

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplombiologin Bettina Müller

aus Plauen

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Die Rolle des BK-Kanals bei der dysfunktionalen Regulation des Gefäßtonus bei Diabetes und seine Aktivitätssteuerung durch Calciumtransportprozesse sowie ATP- und spannungsabhängige Kaliumkanäle

Gutachter:

Prof. Dr. Stephan Frings

Prof. Dr. Rudolf Schubert

Zusammenfassung

Eine an unterschiedliche Umweltbedingungen angepasste Durchblutung des Körpers ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen. Die Durchblutung wird dabei vor allem durch Änderungen des Tonus von Arterien und Arteriolen gesteuert. Bei Diabetes kann häufig eine dysfunktionale Autoregulation beobachtet werden, was kardiovaskuläre Komplikationen zur Folge hat. Da der BK-Kanal bei der Regulation des Gefäßtonus als negativer Feedbackmechanismus eine entscheidende Rolle spielt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit eine Fehlfunktion des BK-Kanals zur dysfunktionalen Autoregulation bei Diabetes beiträgt. Mittels isometrischer Myographie isolierter Rattenarterien wurde zunächst die Aktivitätssteuerung des BK-Kanals genauer untersucht. Arterien gesunder sowie diabetischer Ratten des STZ-Modells wurden dabei vergleichend analysiert. Die Inhibierung des BK-Kanals mit IBTX führte bei Arterien gesunder Tiere neben einer Verstärkung der Gefäßkontraktion auch zum Auftreten von Oszillationen des Gefäßtonus. Der kontraktile Grundzustand der untersuchten Gefäße ist also durch phasische Kontraktionen gekennzeichnet, welche durch die Aktivität des BK-Kanals in tonische Kontraktionen umgewandelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die SERCA, Ryanodin-Rezeptoren, die Natrium-Kalium-ATPase sowie L- und T-Typ-Calciumkanäle an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Gefäßoszillationen beteiligt sind und funktionell mit dem BK-Kanal interagieren, ebenso wie Kv-Kanäle. In den Gefäßen diabetischer Tiere waren die IBTX-induzierten Oszillationen schwächer ausgeprägt. Dies lässt darauf schließen, dass bei Diabetes die Funktion der gap junctions gestört und damit die Synchronisation der glatten Muskelzellen nur unzureichend möglich ist oder aber dass der den Oszillationen in einzelnen Zellen zu Grunde liegende Mechanismus durch den Diabetes in seiner Funktion gestört ist. Ein Einfluss des Diabetes auf die Funktionalität des BK-Kanals konnte hingegen nicht festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Funktionalität des BK-Kanals von verschiedenen Calcium-Transportprozessen sowie Kv-Kanälen mitbestimmt, dies jedoch nicht durch Diabetes beeinflusst wird. Die Entstehung von Oszillationen glatter Muskelzellen oder die Funktionalität der gap junctions wird jedoch durch Diabetes beeinträchtigt.

Abstract

The cardiovascular system is essential for maintaining the bodily functions. Blood flow is controlled by the contractile state of arteries and arterioles. In diabetes, a dysfunctional autoregulation can be observed, leading to cardiovascular damages. The BK channel serves as negative feedback mechanism and therefore plays an important role in controlling vascular tone. The aim of this study was to investigate whether a dysfunction of the BK channels contributes to the malfunction of autoregulation in diabetes. BK channel activity was investigated using isometric force measurement of isolated rat arteries. Arteries from healthy rats as well as from rats with STZ-induced diabetes were used. Ion channel gene expression was studied using qPCR.

Inhibition of BK channels in arteries from healthy animals with iberiotoxin augmented vessel contraction and caused vessel oscillations. Thus, the contractile state of the analyzed vessels is characterized by phasic contractility and BK channels transform phasic into tonic contraction. It has been shown that the SERCA, ryanodine receptors, the sodium-potassium pump and L- and T-type calcium channels contribute to development and maintenance of single cell oscillations and interact functional with BK channels. Kv-channels interact functional with BK channels as well. In arteries from diabetic animals iberiotoxin-induced oscillations were attenuated. These findings indicate a malfunction of gap junctions and, as a consequence, an incomplete synchronization of the smooth muscle cells or an impairment of the mechanism leading to cell oscillation in diabetes. However, there was no influence of diabetes on BK channel functionality or gene expression.

This study shows that calcium transport mechanisms and Kv channel activity contribute to the regulation of BK channel functionality which is not altered in diabetes. However, the development of vessel oscillation or gap junction functionality is affected in diabetes.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau der Arterien.....	2
1.2 Aufbau glatter Muskelzellen	3
1.3 Kontraktionsmechanismus.....	4
1.4 Molekulare Regulationsmechanismen während Vasokonstriktion und Vasodilatation	6
1.5 Die Rolle von Kaliumkanälen bei Kontraktion und Dilatation glatter Muskelzellen.....	7
1.5.1 Der BK-Kanal	8
1.5.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle	13
1.5.3 Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle	15
1.6 Diabetes mellitus	18
1.6.1 Komplikationen und Folgeerkrankungen.....	18
1.6.2 Kaliumkanäle und Diabetes	19
1.7 Fragestellung und Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Versuchstiere	21

2.2	Chemikalien.....	21
2.3	Puffer	24
2.4	Geräte und Arbeitsmaterialien.....	26
2.5	Gefäßpräparation	29
2.6	RNA-Analyse mittels Micro Fluidic Cards (MFCs)	31
2.6.1	Isolation der mRNA.....	31
2.6.2	RNA-Analyse mittels Bioanalyzer	32
2.6.3	cDNA-Synthese und Präamplifikation	33
2.6.4	Durchführung Micro Fluidic Cards.....	35
2.6.5	Analyse Micro Fluidic Cards	36
2.7	RNA-Analyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	37
2.7.1	RNA-Präparation	37
2.7.2	cDNA-Synthese	38
2.7.3	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	39
2.7.4	Analyse der qPCR.....	42
2.8	Isometrische Myographie	43
2.8.1	Normalisierung	44
2.8.2	Versuchsablauf.....	45
2.8.3	Auswertung	48
2.9	Bestimmung der Calciumkonzentration mittels Fluoreszenzmikroskopie	49
2.9.1	Fluoreszenzindikator Fura-2	50
2.9.2	Beladung der Zellen mit Fura-2.....	50
2.9.3	Versuchsablauf:.....	51

2.9.4	Auswertung	52
2.10	Diabetische Ratten	53
2.10.1	Streptozotocininjektion	53
2.10.2	Kontrolle von Gewicht und Blutzucker	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Die Rolle des BK-Kanals bei der Gefäßkontraktion	55
3.2	Der Einfluss von Calciumtransportprozessen auf die Schutzfunktion des BK-Kanals gegen phasische Kontraktionen glatter Muskelzellen	68
3.2.1	Die Rolle von Calciumtransportprozessen der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums	68
3.2.2	Die Rolle von Calciumtransportprozessen der Zellmembran	77
3.3	Die Interaktion des BK-Kanals mit K_V -, K_{ATP} - und Kir-Kanälen während der Kontraktion glatter Muskelzellen	115
4	Diskussion.....	141
4.1	Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals.....	141
4.2	Die Umwandlung phasischer in tonische Kontraktionen durch den BK-Kanal.....	141
4.3	Calciumtransportprozesse beeinflussen die Schutzfunktion des BK-Kanals gegen phasische Kontraktionen	144
4.4	K_V -, K_{ATP} - und Kir-Kanäle interagieren funktionell mit BK-Kanälen..	154
4.5	Die Funktion des BK-Kanals und die Genexpression werden nicht von Diabetes beeinflusst	157
	Literaturverzeichnis	XV
	Danksagung	XXIX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dreischichtiger Aufbau der Arterien.	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des Kontraktionsmechanismus durch das Ineinandergleiten von Aktin- und Myosin-Filamenten.	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der Calciumkanäle und -pumpen der glatten Muskelzelle.	7
Abb. 4: Schematischer Aufbau des BK-Kanals.	10
Abb. 5: Schematischer Aufbau von Kv-Kanälen.	14
Abb. 6: Schematischer Aufbau von Kir-Kanälen.	15
Abb. 7: Schematischer Aufbau des K_{ATP} -Kanals.	17
Abb. 8: Ergebnis der Analyse einer RNA-Probe mittels Bioanalyzer.	33
Abb. 9: Beispielverlauf der Normalisierung eines Gefäßes (aufgenommen mit LabChart).	45
Abb. 10: Beispielverlauf der Aktivierungsphase eines Gefäßes.	46
Abb. 11: Beispielverlauf der 2. und 3. DWK der Gefäße im 4-Kanal-Myographen am Beispiel von Stromatoxin-1	48
Abb. 12: Hydrolyse von Fura-2 AM durch Esterasen des Zytoplasmas und Bildung eines Komplexes mit Calcium	51
Abb. 13: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion.	55
Abb. 14: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration.	56
Abb. 15: Originaldaten der Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin- induzierte Gefäßkontraktion.	57
Abb. 16: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion.	58

Abb. 17: Charakteristik der IBTX-induzierten Oszillationen bei Einwirkung von Methoxamin.....	59
Abb. 18: Wirkung von 18α -Glycyrrhetinsäure 10^{-4} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	60
Abb. 19: Wirkung von Glucose $2 \cdot 10^{-2}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	62
Abb. 20: Wirkung von Glucose $4 \cdot 10^{-2}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	63
Abb. 21: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	65
Abb. 22: Wirkung von Diabetes auf die Charakteristik der IBTX-induzierten Oszillationen bei Einwirkung von Methoxamin.....	66
Abb. 23: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der α - und $\beta 1$ -Untereinheit des BK-Kanals.....	67
Abb. 24: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der α - und β -Untereinheiten des BK-Kanals.....	67
Abb. 25: Wirkung von 2-APB 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	69
Abb. 26: Wirkung von 2-APB $3 \cdot 10^{-5}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	70
Abb. 27: Wirkung von CPA $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	72
Abb. 28: Wirkung von CPA 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	73
Abb. 29: Wirkung von Ryanodin $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	75
Abb. 30: Wirkung von Ryanodin 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.....	76

Abb. 31: Wirkung von Ouabain $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	78
Abb. 32: Wirkung von Ouabain 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	79
Abb. 33: Wirkung von Ouabain 10^{-4} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	80
Abb. 34: Wirkung von Ouabain $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	81
Abb. 35: Wirkung von KB-R7943 10^{-6} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	83
Abb. 36: Wirkung von KB-R7943 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	84
Abb. 37: Wirkung von Caloxin 1b1 10^{-4} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	86
Abb. 38: Wirkung von Caloxin 1b1 $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	87
Abb. 39: Wirkung von Caloxin 2A1 10^{-4} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	89
Abb. 40: Wirkung von Caloxin 2A1 $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	90
Abb. 41: Wirkung von Nimodipin $3 \cdot 10^{-11}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	92
Abb. 42: Wirkung von Nimodipin 10^{-10} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	93
Abb. 43: Wirkung von TTA-A2 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	94
Abb. 44: Wirkung von TTA-A2 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	96

Abb. 45: Wirkung von TTA-P2 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	97
Abb. 46: Wirkung von TTA-P2 10^{-5} M und Iberiotoxin auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	98
Abb. 47: Wirkung von Nickelchlorid $5 \cdot 10^{-5}$ M und Iberiotoxin auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	100
Abb. 48: Wirkung von Nickelchlorid 10^{-4} M und Iberiotoxin auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	101
Abb. 49: Wirkung von Agatoxin 10^{-9} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	103
Abb. 50: Wirkung von Agatoxin 10^{-8} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	104
Abb. 51: Wirkung von H1152 10^{-7} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	106
Abb. 52: Wirkung von H1152 $3 \cdot 10^{-7}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	107
Abb. 53: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von 10^{-3} M.	109
Abb. 54: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von $1,6 \cdot 10^{-3}$ M.	110
Abb. 55: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von $2,2 \cdot 10^{-3}$ M.	112
Abb. 56: Wirkung von NiCl_2 auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei Diabetes.	113
Abb. 57: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Calcium-Kanäle.	114
Abb. 58: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Calcium-Kanäle.	115

Abb. 59: Wirkung von NS11021 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	116
Abb. 60: Wirkung von NS11021 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	117
Abb. 61: Wirkung von NS19504 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	119
Abb. 62: Wirkung von NS19504 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	120
Abb. 63: Wirkung von Lithocholsäure $5 \cdot 10^{-5}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	122
Abb. 64: Wirkung von DPO-1 10^{-7} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	124
Abb. 65: Wirkung von DPO-1 10^{-6} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	125
Abb. 66: Wirkung von ScTx-1 10^{-7} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	127
Abb. 67: Wirkung von XE991 $3 \cdot 10^{-7}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	128
Abb. 68: Wirkung von XE991 10^{-6} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	129
Abb. 69: Wirkung von XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	130
Abb. 70: Einfluss des Endothels auf die Genexpression spannungsabhängiger Kalium-Kanäle.	131
Abb. 71: Wirkung von Glibenclamid 10^{-6} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	132
Abb. 72: Wirkung von Bariumchlorid 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.	134

Abb. 73: Einfluss des Endothels auf die Genexpression der Kir2.x-Kanäle.	135
Abb. 74: Einfluss des Endothels auf die Genexpression der SUR-Untereinheiten sowie der Kir6.x-Kanäle.	136
Abb. 75: Wirkung von XE991 auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei Diabetes.	137
Abb. 76: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Kaliumkanäle.	139
Abb. 77: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Kaliumkanäle.	139
Abb. 78: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der Kir2.x und Kir6.x- Kanäle.	140

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zur Herstellung der Puffer verwendete Reagenzien.	21
Tab. 2: Für die Induktion des Diabetes verwendete Substanzen.	22
Tab. 3: Bei der isometrischen Myographie sowie bei der Bestimmung der Calciumkonzentration der verwendeten Testsubstanzen.	23
Tab. 4: Für Versuche am Myographen verwendete Puffer.	25
Tab. 5: Verwendete Geräte.	26
Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	28
Tab. 7: Für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendete Kits.	29
Tab. 8: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die MFCs.	33
Tab. 9: Protokoll der cDNA-Synthese für die MFCs.	34
Tab. 10: Pipettierschema der Präamplifizierung für die MFCs.	34
Tab. 11: Protokoll der Präamplifikation für die MFCs.	35
Tab. 12: Auf den MFCx hybridisierte Gene mit dazugehöriger Assay ID.	35
Tab. 13: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die qPCR.	38
Tab. 14: Protokoll der cDNA-Synthese für die qPCR.	38
Tab. 15: Protokoll der qPCR.	39
Tab. 16: Bei der qPCR verwendete Primer.	40
Tab. 17: Pipettierschema der Dosiswirkungskurve.	47

Abkürzungsverzeichnis

MX	Methoxamin
IBTX	Iberiotoxin
GTP	Guanosintriphosphat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
ATP	Adenosintriphosphat
MLCP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
TRPC	transient receptor potential channels
IP ₃	Inositoltriphosphat
PLC	Phospholipase C
DAG	Diacylglycerin
PKC	Proteinkinase C
ROK	Rho-Kinase
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	Komplementäre DNA
qPCR	quantitative Echtzeit PCR
IC	Innerer Gefäßumfang

ACh	Acetylcholin
DWK	Dosiswirkungskurve
AUC	Fläche unter der Kurve
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl-Borat
CPA	Cyclopiazonic acid
DPO-1	Diphenyl phosphine oxide-1
ScTx-1	Stromatoxin-1
NiCl ₂	Nickelchlorid
BaCl ₂	Bariumchlorid

1 Einleitung

Die Aufgabe des Herz-Kreislauf-Systems ist die Gewährleistung des Stoffaustausches zwischen Blut und Geweben. Über das Blut findet die Versorgung des gesamten Körpers mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten und Kohlenstoffdioxid statt. Der Blutkreislauf dient darüber hinaus der Thermoregulation. Die Durchblutung muss dabei an die Bedürfnisse des Organismus in unterschiedlichen Situationen angepasst werden. Dieser komplexe Prozess wird über verschiedene Wege reguliert, lokal über eine Änderung der Sauerstoffkonzentration, durch Metabolite (z.B. ADP) aus angrenzenden Organen und Geweben und durch die Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Katecholamine, wie zum Beispiel Adrenalin oder Dopamin, werden bei körperlicher Arbeit oder auch psychischem Stress ausgeschüttet und sorgen in verschiedenem Ausmaß für eine Erhöhung der Herzfrequenz, einen Blutdruckanstieg und eine bessere Durchblutung der betroffenen Muskeln. Im Gegenzug dazu kommt es zu einer Verringerung der Durchblutung der Organe mit Ausnahme der gerade beanspruchten Skelettmuskulatur, des Gehirns, des Herzmuskels und der Haut (kollaterale Vasokonstriktion). Die gute Durchblutung der Haut dient dabei der Thermoregulation. Die Steuerung der Durchblutung wird dabei vor allem durch den Tonus der Arterien und Arteriolen bestimmt. Dabei wird durch Kontraktion oder Dilatation der Gefäßwand entweder die Durchblutungsrate als Antwort auf eine Änderung der Bedingungen erhöht oder erniedrigt oder es wird durch einen als Autoregulation bezeichneten Prozess die Durchblutung der Organe auch bei schwankendem systemischen Blutdruck konstant gehalten. Der unterschiedliche Tonus der Gefäße wird dabei von verschiedenen Faktoren, wie Neurotransmitter oder vasoaktive Substanzen, gesteuert, welche auf die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand wirken. Diese führen über verschiedene zelluläre Signalkaskaden zu einer Kontraktion beziehungsweise Relaxation. Dazu zählt beispielsweise Adrenalin, welches über Adrenorezeptoren seine Wirkung vermittelt, die über GTP-bindende Proteine eine Signalkaskade auslösen. Auch aus dem Endothel werden verschiedene vasoaktive Substanzen abgegeben, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid, welches gefäßerweiternd wirkt.

1.1 Aufbau der Arterien

Grundsätzlich sind alle Arterien durch einen dreischichtigen Aufbau charakterisiert, bestehend aus Tunica intima (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia) (siehe Abb.1). Die innerste Schicht, die Tunica intima, besteht aus Endothelzellen sowie einer aufgelagerten Membran. Die Endothelzellen dienen als semipermeable Membran zwischen Blutgefäß und Blut und regulieren den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe. Außerdem werden vom Endothel verschiedene vasoaktive Substanzen freigesetzt, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid oder Acetylcholin. Die sich anschließende Tunica media besteht aus glatten Muskelzellen sowie eingelagerten elastischen Fasern und kollagenem Bindegewebe. Die Tunica media ist für die Vasokonstriktion und Vasodilatation verantwortlich. Die aus Bindegewebe bestehende Tunica externa bildet als dritte Schicht eine Abgrenzung der Blutgefäße zu anderen Strukturen und dient gleichzeitig der Versorgung der Gefäße.

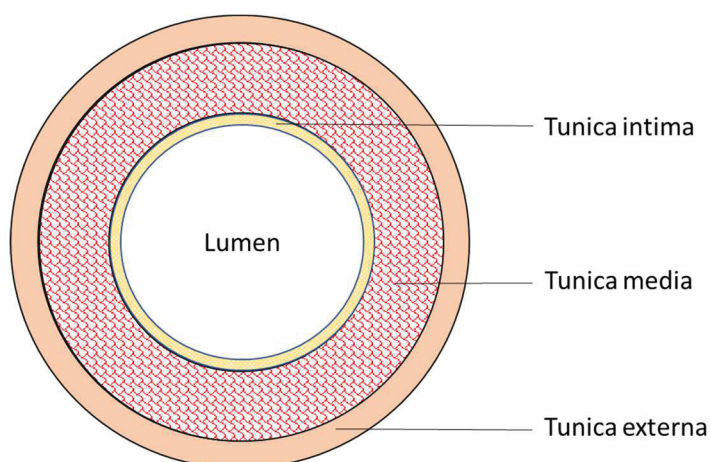


Abb. 1: Dreischichtiger Aufbau der Arterien.

Man unterscheidet dabei grundsätzlich Arterien vom elastischen Typ und Arterien vom muskulären Typ. Arterien vom elastischen Typ (Aorta, Lungenarterien) sind große, herznahe Gefäße. Ihre Aufgabe besteht darin, den vom Herzen ausgehenden diskontinuierlichen, turbulenten Blutfluss in eine annähernd kontinuierliche, laminare

Strömung umzuwandeln. Dies geschieht, indem sich die elastischen Gefäßwände während der Systole zunächst weit dehnen, um den Blutausschuss des Herzens aufzunehmen, und sich während der Diastole wieder zusammenziehen. Durch diese „Windkesselfunktion“ werden die nachfolgenden Arterien kontinuierlich mit Blut versorgt. Die Tunica media elastischer Arterien weist daher einen sehr hohen Anteil elastischer Fasern auf.

Arterien vom muskulären Typ sind die weiter peripher liegenden Gefäße. Die Tunica media dieser Arterien besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen, welche im Querschnitt annähernd kreisförmig angeordnet sind. Arterien vom muskulären Typ sorgen durch Kontraktion beziehungsweise Dilatation dafür, den Gefäßtonus aufrechtzuerhalten sowie an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Damit spielen glatte Muskelzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und der Durchblutung von Organen und Geweben.

1.2 Aufbau glatter Muskelzellen

Glatte Muskelzellen sind spindelförmig, haben einen Durchmesser von 5-8 μm und besitzen in Gefäßen eine Länge von 15-20 μm . Die Muskelzellen der Arterienwand gehören zum Multi-Uni-Typ. Die einzelnen Zellen sind daher nicht oder nur in geringem Maße abhängig von der Kontraktion ihrer Nachbarzellen. Vielmehr wird jede Zelle durch Nervenfasern direkt angesteuert, wodurch die Erregung lokal begrenzt bleibt. Der Zellkern liegt zentral. In Zellmembrannähe befindet sich das schwach ausgeprägte Sarkoplasmatische Retikulum (SR), welches der intrazellulären Speicherung von Calciumionen dient. Die Tubuli des SR liegen meist in der Nähe von Caveolae, sackförmigen Einbuchtungen der Zellmembran.

Den Hauptbestandteil glatter Muskelzellen stellen die kontraktile Filamente Myosin und Aktin sowie die Intermediärfilamente Desmin, Vimentin und Peripherin dar. Die Aktinfilamente der glatten Muskulatur bestehen aus zwei F-Aktin-Ketten, die sich in Form einer Doppelhelix umeinander winden. Daran angelagert ist das fadenförmige Tropomyosin sowie das regulatorische Protein Caldesmon, wodurch die

Myosinbindestellen im Ruhezustand blockiert sind. Die Myosinfilamente bestehen aus zwei schweren sowie vier leichten Ketten. Die schweren Ketten besitzen eine konservierte Kopfregion, die aufgrund ihrer katalytischen ATPase-Funktion als Motordomäne bezeichnet wird. Sie besitzt eine sehr hohe Aktin-Affinität und ist für die Bewegung an den Aktinfilamenten verantwortlich. Die sich anschließende Halsregion besitzt Bindestellen für verschiedene leichte Ketten. Die lange Schwanzregion beider schwerer Ketten bildet eine lange, helikale Struktur. Jeder schweren Kette angelagert ist je eine essentielle leichte Kette, die dem strukturellen Aufbau der Myosinfilamente dient, sowie eine regulatorische leichte Kette. Aktin- und Myosinfilamente bilden zusammen Minisarkomere, welche an α -Actinin-reiche Verdichtungszone, sogenannte dense bodies, angeheftet sind. Diese sind untereinander durch Intermediärfilamente verbunden, wodurch ein dichtes Netz kontraktile Filamente in der Zelle gebildet wird. Über Anheftungsplatten (dense patches) sind die Filamente in der Zellmembran verankert. Das second messenger Protein Calmodulin liegt gelöst im Zytoplasma vor (Huppelsberg 2005).

1.3 Kontraktionsmechanismus

Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst. Dies kann zum einen durch den Einstrom von Calciumionen aus dem extrazellulären Raum über die Zellmembran, zum anderen durch Calciumeinstrom in das Zytosol aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) geschehen. Dabei stellt der Einstrom aus dem extrazellulären Raum den Hauptmechanismus dar, da das SR in glatten Muskelzellen nur wenig ausgeprägt ist. Die Calciumionen binden an das regulatorische Protein Calmodulin und der entstandene Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosinleichtkettenkinase (MLCK). Diese phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins, wodurch die ATPase aktiviert wird. Der Calcium-Calmodulin-Komplex bindet außerdem an Caldesmon und verdrängt dadurch Caldesmon und Tropomyosin von den Aktinfilamenten, was eine Bindung der Myosinköpfe an Aktin ermöglicht. Die Aktin- und Myosinfilamente gleiten so ineinander, wodurch es zu einer Verkürzung der Minisarkomere kommt (siehe Abb. 2).

Dies hat eine Verkürzung der Muskelzelle und damit die Kontraktion der Arterie zur Folge. Antagonistisch zur MLCK wirkt die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), welche die leichte Kette des Myosins dephosphoryliert. Dies bewirkt eine Trennung von Aktin- und Myosinfilamenten und somit eine Relaxation der glatten Muskelzelle (Huppelsberg 2005, Harper 2013).

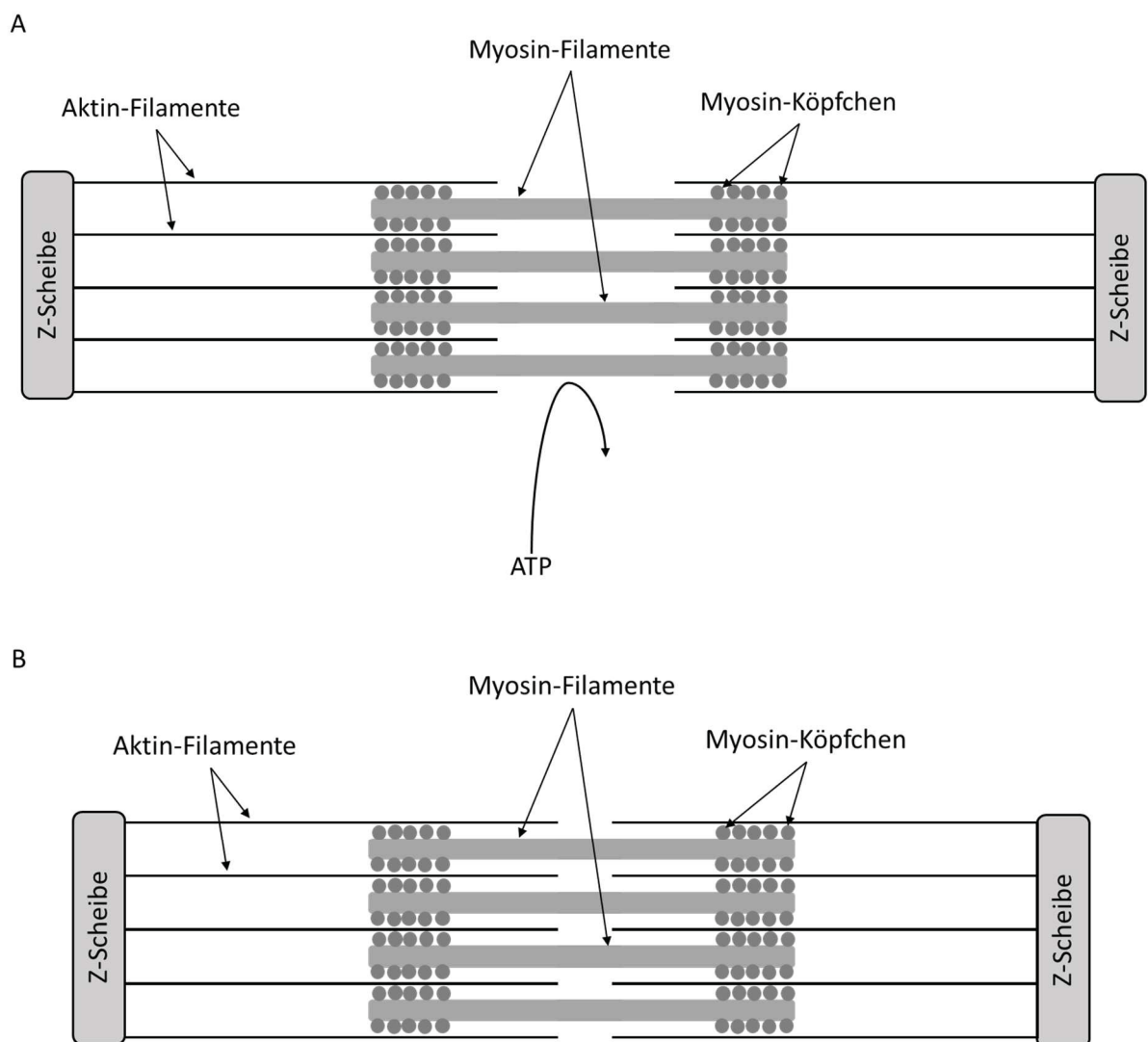


Abb. 2: Schematische Darstellung des Kontraktionsmechanismus durch das Ineinandergleiten von Aktin- und Myosin-Filamenten. A: Sarkomer vor der Kontraktion der glatten Muskelzelle. B: Verkürztes Sarkomer während der Kontraktion der glatten Muskelzelle.

1.4 Molekulare Regulationsmechanismen während Vasokonstriktion und Vasodilatation

Die Kontraktion glatter Muskelzellen hängt im Wesentlichen von der intrazellulären Calciumkonzentration ab. Der Calciumeinstrom kann dabei über ligandengesteuerte sowie über spannungsabhängige Calciumkanäle erfolgen (siehe Abb. 3). Ligandengesteuerte Calciumkanäle, zum Beispiel TRPC-Kanäle in der Zellmembran, werden durch die Bindung von Liganden, wie z.B. Hormonen oder Neurotransmittern, aktiviert (Large, Saleh et al. 2009). Der Calciumeinstrom aus dem SR erfolgt vorrangig über die Kanäle, die IP₃- und Ryanodin-Rezeptoren in der SR-Membran bilden. Durch die G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, in deren Zuge Inositoltrisphosphat (IP₃) sowie Diacylglycerin (DAG) aus der Zellmembran abgespalten werden. IP₃ bindet an die IP₃-Rezeptoren und aktiviert diese, wodurch es zum Ausstrom von Calciumionen aus dem SR und damit zur Aktivierung der MLCK kommt (Balla 2006, Fedorenko, Popugaeva et al. 2014). DAG aktiviert zusammen mit Calciumionen die Proteinkinase C (PKC), welche die MLCP durch die Phosphorylierung des endogenen MLCP-Inhibitors CPI-17 hemmt. Auf gleichem Weg kann die Aktivität der MLCP auch durch eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Rho-Kinase (ROK) gehemmt werden (Löffler 2014). In der vorliegenden Arbeit soll der Kontraktionsmechanismus über Deaktivierung der MLCP jedoch nicht näher beleuchtet werden. Ryanodin-Rezeptoren als calciumaktivierte Calciumkanäle werden durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert (Amador, Stathopoulos et al. 2013, O'Brien, Venturi et al. 2015).

Zu den spannungsabhängigen Calciumkanälen der glatten Muskulatur gehören L-Typ-, T-Typ- und P/Q-Typ-Calciumkanäle. Sie werden durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert bzw. durch eine Re- oder Hyperpolarisation deaktiviert (Catterall 2000, Martinsen, Dessy et al. 2014).

Die Dilatation glatter Muskelzellen wird durch eine Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst. Dies erfolgt durch den Transport der Calciumionen über die Zellmembran in den extrazellulären Raum sowie durch den Rücktransport in das SR (siehe Abb. 3). Der Transport geschieht über ATP-abhängige Ionenpumpen, die SERCA

(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) in der SR-Membran und die PMCA (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase) in der Zellmembran der glatten Muskelzellen (Floyd and Wray 2007). Des Weiteren können Calciumionen über den Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellmembran in den extrazellulären Raum transportiert werden (Nishimura 2006).

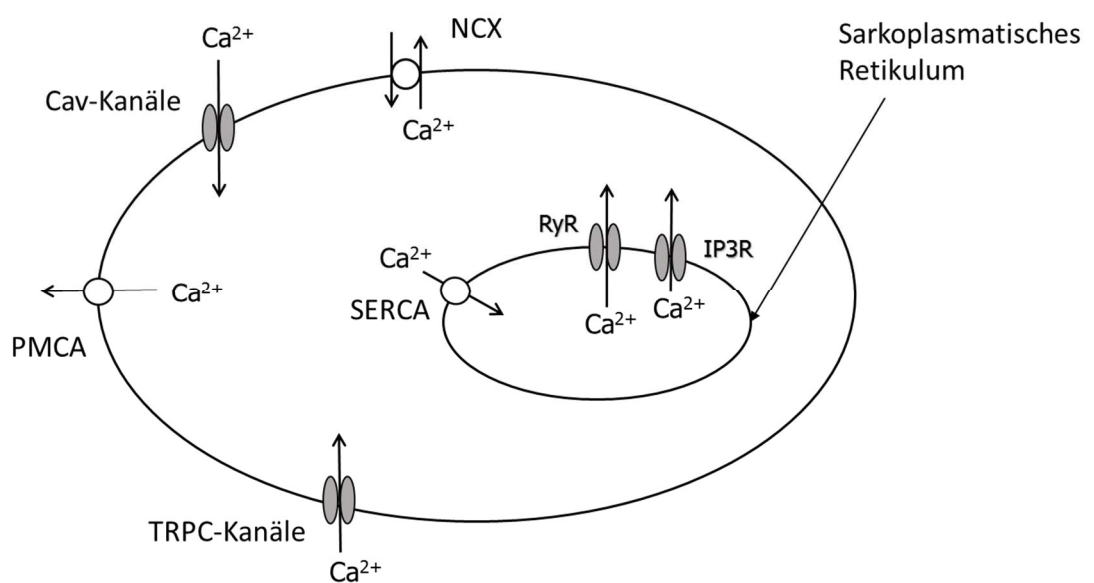


Abb. 3: Schematische Darstellung der Calciumkanäle und -pumpen der glatten Muskelzelle. Spannungsabhängige Calciumkanäle (Cav), Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), PMCA und TRPC-Kanäle in der Zellmembran, IP3- und Ryanodin-Rezeptoren (IP3R, RyR) sowie SERCA in der SR-Membran.

1.5 Die Rolle von Kaliumkanälen bei Kontraktion und Dilatation glatter Muskelzellen

Kaliumkanäle werden ubiquitär in der glatten Muskulatur exprimiert. In glatten Muskelzellen spielen sie durch die von ihnen verursachten Änderungen des

Membranpotentials eine große Rolle bei der Gefäßkontraktion und -dilatation. Kaliumkanäle bilden die größte Gruppe der Ionenkanäle und lassen sich abhängig von ihrem Aktivationsmechanismus in verschiedene Familien einteilen. So gibt es unter anderem calciumabhängige, spannungsabhängige und ATP-sensitive Kaliumkanäle. Des Weiteren gibt es einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle, welche das Ruhepotential der Zelle aufrechterhalten.

1.5.1 Der BK-Kanal

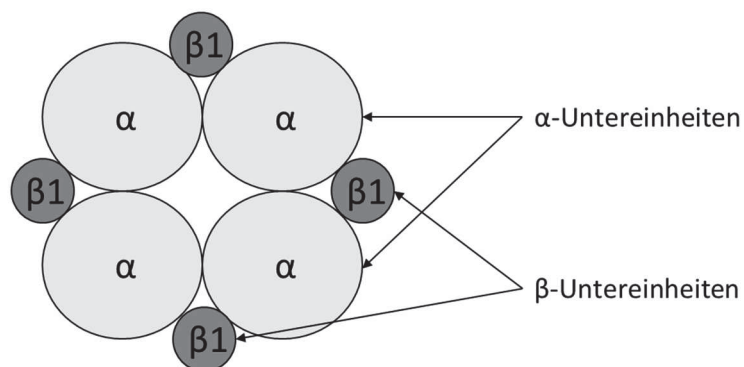
Der BK-Kanal gehört zur Gruppe der calciumabhängigen Kaliumkanäle, welche sich in ihrer Ionenleitfähigkeit unterscheiden. Man unterscheidet dabei SK-Kanäle (calciumabhängige Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit), IK-Kanäle (calciumabhängige Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit) und BK-Kanäle (calciumabhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit) (Alexander, Catterall et al. 2015). Der BK-Kanal zeichnet sich dabei nicht nur durch die hohe Ionenleitfähigkeit, sondern auch durch seine Sensitivität für das Membranpotential aus (Ghatta, Nimmagadda et al. 2006, Castillo, Contreras et al. 2015). Dadurch ist der BK-Kanal ein wichtiger Feedbackmechanismus bei der Kontraktion glatter Muskelzellen, indem er einer zu starken Depolarisation der Zellwand durch den Ausstrom von Kaliumionen entgegenwirkt. Neben der Aktivierung durch Calciumionen sowie durch die Depolarisierung des Membranpotentials wird der BK-Kanal durch eine Vielzahl von weiteren Faktoren reguliert. So wird er zum Beispiel durch die Proteinkinasen A und G aktiviert und durch die Proteinkinase C inhibiert (Schubert and Nelson 2001).

Der BK-Kanal ist aus je vier porenbildenden α -Untereinheiten sowie regulatorischen β -Untereinheiten aufgebaut (siehe Abb. 4A). Es gibt dabei gewebespezifisch verschiedene Arten von β -Untereinheiten, in glatten Muskelzellen werden hauptsächlich $\beta 1$ -Untereinheiten exprimiert (Salkoff, Butler et al. 2006, Lee and Cui 2010). Jede α -Untereinheit besteht aus 11 hydrophoben Domänen (Segmente S0 bis S10) (siehe Abb. 4B). Die Segmente S0 bis S6 sind transmembranäre Domänen. Die Segmente S1 bis S4 dienen dabei als Sensor für das Membranpotential, die Segmente S5 und S6 formen die Pore. Die Segmente S7 bis S10 befinden sich am langen intrazellulären C-Terminus der

α -Untereinheit und sind verantwortlich für die Calciumsensitivität des BK-Kanals (Kaczorowski, Knaus et al. 1996, Meera, Wallner et al. 1997, Salkoff, Butler et al. 2006, Petkov 2011). Dabei sind die zwei RCK-Domänen von Bedeutung, welche jeweils einen Calciumsensor besitzen, den RCK1-Calciumsensor und den RCK2-Calciumsensor, welcher als „Calcium Bowl“ bezeichnet wird (Yusifov, Savalli et al. 2008, Hoshi, Pantazis et al. 2013). Das transmembranäre Segment S0, welches bei anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen nicht vorhanden ist, ermöglicht die Bindung der regulatorischen β -Untereinheit (Wallner, Meera et al. 1996, Toro, Wallner et al. 1998).

Die β 1-Untereinheit besteht aus 2 transmembranären Segmenten (S1 und S2) und einer langen extrazellulären Domäne. Durch die Bindung von β 1-Untereinheiten wird die Aktivität des BK-Kanals deutlich erhöht (Knaus, Folander et al. 1994, Sweet and Cox 2009) (siehe Abb. 4C).

A



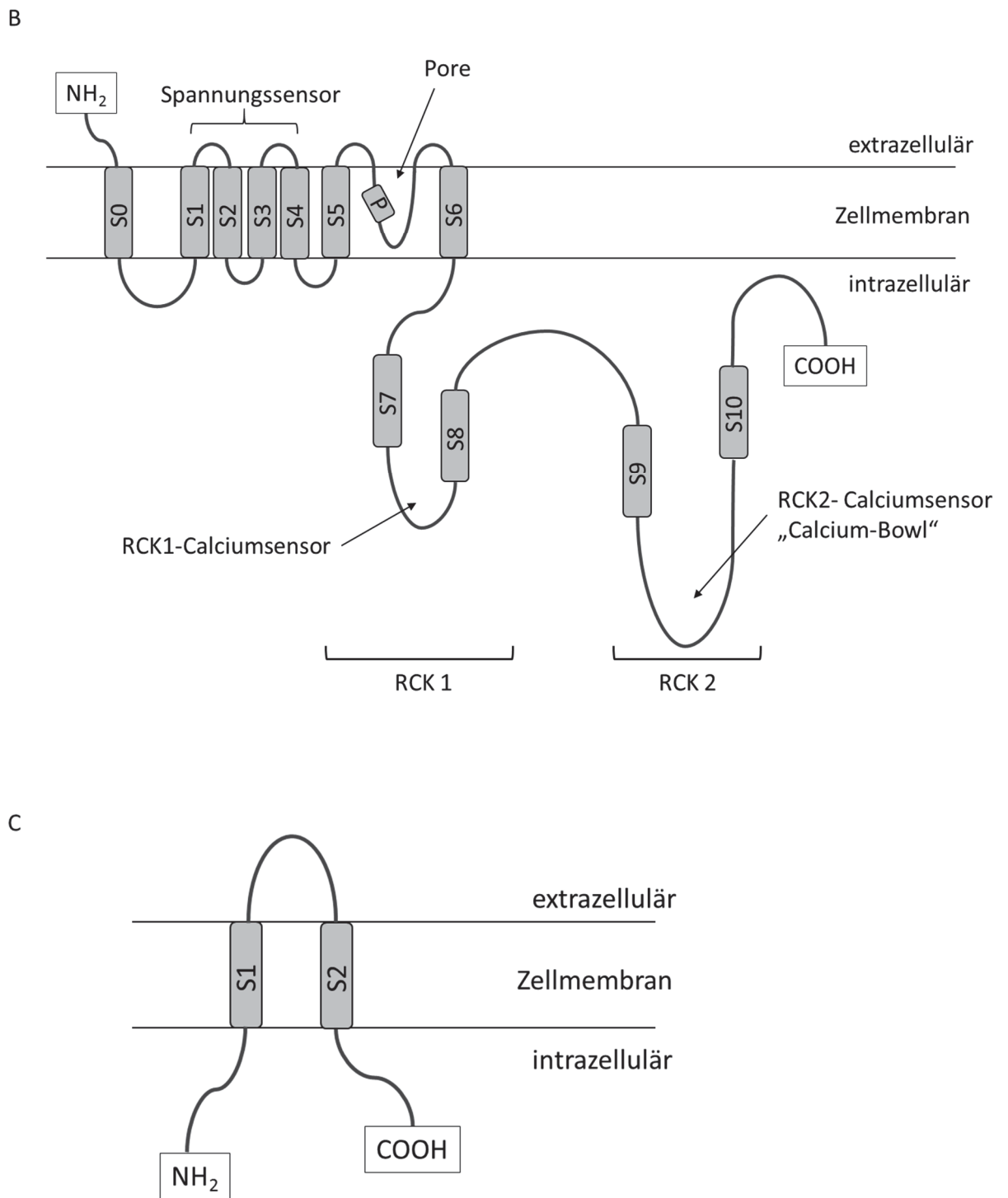


Abb. 4: Schematischer Aufbau des BK-Kanals. A: Komplex aus je 4 α - und β 1-Untereinheiten.
 B: α -Untereinheit. C: β 1-Untereinheit.

Die Regulation des glattmuskulären BK Kanals durch intrazelluläres Calcium

Die Aktivierung des BK-Kanals durch intrazelluläre Calciumionen konnte in vielen Studien nachgewiesen werden, sowohl an isolierten BK-Kanälen (Golowasch, Kirkwood et al. 1986, McManus and Magleby 1991, Cox, Cui et al. 1997) als auch an isolierten glatten Muskelzellen (Gollasch, Ried et al. 1996, Perez, Bonev et al. 1999). Durch die Aktivierung des BK-Kanals strömen Kaliumionen aus der glatten Muskelzelle in den extrazellulären Raum. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, was eine verminderte Aktivität spannungsabhängiger Calciumkanäle zur Folge hat und zur Dilatation der Gefäßmuskulatur führt. Dadurch wird die Aktivität von spannungsabhängigen Calciumkanälen vermindert und es kommt zur Dilatation der Zelle. Gleichzeitig wird die Aktivität des BK-Kanals durch den verminderten Calciumeinstrom herunter reguliert. Der BK-Kanal dient also als negativer Feedbackmechanismus, der die Calciumkonzentration in den glatten Muskelzellen begrenzt und damit eine zu starke Kontraktion der Arterien verhindert (Hill, Yang et al. 2010, Contreras, Castillo et al. 2013). Der Calciumeinstrom in die glatten Muskelzellen erfolgt hauptsächlich über spannungsabhängige Calciumkanäle in der Zellmembran. Diese werden durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert, welche zum Beispiel im Zuge der myogenen Autoregulation durch die Erhöhung des Blutdrucks ausgelöst wird (Knot and Nelson 1998, Harraz, Brett et al. 2015). Dabei spielen sowohl L-Typ als auch T-Typ und P/Q-Typ Calciumkanäle eine Rolle (Navarro-Gonzalez, Grayson et al. 2009, Bjorling, Morita et al. 2013, El-Rahman, Harraz et al. 2013, Hansen 2015). Während die Erhöhung der Calciumkonzentration in der Zelle zur Kontraktion führt, werden dadurch gleichzeitig auch Ryanodin-Rezeptoren aktiviert. In Arteriolen des Auges und der Niere konnte nachgewiesen werden, dass es über die Ryanodin-Rezeptoren zu sogenannten Calcium sparks, lokalen und transienten Calciumströmen aus dem SR-Lumen, kommt (Burdyga, Shmygol et al. 2003, Curtis, Tumelty et al. 2004, Tumelty, Scholfield et al. 2007). In anderen Studien von Ureter- und Cremaster-Arteriolen konnten diese Calcium sparks hingegen nicht nachgewiesen werden (Borisova, Wray et al. 2009, Yang, Murphy et al. 2009). Auch der Effekt der Calcium sparks ist nicht abschließend geklärt. So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass sie BK-Kanäle aktivieren und somit den negativen Feedbackprozess in Gang setzen (Jaggar, Wellman et al. 1998, Perez, Bonev et al. 2001,

Wray and Burdyga 2010). Andere Untersuchungen deuten hingegen darauf hin, dass Calcium sparks einen calciumaktivierten Calciumausstrom bewirken und damit die Kontraktion noch verstärken (Balasubramanian, Ahmed et al. 2007, Fellner and Arendshorst 2007). Auch durch den Calciumausstrom aus dem SR über IP₃-Rezeptoren können BK-Kanäle aktiviert werden (Nelson, Cheng et al. 1995, Boittin, Macrez et al. 1999, Perez, Bonev et al. 1999). Wie genau IP₃-Rezeptoren an der myogenen Autoregulation beteiligt sind, ist jedoch unklar (Potocnik and Hill 2001, Kotecha and Hill 2005, Westcott and Jackson 2011).

Rolle des BK Kanals in phasischen Kontraktionen glatter Muskulatur

In glattmuskulären Organen können zwei Kontraktionsmuster beobachtet werden, phasische und tonische Kontraktionen. Phasische Kontraktionen, bei denen sich Phasen starker Kontraktilität mit Phasen mit geringer Muskelaktivität abwechseln, treten dabei vor allem im Gastrointestinaltrakt auf. In vielen Studien finden sich Hinweise darauf, dass der BK-Kanal die phasischen Kontraktionen von Organen des Gastrointestinaltraktes beeinflusst. So führt eine Inhibierung des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Harnblase zu einer Erhöhung von Kontraktionsamplitude und -frequenz, eine Aktivierung des Kanals zu deren Verminderung (Imai, Okamoto et al. 2001, Aydin, Wang et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass Darmbewegungen durch die Aktivierung des BK-Kanals reduziert werden und sich die Darmaktivität bei nicht exprimierter β -Untereinheit verschlechtert (Sivarao, Newberry et al. 2005, France, Bhattarai et al. 2012). Des Weiteren scheint die Inhibierung von BK-Kanälen zur Stimulation der Kontraktion der Gallenblase beizutragen (Pozo, Perez et al. 2002). Der BK-Kanal trägt also bei einer Verminderung seiner Aktivität zu einer Verstärkung phasischer Kontraktionen bei, auf der anderen Seite sorgt seine vermehrte Aktivität für eine Abschwächung phasischer Kontraktionen.

Tonische Kontraktionen mit einer relativ konstanten Muskelaktivität treten hingegen vor allem in Blutgefäßen auf. Oszillationen der kontraktilen Aktivität der Blutgefäße, zu beobachten als regelmäßige Schwankungen des Durchmessers isobarer Gefäßpräparate oder der Wandspannung isometrischer Gefäßpräparate, können in Verbindung mit

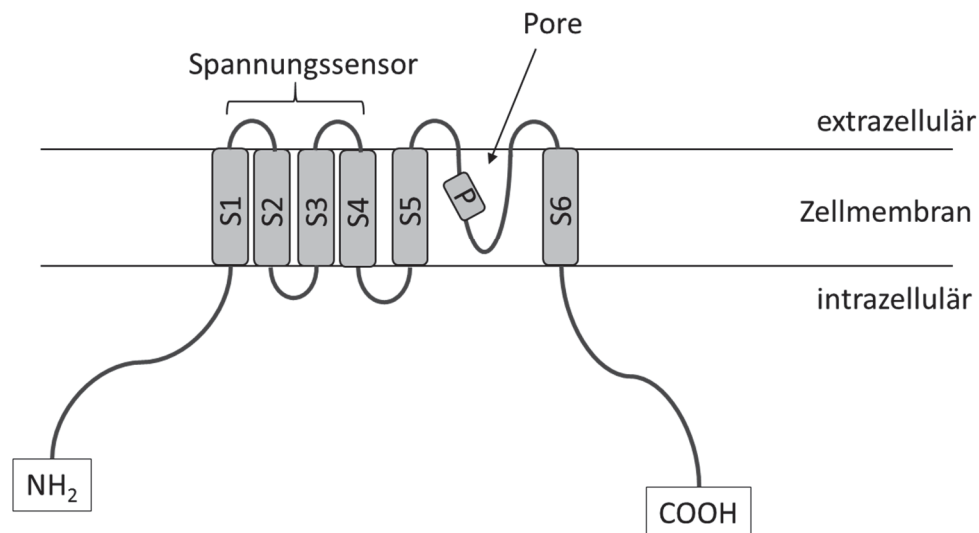
Calcium-Wellen in glatten Muskelzellen auftreten. Calcium-Wellen werden ausgelöst, wenn zunächst an einem oder sehr wenigen Initial-Orten der calciuminduzierte Calciumausstrom aus dem SR über IP₃- oder Ryanodin-Rezeptoren seinerseits benachbarte IP₃- oder Ryanodin-Rezeptoren aktiviert und somit zu einem sich räumlich ausbreitenden Calciumausstrom aus dem SR führt, welcher sich wellenförmig über die ganze Zelle verbreitet (Zacharia, Zhang et al. 2007, Amberg and Navedo 2013). Um dennoch einen stabilen Gefäßtonus aufrechtzuerhalten, muss phasisches in tonisches Kontraktionsverhalten umgewandelt werden. In vielen Fällen erfolgt das dadurch, dass die phasische Aktivität der einzelnen glatten Muskelzellen asynchron abläuft, so dass der Gefäßtonus als Summenaktivität vieler einzelner Zellen keinen phasischen Charakter mehr aufweist. Nur im Fall einer Synchronisierung der Aktivität einer größeren Zahl von glatten Muskelzellen nimmt auch die Aktivität des gesamten glattmuskulären Organs phasischen Charakter an (Peng, Matchkov et al. 2001, Jacobsen, Aalkjaer et al. 2007, Kapela, Parikh et al. 2012). Der BK-Kanal scheint im Prozess der Verhinderung phasischen Kontraktionsverhaltens von arteriellen Blutgefäßen eine wichtige Rolle zu spielen, da dessen Inhibierung zu Gefäßoszillationen führt (McNeish, Altayo et al. 2010, Yuill, McNeish et al. 2010). Die nicht selektive Inaktivierung von Kaliumkanälen durch Tetraethylammoniumion (TEA) hatte hingegen keinen Vasomotionen erzeugenden Effekt (Giachini, Carneiro et al. 2009).

1.5.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) werden in 12 verschiedene Typen (Kv1 bis Kv12-Kanäle) mit jeweils mehreren Subtypen unterteilt (Alexander, Catterall et al. 2015). Kv-Kanäle bestehen typischerweise aus 4 α -Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus 6 transmembranären Domänen (Segmente S1 bis S6). Dabei dienen die Segmente S1 bis S4 als Sensor für das Membranpotential, die Segmente S5 und S6 bilden die Pore (Liu, Holmgren et al. 1997, Petkov 2011, Joseph, Thakali et al. 2013) (siehe Abb. 5A). Die β -Untereinheiten des Kv-Kanals, welche ebenfalls ein Tetramer bilden und auf der cytosolischen Seite mit den α -Untereinheiten assoziiert sein können, regulieren

den Ionenausstrom zusätzlich (Gulbis, Mann et al. 1999, Barski, Tipparaju et al. 2009) (siehe Abb. 5B).

A



B

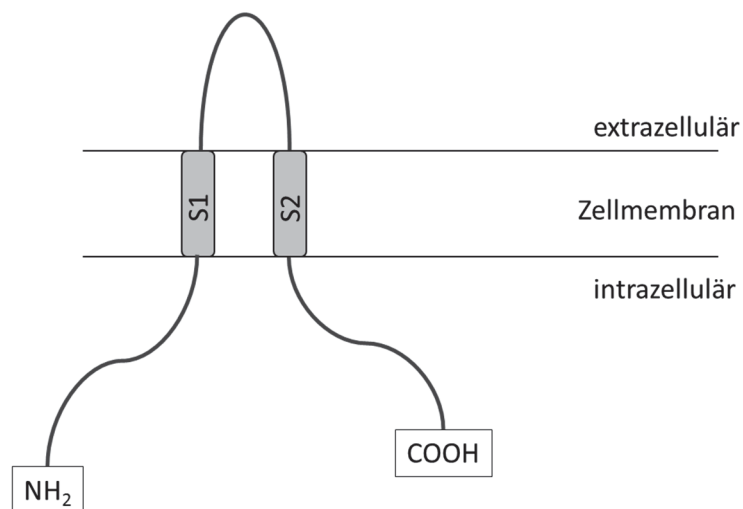


Abb. 5: Schematischer Aufbau von Kv-Kanälen. A: α-Untereinheit. C: β-Untereinheit.

Kv-Kanäle werden durch die Depolarisierung des Membranpotentials aktiviert. Durch die Aktivierung von Kv-Kanälen kommt es zum Ausstrom von Kaliumionen, was zur Hyperpolarisierung der Zellmembran beiträgt. Infolgedessen schließen sich spannungsabhängige Calciumkanäle, was zum Absinken der intrazellulären

Calciumkonzentration und damit zur Vasodilatation führt. Kv-Kanäle spielen daher eine wichtige Rolle bei der Regulation des Membranpotentials und damit der Calciumkonzentration in der Zelle sowie des daraus resultierenden Gefäßtonus (Archer, Souil et al. 1998, Yuan, Wang et al. 1998).

1.5.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) werden in sieben Subtypen unterteilt (Kir1 bis Kir7-Kanäle) (Alexander, Catterall et al. 2015). Kir-Kanäle werden besonders leitfähig, wenn das Membranpotential negativer als das Kalium-Gleichgewichtspotential der Zelle ist. Kir-Kanäle haben vor allem die Aufgabe, das Ruhemembranpotential der Zelle aufrechtzuerhalten und einer Depolarisation entgegen zu wirken. Bei einer Depolarisation des Membranpotentials werden Kir-Kanäle durch Magnesiumionen und Polyamine (Spermin) blockiert, wodurch der Ausstrom von Kaliumionen verhindert wird (Smith, Brett et al. 2008, Hibino, Inanobe et al. 2010). Kir-Kanäle bestehen aus Untereinheiten mit je 2 transmembranären Segmenten (S1 und S2), welche als Tetramer angeordnet sind (Petkov 2011, Sepúlveda, Pablo Cid et al. 2015) (siehe Abb. 6).

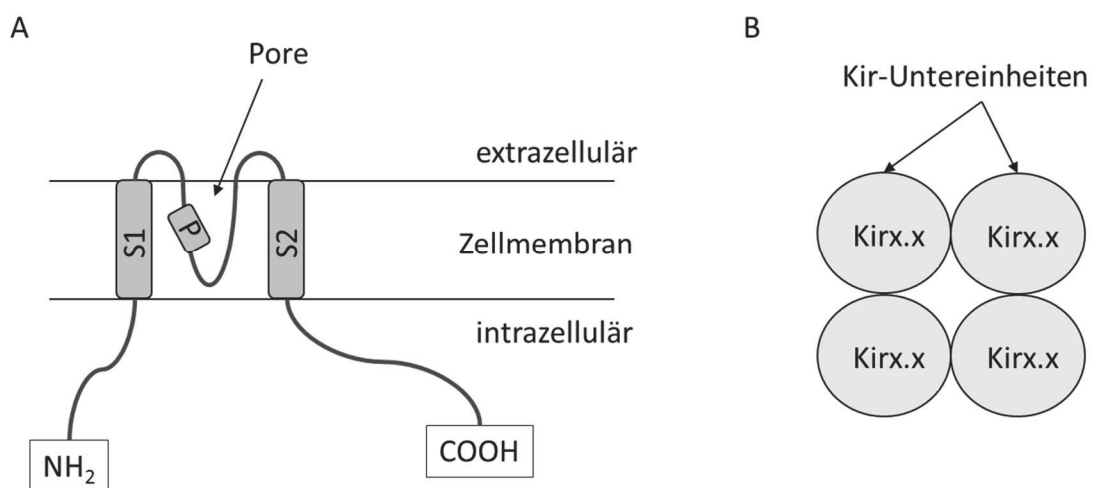
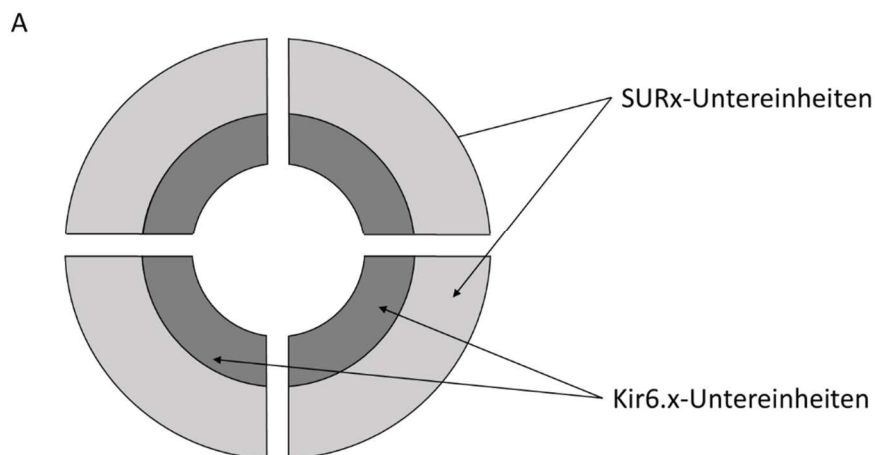


Abb. 6: Schematischer Aufbau von Kir-Kanälen. A: Kir-Untereinheit B: Komplex aus 4 Kir-Untereinheiten.

ATP-sensitive Kaliumkanäle

ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sind eine Untergruppe der Kir-Kanäle. Sie werden, zusätzlich zu dem in 1.5.3 beschriebenen Aktivationsmechanismus, durch einen Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration sowie einen Abfall der intrazellulären ADP-Konzentration inhibiert. Damit ist die Kaliumleitfähigkeit dieser Kanäle direkt von den metabolischen Vorgängen in den glatten Muskelzellen abhängig. K_{ATP} -Kanäle sind aus vier Kir6.1- oder Kir6.2-Untereinheiten sowie vier regulatorischen Untereinheiten (SUR1, SUR2A oder SUR2B) aufgebaut (siehe Abb. 7A). Jede Kir6.x-Untereinheit besteht dabei aus jeweils zwei transmembranären Segmenten (S1 und S2; siehe Abb. 6A). SUR-Untereinheiten bestehen aus 17 transmembranären Segmenten, welche 3 Domänen (TMD0, TMD1, TMD2) bilden. Jede SUR-Untereinheit besitzt intrazelluläre Nukleotid-Bindestellen mit hochkonserviertem Walker A- und Walker B-Motiv. Diese katalysieren die Hydrolyse von ATP (Gribble, Tucker et al. 1997, Tinker, Aziz et al. 2014, Foster and Coetzee 2016) (siehe Abb. 7B).



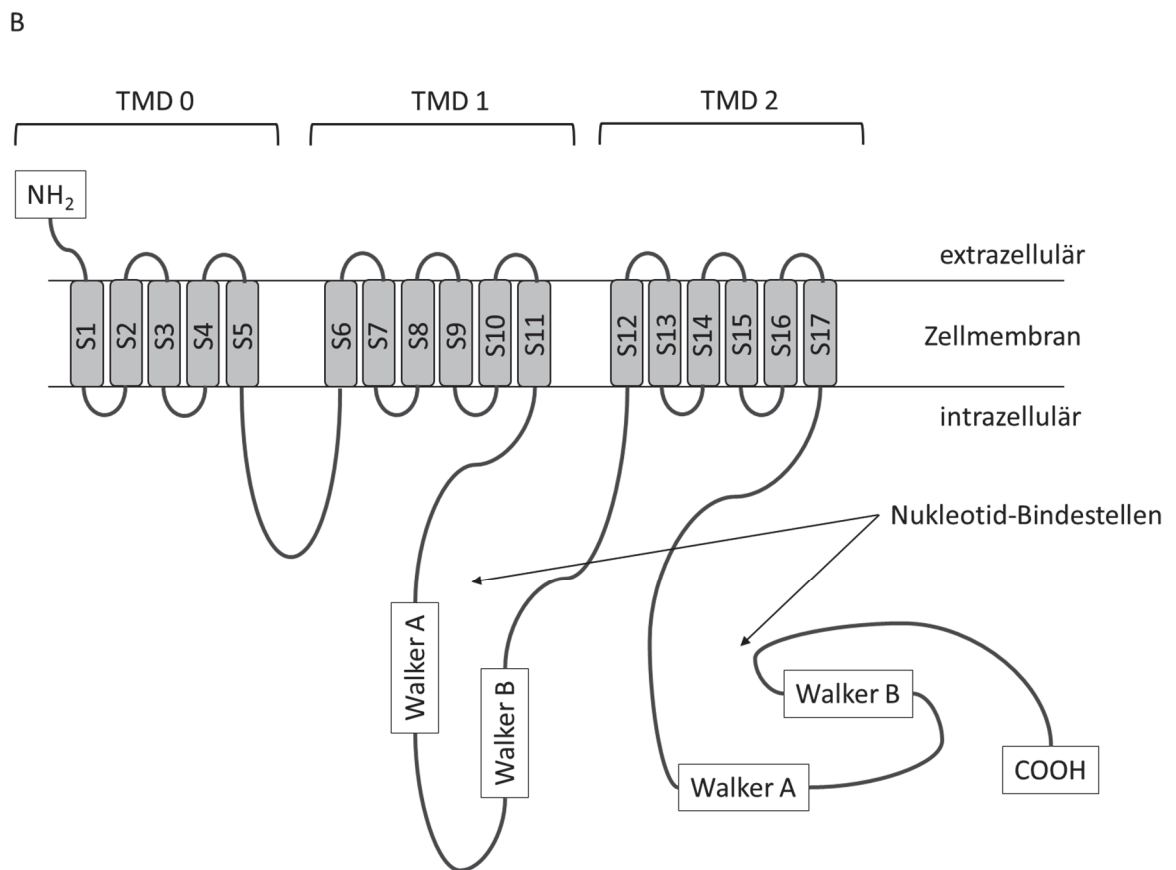


Abb. 7: Schematischer Aufbau des K_{ATP} -Kanals. A: Komplex aus je 4 Kir6.x- und SURx-Untereinheiten. B: SURx-Untereinheit.

