

Aus dem  
Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM) und dem  
European Center for Angioscience (ECAS)  
der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg  
Abteilung für kardiovaskuläre Physiologie  
(Leiter: Prof. Dr. Jörg Heineke)

## **Die Rolle von Kv11.1-Kanälen in der Tonusregulation von Arterien**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Nick Fabian Kaivers

aus  
Herne  
2021

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
**Referent:** Herr Prof. Dr. med. Rudolf Schubert

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Das kardiovaskuläre System .....	1
1.2	Aufbau von Arterien .....	1
1.3	Aufbau glatter Muskulatur .....	3
1.4	Kontraktions- und Relaxationsmechanismen glatter Muskulatur .....	3
1.4.1	Kontraktion glatter Gefäß-Muskulatur .....	3
1.4.2	Relaxation glatter Muskulatur .....	6
1.5	Das Membranpotential glatter Gefäßmuskulatur .....	7
1.6	Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskulatur .....	8
1.6.1	Calcium abhängige Kaliumkanäle ( $BK_{Ca}$ ) .....	8
1.6.2	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ ) .....	9
1.6.3	ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}/K_{IR6}$ ) .....	9
1.6.4	Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle ( $K_{2P}/TASK$ ) .....	9
1.6.5	Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ ) .....	10
1.6.6	Struktur der $K_V$ -Kanäle .....	10
1.6.7	Modulation der $K_V$ -Kanal-Aktivität durch Vasodilatoren und Vasokonstriktoren ..	11
1.6.8	Der $K_V11.1$ -Kanal .....	12
1.6.9	$K_V11.1$ Kanal-Struktur und Kinetik .....	12
1.6.10	Expression des $K_V11.1$ -Kanals .....	13
1.6.11	Die Rolle des $K_V11.1$ -Kanals in glatter Muskulatur .....	13
1.6.12	$K_V11.1$ -Kanäle und glatte Gefäßmuskulatur .....	14
1.7	Fragestellung und Zielsetzung .....	15
2	MATERIAL UND METHODEN .....	17
2.1	Versuchstiere .....	17
2.2	Chemikalien .....	17
2.2.1	Puffer .....	17
2.2.2	Verwendete vasoaktive Substanzen .....	19
2.3	Isometrische Myographie .....	20
2.3.1	Präparationsvorbereitung .....	22
2.3.2	Präparation der A. saphena .....	22
2.3.3	Installation der Gefäße im Multi-Wire-Myographen .....	23
2.3.4	Normalisierung .....	25

2.3.5	Überprüfung der Gefäßqualität .....	27
2.3.6	Versuch .....	28
2.4	Auswertung .....	33
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen .....	33
2.5.1	Präparation zur molekularbiologischen Untersuchung der RNA.....	33
2.5.2	RNA-Isolation .....	34
2.5.3	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	34
2.5.4	cDNA-Synthese .....	35
2.5.5	qPCR .....	36
2.5.6	Verwendete Primer .....	39
2.5.7	Auswertung .....	39
3	ERGEBNISSE .....	41
3.1	Expression von KCNH-Kanälen .....	41
3.1.1	mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Ratte.....	41
3.1.2	mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Maus .....	41
3.2	Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Ratte nach Blockade einzelner Kaliumkanäle .....	42
3.2.1	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von AVE1231.....	42
3.2.2	Effekt von BeKm auf die MX- induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von Glibenclamid .....	44
3.3	Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Ratte nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle .....	45
3.3.1	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von $BaCl_2$ und IBTX.....	45
3.3.2	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von $BaCl_2$ , IBTX, DPO-1 und STX.....	46
3.3.3	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von IBTX und XE991 .....	48
3.4	Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Relaxation der A. saphena der Ratte.....	49
3.4.1	Effekt von NS3623 auf die A. saphena der Ratte .....	49
3.4.2	Effekt von NS3623 auf die A. saphena der Ratte in An- und Abwesenheit von IBTX.....	50
3.4.3	Effekt von NS3623 auf die A. saphena der Ratte in An- und Abwesenheit von BeKm.....	51
3.5	Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Maus nach Blockade einzelner Kaliumkanäle .....	53
3.5.1	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von $BaCl_2$ .....	53
3.5.2	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX.....	54
3.6	Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Maus nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle .....	55

3.6.1	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX und BaCl <sub>2</sub> .....	55
3.6.2	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von BaCl <sub>2</sub> , IBTX, DPO-1 und STX.....	56
3.6.3	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX und XE991 .....	57
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Expression von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Ratte.....	59
4.2	Expression von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Maus.....	59
4.3	Wahl der Methode zur Untersuchung der funktionellen Rolle des K <sub>V</sub> 11.1-Kanals.....	60
4.4	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Vorkontraktion der A. saphena der Ratte.....	61
4.5	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Vorkontraktion der A. saphena der Ratte nach Blockade einzelner Kalium Kanäle .....	62
4.6	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle in der A. saphena der Ratte .....	62
4.6.1	Blockade des TASK-1-Kanals und des K <sub>IR</sub> 6-Kanals.....	62
4.6.2	Blockade des K <sub>IR</sub> 2-Kanals, des BK <sub>Ca</sub> -Kanals, des K <sub>V</sub> 1-Kanals sowie des K <sub>V</sub> 2-Kanals.....	63
4.6.3	Blockade des K <sub>V</sub> 7-Kanals und des BK <sub>Ca</sub> -Kanals .....	63
4.7	Beteiligung des K <sub>V</sub> 11.1-Kanals an der Relaxation der A. saphena der Ratte.....	64
4.7.1	Dilatation durch NS3623 nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle .....	64
4.7.2	Dilatation durch NS3623 ohne Blockade des BK <sub>Ca</sub> -Kanals .....	65
4.7.3	Dilatation durch NS3623 ohne Blockade des K <sub>V</sub> 11.1-Kanals .....	65
4.8	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion der A. saphena der Maus nach Blockade einzelner Kaliumkanäle.....	66
4.8.1	Blockade des K <sub>IR</sub> 2-Kanals und des BK <sub>Ca</sub> -Kanals.....	66
4.9	Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle in der A. saphena der Maus.....	67
4.10	Schlussfolgerung .....	68
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	72
8	LEBENS LAUF .....	80
9	DANKSAGUNG .....	81

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System stellt die Versorgung der Gewebe des Körpers mit Nährstoffen und Sauerstoff sicher, indem die Zielorgane über Gefäße mit Blut versorgt werden. Über den venösen Abfluss können Stoffwechselendprodukte abtransportiert werden. Für eine adäquate Durchblutung ist der Blutdruck unverzichtbar, um den Blutfluss zu gewährleisten und die individuelle Organ-Durchblutung zu garantieren (Guyton, 1981). Durch ihre kontraktile Eigenschaften spielen Arterien, insbesondere kleine systemische Arterien und Arteriolen, eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung des peripheren Gefäßwiderstandes und damit in der Sicherung des Blutdrucks als auch in der Regulation des Blutflusses zu einzelnen Organen (Nelson and Quayle, 1995).

## 1.2 Aufbau von Arterien

Arterien sind dreigeschichtete Hohlgänge. Die Schichtung wird aus einer Tunica intima, einer Tunica media und einer Tunica adventitia gebildet (Abb. 1).

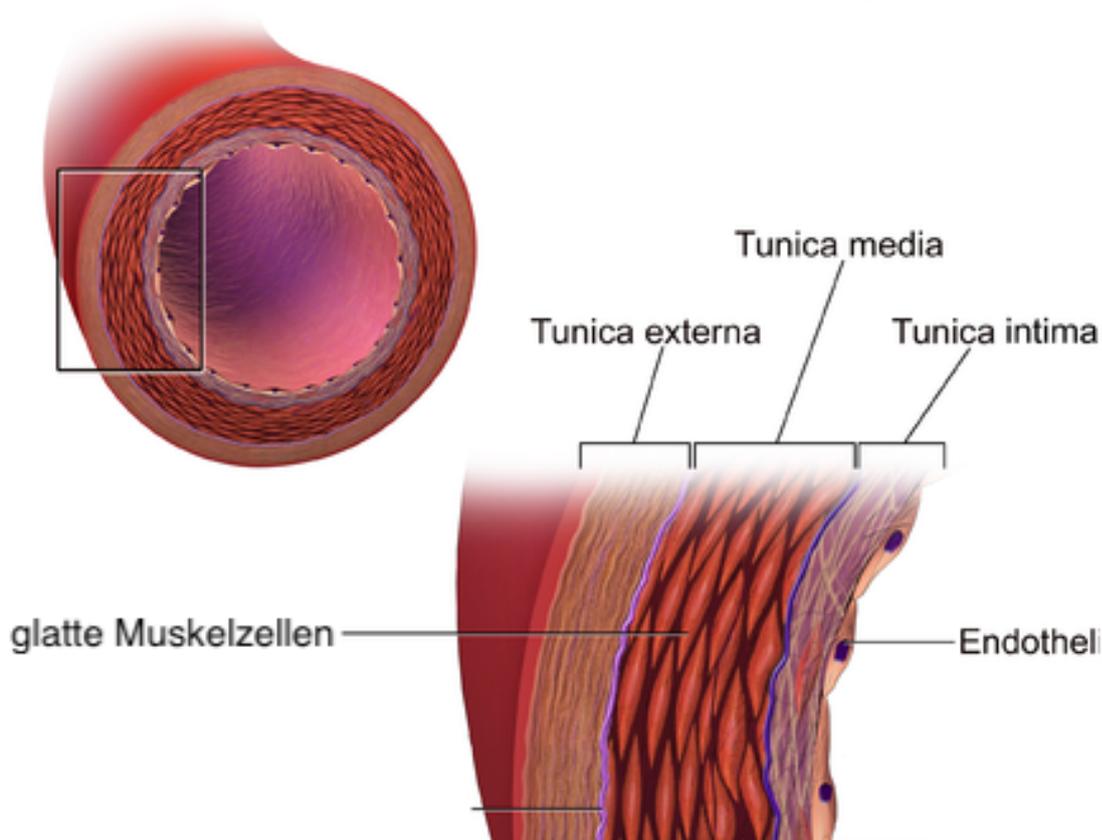
Die Intima besteht aus dem Endothel und einer darunter angrenzenden Bindegewebsschicht, dem Stratum subendotheliale. Als dünne Schicht flacher Epithelzellen kleidet das Endothel Gefäße, sowie das Herz von innen aus.

Somit stellt es die Grenze zwischen Blut und extravasalem Raum dar und ist als selektiv-permeable Membran für den Austausch von Gasen und Metaboliten zwischen Gefäß und Gewebe verantwortlich. Darüber hinaus nimmt das Endothel wichtige Funktionen in der Gerinnungshemmung, in der Leukozytenadhäsion, sowie immunmodulierende Aufgaben ein. Durch Synthese vasoaktiver Substanzen wie dem Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst das Endothel den Gefäßtonus und damit den lokalen Blutfluss (Deller, 2018).

Die Media bildet die kräftigste Schicht einer Arterie und besteht aus drei bis dreißig Lagen konzentrisch angeordneter glatter Muskelzellen. Umgeben sind die glatten Muskelzellen von Proteoglykanen, Typ III-Kollagen und elastischen Fasern, die alle durch die glatte Muskulatur selbst synthetisiert werden. Über Gap Junctions sind die

glatten Muskelzellen miteinander gekoppelt und bilden somit ein funktionelles Synzytium. Durch Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird der Durchmesser von Arterien und damit der periphere Gefäßwiderstand maßgeblich reguliert (Deller, 2018).

Die äußerste Schicht von Arterien wird als Adventitia bezeichnet. Sie besteht aus Typ-I-Kollagen, Bindegewebe, elastischen Fasern, einzelnen Immunzellen und kleinen Blutgefäßen. Sie verankert die Arterie im umliegenden Gewebe und ist für die Blutversorgung der äußeren Gefäßschichten verantwortlich. Außerdem ist die Adventitia stark durch Nervenfasern des vegetativen Nervensystems (v.a. sympathische Fasern) innerviert (Deller, 2018).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer Arterie

Quelle: "Structure of an Artery Wall" von BruceBlasus.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0055\\_ArteryWallStructure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png)

lizensiert unter der Creative Commons Lizenz:

<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.en>

modifizierte Abbildung.

### 1.3 Aufbau glatter Muskulatur

Die spindelförmigen Zellen der glatten Muskulatur sind ca. 20 bis 200  $\mu\text{m}$  lang und besitzen einen Durchmesser von etwa 3 bis 10  $\mu\text{m}$ . Das im Sarkoplasma enthaltene sarkoplasmatische Reticulum (SR) ist ein intrazellulärer Calciumspeicher; Calcium ist maßgeblich am Kontraktionsmechanismus beteiligt. Im Sarkoplasma der glatten Muskelzelle bilden Aktin- und Myosinfilamente den kontraktilem Apparat und verlaufen ohne eine mit dem Skelettmuskel vergleichbare Struktur durch die Muskelzelle. Die Kontraktion glatter Muskulatur findet, wie in jeder anderen Muskulatur auch, durch die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente statt. Dabei schiebt sich Myosin an den Aktinfilamenten entlang und die Muskelzellen verkürzen sich (Deller, 2018).

### 1.4 Kontraktions- und Relaxationsmechanismen glatter Muskulatur

Durch neurale und humorale Signale, sowie durch mechanische Kräfte und Änderung der Ionenkonzentrationen des extrazellulären Raums werden die Mechanismen der Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur gesteuert (Woodrum and Brophy, 2001).

#### 1.4.1 Kontraktion glatter Gefäß-Muskulatur

Abb. 2 zeigt die Kontraktionsmechanismen glatter Gefäßmuskulatur. Vasokonstriktoren wie Angiotensin II aktivieren spezifische Rezeptoren der Zellmembran glatter Muskulatur und bedingen eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ).  $\text{IP}_3$  wirkt als Ligand für Rezeptoren auf dem SR und führt durch deren Aktivierung zur Freisetzung großer Mengen Calcium in die Muskelzelle. Außerdem aktiviert Calcium, sowie DAG die Calcium-abhängige Proteinkinase C (PKC). Die aktivierte PKC besitzt einige Zielstrukturen, die sie phosphoryliert und damit aktiviert, u.a. Calcium-Kanäle vom L-Typ. Die Folge ist ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Webb, 2003).

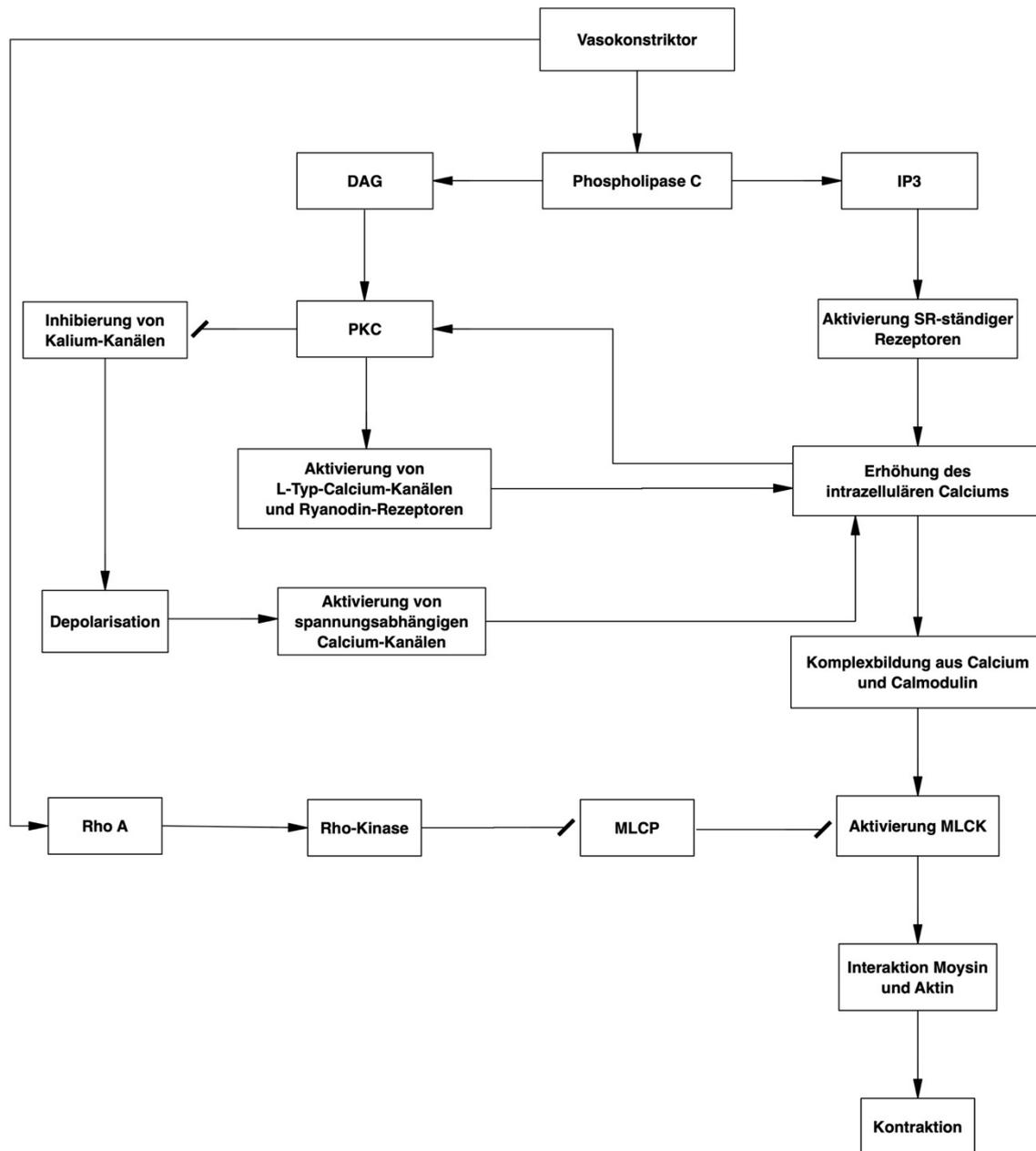
Im Sinne einer Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung (Calcium induced Calcium release, CICR) wird durch die ansteigende intrazelluläre Calcium-Konzentration ein verstärkter Calcium-Fluss aus Ryanodin-Rezeptoren getriggert (Tykocki et al., 2017).

