht exprimiert wird, haben einen signifikant erhöhten Blutdruck (65). Die kombinierte Defizienz der IK und SK3 Kanäle induziert eine stärkere Blutdruckerhöhung als die Defizienz nur eines Kaliumkanals (66). Interessanterweise konnte auch bei bestimmten Hypertonieformen eine Veränderung der Expression dieses Kaliumkanals beobachtet werden. In spontan hypertensiven Ratten, welche ein Modell zur Erforschung des Bluthochdruckes darstellen, sowie in durch Angiotension-II hypertensiven Ratten wurde eine Reduktion der $K_{Ca2.3}$ Kanäle beobachtet (96,97). Andererseits wurde aber auch eine Heraufregulation des $K_{Ca3.1}$ Kanals in hypertensiven Ratten, die eine erhöhte Inzidenz von Schlaganfällen aufweisen, nachgewiesen. Dies wurde von den Autoren als ein Kompensationsmechanismus der beeinträchtigten EDH-Vasodilatation in diesen Tieren diskutiert (98). Auf Grundlage dieser Daten ist es wahrscheinlich, dass eine Aktivierung der gering und intermediär-leitenden calciumabhängigen Kaliumkanäle durch pharmakologische Substanzen zu einer Senkung des Blutdrucks führt.

Einleitung

1.2.2 Bekannte Aktivatoren der $K_{Ca}2.X$ und $K_{Ca}3.1$

Calciumabhängige Kaliumkanäle mit geringer und intermediärer Leitfähigkeit können durch Benzothiazole spezifisch aktiviert werden (2). 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO) war eine der ersten entdeckten Substanzen, die diese beiden Kanäle aktiviert (99–101). Einige Jahre später wurden 5,6-Dichloro-EBIO (DCEBIO) (102) und 6,7-Dichlor-1H-Indol-2,3-Dion-3-Oxim (NS309) als potentere Aktivatoren dieser Kaliumkanäle entwickelt und identifiziert (103–105). NS309 aktiviert vorrangig den $K_{Ca}3.1$, blockiert allerdings spannungsabhängige Calciumkanäle (104,106). 6-(Trifluormethoxy)-1,3-Benzothiazol-2-Amin (Riluzol) besitzt eine Benzothiazolstruktur und aktiviert die calciumabhängigen Kaliumkanäle mit geringer (107) und intermediärer Leitfähigkeit (108) und diente als Grundgerüst zur Generierung weiterer Substanzen.

1.2.3 Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31)

Um einen potenten Kaliumkanalaktivator zu generieren, der erfolgreich *in vivo* angewandt werden kann, wurden mehrere Benzothiazole hergestellt und auf ihre Wirksamkeit getestet (2). Das Benzothiazol Riluzol wurde als Grundgerüst verwendet, da es gute pharmakologische Eigenschaften aufweist und bereits zur Therapie der amyotrophen Lateralsklerose am Menschen zugelassen ist (109,110). Von den hergestellten Benzothiazolen wurden Anthra[2,1-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-20) und Naphtho[2,1-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) als potente Kaliumkanalaktivatoren identifiziert. Aufgrund seiner höheren Selektivität wurde SKA-31 für eine pharmakologische Testung ausgewählt. Hierbei wies SKA-31 in Konzentrationen bis zu 100 μ M keine Zytotoxizität und in Konzentrationen bis zu 30 mg/kg i.v. keine akute Toxizität in Ratten auf. Weitere positive pharmakologische Eigenschaften von SKA-31 sind seine lange Halbwertszeit von etwa 12 Stunden und eine geringe Plasmaproteinbindung von lediglich 39%. SKA-31 aktiviert den $K_{Ca}3.1$ Kanal mit einer mittleren effektiven Konzentration von 260 nM. Die mittleren effektiven Konzentrationen zur Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit ($K_{Ca}2.1/2.2/2.3$) betragen zwischen 1.9 bis 2.9 μ M (2).

Einleitung

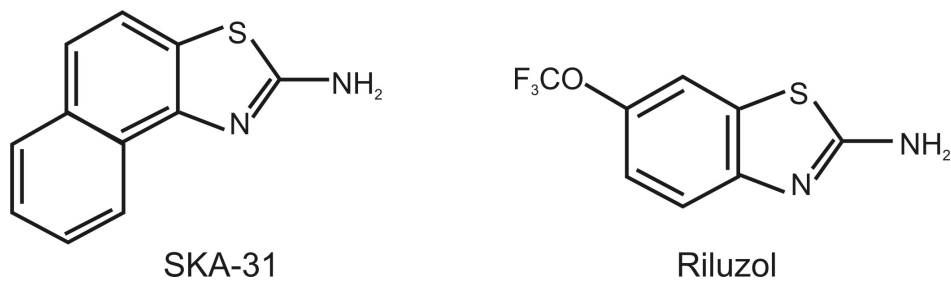


Abbildung 1.4 Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) und Riluzol. Beide Substanzen weisen eine Benzothiazolstruktur auf, die eine heterocyclische Azolverbindung mit einem Stickstoff und Schwefel-Atom ist. Abbildung modifiziert nach (2).

1.2.4 Einfluss von SKA-31 auf den Blutdruck

Die Wirkung von SKA-31 auf den Blutdruck wurde bereits an $K_{Ca}3.1^{-/-}$ und Wildtypmäusen sowie an Wildtypmäusen mit Bluthochdruck, der durch Angiotensin II induziert wurde, untersucht (2). In dieser Studie bewirkte eine intraperitoneale Applikation von 10 mg/kg und 30 mg/kg SKA-31 einen Abfall des mittleren Blutdrucks der Wildtypmäuse von 4 und 6 mmHg über einen Zeitraum von 24 Stunden. In Wildtypmäusen, deren Blutdruck mittels Angiotensin II-Dauerinfusionen auf hypertensive Werte (132 ± 3 mmHg) angehoben wurde, führte die Injektion von 30 mg/kg SKA-31 zu einem Blutdruckabfall von 12 mmHg über einen Zeitraum von 24 Stunden. In $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen war SKA-31 wirkungslos, was auf einen Effekt von SKA-31 über die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ Kanal hinweist. In keinem Experiment hatte SKA-31 (Dosierungen bis 30 mg/kg) einen Einfluss auf die Herzfrequenz der Tiere (2). Auch in großen Säugetieren wirkt SKA-31 blutdrucksenkend, wie an einer Studie in Hunden nachgewiesen werden konnte. Eine i.v. Applikation einer geringeren Dosis (2 mg/kg SKA-31) bewirkte einen nur für einige Sekunden (8 ± 1 s) anhaltenden Blutdruckabfall und wurde von einer Erhöhung der Herzfrequenz gefolgt. Dieser Frequenzanstieg ist als eine Barorezeptor-induzierte Gegenregulation physiologisch (3) und konnte den Druckabfall offenbar komplett antagonisieren.

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals durch Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) eine Vasodilatation auslöst und ob SKA-31 den Blutdruck in Kontrollen und in Tieren, die defizient für Connexin40 sind, senkt.

1.3.1 Wirkung von SKA-31 in der Mikrozirkulation

Bislang ist unklar, ob durch Aktivierung von $K_{Ca3.1}$ per se eine Gefäßerweiterung ausgelöst wird und ob hierbei eine myoendotheliale Kopplung via Gap Junctions bestehend aus Connexinen benötigt wird. Um zu untersuchen, ob SKA-31 über den $K_{Ca3.1}$ eine Gefäßerweiterung initiiert, wurden Versuche an $K_{Ca3.1}$ defizienten Mäusen und an Wildtyp Kontrolltiere durchgeführt. Die Hypothese, ob Connexin40 für eine Dilatation durch SKA-31 essentiell ist, wurde durch Intravitalmikroskopie in Connexin40 defizienten Mäusen überprüft.

1.3.2 Wirkung von SKA-31 auf Blutdruck und Herzfrequenz

In telemetrischen Messungen wurde untersucht, ob SKA-31 den Blutdruck trotz Abwesenheit von Connexin40 senken kann. Es wurden normotensive Mäuse mit einer endothelzellspezifischen Defizienz von Connexin40 sowie Mäuse mit einer globalen Connexin40 Defizienz untersucht. Letztere weisen einen Bluthochdruck auf, sodass gleichzeitig die Wirksamkeit von SKA-31 in einem chronischen Bluthochdruckmodell untersucht werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die Mikrozirkulation wurde in männlichen Mäusen (36 Tiere, Alter: 4-12 Monate, durchschnittliches Gewicht: 29,5 g) untersucht. Die Messung hämodynamischer Parameter wurde in weiblichen Tieren (20 Tiere, Alter: 4-11 Monate, durchschnittliches Gewicht: 23,7 g) durchgeführt. Alle Mäuse wurden in der Gemeinsamen Tierhaltung der Vorklinik der Universität zu Lübeck bei freiem Zugang zu Wasser und Futter (Altromin 1324 Haltungsdiät-Ratten/Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) gezüchtet und in Käfigen mit bis zu 6 Tieren gehalten. Die Versuche waren vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Aktenzeichen V 312-72241.122-2).

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation und hämodynamischer Parameter wurden Mäuse mit globalem (Cx40^{-/-}) oder endothelzellspezifischem Connexin40-Verlust (Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre) sowie Mäuse mit gleichem genetischem Hintergrund ohne Gen-Defizienz verwendet. In Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre ist das Connexin40-Gen von Lox-Sequenzen flankiert (floxed), die vom Enzym Cre-Rekombinase erkannt werden, durch das das Connexin40-Gen entfernt wird. Das Enzym steht unter der Kontrolle des in Endothelzellen aktiven TIE2-Promotors. Die Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre Mäuse wurden in Lübeck durch Verpaarung von Tieren mit dem geflochten Gen (Cx40floxed mit 129/Sv-C57BL/6 Hintergrund) und Mäusen, welche die TIE2-Cre-Rekombinase exprimieren (erhalten von Dr. M. Yanagisawa, Howard Hughes Medical Institute, University of Texas, Dallas, Texas), generiert. Mäuse, die homozygot das geflochte Connexin40-Gen tragen, die Cre-Rekombinase jedoch nicht vorhanden ist (Cx40^{fl/fl}) und somit Cx40 in Endothelzellen exprimieren, dienten als Kontrolle. Zur Intravitalmikroskopie wurden zudem Mäuse, denen das Gen des Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanals mittlerer Leitfähigkeit fehlt (K_{Ca}3.1^{-/-}) und Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund als Wildtypen verwendet.

Material und Methoden

2.1.2 Substanzen und Lösungen

Die Tabelle mit Substanzen und Lösungen mit Herstellerangaben befindet sich auf Seite 62 (Anhang).

Die Ringer-Lösung enthielt 147,2 mmol/L NaCl, 4,0 mmol/L KCl und 2,2 mmol/L CaCl₂. Die gepufferte Krebs-Lösung setzte sich aus 118,4 mmol/L NaCl, 20 mmol/L NaHCO₃, 3,8 mmol/L KCl, 2,5 mmol/L CaCl₂, 1,2 mmol/L KH₂PO₄ und 1,2 mmol/L MgSO₄ zusammen und wurde mit Mischgas (95% N₂, 5% CO₂) von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf begast, sodass der pH bei einem pCO₂ von 40 mmHg 7,4 beträgt.

2.1.3 Anästhetika

Wirkstoff	Narkose- einleitung (i.p.)	kontinuierliche Narkose (i.v.)
Fentanylcitrat	0,05 mg/kg	0,01 mg/kg/h
Midazolamhydrochlorid	5 mg/kg	1,13 mg/kg/h
Medetomidinhydrochlorid	0,5 mg/kg	0,11 mg/kg/h
Isofluran in medizinischem Sauerstoff	10 Vol.%	0,5-1,5 Vol.%
Pentobarbital-Natrium (Euthanasie)	800 mg/kg (i.v.)	

Tabelle 2.1 Verwendete Anästhetika zur intraperitonealen (i.p.) und kontinuierlichen intravenösen (i.v.) Narkose sowie zur Inhalationsnarkose. Hierfür wurden Fentanylcitrat, Midazolamhydrochlorid und Medetomidinhydrochlorid in Ringer-Lösung verdünnt. Die Inhalationsnarkose wurde mit Isofluran in Sauerstoff durchgeführt. Zur Euthanasie wurde Pentobarbital Natrium intravenös injiziert.

Material und Methoden

2.1.4 Weitere Materialien und Geräte

Materialien und Geräte zur Präparation der Versuchstiere

Die Polyethylenkatheter zur Katheterisierung der Vena jugularis (ID 0,28 mm, OD 0,61 mm) und Intubation der Trachea (ID 0,61 mm, OD 1,22 mm) wurden von Sims Portex Ltd, London, UK und das Nahtmaterial (nicht resorbierbarer, monofiler Polypropylenfaden 6.0, Prolene®) von der Firma Johnson & Johnson Medical GmbH (Ethicon GmbH), Norderstedt, bezogen. Die Präparation der Mäuse erfolgte mit Operationsbesteck von Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, und von Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen und einer faseroptischen Lichtquelle (KL1500 LCD, Schott AG, Mainz) oder einem Operationsmikroskop (Wild/Leica M650, Objektiv 6-40x, Okular 10x/21, Leica Microsystems (Schweiz) GmbH, Heerbrugg, Schweiz). Der Plexiglas-Mikroskopiertisch wurde in der Werkstatt der Vorklinischen Institute, Universität zu Lübeck, gefertigt. Die Beatmungsmaschine (Rodent Ventilator UB 7025, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) und ein Infusionsgerät (Perfusor Secura FT®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen oder SP100IZ Syringe Pump, World Precision Instruments Germany GmbH, Berlin) wurden zur Beatmung und zur kontinuierlichen Infusion während der Versuche verwendet.

Materialien zur Herstellung der Mikropipetten

Die Pipetten wurden mit einem Glaspipettenpuller (Flaming/Brown Micropipette Puller, Model P-97, Sutter Instrument Company, Novato, California, USA) aus Glaskapillaren (GB100F-10, 0,58x1x100 mm) von Science Products GmbH, Hofheim, gezogen. Die Pipetten wurden mit einer Schleifmaschine (Werkstatt der Vorklinischen Institute, Universität zu Lübeck) geschliffen. Die Druckpulsapplikation der Substanzen erfolgte mit einem Druckgenerator (PDES-02D, Scientifica Ltd, Uckfield, UK) aus der im Pipettenhalter (Werkstatt der Vorklinischen Institute, Universität zu Lübeck) befindlichen Pipette.

Material und Methoden

Geräte zur Intravitalmikroskopie

Die Versuche wurden an einem aufrechten Mikroskop (Nikon Eclipse E600, Objektiv Plan Fluor 20x/0,45 und Okular CFI 10x/22, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit motorisiertem Kreuztisch (MultiControl2000 MW, ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnu) oder am Mikroskop Zeiss Axioskop 2 FS (Objektiv Achromplan 40x/0,75 W und 10x/0,30W PH1, Okular W-Pl 10x/23, Carl Zeiss Optronics GmbH, Oberkochen) durchgeführt. Alle Bilder wurden mit einer Kamera (Model 77CE-Field und Model XC-77CE, PCO Computer Optics GmbH, Kelheim) aufgezeichnet, auf einem Monitor abgebildet (Trinitron, Sony Europe Limited, Berlin) und mit einem Videorecorder (Panasonic Video Cassette Recorder AG-7350 oder AG-5700, Panasonic Deutschland, Hamburg) auf Videokassetten (S-VHS 240 min, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) aufgezeichnet. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde mittels Silikongummi-Heizfolie (Artikelnummer 14800, Telemeter Electronic GmbH, Donauwörth) konstant gehalten. Hierbei wurde die Temperatur zwischen Heizfolie und Maus mit einem Thermometer (Votcraft® 300K Thermometer mit K-Typ Temperaturfühler, Conrad Elektronik SE, Wernberg-Köblitz) überwacht. Die Krebs-Pufferlösung wurde durch ein Wasserbad mit Thermostat (Haake C10 und Haake FE, Thermo Electron GmbH; Karlsruhe) erwärmt. Eine Rollerpumpe (Ismatec Vario Pumpsystem von IDEX Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld) ermöglichte die Zumischung von pharmakologischen Substanzen zur Krebs-Pufferlösung.

Materialien und Geräte für die telemetrische Messung der Hämodynamik

Während der Operation wurde das Auskühlen der Tiere mittels einer Wärmeplatte, die durch ein Wärmebad (Haake 6P, Thermo Electron GmbH; Karlsruhe) mit Thermostat (Julabo P, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) temperiert wurde, verhindert. Der Druckabnehmer (Model PhysioTel, PA-C10), die Empfänger-Plattform (PhysioTel™ Receiver Model RPC-1) und die Software (Dataquest A.R.T., Version 4.20) wurden von Data Science International, St. Paul, Minnesota, USA bezogen.