Die funktionelle Interaktion von BK-Kanälen mit K_v -, Kir- und K_{ATP} -Kanälen

Die Aktivität insbesondere von K_v und BK-Kanälen ist vom Membranpotential der Zelle abhängig. Gleichzeitig beeinflussen alle Kaliumkanäle das Membranpotential. Damit ist anzunehmen, dass BK-Kanäle mit den anderen Kaliumkanälen funktionell interagieren. Zwar konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass K_v -Kanäle möglicherweise mit spannungsabhängigen Calciumkanälen interagieren (Berwick, Dick et al. 2013) und K_{ATP} -Kanäle mit der Natrium-Kalium-ATPase (Haruna, Horie et al. 1998). Die Interaktion von BK-Kanälen mit K_v -, K_{ATP} - und Kir-Kanälen wurde jedoch noch nicht gezielt untersucht.

1.6 Diabetes mellitus

Diabetes ist eine chronische Stoffwechselkrankheit, die durch einen langanhaltend erhöhten Blutzuckerspiegel charakterisiert wird. Dieser wird durch einen Mangel des Hormons Insulin ausgelöst, welches die Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Zellen vermittelt. Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Typen: Zum einen den Typ 1 Diabetes, der durch die Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ausgelöst wird. Daraus resultiert ein absoluter Mangel an Insulin, der diesen Diabetes-Typ charakterisiert. Zum anderen den Typ 2 Diabetes, dessen Ursache in einem relativen Mangel an Insulin liegt. Dieser wird durch eine verringerte Ansprechbarkeit der Zellen auf Insulin infolge einer Herabregulierung der Insulinrezeptoren der Zelle ausgelöst (Insulinresistenz).

Die Zahl der an Diabetes erkrankten Menschen ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen. Derzeit wird die Zahl der weltweit erkrankten Personen auf über 400 Millionen geschätzt, mit steigender Tendenz (International Diabetes Federation Diabetes Atlas 2015).

1.6.1 Komplikationen und Folgeerkrankungen

Akutkomplikationen des Diabetes stellen vor allem Hypoglykämie sowie Hyperglykämie bis hin zum diabetischen Koma dar. Weitaus bedeutsamer im Verlauf der Erkrankung sind jedoch diabetische Spätfolgen, die kardiovaskulären Erkrankungen. Das Risiko für Diabetiker, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln, ist im Gegensatz zu gesunden Menschen um das Zwei- bis Fünffache erhöht (Dorman, Laporte et al. 1984, Laing, Swerdlow et al. 2003, Kengne, Turnbull et al. 2010) Sie sind der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität von Diabetikern (Nathan 1993, Laing, Swerdlow et al. 2003, Nathan, Cleary et al. 2005).

Man unterscheidet dabei grundsätzlich zwei Arten von Komplikationen, mikrovaskuläre und makrovaskuläre. Zu den makrovaskulären Erkrankungen zählen unter anderem koronare Herzerkrankungen, Schlaganfälle oder Arteriosklerose. Zu den mikrovaskulären Erkrankungen zählen diabetische Retinopathie, Neuropathie und

Nephropathie. Die dysfunktionale Autoregulation der Arterien und Arteriolen ist dabei einer der Hauptgründe für kardiovaskuläre Komplikationen, einen erhöhten Blutdruck und die daraus resultierenden Komplikationen. So konnte zum Beispiel im Tiermodell nachgewiesen werden, dass renale Arteriolen diabetischer Tiere eine Dysfunktion des Endothels und eine verschlechterte Stickstoffmonoxid-induzierte Vasodilatation zeigten (Carlström, Wilcox et al. 2015). Die zerebrale Autoregulation von Patienten mit Diabetes ist gestört (Vianna, Deo et al. 2015)

1.6.2 Kaliumkanäle und Diabetes

Die Dysfunktion der Autoregulation von Arterien und Arteriolen bei Diabetes ist einer der Hauptgründe für vaskuläre Erkrankungen. Kaliumkanäle spielen bei der Autoregulation eine wichtige Rolle, indem sie, wie weiter oben beschrieben, das Membranpotential glatter Muskelzellen regulieren. Die durch die Aktivierung von Kaliumkanälen ausgelöste Hyperpolarisation hat das Schließen spannungsabhängiger Calciumkanäle zur Folge. Dies führt zu einer verminderten Calciumkonzentration in der Zelle und damit zur Vasodilatation. Die Inhibierung von Kaliumkanälen führt hingegen zur Depolarisierung des Membranpotentials und somit zu einem Anstieg der Calciumkonzentration und damit zur Kontraktion glatter Muskelzellen. Normal exprimierte und funktionale Kaliumkanäle sind somit unabdingbar für eine physiologisch korrekte Funktion glatter Gefäßmuskelzellen. Veränderte Genexpression sowie die Fehlfunktion von Kaliumkanälen könnten also zur Dysregulation der Autoregulation beitragen.

In vorangegangenen Studien konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich die Genexpression von Kv-Kanälen bei Diabetes verändert (Chai, Xu et al. 2007). Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Funktion des BK Kanals bei Diabetes beeinträchtigt (Lu, Wang et al. 2005, Lu, Zhang et al. 2010) und die Expression der β -Untereinheit des BK-Kanals herunter reguliert ist (McGahon, Dash et al. 2007).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die Aktivität des BK-Kanals wird also über Calciumionen im Inneren glatter Muskelzellen und damit indirekt durch verschiedenste Calciumkanäle reguliert. Dabei sind in letzter Zeit insbesondere T-Typ-Calciumkanäle als wichtige Regulatoren der Aktivität des BK Kanals entdeckt worden. Der BK Kanal dient nicht nur als wichtiger negativer Feedback-Mechanismus bei der Regulation des Gefäßtonus, sondern spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von phasischem in tonisches Kontraktionsverhalten in Gefäßen.

Es ist jedoch unklar, welche Calciumtransportprozesse, insbesondere über T-Typ-Calciumkanäle, es dem BK-Kanal ermöglichen, Oszillationen des Gefäßtonus zu verhindern. Deshalb soll die Hypothese untersucht werden, dass T-Typ Calciumkanäle sowie weitere Calciumkanäle und -pumpen der Zell- und der SR-Membran zum BK-Kanal-vermittelten Schutz vor phasischen Kontraktionen beitragen. Des Weiteren soll überprüft werden, ob es eine funktionelle Interaktion zwischen BK-Kanälen und K_v -, K_{ATP} - sowie K_{ir} -Kanälen gibt und inwieweit all diese Mechanismen von Diabetes beeinflusst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an isolierten Arterien von Wistarratten durchgeführt. Um mögliche Einflüsse des Hormonzyklus weiblicher Tiere auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden, wurden die beschriebenen Untersuchungen ausschließlich an Gefäßen männlicher Tiere vorgenommen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen mit einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und einer konstanten Temperatur von 22 °C gehalten. Pelletfutter sowie Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Experiments 8-12 Wochen alt und wurden über den Versuchstierzüchter Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich bezogen. Bei einem Teil der Ratten wurde zu Versuchszwecken mittels Streptozotocin ein Typ-I-Diabetes induziert (siehe 2.10). Am Versuchstag wurde die Ratte zunächst mit CO₂ betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Genehmigungsnummer G-208/14).

2.2 Chemikalien

Tab. 1: Zur Herstellung der Puffer verwendete Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
D(-)-Mannit (D-Mannitol)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Glucose	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Kaliumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Tab. 2: Für die Induktion des Diabetes verwendete Substanzen.

Reagenz	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
FORENE (Wirkstoff: Isofluran)	AbbVie, Wiesbaden, Deutschland
Streptozotocin	Tocris, Bristol, UK

Für die Versuche an isolierten Arterien wurden darüber hinaus verschiedene Substanzen untersucht (siehe Tab. 3), welche zum Beispiel die Funktionalität verschiedener Ionenkanäle und -pumpen beeinflussten. Von allen verwendeten Testsubstanzen wurde zunächst eine Stammlösung unter Berücksichtigung der Herstellerangaben angesetzt. Die Konzentration der Stammlösung richtete sich dabei nach der für diese Substanz geplanten Endkonzentration in den Messkammern des Myographen. Die Stammlösungen wurden entsprechend der Empfehlung des jeweiligen Herstellers bei 4 oder -20°C gelagert.

Tab. 3: Bei der isometrischen Myographie sowie bei der Bestimmung der Calciumkonzentration der verwendeten Testsubstanzen.

Substanz	verwendete Konzentrationen (M)	Hersteller
18 α -Glycyrrhetinsäure	10 ⁻⁴	Sigma Aldrich, München, Deutschland
2-Aminoethoxydiphenyl-Borat	10 ⁻⁵ , 3*10 ⁻⁵	Merck Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Acetylcholine chloride	10 ⁻⁵	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Bariumchlorid	10 ⁻⁵	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Caloxin 1b1	10 ⁻⁴ , 3*10 ⁻⁴	Biotrend, Köln, Deutschland
Caloxin 2A1	10 ⁻⁴ , 3*10 ⁻⁴	Biotrend, Köln, Deutschland
Cyclopiazonic acid	3*10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵	Tocris, Bristol, UK
Diphenyl phosphine oxide-1	10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁶	Alomone, Jerusalem, Israel
Fura-2 AM	5*10 ⁻⁶	Invitrogen Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Glibenclamid	10 ⁻⁶	Tocris, Bristol, UK
H 1152	10 ⁻⁷ , 3*10 ⁻⁷	Tocris, Bristol, UK
Iberiotoxin	10 ⁻⁷	Tocris, Bristol, UK
KB-R7943	10 ⁻⁶ , 3*10 ⁻⁶	Tocris, Bristol, UK
Lithocholsäure	5*10 ⁻⁵	Scbio, Dallas, USA
Methoxamin	10 ⁻⁸ bis 10 ⁻⁵	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Nickel(II)-chlorid	5*10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Nimodipin	3*10 ⁻¹¹ , 10 ⁻¹⁰	Tocris, Bristol, UK

Substanz	verwendete Konzentrationen (M)	Hersteller
NS11021	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5}	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NS19504	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5}	Tocris, Bristol, UK
Ouabain	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-4}$	Tocris, Bristol, UK
Ryanodin	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5}	Tocris, Bristol, UK
Stromatoxin-1	10^{-7}	Alomone, Jerusalem, Israel
TTA-A2	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5}	Alomone, Jerusalem, Israel
TTA-P2	$3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5}	Alomone, Jerusalem, Israel
XE 991	$3 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6}	Tocris, Bristol, UK
ω -Agatoxin-IVA	10^{-9} , 10^{-8}	Alomone, Jerusalem, Israel

2.3 Puffer

Für die Versuche am Myographen wurden verschiedene Puffer verwendet (siehe Tab. 4). Um während der Versuche an isolierten Blutgefäßen die *in vivo* Bedingungen möglichst präzise zu simulieren, wurde eine physiologische Salzlösung (Arbeitspuffer) mit einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37 °C verwendet. Die Erwärmung des Arbeitspuffers auf 37 °C erfolgte erst direkt vor dem Versuch, ebenso wie eine Kontrolle und eventuelle Korrektur des pH-Wertes. Da der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion der Blutgefäße hat, musste dieser auch während des Versuches konstant gehalten werden. Zu diesem Zweck enthielt der Arbeitspuffer als pH-Puffer NaHCO_3 . Da das enthaltene CO_2 aufgrund von Konzentrationsunterschieden schnell in die Umgebungsluft entweicht, musste der Puffer durchgängig mit Carbogen, einem Gasmisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 , begast werden. Zusätzlich enthielt der Puffer HEPES zur Stabilisierung. Da eine Begasung während der Präparation die Sicht stark

behindert hätte, wurde beim Präparationspuffer auf NaHCO_3 verzichtet. Hier diente ausschließlich HEPES dazu, den pH-Wert konstant zu halten. Außerdem wurde der Puffer gut gekühlt verwendet, um eine Veränderung des pH-Wertes während der Präparation zu vermeiden. In einem Teil der Versuche wurde außerdem ein modifizierter Arbeitspuffer verwendet, welcher 120 mM KCl eine deutlich höhere KCl-Konzentration aufwies als der Arbeitspuffer. Die Puffer wurden alle 2-3 Tage frisch angesetzt und bei 4 °C gelagert, um eine Veränderung des pH-Wertes bei Zimmertemperatur und Luftzufuhr zu vermeiden.

Tab. 4: Für Versuche am Myographen verwendete Puffer.

Puffer	Reagenz	Konzentration (mM)
Arbeitspuffer	NaCl	120
	NaHCO ₃	26
	KCl	4,5
	NaH ₂ PO ₄	1,2
	MgSO ₄	1
	CaCl ₂	1,6
	EDTA	0,025
	Glucose	5,5
	HEPES	5
Arbeitspuffer mit 120 mM KCl (modifizierter Arbeitspuffer)	NaCl	4,5
	NaHCO ₃	26
	KCl	120
	NaH ₂ PO ₄	1,2
	MgSO ₄	1
	CaCl ₂	1,6
	EDTA	0,025
	Glucose	5,5
	HEPES	5

Puffer	Reagenz	Konzentration (mM)
Präparationspuffer	NaCl	145
	KCl	4,5
	NaH ₂ PO ₄	1,2
	MgSO ₄	1
	CaCl ₂	0,1
	EDTA	0,025
	HEPES	5

2.4 Geräte und Arbeitsmaterialien

Tab. 5: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Affymetrix GeneArray Scanner 3000	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Analysenwaage CPA225D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Blutzuckermessgerät Contour next	Contour, Leverkusen, Deutschland
Datenerfassungsgerät PowerLab 4/30	AD instruments, Spechbach, Deutschland
Datenerfassungsgerät PowerLab 4/30	AD instruments, Spechbach, Deutschland
Dual Wavelength Photometer	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Dumont-Pinzette Biologie No. 5	Dumont, Montignez, Schweiz
Elektrometer	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Federschere G-19760	Geuder, Heidelberg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Micropositioner	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Mikromanipulator	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Mikroplatten-Reader Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop DIAPHOT 200	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop DIAPHOT 200	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mini-Membran-Vakuumpumpe VP 86	VWR, Darmstadt, Deutschland
Multi Wire Myograph System	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Multi Wire Myograph System	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Myograph 610M	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Myograph 610M	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Myograph Interface 410A	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Myograph Interface 410A	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Narkosebox für Nager	Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland
Narkosegerät Research	Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Präzisionswaage Kern 572	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland

Gerät	Hersteller
Stimulus Isolator	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Thermozykler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermozykler Light Cycler 480	Roche, Mannheim, Deutschland
TissueLyser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ultraschallbad S 10H Elmasonic	Elma, Singen, Deutschland
Umwälzthermostat MA-4	Julabo, Seelbach, Deutschland
Vortexer Lab Dancer	IKA, Staufen, Deutschland

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Blutzucker-Teststreifen Contour XT	Contour, Leverkusen, Deutschland
Insulin-Kanülen Micro-Fine Ultra TM Pen Nadel 0,33 x 12,7 mm	BD, Heidelberg, Deutschland
Insulinpen Lantus Solostar	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Omnifix Einmalspritzen 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
PCR-Mikroreaktionsgefäße PCR 0,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Stahldraht, rostfrei, säurebeständig 0,04 mm	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark

Sterican Einmalkanülen 27G (0,4 mm)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer unsteril	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 7: Für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendete Kits.

Kit/Array	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit	Epicentre, Madison, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Waldbronn, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR Green Master Mix	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan Array Micro Fluidic Card	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Gefäßpräparation

Die Untersuchungen fanden an isolierten Schwanzgefäßen (*Arteria caudalis*) der Ratte statt. Die Präparation der Gefäße erfolgte unter dem Stereomikroskop mit Hilfe zweier feiner Pinzetten sowie einer Federschere unter einer Kaltlichtquelle.

Zur Präparation der *A.caudalis* wurde nach der Tötung zunächst der Schwanz des Tieres mit einer Präparierschere abgetrennt und die Haut an dessen Unterseite abpräpariert. Anschließend wurde er in eine Präparierschale mit eiskaltem Präparationspuffer überführt und mit Nadeln am Gelboden fixiert. Unter dem Mikroskop wurde zunächst vorsichtig die Bindegewebsschicht über der zentral gelegenen Arterie mit einem Längsschnitt geöffnet und die ventral gelegene *A.caudalis* freipräpariert. Die Arterie wurde dann von perivaskulärem Fettgewebe befreit und abgesetzt.

Präparation für die isometrische Kraftmessung

Für die isometrische Kraftmessung wurden anschließend jeweils circa 2 mm lange Segmente der zuvor präparierten Arterie in die mit 5ml kaltem Präparationspuffer gefüllten Messkammern überführt. Mittels zweier dünner Drähte, welche durch das Lumen des Gefäßes geführt und anschließend fixiert wurden, wurde das Gefäßsegment in der Messkammer aufgespannt. Anschließend wurde es vorsichtig von eventuell noch vorhandenem Bindegewebe gesäubert. Um die Endothelzellen zu entfernen, wurde ein Barthaar der Ratte in das Lumen des Gefäßsegmentes eingeführt und kreisförmig bewegt. Durch die Drähte wurden dabei die Endothelzellen an der Innenseite der Arterie abgetragen. Anschließend wurden die Messkammern an den Myographen angeschlossen.

Präparation für molekularbiologische Untersuchungen

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die isolierten Arterien mit der Federschere grob zerkleinert, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dabei musste zügig gearbeitet werden, um einen unerwünschten Abbau der RNA zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert.

Präparation endothelfreier Gefäßproben

Um Gefäßpräparate ohne Endothel für molekularbiologische Untersuchungen zu erhalten, wurden von den isolierten Arterien zunächst 2mm lange Segmente in die

Kammer eines Myographen eingespannt. Anschließend wurde ein Barthaar der Ratte ins Lumen des Gefäßes eingeführt und das Endothel mit ca. 50 kreisförmigen Bewegungen in jede Richtung entfernt. Anschließend wurde das Gefäß längs aufgeschnitten und mit 10ml Präparationspuffer gespült, um eventuell noch anhaftende Endothelzellen zu entfernen. Das Gefäß wurde nun in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und schockgefroren.

2.6 RNA-Analyse mittels Micro Fluidic Cards (MFCs)

Zur genomweiten Analyse der isolierten Arterien wurde zunächst mRNA isoliert und anschließend mittels TaqMan Micro Fluidic Cards analysiert. Damit war es möglich, eine große Anzahl an Genen gleichzeitig auf ihre Expression hin zu untersuchen.

2.6.1 Isolation der mRNA

Um die mRNA zu isolieren, wurde das miRNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Auf die gefrorenen Gefäßproben wurden zunächst je 700 µl QIAzol Lysis Reagens gegeben, anschließend folgten Zellaufschluss und Homogenisierung mit Hilfe von Edelstahlkugeln in einer Schwingmühle. Der Lysepuffer bestand aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat und diente der Lyse des Gewebes sowie der Entfernung von DNA und Proteinen. Außerdem wurde die Aktivität von RNasen gehemmt. Durch Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation wurden organische und wässrige Phase getrennt. Die wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde auf eine Spin-Säule gegeben, an deren Silikamembran die RNA binden konnte. In mehreren Waschsritten wurden nun noch verbliebene Proteine, DNA und andere Zellbestandteile entfernt. Die RNA wurde nun mittels RNase freiem Wasser eluiert und die Absorptionsmaxima der Proben bei Wellenlängen von 260 und 280nm gemessen. Aus dem Verhältnis beider Werte lässt sich die Reinheit der isolierten RNA bestimmen. Die Konzentration der Proben wurde anhand der gemessenen Absorptionsmaxima bei 260 nm nach folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{RNA}} = A_{260} * 40 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

2.6.2 RNA-Analyse mittels Bioanalyzer

Um die Qualität der isolierten mRNA zu untersuchen, wurde sie anschließend mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die Kapillarelektrophorese beruht auf diesem Prinzip der Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren wird die RNA in einem Gel anhand ihrer Größe aufgetrennt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen RNA-Fragmente zur Anode, wobei sich große Fragmente langsamer bewegen als kleine Fragmente. Um die erhaltenen Banden anschließend sichtbar machen zu können, werden außerdem Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, welche sich während des Laufes an die RNA anlagern. Anhand eines mitlaufenden Größenstandards (Marker) kann im Anschluss an die Gelelektrophorese die Größe der aufgetrennten RNA-Moleküle bestimmt werden (siehe Abb. 8).

Bei der Kapillarelektrophorese wird die RNA in dünnen Kapillaren aufgetrennt. Dies ermöglicht es, auch kleinste Probenmengen mit hoher Genauigkeit zu analysieren.

Um die Integrität der RNA zu erhalten, wird nach dem Auftrennen der RNA die Größe der beiden ribosomalen Untereinheiten 28S und 18S bestimmt. Anhand ihres Größenverhältnisses wird der RIN-Wert (RNA Integrity Number) errechnet. Dieser liegt zwischen 1 und 10, wobei 10 für eine nicht degradierte RNA in höchster Qualität steht.

Die Analyse wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit durchgeführt. Nach Herstellerangaben wurde zunächst der Chip mit einem Gel-Fluoreszenzfarbstoffgemisch beladen. Anschließend wurden Marker sowie Proben pipettiert und der Lauf im Bioanalyzer gestartet. Mittels eines Fluoreszenzdetektors wurden die Laufzeiten der RNA-Proben bestimmt und die erhaltenen Daten von der Bioanalyzer-Software in Elektropherogramme sowie Gelbilder mit Banden übersetzt. Außerdem wurde der berechnete RIN-Wert angegeben. Für die Durchführung der MFCs wurden nur Proben mit einem RIN-Wert von mindestens 8 verwendet.

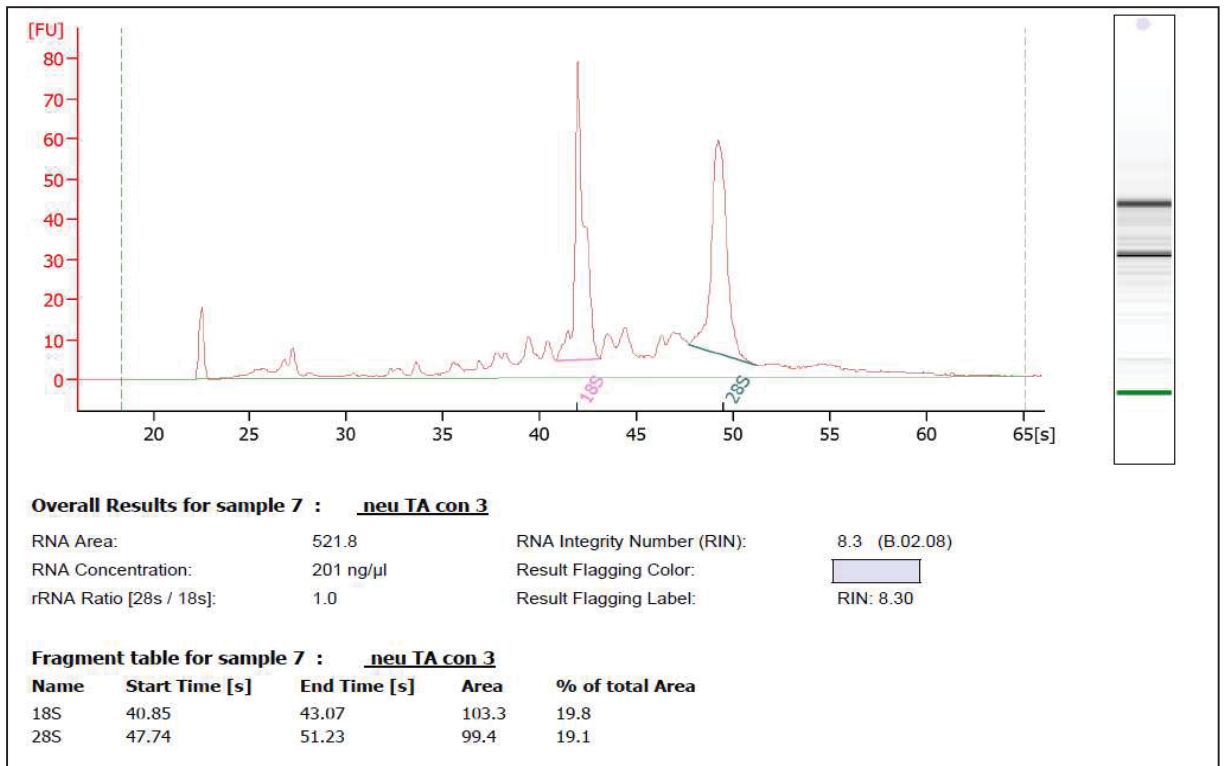


Abb. 8: Ergebnis der Analyse einer RNA-Probe mittels Bioanalyser.

2.6.3 cDNA-Synthese und Präamplifikation

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils zwischen 100 und 200 ng RNA eingesetzt. Das Pipettieren der Reaktionsansätze und die cDNA-Synthese erfolgten nach den in Tabelle 8 und 9 dargestellten Protokollen.

Tab. 8: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die MFCs.

Reagenz	Volumen (µl)
RNA	10
10x RT Buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2

Reagenz	Volumen (μl)
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
Nuklease-freies Wasser	3,2
gesamt	20

Tab. 9: Protokoll der cDNA-Synthese für die MFCs.

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (min)
25	10
37	120
85	5
4	∞

Die gewonnene cDNA wurde anschließend präamplifiziert. Dafür wurde das TaqMan PreAmp Master Mix Kit von Thermo Fisher nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 12,5 μl cDNA eingesetzt. Das Pipettieren der Reaktionsansätze und die Präamplifikation erfolgten nach den in Tabelle 10 und 11 dargestellten Protokollen. Im Anschluss an die Präamplifikation wurde die RNA sofort auf Eis gestellt und nach dem Abkühlen im Verhältnis 1:2 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

Tab. 10: Pipettierschema der Präamplifizierung für die MFCs.

Reagenz	Volumen (μl)
2x TaqMan PreAmp Master Mix	25
0,2x Pooled assay mix	12,5
cDNA	12,5
gesamt	50

Tab. 11: Protokoll der Präamplifikation für die MFCs.

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	95	10
14	95	0,25
	60	4

2.6.4 Durchführung Micro Fluidic Cards

Für die Versuche wurden TaqMan Array Micro Fluidic Card von Thermo Fisher verwendet. Die folgenden Gene (Tab. 11) waren als Gensonden hybridisiert.

Tab. 12: Auf den MFCx hybridisierte Gene mit dazugehöriger Assay ID.

Gen	TaqMan Assay ID
Kcnma1	Rn00582881_m1
Kcnmb1	Rn00570571_m1
Kcnmb2	Rn00598579_m1
Kcnmb3	Rn01462040_m1
Kcnmb4	Rn00576685_m1
Kcne1	Rn02094595_s1
Kcne2	Rn02094913_s1
Kcne3	Rn02377069_s1
Kcne4	Rn01769979_s1
Kcne5	Rn03416044_s1
Kcnq1	Rn00583376_m1
Kcnq2	Rn00591249_m1
Kcnq3	Rn00580995_m1
Kcnq4	Rn01518851_m1
Kcnq5	Rn01512013_m1

Gen	TaqMan Assay ID
Cav1.1	Rn01490941_m1
Cav1.2	Rn00709287_m1
Cav1.3	Rn01453395_m1
Cav1.4	Rn00586734_m1
Cav2.1	Rn00563825_m1
Cav2.2	Rn01643813_m1
Cav2.3	Rn00494444_m1
Cav3.1	Rn01299126_m1
Cav3.2	Rn01460348_m1
Cav3.3	Rn01505208_m1
Kir2.1	Rn00568808_s1
Kir2.2	Rn02533449_s1
Kir2.3	Rn01502359_m1
Kir2.4	Rn00821873_m1
Kir6.1	Rn01492857_m1
Kir6.2	Rn01764077_s1
GAPDH	Rn01775763_g1

Zunächst wurden je 100 µl präamplifizierte RNA mit 100 µl 2x TaqMan Gene Expression Master Mix vermischt und anschließend je 100 µl in die Taschen der Micro Fluidic Cards pipettiert. Dabei musste darauf geachtet werden, keine Luftblasen in die Tasche zu pipettieren. Anschließend wurde die Karte zweimal für jeweils 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert und versiegelt. Anschließend wurde der Lauf gestartet.

2.6.5 Analyse Micro Fluidic Cards

Die Analyse der gewonnenen MFC-Daten erfolgte mit der ArrayStudio Software von Omicsoft. Die relative Expression der zu untersuchenden Gene wurde im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH ermittelt. Anschließend wurden die relativen Expressionsraten

mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen „diabetisch“ und „Kontrolle“ untersucht. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.7 RNA-Analyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um die Ergebnisse der genomweiten Untersuchungen zu validieren, wurde die Expression bestimmter Gene zusätzlich mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht.

2.7.1 RNA-Präparation

RNA für Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde mit dem MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit von Epicentre isoliert. Die Gewebeprobe wurden nach Zugabe von Lysispuffer wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben homogenisiert. Nach Zugabe von Proteinase K und einer Inkubation bei 65 °C für 15 min wurden die Proteine durch Zugabe von MPC Protein Precipitation Reagent gefällt und nach der Zentrifugation der die Nukleinsäuren enthaltende Überstand abgenommen. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet in einer DNase-Lösung resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer erneuten Fällung der Proteine und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die RNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurden 30 µl Depec-Wasser sowie RNase Inhibitor zugegeben und die Proben bei -80 °C gelagert. Vor der Konzentrationsbestimmung folgte zunächst eine 30-minütige Erwärmung der Proben bei 37 °C mit anschließendem Vortexen, um das RNA-Pellet vollständig zu lösen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie oben beschrieben.

2.7.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Reaktionsansatz von 30 µl wurden jeweils 450 ng RNA eingesetzt, wobei pro RNA-Probe je 3 Ansätze hergestellt wurden. Die Reaktionsansätze wurden für jede Probe pipettiert (siehe Tab. 13) und anschließend auf 3 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese im Eppendorf Mastercycler gradient (siehe Tab. 14). Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 13: Pipettierschema der cDNA-Synthese für die qPCR.

Reagenz	Volumen (µl)
RNA	X
Rnase-freies Wasser	=58-X
5x Reaction buffer	14
Random Primer	4,5
dNTP Mix (je 10mM)	9
RevertAid H minus Reverse Transkriptase	4,5
gesamt	90

Tab. 14: Protokoll der cDNA-Synthese für die qPCR.

Temperatur (°C)	Zeit (min)
20	10
50	60
70	10
4	5

2.7.3 quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Zur Durchführung der PCR werden neben der Ausgangs-DNA zwei Primer benötigt, welche an beiden DNA-Einzelsträngen jeweils stromaufwärts des zu untersuchenden Gens binden (Sequenzen der verwendeten Primer siehe Tab. 16). Des Weiteren werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie eine hitzebeständige Polymerase benötigt, um einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Jede PCR läuft in mehreren Zyklen ab. Dabei wird die Probe zunächst erwärmt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. Anschließend wird die Probe wieder abgekühlt, um eine Bindung der Primer an die nun einzelsträngige DNA sowie die Synthese des komplementären DNA-Stranges zu ermöglichen. Dieser Zyklus wird mehrere Male wiederholt, wobei sich die Menge des PCR-Produktes exponentiell erhöht.

Die quantitative Echtzeit PCR (qPCR) basiert auf dem gleichen Prinzip. Hier wird jedoch zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Für die beschriebenen Versuche wurde der SYBR Green I Master Mix von Thermo Fisher verwendet. Dieser enthält neben dNTPs und der hitzebeständigen Taq-Polymerase den Cyanin-Farbstoff SYBR Green I. Dieser lagert sich an doppelsträngige DNA an und dient so der Detektion des PCR-Produktes. Die Fluoreszenz korreliert dabei mit der Menge des PCR-Produktes und wird nach jedem Zyklus gemessen. So kann die Zunahme des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt und quantifiziert werden. Am Ende der qPCR wird durch langsame Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurve für jede Probe aufgenommen. Die Schmelzkurve ist für jedes PCR-Produkt spezifisch. Die PCR wurde im LightCycler 480 durchgeführt (siehe Tab. 15)

Tab. 15: Protokoll der qPCR.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anstiegsgeschwindigkeit Temperatur (°C/s)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94	10	4,4	1
Amplifikation	94	0,15	4,4	47
	60	1	2,2	

Schmelzkurve	95	1	4,4	1
	40	1	2,2	
	60	0,01	1	
	95	/	0,06	
Kühlung	40°C	10	2,2	1

Tab. 16: Bei der qPCR verwendete Primer.

Gen	Primer	Primersequenz (5'→ 3')
Kcnma1	forward	ATGTCTACAGTGGGTTACGG
	reverse	TGGGTGGTAGTTCTTTATGG
Kcnmb1	forward	TGACTGTTGCCTCCTGTG
	reverse	TCCCGAGTGTCTTCTGTG
Kcnq1	forward	GGCTCTGGGTTTGCCTG
	reverse	CATAGCACCTCCATGCAGTC
Kcnq2	forward	ACACAGACTCAGACCTCTGCAC
	reverse	AGCCCAACCCAGAATCACTTCC
Kcnq3	forward	GCTAGGGACCGGAGCCGACA
	reverse	CCCCTCGGTCTCTCCAGGGC,
Kcnq4	forward	CCCCGCTGCTCTACTGAG
	reverse	ATGACATCATCCACCGTGAG,
Kcnq5	forward	CGAGACAACGACAGATGACC
	reverse	TGGATTCAATGGATTGTACCTG
Kcna5	forward	GGCTATCTGCTGAGGATGAG
	reverse	CGGTCGAAGAAGTATTCATTTCTC
Kcnb1	forward	ACACCATCACCATCTCTCAAGG
	reverse	CTAAATTGTCAGCTCACCCCGA
Cav1.2	forward	CATCTCCATCACCTTCTTCC

Gen	Primer	Primersequenz (5'→ 3')
Cav1.3	reverse	AAATACCTGCATCCCAATCAC
	forward	TGTGGCACCAACTTTGCCTA
Cav2.1	reverse	TGCTTGATCCTGCCCTTAGC
	forward	ACACAGAACCCTATTTTCATTGG
Cav2.2	reverse	GTCCGTAGATCAAACCTCCGT
	forward	ACGGAGATTGCGGAAACGAA
Cav2.3	reverse	AGCGCCTTAAAGGACTGGAC
	forward	TGTGGCACCAACTTTGCCTA
Cav3.1	reverse	TGCTTGATCCTGCCCTTAGC
	forward	TAGGATGTGGGTAGTGGGA
Cav3.2	reverse	CTGTGTCTCCAGGAGCTTGT
	forward	CTCTTTCCAGGTCCCATCAGCC
Cav3.3	reverse	GTCTCCTCCAACATCATCAACCTT
	forward	AAGCTGGTCTGCAATGACG
Kir2.1	reverse	AACTGAGCTGTGAGCACGAA
	forward	CTCCCCTTTGTAGTGCCAGA
Kir2.2	reverse	GCCTGGTTGTGGAGATCTATG
	forward	GGCATCATCTTCTGGGTCAT
Kir2.3	reverse	CACTGGGCACTCTTCAGTCA
	forward	CTGTGGACCTGGAGGAATGT
Kir2.4	reverse	TGAAGGGTCAGTGGGAAAAG
	forward	TGCTGCAGCCCCGTG
Kir6.1	reverse	TACGTTCGGTGGAAGTGTCG
	forward	AGCTGGCTGCTCTTCGCTATCA
Kir6.2	reverse	CCCTCCAAACCCAATGGTCACT
	forward	CAACGTCGCCACAAGAACATC
	reverse	CCAGCTGCACAGGAAGGACATG

Gen	Primer	Primersequenz (5'→3')
SUR1	forward	CAGGACCAAGAGCTGGAGAAGGA
	reverse	CATCCAGCAGAAGGCCATCTCTT
SUR2a	forward	GGAGTGCGATACTGGTCCAAACCT
	reverse	CCCGATGCAGAGAACGAGACACT
SUR2b	forward	CATAGCTCATCGGGTTCACACCATT
	reverse	GCATCGAGACACAGGTGCTGTTGT
GAPDH	forward	CACCAGCATCACCCCAT
	reverse	CCATCAAGGACCCCTTCATT
Hmbs	forward	GCGGAAGAAAACGGCTCAATG
	reverse	AGCATCGCTACCACAGTGTC

2.7.4 Analyse der qPCR

Die Analyse der qPCR erfolgte mittels LinReg. Dabei wurde anhand des Anstiegs der Schmelzkurve die Effizienz E der PCR errechnet. Eine Effizienz von 2 bedeutet dabei, dass sich die Menge des PCR-Produktes pro Zyklus genau verdoppelt. Die Effizienz berechnet sich wie folgt:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

E... Effizienz

m... Anstieg der Schmelzkurve

Der cp-Wert (crossing point) gibt den Amplifikationszyklus an, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes erstmals deutlich gegenüber der Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Um eine relative Quantifizierung der untersuchten Gene zu ermöglichen, erfolgte eine Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH oder Hmbs. Die relative Expression der Zielgene wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\text{relative Expression}_{ZG} = (E_{HG}^{\wedge}cp_{HG}) / (E_{ZG}^{\wedge}cp_{ZG})$$

E... Effizienz

HG... Haushaltsgen

ZG... Zielgen

Um den Vergleich zwischen den Bedingungen „diabetisch“ und „Kontrolle“ bzw. „mit Endothel“ und „ohne Endothel“ zu ermöglichen, wurden die relativen Effizienzen für die verschiedenen Zielgene miteinander verglichen. Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurde ermittelt, ob sich die Genexpression der Gefäße in den verschiedenen Gruppen voneinander unterschied. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.8 Isometrische Myographie

Die isometrische Myographie dient der Untersuchung der kontraktiven Aktivität der Gefäße. Es wurde ein Multi Wire Myograph System (Danish Myo Technology, Dänemark), bestehend aus vier Myographen sowie einer Kontrolleinheit. Dies ermöglichte eine parallele Untersuchung von vier Gefäßsegmenten des gleichen Gefäßes. Die Datenerfassung erfolgte mittels PowerLab/LabCharts 6 Pro (ADInstruments, Australien). Eine Wärmeplatte ermöglicht das Aufheizen der Apparatur auf 37 °C.

Bei der isometrischen Kraftmessung bleibt der Durchmesser der Arterie konstant. Gemessen wird die Kraft, welche auf die Drähte wirkt. Dazu wird der erste Draht mit einer Mikrometerschraube verbunden, mit welcher der Abstand der beiden Drähte und

damit der Durchmesser des aufgespannten Gefäßsegmentes reguliert werden kann. Der zweite Draht ist mit dem Kraftaufnehmer, der eigentlichen Messeinheit, verbunden. Mithilfe der Steuereinheit wird die gemessene Kraft digitalisiert und vom Datenerfassungsprogramm aufgezeichnet.

2.8.1 Normalisierung

Wie vorangegangene Studien gezeigt haben, ist die Kontraktionskraft der Gefäße abhängig von deren Vordehnung. Wie Mulvany und Halpern (1977) in ihren Untersuchungen herausfanden, ist die Kontraktion am stärksten, wenn der innere Umfang des Gefäßes (IC) zwischen $0,9 IC_{100}$ und IC_{100} liegt. IC_{100} ist dabei als der innere Umfang des Gefäßes bei einem Druck von 100 mmHg (13,3 kPa) definiert.

Während der Normalisierung sollte nun der Abstand beider Drähte bestimmt werden, bei welchem die Gefäße so weit gedehnt werden, dass eine maximale Kontraktion möglich ist. Dazu wurden zunächst beide Drähte zusammengeführt, es wirkte also zunächst keine Kraft auf das Gefäßsegment. Durch Drehen an der Mikrometerschraube wurde nun schrittweise der Abstand zwischen den Drähten vergrößert und die Kraft gemessen (siehe Abb. 9). Um Gefäßsegmente unterschiedlicher Länge vergleichen zu können, wird Kraft in die Spannung der Gefäßwand umgerechnet:

$$T = F / (2 * l)$$

T...Spannung in mN/mm

l...Länge des Gefäßsegmentes

F...gemessene Kraft in N

Außerdem wird der innere Umfang des Gefäßes (IC) ermittelt:

$$IC = (+2)*d + 2*b$$

IC ...innerer Umfang in μm

d ...Durchmesser des Drahtes ($40\mu\text{m}$)

b ...Abstand der Drähte in μm

Beide Berechnungen erfolgen softwareintern. Aus den ermittelten Werten wird vom Programm eine Kurve $T = f(IC)$ erstellt, anhand derer IC_{100} berechnet wird. Entspricht dabei dem inneren Durchmesser des Gefäßes bei einem Druck von 13,3 kPa. Anschließend wurde die Mikrometerschraube soweit zurückgedreht, bis der innere Durchmesser nur noch 90% des Maximalwertes betrug.

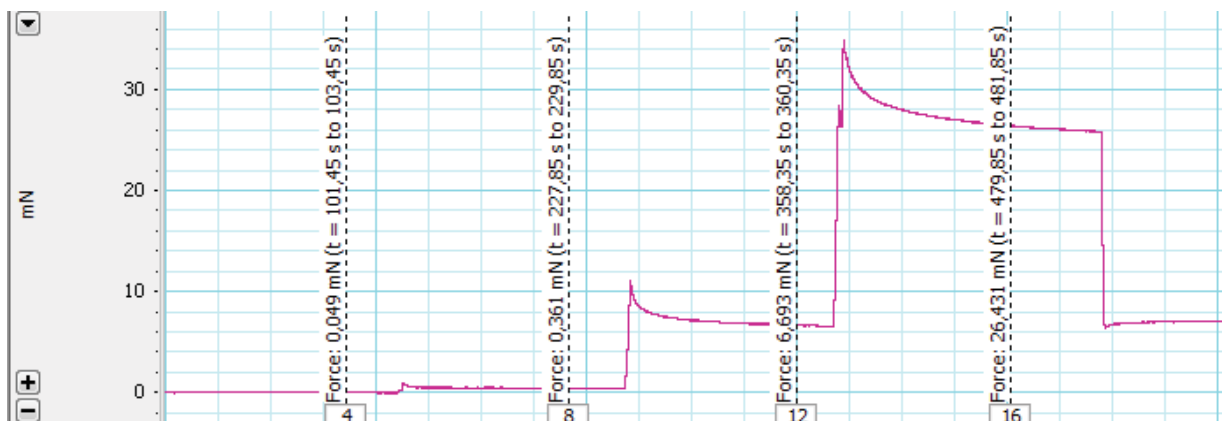


Abb. 9: Beispielverlauf der Normalisierung eines Gefäßes (aufgenommen mit LabChart).

2.8.2 Versuchsablauf

Im Anschluss an die Normalisierung wurde der Präparationspuffer in den Messkammern gegen den Arbeitspuffer ausgetauscht. Im Abstand von jeweils 5 Minuten wurden anschließend alle Kammern noch 1- bis 2-mal mit frischem Arbeitspuffer gespült. Zur Aktivierung der Arterien erfolgte nun die Applikation von Methoxamin (MX), eines Agonisten des $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptors. Dies diente dazu, nach Präparation und

Normalisierung eine stabil reproduzierbare Kontraktion zu erreichen sowie die Funktionstüchtigkeit der Gefäße zu überprüfen. Die maximale MX-Konzentration in den Kammern des Myographen betrug dabei 10^{-5} M. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Messkammern 3-mal im Abstand von 5 min mit Arbeitspuffer gewaschen, bis sich die Gefäße wieder entspannt hatten.

Um zu überprüfen, ob die Entfernung des Endothels erfolgreich war, wurde nun mit einer MX-Konzentration zwischen 10^{-7} M und 10^{-6} M eine Kontraktion erzeugt, welche circa 30 % der Maximalkontraktion entsprach. Anschließend wurde Acetylcholin (Ach) appliziert. Folgte daraufhin keine oder nur eine geringe Relaxation der Gefäße, konnte daraus geschlossen werden, dass das Endothel vollständig oder fast vollständig entfernt worden war. Alle Kammern wurden anschließend wieder mehrmals mit Arbeitspuffer gewaschen und es erfolgte eine erneute Zugabe der maximalen MX-Konzentration von 10^{-5} M mit anschließendem Auswaschen, womit die Aktivierungsphase abgeschlossen wurde (beispielhafte Aktivierungsphase siehe Abb. 10).

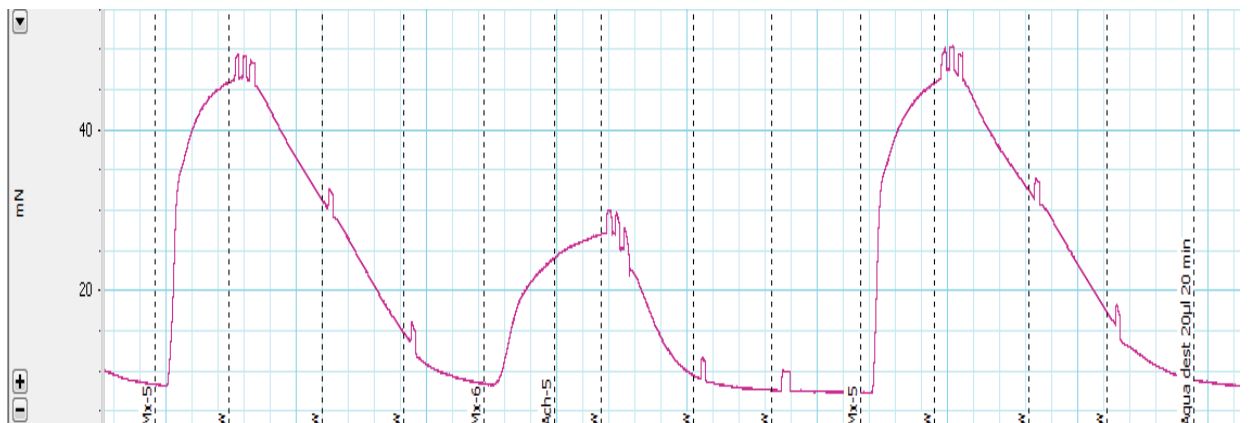


Abb. 10: Beispielverlauf der Aktivierungsphase eines Gefäßes (aufgenommen mit LabChart).

Alle Kammern wurden nun mit 20 μ l destilliertem Wasser für ca. 20 min inkubiert. In dieser Zeit konnten die Gefäße vollständig relaxieren und der Basaltonus der Arterien im Ruhezustand, welcher wichtig für die spätere Auswertung war, konnte registriert werden. Nach der Inkubationszeit wurde zunächst eine Dosiswirkungskurve (DWK) aufgenommen, die als Kontrolle für die folgenden Versuchsteile diente. Dazu wurde,

beginnend mit einer Konzentration von 10^{-8} M, in Abständen von jeweils 3 min die MX-Konzentration schrittweise erhöht bis zur Maximalkonzentration von 10^{-5} M (Schema siehe Tab. 17). Anschließend wurde mit Arbeitspuffer gespült, bis die Gefäße wieder den Basaltonus zeigten. Es folgte nun die Inkubation mit dem Lösungsmittel der später verwendeten Testsubstanz. Auch die Inkubationszeit wurde entsprechend angepasst. Anschließend wurde der BK-Kanal Blocker Iberitoxin (IBTX) in einer Konzentration von 10^{-7} M in 2 Kanäle appliziert, in die beiden anderen Kanäle wurde die entsprechende Menge des Lösungsmittels als Kontrolle gegeben. Es wurde eine zweite Dosiswirkungskurve nach gleichem Schema aufgenommen. Nach dem erneuten Auswaschen folgte nun die Applikation der Testsubstanz in 2 Kanäle sowie des Lösungsmittels in die anderen beiden Kanäle. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 min wurde erneut IBTX beziehungsweise das Lösungsmittel gegeben. Anschließend erfolgte die Aufnahme einer weiteren Dosiswirkungskurve (beispielhafter Verlauf der 2. und 3. DWK siehe Abb. 11). Eventuell folgte nun noch eine vierte Dosiswirkungskurve mit einer höheren Konzentration der Testsubstanz nach dem gleichen Prinzip. Die verschiedenen Substanzen wurden dabei immer nach folgendem Schema zugegeben:

Kanal 1: Lösungsmittel + IBTX.... 2.DWK	Testsubstanz + IBTX..... 3.DWK
Kanal 2: Lösungsmittel + IBTX.... 2.DWK	Lösungsmittel + IBTX..... 3.DWK
Kanal 3: Lösungsmittel + H ₂ O..... 2.DWK	Testsubstanz + H ₂ O..... 3.DWK
Kanal 4: Lösungsmittel + H ₂ O..... 2.DWK	Lösungsmittel + H ₂ O..... 3.DWK

Tab. 17: Pipettierschema der Dosiswirkungskurve.

Konzentration MX-Stammlösung (M)	applizierte Menge (µl)	Endkonzentration im Myographen (M)
10^{-5}	5	10^{-8}
10^{-5}	10	$3 \cdot 10^{-8}$

10^{-4}	3,5	10^{-7}
10^{-4}	10	$3 \cdot 10^{-7}$
10^{-3}	3,5	10^{-6}
10^{-3}	10	$3 \cdot 10^{-6}$
10^{-2}	3,5	10^{-5}

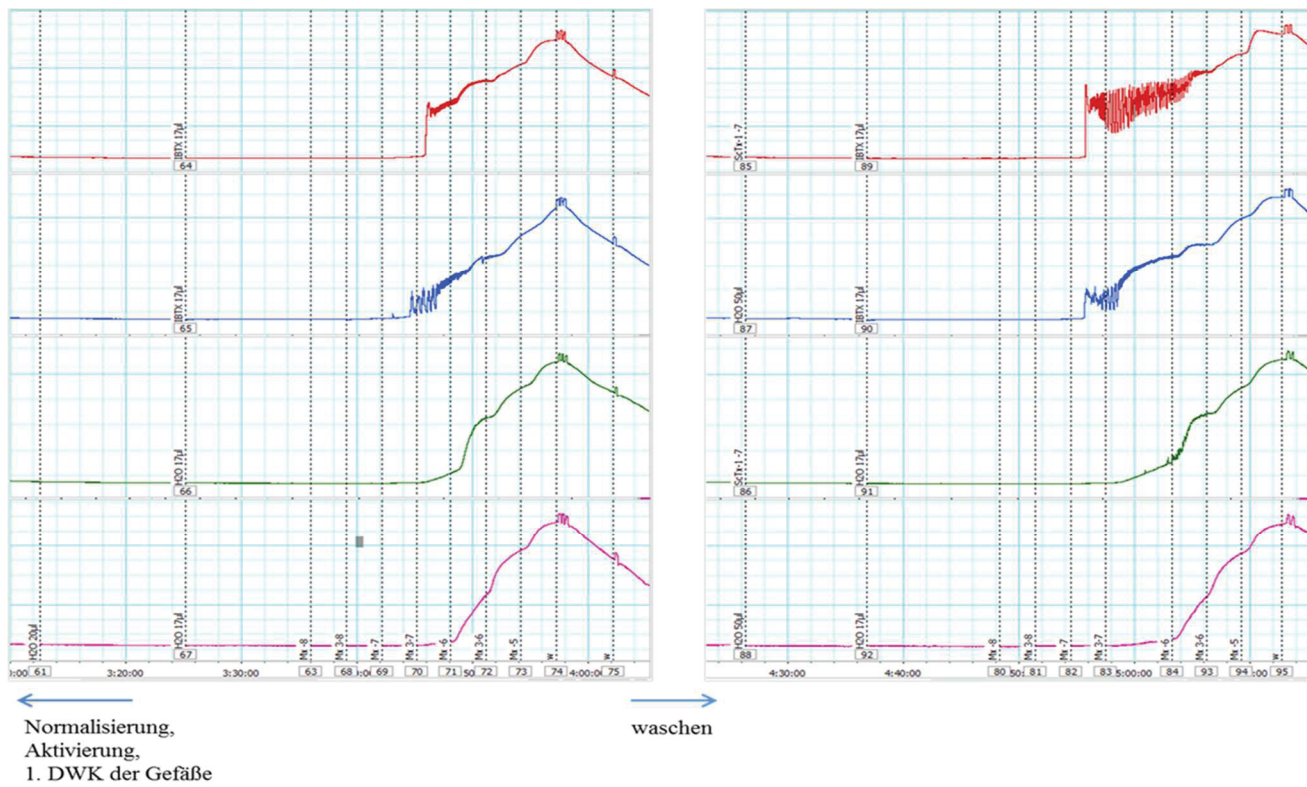


Abb. 11: Beispielverlauf der 2. und 3. DWK der Gefäße im 4-Kanal-Myographen am Beispiel von Stromatoxin-1 (aufgenommen mit LabChart).

2.8.3 Auswertung

Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels zweier Programme. Mit LabChart 6 Pro wurden die Daten der Kraftmessung abgelesen, Berechnungen wurden mit dem

Tabellenkalkulationsprogramm Excel vorgenommen. Zunächst wurden die Daten aus LabChart in Excel übertragen. Dabei wurde für die jeweilige Konzentration des Agonisten 100 % der maximalen Kraft abgelesen, wenn die Kontraktion stabil war. Bei abnehmender Kontraktion wurde ein Wert von etwa 90 % des Maximalwertes, bei Oszillationen der Mittelwert eingetragen. Durch Abzug des Basistonus ergab sich die absolute Kraftänderung, welche nach folgender Formel normiert wurde:

$$N_{\text{norm}} = (N/N_{\text{max}}) * 100\%$$

N_{norm} ...normierte Kraft

N ...absolut gemessene Kraft

N_{max} ...Kraft bei maximaler MX-Konzentration

Mit Hilfe der normierten Werte für die Änderung der Kraft konnten nun Versuche unter unterschiedlichen Bedingungen miteinander verglichen werden. Dazu wurde zunächst die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) für die verschiedenen Bedingungen berechnet und mittels zweiseitigem t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.9 Bestimmung der Calciumkonzentration mittels

Fluoreszenzmikroskopie

Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Gleichzeitig wurden während des gesamten Versuches isometrische Kraftmessungen vorgenommen, um die kontraktile Reaktion der Gefäße zu erfassen. Die Datenerfassung erfolgte mittels der Software BloodvesselAnalyzer BVA300 (HaSoTec), die Kraftmessung erfolgte wie in den vorher beschriebenen Versuchen mit PowerLab/LabCharts 6 Pro.

2.9.1 Fluoreszenzindikator Fura-2

Um die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration zu ermöglichen, mussten die Zellen mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 beladen werden. Fura-2 besitzt die Fähigkeit, freies Calcium zu binden und fluoresziert sowohl in gebundener als auch in ungebundener Form. Kommt es zur Bindung von Calciumionen, so ändert sich die spektrale Charakteristik von Fura-2, das Absorptionsmaxima wird in den kurzwelligen Bereich verschoben. Dieses liegt für die gebundene Form bei 335nm, für die ungebundene Form bei 362 nm. Die calciumabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität ist maximal bei einer Anregungswellenlänge von 340 bzw. 380nm und der Messung der Emission bei 510 nm (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985). Durch abwechselnde Belichtung mit 340 und 380 nm kann das Emissionsverhältnis der calciumfreien und -gebundenen Form von Fura (F340/F380) ermittelt werden und damit die intrazelluläre Calciumkonzentration abgeschätzt werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber single-wavelength-Fluoreszenzindikatoren liegt in der höheren Sensitivität. Da bei einer Erhöhung der Calciumkonzentration nicht nur die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm zunimmt, sondern gleichzeitig auch die Fluoreszenz bei 380 nm abnimmt, führen auch kleine Änderungen der Calciumkonzentration zu einer deutlichen Änderung F340/F380-Quotienten.

2.9.2 Beladung der Zellen mit Fura-2

Fura-2 besitzt als Polycarboxylat-Anion eine hohe negative Ladung und kann somit nicht durch die Zellmembran diffundieren. Daher wurde in den Versuchen Fura-2 AM verwendet, der Acetomethylester von Fura-2. Da die positiv geladenen Acetomethylgruppe die negative Ladung der Carboxylgruppe aufhebt, kann Fura-2 AM mittels passiver Diffusion durch die Zellmembran ins Zytosol gelangen. Im Zytosol wird die AM-Gruppe durch die dort befindlichen Esterasen abgebaut (Kao, Fan et al. 1994), wodurch wieder Calcium durch Fura-2 gebunden werden kann (siehe Abb. 12).

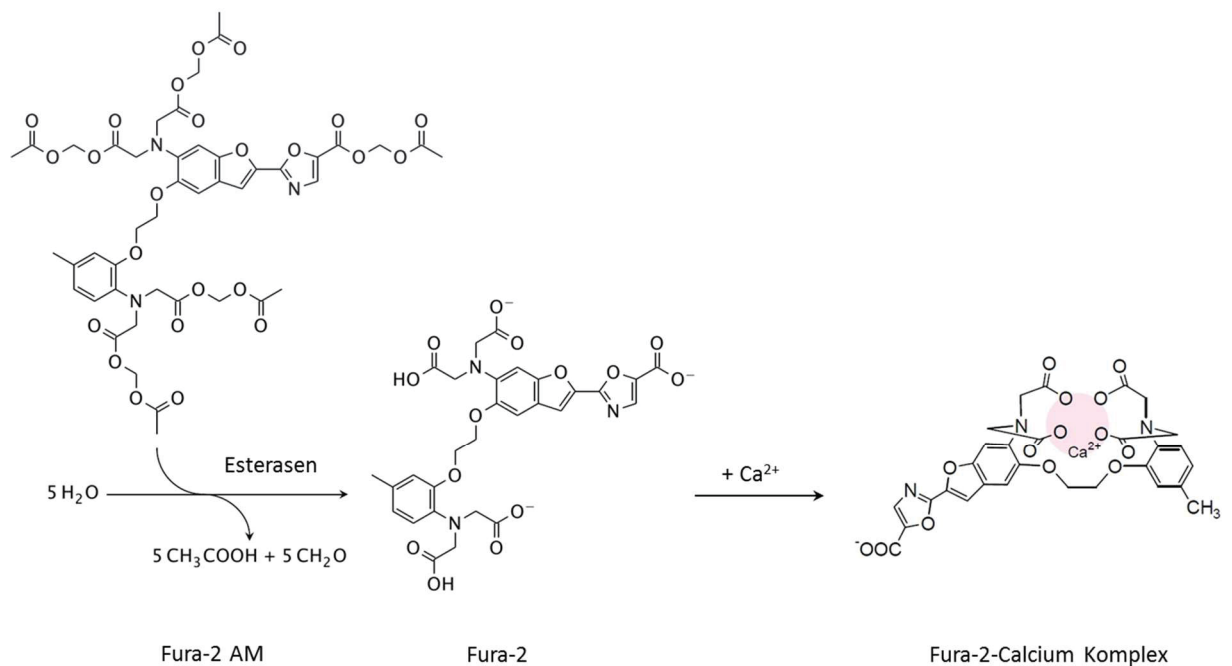


Abb. 12: Hydrolyse von Fura-2 AM durch Esterasen des Zytoplasmas und Bildung eines Komplexes mit Calcium (nach <http://www.dojindo.eu.com/>; <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/discoveryScreening.html>; modifiziert).

2.9.3 Versuchsablauf:

Ein Gefäßsegment wurde in einen Ein-Kammer-Myographen eingespannt (siehe 2.5) und auf dem Objektisch eines inversen Mikroskops platziert. Nach dem Aufheizen der Messkammer auf 37 °C wurde das Gefäß normalisiert (siehe 2.8.1), anschließend wurde der Arbeitspuffer in der Kammer durch Arbeitspuffer ersetzt und noch 2 mal gespült. Nun wurde der Raum abgedunkelt und das Mikroskop zusätzlich mit einer lichtundurchlässigen Haube bedeckt. Die Fluoreszenzmessung wurde nun gestartet, wobei zunächst die Grundfluoreszenz registriert wurde. Zur Aktivierung des Gefäßes wurde der Arbeitspuffer in der Kammer zunächst gegen den modifizierten Arbeitspuffer mit 120 mM KCl ausgetauscht, was zu einer starken Kontraktion intakter Gefäße führte.

Nach dem Auswaschen erfolgte die Applikation von 10^{-5} M MX sowie nach dem erneuten Spülen der Kammer die Gabe von 10^{-5} M ACh auf das zu circa 30% des Maximalwertes kontrahierten Gefäßes, um zu überprüfen, ob das Endothel vollständig entfernt worden war. Zeigte das Gefäß eine gute Reaktion auf die Gabe von 10^{-5} M MX, wurden die Zellen anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff für die Calciummessung in den glatten Muskelzellen beladen. Dazu wurden zunächst 10 µg Fura-2 AM in 10 µl DMSO gelöst. In einem Zentrifugenröhrchen wurden nun 5 µl des aufgelösten Fura-2 AM mit 5 ml vorgewärmtem Arbeitspuffer vermischt, was einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ M entsprach. Um das Fura vollständig zu lösen, folgte eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad. Anschließend wurde der so vorbereitete Arbeitspuffer in die Messkammer gegeben und für 45 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde mit den verbliebenen 5 µl des aufgelösten Fura-2 AM ebenso verfahren und weitere 45 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kammer 3 Mal im Abstand von jeweils 5 min gründlich mit Arbeitspuffer gespült. Diese Zeit diente auch dazu, den Estrasen im Zytosol den vollständigen Abbau der AM-Gruppen zu ermöglichen. Es folgte ein erneuter Test auf die Funktionsfähigkeit der Gefäße mittels 120 mM KCl und 10^{-5} M MX, anschließend wurde mit dem eigentlichen Versuch begonnen.

