Aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Köhling

Beteiligung von KCNQ Kanälen an der myogenen Reaktion kleiner Skelettmuskelarterien

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Eva Stavrakas geb. Diekmann

geboren am 31.07.1978 in Bad Oeynhausen

Löhne, 14.04.2014

urn:nbn:de:gbv:28-diss2015-0148-5

Gutachter 1: Prof. Dr. Rudolf Schubert, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg

Gutachter 2: PD Dr. Timo Kirschstein, Medizinische Fakultät Universität Rostock

Gutachter 3: Prof. Dr. Olaf Grisk, Medizinische Fakultät Universität Greifswald

Tag der Einreichung: 14.04.2014

Tag der Verteidigung: 21.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Autoregulation des Blutflusses 1

1.2 Die myogene Reaktion 1

1.3 Die glatte Muskulatur 2

1.4 Intrazelluläre Signaltransduktionswege 3

1.4.1 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration 3

1.4.2 Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) 4

1.4.3 Proteinkinase C 5

1.4.4 Tyrosinkinase 5

1.4.5 Zytoskelett 6

1.5 Die Membrandepolarisation 6

1.5.1 Nichtselektive Kationenkanäle 6

1.5.2 Spannungsabhängige Kalziumkanäle 7

1.5.3 Chloridkanäle 7

1.5.4 Kaliumkanäle 8

1.5.4.1 Kalziumabhängige Kaliumkanäle 8

1.5.4.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle 9

1.6 Problemstellung 16

2 Material und Methoden 17

2.1 Untersuchungsmodelle 17

2.2 Material 17

2.3 Methoden 18

2.3.1 Die Präparation der A. gracilis bei der Ratte und dem Hamster 18

2.3.2 Einspannen der A. gracilis in der Messkammer 19

2.3.3 Entfernung des Endothels 21

2.3.4 Durchführung der Messung 22

2.3.4.1 Isobare Messung 22

2.3.4.2 Isometrische Messung 22
2.3.5 Versuchsablauf 22
2.3.5.1 Isobare Messung 22
2.3.5.2 Isometrische Messung 26
2.3.6 Chemikalien 27
2.3.7 Statistik 28
3 Ergebnisse 29
3.1 Die Aktivität von KCNQ-Kanälen in Gefäßen mit myogenem Tonus 29
3.2 Wirkung von XE991 und Linopiridin auf isometrische Präparate der Gefäße 30
3.3 Die myogene Reaktion 32
3.4 Modulation der myogenen Reaktion durch Blockade der KCNQ-Kanäle 33
3.4.1 Hemmung der Kanäle durch XE991 33
3.4.2 Hemmung der Kanäle durch Linopiridin 36
4 Diskussion 41
4.1 Diskussion der Methodik 41
4.2 Die Wirkung der KCNQ-Kanal-Inhibitoren XE991 und Linopiridin auf den myogenen Tonus kleinerer Gefäße 44
4.2.1 Verteilung der KCNQ-Kanäle in den Gefäßbetten 44
4.2.2 Inhibitoren der KCNQ-Kanalfamilie 44
4.2.3 Wirkung von XE991 und Linopiridin auf KCNQ-Kanäle 45
5 Zusammenfassung 50
6 Literaturverzeichnis 51
7 Thesen 62
I. Selbstständigkeitserklärung 64
II. Lebenslauf ..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
III. Danksagung 65

Meiner Familie

Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
ChTx	Charybdotoxin
con	Kontrolle
DAG	Diacylglycerin
DEA-NO	2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid-diethylammonium
dia_{40}	Gefäßdurchmesser bei 40mmHg
dia_{80}	Gefäßdurchmesser bei 80mmHg
dia_{120}	Gefäßdurchmesser bei 120mmHg
dia_{max}	maximaler Gefäßdurchmesser
dia_{akt}	Gefäßdurchmesser zu einem bestimmten Zeitpunkt
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraenoidsäure
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
IbTx	Iberiotoxin
IP3	Inositoltrisphosphat
K_{Ca}-Kanäle	kalziumabhängige Kaliumkanäle
K_v-Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle
Lin	Linopiridin
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PKC	Proteinkinase C
TEA	Tetraethylammonium
XE991	10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone

1 Einleitung

1.1 Autoregulation des Blutflusses

Bei der Regulation des Blutflusses einzelner Organe kommt kleinen Arterien und Arteriolen eine besondere Bedeutung zu. In vivo unterliegen sie mannigfaltigen Einflüssen, die auf den Gefäßdurchmesser wirken. Um den Blutfluss so zu regulieren, dass er dem Bedarf angepasst ist, besitzen diese Gefäße insbesondere lokale autoregulatorische Mechanismen zu denen unter anderem die metabolische Kontrolle und die myogene Aktivität gehören. Des Weiteren verfügen diese Gefäße über systemische Kontrollmechanismen wie z.B. einer Regulation des Gefäßtonus über den Sympathikus sowie über vasoaktive Hormone.
Unter myogener Aktivität versteht man ein Zusammenspiel von basalem myogenen Tonus, einer vasomotorischen Aktivität und der myogenen Reaktion in Antwort auf Änderungen des transmuralen Druckes. Letzterer spielt die größte Rolle in der Regulation des Blutflusses und dessen Anpassung an die ständig stattfindenden Veränderungen des systemischen Blutdrucks.

1.2 Die myogene Reaktion

Von Bayliss im Jahre 1902 zum ersten Mal beschrieben, versteht man unter der myogenen Reaktion eine Änderung des Gefäßdurchmessers in Abhängigkeit vom transmuralen Druck. Eine Erhöhung des transmuralen Drucks hat eine Kontraktion des Gefäßes zur Folge, eine Verringerung des transmuralen Drucks führt zu einer Gefäßdilatation. Dieses dient der Konstanthaltung der Perfusion des jeweils nachgeschalteten Versorgungsgebiets der entsprechenden kleinen Arterien bzw. Arteriolen [Bayliss, 1902; Hill et al., 2006]. Als Auslöser der myogenen Reaktion wird eine Erhöhung der Wandspannung angenommen [Schubert und Mulvany, 1999]. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute jedoch noch nicht vollständig geklärt. An dieser Reaktion potenziell beteiligte Strukturen, der dem transmuralen Druck ausgesetzten Gefäßwand lassen sich zunächst in drei Gruppen gliedern: die glatte Gefäßmuskulatur, das Endothel und die freie Nervenendigungen in der Adventitia. Über die Rolle des Endothels liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. So zeigten einige Versuche einen Einfluss des Endothels auf die myogene Reaktion, andere Versuche widerlegten dieses jedoch. Nähere Betrachtungen zeigten, dass die Methode der Entfernung des Endothels einen Einfluss auf die myogene Antwort besitzt. Entfernt man dieses mit chemischen Substanzen

zeigt sich eine signifikante Veränderung des myogenen Tonus. Bei einer vorsichtigen mechanischen Entfernung kann dieser Einfluss jedoch nicht nachgewiesen werden. Folglich zeigten diese Untersuchungen, nach Einsatz adäquater Entfernungsmethoden, dass das Endothel nicht an der Entwicklung der myogenen Reaktion beteiligt ist [Harder et al., 1989; Meininger und Davis, 1992; Eskinder et al., 1990].

Um einen Einfluss der freien Nervenendigungen auf die Ausbildung der myogenen Reaktion zu untersuchen, wurden diese mittels unterschiedlicher Substanzen, wie z.B. einer Kombination von Tetrodotoxin und Phentolamin oder Propranolol und Atropin funktionell ausgeschaltet [Harder, 1984; Osol und Halpern, 1985]. Bei diesen Versuchen wurde kein Unterschied in der Ausbildung der myogenen Reaktion festgestellt, folglich spricht dies gegen eine Beteiligung der freien Nervenendigungen an der myogenen Reaktion.

Auf Grundlage der oben genannten Ergebnisse wird angenommen, dass die myogene Reaktion ausschließlich von den Zellen der glatten Muskulatur entwickelt wird. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Reihe beobachteter Reaktionen der glatten Muskelzellen im Rahmen der myogenen Reaktion, wie z.B. einer Membrandepolarisation, einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und anderer Second Messenger [Schubert und Mulvany, 1999].

Das Ausmaß der myogenen Reaktion eines Gefäßes ist abhängig von der Art des Gefäßes, wie z.B. kleinere Arterien, Arteriolen oder Venen und von dem betrachteten Gefäßbett. Eine weitere Komponente ist der Durchmesser des betrachteten Gefäßes. Sehr kleine bzw. größere Gefäße zeigten eine eher mäßige myogene Reaktion im Vergleich zu mittelweiten Gefäßen. Weiterhin zeigten einige Untersuchungen, dass es auch unterschiedliche myogene Reaktionen innerhalb eines Gefäßbettes bei ähnlichem Gefäßdurchmesser gab. Versuche mit subendocardialen und subepicardialen Schweinearterien zeigten eine schwache myogene Reaktion in der subendocardialen, aber eine starke myogene Antwort in den subepicardialen Arterien [Kou et al., 1988, Schubert und Mulvany, 1999].

1.3 Die glatte Muskulatur

Als wesentlicher Bestandteil der Gefäßwand und Hauptakteur der myogenen Reaktion, kommt der glatten Muskulatur eine besondere Bedeutung zu. Es werden zwei Haupttypen strukturell und funktionell unterschieden: der Single-Unit und der Multi-Unit Typ.

Bei glatter Muskulatur des Single-Unit-Typs werden die einzelnen Zellen über Gap Junctions elektrisch gekoppelt, so dass sie eine funktionelle Einheit bilden [Schmidt et al., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Auflage 29, Kapitel 6.7]

Bei dem Multi-Unit-Typ hingegen kontrahiert jede Zelle unabhängig von der anderen. Die Zellen werden durch vegetative Nervenfasern aktiviert [Schmidt et al. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Auflage 29, Kapitel 6.7].
Für den Gefäßmuskel gilt, dass er Eigenschaften von beiden Haupttypen aufweist.

1.4 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

1.4.1 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration

Vielfache Untersuchungen bestätigen, dass eine Erhöhung des transmuralen Druckes in Gefäßen mit einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums in glatten Gefäßmuskelzellen einhergeht [Zou et al., 1995 und 2000; Knot und Nelson, 1998; Meininger et al., 1991; Yip und Marsh, 1996; Karibe et al., 1997; Van Bavel et al., 1998; Bolz und Pohl, 1996; D`Angelo et al., 1997]. Die Bedeutung des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde durch spezielle Versuche an isolierten Arteriolen der Ratte bestätigt. Bei diesen Versuchen war kein Kalzium extrazellulär anwesend; eine Erhöhung des transmuralen Drucks führte dann nicht zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums und es kam nicht zu einer Ausbildung eines myogenen Tonus [Uchida und Bohr, 1969; Davis und Hill, 1999]. Bei weiteren Versuchen an Hirnarterien der Ratte wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration fixiert. Eine myogene Reaktion war im Druckbereich von 0 bis 80mmHg unter diesen Bedingungen nicht auszulösen [McCarron et al., 1997].
Um die besondere Bedeutung des extrazellulären Kalziums für die myogene Reaktion zu bestätigen, wurde in einer ganzen Reihe von Studien das extrazelluläre Kalzium komplett entfernt. In verschiedenen Geweben und Spezies wurde hierdurch die Ausbildung der myogenen Reaktion verhindert [Osol und Halpern, 1985; Kauser et al., 1991; Wellmann et al., 1996; Hill und Meininger, 1994; Fredericks et al., 1994; Reber und Nowicki, 1998; Wallis et al., 1996; Berczi et al., 1992]. Basierend auf diesen Versuchsergebnissen gilt als gesichert, dass extrazelluläres Kalzium notwendig für die myogene Reaktion ist.
Das extrazelluläre Kalzium kann über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle in die glatte Muskelzelle kommen. Dies scheint bei der myogenen Reaktion der bedeutendeste Weg für den Kalziumeinstrom in die Zelle zu sein. Der Mechanismus der Aktivierung dieser Kanäle ist entweder eine Depolarisation der Zelle oder eine Dehnung der Zellemembran [McCarron et al., 1997]. Unterstützend zu dieser Theorie wurde gefunden, dass bei spezifischer Blockade des spannungsgesteuerten Kalziumkanals eine myogene Reaktion verhindert wird [Harder et al., 1987; Wesselmann et al., 1996]. Des Weiteren wurde bei einigen Versuchen beobachtet, dass dabei nicht nur die myogene Reaktion, sondern auch der Anstieg der intrazellulären

Kalziumkonzentration blockiert wurde [Karibe et al., 1997; VanBavel et al., 1998; Knot und Nelson, 1995]. Wenn jedoch der spezifische Öffner des spannungsgesteuerten Kalziumkanals Bay K 8644 verwendet wurde, sah man bei Versuchen mit der Mesenterialarterie der Ratte eine verstärkte myogene Reaktion [Wesselmann et al., 1996].

Weitere Studien zeigten, dass eine Erhöhung des transmuralen Druckes eine Steigerung der Inositoltrisphosphat (IP3)-Konzentration zur Folge hat [Narayanan et al., 1994]. Über diesen Mechanismus kann Kalzium aus intrazellulären Speichern, dem sarkoplasmatischen Retikulum, freigesetzt werden und somit ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beitragen und damit unterstützend bei der myogenen Reaktion tätig sein.

Mehrere Versuchsreihen zeigten jedoch, dass die Höhe des transmuralen Druckes nicht proportional zur intrazellulären Kalziumkonzentration und der myogenen Reaktion ist. So hat in Versuchen mit Arteriolen des Hamsters ein Vergleich zwischen kleinen und größeren Druckerhöhungen gezeigt, dass letzter eine größere Durchmesseränderung des Gefäßes im steady-state bei ähnlich hoher Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration wie bei der kleinen Druckerhöhung induziert [VanBavel et al., 1998; D´Angelo et al., 1997]. Dies veranlasste die Überlegung, dass es einen weiteren Mechanismus zur Regulation der myogenen Reaktion geben muss. Es wird angenommen, dass dies über eine Modulation der Kalziumsensitivität geschieht [D´Angelo et al., 1997]. Eine Kalziumsensitivierung erfolgt über die Hemmung der Myosinphosphatase; hierdurch kommt es zur Anreicherung phosphorylierten Myosins. So kann es schon bei geringeren Kalziumkonzentrationen zur Ausbildung einer Kontraktion kommen [Schmidt et al., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Auflage 29, Kapitel 6.8].

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration notwendig für die Ausbildung der myogenen Reaktion, jedoch allein nicht ausreichend ist. Dies zeigt, dass es noch andere intrazelluläre Signalwege zur Ausbildung einer myogenen Reaktion geben muss [Schubert und Mulvany, 1999].

1.4.2 Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK)

Die Erhöhung des intrazellulären Kalziumangebots während einer myogenen Antwort führt zu einer Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase. Über die Bindung von Kalziumionen an Calmodulin ändert sich die Konformation des Calmodulins. Diese Konformationsänderung führt zu einem Kalzium-Calmodulin-MLCK-Enzymkomplex und damit zu einer Übertragung von Phosphatgruppen von ATP auf regulatorische leichte Ketten des Myosins. Das

phosphorylorierte Myosin interagiert dann mit Aktin, was eine Kontraktion nach sich zieht [Schmidt et al., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Auflage 29, Kapitel 6.8].
In Bezug auf die myogene Reaktion zeigten Versuche mit Kremasterarteriolen der Ratte einen Anstieg an phosphorylierten Myosinleichtketten nach Druckerhöhung. Außerdem blieb bei der Verwendung eines Inhibitors der MLCK die Aktivität der Kinase sowie die Ausbildung einer myogenen Reaktion aus [Zou et al., 1995 und 2000].

1.4.3 Proteinkinase C

Bei der Abspaltung von Inositoltrisphosphat (IP3) mittels der G-proteinvermittelten Aktivierung der Phospholipase C entsteht aus den Membranphospholipiden auch Diacylglcerol (DAG). Zusammen mit Kalzium aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC). Diese phosphoryliert und aktiviert dann verschiedene Proteine [Schmidt et al., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Auflage 29, Kapitel 2.4].
Durch Inhibition der PKC mittels z.B. Staurosporin und anderer, spezifischer Inhibitoren wurde die Bedeutung der PKC in der myogenen Reaktion untersucht. Versuche mit Hirnarterien der Ratte sowie der Kremasterarterie der Ratte zeigten eine Abschwächung der myogenen Reaktion bei akuter Anhebung des transmuralen Druckes in Anwesenheit dieser Inhibitoren [Osol et al., 1991; Hill et al., 1994]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit menschlichen Koronararterien und Gesichtsvenen der Ratten erzielt [Miller et al., 1997; Laher und Wang, 1989].
Versuche an der Nierenarterie des Hundes zeigten einen durch die Erhöhung des transmuralen Druckes ausgelösten Anstieg der Konzentration von DAG [Narayanan et al., 1994]. Die Erhöhung der Konzentration von DAG als Aktivator der PKC impliziert eine bedeutende Rolle der PKC in der myogenen Antwort.

1.4.4 Tyrosinkinase

Um die Bedeutung von Tyrosinkinasen für die myogene Antwort zu bestimmen, wurden Untersuchungen an der Hirnarterie der Ratte durchgeführt. Es zeigte sich, dass die myogene Reaktion des Gefäßes durch verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren reduziert wurde. Weitere Versuche mit Inhibitoren der Tyrosinphosphatase zeigten eine verstärkte myogene Reaktion [Masumoto et al., 1997]. Spätere Untersuchungen demonstrierten jedoch, dass es in Anwesenheit von Tyrosinkinase-Inhibitoren sowie Tyrosinphosphatase-Inhibitoren zu keiner Änderung der myogenen Antwort sowie des Gefäßtonus kommt. Auch zeigten diese Versuche, dass es nicht zu einer Änderung der basalen Kalziumkonzentration oder zu einem

verminderten intrazellulären Kalziumanstieg nach Erhöhung des transmuralen Druckes kommt [Spurrell et al., 2000]. Weiterhin wurde gefunden, dass ein Anstieg der Menge an phosphorylierter Tyrosinkinase nach einer Druckerhöhung erst mit Verzögerung auftritt [Murphy et al., 2002]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von einer Beteiligung der Tyrosinkinase an der akuten Gefäßreaktion auf Änderung des transmuralen Drucks nicht auszugehen ist.

1.4.5 Zytoskelett

Die Beteiligung des Zytoskeletts an der Ausbildung einer myogenen Antwort eines Gefäßes wurde durch verschiedene Versuchsreihen bestätigt. So konnte eine Aktinpolymerisation während einer Kontraktion von Gefäßen nach Erhöhung des transmuralen Druckes nachgewiesen werden. Wurde die Polymerisation mittels Inhibitoren verhindert, war die Ausbildung der myogenen Antwort bei Erhöhung des transmuralen Druckes gestört [Cipolla et al., 2002; Gokina und Osol, 2002].

1.5 Die Membrandepolarisation

In einer Vielzahl an Versuchen wurde auf eine Erhöhung des transmuralen Druckes eine Membrandepolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet, die ihrerseits mit einer Kontraktion des Gefäßes vergesellschaftet ist [Schubert und Mulvany, 1999; Hill et al., 2006]. Die Membrandepolarisation wird durch Blocker nichtselektiver Kationenkanäle, spannungsabhängiger Kalziumkanäle sowie kalziumaktivierter Kaliumkanäle beeinflusst. Allen diesen Kanälen ist gemein, dass sie auf Dehnung aktivierbar sind [McCarron et al., 1997; Do-pico et al., 1994; Kirber et al., 1992]. Damit könnten sie alle ursächlich an der druckinduzierten Depolarisation der glatten Muskelzellen bei der myogenen Reaktion beteiligt sein.

1.5.1 Nichtselektive Kationenkanäle

In patch-clamp-Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Aktivität der nichtselektiven Kationenkanäle durch Dehnung der glatten Muskelzelle gesteigert werden kann. Es kommt zu einem Fluss von Natrium-, Kalium- sowie Kalziumionen, die eine Depolarisation der Zellmembran bewirken [Davis et al., 1992]. Der Hauptträger der Membrandepolarisation durch nichtselektive Kationenkanäle ist wahrscheinlich der Fluss von Natriumionen [Setoguchi et al., 1997]. Im Gegensatz hierzu steht allerdings das Ergebnis, dass extrazelluläre

Natriumionen nicht notwendig für die Ausbildung einer myogenen Reaktion sind [Watanabe et al., 1996; Nelson et al., 1997].
Weitere Versuche an nichtselektiven Kationenkanälen zeigten, dass durch eine genetische Ausschaltung des TRPC-6-Kanals an bestimmten Gefäßen, wie z.B. der Hirnarterien der Ratte, eine Ausbildung des myogenen Tonus und eine durch Druck induzierte Membrandepolarisation verhindert werden konnte [Welsh et al.; 2002]. Die genaue Bedeutung dieser Kanäle für die myogene Reaktion ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt.

1.5.2 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Eine Aktivierung dieser Kanäle kann potenziell ebenfalls zur Ausbildung einer Membrandepolarisation führen. Versuche an Hirnarterien von Kaninchen und Ratten zeigten jedoch, dass eine vollständige Blockade dieser Kanäle zwar eine Ausbildung der myogenen Reaktion bei einer Erhöhung des transmuralen Druckes verhindert, es aber dennoch zu einer Depolarisation der Plasmamembran kommt [Knot und Nelson, 1995; Knot und Nelson, 1998]. Diese Versuche zeigten, dass eine Beteiligung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen an der Ausbildung einer myogenen Reaktion essenziell ist. Zur Depolarisation der Plasmamembran bei der myogenen Reaktion werden diese Kanäle hingegen nicht benötigt.

1.5.3 Chloridkanäle

Die Aktivierung von Chloridkanälen, die mit einem Fluss von Chloridionen aus der Zelle einhergeht, hat ebenfalls eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge. An diesem Effekt sind zwei verschiedene Typen von Chloridkanälen beteiligt, erstens durch Kalzium aktivierte und zweitens durch Volumenänderung aktivierte Kanäle [Hogg et al., 1994; Large et al., 1996; Nelson, 1998; Yamazaki et al., 1998]. In Versuchen an Hirnarterien der Ratte konnte eine mutmaßliche Beteiligung dieser Kanäle an der myogenen Reaktion gezeigt werden. Hierbei wurde mit verschiedenen Chloridkanalblockern demonstriert, dass die Hirngefäße bei einem Druck von 80mmHg unter Kanalblockade ein verändertes Membranpotential und einen veränderten Gefäßdurchmesser zeigten [Nelson et al., 1997]. Während einer myogenen Reaktion konnten außerdem indirekt Chloridströme gemessen werden. Diese traten jedoch trotz Inhibition mit Chloridkanalblockern auf [Doughty et al., 1998]. Deshalb ist die genaue Bedeutung der Chloridkanäle nach wie vor ungeklärt. Dazu trägt auch der Umstand bei, dass die verwendeten Inhibitoren der Chloridkanäle nicht sehr selektiv sind [Schubert und Mulvany, 1999].