2.2 Intravitalmikroskopie

2.2.1 Versuchsaufbau

Apparativer Versuchsaufbau

Das Mikroskop Nikon Eclipse E600 war mit einem motorisierten Kreuztisch ausgestattet, der die Beobachtung und Wiederfindung unterschiedlicher Gefäße erleichterte. Die Versuche, bei denen eine Pipette zur Stimulation verwendet wurde, wurden am binokularen Mikroskop Zeiss Axioskop 2 FS durchgeführt, bei dem das Mikroskop über dem Präparat verschoben wird. Dies ermöglichte die Platzierung einer Pipette mit unveränderlicher Position. Durch eine kurze (100-500 ms) Druckerhöhung (1,4 bar) konnten Substanzen strikt lokal an die Arteriole appliziert werden.

Superfusion des Cremastermuskels

Zur Superfusion des Cremastermuskels befand sich die Krebs-Pufferlösung in einem Vorratsgefäß und floss von diesem aus kontinuierlich in einen temperierbaren Glaskolben. Der Wasserspiegel im Glaskolben entsprach dem Wasserspiegel im Ausgleichsrohr des Vorratsgefäßes, über das die abgeflossene Krebs-Pufferlösung mit Umgebungsluft ersetzt wurde (**Abbildung 2.1**). Im doppelwandigen Glaskolben wurde die Lösung auf 36°C erwärmt und mithilfe einer Glasfritte mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ begast. Dadurch wurde ein pCO₂ von ca. 40 mmHg und ein pH von 7,3-7,4 eingestellt. Aus dem Glaskolben floss die Krebs-Pufferlösung durch einen Schlangenkühler, der die Temperatur der Pufferlösung bis zum Erreichen des Cremastermuskels auf 36°C hielt. Sowohl Glaskolben als auch Schlangenkühler wurden über ein Wasserbad mit Pumpensystem erwärmt. Über eine Rollenklemme am Schlauch konnte die Flussrate der Krebs-Pufferlösung eingestellt werden und betrug bei 8 ml/min. Über zwei Nebenzuläufe, die durch eine Rollerpumpe gespeist wurden, konnten die zu untersuchenden Substanzen im Verhältnis 1:100 der Krebs-Pufferlösung zugeführt werden, sodass dann der gesamte Muskel von der Substanz überströmt wurde.

Material und Methoden

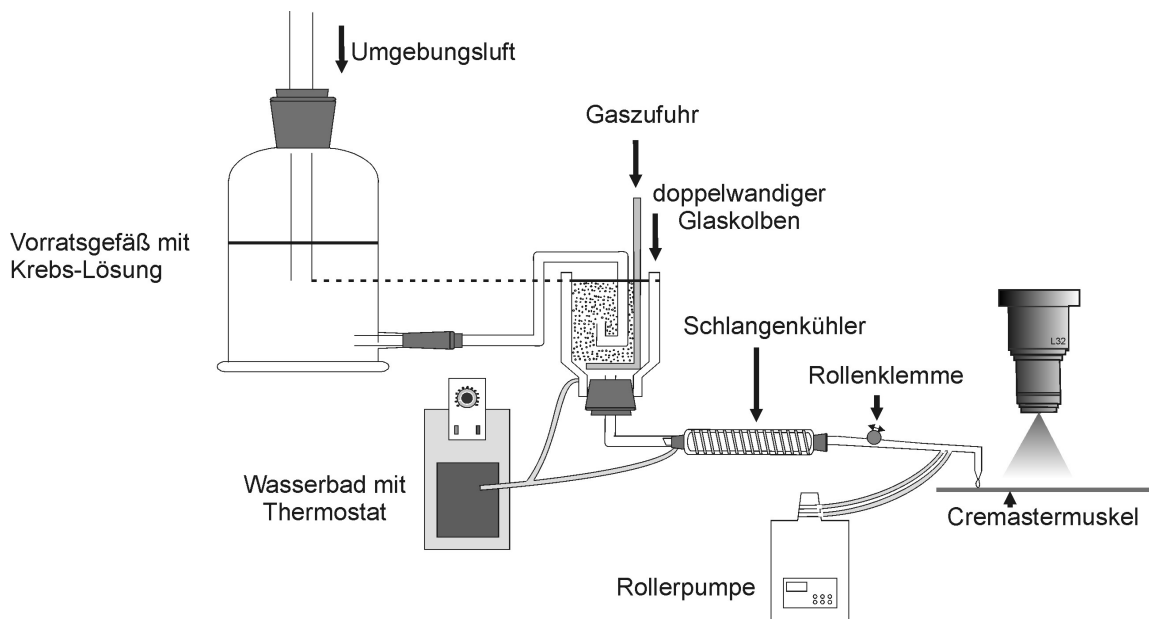


Abbildung 2.1 Superfusionssystem. Die im Vorratsgefäß befindliche Krebs-Pufferlösung floss in einen doppelwandigen Glaskolben, in dem die Lösung auf 36°C erwärmt wurde. Hier erfolgte zudem die Gaszufuhr zur Einstellung des pH (7,3-7,4). Über eine Rollenklemme wurde das Flussvolumen eingestellt. Mittels einer Rollerpumpe konnten der Krebs-Pufferlösung Substanzen zugeführt werden.

2.2.2 Präparation der Versuchstiere

Narkose und Katheterisierung der Vena jugularis

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Verabreichung von Fentanylcitrat, Midazolamhydrochlorid und Medetomidinhydrochlorid in Ringer-Lösung narkotisiert. 10-15 Minuten nach Injektion der Narkose befanden sich die Tiere im Toleranzstadium. Daraufhin wurden die Mäuse gewogen und an den Operationszugängen, Hals und rechter Leisten- und Genitalbereich, rasiert. Am Hals wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt in der Medianlinie unterhalb des Unterkiefers bis oberhalb des Sternums durchgeführt und die rechte Vena jugularis zur Katheterisierung freigelegt. Drei Baumwollfäden wurden unter der Vene durchgeführt, von diesen wurde der craniale Faden verknotet und diente zusammen mit dem caudalen Faden zum Aufspannen des Gefäßes. Daraufhin wurde die Vene mithilfe einer Gefäßschere unter einem Operationsmikroskop quer eingeschnitten und ein mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllte Polyethylenkatheter eingeführt (**Abbildung**

Material und Methoden

2.2). Hierbei erleichterte eine gebogene Kanüle das Offenhalten des Gefäßeschnittes und das Einführen des Katheters. Nach leichtem Anziehen des Knotens des mittleren Fadens und Lockerung des caudalen Haltefadens konnte der Katheter ca. 0,5 cm vorgeschoben und die korrekte Lage durch Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung und Blutaspiration kontrolliert werden. Die drei Fäden wurden daraufhin verknotet und der Katheter fixiert. Die Narkosetiefe wurde während des Versuches durch Testen des Zwischenzehenreflexes überprüft und die Narkotikagabe angepasst.

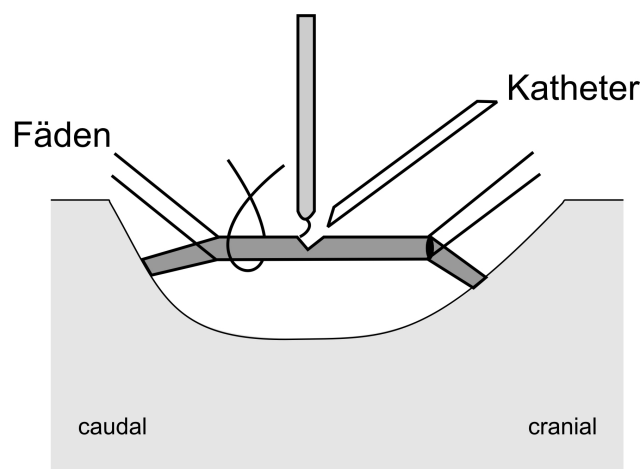


Abbildung 2.2 Katheterisierung von Venen und Arterien am Hals. Der Blutfluss wurde durch Anziehen des Fadens im caudalen Gefäßbereich unterbunden, während im cranialen Gefäßanteil das Gefäß mit dem Faden verschlossen wurde. Nach dem Einschneiden des Gefäßes wurde eine gebogene Kanüle zum Aufhalten benutzt, was das Einführen des Katheters erleichterte.

Intubation der Versuchstiere

Über den gleichen Hautschnitt am Hals der Maus wurde die Trachea freigelegt und mit zwei Baumwollfäden angeschlungen. Die Trachea wurde daraufhin zwischen zwei Knorpelspangen quer eingeschnitten und ein ca. 1 cm langer Polyethylenschlauch eingeführt, der mit zwei Fäden fixiert wurde. Der Tubus erleichterte die Spontanatmung des Tieres. Nach Umlagerung auf das Mikroskop wurde die Maus mit einer Atemfrequenz von 155-165/min mit Raumluft beatmet. Der Beatmungsdruck wurde mithilfe einer Wassersäule auf Werte zwischen 3-5 cmH₂O eingestellt.

Material und Methoden

Präparation des Cremastermuskels

Nach Abschluss der Halspräparation wurde die Maus rücklings auf einen Plexiglastisch gelagert und die Körpertemperatur mit einer Heizfolie bei ca. 37°C konstant gehalten. Des Weiteren ermöglichte der Mikroskopiertisch das Ausbreiten und Aufspannen des Cremastermuskels über ein Deckglas, was ihn der Intravitalmikroskopie zugänglich machte. Der Hodensack wurde mit einem Schnitt von der Schwanzwurzel bis in die rechte Leistenregion eröffnet. Ab diesem Moment wurde der Cremastermuskel mit warmer (34°C) Krebs-Pufferlösung überströmt. Der rechte Hoden und Nebenhoden wurde exponiert und der caudale Pol des Cremastermuskels erkennbar und an diesem ein Faden fixiert. Durch Aufspannen des Muskels konnte das anliegende Bindegewebe entfernt werden. Daraufhin wurde der Muskelschlauch auf das Deckglas gelegt und mithilfe des caudalen Fadens am Silikonring befestigt. Der Muskel wurde in der vorderen Medianlinie vom caudalen Pol aus eröffnet und seine Ränder durch 6-8 weitere monofile Polypropylenfäden am Silikonring fixiert, sodass der Muskel ausgebreitet auf dem Deckglas zu liegen kam (**Abbildung 2.3**). Hoden und Nebenhoden wurden vom Cremastermuskel getrennt und in das Abdomen zurückverlagert.

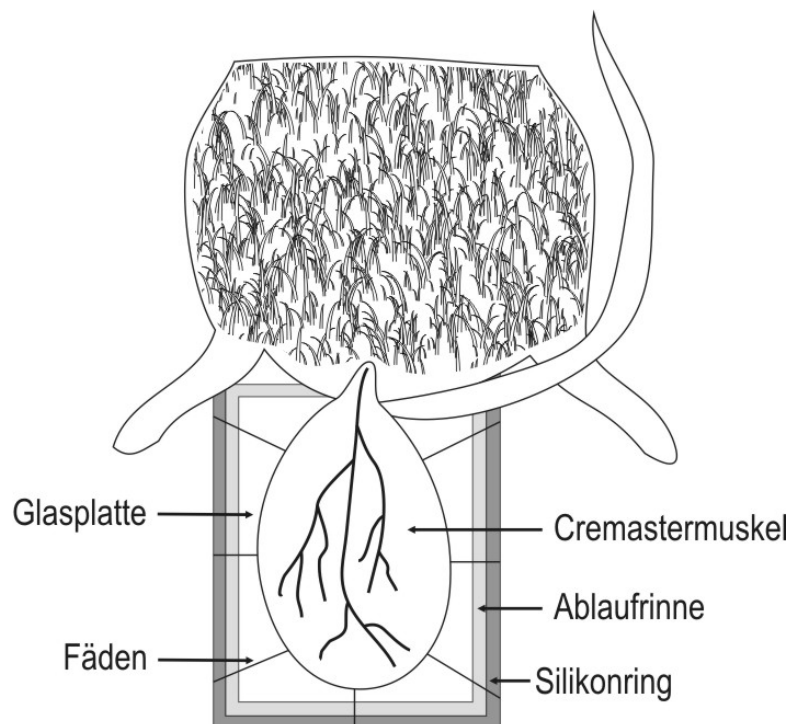


Abbildung 2.3 Präparation des Cremastermuskels. Der Cremastermuskel der Maus wurde über einem Deckgläschen aufgespannt, um die Intravitalmikroskopie zu ermöglichen. Fäden dienen der Fixierung an einem Silikonring. Die superfundierte Krebs-Pufferlösung wurde über eine Ablaufrinne in einen Auffangbehälter abgeleitet.

2.2.3 Versuchsablauf

In Versuchen, bei denen der Cremastermuskel mit aufsteigenden Konzentrationen einer Substanz superfundiert wurde, wurden jeweils 6-10 Arteriolen mit Durchmessern von 5-50 μm untersucht. Dabei wurden gut tonisierte Gefäße an prominenten Stellen (Gefäßabgänge, Venen, Nerven, Muskelfasern) ausgewählt. Vor jeder Applikation einer pharmakologischen Substanz wurde eine Videosequenz aller Gefäße aufgezeichnet, um den Ruhedurchmesser zu bestimmen. Während die Substanzen über eine Rollerpumpe der Krebs-Pufferlösung zugeführt wurden, wurden alle Gefäße nacheinander jeweils zweimal für ca. 3 Sekunden aufgenommen. Vor der Applikation einer höheren Konzentration der pharmakologischen Substanz wurde der Cremastermuskel mindestens zwei Minuten mit Krebs-Pufferlösung superfundiert, sodass die Gefäße zu ihrem Ruhedurchmesser zurückkehren konnten. Das Zuführen einer pharmakologischen Substanz in aufsteigenden Konzentrationen wurde im zweiten Versuchsabschnitt in Anwesenheit von $\text{N}\omega$ -Nitro-L-Arginin (30 $\mu\text{mol/L}$) und Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$), zur Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase, wiederholt. Am Ende des Versuches wurden die Vasodilatoren Acetylcholin, Adenosin und Natriumnitroprussid in supramaximaler Konzentration (jeweils 3 $\mu\text{mol/L}$) superfundiert, um den maximal möglichen Durchmesser zu bestimmen.

In den Versuchen, in denen eine Pipette zur Stimulation verwendet wurde, wurde die Mikropipette mit Acetylcholin (0,1 mmol/L) befüllt und an ein gut tonisiertes Gefäß positioniert. Im ersten Versuchsabschnitt wurde der Cremastermuskel mit Ringer-Lösung superfundiert und eine Videosequenz des Gefäßes jeweils 10 Sekunden vor und bis 1 Minute nach Druckpulsapplikation von Acetylcholin kontinuierlich aufgezeichnet. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde der Ringer-Lösung SKA-31 zugeführt und die Druckpulsapplikation von Acetylcholin wiederholt. Am Ende des Versuches wurden Acetylcholin, Adenosin und Natriumnitroprussid in supramaximaler Konzentration (jeweils 3 $\mu\text{mol/L}$) superfundiert, um den maximal möglichen Durchmesser zu bestimmen.

Nach Versuchsende wurde die Maus durch eine intravenöse Injektion von 800mg/kg Pentobarbital-Natrium euthanasiert.

2.2.4 Versuchsprotokolle

Wirkung von SKA-31 in der Mikrozirkulation

In diesen Versuchen wurde der Effekt aufsteigender SKA-31 Konzentrationen auf die Gefäße untersucht (1 bis 30 $\mu\text{mol/L}$). Da SKA-31 in Cremophor gelöst wurde, wurde Cremophor in der verwendeten Konzentration ebenfalls superfundiert. Im zweiten Versuchsteil wurde dieses Protokoll in Anwesenheit von N ω -Nitro-L-Arginin (L-NA) (30 $\mu\text{mol/L}$) und Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$) wiederholt. Außerdem wurden die Vasodilatoren ACh (10 $\mu\text{mol/L}$), Ado (3 und 10 $\mu\text{mol/L}$) oder SNP (10 $\mu\text{mol/L}$) zum Vergleich untersucht.

Kombination von SKA-31 und Acetylcholin

In diesem Protokoll wurde untersucht, ob der Kaliumkanalaktivator SKA-31 die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation verstärkt. Dafür wurden bis zu 10 Gefäße pro Maus betrachtet und die Vasodilatation bei aufsteigenden Acetylcholin-Konzentrationen (0,3-10 $\mu\text{mol/L}$) aufgezeichnet. Danach wurde zeitgleich mit Acetylcholin jeweils SKA-31 (3 oder 30 $\mu\text{mol/L}$) der Ringer-Lösung zugeführt. In einer weiteren Versuchsserie wurde Acetylcholin mittels Mikropipette lokal appliziert. Danach wurde die lokale Applikation von ACh während Superfusion von SKA-31 (3, 10 und 30 $\mu\text{mol/L}$) wiederholt. Während des gesamten Versuches war N ω -Nitro-L-Arginin (30 $\mu\text{mol/L}$) und Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$) anwesend.

2.3 Telemetrische Messung der Hämodynamik

2.3.1 Versuchsaufbau

Der den Mäusen implantierte Druckabnehmer konnte mit einem Magneten angeschaltet werden, sodass die Datensendung an die Empfänger-Plattform, welche sich unterhalb des Käfigs befand, initiiert wurde. Mit der entsprechenden kommerziell verfügbaren Software (Datascience) wurden die Daten aufgezeichnet (500 Hz) und gespeichert. Aus den Blutdruckoszillationen wurde die Herzfrequenz errechnet.