Um die Calciumantwort während der MX-induzierten Kontraktion in Gegenwart von IBTX sowie unter Kontrollbedingungen zu untersuchen, wurde nun eine Dosiswirkungskurve in Abwesenheit oder in Anwesenheit von IBTX aufgenommen. Die Inkubation mit IBTX bzw. H₂O in Kontrollversuchen sowie das Aufzeichnen der Dosiswirkungskurve wurden wie in Punkt 2.9.2 beschrieben durchgeführt.

2.9.4 Auswertung

Die Auswertung der isometrischen Kraftmessung erfolgte wie in Punkt 2.8.3 beschrieben. Für die Auswertung der Calciummessung wurde ein spezielles Excel-Makro benötigt, mit dessen Hilfe die die Calciumkonzentration als Verlaufskurve dargestellt werden konnte. Der F340/F380-Quotient wurde dabei gegen die MX-Konzentration aufgetragen und die AUC für in Gegenwart sowie Abwesenheit von IBTX berechnet. Dabei war darauf zu achten, dass die erste Reaktion der Gefäße in den verglichenen Versuchen ähnlich stark

ausfiel. Mittels eines zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Versuche analysiert. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.10 Diabetische Ratten

Ein Teil der Versuche wurde an Wistarratten vorgenommen, bei denen mittels Streptozotocin (STZ) ein Typ-I-Diabetes induziert wurde. STZ ist ein Toxin, welches die Betazellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas zerstört und somit zu einer Reduktion der Insulinproduktion führt.

2.10.1 Streptozotocininjektion

Die STZ-Injektion wurde an 7 Wochen alten, männlichen Wistarratten vorgenommen. Dabei betrug die Dosis 35 mg je kg Körpergewicht. Die entsprechende Menge wurde am Vortag der Injektion für jedes Tier einzeln abgewogen und in einem Mikroreaktionsgefäß bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Ratten zunächst für circa 5 min in eine Wärmekammer gesetzt, in der eine Temperatur von 34 °C eingestellt war. Dies diente dazu, die Blutgefäße der Tiere zu erweitern und somit die folgende intravenöse Injektion zu erleichtern. Währenddessen wurde eine Inkubationskammer mit einem 5-prozentigen Isofluran-Sauerstoff-Gemisch geflutet, um die spätere Narkose vorzubereiten. Außerdem wurde die STZ-Lösung zur Injektion vorbereitet. Dazu wurden 0,9 ml aqua ad injectabilia zu dem am Vortag abgewogenen STZ gegeben und leicht erwärmt, bis die Substanz vollständig gelöst war. Anschließend wurden 0,7 ml der Lösung mit einer 1-ml-Spritze aufgezogen und eine Kanüle (0,4 mm) aufgesetzt. Es war wichtig, das Streptozotocin erst kurz vor der Injektion aufzulösen, da es in diesem Zustand nur circa 15 min stabil bleibt. Waren die Tiere ausreichend aufgewärmt, wurden sie jeweils einzeln in die Narkosekammer eingesetzt, wobei die Isoflurankonzentration zur Narkoseerhaltung auf 1,7 % verringert wurde. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch das Kneifen in die Zehenzwischenhaut getestet. Folgte hierauf keine Beugung des Beines, wurde mit der STZ-Injektion begonnen. Dazu wurde das Tier in Seitenlage gebracht und der Schwanz

durch eine kleine Öffnung in der Narkosekammer nach außen geführt. Nach der Desinfektion der Einstichstelle wurde die vorbereitete STZ-Lösung langsam in die Schwanzvene injiziert, wobei darauf zu achten war, keine Luftblasen zu injizieren. Anschließend wurde das Tier zurück in den Käfig gesetzt und bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet.

Mit den Kontrolltieren wurde ähnlich verfahren, es wurde jedoch statt Streptozotocin 0,7 ml reines aqua ad injectabilia injiziert.

2.10.2 Kontrolle von Gewicht und Blutzucker

Zur Verlaufskontrolle des Diabetes wurde regelmäßig das Gewicht sowie der Blutzucker der Ratten ermittelt, wobei der jeweils erste Wert vor der STZ-Injektion genommen wurde. Anschließend fanden Gewichtskontrollen im ersten Monat wöchentlich, ab dem zweiten Monat alle zwei Wochen statt. Der Blutzucker wurde wöchentlich kontrolliert. Zur Blutzuckerkontrolle wurde ein herkömmliches Glucosemessgerät verwendet. Blut wurde durch Punktierung der Schwanzspitze der Ratten mit einer Kanüle gewonnen. Gewicht und Blutzucker wurden bei den Kontrolltieren als Vergleichswerte ebenfalls protokolliert. Stieg der Blutzucker der diabetischen Tiere auf über 600 mg/dl an oder kam es zu einem starken Gewichtsverlust von über 5 %, mussten die Ratten mit Insulin (Lantus) behandelt werden, wobei alle zwei Tage drei Einheiten subkutan in den Nacken der Tiere injiziert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle des BK-Kanals bei der Gefäßkontraktion

Gefäßkontraktionen wurden in den hier vorgestellten Versuchen durch Methoxamin ausgelöst, einen selektiven α_1 -Adrenozeptoragonisten, der nicht durch sympathische Nervenendigungen aufgenommen wird (Trendelenburg, Maxwell et al. 1970).

Um die Rolle des BK-Kanals während der Gefäßkontraktion sowie seine Interaktion mit anderen Kaliumkanälen zu untersuchen, wurde der spezifische BK-Kanal-Blocker Iberiotoxin (IBTX) verwendet. Durch die hohe Spezifität dieses Peptids für den Kanal wurde sichergestellt, dass ausschließlich der BK-Kanal, jedoch keine anderen Ionenkanäle blockiert wurden (Kaczorowski, Knaus et al. 1996, Wei, Gutman et al. 2005).

In Gegenwart von IBTX war die MX-induzierte Kontraktion verstärkt, der BK-Kanal besitzt also einen antikontraktilen Effekt. Dieser Effekt zeigte sich vor allem in den niedrigeren und mittleren MX-Konzentrationen (Abb. 13; $n = 8$; $p < 0,01$).

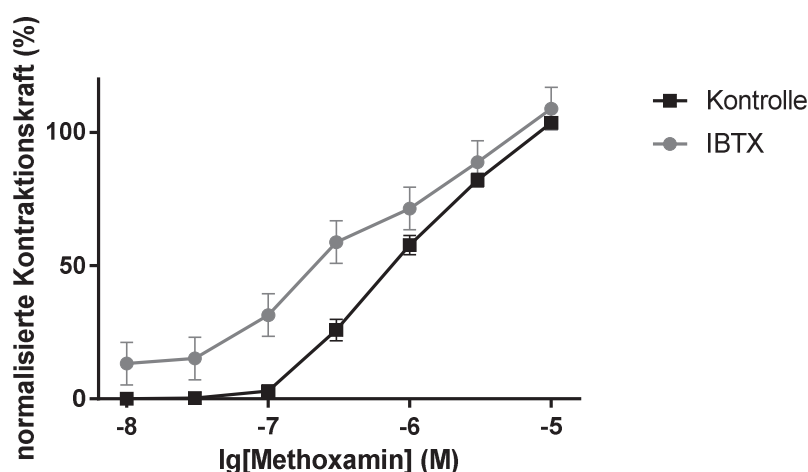


Abb. 13: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion. Mittelwerte der Kontraktionsamplitude in Gegenwart (Kreis geschlossen, grau, IBTX) bzw. Abwesenheit von IBTX (Quadrat geschlossen, schwarz, Kontrolle).

Außerdem wurde mittels Fura-2-Fluorimetrie untersucht, wie sich die intrazelluläre Calciumkonzentration in den glatten Muskelzellen während der MX-induzierten

Gefäßkontraktion in Gegenwart und Abwesenheit von IBTX verhält. Die Calciumkonzentration in den Zellen war bei geringen und mittleren MX-Konzentrationen in Gegenwart von IBTX höher als unter Kontrollbedingungen (Abb. 14; $n = 5$; $p < 0,05$). Bei hohen MX-Konzentrationen stellte sich, im Gegensatz zur Kontraktionsspannung, eine maximale Calciumkonzentration sowohl in Gegenwart von IBTX als auch unter Kontrollbedingungen auf dem gleichen Niveau ein.

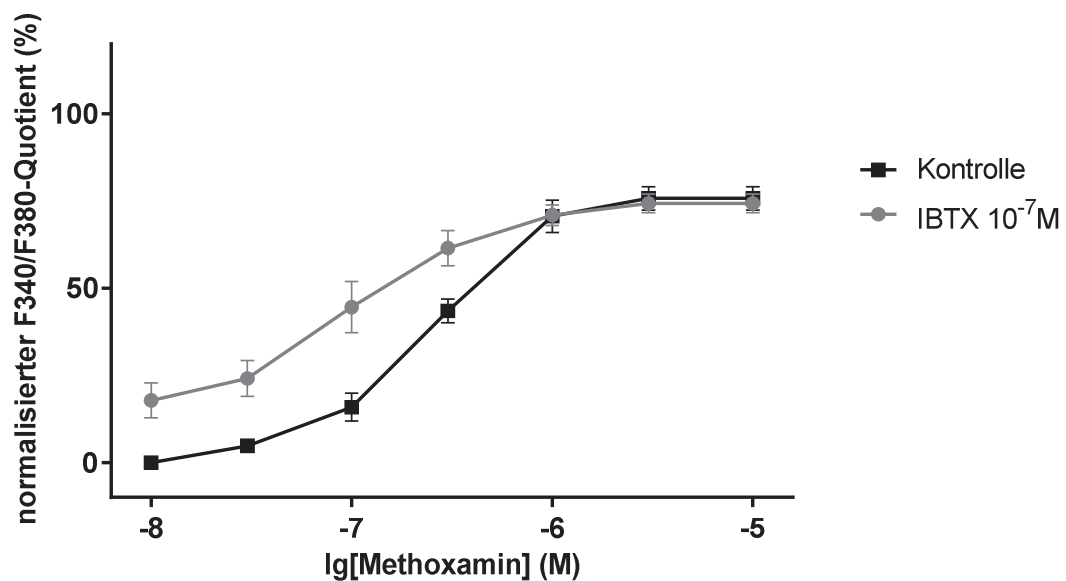


Abb. 14: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Mittelwerte der intrazellulären Calciumkonzentration (dargestellt durch den F340/F380-Quotienten) in Gegenwart (Kreis geschlossen, grau, IBTX) bzw. Abwesenheit von IBTX (Quadrat geschlossen, schwarz, Kontrolle).

Außerdem zeigten die Gefäße in Gegenwart von IBTX typische Oszillationen im Bereich niedrigerer und mittlerer MX-Konzentrationen (Abb. 15A). Diese Oszillationen bestanden aus Oszillationen mit kleiner Frequenz und großer Amplitude (Abb. 15C), überlagert von Oszillationen mit großer Frequenz und kleiner Amplitude (Abb. 15B).

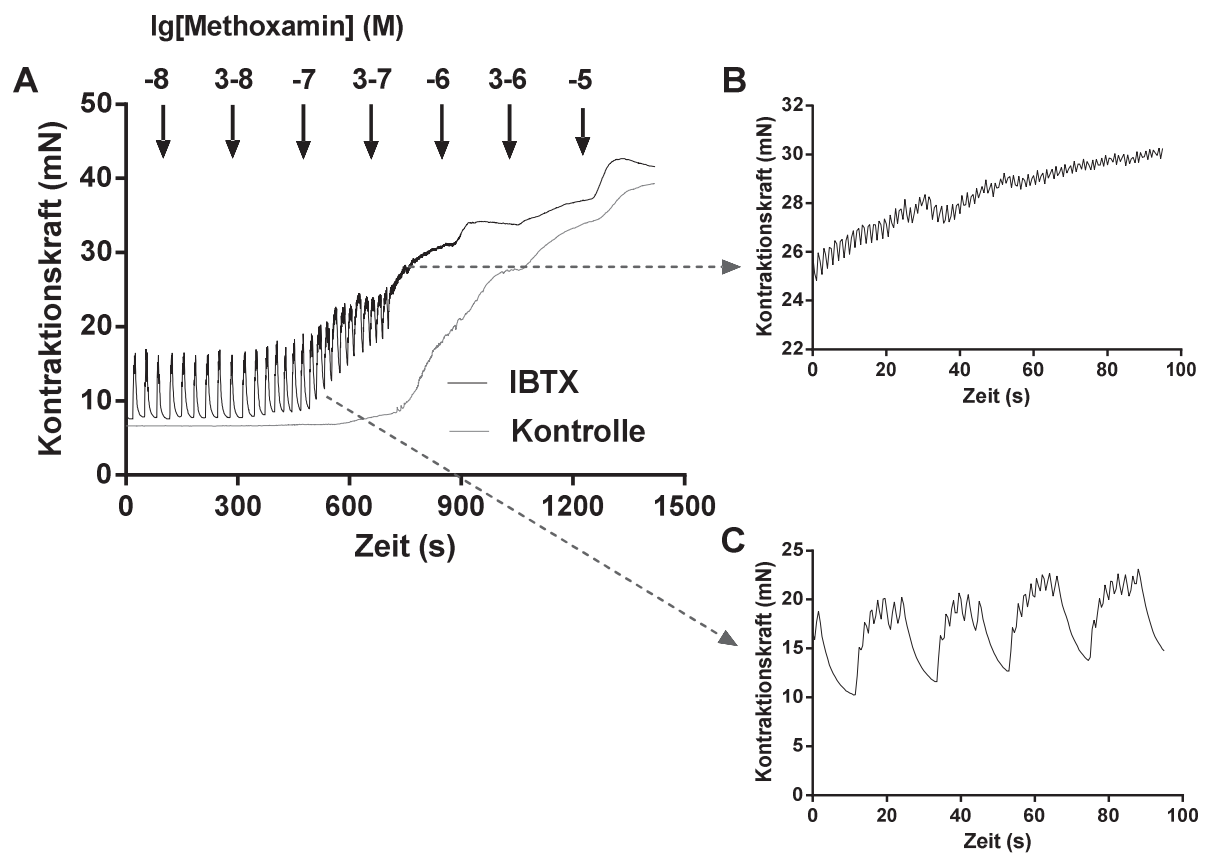


Abb. 15: Originaldaten der Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion. A: Applikation von Methoxamin zur Schwanzarterie der Ratte in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} M in Anwesenheit von IBTX (schwarz, IBTX) und in seiner Abwesenheit (grau, Kontrolle). B: Detaillierte Ansicht der von IBTX erzeugten kleinen Oszillationen. C: Detaillierte Ansicht der von IBTX erzeugten großen Oszillationen.

Die beobachteten Oszillationen wurden genauer analysiert. In Bezug auf die Minima und Maxima der großen und kleinen Oszillationen zeigte sich ein von der MX-Konzentration abhängiger Effekt. Oszillationen mit großer Amplitude waren dabei nur bis zu einer MX-Konzentration von 10^{-7} M zu sehen, Oszillationen mit kleiner Amplitude bis zu einer MX-Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M. Bei höheren MX-Konzentrationen verschwanden die Oszillationen völlig und die Kontraktionskräfte der Gefäße unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von IBTX näherten sich einander stark an (Abb. 16).

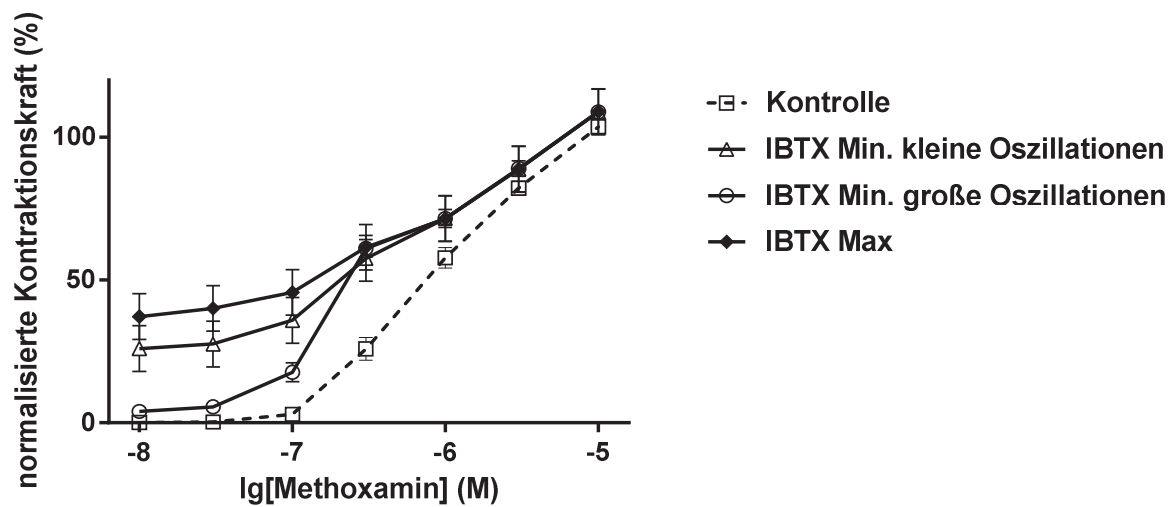


Abb. 16: Wirkung von Iberiotoxin auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion. Effekt von MX in Abwesenheit von IBTX (Quadrat offen, Linie gestrichelt, Kontrolle) und in Anwesenheit von IBTX in Bezug auf die Minima der kleinen Oszillationen (Dreieck offen, Linie durchgängig, IBTX Min. kleine Oszillationen), die Minima der großen Oszillationen (Kreis offen, Linie durchgängig, IBTX Min. große Oszillationen) und die Maxima der großen als auch kleinen Oszillationen (Raute geschlossen, Linie durchgängig, IBTX Max).

Bei der genaueren Charakterisierung der von IBTX verursachten Oszillationen wurde gefunden, dass die Amplitude der Oszillationen mit großer Amplitude mit steigender MX-Konzentration gleichbleibt (Abb. 17A), während die Frequenz zunimmt (Abb. 17C). Die Amplitude der Oszillationen mit kleiner Amplitude war bei einer MX-Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M abgeschwächt (Abb. 17B), die Frequenz war unverändert (Abb. 17D).

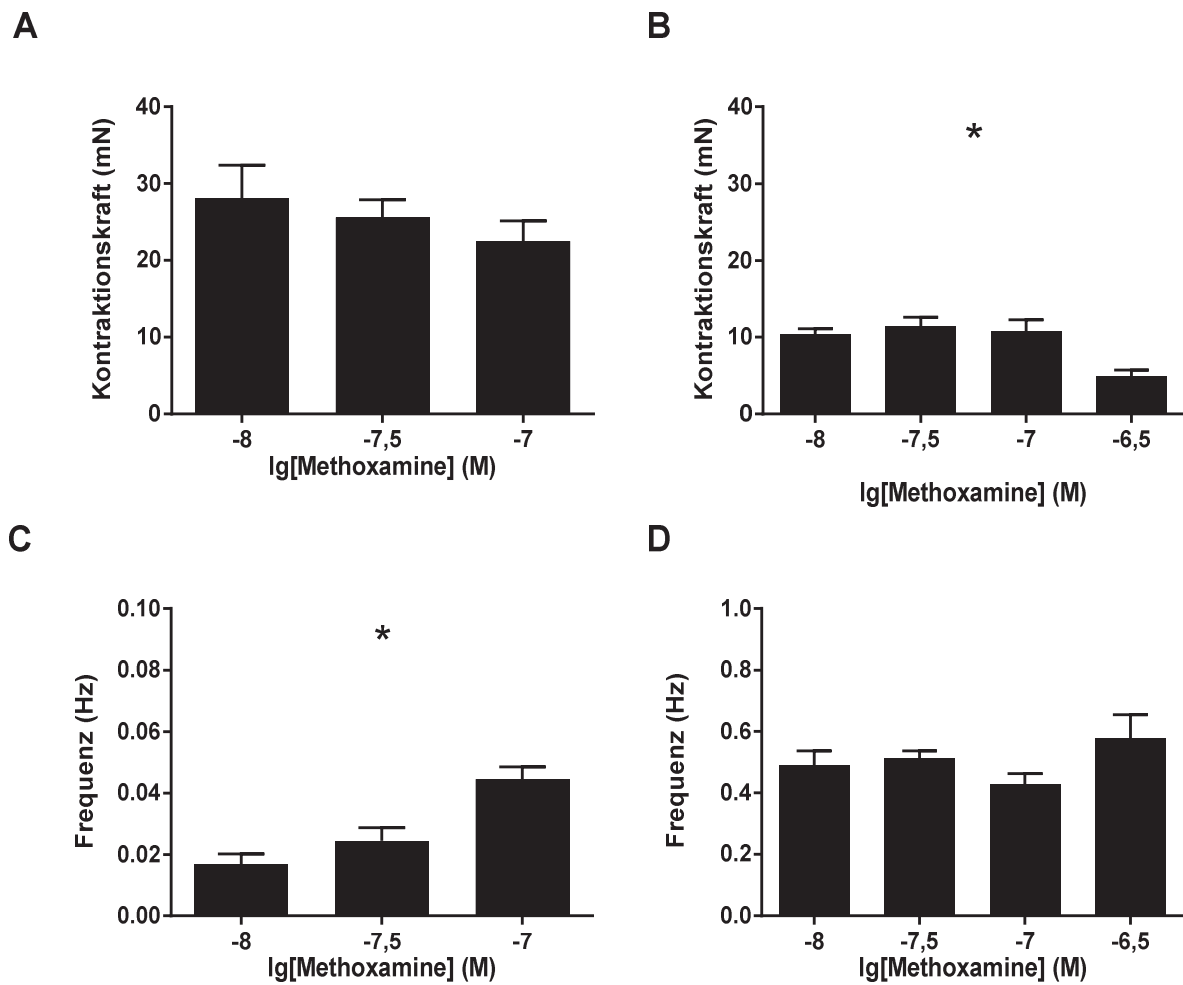


Abb. 17: Charakteristik der IBTX-induzierten Oszillationen bei Einwirkung von Methoxamin. A: Amplitude der großen Oszillationen. B: Amplitude der kleinen Oszillationen. C: Frequenz der großen Oszillationen. D: Frequenz der kleinen Oszillationen (hier zu beachten ist der 10-fach größere Bereich der y-Achse im Vergleich zu C).

In der Literatur existieren Hinweise, dass Oszillationen der Kontraktionskraft durch eine gap junction vermittelte Synchronisation der individuellen Calcium-Wellen einzelner glatter Muskelzellen entstehen (Halidi, Alonso et al. 2012). Um den Einfluss der gap junctions auf die Oszillationen der Kontraktionskraft zu untersuchen, wurden Versuche mit deren Blocker 18 α -Glycyrrhetinsäure in einer Konzentration von 10⁻⁴ M durchgeführt (Davidson, Baumgarten et al. 1986). Im Bereich niedriger und mittlerer MX-Konzentrationen, in dem die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von IBTX

verändert ist, war in Gegenwart von 10^{-4} M 18α -Glycyrrhetinsäure die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 18B; $n = 9$; $p = 0,38$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 18α -Glycyrrhetinsäure und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 18A). Der Effekt von 18α -Glycyrrhetinsäure trat erst in Gegenwart von IBTX zu Tage (Abb. 18C; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 3,646 bis 11,18). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht von 10^{-4} M 18α -Glycyrrhetinsäure beeinflusst (Abb. 18D; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -17,85 bis 3,026).

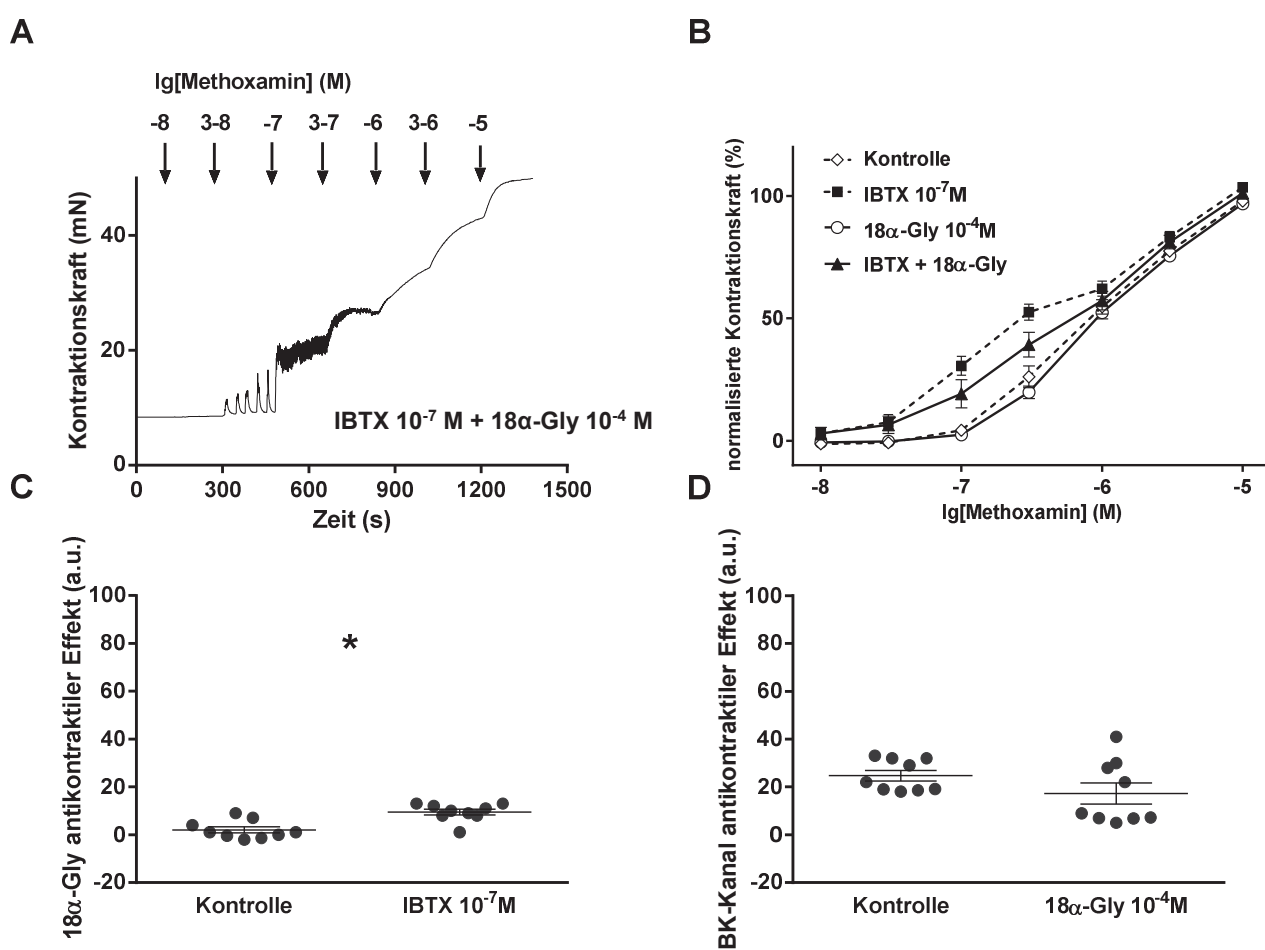


Abb. 18: Wirkung von 18α -Glycyrrhetinsäure 10^{-4} M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und 18α -Glycyrrhetinsäure. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von

Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von 18α - Glycyrrhetinsäure (Kreis offen, 18α -Gly 10^{-4} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und 18α - Glycyrrhetinsäure (Dreieck geschlossen, IBTX + 18α -Gly). C: Antikontraktiler Effekt von 18α - Glycyrrhetinsäure in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 18α - Glycyrrhetinsäure (18α -Gly 10^{-4} M).

Die Funktion des BK-Kanals bei Diabetes und Hyperglykämie

Um zu untersuchen, ob sich die Funktion der BK-Kanäle bei Diabetes bzw. Hyperglykämie verändert, wurden zunächst Versuche mit kurzzeitiger Einwirkung von hohen Glucose-Konzentrationen auf die isolierten Gefäße durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Glucose-Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ M verwendet. In Gegenwart von $2 \cdot 10^{-2}$ M Glucose war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 19B; $n = 6$; $p = 0,38$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 19A). Der Effekt von Glucose wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 19C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -3,983 bis 13,98). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht von $2 \cdot 10^{-2}$ M Glucose beeinflusst (Abb. 19D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -2,574 bis 12,57).

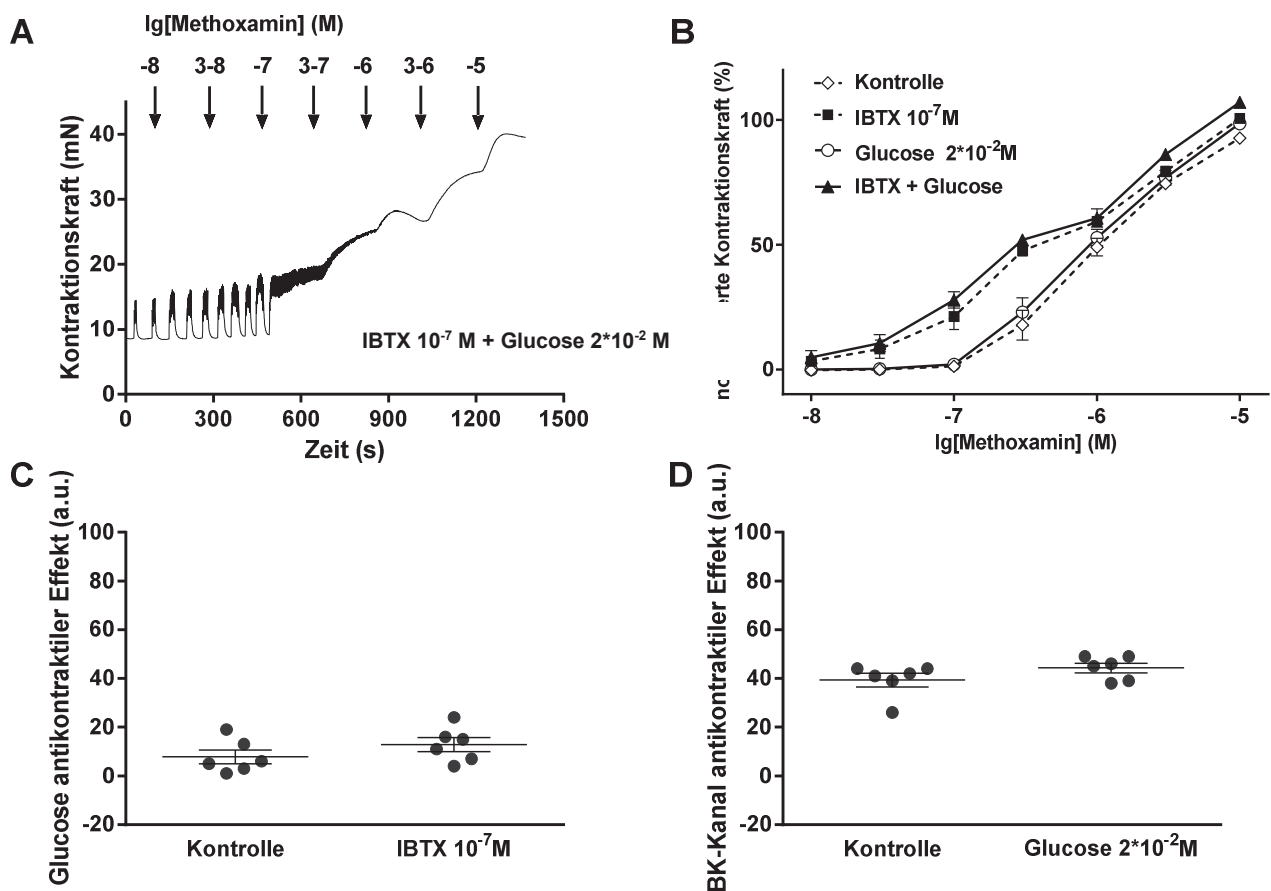


Abb. 19: Wirkung von Glucose $2 \cdot 10^{-2}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Glucose. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Glucose (Kreis offen, Glucose $2 \cdot 10^{-2}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Glucose (Dreieck geschlossen, IBTX + Glucose). C: Antikontractiler Effekt von Glucose in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Glucose (Glucose $2 \cdot 10^{-2}$ M).

Auch in Gegenwart einer höheren Glucose-Konzentration von $4 \cdot 10^{-2}$ M war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 20B; $n = 6$; $p = 0,85$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 20A). Der Effekt von Glucose wurde nicht von IBTX beeinflusst

(Abb. 20C; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -9,943 bis 23,94). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde von $4 \cdot 10^{-2}$ M Glucose nicht beeinflusst (Abb. 20D; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -17,68 bis 31,68).

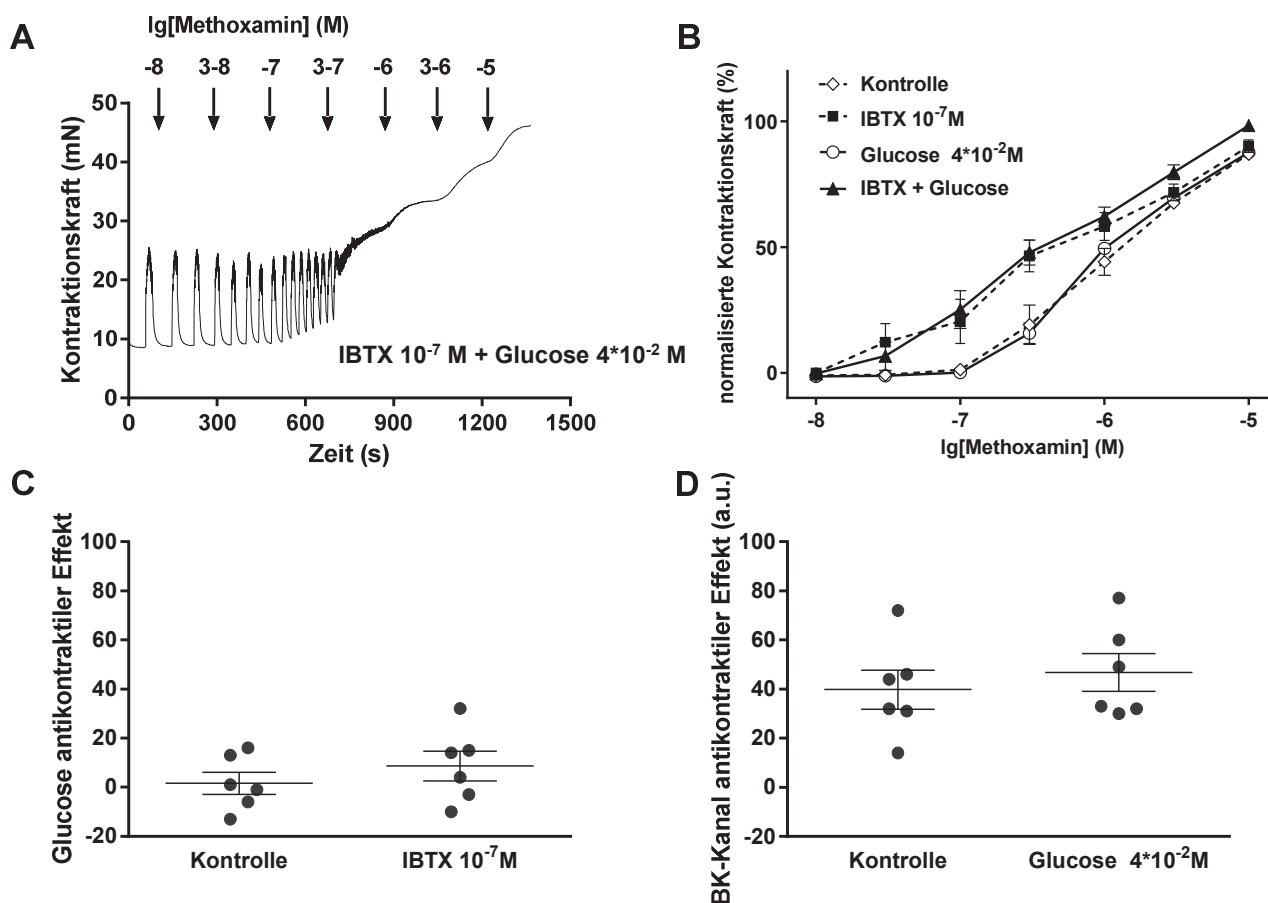


Abb. 20: Wirkung von Glucose $4 \cdot 10^{-2}$ M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Glucose. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Glucose (Kreis offen, Glucose $4 \cdot 10^{-2}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Glucose (Dreieck geschlossen, IBTX + Glucose). C: Antikontractiler Effekt von Glucose in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Glucose (Glucose $4 \cdot 10^{-2}$ M).

Um den Einfluss einer hohen Glucosekonzentration über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden anschließend Versuche mit Gefäßen von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes durchgeführt.

Die Gefäße wurden nach einer Diabetes-Dauer von 8 Wochen untersucht. Bei Gefäßen diabetischer Tiere war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 21B; $n = 8$; $p = 0,58$). In Gegenwart von IBTX waren die phasischen Kontraktionen bei den Gefäßen diabetischer Tiere weiter vorhanden (Abb. 21A). Der Effekt des Diabetes wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 21C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -6,9 bis 10,65). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde vom Diabetes nicht beeinflusst (Abb. 21D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -17,77 bis 14,02).

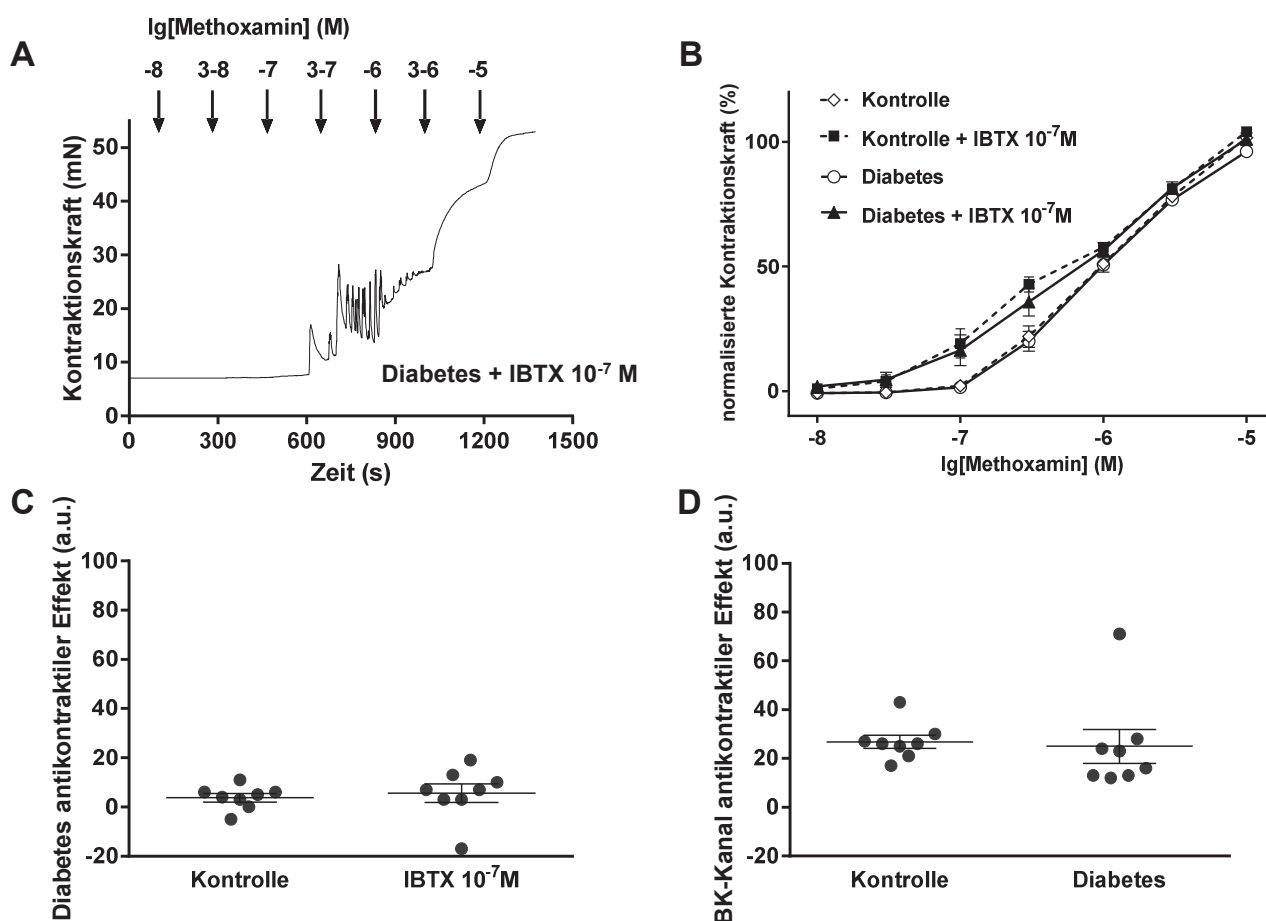


Abb. 21: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion der Gefäße diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere (Raute offen, Kontrolle), von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M), von Gefäßen diabetischer Tiere (Kreis offen, Diabetes) und von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX 10^{-7} M). C: Antikontraktiler Effekt von Diabetes in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes).

Anschließend wurden die IBTX-induzierten Oszillationen von Gefäßen diabetischer Tiere genauer analysiert. Es zeigte sich, dass große Oszillationen nur bis zu einer MX-Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M auftraten, teilweise konnten auch gar keine großen Oszillationen beobachtet werden. Die Amplituden der Oszillationen waren bei Gefäßen diabetischer Tiere kleiner als unter Kontrollbedingungen. Das galt sowohl für die großen (Abb. 22A, $n = 9$, $p < 0,001$) als auch für die kleinen Oszillationen (Abb. 22B, $n = 9$, $p < 0,001$). Auch die Frequenz der Oszillationen war bei Gefäßen diabetischer Tiere kleiner als unter Kontrollbedingungen, sowohl bei den großen (Abb. 22C, $n = 9$, $p < 0,001$) als auch bei den kleinen Oszillationen (Abb. 22D, $n = 9$, $p < 0,001$).

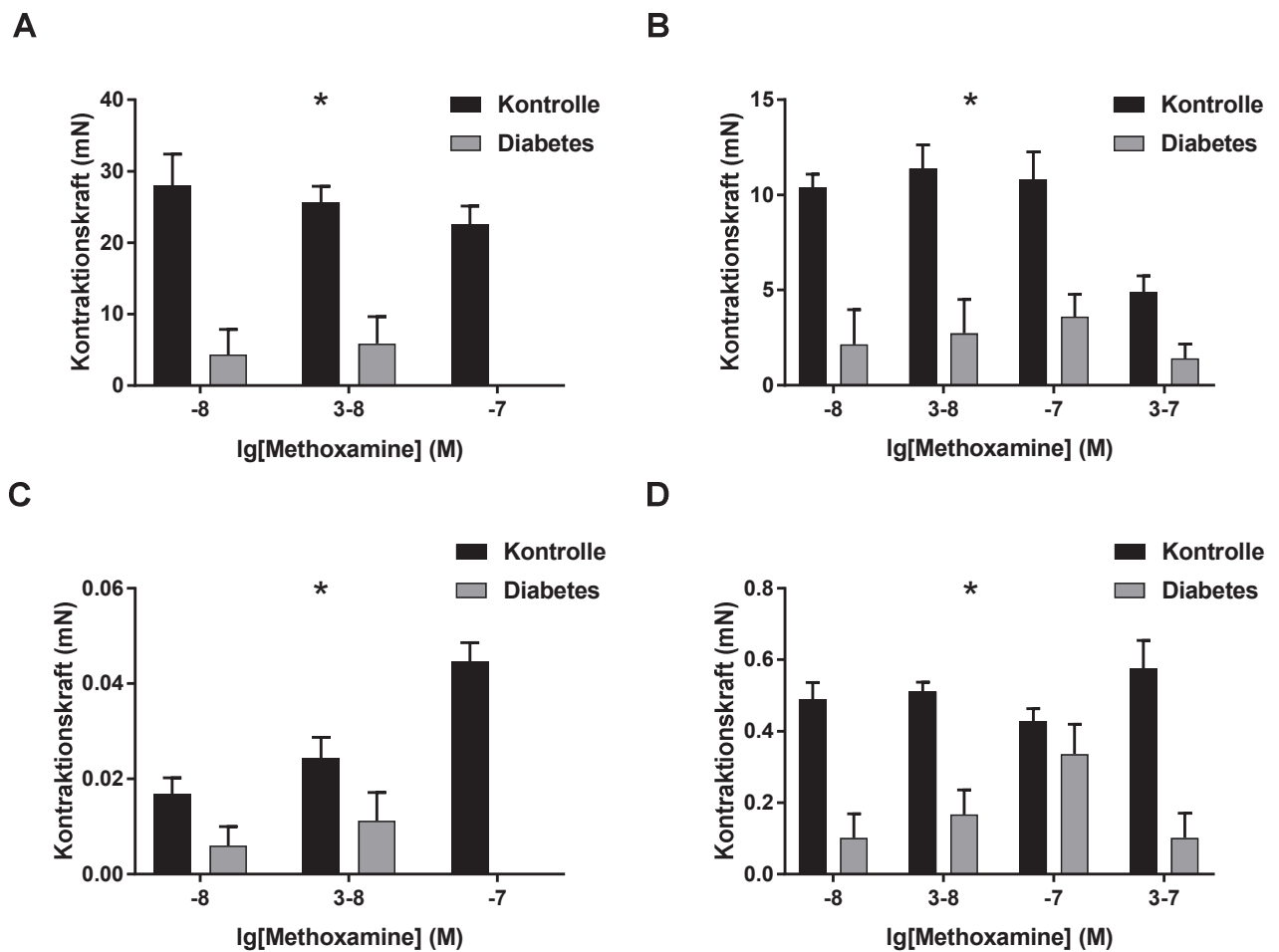


Abb. 22: Wirkung von Diabetes auf die Charakteristik der IBTX-induzierten Oszillationen bei Einwirkung von Methoxamin. A: Amplitude der großen Oszillationen bei Kontrolltieren (schwarz, Kontrolle) und diabetischen Tieren (grau, Diabetes). B: Amplitude der kleinen Oszillationen bei Kontrolltieren (schwarz, Kontrolle) und diabetischen Tieren (grau, Diabetes). C: Frequenz der großen Oszillationen bei Kontrolltieren (schwarz, Kontrolle) und diabetischen Tieren (grau, Diabetes). D: Frequenz der kleinen Oszillationen bei Kontrolltieren (schwarz, Kontrolle) und diabetischen Tieren (grau, Diabetes).

Zudem wurde die Genexpression der α - und β -Untereinheit des BK-Kanals in den Schwanzgefäßen diabetischer und nicht diabetischer Ratten mittels real time PCR untersucht. Beim Vergleich der beiden Gruppen konnte kein Unterschied in der Genexpression festgestellt werden (Abb. 23, $n = 4$, $p = 0,39$).

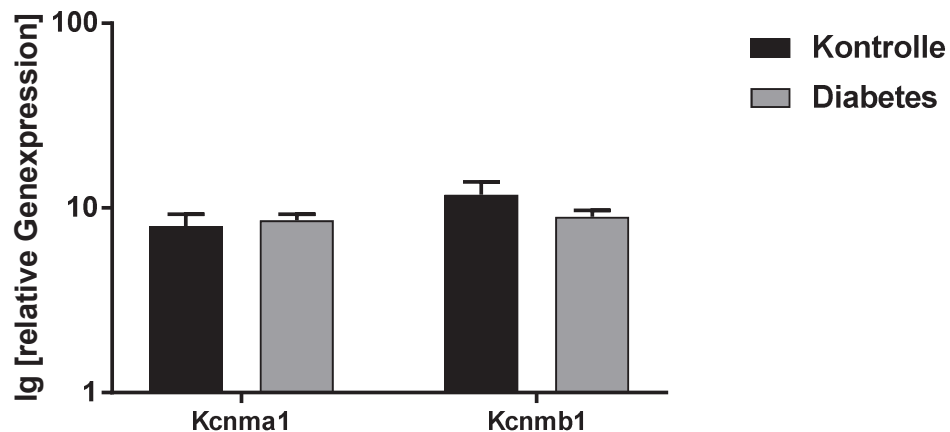


Abb. 23: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der α - und β 1-Untereinheit des BK-Kanals. Real time PCR vom Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

Eine detailliertere Untersuchung der α - und β -Untereinheiten des BK-Kanals fand außerdem mit Hilfe von Micro Fluidic Cards (MFC) statt. Es wurde kein Unterschied in der Genexpression zwischen diabetischen Gefäßen im Vergleich zu Kontrollgefäßen gefunden (Abb. 24, $n = 4$, $p = 0,47$).

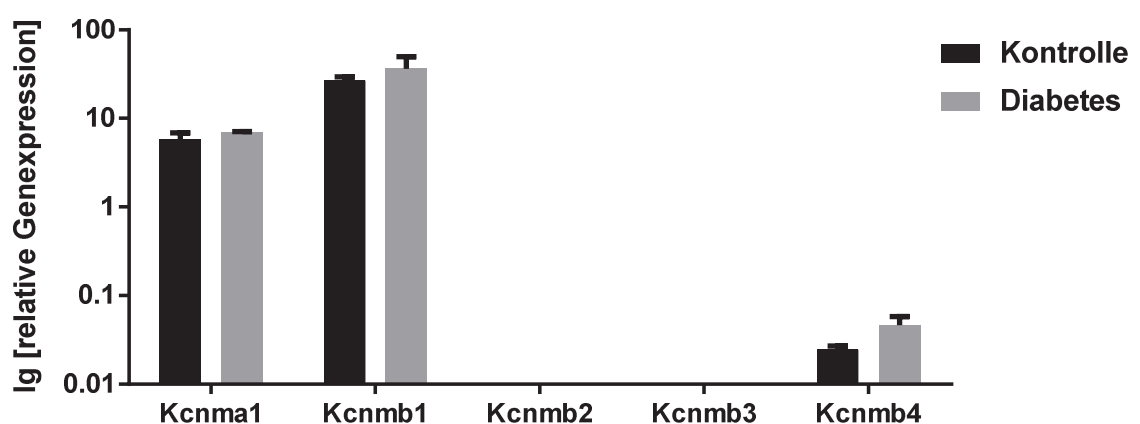


Abb. 24: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der α - und β -Untereinheiten des BK-Kanals. MFC-Analyse im Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

3.2 Der Einfluss von Calciumtransportprozessen auf die Schutzfunktion des BK-Kanals gegen phasische Kontraktionen glatter Muskelzellen

In Kapitel 3.1 wurden Oszillationen der Kontraktionskraft detailliert beschrieben, die durch den BK-Kanal-Inhibitor IBTX ausgelöst wurden. Das bedeutet, dass der BK-Kanal eine Schutzfunktion gegen phasische Kontraktionen hat. Es sollten nun die Mechanismen gefunden werden, die den BK-Kanal aktivieren, damit er diese Funktion ausfüllen kann. Dabei sollten sowohl Calciumtransportprozessen des sarkoplasmatischen Retikulums als auch der Zellmembran untersucht werden.

3.2.1 Die Rolle von Calciumtransportprozessen der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums

Um die Rolle von Calciumtransportprozessen der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss des IP₃-Rezeptors untersucht. Dazu wurde 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) verwendet, ein Blocker des IP₃-Rezeptors (Peppiatt, Collins et al. 2003).

In Gegenwart von 10⁻⁵ M 2-APB war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 25B; n = 6; p < 0,001), d.h. 2-APB zeigte einen antikontraktilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2-APB und IBTX kam es weiterhin zum Auftreten phasischer Kontraktionen (Abb. 25A). Für den antikontraktilen Effekt von 2-APB konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 25C; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -4,98 bis 18,64). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktilen Effekts des BK-Kanals durch 10⁻⁵ M 2-APB beobachtet (Abb. 25D; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -20,23 bis 6,57).

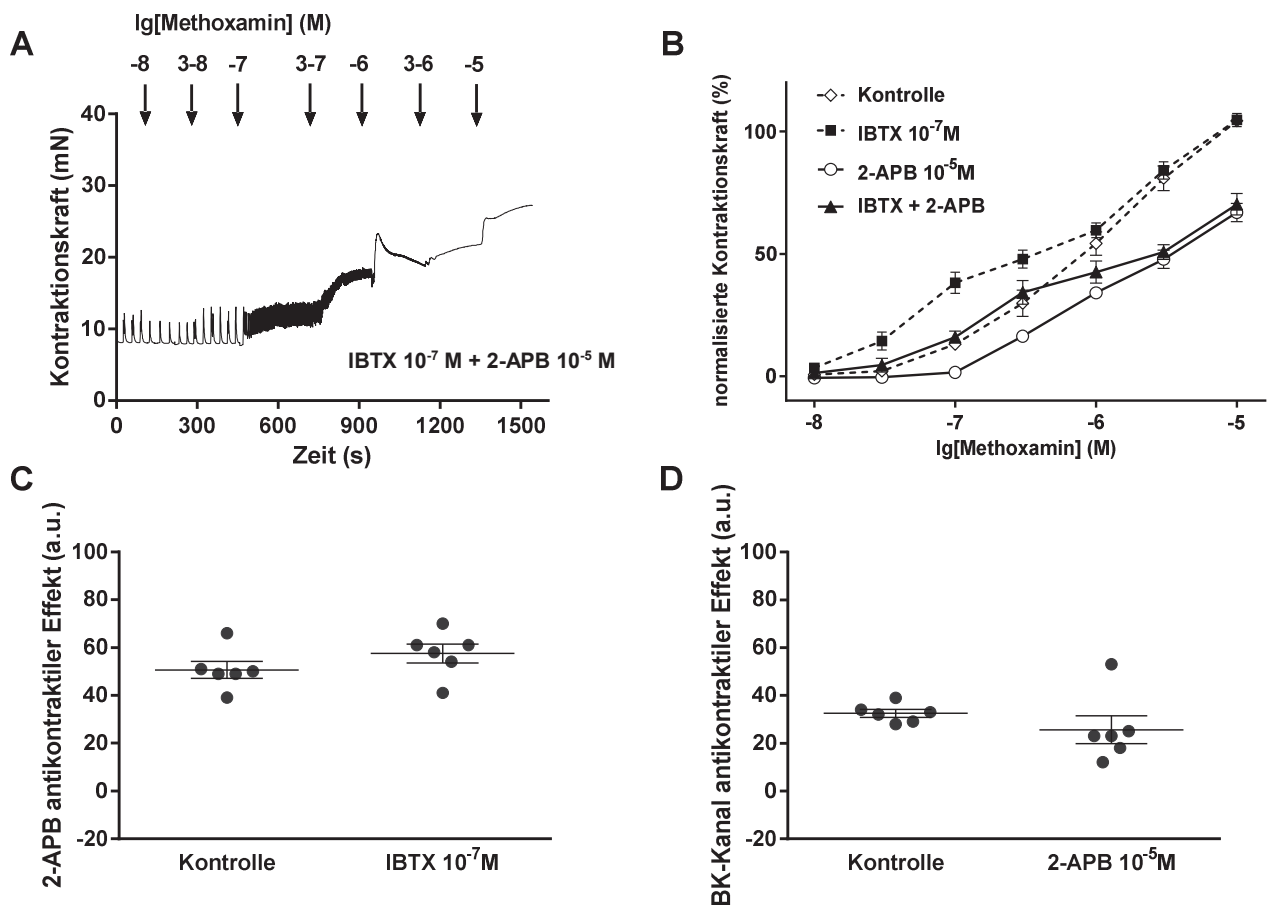


Abb. 25: Wirkung von 2-APB 10^{-5} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und 2-APB. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von 2-APB (Kreis offen, 2-APB 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und 2-APB (Dreieck geschlossen, IBTX + 2-APB). C: Antikontractiler Effekt von 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 2-APB (2-APB 10^{-5} M).

Um den konzentrationsabhängigen Effekt von 2-APB zu untersuchen, wurde eine zweite Versuchsserie mit einer höheren 2-APB-Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M durchgeführt. In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-5}$ M 2-APB war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt

(Abb. 26B; $n = 8$; $p < 0,001$), d.h. 2-APB zeigte einen antikontraktile Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2-APB und IBTX kam es weiterhin zum Auftreten phasischer Kontraktionen (Abb. 26A). Der antikontraktile Effekt von 2-APB war in Gegenwart von IBTX verstärkt (Abb. 26C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz 17,41 bis 47,84). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-5}$ M 2-APB abgeschwächt (Abb. 26D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -41,51 bis -23,74).

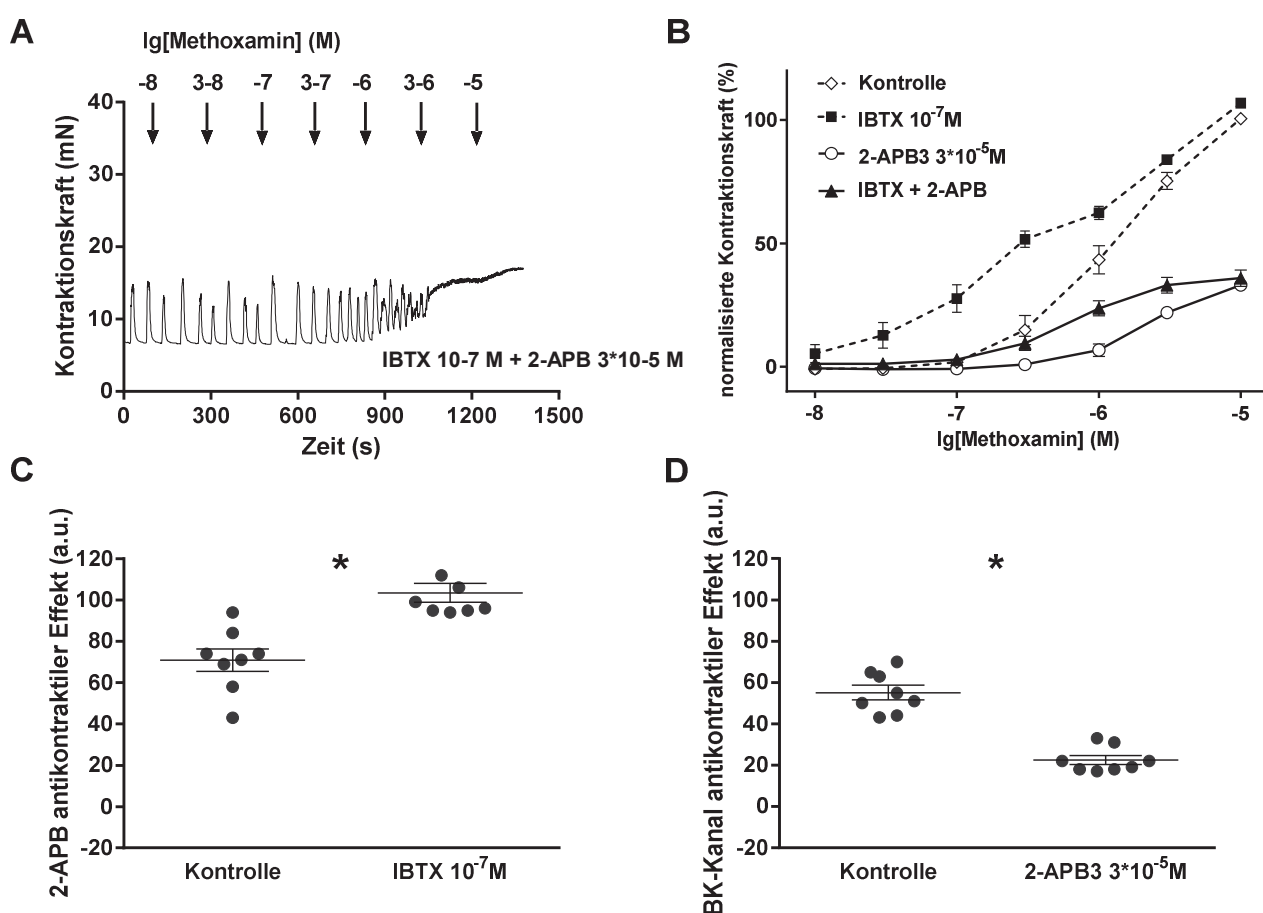


Abb. 26: Wirkung von 2-APB $3 \cdot 10^{-5}$ M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und 2-APB. **B:** Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von 2-APB (Kreis offen, 2-APB 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von

Iberiotoxin und 2-APB (Dreieck geschlossen, IBTX + 2-APB). C: Antikontraktiler Effekt von 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von 2-APB (2-APB $3 \cdot 10^{-5}$ M).

Um den Einfluss der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) zu untersuchen, wurde deren Inhibitor Cyclopiazonic acid (CPA) verwendet (Seidler, Jona et al. 1989, Suzuki, Muraki et al. 1992). CPA in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M hatte keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 27B; $n = 5$; $p = 0,67$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von CPA und IBTX kam es weiterhin zum Auftreten phasischer Kontraktionen (Abb. 27A). Für den Effekt von CPA konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 27C; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -11,27 bis 29,27). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-6}$ M CPA abgeschwächt (Abb. 27D; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -34,49 bis -4,181).