Weiterhin inhibieren Isoformen der PKC membranständige Kaliumkanäle, sodass Kalium dem elektrochemischen Gradienten folgend nicht aus der Muskelzelle fließen kann und somit die Zell-Depolarisation begünstigt wird (Ko et al., 2008).

Die durch die Deaktivierung von Kaliumkanälen induzierte Depolarisation (Ko et al., 2008) mündet in einer Aktivierung membranständiger spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, wodurch vermehrt Calcium in die Muskelzelle einströmt (Somlyo and Somlyo, 1994). Das in großen Mengen freigesetzte Calcium bildet mit dem Protein Calmodulin einen Komplex, der in der Lage ist die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) zu aktivieren. Die MLCK wiederum phosphoryliert die leichten Ketten der Myosinfilamente. Nun kann Myosin mit Aktin interagieren und die Voraussetzungen für den Kontraktionsmechanismus sind erfüllt (Webb, 2003).

Die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) antagonisiert die Funktion der MLCK, indem sie die Myosin-Leichtketten dephosphoryliert. Damit ist eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin nicht mehr möglich und somit auch keine Kontraktion. Daher wird im Sinne einer Stabilisierung der Kontraktion über das GTP-bindende Protein RhoA das Enzym Rho-Kinase aktiviert. Die Rho-Kinase phosphoryliert eine Untereinheit der MLCP und inaktiviert sie (Webb, 2003).

Das Protein CPI-17 wird durch die PKC phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die aktive Form von CPI-17 ist ebenfalls imstande, die Aktivität der MLCP zu hemmen (Eto et al., 1995). Somit kann die Kontraktion nicht mehr abgeschwächt werden. Sogenannte Guanine Exchange Factors (GEFs) tauschen an RhoA gebundenes Guanindiphosphat (GDP) durch Guanintriphosphat (GTP) aus und führen RhoA in einen aktivierten Zustand über (Webb, 2003).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Kontraktions-Mechanismen glatter Gefäß-Muskulatur

Durch einen Vasokonstriktor, wie z.B. Angiotensin II, wird G-Protein-vermittelt die Phospholipase C aktiviert, die ihrerseits Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) synthetisiert. Freies Calcium und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum Kaliumkanäle deaktiviert. Es folgt eine Depolarisation der Zellmembran und somit eine Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Außerdem aktiviert die PKC L-Typ-Calcium-Kanäle sowie Ryanodin-Rezeptoren des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), wodurch die Calcium-Konzentration intrazellulär ansteigt.  $IP_3$  seinerseits aktiviert Rezeptoren am SR. Als Folge werden große Mengen Calcium intrazellulär freigesetzt. Der Komplex aus Calcium und Calmodulin ist in der Lage die Myosin-Leichtketten-Kinase

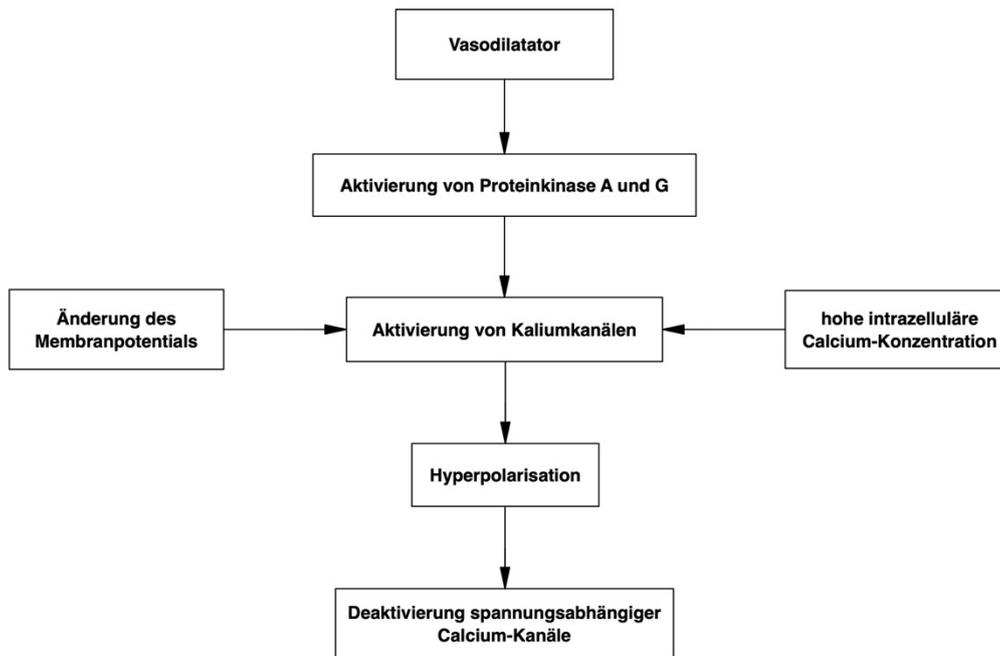
*(MLCK) zu aktivieren, welche die leichten Ketten der Myosinfilamente phosphoryliert und damit die Interaktion zwischen Myosin und Aktin und folglich eine Kontraktion ermöglicht.*

*Das Protein Rho A aktiviert die Rho-Kinase, welche in der Lage ist die MLCP im Sinne einer Kontraktionsstabilisierung zu inaktivieren. Aus Übersichtsgründen ist die Aktivierung des Proteins CPI-17 durch die PKC sowie die daraus resultierende Inaktivierung der MLCP nicht dargestellt.*

#### 1.4.2 Relaxation glatter Muskulatur

Die Mechanismen der Relaxation glatter Muskulatur basieren auf der Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration sowie auf der gesteigerten Aktivität der MLCP. Dabei reduzieren Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellmembran intrazelluläres Calcium durch Ausschleusung aus der Zelle (Webb, 2003). Darüber hinaus enthält die Membran des SR Isoformen der Calcium-ATPase SERCA (sarcoplasmic or endoplasmic reticulum calcium ATPase). Diese reduziert die Konzentration des freien Calciums durch ATP-abhängigen Transport von Calcium-Ionen in das SR (Wu et al., 2001). Im SR lokalisierte Calcium-bindende Proteine wie Calreticulin verbessern die Aufnahme-Kapazität der Calciumspeicher (Milner et al., 1991).

Ein wichtiger Mechanismus, der zur Relaxation der glatten Muskulatur führt, ist die Aktivierung von Kaliumkanälen in der Zellmembran (Abb. 3). Die Bindung von Vasodilatoren an Rezeptoren der Zellmembran aktiviert G-Protein-vermittelt Enzyme wie die Adenylatcyclase oder die Guanylatcyclase. Diese synthetisieren zyklische Nukleotide, welche wiederum benötigt werden, um Kinasen wie die Proteinkinase A oder die Proteinkinase G zu stimulieren. Die Proteinkinasen sind in der Lage spezifische Kaliumkanäle durch Phosphorylierung zu öffnen. Kaliumkanäle können auch durch eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration oder durch Änderungen des Membranpotentials geöffnet werden. Die unterschiedlichen Mechanismen der Aktivierung von Kaliumkanälen resultieren dem elektro-chemischen Gradienten folgend im Austritt von Kalium-Ionen aus der Muskelzelle. Dadurch wird eine Hyperpolarisation ausgelöst, wodurch die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle deaktiviert werden und die intrazelluläre Calcium-Konzentration reduziert wird (Ko et al., 2008).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Rolle von Kaliumkanälen in der Relaxation glatter Gefäß-Muskulatur

Durch einen Vasodilatator wird G-Protein-vermittelt die Synthese zyklischer Nukleotide vermittelt (nicht dargestellt), welche wiederum die Proteinkinasen A und G aktivieren. Diese phosphorylieren spezifische Kaliumkanäle und öffnen sie damit. Auch die Änderung des Membranpotentials kann spannungsabhängige Kaliumkanäle aktivieren. Andere, Calcium-sensible Kaliumkanäle werden durch eine hohe intrazelluläre Calcium-Konzentration aktiviert. Dem elektro-chemischen Gradienten folgend strömt Kalium aus der Zelle heraus und es folgt eine Hyperpolarisation. Damit kommt es zur Deaktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Folglich steht weniger Calcium bereit und die Kontraktion wird abgeschwächt.

### 1.5 Das Membranpotential glatter Gefäßmuskulatur

Das Membranpotential glatter Gefäßmuskulatur liegt zwischen -40 mV und -55 mV. Es entsteht durch die intra- und extrazelluläre Ionen-Verteilung und die dadurch über die Zellmembran erzeugten elektrochemischen Gradienten, sowie der Membranpermeabilität für diese Ionen. Kalium weist eine sehr hohe intrazelluläre Konzentration (140 – 160 mM) im Vergleich zur extrazellulären Konzentration (3 – 5 mM) auf, wodurch ein Kalium-Gleichgewichtspotential  $E_K$  von -90 mV gebildet wird. Außerdem ist die Permeabilität der Zellmembran für Kalium im Vergleich zu der anderer Ionen hoch, daher ist Kalium maßgeblich an der Einstellung der Größe des

Membranpotentials (Hirst and Edwards, 1989) und damit auch an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Vermutlich ist die Permeabilität der Zellmembran für Chlorid ursächlich für positivere Werte des Membranpotentials als das Kalium-Gleichgewichtspotential (Nelson and Quayle, 1995).

## 1.6 Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskulatur

Kaliumkanäle spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation des Gefäßtonus. Eine Aktivierung dieser Kanäle hat zur Folge, dass Kalium-Ionen dem elektrochemischen Gradienten folgend aus der Zelle fließen, wodurch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials in der glatten Gefäßmuskulatur ausgelöst wird. Daraufhin schließen sich spannungsabhängige Calcium-Kanäle, sodass als Folge der niedrigen Calcium-Konzentration die Kontraktion abgeschwächt wird oder in eine Relaxation der Muskulatur übergeht. Auf der anderen Seite führt eine Deaktivierung von Kaliumkanälen zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur (Ko et al., 2008).

Bisher konnten fünf Familien von Kaliumkanälen in glatter Gefäßmuskulatur identifiziert werden (Gurney and Manoury, 2009; Tykocki et al., 2017).

### 1.6.1 Calcium abhängige Kaliumkanäle ( $BK_{Ca}$ )

$BK_{Ca}$ -Kanäle stellen die am häufigsten vorkommende Gruppe der Kaliumkanäle in glatter Gefäßmuskulatur dar. Sie werden durch erhöhte Konzentrationen intrazellulären Calciums sowie durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert (Tykocki et al., 2017). Zudem findet eine Regulation der Kanalaktivität über die Proteinkinasen A, G und C statt (Schubert and Nelson, 2001).  $BK_{Ca}$ -Kanäle regulieren den sogenannten myogenen Tonus, eine entscheidende Reaktion, um den peripheren Gefäßwiderstand zu stabilisieren. Als Folge eines erhöhten intravasalen Drucks depolarisiert die Muskulatur peripherer Widerstandsgefäße und führt zur Vasokonstriktion. Die Depolarisation und das erhöhte intrazelluläre Calcium bedingen eine Aktivierung der  $BK_{Ca}$ -Kanäle, womit im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus eine überschießende Kontraktion und Vasospasmen begrenzt werden (Nelson and Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017).

### 1.6.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ )

$K_{IR}$ -Kanäle stabilisieren das Membranpotential und reduzieren den Verlust intrazellulären Kaliums. Darauf lässt die Tatsache schließen, dass  $K_{IR}$ -Kanäle eine erhöhte Aktivität bei negativen Membranpotentialen aufweisen. Membranpotentiale, die negativer als das Kalium-Gleichgewichtspotential sind, bewirken einen Einstrom von Kalium-Ionen über  $K_{IR}$ -Kanäle; Membranpotentiale, die positiver als das Kalium-Gleichgewichtspotential sind, führen zu einem Kalium-Ausstrom. Des Weiteren sind  $K_{IR}$ -Kanäle mitverantwortlich für die Kalium-induzierte Vasodilatation. Dabei wird vermutlich durch eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration der  $K_{IR}$ -Kanal aktiviert und eine Vasodilatation ausgelöst, wodurch der Blutfluss reguliert werden kann (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017).

### 1.6.3 ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}/K_{IR6}$ )

$K_{ATP}$ -Kanäle gehören zu den o.g. einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen und werden durch eine erhöhte intrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP) - Konzentration inhibiert. Eine erniedrigte ATP-Konzentration, sowie vermutlich eine erhöhte Adenosindiphosphat (ADP) - Konzentration und eine intrazelluläre Übersäuerung führen zu einer Aktivierung dieser Kanäle. Daher liegt die Vermutung nahe, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle eine relevante Rolle in der Regulation von hypoxischen Stoffwechsellagen einnehmen. Außerdem sind  $K_{ATP}$ -Kanäle an der reaktiven Hyperämie nach unterbundenem Blutfluss beteiligt, indem sie eine Vasodilatation induzieren und damit den Blutfluss in minderperfundierte Gefäßareale verbessern. Darüber hinaus beteiligen sich die  $K_{ATP}$ -Kanäle an der Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus (Cole and Clement-Chomienne, 2003; Nelson and Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017).

### 1.6.4 Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle ( $K_{2P}/TASK$ )

$K_{2P}$ -Kanäle besitzen zwei Kalium-selektive Kanal-Poren. Ihre Rolle in glatter Gefäßmuskulatur ist nicht vollständig geklärt; zum einen wird vermutet, dass sie aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und dem pH-Wert sowie chemischen Signalen wie Arachidonsäure als Chemosensoren dienen. Zum anderen spielen  $K_{2P}$ -Signale wahrscheinlich eine Rolle in der durch Hypoxie vermittelten Vasokonstriktion von Pulmonalarterien (Gurney and Manoury, 2009).

### 1.6.5 Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ )

Die zuerst von Beech & Bolton (Beech and Bolton, 1987, 1989), sowie von Okabe et al. (Okabe et al., 1987) beschriebenen  $K_V$ -Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur kennzeichnet ihr Öffnungsverhalten bei Änderungen des Membranpotentials. Sie werden durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert und inaktivieren bei anhaltend positivem Membranpotential. Die als Folge ihrer Aktivierung ausgelöste Hyperpolarisation ist ein wichtiger Mechanismus, um das Membranpotential zu stabilisieren und eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur zu begrenzen, bzw. den Ruhetonus des Gefäßes wieder herzustellen (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995).

$K_V$ -Kanäle können anhand ihrer Kinetik bezüglich der Aktivierung und Inaktivierung eingeteilt werden. Es wird zwischen einem A-Typ (schnelle Inaktivierung nach beginnender Depolarisation) und einem Delayed Rectifier-Typ (langsame Inaktivierung nach beginnender Depolarisation) unterschieden, wobei letzterer Mechanismus am häufigsten in glatter Gefäßmuskulatur vorkommt (Cox, 2005; Gonzalez et al., 2012; Tykocki et al., 2017)

$K_V$ -Kanäle lassen sich 12 Familien zuordnen ( $K_V1-12$ ), die durch 40 Gene codiert werden (Jackson, 2018; Tykocki et al., 2017). Ursächlich für die Vielfalt der  $K_V$ -Kanäle ist neben alternativem RNA-Splicing und post-translationaler Modifikation die sog. Heteromultimerisation, ein Prozess, bei dem sich ein Kanal aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammensetzt (Gutman et al., 2005).

### 1.6.6 Struktur der $K_V$ -Kanäle

Die Struktur eines  $K_V$ -Kanals besteht aus einem Tetramer, der aus 4  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet wird. Jede der  $\alpha$ -Untereinheiten besteht aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6) sowie einer Schleifendomäne (P-Domäne) zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6. S5, S6 und die P-Domäne bilden gemeinsam die Kalium-selektive Pore des Kanals. Der N-Terminus und der C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten sind intrazellulär positioniert (Cox, 2005). Durch positiv geladene Aminosäuren in den Transmembrandomäne S4 werden Veränderungen des Membranpotentials registriert. Daher übernimmt S4 mit den Transmembrandomänen S1-S3 die Funktion des

Spannungssensors des Kanals (Jackson, 2018). Neben den  $\alpha$ -Untereinheiten nehmen akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten Einfluss auf die Kanalfunktion und können die Kanalinaktivierung mit regulieren (Gutman et al., 2005; Robertson, 1997; Torres et al., 2007). Ein am N-Terminus befestigter „Ball“ fungiert im Rahmen der schnellen Inaktivierung des  $K_V$ -Kanals, der N-Inaktivierung, als Verschluss der Kanalpore. Der Ball besitzt geladene und hydrophobe Anteile, die seine Affinität zum Kanal modulieren (Robertson, 1997). Intrazelluläre Signalkaskaden können durch Phosphorylierung den Ball und damit auch die Inaktivierungskinetik des Kanals beeinflussen (Covarrubias et al., 1994; Drain et al., 1994; Roeper et al., 1997). Die N-Inaktivierung ist vor allem in A-Typ- $K_V$ -Kanälen vertreten. Die insbesondere bei Delayed Rectifier- $K_V$ -Kanälen vorkommende C-Inaktivierung ist ein deutlich langsamerer Prozess, bei der bei anhaltender Depolarisation durch eine Konformationsänderung des Selektivitätsfilters eine Inaktivierung des  $K_V$ -Kanals erfolgt (Leung, 2012). Erst bei erneuter Depolarisation ändert sich die Kanalkonformation, sodass der  $K_V$ -Kanal sich wieder öffnen kann (Jensen et al., 2012).