2.3.2 Präparation der Versuchstiere

Anästhesie

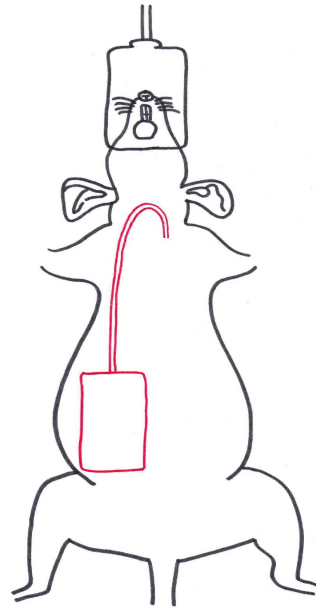
Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Glasglocke (4x6 cm) gehalten, in die ein Gemisch aus Isofluran (10%) und Sauerstoff einströmte. Nach 2-3 Minuten befand sich das Tier im Toleranzstadium. Die weitere Narkose wurde mit Isofluran (2%) durchgeführt. Hierbei wurde eine Maske verwendet, die die Schnauze des Tieres bedeckte. (**Abbildung 2.4**) Zur Analgesie wurde der Maus vor Operationsbeginn 0,07 mg/kg Fentanyl injiziert.

Katheterisierung der Arteria carotis communis und Implantation des Transmitters

Während der Präparation wurde das Auskühlen der Maus mittels einer Wärmeplatte, die mit einem Wasserbad temperiert wurde, vermindert. Am rasierten Hals, der auf dem Rücken gelagerten Maus, wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianlinie unterhalb des Kiefers bis zum Xiphoid gemacht. Durch Spreizbewegungen mit der Schere wurde über dem rechten Abdomen eine subkutane Tasche geschaffen, in die später der Druckabnehmer positioniert wurde (**Abbildung 2.4**). Danach wurde die linke Arteria carotis communis freipräpariert und mit zwei Fäden, von denen der craniale Faden verknotet wurde, angeschlungen und aufgespannt. Somit wurde der Blutfluss im Gefäß unterbrochen und das Herausfließen von Blut nach Gefäßeröffnung verhindert (**Abbildung 2.2**). Nach Eröffnung des Gefäßes wurde der Katheter mithilfe einer gebogenen Kanüle in die Arterie eingeführt und nach Lösen des caudalen Fadens einen Zentimeter vorgeschoben. Ein dritter Faden diente der Fixierung des Katheters im Gefäß. Daraufhin wurde der Druckabnehmer in die subkutane Tasche eingeführt und der Hautschnitt mit einem Polypropylenfaden vernäht.

Material und Methoden

Abbildung 2.4 Inhalationsnarkose und Lage des Transmitters. Abgebildet ist die Position des Katheters in der linken Halsschlagader der Maus und des Transmitters in der subkutanen Bauchtasche. Über eine Maske wurde die Maus während der Präparation mit Isofluran narkotisiert.



2.3.3 Versuchsprotokolle

Telemetrische Messung der Hämodynamik

Der Blutdruck wurde in acht Wildtypmäusen (C57BL/6), sechs Cx40^{-/-} und sechs Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre Mäusen gemessen. Die Messung wurde ab dem sechsten Tag nach Transmitterimplantation begonnen, um eine Erholung der Tiere von der Implantation zu ermöglichen. Die Versuchsreihe begann mit einer nächtlichen Messung ohne Substanzapplikation. Am Abend wurde die Datenaufzeichnung 30 Minuten vor Injektion gestartet. Zur Injektion wurde die wache Maus aus dem Käfig genommen und SKA-31 intraperitoneal injiziert. Weitere Injektionen der fünf verschiedenen Dosierungen von SKA-31 (1-100 mg/kg gelöst in 150 µl Erdnussöl) und des Lösungsmittels (150 µl Erdnussöl) erfolgte in jedem Tier an den darauffolgenden Abenden, wobei nach 10 und 30 mg/kg jeweils ein Ruhetag eingelegt wurde. Die Euthanasie der Tiere erfolgte mittels Pentobarbital-Natrium.

2.4 Datenverarbeitung

2.4.1 Datenauswertung

Die auf Videoband aufgenommenen Bilder wurden zur Auswertung digitalisiert. Hierfür wurde ein im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck in LabVIEW® 7.0 (I.E.D Institut für Explorative Datenanalyse GmbH, Hamburg) geschriebenes Programm verwendet. Dieses diente auch zum Ausmessen der inneren Gefäßdurchmesser, indem der Abstand zwischen den der Gefäßinnenwand angelegten Balken berechnet wurde. Zur Weiterverarbeitung der ermittelten Größen und zur Berechnung der Statistik wurde die Statistiksoftware Stata® (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) genutzt. Um die Dilatation der Gefäße unabhängig vom Ruhedurchmesser (Kontraktionszustand) zu bestimmen, wurde die Durchmesseränderung auf die maximal mögliche Änderung normalisiert:

$$Dilatation [\%] = \left(\frac{D_{stim} - D_{Ruhe}}{D_{max} - D_{Ruhe}} \right) \cdot 100$$

D_{stim} : Durchmesser nach Stimulation, D_{Ruhe} : Ruhedurchmesser, D_{max} : maximaler Durchmesser

Die Daten der telemetrischen Hämodynamikmessungen wurden aus der Software (Dataquest A.R.T., Version 4.20, Data Science International, St. Paul, Minnesota, USA) exportiert und in Stata® Data Analysis and Statistical Software 8.2. (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) importiert und weiterverarbeitet.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde SigmaPlot® 2001 (Systat Software GmbH, Erkrath) genutzt. Zur Erstellung der Abbildungen wurde das Programm Corel Draw 12 verwendet. Als Textverarbeitungsprogramm diente OpenOffice 3.2.0. (www.openoffice.org). Das Literaturverzeichnis wurde mithilfe von Mendeley Desktop 1.5.2. (www.mendeley.com) erstellt.

Material und Methoden

2.4.2 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Standard error of the mean, Standardfehler) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde zwischen zwei Gruppen mittels gepaarten (zwei Substanzen in einem Genotyp) oder ungepaarten (eine Substanz in zwei Genotypen) Students *t*-Test berechnet. Waren mehr als zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede hin zu untersuchen, wurde eine Varianzanalyse (Analysis of variance; ANOVA) durchgeführt, bei der der α -Wert nach Bonferroni korrigiert wurde.

Zur statistischen Auswertung der Blutdruck- und Herzfrequenzdaten wurde eine eindimensionale ANOVA durchgeführt. Diese Analyse wurde auch genutzt, um Unterschiede zwischen den Genotypen zu testen. Die Normalverteilung wurde durch einen Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) validiert.

P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 SKA-31 induziert $K_{Ca}3.1$ -abhängig eine arterioläre Dilatation

3.1.1 Spezifität von SKA-31

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Spezifität von SKA-31 untersucht. Hierzu wurden aufsteigende Konzentrationen von SKA-31 in $K_{Ca}3.1$ defizienten Mäusen und Wildtypmäusen in der Mikrozirkulation des Cremastermuskels untersucht. Das zunächst verwendete Lösungsmittel Dimethylsulfoxid induzierte eine beträchtliche Gefäßerweiterung von bis zu $49,5\pm 2\%$ des maximalen Durchmessers (je 4 Wildtypmäuse und $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Tiere). Aus diesem Grund wurde Dimethylsulfoxid durch das Lösungsmittel Cremophor ersetzt, wobei mehrere Cremophor-Konzentrationen in der Mikrozirkulation getestet wurden. Im Gegensatz zum Lösungsmittel Dimethylsulfoxid hatte Cremophor nur einen geringen Effekt auf den Kontraktionszustand der Gefäße (**Abb. 3.1 A und B**). Arteriolen von Wildtypmäusen und $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Tieren wiesen den gleichen maximalen arteriolären Durchmesser auf ($K_{Ca}3.1^{-/-}$: $36\pm 1\ \mu\text{m}$, $n=45$; WT: $36\pm 2\ \mu\text{m}$, $n=42$), jedoch war der Ruhetonus der Arteriolen in $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen höher (Verhältnis des Ruhedurchmessers zum maximalen Durchmesser: $0,46\pm 0,02$ ($K_{Ca}3.1^{-/-}$) vs. $0,53\pm 0,03$ (WT); $P<0,03$), d.h. die Arteriolen in $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen wiesen einen geringeren Durchmesser auf. Der erhöhte Ruhetonus von Arteriolen in $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen wurde bereits beschrieben (95). In Wildtypmäusen induzierte SKA-31 in Anwesenheit von NO und PG eine konzentrationsabhängige Gefäßerweiterung (**Abb. 3.1 A**; 42 Arteriolen in 5 Tieren). Die Hemmung der NO- und PG-Synthese führte in Wildtypmäusen zu einer signifikanten Vasokonstriktion (von $20\pm 2\ \mu\text{m}$ auf $16\pm 2\ \mu\text{m}$). Die Gefäßdilatation durch SKA-31 blieb aber trotz Hemmung der NO- und PG-Synthese unbeeinträchtigt (**Abb. 3.1 B**). In $K_{Ca}3.1$ -defizienten Tieren induzierte SKA-31 weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen eine Dilatation (**Abb. 3.1 A und B**; 45 Arteriolen in 5 Tieren). Die Vasodilatoren Adenosin ($3\ \mu\text{mol/L}$: $27\pm 5\%$; $10\ \mu\text{mol/L}$: $74\pm 4\%$) und Natriumnitroprussid ($10\ \mu\text{mol/L}$: $39\pm 3\%$) induzierten in Arteriolen von $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Mäusen eine Dilatation, sodass ein genereller Verlust der Dilatationsfähigkeit auszuschließen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass SKA-31 eine Dilatation induziert, die vom Vorhandensein des $K_{Ca}3.1$ Kanals abhängig und unabhängig von NO und PG ist (**Tabelle 3.1**).

Ergebnisse

Behandlung	SKA-31 [$\mu\text{mol/L}$]	Wildtypmaus		$K_{Ca3.1}^{-/-}$	
		Gefäßweite [μm] vor vs. nach SKA-31		Gefäßweite [μm] vor vs. nach SKA-31	
Anwesenheit von NO und PG	1	18,1 \pm 1,5 vs. 19,3 \pm 1,5		16,5 \pm 1,0 vs. 16,8 \pm 1,0	
	3	19,0 \pm 1,7 vs. 21,9 \pm 1,8		18,6 \pm 1,2 vs. 17,4 \pm 1,2	
	10	19,5 \pm 1,9 vs. 23,5 \pm 2,1		16,3 \pm 1,0 vs. 17,8 \pm 1,1	
	30	19,8 \pm 2,0 vs. 26,1 \pm 2,1		17,2 \pm 1,1 vs. 17,4 \pm 1,1	
Abwesenheit von NO und PG	1	16,7 \pm 1,6 vs. 18,1 \pm 1,7		13,9 \pm 1,0 vs. 12,7 \pm 1,0	
	3	16,3 \pm 1,6 vs. 19,2 \pm 1,7		13,2 \pm 1,1 vs. 13,7 \pm 1,0	
	10	17,0 \pm 1,8 vs. 21,9 \pm 1,8		15,4 \pm 1,1 vs. 16,3 \pm 1,6	
	30	15,6 \pm 1,5 vs. 25,6 \pm 2,0		13,9 \pm 1,3 vs. 14,3 \pm 1,2	

Tabelle 3.1 Gefäßdurchmesser vor und nach Superfusion von SKA-31. Gefäßdurchmesser in $K_{Ca3.1}$ -defizienten Mäusen und Wildtypmäusen in Anwesenheit und Abwesenheit von NO und PG vor und nach SKA-31 Superfusion in aufsteigenden Konzentrationen.

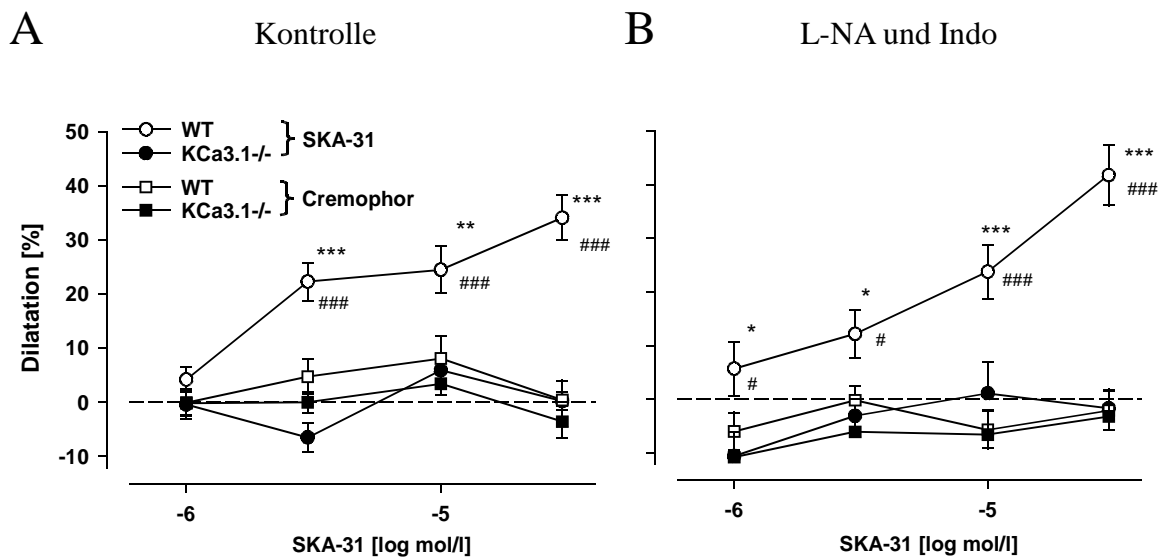


Abbildung 3.1 Dilatation nach SKA-31 in $K_{Ca3.1}^{-/-}$ und Wildtypmäusen. Dargestellt ist die prozentuale Dilatation in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen von SKA-31 (1-30 $\mu\text{mol/L}$) und vom Lösungsmittel Cremophor. (A) in Anwesenheit von NO und PG und (B) in Abwesenheit von NO und PG durch Superfusion von N ω -Nitro-L-Arginin (L-NA, 30 $\mu\text{mol/L}$) und Indometacin (Indo, 3 $\mu\text{mol/L}$). *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ vs. Cremophor und #: $P < 0,05$, ###: $P < 0,001$ vs. $K_{Ca3.1}^{-/-}$.

Ergebnisse

3.1.2 Wirkung von SKA-31 bei Fehlen von Connexin40 im Endothel

Um die Rolle von Connexin40 bei der durch SKA-31 induzierten Gefäßerweiterung zu eruieren, wurden aufsteigende Konzentrationen von SKA-31 über den Cremastermuskel in endothelspezifisch Connexin40 defizienten Mäusen (Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre) und Kontrolltieren (Cx40^{fl/fl}) superfundiert. Hierbei löste das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid eine Gefäßerweiterung aus (5 Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre, 4 Cx40^{fl/fl}). Daher wurde das Lösungsmittel Cremophor verwendet, welches keinen wesentlichen Effekt auf den Gefäßdurchmesser hatte. Der Ruhedurchmesser der Arteriolen in Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre und Cx40^{fl/fl} war gleich (Ruhetonus: 16±1 vs. 17±1 µm; n=45 Gefäße in 4 Cx40^{fl/fl} und n=36 Gefäße in 5 Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre). Ebenso war der maximale arterioläre Durchmesser in beiden Genotypen identisch (maximaler Durchmesser: 34±1 vs. 32±1 µm).

In Anwesenheit von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen induzierte SKA-31 in Kontrolltieren (Cx40^{fl/fl}) eine konzentrationsabhängige Vasodilatation (**Abb. 3.2 A**). Die Hemmung der Stickstoffmonoxid- und Prostaglandin-Synthese führte zur Konstriktion der Arteriolen von Cx40^{fl/fl} Tieren (von 16±1 auf 12±1 µm, $P<0,05$). Dennoch löste SKA-31 eine Vasodilatation aus, welche im Vergleich zur Vasodilatation bei intakter NO- und PG-Synthese unverändert war (**Tabelle 3.2**). In endothelspezifisch Connexin40 defizienten Mäusen (36 Arteriolen in 4 Tieren) induzierte SKA-31 in Anwesenheit von NO und PGs eine Vasodilatation, die der in Cx40^{fl/fl} entsprach (**Abb. 3.2 A**). Bei der Konzentration von 3 µmol/L SKA-31 war die Gefäßerweiterung sogar stärker ausgeprägt. Nach Hemmung der Stickstoffmonoxid- und Prostaglandin-Synthese blieb auch in diesem Genotyp die Vasodilatation durch SKA-31 unverändert (**Abb. 3.2 B**). Dies zeigt erneut, dass weder Stickstoffmonoxid oder Prostaglandine an der durch SKA-31 induzierten Vasodilatation beteiligt sind. Demnach ist die Vasodilatation wahrscheinlich durch EDH mediiert. Diese EDH-abhängige Vasodilatation ist auch in Abwesenheit von Connexin40 im Endothel intakt.