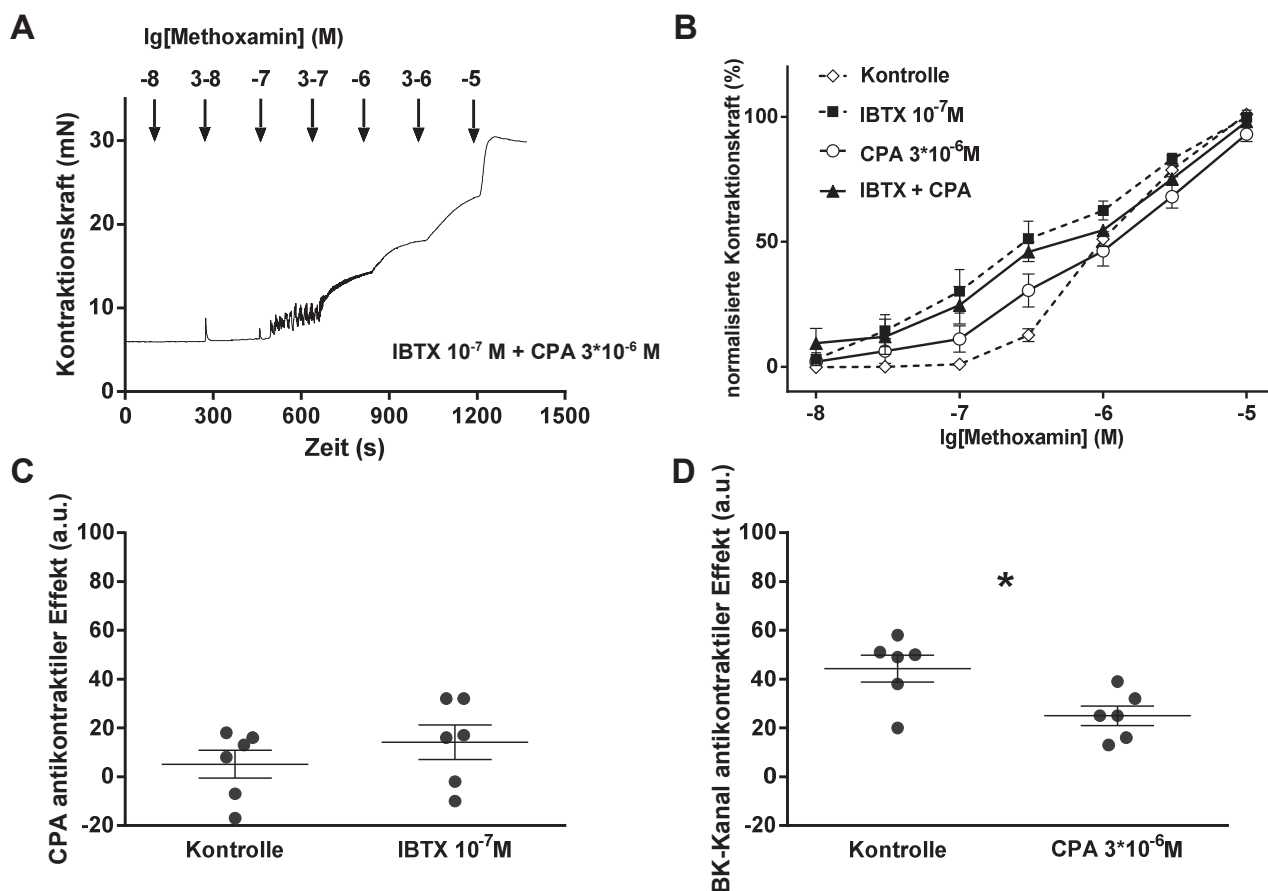


Abb. 27: Wirkung von CPA $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. **A:** Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und CPA. **B:** Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von CPA (Kreis offen, CPA $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und CPA (Dreieck geschlossen, IBTX + CPA). **C:** Antikontractiler Effekt von CPA in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). **D:** Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von CPA (CPA $3 \cdot 10^{-6}$ M).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde CPA in einer Konzentration von 10^{-5} M verwendet. Ein Einfluss von 10^{-5} M CPA auf die MX-induzierte Kontraktion konnte nicht beobachtet werden (Abb. 28B; n = 6; p = 0,62). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von CPA und IBTX wurden keine phasischen Kontraktionen mehr beobachtet (Abb. 28A). Der Effekt von

CPA trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 28C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 15,75 bis 35,92). Der antikonstraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-5} M CPA aufgehoben (Abb. 28D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -35,99 bis -15,68).

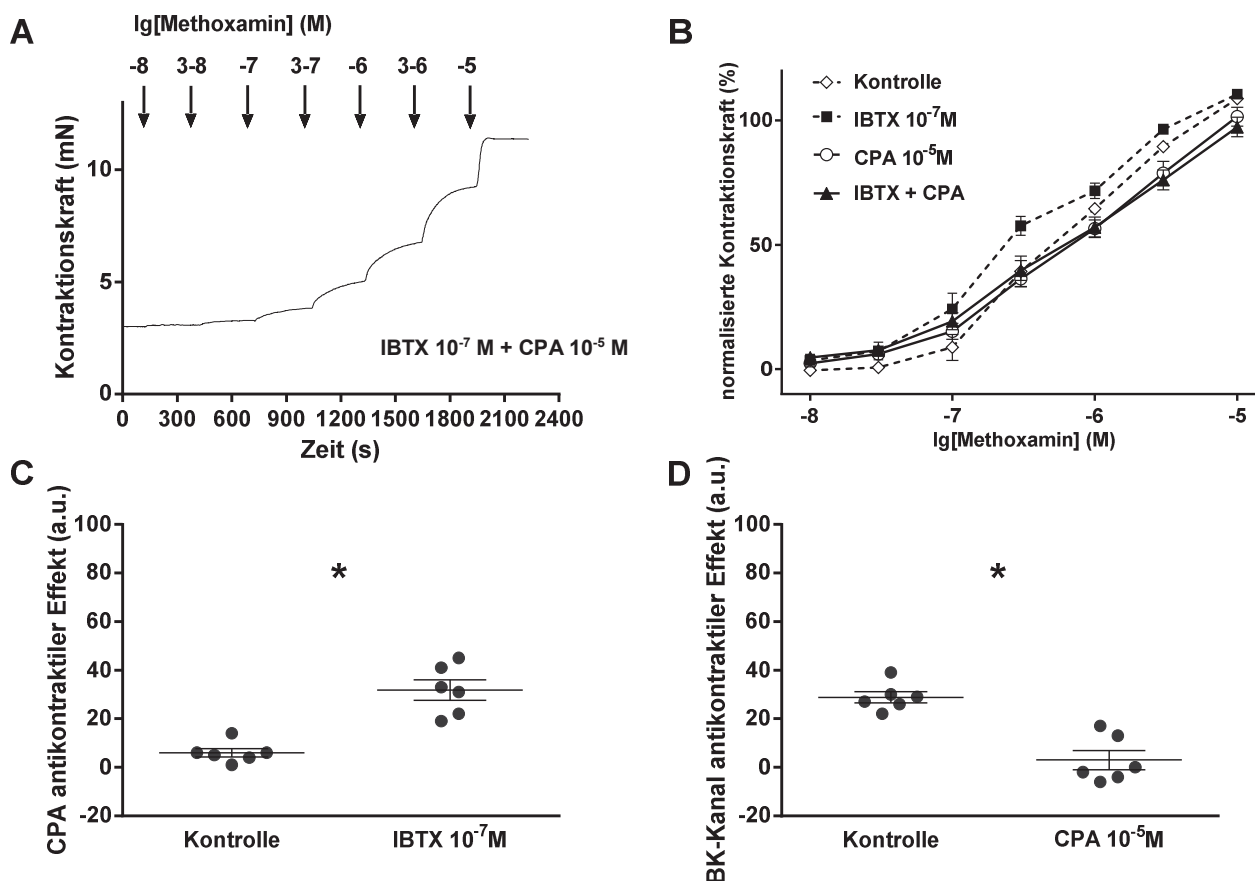


Abb. 28: Wirkung von CPA 10^{-5} M auf den antikonstraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und CPA. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, $IBTX\ 10^{-7}\ M$), in Gegenwart von CPA (Kreis offen, $CPA\ 10^{-5}\ M$) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und CPA (Dreieck geschlossen, $IBTX + CPA$). C: Antikonstraktiler Effekt von CPA in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin ($IBTX\ 10^{-7}\ M$). D: Antikonstraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von CPA ($CPA\ 10^{-5}\ M$).

Als dritter Mechanismus, der die intrazelluläre Calciumkonzentration über das sarkoplasmatische Retikulum steuert, wurde der Ryanodin-Rezeptor untersucht. Dies erfolgte mittels Ryanodin in einer Konzentration, in der diese Substanz eine Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren bewirkt (Lanner, Georgiou et al. 2010). Die MX-induzierte Kontraktion wurde von $3 \cdot 10^{-6}$ M Ryanodin nicht beeinflusst (Abb. 29B; $n = 7$; $p = 0,77$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ryanodin und IBTX waren die phasischen Kontraktionen fast vollständig aufgehoben (Abb. 29A). Der Effekt von Ryanodin trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 29C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 16,16 bis 34,12). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M Ryanodin abgeschwächt (Abb. 29D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -32,61 bis -17,68).

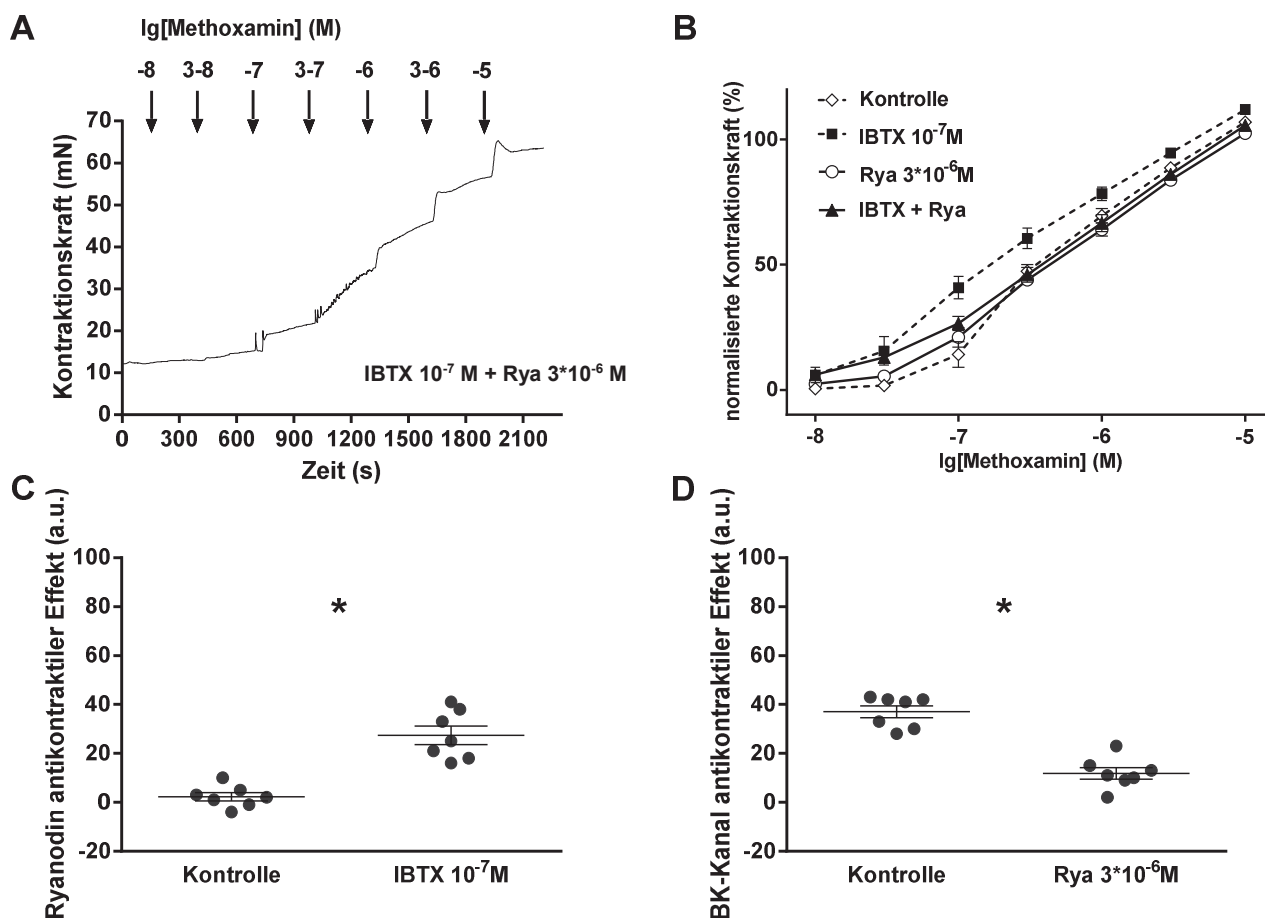


Abb. 29: Wirkung von Ryanodin $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ryanodin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ryanodin (Kreis offen, Rya $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ryanodin (Dreieck geschlossen, IBTX + Rya). C: Antikontraktiler Effekt von Ryanodin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ryanodin (Rya $3 \cdot 10^{-6}$ M).

In Gegenwart einer höheren Konzentration von Ryanodin, 10^{-5} M, war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 30B; $n = 9$; $p = 0,03$), d.h. Ryanodin zeigte in dieser Konzentration einen antikontraktilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ryanodin und IBTX waren die phasischen Kontraktionen vollständig aufgehoben (Abb. 30A). Der antikontraktile Effekt von Ryanodin wurde durch IBTX verstärkt (Abb. 30C; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 28,42 bis 56,02). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-5} M Ryanodin aufgehoben (Abb. 30D; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -52,43 bis -32,02).

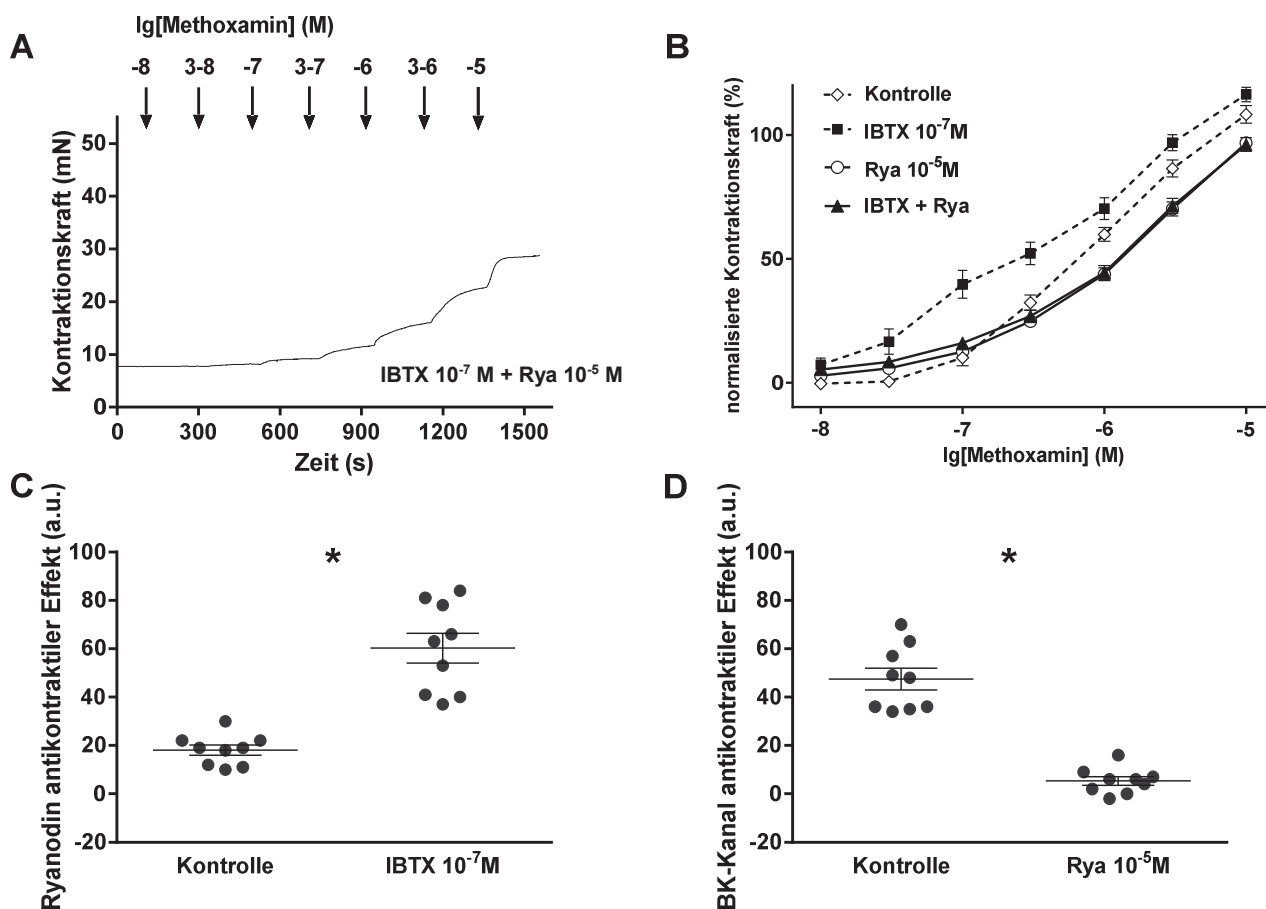


Abb. 30: Wirkung von Ryanodin 10^{-5} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und Ryanodin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberitoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ryanodin (Kreis offen, Rya 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und Ryanodin (Dreieck geschlossen, IBTX + Rya). C: Antikontractiler Effekt von Ryanodin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberitoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ryanodin (Rya 10^{-5} M).

3.2.2 Die Rolle von Calciumtransportprozessen der Zellmembran

Neben der Freisetzung von Calciumionen aus dem SR sowie deren Rücktransport in das SR wird die intrazelluläre Calciumkonzentration durch den Ein- und Ausstrom von Calciumionen über die Plasmamembran gesteuert.

Der Einfluss der Natrium-Kalium-ATPase wurde mit Hilfe des Blockers Ouabain untersucht (Dostanic, Paul et al. 2005). In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M Ouabain war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 31B; $n = 6$; $p = 0,57$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ouabain und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 31A). Der Effekt von Ouabain trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 31C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 41,91 bis 86,76). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M Ouabain abgeschwächt (Abb. 31D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -89,75 bis -38,91).

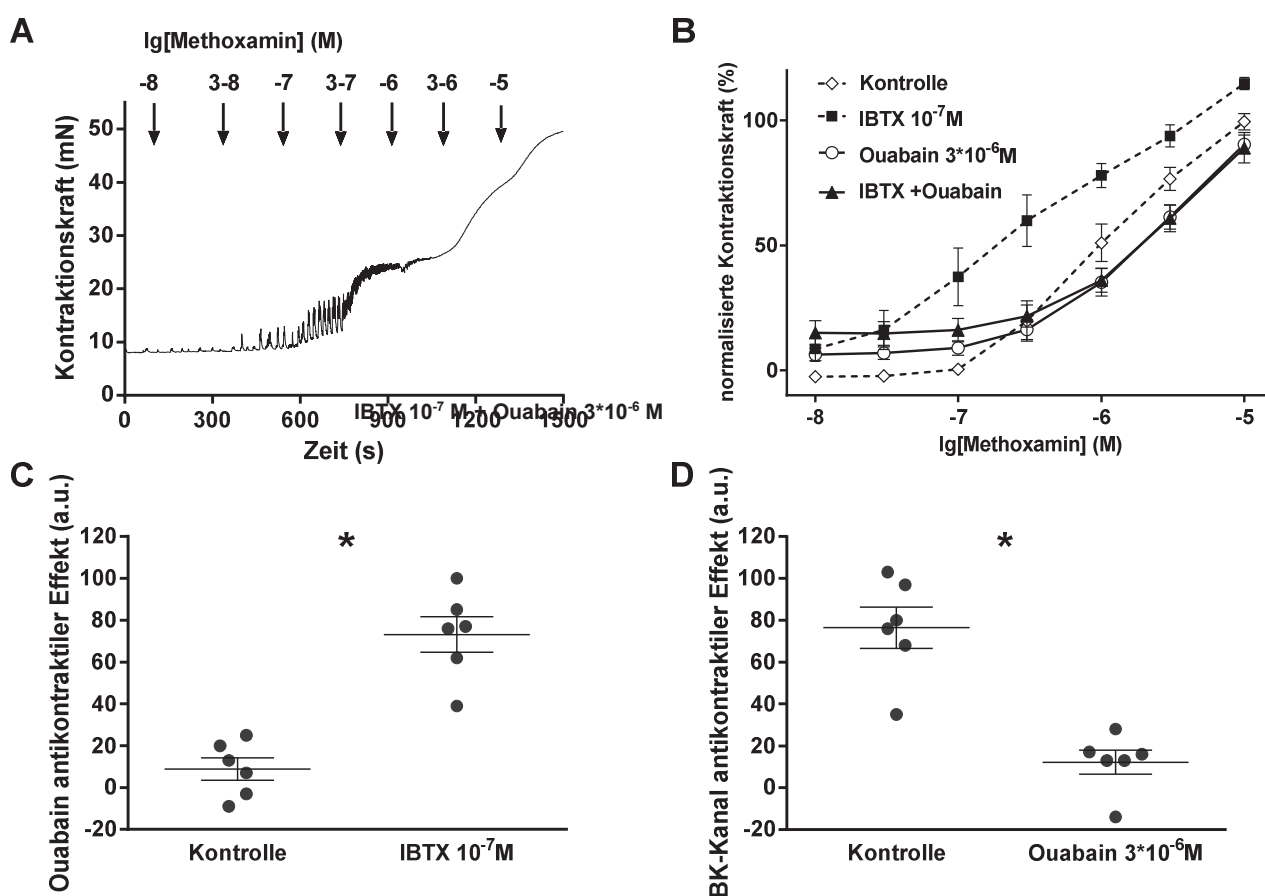


Abb. 31: Wirkung von Ouabain $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ouabain (Kreis offen, Ouabain $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain (Dreieck geschlossen, IBTX + Ouabain). C: Antikontraktiler Effekt von Ouabain in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ouabain (Ouabain $3 \cdot 10^{-6}$ M).

In Gegenwart von Ouabain in einer Konzentration von 10^{-5} M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 32B; $n = 7$; $p = 0,18$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ouabain und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 32A). Der Effekt von Ouabain trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 32C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 38,21 bis 76,79). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von 10^{-5} M Ouabain aufgehoben (Abb. 32D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -78,15 bis -36,85).

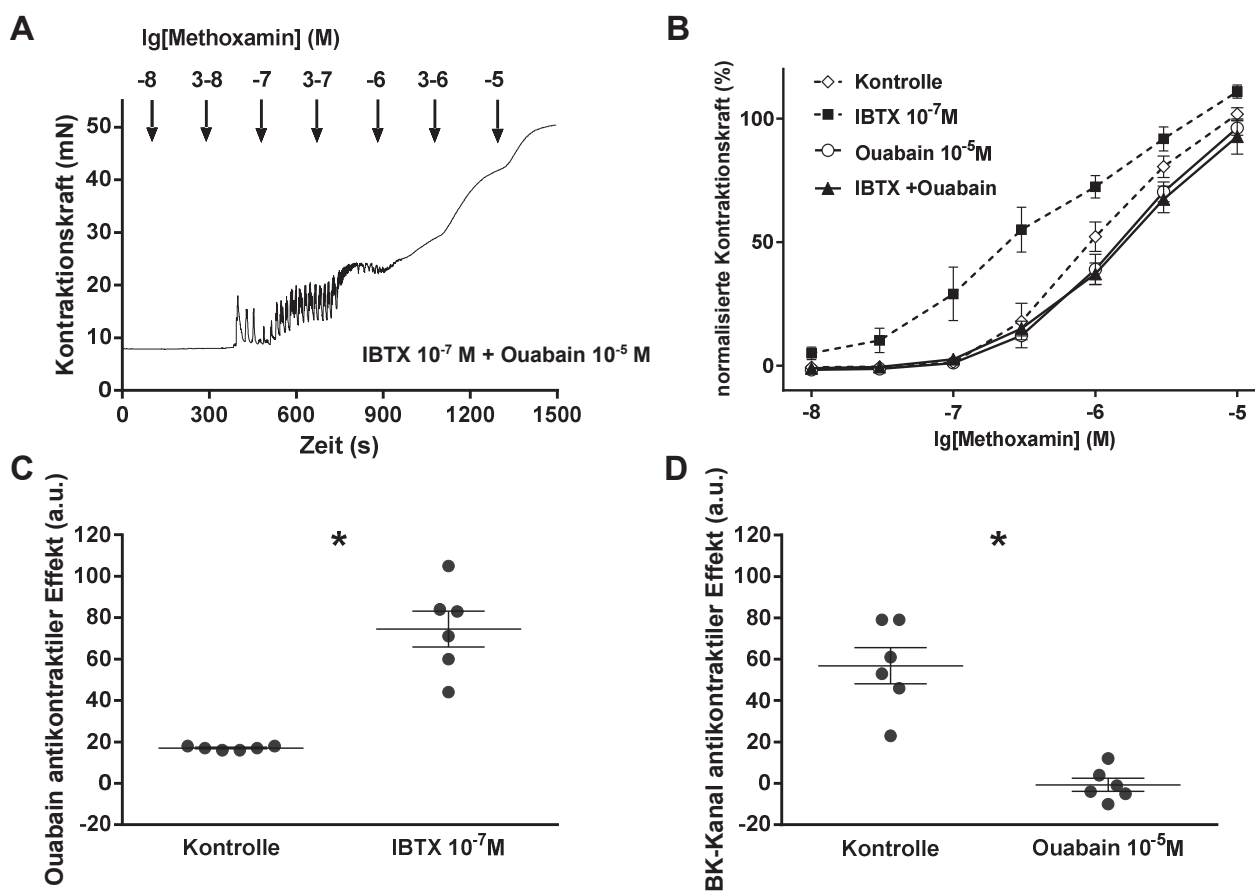


Abb. 32: Wirkung von Ouabain 10^{-5} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ouabain (Kreis offen, Ouabain 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain (Dreieck geschlossen, IBTX + Ouabain). C: Antikontractiler Effekt von Ouabain in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ouabain (Ouabain 10^{-5} M).

Auch in Gegenwart von 10^{-4} M Ouabain war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 33B; $n = 6$; $p = 0,93$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ouabain und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 33A). Der

Effekt von Ouabain trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 33C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 27,16 bis 71,84). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von 10^{-4} M Ouabain abgeschwächt (Abb. 33D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -73,24 bis -25,76).

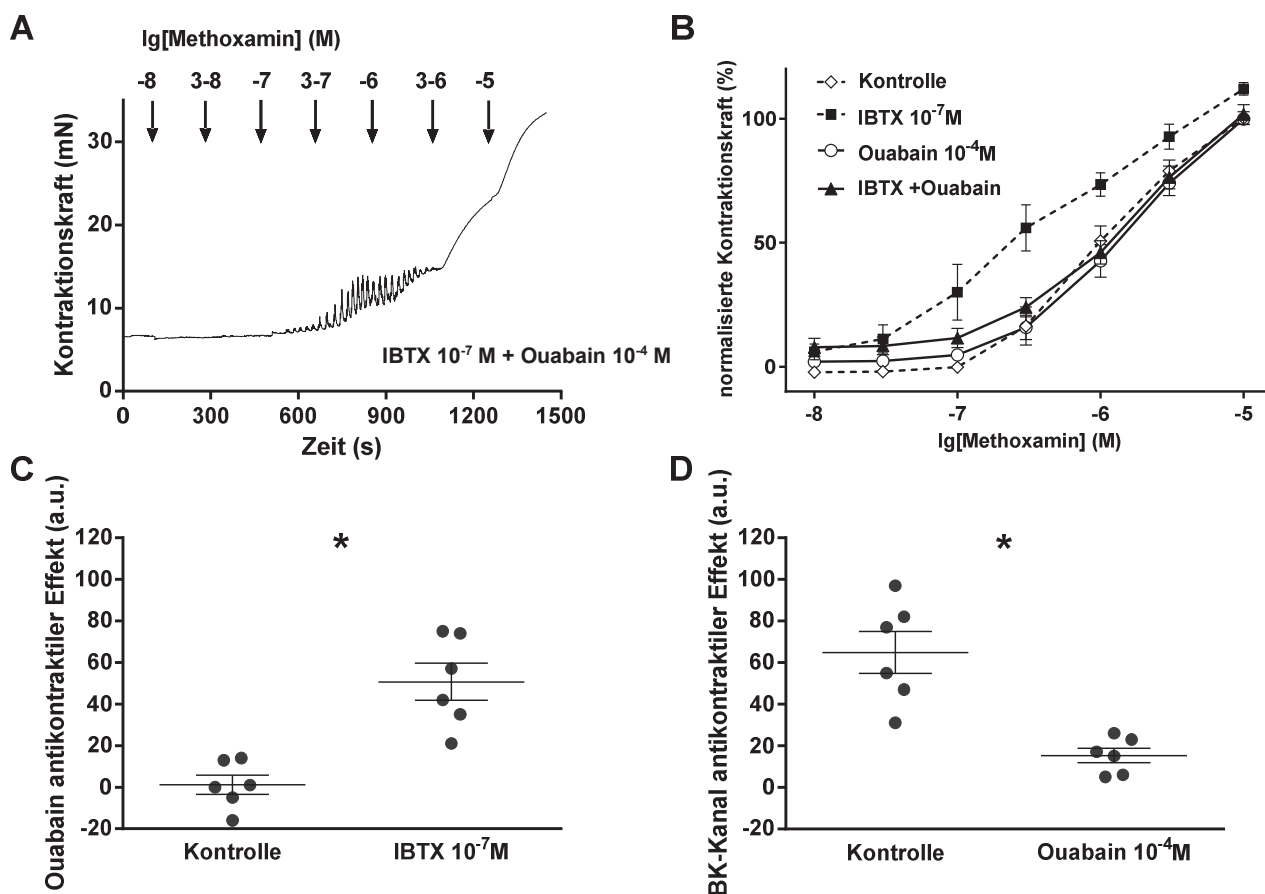


Abb. 33: Wirkung von Ouabain 10^{-4} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ouabain (Kreis offen, Ouabain 10^{-4} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain (Dreieck geschlossen, IBTX + Ouabain). C: Antikontractiler Effekt von Ouabain in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ouabain (Ouabain 10^{-4} M).

In Gegenwart von Ouabain in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 34B; $n = 6$; $p = 0,83$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ouabain und IBTX waren die phasischen Kontraktionen vermindert (Abb. 34A). Für den Effekt von Ouabain konnte keine Beeinflussung durch IBTX festgestellt werden (Abb. 34C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -11,51 bis 16,18). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktiven Effekts des BK-Kanals durch $3 \cdot 10^{-4}$ M Ouabain beobachtet (Abb. 34D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -28,09 bis 23,42).

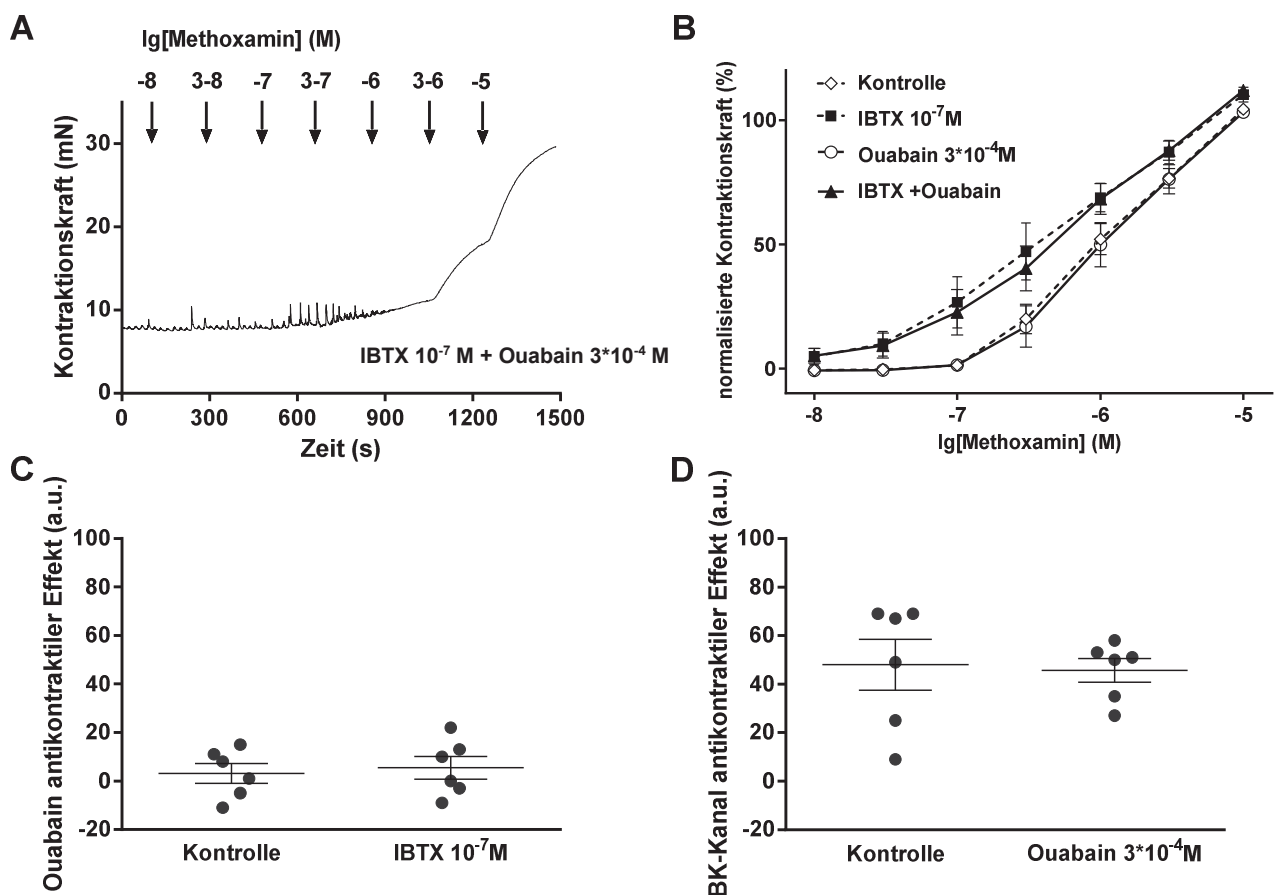


Abb. 34: Wirkung von Ouabain $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikontraktiven Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Ouabain. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Ouabain (Kreis offen, Ouabain $3 \cdot 10^{-4}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von

Iberitoxin und Ouabain (Dreieck geschlossen, IBTX + Ouabain). C: Antikontraktiler Effekt von Ouabain in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberitoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Ouabain (Ouabain $3 \cdot 10^{-4}$ M).

Der Einfluss des Natrium-Calcium-Austauschers wurde mit Hilfe des Blockers KB-R7943 untersucht, welcher vor allem den „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers, also den Ausstrom von Natrium- und den Einstrom von Calciumionen, inhibiert (Iwamoto, Watano et al. 1996). Bei einer Konzentration von 10^{-6} M war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 35B; $n = 8$; $p = 0,10$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von KB-R7943 und IBTX leicht verstärkt (Abb. 35A). Für den Effekt von KB-R7943 konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 35C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -15,61 bis 18,61). Auch für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch 10^{-6} M KB-R7943 gefunden werden (Abb. 35D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -13,6 bis 16,6).

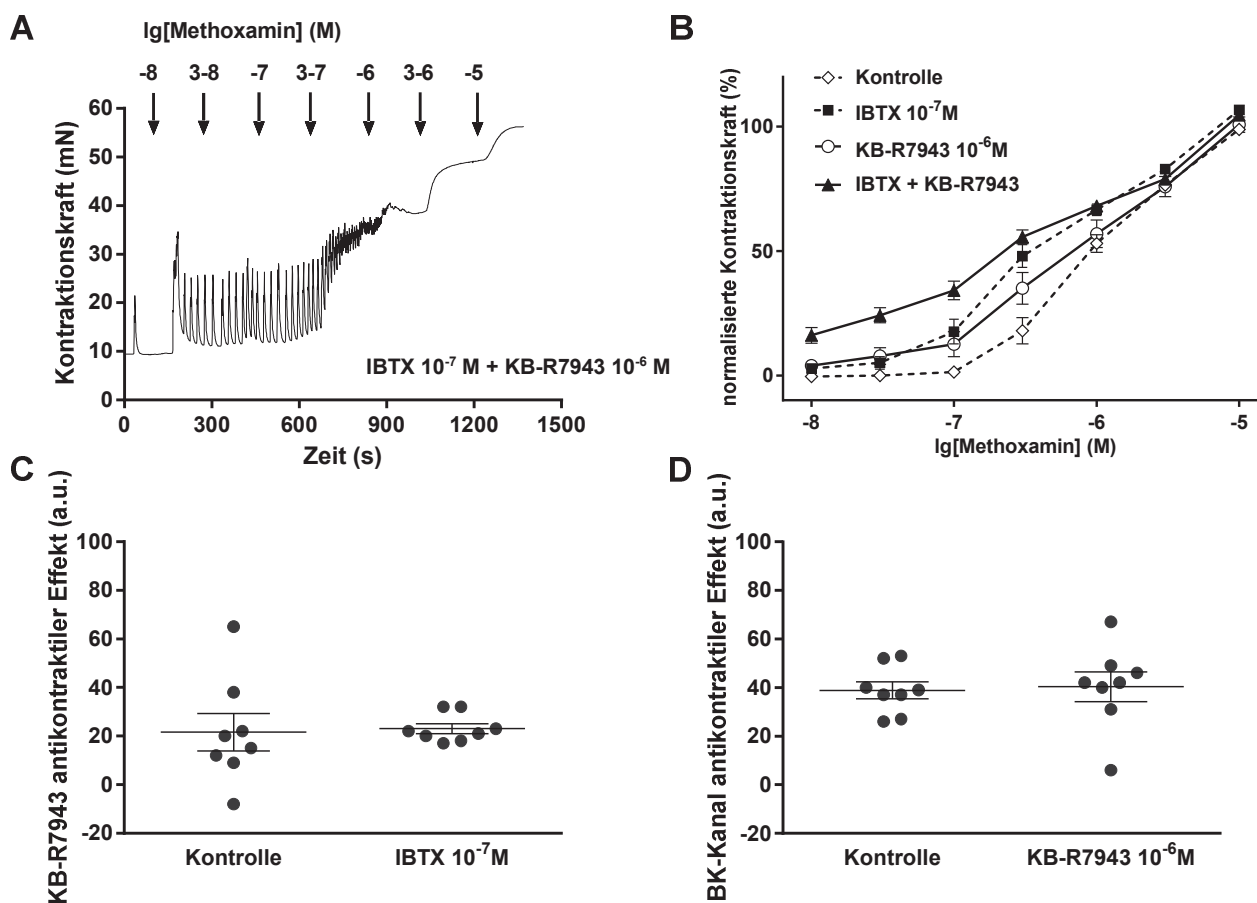


Abb. 35: Wirkung von KB-R7943 10^{-6} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und KB-R7943. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von KB-R7943 (Kreis offen, KB-R7943 10^{-6} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und KB-R7943 (Dreieck geschlossen, IBTX + KB-R7943). C: Antikontractiler Effekt von KB-R7943 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von KB-R7943 (KB-R7943 10^{-6} M).

In Gegenwart von KB-R7943 in einer höheren Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M war die MX-induzierte Kontraktion verstärkt (Abb. 36B; $n = 8$; $p < 0,001$), KB-R7943 zeigte in dieser Konzentration also einen kontraktilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von

KB-R7943 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen verstärkt (Abb. 36A). Der kontraktile Effekt von KB-R7943 wurde nicht durch IBTX beeinflusst (Abb. 36C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -16,81 bis 14,56). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-6}$ M KB-R7943 nicht beeinflusst (Abb. 36D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -17,94 bis 15,69).

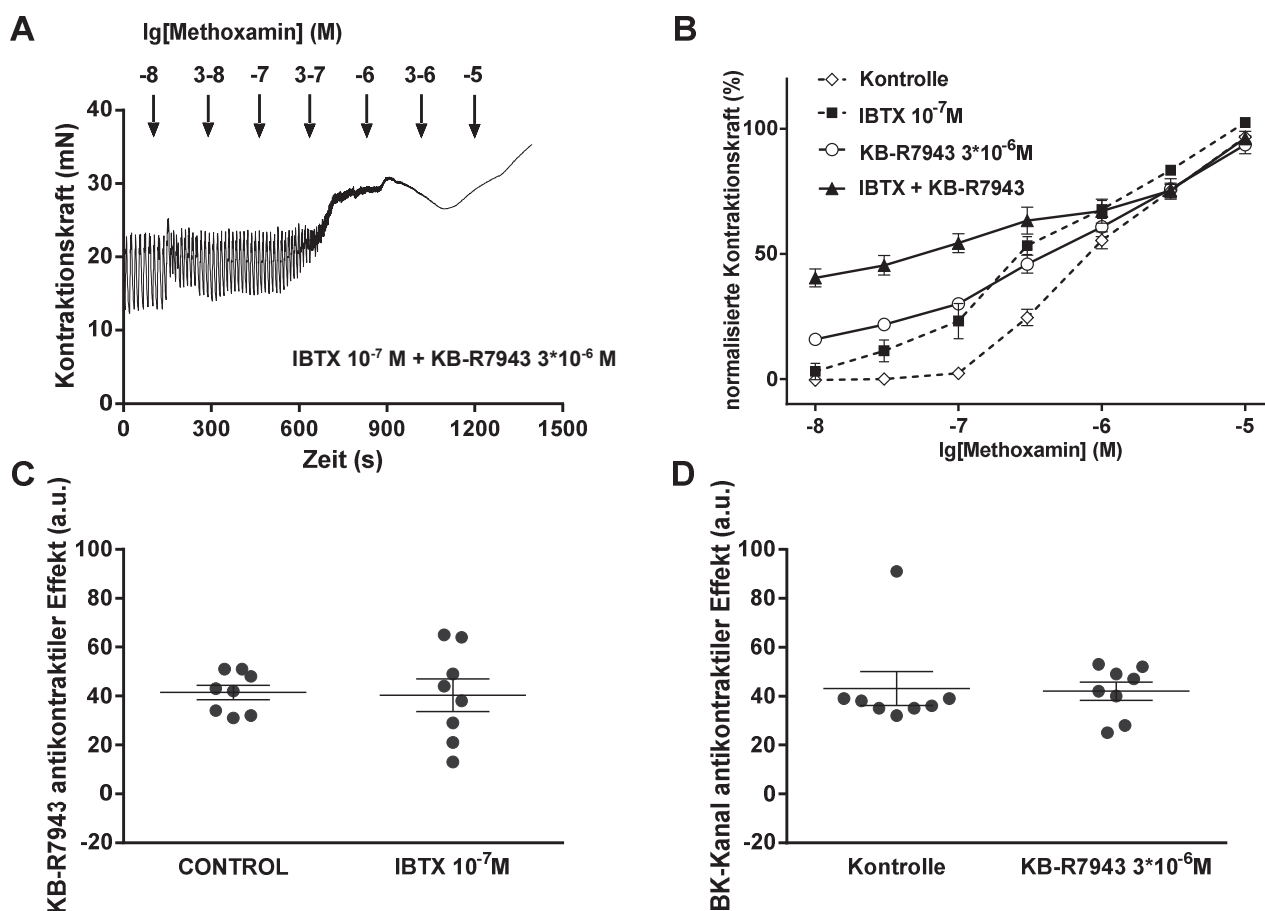


Abb. 36: Wirkung von KB-R7943 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und KB-R7943. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von KB-R7943 (Kreis offen, KB-R7943 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und KB-R7943 (Dreieck geschlossen, IBTX + KB-R7943). C: Antikontraktile Effekt von KB-R7943 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw.

Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von KB-R7943 (KB-R7943 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Um den Einfluss der Calcium-ATPase der Plasmamembran (Plasma Membrane Calcium ATPase, PMCA) zu untersuchen, wurden deren Blocker Caloxin 1b1 und Caloxin 2A1 untersucht (Chaudhary, Walia et al. 2001, Pande, Mallhi et al. 2006).

In Gegenwart von 10^{-4} M Caloxin 1b1 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 37B; $n = 6$; $p = 0,75$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Caloxin 1b1 und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 37A). Der Effekt von Caloxin 1b1 wurde nicht durch IBTX beeinflusst (Abb. 37C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -26,16 bis 17,16). Für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch 10^{-4} M Caloxin 1b1 festgestellt werden (Abb. 37D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -23,91 bis 14,91).

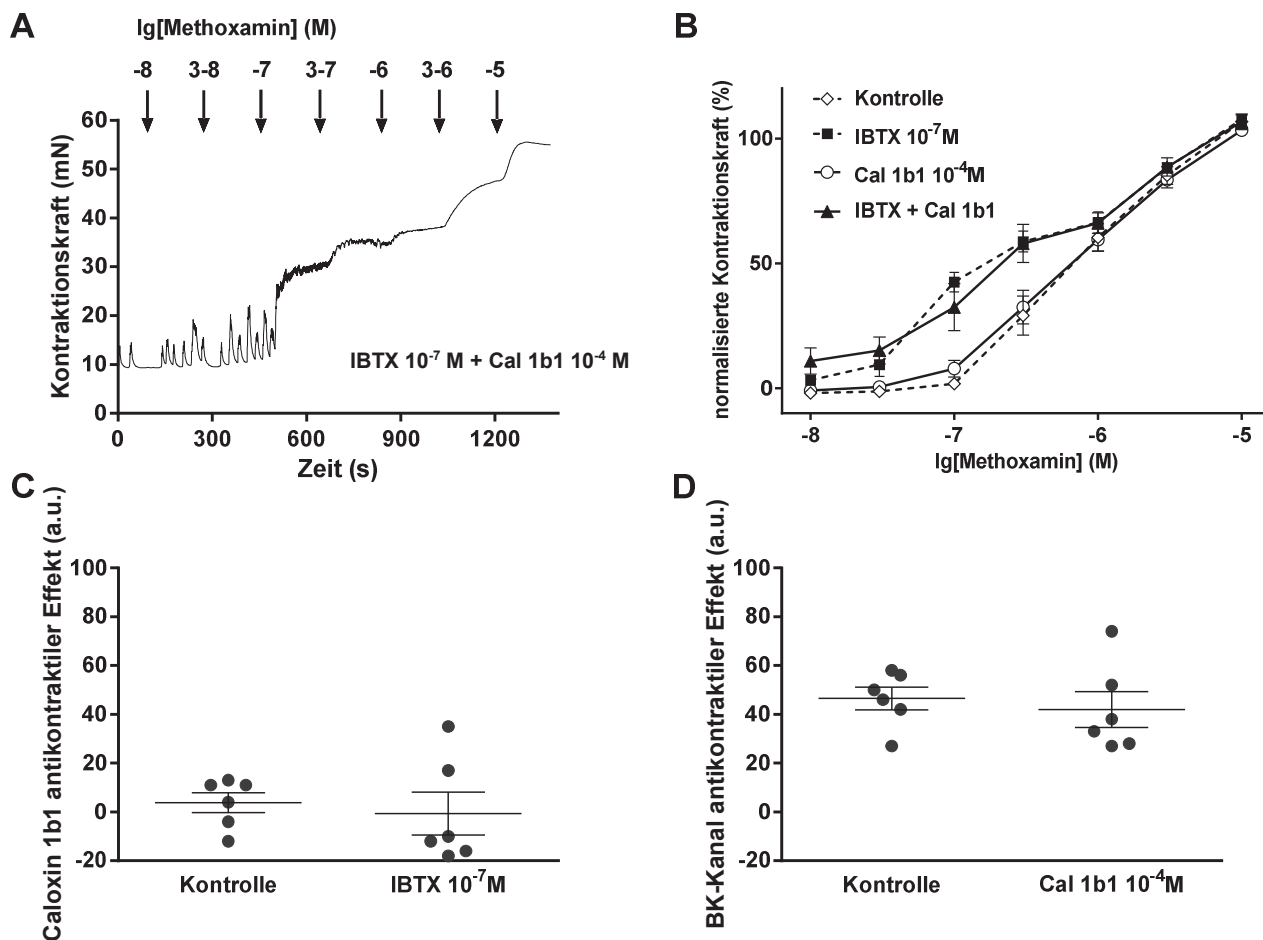


Abb. 37: Wirkung von Caloxin 1b1 10^{-4} M auf den antikonstraktile Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 1b1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Caloxin 1b1 (Kreis offen, Cal 1b1 10^{-4} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 1b1 (Dreieck geschlossen, IBTX + Cal 1b1). C: Antikonstraktile Effekt von Caloxin 1b1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikonstraktile Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Caloxin 1b1 (Cal 1b1 10^{-4} M).

In Gegenwart einer höheren Konzentration von Caloxin 1b1, $3 \cdot 10^{-4}$ M, war die MX-induzierte Kontraktion verstärkt (Abb. 38B; $n = 4$; $p = 0,04$), Caloxin 1b1 zeigte in dieser Konzentration also einen kontraktile Effekt. Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Caloxin 1b1 und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 38A). Der kontraktile Effekt von Caloxin 1b1 wurde nicht durch IBTX beeinflusst (Abb. 38C; $n = 4$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -41,68 bis 13,68). Für den antikrampflichen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch $3 \cdot 10^{-4}$ M Caloxin 1b1 festgestellt werden (Abb. 38D; $n = 4$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -44,62 bis 16,62).

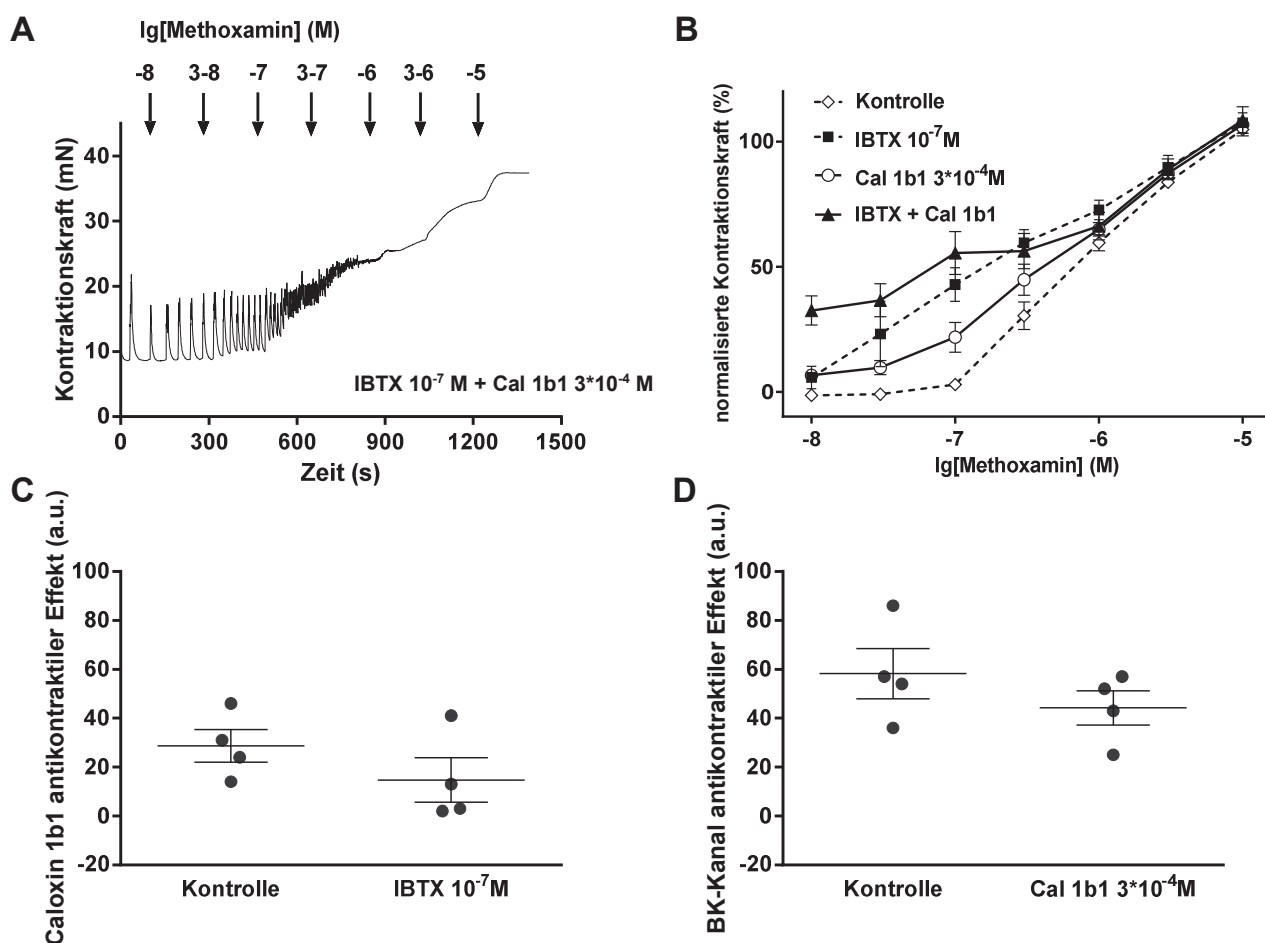


Abb. 38: Wirkung von Caloxin 1b1 $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikrampflichen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 1b1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter

Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Caloxin 1b1 (Kreis offen, Cal 1b1 $3 \cdot 10^{-4}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 1b1 (Dreieck geschlossen, IBTX + Cal 1b1). C: Antikontraktiler Effekt von Caloxin 1b1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Caloxin 1b1 (Cal 1b1 $3 \cdot 10^{-4}$ M).

In Gegenwart von 10^{-4} M Caloxin 2A1 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 39B; $n = 6$; $p = 0,62$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Caloxin 2A1 und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 39A). Der Effekt von Caloxin 2A1 wurde nicht durch IBTX beeinflusst (Abb. 39C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -22,55 bis 10,55). Für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch 10^{-4} M Caloxin 2A1 festgestellt werden (Abb. 39D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -20,38 bis 16,38).

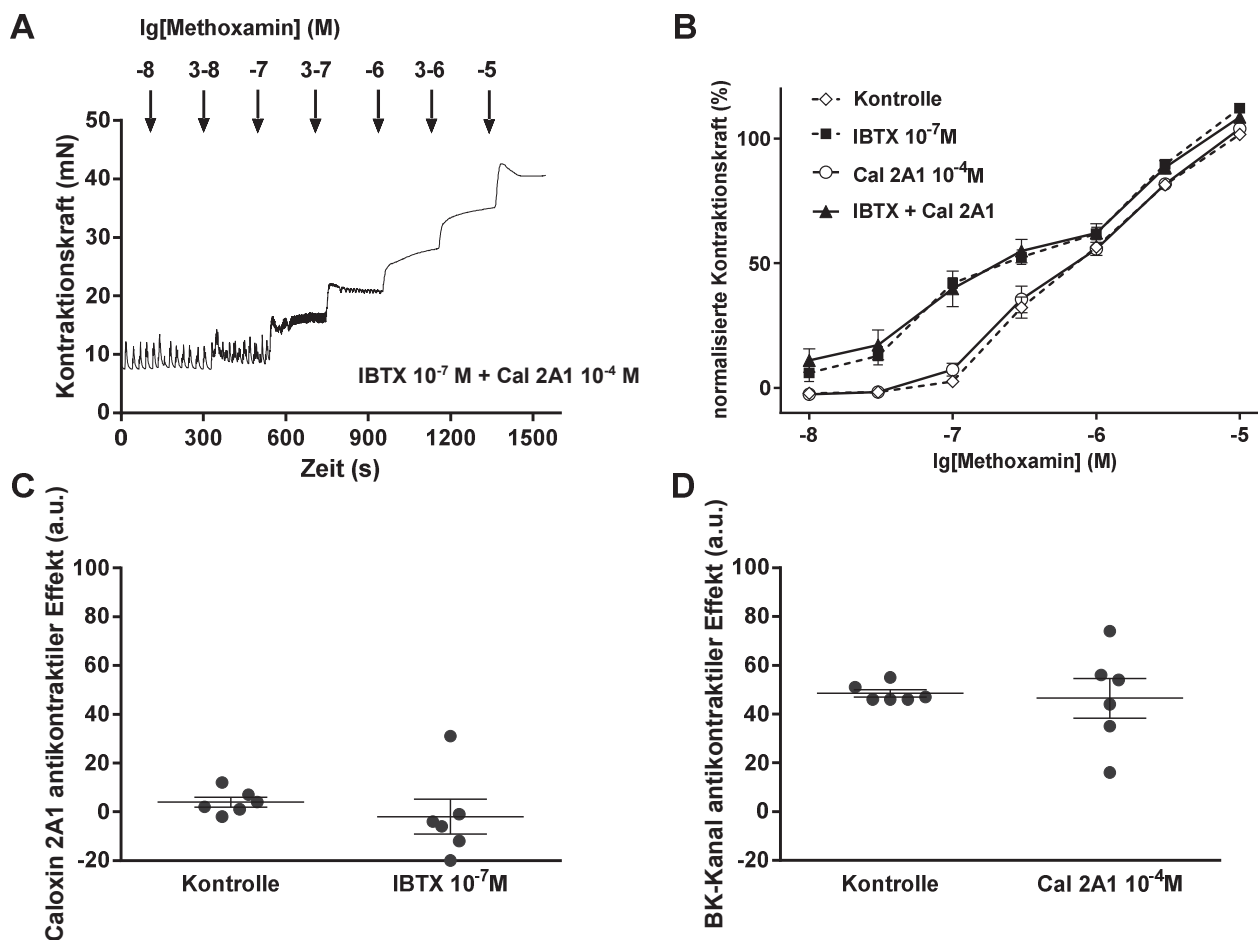


Abb. 39: Wirkung von Caloxin 2A1 10^{-4} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 2A1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Caloxin 2A1 (Kreis offen, Cal 2A1 10^{-4} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 2A1 (Dreieck geschlossen, IBTX + Cal 2A1). C: Antikontractiler Effekt von Caloxin 2A1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Caloxin 2A1 (Cal 2A1 10^{-4} M).

In Gegenwart einer Caloxin 2A1-Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 40B; $n = 7$; $p = 0,47$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Caloxin 2A1 und IBTX

weiterhin vorhanden (Abb. 40A). Der Effekt von Caloxin 2A1 wurde nicht durch IBTX beeinflusst (Abb. 40C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -34,82 bis 16,54). Für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch $3 \cdot 10^{-4}$ M Caloxin 2A1 festgestellt werden (Abb. 40D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -24,22 bis 9,938).

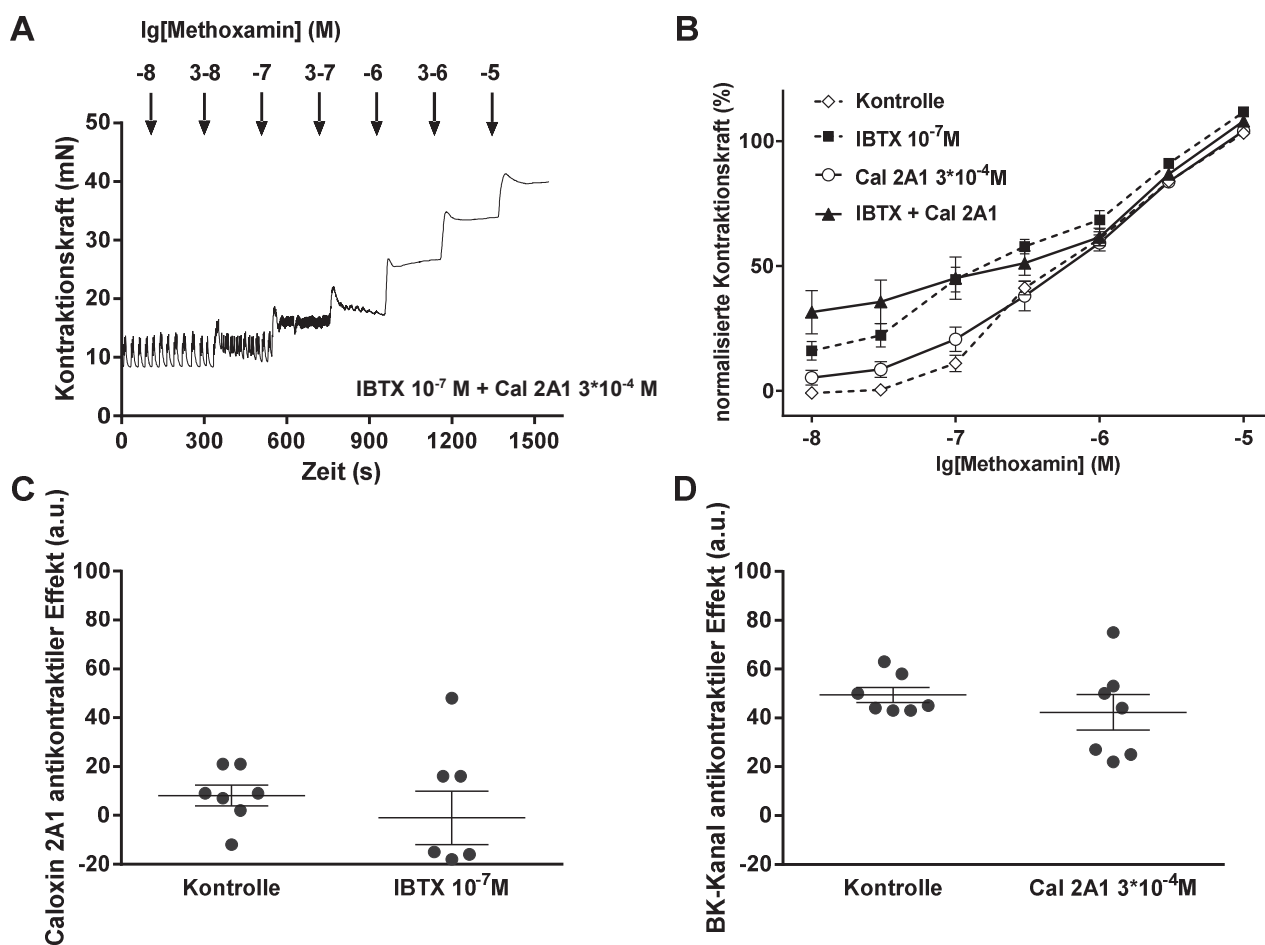


Abb. 40: Wirkung von Caloxin 2A1 $3 \cdot 10^{-4}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 2A1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Caloxin 2A1 (Kreis offen, Cal 2A1 $3 \cdot 10^{-4}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Caloxin 2A1 (Dreieck geschlossen, IBTX +

Cal 2A1). C: Antikontraktile Effekt von Caloxin 2A1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberitoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktile Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Caloxin 2A1 (Cal 2A1 $3 \cdot 10^{-4}$ M).

Die Rolle von L-Typ-Calciumkanälen wurde mit Hilfe des Blockers Nimodipin untersucht (Xu and Lipscombe 2001). $3 \cdot 10^{-11}$ M Nimodipin zeigte keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 41B; $n = 6$; $p = 0,43$). Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nimodipin und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 41A). Der Effekt von Nimodipin trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 41C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 2,567 bis 21,1). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-11}$ M Nimodipin nicht beeinflusst (Abb. 41D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -23,72 bis 0,05587).