#### 1.6.7 Modulation der $K_V$ -Kanal-Aktivität durch Vasodilatoren und Vasokonstriktoren

Eine durch Vasodilatoren bedingte Aktivierung von  $K_V$ -Kanälen basiert auf der Stimulation  $G_S$ -Protein gekoppelter Rezeptoren, der cAMP-Signalkaskade, und der daraus resultierenden Stimulation der Proteinkinase A, welche  $K_V$ -Kanäle aktiviert. Das vom Endothel sezernierte NO wirkt über Aktivierung der cGMP Signalkaskade. Die dabei aktivierte Proteinkinase G ist in der Lage  $K_V$ -Kanäle durch Phosphorylierung zu aktivieren (Jackson, 2018; Tykocki et al., 2017).

Vasokonstriktoren wirken über  $G_q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Phospholipase C-Signalkaskade in Gang setzen. Folglich werden Proteinkinasen, wie die Proteinkinase C, aktiviert und deaktivieren  $K_V$ -Kanäle. Auch über die Rho-Kinase können  $K_V$ -Kanäle deaktiviert werden. Daneben bewirkt eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration, wahrscheinlich im Rahmen einer Selbstverstärkung bei einer Depolarisation, eine Deaktivierung von  $K_V$ -Kanälen (Jackson, 2018; Tykocki et al., 2017).

### 1.6.8 Der $K_v11.1$ -Kanal

Der  $K_v11.1$ -Kanal ist Mitglied der ether-a-go-go related gene (ERG) Kanäle, zu denen auch der  $K_v11.2$ - und der  $K_v11.3$ -Kanal gehören (Bauer and Schwarz, 2018). Das menschliche Äquivalent des  $K_v11.1$ -Kanals wird als hERG (human ether-a-go-go related gene) bezeichnet und liegt auf Chromosom 7 (Vandenberg et al., 2012).

$K_v11.1$ -Kanäle werden durch die KCNH-Gen-Familie codiert (Bauer and Schwarz, 2018), wobei KCNH2 für den  $K_v11.1$ -Kanal codiert (Warmke and Ganetzky, 1994).

Durch Kaplan & Trout konnte schon 1969 gezeigt werden, dass bei Mutanten von *Drosophila melanogaster* unter Ether-Anästhesie charakteristische Zuckungen der Beine auftreten. Diese an den Go-Go-Tanz erinnernde Bewegungen führten zu dem eigentümlichen Namen „ether a go go“ (Kaplan and Trout, 1969).

Später konnte herausgefunden werden, dass diese Mutation zu einer erhöhten Spontanaktivität von Motorneuronen und Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt führt und im EAG - (Ether-a-go-go) Genlokus von *Drosophila melanogaster* lokalisiert ist (Ganetzky and Wu, 1983), welcher ein homologes Protein von hERG codiert (Warmke et al., 1991).

### 1.6.9 $K_v11.1$ Kanal-Struktur und Kinetik

Der  $K_v11.1$ -Kanal besteht, genauso wie andere Gruppen der  $K_v$ -Familie, aus einem Tetramer mit jeweils 6 Transmembrandomänen, einem Spannungssensor und einer Kanalpore (Vandenberg et al., 2012). Am N-Terminus befindet sich eine sog. PAS-Domäne (Morais Cabral et al., 1998), welche vermutlich eine Rolle in der Regulation der Kanal-Kinetik spielt (Harley et al., 2016). Eine weitere Besonderheit ist das Vorkommen einer cyclic nucleotide binding-Domäne (cNBD) am C-Terminus, welche denen von cyclic nucleotide-gated cation (CNG)- Kanälen sehr ähnelt (Warmke and Ganetzky, 1994) und wahrscheinlich ebenfalls regulatorische Aufgaben übernimmt (Cui et al., 2001). Interaktionen zwischen N-Terminus und C-terminaler cNBD-Domäne sind entscheidend für die Deaktivierungs-Kinetik des Kanals (Ng et al., 2014).

Akzessorische Untereinheiten wie minK oder MiRP1 werden durch die KCNE-Gen-Familie codiert und bilden gemeinsam mit dem  $K_v11.1$ -Kanal funktionelle Komplexe. Außerdem nehmen die Untereinheiten Kanal-modulierende Rollen ein (Abbott et al., 1999; McCrossan and Abbott, 2004; McDonald et al., 1997).

Den  $K_v11.1$ -Kanal kennzeichnet eine besondere Kinetik. Er wird schneller inaktiviert als aktiviert. Dies bedeutet, dass bei Depolarisation der Zelle eine langsame Aktivierung des Kanals ausgelöst wird, auf die eine schnelle spannungsabhängige Inaktivierung folgt, sodass bei positiven Membranpotentialen nur ein geringer Kalium-Auswärtsstrom auftritt (Smith et al., 1996; Spector et al., 1996; Trudeau et al., 1995). Da sich der  $K_v11.1$ -Kanal während der Repolarisation schneller von dem inaktivierten Zustand „erholen“ kann, als er deaktiviert wird, folgt dabei ein weiterer, großer Kalium-Auswärtsstrom, bis der Kanal in den deaktivierten Zustand übergeht (Shibasaki, 1987; Trudeau et al., 1995).

#### 1.6.10 Expression des $K_v11.1$ -Kanals

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert den  $K_v11.1$ -Kanal. Er konnte u.a. im humanen Hippocampus (Huffaker et al., 2009), im zentralen Nervensystem der Maus (Guasti et al., 2005), in humanen  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Rosati et al., 2000), sowie in laktotropen Zellen der Adenohypophyse der Ratte (Schafer et al., 1999) nachgewiesen werden.

Darüber hinaus spielt der  $K_v11.1$ -Kanal aufgrund seiner besonderen kinetischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle in der Repolarisation der Plateauphase des Aktionspotentials in Kardiomyozyten und verhindert unter physiologischen Bedingungen Arrhythmien. Loss-of-function Mutationen im  $KCNH2$ -Gen können zum Long-QT-Syndrom Typ 2 führen, bei dem durch eine verzögerte Repolarisation das Auftreten des plötzlichen Herztodes durch Arrhythmien begünstigt wird (Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006; Smith et al., 1996).

#### 1.6.11 Die Rolle des $K_v11.1$ -Kanals in glatter Muskulatur

In glatter zirkulärer Muskulatur des Opossum-Ösophagus konnten spezifische  $K_v11.1$ -Kalium-Ströme durch  $K_v11.1$ -Kanal-Blocker vollständig aufgehoben und phasische Kontraktionen ausgelöst werden (Akbarali et al., 1999). Ähnliche Resultate wurden in glatter Muskulatur des Rattenmagens (Ohya et al., 2002a) und im Jejunum des Pferdes (Lillich et al., 2003) beobachtet. In glatter Muskulatur der Meerschweinchen-Gallenblase verlängerte ein spezifischer  $K_v11.1$ -Kanal-Blocker die Plateauphase des Aktionspotentials und führte zur Depolarisation sowie Kontraktion glatter Muskelzellen

(Parr et al., 2003). In glatter Muskulatur des Nebenhodengangs von Rindern wurden durch  $K_V11.1$ -Kanal-Blocker spontane Kontraktionen ausgelöst;  $K_V11.1$ -Kanal-Öffner hingegen hoben rhythmische Kontraktionen vollständig auf (Mewe et al., 2008). Spontane Kontraktionen durch  $K_V11.1$ -Kanal-Blocker konnten ebenfalls in glatter Muskulatur der Meerschweinchen-Harnblase (Imai et al., 2001), sowie im Myometrium von nicht schwangeren Mäusen ausgelöst werden.  $K_V11.1$ -Kanal-spezifische Öffner führten im Myometrium zur vollständigen Relaxation (Greenwood et al., 2009).

Diese Tatsachen veranlassten die Autoren der hier aufgeführten Untersuchungen zur Schlussfolgerung, dass der  $K_V11.1$ -Kanal eine wichtige Funktion in der Repolarisation sowie in der Stabilisierung des Membranpotentials glatter Muskulatur einnimmt (Akbarali et al., 1999; Greenwood et al., 2009; Imai et al., 2001; Lillich et al., 2003; Mewe et al., 2008; Ohya et al., 2002a; Parr et al., 2003).

#### 1.6.12 $K_V11.1$ -Kanäle und glatte Gefäßmuskulatur

Ohya, Horowitz & Greenwood waren die ersten, die die Expression von  $K_V11.1$ -Kanälen in glatter Gefäßmuskulatur belegten. Es gelang ihnen zwei Isoformen des  $K_V11.1$ -Kanals in glatter Muskulatur der Pfortader der Maus nachzuweisen. Darüber hinaus wiesen sie  $K_V11.1$ -Kanal-spezifische Ströme nach. Die Autoren vermuteten, dass der  $K_V11.1$ -Kanal eine zu beachtende Rolle in der Repolarisation des Membranpotentials glatter Gefäßmuskulatur spielt (Ohya et al., 2002b).

Yeung & Greenwood konnten unter quasi-physiologischen Bedingungen nachweisen, dass in der Pfortader der Maus  $K_V11.1$ -Kanal-Ströme fließen und diese durch spezifische  $K_V11.1$ -Kanal-Blocker unterbunden werden können. Außerdem führte eine Stimulation der  $K_V11.1$ -Kanäle mit spezifischen Öffnern zur Hyperpolarisation des Membranpotentials. Damit bestätigten Yeung & Greenwood die Ergebnisse von Ohya, Horowitz & Greenwood, dass  $K_V11.1$ -Kanäle eine relevante Funktion in der Repolarisation und Stabilisierung des Membranpotentials der Pfortader einnehmen (Yeung and Greenwood, 2007).

Barrese et al. wiesen die Expression von  $K_V11.1$ -Kanälen mittels quantitativer PCR in der Pfortader, in der A. carotis, A. femoralis, sowie in der Aorta der Maus nach. Sie konnten, wie schon Yeung & Greenwood zuvor,  $K_V11.1$ -Kanal-Ströme mittels Patch-Clamp-Technik in glatten Muskelzellen der Pfortader messen, die durch einen spezifischen  $K_V11.1$ -Kanal-Blocker gehemmt wurden. Allerdings konnten sie keine

K<sub>V</sub>11.1-Ströme in glatter Muskulatur der Aorta und A. carotis nachweisen. Nach Gabe der K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffner NS1643 und PD-118057 wurden zwar verstärkte Kaliumströme aus der Zelle hinaus gemessen, welche jedoch durch Gabe des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers Paxillin unterbunden wurden. Dies lies die Autoren vermuten, dass die benutzten K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffner ebenfalls BK<sub>Ca</sub>-Kanäle öffnen (Barrese et al., 2017). Untersuchungen mittels isometrischer Myographie ergaben, dass der spezifische K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Blocker Dofetilid den Ruhetonus von A. carotis-Segmenten nicht beeinflusst. Außerdem verstärkte Dofetilid nicht die Kontraktion der Aorta und A. carotis, die zuvor mit dem  $\alpha_1$ -Rezeptor-Agonisten Phenylephrin induziert wurde (Barrese et al., 2017).

Barrese et al. konnten nachweisen, dass in Zellkulturen mit glatten Muskelzellen der A. femoralis die Proliferation in Anwesenheit von Dofetilid abgeschwächt wurde, während in Anwesenheit des K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffners NS1643 die Proliferation verstärkt wurde (Barrese et al., 2017).

Aus ihren Ergebnissen schlussfolgerten Barrese et al., dass der K<sub>V</sub>11.1-Kanal keine relevante Rolle bezüglich der Membranerregung und Kontraktion in glatter Muskulatur von Arterien spielt. Sie argumentierten, dass die Voruntersuchungen sich insofern unterschieden, dass die Pfortader spontane Kontraktionen und Aktionspotentiale generiert; Eigenschaften, die in Arterien des großen Kreislaufs nicht auftreten (Barrese et al., 2017).

Voruntersuchungen in unserem Labor setzten sich mit dem Effekt von K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Blockern wie BeKm auf vorkontrahierte Arterien der Ratte auseinander. Diese Blocker konnten allein keine Verstärkung der Vorkontraktion bewirken. Auch nachdem jeweils einzelne Kaliumkanäle (K<sub>IR</sub>2-Kanal, K<sub>V</sub>1-Kanal, K<sub>V</sub>2-Kanal, K<sub>V</sub>7-Kanal, BK<sub>Ca</sub>-Kanal) zuvor durch ihre spezifischen Blocker funktionell ausgeschaltet wurden, hatten die spezifischen K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Blocker keinen Einfluss auf die Vorkontraktion (Krauth, 2017).

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen konnte nachweisen, dass der K<sub>V</sub>11.1-Kanal eine relevante Rolle in der Repolarisation glatter Muskulatur einnimmt (Akbarali et al., 1999; Greenwood et al., 2009; Imai et al., 2001; Lillich et al., 2003; Mewe et al., 2008; Ohya et al., 2002a; Parr et al., 2003).

Untersuchungen zur Funktion des Kanals in glatter Gefäßmuskulatur, insbesondere in Arterien, sind jedoch rar. Ohya, Horowitz & Greenwood wiesen  $K_{V11.1}$ -Kanäle in glatter Gefäßmuskulatur der Pfortader nach (Ohya et al., 2002b). Yeung & Greenwood und Barrese et al. stellten fest, dass der Kanal Einfluss auf die Kontraktion der Pfortader nimmt (Barrese et al., 2017; Yeung and Greenwood, 2007). Da die Pfortader jedoch selbst spontane Kontraktionen erzeugt, ähnlich wie die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, eignet sie sich nicht als Modell-Gefäß für das kardio-vaskuläre System.

Die Untersuchungen von Barrese et al. und die Voruntersuchungen aus unserem Labor sind bisher die einzigen Studien, die sich mit dem Einfluss des  $K_{V11.1}$ -Kanals auf die Kontraktilität in Arterien des großen Kreislaufs beschäftigen.

Barrese et al. zweifelten aufgrund ihrer Ergebnisse an einer relevanten Rolle des  $K_{V11.1}$ -Kanals hinsichtlich der Kontraktilität von Arterien (Barrese et al., 2017).

Auch die von uns durchgeführten Voruntersuchungen konnten keinen kontraktilen Effekt durch  $K_{V11.1}$ -Kanal-Blocker allein oder nach funktioneller Ausschaltung einzelner anderer Kaliumkanäle beobachten (Krauth, 2017). Neuere Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass die Funktion eines bestimmten Kaliumkanals durch einen anderen, dominanten Kaliumkanal maskiert werden kann (Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020). Offen bleibt damit, ob nach funktioneller Ausschaltung anderer an der Repolarisation beteiligter Kaliumkanäle, bzw. nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle ein Effekt des  $K_{V11.1}$ -Kanals auf die Kontraktilität von Arterien beobachtet werden kann.

Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass der  $K_{V11.1}$ -Kanal eine Rolle in der Kontraktilität glatter Gefäßmuskulatur nach Blockade von dominierenden Kaliumkanälen in Arterien des großen Kreislaufs spielt. Die Fragestellung soll mittels isometrischer Myographie an der A. saphena der Ratte und der Maus durch funktionelle Ausschaltung an der Repolarisation beteiligter Kaliumkanäle untersucht werden. Durch Blockade diverser Kaliumkanäle soll überprüft werden, ob der  $K_{V11.1}$ -Kanal-Öffner NS3623 Kontraktionen abschwächt, sowie auf andere Kaliumkanäle wirkt. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR soll die Expression von  $K_{V11.1}$ -Kanälen und anderen KCNH-Kanälen in der A. saphena der Ratte und Maus überprüft werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistarratten, sowie männliche und weibliche, nicht geschlechtsreife C57BL/6JRj-Mäuse benutzt. Alle Tiere wurden über Janvier Labs, Frankreich, zugekauft. Die Anzeige der Versuche erfolgte über das Regierungspräsidium Karlsruhe (Aktenzeichen I-17/17); alle Versuche waren im Einklang mit dem Tierschutzgesetz. Die Ratten waren zwischen acht bis zwölf Wochen alt; das Alter der Mäuse betrug sechs Wochen. Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Dabei wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von jeweils zwölf Stunden bei einer Temperatur von 22°C eingehalten. Die Tiere hatten stets genügend Nahrung und Wasser zur freien Verfügung.

### 2.2 Chemikalien

#### 2.2.1 Puffer

Die für den Puffer verwendeten Chemikalien sind in Tab. 1 aufgelistet.

Als Präparationspuffer diente eine 4°C kalte physiologische Kochsalzlösung. Da ein stabiler pH-Wert für die Funktion der Arterien entscheidend ist, wurde dem Präparationspuffer HEPES hinzugefügt (Tab. 2). Somit konnte der pH-Wert während der Präparation konstant gehalten werden.

Während der Versuche wurde in den Messkammern des Myographen eine physiologische Kochsalzlösung mit einem pH-Wert von 7,4 als Arbeitspuffer genutzt (Tab. 2). Diese wurde zuvor in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Der Arbeitspuffer enthielt  $\text{NaHCO}_3$  sowie HEPES als pH-Puffer und wurde während des Versuchs mit Carbogen begast, ein Gasgemisch, welches zu 95% aus  $\text{O}_2$  und zu 5% aus  $\text{CO}_2$  besteht. Auf diese Weise konnte der pH-Wert in den Messkammern bei 7,4 stabil gehalten werden. Der pH-Wert des Arbeitspuffers wurde während eines Experiments regelmäßig neu eingestellt. Eine modifizierte Version des Arbeitspuffers enthielt 50 bzw. 120 mM KCl und wurde vor dem eigentlichen Versuch zur Gefäßaktivierung benutzt (Tab. 2).