Ergebnisse

Behandlung	SKA-31 [$\mu\text{mol/L}$]	Cx40 ^{fl/fl}	Cx40 ^{fl/fl} :TIE2-Cre
		Gefäßweite [μm] vor vs. nach SKA-31	
Anwesenheit von NO und PG	1	16,9 \pm 0,8 vs. 18,4 \pm 0,8	15,5 \pm 1,3 vs. 17,0 \pm 1,3
	3	17,7 \pm 0,9 vs. 19,2 \pm 1,0	17,1 \pm 1,4 vs. 20,5 \pm 1,6
	10	16,0 \pm 0,9 vs. 22,6 \pm 1,2	16,9 \pm 1,4 vs. 22,0 \pm 1,6
	30	16,2 \pm 0,9 vs. 22,1 \pm 1,1	19,6 \pm 1,7 vs. 24,4 \pm 1,6
Abwesenheit von NO und PG	1	10,5 \pm 0,8 vs. 14,0 \pm 1,0	12,6 \pm 1,5 vs. 15,5 \pm 1,4
	3	10,5 \pm 1,0 vs. 15,4 \pm 1,0	13,5 \pm 1,1 vs. 16,8 \pm 1,5
	10	11,0 \pm 0,9 vs. 18,2 \pm 1,3	15,3 \pm 1,3 vs. 20,4 \pm 1,5
	30	11,2 \pm 0,9 vs. 21,5 \pm 1,3	16,1 \pm 1,6 vs. 22,5 \pm 1,6

Tabelle 3.2 Gefäßdurchmesser nach Superfusion von SKA-31. Gefäßdurchmesser in Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre und Cx40^{fl/fl} Mäusen in Anwesenheit und Abwesenheit von NO und PG vor und nach SKA-31 Superfusion in aufsteigenden Konzentrationen.

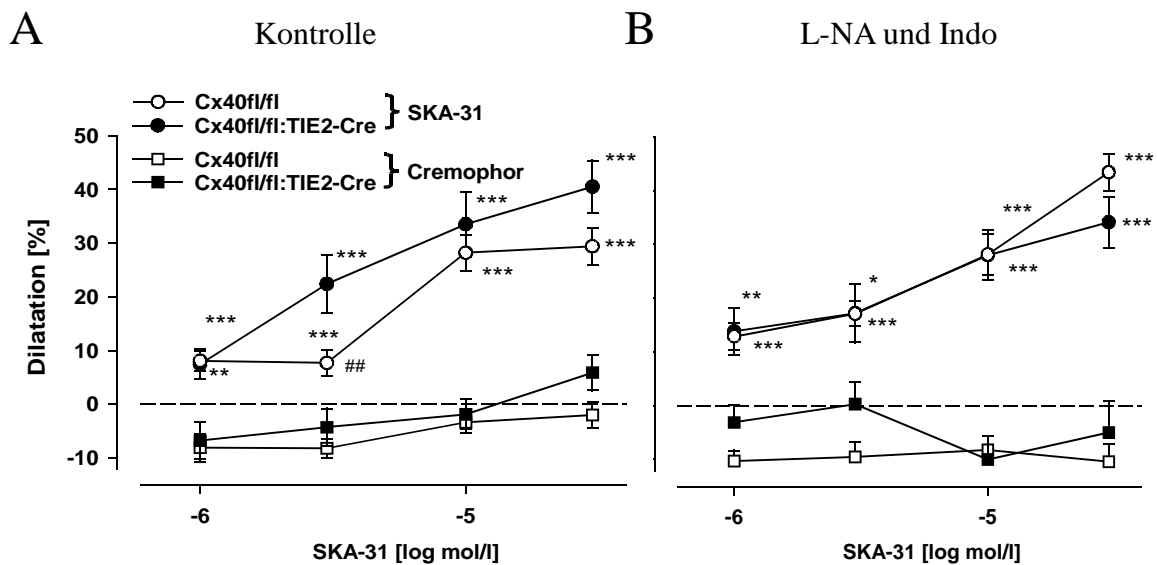


Abbildung 3.2 Dilatation nach SKA-31 in Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre und Cx40^{fl/fl}. Dargestellt ist die prozentuale Dilatation in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen von SKA-31 (1-30 $\mu\text{mol/L}$) und vom Lösungsmittel Cremophor in Cx40^{fl/fl} und Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre Mäusen (A) in Anwesenheit von NO und PG und (B) in Abwesenheit von NO und PG durch Superfusion von N ω -Nitro-L-Arginin (L-NA, 30 $\mu\text{mol/L}$) und Indometacin (Indo, 3 $\mu\text{mol/L}$). *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ vs. Cremophor und ##: $P < 0,01$ vs. Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre.

3.1.3 Wirkung von SKA-31 auf die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation

Einfluss von SKA-31 auf die Amplitude der Acetylcholin-induzierten Dilatation

Um der Frage nachzugehen, ob SKA-31 die Vasodilatation durch Acetylcholin modifiziert, wurden aufsteigende Acetylcholin-Konzentrationen in Anwesenheit oder Abwesenheit von SKA-31 appliziert. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der Pufferlösung $\text{N}\omega$ -Nitro-L-Arginin und Indometacin zugeführt, um lediglich EDH-abhängige Mechanismen darzustellen.

Die alleinige Superfusion von 3 $\mu\text{mol/L}$ SKA-31 induzierte eine Vasodilatation von $8,4 \pm 3,2 \%$. Die gleichzeitige Superfusion von ACh und SKA-31 (3 $\mu\text{mol/L}$, 57 Arteriolen in 7 C57BL/6) führte bei Acetylcholin-Konzentrationen von 0,1 und 0,3 $\mu\text{mol/L}$ zu einem additiven Effekt. Dabei wurde der Gefäßdurchmesser durch SKA-31 bei 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ACh von $18,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$ auf $21,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ und bei 0,3 $\mu\text{mol/L}$ ACh von $19,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$ auf $22,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$ vergrößert ($P < 0,01$; ACh vs. ACh mit SKA-31). Bei höheren Acetylcholin-Konzentrationen war die Vasodilatation durch Acetylcholin in Anwesenheit von SKA-31 nicht verändert (**Abb. 3.3 A**). Eine höhere Konzentration von SKA-31 (30 $\mu\text{mol/L}$; 24 Arteriolen in 3 C57BL/6) induzierte eine Vasodilatation von $39,4 \pm 3,7 \%$. Das Lösungsmittel DMSO, in welchem SKA-31 gelöst war, induzierte allein eine Vasodilatation von $16,3 \pm 3,7 \%$. Die Superfusion von SKA-31 (30 $\mu\text{mol/L}$) führte bei niedrigen Acetylcholin Konzentrationen zu einem additiven Effekt. Dadurch wurden die Gefäßerweiterungen durch Acetylcholin von $17,1 \pm 2,0 \mu\text{m}$, $22,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $21,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$ und $24,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$ (0,03 bis 1 $\mu\text{mol/L}$ ACh) durch SKA-31 auf jeweils $22,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$, $22,5 \pm 2,1 \mu\text{m}$, $23,4 \pm 2,1 \mu\text{m}$ und $26,2 \pm 1,9 \mu\text{m}$ vergrößert ($P < 0,01$ ACh vs. ACh mit SKA-31). 3 und 10 $\mu\text{mol/L}$ ACh lösten Gefäßweiten von jeweils $24,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$ und $27,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$ aus. Diese wurden durch SKA-31 auf je $27,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$ und $25,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$ erhöht ($P < 0,05$, ACh vs. ACh mit SKA-31). Somit verstärkte SKA-31 die Vasodilatation bei den zwei höchsten ACh-Konzentrationen zwar signifikant, die Vasodilatation war allerdings geringer ausgeprägt als der errechnete additive Wert der Vasodilatationen von SKA-31 und Acetylcholin ($P < 0,01$ ACh und SKA-31 vs. errechneter additiver Effekt) (**Abb. 3.3 B**).

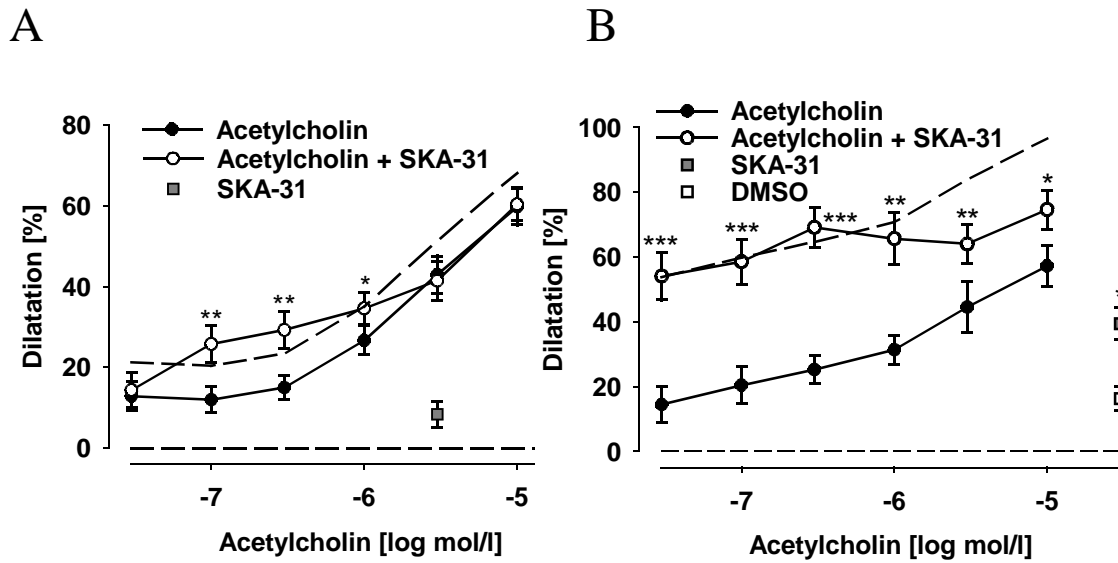


Abbildung 3.3 Konzentrationsabhängige Dilatation nach Acetylcholin ohne und mit SKA-31. Es wurden zwei Konzentrationen von SKA-31 untersucht (A) 3 µmol/L und (B) 30 µmol/L. Dargestellt ist die Dilatation nach Acetylcholin und SKA-31 alleine sowie die Dilatation bei simultaner Gabe. Die gestrichelte Linie ist die errechnete Dilatation der Acetylcholin-induzierte Vasodilatation und der alleinigen SKA-31 Superfusion. Während des gesamten Versuches wurden N ω -Nitro-L-Arginin (30 µmol/L) und Indometacin (3 µmol/L) superfundiert. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ Acetylcholin vs. Acetylcholin und SKA-31.

Ergebnisse

Effekt von SKA-31 auf die Dauer der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation

In dieser Versuchsserie galt es zu untersuchen, ob SKA-31 einen Einfluss auf die Dauer der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation hat. Hierfür wurde eine Arteriole mittels einer Mikropipette lokal in Anwesenheit oder Abwesenheit von SKA-31 mit Acetylcholin stimuliert. Während des gesamten Versuches wurde N ω -Nitro-L-Arginin (30 μ mol/L) und Indometacin (3 μ mol/L) superfundiert. Der Ruhedurchmesser der Gefäße vor Acetylcholin-Applikation betrug $12,4 \pm 0,8 \mu$ m. Nach Stimulation kam es zu einer sofort einsetzenden Dilatation, die nach 5-6 Sekunden ein Maximum von $19,1 \pm 0,9 \mu$ m ($52,6 \pm 3,0 \%$, $P < 0,001$ vs. Ausgangsdurchmesser) erreichte (**Tabelle 3.3**). In Anwesenheit von SKA-31, welches kontinuierlich superfundiert wurde (3 μ mol/L; 13 Stimulationen in 4 Tieren sowie 10 μ mol/L; 18 Stimulationen in 3 Tieren), wurde die maximale Gefäßweite fünf Sekunden nach ACh-Stimulation erreicht. Bei einer SKA-31 Konzentration von 30 μ mol/L (15 Stimulationen in 2 Tieren) wurde die maximale Gefäßweite sechs Sekunden nach ACh-Stimulation erreicht (**Abb. 3.4**). In Anwesenheit von SKA-31 erreichten die Gefäße ihren Ausgangsdurchmesser 20 Sekunden nach ACh-Stimulation. Diese Dauer der Dilatation unterschied sich nicht von den Kontrollbeobachtungen. Somit hatte SKA-31 keinen Einfluss auf die Amplitude und die Dauer der Dilatation nach lokaler Acetylcholin-Stimulation.

Lokale Stelle	n	Ruhedurchmesser [μ m]	Max. Durchmesser [μ m]	Dilatation [%]
Acetylcholin	29	$12,4 \pm 0,8$	$19,1 \pm 0,9$	$52,6 \pm 3,0$
+ SKA-31 (3 μ mol/L)	13	$16,8 \pm 1,3$	$21,7 \pm 1,0$	$52,0 \pm 3,9$
+ SKA-31 (10 μ mol/L)	18	$15,6 \pm 1,7$	$21,1 \pm 1,5$	$55,3 \pm 4,7$
+ SKA-31 (30 μ mol/L)	15	$17,6 \pm 2,4$	$21,2 \pm 2,0$	$48,3 \pm 6,8$

Tabelle 3.3 Effekt von SKA-31 auf die Vasodilatation nach lokaler Stimulation mit Acetylcholin. Ruhedurchmesser, maximaler Durchmesser und prozentuale Dilatation nach Druckpulsapplikation von Acetylcholin bei gleichzeitiger Superfusion von SKA-31.

Ergebnisse

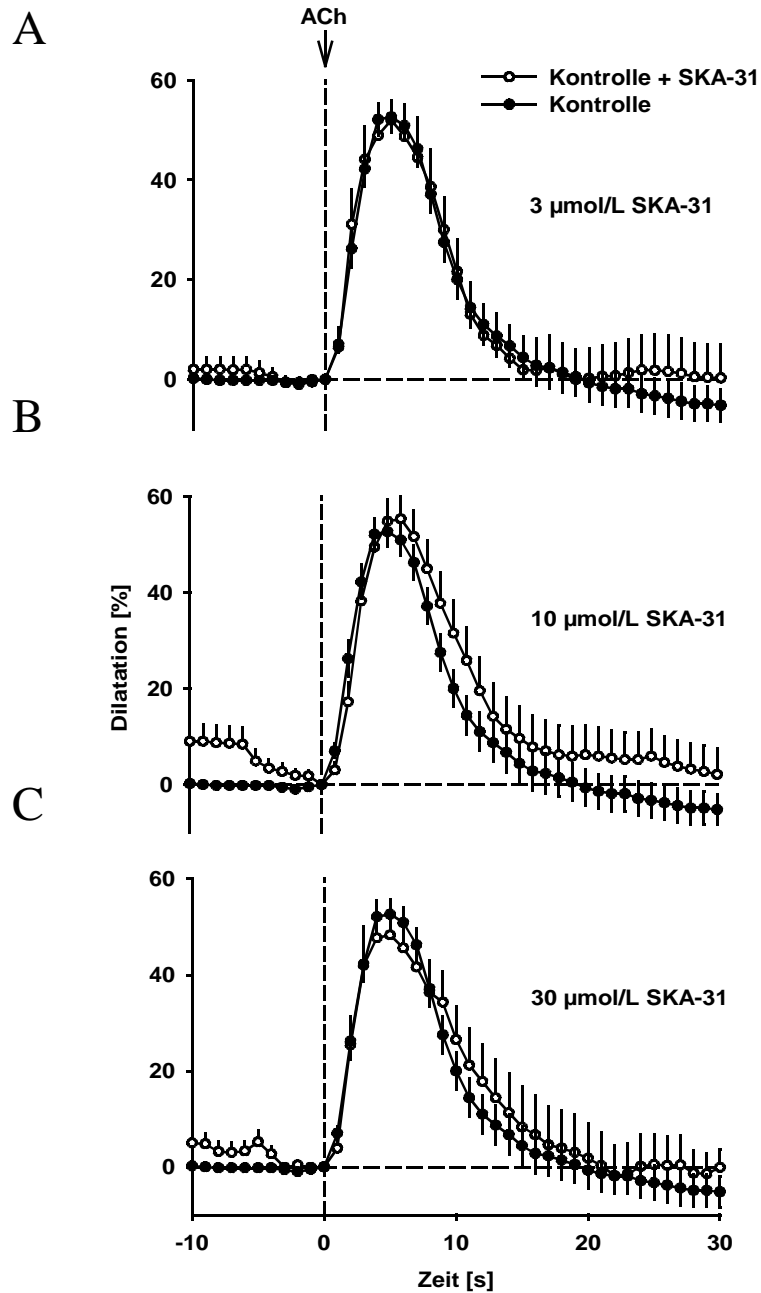


Abbildung 3.4 Effekt von SKA-31 auf die Dilatation nach lokaler Stimulation mit Acetylcholin. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation ohne (Kontrolle) und in Anwesenheit von SKA-31 in verschiedenen Konzentrationen: (A) 3 µmol/L, (B) 10 µmol/L und (C) 30 µmol/L. Während des gesamten Versuches wurden N ω -Nitro-L-Arginin (30 µmol/L) und Indometacin (3 µmol/L) superfundiert.