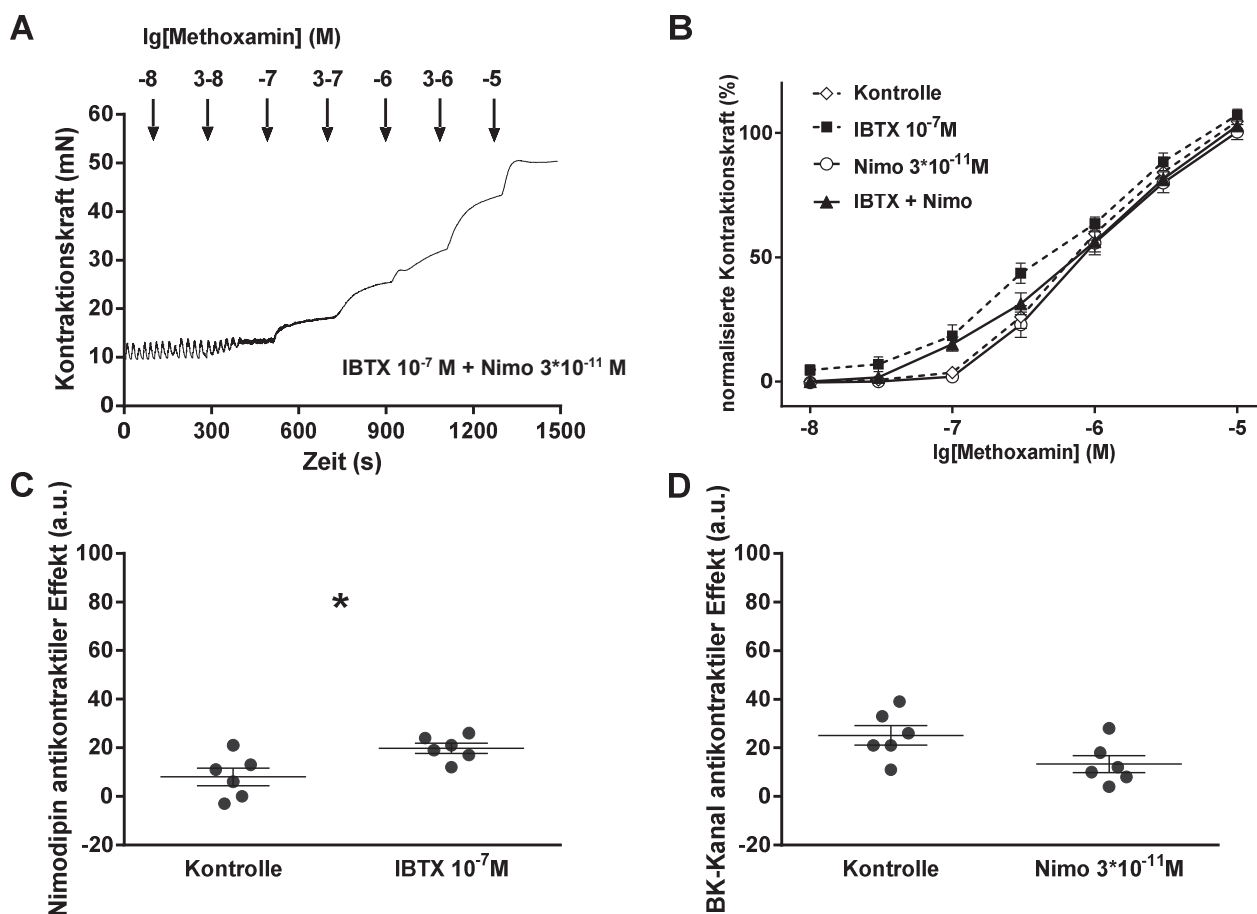


Abb. 41: Wirkung von Nimodipin $3 \cdot 10^{-11}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nimodipin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Nimodipin (Kreis offen, Nimo $3 \cdot 10^{-11}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nimodipin (Dreieck geschlossen, IBTX + Nimo). C: Antikontraktiler Effekt von Nimodipin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Nimodipin (Nimo $3 \cdot 10^{-11}$ M).

In Gegenwart von 10^{-10} M Nimodipin war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 42B; $n = 6$; $p < 0,001$), d.h. Nimodipin zeigte in dieser Konzentration einen antikontraktilen Effekt. Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nimodipin und IBTX vollständig aufgehoben (Abb. 42A). Der antikontraktile Effekt von Nimodipin war in Gegenwart von IBTX verstärkt (Abb. 42C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 35,04 bis 66,96). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals in Gegenwart von 10^{-10} M Nimodipin war aufgehoben (Abb. 42D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -51,28 bis -20,72).

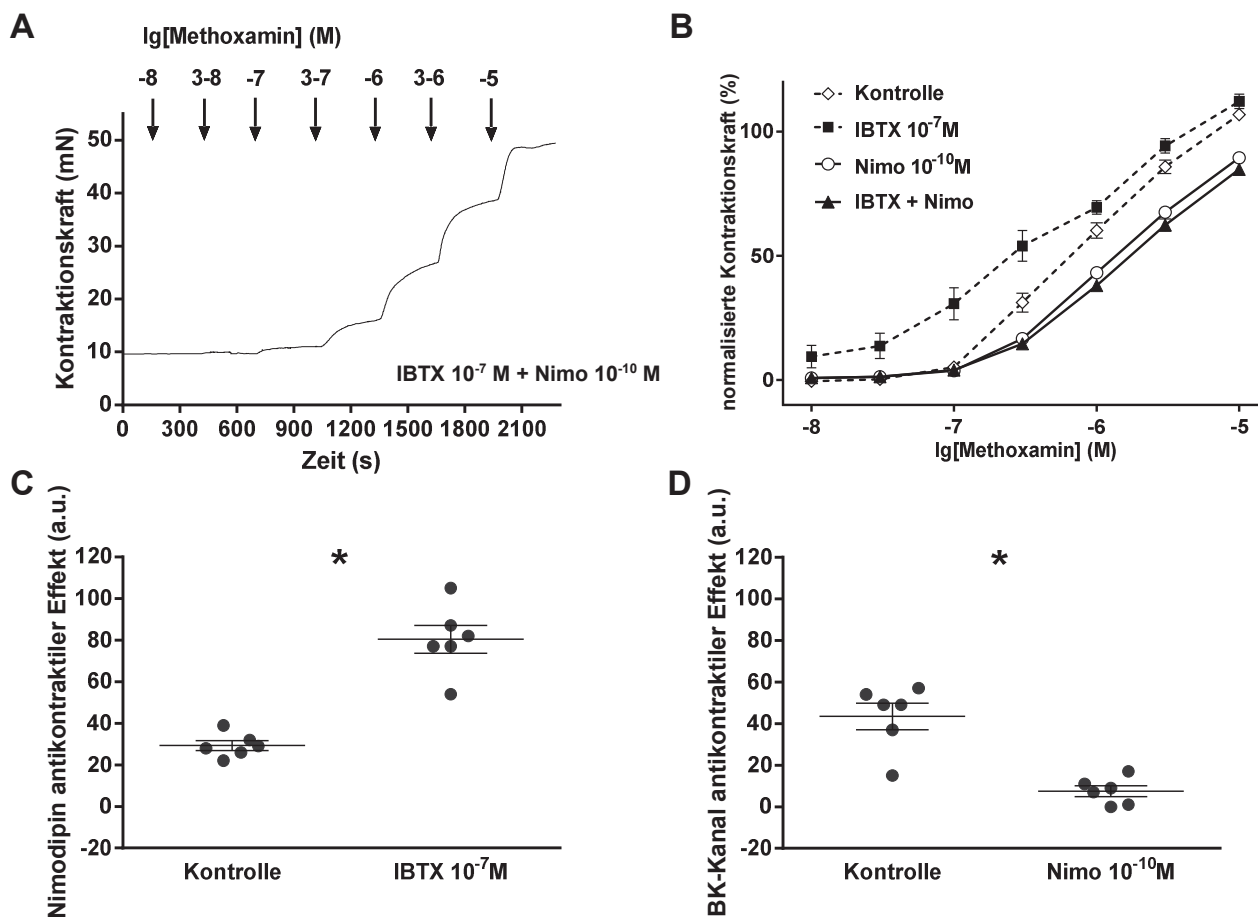


Abb. 42: Wirkung von Nimodipin 10^{-10} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nimodipin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Nimodipin (Kreis offen, Nimo 10^{-10} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nimodipin (Dreieck geschlossen, IBTX + Nimo). C: Antikontractiler Effekt von Nimodipin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Nimodipin (Nimo 10^{-10} M).

Zur Untersuchung von T-Typ-Calciumkanälen wurden die Blocker TTA-A2 (Kraus, Li et al. 2010) und TTA-P2 (Choe, Messinger et al. 2011) sowie Nickelchlorid (Lee, Gomora et al. 1999) verwendet. In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M TTA-A2 war die MX-induzierte

Kontraktion abgeschwächt (Abb. 43B; $n = 7$; $p < 0,001$), TTA-A2 zeigte also einen antikontraktilen Effekt. Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von TTA-A2 und IBTX stark reduziert (Abb. 43A). Der antikontraktile Effekt von TTA-A2 wurde durch IBTX verstärkt (Abb. 43C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 9,998 bis 24). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-6}$ M TTA-A2 abgeschwächt (Abb. 43D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -26,3 bis -7,699).

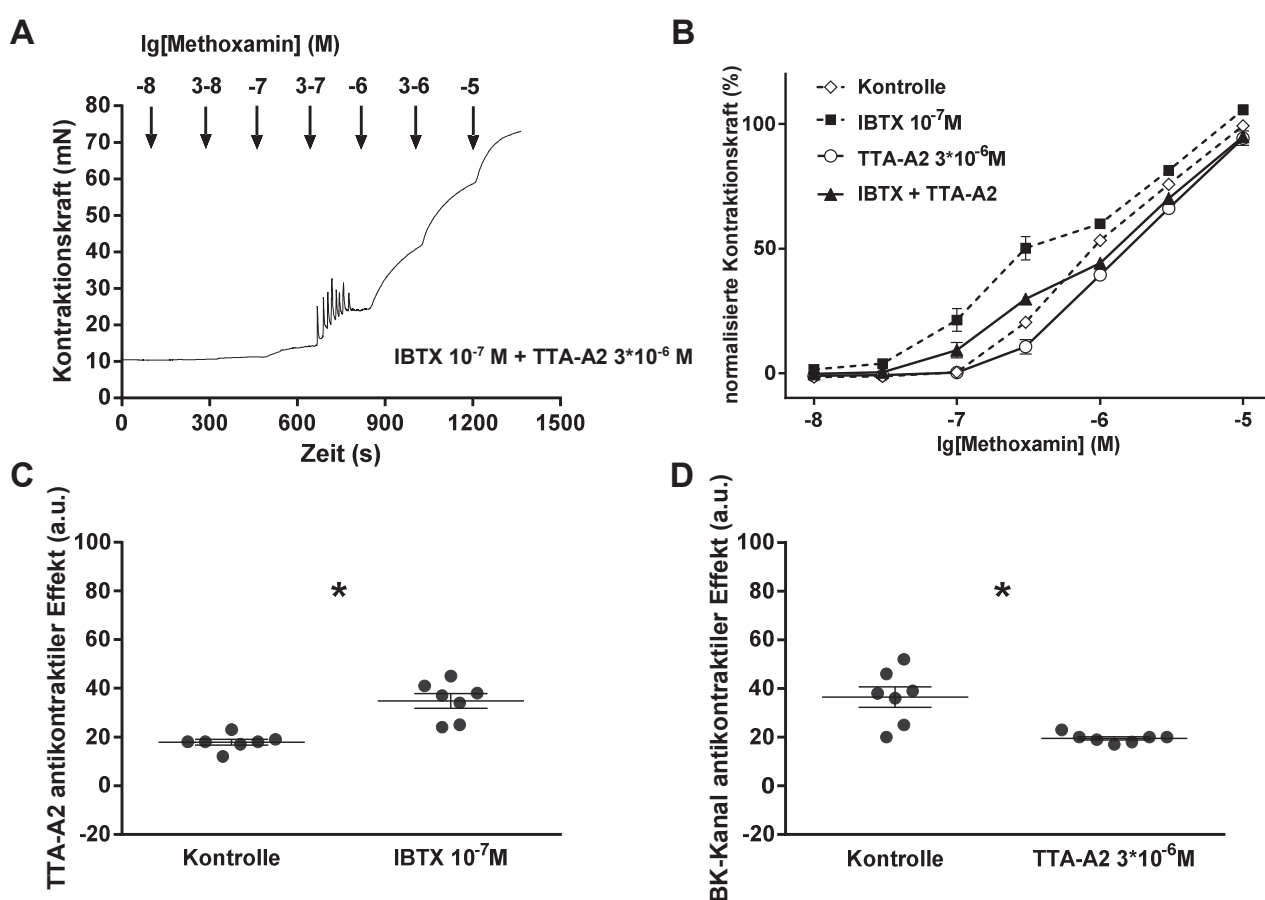


Abb. 43: Wirkung von TTA-A2 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-A2. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von TTA-A2 (Kreis offen, TTA-A2 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit

von Iberiotoxin und TTA-A2 (Dreieck geschlossen, IBTX + TTA-A2). C: Antikontraktiler Effekt von TTA-A2 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von TTA-A2 (TTA-A2 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Bei einer TTA-A2-Konzentration von 10^{-5} M war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 44B; $n = 7$; $p < 0,001$), TTA-A2 zeigte also einen antikontraktilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von TTA-A2 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen vollständig aufgehoben (Abb. 44A). Der antikontraktile Effekt von TTA-A2 wurde durch IBTX verstärkt (Abb. 44C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 23,85 bis 40,43) Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart 10^{-5} M TTA-A2 aufgehoben (Abb. 44D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -41,49 bis -22,79).

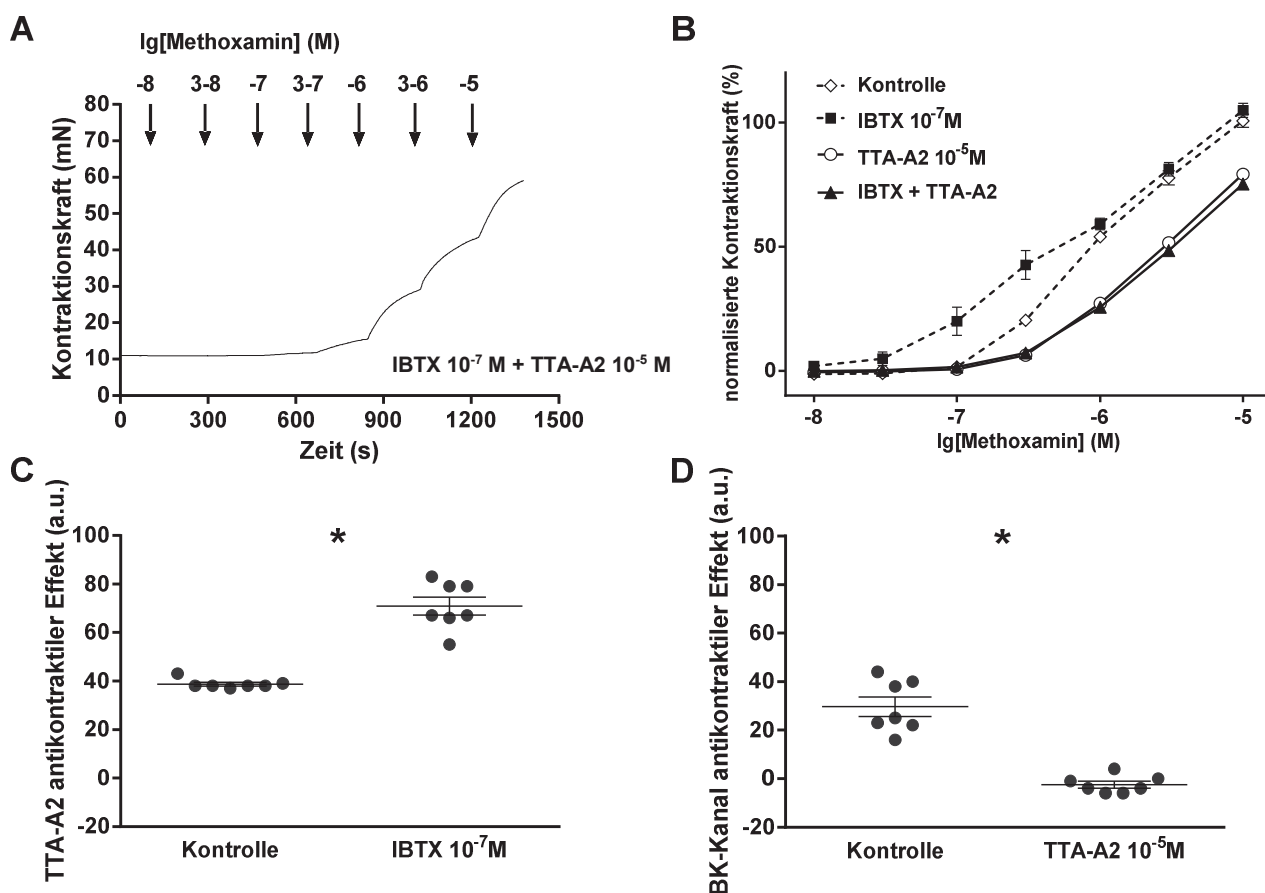


Abb. 44: Wirkung von TTA-A2 10^{-5} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-A2. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von TTA-A2 (Kreis offen, TTA-A2 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-A2 (Dreieck geschlossen, IBTX + TTA-A2). C: Antikontractiler Effekt von TTA-A2 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von TTA-A2 (TTA-A2 10^{-5} M).

TTA-P2 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M hatte keinen Einfluss auf die MX-induzierten Kontraktion (Abb. 45B; $n = 8$; $p = 0,99$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von TTA-P2 und IBTX wurden die phasischen Kontraktionen nicht erkennbar beeinflusst (Abb. 45A). Für den Effekt von TTA-P2 konnte keine Beeinflussung durch IBTX

gefunden werden (Abb. 45C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -2,587 bis 18,34). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-6}$ M TTA-P2 nicht beeinflusst (Abb. 45D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -21,04 bis 5,288).

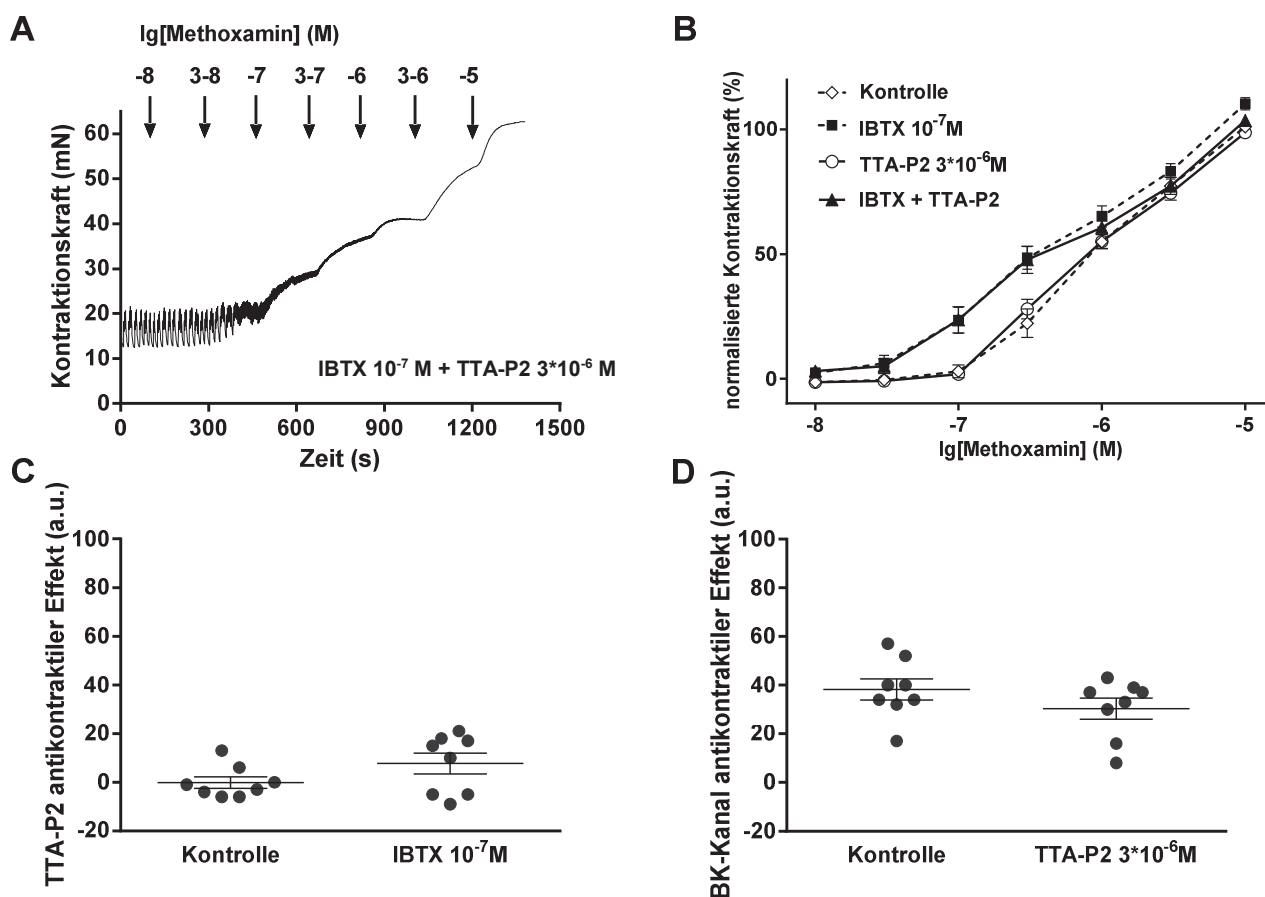


Abb. 45: Wirkung von TTA-P2 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-P2. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von TTA-P2 (Kreis offen, TTA-P2 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-P2 (Dreieck geschlossen, IBTX + TTA-P2). C: Antikontractiler Effekt von TTA-P2 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von TTA-P2 (TTA-P2 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Auch durch eine höhere TTA-P2-Konzentration von 10^{-5} M wurde die MX-induzierte Kontraktion nicht beeinflusst (Abb. 46B; $n = 6$; $p = 0,14$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von TTA-P2 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 46A). Für den Effekt von TTA-P2 konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 46C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -12,13 bis 23,79). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-5} M TTA-P2 nicht beeinflusst (Abb. 46D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -16,86 bis 5,189).

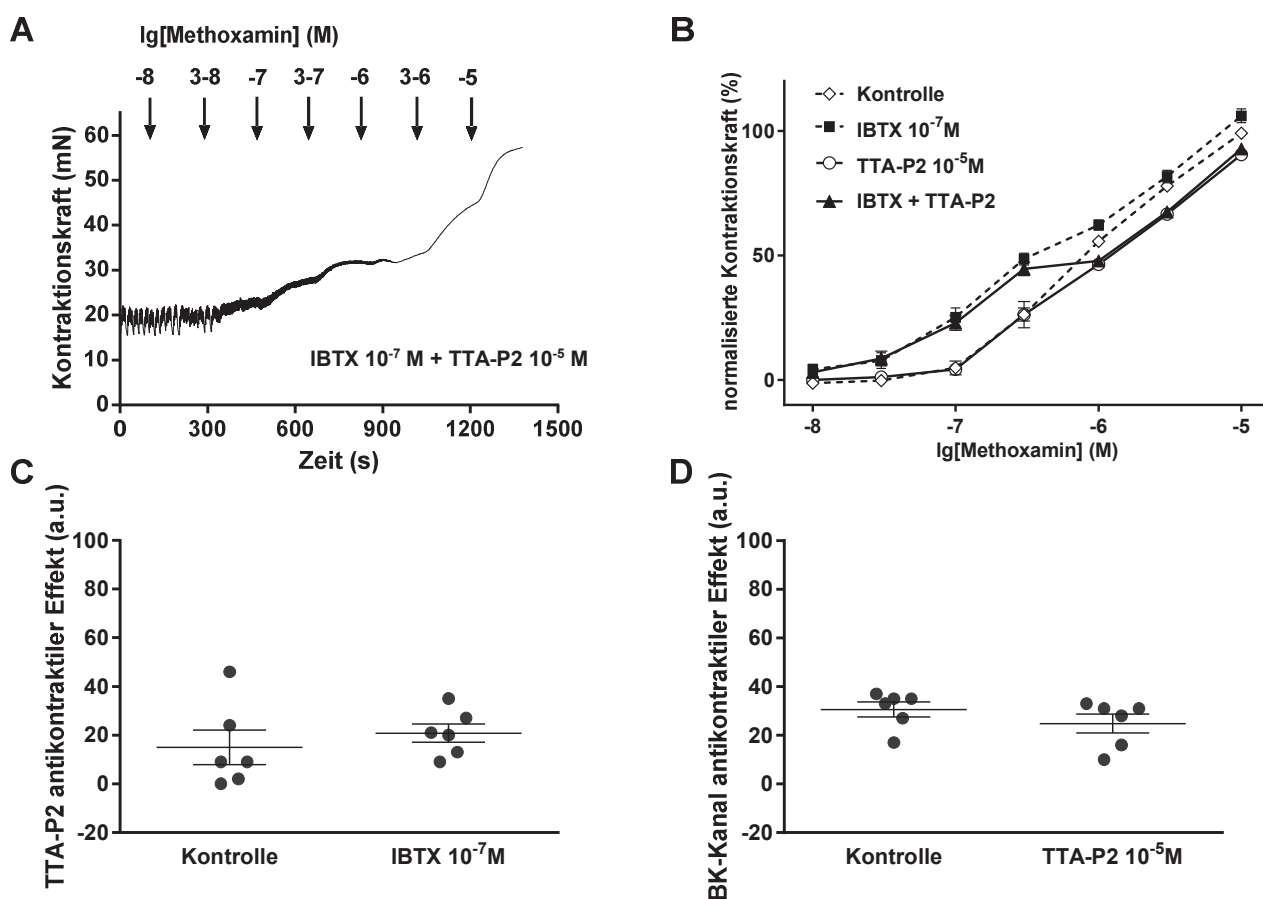


Abb. 46: Wirkung von TTA-P2 10^{-5} M und Iberiotoxin auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-P2. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat

geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von TTA-P2 (Kreis offen, TTA-P2 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und TTA-P2 (Dreieck geschlossen, IBTX + TTA-P2). C: Antikontraktiler Effekt von TTA-P2 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von TTA-P2 (TTA-P2 10^{-5} M).

Um den Einfluss von Cav3.2-Kanälen zu untersuchen, wurde der Blocker Nickelchlorid benutzt. In Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M Nickelchlorid war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 47B; $n = 9$; $p = 0,91$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nickelchlorid und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 47A). Der Effekt von Nickelchlorid trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 47C; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 2,719 bis 24,17). Es wurde keine Beeinflussung des antikontraktilen Effekts des BK-Kanals durch $5 \cdot 10^{-5}$ M Nickelchlorid beobachtet (Abb. 47D; $n = 9$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -23,76 bis 0,4301).

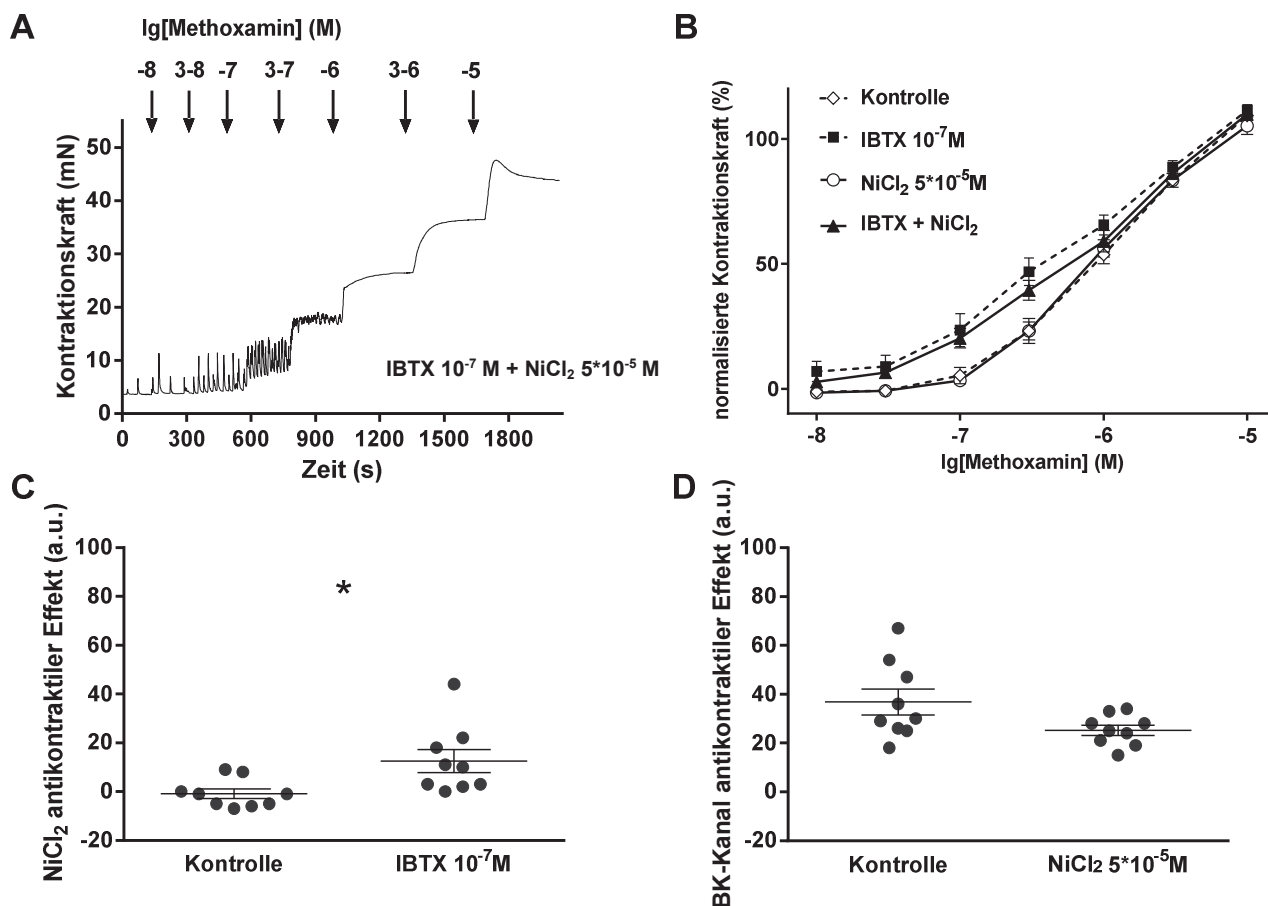


Abb. 47: Wirkung von Nickelchlorid $5 \cdot 10^{-5}$ M und Iberiotoxin auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nickelchlorid. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Nickelchlorid (Kreis offen, NiCl₂ $5 \cdot 10^{-5}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nickelchlorid (Dreieck geschlossen, IBTX + NiCl₂). C: Antikontractiler Effekt von Nickelchlorid in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Nickelchlorid (NiCl₂ $5 \cdot 10^{-5}$ M).

In Gegenwart von Nickelchlorid in einer höheren Konzentration von 10^{-4} M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 48B; n = 8; p = 0,94). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nickelchlorid und IBTX waren die phasischen

Kontraktionen stark abgeschwächt (Abb. 48A). Der Effekt von Nickelchlorid trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 48C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 13,91 bis 45,09). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-4} M Nickelchlorid abgeschwächt (Abb. 48D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -47,01 bis -14,99).

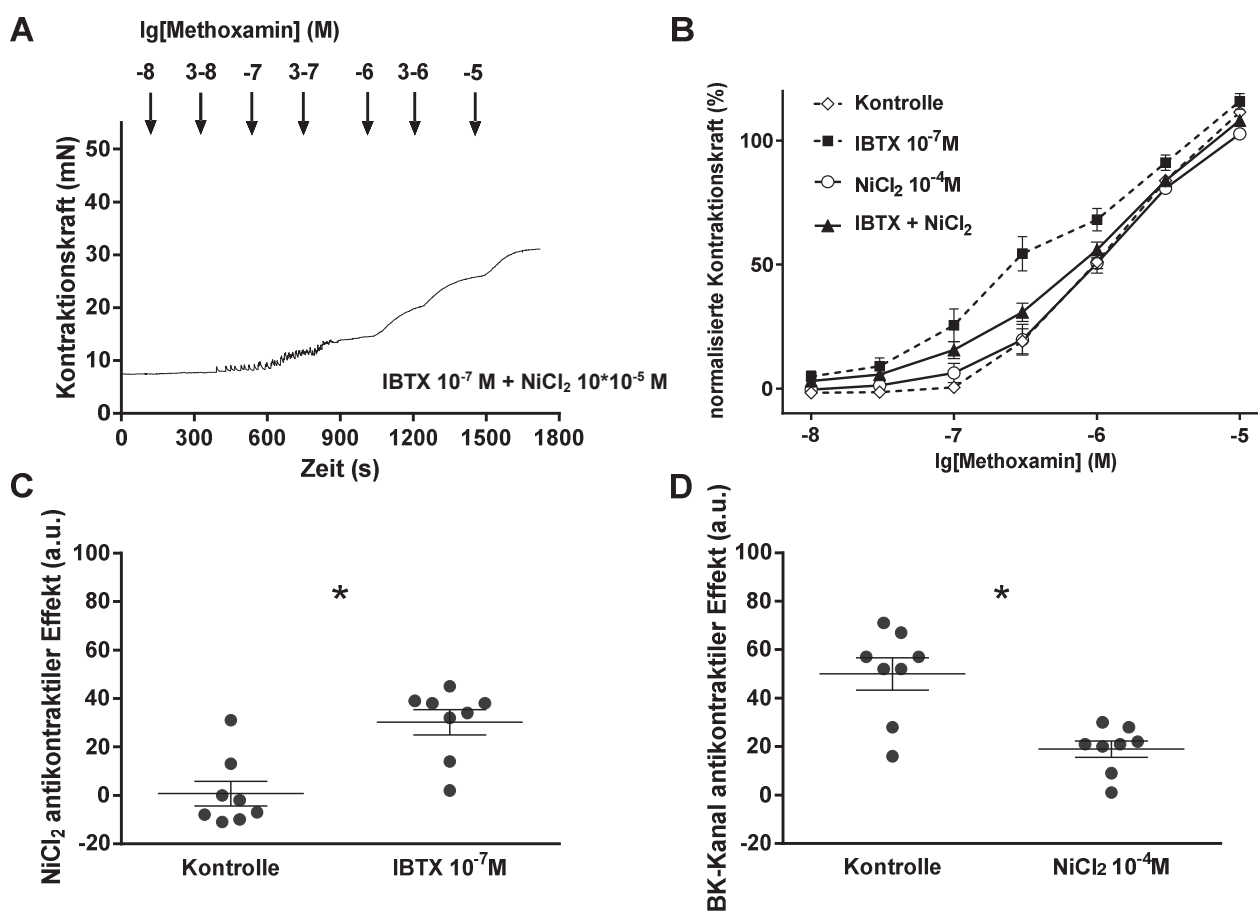


Abb. 48: Wirkung von Nickelchlorid 10^{-4} M und Iberiotoxin auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nickelchlorid. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, $\text{IBTX } 10^{-7} \text{ M}$), in Gegenwart von Nickelchlorid (Kreis offen, $\text{NiCl}_2 \text{ } 10^{-4} \text{ M}$) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Nickelchlorid (Dreieck geschlossen, $\text{IBTX} +$

NiCl₂). C: Antikontraktiler Effekt von Nickelchlorid in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10⁻⁷ M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Nickelchlorid (NiCl₂ 10⁻⁴ M).

Um die Beteiligung von spannungsabhängigen Calciumkanälen des P/Q-Types zu untersuchen, wurde der spezifische Blocker ω-Agatoxin-IVA verwendet (Birnbauer, Campbell et al. 1994, Nakanishi 2016). In Gegenwart von 10⁻⁹ M Agatoxin war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 49B; n = 6; p = 0,81). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Agatoxin und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiter vorhanden (Abb. 49A). Der Effekt von Agatoxin wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 49C; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -27,31 bis 13,97). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht von 10⁻⁹ M Agatoxin beeinflusst (Abb. 49D; n = 6; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -28,05 bis 14,72).

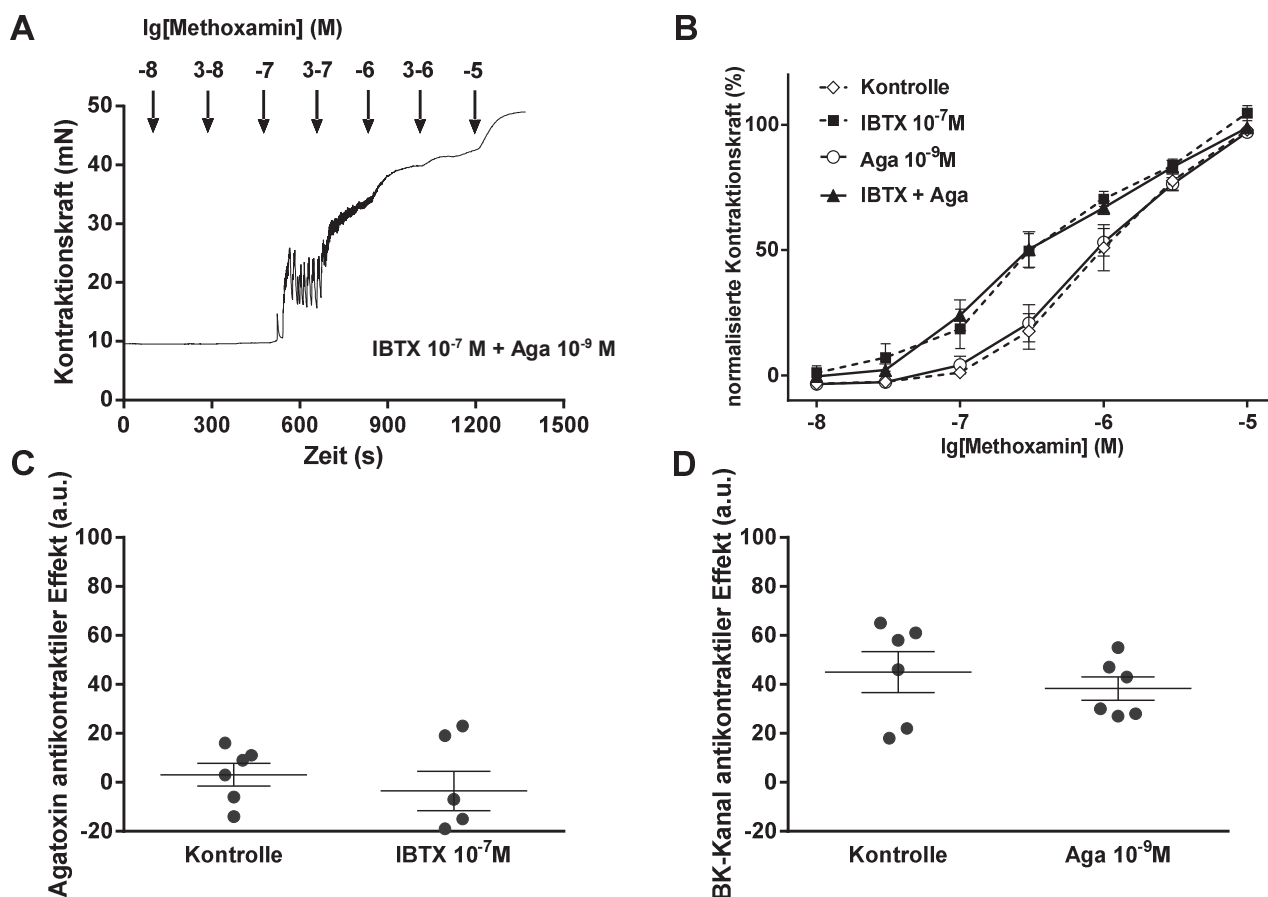


Abb. 49: Wirkung von Agatoxin 10^{-9} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Agatoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Agatoxin (Kreis offen, Aga 10^{-9} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Agatoxin (Dreieck geschlossen, IBTX + Aga). C: Antikontraktiler Effekt von Agatoxin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Agatoxin (Aga 10^{-9} M).

Auch bei einer höheren Agatoxin-Konzentration von 10^{-8} M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (Abb. 50B; $n = 6$; $p = 0,89$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Agatoxin und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin

vorhanden (Abb. 50A). Der Effekt von Agatoxin wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 50C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -25,43 bis 8,765). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht von 10^{-8} M Agatoxin beeinflusst (Abb. 50D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -31,6 bis 14,94).

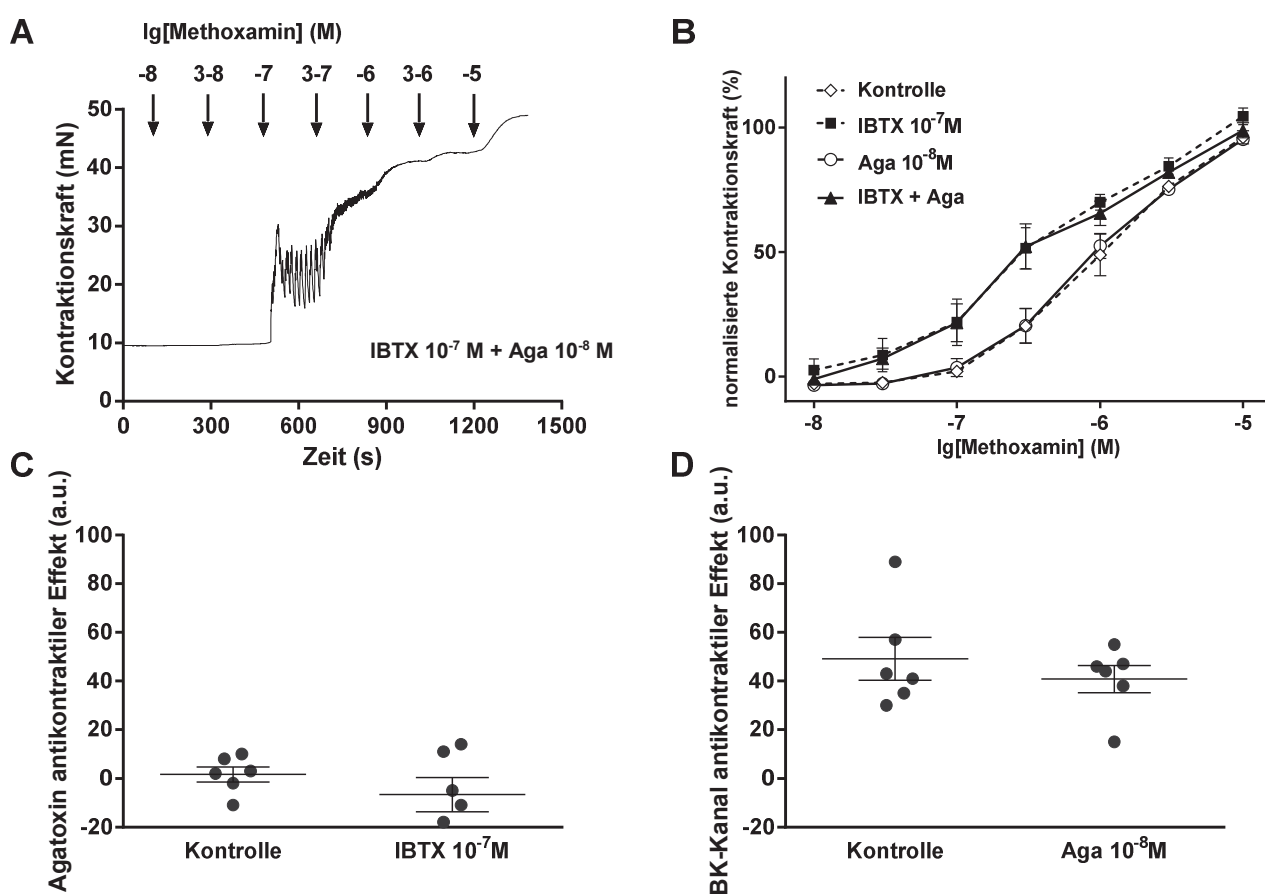


Abb. 50: Wirkung von Agatoxin 10^{-8} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Agatoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Agatoxin (Kreis offen, Aga 10^{-8} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Agatoxin (Dreieck geschlossen, IBTX + Aga). C: Antikontraktiler Effekt von

Agatoxin in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Agatoxin (Aga 10^{-8} M).

Für ein besseres Verständnis der beobachteten Effekte wurde der Einfluss der Rho-Kinase untersucht, wenn nur die Calciumsensitivität verändert wird. Dazu wurde deren Blocker H1152 verwendet (Sasaki, Suzuki et al. 2002, Breitenlechner, Gassel et al. 2003). In Gegenwart von 10^{-7} M H1152 war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 51B; $n = 7$; $p < 0,001$), H1152 zeigte also einen antikontraktilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von H1152 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen unverändert (Abb. 51A). Der antikontraktile Effekt von H1152 wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 51C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -5,075 bis 11,07). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht von 10^{-7} M H1152 beeinflusst (Abb. 51D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -14,75 bis 8,747).

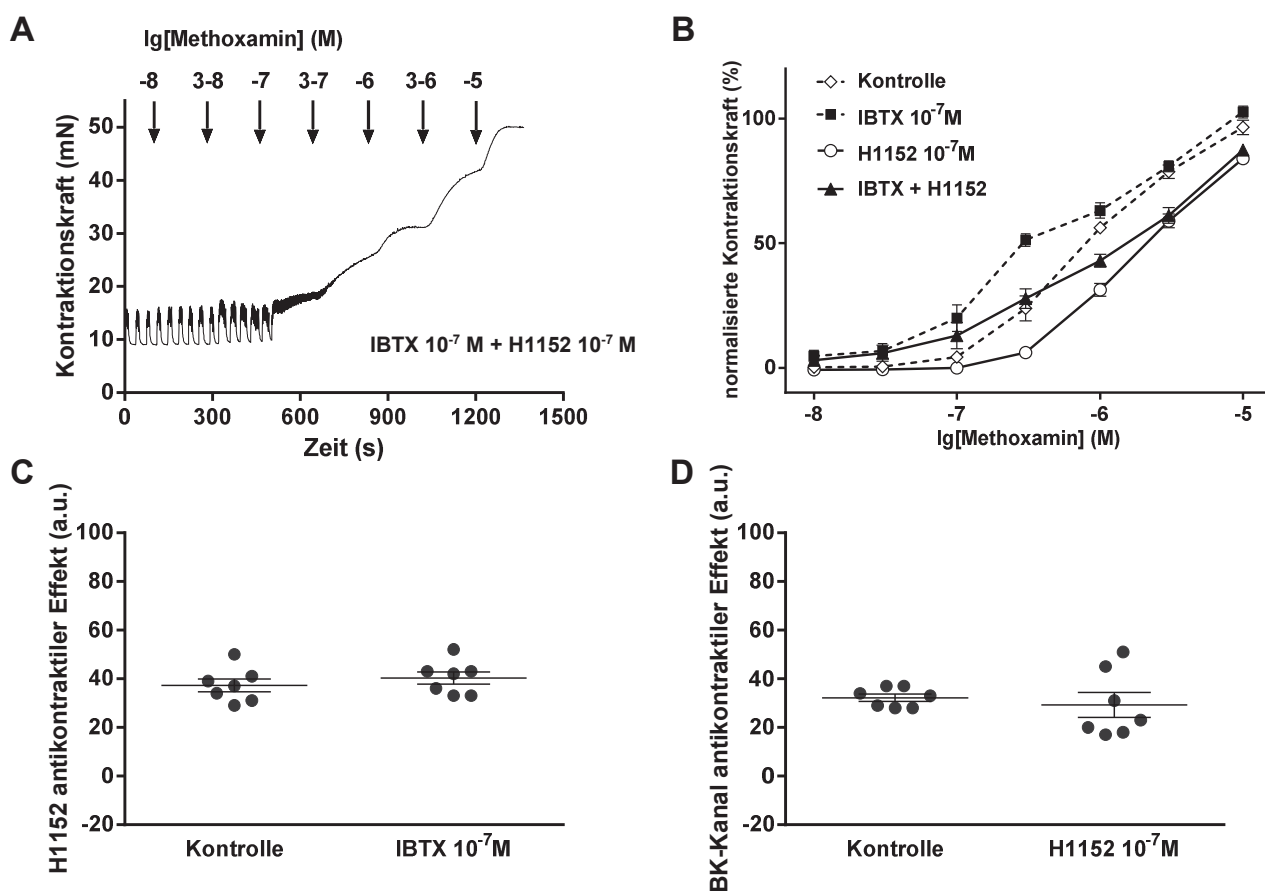


Abb. 51: Wirkung von H1152 10^{-7} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und H1152. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von H1152 (Kreis offen, H1152 10^{-7} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und H1152 (Dreieck geschlossen, IBTX + H1152). C: Antikontractiler Effekt von H1152 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von H1152 (H1152 10^{-7} M).

In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-7}$ M H1152 war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 52B; $n = 6$; $p < 0,001$), H1152 zeigte also einen antikontractilen Effekt. Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von H1152 und IBTX

leicht vermindert (Abb. 52A). Der antikontraktile Effekt von H1152 wurde durch IBTX verstärkt (Abb. 52C; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -23,16 bis 46,84). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-7}$ M H1152 abgeschwächt (Abb. 52D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -49,5 bis -20,5).

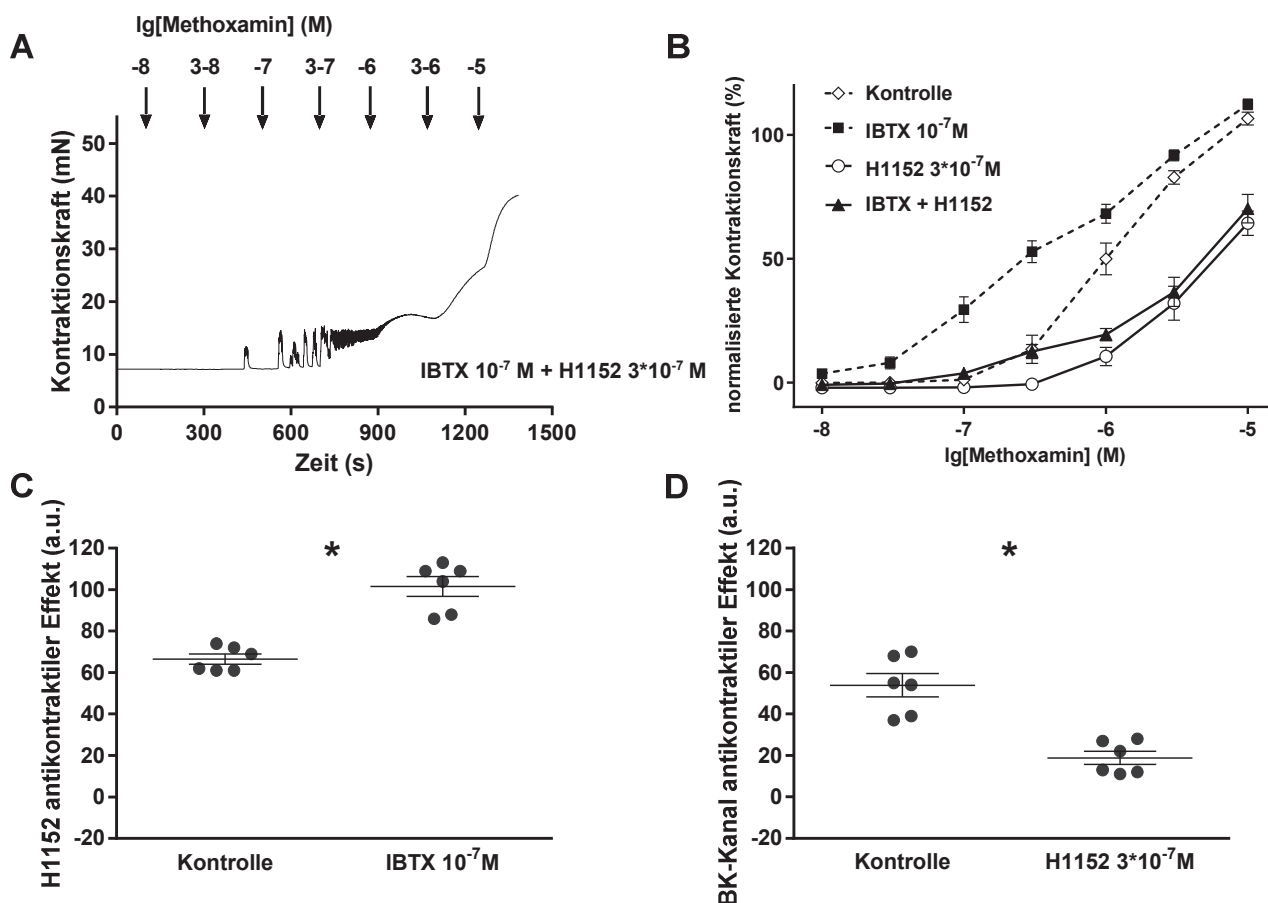


Abb. 52: Wirkung von H1152 $3 \cdot 10^{-7}$ M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und H1152. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX $3 \cdot 10^{-7}$ M), in Gegenwart von H1152 (Kreis offen, H1152 10^{-7} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und H1152 (Dreieck geschlossen, IBTX + H1152). C: Antikontraktile Wirkung von H1152 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D:

Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von H1152 (H1152 $3 \cdot 10^{-7}$ M).

Beeinflussung von Calcium-Transportprozessen durch Diabetes

Um zu untersuchen, inwieweit Diabetes einen Einfluss auf die zuvor untersuchten Calcium-Transportprozesse hat, wurden anschließend Versuche mit Gefäßen diabetischer Tiere durchgeführt. Dabei wurde sich auf Versuche zum neuen, funktionell bedeutsamsten Befund aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Rolle der T-Typ Calciumkanäle beschränkt.

Zunächst wurden Versuche mit verschiedenen extrazellulären Calciumkonzentrationen durchgeführt, um allgemein die Rolle des Calciumeinstroms für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei Diabetes zu untersuchen.

Im Bereich niedriger und mittlerer MX-Konzentrationen, in dem die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von IBTX verändert ist, war bei einer Calciumkonzentration von 10^{-3} M die MX-induzierte Kontraktion bei Gefäßen diabetischer Tiere unverändert (Abb. 53B; $n = 13$; $p = 0,95$). In Gegenwart von IBTX waren die phasischen Kontraktionen bei den Gefäßen diabetischer Tiere fast vollständig abwesend (Abb. 53A). Der Effekt des Diabetes wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 53C; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -1,856 bis 2,687). Der BK-Kanal zeigte bei dieser Calciumkonzentration einen antikontraktilen Effekt (Abb. 53B; $n = 13$; $p = 0,03$). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde vom Diabetes nicht beeinflusst (Abb. 53D; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -8,591 bis 7,76).

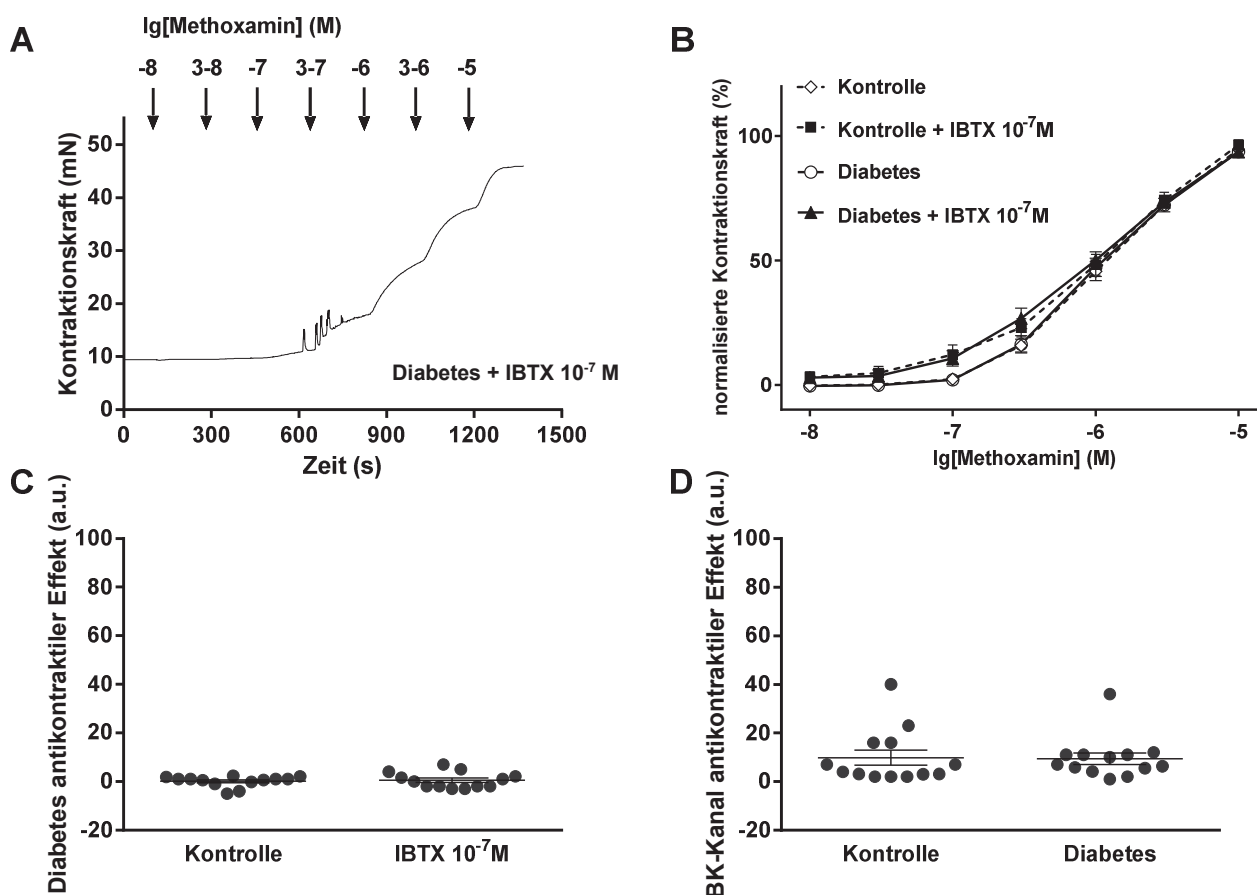


Abb. 53: Wirkung von Diabetes auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von 10^{-3} M. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion der Gefäße diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere (Raute offen, Kontrolle), von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M), von Gefäßen diabetischer Tiere (Kreis offen, Diabetes) und von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX 10^{-7} M). C: Antikontractiler Effekt von Diabetes in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes).

Bei einer Calciumkonzentration von $1,6 \cdot 10^{-3}$ M, welche der normalen physiologischen freien Calciumkonzentration entspricht, war die MX-induzierte Kontraktion bei Gefäßen diabetischer Tiere weiterhin unverändert (Abb. 54B; $n = 13$; $p = 0,74$). In Gegenwart von

IBTX waren die phasischen Kontraktionen bei den Gefäßen diabetischer Tiere vorhanden (Abb. 54A). Der Effekt des Diabetes wurde nicht von IBTX beeinflusst (Abb. 54C; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -5,079 bis 13,54). Der BK-Kanal zeigte bei dieser Calciumkonzentration einen antikontraktiven Effekt (Abb. 54B; $n = 13$; $p < 0,01$). Dieser wurde vom Diabetes nicht beeinflusst (Abb. 54D; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -20,57 bis 12,11).

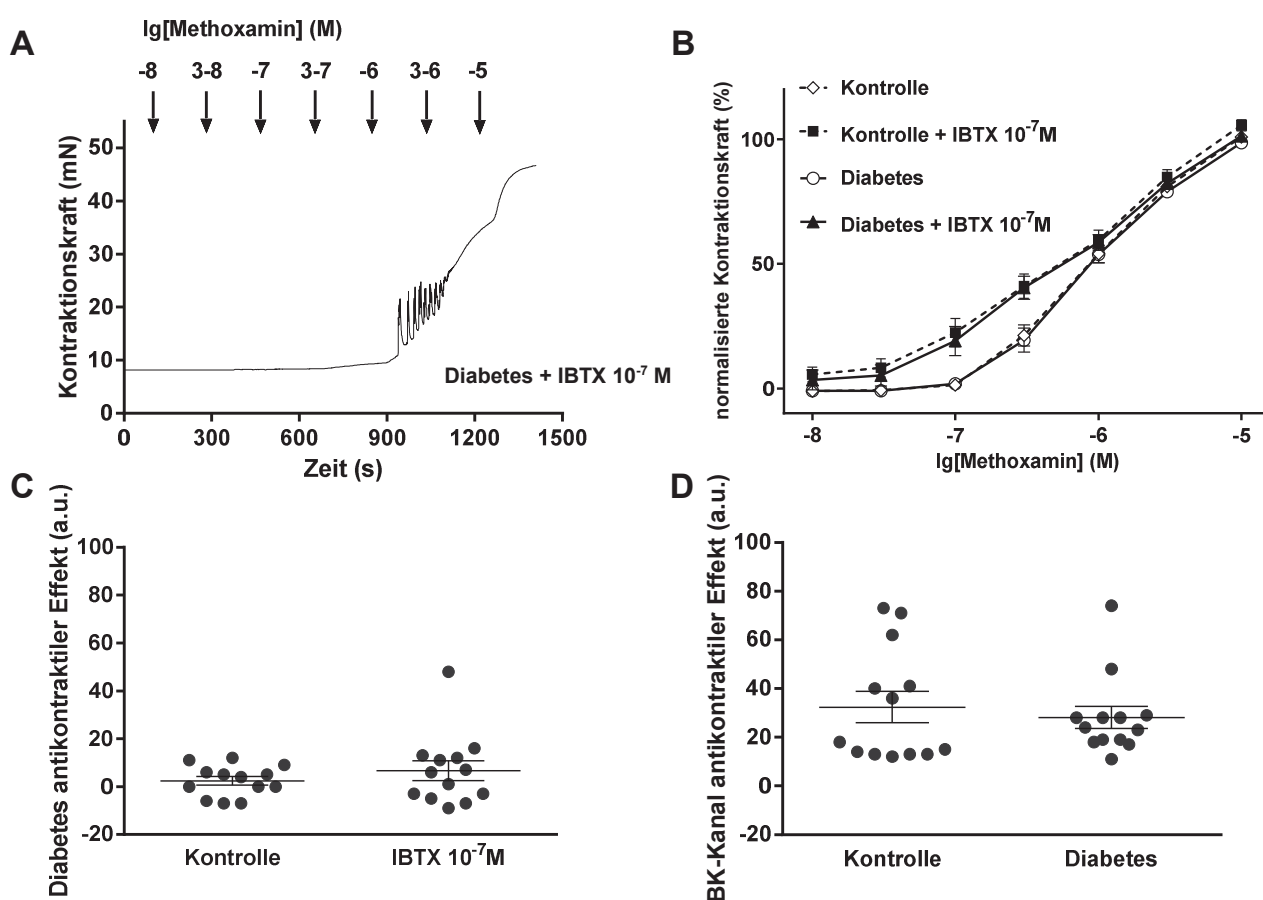


Abb. 54: Wirkung von Diabetes auf den antikontraktiven Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von $1,6 \cdot 10^{-3}$ M. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion der Gefäße diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere (Raute offen, Kontrolle), von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M), von Gefäßen diabetischer Tiere (Kreis offen, Diabetes) und von Gefäßen diabetischer Tiere in

Gegenwart von Iberiotoxin (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX 10^{-7} M). C: Antikontraktiler Effekt von Diabetes in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes).