Alle Puffer wurden täglich frisch angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 1:** Für die Puffer verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Deutschland
D(+)-Glucose	Roth, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Deutschland

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Präparationspuffer (Konz. in mM)	Arbeitspuffer (Konz. in mM)	Arbeitspuffer modifiziert (Konz. in mM)
CaCl <sub>2</sub> : 0,1	CaCl <sub>2</sub> : 1,6	CaCl <sub>2</sub> : 1,6
EDTA: 0,025	EDTA: 0,025	EDTA: 0,025
HEPES: 5	HEPES: 5	HEPES: 5
KCl: 4,5	KCl: 4,5	KCl: 50 bzw. 120
MgSO <sub>4</sub> : 1	MgSO <sub>4</sub> : 1	MgSO <sub>4</sub> : 1
NaCl: 145	NaCl: 120	NaCl: 74,5 bzw. 4,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1,2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1,2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1,2
	NaHCO <sub>3</sub> : 26	NaHCO <sub>3</sub> : 26
	Glucose: 5,5	Glucose: 5,5

### 2.2.2 Verwendete vasoaktive Substanzen

Für die Versuche wurden die in Tab. 3 aufgeführten vasoaktiven Substanzen benutzt. Sie wurden zunächst nach Herstellerangaben zu Stammlösungen angesetzt und anschließend so verdünnt, dass die gewünschte Konzentration in der Myographenkammer erreicht werden konnte. Die angesetzten Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

**Tab. 3:** Liste der verwendeten vasoaktiven Substanzen

Substanz	verwendete Konzentration in M	Wirkmechanismus	Hersteller
Acetylcholinchlorid (Ach)	$10^{-5}$	Agonist am cholinergen Rezeptor	Sigma Aldrich, Deutschland
AVE 1231	$10^{-6}$	TASK-1-Kanal - Blocker	Sanofi, Frankreich
BeKm	$10^{-7}$	K <sub>v</sub> 11.1-Kanal-Blocker	Alomone Labs, Israel
Bariumchlorid (BaCl <sub>2</sub> )	$3 \times 10^{-5}$	K <sub>IR2</sub> -Kanal-Blocker	Riedel- de Haën, Deutschland
Diphenylphosphinoxid (DPO-1)	$10^{-6}$	K <sub>v</sub> 1-Kanal-Blocker	Tocris, England
Glibenclamid (Glib)	$10^{-6}$	K <sub>IR6</sub> -Kanal-Blocker	Tocris, England
Iberiotoxin (IBTX)	$10^{-7}$	BK <sub>Ca</sub> -Kanal-Blocker	Alomone Labs, Israel
Methoxamin (MX)	$10^{-8} - 10^{-5}$	α <sub>1</sub> - Adrenorezeptor-Agonist	Sigma Aldrich, Deutschland
NS3623	$10^{-6} - 10^{-5}$	K <sub>v</sub> 11.1-Kanal-Öffner	Tocris, England
Stromatoxin (STX)	$10^{-7}$	K <sub>v</sub> 2-Kanal-Blocker	Alomone Labs, Israel
XE991	$3 \times 10^{-6}$	K <sub>v</sub> 7-Kanal-Blocker	Alomone Labs, Israel

### 2.3 Isometrische Myographie

Die Versuche dieser Arbeit wurden mittels isometrischer Myographie durchgeführt. Dabei wurden jeweils ca. zwei Millimeter lange Gefäßsegmente in vier Messkammern (jeweils ein Volumen von fünf Millilitern) des Multi-Wire-Myographen M610 und 620M (Abb. 4A) (Danish Myo Technology, Dänemark) an zwei rostfreien Stahldrähten (Durchmesser 40 $\mu$ m) aufgefädelt, welche mit Trägerbacken verbunden waren. Eine der Backen stand in Verbindung mit einer Mikrometerschraube, welche durch Drehen die Distanz der Backen und damit auch der an den Backen befestigten Drähte in  $\mu$ m-Schritten beeinflusste. Auf diese Weise konnte ein Gefäßsegment zwischen den zwei Drähten aufgespannt werden. Die andere Backe stand in direkter Verbindung zu einem Kraftaufnehmer (Abb. 4B). Durch eine Änderung der Wandspannung bei gleich bleibendem Durchmesser konnte das Kontraktionsverhalten von Gefäßsegmenten untersucht werden (Mulvany and Halpern, 1976).

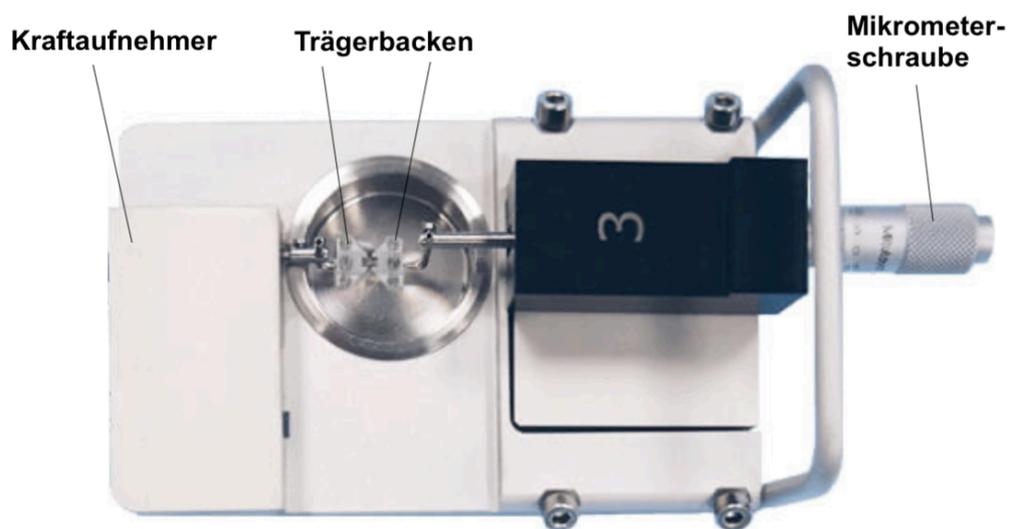
Die Messdaten wurden über den Kraftaufnehmer abgeleitet, von einer Kontrolleinheit verarbeitet, digitalisiert und mittels der Software PowerLab/LabCharts 6 Pro (ADInstruments, Neuseeland) aufgezeichnet.

Mittels einer im Myographen integrierten Wärmeplatte wurden die Messkammern auf 37°C erwärmt; die Temperatur konnte durch eine Temperatursonde überprüft werden. Darüber hinaus wurde jede Kammer mit einer im Myographen integrierten Vorrichtung mit Carbogen begast, um den pH-Wert in den Messkammern konstant zu halten. Über eine Vakuum-Pumpe konnte der Puffer in den einzelnen Messkammern abgesaugt werden, wodurch ein Spülen der Kammern während eines Versuchs ermöglicht wurde. Ein Plastikdeckel über jeder Messkammer verhinderte das Verdunsten des Puffers.

**A**



**B**



**Abb. 4:** Multi-Wire-Myograph System

mit freundlicher Genehmigung von Danish Myo Technology. ([www.dmt.dk](http://www.dmt.dk), Stand 19.08.2021), modifizierte Darstellung

**A:** Dargestellt ist der Multi-Wire-Myograph 620 M, welcher u.a. in dieser Arbeit benutzt wurde.

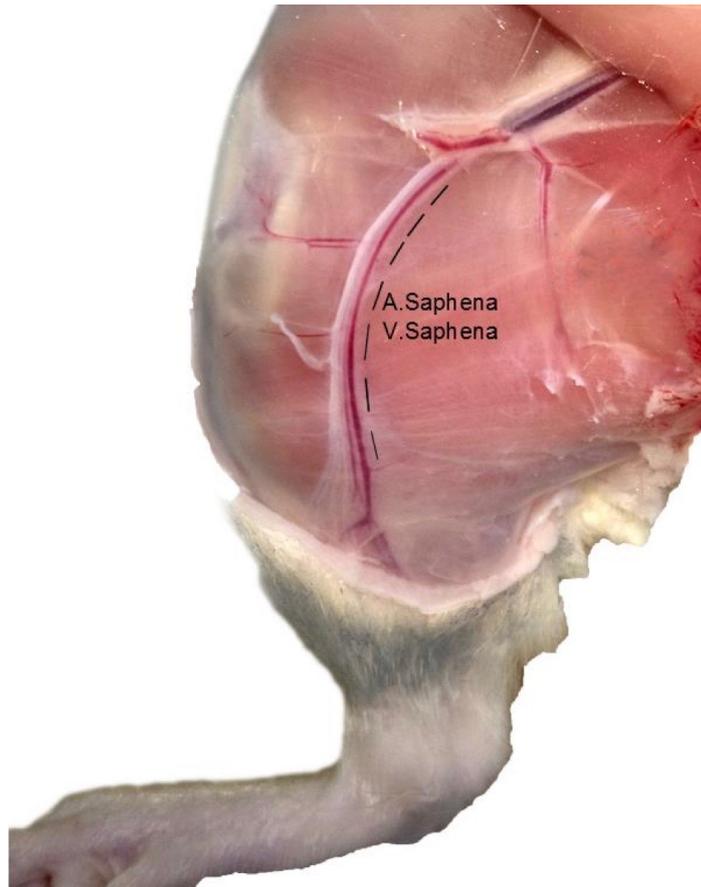
**B:** Dargestellt ist eine der vier Messkammern des Multi-Wire-Myographen 620M. Mittels Mikrometerschraube kann der Abstand zwischen den Trägerbacken verändert werden. Über einen Kraftaufnehmer wird die einwirkende Kraft abgeleitet.

### 2.3.1 Präparationsvorbereitung

Die Ratten wurden mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend ebenfalls durch Dekapitation getötet. Für die Versuche an der Ratte und der Maus wurde ein oberflächlicher Seitenast der A. femoralis, die A. saphena, benutzt. Die Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle mit Hilfe zweier feiner Pinzetten sowie einer Feder-Schere.

### 2.3.2 Präparation der A. saphena

Das Bein der Ratte und der Maus wurde vom Rumpf entfernt, indem es am Hüftgelenk abgetrennt wurde. Das Fell wurde am Innenschenkel abgeschnitten. Danach wurde das Bein in eine Petrischale mit 4°C kaltem Präparationspuffer übertragen und fixiert. Abb. 5 zeigt ein zur Präparation vorbereitetes Rattenbein. Zunächst wurde das Bindegewebe entfernt, welches über der Gefäß-Nervenstraße des Innenschenkels liegt. Anschließend wurde das Bindegewebe zwischen Arterie und Nerv, sowie zwischen Arterie und Vene vorsichtig durchtrennt, um die A. saphena zu isolieren. Restliches Bindegewebe, das sich an der Arterie befand, wurde behutsam abgetragen.



**Abb. 5:** Rechter Innenschenkel des Hinterbeins einer Ratte mit freier Sicht auf die Gefäß- und Nerven-anatomie

mit freundlicher Genehmigung von D. Ma. (Ma, 2018). Modifizierte Darstellung.

Dargestellt ist der Innenschenkel eines rechten Rattenhinterbeins nachdem das Fell zur Präparation entfernt wurde. Sichtbar ist die Gefäß-Nervenstraße, in die die A. saphena zwischen begleitendem Nerv und Vene eingebettet liegt und von einer Bindegewebsschicht bedeckt ist.

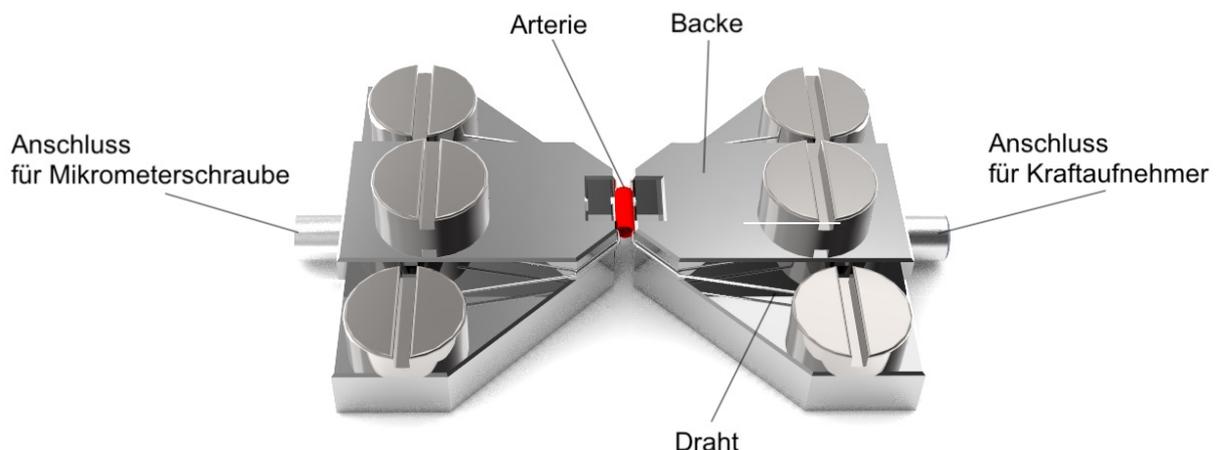
### 2.3.3 Installation der Gefäße im Multi-Wire-Myographen

Nach der Präparation wurden die Messkammern des Myographen mit fünf Millilitern des 4°C kalten Präparationspuffers befüllt und ca. zwei Millimeter lange Gefäßsegmente von den Arterien abgeschnitten und in die Kammern übertragen.

Zunächst wurde ein Stahldraht zwischen den Backen so eingespannt, dass nur eine Seite des Drahtes mit einer Schraube an der Backe fixiert wurde. Auf diese Weise konnte das Gefäßsegment behutsam über das nicht fixierte Ende des Drahtes geschoben werden, in dem der Draht durch das Lumen des Gefäßsegmentes eingefädelt wurde. Nachdem das Segment zwischen den Backen platziert wurde,

konnte das andere Drahtende ebenfalls mittels Schraube befestigt werden. In einem nächsten Schritt wurde ein zweiter Draht durch das Lumen geführt und an den Schrauben der anderen Backe fixiert. Auf diese Weise wurde das Gefäß eingespannt (Abb. 6). Die Mikrometerschraube wurde so adjustiert, dass die Drähte einen minimalen Abstand zueinander besaßen ohne sich zu berühren, sodass das Gefäß nicht gedehnt wurde.

Restliches Bindegewebe wurde mit Vorsicht abgetragen. Anschließend wurde das Endothel entfernt, indem ein Rattenbarthaar durch das Lumen des Segmentes geführt und an den beiden Enden mit zwei feinen Pinzetten festgehalten wurde, um es dann einige Male kreisförmig zu bewegen. Somit konnte das Endothel abgeschabt werden, ohne das Gefäß zu verletzen. Daraufhin wurden die Messkammern auf dem Myographen platziert und mit der Kontrolleinheit verbunden. Die Begasung mit Carbogen wurde eingeschaltet und die Plastikdeckel auf den Messkammern als Verdunstungsschutz aufgelegt. Die Temperatursonde wurde in eine der Messkammern gelegt und etwa 15 bis 20 Minuten gewartet, bis die Messkammern auf 37°C aufgewärmt wurden.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung eines aufgespannten Arteriensegmentes in einer Myographenmesskammer

Dargestellt ist eine zwischen den beiden Trägerbacken an zwei Drähten aufgespannte Arterie. Die Drähte werden auf jeder Backe mittels zweier Schrauben fixiert. Durch Drehen an der Mikrometerschraube (hier nur der Anschluss dargestellt) kann der Abstand zwischen den Backen, und damit der Gefäßdurchmesser, verändert werden. Über einen Kraftaufnehmer (hier nur der Anschluss dargestellt) kann die auf die Drähte einwirkende Kraft abgeleitet werden. Nicht dargestellt ist die Begasungs- und Absaugungsvorrichtung.

### 2.3.4 Normalisierung

Die Normalisierung bezeichnet den Prozess, bei dem die Gefäßsegmente in solcher Weise passiv vorgedehnt werden, dass die für die Kontraktion entscheidenden Myofilamente der glatten Muskulatur die maximale Kontraktionsstärke erreichen können. Somit wird die Normalisierung als Standardisierungsverfahren genutzt und erlaubt Vergleiche der einzelnen Versuche untereinander.

Der innere Gefäßumfang, welcher der idealen Vordehnung entspricht ( $IC_1$ ), wurde mit Hilfe des inneren Umfangs eines relaxierten Gefäßes bei einem transmuralen Druck von 13,3 kPa errechnet. Der innere Umfang bei 13,3kPa wird als  $IC_{100}$  bezeichnet. Bei der Berechnung des  $IC_1$  musste neben dem  $IC_{100}$  auch der gefäßspezifische Normalisierungsfaktor  $k$  berücksichtigt werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gefäßen lag der Normalisierungsfaktor  $k$  bei 0,9 (Mulvany and Halpern, 1977). Der  $IC_1$  wurde wie folgt berechnet:

$$IC_1 = IC_{100} \times k$$

wobei  $IC_1$  der ideale innere Umfang in  $\mu\text{m}$ ,  $IC_{100}$  der innere Umfang bei einem transmuralen Druck von 13,3 kPa und  $k$  der Normalisierungsfaktor ist.

Um die ideale Vordehnung einzustellen, wurde gewartet, bis die Messkammern des Myographen nach der Präparation auf 37°C aufgewärmt waren. Da zuvor mittels Mikrometerschraube der Abstand der Stahldrähte auf ein Minimum eingestellt war, war das die Drähte umgebende Gefäßsegment nicht vorgedehnt und befand sich in einem relaxierten Zustand. Anschließend erfolgte die passive Dehnung der Gefäßsegmente, indem über die Mikrometerschraube der jeweiligen Messkammern der innere Umfang in zuvor festgelegten Schritten vergrößert wurde. Vor jeder weiteren Dehnung wurde pro Kammer 90 Sekunden gewartet.

Die Software Powerlab/Labchart 6 Pro berechnete den aktuellen inneren Umfang ( $IC$ ) während der einzelnen Dehnungsschritte mit folgender Formel:

$$IC = (2+\pi) \times d + 2 \times b$$

wobei  $IC$  der aktuelle innere Umfang in  $\mu\text{m}$ ,  $d$  der Drahtdurchmesser ( $40\mu\text{m}$ ) und  $b$  der Abstand der Drähte in  $\mu\text{m}$  ist.