Ergebnisse

3.2 Effekt von SKA-31 auf die Makrohämodynamik

Die Bestimmung hämodynamischer Parameter wurde in Wildtypmäusen (n=8), endothelzellspezifisch Connexin40-defizienten Tieren (Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre; n=6) sowie global Connexin40-defizienten Mäusen (Cx40^{-/-}, n=6) (Alter: 4-11 Monate) durchgeführt. Wildtypmäuse wiesen einen systolischen Blutdruck (SP) von 128±5,5 mmHg und einen diastolischen Blutdruck (DP) von 96±5,6 mmHg bei einem mittleren arteriellen Druck (MAP) von 110±4,3 mmHg auf. Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre Mäuse unterschieden sich nicht (SP 125±5,7, DP 97±4,4, MAP 109±4,3 mmHg). Im Gegensatz dazu waren global Connexin40 defiziente Tiere mit einem SP von 170,3±5,3 mmHg und einen DP von 123±2,9 mmHg (MAP 146±3,8 mmHg) hypertensiv. In den Genotypen war die Herzfrequenz ähnlich (WT: 601±11/min, Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre: 600±23/min, Cx40^{-/-}: 612±16/min).

3.2.1 Wirkung von SKA-31 auf den arteriellen Mitteldruck

Die intraperitoneale Injektion des Lösungsmittels Erdnussöl (150 µl) oder 1 bzw. 3 mg/kg SKA-31 änderte den mittleren arteriellen Druck in keiner der drei Genotypen (**Abb. 3.5**). Die Dosis von 10 mg/kg SKA-31 senkte den arteriellen Mitteldruck in hypertensiven Cx40^{-/-} von 145,3±6,0 mmHg auf 132,6±6,0 mmHg nach 50 Minuten ($P<0,05$). In Wildtypmäusen und endothelzellspezifisch Connexin40-defizienten Tieren führte diese Dosis zu keiner Reduktion des arteriellen Mitteldruckes. 30 mg/kg SKA-31 senkte den Blutdruck in allen drei Genotypen beginnend nach 20 Minuten. Der Blutdruckabfall war in allen Genotypen ähnlich und betrug maximal 21±9 mmHg (WT), 13±4 mmHg (Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre) und 30±11 mmHg (Cx40^{-/-}) (**Abb. 3.6** und **3.7**). Bei einer Injektion von 100 mg/kg SKA-31 fiel der Mitteldruck in allen Genotypen signifikant ab und erreichte ein Minimum ca. 50 Min. nach Injektion (maximaler Abfall WT: 42±8 mmHg, Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre: 32±8 mmHg, Cx40^{-/-}: 32±10 mmHg). Nur in Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre war der Blutdruckabfall nach 100mg/kg signifikant stärker ausgeprägt als nach 30 mg/kg SKA-31 ($P<0,05$ vs. 30 mg/kg) (**Abb. 3.7**). In allen Tieren erreichte der Blutdruck den Ausgangswert ca. 80 (30 mg/kg) bzw. 200 Minuten (100 mg/kg) nach SKA-31 Injektion. Somit senkt SKA-31 den Blutdruck in normotensiven sowie in hypertensiven Mäusen unabhängig von Connexin40.

Ergebnisse

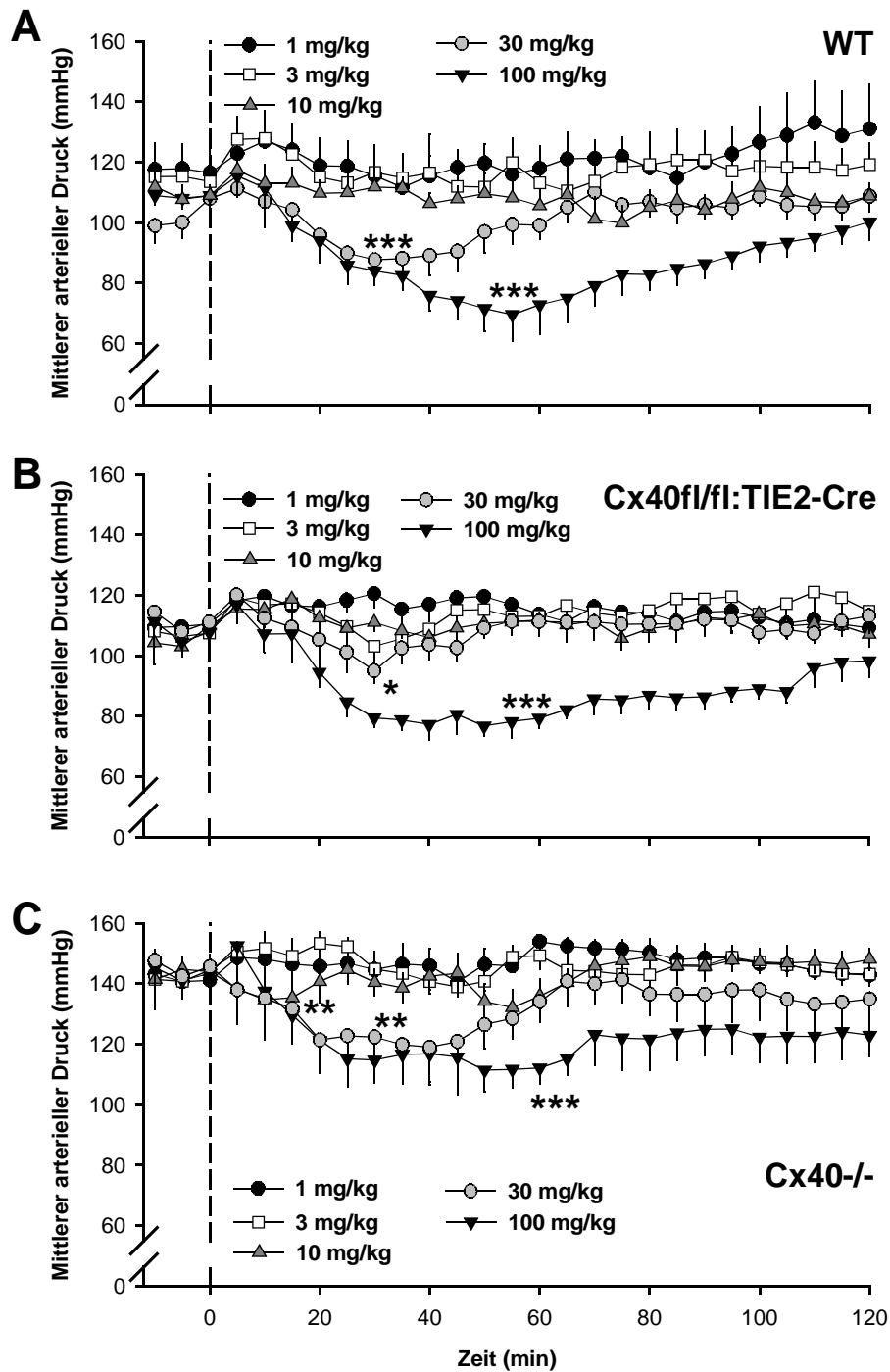


Abbildung 3.5 Zeitlicher Verlauf des arteriellen Mitteldrucks nach Injektion von SKA-31 in den verschiedenen Genotypen. Der Ausgangsblutdruck ist bis zu 12 Minuten vor Injektion (Zeitpunkt 0) dargestellt. Nach intraperitonealer Injektion von 1 und 3 mg/kg blieb der mittlere arterielle Druck unverändert. 10 mg/kg SKA-31 senkte den Druck in Cx40^{-/-}, 30 und 100 mg/kg SKA-31 senkten den Blutdruck in allen drei Genotypen. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ vs. Mitteldruck vor SKA-31 Injektion.

Ergebnisse

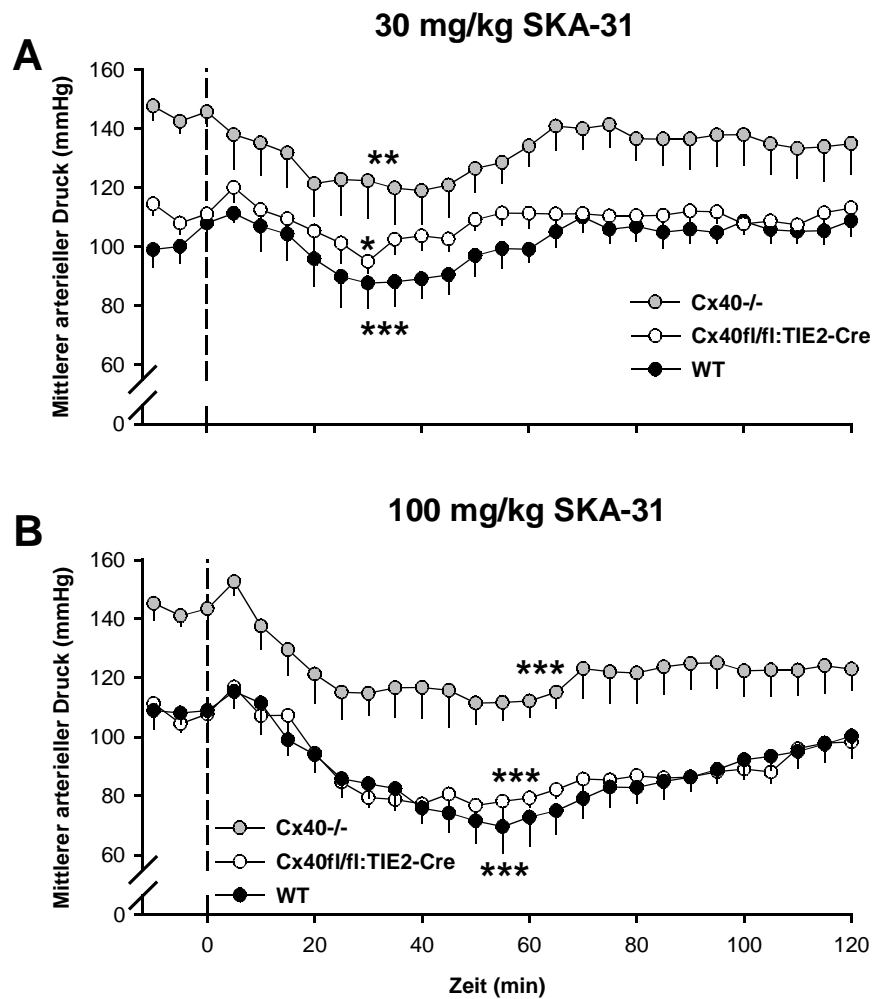


Abbildung 3.6 Vergleich des arteriellen Mitteldrucks in den verschiedenen Genotypen im zeitlichen Verlauf nach Injektion von 30 und 100 mg/kg SKA-31. Der Blutdruck ist vor Injektion (Zeitpunkt 0) dargestellt. Nach intraperitonealer Injektion von (A) 30 mg/kg und (B) 100 mg/kg SKA-31 fiel der mittlere arterielle Druck in allen drei Genotypen signifikant ab. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ vs. Ausgangsblutdruck.

Ergebnisse

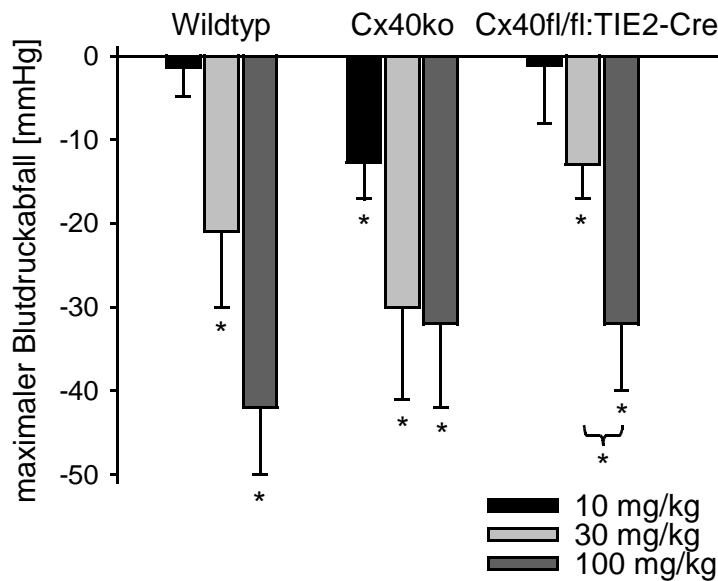


Abbildung 3.7 Maximaler Abfall des arteriellen Mitteldruckes nach Injektion von SKA-31. In hypertensiven Cx40^{-/-} induzierte 10 mg/kg SKA-31 einen signifikanten Blutdruckabfall. 30 und 100 mg/kg SKA-31 induzierte in allen drei Genotypen einen signifikanten Abfall des Blutdrucks ca. 20 bzw. 50 Minuten nach SKA-31 Injektion. Die Werte sind angegeben als Differenz des Ausgangsblutdrucks und des jeweils niedrigsten Wertes nach SKA-31 Injektion. * $P < 0,05$ vs. Ausgangsblutdruck.

3.2.2 Wirkung von SKA-31 auf die Herzfrequenz

Wache Mäuse aller drei Genotypen wiesen in Ruhe eine Herzfrequenz von ca. 600/min auf. Nach intraperitonealer Injektion von 150 μ l Erdnussöl, welches als Lösungsvermittler verwendet wurde, stieg die Herzfrequenz der Mäuse kurzzeitig an (WT: $704 \pm 15,3$ /min; $P < 0,01$; Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre: $744 \pm 11,5$ /min sowie Cx40^{-/-} Tiere: $727 \pm 18,2$ /min, $P < 0,05$; wenige Minuten nach Injektion). Innerhalb weniger Minuten wurde das Ausgangsniveau der Herzfrequenz wieder erreicht. Dem initialem Herzfrequenzanstieg, der auch nach SKA-31 Injektionen auftrat, liegt wahrscheinlich eine Sympathikusaktivierung durch die Fixierung der wachen Tiere zur intraperitonealen Injektion zugrunde. Nach Injektion von SKA-31 (1, 3 und 10 mg/kg) kam es nach dem initialen Herzfrequenzanstieg zu einer Rückkehr auf den Ausgangsblutdruck. SKA-31 in einer Dosierung von 30 mg/kg führte zu einer geringen Erhöhung der Herzfrequenz in allen Genotypen ca. 60 Minuten nach Injektion. Die Dosis von 100 mg/kg SKA-31 induzierte in allen drei Genotypen nach initialem Herzfrequenzanstieg einen Abfall der Herzfrequenz mit einem Minimum nach 50

Ergebnisse

Minuten (**Abb. 3.8 und 3.9**). Zu diesem Zeitpunkt wiesen Wildtypmäuse eine Herzfrequenz von $383 \pm 45,9/\text{min}$ ($P < 0,001$ vs. vor Injektion) auf. Endothelzellspezifisch und global Connexin40 defiziente Mäuse hatten ein Herzfrequenzminimum von $353 \pm 50,3/\text{min}$ und $334 \pm 67,8/\text{min}$ (je $P < 0,01$). Die Herzfrequenz stieg in allen Genotypen nur langsam wieder an und das Ausgangsniveau wurde erst nach ca. 10 Stunden erreicht. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass SKA-31 nur in der höchsten verwendeten Dosierung (100 mg/kg) die Herzfrequenz aller Genotypen signifikant senkt. Unterschiede zwischen den Genotypen wurden nicht beobachtet.

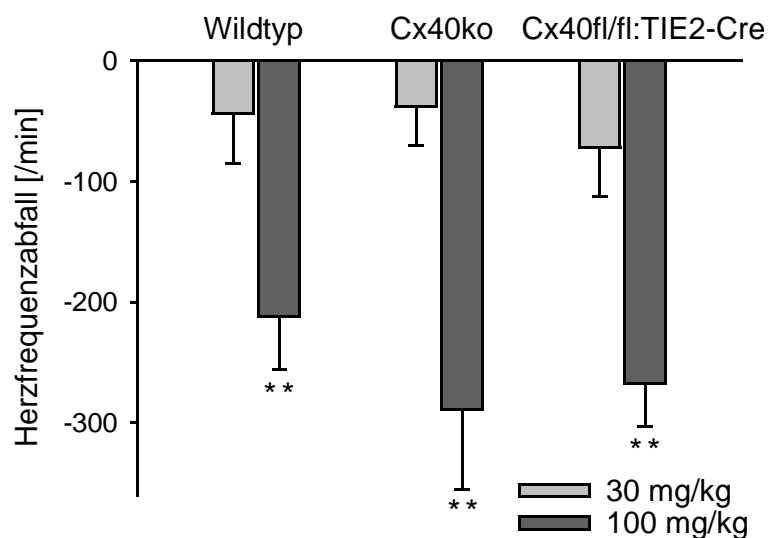


Abbildung 3.8 Maximale Herzfrequenzänderung nach Injektion von SKA-31. Herzfrequenzabfall in drei Genotypen nach Injektion von 30 mg/kg SKA-31 (30 Minuten nach Injektion) und 100 mg/kg SKA-31 (50 Minuten nach Injektion). **: $P < 0,01$ vs. Herzfrequenz vor Injektion.