1.5.4 Kaliumkanäle

Das Zellmembranpotenzial in glatter Muskulatur wird durch das Zusammenwirken nichtselektiver Kationen- und spannungsabhängiger Kalium- und Kalziumkanäle bestimmt [Nelson et al., 1990]. Durch einen Kaliumausstrom aus der Zelle durch einen aktiven Kaliumkanal und Kalzium- bzw. Natriumeinstrom in die Zelle durch nichtselektive Kationenkanäle und/oder spannungsabhängige Kalziumkanäle [Smirnov et al., 2003] wird das Ruhemembranpotenzial der Zelle aufrechterhalten. Bis jetzt wurden vier verschiedene Klassen von Kaliumkanälen in glatten Muskelzellen beschrieben: kalziumabhängige, spannungsabhängige, ATP-sensitive sowie einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle [Nelson et al., 1995; Korovkina und England, 2002; Quayle et al., 1997; Standen und Quayle, 1998]. Die Expression dieser Kanäle ist sehr unterschiedlich in den einzelnen Gefäßbetten und unter anderem auch abhängig von der Größe des Gefäßes in einem Gefäßbett [Archer et al., 1996; Smirnov et al., 2002]. Jedoch sind spannungs- und kalziumabhängige Kaliumkanäle in nahezu allen Gefäßgebieten zu finden. Sie kontrollieren das Membranpotential und nehmen dadurch Einfluss auf den myogenen Tonus und die myogene Kontraktion [Nelson et al., 1995; Smirnov et al., 2003].

1.5.4.1 Kalziumabhängige Kaliumkanäle

Man unterscheidet drei Subtypen des kalziumabhängigen Kaliumkanals, einen mit großen (BKCa), mittleren (IKCa) und kleinem Leitwert (SKCa). Der große Kanal ist hauptsächlich in den glatten Muskelzellen vertreten [Félétou, 2009].

Um die Funktion des kalziumabhängigen Kaliumkanals großer Leitfähigkeit für die Gefäßaktivität zu bestimmen, wurden Versuche mit Blockern dieses Kanals wie TEA, Charybdotoxin (ChTx) und Iberiotoxin (IbTx) durchgeführt. IbTx ist ein selektiver Antagonist dieses Kanals. Zum Beispiel zeigten Versuche an Koronararterien der Ratte sowie Zerebralarterien des Schafes eine Kontraktion nach IbTx-Gabe. Als Folgerung aus den Versuchen wurde festgestellt, dass der kalziumabhängige Kaliumkanal das Membranpotenzial während des Ruhezustandes kontrolliert [Marijic et al., 2001; Long et al., 2000]. Sie ermöglichen außerdem eine Rückkopplungsregelung bei erhöhtem intrazellulärem Kalzium und einer Membrandepolarisation, d.h. bei einer Gefäßkontraktion [Eichhorn und Dobrev, 2007] und spielen damit auch eine wichtige Rolle in der Regulation der myogenen Reaktion [Brayden und Nelson, 1992]. Sie wirken über einen auswärtsgerichteten Kaliumstrom, welcher dann zu einer Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzelle führt.

Die Funktion des Kanals ist dynamisch und unterliegt mannigfaltigen Einflüssen durch Gefäßdilatatoren und -konstriktoren. Der Kanal wird im Besonderen durch Proteinkinasen reguliert, z.B. über eine Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase, die eine wichtige Rolle für die über NO ausgelöste Relaxation der Gefäße spielt [Standen und Quayle, 1998; Schubert und Nelson, 2001]. Adenosin und β-Adrenorezeptoragonisten können den kalziumabhängigen Kaliumkanal über cAMP-abhängige und -unabhängige Mechanismen aktivieren [Lou et al., 2006; Matsushita et al., 2006]. Eine Stimulation der Proteinkinase A über cAMP aktiviert den Kanal über eine Phosphorylierung des Kanals [Lou et al., 2006].

1.5.4.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Kontraktionszustandes der glatten Muskelzelle durch ihren Effekt auf das Membranpotenzial.
Sie gehören zu der 6-Transmembrandomäne-1-Pore-Strukturklasse. Diese Klasse ist unterteilt in 12 Subfamilien mit jeweils mehreren Mitgliedern. Allen Kanälen dieser Klasse ist gemein, dass sie aus mehreren Proteinuntereinheiten bestehen, einer α- und einer/mehreren akzessorischen Untereinheit.
Die Architektur der α-Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Domänen (S1 – S6) sowie einer Schleifendomäne (P), die die Kanalpore zusammen mit den Domänen S5 und S6 bildet. Intrazellulär gelegen sind die durch die Carboxy- sowie die Aminogruppe abgeschlossenen zwei Enden der Kanaluntereinheit. Die Domäne S4 ist diejenige, die als Sensor der Spannung angesehen wird. Die Domäne S4 besteht hauptsächlich aus basischen Aminosäuren, die anderen Segmente S1 bis S3 sowie S5 und S6 aus hydrophoben Aminosäuren. Die Domäne S4 induziert bei Depolarisation die Öffnung des Kanals und ermöglicht so den Fluss von Kaliumionen durch die Kanalpore. Die Pore entsteht durch Anordnung von 4 α-Untereinheiten zu einem Tetramer und wird aus dem jeweiligen Segmenten S5 und S6 gebildet.

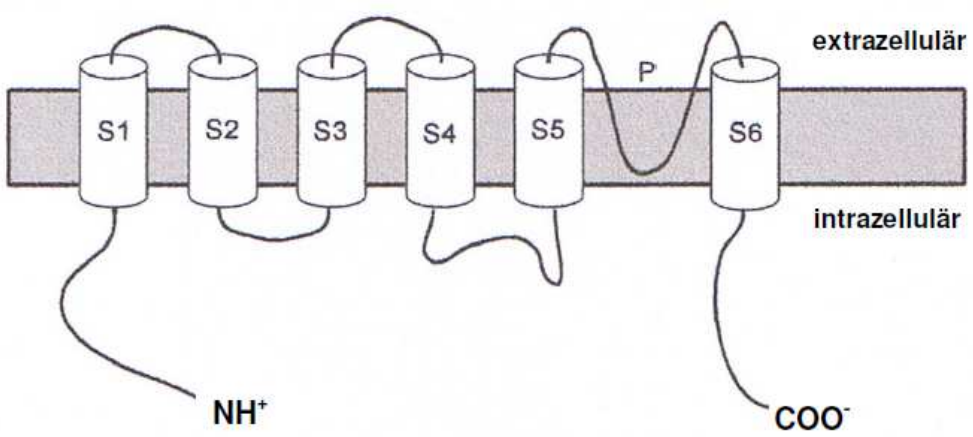

Abbildung 1-1 Aufbau einer α-Untereinheit eines spannnungsabhängigen Kaliumkanals modifiziert nach Cox, R.H. (2005) „Molecular Determinants of Voltage-Gated potassium Currents in Vascular Smooth Muscle."

Funktionelle Kaliumkanäle bestehen aus vier identischen oder beinahe identischen α-Untereinheiten [Yu et al., 1996; Cox, 2005]. Das menschliche Genom kodiert mehr als siebzig Gene für spannungsabhängige Kaliumkanäle [Coetzee et al., 1999]. Jedoch konnten bis heute durchgehend nur Mitglieder einiger K_v-Familien, K_v1-K_v4 und K_v7, in vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, zusammen mit Vertretern der K_vβ-Familie. Die Kombinationsmöglichkeiten der K_vα- und K_vβ-Unterfamilien ist groß [Xu und Li, 1998; Cox, 2005]. Hieraus resultiert, dass der genaue Aufbau von funktionalen K_v Kanälen in glatten Muskelzellen schwer zu entschlüsseln ist. Je nach Gefäßbett, Größe des Gefäßes und Spezies ist die Zusammensetzung der Kanäle aus α- und β-Untereinheiten sehr unterschiedlich [Cox, 2005].

Es wurden drei verschiedene Typen von akzessorischen Untereinheiten beschrieben, die K_vβ-Untereinheit, inaktive K_vα-Untereinheiten sowie andere Zellproteine, u.a. Proteine aus der Familie der kalziumbindenden Proteine [Li und Adelman, 2000]. Innerhalb der K_vβ-Untereinheit werden wiederum drei Familien beschrieben, K_vβ1-3. Die β–Untereinheit bindet an das intrazellulär gelegene Amino-Ende der α-Untereinheit. Die Interaktion der K_vβ-Untereinheit mit den K_vα-Untereinheiten führt in manchen Fällen zu einer Inaktivierung der K_vα-Untereinheit, in anderen Fällen jedoch zu einer Aktivierung [Accili et al., 1997; Morales et al., 1995; Heinemann et al., 1996]. Durch die K_vβ-Untereinheit wurde in einigen Fällen eine vermehrte, in anderen Fällen eine verminderte Expression von α-Untereinheiten induziert [Accili et al., 1997; Cox, 2005].

Zu den β-Untereinheiten gehört auch die Familie KCNE, welche vielfach Bindungen mit den α-Untereinheiten eingehen und deren Funktion modifizieren. Es werden fünf Mitglieder der KCNE-Familie beschrieben, KCNE 1-5. KCNE-Proteine besitzen ein Transmembransegment und ein intrazelluläres Carboxyl-Ende sowie ein extrazelluläres Amino-Ende.

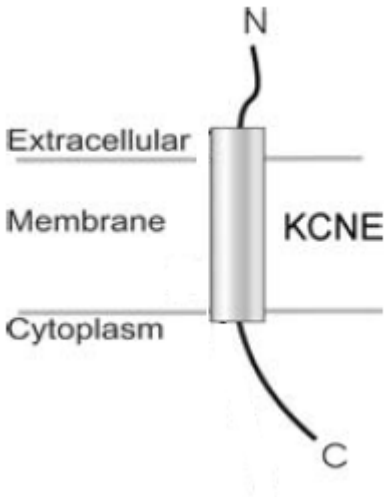

Abbildung 1-2 Aufbau der KCNE-Untereinheit modifiziert nach Bett et al.; (2006) „Ancillary subunits and stimulation frequency determine the potency of chromanol 293B block of the KCNQ1 potassium channel."

Die inaktiven oder auch stillen K_vα-Untereinheiten zählen ebenfalls zu den akzessorischen Untereinheiten. Sie gehen in Bindung mit den Klassen K_v2.1 und K_v2.2 und modifizieren deren Funktion.

Die interagierenden Proteine sind auch als sogenannte K_v-Kanal interagierende Proteine (KChIP) bekannt. Sie besitzen eine Größe von 216 bis 256 Aminosäuren und haben ein festes Carboxylende [An et al., 2000]. Sie erhöhen die Stromdichte, verändern die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und beschleunigen die Erholungsphasen [An et al., 2000]. Weiterhin wurde ein Kaliumkanal-assoziiertes Protein (KChAP) beschrieben, welches die Expression von K_v2-Untereinheiten, sowie von K_v1.3 und K_v4.3 erhöht [Nakamura et al., 2001].

Wie in Bezug auf die Variation in der Genexpression zu erwarten, gibt es in der Pharmakologie der K_v-Kanäle Unterschiede. Die Substanzen 4-Aminopyridine (4-AP) und Tetraethylammonium (TEA) beispielsweise haben eine hemmende Wirkung auf diese Kanäle, jedoch ist diese Wirkung in den einzelnen Subfamilien unterschiedlich ausgeprägt.

1.5.4.2.1 KCNQ-Kanäle

Die in dieser Arbeit untersuchten Kanäle gehören zur K_v-Familie, es geht um die K_v7 oder auch KCNQ-Kanäle. Es werden fünf Gene beschrieben, KCNQ1-5. Entdeckt wurden diese Kanäle im Zusammenhang mit Erbkrankheiten. Das long-QT-Syndrom Typ Romano-Ward-Syndrom entsteht u.a. durch eine Mutation im KCNQ1-Kanal und führt zu einem verlängertem Aktionspotential im Herzmuskel.

Die Struktur der α-Untereinheit der KCNQ-Kanäle weist wie alle K_v-Kanäle sechs Transmembrandomänen und eine P-Schleife auf. Das vierte Transmembransegment ist das spannungssensitive. Wie bei allen spannungsabhängigen Kaliumkanälen liegen das C- und N-Terminal intrazellulär. Alle KCNQ-Kanaluntereinheiten sind in der Lage in vitro homomere Kanäle zu bilden, heteromere Verbindungen sind auf einige wenige Kombinationen beschränkt [Dedek, 2003].

Die Verteilung der einzelnen KCNQ-Kanaluntereinheiten in verschiedenen Organen ist unterschiedlich. Die fünf Typen wurden zunächst in Säugetierzellen entdeckt und vornehmlich dem zentralen Nervensystem sowie dem Herzen zugerechnet. Erst kürzlich wurden diese Kanäle auch in glatten Muskelzellen gefunden. Ohya et al. waren die ersten, die KCNQ-Kanäle in glatten Muskelzellen der Portalvene der Maus identifizierten [Ohya et al., 2003]. Sie fanden eine vergleichbare Expression von KCNQ1, KCNQ4 und KCNQ5 in der Portalvene der Maus wie im Bereich des Herzens [Ohya et al., 2003]. RT-PCR und Immunzytochemie zeigten ebenfalls das Vorkommen von KCNQ4 und KCNQ5 in der Portalvene der Maus [Yeung et al., 2008]. In einer Studie untersuchten Yeung et al. die Genexpression von KCNQ-Kanälen in verschiedenen Gefäßen, z.B. in der thorakalen Aorta, der A.carotis und der A.femoralis der Maus. Hier wurde die Expression von KCNQ1 und KCNQ4 sowie KCNQ5 nachgewiesen [Yeung et al., 2007]. Die Expression der β-Kanaluntereinheiten KCNE scheint spezifisch für ein Gefäß zu sein. So wurde KCNE4 im Vergleich zu den anderen KCNE-Untereinheiten reichlich im Bereich der Aorta der Maus nachgewiesen, hingegen im Bereich der Portalvene der Maus fanden sich KCNE3 und KCNE5 [Ohya et al., 2002, Yeung et al., 2007].

Der KCNQ1-Kanal wird der langsamen Komponente des verzögert, gleichrichtenden Kaliumstroms der Herzmuskelzellen zugerechnet. Jedoch zeigten weitere Versuche diese Kanalfamilie betreffend, dass der Kanal ebenso in glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta, der A. carotis und A. femoralis der Maus vorkommt [Yeung et al., 2007]. Brueggemann et al. demonstrierten dann sein Vorkommen auch in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Ratte

[Brueggemann et al., 2007]. KCNQ1 geht Verbindungen u.a. mit KCNE1 und 3 ein. KCNE1 findet man vornehmlich im Bereich der Herzmuskulatur. Mutationen im KCNQ1- und KCNE1-Gen führen zur Ausbildung einer Arrhythmie [Chen et al., 2009]. Jedoch bildet KCNQ1 keine heterologen Verbindungen mit anderen Mitgliedern der KCNQ Familie [Brueggemann et al., 2011]. Versuche mit Flurpirtin und Retigabine, Substanzen, die auf KCNQ2-KCNQ5 wirken, jedoch nicht auf KCNQ1, zeigten eine Erhöhung der KCNQ-Ströme und eine Dilatation der Gefäßwand. Es wird daher vermutet, dass eher KCNQ4 und KCNQ5 eine wichtige Rolle in der Kontraktilität von Gefäßen spielen als KCNQ1 [Brueggemann et al., 2011]. Kürzlich führten Chadha et al. Versuche mit drei verschiedenen Gefäßabschnitten der Ratte durch, Mesenterialarterien, intrapulmonalen Arterien und der thorakalen Aorta. Ihr Bestreben war es, die Rolle von KCNQ1 für die Reaktivität von glatten Gefäßmuskelzellen aufzuzeigen. Versuche mit den selektiven KCNQ1-Inhibitoren L-768,673, HMR1556 und JNJ282 zeigten keinen Effekt auf das Ruhemembranpotenzial der Zellen im Vergleich zur Gabe von Linopirdin [Chadha et al., 2012]. Jedoch können sie zu einer Verstärkung der Dilatation von Gefäßen beitragen, wie Versuche mit selektiven Öffnern der KCNQ1-Kanäle zeigten [Chadha et al., 2012].

Bisher konnten noch keine Versuche das Vorkommen von KCNQ2 und KCNQ3 in glatten Gefäßmuskelzellen zeigen. Diese Kanäle sind spezifisch für das zentrale Nervengewebe. Ihre Verteilung im Nervengewebe ist jedoch unterschiedlich. So kommt KCNQ2 in Geweben mit dopaminergen und cholinergen Neuronen vor. KCNQ2 und 3 können auch Verbindungen untereinander ausbilden, allerdings bilden sie auch heterologe Kanäle mit z.B. KCNE-Proteinen und KCNQ4. Mutationen im Bereich dieser Kanäle gehen mit der Ausbildung von Krankheiten, bestimmten Formen der Epilepsie, einher.

Für die KCNQ4-Expression gilt eine Bevorzugung in Zellen des Innenohrs und des Hörnervs. Neuere Versuchsreihen belegten jedoch auch hier, wie schon weiter oben erwähnt, dass ein Vorkommen in glatten Muskelzellen einzelner Abschnitte von Gefäßbetten vorliegt [Ohya et al., 2003; Yeung et al., 2007]. Weiterhin zeigten Joshi et al. eine Expression in der Pulmonalarterie der Ratte, die stärker als die Expression von KCNQ1 und KCNQ5 in dieser Arterie war [Joshi et al., 2009]. Eine neuere Studie der Arbeitsgruppe um Jepps zeigt das Vorkommen von KCNQ4 im Bereich der thorakalen Aorta, der A. mesenterica superior und der Koronarien der Ratte sowie im Bereich der A. mesenterica der Maus [Jepps et al., 2011]. Sie demonstrierten auch eine Verminderung der Expression von KCNQ4 bei hypertensiven Ratten im Vergleich zu normotensiven Ratten des selben Stammes. Zu gleichen Ergebnissen kamen sie bei einer Versuchsreihe mit der Mesenterialarterie von normotensiven Mäusen im

Vergleich zu Mäusen mit einem sekundären, durch Angiotensin-II induziert Hypertonus. Die Ursache der verminderten Expression von KCNQ4 ist jedoch bisher nicht geklärt.
KCNQ5-Kanäle sind weit verbreitet in Nervenzellen und im Skelettmuskel. Yeung et al. zeigten, dass der KCNQ5-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen vieler Organe vorkommt [Yeung et al., 2008]. So fanden sie ihn im Bereich der thorakalen Aorta, der A. carotis, der A. femoralis und der A. mesenterica bei der Maus. Auch im Bereich der Mesenterialarterie der Ratte fand sich KCNQ5 [Mackie et al., 2008, Joshi et al., 2009] sowie in der A. pulmonalis der Ratte [Joshi et al., 2009]. In glatten Muskelzellen wird durch eine Spleißform, der das Exon 9 in der mRNA fehlt, ein funktionaler Kanal gebildet.
Es ist noch ungeklärt, ob eine homologe Form von KCNQ4 oder KCNQ5 oder eine heterologe Form von KCNQ4/5 die Funktion in der Gefäßmuskelzelle übernehmen [Brueggemann et al., 2011].

Es gibt viele Publikationen zur Funktion der KCNQ-Kanäle im Bereich des zentralen Nervensystems und des Herzens. Im Bereich der glatten Muskelzellen ist dieser Kanal bisher vergleichsweise weniger gut untersucht. Ein Grund war zunächst das Fehlen eines selektiven Kanalsblockers [Yeung und Greenwood, 2005]. Mit den Substanzen Chromanol 293B, Linopiridin und XE991 gibt es nun aber relativ selektive Antagonisten der KCNQ-Familie.

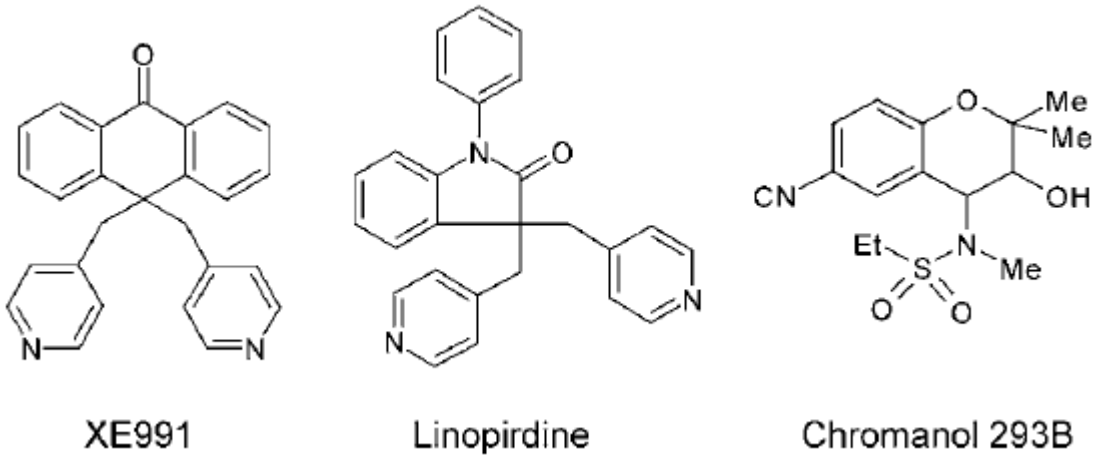

Abbildung 1-33 Aufbau spezifischer KCNQ-Antagonisten modifziert nach Yeung,S.Y.M & Greenwood, I.A.(2005) „KCNQ currents in murine portal vein smooth muscle“.