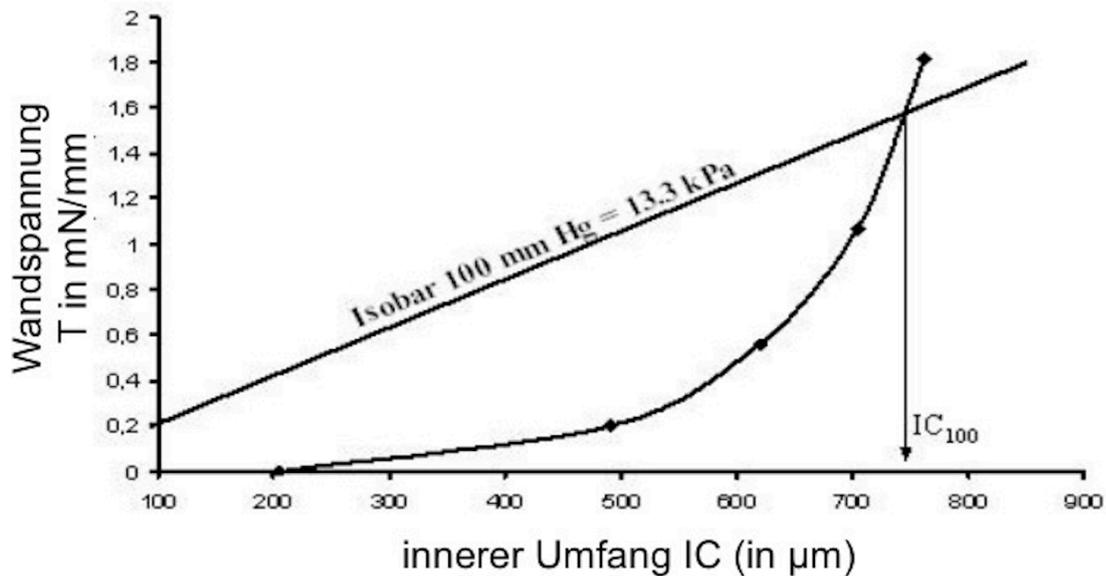
Gleichzeitig wurde durch Powerlab/Labchart 6 Pro für jeden der Dehnungsschritte die entsprechende Wandspannung  $T$  berechnet, da ein direkter Kraftvergleich der Gefäßsegmente bei variierender Länge nicht sinnvoll wäre. Folgende Formel wurde zur Kalkulation benutzt:

$$T = F \div (2 \times l)$$

wobei  $T$  die Wandspannung in  $\text{mN/mm}$ ,  $F$  die Kraft in  $\text{N}$  und  $l$  die Gefäßlänge in  $\text{mm}$  ist.

Die ermittelten Werte aus Wandspannung  $T$  und aktuellem innerem Umfang  $IC$  ergaben die Funktion  $T = f(IC)$ , die die Gerade der  $13,3 \text{ kPa}$  Isobaren im  $IC_{100}$  schnitt (Abb. 7). Da durch den Schnittpunkt der  $IC_{100}$  bestimmt werden konnte, war es möglich, den  $IC_1$  zu kalkulieren und ihn durch die Mikrometerschraube einzustellen.

Somit befanden sich die Gefäßsegmente in einem Zustand der idealen Vordehnung und waren für den weiteren Versuch vorbereitet.



**Abb. 7:** Funktion  $T = f(IC)$

mit freundlicher Genehmigung von Danish Myo Technology. ([www.dmt.dk](http://www.dmt.dk), Stand 25.08.2021), modifizierte Darstellung

Dargestellt ist die Funktion  $T = f(IC)$ , die die Geraden der 13,3 kPa Isobaren im  $IC_{100}$  schneidet. Der  $IC_{100}$  gibt den inneren Umfang des Gefäßes bei 13,3 kPa an. Nach Ermittlung des  $IC_{100}$  kann der  $IC_1$  ermittelt werden:  $IC_1 = IC_{100} \times \text{Normalisierungsfaktor } k$ . Anhand des  $IC_1$  kann anschließend der Gefäßdurchmesser mit der idealen Vordehnung eingestellt werden.

### 2.3.5 Überprüfung der Gefäßqualität

Im Anschluss an die Normalisierung wurde überprüft, wie die Qualität der benutzten Gefäßsegmente war. Diese wurde anhand der Reproduzierbarkeit und Stärke von Kontraktionen beurteilt. Der Präparationspuffer in den Messkammern wurde gegen Arbeitspuffer ausgetauscht und anschließend wurde mit Hilfe des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Agonisten Methoxamin (MX) in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M Kontraktionen in den Kammern induziert. Nach fünf minütiger Inkubation wurde anschließend  $10^{-5}$  M Acetylcholin inkubiert, um zu überprüfen, ob das Endothel vollständig entfernt wurde. Bei vollständig entferntem Endothel wurde durch Acetylcholin die MX-induzierte Kontraktion nicht abgeschwächt. Nach fünf minütiger Inkubation wurden die Kammern in mehreren Schritten ausgewaschen. Anschließend wurden fünf Milliliter des

modifizierten Arbeitspuffers mit 120 mM KCl (Tab. 2) und  $10^{-5}$  M MX für fünf Minuten in den Kammern inkubiert. Nach mehrmaligem Auswaschen war die Überprüfung der Gefäßqualität abgeschlossen.

### 2.3.6 Versuch

Nach der Überprüfung der Gefäßqualität wurde in jeder Messkammer MX in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M für fünf Minuten inkubiert, um durch die ausgelöste Kontraktion die maximale Kontraktionskraft  $F_{\max}$  für jede Kammer festzulegen. Die Kammern wurden mehrmals ausgewaschen; dann wurden fünf Mikroliter destilliertes Wasser für 10 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurde MX in steigender Konzentration für jeweils drei Minuten inkubiert. Die benutzten MX-Konzentrationen waren in ihrer Reihenfolge:  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M.

Tab. 4 stellt ein Schema des Versuchsablaufes dar. Nach Gabe einer vasoaktiven Substanz, oder einer zeitgleichen Kombination mehrerer Substanzen in einer Kammer, wurde nach ihrer Inkubationszeit das jeweilige Lösungsmittel inkubiert. Daraufhin wurde MX auftitriert. Die Kammern wurden ausgewaschen und nach dem gleichen Schema wie zuvor mit vasoaktiven Substanzen versetzt. Nach der Inkubationszeit wurde nun eine oder mehrere weitere Substanzen inkubiert und mit MX auftitriert. In Tab. 5 sind die an der A. saphena der Ratte durchgeführten Protokolle aufgelistet.

**Tabelle 4: Schematischer Ablauf eines Versuchs**

Substanz A, B: beispielhafte vasoaktive Substanzen, bzw. Kombinationen mehrerer Substanzen

Lösungsmittel A, B: beispielhafte Lösungsmittel der Substanzen A, B

H<sub>2</sub>O: destilliertes Wasser

MX-Auftitrierung: verabreichte MX-Konzentrationen in der Reihenfolge:  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M.

Schritte	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
MX-Gabe $10^{-5}$ M	MX $10^{-5}$ M	MX $10^{-5}$ M	MX $10^{-5}$ M	MX $10^{-5}$ M
3 × Auswaschen (je 5 Min.)	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen
Inkubation (10 Min.)	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
MX-Auftitrierung (je 3 Min.)	MX	MX	MX	MX
3 × Auswaschen (je 5 Min.)	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen
Inkubation (10 Min.)	Substanz A	Substanz A	Lösungsmittel A	Lösungsmittel A
Inkubation (10 Min.)	Lösungsmittel A	Lösungsmittel A	Lösungsmittel A	Lösungsmittel A
MX-Auftitrierung (je 3 Min.)	MX	MX	MX	MX
3 × Auswaschen (je 5 Min.)	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen	Auswaschen
Inkubation (10 Min.)	Substanz A	Substanz A	Lösungsmittel A	Lösungsmittel A
Inkubation (10 Min.)	Substanz B	Lösungsmittel B	Substanz B	Lösungsmittel B
MX-Auftitrierung (je 3 Min.)	MX	MX	MX	MX

**Tabelle 5:** Protokolle, die an der *A. saphena* der Ratte angewendet wurden

AVE1231 =  $10^{-6}$  M AVE1231, BaCl<sub>2</sub> =  $3 \times 10^{-5}$  M Bariumchlorid, BeKm =  $10^{-7}$  M BeKm, DPO-1 =  $10^{-6}$  M Diphenylphosphinoxid, Glib =  $10^{-6}$  M Glibenclamid, IBTX =  $10^{-7}$  M Iberitoxin, STX =  $10^{-7}$  M Stromatoxin, XE991 =  $3 \times 10^{-6}$  M XE991

MX: MX-Auftitrierung mit den Konzentrationen  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M.

Zwischen jedem Schritt wurde eine Inkubationszeit von 3 Minuten eingehalten. Nach jeder Auftitrierung wurden die Messkammern in mehreren Schritten ausgewaschen.

Es wurde eine Inkubationszeit von jeweils 10 Minuten (Ausnahme BaCl<sub>2</sub>: 5 Minuten) zwischen den einzelnen Kombinationen eingehalten, außer bei der Kombination von IBTX + XE991, sowie DPO-1 + STX, die zum gleichen Zeitpunkt inkubiert wurden. Es folgte auf die gegebenen Kombinationen stets eine MX-Auftitrierung. H<sub>2</sub>O ist das jeweilige Lösungsmittel der Substanzen.

Protokoll	Kammer	Benutzte Kombination		M X	Benutzte Kombination		M X	Benutzte Kombinationen				MX
1	1	IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX	BeKm		IBTX+		BeKm		
								XE991				
	2	IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX+		H <sub>2</sub> O		
								XE991				
	3	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	BeKm		H <sub>2</sub> O		BeKm		
	4	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O		
2	1	Glib	H <sub>2</sub> O		Glib	BeKm		I	Ba	DPO	BeKm	
								B	Cl <sub>2</sub>	-1 +		
								T		STX		
								X				
	2	Glib	H <sub>2</sub> O		Glib	H <sub>2</sub> O				DPO	H <sub>2</sub> O	
										-1 +		
										STX		
	3	AVE 1231	H <sub>2</sub> O		AVE	BeKm				H <sub>2</sub> O	BeKm	
					1231							
	4	AVE 1231	H <sub>2</sub> O		AVE	H <sub>2</sub> O				H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
					1231							

Das Protokoll an der *A. saphena* der Ratte unter Verwendung des K<sub>v</sub>11.1-Kanal-Öffners NS3623 unterschied sich in seinem Ablauf von den übrigen Protokollen, insofern, dass nach der ersten MX-Auftitrierung nach der Gabe von destilliertem Wasser keine weitere MX-Auftitrierung erfolgte. Stattdessen wurde nach der Inkubation von mehreren Kombinationen vasoaktiver Substanzen NS3623 auftitriert (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** *Protokoll, das an der A. saphena der Ratte unter Verwendung von NS3623 angewendet wurde*

*Mix = gleichzeitige Gabe von  $3 \times 10^{-5}$  BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-7}$  M BeKm,  $10^{-6}$  M DPO-1,  $10^{-6}$  M Glib,  $10^{-7}$  M IBTX,  $10^{-7}$  M STX,  $3 \times 10^{-6}$  M XE991*

*50 mM KCl = Gabe des modifizierten Arbeitspuffers mit 50 mM Kaliumchlorid*

*Die Kombinationen wurden für jeweils 15 Minuten inkubiert. Nach Inkubation der Kombinationen wurde NS3623 auftitriert.*

*NS3623-Auftitrierung: NS3623-Auftitrierung mit den Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M. Zwischen jedem Schritt wurde für 15 Minuten gewartet. Nach jeder Auftitrierung wurden die Messkammern in mehreren Schritten ausgewaschen.*

*DMSO diente als Lösungsmittel für NS3623 und wurde im Abstand von jeweils 15 Minuten mit folgenden Konzentrationen auftitriert:  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M.*

Protokoll	Kammer	Benutzte Kombinationen	NS3623-Auftitrierung	Benutzte Kombinationen	DMSO-Gabe
1	1	Mix		Mix	
	2	Mix ohne BeKm		Mix ohne BeKm	
	3	Mix ohne IBTX		Mix ohne IBTX	
	4	50 mM KCl		50 mM KCl	

In Tab. 7 sind die an der A. saphena der Maus durchgeführten Protokolle dargestellt.

**Tabelle 7:** Protokolle, die an der A. saphena der Maus angewendet wurden

$BaCl_2 = 3 \times 10^{-5} M$  Bariumchlorid,  $BeKm = 10^{-7} M$  BeKm,  $DPO-1 = 10^{-6} M$  Diphenylphosphinoxid,  $Glib = 10^{-6} M$  Glibenclamid,  $IBTX = 10^{-7} M$  Iberitoxin,  $STX = 10^{-7} M$  Stromatoxin,  $XE991 = 3 \times 10^{-6} M$  XE991  
 MX: MX-Auftitrerieung mit den Konzentrationen  $10^{-8} M$ ,  $3 \times 10^{-8} M$ ,  $10^{-7} M$ ,  $3 \times 10^{-7} M$ ,  $10^{-6} M$ ,  $3 \times 10^{-6} M$  und  $10^{-5} M$ .

Zwischen jedem Schritt wurde eine Inkubationszeit von 3 Minuten eingehalten. Nach jeder Auftitrerieung wurden die Messkammern in mehreren Schritten ausgewaschen.

Es wurde eine Inkubationszeit von jeweils 10 Minuten (Ausnahme  $BaCl_2$ : 5 Minuten) zwischen den einzelnen Kombinationen eingehalten, außer bei der Kombination von  $IBTX + XE991$ , sowie  $DPO-1 + STX$ , die zum gleichen Zeitpunkt inkubiert wurden. Es folgte auf die gegebenen Kombinationen stets eine MX-Auftitrerieung.  $H_2O$  ist das jeweilige Lösungsmittel der Substanzen.

Protokoll	Kammer	Benutzte Kombination		M X	Benutzte Kombination		M X	Benutzte Kombinationen				M X	
1	1	IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX	BeKm		IBTX+	BeKm				
	2	IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX	H <sub>2</sub> O		IBTX+	H <sub>2</sub> O				
	3	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	BeKm		H <sub>2</sub> O	BeKm				
	4	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O				
2	1	BaCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O		BaCl <sub>2</sub>	BeKm		I	Ba	DPO	B		
								B	Cl <sub>2</sub>	-1 +	e		
								T		STX	K		
								X			m		
	2	BaCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O		BaCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O				DPO	H		
										-1 +	2		
										STX	O		
	3	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	BeKm				H <sub>2</sub> O	B		
											e		
											K		
											m		
	4	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O				H <sub>2</sub> O	H		
											2		
											O		

## 2.4 Auswertung

Die Versuche wurden mittels PowerLab/LabChart 6 Pro aufgezeichnet und wurden anschließend an EXCEL 2013 (Microsoft, USA) zur weiteren Auswertung übermittelt. Es wurde die jeweils maximale Kontraktion (bei NS3623 Abnahme der Kontraktion), die durch eine Substanz ausgelöst wurde, am Ende der entsprechenden Inkubationszeit gemessen. Wenn die Reaktion instabil war oder Oszillationen entstanden, wurde der Mittelwert als Messwert genutzt.

Um Versuche untereinander vergleichen zu können, wurde auf die maximale Kontraktionskraft  $F_{\max}$  zurückgegriffen, welche zu Beginn eines jeden Versuchs erhoben wurde.  $F_{\max}$  wurde zu allen erhobenen Messdaten in Beziehung gesetzt, um die normierte Kraft  $F_{\text{norm}}$  zu berechnen:

$$F_{\text{norm}} = (F/F_{\max}) \times 100\%$$

wobei  $F_{\text{norm}}$  die normierte Kraft,  $F$  die gemessene Kraft und  $F_{\max}$  die maximale Kontraktionskraft ist.

Durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA) wurde die Area under the curve (AUC) berechnet und mit zweiseitigem t-Test für unabhängige Stichproben analysiert (Signifikanzniveau 0,05).

## 2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.5.1 Präparation zur molekularbiologischen Untersuchung der RNA

Für die molekularbiologischen Untersuchungen der RNA wurde die A. saphena der Ratte und der Maus wie zuvor beschrieben aus dem Gewebe präpariert und mit Hilfe einer Federschere in kleine Stücke zerschnitten. Diese Stücke wurden zügig in ein Mikroreaktionsgefäß übertragen und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Anschließend wurden die entnommenen Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.5.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mithilfe des Masterpure DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, USA) durchgeführt. Dabei wird nach Lyse des verwendeten Gewebes die Gesamt-RNA durch mehrere Fällungsreaktionen und Zentrifugationsschritte isoliert. Zunächst wurden dazu die entnommenen Arterien zerkleinert, in 2ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gehalten. Anschließend wurde jeweils eine Stahlkugel ( $\varnothing$  3mm) zu jeder Probe gegeben und die Proben mit der Tissue and Cell Lysis Solution des Purification Kits versetzt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte im Tissue Lyser (Qiagen, Niederlande) für drei Minuten bei 30 Hz. Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die dabei entstandenen RNA-Pellets wurden danach mit 30  $\mu$ l RNase freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor weiterer Verwendung wurde die RNA bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.5.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der RNA wurde durch eine spektralphotometrische Messung durchgeführt.

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der RNA. Ein Verhältnis von 2,0 gilt hierbei als „rein“ für eine RNA-Probe. Ist das Verhältnis niedriger als vorher angegeben, kann dies ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder andere Verunreinigungen sein, die ihr Absorptionsmaximum bei oder in der Nähe von 280 nm besitzen.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde der Tecan Plate Reader Infinite M200 Pro (Tecan, Schweiz) mit einer NanoQuantPlate-Tecan16 Flat black genutzt. Bei diesem System kann eine Platte mit bis zu 16 Proben bestückt und nacheinander im Tecan Plate Reader eine photometrische Messung aller Proben durchgeführt werden. Zunächst wurde ein Probenleerwert gemessen, indem auf die Platte jeweils 2  $\mu$ l RNase freies Wasser gegeben wurde. Es wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm des Wassers bestimmt und dadurch der Tecan Plate Reader auf die zu untersuchenden RNA-Proben kalibriert. Anschließend wurde die OD von jeweils 2  $\mu$ l der RNA-Proben bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Die

Nukleinsäurekonzentration wurde automatisch aus der OD bei 260 nm und einem für die DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor errechnet.