Bei einer Calciumkonzentration von $2,2 \cdot 10^{-3}$ M war die MX-induzierte Kontraktion bei Gefäßen diabetischer Tiere weiterhin unverändert (Abb. 55B; $n = 13$; $p = 0,60$). In Gegenwart von IBTX waren die phasischen Kontraktionen bei den Gefäßen diabetischer Tiere weiterhin vorhanden (Abb. 55A). Ein Effekt des Diabetes zeigte sich erst in Gegenwart von IBTX (Abb. 55C; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 0,3816 bis 20,08). Der BK-Kanal zeigte bei dieser Calciumkonzentration einen antikontraktilen Effekt (Abb. 55B; $n = 13$; $p < 0,001$). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde vom Diabetes nicht beeinflusst (Abb. 55D; $n = 13$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -25,58 bis 5,115).

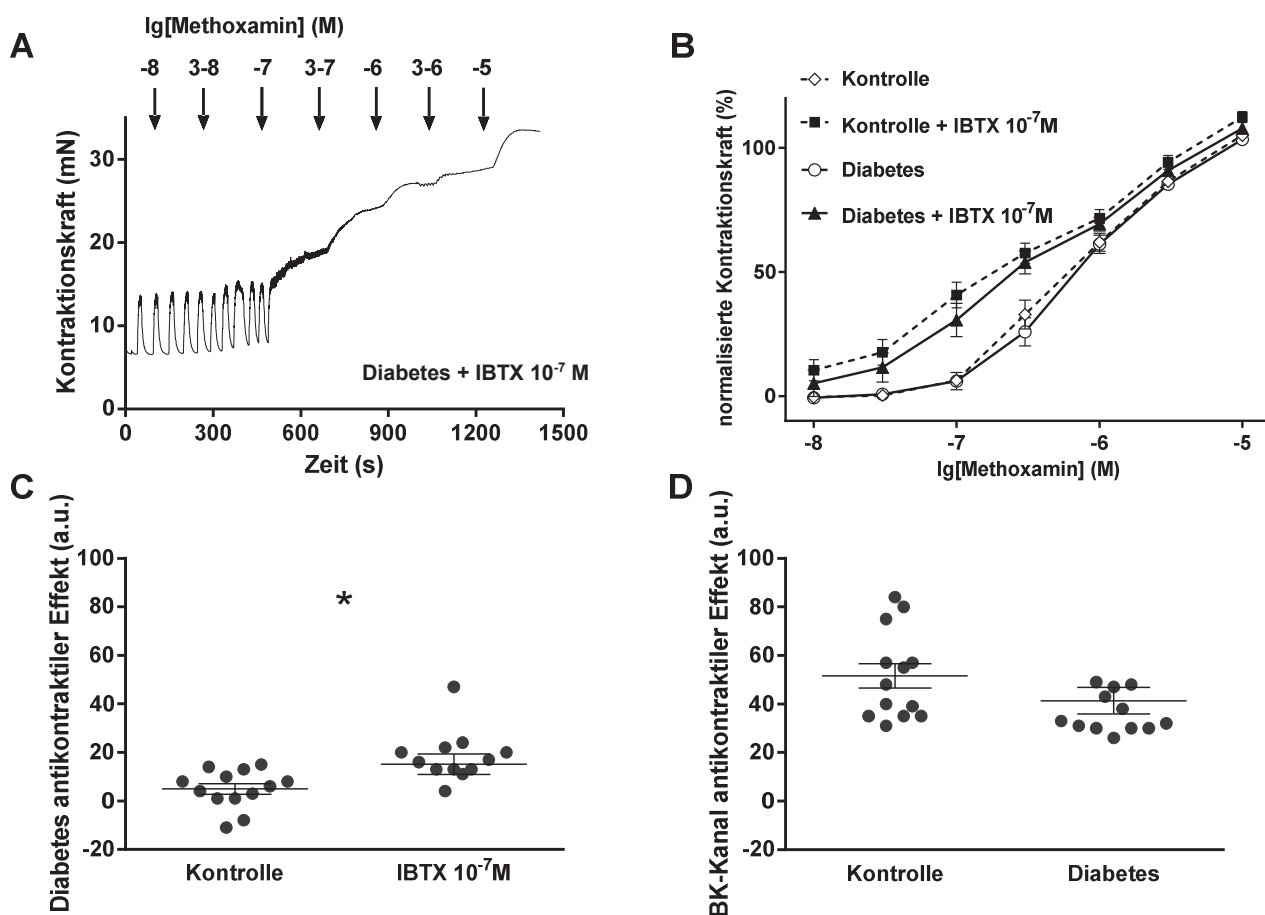


Abb. 55: Wirkung von Diabetes auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals bei einer extrazellulären Calciumkonzentration von $2,2 \cdot 10^{-3}$ M. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion der Gefäße diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere (Raute offen, Kontrolle), von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M), von Gefäßen diabetischer Tiere (Kreis offen, Diabetes) und von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX 10^{-7} M). C: Antikontractiler Effekt von Diabetes in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes).

In Gegenwart von Nickelchlorid war die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von IBTX in Gefäßen diabetischer Tiere unverändert (Abb. 56B; n = 8; p = 0,48). In Gefäßen

gesunder Tiere war die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von IBTX hingegen abgeschwächt (Abb. 56B; $n = 8$; $p = 0,03$). Der antikontraktile Effekt von Nickelchlorid war in Gefäßen diabetischer Tiere aufgehoben (Abb. 56C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -37,93 bis -8,075), Nickelchlorid zeigte also nur in Gefäßen gesunder Tiere einen antikontraktilen Effekt. Die phasischen Kontraktionen der Gefäße diabetischer Tiere waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nickelchlorid und IBTX weiterhin vorhanden (Abb. 56A).

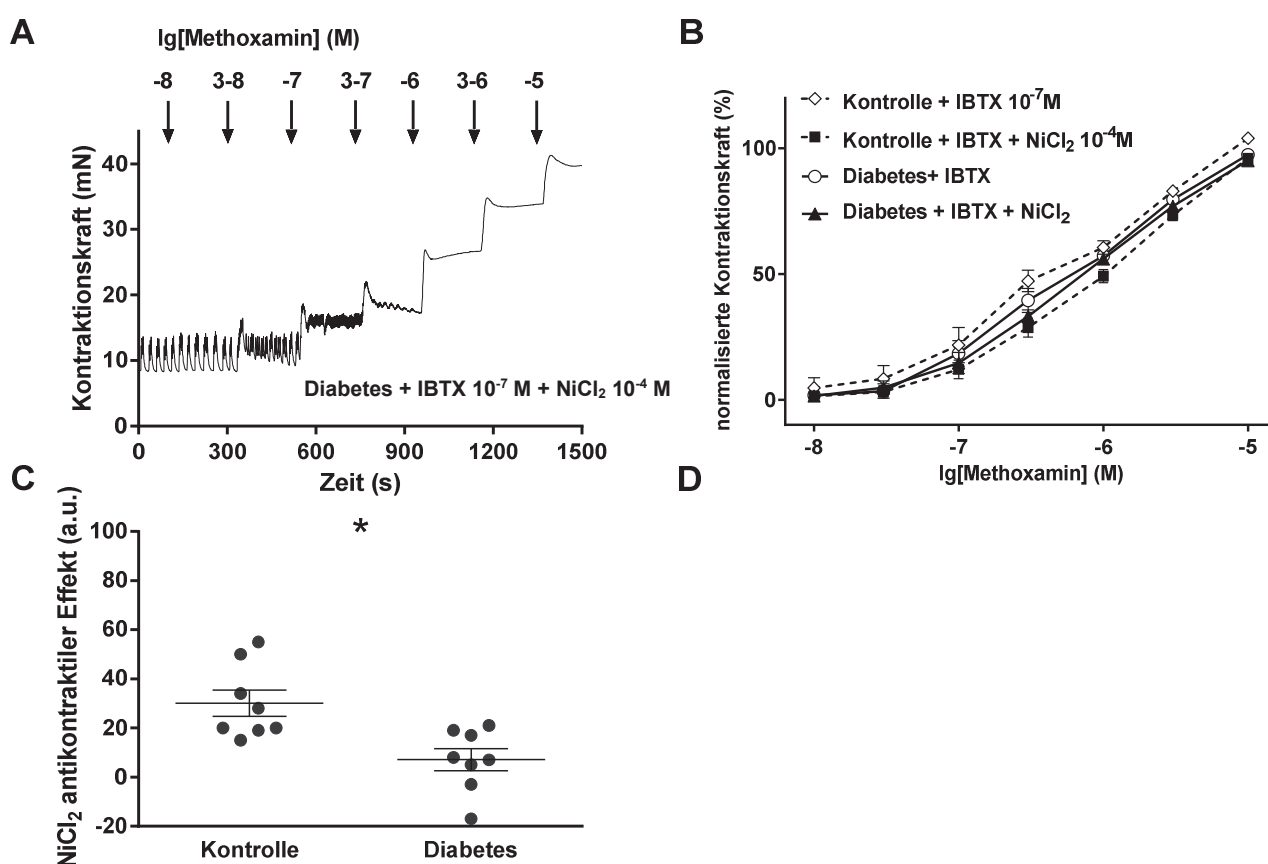


Abb. 56: Wirkung von NiCl₂ auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei Diabetes.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion der Gefäße diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin und NiCl₂. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Raute offen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M), von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin und NiCl₂ (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX + NiCl₂ 10^{-4} M), von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberiotoxin (Kreis

offen, Diabetes + IBTX) und von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Iberitoxin und NiCl_2 (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX + NiCl_2). C: Antikontraktile Effekt von NiCl_2 bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes) in Anwesenheit von Iberitoxin.

Die Genexpression spannungsabhängiger Calcium-Kanäle in den Schwanzgefäßen diabetischer und nicht diabetischer Ratten wurde mittels real time PCR untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede gefunden (Abb. 57; $n = 8$; $p = 0,41$).

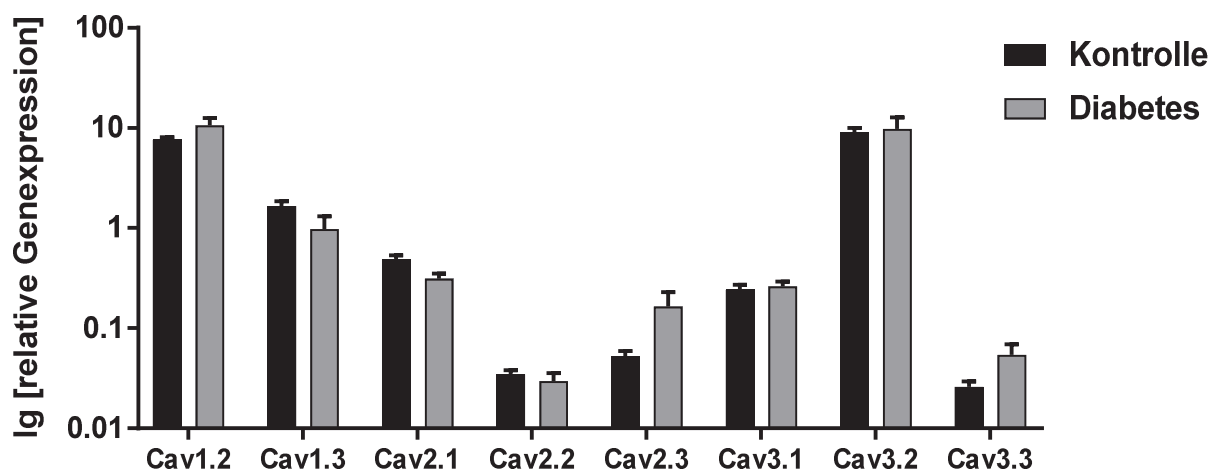


Abb. 57: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Real time PCR vom im Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu Hmbs.

Eine detailliertere Untersuchung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle fand außerdem mit Hilfe von Micro Fluidic Cards (MFC) statt. Es wurde kein Unterschied zwischen der Genexpression in diabetischen Gefäßen im Vergleich zu Kontrollgefäßen gefunden (Abb. 58, $n = 4$, $p = 0,10$).

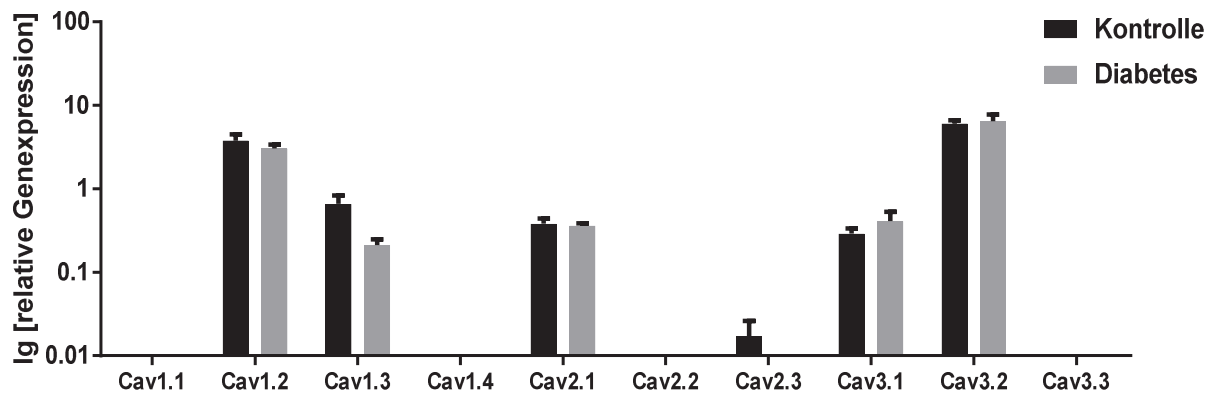


Abb. 58: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. MFC-Analyse im Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu Hmbs.

3.3 Die Interaktion des BK-Kanals mit K_V -, K_{ATP} - und Kir-Kanälen während der Kontraktion glatter Muskelzellen

Um die funktionelle Interaktion des BK-Kanals mit anderen Kaliumkanälen zu untersuchen, sollte die Rolle des BK-Kanals sowohl während dessen Inhibierung als auch während dessen Aktivierung untersucht werden. Dazu wurden zunächst verschiedene BK-Kanal-Öffner auf ihre Wirksamkeit hin getestet.

In Gegenwart des BK-Kanal-Öffners NS11021 (Bentzen, Olesen et al. 2014) in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 59B; $n = 8$; $p = 0,08$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von NS11021 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen leicht vermindert (Abb. 59A). Für den Effekt von NS11021 konnte keine Beeinflussung durch IBTX festgestellt werden (Abb. 59C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -4,907 bis 8,407). Für den antikontraktile Effekt des BK-Kanals konnte ebenfalls keine Beeinflussung durch $3 \cdot 10^{-6}$ M NS11021 festgestellt werden (Abb. 59D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -14,45 bis 10,95).

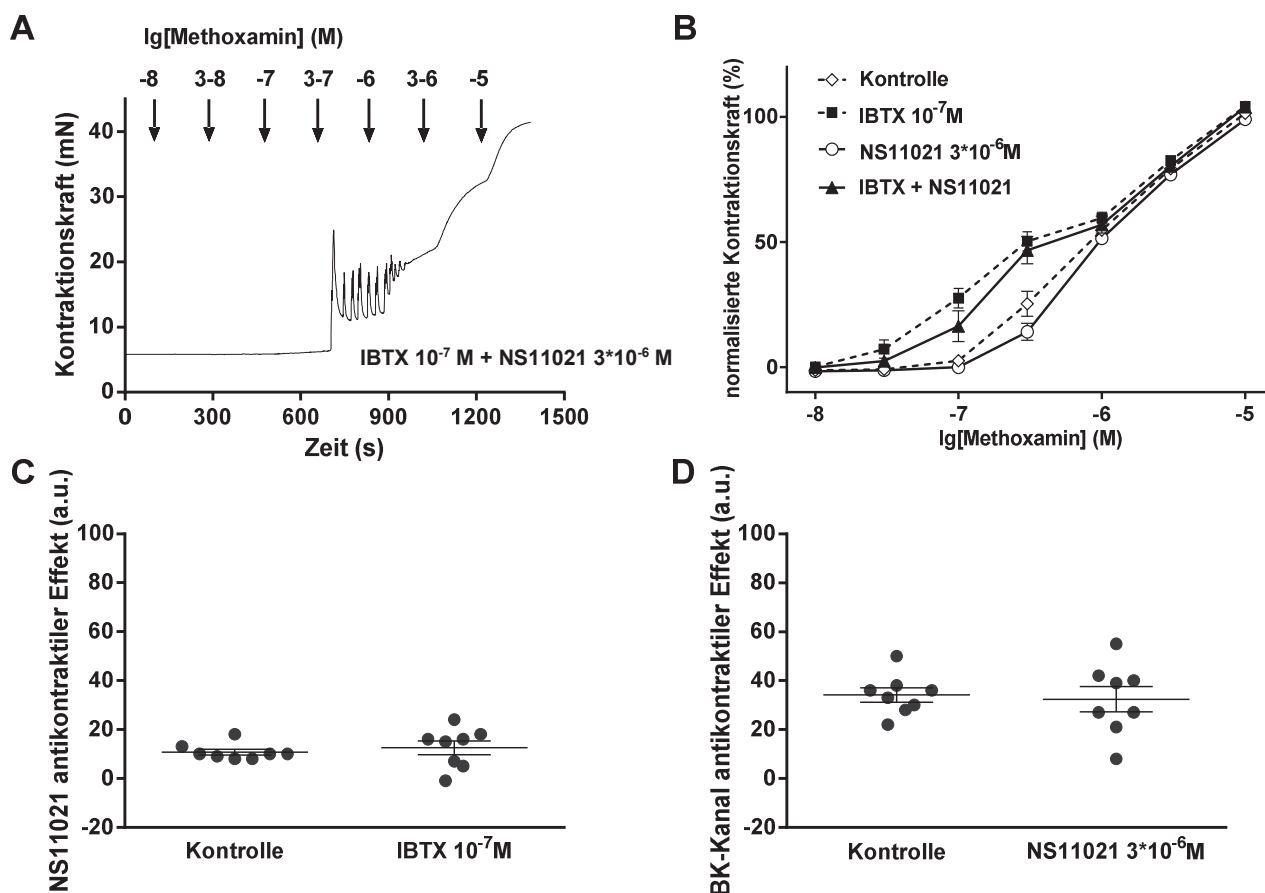


Abb. 59: Wirkung von NS11021 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und NS11021. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von NS11021 (Kreis offen, NS11021 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und NS11021 (Dreieck geschlossen, IBTX + NS11021). C: Antikontractiler Effekt von NS11021 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von NS11021 (NS11021 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

In Gegenwart von NS11021 in einer höheren Konzentration von 10^{-5} M war die MX-induzierte Kontraktion vermindert (Abb. 60B; $n = 8$; $p < 0,001$), 10^{-5} M NS11021 zeigte also einen antikontractilen Effekt. Die phasischen Kontraktionen waren bei gleichzeitiger Anwesenheit von NS11021 und IBTX fast vollständig aufgehoben (Abb. 60A). In

Gegenwart von IBTX war der antikontraktile Effekt von NS11021 verstärkt (Abb. 60C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 4,38 bis 28,87). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von 10^{-5} M NS11021 abgeschwächt (Abb. 60D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -27,86 bis -5,393).

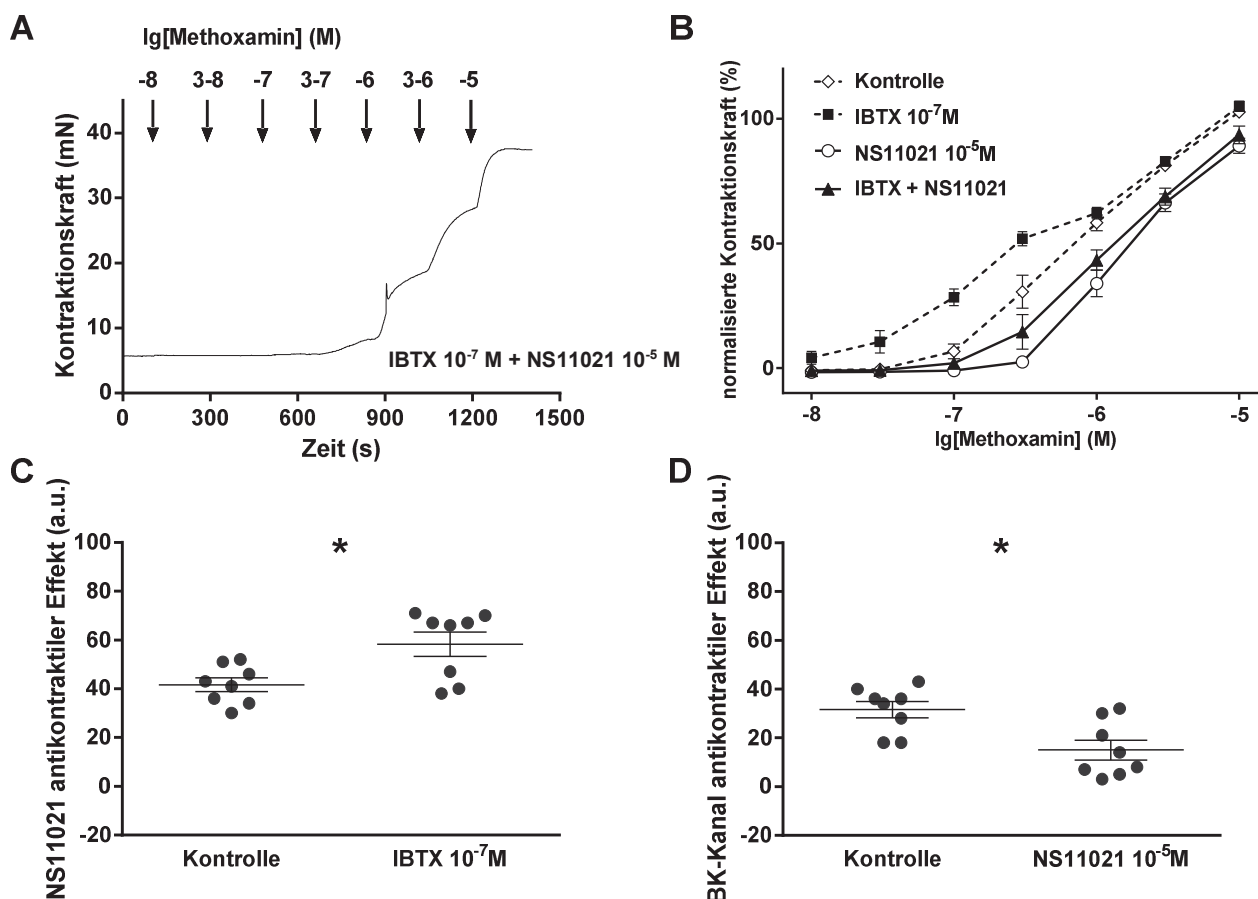


Abb. 60: Wirkung von NS11021 10^{-5} M auf den antikontraktile Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und NS11021. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberitoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von NS11021 (Kreis offen, NS11021 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und NS11021 (Dreieck geschlossen, IBTX + NS11021). C: Antikontractiler Effekt von NS11021 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw.

Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von NS11021 (NS11021 10^{-5} M).

Als weiterer BK-Kanal-Öffner wurde NS19504 (Nausch, Rode et al. 2014) untersucht. In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M NS19504 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 61B; $n = 5$; $p = 0,74$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von NS19504 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 61A). Für den Effekt von NS19504 konnte keine Beeinflussung durch IBTX festgestellt werden (Abb. 61C; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -6,452 bis 19,25). Auch für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte keine Beeinflussung durch $3 \cdot 10^{-6}$ M NS19504 festgestellt werden (Abb. 61D; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -39,59 bis 33,99).

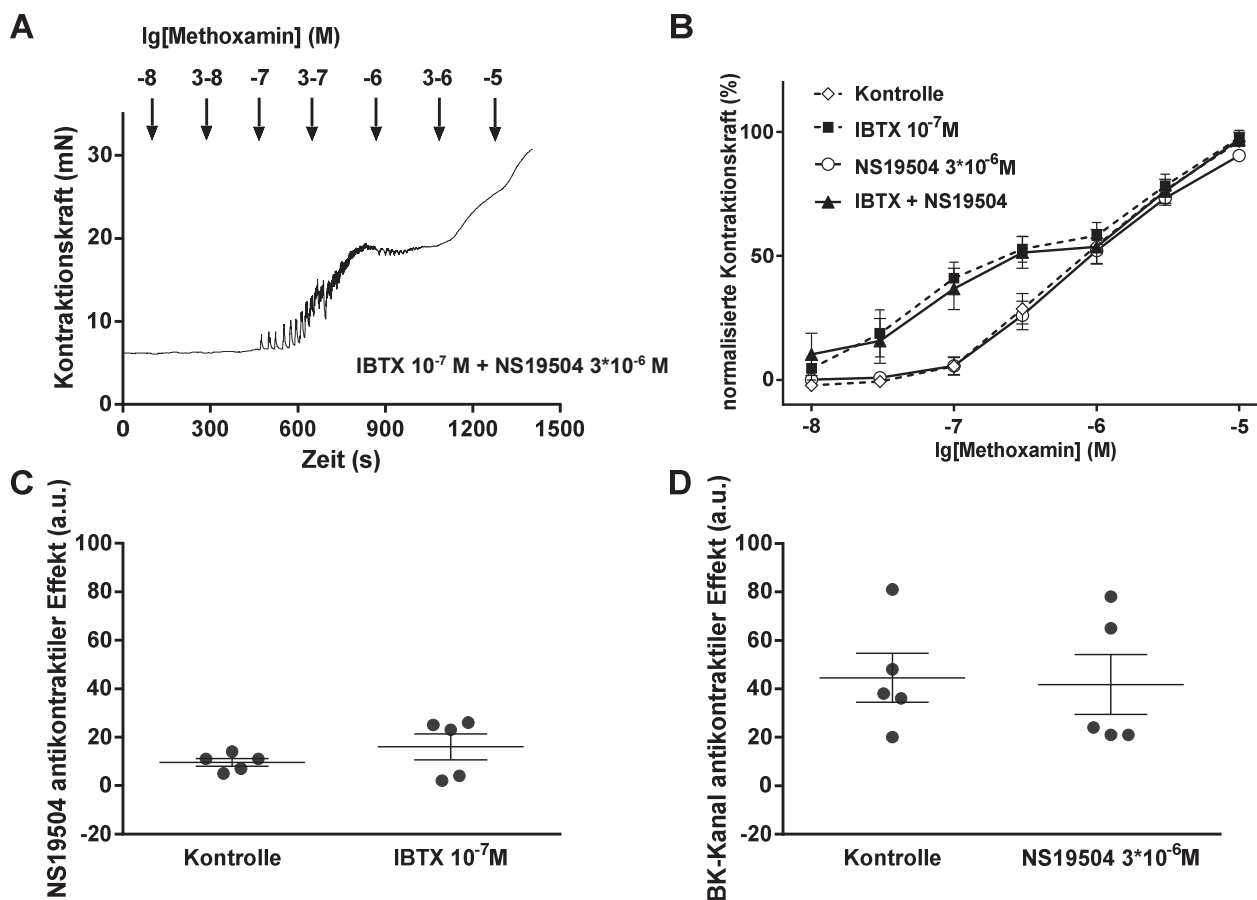


Abb. 61: Wirkung von NS19504 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und NS19504. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von NS19504 (Kreis offen, NS19504 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und NS19504 (Dreieck geschlossen, IBTX + NS19504). C: Antikontractiler Effekt von NS19504 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von NS19504 (NS19504 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

In Gegenwart von 10^{-5} M NS19504 war die MX-induzierte Kontraktion abgeschwächt (Abb. 62B; $n = 5$; $p = 0,02$), d.h. NS19504 zeigte in dieser Konzentration einen antikontractilen Effekt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von NS19504 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen leicht vermindert (Abb. 62A). Für den antikontractilen

Effekt von NS19504 konnte keine Beeinflussung durch IBTX festgestellt werden (Abb. 62C; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -6,452 bis 19,2 -28,12 bis 31,32). Für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals konnte ebenfalls keine Beeinflussung durch 10^{-5} M NS19504 festgestellt werden (Abb. 62D; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -44,17 bis 40,97).

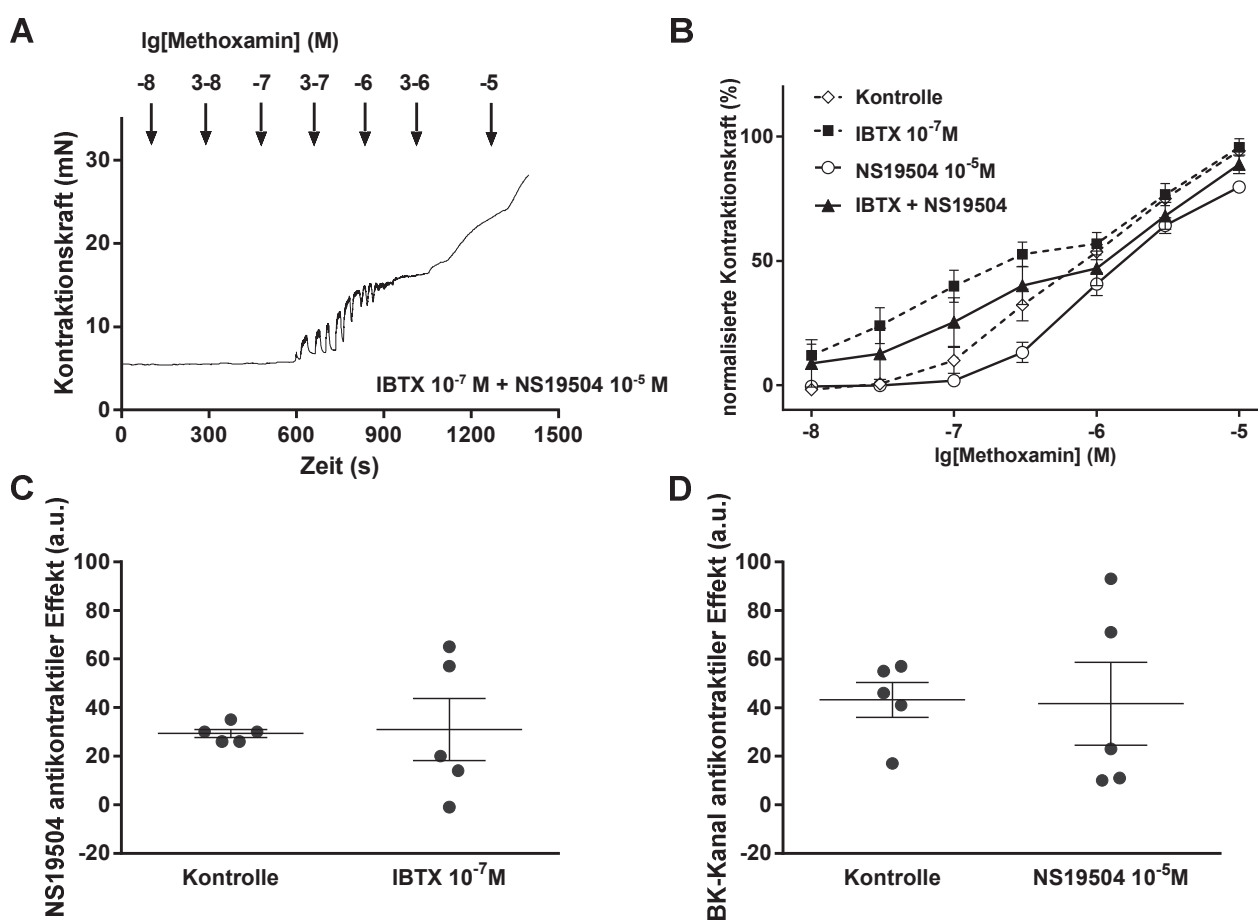


Abb. 62: Wirkung von NS19504 10^{-5} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und NS19504. **B:** Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberitoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von NS19504 (Kreis offen, NS19504 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberitoxin und NS19504 (Dreieck geschlossen, IBTX + NS19504). **C:** Antikontractiler Effekt von NS19504 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw.

Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von NS19504 (NS19504 10^{-5} M).

Als weiterer BK-Kanal-Aktivator wurde Lithocholsäure verwendet (Dopico, Walsh et al. 2002). In Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M Lithocholsäure war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 63B; $n = 7$; $p = 0,10$). Die phasischen Kontraktionen waren hingegen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lithocholsäure und IBTX vollständig aufgehoben (Abb. 63A). Der Effekt von Lithocholsäure trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 63C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 31,61 bis 56,96). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-5}$ M Lithocholsäure aufgehoben (Abb. 63D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -57,76 bis -30,82).

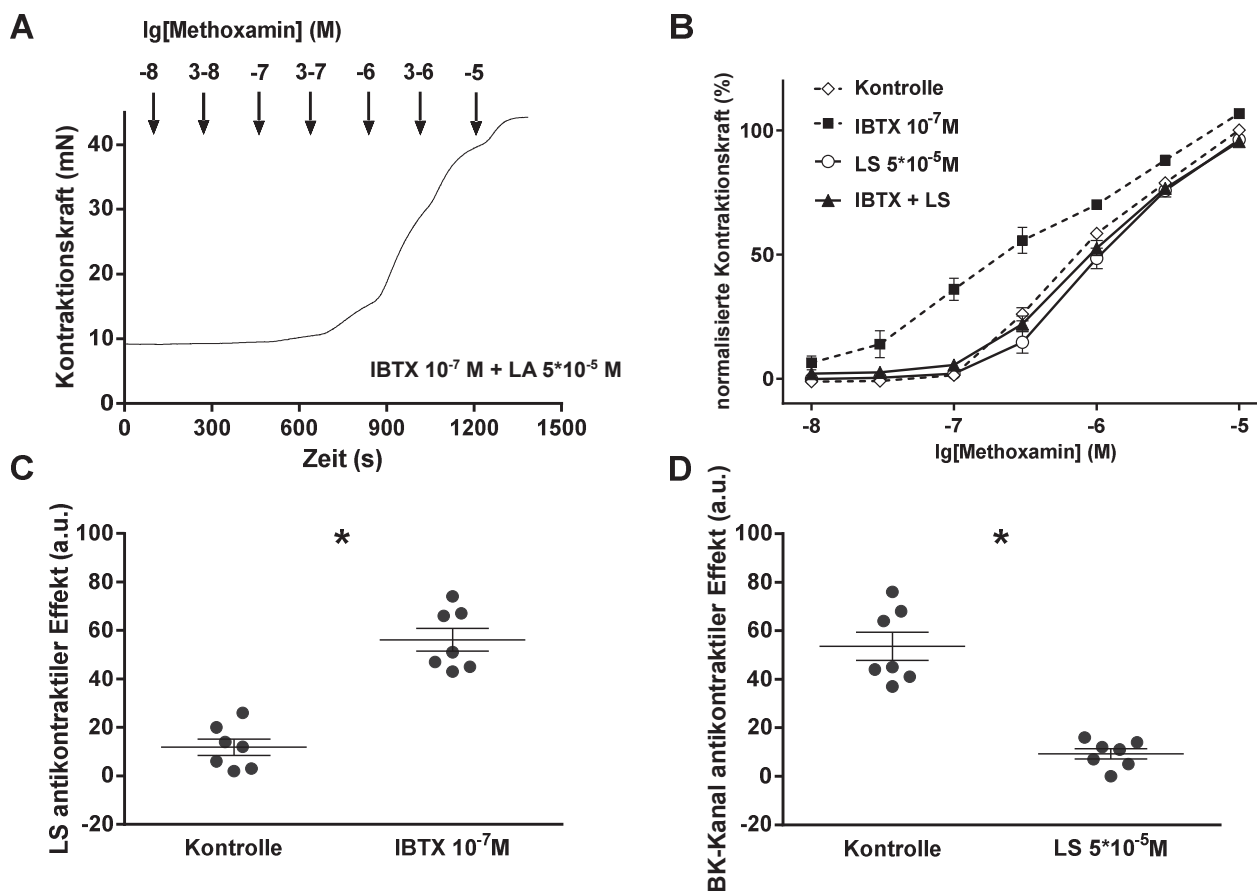


Abb. 63: Wirkung von Lithocholsäure $5 \cdot 10^{-5}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Lithocholsäure. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Lithocholsäure (Kreis offen, LS $5 \cdot 10^{-5}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Lithocholsäure (Dreieck geschlossen, IBTX + LS). C: Antikontractiler Effekt von Lithocholsäure in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Lithocholsäure (LS $5 \cdot 10^{-5}$ M).

Die verwendeten Aktivatoren zeigten also vor allem eine Wirkung bei gleichzeitiger Anwesenheit von IBTX. Das ist das Gegenteil dessen, was von einem Aktivator des BK-Kanals erwartet wird. Diese Substanzen scheinen also keine selektiven Aktivatoren des BK-Kanals zu sein. Deshalb wurde auf ihre weitere Verwendung verzichtet.

Zunächst wurde nun die Interaktion zwischen spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv-Kanälen) und dem BK-Kanal untersucht. Um den Einfluss des Kv1.5-Kanals zu untersuchen, wurde der Blocker DPO-1 verwendet (Lagrutta, Wang et al. 2006). In Gegenwart von 10^{-7} M DPO-1 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 64B; n = 7; p = 0,40). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von DPO-1 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen leicht verstärkt (Abb. 64A). Für den Effekt von DPO-1 konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 64C; n = 7; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -15,6 bis 3,883). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktiven Effekts des BK-Kanals durch 10^{-7} M DPO-1 beobachtet (Abb. 64D; n = 7; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -15,78 bis 4,061).

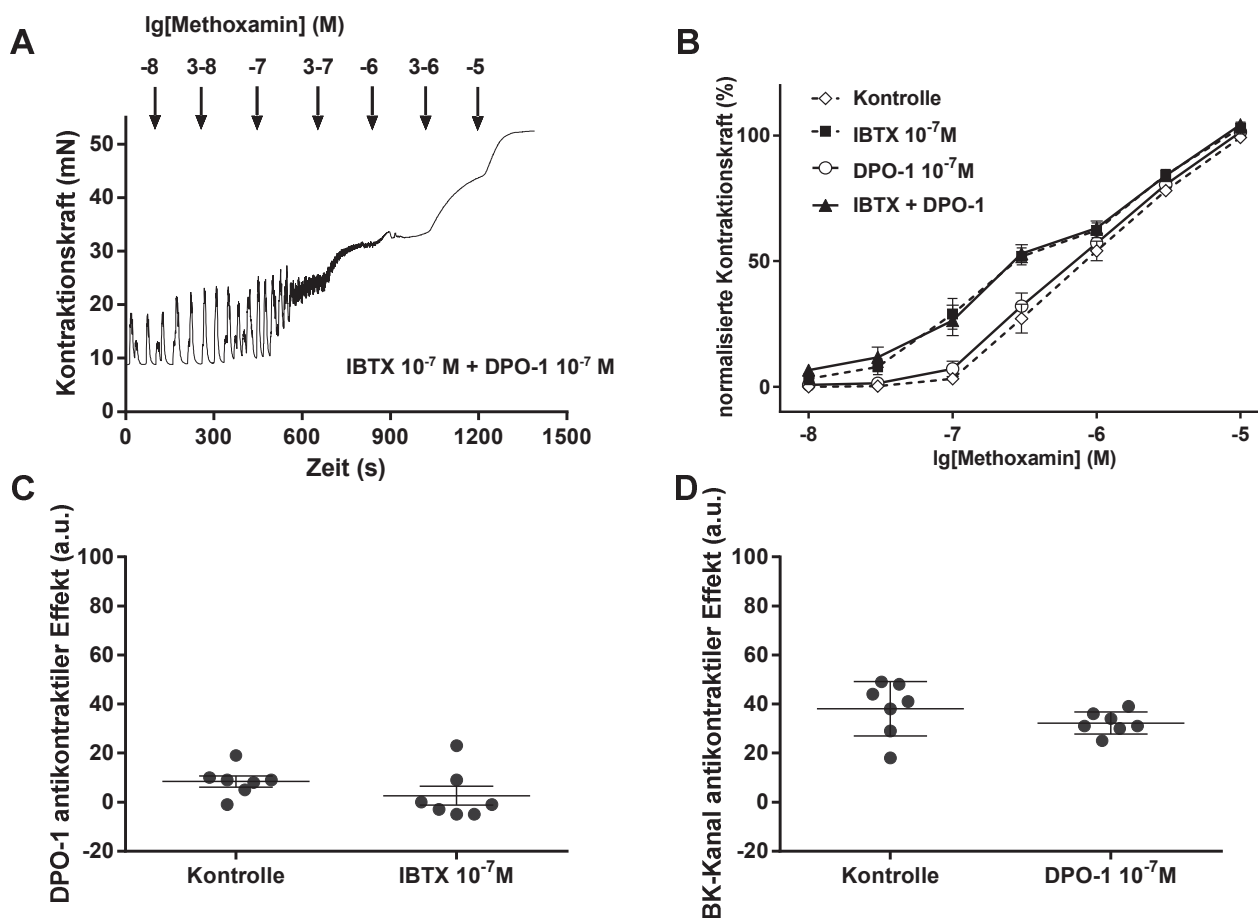


Abb. 64: Wirkung von DPO-1 10^{-7} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und DPO-1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von DPO-1 (Kreis offen, DPO-1 10^{-7} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und DPO-1 (Dreieck geschlossen, IBTX + DPO-1). C: Antikontractiler Effekt von DPO-1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-7} M).

Auch in Gegenwart von 10^{-6} M DPO-1 war die MX-induzierte Kontraktion weiter unverändert (Abb. 65B; n = 8; p = 0,87). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von DPO-1 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen verstärkt (Abb. 65A). Der Effekt von DPO-1

trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 65C; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 15,37 bis 30,88). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-6} M DPO-1 verstärkt (Abb. 65D; $n = 8$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 7,266 bis 38,98).

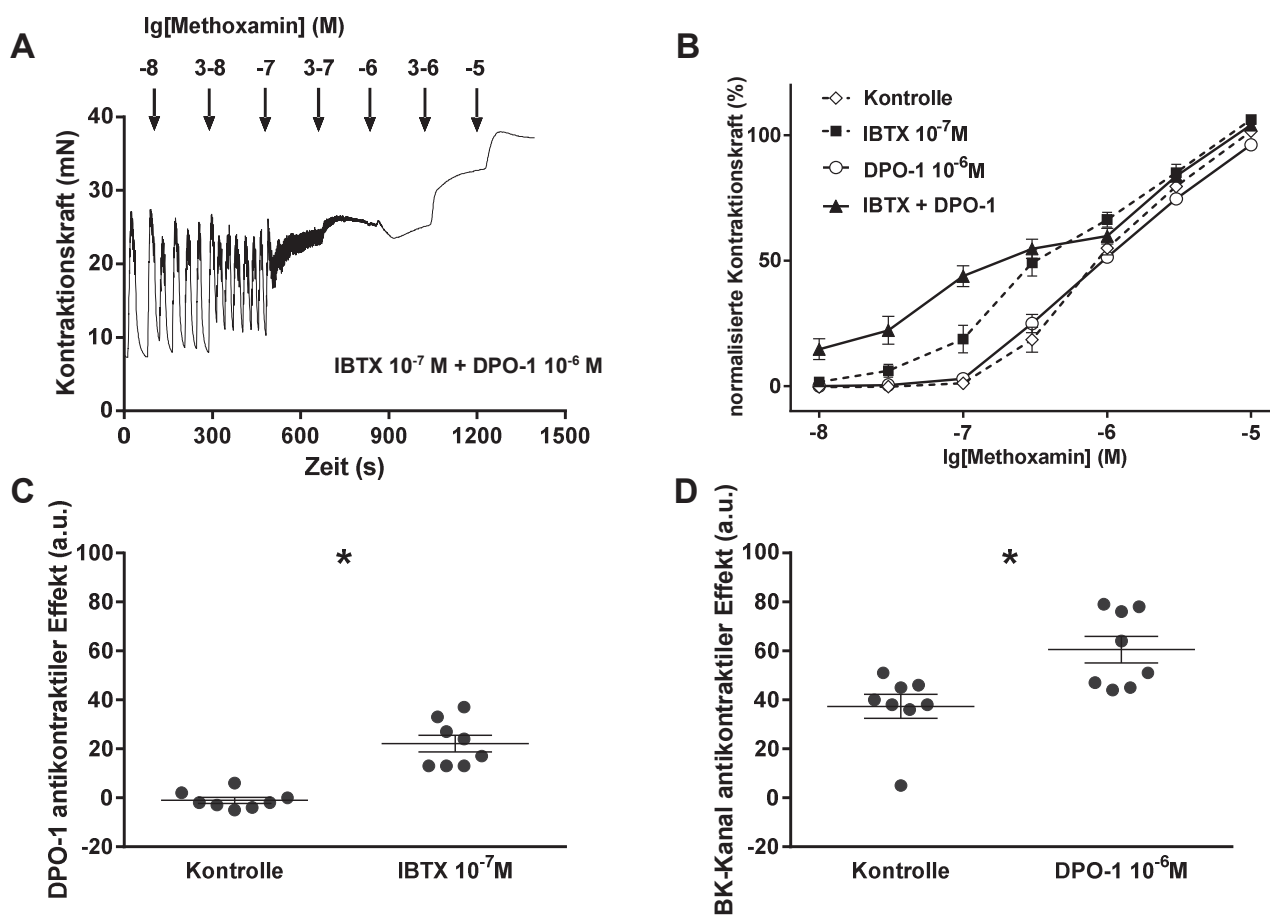


Abb. 65: Wirkung von DPO-1 10^{-6} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und DPO-1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, $IBTX\ 10^{-7}\ M$), in Gegenwart von DPO-1 (Kreis offen, $DPO-1\ 10^{-6}\ M$) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und DPO-1 (Dreieck geschlossen, $IBTX + DPO-1$). C: Antikontractiler Effekt von DPO-1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin ($IBTX\ 10^{-7}\ M$). D:

Antikontraktile Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-6} M).

Als nächstes wurde der Einfluss von Kv2.1-Kanälen untersucht. Dazu wurde deren Blocker Stromatoxin-1 (ScTx-1) verwendet (Escoubas, Diochot et al. 2002). In Gegenwart von 10^{-7} M ScTx-1 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 66B; $n = 10$; $p = 0,76$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von ScTx-1 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen verstärkt (Abb. 66A). Der Effekt von ScTx-1 trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 66C; $n = 10$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 1,654 bis 17,75). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch 10^{-7} M ScTx-1 verstärkt (Abb. 66D; $n = 10$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 2,009 bis 17,39).

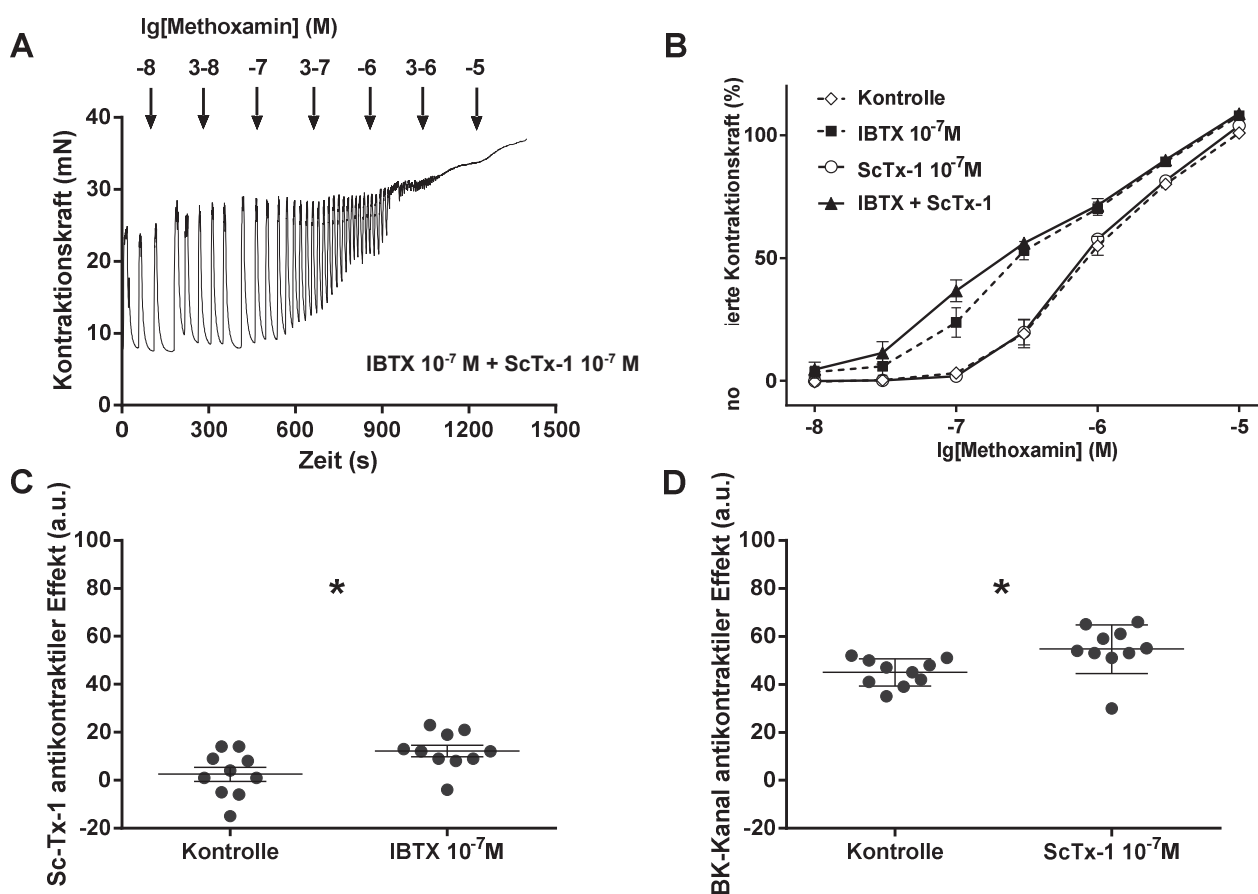


Abb. 66: Wirkung von ScTx-1 10^{-7} M auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und ScTx-1. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von ScTx-1 (Kreis offen, ScTx-1 10^{-7} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und ScTx-1 (Dreieck geschlossen, IBTX + ScTx-1). C: Antikontraktiler Effekt von ScTx-1 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von ScTx-1 (ScTx-1 10^{-7} M).

Der Einfluss von Kv7-Kanälen wurde mit Hilfe von XE991 untersucht (Robbins 2001). In Gegenwart von $3 \cdot 10^{-7}$ M XE991 war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 67B; n = 5; p = 0,94). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von XE991 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 67A). Für den Effekt von XE991 konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 67C; n = 5; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -2,727 bis 18,33). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktilen Effekts des BK-Kanals durch $3 \cdot 10^{-7}$ M XE991 beobachtet (Abb. 67D; n = 5; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -11,28 bis 26,88).

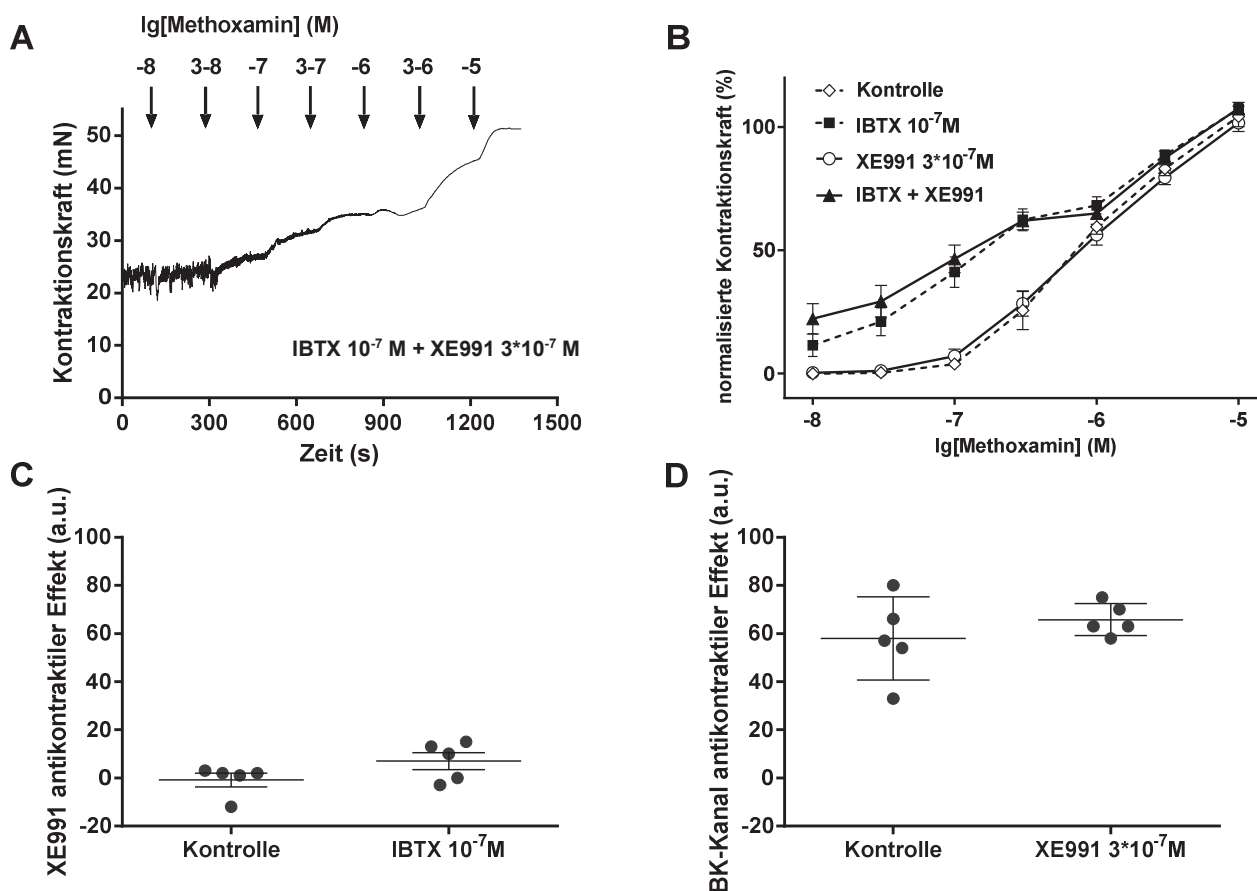


Abb. 67: Wirkung von XE991 $3 \cdot 10^{-7}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von XE991 (Kreis offen, XE991 $3 \cdot 10^{-7}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Dreieck geschlossen, IBTX + XE991). C: Antikontractiler Effekt von XE991 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-7}$ M).

In Gegenwart von XE991 in einer Konzentration von 10^{-6} M war die MX-induzierte Kontraktion weiterhin unverändert (68 n = 7; p = 0,53). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von XE991 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 68A). Für den Effekt von XE991 konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden

werden (Abb. 68C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -42,59 bis 29,74). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktiven Effekts des BK-Kanals durch 10^{-6} M XE991 beobachtet (Abb. 68D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -6,763 bis 61,91).

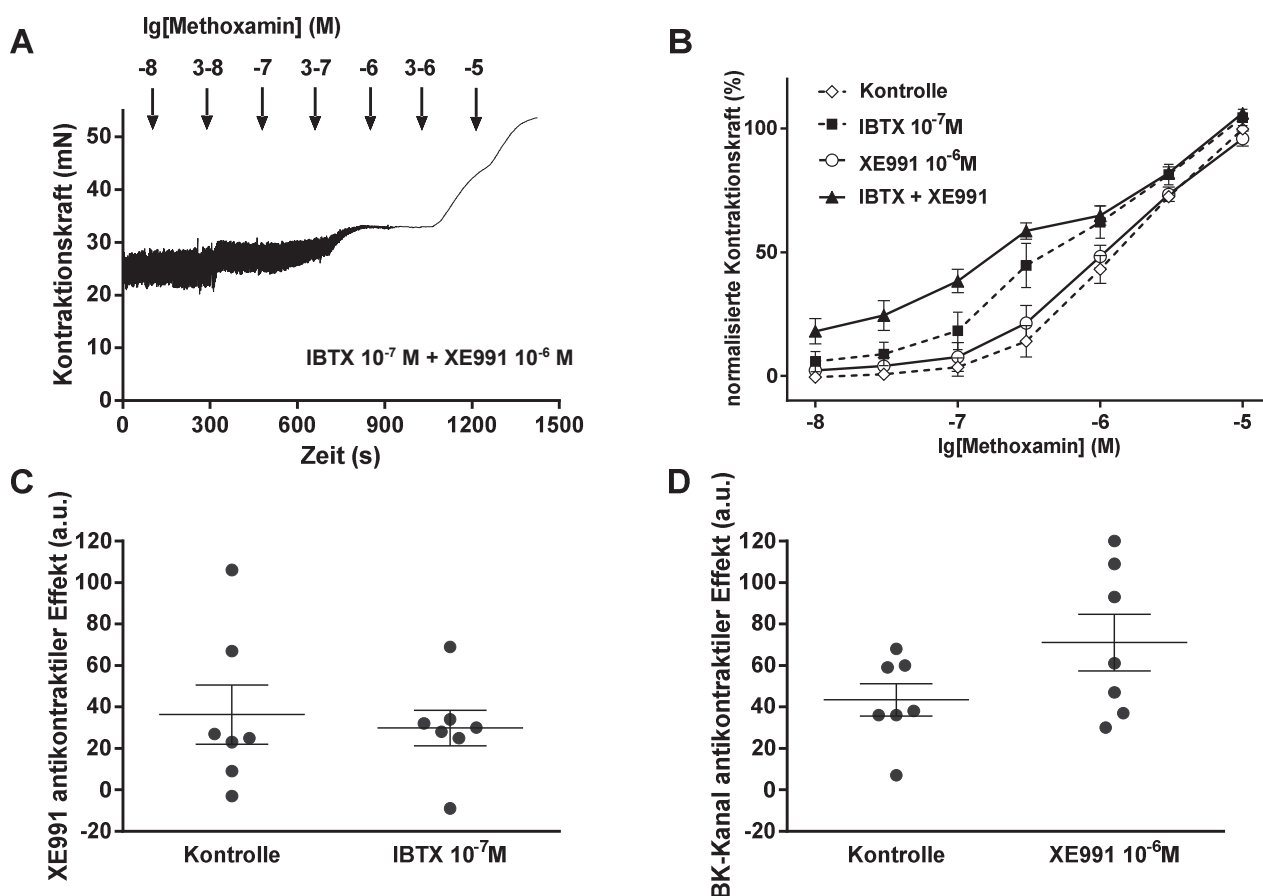


Abb. 68: Wirkung von XE991 10^{-6} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von XE991 (Kreis offen, XE991 10^{-6} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Dreieck geschlossen, IBTX + XE991). C: Antikontractiler Effekt von XE991 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von XE991 (XE991 10^{-6} M).

Auch in Gegenwart von XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 69B; $n = 7$; $p = 0,44$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von XE991 und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 69A). Der Effekt von XE991 trat erst in Anwesenheit von IBTX zu Tage (Abb. 69C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 27,39 bis 48,04). Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 verstärkt (Abb. 69D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: 21,1 bis 54,33).

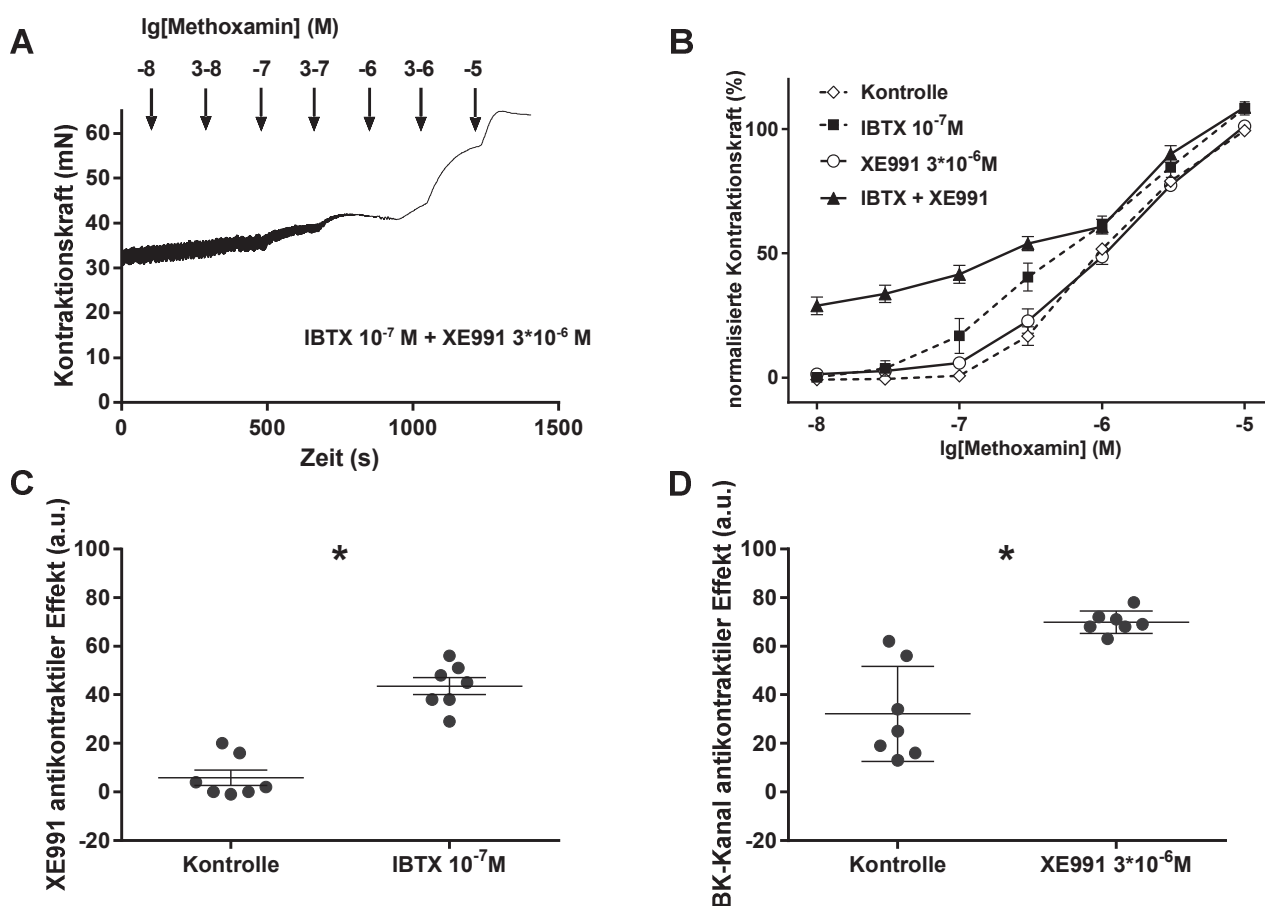


Abb. 69: Wirkung von XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in

Gegenwart von XE991 (Kreis offen, XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Dreieck geschlossen, IBTX + XE991). C: Antikontraktiler Effekt von XE991 in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Da von den getesteten Kv-Kanal-Blockern bei XE991 die stärkste Wirkung zu beobachten war, wurde sich bei der anschließenden Untersuchung der Genexpression auf Kv7-Kanäle fokussiert. Mittels real time PCR wurde die Genexpression der Kanäle KCNQ1 bis KCNQ5 in Schwanzgefäßen mit Endothel und Gefäßen, bei denen das Endothel entfernt wurde, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Kanäle KCNQ1-5 in der Schwanzarterie exprimiert werden. Ein Unterschied zwischen Gefäßen konnte nicht gezeigt werden (Abb. 70; n = 8; p = 0,41).