In Versuchen, in denen die KCNQ-Kanäle durch XE991 und Chromanol 293B blockiert wurden, zeigten Yeung und Greenwood, dass diese KCNQ-Kanäle einen Beitrag zur

Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials leisten [Yeung und Greenwood, 2005]. Hierzu untersuchten sie das Verhalten der Portalvene der Maus.
Yeung et al. bestimmten die benötigte Dosis von XE991 und zeigten, dass die IC_{50} bei ca. 1-5µmol/l für die Kanäle KCNQ1-4 liegt. Für den Kanal KCNQ5 liegt die IC_{50} bei ca. 75µmol/l [Yeung et al., 2007; Yeung et al., 2008]. Bisher ist noch kein Effekt von XE991 auf K_v1.2, K_v4.3oder EAG-Kanäle für Konzentrationen unter 100µmol/l nachgewiesen [Wang et al., 2000]. XE991 ist in den Dosen, die die KCNQ-Kanäle blockieren, selektiv, es ist bisher noch nicht ausreichend untersucht, ob XE991 in höheren Dosen auch auf andere Ionenkanäle wirkt.
Linopiridin gilt als der weniger potente Inhibtor im Vergleich mit XE991.

1.5.4.2.2 Die Rolle der spannungsabhängigen Kaliumkanäle in der myogenen Reaktion

Die K_v-Kanal Familie ist essentiell für die normale Funktion von Gefäßen [Smirnov et al., 2003]. Ihnen wird eine Aufgabe je nach Gefäßbett nachgesagt, in manchen haben sie die Kontrolle über Kontraktionsmechanismen, agieren dabei häufig als negative Rückkopplung, in anderen regulieren sie das Ruhemembranpotenzial oder vermitteln Gefäßdilatationen.
Nach Öffnung eines K_v-Kanals strömt Kalium aus der Zelle aus, es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle. Diese Hyperpolarisation löst eine Kaskade an Reaktionen aus, insbesondere vermindert sich der Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Zelle und es kommt zu einer Gefäßdilatation. Wenn K_v-Kanäle inhibiert werden, kommt es zu einer Depolarisation der Zelle, einem Anstieg des intrazellulären Kalziums und damit einhergehend einer Vasokonstriktion.

Durch Versuche mit verschiedenen Inhibitoren des K_v1-Kanals und in jüngster Zeit auch mit einer dominant negativen K_v1.5-Mutante, zeigte sich, dass K_v1-Kanäle die myogene Reaktion im Sinne eines negativen Feedbacks abschwächen [Knot et al., 1995; Plane et al., 2005; Chen et al., 2006]. Auch zum K_v2-Kanal gibt es Vermutungen, dass dieser Kanal auf die myogene Reaktion einwirkt, wie Amberg et al. in Versuchen mit dem Inhibitor Stromtoxin, welcher selektiv für den K_v2-Kanal ist, an der mittleren Zerebralarterie der Ratte zeigten [Amberg et al., 2006]. Neuere Publikationen bezüglich der Rolle von K_v2-Kanälenbei der myogenen Reaktion von K_v2 von Zhong et al. demonstrierten, dass dieser Kanal die myogene Reaktion in der Druckspanne von 10mmHg bis 100mmHg abschwächt [Zhong et al., 2010; Zhong et al., 2010].

1.6 Problemstellung

Es ist bekannt, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, insbesondere K_v1- und K_v2-Kanäle, an der Ausbildung einer myogenen Reaktion beteiligt sind. Welche Rolle jedoch KCNQ-Kanäle dabei spielen, ist noch weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle der KCNQ Familie an der Regulation der myogenen Reaktion beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmodelle

Die folgende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der myogenen Reaktion an einem vereinfachten Modell. Dazu wurde das komplexe Modell des Organismus auf ein isoliertes Gefäßpräparat mit seinen drei wichtigen funktionellen Bestandteilen reduziert. Unter letztem versteht man die glatten Muskelzellen, die freien Nervenendigungen und das Endothel. Bei solchen Versuchen unterscheidet man den isobaren von dem isometrischen Versuchsaufbau. Für diese Arbeit wurden Versuche sowohl an isobaren als auch an isometrischen Gefäßpräparaten vorgenommen.

2.2 Material

Für einen Teil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Ratten vom Wistar - Stamm eingesetzt, wobei ausschließlich männliche Tiere im Alter von 16-25 Wochen mit einem Gewicht von 350-400g verwendet wurden. Die Tiere befanden sich bei einer Raumtemperatur von 22°C in Käfighaltung. Der Tagesablauf wurde an einen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei kontinuierlicher Versorgung mit Futter und Wasser angepasst. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels mechanischer Betäubung und anschließender Durchtrennung der Halswirbelsäule. Der Tod trat unmittelbar ein.
Für einen weiteren Teil der Untersuchungen dieser Arbeit wurden Hamster der Art „syrische Hamster“ verwand. Die Tiere waren um 158 Tage alt und wogen zum Zeitpunkt des Versuches zwischen 150-200g. Die Tiere befanden sich analog zu den Ratten in einer Käfighaltung bei einer Raumtemperatur von 22°C. Der Tagesablauf wurde an einen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei ebenfalls kontinuierlicher Versorgung mit Futter und Wasser angepasst. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels Durchtrennung der Halswirbelsäule nach vorheriger Narkotisierung.
Für die Gefäßpräparation der Ratte wurde im Vorfeld das Tierfell im Bereich des Abdomens, der Hüfte und des überwiegend medialen Anteils des Hinterlaufs entfernt. Der Hinterlauf der Ratte wurde im Bereich des Hüftgelenkes isoliert und in eine Präparierkammer überführt und hier befestigt. Hier konnte mit der Präparation der A. gracilis begonnen werden. Die Arterie ist ein Ast der A. femoralis, die zunächst oberflächlich unter der Muskelfaszie verläuft, um dann unterhalb des M. gracilis in tiefere Schichten einzudringen. Bei vollständiger Relaxation des Gefäßes beträgt der Durchmesser im Mittel zwischen 200 bis 300µm.

Bei den Hamstern wurde in einer ähnlichen Weise das Tierfell entfernt. Zur anschließenden Abtrennung des Hinterlaufs wurde dieser ebenfalls im Hüftgelenk durchtrennt und in eine Präparationskammer überführt und befestigt. Der Verlauf der A. gracilis und deren Präparation ist ähnlich dem der Ratte und wird hier nicht gesondert erläutert. Der Durchmesser des Gefäßes bei voll relaxiertem Zustand beträgt zwischen 250 und 320µm.

2.3 Methoden

Als Modell wurden sowohl isobare als auch isometrische Gefäßpräparate in der vorliegenden Arbeit verwand.

2.3.1 Die Präparation der A. gracilis bei der Ratte und dem Hamster

Die Präparation der Arterien fand in einer gekühlten Kammer bei einer Temperatur um 4°C und einem pH-Wert von 7,3 statt. Es kam eine physiologische Salzlösung mit folgender Zusammensetzung zum Einsatz: 145 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH_2PO_4; 1,0 mM Mg SO_4; 0,1 mM $CaCl_2$; 0,023 mM EDTA und 5 mM HEPES. Zur Präparation wurden zwei feine Pinzetten des Typs Dumont Nr. 5 und eine Irisschere verwendet.

Die Präparation des Gefäßes begann mit der Eröffnung der Muskelfaszie, unter der sich die Arterie befindet. Dazu wurde die Faszie vorsichtig mit der Pinzette angehoben und mittels Schere durchtrennt. Die Arterie verläuft in Begleitung der V. gracilis und zieht mit ihr unterhalb des M. gracilis in die Tiefe. Für die vorliegenden Experimente war es notwendig einen Gefäßabschnitt zu erhalten, der möglichst keine Aufzweigungen aufwies, da diese Schwierigkeiten, wie z.B. ein undichtes Gefäß während des Versuche mit sich zögen. Zum Teil war es notwendig, Bereiche des Gefäßes unterhalb des Muskels zu verwenden. Dazu wurde die Gefäßstraße vorsichtig von dem Muskel befreit und ein Abschnitt ohne Abgänge aufgesucht. Die Arterie wurde anschließend von dem dicht an ihr liegenden Bindegewebe und der Vene befreit und ein Abschnitt entnommen.

Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass die Arterie nicht verletzt wurde und auch nicht mit den Instrumenten in Kontakt trat. Da Arterien insbesondere auf Zug empfindlich reagieren, empfiehlt es sich, das Gefäß vorsichtig vom Bindegewebe und der Vene zu befreien, möglichst ohne es dabei zu berühren, da sonst die kontraktilen Eigenschaften der Arterie beeinträchtigt werden.

Die Präparation der Gefäße des Hamsters erfolgte in gleicher Art und Weise wie die der Ratten. Nach Befestigung des Schenkels in der gekühlten Präparierkammer wurde diese ebenfalls mit physiologischer Salzlösung gefüllt. Die Unterschiede zur Präparation bei der

Ratte beziehen sich nur auf einige anatomische Differenzen, so wie die größere Muskelmasse bei aber ansonsten kleineren Verhältnissen des Körpers. Auch hier musste sehr sorgsam und vorsichtig gearbeitet werden. Nach Entfernen des Bindegewebes und des Muskels lag ähnlich wie bei der Ratte die Gefäßstraße frei. Auch hier empfiehlt es sich, die Vene von der Arterie vorsichtig zu entfernen und danach die Arterie von dem sie umgebenden Bindegewebe zu befreien. Anschließend wurde auch hier ein Präparat entnommen und in die vorbereitete Messkammer überführt.

2.3.2 Einspannen der A. gracilis in der Messkammer

Nach abgeschlossener Isolierung der Arterie in der Präparierkammer wurde die Messkammer vorbereitet. Dazu wurden zwei Glaspipetten in die Kammer eingespannt und diese austariert. Die beiden Pipetten sollten in etwa auf einer Ebene liegen, so dass es zu keinerlei Veränderungen der kontraktilen Eigenschaften der Gefäßmuskulatur durch eventuelle Zugkräfte kommt. Aus Borosilikat-Glaskapillaren wurden mittels der Narishige PC-10, einem Pipettenziehgerät, Pipetten hergestellt. Dabei wurden die Glaskapillaren im Ziehgerät befestigt und in der Mitte über einen Glühdraht erwärmt, so dass sich die Kapillaren auseinander zogen und in der Mitte dünner wurden, um dann zu brechen. Der Durchmesser der Pipettenspitzen betrug ca. 100µm. Die Pipetten wurden an den Bruchenden über einer Heizwendel abgerundet, so dass das empfindliche Gefäß beim Aufziehen nicht verletzt werden konnte. Opthalmologischen Fäden (Prolene, Ethicon 10-0), je zwei pro Glaspipette wurden in der Messkammer angebracht. Die Knoten mittels derer das Gefäß befestigt wird, wurden vorbereitet, so dass nach Anbringen des Gefäßes nur noch wenig am Gefäß manipuliert werden muss. In der Messkammer befand sich physiologische Versuchslösung mit folgender Zusammensetzung: 120 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH_2PO_4; 1,6 mM CaCl; 1,0 mM $MgSO_4$; 0,025 mM EDTA; 5,5 mM Glukose; 26 mM $NaHCO_3$ und 5 mM HEPES. Der pH-Wert betrug 7,4.

Die A. gracilis wurde aus der Präparierkammer entnommen und in die Messkammer eingebracht. Zuerst wurde eines der Gefäßenden mittels zweier Pinzetten auf die Kapillare gezogen und mit den Fäden befestigt. Das freie Ende des Gefäßes wurde mittels zweier Pinzetten vorsichtig geöffnet. Über ein von außen zur Glaskapillare hinführendes Schlauchsystem wurde dann mittels einer Spritze das Gefäß mit Versuchslösung durchspült, um es von eventuell noch enthaltenem Blut zu reinigen. Dabei sollten keine Luftblasen in das Gefäß gelangen, damit das Endothel nicht geschädigt wird. Das freie Ende wurde dann auf die

zweite Pipette aufgezogen und mit zwei weiteren Fäden befestigt. Die Messkammer wurde nun zum Messplatz überführt und dort mit dem Versuchsvorlauf begonnen.

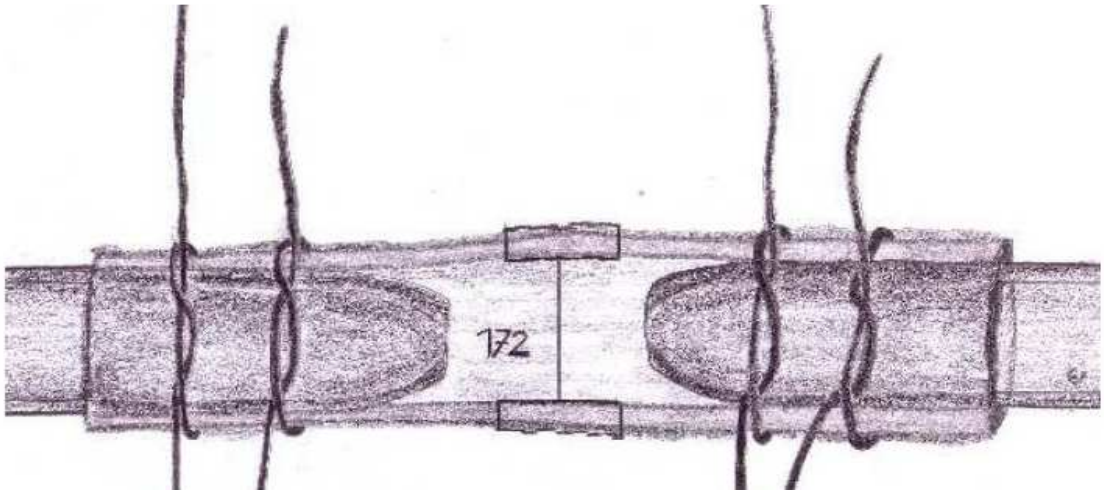

Abbildung 2-1: Darstellung eines kanülierten Gefäßsegments; Abbildung modifiziert nach E.Uhlig „Modulation der myogenen Reaktion kleiner Arterien durch den Kaliumkanalblocker BDS-1“ (2010).

Für Versuche am isometrischen Myographen wurde das isolierte Gefäß ebenfalls von der Präparierkammer in die Messkammer überführt, die zuvor mit physiologischer Versuchslösungen obengenannter Zusammensetzung, gefüllt wurde. Die Vorbereitung der Messkammer vor der Überführung des Gefäßes beinhaltete das Schneiden zweier Drähte. Einer dieser Drähte wurde an einer Seite der Messvorrichtung mittels einer Schraube befestigt. Über das Lumen des Gefäßes wurde dieses auf den Draht gefädelt. Der zweite Draht wurde ebenfalls durch das Lumen des Gefäßes geschoben und mit einer Schraube fixiert. Die noch freien Enden der Drähte wurden am distalen Ende des Gefäßes auch über je eine Schraube befestigt, so dass das Gefäß auf den beiden Drähten fixiert war.
Da die Messkammer über zwei Messvorrichtungen verfügte, wurde in der zweiten Vorrichtung auf gleiche Weise ein zweites Gefäßpräparat befestigt.

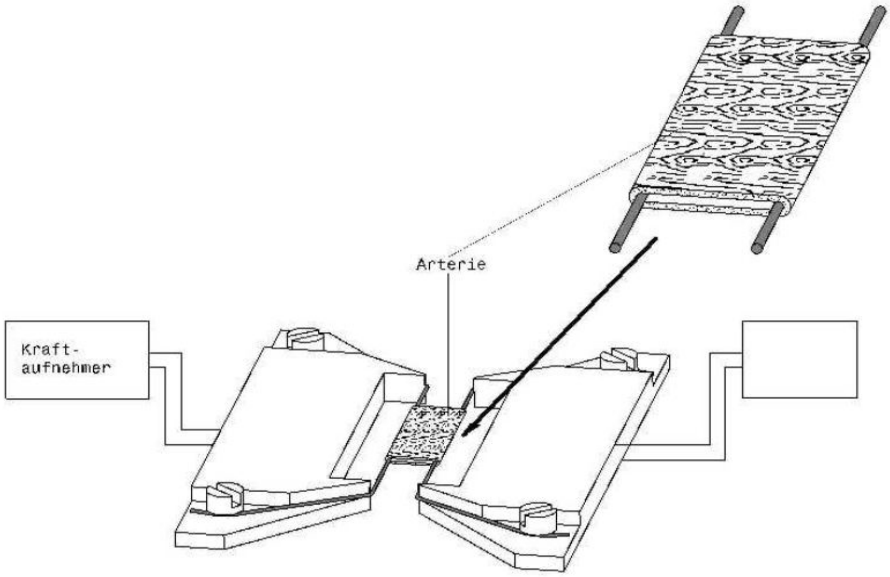

Abbildung 2-2: Aufgespanntes Gefäßsegment im isometrischen Myografen; Abbildung modifiziert nach E.Uhlig „Modulation der myogenen Reaktion kleiner Arterien durch den Kaliumkanalblocker BDS-1“ (2010).

2.3.3 Entfernung des Endothels

Bei den Messungen mit Hilfe des isometrischen Myographen wurden je nach Versuchsprotokoll parallel Messungen mit intaktem und entferntem Endothel unternommen. Die Endothelentfernung wurde mittels eines Rattenbarthaares, das durch das Lumen des Gefäßes eingeführt wurde, durchgeführt. Auf chemische Methoden zur Entfernung des Endothels wurde verzichtet. Hierbei war ebenfalls darauf zu achten, dass das Gefäß nicht weiter beschädigt wurde. Der Erfolg der Entfernung des Endothels wurde durch die Abwesenheit der Reaktion auf Acetylcholin nachgewiesen.

Bei den isobaren Messungen wurde das Endothel unter zu Hilfenahme einer Luftblase entfernt. Hierbei wurde die eine Seite des Gefäßes auf die Pipettenspitze aufgezogen und befestigt und dann eine Spritze am anderen Ende der Pipette über ein Schlauchsystem mit Luer-Lock-Anschluss angebracht, so dass eine Luftblase durch das Gefäß geschickt werden konnte. Auch hierbei wurde auf chemische Zusätze verzichtet und das Endothel ausschließlich durch Luft geschädigt. Danach wurde das Gefäß erneut mit Versuchslösung durchspült.

2.3.4 Durchführung der Messung

2.3.4.1 Isobare Messung

Bei diesem Versuchsprotokoll war der zu bestimmende Parameter der Innendurchmesser des Gefäßlumens. Seine Bestimmung erfolgte über die Nutzung eines inversen Mikroskops (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), das das Gefäß abbildete. Über eine CCD-Kamera wurde das Bild aufgenommen und an einen Computer übertragen. Die Verarbeitung der aufgenommenen Daten erfolgte mittels Framegrabber-Karte. Die Bilder wurden digitalisiert und durch ein speziell entwickeltes Computerprogramm bearbeitet. Hierdurch wurde eine kontinuierliche Messung des Gefäßdurchmessers möglich gemacht. Für die Messung waren die Kontrastunterschiede zwischen Gefäßlumen und Gefäßwand nützlich, da diese beim Übergang von Lumen zur Wand besonders ausgeprägt sind. Ein Messalgorithmus, welcher mit an das zu untersuchenden Gefäß angepassten Parametern arbeitete, erlaubte die Bestimmung des Durchmessers im µm-Bereich.
Die Speicherung der Daten erfolgte in einem ASCII-File, der nach Abschluss des Versuches mit Hilfe eines im Institut erstellten EXCEL-Makros bearbeitet wurde. So wurde eine optimale Darstellung der Daten erhalten, die dann anhand eines Ausdruckes dokumentiert wurden. Dieses System erlaubte bei der Nutzung eines 10er Objektivs und eines 3,2-fach Projektivs eine Messgenauigkeit von 2µm pro Bildschirmpixel.

2.3.4.2 Isometrische Messung

Bei diesem Versuchsprotokoll wurde im Gegensatz zur isobaren Messung nicht der Innendurchmesser des Gefäßes, sondern die Wandspannung des Gefäßes gemessen. Hierbei wurden die Daten mittels einer Messapparatur mit Kraftmesswandler aufgenommen, an einen Computer übertragen und gespeichert. Auch hier erfolgten kontinuierliche Messungen. Für die Messungen wurden die Änderungen, der auf die Messwandler wirkenden Wandspannung registriert. Diese lagen im Bereich von mN.

2.3.5 Versuchsablauf

2.3.5.1 Isobare Messung

Nach Befestigen des Gefäßes in der Messkammer wurde die Kammer auf dem Mikroskoptisch fixiert und an die Apparaturen angeschlossen. Das Starten der Kamera und das Aufrufen des Messprogramms wurden sofort nach Befestigung der Kammer auf dem

Tisch durchgeführt. Die Kammer wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mehrmals mit Versuchslösung bei einer Pumprate von 2ml pro Minute durchgespült. Durch Einsatz einer Pipette konnten der Messkammer Versuchslösung und Zusätze appliziert werden, die dann das Gefäß immer über Diffusion erreichten. Dabei wurden hinzu gegebene Pharmaka immer im Verhältnis 1:100 appliziert.

Die Pipette am proximalen Ende des Gefäßes wurde mit einem Reservoir gefüllt mit physiologischer Lösung verbunden, so dass sich über eine Änderung des Höhenniveaus dieses Reservoirs der transmurale Druck des Gefäßes beeinflussen ließ. Durch vorherige Kalibrierung der unterschiedlichen Niveaustufen war es dann im Versuchsablauf möglich, das Gefäß definierten transmuralen Drücken auszusetzen. Die Pipette am distalen Ende des Gefäßes wurde mittels eines Luer-Stopfens verschlossen, so dass das Austreten von Flüssigkeit verhindert wurde.

Das Schlauchsystem wurde an einer Stelle mit einer kleinen horizontalen Luftblase gefüllt, um die Kontrolle über einen eventuellen Fluss durch das Gefäß während des laufenden Versuches zu ermöglichen. Es wurde dazu eine Glaspipette in das Schlauchsystem eingeführt und in eine waagerechte Position gebracht. Durch Wanderung der Luftblase innerhalb der Pipette oder darüber hinaus, wurde ein undichtes Gefäß angezeigt. Flüssigkeitswanderungen, die durch physiologisch bedingte Filtration erfolgten und damit eine minimale Bewegung der Luftblase bewirkten, wurden toleriert. Größere Flüssigkeitsverschiebungen dagegen waren als Abbruchkriterium des Versuches definiert.