#### 2.5.4 cDNA-Synthese

Bei der reversen Transkription wird die komplementäre DNA (cDNA) durch Verwendung von Random-Primern und bei Vorhandensein von RNA synthetisiert. Die daraus resultierende cDNA kann als Template für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) eingesetzt werden.

Mit Hilfe der RevertAID H Minus Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) wurde RNA in einzelsträngige cDNA umgewandelt. Um das wiederholte Pipettieren kleiner Mengen zu vermeiden wurde ein Master-Mix angesetzt, dem nur noch die jeweiligen RNA-Proben zugegeben wurden. Der Mastermix enthielt folgende Reagenzien: Reaktionspuffer, Random Primer, ein Mix aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), sowie die RevertAID H Minus Reverse Transkriptase.

Dafür wurde kalkuliert, in welchen Mengen die einzelnen Reagenzien benutzt werden müssen, sodass am Ende 100 ng RNA in jedem Mikroreaktionsgefäß enthalten war (Tab. 8). Die Synthese der cDNA erfolgte nach Herstellerangaben im Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Deutschland). Tab. 9 zeigt die dabei eingehaltenen Temperaturschritte und die Dauer der einzelnen Schritte. Nach erfolgter Synthese wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

**Tab. 8:** Probenansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Menge (in $\mu$ l)
RNA (100ng)	X
Rnase-freies Wasser	Y
5x Reaktionspuffer	4
Random Primer	1
dNTP Mix (10mM)	2
RevertAid H minus Reverse Transkriptase	1
Gesamt	20

**Tab. 9:** Temperaturschritte und Dauer der cDNA-Synthese

Temperatur (in $^{\circ}$ C)	Dauer (in min)
20	10
50	60
70	10
4	5

### 2.5.5 qPCR

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, lineare doppelsträngige DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Dazu muss das zu amplifizierende DNA-Fragment von zwei Primern flankiert werden, die als Start- und Endpunkt der Reaktion dienen. Es handelt sich dabei zu Strang und Gegenstrang komplementäre Oligonukleotide. In Gegenwart von freien dNTPs wird dann der korrespondierende Gegenstrang durch thermostabile Polymerasen an dem als Matrize dienenden einzelsträngigen DNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert.

Diese Vorgehensweise ist auch Grundlage der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR). Zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA wird bei der qPCR eine Gesamt-RNA eingesetzt. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird zusätzlich die Fluoreszenz eines Farbstoffes am Ende eines PCR-Zyklus gemessen. Dieser Farbstoff bindet nur

an doppelsträngige DNA und somit ist die gemessene Fluoreszenz proportional zum PCR-Produkt, sodass die Menge der synthetisierten DNA-Abschnitte direkt erfasst werden kann.

Die Quantifizierung erfolgt letztendlich durch den Vergleich der Menge der gewünschten mRNA mit der mRNA eines in der Zelle konstitutiv exprimierten Referenzgens. In der vorliegenden Arbeit wurde Ywhaz als Referenzgen benutzt. Nach der Amplifikation wird für jede Probe eine Schmelzkurve bestimmt, welche für die einzelnen PCR-Produkte charakteristisch ist. Diese gibt Aufschluss über die Spezifität des jeweils verwendeten Primerpaars. Zur Bestimmung der spezifischen Schmelztemperatur wird die PCR-Reaktion mit den darin enthaltenen doppelsträngigen PCR-Produkten nach der Amplifikation stufenweise von 40°C auf 95°C erhitzt. Bei der spezifischen Schmelztemperatur lösen sich die komplementären Stränge voneinander und der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt und gemessen. Bei einem spezifischen PCR-Produkt erhält man einen einzelnen Peak bei der spezifischen Schmelztemperatur.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte qPCR wurde das SensiFAST SYBR Green No Rox Kit (Bioline, England) verwendet.

Um Pipettierfehler zu vermeiden wurde ein Master-Mix angesetzt, der alle Komponenten außer der cDNA enthielt. Zu je 18 µl des Master-Mix wurden dann 2 µl der cDNA in eine optische 96-Loch-PCR-Platte pipettiert (Tab. 10). Die verwendeten Primer sind in Tab. 12 aufgelistet. Die Positivkontrollen zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der benutzten Primer wurden an Proben von Herz- und Hirngewebe der Ratte und Maus durchgeführt.

**Tab. 10:** Mastermix-Ansatz für die qPCR

Reagenz	Menge (in µl)
Template cDNA	2
SensiFAST SYBR ( 2×)	10
Forward Primer	2,5
Reverse Primer	2,5
Nuclease-freies Wasser	3
Gesamt	20

Für jede cDNA-Probe wurde zusätzlich ein zweiter Ansatz zur Bestimmung der RNA-Menge des Referenzgens analysiert. Die PCR wurde im LightCycler 480 (Roche, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 11):

Tab. 11: Schritte der qPCR im Detail

Schritt	Dauer (in sec)	Temperatur (in °C)	Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs (°C/sec)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	120	95	4,4	1
Amplifikation	5	95	4,4	47
	30	60	2,2	
Schmelzkurve	60	95	4,4	1
	60	40	2,2	
	1	60	1	
	/	95	0,06	
Kühlung	10	40	2,2	1

## 2.5.6 Verwendete Primer

**Tab. 12:** für die qPCR verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie sowohl für die Untersuchungen an der Ratte als auch an der Maus genutzt werden konnten

Gen	Primer	Primersequenz (5' →3')
GAPDH	Forward	CACCAGCATCACCCATT
	Reverse	CCATCAAGGACCCCTTCATT
Ywhaz	Forward	TTGATCCCCAATGCTTCGCAGC
	Reverse	TGTCATCACCAGCAGCAACCTC
KCNH1 / K <sub>V</sub> 10.1	Forward	GACACTTCCTACCGCACCAA
	Reverse	TGCCATCTTGATGGTAGGG
KCNH2 / K <sub>V</sub> 11.1	Forward	CTCGACACCATCATCCGCAA
	Reverse	AGGAAGCAGCTCCCATCTTTC
KCNH3 / K <sub>V</sub> 12.2	Forward	GTCCCCGCCGCCTAAGAT
	Reverse	GACGAAGTTACTGTGCGTCCC
KCNH4 / K <sub>V</sub> 12.3	Forward	ACTCTTGTGGGAGGGGAGTC
	Reverse	CACCTTGCATGACAGCCTCCA
KCNH5 / K <sub>V</sub> 10.2	Forward	GGATGAGGGAATCAGCAGTCTC
	Reverse	ACCGCTGCTCCATATTCCAG
KCNH6 / K <sub>V</sub> 11.2	Forward	GCTTCTGCGAACTCTTTGGC
	Reverse	CCTCATTCTTCACGGGGACC
KCNH7 / K <sub>V</sub> 11.3	Forward	ACAATGGTTCGAAATGTCAAAGGAC
	Reverse	TGCTCCCAAAGAAAGAACCTGA
KCNH8 / K <sub>V</sub> 12.1	Forward	GGAAGCTGACCCACCTAACC
	Reverse	TCCATCGACAATCCTCGGAC

## 2.5.7 Auswertung

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in jedem Annealing/Extension-Schritt. Die Schwellenwerte (C(T)-Werte) jeder Probe wurden auf den jeweiligen C(T)-Wert des Referenzgens Yhwaz normiert. Die C(T)-Werte geben den Wert an, bei dem zum ersten Mal die Fluoreszenz exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

Für jede PCR-Probe wurde auf Basis der gewonnenen Fluoreszenzdaten die Effizienz jedes Primerpaares kalkuliert, die zur Berechnung der Expressionen verwendet wurde. Die Expression wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{relative Expression} = \frac{E^{C(T) \text{ Referenzgen}}}{E^{C(T) \text{ Zielgen}}}$$

wobei E die Amplifikationseffizienz ist.

Die Amplifikationseffizienz E errechnet sich wie folgt:

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

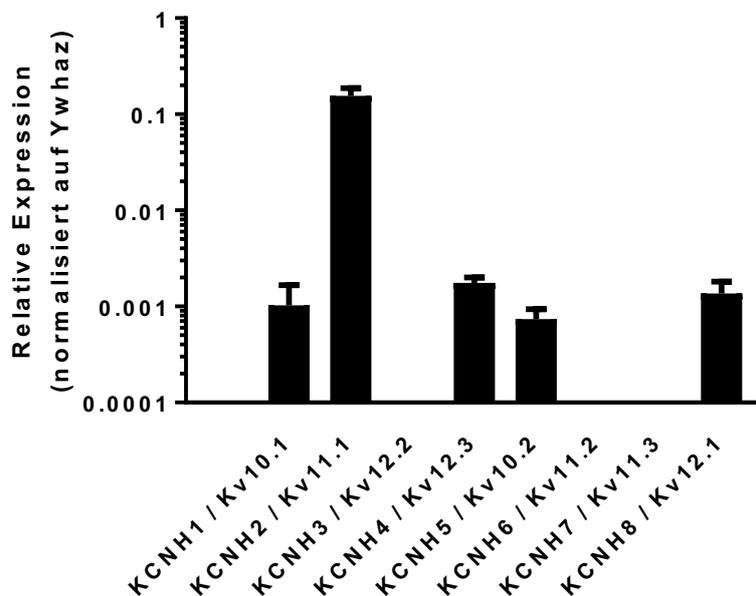
wobei m der Anstieg der Schmelzkurve ist.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression von KCNH-Kanälen

##### 3.1.1 mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Ratte

Das mRNA-Expressionsprofil der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Ratte zeigte eine deutlich stärkere Expression des KCNH2 / K<sub>v</sub>11.1-Kanals im Vergleich zu den anderen gefundenen KCNH-Kanälen. Die Gene für KCNH3, KCNH6 sowie KCNH7 konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 8). Die Positivkontrollen der benutzten Primer konnte deren Funktionsfähigkeit nachweisen.

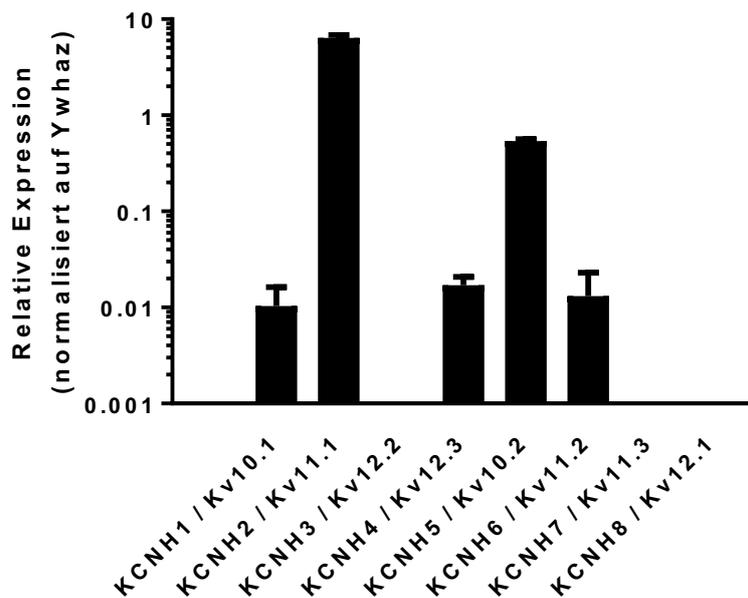


**Abb. 8:** mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Ratte

Relative Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Ratte (normalisiert auf Ywhaz).

##### 3.1.2 mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Maus

Das mRNA-Expressionsprofil der KCNH-Kanäle in der A. saphena der Maus zeigte ebenfalls eine deutlich stärkere Expression des KCNH2 / K<sub>v</sub>11.1-Kanals im Vergleich zu den anderen gefundenen KCNH-Kanälen. Die Gene für KCNH3, KCNH7 sowie KCNH8 konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 9). Die Positivkontrollen der benutzten Primer konnten deren Funktionsfähigkeit nachweisen.



**Abb. 9:** mRNA-Expression der KCNH-Kanäle in der *A. saphena* der Maus

Relative Expression der KCNH-Kanäle in der *A. saphena* der Ratte (normalisiert auf Ywhaz).

### 3.2 Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der *A. saphena* der Ratte nach Blockade einzelner Kaliumkanäle

#### 3.2.1 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Ratte in Anwesenheit von AVE1231

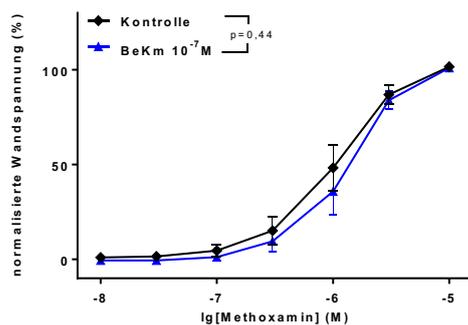
Die funktionelle Rolle des  $K_v11.1$ -Kanals wurde mit Hilfe seines Blockers BeKm (Korolkova et al., 2001) untersucht. Des Weiteren wurde der  $\alpha 1$ -Adrenorezeptor-Agonist Methoxamin (MX) (Thiele et al., 2011) genutzt, um Gefäßkontraktionen zu induzieren. Vorangegangene Studien in unserem Labor zeigten unveränderte MX-induzierte Kontraktionen der *A. saphena* der Ratte nach Blockade allein des  $K_v11.1$  Kanals durch verschiedene Blocker dieses Kanals, einschließlich BeKm (Krauth, 2017).

BeKm hatte auch keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion nach vorangegangener Blockade einzelner anderer Kaliumkanäle wie (i) des  $K_{IR2}$ -Kanals

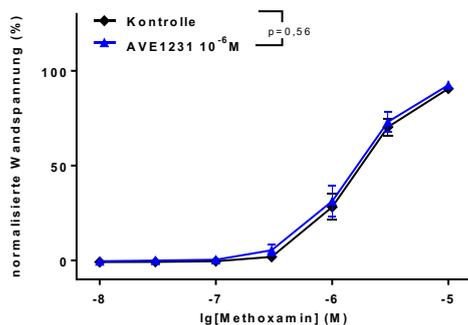
durch Bariumchlorid ( $\text{BaCl}_2$ ) (Alagem et al., 2001), (ii) des  $\text{K}_V1$ -Kanals durch DPO-1 (Lagrutta et al., 2006), (iii) des  $\text{K}_V2$ -Kanals durch Stromatoxin (STX) (Escoubas et al., 2002; Shiau et al., 2003), (iv) des  $\text{K}_V7$ -Kanals durch XE991 (Yeung and Greenwood, 2005) und (v) des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanals durch Iberitoxin (IBTX) (Candia et al., 1992). Nicht untersucht war bisher die Rolle von  $\text{K}_{\text{IR6}}$ - und TASK-1-Kanälen für die Wirkung von BeKm.

Unter Zuhilfenahme des TASK-1-Kanal-Blockers AVE1231 (Kiper et al., 2015; Wiedmann et al., 2019) wurde die Beteiligung des  $\text{K}_V11.1$ -Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des TASK-1-Kanals untersucht. BeKm hatte sowohl allein (Abb. 10A) als auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 10C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion. AVE1231 allein veränderte die MX-induzierte Gefäßkontraktion ebenfalls nicht (Abb. 10B).

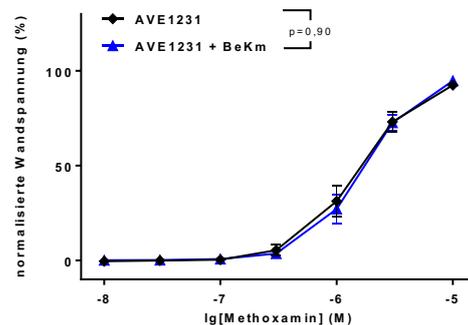
A



B



C



**Abb. 10:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Ratte in Anwesenheit von AVE1231

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-7}$  M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=8$ )

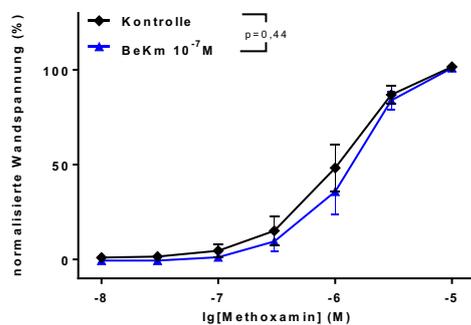
**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-6}$  M AVE1231 (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=8$ )

**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit von  $10^{-6}$  M AVE1231 (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}$  M BeKm und AVE1231 (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=8$ )

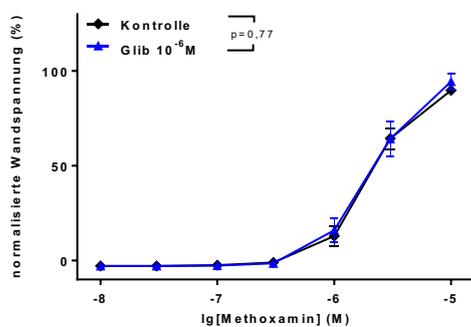
### 3.2.2 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von Glibenclamid

Unter Zuhilfenahme des  $K_{IR6}$ -Kanal-Blockers Glibenclamid (Gribble et al., 1998) wurde die Beteiligung des  $K_V11.1$ -Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR6}$ -Kanals untersucht. BeKm hatte sowohl allein (Abb. 11A) als auch in Anwesenheit von Glibenclamid (Abb. 11C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion. Glibenclamid allein veränderte die MX-induzierte Gefäßkontraktion ebenfalls nicht (Abb. 11B).