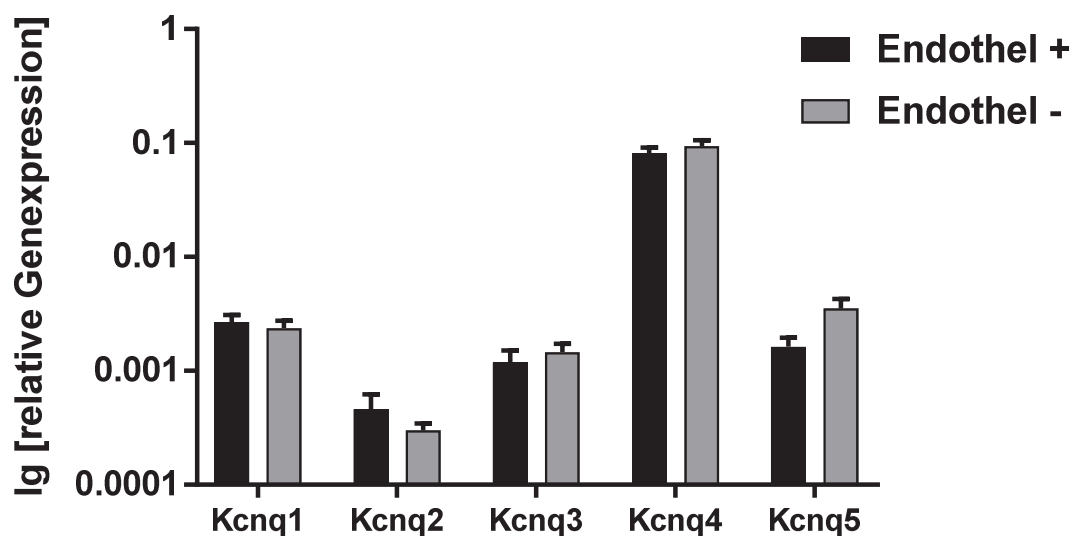


Abb. 70: Einfluss des Endothels auf die Genexpression spannungsabhängiger Kalium-Kanäle. Real time PCR vom Schwanzgefäß mit (schwarz, Endothel +) sowie ohne Endothel (grau, Endothel -). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

Um den Effekt von ATP-sensitiven Kaliumkanälen zu untersuchen, wurde der Blocker Glibenclamid verwendet (Benz and Kohlhardt 1994). In Gegenwart von 10^{-6} M Glibenclamid war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 71B; $n = 7$; $p = 0,68$). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glibenclamid und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 71A). Für den Effekt von Glibenclamid konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 71C; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -15,96 bis 19,1). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktiven Effekts des BK-Kanals durch 10^{-6} M Glibenclamid beobachtet (Abb. 71D; $n = 7$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -23,87 bis 16,73).

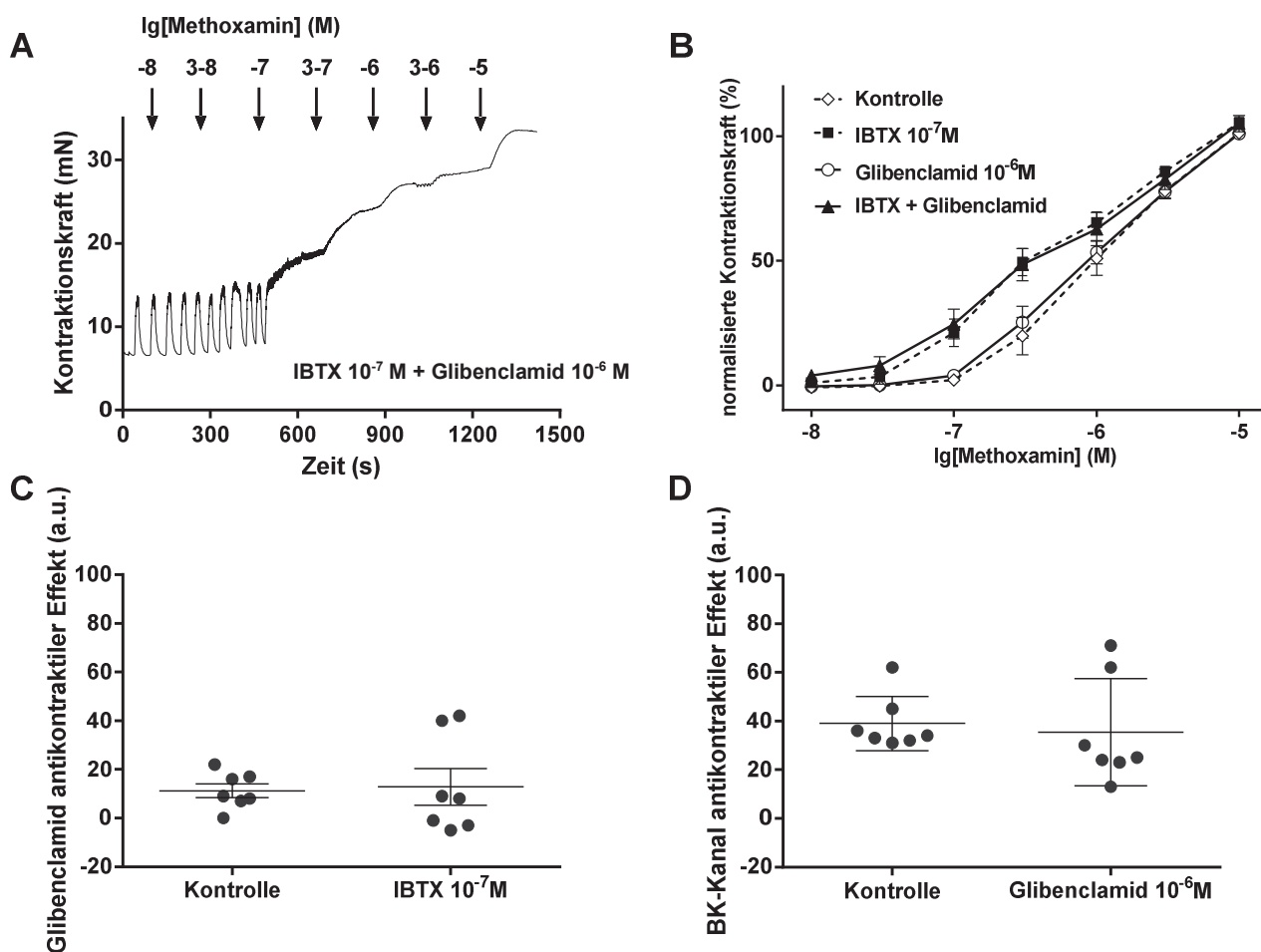


Abb. 71: Wirkung von Glibenclamid 10^{-6} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals.

A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von

Iberiotoxin und Glibenclamid. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Glibenclamid (Kreis offen, Glibenclamid 10^{-6} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Glibenclamid (Dreieck geschlossen, IBTX + Glibenclamid). C: Antikontraktiler Effekt von Glibenclamid in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Glibenclamid (Glibenclamid 10^{-6} M).

Um den Einfluss einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) zu untersuchen, wurde der Blocker Bariumchlorid verwendet (Quayle, McCarron et al. 1993). In Gegenwart von 10^{-5} M Bariumchlorid war die MX-induzierte Kontraktion unverändert (Abb. 72B; n = 8; p = 0,42). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Bariumchlorid und IBTX waren die phasischen Kontraktionen weiterhin vorhanden (Abb. 72A). Für den Effekt von Bariumchlorid konnte keine Beeinflussung durch IBTX gefunden werden (Abb. 72C; n = 8; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -17,8 bis 16,55). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktilen Effekts des BK-Kanals durch 10^{-5} M Bariumchlorid beobachtet (Abb. 72D; n = 8; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -16,17 bis 14,92).

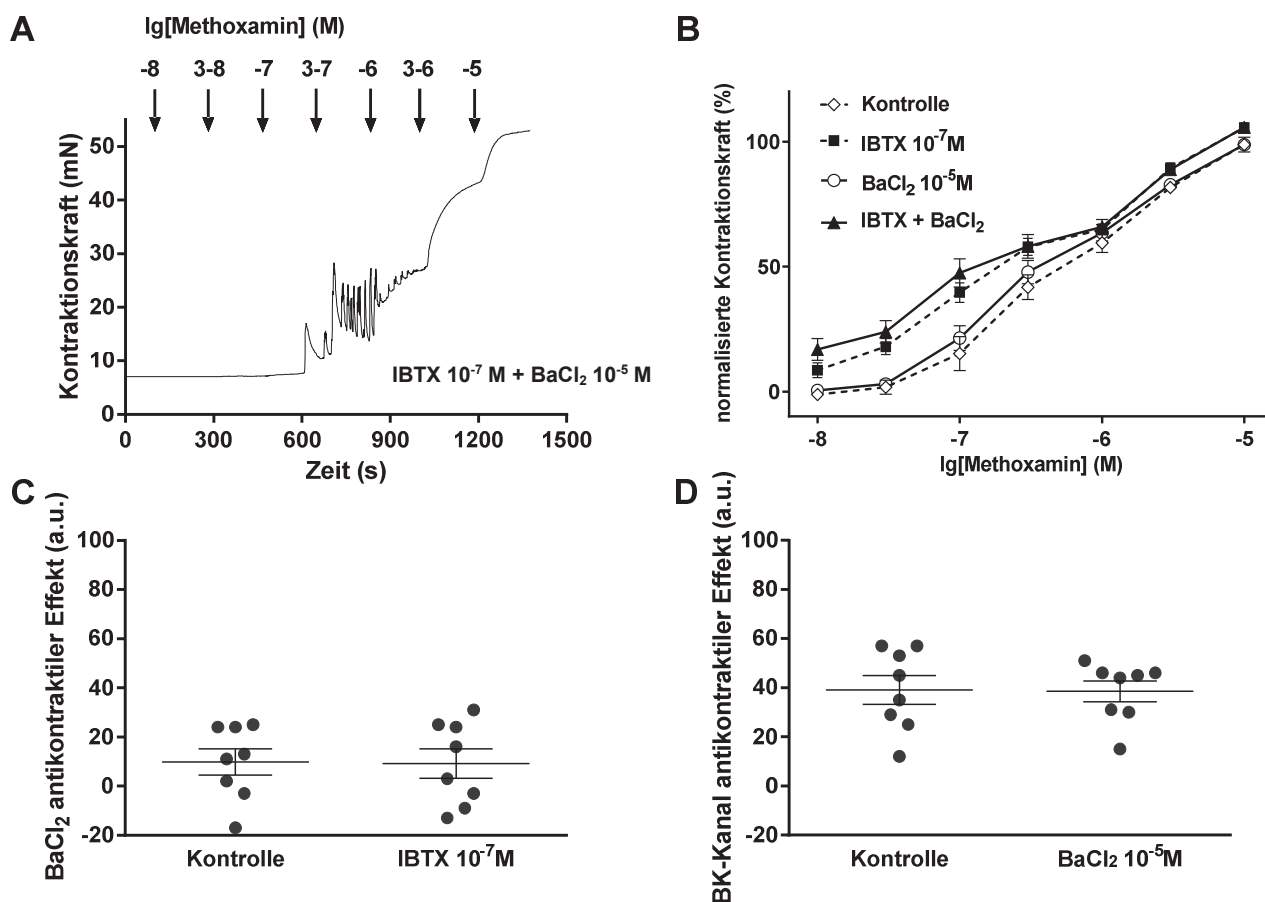


Abb. 72: Wirkung von Bariumchlorid 10^{-5} M auf den antikontractilen Effekt des BK-Kanals. A: Originaldaten der MX-induzierten Gefäßkontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Bariumchlorid. B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), in Gegenwart von Iberiotoxin (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M), in Gegenwart von Bariumchlorid (Kreis offen, BaCl₂ 10^{-5} M) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und Bariumchlorid (Dreieck geschlossen, IBTX + BaCl₂). C: Antikontractiler Effekt von Bariumchlorid in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Iberiotoxin (IBTX 10^{-7} M). D: Antikontractiler Effekt des BK-Kanals in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit von Bariumchlorid (BaCl₂ 10^{-5} M).

Abschließend wurde die Genexpression ATP-sensitiver (Kir6.1- und Kir6.2) und einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle (Kir2.1- bis Kir2.4) sowie der SUR-Untereinheiten mittels real time PCR untersucht. Die Genexpression wurde sowohl in

Schwanzgefäßen mit Endothel als auch in Gefäßen, bei denen das Endothel entfernt wurde, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Kir-Kanäle in der Schwanzarterie exprimiert werden. Ein Unterschied zwischen Gefäßen mit und ohne Endothel konnte weder für Kir2.x-Kanäle (Abb. 73; $n = 8$; $p = 1,00$) noch für die SUR-Untereinheiten und Kir6.x-Kanäle gefunden werden (Abb. 74; $n = 8$; $p = 0,42$).

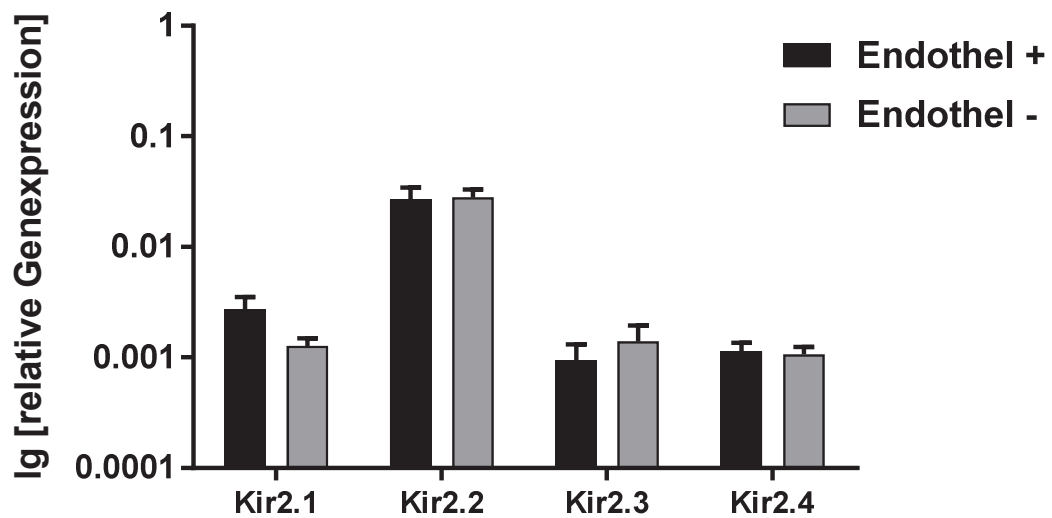


Abb. 73: Einfluss des Endothels auf die Genexpression der Kir2.x-Kanäle. Real time PCR vom Schwanzgefäß mit (schwarz, Endothel +) sowie ohne Endothel (grau, Endothel -). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

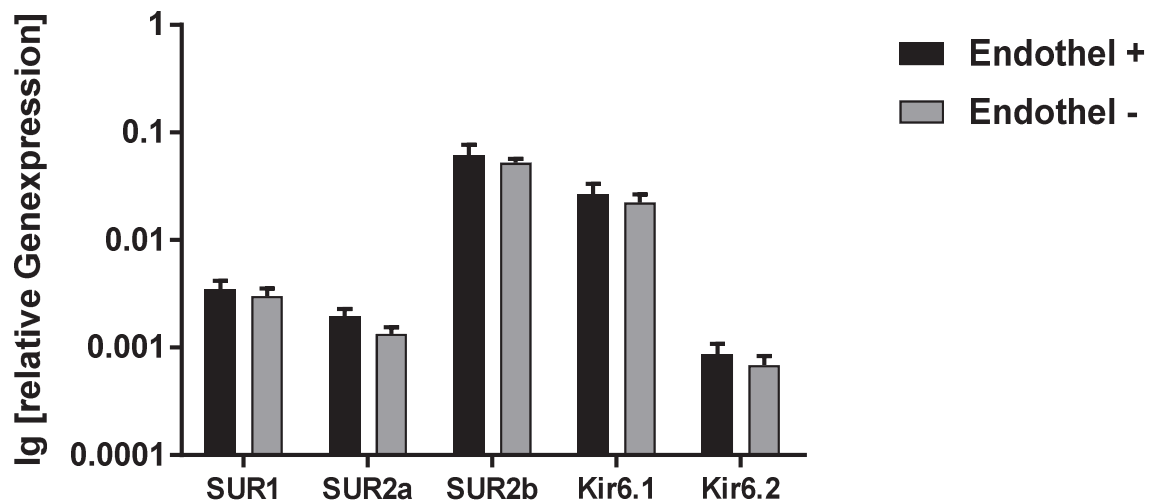


Abb. 74: Einfluss des Endothels auf die Genexpression der SUR-Untereinheiten sowie der Kir6.x-Kanäle. Real time PCR vom Schwanzgefäß mit (schwarz, Endothel +) sowie ohne Endothel (grau, Endothel -). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

Kir-Kanäle werden also teilweise in der Schwanzarterie exprimiert, der von uns verwendete Blocker war jedoch nicht wirksam. Da zudem die Expressionsrate der Kir-Kanäle nicht vom Diabetes beeinflusst wurde, wurde sich für die Untersuchung der Interaktion des BK-Kanals mit anderen Kaliumkanälen bei Diabetes auf Kv7-Kanäle beschränkt.

Die Interaktion von BK- und Kv-Kanälen bei Diabetes

Um zu untersuchen, ob Diabetes Einfluss auf die Interaktion von Kv- und BK-Kanälen hat, wurden anschließend Versuche mit den Gefäßen diabetischer Tiere durchgeführt. Dabei wurde sich auf die Interaktion zwischen BK- und Kv7-Kanälen beschränkt, da hierbei die größten Effekte auftraten.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10^{-7} M IBTX und $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 war die MX-induzierte Kontraktion sowohl in Gefäßen diabetischer (Abb. 75A; $n = 5$; $p < 0,001$) als auch in Gefäßen gesunder Tiere (Abb. 75A; $n = 5$; $p < 0,01$) verstärkt. BK- und Kv7-Kanäle zeigten also gemeinsam einen antikonstraktiven Effekt. Bei gleichzeitiger

Anwesenheit von 10^{-7} M IBTX und $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 war die MX-induzierte Kontraktion auch im Vergleich zu einer alleinigen Anwesenheit von XE991 verstärkt. Dies galt sowohl für Gefäße diabetischer (Abb. 75B; $n = 6$; $p < 0,01$) als auch für die Gefäße gesunder Tiere (Abb. 75B; $n = 6$; $p < 0,01$). Der BK-Kanal zeigte also auch in Gegenwart von XE991 einen antikontraktiven Effekt. Für den antikontraktiven Effekt von BK- und Kv7-Kanal konnte keine Beeinflussung durch Diabetes beobachtet werden (Abb. 75C; $n = 5$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -10,88 bis 55,28). Es wurde auch keine Beeinflussung des antikontraktiven Effekts des BK-Kanals in Abwesenheit des Kv7-Kanals durch Diabetes beobachtet (Abb. 75D; $n = 6$; 95 %-KI der Mittelwertdifferenz: -31,43 bis 22,77).

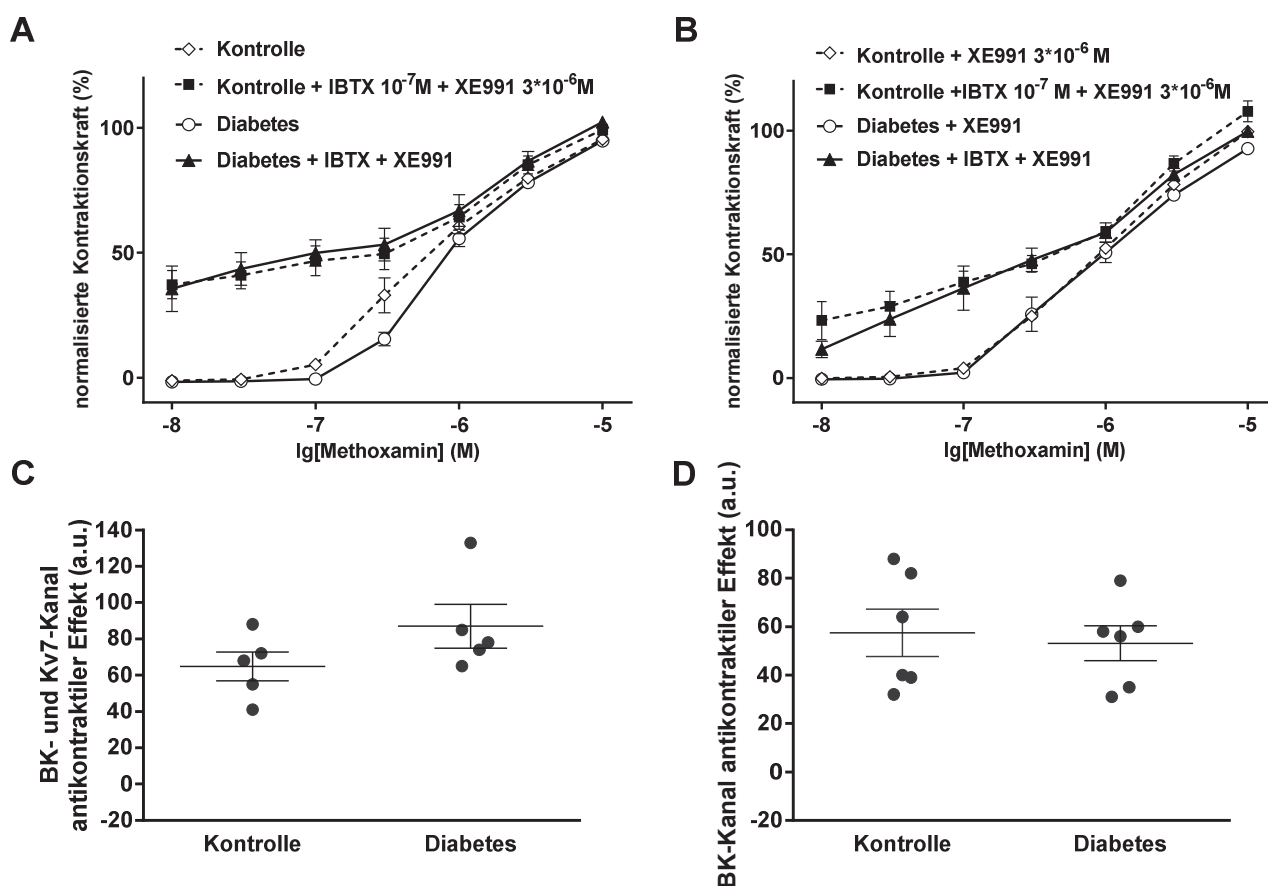


Abb. 75: Wirkung von XE991 auf den antikontraktiven Effekt des BK-Kanals bei Diabetes.

A: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere unter

Kontrollbedingungen (Raute offen, Kontrolle), von Gefäßen gesunder Tiere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Quadrat geschlossen, IBTX 10^{-7} M + XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M), von Gefäßen diabetischer Tiere unter Kontrollbedingungen (Kreis offen, Diabetes) und von Gefäßen diabetischer Tiere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX + XE991). B: Mittelwerte der Kontraktionsamplituden von Gefäßen gesunder Tiere in Gegenwart von XE991 (Raute offen, Kontrolle + XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M), von Gefäßen gesunder Tiere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Quadrat geschlossen, Kontrolle + IBTX 10^{-7} M + XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M), von Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von XE991 (Kreis offen, Diabetes + XE991) und von Gefäßen diabetischer Tiere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Iberiotoxin und XE991 (Dreieck geschlossen, Diabetes + IBTX + XE991). C: Antikontraktiler Effekt von BK- und Kv7-Kanal bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes). D: Antikontraktiler Effekt des BK-Kanals nach Ausschaltung von Kv7 Kanälen bei Gefäßen gesunder Tiere (Kontrolle) bzw. bei Gefäßen diabetischer Tiere (Diabetes).

Die Genexpression spannungsabhängiger Kalium-Kanäle wurde in den Gefäßen gesunder und diabetischer Tiere mittels real time PCR untersucht. Es wurde dabei kein Unterschied zwischen der Genexpression in diabetischen Gefäßen im Vergleich zu Kontrollgefäßen gefunden (Abb. 76, $n = 4$, $p = 0,94$).

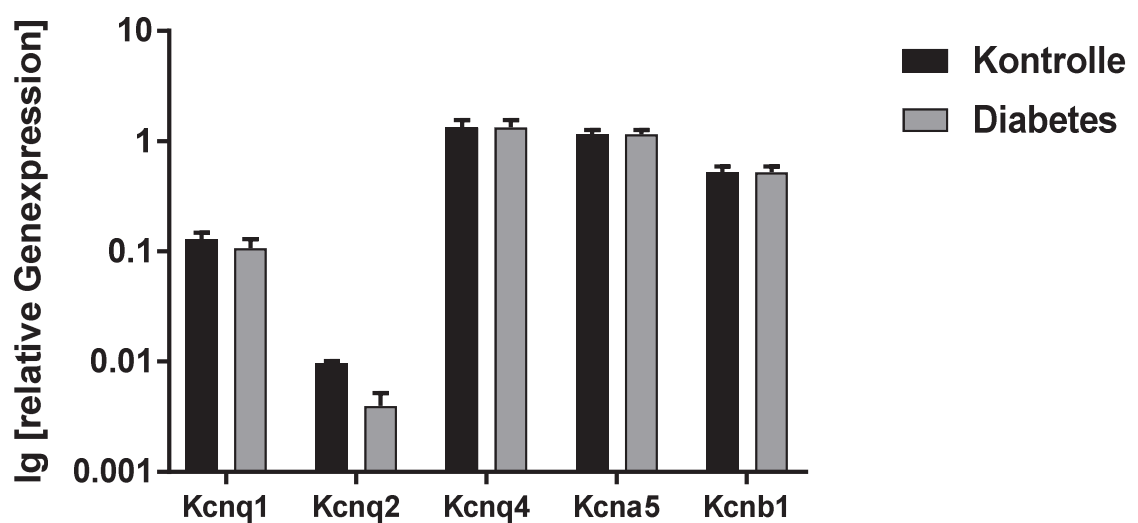


Abb. 76: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Real time PCR vom Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

Des Weiteren fand eine detailliertere Untersuchung verschiedener spannungsabhängiger sowie einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle mit Hilfe von Micro Fluidic Cards (MFC) statt. Es konnte dabei kein Unterschied in der Genexpression in diabetischen Gefäßen im Vergleich zu Kontrollgefäßen gefunden werden. Das gilt sowohl für spannungsabhängige (Abb. 77, $n = 4$, $p = 0,94$) als auch für einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Abb. 78; $n = 4$; $p = 0,32$).

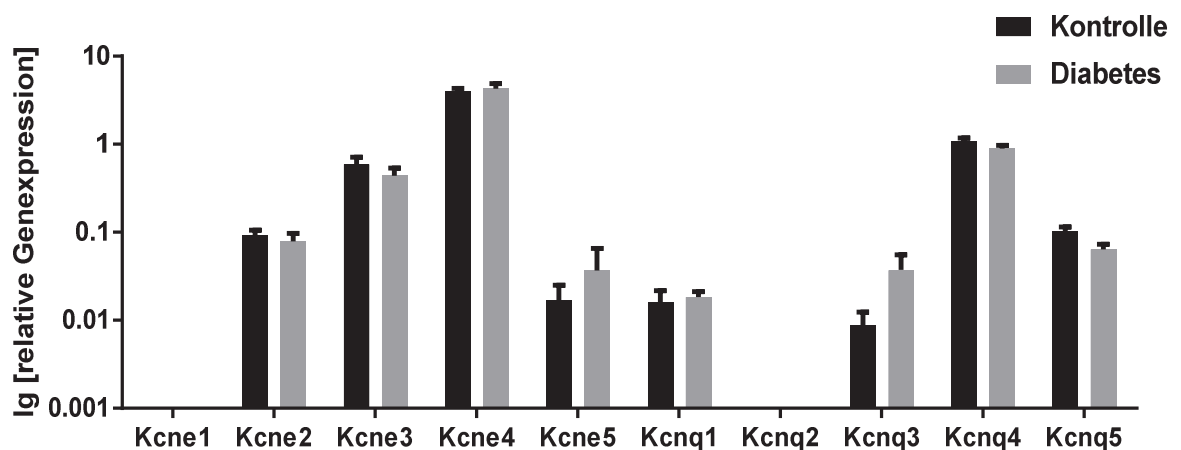


Abb. 77: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression spannungsabhängiger Kaliumkanäle. MFC-Analyse vom Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

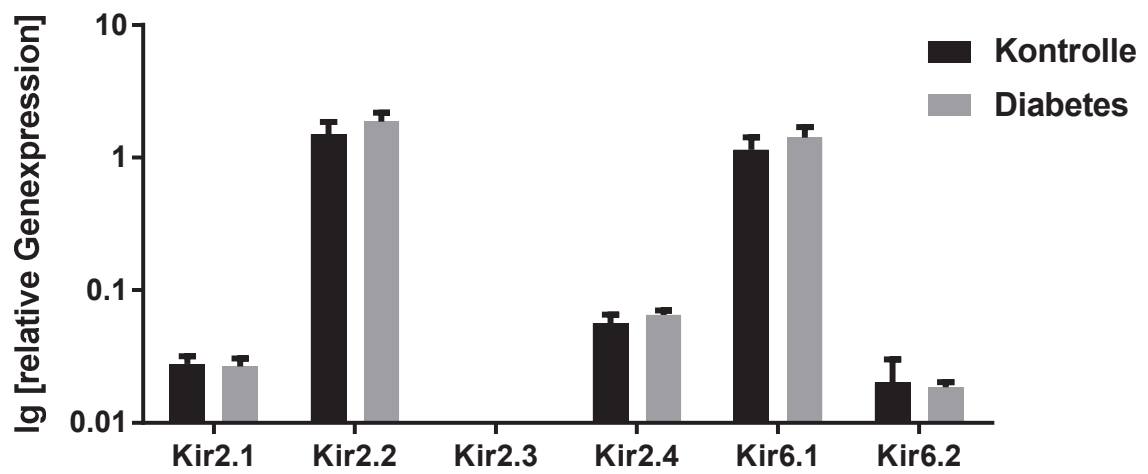


Abb. 78: Wirkung von Diabetes auf die Genexpression der Kir2.x und Kir6.x-Kanäle. MFC-Analyse im Schwanzgefäß gesunder (schwarz, Kontrolle) sowie diabetischer Tiere (grau, Diabetes). Genexpression dargestellt relativ zu GAPDH.

4 Diskussion

4.1 Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals

Der BK-Kanal spielt aufgrund seines negativen Feedbackmechanismus eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, indem er die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit die Kontraktion der Gefäße begrenzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des BK-Kanals zu einer stärkeren Gefäßkontraktion und einer höheren Calciumkonzentration in der Zelle führt. Verstärkte Kontraktionen in Gegenwart von IBTX konnten in vielen vorangegangenen Studien nachgewiesen werden und bestätigen die hier vorgelegten Befunde, zum Beispiel an isolierten glatten Muskelzellen der Blase bei Maus (Herrera, Etherton et al. 2005, Brown, Bentcheva-Petkova et al. 2008) und Mensch (Hristov, Cui et al. 2008), an Koronararterien des Schweins (Yu, Ma et al. 2011), an Femoralarterien der Ratte (Leung, Leung et al. 2006) oder an Cremasterarterien (sowohl an isolierten glatten Muskelzellen als auch bei *in vivo* Versuchen) des Hamsters (Jackson and Blair 1998).

Es ist also gut etabliert, dass der BK-Kanal also die Kontraktion der Gefäße begrenzt, indem er einen zu großen Anstieg der Calciumkonzentration in den glatten Muskelzellen verhindert.

4.2 Die Umwandlung phasischer in tonische Kontraktionen durch den BK-Kanal

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des BK-Kanals zu Gefäßoszillationen führt. Deren Charakteristik war dabei abhängig vom Kontraktionszustand der untersuchten Arterien. Bei geringem Kontraktionsniveau konnten Oszillationen mit großer Frequenz und Amplitude beobachtet werden, welche von Oszillationen mit kleiner Frequenz und Amplitude überlagert wurden. Mit steigendem Kontraktionsniveau waren nur noch Oszillationen mit kleiner Frequenz und Amplitude zu sehen, welche bei stark kontrahierten Arterien schließlich ganz

verschwanden. Der BK-Kanal wandelt also phasische in tonische Kontraktionen um. Die gefäßtypischen tonischen Kontraktionen sind damit, zumindest bei den hier untersuchten Gefäßen, nicht der kontraktile Grundzustand. Dieser ist vielmehr durch phasische Kontraktionen charakterisiert, die nur durch die Aktivität des BK Kanals nicht zu Tage treten. Ähnliche Beobachtungen konnten in vorangegangenen Studien gemacht werden. Die Inhibierung des BK-Kanals mittels Iberiotoxin führte dabei zu Oszillationen von Membranpotential und Gefäßspannung bei isolierten Zerebralarterien der Ratte (McNeish, Altayo et al. 2010, Yuill, McNeish et al. 2010). Hier wurden die Arterien jedoch auf ein bestimmtes Niveau vorkontrahiert, bevor der BK-Kanal inhibiert wurde. Daher konnte aus diesen Studien nicht abgeleitet werden, ob sich die Charakteristik der Oszillationen mit steigender Gefäßkontraktion verändert. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien, dass inhibierte BK-Kanäle zwar zu einer verstärkten Gefäßkontraktion von isolierten Koronararterien des Hundes und Zerebralarterien der Ratte führen, es traten jedoch keine Oszillationen auf. In diesen Untersuchungen wurden die BK-Kanäle jedoch nicht mit Iberiotoxin, sondern mit Penitrem A (Asano, Bratz et al. 2012) bzw. Paxillin (Harraz, Abd El-Rahman et al. 2014) inhibiert. Die Inhibierung anderer Kaliumkanäle, wie beispielsweise K_V - oder K_{ATP} -Kanäle, führte in der vorliegenden Studie nicht zu Gefäßoszillationen. Dies wird auch durch vorangegangene Studien an Koronararterien des Schweins (Hedegaard, Nielsen et al. 2014) und Mesenterialarterien der Ratte (Davie, Kubo et al. 1998) bestätigt. Es handelt sich bei den beobachteten Oszillationen also um einen spezifischen Effekt des BK-Kanals. Da in den erwähnten Untersuchungen von Asano et al. und Harraz et al. (Asano, Bratz et al. 2012, Harraz, Abd El-Rahman et al. 2014) keine Oszillationen bei Inhibierung des BK-Kanals mit anderen Blockern als IBTX zu sehen waren, könnte es sich bei den in Gegenwart von IBTX beobachteten Oszillationen um einen IBTX-spezifischen Effekt handeln. Die Rolle des BK Kanals könnte in verschiedenen Gefäßen jedoch auch unterschiedlich sein. Zur Klärung dieser gegensätzlichen Daten ist eine systematische vergleichende Studie an Gefäßen aus unterschiedlichen Organen und unterschiedliche Größe notwendig. Diese würde jedoch den Rahmen der hier vorgelegten Untersuchungen überschreiten.

Um die Hypothese zu untersuchen, dass die beobachteten Oszillationen durch eine gap junction vermittelte Synchronisation von Calcium-Wellen einzelner glatter Muskelzellen

entstehen, wurde der Einfluss der gap junctions mittels des Blockers 18α -Glycyrrhetinsäure getestet (Davidson, Baumgarten et al. 1986). Bei blockierten gap junctions waren die IBTX-induzierten Oszillationen in der vorliegenden Studie weiterhin vorhanden, diese waren jedoch reduziert. Diese unvollständige Eliminierung der Oszillationen lässt darauf schließen, dass es durch den verwendeten Blocker 18α -Glycyrrhetinsäure nur zu einer unvollständigen Blockade der gap junctions kam. Um unspezifische Effekte des Blockers in höheren Konzentrationen zu vermeiden, konnte dieser jedoch nicht in einer höheren Konzentration verwendet werden (Matchkov, Rahman et al. 2004). Es ist davon auszugehen, dass Gefäßoszillationen ihren Ursprung in den Calcium-Wellen einzelner glatter Muskelzellen haben. Laufen diese Calcium-Wellen nicht synchronisiert ab, zeigt das Gefäß eine tonische Kontraktion. Kommt es jedoch zur Synchronisation der glatten Muskelzellen, kann die phasische Kontraktion nicht mehr in tonische umgewandelt werden und es kommt zur Vasomotion. Die hier vorgelegten Befunde lassen darauf schließen, dass sich bei blockierten BK-Kanälen und damit vergrößertem Membranwiderstand Änderungen des Membranpotentials weiter über die Gefäßwand ausbreiten können und damit mehr Zellen synchronisieren. Bei teilweise blockierten gap junctions breiten sich Änderungen des Membranpotentials hingegen nicht mehr so weit aus. Damit wird der Effekt des IBTX nur reduziert.

Der BK-Kanal spielt also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäßspannung, indem er einerseits die Kontraktion der Gefäße begrenzt und andererseits phasische Kontraktionen in tonische umwandelt. Der BK Kanal hat also eine antikontraktile und eine phasische Kontraktionen unterdrückende, antioszillatorische Schutzfunktion. Damit leistet der BK-Kanal einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen, an unterschiedliche Bedingungen angepassten Blutflusses in den Arterien.

4.3 Calciumtransportprozesse beeinflussen die Schutzfunktion des BK-Kanals gegen phasische Kontraktionen

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit die IBTX-induzierten Oszillationen von verschiedenen Calciumtransportprozessen beeinflusst werden. Zunächst wurden dazu der Einfluss von IP₃-Rezeptoren, Ryanodin-Rezeptoren sowie der SERCA untersucht.

IP₃-Rezeptoren

Bei mittels 2-APB inhibierten IP₃-Rezeptoren (Peppiatt, Collins et al. 2003) war die MX-induzierte Kontraktion der Arterien abgeschwächt, die Oszillationen waren jedoch weiterhin vorhanden. Es konnte also kein Hinweis darauf gefunden werden, dass IP₃-Rezeptoren an der Umwandlung von phasischen in tonische Kontraktionen beteiligt sind. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen vorangegangener Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Calcium-Wellen in glatten Muskelzellen in Gegenwart von 2-APB stark reduziert waren (Hennig, Smith et al. 2002, Navarro-Dorado, Garcia-Alonso et al. 2014). Allerdings wurden in diesen Studien Calcium-Wellen an isolierten glatten Muskelzellen bestimmt, welche erst Auswirkungen auf den Gefäßtonus hätten, wenn es zur Synchronisierung der Zellen kommt. Die MX-induzierte Kontraktion war zwar bei der Verwendung von 10⁻⁵ M 2-APB abgeschwächt, der antikontraktile Effekt von 2-APB wurde jedoch nicht von IBTX beeinflusst. Noch wichtiger in Bezug auf die untersuchte Fragestellung war, dass der antikontraktile Effekt des BK-Kanals nicht durch 2-APB beeinflusst wurde. Bemerkenswert dabei ist, dass 2-APB in dieser Konzentration die MX-induzierte Calcium-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern und auch den kapazitiven, durch Entleerung der Calcium-Speicher induzierten Calciumeinstrom deutlich reduzierte (Bachelorarbeit D. Heppeler, unveröffentlicht). Auch in Gegenwart von 3*10⁻⁵ M 2-APB, welches die MX-induzierte Kontraktion stark reduzierte, waren die Oszillationen bei gleichzeitiger Anwesenheit von IBTX immer noch stark ausgeprägt. Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war in Gegenwart dieser Konzentration von 2-

APB jedoch abgeschwächt. Durch die starke Suppression der Kontraktion durch $3 \cdot 10^{-5}$ M 2-APB ist ein direkter numerischer Vergleich der antikontraktile Effekte des BK Kanals in Abwesenheit und in Anwesenheit von 2-APB allerdings schwierig zu interpretieren. Leider konnten wir keine Kontrollversuche vornehmen, die zeigen würden, wie sich der antikontraktile Effekt des BK Kanals darstellt, wenn es zu einer starken Suppression der MX-induzierten Kontraktion kommt, bei der der BK Kanal mit Sicherheit nicht beeinflusst wird. Solche Kontrollversuche wurden versucht, indem die MX-induzierte Kontraktion durch Aktivierung der MLCP über eine Inhibierung der Rho-Kinase abgeschwächt wurde. Da die MLPC nicht von Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration oder des Membranpotentials beeinflusst wird, ist sie unabhängig von der Aktivität von Ionenkanälen. Bei einer Inhibierung der Rho-Kinase mit Hilfe des selektiven Inhibitors H1152 (Sasaki, Suzuki et al. 2002, Breitenlechner, Gassel et al. 2003) in einer Konzentration, die eine ähnlich große Wirkung auf die MX-induzierte Kontraktion wie $3 \cdot 10^{-5}$ M 2-APB hatte, war jedoch auch die intrazelluläre Calciumkonzentration reduziert (Bachelorarbeit D. Heppeler, unveröffentlicht). Dieser Befund lässt sich gut mit der bekannten und wohl auch in den hier untersuchten Gefäßen vorkommenden aktivierenden Wirkung der Rho-Kinase auf Calciumkanäle erklären (Ghisal, Vandenberg et al. 2003, Villalba, Stankevicius et al. 2008), macht diesen Versuch als von Ionenkanälen unabhängigen Kontrollversuch zu 2-APB jedoch nutzlos. Unter Abwägung aller Umstände interpretieren wir die Reduktion des antikontraktile Effekts des BK-Kanals in Anwesenheit von $3 \cdot 10^{-5}$ M 2-APB eher als Folge der starken Reduktion der MX-induzierten Kontraktion und nicht als Ausdruck der Verringerung der funktionellen Verfügbarkeit des BK-Kanals. Im Gegensatz zu diesen Befunden ist in der Literatur beschrieben, dass IP_3 -Rezeptoren für die Aktivität des BK-Kanals verantwortlich sein können (Boittin, Macrez et al. 1999, Westcott and Jackson 2011, Yang, Li et al. 2013). Zusammengefasst zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass IP_3 -Rezeptoren eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, insbesondere bei der MX-induzierten Kontraktion spielen, da der Calciumausstrom aus dem SR in die glatte Muskelzelle bei inhibierten IP_3 -Rezeptoren reduziert und damit die Gefäßkontraktion vermindert wurde. Die Calciumfreisetzung über IP_3 -Rezeptoren scheint jedoch kein

entscheidender Mechanismus für die antikontraktile und die antioszillatorische Schutzfunktion der BK-Kanäle zu sein.

Ryanodin-Rezeptoren

Des Weiteren wurde der Einfluss von Ryanodin-Rezeptoren auf die antioszillatorische Schutzfunktion des BK-Kanals mittels Ryanodin untersucht. Dabei wurde Ryanodin in einer Konzentration verwendet, welche eine Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren bewirkt (Lanner, Georgiou et al. 2010). Hier zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt. Bei der höheren Ryanodin-Konzentration war die MX-induzierte Gefäßkontraktion abgeschwächt. Der antikontraktile Effekt von Ryanodin war in Gegenwart von IBTX verstärkt, der antikontraktile Effekt des BK-Kanals in Anwesenheit von Ryanodin aufgehoben. Die Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren erzeugte eine erhöhte basale Calciumkonzentration in der Zelle und einen erhöhten basalen Tonus der Gefäße. Allerdings führte das auch zu einer Entleerung der Speicher und einer starken Reduzierung der MX-induzierten Calcium-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (Bachelorarbeit D. Heppeler, unveröffentlicht). Beide Effekte scheinen sich fast zu neutralisieren, so dass die MX-induzierte Kontraktion unter Ryanodin nur leicht abgeschwächt ist. Im Detail unterscheiden sich die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit und Abwesenheit von Ryanodin jedoch deutlich. So waren die IBTX-induzierten Oszillationen schon in Gegenwart der niedrigeren der getesteten Ryanodin Konzentrationen fast völlig abwesend und bei der höheren Ryanodin-Konzentration vollständig aufgehoben. Ryanodin-Rezeptoren bzw. gefüllte intrazelluläre Speicher scheinen also an der Erzeugung phasischer Kontraktionen beteiligt zu sein. Dies konnte ebenfalls im Zusammenhang mit Calcium-Wellen an isolierten Cremasterarterien der Maus gezeigt werden (Westcott, Goodwin et al. 2012). Des Weiteren führte die Blockade der Ryanodin-Rezeptoren zur Aufhebung des antikontraktilen Effekts des BK Kanals. Dieser Effekt des BK Kanals hängt also von den Ryanodin-Rezeptoren bzw. gefüllten intrazellulären Speicher ab. Die Ryanodin-Rezeptoren bzw. gefüllte intrazelluläre Speicher sind damit Voraussetzung für die Entstehung von Oszillationen und gleichzeitig

für die Aktivierung des BK Kanals zur Erfüllung seiner antioszillatorischen und antikontraktilen Schutzfunktion.

Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)

Der Einfluss der SERCA auf die antioszillatorische Schutzfunktion des BK Kanals wurde mittels des Blockers CPA untersucht (Seidler, Jona et al. 1989, Suzuki, Muraki et al. 1992). CPA allein zeigte keinen Einfluss auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion, dieser zeigte sich erst in Gegenwart von IBTX. So war der antikontraktile Effekt von CPA in Gegenwart von IBTX verstärkt, der antikontraktile Effekt des BK-Kanals in Anwesenheit von CPA aufgehoben. Die Blockade der SERCA erzeugte auf Grund des fehlenden Rücktransports des intrazellulären Calciums ins SR eine erhöhte basale Calciumkonzentration in der Zelle und einen erhöhten basalen Tonus der Gefäße. Allerdings führte dies auch zu einer Entleerung der Speicher und damit zu einer starken Reduzierung der MX-induzierten Calcium-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (Bachelorarbeit D. Heppeler, unveröffentlicht). Beide Effekte scheinen sich nahezu auszugleichen, so dass die MX-induzierte Kontraktion unter CPA weitestgehend unverändert war. Bei einer detaillierten Betrachtung unterscheiden sich die MX-induzierte Kontraktion in Anwesenheit und Abwesenheit von CPA jedoch deutlich voneinander. So waren die IBTX-induzierten Oszillationen bei der niedrigeren der getesteten CPA-Konzentrationen reduziert und bei der höheren CPA-Konzentrationen nicht mehr vorhanden. Die SERCA bzw. gefüllte intrazelluläre Speicher scheinen also an der Erzeugung phasischer Kontraktionen beteiligt zu sein. Darauf geben auch vorangegangene Studien einen Hinweis, in welchen gezeigt werden konnte, dass die SERCA-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Calcium-Wellen in glatten Muskelzellen spielt (Aalkjær and Nilsson 2005, Johnny, Plank et al. 2017). Des Weiteren führte die Blockade der SERCA zur Aufhebung des antikontraktilen Effekts des BK Kanals. Dieser Effekt des BK Kanals hängt also von der SERCA bzw. gefüllten intrazellulären Speicher ab. Die SERCA bzw. gefüllte intrazelluläre Speicher sind damit Voraussetzung für die Entstehung von Oszillationen

und gleichzeitig für die Aktivierung des BK Kanals zur Erfüllung seiner antioszillatorischen und antikontraktilen Schutzfunktion.

Für die Calcium-Transportprozesse über die SR-Membran kann also zusammenfassend gesagt werden, dass die SERCA und Ryanodin-Rezeptoren für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Oszillationen des Gefäßtonus mitverantwortlich sind. Gleichzeitig bestimmen sie die Aktivität des BK-Kanals mit und damit seine antioszillatorische und antikontraktile Schutzfunktion.

Anschließend wurde der Einfluss von Calciumtransportprozessen der Zellmembran auf die Schutzfunktion des BK-Kanals vor phasischen Kontraktionen untersucht.

Natrium-Kalium-ATPase

Mit Hilfe des Blockers Ouabain in den Konzentrationen $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M, 10^{-4} M und $3 \cdot 10^{-4}$ M wurde die Rolle der Natrium-Kalium-ATPase untersucht (Dostanic, Paul et al. 2005). Eine Beeinflussung der MX-induzierten Gefäßkontraktion durch Ouabain konnte für keine der verwendeten Konzentrationen festgestellt werden. In Gegenwart von IBTX zeigte Ouabain in den Konzentrationen $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M und 10^{-4} M hingegen einen antikontraktilen Effekt. In Gegenwart von Ouabain in diesen Konzentrationen war auch der antikontraktile Effekt des BK-Kanals abgeschwächt. Die IBTX-induzierten Oszillationen waren unverändert. Bei einer Konzentration von 10^{-4} M erzeugte Ouabain in Gegenwart von IBTX einen antikontraktilen Effekt, der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war abgeschwächt. Ouabain in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M zeigte keinen Effekt in Gegenwart von IBTX und beeinflusste auch den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals nicht. Die IBTX-induzierten Oszillationen waren in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-4}$ M abgeschwächt. Der ausbleibende Effekt von Ouabain auf die MX-induzierte Kontraktion steht im Gegensatz zu den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen. So führte die Inhibierung der Natrium-Kalium-ATPase durch Ouabain bei isolierten Zerebral- und Mesenterialarterien der Ratte zur Gefäßkontraktion (McCarron and Halpern 1990, Zhang,

Hamlyn et al. 2009). Auch war die Calciumkonzentration in der Zelle durch 10^{-4} M Ouabain erhöht (Bachelorarbeit D. Heppeler, unveröffentlicht). Dies lässt sich damit erklären, dass die Natriumkonzentration in der Zelle durch die Inhibierung der Natrium-Kalium-ATPase ansteigt, was zur einer Verminderung der Aktivität des Natrium-Calcium-Austauschers führt. Dadurch werden weniger Calciumionen nach außen gepumpt und die Calciumkonzentration steigt, was zur Kontraktion der Arterien führen sollte. Da Ouabain jedoch in den geringen Konzentrationen in Gegenwart von IBTX einen antikontraktilen Effekt zeigt und auch den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals abschwächt, ist davon auszugehen, dass es eine funktionelle Interaktion zwischen Natrium-Kalium-ATPase und BK-Kanälen gibt. Die erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle führt zu einer Verstärkung der Aktivität der BK-Kanäle und wirkt damit einer Kontraktion entgegen. In der höchsten verwendeten Ouabain-Konzentration war dieser Effekt nicht mehr vorhanden, hier zeigte sich jedoch ein abschwächender Einfluss auf die IBTX-induzierten Oszillationen. Zusammenfassend ist die Natrium-Kalium-ATPase als an der Regulation der Aktivität des BK-Kanals beteiligt und trägt zu dessen antikontraktiler und antioszillatorischer Schutzfunktion bei.

Natrium-Calcium-Austauscher

Die Rolle des Natrium-Calcium-Austauschers wurde mit Hilfe des Blockers KB-R7943 untersucht (Iwamoto, Watano et al. 1996). KB-R7943 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M führte zu einer Verstärkung der MX-induzierten Gefäßkontraktion und zu einer Verstärkung der IBTX-induzierten Oszillationen. Der kontraktile Effekt von KB-R7943 ist eine eher unerwartete Beobachtung, da KB-R7943 vor allem den „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers inhibiert. Dies hätte eine Reduktion des Calciumeinstroms und damit eine Verringerung des Gefäßtonus zur Folge gehabt. Ein ähnlicher Effekt konnte jedoch schon an Arterien isolierter Nieren der Ratte beobachtet werden (Schweda, Seebauer et al. 2001). Andere Studien zeigen aber auch, dass KB-R7943 einer durch den „reverse mode“ des Natrium-Calcium-Austauschers hervorgerufenen Gefäßkontraktion entgegen wirkt (Kim, Kim et al. 1999, Takai, Yamada et al. 2004). Da der Natrium-Calcium-Austauscher jedoch unter normalen

physiologischen Bedingungen Calciumionen nach außen pumpt, also im „forward mode“ arbeitet, ist anzunehmen, dass die Inhibierung des „reverse mode“ in diesem Fall nicht von funktioneller Bedeutung ist. Die beobachtete Verstärkung der Gefäßkontraktion spricht also dafür, dass KB-R7943 in der verwendeten Konzentration auch den „forward mode“ inhibiert und durch den reduzierten Calciumausstrom zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und damit zur Gefäßkontraktion führt. Da es in Gegenwart von KB-R7943 zu einer Verstärkung der IBTX-induzierten Oszillationen kommt, scheint der Natrium-Calcium-Austauscher einen antioszillatorischen Effekt zu haben. Da der kontraktile Effekt von KB-R7943 jedoch nicht von IBTX beeinflusst wurde und KB-R7943 keinen Einfluss auf den antikonstraktile Effekt des BK-Kanals hatte, scheint es keine funktionelle Interaktion zwischen BK-Kanal und Natrium-Calcium-Austauscher zu geben.

Calcium-ATPase der Plasmamembran (PMCA)

Die Inhibierung der PMCA erfolgte mittels Caloxin2A1 und Caloxin1b1 (Chaudhary, Walia et al. 2001, Pande, Mallhi et al. 2006). Caloxin2A1 hatte weder einen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion, noch auf die IBTX-induzierten Oszillationen. Auch der antikonstraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht beeinflusst. Caloxin1b1 verstärkte bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M die MX-induzierte Kontraktion. Die IBTX-induzierten Oszillationen wurden nicht beeinflusst, auch wurde der kontraktile Effekt von Caloxin1b1 nicht von IBTX beeinflusst. Der antikonstraktile Effekt des BK-Kanals wurde von Caloxin1b1 nicht verändert. Caloxin1b1 stellte sich also als der PMCA-Blocker mit der höheren Potenz heraus. Der kontraktile Effekt von Caloxin1b1 ist darauf zurückzuführen, dass bei inhibierter PMCA weniger Calciumionen aus der Zelle gepumpt werden. Dies führt zu einer höheren intrazellulären Calciumkonzentration und infolgedessen zu einer stärkeren Gefäßkontraktion. Solche Effekte wurden auch schon in vorangegangenen Studien an Aorten der Ratte (Pande, Mallhi et al. 2006) sowie Koronararterien des Schweins (Pande, Szewczyk et al. 2008) beobachtet. Darüber hinaus geben die vorliegenden Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass es eine funktionelle

Interaktion zwischen PMCA und BK-Kanälen gibt oder dass die PMCA eine Rolle bei der Vasomotion spielt.

L-Typ-Calciumkanäle

Die Inhibierung von L-Typ-Calciumkanälen mittels Nimodipin (Xu and Lipscombe 2001) verringerte bei einer Konzentration von 10^{-10} M die MX-induzierte Kontraktion. Dies lässt sich auf den reduzierten Einstrom von Calciumionen und die damit verringerte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückführen, was zur Vasodilatation führt. Ähnliche Befunde konnten schon in vorangegangenen Studien z. B. an Zerebralarterien der Ratte und kortikalen Arterien der Katze gezeigt werden (Brandt, Ljunggren et al. 1983, Knot and Nelson 1998). Der antikontraktile Effekt von Nimodipin wurde durch IBTX verstärkt, der antikontraktile Effekt des BK-Kanals aufgehoben. L-Typ-Calciumkanäle interagieren also funktionell mit BK-Kanälen. Diese Beobachtung wird durch ähnliche Befunde von Arteriolen des Cremastermuskels der Maus (Westcott and Jackson 2011, Westcott, Goodwin et al. 2012) und von isolierten glatten Muskelzellen aus Mesenterialarterien der Maus (Suzuki, Yamamura et al. 2013) unterstützt. Auch waren die IBTX-induzierten Oszillationen in Gegenwart von 10^{-10} M Nimodipin aufgehoben. Dies deckt sich mit zahlreichen Studien z. B. an Mesenterialarterien der Ratte, Cremasterarterien der Ratte oder Netzhautarterien des Schweins (Gustafsson and Nilsson 1993, Hill and Meininger 1994, Misfeldt, Aalkjaer et al. 2010). In diesen Studien führte die Inhibierung der L-Typ-Calciumkanäle zur Aufhebung von Gefäßoszillationen. L-Typ-Calciumkanäle spielen also eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Calcium-Wellen in den glatten Muskelzellen und gleichzeitig für die Aktivierung des BK Kanals zur Erfüllung seiner antioszillatorischen und antikontraktilen Schutzfunktion.

T-Typ-Calciumkanäle

Zur Untersuchung der Rolle der T-Typ-Calciumkanäle wurden die Blocker TTA-P2 (Choe, Messinger et al. 2011), TTA-A2 (Kraus, Li et al. 2010) sowie Nickelchlorid (Lee, Gomora et al. 1999) verwendet. TTA-P2 zeigte keinen Effekt auf die MX-induzierte

Kontraktion oder die IBTX-induzierten Oszillationen. Auch konnte keine Beeinflussung der Wirkung von TTA-P2 durch IBTX oder ein Einfluss von TTA-P2 auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals beobachtet werden. Die vollständige Abwesenheit jegliches Effekts von TTA-P2 zeigt an, dass diese Substanz kein wirksamer Inhibitor der T-Typ Calciumkanäle in den untersuchten Gefäßen ist, zumindest in den verwendeten, sonst üblichen Konzentrationen. Dem Grund für die Unwirksamkeit von TTA-P2 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen.

Der zweite verwendete Blocker der T-Typ Calciumkanäle, TTA-A2, führte zu einer Abschwächung der MX-induzierten Kontraktion. TTA-A2 zeigte sich also bei gleichen verwendeten Konzentrationen deutlich potenter als TTA-P2. Eine ähnliche Wirkung von TTA-A2 auf den Druck-induzierten Gefäßtonus wurde auch an Arteriolen der Ratte (Fernandez, McGahon et al. 2015) und Skelettmuskelarteriolen der Maus (Howitt, Matthaei et al. 2015) beobachtet. Es wurde gezeigt, dass dieser Blocker funktionell selektiv für T-Typ- gegenüber L-Typ-Calciumkanälen in arteriellen Blutgefäßen ist (Howitt, Matthaei et al. 2015). Die IBTX-induzierten Oszillationen waren in Gegenwart von $3 \cdot 10^{-6}$ M TTA-A2 stark reduziert und in Gegenwart von 10^{-5} M TTA-A2 schließlich ganz aufgehoben. Der antikontraktile Effekt von TTA-A2 wurde durch IBTX verstärkt und der antikontraktile Effekt des BK-Kanals aufgehoben. Es konnte also eine funktionelle Interaktion von T-Typ-Calciumkanälen und BK-Kanälen während der MX-induzierten Kontraktion beobachtet werden.

Nickelchlorid, der selektive Blocker von T-Typ-Calciumkanälen der Cav3.2-Unterfamilie (Lee, Gomora et al. 1999), hatte keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion. Solch eine Beobachtung wurde auch an Basilararterien der Ratte gemacht (Navarro-Gonzalez, Grayson et al. 2009). Der antikontraktile Effekt des Blockers trat jedoch in Gegenwart von IBTX zu Tage. In Gegenwart von Nickelchlorid war der antikontraktile Effekt des BK-Kanals abgeschwächt. Diese Beobachtung wird gestützt durch den Befund, dass Nickelchlorid auch Druck-induzierte Kontraktionen kleiner, myogen aktiver Zerebralarterien der Ratte verstärkte und die Wirkung eines BK Kanal Blockers aufhob (Harraz, Abd El-Rahman et al. 2014). Auch in Mesenterialarterien des Rindes konnte gezeigt werden, dass Nickelchlorid die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals vermindert (Stockand, Sultan et al. 1993). Hervorzuheben ist unsere

Beobachtung, dass die IBTX-induzierten Oszillationen in Gegenwart von Nickelchlorid in einer Konzentration von 10^{-4} M stark reduziert waren. Ob höhere Konzentrationen von Nickelchlorid die IBTX-induzierten Oszillationen komplett eliminiert hätten, wurde nicht untersucht, da solche Konzentrationen nicht mehr mit Sicherheit selektiv gegenüber L-Typ Calciumkanälen sind.

Eine Vasodilatation in Gegenwart von anderen Blockern der T-Typ-Calciumkanäle als TTA-A2 und Nickelchlorid wurde schon in früheren Studien an Nieren- und Cremasterarterien der Ratte (VanBavel, Sorop et al. 2002, Feng, Li et al. 2004) berichtet. Zusammen mit den Befunden aus der Literatur zeigen unsere Daten, dass auch T-Typ-Calciumkanäle, ähnlich den L-Typ-Calciumkanälen, an der Entstehung sowie der Aufrechterhaltung von Oszillationen der Gefäße beteiligt sind. Gleichzeitig sind sie für die Aktivierung des BK Kanals zur Erfüllung seiner antikontraktiven Schutzfunktion sowie, und das ist der völlig neue Befund der vorliegenden Arbeit, der antioszillatorischen Schutzfunktion notwendig.