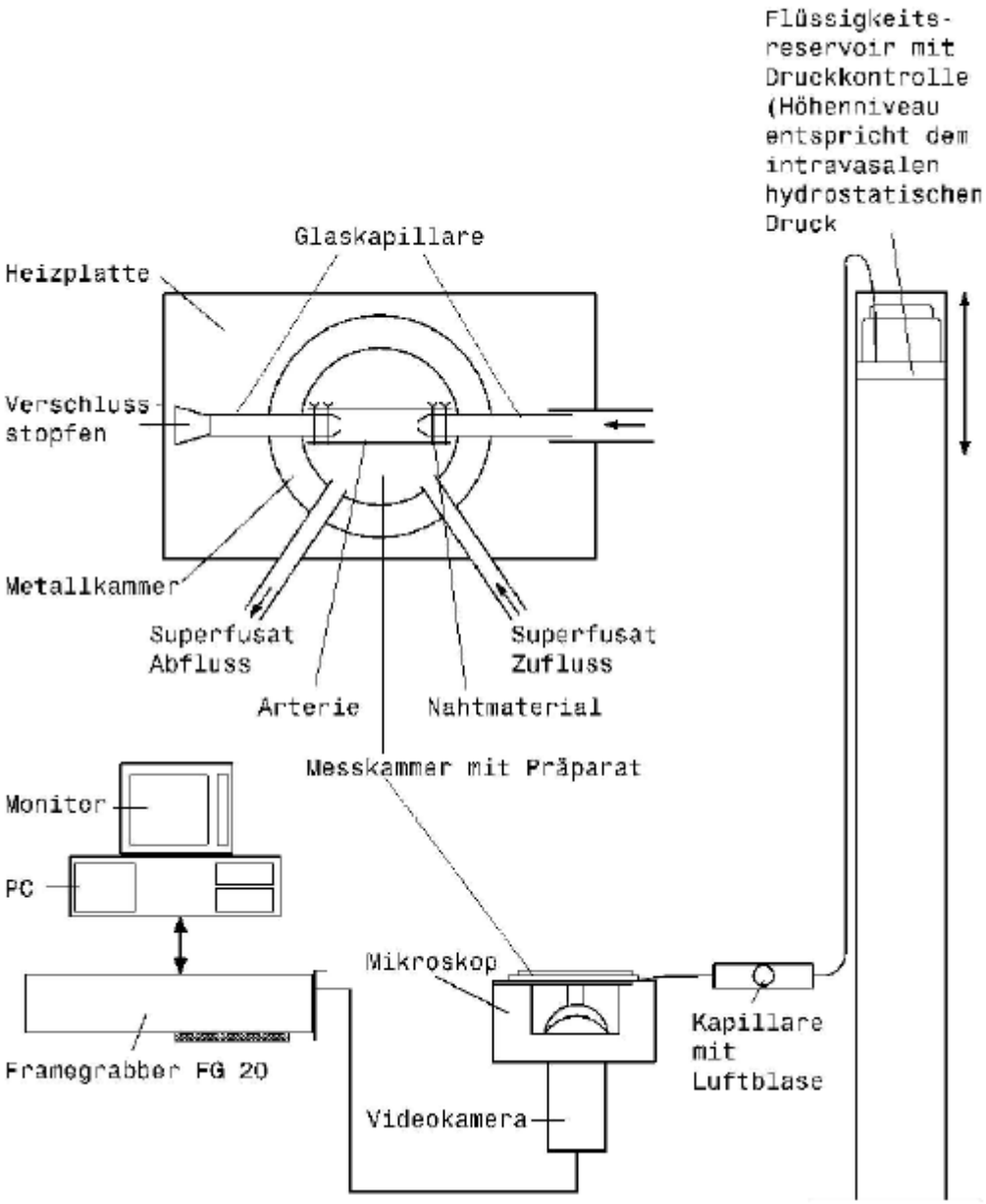

Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der isobaren Versuchsanordnung; Abbildung modifiziert nach E.Uhlig „Modulation der myogenen Reaktion kleiner Arterien durch den Kaliumkanalblocker BDS-1“ (2010).

Zu Beginn des Versuchs wurde das Gefäß einem Druck von 80mmHg ausgesetzt. Dieser Druckveränderung folgte eine Änderung des Gefäßes sowohl in seiner Ausdehnung in Längsrichtung als auch im Durchmesser. Mit Hilfe einer Mikrometerschraube, die am Ende der einen Pipette saß, wurde das Gefäß vorsichtig in Längsrichtung gestreckt, so dass es wieder einen geraden Verlauf einnahm.

Nach der beschriebenen Einstellung des Druckes wurde die Messkammer und mit ihr das Gefäß auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Dieses erfolgte über eine in die Messkammer integrierte Heizung. Diese Aufwärmphase war auch gleichzeitig eine Beruhigungsphase für das Gefäß unter dem Druck von 80mmHg. Die Phase betrug zwischen 20 und 30 Minuten, in

denen keine weiteren Veränderungen der äußeren Bedingungen getätigt wurden. Während der Erwärmungsphase dilatierte das Gefäß, um danach in eine Kontraktionsphase überzugehen. Dieses entsprach der Einstellung des spontanen myogenen Tonus. Eine ca. 15 bis 20-minütige Stabilisierungsphase schloss sich an.

Zur Fortsetzung der Versuchsreihe mussten einige Voraussetzungen erfüllt sein. Dazu gehörte u.a. die ausreichende Entwicklung des soeben beschriebenen myogenen Tonus, wobei ein Kriterium das Erreichen einer Kontraktion des Gefäßes auf weniger als 85% des maximalen Durchmessers ist. Der maximale Durchmesser des Gefäßes wurde am Ende eines jeden Versuchs mittels kalziumfreier Lösung bestimmt. Des Weiteren wurde die Funktionalität des Gefäßes mittels Agonisten überprüft. Es wurde über eine Pipette 10^{-6}M Acetylcholin hinzugegeben, um die Funktion des Gefäßendothels zu überprüfen. Bei intaktem Endothel kommt es direkt nach Gabe des Acetylcholins zu einer vollständigen Dilatation des Gefäßes. Je nach Versuchsprotokoll konnte man mit dieser Methode auch das funktionelle Entfernen des Endothels überprüfen: hierbei blieb dann die Reaktion nach Applikation von Acetylcholin aus. Die Fähigkeit der glatten Muskulatur zur Kontraktion wurde mit der Applikation von 10^{-7}M Noradrenalin überprüft, welches zu einer Kontraktion um mindestens 20% führen sollte.

Bei der Auswertung der Versuche wurde zur Bestimmung der myogenen Konstriktion der aktive Gefäßdurchmesser ins Verhältnis zum maximal dilatierten Gefäßdurchmesser bei 80mmHg gesetzt

$$[\text{normalisierter Durchmesser} = dia_{akt}/dia_{max80mmHg}].$$

Hierbei ist dia_{akt} der aktuell gemessene Durchmesser und $dia_{max80mmHg}$ der maximal dilatierte Durchmesser des Gefäßes bei 80mmHg.

Um die Gefäßreaktion bei unterschiedlichen Drücken vergleichen zu können, wurde der myogene Tonus verwendet. Dieser stellt den Gefäßdurchmesser (dia_{akt}) zu einem bestimmten Zeitpunkt im Verhältnis zum maximalen Durchmesser (dia_{max}), der bei vollständiger Dilatation in kalziumfreier Lösung bei gleichem Druck gemessen wurde, dar.

$$[\text{Myogener Tonus} = 1 - dia_{akt}/dia_{max}].$$

Daraus resultierend kann man den myogenen Index bestimmen. Der myogene Index definiert sich als relative myogene Konstriktion bezogen auf die dabei erfolgte Druckänderung. Er beschreibt den Anstieg des Zusammenhangs zwischen Druck und Durchmesser; bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit bei den Drucksprüngen von 10 auf 40mmHg, 40 auf 80mmHg und von 80 auf 120mmHg. Ein positiver Wert des Index stellt eine Dehnung des

Gefäßes bei Druckanstieg dar, ein negativer Wert zeigt eine Kontraktion des Gefäßes bei Druckanstieg.

$$[\text{Myogener Index}_{10\rightarrow40} = (dia_{40}/dia_{10} - 1) / \Delta P_{10\rightarrow40}]$$

$$[\text{Myogener Index}_{40\rightarrow80} = (dia_{80}/dia_{40} - 1) / \Delta P_{40\rightarrow80}]$$

$$[\text{Myogener Index}_{80\rightarrow120} = (dia_{1200}/dia_{80} - 1) / \Delta P_{80\rightarrow120}]$$

hierbei ist dia_{10} der Durchmesser bei 10mmHg, dia_{40} der Durchmesser bei 40mmHg, dia_{80} der Durchmesser bei 80mmHg, dia_{120} der Durchmesser bei 120mmHg, ΔP ist die jeweilige Druckänderung.

Zur Abschätzung der Wirkung der myogenen Gefäßreaktionen auf den funktionell wichtigen Blutfluss wurde der relative Fluss bei einem bestimmten Druck ermittelt. Dieser stellt den Fluss bei einem bestimmten Druck ins Verhältnis zum bei diesem Druck maximal möglichen Fluss im voll relaxierten Gefäß und errechnet sich aus:

$$[\text{relativer Fluss} = dia_{akt}^4/dia_{max}^4]$$

Dabei ist dia_{akt} der aktuelle Durchmesser und dia_{max} der maximale Durchmesser bei ein und demselben Druck.

Um zu ermitteln, wie gut die Autoregulation des Blutflusses bei Erhöhung des Drucks ausfällt, wurde der Flussindex ermittelt. Ein Flussindex von 1 zeigt dabei eine perfekte Autoregulation an, d.h. einen konstanten Blutfluss bei Druckänderung.

$$[\text{Flussindex}_{10\rightarrow40} = (1-(((40*dia_{40}^4)/(10*dia_{10}^4))-1)/((40-10)/10))]$$

$$[\text{Flussindex}_{40\rightarrow80} = (1-(((80*dia_{80}^4)/(40*dia_{40}^4))-1)/((80-40)/40))]$$

$$[\text{Flussindex}_{80\rightarrow120} = (1-(((120*dia_{120}^4)/(80*dia_{80}^4))-1)/((120-80)/80))],$$

wobei dia_{10} der Durchmesser bei 10mmHg, dia_{40} der Durchmesser bei 40mmHg, dia_{80} der Durchmesser bei 80mmHg und dia_{120} der Durchmesser bei 120mmHg ist.

2.3.5.2 Isometrische Messung

Nach dem Befestigen des Gefäßes in der Messkammer wurde diese zum Versuchsplatz gebracht. Dort wurde sie an einen PC angeschlossen und mittels einer Pipette wurden im Versuchsverlauf die zu prüfenden Pharmaka zugegeben. Diese wurden ebenfalls immer in einem Verhältnis von 1:100 appliziert.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde das Gefäß auf 37°C gebracht. Nach einer Beruhigungsphase wurde das Gefäß verschiedenen radialen Dehnungen ausgesetzt, um so eine Vorspannung zu ermitteln, die 90% des Durchmessers entsprach, welches das Gefäß bei einem transmuralen Druck von 100mmHg gehabt hätte. Nach Abschluss dieser Prozedur

wurde auch bei dieser Messmethode eine Funktionalitätsprüfung des Gefäßes durchgeführt. Dazu wurde der Messkammer Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5}M hinzugefügt, um eine Zunahme der Wandspannung der Gefäße zu beobachten. Nach einer weiteren Gabe von Serotonin mit einer Konzentration von 10^{-5}M wurde eine Kontrolle mit einer Konzentration von 10^{-7}M veranlasst. Während dieser Reaktion wurde im Maximum der Gefäßkontraktion Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-5}M hinzu gegeben. Dieses erfolgte zur Überprüfung der Funktionalität des Endothels, es ist funktionsfähig, wenn sich das Gefäß dilatiert, d.h. die Wandspannung abnimmt. Je nach Versuchsprotokoll war dieses erwünscht oder auszuschließen. Daraufhin konnte mit dem Versuchsablauf begonnen werden.
Um diese Versuche auszuwerten, wurde die normalisierte Wandspannung verwendet, d.h. alle Werte der aktuellen Wandspannung sind im Verhältnis zur maximalen Wandspannung des Gefäßes dargestellt, welche am Anfang eines jedenVersuches bestimmt wurde.

[normalisierte Wandspannung = $\text{Wandspannung}_{akt}/\text{Wandspannung}_{max}$]

2.3.6 Chemikalien

Für die Untersuchungen wurden verschiedene Chemikalien von verschiedenen Herstellern verwendet:
von Sigma

- Acetylcholin
- Noradrenalin
- Serotonin
- 4 - AP
- Linopiridine

von Merck

- Salze für die beschriebenen Versuchs- und Präparationslösungen

von Research Biochemical International

- Phentolamin
- Propanolol

von Tocris

- XE991
- DEA-NO

2.3.7 Statistik

Alle Angaben der Daten verstehen sich als Mittelwert ± Standardfehler (SE). Pro Ratte wurde jeweils nur ein Gefäß verwendet, so dass das n der Anzahl der Tiere entspricht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS 15.0 für Windows erstellt. Es wurden folgende Tests angewandt: t-Test, repeated measures ANOVA und one-way ANOVA. Zur Bestimmung der Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Aktivität von KCNQ-Kanälen in Gefäßen mit myogenem Tonus

Die Annahme dieser Arbeit besteht darin, dass KCNQ-Kanäle die myogene Reaktion von Gefäßen modulieren können und somit müssten sie in Gefäßen mit einem myogenen Tonus aktiv sein. Das bedeutet, dass Inhibitoren der KCNQ-Kanäle den Gefäßdurchmesser beeinflussen können, wenn den Gefäßen unter isobaren Bedingungen die Ausbildung eines stabilen myogenen Tonus ermöglicht wird. Diese Vermutung soll in diesem Abschnitt der Arbeit durch die Gabe der KCNQ-Inhibitoren XE991 und Linopiridin untersucht werden.
Dazu wurden Dosis-Wirkungskurven für die Substanzen XE991 und Linopiridin bei einem transmuralen Druck von 80mmHg bestimmt. XE991 erzeugte eine konzentrationsabhängige Verringerung des Gefäßdurchmessers, die jedoch bei der höchsten getesteten Konzentration von 10^{-4}M teilweise rückläufig war (n=8; $p<0,05$ im Konzentrationsbereich von $1*10^{-7}$ bis $3*10^{-5}$M) (Abb. 3-1). Diese Daten erlauben es auch, eine für die weiteren Versuche geeignete Konzentration der Inhibitoren, d.h. eine Konzentration, bei der nicht-selektive Effekte unwahrscheinlich sind, zu bestimmen.

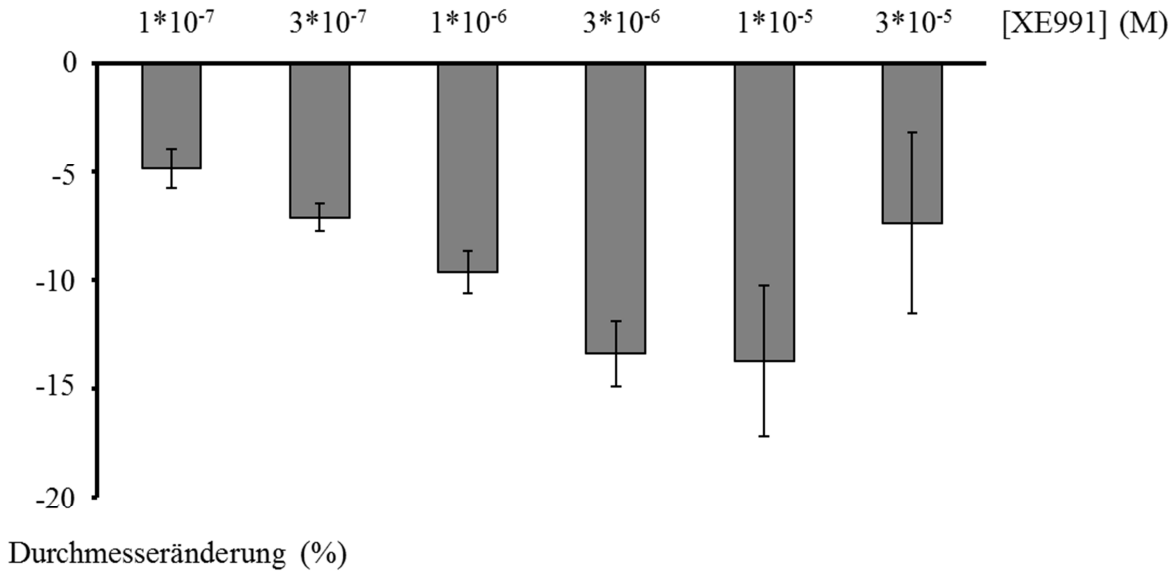

Abbildung 3-1 Wirkung von XE991 auf den Durchmesser der A. gracilis bei einem transmuralen Druck von 80mmHg.

Wie die Abbildung 3-1 zeigt, steigt mit zunehmender Konzentration von XE991 zunächst auch die durch den Inhibitor hervorgerufene Verringerung des Durchmessers der verwendeten Arterie. Die größte Kontraktion konnte bei einer Konzentration von $1* 10^{-5}$M erreicht werden.

Die nächst höher gewählte Konzentration zeigte jedoch eine im Vergleich zu den vorangegangenen Konzentrationen geringere Änderung des Durchmessers. Dies weist auf eine unspezifische Wirkung von XE991 bei hohen Konzentrationen hin. Deshalb wurde für die in den nächsten Abschnitten beschriebenen Versuche eine Konzentration von $3*10^{-6}$M XE991 verwandt. Die Wirkung von XE991 ist reversibel.

Zur Absicherung des Befundes mit XE911 wurde auch der zweite KCNQ-Kanal-Inhibitor, das Linopiridin, untersucht. Wie Abbildung 3-2 zu entnehmen ist, steigt mit zunehmender Konzentration der Substanz auch die durch diese hervorgerufene Kontraktion des Gefäßes (n=6; p<0,01). Die größte Kontraktion konnte mit der Konzentration $1*10^{-4}$M erreicht werden. Auch die Wirkung von Linopiridin ist reversibel.

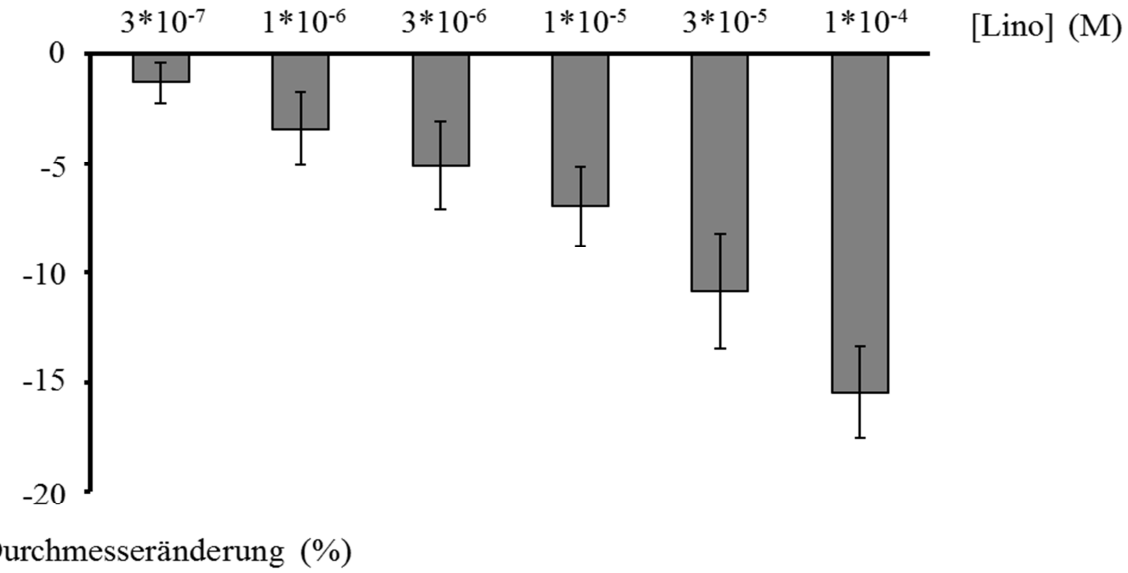

Abbildung 3-2 Wirkung von Linopiridin auf den Durchmesser der A. gracilis bei einem transmuralen Druck von 80mmHg.

3.2 Wirkung von XE991 und Linopiridin auf isometrische Präparate der Gefäße

Die Mehrzahl der bisher publizierten Versuche, die sich einer ähnlichen Fragestellung zugewandt hatten und deshalb für die Einordnung der hier erhobenen Befunde wichtig sind, wurde an isometrischen Gefäßpräparaten erhoben. Deshalb wurde der Effekt von XE991 und Linopiridin auch an isometrischen Präparaten, der in dieser Arbeit untersuchten Gefäße bestimmt. Die Wirkung von XE991 auf die Wandspannung des Gefäßes ist in Abbildung 3-3

dargestellt. Mit zunehmender Konzentration der Substanz tritt eine größere Wandspannung im Gefäß auf (n=7; p<0,01). Der Effekt von XE991 war jedoch im Vergleich zur maximalen Wandspannung relativ klein.

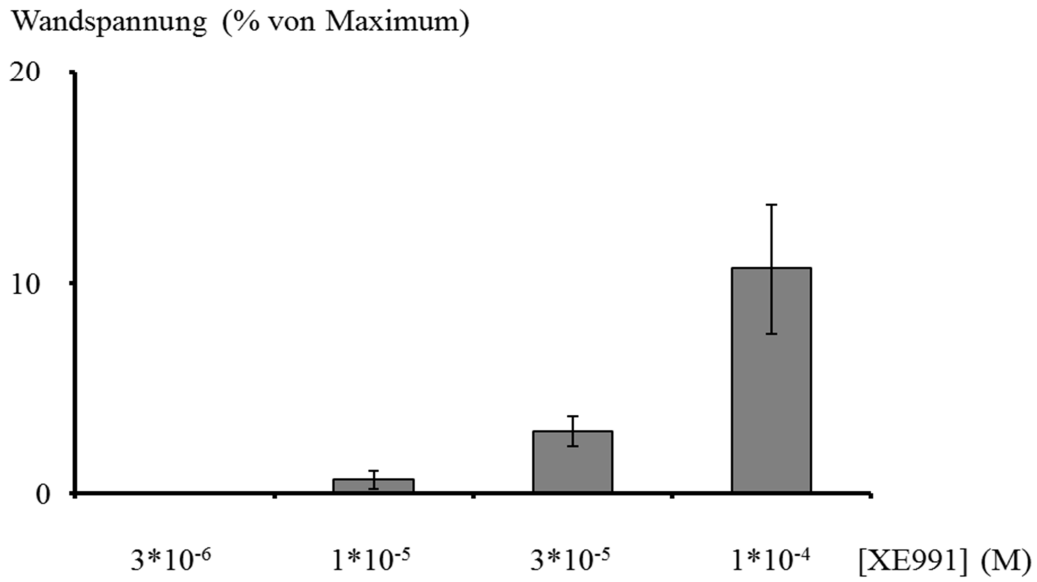

Abbildung 3-3 Wirkung von XE991 auf die Wandspannung der A. gracilis.