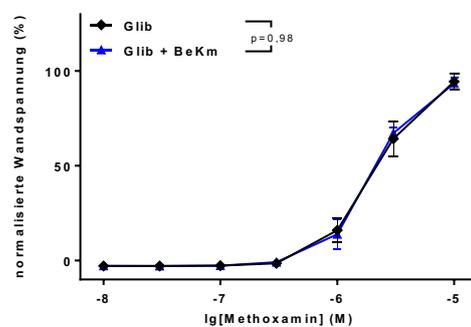
**A**



**B**



**C**



**Abb. 11:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von Glibenclamid

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-7}M$  BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-6}M$  Glibenclamid (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit von  $10^{-6}M$  Glibenclamid (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}M$  BeKm und  $10^{-6}M$  Glibenclamid (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

### 3.3 Beteiligung des $K_V11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Ratte nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle

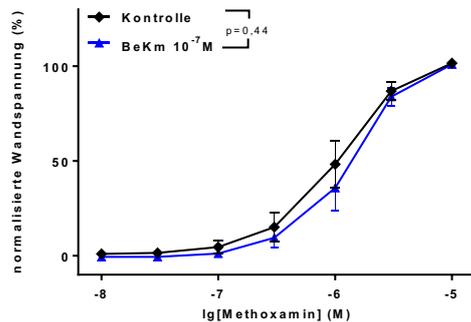
Vorangegangene Studien aus unserem Labor sowie die unter 3.2 aufgeführten Ergebnisse zeigten, dass BeKm keinen Einfluss auf die MX-induzierte Kontraktion nach vorangegangener Blockade einzelner anderer Kaliumkanäle, wie des  $K_{IR2}$ -Kanals, des  $K_V1$ -Kanals, des  $K_V2$ -Kanals des  $K_V7$ -Kanals, des  $BK_{Ca}$ -Kanals, des TASK-1-Kanals sowie des  $K_{IR6}$ -Kanals hatte (Krauth, 2017).

Daher wurden mehrere unterschiedliche Kaliumkanal-Blocker kombiniert, um einen Einfluss von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach vorangegangener Blockade von mehr als einem der anderen Kaliumkanäle zu untersuchen.

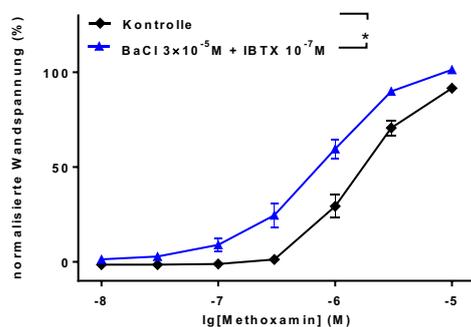
#### 3.3.1 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von $BaCl_2$ und IBTX

Unter Zuhilfenahme des  $K_{IR2}$ -Kanal-Blockers  $BaCl_2$  sowie des  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blockers IBTX wurde die Beteiligung des  $K_V11.1$ -Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR2}$ -Kanals und des  $BK_{Ca}$ -Kanals untersucht. BeKm hatte sowohl allein (Abb. 12A) als auch in Anwesenheit von  $BaCl_2$  und IBTX (Abb. 12C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion.  $BaCl_2$  und IBTX verstärkten die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 12B).

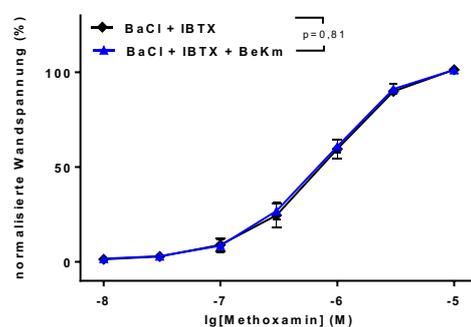
A



B



C



**Abb. 12:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Ratte in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub> und IBTX

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub> und 10<sup>-7</sup>M IBTX (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

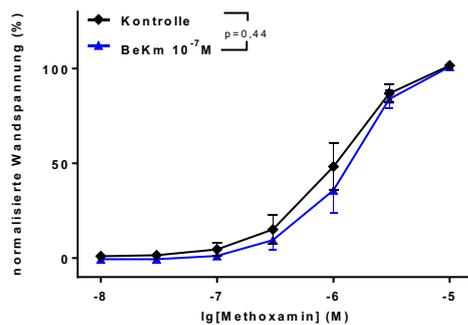
**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub> und 10<sup>-7</sup>M IBTX (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-7</sup>M IBTX und 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

### 3.3.2 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Ratte in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX

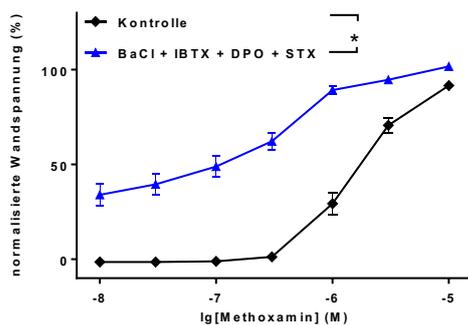
Unter Zuhilfenahme des K<sub>IR2</sub>-Kanal-Blockers BaCl<sub>2</sub>, des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX, des K<sub>V1</sub>-Kanal-Blockers DPO-1, sowie des K<sub>V2</sub>-Kanal-Blockers STX wurde die Beteiligung des K<sub>V11.1</sub>-Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des K<sub>IR2</sub>-Kanals, des BK<sub>Ca</sub>-Kanals, des K<sub>V1</sub>-Kanals sowie des K<sub>V2</sub>-Kanals untersucht.

BeKm hatte allein keinen Effekt auf die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 13A). BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX verstärkten die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 13B). In Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX verstärkte BeKm die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 13C).

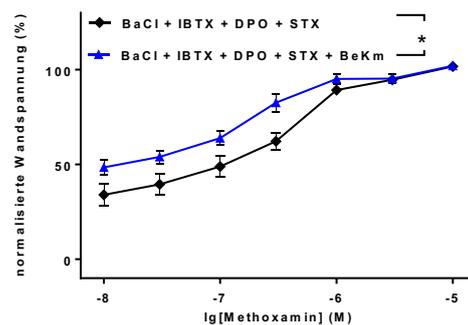
A



B



C



**Abb. 13:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Ratte in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX

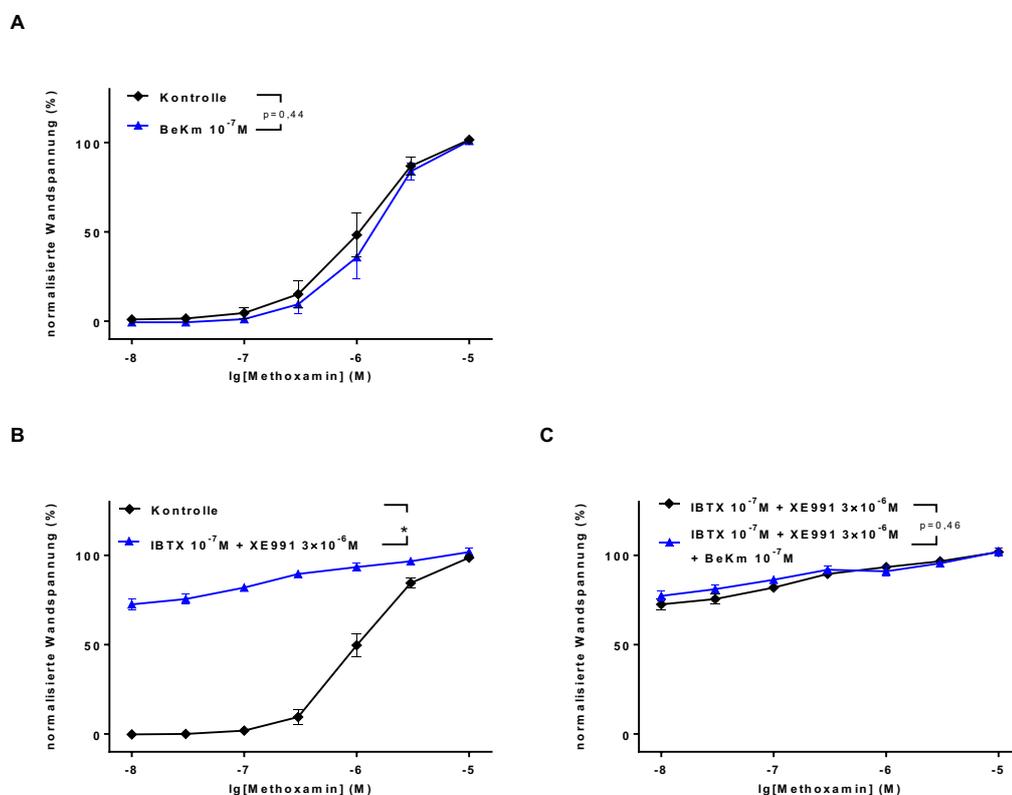
**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-7</sup>M IBTX, 10<sup>-6</sup>M DPO-1 und 10<sup>-7</sup>M STX (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-7</sup>M IBTX, 10<sup>-6</sup>M DPO-1 und 10<sup>-7</sup>M STX (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-7</sup>M IBTX, 10<sup>-6</sup>M DPO-1 und 10<sup>-7</sup>M STX und 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=14)

### 3.3.3 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von IBTX und XE991

Unter Zuhilfenahme des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX, sowie des K<sub>V</sub>7-Kanal-Blockers XE991 wurde die Beteiligung des K<sub>V</sub>11.1-Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals sowie des K<sub>V</sub>7-Kanals untersucht. BeKm hatte sowohl allein (Abb. 14A) als auch in Anwesenheit von IBTX und XE991 (Abb. 14C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Kontraktion. IBTX und XE991 verstärkten die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 14B).



**Abb. 14:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Ratte in Anwesenheit von IBTX und XE991

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=11)

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von 10<sup>-7</sup>M IBTX und 3 × 10<sup>-6</sup>M XE991 (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=11)

**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit einer Kombination von 10<sup>-7</sup>M IBTX und 3 × 10<sup>-6</sup>M XE991 (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von 10<sup>-7</sup>M IBTX, 3 × 10<sup>-6</sup>M XE991 und 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=11)

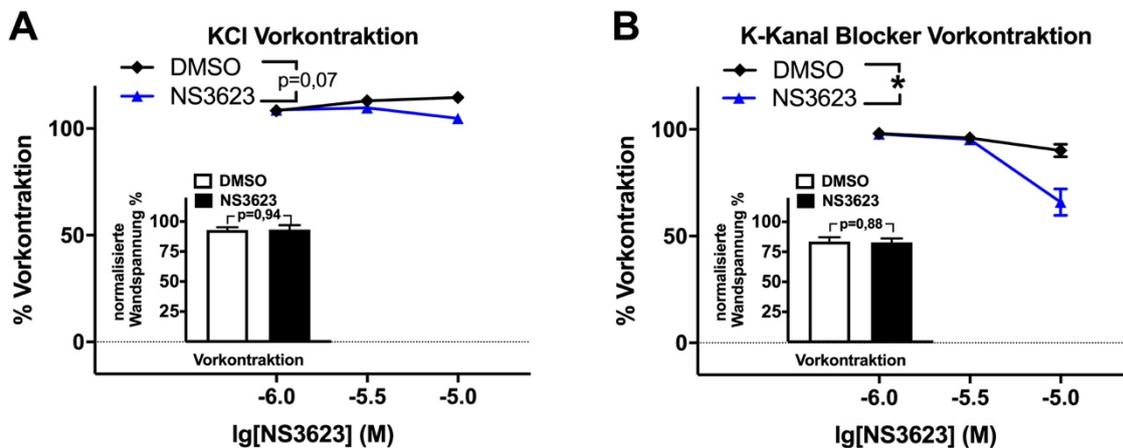
### 3.4 Beteiligung des $K_v11.1$ -Kanals an der Relaxation der A. saphena der Ratte

Vorangegangene Untersuchungen aus unserem Labor konnten eine Abschwächung der MX-induzierten Kontraktion durch den  $K_v11.1$ -Aktivator NS3623 (Hansen et al., 2006) nachweisen. Diese Wirkung wurde jedoch nicht durch Blocker des  $K_v11.1$ -Kanals wie BeKm beeinflusst. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung anderer Kaliumkanäle durch NS3623 den Effekt von NS3623 auf den  $K_v11.1$  Kanal maskiert (Krauth, 2017).

#### 3.4.1 Effekt von NS3623 auf die A. saphena der Ratte

In einer ersten Versuchsserie wurden alle Kaliumkanäle entweder durch eine extrazelluläre Lösung mit 50mM KCl funktionell eliminiert (unter diesen Bedingungen ist der elektrochemische Gradient für Kaliumionen so klein, dass selbst bei geöffneten Kaliumkanälen kein Kaliumstrom und damit keine Veränderung des Gefäßtonus auftritt) oder durch eine Kombination des  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blockers IBTX, des  $K_v1$ -Kanal-Blockers DPO-1, des  $K_v2$ -Kanal-Blockers STX, des  $K_v7$ -Kanal-Blockers XE991, des  $K_{IR2}$ -Kanal-Blockers  $BaCl_2$ , des  $K_{IR6}$ -Kanal-Blockers Glibenclamid und des  $K_v11.1$ -Kanal-Blockers BeKm inhibiert.

NS3623, getestet in 3 Konzentrationen, hatte keinen Effekt auf die KCl-induzierte Gefäßkontraktion. Eine Analyse der a priori Hypothese zur Wirkung von  $10^{-5}$  M NS3623 ergab eine Dilatation um  $-5,7 \pm 1,9\%$  im Vergleich zum von DMSO, dem Lösungsmittel von NS3623, bewirkten Effekt um  $4,0 \pm 1,8\%$  (t-Test,  $n=11$   $p < 0,01$ ). Die KCl-induzierte Vorkontraktion war in An- und Abwesenheit von NS3623 gleich stark (Abb. 15A). NS3623 erzeugte eine Dilatation nach Vorkontraktion durch die Kombination von Kaliumkanal-Blockern. Diese Vorkontraktion war in An- und Abwesenheit von NS3623 gleich stark (Abb. 15B).



**Abb. 15:** Effekt von NS3623 auf die *A. saphena* der Ratte

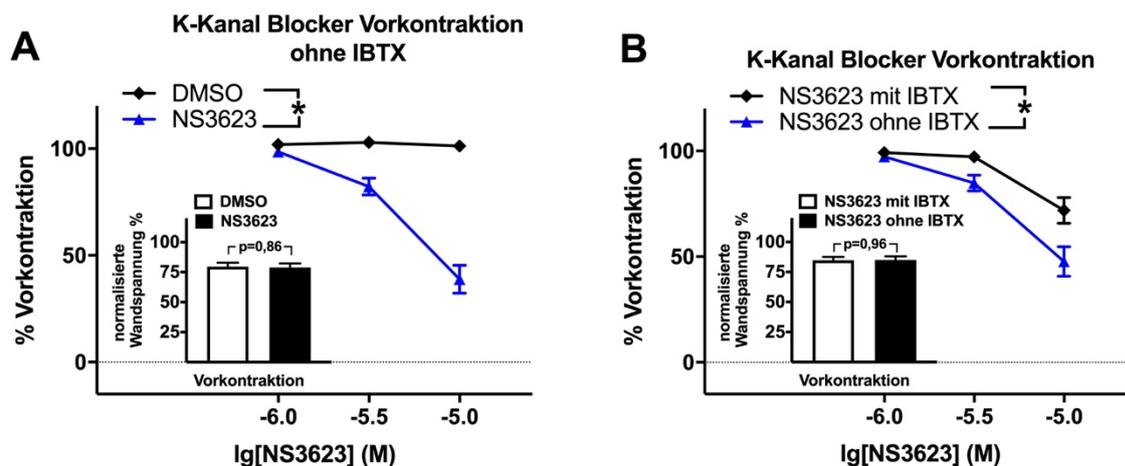
**A:** Vorkontraktionen durch 50mM KCl und anschließende Gabe von DMSO (Lösungsmittel von NS3623) (schwarze Kurve) bzw. von NS3623 (blaue Kurve); Säulendiagramm: KCl-induzierte Vorkontraktion vor der Gabe von DMSO (weiße Säule) bzw. von NS3623 (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. *t*-Test, *n*=11)

**B:** Vorkontraktionen durch eine Kombination von  $10^{-7}$ M IBTX,  $10^{-6}$ M DPO-1,  $10^{-7}$ M STX,  $3 \times 10^{-6}$ M XE991,  $3 \times 10^{-5}$ M BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-6}$ M Glibenclamid und  $10^{-7}$ M BeKm und anschließende Gabe von DMSO (schwarze Kurve) bzw. von NS3623 (blaue Kurve); Säulendiagramm: Kaliumkanal-Blocker induzierte Vorkontraktion vor der Gabe von DMSO (weiße Säule) bzw. von NS3623 (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. *t*-Test, *n*=9)

### 3.4.2 Effekt von NS3623 auf die *A. saphena* der Ratte in An- und Abwesenheit von IBTX

In einer zweiten Versuchsreihe wurden durch eine Kombination des K<sub>v</sub>1-Kanal-Blockers DPO-1, des K<sub>v</sub>2-Kanal-Blockers STX, des K<sub>v</sub>7-Kanal-Blockers XE991, des K<sub>IR</sub>2-Kanal-Blockers BaCl<sub>2</sub>, des K<sub>IR</sub>6-Kanal-Blockers Glibenclamid und des K<sub>v</sub>11.1-Kanal-Blockers BeKm die entsprechenden Kaliumkanäle inhibiert. Dabei wurde auf die Inhibition des BK<sub>Ca</sub>-Kanals durch den spezifischen Blocker IBTX verzichtet.

NS3623 erzeugte eine konzentrationsabhängige Dilatation nach Vorkontraktion durch die Kombination von Kaliumkanal-Blockern in Abwesenheit von IBTX im Vergleich zur Gabe von DMSO, des NS3623 Lösungsmittels (Abb. 16A), als auch im Vergleich zu seiner Dilatation nach Vorkontraktion durch die Kombination von Kaliumkanal-Blockern mit IBTX (Abb. 16B). Die erzeugten Vorkontraktionen waren jeweils gleich stark (Abb. 16A, B).