Ergebnisse

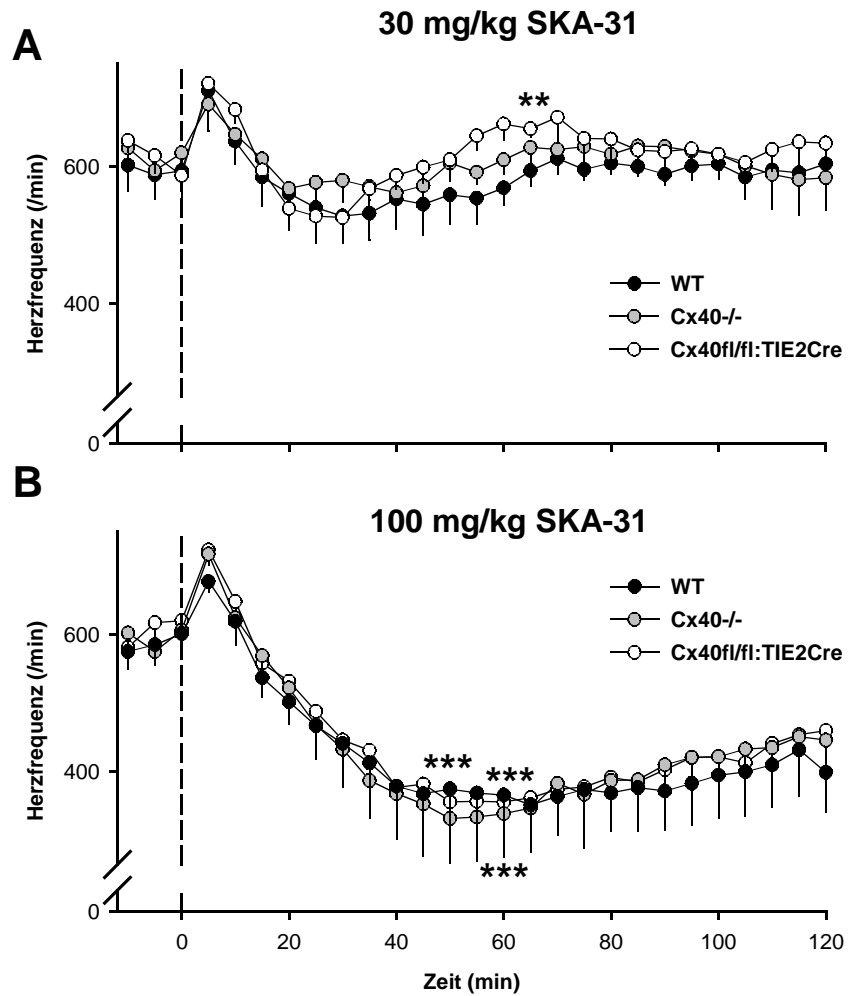


Abbildung 3.9 Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz nach Injektion von SKA-31. Dargestellt ist die Herzfrequenz [/min] im Zeitraum 20 Minuten vor bis 120 Minuten nach Injektion von (A) 30 mg/kg und (B) 100 mg/kg SKA-31. **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ vs. Ausgangsherzfrequenz.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt *in vivo*, dass der Kaliumkanalaktivator Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) eine EDH-mediierte Gefäßerweiterung auslöst, welche durch den $K_{Ca3.1}$ Kanal vermittelt wird und unabhängig von Connexin40 ist. Die simultane Applikation von Acetylcholin und SKA-31 führt zu einer additiven Dilatation. SKA-31 induziert einen Blutdruckabfall in Wildtypmäusen, normotensiven endothelzellspezifisch Connexin40 defizienten Mäusen und in global Connexin40 defizienten Mäusen, die einen Renin-abhängigen Bluthochdruck aufweisen. Allerdings führte die höchste verwendete SKA-31 Dosis in allen Genotypen zu einem Herzfrequenzabfall. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass der Kaliumkanalaktivator SKA-31 *in vivo* eine Dilatation von Arteriolen auslöst und den Blutdruck von normotensiven sowie hypertensiven Mäusen über einen längeren Zeitraum senkt und dies unabhängig von Connexin40 ist.

4.1 Die SKA-31-induzierte Dilatation ist abhängig vom $K_{Ca3.1}$ Kanal

Der Kaliumkanalaktivator Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine (SKA-31) aktiviert den $K_{Ca3.1}$ Kanal mit einer EC_{50} (Konzentration, die 50% der maximalen Wirkung auslöst) von 0,26 $\mu\text{mol/L}$ und die verwandten K_{Ca2} Kanäle mit einer 10-fach geringeren Potenz (EC_{50} 2,9 $\mu\text{mol/L}$) (2). Der $K_{Ca3.1}$ Kanal wird im Endothel exprimiert (63,64) und SKA-31 verschiebt das Membranpotential von Endothelzellen in Richtung negativere Werte (111). SKA-31 verstärkt *in vitro* die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation, löst allerdings in diesen Untersuchungen allein keine Vasodilatation aus (2,3). Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal in Arteriolen der Skelettmuskulatur, dass SKA-31 per se *in vivo* eine Vasodilatation auslöst. Wie erwartet, induzierte SKA-31 in $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Mäusen keine Vasodilatation. Dies zeigt, dass SKA-31 tatsächlich über die Aktivierung des $K_{Ca3.1}$ Kanals und nicht über die Aktivierung von K_{Ca2} Kanälen oder unspezifisch gefäßerweiternd wirkt. Gleichermäßen löst DCEBIO, ein anderer Aktivator calciumabhängiger Kaliumkanäle, eine Vasodilatation aus, welche in $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Mäusen nicht vorhanden ist (95). Zusammenfassend zeigt dies, dass eine Aktivierung des $K_{Ca3.1}$ durch SKA-31 in der

Diskussion

Mikrozirkulation des Cremastermuskels eine Gefäßerweiterung der Arteriolen auslösen kann. Die Gefäßerweiterung durch SKA-31 entspricht etwa 40% der maximal möglichen Dilatation und erreicht somit nicht das Ausmaß, welches durch Applikation von Acetylcholin ausgelöst wird (etwa 75% der maximalen Dilatation) (95,112,113). Wie SKA-31 löst auch DCEBIO eine Vasodilatation von etwa 40% der maximal möglichen Dilatation aus (95). Die im Vergleich zu Acetylcholin geringere Vasodilatation durch SKA-31 kann darin begründet sein, dass der Skelettmuskel eine Diffusionsbarriere für das lipophile SKA-31 darstellt, sodass am Endothel eine deutlich geringere Konzentration wirksam ist. Dies könnte auch erklären, warum eine höhere SKA-31 Konzentration (1-30 $\mu\text{mol/L}$) zur Auslösung einer Vasodilatation nötig ist als es die EC_{50} von 0,26 $\mu\text{mol/L}$ vermuten ließe. Dennoch zeigen die Befunde erstmals, dass SKA-31 per se eine relevante Dilatation auslösen kann.

4.2 Die SKA-31-induzierte Dilatation ist unabhängig von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SKA-31 über die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ Kanals eine Vasodilatation auslöst und dass diese Vasodilatation in Abwesenheit von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen unverändert ist. Dies legt eine EDH-Vasodilatation nahe. Allerdings führen die Kaliumkanalaktivatoren NS309 und DCEBIO in Gefäßen der Ratte über eine Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Endothelzellen zur Vasodilatation (114,115). Daher ist es denkbar, dass auch SKA-31 eine Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Endothelzellen hervorruft. Selbst wenn dies so sein sollte, zeigen die vorgelegten Daten, dass Stickstoffmonoxid in Anwesenheit einer EDH-Typ Dilatation dennoch keinen Anteil an der SKA-31-induzierten Vasodilatation *in vivo* hat. Somit handelt es sich bei der SKA-31-induzierten Vasodilatation am ehesten um eine EDH-medierte Gefäßerweiterung. Eine weitere Charakterisierung durch eine pharmakologische Blockade ist nicht möglich, da der Mechanismus in dieser Präparation noch unklar ist. Oft wird zur Charakterisierung einer EDH-Typ Dilatation die extrazelluläre Konzentration von Kalium drastisch erhöht, um zu demonstrieren, dass die Dilatation auf einer Hyperpolarisation beruht. Dieses Vorgehen ist aber nicht möglich, da die endotheliale Auslösung ja ihrerseits ebenso auf eine Hyperpolarisation durch einen K^+ -Ausstrom über $K_{Ca}3.1$ angewiesen ist.

4.3 Connexin40 ist für die EDH-medierte SKA-31-induzierte Dilatation nicht relevant

SKA-31 löst über die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ Kanals eine EDH-medierte Vasodilatation aus. Bei einer EDH-medierten Dilatation wird die endotheliale Hyperpolarisation entweder mittels eines Faktors oder durch direkte Übertragung des Potentials über Gap Junctions von den Endothelzellen auf die glatten Muskelzellen übertragen. Myoendotheliale Gap Junctions bestehen aus Connexinen (7,56,57,116), die interzelluläre Kanäle zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen bilden (31,117). In Cx40floxed Mäusen, die Connexin40 exprimieren, dilatierten Arteriolen nach SKA-31 Superfusion konzentrationsabhängig. In Cx40^{fl/fl}:TIE2-Cre, die in Endothelzellen kein Connexin40 exprimieren, war die Vasodilatation durch SKA-31 unbeeinträchtigt.

Dies zeigt, dass die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ durch SKA-31 auch in Abwesenheit von Connexin40 eine Vasodilatation hervorruft. Somit ist Connexin40 in myoendothelialen Gap Junctions nicht kritisch notwendig, um eine EDH-Vasodilatation in Arteriolen auszulösen. Diese Ergebnisse werden von Arbeiten unterstützt, in denen eine myoendotheliale Kopplung über Connexin40 in Skelettmuskelarteriolen der Maus bei der EDH-Vasodilatation nach ACh-Stimulation *in vivo* ebenfalls nicht von Bedeutung ist (52,118). Neben Connexin40 wurde auch das Vorkommen von Connexin37 in myoendothelialen Gap Junctions beschrieben (7,57). Da aber die Expression von Connexin37 in Connexin40-defizienten Endothelzellen stark reduziert ist (119), ist es sogar denkbar, dass die SKA-31-induzierte Vasodilatation nicht nur unabhängig von Connexin40 ist, sondern hierfür myoendotheliale Gap Junctions generell nicht relevant sind. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine myoendotheliale Kopplung über Connexin40 zur SKA-31 induzierten Vasodilatation nicht benötigt wird.

4.4 Mögliche EDH-Mechanismen der Dilatation

Wenn die EDH-Dilatation unabhängig von myoendothelialer Kopplung über Gap Junctions und keine direkte Übertragung des Membranpotentials von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen ist, stellt sich die Frage, ob tatsächlich eine chemische Substanz vom Endothel freigesetzt wird und als Faktor (EDHF) fungiert. Bisher wurden H_2O_2 , Epoxyeicosatriensäuren, Anandamide, das C-Typ natriuretische Peptid sowie Kaliumionen als EDHF identifiziert, wobei diese Daten nicht einheitlich sind und nur in einzelnen Gefäßbetten oder Spezies erhoben wurden.

H_2O_2 wird von Endothelzellen freigesetzt und dilatiert Mesenterialgefäße in Mäusen und Menschen unabhängig von NO und PGs (18–20). Hierbei weisen die Daten auf H_2O_2 als EDHF, da sich in Mäusen, die defizient für die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase sind, eine reduzierte H_2O_2 -Produktion und eine verminderte Vasodilatation nach Acetylcholin zeigt (18). Dennoch ist eine EDH-Vasodilatation in Mäusen, die defizient für die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase sind, beschrieben (112). Die Autoren diskutieren, dass unterschiedliche EDH in verschiedenen Gefäßbetten der Maus eine Rolle spielen könnten (18). Der Arachidonsäure-Metabolit 11,12-Epoxyeicosatriensäuren löst in Koronararterien eine Vasodilatation aus und wurde daher als EDHF diskutiert. Zudem hemmen Inhibitoren von Cytochrome P450 Enzymen die Bradykinin-induzierte Dilatation (120) und das Enzym Cytochrome P450 2C konnte als entscheidender Schritt in der Bildung von EDHF identifiziert werden (16). In Mesenterialgefäßen von Ratten könnten endogene Cannabinoide als EDHF wirken, denn der Cannabinoid-Rezeptor Antagonist hemmt die EDHF-Vasodilatation und exogen zugeführtes Anandamid löst ebenfalls eine Vasodilatation aus (21). In diesen Gefäßen konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) ein EDHF darstellt, da dieses nach Acetylcholin-Applikation freigesetzt wird und ein direkter Aktivator des CNP-Rezeptors eine Vasodilatation auslöst (22). Allerdings muss betont werden, dass diese Hypothesen umstritten sind und nur wenig Übereinstimmung zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen besteht. Es ist beispielsweise unklar, inwieweit diese postulierten Substanzen selbst als Mediator wirken oder nur einen permissiven Effekt ausüben.

Diskussion

Gemeinsam ist diesen Faktoren, dass zur Synthese eine intrazelluläre Calciumerhöhung in Endothelzellen nötig ist (31). Allerdings führt der Kaliumkanalaktivator 1-EBIO direkt über die Aktivierung von Kaliumkanälen zur Hyperpolarisation der Endothelzellen und löst selbst keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Endothelzellen aus (92). Somit scheint SKA-31 keine Erhöhung des intrazellulären Calciums zu induzieren, was gegen lösliche EDHFs als Schritt in der SKA-31 induzierten Vasodilatation spricht. Weiter könnten die bei der endothelialen Hyperpolarisation aus dem Endothel strömenden Kaliumionen selbst als EDHF fungieren. Ähnliches wurde auch für Acetylcholin und die hierdurch ausgelöste Öffnung calciumabhängiger Kaliumkanäle postuliert (23). Die Erhöhung der Kaliumkonzentration wirkt an der glatten Muskulatur aktivierend auf einwärtsgerichtete Kaliumkanäle und die Na^+/K^+ ATPase. Beide Vorgänge resultieren in einer Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskelzellen (23). Ebenso führt die Applikation von Kalium zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen und die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration ist ein bekannter Mechanismus der Vasodilatation (24). Dies ist abhängig von der Aktivierung der K_{IR} -Kanäle (23). Allerdings hatten Blocker der Na^+/K^+ ATPase (Ouabain) und des einwärtsgerichteten Kaliumkanals (Barium) keine Abschwächung der ACh-induzierten Dilatation in Arteriolen der Maus zur Folge, obwohl die Dilatation durch appliziertes Kalium durch diese Blocker aufgehoben war (nicht veröffentlichte Daten). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass Kalium als EDHF bei der SKA-31-induzierten Vasodilatation beteiligt ist. Letztlich erlauben die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche allerdings keine genaue Identifikation eines beteiligten Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors.

4.4.1 Zusammenwirken von SKA-31 und Acetylcholin

Eine Beeinträchtigung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation wird bei unterschiedlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, beobachtet (121,122). Da SKA-31 eine vasodilatierende Wirkung zeigt, ist eine Verstärkung der Acetylcholin-induzierten Gefäßerweiterung und somit ein neuer therapeutischer Ansatz von Bluthochdruck und Krankheiten mit einer Einschränkung der EDH-Vasodilatation denkbar. SKA-31 verstärkt die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation bei niedrigen ACh Konzentrationen (**Abb. 3.3**). Bei 30 $\mu\text{mol/L}$ SKA-31 ist dieser additive Effekt auch bei höheren ACh-Konzentrationen vorhanden (**Abb. 3.3B**). Dieser additive Effekt weist auf

Diskussion

einen gemeinsamen Signalweg und reflektiert am ehesten die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ Kanals. Bei hohen Konzentrationen wird die Vasodilatation durch die Annäherung der Hyperpolarisation an das Gleichgewichtspotentials für Kaliumionen limitiert. Die Dauer der Dilatation nach Acetylcholin wird aber durch SKA-31 nicht verlängert (**Abb. 3.4**).