In der folgenden Abbildung 3-4 ist die Wirkung des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin auf das Gefäß gezeigt. Die Wirkung des Linopiridins ist ähnlich der des XE991. Die größte Wandspannung wurde hier bei einer Konzentration von $1*10^{-4}$M gemessen.

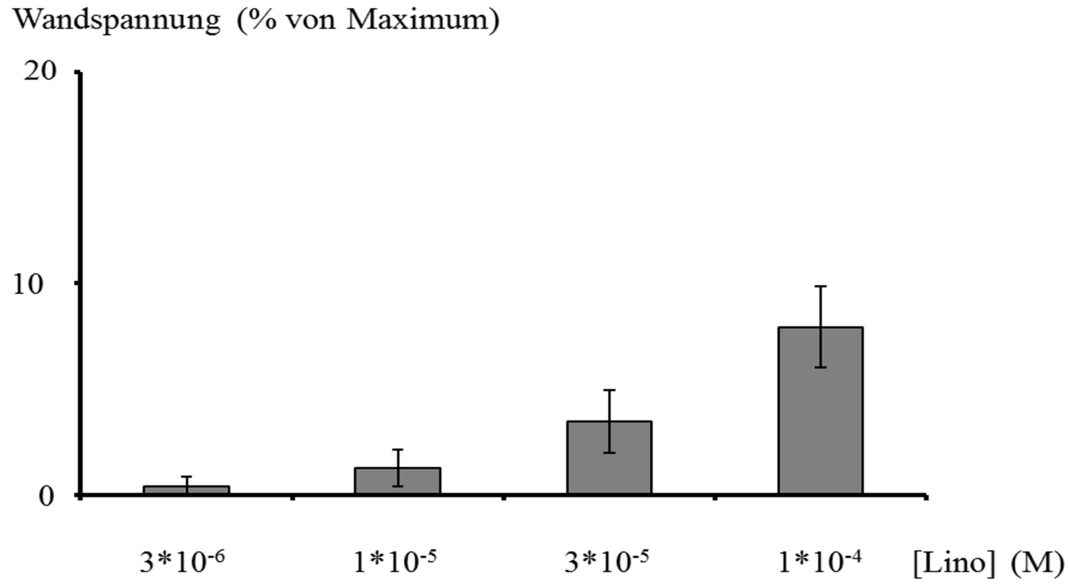

Abbildung 3-4 Wirkung von Linopiridin auf die Wandspannung der A. gracilis.

3.3 Die myogene Reaktion

Bevor die Modulation der myogenen Reaktion durch KCNQ-Kanäle untersucht werden kann, soll die myogene Reaktion der A. gracilis beschrieben werden. Dafür wurden die Gefäße stufenweise Drücken von 10 bis 120mmHg ausgesetzt. Es wurden zwei Versuchsreihen mit einander verglichen. Die erste wurde in physiologischer Lösung durchgeführt, die zweite Versuchreihe dagegen in kalziumfreier Lösung. Durch den Kalziummangel werden die kontraktilen Filamente an der Interaktion gehindert, wodurch die rein passiven Eigenschaften der Gefäße bestimmt werden konnten. Wie die Abbildung 3-5 zeigt, reagieren die Gefäße bei Erhöhung des Druckes von 10 auf 40mmHg mit einer Dilatation, die jedoch geringer als beim passiven Gefäß ausfiel. Erhöht man den Druck weiter, reagiert das Gefäß zunehmend mit einer Kontraktion. Dadurch entsteht ein deutlicher Unterschied der druckabhängigen Durchmesserwerte zwischen den Gefäßen in physiologischer und kalziumfreier Lösung (n=17; p<0,001). Für die nachfolgenden Versuche wurde nur physiologische Lösung verwandt, da nur die aktiven Eigenschaften des Gefäßes von Interesse waren.

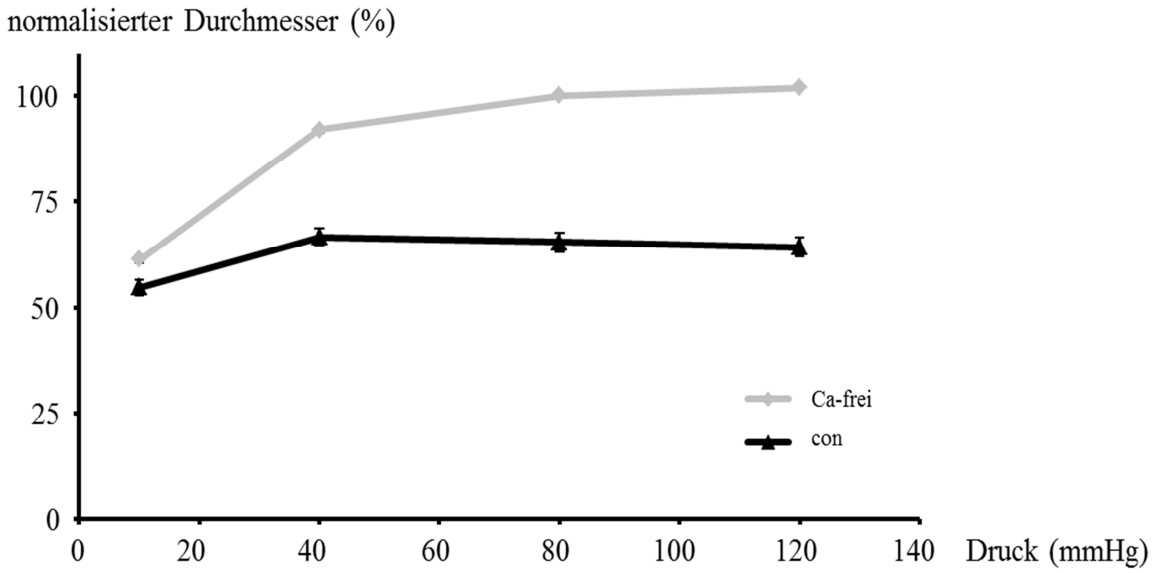

Abbildung 3-5 Wirkung des transmuralen Drucks auf den Durchmesser der A. gracilis. Es erfolgte die Bestimmung des Durchmessers unter stufenweiser Erhöhung des Druckes in kalziumfreier (Ca^{2+}-frei) sowie in physiologischer (con) Lösung. Der Durchmesser wurde auf den Durchmesser von 80mmHg in kalziumfreier Lösung normalisiert.

3.4 Modulation der myogenen Reaktion durch Blockade der KCNQ-Kanäle

3.4.1 Hemmung der Kanäle durch XE991

Wie unter 3.1 ermittelt, wurde für diese Versuche XE991 in einer Konzentration von $3*10^{-6}$M eingesetzt, um einerseits die KCNQ-Kanäle weitgehend zu blockieren aber andererseits unspezifische Effekte so klein wie möglich zu halten.
Die Abbildung 3-6 zeigt, dass die Gefäße in Anwesenheit von XE991 schon bei niedrigem Druck einen verringerten Durchmesser aufweisen. Dieser Befund findet sich auch bei höheren Drücken, so dass die Gefäße unter der Blockade der KCNQ-Kanäle bei jedem applizierten Druck kleinere Durchmesser aufweisen als in der Kontrollgruppe. Die Druck-Durchmesser-Kurve ist zu niedrigeren Durchmesserwerten hin verschoben (n=12; p<0,001).

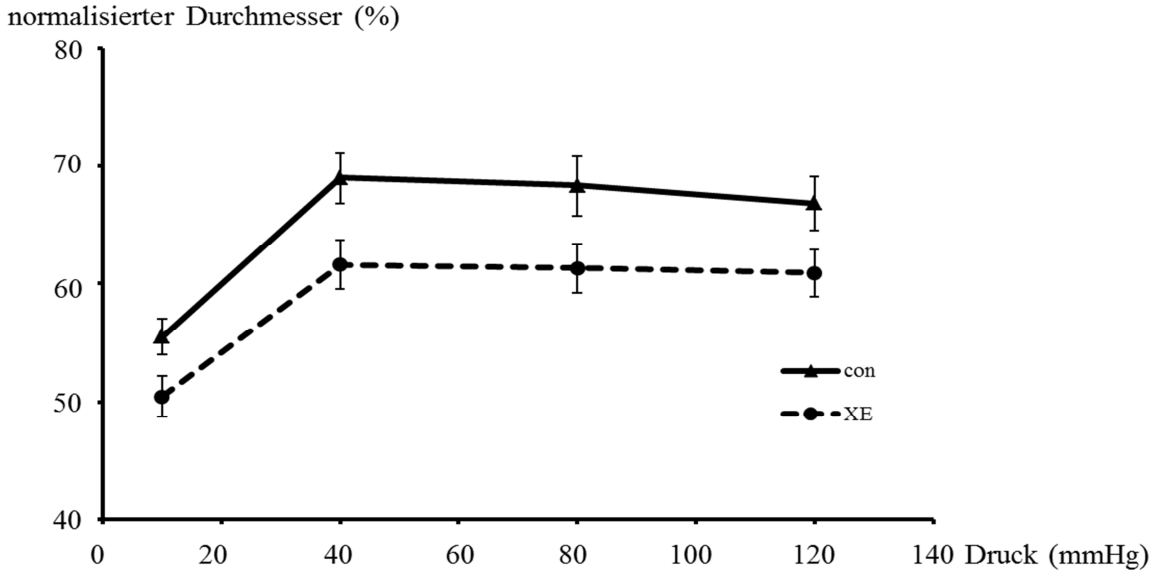

Abbildung 3-6 Reaktion der A. gracilis auf Druckänderungen in Anwesenheit (XE) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors XE991. Alle Durchmesser sind auf den Durchmesser des Gefäßes bei 80mmHg in kalziumfreier Lösung normalisiert.

In der folgenden Abbildung 3-7 ist der myogene Tonus der Gefäße beim jeweiligen intraluminalen Druck dargestellt. Wie aus ihr zu entnehmen ist, ist der myogene Tonus bei Hemmung der KCNQ-Kanäle mittels XE991 größer als in der Kontrollgruppe (n=12; p<0,001).

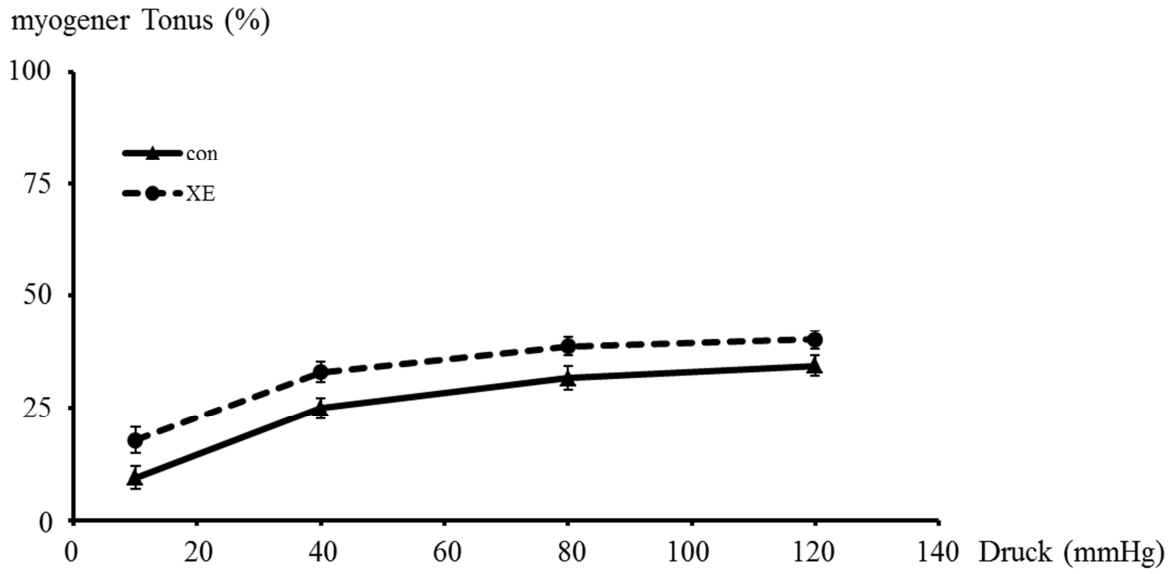

Abbildung 3-7 Myogener Tonus der A. gracilis in Anwesenheit (XE) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors XE991.

Um zu ermitteln, ob auch die Tonusveränderung in Reaktion auf eine Erhöhung des Drucks in Anwesenheit des KCNQ-Kanal-Inhibitors anders als unter Kontrollbedingungen ausfällt, wurde der myogene Index für die Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 und 80 auf 120mmHg ermittelt. Die Abbildung 3-8 zeigt, dass die mit XE991 behandelten Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe gleiche Werte für den myogenen Index aufweisen (n=12; p=0,88).

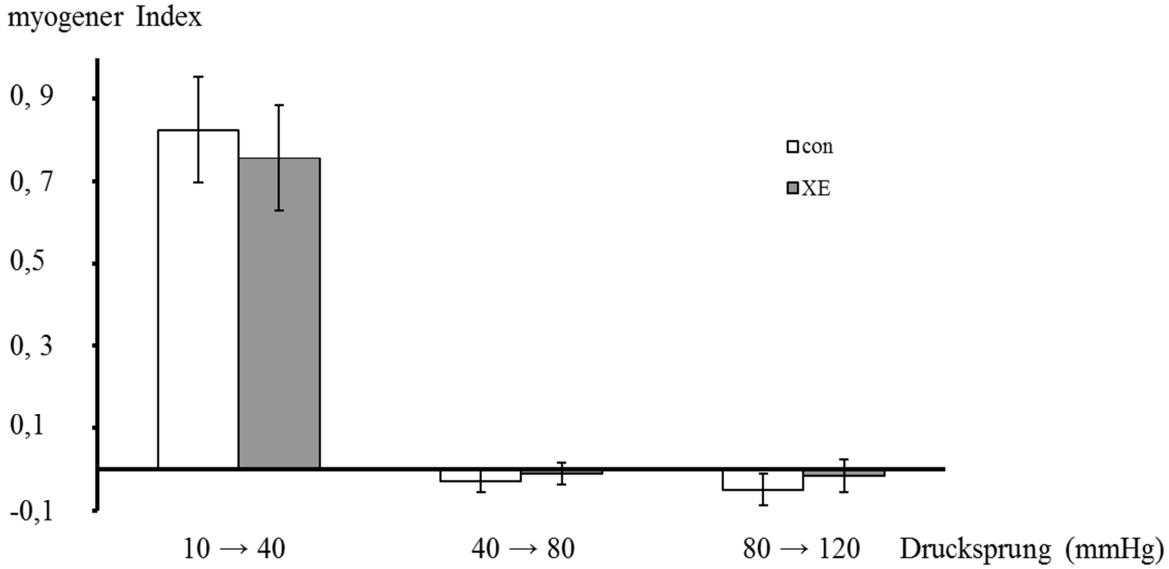

Abbildung 3-8 Myogener Index der A. gracilis für Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 und 80 auf 120mmHg in Anwesenheit (XE) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors XE991.

Da Durchmesseränderungen von Gefäßen in vivo zu Veränderungen des Blutflusses führen, der die entscheidende Größe für die Blutversorgung einzelner Organe ist, wurde der relative Fluss bei verschieden Drücken bestimmt. Wie aus der Abbildung 3-9 zu entnehmen ist, ist der relative Fluss der A. gracilis, die mit XE991 behandelt wurde, bei jedem appliziertem Druck geringer als der der Kontrollgruppe (n=12; p<0,001).

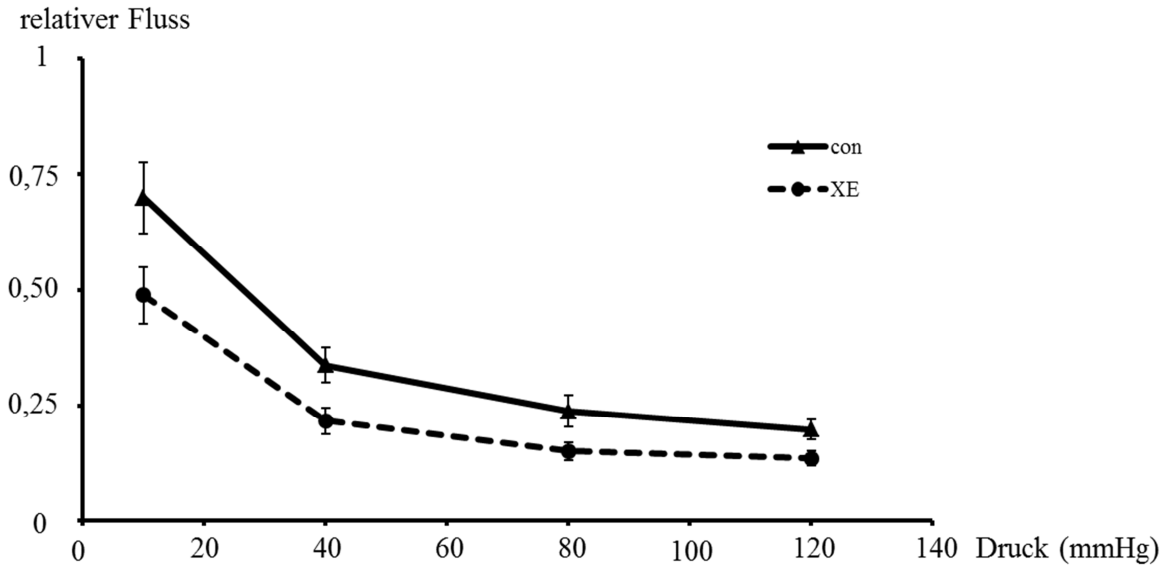

Abbildung 3-9 Relativer Fluss in der A. gracilis in Anwesenheit (XE) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors XE991.

Um zu ermitteln, wie gut die Autoregulation des Blutflusses bei Erhöhung des Drucks ausfällt und inwieweit die Anwesenheit des KCNQ-Kanal-Inhibitors einen Einfluss auf die Autoregulation des Flusses hat, wurde der Flussindex für die Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 und 80 auf 120mmHg ermittelt. Veranschaulicht wird dies durch die Abbildung 3-10, die den Flussindex der A. gracilis mit und ohne Wirkung von XE991 darstellt. Es zeigt sich, dass bei höheren Drücken der Flussindex näher am Wert 1 liegt, der eine perfekte Autoregulation des Blutflusses anzeigt. Dabei demonstrieren die mit XE991 behandelten Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe gleiche Werte für den Flussindex (n=12; p=0,97).

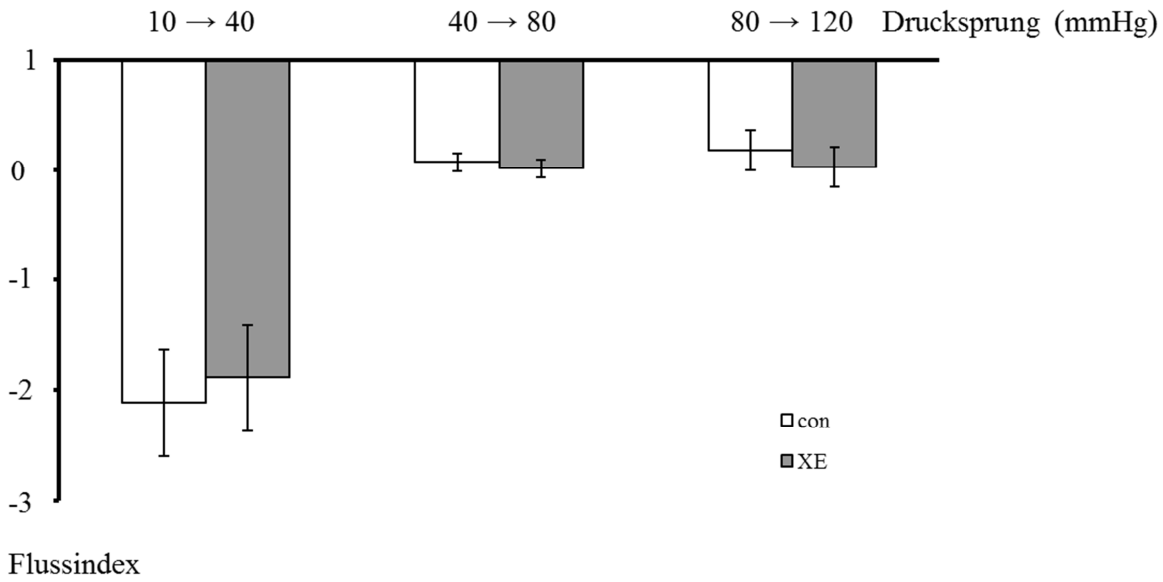

Abbildung 3-10 Flussindex der A. gracilis für Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 und 80 auf 120mmHg in Anwesenheit (XE) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors XE991

3.4.2 Hemmung der Kanäle durch Linopiridin

Um den Einfluss des KCNQ-Kanals auf die myogene Antwort weiter zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt, in denen dieser mit Linopiridin gehemmt wurde. Wie ebenfalls unter 3.1 ermittelt, wurde für diese Versuche Linopiridin in einer Konzentration von $1*10^{-4}$M verwandt. Die Abbildung 3-11 zeigt, dass die Gefäße unter Anwesenheit von Linopiridin schon bei niedrigen Drücken einen verringerten Durchmesser aufweisen. Dies findet sich auch bei höheren Drücken. So zeigt die Abbildung 3-11 bei jedem appliziertem Druck eine stärkere Konstriktion des Gefäßes unter Inhibition des KCNQ-Kanals im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=5$; $p<0,01$).