P/Q-Typ- Calciumkanäle

Die Inhibierung der P/Q-Typ- Calciumkanäle mittels ω -Agatoxin-IVA (Birnbauer, Campbell et al. 1994, Nakanishi 2016) hatte keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion. Auch die IBTX-induzierten Oszillationen waren unverändert. Eine Beeinflussung des Effekts von ω -Agatoxin-IVA durch IBTX war nicht zu erkennen, der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde durch ω -Agatoxin-IVA nicht beeinflusst. Dies war sowohl bei einer Agatoxin-Konzentration von 10^{-9} M als auch von 10^{-8} M zu sehen. Da Agatoxin in diesen Konzentrationen vor allem P-Typ-Calciumkanäle inhibiert (Mintz, Venema et al. 1992, Wheeler, Randall et al. 1994), scheinen diese Kanäle bei der der MX-induzierten Kontraktion der hier untersuchten Arterien keine Rolle zu spielen. Auch in vorangegangenen Studien an inneren Brustwandarterien und Zerebralarterien des Menschen konnte kein Effekt an den Gefäßen gesunder Menschen beobachtet werden (Thuesen, Lyngso et al. 2017). Es gibt jedoch auch gegenteilige Ergebnisse, z. B. von afferenten Arteriolen des Kaninchens oder Nierenarterien des Menschen. Hier führte ω -Agatoxin-IVA zu einer Verringerung der Gefäßkontraktion (Hansen, Jensen et al. 2000,

Hansen, Poulsen et al. 2011). Es handelt sich hier also eventuell um gewebespezifische Unterschiede der Expression der P/Q-Typ- Calciumkanäle. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gefäßen haben P/Q-Typ- Calciumkanäle keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion. Auch scheinen diese Kanäle keine Rolle bei der Entstehung der Vasomotion zu spielen und funktionell nicht mit BK-Kanälen zu interagieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Natrium-Kalium-ATPase sowie spannungsabhängige Calciumkanäle des L- und T-Typs an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Calcium-Wellen in den glatten Muskelzellen beteiligt sind. Auch beeinflussen sie die Aktivität des BK-Kanals und damit auch dessen antikontraktilen und antioszillatorischen Effekt. Der Natrium-Calcium-Austauscher scheint hingegen an der Umwandlung von tonischen in phasische Kontraktionen beteiligt zu sein und damit ebenfalls eine antioszillatorische Schutzfunktion zu besitzen. Gleichzeitig konnte keine funktionelle Interaktion mit BK-Kanälen beobachtet werden, die Schutzfunktion des Natrium-Calcium-Austauschers ist also unabhängig von BK-Kanälen. Für die PMCA sowie für spannungsabhängige Calciumkanäle des P/Q-Typs konnten hingegen weder Hinweise auf einen Einfluss auf intrazelluläre Calcium-Wellen noch auf eine funktionelle Interaktion mit BK-Kanälen gefunden werden.

4.4 K_v-, K_{ATP}- und Kir-Kanäle interagieren funktionell mit BK-Kanälen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit BK-Kanäle funktionell mit K_v-, K_{ATP}- und Kir-Kanälen interagieren. Dabei sollte die Rolle des BK-Kanals sowohl in inhibiertem als auch in aktiviertem Zustand untersucht werden. Um einen geeigneten, d.h. selektiven BK-Kanal-Aktivator zu finden, wurden zunächst verschiedene getestet: NS11021 (Bentzen, Olesen et al. 2014), NS19504 (Nausch, Rode et al. 2014) sowie Lithocholsäure (Dopico, Walsh et al. 2002). Leider zeigten alle getesteten Blocker schon in geringen Konzentrationen vor allem in Gegenwart von IBTX einen Effekt. Die untersuchten Substanzen scheinen also keine selektiven BK-Kanal-Aktivatoren zu sein.

Für die geplanten Versuche waren sie daher nicht zu verwenden, weswegen darauf verzichtet wurde und die Interaktion des BK-Kanals mit anderen Kaliumkanälen nur in Gegenwart des BK Kanal Blockers IBTX untersucht wurde.

Kv-Kanäle

Die Rolle von Kv1.5-, Kv2.1- und Kv7-Kanälen wurde mit Hilfe der Blocker DPO-1 (Lagrutta, Wang et al. 2006), ScTx-1 (Escoubas, Diochot et al. 2002) sowie XE991 (Robbins 2001) untersucht. Die MX-induzierte Kontraktion wurde von 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M ScTx-1 oder $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 nicht beeinflusst. DPO-1 und XE991 zeigten auch in einer vorangegangenen Studie keinen Effekt auf die Kontraktion der Mesenterialarterien von Ratte und Maus (Tsvetkov, Tano et al. 2016). In anderen Untersuchungen hingegen war der Gefäßtonus von Interlobararterien der Ratte und von afferenten Arteriolen der Maus in Gegenwart von XE991 erhöht (Salomonsson, Brasen et al. 2015) bzw. die Kontraktion von Zerebralarterien und der *Arteria gracilis* der Ratte in Gegenwart von DPO-1 verstärkt (Fancher, Butcher et al. 2015). Auch ScTx-1 führte zu einer Erhöhung des Gefäßtonus in Zerebralarterien der Ratte (Amberg and Santana 2006, Zhong, Abd-Elrahman et al. 2010). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Effekte sind gewebespezifische Unterschiede in der Expression und/oder Funktion verschiedener Kv-Kanäle. In der vorliegenden Studie trat der kontraktile Effekt der verwendeten Blocker erst in Gegenwart von IBTX zu Tage, außerdem verstärkten sie den antikonstraktiven Effekt des BK-Kanals. In Gegenwart von DPO-1 bzw. ScTx-1 waren außerdem die IBTX-induzierten Oszillationen verstärkt. Da XE991 die stärkste Wirkung auf den antikonstraktiven Effekt des BK-Kanals zeigte, wurden bei den anschließenden Expressionsstudien die Versuche auf Kv7-Kanäle fokussiert. Es konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Gefäßen Kv7.1- bis Kv7.5-Kanäle exprimiert waren, wobei auf mRNA Ebene Kv7.4 Kanäle dominierten. Es konnten dabei zwischen Gefäßen mit und ohne Endothel keine Unterschiede in der Genexpression beobachtet werden.

Kv-Kanäle interagieren also funktionell mit BK-Kanälen. Dabei kommt es bei einer Inhibierung der Kv-Kanäle zur Depolarisierung des Membranpotentials und damit zu

einer Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Durch den erhöhten Calciumeinstrom steigt die Aktivität der BK-Kanäle, wodurch der antikontraktile Effekt der BK-Kanäle verstärkt wird. Damit bestimmen Kv Kanäle die funktionelle Aktivität der BK Kanäle mit.

K_{ATP}-Kanäle

Die Rolle der K_{ATP}-Kanäle wurde mittels des Blockers Glibenclamid untersucht (Benz and Kohlhardt 1994). In Gegenwart von 10⁻⁶ M Glibenclamid waren jedoch sowohl die MX-induzierte Kontraktion als auch die IBTX-induzierten Oszillationen unverändert. Auch vorangegangene Studien zeigen keinen Einfluss von Glibenclamid auf Koronararterien des Kaninchens (Jiang and Collins 1994) und des Schweins (Mellemkjaer and Nielsen-Kudsk 1994). Es konnte außerdem keine Beeinflussung der Glibenclamid-Wirkung durch IBTX festgestellt werden, auch der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde von Glibenclamid nicht verändert. Die vorgenommenen Untersuchungen zur Genexpression zeigen, dass K_{ATP}-Kanäle in den untersuchten Gefäßen ohne Endothel exprimiert werden. Der fehlende Effekt von Glibenclamid kann also nicht mit einer fehlenden Expression der K_{ATP}-Kanäle erklärt werden. Die Daten zeigen eher an, dass die K_{ATP}-Kanäle in diesen Gefäßen nicht aktiv sind. Auch in anderen Gefäßen wurde eine Aktivität der K_{ATP}- Kanäle erst nach ihrer Stimulation durch vasoaktive Substanzen gefunden, z.B. durch Iloprost in kleinen Schwanzarterien der Ratte (Schubert, Serebryakov et al. 1997), durch Beraprost in Arteriolen der Retina des Schweins (Ono, Nagaoka et al. 2014) oder durch Iloprost, Prostacyclin, Adenosine bzw. Cromakalim in Koronararterien isolierter Kaninchenherzen. Auf Grund der fehlenden Aktivität der K_{ATP}-Kanäle, selbst nach Ausschalten der dominierenden BK Kanäle, kann keine Aussage über die Möglichkeit einer Interaktion zwischen den K_{ATP}- und den BK-Kanälen getroffen werden.

Kir-Kanäle

Kir-Kanäle wurden mittels des Blockers Bariumchlorid in einer Konzentration von 10⁻⁵ M untersucht (Quayle, McCarron et al. 1993). In dieser Konzentration gilt

Bariumchlorid als selektiver Blocker dieser Kanäle (Quayle, McCarron et al. 1993, Schubert, Krien et al. 2004). Auch Bariumchlorid hatte keinerlei Effekt auf die MX-induzierte Kontraktion und die IBTX-induzierten Oszillationen. Auch konnte kein Effekt von IBTX auf die Wirkung von Bariumchlorid und kein Einfluss von Bariumchlorid auf den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals festgestellt werden. Die durchgeführten Expressionsstudien zeigen jedoch klar, dass Kir-Kanäle in den untersuchten Arterien ohne Endothel exprimiert werden, jedenfalls auf mRNA Ebene. Andere Studien konnten hingegen zeigen, dass Bariumchlorid der Vasodilatation in Zerebralarterien der Ratte entgegen wirkt (Nakahata, Kinoshita et al. 2006) sowie zur Vasokonstriktion dieser Arterien *in vivo* führt (Mayhan, Mayhan et al. 2004). Der ausbleibende Effekt von Bariumchlorid in der vorliegenden Arbeit scheint also wieder ein Hinweis auf gewebespezifische Unterschiede in der Expression bzw. der funktionellen Verfügbarkeit der dieser Kanäle zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kv-Kanäle funktionell mit BK-Kanälen interagieren, K_{ATP} - und Kir-Kanäle jedoch nicht. Diese Aussage gilt für Kv-, K_{ATP} - und Kir-Kanäle in Gefäßen, die durch Methoxamin in verschiedene Kontraktionszustände versetzt wurden. Ob bei Anwesenheit anderer vasoaktiver Substanzen eine funktionelle Interaktion auch von K_{ATP} - und Kir-Kanälen mit BK Kanälen auftritt, muss in nachfolgenden Untersuchungen ergründet werden. Das gilt insbesondere für vasoaktive Substanzen, welche K_{ATP} - und Kir-Kanäle aktivieren können. Kv-Kanäle spielen damit eine wichtige Rolle bei der Aktivitätssteuerung des BK-Kanals und beeinflussen damit seine antioszillatorische und antikontraktile Schutzfunktion.

4.5 Die Funktion des BK-Kanals und die Genexpression werden nicht von Diabetes beeinflusst

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Faktoren zu identifizieren, die bei der dysfunktionalen Regulation des Gefäßtonus bei Diabetes eine Rolle spielen können. Daher wurde die Funktion des BK-Kanals, der Einfluss von Calciumtransportprozessen

darauf sowie die Interaktion des BK-Kanals mit anderen Kaliumkanälen vergleichend an gesunden und diabetischen Tieren untersucht.

Die Funktion des BK-Kanals bei Diabetes und Hyperglykämie

Die Versuche zum Einfluss einer akuten, kurzzeitigen Einwirkung erhöhter Glucosekonzentrationen auf die Gefäße zeigten, dass diese Intervention keine Auswirkungen auf die Funktion des BK-Kanals hatte. Weder die MX-induzierte Kontraktion, noch die IBTX-induzierten Oszillationen wurden von einer Glucosekonzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ M bzw. $4 \cdot 10^{-2}$ M beeinflusst. Auch der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war nicht verändert. Die Dauer der Glucoseeinwirkung war möglicherweise zu kurz, um sichtbare Effekte zu verursachen. Ähnliche Ergebnisse wurden an isolierten Herzen der Ratte (Klabunde, Ryan et al. 2007) oder an Arteriolen der Retina des Menschen (Jeppesen, Knudsen et al. 2007) beobachtet. Auch hier hatte kurzzeitige Hyperglykämie keinen Einfluss auf die Funktion der Gefäße. Gegenteilige Befunde liefert hingegen eine Studie an Mesenterialarterien der Ratte, Koronararterien des Schweins sowie inneren Brustkorbarterien des Menschen. Hier wurde die Kontraktion der Arterien in Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen verstärkt (Jackson, Brennan et al. 2016).

Der Einfluss einer deutlich längeren Hyperglykämie-Dauer wurde mittels diabetischer Ratten des STZ-Modells untersucht. Für die MX-induzierte Kontraktion konnte kein Unterschied zwischen den Gefäßen gesunder und denen diabetischer Tiere festgestellt werden. Auch der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war nicht durch den Diabetes beeinflusst. Bei detaillierter Betrachtung der IBTX-induzierten Oszillationen abseits der einfachen Mittelwerte des Gefäßtonus zeigten sich jedoch Unterschiede. So waren die Amplituden sowie die Frequenzen der Oszillationen bei Gefäßen diabetischer Tiere reduziert, teilweise traten gar keine Oszillationen mit großer Amplitude auf. Würde der Diabetes die Funktionalität des BK-Kanals negativ beeinflussen, wie in der Literatur beschrieben, wären eher verstärkte Oszillationen zu erwarten bzw. Oszillationen auch in Abwesenheit von IBTX. Die vorliegenden funktionellen Befunde lassen vermuten, dass der BK-Kanal durch Diabetes nicht verändert ist. Dies wird durch die Ergebnisse der

Untersuchung der Expression der α - und β -Untereinheiten des BK-Kanals unterstützt. So waren die α - sowie die β 1-Untereinheit exprimiert, einen Unterschied in der Genexpression zwischen gesunden und diabetischen Tieren gab es jedoch nicht. Damit könnten die gap junctions oder der den Oszillationen in einzelnen Zellen zu Grunde liegende Mechanismus durch den Diabetes in seiner Funktion gestört sein. Somit wäre die Synchronisation der glatten Muskelzellen auch bei inhibiertem BK-Kanal unvollständig oder die die Oszillationen auslösenden Calcium-Wellen selbst abgeschwächt. Eine durch Diabetes verminderte interzelluläre Kommunikation über gap junctions konnte bereits in einer früheren Studie beobachtet werden (Inoguchi, Yu et al. 2001, Figueroa and Duling 2009). Auch konnten Unterschiede in der Genexpression von gap junctions der Nierenarterien gesunder und diabetischer Mäuse gefunden werden (Zhang and Hill 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Funktionalität oder der Expression der BK-Kanäle durch den Diabetes gefunden werden. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Entstehung und/oder Ausbreitung von Calcium-Wellen und die damit einhergehende Synchronisation der Zellen durch den Diabetes negativ beeinflusst wird.

Beeinflussung von Calcium-Transportprozessen durch Diabetes

Bei der Untersuchung des Einflusses von Calcium-Transportprozessen auf die antikontraktile und antioszillatorische Schutzfunktion des BK-Kanals ist als neuer Befund vor allem die Rolle der T-Typ-Calciumkanäle hervorzuheben. Diese scheinen an der Entstehung und Aufrechterhaltung von intrazellulären Calcium-Wellen beteiligt zu sein und funktionell mit BK-Kanälen zu interagieren. Daher wurde sich bei der Untersuchung diabetischer Arterien auf T-Typ-Calciumkanäle fokussiert.

Um die Rolle des Calciumeinstroms für den antikontraktilen Effekt des BK-Kanals bei Diabetes zu untersuchen, wurden Versuche mit verschiedenen extrazellulären Calciumkonzentrationen durchgeführt. Bei einer niedrigen extrazellulären Calciumkonzentration von 10^{-3} M waren die IBTX-induzierten Oszillationen bei Gefäßen diabetischer Tiere fast vollständig abwesend. Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde nicht durch den Diabetes beeinflusst. Mit steigender Calciumkonzentration

nahmen auch die IBTX-induzierten Oszillationen zu. Bei einer hohen extrazellulären Calciumkonzentration von $2,2 \cdot 10^{-3}$ M zeigten diabetische Gefäße in Gegenwart von IBTX einen antikontraktilen Effekt. Der antikontraktile Effekt des BK-Kanals wurde jedoch in keiner der verwendeten Calciumkonzentrationen vom Diabetes beeinflusst, d.h. er war genau so auch in nicht-diabetischen Gefäßen ausgeprägt.

Der Einfluss der T-Typ-Calciumkanäle wurde mit Hilfe von Nickelchlorid untersucht. Nickelchlorid zeigte in gesunden Gefäßen einen antikontraktilen Effekt, jedoch nicht in diabetischen Gefäßen. Auch waren die IBTX-induzierten Oszillationen in Gefäßen diabetischer Tiere in Gegenwart von Nickelchlorid weiterhin vorhanden, während bei Gefäßen gesunder Tiere eine starke Abnahme der Oszillationen zu beobachten war. Die Untersuchung der Genexpression spannungsabhängiger Calciumkanäle zeigte, dass Kanäle vom L-, T- und P/Q-Typ in den untersuchten Gefäßen exprimiert werden. Es zeigte sich dabei kein Unterschied in der Expression zwischen Gefäßen gesunder und diabetischer Tiere. Der fehlende Effekt von Nickelchlorid bei diabetischen Arterien ist also nicht auf eine fehlende Expression der T-Typ- Calciumkanäle zurückzuführen, sondern eher auf eine veränderte Funktion. Der Effekt war jedoch nicht sehr ausgeprägt, so dass weitere Untersuchungen zur Absicherung dieses Befundes notwendig sind.

Die Interaktion von BK- und Kv-Kanälen bei Diabetes

Die bei den Versuchen zur Rolle von K_{ATP} - und Kir-Kanälen verwendeten Blocker zeigten dort keinen Effekt und auch bei Untersuchungen der Genexpression dieser Kanäle zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gefäßen diabetischer und gesunder Tiere. Daher beschränkte sich die funktionelle Untersuchung der Interaktion des BK-Kanals mit anderen Kaliumkanälen bei Diabetes auf Kv-Kanäle. Da in Bezug auf diese Interaktion in Gegenwart von XE991 die größten Effekte beobachtet werden konnten, wurde sich im Folgenden auf Kv7-Kanäle fokussiert. Versuche mit dem Blocker XE991 zeigten, dass die MX-induzierte Kontraktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von IBTX und XE991 verstärkt war. Das war sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von XE991 der Fall. Beide Blocker gemeinsam zeigten also einen antikontraktilen Effekt und der antikontraktile Effekt des BK-Kanals war auch in

Anwesenheit von XE991 vorhanden. Beide Effekte wurden jedoch nicht durch den Diabetes beeinflusst, es zeigten sich auch keine Unterschiede zwischen gesunden und diabetischen Arterien. Auch bei der Genexpression konnten keine Unterschiede zwischen Gefäßen gesunder und Gefäßen diabetischer Tiere festgestellt werden.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Diabetes im STZ-Modell die Funktionalität der gap junctions oder die Mechanismen der den Oszillationen zu Grunde liegenden Calcium-Wellen beeinflusst. Ein Einfluss des Diabetes auf die Funktionalität des BK-Kanals und die Interaktion zwischen BK- und Kv7-Kanälen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch die Genexpression der BK-, Cav-, Kv- und Kir-Kanäle unterschied sich nicht in Gefäßen von gesunden und diabetischen Tieren. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien. So wurde die β 1-Untereinheit des BK-Kanals in Arteriolen der Retina von diabetischen Ratten weniger exprimiert als in denen nicht-diabetischer Ratten (McGahon, Dash et al. 2007). Gleiches konnte auch in Aorten diabetischer Mäuse gezeigt werden (Yi, Wang et al. 2014). Die Expression von Kir-Untereinheiten unterschied sich nicht zwischen Aorten diabetischer und gesunder Mäuse, die Expression der SUR-Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals war jedoch bei Diabetes reduziert (Ren, Xu et al. 2003). An glatten Muskelzellen der Koronararterien der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Expression von Kv1.2- und Kv1.5-Kanälen bei Diabetes verringert war (Chai, Xu et al. 2007). Zu beachten ist hierbei, dass in den erwähnten Studien teilweise ein anderes Diabetes-Modell als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Mäuse mit STZ-induziertem Diabetes). Aber auch bei Untersuchungen, bei denen ebenfalls Ratten mit STZ-induziertem Diabetes verwendet wurden, gab es methodische Unterschiede. So lag die Diabetesdauer häufig bei 3 Monaten und war damit länger als in der vorliegenden Arbeit. Auch der Zeitpunkt der Diabetesinduktion ist in verschiedenen Studien unterschiedlich. Es ist also möglich, dass fehlende Unterschiede in der Genexpression in der vorliegenden Arbeit darauf zurückzuführen sind, dass die Gefäße der Ratten schon 8 Wochen nach dem Beginn des STZ-induzierten Diabetes untersucht wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass diese Zeitspanne ist eventuell zu kurz ist, um molekulare Änderungen hervorrufen zu können. Dieser Vermutung widersprechen Befunde mit einer kürzeren Diabetesdauer, wie z.B. die Studie von Chai et al. 2007 (Chai, Xu et al. 2007) mit einer Diabetesdauer von 6 Wochen, die

Unterschiede in der Genexpression zeigen. Hier wurden jedoch andere Kv-Kanäle als in der vorliegenden Arbeit untersucht. Damit ist ein direkter Vergleich in diesem Fall nicht möglich. Aufgrund dieser Überlegungen ist es daher sinnvoll, weiterführende Untersuchungen mit einer längeren Diabetesdauer durchzuführen. Dadurch könnte festgestellt werden, ob sich die Genexpression der untersuchten Kanäle bei einer längeren Hyperglykämie ändern und ob sich Unterschiede in der Funktionalität des BK-Kanals zeigen würden.

Literaturverzeichnis

- Aalkjær, C. and H. Nilsson (2005). "Vasomotion: cellular background for the oscillator and for the synchronization of smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **144**(5): 605-616.
- Alexander, S. P. H., W. A. Catterall, E. Kelly, N. Marrion, J. A. Peters, H. E. Benson, . . . J. A. Davies (2015). "The Concise Guide to pharmacology 2015/16: Voltage-gated ion channels." *Br J Pharmacol* **172**(24): 5904-5941.
- Amador, F. J., P. B. Stathopoulos, M. Enomoto and M. Ikura (2013). "Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies." *Febs j* **280**(21): 5456-5470.
- Amberg, G. C. and M. F. Navedo (2013). "Calcium dynamics in vascular smooth muscle." *Microcirculation* **20**(4): 281-289.
- Amberg, G. C. and L. F. Santana (2006). "Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(2): C348-356.
- Archer, S. L., E. Souil, A. T. Dinh-Xuan, B. Schremmer, J. C. Mercier, A. El Yaagoubi, . . . V. Hampl (1998). "Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes." *J Clin Invest* **101**(11): 2319-2330.
- Asano, S., I. N. Bratz, Z. C. Berwick, I. S. Fancher, J. D. Tune and G. M. Dick (2012). "Penitrem A as a tool for understanding the role of large conductance Ca(2+)/voltage-sensitive K(+) channels in vascular function." *J Pharmacol Exp Ther* **342**(2): 453-460.
- Aydin, M., H. Z. Wang, X. Zhang, R. Chua, K. Downing, A. Melman and M. E. DiSanto (2012). "Large-conductance calcium-activated potassium channel activity, as determined by whole-cell patch clamp recording, is decreased in urinary bladder smooth muscle cells from male rats with partial urethral obstruction." *BJU Int* **110**(8 Pt B): E402-408.
- Balasubramanian, L., A. Ahmed, C. M. Lo, J. S. Sham and K. P. Yip (2007). "Integrin-mediated mechanotransduction in renal vascular smooth muscle cells: activation of calcium sparks." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(4): R1586-1594.
- Balla, T. (2006). "Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling." *J Endocrinol* **188**(2): 135-153.
- Barski, O. A., S. M. Tipparaju and A. Bhatnagar (2009). "Kinetics of nucleotide binding to the β -subunit (AKR6A2) of the voltage-gated potassium (Kv) channel." *Chem Biol Interact* **178**(1-3): 165-170.
- Bentzen, B. H., S. P. Olesen, L. C. B. Rønn and M. Grønnet (2014). "BK channel activators and their therapeutic perspectives." *Front Physiol* **5**.
- Benz, I. and M. Kohlhardt (1994). "Distinct modes of blockade in cardiac ATP-sensitive K⁺ channels suggest multiple targets for inhibitory drug molecules." *J Membr Biol* **142**(3): 309-322.

- Berwick, Z. C., G. M. Dick, H. A. O'Leary, S. B. Bender, A. G. Goodwill, S. P. Moberly, . . . J. D. Tune (2013). "Contribution of electromechanical coupling between Kv and Ca v1.2 channels to coronary dysfunction in obesity." *Basic Res Cardiol* **108**(5): 370.
- Birnbaumer, L., K. P. Campbell, W. A. Catterall, M. M. Harpold, F. Hofmann, W. A. Horne, . . . et al. (1994). "The naming of voltage-gated calcium channels." *Neuron* **13**(3): 505-506.
- Bjorling, K., H. Morita, M. F. Olsen, A. Prodan, P. B. Hansen, P. Lory, . . . L. J. Jensen (2013). "Myogenic tone is impaired at low arterial pressure in mice deficient in the low-voltage-activated CaV 3.1 T-type Ca(2+) channel." *Acta Physiol (Oxf)* **207**(4): 709-720.
- Boittin, F.-X., N. Macrez, G. Halet and J. Mironneau (1999). "Norepinephrine-induced Ca²⁺waves depend on InsP₃ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **277**(1): C139-C151.
- Borisova, L., S. Wray, D. A. Eisner and T. Burdyga (2009). "How structure, Ca signals, and cellular communications underlie function in precapillary arterioles." *Circ Res* **105**(8): 803-810.
- Brandt, L., B. Ljunggren, K. E. Andersson, L. Edvinsson, E. MacKenzie, A. Tamura and G. Teasdale (1983). "Effects of topical application of a calcium antagonist (nifedipine) on feline cortical pial microvasculature under normal conditions and in focal ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **3**(1): 44-50.
- Breitenlechner, C., M. Gassel, H. Hidaka, V. Kinzel, R. Huber, R. A. Engh and D. Bossemeyer (2003). "Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity." *Structure* **11**(12): 1595-1607.
- Brown, S. M., L. M. Bentcheva-Petkova, L. Liu, K. L. Hristov, M. Chen, W. F. Kellett, . . . G. V. Petkov (2008). "β-Adrenergic relaxation of mouse urinary bladder smooth muscle in the absence of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel." *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(4): F1149-1157.
- Burdyga, T., A. Shmygol, D. A. Eisner and S. Wray (2003). "A new technique for simultaneous and in situ measurements of Ca²⁺ signals in arteriolar smooth muscle and endothelial cells." *Cell Calcium* **34**(1): 27-33.
- Carlström, M., C. S. Wilcox and W. J. Arendshorst (2015). "Renal Autoregulation in Health and Disease." *Physiol Rev* **95**(2): 405-511.
- Castillo, K., G. F. Contreras, A. Pupo, Y. P. Torres, A. Neely, C. González and R. Latorre (2015). "Molecular mechanism underlying β1 regulation in voltage- and calcium-activated potassium (BK) channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(15): 4809-4814.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555.
- Chai, Q., X. Xu, Q. Jia, Q. Dong, Z. Liu, W. Zhang and L. Chen (2007). "Molecular basis of dysfunctional Kv channels in small coronary artery smooth muscle cells of streptozotocin-induced diabetic rats." *Chin J Physiol* **50**(4): 171-177.

- Chaudhary, J., M. Walia, J. Matharu, E. Escher and A. K. Grover (2001). "Caloxin: a novel plasma membrane Ca²⁺ pump inhibitor." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4): C1027-1030.
- Choe, W. J., R. B. Messinger, E. Leach, V. S. Eckle, A. Obradovic, R. Salajegheh, . . . S. M. Todorovic (2011). "TTA-P2 Is a Potent and Selective Blocker of T-Type Calcium Channels in Rat Sensory Neurons and a Novel Antinociceptive Agent." *Mol Pharmacol* **80**(5): 900-910.
- Contreras, G. F., K. Castillo, N. Enrique, W. Carrasquel-Ursulaez, J. P. Castillo, V. Milesi, . . . R. Latorre (2013). "A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology." *Channels (Austin)* **7**(6): 442-458.
- Cox, D., J. Cui and R. Aldrich (1997). "Allosteric Gating of a Large Conductance Ca-activated K(+) Channel." *J Gen Physiol* **110**(3): 257-281.
- Curtis, T. M., J. Tumelty, J. Dawicki, C. N. Scholfield and J. G. McGeown (2004). "Identification and spatiotemporal characterisation of spontaneous Ca(2+) sparks and global Ca(2+) oscillations in retinal arteriolar smooth muscle cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(12): 4409-4414.
- Davidson, J. S., I. M. Baumgarten and E. H. Harley (1986). "Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid." *Biochem Biophys Res Commun* **134**(1): 29-36.
- Davie, C. S., M. Kubo and N. B. Standen (1998). "Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries." *Br J Pharmacol* **125**(8): 1715-1725.
- Dopico, A. M., J. V. Walsh and J. J. Singer (2002). "Natural Bile Acids and Synthetic Analogues Modulate Large Conductance Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) Channel Activity in Smooth Muscle Cells." *J Gen Physiol* **119**(3): 251-273.
- Dorman, J. S., R. E. Laporte, L. H. Kuller, K. J. Cruickshanks, T. J. Orchard, D. K. Wagener, . . . A. L. Drash (1984). "The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results." *Diabetes* **33**(3): 271-276.
- Dostanic, I., R. J. Paul, J. N. Lorenz, S. Theriault, J. W. Van Huysse and J. B. Lingrel (2005). "The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(2): H477-485.
- El-Rahman, R. R. A., O. F. Harraz, S. E. Brett, Y. Anfinogenova, R. E. Mufti, D. Goldman and D. G. Welsh (2013). "Identification of L- and T-type Ca(2+) channels in rat cerebral arteries: role in myogenic tone development." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**(1): H58-71.
- Escoubas, P., S. Diochot, M. L. Celerier, T. Nakajima and M. Lazdunski (2002). "Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies." *Mol Pharmacol* **62**(1): 48-57.
- Fancher, I. S., J. T. Butcher, S. D. Brooks, T. S. Rottgen, P. R. Skaff, J. C. Frisbee and G. M. Dick (2015). "DPO-1-sensitive K(+) channels contribute to the vascular tone and

- reactivity of resistance arteries from brain and skeletal muscle." *Microcirculation* **22**(4): 315-325.
- Fedorenko, O. A., E. Popugaeva, M. Enomoto, P. B. Stathopoulos, M. Ikura and I. Bezprozvanny (2014). "Intracellular calcium channels: inositol-1,4,5-trisphosphate receptors." *Eur J Pharmacol* **739**: 39-48.
- Fellner, S. K. and W. J. Arendshorst (2007). "Voltage-gated Ca²⁺ entry and ryanodine receptor Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in preglomerular arterioles." *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(5): F1568-1572.
- Feng, M. G., M. Li and L. G. Navar (2004). "T-type calcium channels in the regulation of afferent and efferent arterioles in rats." *Am J Physiol Renal Physiol* **286**(2): F331-337.
- Fernandez, J. A., M. K. McGahon, J. G. McGeown and T. M. Curtis (2015). "CaV3.1 T-Type Ca²⁺ Channels Contribute to Myogenic Signaling in Rat Retinal Arterioles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**(9): 5125-5132.
- Figuroa, X. F. and B. R. Duling (2009). "Gap junctions in the control of vascular function." *Antioxid Redox Signal* **11**(2): 251-266.
- Floyd, R. and S. Wray (2007). "Calcium transporters and signalling in smooth muscles." *Cell Calcium* **42**(4-5): 467-476.
- Foster, M. N. and W. A. Coetzee (2016). "KATP Channels in the Cardiovascular System." *Physiol Rev* **96**(1): 177-252.
- France, M., Y. Bhattarai, J. J. Galligan and H. Xu (2012). "Impaired propulsive motility in the distal but not proximal colon of BK channel beta1-subunit knockout mice." *Neurogastroenterol Motil* **24**(9): e450-459.
- Ghatta, S., D. Nimmagadda, X. Xu and S. T. O'Rourke (2006). "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications." *Pharmacol Ther* **110**(1): 103-116.
- Ghisdal, P., G. Vandenberg and N. Morel (2003). "Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries." *J Physiol* **551**(Pt 3): 855-867.
- Giachini, F. R., F. S. Carneiro, V. V. Lima, Z. N. Carneiro, M. W. Brands, R. C. Webb and R. C. Tostes (2009). "A key role for Na⁺/K⁺-ATPase in the endothelium-dependent oscillatory activity of mouse small mesenteric arteries." *Braz J Med Biol Res* **42**(11): 1058-1067.
- Gollasch, M., C. Ried, R. Bychkov, F. C. Luft and H. Haller (1996). "K⁺ currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **78**(4): 676-688.
- Golowasch, J., A. Kirkwood and C. Miller (1986). "Allosteric effects of Mg²⁺ on the gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle." *J Exp Biol* **124**: 5-13.
- Gribble, F. M., S. J. Tucker and F. M. Ashcroft (1997). "The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide." *Embo j* **16**(6): 1145-1152.

- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450.
- Gulbis, J. M., S. Mann and R. MacKinnon (1999). "Structure of a Voltage-Dependent K⁺ channel beta Subunit." *Cell* **97**(7): 943-952.
- Gustafsson, H. and H. Nilsson (1993). "Rhythmic contractions of isolated small arteries from rat: role of calcium." *Acta Physiol Scand* **149**(3): 283-291.
- Halidi, N., F. Alonso, J. M. Burt, J. L. Bény, J. A. Haefliger and J. J. Meister (2012). "Intercellular calcium waves in primary cultured rat mesenteric smooth muscle cells are mediated by Connexin43." *Cell Commun Adhes* **19**(2): 25-37.
- Hansen, P. B. (2015). "New Role of P/Q-type Voltage-gated Calcium Channels: From Transmitter Release to Contraction of Renal Vasculature." *J Cardiovasc Pharmacol* **65**(5): 406-411.
- Hansen, P. B., B. L. Jensen, D. Andreasen, U. G. Friis and O. Skott (2000). "Vascular smooth muscle cells express the alpha(1A) subunit of a P-/Q-type voltage-dependent Ca(2+)Channel, and It is functionally important in renal afferent arterioles." *Circ Res* **87**(10): 896-902.
- Hansen, P. B., C. B. Poulsen, S. Walter, N. Marcussen, L. L. Cribbs, O. Skott and B. L. Jensen (2011). "Functional importance of L- and P/Q-type voltage-gated calcium channels in human renal vasculature." *Hypertension* **58**(3): 464-470.
- Harper, H., Martin, D., Mayes, P., Rodwell, V. (2013). *Medizinische Biochemie*. Springer, Heidelberg.
- Harraz, O. F., R. R. Abd El-Rahman, K. Bigdely-Shamloo, S. M. Wilson, S. E. Brett, M. Romero, . . . D. G. Welsh (2014). "Ca(V)_{3.2} Channels and the Induction of Negative Feedback in Cerebral Arteries." *Circ Res* **115**(7): 650-661.
- Harraz, O. F., S. E. Brett, A. Zechariah, M. Romero, J. L. Puglisi, S. M. Wilson and D. G. Welsh (2015). "Genetic Ablation of Ca(V)_{3.2} Channels Enhances the Arterial Myogenic Response by Modulating the RyR-BK(Ca) Axis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**(8): 1843-1851.
- Haruna, T., M. Horie, I. Kouchi, R. Nawada, K. Tsuchiya, M. Akao, . . . S. Sasayama (1998). "Coordinate interaction between ATP-sensitive K⁺ channel and Na⁺, K⁺-ATPase modulates ischemic preconditioning." *Circulation* **98**(25): 2905-2910.
- Hedegaard, E. R., B. D. Nielsen, A. Kun, A. D. Hughes, C. Krøigaard, S. Mogensen, . . . U. Simonsen (2014). "K(V)₇ channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries." *Br J Pharmacol* **171**(1): 69-82.
- Hennig, G. W., C. B. Smith, D. M. O'Shea and T. K. Smith (2002). "Patterns of intracellular and intercellular Ca²⁺ waves in the longitudinal muscle layer of the murine large intestine in vitro." *J Physiol* **543**(Pt 1): 233-253.
- Herrera, G. M., B. Etherton, B. Nausch and M. T. Nelson (2005). "Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by KCa channels in mouse urinary bladder smooth muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(2): R402-r409.

Hibino, H., A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay and Y. Kurachi (2010). "Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles." *Physiol Rev* **90**(1): 291-366.

Hill, M. A. and G. A. Meininger (1994). "Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 2): H1085-1092.

Hill, M. A., Y. Yang, S. R. Ella, M. J. Davis and A. P. Braun (2010). "Large Conductance, Ca(2+)-Activated K(+) Channels (BK(Ca)) and Arteriolar Myogenic Signaling." *FEBS Lett* **584**(10): 2033-2042.

Hoshi, T., A. Pantazis and R. Olcese (2013). "Transduction of Voltage and Ca(2+) Signals by Slo1 BK Channels." *Physiology (Bethesda)* **28**(3): 172-189.

Howitt, L., K. I. Matthaai, G. R. Drummond and C. E. Hill (2015). "Nox1 upregulates the function of vascular T-type calcium channels following chronic nitric oxide deficit." *Pflugers Arch* **467**(4): 727-735.

Hristov, K. L., X. Cui, S. M. Brown, L. Liu, W. F. Kellett and G. V. Petkov (2008). "Stimulation of β 3-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels." *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(5): C1344-1353.

Huppelsberg, J. e. a. (2005). Kurzlehrbuch Physiologie

Imai, T., T. Okamoto, Y. Yamamoto, H. Tanaka, K. Koike, K. Shigenobu and Y. Tanaka (2001). "Effects of different types of K⁺ channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle." *Acta Physiol Scand* **173**(3): 323-333.

Inoguchi, T., H. Y. Yu, M. Imamura, M. Kakimoto, T. Kuroki, T. Maruyama and H. Nawata (2001). "Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes." *Med Electron Microsc* **34**(2): 86-91.

Iwamoto, T., T. Watano and M. Shigekawa (1996). "A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1." *J Biol Chem* **271**(37): 22391-22397.

Jackson, R., S. Brennan, P. Fielding, M. W. Sims, R. A. Challiss, D. Adlam, . . . R. D. Rainbow (2016). "Distinct and complementary roles for alpha and beta isoenzymes of PKC in mediating vasoconstrictor responses to acutely elevated glucose." *Br J Pharmacol* **173**(5): 870-887.

Jackson, W. F. and K. L. Blair (1998). "Characterization and function of Ca(2+)-activated K⁺ channels in arteriolar muscle cells." *Am J Physiol* **274**(1 Pt 2): H27-34.

Jacobsen, J. C., C. Aalkjaer, H. Nilsson, V. V. Matchkov, J. Freiberg and N. H. Holstein-Rathlou (2007). "Activation of a cGMP-sensitive calcium-dependent chloride channel may cause transition from calcium waves to whole cell oscillations in smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(1): H215-228.

Jaggar, J. H., G. C. Wellman, T. J. Heppner, V. A. Porter, G. J. Perez, M. Gollasch, . . . M. T. Nelson (1998). "Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K⁺

- channels: a functional unit for regulating arterial tone." *Acta Physiol Scand* **164**(4): 577-587.
- Jeppesen, P., S. T. Knudsen, P. L. Poulsen, C. E. Mogensen, O. Schmitz and T. Bek (2007). "Response of retinal arteriole diameter to increased blood pressure during acute hyperglycaemia." *Acta Ophthalmol Scand* **85**(3): 280-286.
- Jiang, C. and P. Collins (1994). "Inhibition of hypoxia-induced relaxation of rabbit isolated coronary arteries by NG-monomethyl-L-arginine but not glibenclamide." *Br J Pharmacol* **111**(3): 711-716.
- Johny, J. P., M. J. Plank and T. David (2017). "Importance of Altered Levels of SERCA, IP3R, and RyR in Vascular Smooth Muscle Cell." *Biophys J* **112**(2): 265-287.
- Joseph, B. K., K. M. Thakali, C. L. Moore and S. W. Rhee (2013). "Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches." *Pharmacol Res* **70**(1): 126-138.
- Kaczorowski, G. J., H.-G. Knaus, R. J. Leonard, O. B. McManus and M. L. Garcia (1996). "High-conductance calcium-activated potassium channels; Structure, pharmacology, and function." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **28**(3): 255-267.
- Kaczorowski, G. J., H. G. Knaus, R. J. Leonard, O. B. McManus and M. L. Garcia (1996). "High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function." *J Bioenerg Biomembr* **28**(3): 255-267.
- Kao, J., Y. G. Fan, I. Haehnel, J. Brett, S. Greenberg, M. Clauss, . . . et al. (1994). "A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response." *J Biol Chem* **269**(13): 9774-9782.
- Kapela, A., J. Parikh and M. Tsoukias N (2012). "Multiple Factors Influence Calcium Synchronization in Arterial Vasomotion." *Biophys J* **102**(2): 211-220.
- Kengne, A. P., F. Turnbull and S. MacMahon (2010). "The Framingham Study, diabetes mellitus and cardiovascular disease: turning back the clock." *Prog Cardiovasc Dis* **53**(1): 45-51.
- Kim, J. K., S. J. Kim, Y. C. Kim, I. So and K. W. Kim (1999). "Influence of extracellular Na⁺ removal on cytosolic Ca²⁺ concentration in smooth muscle cells of rabbit cerebral artery." *J Smooth Muscle Res* **35**(5-6): 135-145.
- Klabunde, R. E., K. M. Ryan and C. E. Paxson (2007). "Acute hyperglycaemia does not alter coronary vascular function in isolated, perfused rat hearts." *Diabetes Obes Metab* **9**(5): 697-705.
- Knaus, H. G., K. Folander, M. Garcia-Calvo, M. L. Garcia, G. J. Kaczorowski, M. Smith and R. Swanson (1994). "Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle." *J Biol Chem* **269**(25): 17274-17278.

- Knot, H. J. and M. T. Nelson (1998). "Regulation of arterial diameter and wall [Ca(2+)] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure." *J Physiol* **508**(Pt 1): 199-209.
- Kotecha, N. and M. A. Hill (2005). "Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca(2+) signaling." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(4): H1326-1334.
- Kraus, R. L., Y. Li, Y. Gregan, A. L. Gotter, V. N. Uebele, S. V. Fox, . . . J. J. Renger (2010). "In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **335**(2): 409-417.
- Lagrutta, A., J. Wang, B. Fermini and J. J. Salata (2006). "Novel, potent inhibitors of human Kv1.5 K⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current." *J Pharmacol Exp Ther* **317**(3): 1054-1063.
- Laing, S. P., A. J. Swerdlow, S. D. Slater, A. C. Burden, A. Morris, N. R. Waugh, . . . C. C. Patterson (2003). "Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes." *Diabetologia* **46**(6): 760-765.
- Lanner, J. T., D. K. Georgiou, A. D. Joshi and S. L. Hamilton (2010). "Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(11).
- Large, W. A., S. N. Saleh and A. P. Albert (2009). "Role of phosphoinositol 4,5-bisphosphate and diacylglycerol in regulating native TRPC channel proteins in vascular smooth muscle." *Cell Calcium* **45**(6): 574-582.
- Lee, J. H., J. C. Gomora, L. L. Cribbs and E. Perez-Reyes (1999). "Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H." *Biophys J* **77**(6): 3034-3042.
- Lee, U. S. and J. Cui (2010). "BK channel activation: structural and functional insights." *Trends Neurosci* **33**(9): 415-423.
- Leung, H. S., F. P. Leung, X. Yao, W. H. Ko, Z. Y. Chen, P. M. Vanhoutte and Y. Huang (2006). "Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery." *Vascul Pharmacol* **44**(5): 299-308.
- Liu, Y., M. Holmgren, M. E. Jurman and G. Yellen (1997). "Gated Access to the Pore of a Voltage-Dependent K⁺ Channel." *Neuron* **19**(1): 175-184.
- Löffler, G., Petrides, P E., Heinrich, P C., & Graeve, L. (2014). Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie (9. Aufl.). Berlin ; Heidelberg: Springer.
- Lu, T., X. L. Wang, T. He, W. Zhou, T. L. Kaduce, Z. S. Katusic, . . . H. C. Lee (2005). "Impaired arachidonic acid-mediated activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary arterial smooth muscle cells in Zucker Diabetic Fatty rats." *Diabetes* **54**(7): 2155-2163.
- Lu, T., D. M. Zhang, X. L. Wang, T. He, R. X. Wang, Q. Chai, . . . H. C. Lee (2010). "Regulation of coronary arterial BK channels by caveolae-mediated angiotensin II signaling in diabetes mellitus." *Circ Res* **106**(6): 1164-1173.

- Martinsen, A., C. Dessy and N. Morel (2014). "Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase." *Channels (Austin)* **8**(5): 402-413.
- Matchkov, V. V., A. Rahman, H. Peng, H. Nilsson and C. Aalkjaer (2004). "Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivatives in rat mesenteric small arteries." *Br J Pharmacol* **142**(6): 961-972.
- Mayhan, W. G., J. F. Mayhan, H. Sun and K. P. Patel (2004). "In vivo properties of potassium channels in cerebral blood vessels during diabetes mellitus." *Microcirculation* **11**(7): 605-613.
- McCarron, J. G. and W. Halpern (1990). "Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **259**(3): H902-H908.
- McGahon, M. K., D. P. Dash, A. Arora, N. Wall, J. Dawicki, D. A. Simpson, . . . T. M. Curtis (2007). "Diabetes downregulates large-conductance Ca²⁺-activated potassium beta 1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle." *Circ Res* **100**(5): 703-711.
- McManus, O. B. and K. L. Magleby (1991). "Accounting for the Ca(2+)-dependent kinetics of single large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat skeletal muscle." *J Physiol* **443**: 739-777.
- McNeish, A., F. J. Altayo and C. Garland (2010). "Evidence both L-type and non-L-type voltage-dependent calcium channels contribute to cerebral artery vasospasm following loss of NO in the rat." *Vascul Pharmacol* **53**(3-4): 151-159.
- Meera, P., M. Wallner, M. Song and L. Toro (1997). "Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(25): 14066-14071.
- Mellemkjaer, S. and J. E. Nielsen-Kudsk (1994). "Glibenclamide inhibits hypoxic relaxation of isolated porcine coronary arteries under conditions of impaired glycolysis." *Eur J Pharmacol* **270**(4): 307-312.
- Mintz, I. M., V. J. Venema, K. M. Swiderek, T. D. Lee, B. P. Bean and M. E. Adams (1992). "P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA." *Nature* **355**(6363): 827-829.
- Misfeldt, M. W., C. Aalkjaer, U. Simonsen and T. Bek (2010). "Voltage-gated calcium channels are involved in the regulation of calcium oscillations in vascular smooth muscle cells from isolated porcine retinal arterioles." *Exp Eye Res* **91**(1): 69-75.
- Nakahata, K., H. Kinoshita, Y. Tokinaga, Y. Ishida, Y. Kimoto, M. Dojo, . . . Y. Hatano (2006). "Vasodilation mediated by inward rectifier K⁺ channels in cerebral microvessels of hypertensive and normotensive rats." *Anesth Analg* **102**(2): 571-576.
- Nakanishi, S. (2016). "A spider toxin, omega-agatoxin IV A, binds to fixed as well as living tissues: cytochemical visualization of P/Q-type calcium channels." *Microscopy (Oxf)* **65**(4): 337-340.

- Nathan, D. M. (1993). "Long-term complications of diabetes mellitus." *N Engl J Med* **328**(23): 1676-1685.
- Nathan, D. M., P. A. Cleary, J. Y. Backlund, S. M. Genuth, J. M. Lachin, T. J. Orchard, . . . B. Zinman (2005). "Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes." *N Engl J Med* **353**(25): 2643-2653.
- Nausch, B., F. Rode, S. Jørgensen, A. Nardi, M. P. G. Korsgaard, C. Hougaard, . . . L. C. B. Rønn (2014). "NS19504: A Novel BK Channel Activator with Relaxing Effect on Bladder Smooth Muscle Spontaneous Phasic Contractions." *J Pharmacol Exp Ther* **350**(3): 520-530.
- Navarro-Dorado, J., M. Garcia-Alonso, C. van Breemen, T. Tejerina and N. Fameli (2014). "Calcium oscillations in human mesenteric vascular smooth muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **445**(1): 84-88.
- Navarro-Gonzalez, M. F., T. H. Grayson, K. R. Meaney, L. L. Cribbs and C. E. Hill (2009). "Non-L-type voltage-dependent calcium channels control vascular tone of the rat basilar artery." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**(1): 55-66.
- Nelson, M. T., H. Cheng, M. Rubart, L. F. Santana, A. D. Bonev, H. J. Knot and W. J. Lederer (1995). "Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks." *Science* **270**(5236): 633-637.
- Nishimura, J. (2006). "Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation." *J Pharmacol Sci* **102**(1): 27-31.
- O'Brien, F., E. Venturi and R. Sitsapesan (2015). "The ryanodine receptor provides high throughput Ca²⁺-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation." *Biochem Soc Trans* **43**(3): 426-433.
- Ono, S., T. Nagaoka, T. Omae, I. Tanano, T. Kamiya, S. Otani, . . . A. Yoshida (2014). "Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: roles of eNOS and potassium channels." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**(9): 5752-5759.
- Pande, J., K. K. Mallhi, A. Sawh, M. M. Szewczyk, F. Simpson and A. K. Grover (2006). "Aortic smooth muscle and endothelial plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms are inhibited differently by the extracellular inhibitor caloxin 1b1." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(5): C1341-1349.
- Pande, J., M. M. Szewczyk, I. Kuszczak, S. Grover, E. Escher and A. K. Grover (2008). "Functional effects of caloxin 1c2, a novel engineered selective inhibitor of plasma membrane Ca(2⁺)-pump isoform 4, on coronary artery." *J Cell Mol Med* **12**(3): 1049-1060.
- Peng, H., V. Matchkov, A. Ivarsen, C. Aalkjær and H. Nilsson (2001). "Hypothesis for the Initiation of Vasomotion." *Circ Res* **88**(8): 810-815.
- Peppiatt, C. M., T. J. Collins, L. Mackenzie, S. J. Conway, A. B. Holmes, M. D. Bootman, . . . H. L. Roderick (2003). "2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-

dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels." *Cell Calcium* **34**(1): 97-108.

Perez, G. J., A. D. Bonev and M. T. Nelson (2001). "Micromolar Ca(2+) from sparks activates Ca(2+)-sensitive K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(6): C1769-1775.

Perez, G. J., A. D. Bonev, J. B. Patlak and M. T. Nelson (1999). "Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries." *J Gen Physiol* **113**(2): 229-238.

Petkov, G. V. (2011). "Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction." *Nat Rev Urol* **9**(1): 30-40.

Potocnik, S. J. and M. A. Hill (2001). "Pharmacological evidence for capacitance Ca(2+) entry in cannulated and pressurized skeletal muscle arterioles." *Br J Pharmacol* **134**(2): 247-256.

Pozo, M. J., G. J. Perez, M. T. Nelson and G. M. Mawe (2002). "Ca(2+) sparks and BK currents in gallbladder myocytes: role in CCK-induced response." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(1): G165-174.

Quayle, J. M., J. G. McCarron, J. E. Brayden and M. T. Nelson (1993). "Inward rectifier K+ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 1): C1363-1370.

Ren, Y., X. Xu and X. Wang (2003). "Altered mRNA expression of ATP-sensitive and inward rectifier potassium channel subunits in streptozotocin-induced diabetic rat heart and aorta." *J Pharmacol Sci* **93**(4): 478-483.

Robbins, J. (2001). "KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Ther* **90**(1): 1-19.

Salkoff, L., A. Butler, G. Ferreira, C. Santi and A. Wei (2006). "High-conductance potassium channels of the SLO family." *Nat Rev Neurosci* **7**(12): 921-931.

Salomonsson, M., J. C. Brasen, T. H. Braunstein, P. Hagelqvist, N. H. Holstein-Rathlou and C. M. Sorensen (2015). "K(V)7.4 channels participate in the control of rodent renal vascular resting tone." *Acta Physiol (Oxf)* **214**(3): 402-414.

Sasaki, Y., M. Suzuki and H. Hidaka (2002). "The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway." *Pharmacol Ther* **93**(2-3): 225-232.

Schubert, R., U. Krien, I. Wulfsen, D. Schiemann, G. Lehmann, N. Ulfing, . . . H. Gago (2004). "Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels." *Hypertension* **43**(4): 891-896.

Schubert, R. and M. T. Nelson (2001). "Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle." *Trends Pharmacol Sci* **22**(10): 505-512.

Schubert, R., V. N. Serebryakov, H. Mewes and H. H. Hopp (1997). "Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase." *Am J Physiol* **272**(3 Pt 2): H1147-1156.

- Schweda, F., H. Seebauer, B. K. Krämer and A. Kurtz (2001). "Functional role of sodium-calcium exchange in the regulation of renal vascular resistance." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **280**(1): F155-F161.
- Seidler, N. W., I. Jona, M. Vegh and A. Martonosi (1989). "Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **264**(30): 17816-17823.
- Sepúlveda, F. V., L. Pablo Cid, J. Teulon and M. I. Niemeyer (2015). "Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K(2P) and Kir K(+)-Transport Channels." *Physiol Rev* **95**(1): 179-217.
- Sivarao, D. V., K. Newberry, S. Langdon, A. V. Lee, P. Hewawasam, M. J. Plym, . . . N. J. Lodge (2005). "Effect of 4-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3-(2-hydroxyethyl)-6-(trifluoromethyl)-quinolin-2(1H)-one (BMS-223131), a novel opener of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (maxi-K) channels on normal and stress-aggravated colonic motility and visceral nociception." *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 840-847.
- Smith, P. D., S. E. Brett, K. D. Luykenaar, S. L. Sandow, S. P. Marrelli, E. J. Vigmond and D. G. Welsh (2008). "K(IR) channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle." *J Physiol* **586**(Pt 4): 1147-1160.
- Stockand, J., A. Sultan, D. Molony, T. DuBose, Jr. and S. Sansom (1993). "Interactions of cadmium and nickel with K channels of vascular smooth muscle." *Toxicol Appl Pharmacol* **121**(1): 30-35.
- Suzuki, M., K. Muraki, Y. Imaizumi and M. Watanabe (1992). "Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-pump, reduces Ca(2⁺)-dependent K⁺ currents in guinea-pig smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **107**(1): 134-140.
- Suzuki, Y., H. Yamamura, S. Ohya and Y. Imaizumi (2013). "Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) and Cav1.2 Ca²⁺ channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes." *J Biol Chem* **288**(51): 36750-36761.
- Sweet, T. B. and D. H. Cox (2009). "Measuring the Influence of the BK(Ca) β 1 Subunit on Ca(2⁺) Binding to the BK(Ca) Channel." *J Gen Physiol* **133**(2): 139-150.
- Takai, N., A. Yamada, K. Muraki, M. Watanabe and Y. Imaizumi (2004). "KB-R7943 reveals possible involvement of Na(+)-Ca²⁺ exchanger in elevation of intracellular Ca²⁺ in rat carotid arterial myocytes." *J Smooth Muscle Res* **40**(1): 35-42.
- Thuesen, A. D., K. S. Lyngso, L. Rasmussen, J. Stubbe, O. Skott, F. R. Poulsen, . . . P. B. Hansen (2017). "P/Q-type and T-type voltage-gated calcium channels are involved in the contraction of mammary and brain blood vessels from hypertensive patients." *Acta Physiol (Oxf)* **219**(3): 640-651.
- Tinker, A., Q. Aziz and A. Thomas (2014). "The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system." *Br J Pharmacol* **171**(1): 12-23.
- Toro, L., M. Wallner, P. Meera and Y. Tanaka (1998). "Maxi K Ca channels, a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily." *Physiology* **13**(3): 112-117.

- Trendelenburg, U., R. A. Maxwell and S. Pluchino (1970). "Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of l-norepinephrine in the cat's nictitating membrane." *J Pharmacol Exp Ther* **172**(1): 91-99.
- Tsvetkov, D., J. Y. Tano, M. Kassmann, N. Wang, R. Schubert and M. Gollasch (2016). "The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone." *Front Physiol* **7**: 335.
- Tumelty, J., N. Scholfield, M. Stewart, T. Curtis and G. McGeown (2007). "Ca(2+)-sparks constitute elementary building blocks for global Ca(2+)-signals in myocytes of retinal arterioles." *Cell Calcium* **41**(5): 451-466.
- VanBavel, E., O. Sorop, D. Andreasen, M. Pfaffendorf and B. L. Jensen (2002). "Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(6): H2239-2243.
- Vianna, L. C., S. H. Deo, A. K. Jensen, S. W. Holwerda, M. C. Zimmerman and P. J. Fadel (2015). "Impaired dynamic cerebral autoregulation at rest and during isometric exercise in type 2 diabetes patients." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**(7): H681-687.
- Villalba, N., E. Stankevicius, U. Simonsen and D. Prieto (2008). "Rho kinase is involved in Ca²⁺ entry of rat penile small arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(4): H1923-H1932.
- Wallner, M., P. Meera and L. Toro (1996). "Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N terminus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(25): 14922-14927.
- Wei, A. D., G. A. Gutman, R. Aldrich, K. G. Chandy, S. Grissmer and H. Wulff (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels." *Pharmacological Reviews* **57**(4): 463-472.
- Westcott, E. B., E. L. Goodwin, S. S. Segal and W. F. Jackson (2012). "Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles." *J Physiol* **590**(8): 1849-1869.
- Westcott, E. B. and W. F. Jackson (2011). "Heterogeneous function of ryanodine receptors, but not IP(3) receptors, in hamster cremaster muscle feed arteries and arterioles." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**(5): H1616-1630.
- Wheeler, D. B., A. Randall and R. W. Tsien (1994). "Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission." *Science* **264**(5155): 107-111.
- Wray, S. and T. Burdyga (2010). "Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle." *Physiol Rev* **90**(1): 113-178.
- Xu, W. and D. Lipscombe (2001). "Neuronal Ca(V)1.3 α (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines." *J Neurosci* **21**(16): 5944-5951.
- Yang, Y., P. Y. Li, J. Cheng, F. Cai, M. Lei, X. Q. Tan, . . . X. R. Zeng (2013). "IP₃ decreases coronary artery tone via activating the BKCa channel of coronary artery smooth muscle cells in pigs." *Biochem Biophys Res Commun* **439**(3): 363-368.

- Yang, Y., T. V. Murphy, S. R. Ella, T. H. Grayson, R. Haddock, Y. T. Hwang, . . . M. A. Hill (2009). "Heterogeneity in function of small artery smooth muscle BK(Ca): involvement of the β 1-subunit." *J Physiol* **587**(Pt 12): 3025-3044.
- Yi, F., H. Wang, Q. Chai, X. Wang, W. K. Shen, M. S. Willis, . . . T. Lu (2014). "Regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BK) channel beta1 subunit expression by muscle RING finger protein 1 in diabetic vessels." *J Biol Chem* **289**(15): 10853-10864.
- Yu, X., H. Ma, S. A. Barman, A. T. Liu, M. Sellers, J. N. Stallone, . . . G. Han (2011). "Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**(5): E882-888.
- Yuan, X. J., J. Wang, M. Juhaszova, V. A. Golovina and L. J. Rubin (1998). "Molecular basis and function of voltage-gated K^{+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells." *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): L621-635.
- Yuill, K. H., A. J. McNeish, Y. Kansui, C. J. Garland and K. A. Dora (2010). "Nitric oxide suppresses cerebral vasomotion by sGC-independent effects on ryanodine receptors and voltage-gated calcium channels." *J Vasc Res* **47**(2): 93-107.
- Yusifov, T., N. Savalli, C. S. Gandhi, M. Ottolia and R. Olcese (2008). "The RCK2 domain of the human BK(Ca) channel is a calcium sensor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 376-381.
- Zacharia, J., J. Zhang and W. G. Wier (2007). " Ca^{2+} signaling in mouse mesenteric small arteries: myogenic tone and adrenergic vasoconstriction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(3): H1523-1532.
- Zhang, J., J. M. Hamlyn, E. Karashima, H. Raina, J. R. Mauban, M. Izuka, . . . M. P. Blaustein (2009). "Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(3): H1140-1150.
- Zhang, J. and C. E. Hill (2005). "Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes." *Kidney Int* **68**(3): 1171-1185.
- Zhong, X. Z., K. S. Abd-Elrahman, C. H. Liao, A. F. El-Yazbi, E. J. Walsh, M. P. Walsh and W. C. Cole (2010). "Stromatoxin-sensitive, heteromultimeric $\text{Kv}2.1/\text{Kv}9.3$ channels contribute to myogenic control of cerebral arterial diameter." *J Physiol* **588**(Pt 22): 4519-4537.

Danksagung

Ich möchte mich bei all den Menschen bedanken, die mir in den letzten Jahren zur Seite standen und diese Arbeit möglich gemacht haben.

Als erstes möchte ich Prof. Schubert für die Möglichkeit danken, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Danke für die intensive Betreuung, die ständige Erreichbarkeit und die Hilfestellung bei allen auftauchenden Problemen. Vielen Dank auch an Prof. Frings für die Bereitschaft, meine Arbeit als Erstgutachter zu begutachten und für die unkomplizierte Betreuung meiner Dissertation.

Ein besonderes Dankeschön gilt den Mitarbeitern der AG Schubert und Gloe, die mir nicht nur allzeit mit einer helfenden Hand zur Seite standen, sondern auch für gute Laune, eine tolle Arbeitsatmosphäre und die nötigen Kaffeepausen sorgten. Besonders danken möchte ich Camela Jost, die mir mit ihrer unendlichen Geduld jederzeit bei kleineren und größeren Problemen im Labor zu Hilfe kam. Auch möchte ich Lena, Vera, Betül, Nikola, Johannes, Dina, Carolina und David für die Unterstützung und Hilfe bei der Erhebung der Daten danken.

Paulus Wohlfart danke ich für die Möglichkeit, einen Teil meiner Versuche bei Sanofi durchführen zu können. Danke auch an Elke für die Hilfe im Labor und den warmen Empfang.

Auch möchte ich Prof. Hammes sowie Sigrid Englert für die Organisation des Graduiertenkollegs und die Möglichkeit, Teile meine Arbeit auf Meetings und Konferenzen vorzustellen, danken.

Prof. Buikema danke ich für die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes in Groningen. Danke auch an Dalibor für die Hilfe bei den Versuchen und Arash für das „Kulturprogramm“.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich all die Jahre bedingungslos unterstützt hat, mir den nötigen Rückhalt gegeben hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen hatte. Vielen Dank!