In Mesenterialgefäßen von Ratten führt der Kaliumkanalaktivator NS309 nach 5 minütiger Inkubationszeit zu einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Acetylcholin (121). Ebenso kann DCEBIO die Acetylcholin-Vasodilatation verstärken, sodass NS309 und DCEBIO mit Acetylcholin synergistisch wirken (114). SKA-31 (0,2 und 0,5 $\mu\text{mol/L}$) induzierte in isobarischen Versuchen an Carotisarterien der Maus eine 1,5 fache Verstärkung der ACh-Vasodilatation (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Zudem induzierte SKA-31 bei einer Acetylcholin-Konzentration, die normalerweise keine Vasodilatation auslöst (0,01 $\mu\text{mol/L}$), eine Gefäßerweiterung (111). In einer anderen Versuchsreihe induzierte SKA-31 an Carotisarterien von Mäusen eine 2-3 fache Verstärkung der Acetylcholin-induzierten Gefäßerweiterung (2), woraus geschlossen wurde, dass SKA-31 die ACh-Vasodilatation potenziert. Bekräftigt wurde dies in Versuchen an Mesenterialarterien von Hunden, in denen SKA-31 (1 $\mu\text{mol/L}$) die Acetylcholin-Wirkung um das 2,5 fache verstärkte. Interessanterweise wurde in diesen beiden Studien im Gegensatz zu den hier erhobenen Befunden keine Relaxation durch alleinige SKA-31 Applikation gesehen (2,3). In der vorliegenden Arbeit waren zur Aktivierung der endothelialen Kaliumkanäle höhere Konzentration von SKA-31 als im Draht- oder Druckmyographen nötig. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die Tatsache, dass die Arteriolen in diesem Setting im Skelettmuskelgewebe verbleiben und die Diffusionsstrecken größer werden. Möglicherweise erklärt dies auch, warum keine Potenzierung der ACh-Wirkung durch SKA-31 beobachtet wurde. Andererseits führte SKA-31 in den vorliegenden Untersuchungen per se zu einer Dilatation und lässt hierdurch keine klare Verstärkung der ACh-Dilatation erkennen. Dennoch kann SKA-31 möglicherweise bei einer beeinträchtigten Acetylcholin-induzierten Vasodilatation (123) oder wenn der $K_{Ca}3.1$ Signalweg hochreguliert ist (124) eine verstärkende Wirkung ausüben, indem es direkt über die Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ Kanals eine Hyperpolarisation auslöst. Somit könnte die Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle durch SKA-31 einen neuen Therapieansatz zur Behandlung bei Beeinträchtigungen der Endothelfunktion darstellen, welche bei vielen Erkrankungen beobachtet wird (15,123).

4.5 Blutdruckabfall durch SKA-31

Bisher wurde gezeigt, dass SKA-31 den Blutdruck von Wildtypmäusen und von hypertensiven Mäusen, welche durch Angiotensin II Gabe einen Bluthochdruck entwickelten (2), aber auch von Hunden kurzfristig (3) senken kann. Eine Veränderung der Herzfrequenz der Mäuse wurde nach SKA-31 Injektion von bis zu 30 mg/kg nicht beobachtet, sodass diskutiert wurde, dass weder der Blutdruckabfall noch das Zurückkehren zum Ausgangsblutdruck auf eine Veränderung der Herzfrequenz zurückzuführen ist (2).

In der vorliegenden Arbeit konnte der beschriebene Hochdruck in global Connexin40 defizienten Tieren (Cx40^{-/-}) eindrucksvoll belegt werden (52–55). Ursächlich hierfür ist ein defekter Signalweg in Renin-produzierenden Nierenzellen, der zu einem Fehlen des Angiotensin II-vermittelten negativen Feedbacks auf die Reninsekretion führt (54,55,125). Daher sind Mäuse mit einer endothelspezifischen Connexin40 Defizienz normotensiv (55), wie hier bestätigt wurde. Eine intraperitoneale Injektion von 30 und 100 mg/kg SKA-31 senkte den Blutdruck aller Genotypen um etwa 20 bzw. 32 mmHg. Eine geringere Dosis SKA-31 (10 mg/kg) senkte den Blutdruck nur in hypertensiven global Connexin40 defizienten Tieren signifikant. Somit senkt SKA-31 den Blutdruck auch in chronisch hypertensiven Tieren. Der Blutdruckabfall ist am ehesten in der Gefäßerweiterung und dem folgenden Abfall des peripheren Widerstandes begründet, welche in der Mikrozirkulation nach SKA-31 Superfusion auch direkt beobachtet werden konnte.

Da SKA-31 den Blutdruck von Wildtypmäusen und normotensiven endothelzellspezifisch Connexin40-defizienten Mäusen gleichermaßen senkt, ist der Effekt unabhängig vom Connexin40. Ebenso war die Vasodilatation, die in der Intravitalmikroskopie beobachtet wurde, in Connexin40-defizienten Tieren nicht beeinträchtigt. Hierbei ist besonders interessant, dass SKA-31 den Blutdruck von global Connexin40-defizienten Tieren deutlich senken kann und somit diese Substanz bei chronischem Bluthochdruck mit vermehrter Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (54,55) wirksam ist. Daher könnte die Auslösung einer EDH-Vasodilatation und ein Abfall des peripheren Widerstandes durch die Aktivierung des K_{Ca}3.1 Kanals einen neuen Ansatzpunkt in der Behandlung des Bluthochdruckes darstellen.

Diskussion

Im Gegensatz zu den bisherigen Arbeiten zeigt die hier vorliegende Arbeit den zeitlichen Verlauf des Blutdruckabfalls. Die intraperitoneale Injektion von SKA-31 führt zu einem langsamen Blutdruckabfall mit einem minimalen arteriellen Druck ca. 30 Minuten (30 mg/kg SKA-31) bzw. 50 Minuten (100 mg/kg SKA-31) nach Injektion. Somit ähnelt der Abfall des Blutdrucks dem langsamen Anstieg der Plasmakonzentration von SKA-31, der etwa zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion seinen Höhepunkt erreicht (2). Interessanterweise kam es bei Hunden zu einem nur wenige Sekunden (8 ± 1 s) anhaltenden Blutdruckabfalls nach intravenöser Injektion von 2 mg/kg SKA-31 (3), woraus ersichtlich wird, dass die Applikationsart (intraperitoneal im Gegensatz zu intravenös) die Pharmakokinetik von SKA-31 beeinflusst. Zusammenfassend kann SKA-31 aufgrund guter pharmakologischer Eigenschaften (2) und des blutdrucksenkenden Effektes ein neues Therapieprinzip bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie darstellen.

Dem initialen Herzfrequenzanstieg der Mäuse in dieser Arbeit liegt wahrscheinlich eine Sympathikusaktivierung durch die Fixierung der wachen Tiere, was zur intraperitonealen Injektion notwendig war, zugrunde. Nach Verbringen der Tiere in die Käfige kehrte die Herzfrequenz rasch auf das Ausgangsniveau zurück und blieb danach konstant. Lediglich bei der höchsten injizierten Dosis von 100 mg/kg SKA-31 kam es in allen Genotypen zu einem signifikanten Abfall der Herzfrequenz. Die Expression des $K_{Ca3.1}$ in Schrittmachergewebe des Herzens oder eine Funktion bei der Regulation der Herzfrequenz wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch ließ sich mRNA der K_{Ca2} Kanäle in Vorhof- und Kammermyocyten nachweisen (126,127). K_{Ca2} haben eine Funktion bei der Repolarisation von Myocyten (128). Es konnte gezeigt werden, dass auch eine Inhibition des $K_{Ca3.1}$ Kanales in menschlichen embryonalen Stammzellen eine Depression der Schrittmacherzellen auslöst (129). Weiter führt die genetisch induzierte K_{Ca2} Defizienz zu einer Sinusbradykardie und umgekehrt eine Überexpression von K_{Ca2} Kanälen zu einem Anstieg der Herzfrequenz (71). Dies lässt vermuten, dass der K_{Ca2} Kanal eine Rolle bei der Schrittmacherfunktion im Herzen hat und die Aktivierung des Kanals beschleunigend wirkt. Die genetische Überexpression und eine pharmakologische Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle könnten aber unterschiedliche Auswirkungen haben. Es ist denkbar, dass SKA-31 calciumabhängige Kanäle von Schrittmacherzellen aktiviert, sodass die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials später erreicht wird, was zu

Diskussion

einer Reduktion der Herzfrequenz führt. Zudem hat das lipophile SKA-31 einen sedativen Effekt, der unabhängig vom $K_{Ca3.1}$ Kanal ist, da der sedative Effekt auch in $K_{Ca3.1}$ defizienten Tieren auftrat (130). Daher ist der Abfall der Herzfrequenz am ehesten in einer Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle in Schrittmacherzellen und zusätzlich in einem sedativen Effekt begründet, wobei dieser Effekt am ehesten durch die Aktivierung von K_{Ca2} Kanälen in hoher SKA-31 Konzentration ausgelöst wird.

5 Zusammenfassung

Der endotheliale $K_{Ca}3.1$ Kanal hat eine entscheidende Funktion bei der endothelialen Hyperpolarisation, die auf die glatten Muskelzellen übertragen wird und so eine Gefäßerweiterung hervorruft. Diese von Stickstoffmonoxid und Prostaglandin unabhängige Dilatation wird EDH-Typ Dilatation genannt. Unklar ist, ob die endotheliale Hyperpolarisation über einen chemischen Faktor oder das Potential elektrotonisch über myoendotheliale Gap Junctions direkt übertragen wird. In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob der Kaliumkanalaktivator SKA-31 über Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ *in vivo* eine arterioläre Dilatation induziert und ob diese Gefäßerweiterung Connexin40-unabhängig ist. In der Skelettmuskulatur induzierte SKA-31 eine Vasodilatation von Arteriolen in Wildtypmäusen und Mäusen mit endothelialer Connexin40 Defizienz. Im Gegensatz dazu war SKA-31 in $K_{Ca}3.1$ defizienten Mäusen ineffektiv. Die Gefäßerweiterung war unbeeinträchtigt von der Blockade der Stickstoffmonoxid- und Prostaglandinsynthese. Bei gleichzeitiger Applikation verstärkte SKA-31 die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation. SKA-31 (30 und 100 mg/kg) senkte den Blutdruck sowohl in wachen Wildtypmäusen als auch in normotensiven Connexin40 defizienten Tieren. In hypertensiven global Connexin40 defizienten Mäusen führte bereits eine geringere Dosis (10 mg/kg SKA-31) zu einem Blutdruckabfall und SKA-31 senkte in höherer Dosis den Blutdruck dieser Tiere deutlich. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Aktivierung endothelialer $K_{Ca}3.1$ Kanäle mittels SKA-31 zu einer Gefäßerweiterung und zu einer Blutdrucksenkung führt. Die Vasodilatation durch Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ ist unabhängig von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen und daher als EDH-Typ Dilatation zu klassifizieren. Diese EDH-Dilatation ist unabhängig von Connexin40 im Endothel. Somit sind myoendotheliale Gap Junctions, bestehend aus Connexin40, *in vivo* nicht beteiligt und es ist unwahrscheinlich, dass die endotheliale Hyperpolarisation elektronisch auf den glatten Muskel übertragen wird. Diese Vasodilatation liegt sehr wahrscheinlich auch dem Blutdruckabfall nach SKA-31 zugrunde und SKA-31 kann den Druck in einem Renin-abhängigen Tiermodell senken. Die Aktivierung des calciumabhängigen Kaliumkanals mit intermediärer Leitfähigkeit durch SKA-31 könnte ein neues Therapieprinzip in der Behandlung des Bluthochdruckes darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Chobanian A V, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ: Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42: 1206-1252; 2003
2. Sankaranarayanan A, Raman G, Busch C, Schultz T, Zimin PI, Hoyer J, Köhler R, Wulff H: Naphtho [1,2-d] thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa₂ and KCa_{3.1} potassium channels , potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. *Mol Pharmacol* 75: 281-295; 2009
3. Damkjaer M, Nielsen G, Bodendiek S, Staehr M, Gramsbergen JB, de Wit C, Jensen BL, Simonsen U, Brie P, Wulff H, Köhler R: Pharmacological activation of KCa_{3.1}/KCa_{2.3} channels produces endothelial hyperpolarization and lowers blood pressure in conscious dogs. *Br J Pharmacol* 165: 223-234; 2012
4. Pirofsky B: The determination of blood viscosity in man by a method based on Poiseuille's law. *J Clin Invest* 32: 292-298; 1953
5. Haas TL, Duling BR: Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc Res* 53: 113-120; 1997
6. Inagami T, Naruse M, Hoover R: Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* 57: 171-189; 1995
7. Haddock RE, Grayson TH, Brackenbury TD, Meaney KR, Neylon CB, Sandow SL, Hill CE: Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2047-2056; 2006
8. Jackson WF: Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12: 113-127; 2005
9. Furchgott RF, Zawadzki J V: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376; 1980
10. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879; 1987
11. Moncada S, Vane JR: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331; 1978
12. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A: The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 703-711; 1996
13. Chen G, Suzuki H, Weston AH: Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165-1174; 1988

Literaturverzeichnis

14. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93: 515-524; 1988
15. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R: Endothelial Ca⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses-relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol* 157: 509-526; 2009
16. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R: Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401: 493-497; 1999
17. Campbell WB, Falck JR: Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 49: 590-596; 2007
18. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106: 1521-1530; 2000
19. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 909-913; 2002
20. Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, Shimokawa H: Mechanisms for enhanced Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-mediated responses in microvessels in mice. *Circ J* 76: 1768-1779; 2012
21. Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA: An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 114-120; 1996
22. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ: Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100: 1426-1431; 2003
23. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH: K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272; 1998
24. Bény JL, Schaad O: An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 131: 965-973; 2000
25. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853; 1994
26. Griffith TM: Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* 141: 881-903; 2004
27. Mather S, Dora K a, Sandow SL, Winter P, Garland CJ: Rapid endothelial cell-selective loading of connexin 40 antibody blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor dilation in rat small mesenteric arteries. *Circ Res* 97:399-407; 2005
28. Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH, Griffith TM: Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. *Br J Pharmacol* 144: 108-114; 2005

Literaturverzeichnis

29. Sokoya EM, Burns AR, Setiawan CT, Coleman H a, Parkington HC, Tare M: Evidence for the involvement of myoendothelial gap junctions in EDHF-mediated relaxation in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H385-393; 2006
30. Sandow SL, Hill CE: Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 86: 341-346; 2000
31. De Wit C, Wölfle SE: EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 11-25; 2007
32. De Wit C, Griffith TM: Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Arch* 459: 897-914; 2010
33. Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE: Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277: 171-177; 1998
34. Stauffer KA, Kumar NM, Gilula NB, Unwin N: Isolation and purification of gap junction channels. *J Cell Biol* 115: 141-150; 1991
35. Boettcher M, de Wit C: Distinct endothelium-derived hyperpolarizing factors emerge in vitro and in vivo and are mediated in part via connexin 40-dependent myoendothelial coupling. *Hypertension* 57: 802-808; 2011
36. Earley S, Resta TC, Walker BR: Disruption of smooth muscle gap junctions attenuates myogenic vasoconstriction of mesenteric resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2677-2686; 2004
37. Figueroa XF, Paul DL, Simon AM, Goodenough DA, Day KH, Damon DN, Duling BR: Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* 92: 793-800; 2003
38. Figueroa XF, Duling BR: Dissection of two Cx37-independent conducted vasodilator mechanisms by deletion of Cx40: electrotonic versus regenerative conduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: 2001-2007; 2008
39. Chaytor AT, Martin PEM, Edwards DH, Tudor M: Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by ACh in the rat hepatic artery. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 280: H2441-2450; 2001
40. Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thuneberg L, Neve S, Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH: Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol* 119: 139-148, 2003
41. Hill CE, Rummery N, Hickey H, Sandow SL: Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clinical Exp Pharmacol Physiol* 29: 620-625; 2002
42. Looft-Wilson RC, Payne GW, Segal SS, Robin C, Steven S: Connexin expression and conducted vasodilation along arteriolar endothelium in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 97: 1152-1158; 2004

Literaturverzeichnis

43. Ujiie H, Chaytor AT, Bakker LM, Griffith TM: Essential role of Gap junctions in NO- and prostanoid-independent relaxations evoked by acetylcholine in rabbit intracerebral arteries. *Stroke* 34: 544-550; 2003
44. Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y: Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127: 3501-3512; 2000
45. Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K: Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127: 4179-4193; 2000
46. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J: Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834; 1995
47. Ya J, Erdtsieck-Ernste EB, Boer PA de, van Kempen MJ, Jongasma H, Gros D, Moorman AF, Lamers WH: Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res* 82: 360-366; 1998
48. Simon AM, McWhorter AR: Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol* 251: 206-220; 2002
49. Munger S, Kanady J, Simon A: Absence of venous valves in mice lacking connexin37. *Dev Biol* 373: 338-348; 2013
50. Looft-Wilson RC, Payne GW, Segal SS: Connexin expression and conducted vasodilation along arteriolar endothelium in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* (Behesda, Md.1985) 97: 1152-1158; 2004
51. Wölfle SE, Schmidt VJ, Hoepfl B, Gebert A, Alcoléa S, Gros D, de Wit C: Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res* 101: 1292-1299; 2007
52. De Wit C, Roos F, Bolz S-S, Kirchhoff S, Krüger O, Willecke K, Pohl U: Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* 86: 649-655; 2000
53. De Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U: Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 13: 169-177; 2003
54. Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F: Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100: 556-563; 2007
55. Wagner C, Jobs A, Schweda F, Kurtz L, Kurt B, Lopez ML, Gomez RA, van Veen TA, de Wit C, Kurtz A: Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int* 78: 762-768; 2010
56. Isakson BE, Duling BR: Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization. *Circ Res* 97: 44-51; 2005