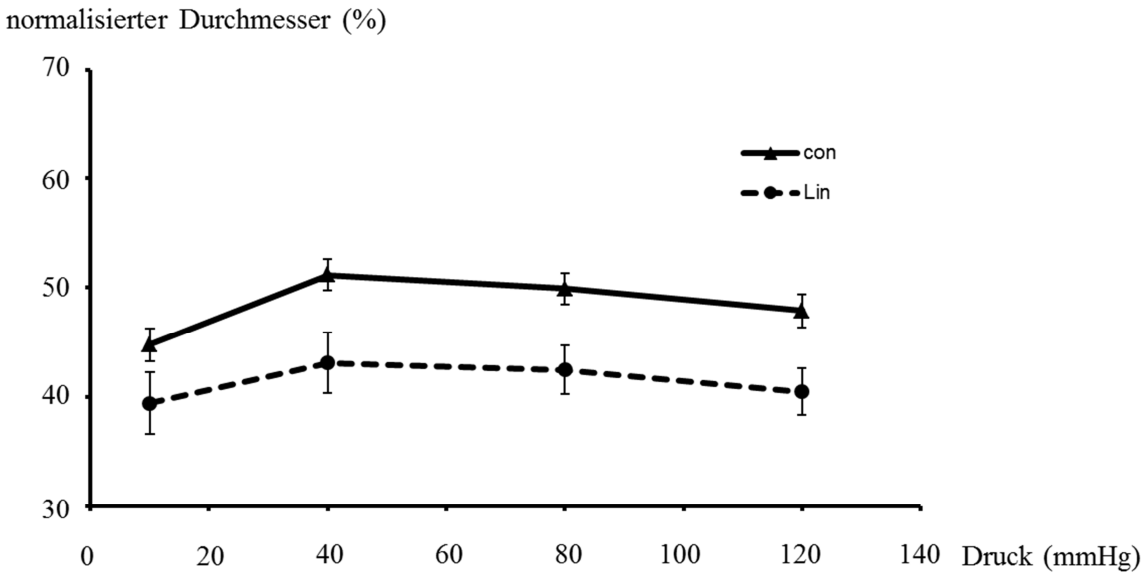

Abbildung 3-11 Reaktion der A. gracilis auf Druckänderungen in Anwesenheit (Lin) und in Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin. Alle Durchmesserwerte sind auf den Durchmesser des Gefäßes bei 80mmHg in kalziumfreier Lösung normalisiert.

Die Auswirkungen der Substanz Linopiridin auf den myogenen Tonus werden in Abbildung 3-12 veranschaulicht. Es wird der myogene Tonus beim jeweiligen intraluminalen Druck dargestellt. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, wird der myogene Tonus unter Wirkung von Linopiridin in allen Druckbereichen verstärkt (n=5; $p<0,01$).

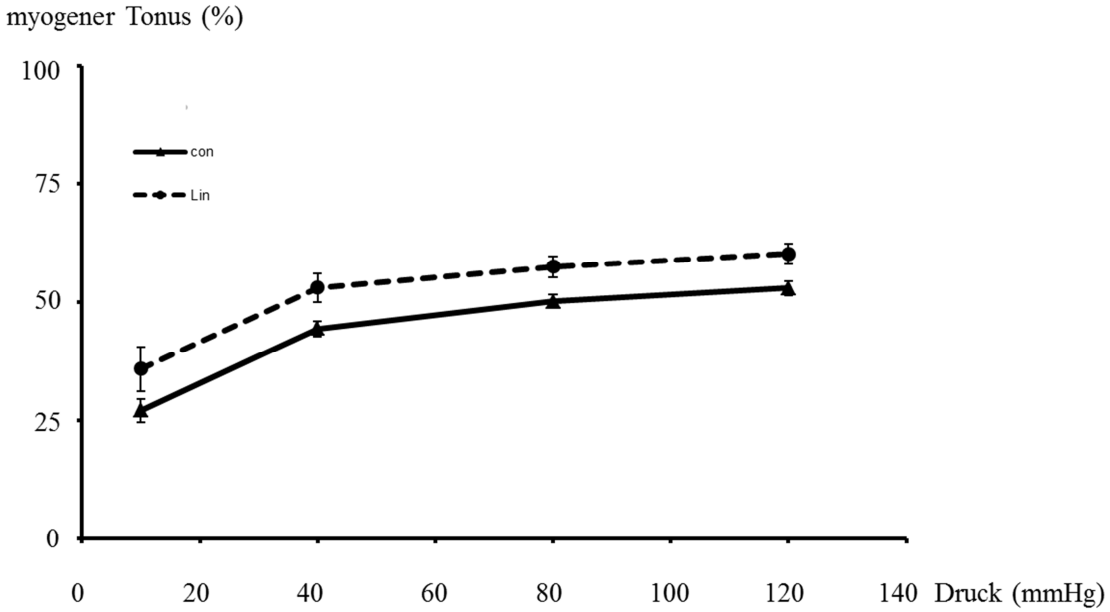

Abbildung 3-12 Myogener Tonus der A. gracilis in Anwesenheit (Lin) und Abwesenheit (con) der KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin.

Im Weiteren wurde auch die Tonusveränderung für die Gefäße bei Anwesenheit und Abwesenheit des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin untersucht. Die folgende Abbildung 3-13 zeigt den myogenen Index für die Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 sowie 80 auf 120mmHg. Im Vergleich zur Kontrollgruppe reagiert das Gefäß mit einer gleichen Tonusänderung (n=5; p=0,18).

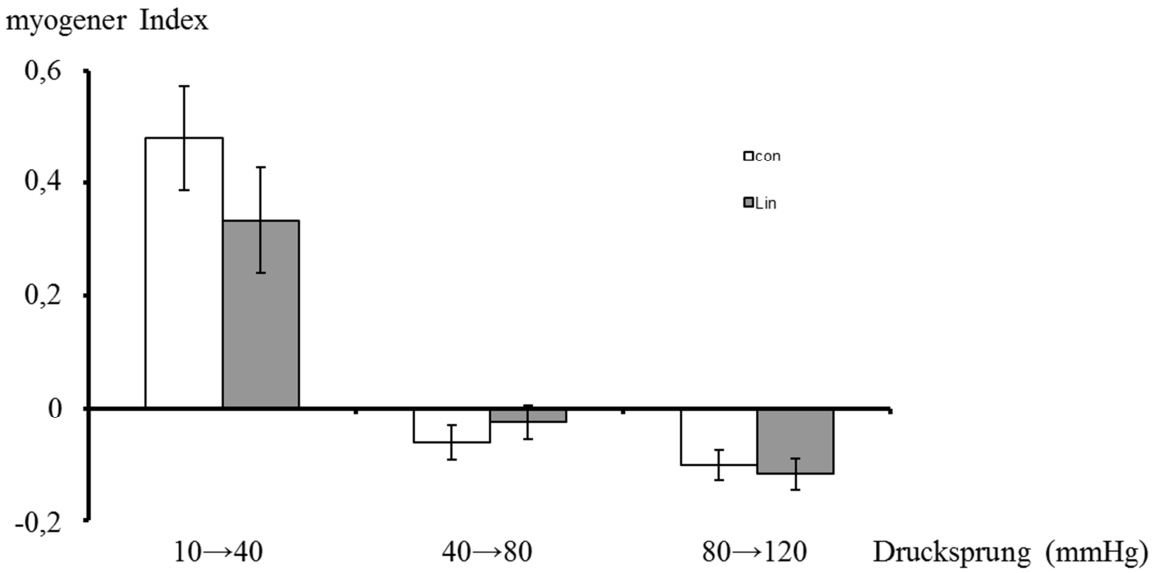

Abbildung 3-13 Myogener Index der A. gracilis für Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 sowie 80 auf 120mmHg in Anwesenheit (Lin) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin.

Wie auch bei der Inhibition des KCNQ-Kanals mittels XE991, wurde auch hier der Effekt auf den Blutfluss der Gefäße untersucht. Dieser ist in der A. gracilis, die mit Linopiridin behandelt wurde, bei jedem applizierten Druck geringer als der in der Kontrollgruppe (n=5; $p<0,001$).

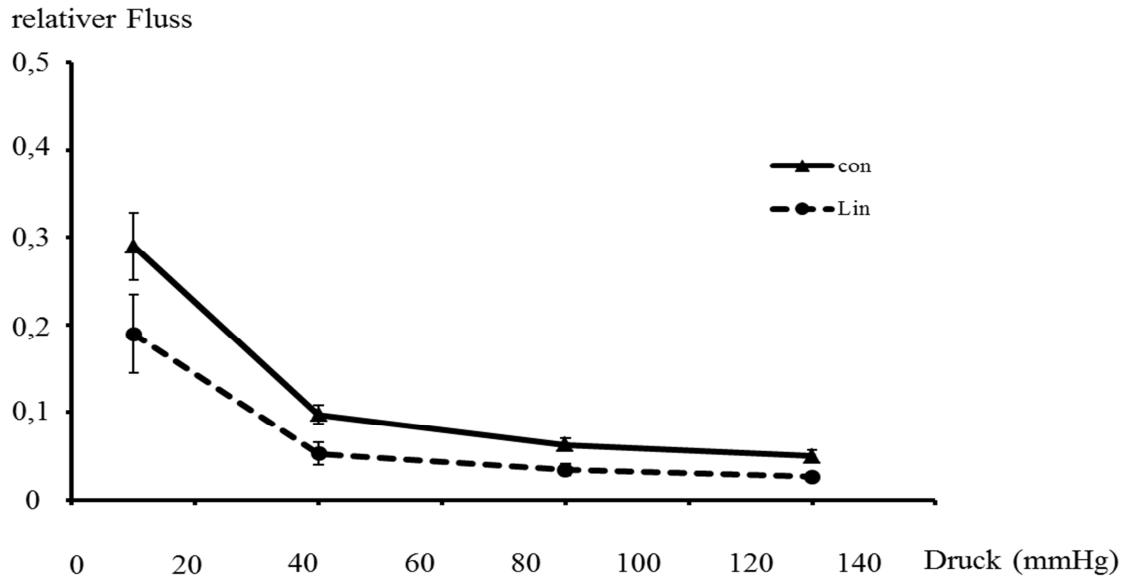

Abbildung 3-14 Relativer Fluss in der A. gracilis in Anwesenheit (Lin) und Abwesenheit (con) des KCNQ- Kanal-Inhibitors Linopiridin.

Zur Verdeutlichung der Flussreduktion und dessen Auswirkungen auf die Autoregulation des Flusses in Anwesenheit des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin, ist in Abbildung 3-15 der ermittelte Flussindex für die Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 und 80 auf 120mmHg dargestellt. Die Abbildung 3-15 zeigt den Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es zeigt sich, dass bei höheren Drücken der Wert näher bei 1 liegt, welcher für eine perfekte Autoregulation spräche. Es wurde auch klar, dass die Linopirdin-behandelten Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnliche Werte für den Flussindex aufweisen (n=5; p=0,45).

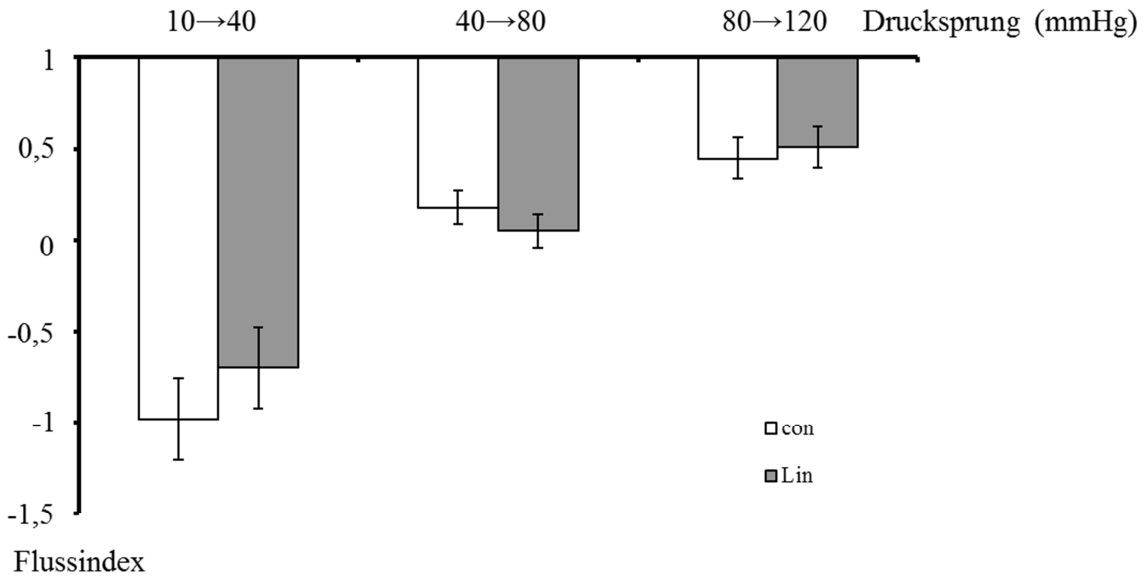

Abbildung 3-15 Flussindex der A. gracilis für Drucksprünge von 10 auf 40, 40 auf 80 sowie 80 auf 120mmHg in Anwesenheit (Lin) und Abwesenheit (con) des KCNQ-Kanal-Inhibitors Linopiridin.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf Untersuchungen an isobaren und teils isometrischen Gefäßpräparaten. Wie im Kapitel Material und Methoden im Detail beschrieben ist, wird im isobaren Fall ein Gefäßpräparat auf zwei Kapillaren aufgezogen. Der Vorteil dieses Versuchsaufbaus liegt darin, dass er die Möglichkeit bietet, die dilatativen und kontraktilen Eigenschaften des Präparates direkt zu beobachten. Vergleicht man die isobare und die isometrische Versuchsmethode, werden Unterschiede in den Ergebnissen sichtbar [Schubert und Mulvany, 1999]. So ist die Depolarisation in isometrischen Präparaten nach Applikation von Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5}M 2,6 mal stärker als in isobaren [Schubert et al., 1996]. Ein anderes Beispiel hierfür ist das stärker depolarisierte Membranpotenzial unter isobaren Versuchsbedingungen. Ein Grund hierfür kann die höhere Wandspannung sein, die bei isobaren Präparaten vorherrscht [Schubert, 2005]. Um Versuchsergebnisse angemessen interpretieren zu können, muss man die Unterschiede der einzelnen Versuchsaufbauten berücksichtigen. Die isobaren Präparate kommen der in vivo Situation viel näher. Die Gefäßwand ist zirkulär angeordnet, im Gegensatz zu den isometrischen Präparaten, wo die zwei Gefäßwände flach aufeinander liegen und zwei Schichten bilden. In diesem Fall ist es für das Gefäß sehr schwierig den Gefäßdurchmesser relevant zu verändern, wie es unter isobaren Bedingungen üblich ist. Die letztgenannten Bedingungen kommen den physiologischen Bedingungen des Gefäßsystems sehr nahe und das Gefäß kann dabei auch einen spontanen myogenen Tonus ausbilden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Intaktheit des Endothels. Im Versuch mit isometrischen Präparaten werden durch das Gefäßlumen zwei Drähte geschoben, die selbst unter äußerster Vorsicht das Endothel verletzen können und damit die Funktion des Endothels verändern. Bei Experimenten an isobaren Präparaten bleibt das Endothel unbeeinflusst. Es existieren weitere Unterschiede, jedoch soll nur noch einer hier genannt werden: der isobare Aufbau ermöglicht das separate Applizieren von Substanzen sowohl von der Seite der Adventitia als auch intraluminal. Beim isometrischen Aufbau erfolgt die Applikation immer von beiden Seiten also von intraluminal sowie von außen zugleich. Wichtig ist dies zum Beispiel bei der Applikation von Phenylephrin, welches in einer geringeren Konzentration von der Adventitia aufgenommen wird. Auf Grund der genannten Punkte wurden isobare Präparate als adäquate Methode zur Bearbeitung der meisten Fragestellungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

Weiterhin spielt die gewählte Versuchslösung eine wichtige Rolle, die normale extrazelluläre Bedingungen simulieren soll. Unter in vivo Bedingungen spielen Änderungen des extrazellulären pH-Wertes eine große Rolle für die Einstellung des Durchmessers der kleineren Gefäße und die Aktivität der glatten Muskelzellen in diesen Gefäßen. Vorherrschend ist das Natriumbicarbonat-Puffersystem im Körper. Hier zerfallen zwei HCO_3-Moleküle zu H_2O und CO_2. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen würde das CO_2 jedoch die Versuchskammer verlassen und deshalb eine Veränderung des pH folgen. Um einer Änderung des pH-Wertes vorzubeugen, könnte man die Kammer mit einem Gemisch von CO_2 und O_2 begasen. Dieses führt jedoch zu Ungenauigkeiten der videomikroskopischen Messungen des Gefäßdurchmessers, wenn sich Gasbläschen an die Gefäßwand extraluminal ansetzen. Während der Versuche für diese Arbeit wurde ein anderes Puffersystem verwand und zwar ein bicarbonatfreies, das mittels HEPES gepuffert wurde. Initiale Versuchsreihen zur Gleichwertigkeit der genannten Puffersysteme zeigten auf, dass das Kontraktions- als auch das Relaxationsverhalten der kleinen Gefäße durch das verwendete Puffersystem nicht beeinflusst wird.

Beim Applizieren, der in den Versuchen benutzten Substanzen, wurden üblicherweise höhere Konzentrationen als die Zielkonzentration verwandt, um eine Zugabe zur Badlösung ohne Veränderung der anderen Bestandteile der Badlösungen und Eigeneffekte der Lösungsmittel zu ermöglichen. Eine homogene Vermischung der Versuchslösung mit den applizierten Substanzen wurde mittels Mischung durch eine Pipette erreicht. Hierbei wurde die Substanz appliziert und danach dreimal ein Teil der Versuchslösung vorsichtig ein- und auspipettiert. Ein Nachteil dieser Methode ist die relativ lange Dauer der Mischphase sowie, bei unvorsichtigem Pipettieren, die mechanische Manipulation des Gefäßes. Diese Fehlerquellen konnten jedoch bei ausreichender Routine umgangen werden. Eine alternative Methode der Vermischung der zu applizierenden Substanzen mit der Versuchslösung ist die Begasung der Messkammer. Hierbei wird durch den Strom des Gases die Substanz gleichmäßig in der Kammer verteilt. Der Nachteil der Begasung ist jedoch, wie weiter oben erwähnt, das Auftreten von Gasbläschen in der Kammer. Diese Bläschen können sich an das Gefäßpräparat anlegen und damit zu einer Störung der Messung des Gefäßdurchmessers führen. Für die vorliegende Arbeit wurde auf Grund der oben genannten Punkte auf eine Begasung des Präparates verzichtet und auf die Durchmischung der Lösung mittels Pipette zurückgegriffen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für verlässliche Versuchsergebnisse ist die korrekte Präparation der Arterien. Durch dieses werden die kontraktilen Eigenschaften der glatten Muskelzellen und intakte Endothelzellen erhalten. Berührungen der Gefäße mit dem

Präparationsinstrumentarium oder Dehnung der Gefäße in longitudinaler Richtung sollte möglichst vermieden werden. Um das Gefäß zu schonen, wurde in gekühlter Lösung präpariert. Für den Nachweis der funktionellen Intaktheit eines Gefäßes wurden zunächst folgende Kriterien aufgestellt: bei einem Druck von 80mmHg musste sich ein myogener Tonus ausbilden, der aus einer Kontraktion von mindestens 15% bezogen auf den Maximaldurchmesser bestand. Weiterhin sollten sich nach Gabe von 10^{-7}M Noradrenalin die Gefäße um mindestens 20% kontrahieren und nach Applikation von 10^{-6}M Acetylcholin vollständig dilatieren. Gefäße, die diese Bedingungen nicht erfüllten, wurden in den Versuchen nicht verwendet.

Kleinere Gefäße unterliegen in vivo auch dem Einfluss eines intakten Endothels. Das Endothel wird aktiviert durch den Blutfluss, der die Freisetzung verschiedener Transmitter aus dem Endothel bewirkt. In dieser Arbeit wurden die Versuche ohne aktiven Gefäßfluss durchgeführt, um eine Aussage unabhängig von einer Reaktion des Endothels tätigen zu können. Hierzu war es wichtig bei der Präparation des zu untersuchenden Gefäßabschnittes einen Abschnitt ohne Gefäßabgänge zu erhalten. Weiterhin wurde durch den Versuchsaufbau selbst kein Fluss durch das Gefäß erzeugt. Überprüft wurde dieses durch eine Luftblase, die in das Schlauchsystem, welches die Arterie mit der Flasche zur Druckregulierung verband, eingebracht wurde. Nur Gefäße, bei denen kein Fluss im Gefäß beobachtet wurde, durchliefen den Versuch.

Unter in vivo Konditionen unterliegt die Gefäßantwort unter anderem einem pulsatilen Druck. Im Gegensatz hierzu wurde in dieser Arbeit mit einem statischen Drucksystem gearbeitet. Hierbei wurde jedoch vernachlässigt, dass kleinere Gefäße wie z.B. Koronararterien des Schweins unter Applikation eines pulsatilen Druckes eine endothelunabhängige Dilatation aufweisen [VanBavel et al., 1996]. In dieser Arbeit wurde auf einen vereinfachten Versuchsaufbau zurückgegriffen, um eine möglichst klare Aussage treffen zu können. Jedoch ist die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse der Arbeit auf in vivo Bedingungen noch im Detail zu klären.

4.2 Die Wirkung der KCNQ-Kanal-Inhibitoren XE991 und Linopiridin auf den myogenen Tonus kleinerer Gefäße

4.2.1 Verteilung der KCNQ-Kanäle in den Gefäßbetten

Zunächst muss erwähnt werden, welche KCNQ-Kanal-Unterfamilie sich in welchem Organsystem oder Gefäßbett befindet. Sanguinetti et al. zeigten in ihren Versuchen 1996, dass sich KCNQ1 (K_v7.1) vorwiegend im Bereich der kardialen Myozyten finden lässt. KCNQ2 bis KCNQ5 (K_v7.2-K_v7.5) wurden von Jentsch vorwiegend dem Nervensystem zugeordnet. Mutationen in den KCNQ-Genen kann zur Ausbildung von Arrhythmie, Epilepsie sowie Taubheit führen [Ng et al., 2010]. Weiterführende Versuchsreihen an Gefäßbetten von verschieden Nagetieren erbrachten den Nachweis von KCNQ-Genen auch im Kreislaufsystem. Hier zeigte sich vorwiegend die Expression von KCNQ1 und KCNQ4 sowie von Varianten von KCNQ5. Mehrere Arbeitsgruppen erbrachten den Nachweis, dass diese KCNQ-Kanäle in den glatten Muskelzellen exprimiert werden. So zeigten Ohya et al. in ihrer 2003 veröffentlichten Arbeit, dass KCNQ1 in der Portalvene der Maus vorkommt. Weitere durch Yeung et al. durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass diverse Gefäßsysteme der Maus KCNQ1, KCNQ4 und KCNQ5 exprimieren, wie z.B. die thorakale Aorta, die A. carotis, die A. femoralis und die Mesenterialarterien [Yeung et al., 2007]. Somit kann gesagt werden, dass die KCNQ-Kanäle in nahezu allen Gefäßbetten vorkommen und sie mutmaßlich an der Regulation der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sind.

4.2.2 Inhibitoren der KCNQ-Kanalfamilie

Um die Beteiligung von KCNQ-Kanälen an der Aufrechterhaltung des myogenen Tonus sowie an der myogenen Reaktion zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels der Wirkstoffe XE991 und Linopiridin, die KCNQ-Kanäle blockiert und die dadurch bewirkte Beeinflussung des myogenen Tonus und der myogenen Reaktion am Beispiel kleinerer Skelettmuskelgefäße bestimmt. Generell gilt, blockiert man spannungsabhängige Kaliumkanäle kommt es zu einer Verhinderung des Durchflusses von Kaliumionen durch den blockierten Kanal aus der Zelle heraus. Dies löst eine Depolarisation der Zelle aus und führt damit zu einem erhöhten Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Zelle, gefolgt von einer Kontraktion des Gefäßes. Unspezifische Kaliumkanal-Inhibitoren wie z.B. 4-AP führen zu einer solchen Reaktion. Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse zeigen am Beispiel von 4-AP, dass mit steigender Konzentration eines Kaliumkanal-Inhibitors das Gefäß verstärkt kontrahiert [Knot und Nelson, 1995; Straub, Girouard et al., 2009]. Dieser

Effekt ist an mehreren Gefäßen beobachtet worden und in der Literatur gut beschrieben. Cox zeigte außerdem in seinen Versuchen an der narkotisierten Ratte eine Blutdruckerhöhung und eine Erhöhung des peripheren Widerstandes aufgrund einer Konstriktion der Gefäße nach Applikation von 4-AP intravenös [Cox, 2005]. 4-AP ist jedoch kein spezifischer KCNQ-Kanal-Inhibitor.

Die beiden getesteten Substanzen der vorliegenden Arbeit, XE991 und Linopiridin, gelten als spezifische KCNQ-Kanal-Inhibitoren [Jentsch, 2000; Robbins, 2001]. Versuche von Wang et al. 1998 zeigten, dass XE991 keine Wirkung auf die in Xenopus Oozyten exprimierten K_v1.2, K_v4.3, EAG1, ERG1 und ELK1 Kanäle hat. Passmore et al. 2003 zeigten in Versuchen mit natürlichen KCNQ-Kanälen an dorsalen Stammganglien, Rennie et al. 2001 sowie Olivier et al. 2003 an Vestibularzellen der Maus und Wüstenrennmaus, dass XE991 auf KCNQ2 und KCNQ3 wirkt.

Analog zu den Untersuchung mit XE991 wurde auch Versuche mit der Substanz Linopiridin durchgeführt. Linopiridin galt als direkter Inhibitor des M-Stroms. Es werden viele Versuchsreihen in der Literatur erwähnt, in denen Linopiridin als eine leistungsfördernde Substanz beschreiben wird, die die kognitive Leistung steigert. So zeigten Schnee und Brown in Ihrer Arbeit, dass Linopiridin auf den M-Strom des Hippocampus der Ratte inhibierend wirkt [Schnee und Brown, 1998]. Der M-Strom war zunächst in peripheren Neuronen beschrieben. Er gehört zu den langsamen aktivierenden und deaktivierenden Kaliumkanälen. Wang et al. beschrieben, das KCNQ2 und KCNQ3 einen Kanaleinheit bilden können, die den M-Strom sehr ähnlich ist. Weiterhin untersuchten sie, dass nur eine Kaliukmkanalklasse ein ähnliches Profil wie der M-Strom aufbaut und das ist die Gruppe der KCNQ-Kanälen [Wang et al., 1998]. In weiteren Versuchen wurde jdeoch bewiesen, dass der M-Strom auch aus unterschiedlichen Aufbauten von KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3,KCNQ4 und KCNQ5 [Joshi et al., 2006].

4.2.3 Wirkung von XE991 und Linopiridin auf KCNQ-Kanäle

Bei der Applikation von XE991 in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich mit zunehmender Konzentration eine Kontraktion des Gefäßes. Ab einer Konzentration von 10^{-4}M wurde die Reaktion des Gefäßes jedoch geringer als bei der zuvor verabreichten Dosis. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Joshi et al. 2006 in ihren Versuchen zur Wirkung von XE991 auf die Pulmonalarterie der Ratte. Dies weist auf eine unspezifische Wirkung der Substanz in sehr hohen Konzentrationen hin.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der KCNQ-Kanal Inhibitor Linopiridin verwendet. Dabei wurde zunächst auch hier eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. In der vorliegenden Arbeit konnten bei den genutzten Konzentrationen bis zu 10^{-4} M keine Hinweise auf eine unspezifische Wirkung auf die Gefäße gefunden werden. Wie Mackie et al. in ihren Versuchen mit glatten Gefäßmuskelzellen der Mesenterialarterie zeigten, wirkt Linopiridin kontrahierend auf die Zelle bei einer Konzentration von 10µM. Eine Verdopplung der Konzentration von Linopiridin bewirkt jedoch keine Verstärkung der Kontraktion der Gefäßzelle [Mackie, Brueggemann et al., 2008]. Dies lässt einerseits den Schluss zu, dass Linopiridin keine unspezifischen Reaktionen an der glatten Gefäßmuskelzelle provoziert und andereseits ab einer gewissen Konzentration die Wirkung von Linopiridin nicht verstärkt werden kann. Weiterhin wurden von Ihnen gezeigt, dass nicht in jedem Gefäßbett und bei jedem Organismus die KCNQ-Kanäle auf die gleiche Weise funktionieren.

Versuche mit der patch-clamp-Technik an isolierten glatten Muskelzellen zeigten den oben beschriebenen Effekt der unspezifischen Reaktion von XE991 jedoch nicht. So berichteten Yeung und Greenwood in ihren Versuchsreihen, dass XE991 und Linopiridin einen Ausstrom von Kalium blockierten und das Ruhemembranpotenzial reduzierten. In weiteren Experimenten zeigten sie, dass sich unter XE991 oder Linopiridin die spontane Kontraktion der Gefäße erhöhte. Somit demonstrierten sie, dass die KCNQ-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Regulation der Erregbarkeit der glatten Gefäßmuskelzelle spielen [Yeung und Greenwood, 2005]. Weiterhin zeigten sie in Versuchen mit 4-AP und XE991, dass die absolute Amplitude des Kaliumstroms reduziert wurde. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von KCNQ-Kanälen an der Ausbildung einer myogenen Reaktion hin, jedoch sind KCNQ-Kanäle nicht allein daran beteiligt. Weiterhin besagt es, dass XE991 in höheren Dosen (in Anlehnung an die Arbeit von Mackie und Greenwood, 2005) ab einer Konzentration größer als 10µM, eine unspezifische Wirkung auf Kaliuimkanäle hat. Hier werden dann auch andere Kanäle als die KCNQ-Kanäle erreicht und blockiert.

Weitere Arbeitsgruppen, wie zum Beispiel Mackie und Byron zeigten in ihren Versuchen, dass XE991 in niedrigen Dosierungen als spezifischer Kaliumkanalinhibitor auf alle Mitglieder der KCNQ-Familie wirkt. In höheren Dosierungen jedoch wird die Wirkung unspezifischer und kann auch andere Kaliumkanäle erreichen [Mackie und Byron, 2008].

Um die Wirkung von XE991 auf die myogene Reaktion eines Gefäßes weiter zu untersuchen wurde von Cotzee et al. eine Versuchsreihe in Anwesenheit von 4-AP durchgeführt. Später bauten Yeung et al auf diese Ergbnisse weitere Versuchsreihen auf. Die These, dass trotzdem die beiden oben genannten Substanzen als spezifische KCNQ-Kanal-Inhibitoren gelten, der

Effekt auf die myogene Reaktion auch von anderen spannungsabhängigen Kaliumkanäle verursacht werden, wurden von ihnen untersucht. Hierzu wurde das Gefäßpräparat zunächst mit 4-AP stimuliert. Es zeigte sich eine Kontraktion des Gefäßes. Nach einer gewissen Zeit wurde dann eine bestimmt Konzentration von XE991 hinzugefügt und es zeigte sich eine Verstärkung der Kontraktion. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen sie auch bei dem Versuch mit einem kontinuierlichen Vorhandensein von 4-AP. Die Versuche wurden auch mit Linopiridin durchgeführt und zeigten auch hier das Verhalten analog zu XE991, eine Verstärkung der Kontraktionskraft. Yeung et al. untersuchten jedoch keine Kontraktion eines Gefäßes, sondern die Ströme die nach Applikation der Substanzen floßen. Auch sie kamen zu den gleichen Ergebnissen. Somit ist die Aussage, dass nicht alleine KCNQ-Kanäle für die Ausbildung einer myogenen Reaktion verantwortlich sind, bewiesen [Coetzee et al., 1999; Yeung et al. 2005].

Die Allgemeingültigkeit der Wirkung von XE991 und Linopiridin in Bezug auf Gefäße aus verschiedenen Organen und Organsystemen (z.B. Aorta, Mesenterium) wurde von Yeung et al. hinreichend untersucht. Sie zeigten eine Konstriktion sämtlicher Gefäße nach Applikation von XE991 sowie Linopiridin [Yeung, Pecovský et al., 2007]. Selbst Gefäße des Mesenteriums, die zunächst nicht auf XE991 und Linopiridin reagierten, kontrahierten, sofern sie eine Vorbehandlung mit Phenylephrin erhielten. Die Wirkung von XE991 auf eine glatte Muskelzelle wurde noch von weiteren Arbeitsgruppen untersucht. Yeung und Greenwood zeigten in ihrer Arbeit 2005 die Wirkung von XE991 auf die Portalarterie der Maus. Sie wiesen eine gesteigerte spontane Aktivität des Gefäßes in funktionellen Versuchen nach sowie eine Depolarisation des Ruhemembranpotenzials der Zellen mit in der patch-clamp-Technik. In dieser Arbeit wurde bei Erhöhung der Konzentration auch eine stärkere Kontraktion der Gefäße beobachtet.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine unspezifische Wirkung von XE991 ab einer Konzentration höher als $3*10^{-5}$ M. Für die weiterführenden Versuche wurde diese Konzentration gewählt, so dass von einer spezifischen Wirkung auf KCNQ-Kanäle ausgegangen werden kann. Es stellt sich die Frage, welche Funktion die KCNQ-Kanäle in kleineren Gefäßen haben. Und ob sie hier an der Aufrechterhaltung der myogenen Reaktion beteiligt sind?

So zeigten die Ergebnisse des isobaren Versuchaufbaus der vorliegenden Arbeit eine Verringerung des Gefäßdurchmessers bei Anwesenheit von XE991 für alle untersuchten Drücke im Vergleich zur Kontrollgruppe, d.h. eine Zunahme des myogenen Tonus. Es zeigte sich auch schon in niedrigen Druckbereichen ein kleinerer Gefäßdurchmesser. Der myogene

Index, der ein Maß für die druckinduzierte Durchmesseränderung ist, zeigte vor allem für den niedrigen Druckbereich, also den Drucksprung von 10 auf 40mmHg, eine relative Vergrößerung des Gefäßdurchmessers an. Wenn man dafür die Reaktion des Gefäßes in Anwesenheit von XE991 mit der Kontrollgruppe vergleicht, finden sich in etwa gleiche Werte für die Durchmesseränderungen. Der Durchmesser des mit XE991 behandelten Gefäßes verändert sich ähnlich stark wie der des Kontrollgefäßes. In höheren Druckbereichen, also bei Drucksprüngen von 40 auf 80 und von 80 auf 120mmHg, zeigten sich auch ähnliche Werte in der Durchmesseränderung in Anwesenheit und Abwesenheit von XE991. Hier trat jedoch ein negativer myogener Index, also eine Verringerung des Durchmessers der Gefäße, auf. Diese Daten lassen darauf schließen, dass XE991 zwar auf den myogenen Tonus wirkt und eine Rolle bei seiner Einstellung spielt, nicht jedoch die myogene Reaktion verändert.

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Wirkweise von XE991 an kleinen Skelett-muskelarterien ist die Wirkung auf den Blutfluss durch die Gefäße. Durch den verringerten Durchmesser der Gefäße nach Einwirkung von XE991 zeigte sich auch eine Verringerung des Blutflusses durch das Gefäß. Diese wurde bei jedem applizierten Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Der daraus resultierende Flussindex ist für beide Gruppen ähnlich. Der Index dient als Maß für die myogene Autoregulation eines Gefäßes. Ist dieser 1, gilt dieses als perfekte Autoregulation. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit für die kleinen Skelettmuskelarterien zeigen, ist im niedrigen Druckbereich, zwischen 10 und 40mmHg, der Flussindex um -2, also entfernt von einer perfekten Autoregulation. Für den höheren Druckbereich, also zwischen 40 und 80 und 80 und 120mmHg, nähert der Wert sich der 1 an. Die Autoregulation der kleineren Gefäße erfolgt also in den höheren Druckbereichen besser.

Da weiterhin in dieser Arbeit die Wirkung von Linopiridin auf den KCNQ-Kanal untersucht wurde, zeigte sich bei der Applikation von Linopirdin, analog zur Applikation von XE991, ebenfalls eine Konstriktion des Gefäßes und damit ein stärkerer myogener Tonus. Dieses konnte man schon in den niedrigen Druckbereichen sehen. In der Literatur wird die Substanz jedoch als weniger potent als XE991 beschrieben. Man erkennt eine stärkere Wirkung des Linopiridins bei dem Drucksprung von 10 auf 40mmHg. Bei den nächst höheren Drucksprüngen ist zwar ein kleinerer Durchmesser des Gefäßes zu verzeichnen, jedoch keine stärkere myogene Reaktion. Die Abbildung 3.12 stellt dies anhand des myogenen Tonus dar. Allgemein kann man jedoch sagen, dass das Gefäß unter Inhibition mit Linopiridin für alle Druckbereiche einen erhöhten myogenen Tonus aufweist. Analog zur Applikation von XE991 hat Linopiridin einen Einfluss auf den myogenen Tonus. Nach Applikation von Linopiridin wirkte sich dieses analog zur Applikation von XE991 auch auf den Fluss innerhalb des

Gefäßes aus. In den niedrigen Druckbereichen 10 und 40mmHg zeigte sich ein kleinerer Blutfluss als bei der Kontrollgruppe. Jedoch nähern sich die Kurven in den höheren Druckbereichen bei 80 und 120mmHg an. Dieses zeigte sich auch in der Abbildung 3.15, in der der Flussindex dargestellt ist. Die Gefäße, welche mit Linopiridin behandelt wurden, zeigen einen ähnlichen Flussindex wie die Kontrollgefäße. Da Linopiridin im Vergleich zu XE991 als der weniger potente Inhibitor der KNCQ-Kanäle gilt, kann auch unter Blockade mit Linopiridin ein vollständiges Ausbleiben der myogenen Reaktion nicht beobachtet werden. Die KCNQ-Kanäle sind beteiligt an der Ausbildung einer myogenen Reaktion, sie dürfen aber nicht als Einzelakteure angesehen werden.

Stellt man die hier in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse in den physiologischen Zusammenhang und in Bezug auf die Bedeutung der myogenen Reaktion für einen Organismus, so muss man die KCNQ Kanäle als eine Art Schutzmechanismus ansehen. Im physiologischen Druckbereich, zwischen 80 und 120mmHg halten die kleineren Skelettmuskelarterien den Blutfluss einigermaßen konstant und lassen auf Grund der dilatierenden Wirkung der KCNQ Kanäle einen ausreichenden Blutfluss zu. Dieses ist immens wichtig, sollte es zu einem Druckabfall kommen. Analog ist die Reaktion bei einer Drucksteigerung, dort reagieren die kleineren Gefäße mit einer Verringerung des Gefäßdurchmesser. Dieses führt dann zu einer Verringerung des Blutflusses, was wiederum zu einer Senkung des Druckes führt und damit zu einer Stabilisierung der physiologischen Bedingung im jeweiligen Gefäßbettsystem führen soll.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass XE991 und Linopiridin durch Inhibition von KCNQ-Kanälen kleine Arterien kontrahiert und damit die myogene Reaktion beeinflusst.

Die Untersuchungen erfolgten an isometrischen und isobaren Gefäßpräparationen der A. gracilis der Ratte vom Wistar-Stamm sowie an der A. gracilis des syrischen Hamsters. XE991 und Linopiridin gelten in der Literatur als spezifische KCNQ-Kanal-Inhibitoren. Durch sie wird eine Depolarisation der Zelle ausgelöst, welche mit einem Kalziumeinstrom einhergeht. Der Einstrom von Kalzium führt zu einer Kontraktion der Gefäßzelle.

Nach Zugabe der Substanzen zeigte sich eine Kontraktion der kleinen Arterien und eine Verstärkung des myogenen Tonus. Durch die Kontraktion der Gefäße wurde der Fluss durch das Gefäß verringert. Die Auswirkung beider getesteter Substanzen wurde auch auf die myogene Reaktion geprüft. In allen untersuchten Druckbereichen, also zwischen 0 und 40, 40 und 80 als auch 80 und 120mmHg, wurde die myogene Reaktion und die Autoregulation des Blutflusses nicht verändert

Die Bedeutung der myogenen Reaktion liegt in der Konstanthaltung der Blutflusses bei unterschiedlichen systemischen Blutdrücken. Bei höheren Drücken führt eine Verstärkung der myogenen Reaktion zu einer Verringerung des durch den höheren Druck angestiegenen Blutflusses. Dieses ist unter anderem wichtig für Organsysteme wie die Niere und das Gehirn. Umgekehrt führt bei niedrigen systemischen Drücken eine Abschwächung der myogenen Reaktion zu einer Erhöhung des durch den niedrigeren Druck verringerten Flusses durch das Gefäß. Insgesamt ist dieses ein Schutzmechanismus des Organsystems vor einer Hypo- bzw. Hyperperfusion.

6 Literaturverzeichnis

Abbott, G.W. and Goldstein, S.A.N. (2001). "Potassium Channel Subunits Encoded by the KCNE Gene Family: Physiology and Pathophysiology of the MinK-Related Peptides (MiRPs)." Molecular Interventions **1**, 95-107.

Accili, E.A.; Kiehn, J.; et al. (1997). "Separable $K_v\beta$-subunit domains alter expression and gating of potassium channels." The Journal of Biological Chemestry **272**, 25824-25831.

An, W.F.; Bowly, M.R.; et al. (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." Nature **403**, 553-556 (Abstract).

Anschütz, S. and Schubert, R. (2005). "Modulation of the myogenic response by neurogenic influences in rat small arteries." British Journal of Pharmacology **146**, 226-233.

Archer, S.L.; Huang, J.M.C.; et al. (1996). "Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia." Circulation Research **78**, 431-442.

Bähring, R.; Milligan, C.J.; et al. (2001). "Coupling of Voltage-dependent Potassium Channel Inactivation and Oxidoreductase Active Site of $K_v\beta$ Subunits." The Journal of Biological Chemistry **276**, 22923-22929.

Bayliss, W.M. (1902). "On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure." The Journal of Physiology **28**, 220-231.

Bendahhou, A.; Marionneau, C.; et al. (2005). "In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart." Cardiovascular Research **67**, 529-538.

Berczi, V.; Stekiel, W.J.; et al. (1992). "Pressure-induced activation of membrane K^+ current in rat saphenous artery." Hypertension **19**, 725-729.

Bett, G.C.L.; Morales, M.J.; et al. (2006). "Ancillary subunits and stimulation frequency determine the potency of chromanol 293B block of the KCNQ1 potassium channel." The Journal of Physiology **576**, 755-767.

Bolz, S.S. and Pohl, U. (1996). "Nitric oxide (NO) attenuates pressure-induced vasoconstriction in isolated arterioles without changes in intracellular calcium." Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **10**, (Abstract).

Brayden, J.E. and Nelson, M.T. (1992). "Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels." Science **256**, 532-535 (Abstract).

Brown, D.A. and Passmore, G.M. (2009). "Neural KCNQ (K_v7) channels" Britisch Journal of Physiology **156**, 1185-1195.

Brueggemann, L.I.; Moran, C.J.; et al. (2007). "Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase C-dependent inhibition of KCNQ5 in A7r5 rat aortic smooth muscle cells." American Journal of Physiology **292**, 1352-1363.

Brueggemann, L.I.; Mackie, A.R.; et al. (2009). "Differential Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors on Vascular Smooth Muscle Ion Channels May Account for Differences in Cardiovascular Risk Profiles." Molecular Pharmacology **76**, 1053-1061.

Brueggemann, L.I.; Mackie, A.R.; et al. (2010). "Diclofenac Distinguishes among Homomeric and Heteromeric Potassium Channels Composed of KCNQ4 and KCNQ5 Subunits." Molecular Pharmacology **79**, 10-23.

Chadha, P.S.; Zunke, F.; et al. (2012). "Reduced KCNQ4-Encoded Voltage-Dependent Potassium Channel Activity Underlies Impaired β-Adrenoceptor-Mediated Relaxation of Renal Arteries in Hypertension." Hypertension **59**, 877-884.

Chadha, P.S.; Zunke, F.; et al. (2012). "Pharmacological dissection of $K_v7.1$ channels in systemic and pulmonary arteries." British Journal of Pharmacology **166**, 1377-1387.

Chen, T.T.; Luykenaar, K.D.; et al. (2006). "Key Role of K_v1 Channels in Vasoregulation." Circulation Research **99**, 53-60.

Cipolla, M.J.; Gokina, N.I. and Osol, G.(2002). "Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior." Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **16**, 72-76.

Coetzee, W.A.; Amarillo, Y.; et al. (1999). "Molecular diversity of K^+ channels." Annals of the New York Academy of Science **868**,233-285 (Abstract).

Cox, R.H. (2005). "Molecular Determinants of Voltage-Gated Potassium Currents in Vascular Smooth Muscle." Cell Biochemistry and Biophysics **42**, 95-123.

Cui, J.; Yang, H and Lee, U.S. (2009). "Molecular Mechanisms of BK Channel Activation." Cellular and Molecular Life Science **66**, 852-875.