Literaturverzeichnis

57. Isakson BE, Best AK, Duling BR: Incidence of protein on actin bridges between endothelium and smooth muscle in arterioles demonstrates heterogeneous connexin expression and phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2898-2904; 2008
58. Alonso F, Boittin FX, Bény JL, Haefliger JA: Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and eNOS levels in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1365-1373; 2010
59. Chadha PS, Haddock RE, Howitt L, Morris MJ, Murphy TV, Grayson TH, Sandow SL: Obesity Up-Regulates Intermediate Conductance Calcium- Activated Potassium Channels and Myoendothelial Gap Junctions to Maintain Endothelial Vasodilator Function. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 284-293; 2010
60. Crane GJ, Gallagher N, Dora KA, Garland CJ: Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 553: 183-189; 2003
61. Nilius B, Viana F, Droogmans G: Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 59: 145-170; 1997
62. Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H: International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 463-472; 2005
63. Köhler R, Brakemeier S, Kuhn M, Behrens C, Real R, Degenhardt C, Orzechowski HD, Pries AR, Paul M, Hoyer J: Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circ Res* 89: 174-179; 2001
64. Bychkov R, Burnham MP, Richards GR, Edwards G, Weston AH, Féléto M, Vanhoutte PM: Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol* 137: 1346-1354; 2002
65. Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT: Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ Res* 93: 124-131; 2003
66. Brähler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wöfle SE, Busch C, Kaistha BP, Kacik M, Hasenau AL, Grgic I, Si H, Bond CT, Adelman JP, Wulff H, de Wit C, Hoyer J, Köher R: Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation* 119: 2323-2332; 2009
67. Mistry DK, Garland CJ: Characteristics of Single, Large-Conductance Calcium-Dependent Potassium Channels (BK Ca) from Smooth Muscle Cells Isolated from the Rabbit Mesenteric Artery. *J Membr Biol* 164: 125-138; 1998
68. Sauvé R, Chahine M, Tremblay J, Hamet P: Single-channel analysis of the electrical response of bovine aortic endothelial cells to bradykinin stimulation: contribution of a Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channel. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens* 8: S193-201; 1990

Literaturverzeichnis

69. Vaca L, Schilling WP, Kunze DL: G-protein-mediated regulation of a Ca(2+)-dependent K⁺ channel in cultured vascular endothelial cells. *Pflugers Arch* 422: 66-74; 1992
70. Stocker M, Pedarzani P: Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 15: 476-493; 2000
71. Zhang Q, Timofeyev V, Lu L, Li N, Singapuri A, Long MK, Bond CT, Adelman JP, Chiamvimonvat N: Functional roles of a Ca²⁺-activated K⁺ channel in atrioventricular nodes. *Circ Res* 102: 465-471; 2008
72. Jensen BS, Odum N, Jorgensen NK, Christophersen P, Olesen SP: Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96: 10917-10921; 1999
73. Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A: The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100: 7366-7371; 2003
74. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, Melvin JE: Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem* 279: 47681-47687; 2004
75. Thompson-Vest N, Shimizu Y, Hunne B, Furness J: The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat* 208: 219-229; 2006
76. Si H, Heyken W-T, Wölfle SE, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovic L, Giebing G, Maier T, Gross V, Bader M, de Wit C, Hoyer J, Köher R: Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circ Res* 99: 537-544; 2006
77. Milkau M, Köhler R, de Wit C: Crucial importance of the endothelial K⁺ channel SK3 and connexin40 in arteriolar dilations during skeletal muscle contraction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 24: 3572-3579; 2010
78. Hilgers RH, Todd J Jr, Webb RC: Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H216-222; 2006
79. Doughty JM, Plane F, Langton PD: Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol* 276: H1107-H1112; 1999
80. Edwards G, Gardener MJ, Feletou M, Brady G, Vanhoutte PM, Weston AH: Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery: studies using 1-EBIO and ouabain. *Br J Pharmacol* 128: 1064-1070; 1999
81. 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: Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507; 1998

Literaturverzeichnis

82. Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC: hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K_{Ca} channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* 274: 14838-14849; 1999
83. Corriu C, Félétou M, Canet E, Vanhoutte PM: Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 119: 959-964; 1996
84. Zygmunt PM, Högestätt ED: Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 117: 1600-1606; 1996
85. Chataigneau T, Félétou M, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine JP, Duhault J, Vanhoutte PM: Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 123: 968-974; 1998
86. Zygmunt PM, Plane F, Paulsson M, Garland CJ, Högestätt ED: Interactions between endothelium-derived relaxing factors in the rat hepatic artery: focus on regulation of EDHF. *Br J Pharmacol* 124: 992-1000; 1998
87. Andersson DA, Zygmunt PM, Movahed P, Andersson TL, Högestätt ED: Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na(+)/ K(+)ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 129: 1490-1496; 2000
88. Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Köhler R: Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 138: 594-601; 2003
89. Hinton JM, Langton PD: Inhibition of EDHF by two new combinations of K⁺ channel inhibitors in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 138: 1031-1035; 2003
90. Gluais P, Edwards G, Weston AH, Falck JR, Vanhoutte PM, Félétou M: Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol* 144: 477-485; 2005
91. Weston AH, Félétou M, Vanhoutte PM, Falck JR, Campbell WB, Edwards G: Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel activation and epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol* 145: 775-784; 2005
92. Marrelli SP, Eckmann MS, Hunte MS: Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1590-H1599; 2003
93. McNeish AJ, Dora KA, Garland CJ: Possible role for K⁺ in endothelium-derived hyperpolarizing factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery. *Stroke* 36: 1526-1532; 2005

Literaturverzeichnis

94. Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA: SKCa and IKCa Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke* 40: 1451-1457; 2009
95. Wölfle SE, Schmidt VJ, Hoyer J, Köhler R, de Wit C: Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo. *Cardiovasc Res* 82: 476-483; 2009
96. Weston AH, Porter EL, Harno E, Edwards G: Impairment of endothelial SKCa channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 160: 836-843; 2010
97. Hilgers RHP, Webb RC: Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: 2275-2284; 2007
98. Giachini FR, Carneiro FS, Lima VV, Carneiro ZN, Dorrance A, Webb RC, Tostes RC: Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Transl Res* 154: 183-193; 2009
99. Devor DC, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ: Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K⁺ channel. *Am J Physiol* 271: L775-784; 1996
100. Pedersen KA, Schrøder RL, Skaaning-Jensen B, Strøbaek D, Olesen SP, Christophersen P: Activation of the human intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly Ca(2+)-dependent. *Biochem Biophys Acta* 1420: 231-240; 1999
101. Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D, Stocker M, Adelman JP, Fakler B: Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* 276: 9762-9769; 2001
102. Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ: Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 600-611; 2001
103. Strøbaek D, Teuber L, Jørgensen TD, Ahring PK, Kjaer K, Hansen RS, Olesen SP, Christophersen P, Skaaning-Jensen B: Activation of human IK and SK Ca²⁺-activated K⁺ channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim Biophys Acta* 1665: 1-5; 2004
104. Leuranguer V, Gluais P, Vanhoutte PM, Verbeuren TJ, Félétou M: Openers of calcium-activated potassium channels and endothelium-dependent hyperpolarizations in the guinea pig carotid artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 101-109; 2008
105. Pedarzani P, McCutcheon JE, Rogge G, Jensen BS, Christophersen P, Hougaard C, Stobaek D, Stocker M: Specific enhancement of SK channel activity selectively potentiates the afterhyperpolarizing current I(AHP) and modulates the firing properties of hippocampal pyramidal neurons. *J Biol Chem* 280: 41404-41411; 2005

Literaturverzeichnis

106. Morimura K, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y: Voltage-dependent Ca²⁺-channel block by openers of intermediate and small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in urinary bladder smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci* 100: 237-241; 2006
107. Cao Y, Dreixler JC, Couey JJ, Houamed KM: Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. *Eur J Pharmacol* 449: 47-54; 2002
108. Grunnet M, Jespersen T, Angelo K, Frøkjær-Jensen C, Klaerke DA, Olesen SP, Jensen BS: Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology* 40: 879-887; 2001
109. Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH: Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD001447; 2012
110. Zarate CA, Manji HK: Riluzole in psychiatry: a systematic review of the literature. *Expert Opin. Drug Metab Toxicol* 4: 1223-1234; 2008
111. Hasenau A-L, Nielsen G, Morisseau C, Hammock BD, Wulff H, Köhler R: Improvement of endothelium-dependent vasodilations by SKA-31 and SKA-20, activators of small- and intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺-channels. *Acta Physiol. (Oxf)* 203: 117-126; 2011
112. Koeppen M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C: cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* 44: 952-955; 2004
113. Wölfle SE, de Wit C: Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res* 42: 475-482; 2005
114. Sheng J, Ella S, Davis MJ, Hill MA, Braun AP: Openers of SKCa and IKCa channels enhance agonist-evoked endothelial nitric oxide synthesis and arteriolar vasodilation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 23: 1138-1145; 2009
115. Stankevicius E, Dalsgaard T, Kroigaard C, Beck L, Boedtkjer E, Misfeldt MW, Nielsen G, Schjorring O, Hughes A, Simonsen U: Opening of small and intermediate calcium-activated potassium channels induces relaxation mainly mediated by nitric-oxide release in large arteries and endothelium-derived hyperpolarizing factor in small arteries from rat. *J Pharmacol Exp Ther* 339: 842-850; 2011
116. Isakson BE, Kronke G, Kadl A, Leitinger N, Duling BR: Oxidized phospholipids alter vascular connexin expression, phosphorylation, and heterocellular communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2216-2221; 2006
117. Wang HZ, Veenstra RD: Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J Gen Physiol* 109: 491-507; 1997
118. Siegl D, Koeppen M, Wölfle S, Pohl U, de Wit C: Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo. *Circ Res* 97: 781-788; 2005

Literaturverzeichnis

119. Jobs A, Schmidt K, Schmidt VJ, Lübckemeier I, van Veen TA, Kurtz A, Willecke K, de Wit C: Defective Cx40 maintains Cx37 expression but intact Cx40 is crucial for conducted dilations irrespective of hypertension. *Hypertension* 60: 1422-1429; 2012
120. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R: Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 481: 407-414; 1994
121. Brøndum E, Kold-Petersen H, Simonsen U, Aalkjaer C: NS309 restores EDHF-type relaxation in mesenteric small arteries from type 2 diabetic ZDF rats. *Br J Pharmacol* 159: 154-165; 2010
122. Matsumoto T, Ishida K, Taguchi K, Kobayashi T, Kamata K: Losartan normalizes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation by activating Ca²⁺-activated K⁺ channels in mesenteric artery from type 2 diabetic GK rat. *J Pharmacol Sci* 112: 299-309; 2010
123. Köhler R, Kaistha B, Wulff H: Vascular K_{Ca}-channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert Opin Ther Targets* 14: 143-155; 2010
124. Simonet S, Isabelle M, Bousquenaud M, Clavreul N, Félétou M, Vayssettes-Courchay C, Verbeuren TJ: K_{Ca} 3.1 channels maintain endothelium-dependent vasodilatation in isolated perfused kidneys of spontaneously hypertensive rats after chronic inhibition of NOS. *Br J Pharmacol* 167: 854-867; 2012
125. Oppermann M, Carota I, Schiessl I, Eisner C, Castrop H, Schnermann J: Direct assessment of tubuloglomerular feedback responsiveness in connexin 40-deficient mice. *Am J Physiol Ren Physiol* 304: F1181-1186, 2013
126. Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vazquez AE, Young JN, Glatter KA, Chiamvimonvat N: Differential expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2714-2723; 2005
127. Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, Mateo RK, Singapuri A, Young JN, Knowlton AA, Chiamvimonvat N: Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res* 107: 851-859; 2010
128. Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vazquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N: Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K⁺ channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem* 278: 49085-49094; 2003
129. Weisbrod D, Peretz A, Ziskind A, Menaker N, Oz S, Barad L, Eliyahu S, Itskovitz-Eldor J, Dascal N, Khananshvili D, Binah O, Attali B: SK4 Ca²⁺ activated K⁺ channel is a critical player in cardiac pacemaker derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 110: E1685-1694; 2013
130. Lambertsen KL, Gramsbergen JB, Sivasaravanaparan M, Ditzel N, Sevelsted-Møller LM, Oliván-Viguera A, Rabjerg M, Wulff H, Köhler R: Genetic K_{Ca}3.1-deficiency produces locomotor hyperactivity and alterations in cerebral monoamine levels. *PLoS One* 7:e47744; 2012

7 Anhang

7.1 Substanzen und Lösungen

Substanz	Hersteller
Acetylcholin (ACh)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Adenosin (Ado)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bupivacain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Fentanylcitrat	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Indometacin	Promedica S.R.L., Parma, Italien
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Medetomidinhydrochlorid	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Midazolamhydrochlorid	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
Naphtho[1,2- <i>d</i>]thiazol-2-ylamine (SKA-31)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N ω -Nitro-L-Arginin (L-NA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pentobarbital-Natrium	Merck KGaA, Darmstadt

7.2 Protokoll zur Reinigung der Transmitter

1. Grobe Reinigung mit destilliertem Wasser nach der Explantation des Katheters
2. Enzymatische Reinigung (Haemo-Sol® Non-Sudsing, Haemo-Sol, Inc., Baltimore, Maryland, USA; 5 g Pulver in 1 Liter destilliertem Wasser) für 4 bis 72 Stunden
3. Erneute Reinigung mit destilliertem Wasser
4. Sterilisation in Glutardialdehyd 2% (verdünnt aus Glutardialdehyd 25%, Merck KGaA, Darmstadt) für mindestens 10 Stunden
5. Dreimalige Spülung mit steriler NaCl-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
6. Einlegen des Katheters in steriler NaCl-Lösung für etwa 10 Stunden
7. Bei Bedarf Katheterspitze mit neuem Gel (276-0038-001-Regel Syringe .50 CC, Data Science International, St. Paul, Minnesota, USA) befüllen
8. Lagerung der Katheter in destilliertem Wasser in sterilen Schraubverschluss Röhren (50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

7.3 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Josephine Radtke, Kjestine Schmidt, Heike Wulff, Ralf Köhler, Cor de Wit: Activation of $K_{Ca3.1}$ by SKA-31 induces arteriolar dilation and lowers blood pressure in normo- and hypertensive connexin40-deficient mice. British Journal of Pharmacology, 170(2):293-303; 2013

Marc Reismann, Nader Ghaffarpour, Ethel Luvall, Adan C. Jirno, Ola Winqvist, Josephine Radtke, Tomas Wester, Gösta Claesson: Dynamic Toll-like receptor expression predicts outcome of sclerotherapy for lymphatic malformations with OK-432 in children. The Journal of surgical research, 187(1):197-201; 2014

Kongressbeiträge mit Vortrag

Experimental Biology 2011, Washington DC, USA: The IK_{Ca} -channel ($K_{Ca3.1}$) activator SKA-31 lowers blood pressure independent of connexin40 (2011)

9th World Congress for Microcirculation, Paris, Frankreich: The IK_{Ca} -channel ($K_{Ca3.1}$) activator SKA-31 lowers arterial pressure independent of connexin40 in normo- and hypertensive mice (2010)

15. Treffen der Ostseephysiologen, Lübeck: Aktivierung von IK_{Ca} senkt den Blutdruck unabhängig von Connexin40 in normo- und hypertensiven Mäusen (2010)

Kongressbeiträge mit Poster

Experimental Biology 2011, Washington DC, USA: The IK_{Ca} -channel ($K_{Ca3.1}$) activator SKA-31 lowers blood pressure independent of connexin40 (2011)

Uni im Dialog - 4. Lübecker Doktorandentag, Lübeck: Neuer Ansatz der Bluthochdruckbehandlung: Hochspannung im Gefäß durch Aktivierung von Kaliumkanälen (2010)

8 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde von April 2008 bis Dezember 2013 erstellt. Viele Personen haben mich in dieser Zeit unterstützt und ich möchte diese Seite nutzen um mich zu bedanken, auch wenn ich hierbei nicht alle erwähnen kann.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Cor de Wit danke ich für die Vergabe des Themas und die Unterstützung bei der Methodenerlernung. Besonders dankbar bin ich ihm für die Möglichkeit internationale Kongresse zu besuchen und für die Unterstützung vor und während der Kongresse sowie für die Hilfe bei der Publikation.

Dr. rer. nat. Markus Böttcher, Kjestine Schmidt und Rita Meuer sowie Gabriela Fletschinger möchte ich für die wissenschaftliche Hilfe im Labor, die Unterstützung mit Computerprogrammen sowie für die vielen Gespräche und aufmunternden Worte herzlich danken!

Meiner Freundin, Dr. med. Katharina Chase, danke ich für ihren Zuspruch.

Weiterhin möchte ich Dr. med. Marc Reismann und Birgitt Lucas für die Durchsicht der Doktorarbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für die Unterstützung und das Verständnis danken! Ohne Ihre Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht in dieser Zeit beenden können. Besonderer Dank gilt meiner Mama, Blanche Radtke, und meinem Papa, Mike Radtke, die trotz der Entfernung immer erreichbar waren und mich in meinen Entscheidungen unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Auf eine Veröffentlichung des Lebenslaufes wird in der elektronischen Dissertation verzichtet.