D´Angelo, G.; Meininger, G.A. (1994). "Transduction mechanismsinvolved in the regulation of myogenic activity." Hypertension **23**, 1096-1105.

D´Angelo, G.; Davis, M.J. and Meininger, G.A. (1997). "Calcium and mechanotransduction of the myogenic response." The American Journal of Physiology **273**, 175-182 (Abstract).

Davis, M.D.; Meininger, G.A. and Zawieja, D.C. (1992). "Stretch-induced increases in intracellular calcium in isolated vascular smooth muscle cells." The American Journal of Physiology **263**, 1292-1299 (Abstract).

Davis, M.J. and Hill, M.A. (1999). "Signaling Mechanisms underlying the Vascular Myogenic Response." Physiological Reviews **79**, 387-423

Dedek, K. (2003). "Charakterisierung von KCNQ-Kaliumkanälen und ihren β-Untereinheiten."

Dopico, A.M.; Kirber, M.T., et al. (1994). "Membrane stretch directly activates large conductance Ca_{2+}-activated K^+ channels in mesenteric artery smooth muscle cells." American Journal of Hypertension **7**, 82-89 (Abstract).

Doughty, J.M.; Miller, A.L. and Langton, P.D. (1998). "Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel." The Journal of Physiology **507**, 433-439.

Eichorn, B. and Dobrev, D. (2007). "Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: Functional role and therapeutic potential." Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacology **376**, 145-155.

Eskinder, H.; Harder, D.R. and Lombard, J.H. (1990). "Role of the vascular endothelium in regulation the response of small arteries of the dog kidney to transmural pressure elevation and reduced PO_2." Circulation Research **66**, 1427-1435.

Fredricks, K.T.; Liu, Y.P. and Lombard, J.H. (1994). "Response of extraparenchymal resistance arteries of rat skeletal muscle to reduced PO_2." American Journal of Physiology **267**, 706-715 (Abstract).

Félétou, M. (2009). "Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?" British Journal of Pharmacology **156**, 545-562.

Gokina, N.I. and Osol, G. (2002). "Actin cytoskeletal modulation of pressure-induced depolarization and $Ca(_{2+})$ influx in cerebral arteries." American Journal of Physiology **282**, 1410-20.

Greenwood, I.A. and Ohya, S. (2009). "New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle." British Journal of Pharmacology **156**, 1196-1203.

Harder, D.R. (1984). "Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery." Circulation Research **55**, 197-202.

Harder, D.R.; Gilbert, R. and Lombard, J.H. (1987). "Vascular muscle cell depolarization and activation in renal arteries on elevation of transmural pressure." American Journal of Physiology **253**, 778-781 (Abstract).

Harder, D.R.; Sanchez-Ferrer, C.; et.al. (1998). "Pressure releases a transferable endothelial contractile factor in cat cerebral arteries." Circulation Research **65**, 193-198.

Heinemann, S.H.; Rettig, J.; et al. (1996). "Functional characterization of K_v channel β-subunits from rat brain." The Journal of Physiology **493**, 625-633.

Hill, M.A.; Falcone, J.A. and Meininger, G.A. (1990). "Evidence for protein kinase C involvement in arteriolar myogenic activity." American Journal of Physiology **259**, 1586-1594 (Abstract).

Hill, M.A. and Zou, H. (1994). "Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles." American Journal of Physiology **267**, 1085-1092 (Abstract).

Hill, M.A.; Zou, H.; et al. (2001). "Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review: Arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca_{2+} signaling pathways underlying myogenic reactivity." Journal of Applied Physiology **91**, 973-983.

Hill, M.A.; Davis, M.J., et al. (2006). "Arteriolar myogenic signaling mechanisms: Implications for local vascular function." Clinical Hemorheology and Microcirculation 34, 67-79.

Hogg, R.C.; Wang, Q. and Large, W.A. (1994). "Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein." British Journal of Pharmacology **112**, 977-984.

Jackson, W.F. (2005). "Potassium Channels in the peripheral Microcirculation." Microcirculation **12**, 113-127.

Jepps, T.A.; Greenwood, I.A.; et al. (2009). "Molecular and functional characterization of K_v7 K^+ channel in murine gastrointestinal smooth muscles." Amercian Journal of physiology **297**, 107-115.

Jepps, T.A.; Chadha, P.S.; et al.(2011). "Downregulation of $K_v7.4$ Channel Activity in primary and Secondary Hypertension." Circulation **124**, 602-611.

Joshi, S.; Balan, P. and Gurney, A.M. (2006). "Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers." Respiratory Research **7**, 31.

Joshi, S.; Sedivy, V.; et al. (2009). "KCNQ Modulators Reveal a Key Role for KCNQ Potassium Channels in Regulating the Tone of Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **329**, 368-376.

Kang, L.S.; Kim, S., et al. (2009). "Aging and muscle fiber type alter K^+ channel contributions to the myogenic response in skeletal muscle arterioles." Journal of Applied Physiology **107**, 389-398.

Karibe, A.; Watanabe, J.; et al. (1997). "Role of cytosolic Ca_{2+} and protein kinase C in developing myogenic contraction in isolated rat small arteries." American Journal of Physiology **272**, 1165-1172 (Abstract).

Kauser, K.; Clark, J.E.; et al. (1991). "Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dog renal arcuate arteries." Circulation Research **68**, 1154-1163.

Kirber, M.T.; Ordway, R.W.; et al. (1992). "Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca_{2+}-activated K^+ channels in vascular smooth muscle cells." Federation of European Biochemical Societies Letters **297**,24-28 (Abstract).

Knot, H.T. and Nelson, M.T. (1995). "Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K^+ channels in rabbit myogenic cerebral arteries." American Journal of Physiology 269, 348-355 (Abstract).

Knot, H.T. and Nelson, M.T. (1998). "Regulation of arterial diameter and wall [Ca_{2+}] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure." The Journal of Physiology **508**, 199-209.

Ko, E.A., Han; J; et al. (2008). "Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth cells" Journal of Smooth Muscle Research **44**, 65-81.

Korovkina V.P. and England, S.K. (2002). "Molecular diversity ofvascular potassium channel isoforms." Clinical and experimental Pharmacology & Physiology **29**,317-323 (Abstract).

Kou, L.; Davis, M.J. and Chilian, W.M. (1988). "Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arteries." American Journal of Physiology **255**, 1558-1562 (Abstract).

Laher,I; Germann, P.; et al. (1989). "The Selective Potentiation of Noradrenaline-Induced Tone by Bay K 8644 in the Rabbit Basilar Artery." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **9**, 759-764.

Large, W.A. and Wang, Q. (1996). "Characteristics and physiological role of the Ca_{2+}-activated Cl^- conductance in smooth muscle." American Journal of Physiology **271**, 435-454 (Abstract).

Li, M. and Adelman, J.P. (2000). "ChIPing away at potassium channel regulation." Nature Neuroscience **3**, 202-204.

Long, W.; Zhang, L. and Longo, L.D. (2000). "Cerebral artery K_{ATP}-and K_{Ca}-channel activity and contractility: changes with development." American Journal of Physiology **279**, 2004-2014.

Mackie, A.R. and Byron, K.L. (2008). "Cardiovascular KNCQ (K_v7) Potassium Channels: Physiological Regulators and New Targets for Therapeutic Intervention." Molecular Pharmacology **74**, 1171-1179.

Mackie, A.R.; Brueggemann, L.I.; et al. (2008). "Vascular KCNQ Potassium Channels as Novel Targets for the Control of Mesenteric Artery Constriction by Vasopressin, Based on Studies in Single Cells, Pressurized Arteries, and in Vivo Measurements of Mesenteric Vascular Resistance." The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics **325**, 475-483.

Mani, B.K.; Brueggemann, L.I., et al. (2009). "Opposite regulation of KCNQ5 and TRPC6 channels contributes to vasopressin-stimulated calcium spiking responses in A7r5 vascular smooth muscle cells." Cell Calcium **45**, 400-411.

Mani, B.K. and Byron, K.L. (2010). "Vascular KCNQ channels in humans: the sub-threshold brake that regulates vascular tone?" British Journal of Pharmacology **162**, 38-41.

Mani, B.K., Brueggemann, L.I.; et al. (2011). "Activation of vascular KCNQ(K_v7) potassium channels reverses spasmogen-induced constrictor responses in rat basilar artery." British Journal of Pharmacology **164**, 237-249.

Marijic, J.; Li, Q.; et al. (2001). "Decreased expression of voltage- and Ca_{2+} activated K_+ channels in coronary smooth muscle during aging." Circulation Research **88**, 210-216.

Masumoto, N.; Nakayama, K.; et al. (1997). "Specific attenuation of the pressure-induced contraction of rat cerebral artery by herbimycin." European Journal of Pharmacology **330**, 55-63 (Abstract).

Matsushita, M.; Tanaka, Y. and Koike, K. (2006). "Studies on the mechanisms underlying β-adrenoceptormediated relaxation of rat abdominal aorta." Journal of Smooth Muscle Research **42**, 217-225.

McCarron, J.G.; Crichton, C.A.; et al. (1997). "Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries." Journal of Physiology **498**, 371-379.

Meininver, G.A.; Zawieja, D.C.; et al.(1991). "Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation." American Journal of Physiology **261**, 950-959 (Abstract).

Meininger, G.A. and Davie, M.J. (1992). "Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response." American Journal of Physiology **263**, 647-659 (Abstract).

Melman, Y.F.; Domènech, A.; et al. (2001). "Structural Determinants of K_vLQT1 Control by the KCNE Family of Proteins." The Journal of Biological Chemistry **276**, 6439-6444.

Miller, F.J.; Platts, K.C.; et al. (1997). "Moygenic constriction of human coronary arterioles." American Journal of Physiology **273**, 257-264 (Abstract).

Morales, M.J.; Catellino, R.C.; et al. (1995). "A novel beta-subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel alphy-subunits." The Journal of Biological Chemestry **270**, 6272-6277.

Morecroft, I.; Murray, A.; et al. (2009). "Treatment with the K_v7 potassium channel activator flupirtine is beneficial in two independent mouse models of pulmonary hypertension." British Journal of Pharmacology **157**, 1241-1249.

Murphy, T.V.; Spurrell, B.E. and Hill, M.A. (2002). "Celluar signalling in arteriolar myogenic constriction: involvement of tyrosine phosphorylation pathways." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **29**, 612-9 (Abstract).

Nakamura, T.Y.; Pountney, D.J.; et al. (2001). "A role for frequenin, a Ca_{2+}-binding protein, as a regulator of K_v4 K_+ currents." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **98**, 12808-12813.

Narayanan, J.; Imig, M.; et al. (1994). "Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol." American Journal of Physiology **266**, 1840-1845 (Abstract).

Nelson, M.T.; Patlak, J.B.; et al. (1990). "Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone." American Journal of Physiology **259**, 3-18 (Abstract).

Nelson, M.T. and Quayle, J.M. (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." American Journal of Physiology **268**, 799-822 (Abstract).

Nelson, M.T., Conway, M.A.; et al. (1997). "Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries." Journal of Physiology **502**, 259-262.

Ng, F.L.; Davis, A.J.; et al. (2010). "Expression and function of the K^+ channel KCNQ genes in human arteries." British Journal of Pharmacology **162**, 42-53.

Ohya, S.; Asakura, K.; et al. (2002). "Molecular and functional characterization of ERG, KCNQ and KCNE subtypes in rat stomach smooth muscle." Amercian Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver physiology **282**, 277-287.

Ohya, S.; Horowitz, B.; et al. (2002). "Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes." Amercian Journal of Physiology Cell Physiology **283**, 866-877.

Ohya, S.; Sergeant, G.P.; Greenwood, I.A. and Horowitz, B. (2003). "Molecular Variants of KNCQ Channels Expressed in Murine Portal Vein Myocytes: A Role in Delayed Rectifier Current." Circulation Research **92**, 1016-1023.

Osol, G. and Halpern, W. (1985). "Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats." Amercian Journal of Physiology **249**, 914-921 (Abstract).

Osol, G.; Laher, I. and Cipolla, M. (1991). "Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation." Circulation Research **68**, 359-367.

Passmore, G.M.; Selyanko, A.A.; et al. (2003). "KCNQ/M Currents in Sensory Neurons: Significance for Pain Therapy." The Journal of Neuroscience **23**, 7227-7236.

Petkov, G.V.; Bonev, A.D.; et al. (2001). "β1-Subunit of the Ca_{2+}-activated K_+ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle." The Journal of Physiology **537**, 443-452.

Quayle, J.M., Nelson, M.T. and Standen, N.B. (1997). "ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle." Physiological Reviews **77**, 1165-1232 (Abstract).

Reber, K.M. and Nowicki, P.T. (1998). "Pressure and flow characteristics of terminal mesenteric arteries in postnatal intestine." Amercian Journal of Physiology **274**,290-298.

Roura-Ferrer, M.; Etxebarria,A.; et al. (2009). "Functional Implications of KCNE Subunit Expression for the K_v7.5 (KCNQ5) Channel." Cellular Physiology and Biochemistry **24**, 325-334.

Schmidt, R.F.; Lang, F.; et al. (2005). „Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie" Springer Verlag, Auflage **29**, Kapitel 1 -6

Schnee, M.E. and Brown, B.S. (1998). "Selectivity of Linopirdine (DuP 996), a Neurotransmitter Release Enhancer, in Blocking Voltage-Dependent and Calcium-Activated Potassium Currents in Hippocampal Neurons." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **286**, 709-717.

Schubert, R and Mulvany, M.J. (1999). "The myogenic response: established facts and attractive hypotheses." Clinical Science **96**(4), 313-326.

Schubert, R.; Lidington, D. and Bolz, S.S, (2008). "The emerging role of Ca_{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction." Cardiovascular Research **77**, 8-18.

Schwake, M.; Athanasiadu, D.; et al. (2006). "Structural Determinants of M-Type KCNQ (K_v7) K_+-Channel Assembly" Cellular/ Molecular **26**, 3757-3766.

Setoguchi, M.; Ohya, Y.; et al. (1997). "Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig." Journal of Physiology **501**, 343-353.

Smirnov, S.V.; Tammaro, P.; et al. (2003). "Role of Voltage-Gated K_+ (K_v) Channels in Vascular Function." Neurophysiology **35**, 262-275.

Smith, P.D.; Brett, S.E., et al. (2008). "K_{ir} channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle." The Journal of Physiology **586**, 1147-1160.

Spurrell, B.E., Murphy, T.V. and Hill, M.A. (2000). "Tyrosine phosphorylation modulates arteriolar tone but is not fundamental to myogenic response." Amercian Journal of Physiology **278**, 373-82.

Standen, N.B. and Quayle, J.M. (1998). "K_+ channel modulation in arterial smooth muscle." Acta Physiologica Scandinavica **164**, 549-557 (Abstract).

Suzuki, M.; Li, R.A.; et al. (2001). "Functional Roles of Cardiac and Vascular ATP-Sensitive Potassium Channels Clarified by Kir6.2-Knockout Mice." Circulation Research **88**, 570-577.

Teramoto, N. (2006). "Physiological roles of ATP-sensitive K_+ channels in smooth muscle." The Journal of Physiology **572**, 617-624.

Thorneloe, K.S.; Chen, T.T.; et al. (2001). "Molecular Composition of 4-Aminopyridine-Sensitive Voltage-Gated K_+ Channels of Vascular Smooth Muscle." Circulation Research **89**, 1030-1037.

Uchida, E. and Bohr, D.F. (1969). "Myogenic tone in isolated perfused resistance vessels from rats." American Journal of Physiology **216**, 1343-1350.

Uhlig, E. (2010). "Modulation der myogenen Reaktion kleiner Arterien durch den Kaliumkanalblocker BDS-I".

VanBavel, E.; Wesselmann, J.P.M. and Spann, J.A.E. (1998). "Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries." Circulation Research **82**, 210-220.

Wallis, S.J.; Firth, J. and Dunn, W.R. (1996). "Pressure-induced myogenic responses in human isolated cerebral resistance arteries." Stroke **27**, 2287-2291.

Wang, H.S.; Pan, Z.; et al. (1998). "KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel Subunits: Molecular Correlates of the M-Channel." Science **282**, 1890-1893.

Wang, H.S.; Brown, B.S.; et al. (2000). "Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I_{Ks} channels to the cognitive enhancer XE991." Molecular Pharmacology **57**, 1218-1223.

Watanabe, J.; Horiguchi, S.; et al. (1996). "The role of extracellular cations in the development of myogenic contraction in isolated rat small arteries." Japanese Circulation Journal **60**, 239-246.

Wellmann, G.C.; Bonev, A.D., et al. (1996). "Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and $Ca_{(2+)}$-ddependent K_+ channels." Circulation Research **79**, 1024-1030

Wesselmann, J.P.M.; VanBavel, E.; et al. (1996). "Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries." Journal of Vascular Research **33**, 32-41 (Abstract).

Xu, J. and Li, M. (1998). "Auxilliary subunits of Shaker-type potassium channels." Trends Carciovascular Medicine **8**, 22-234 (Abstract).

Yanazaki, J.; Duan, D.; et al. (1998). "Functional and molecular expression of volume regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells." Journal of Physiology **507**, 729-736.

Yeung, S.Y.M. and Greenwood, I.A. (2005). "Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells." British Journal of Pharmacology **146**, 585-595.

Yeung, S.Y.M.; Pucosvsky, V.; et al. (2007). "Molecular expression and pharmacological identification of a role for K_v7 channels in murine vascular reactivity." British Journal of Pharmacology **151**, 758-770.

Yeung, S.Y.M.; Lange, W; et al. (2008). "Expression profile and characterisation of a truncated KCNQ5 splice variant." Biochemical and Biophysical Research Communications **371**, 741-746.

Yeung, S.Y.M.; Schwake M.; et al. (2008). "Bimodal effects of the Kv7 channel activator retigabine on vascular K^+ currents." British Journal of Pharmacology **155**, 62-72.

Yip, K.P. and Marsh, D.J. (1996). "$[Ca_{2+}]_i$ in rat afferent arteriole during constriction measured with confocal fluorescence microscopy." American Journal of Physiology **271**, 1004-1011 (Abstract).

Yu, W; Xu, J.; et al. (1996). "NAB domain us essential for the subunit assembly of both α-α and α-β complexes of Shaker-like potassium channels." Neuron **16**, 441-453.

Zaczek, R.;, Chorvat, R.J.; et al. (1998). "Two New Potent Neurotransmitter Release Enhancers, 10,10-Bis(4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-Anthracenone and 10,10-Bis(2-Fluoro-4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-Anthracenone: Comparison to Linopirdine." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **285**, 724-730.

Zhong, X.Z.; Harhun, M.I.; et al. (2010). "Participation of KCNQ (K_v7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter." The Journal of Physiology **588**, 3277-3293.

Zou, H.; Ratz, P.H. and Hill, M.A. (1995). "Role of myosin phosphorylation and $[Ca_{2+}]$ in myogenic reactivity and arteriolar tone." American Journal of Physiology **269**, 1590-1596 (Abstract).

Zou, H.; Ratz, P.H. and Hill, M.A. (1995). "Temporal aspects of $[Ca_{2+}]_i$ and myosin phosphorylation during myogenic and agonist induced arteriolar constriction." Journal of Vascular Research **37**, 556-567 (Abstract).

7 Thesen

- Alle Organe benötigen Sauerstoff und Nährstoffe. Um eine von äußeren Einflüssen möglichst unabhängige Versorgung zu gewährleisten, besitzen Blutgefäße eine myogene Autoregulation. Dieser Mechanismus wird durch Kontraktion und Dilatation kleiner Arterien als Antwort auf Blutdruckänderungen ausgelöst.
- Als myogene Reaktion bezeichnet man die auf Druckerhöhung folgende Kontraktion und auf Drucksenkung folgende Dilatation kleiner Arterien und Arteriolen.
- Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an der myogenen Reaktion. Daraus folgt, dass Substanzen, die auf diese Kanäle wirken, die myogene Reaktion beeinflussen können.
- KCNQ-Kanäle sind spannungsabhängige Kaliumkanäle und gehören zur K_v7–Familie.
- XE991 und Linopiridin sind spezifische Inhibitoren der KCNQ-Familie.
- In dieser Arbeit wurde die These überprüft, dass XE991 und Linopiridin durch Inhibition von KCNQ-Kanälen kleine Arterien kontrahieren und damit die myogene Reaktion beeinflussen können.
- Der innere Gefäßdurchmesser bzw. dessen Veränderungen wurden in vitro an isometrischen und isobaren Präparaten der A.gracilis der Ratte und des Hamsters gemessen.
- Nach Zugabe von XE991 erfolgte eine Zunahme der gemessenen Wandspannung der Gefäße und damit eine Verstärkung des myogenen Tonus bei dem isometrischen Versuchsaufbau.
- Nach Zugabe von XE991 erfolgte eine Kontraktion der Gefäße und eine Verstärkung des myogenen Tonus im Druckbereichen von 10 bis 120mmHg bei dem isobaren Versuchsaufbau.
- Nach Zugabe von Linopiridin erfolgte ebenfalls eine Zunahme der Wandspannung und damit eine Verstärkung des myogenen Tonus bei dem isometrischen Versuchsaufbau.
- Nach Zugabe von Linopiridin erfolgte ebenfalls eine Kontraktion der Gefäße und eine Verstärkung des myogenen Tonus im Druckbereichen von 10 bis 120mmHg bei dem isobaren Versuchsaufbau.

- Nach Zugabe beider Substanzen war die myogene Reaktion und damit die Veränderung des Blutflusses bei Druckänderung nicht beeinflusst.
- Es ergibt sich daraus, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle der KCNQ-Familie an der Regulation des myogenen Tonus beteiligt sind und damit den Blutfluss bei einem gegebenen Druck mitbestimmen, die myogene Reaktion, d.h. die Flussänderung in Folge einer Druckänderung, jedoch nicht beeinflussen.

I. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe oder andere als in der Arbeit angegebene Hilfsmittel verfasst habe.

Löhne, 14.04.2014

Eva Stavrakas, geb. Diekmann

II. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Schubert für seine Betreuung während der Durchführung meiner Versuchsreihen sowie sein Engagement während der Verfassung dieser Arbeit bedanken.
Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts, die mir stets bei der praktischen Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meiner Familie gebührt ein besonderer Dank für ihre Hilfe bei technischen Problemen, für ihre Korrekturlesungen und ihre unendliche Geduld und mentale Unterstützung.