**Abb. 16:** Effekt von NS3623 auf die *A. saphena* der Ratte in An- und Abwesenheit von IBTX

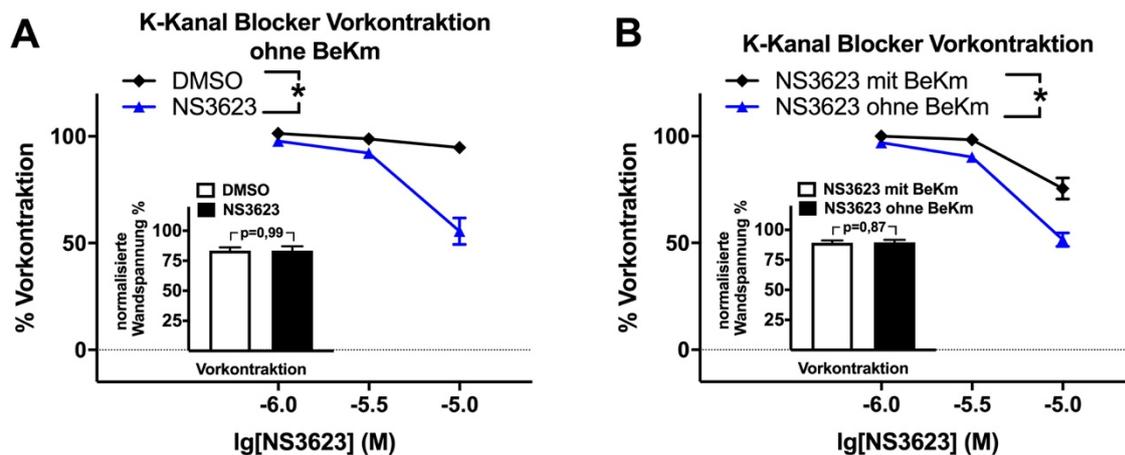
**A:** Vorkontraktionen durch eine Kombination von  $10^{-6}$ M DPO-1,  $10^{-7}$ M STX,  $3 \times 10^{-6}$ M XE991,  $3 \times 10^{-5}$ M BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-6}$ M Glibenclamid und  $10^{-7}$ M BeKm und anschließende Gabe von DMSO (schwarze Kurve) bzw. von NS3623 (blaue Kurve); Säulendiagramm: Kaliumkanal-Blocker induzierte Vorkontraktion in Abwesenheit von IBTX vor der Gabe von DMSO (weiße Säule) bzw. von NS3623 (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. t-Test, n=10)

**B:** Vorkontraktionen durch eine Kombination von  $10^{-6}$ M DPO-1,  $10^{-7}$ M STX,  $3 \times 10^{-6}$ M XE991,  $3 \times 10^{-5}$ M BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-6}$ M Glibenclamid und  $10^{-7}$ M BeKm und anschließende Gabe von NS3623 in Anwesenheit von  $10^{-7}$ M IBTX (schwarze Kurve) bzw. in Abwesenheit von IBTX (blaue Kurve); Säulendiagramm: Kaliumkanal-Blocker induzierte Vorkontraktion in Anwesenheit von IBTX (weiße Säule) bzw. in Abwesenheit von IBTX (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. t-Test, n=12)

### 3.4.3 Effekt von NS3623 auf die *A. saphena* der Ratte in An- und Abwesenheit von BeKm

In einer weiteren Versuchsreihe wurde durch eine Kombination des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX, des K<sub>V1</sub>-Kanal-Blockers DPO-1, des K<sub>V2</sub>-Kanal-Blockers STX, des K<sub>V7</sub>-Kanal-Blockers XE991, des K<sub>IR2</sub>-Kanal-Blockers BaCl<sub>2</sub> und des K<sub>IR6</sub>-Kanal-Blockers Glibenclamid die entsprechenden Kaliumkanäle inhibiert. Dabei wurde auf die Inhibition des K<sub>V11.1</sub>-Kanals durch den spezifischen Blocker BeKm verzichtet.

NS3623 erzeugte eine konzentrationsabhängige Dilatation nach Vorkontraktion durch die Kombination von Kaliumkanal-Blockern in Abwesenheit von BeKm im Vergleich zur Gabe von DMSO, des NS3623 Lösungsmittels (Abb. 17A), als auch im Vergleich zu seiner Dilatation nach Vorkontraktion durch die Kombination von Kaliumkanal-Blockern mit BeKm (Abb. 17B). Die erzeugten Vorkontraktionen waren jeweils gleich stark (Abb. 17 A, B).



**Abb. 17:** Effekt von NS3623 auf die *A. saphena* der Ratte in An- und Abwesenheit von BeKm

**A:** Vorkontraktionen durch eine Kombination von  $10^{-7}M$  IBTX,  $10^{-6}M$  DPO-1,  $10^{-7}M$  STX,  $3 \times 10^{-6}M$  XE991,  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub> und  $10^{-6}M$  Glibenclamid und anschließende Gabe von DMSO (schwarze Kurve) bzw. von NS3623 (blaue Kurve); Säulendiagramm: Kaliumkanal-Blocker induzierte Vorkontraktion in Abwesenheit von BeKm vor der Gabe von DMSO (weiße Säule) bzw. von NS3623 (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. t-Test, n=6)

**B:** Vorkontraktionen durch eine Kombination von  $10^{-6}M$  DPO-1,  $10^{-7}M$  STX,  $3 \times 10^{-6}M$  XE991,  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-6}M$  Glibenclamid und  $10^{-7}M$  IBTX und anschließende Gabe von NS3623 in Anwesenheit von  $10^{-7}M$  BeKm (schwarze Kurve) bzw. in Abwesenheit von BeKm (blaue Kurve); Säulendiagramm: Kaliumkanal-Blocker induzierte Vorkontraktion in Anwesenheit von BeKm (weiße Säule) bzw. in Abwesenheit von BeKm (schwarze Säule) (ANOVA mit Messwiederholung bzw. t-Test, n=15)

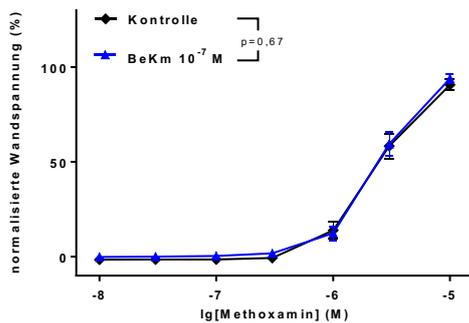
### 3.5 Beteiligung des $K_V11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der *A. saphena* der Maus nach Blockade einzelner Kaliumkanäle

#### 3.5.1 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von $BaCl_2$

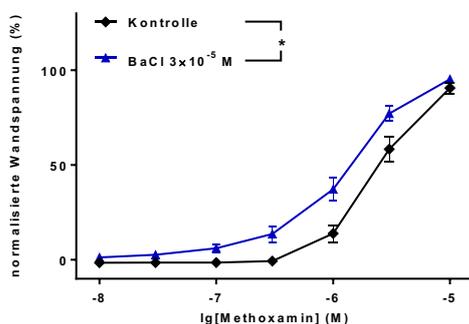
Unter Zuhilfenahme des  $K_{IR2}$ -Kanal-Blockers  $BaCl_2$  wurde die Beteiligung des  $K_V11.1$ -Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR2}$ -Kanals untersucht.

BeKm hatte sowohl allein (Abb. 18A) als auch in Anwesenheit von  $BaCl_2$  (Abb. 18C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion.  $BaCl_2$  allein verstärkte die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 18B).

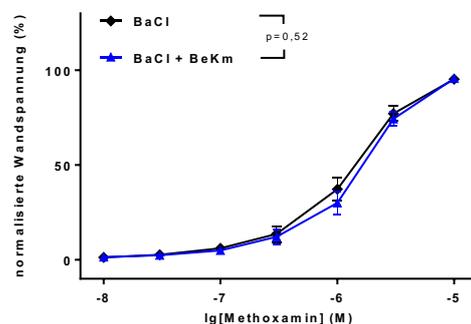
A



B



C



**Abb. 18:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von  $BaCl_2$

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-7}$ M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=18$ )

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub> (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=18)

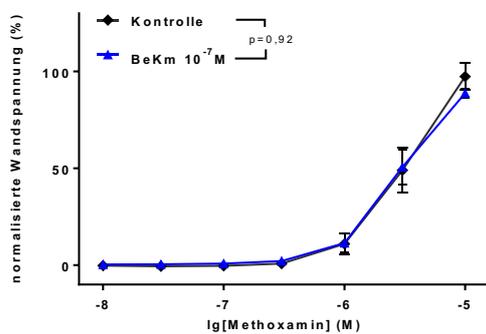
**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub> (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub> und  $10^{-7}M$  BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=18)

### 3.5.2 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX

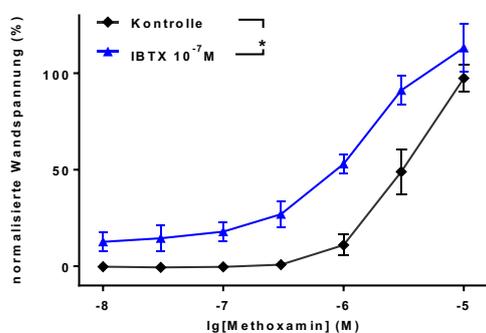
Unter Zuhilfenahme des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX wurde die Beteiligung des K<sub>v</sub>11.1-Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals untersucht.

BeKm hatte sowohl allein (Abb. 19A) als auch in Anwesenheit von IBTX (Abb. 19C) keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion. IBTX allein verstärkte die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 19B).

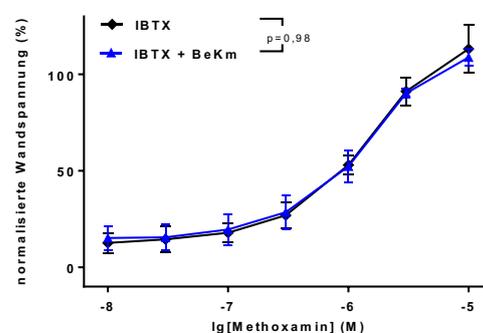
A



B



C



**Abb. 19:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-7}M$  BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von  $10^{-7}M$  IBTX (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

**C:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit von  $10^{-7}M$  IBTX (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}M$  IBTX und  $10^{-7}M$  BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=7$ )

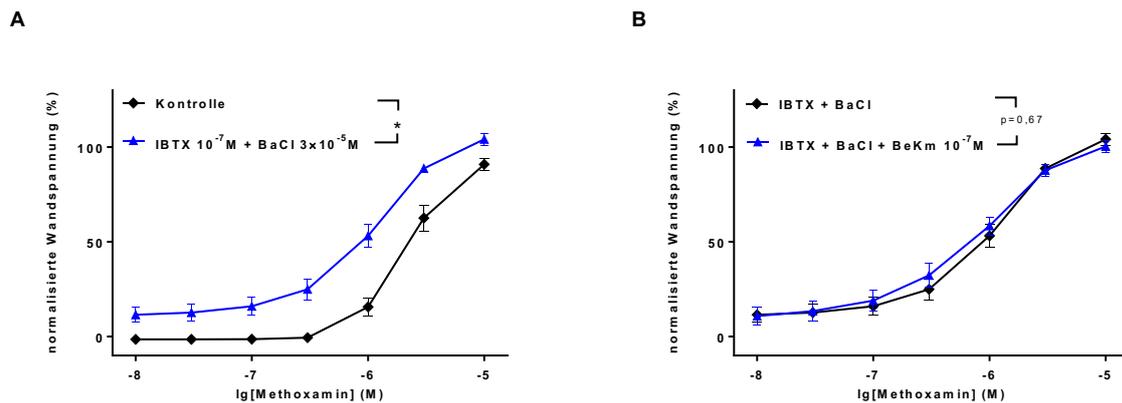
### 3.6 Beteiligung des $K_V11.1$ -Kanals an der Methoxamin-induzierten Kontraktion der A. saphena der Maus nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle

Analog zu den Versuchen am Gefäß der Ratte wurden unterschiedliche Kaliumkanal-Blocker kombiniert, um einen Einfluss von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach vorangegangener Blockade von mehr als einem der anderen Kaliumkanäle zu untersuchen.

#### 3.6.1 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der A. saphena der Maus in Anwesenheit von IBTX und $BaCl_2$

Unter Zuhilfenahme des  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blockers IBTX und des  $K_{IR2}$ -Kanal-Blockers  $BaCl_2$  wurde die Beteiligung des  $K_V11.1$ -Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des  $BK_{Ca}$ -Kanals und des  $K_{IR2}$ -Kanals untersucht.

IBTX und  $BaCl_2$  verstärkten die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 20A). BeKm hatte in Anwesenheit von IBTX und  $BaCl_2$  keinen Einfluss auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 20B).



**Abb. 20:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von IBTX und BaCl<sub>2</sub>

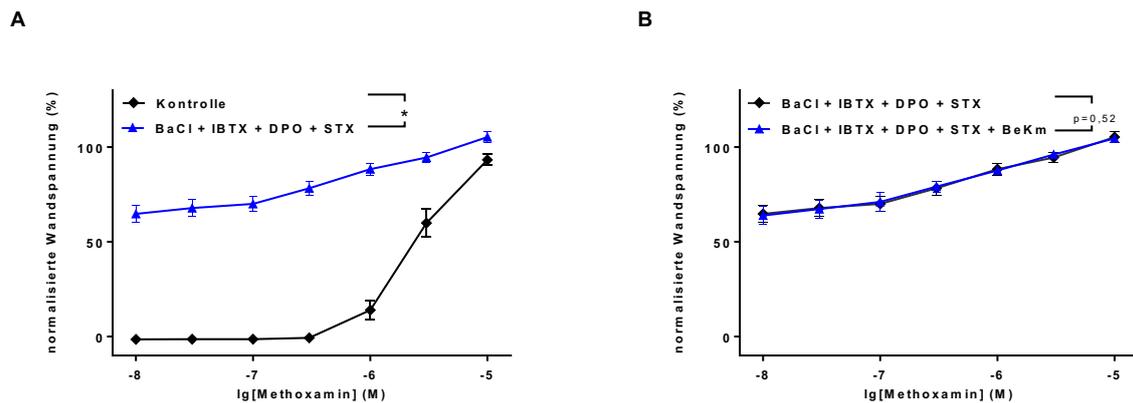
**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von 10<sup>-7</sup>M IBTX und 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub> (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=16)

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit von 10<sup>-7</sup>M IBTX, 3 × 10<sup>-5</sup>M BaCl<sub>2</sub> und 10<sup>-7</sup>M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung, n=16)

### 3.6.2 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX

Unter Zuhilfenahme des K<sub>IR2</sub>-Kanal-Blockers BaCl<sub>2</sub>, des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX, des K<sub>V1</sub>-Kanal-Blockers DPO-1, sowie des K<sub>V2</sub>-Kanal-Blockers STX wurde die Beteiligung des K<sub>V11.1</sub>-Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des K<sub>IR2</sub>-Kanals, des BK<sub>Ca</sub>-Kanals, des K<sub>V1</sub>-Kanals sowie des K<sub>V2</sub>-Kanals untersucht.

BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX verstärkten die MX-induzierte Kontraktion (Abb. 21A). BeKm hatte keinen Effekt auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX (Abb. 21B).



**Abb. 21:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX

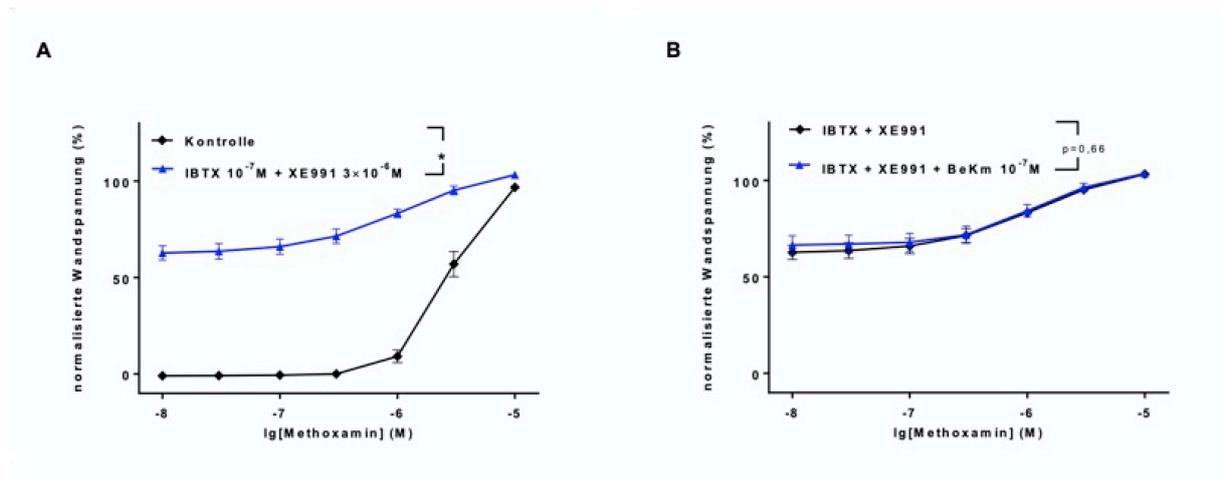
**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-7}M$  IBTX,  $10^{-6}M$  DPO-1 und  $10^{-7}M$  STX (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=14$ )

**B:** MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit einer Kombination von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-7}M$  IBTX,  $10^{-6}M$  DPO-1 und  $10^{-7}M$  STX (schwarze Kurve), und in Anwesenheit einer Kombination von  $3 \times 10^{-5}M$  BaCl<sub>2</sub>,  $10^{-7}M$  IBTX,  $10^{-6}M$  DPO-1 und  $10^{-7}M$  STX und  $10^{-7}M$  BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=14$ )

### 3.6.3 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von IBTX und XE991

Unter Zuhilfenahme des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX und des K<sub>v</sub>7-Kanal-Blockers XE991 wurde die Beteiligung des K<sub>v</sub>11.1-Kanals an der MX-induzierten Gefäßkontraktion nach funktioneller Ausschaltung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals und des K<sub>v</sub>7-Kanals untersucht.

IBTX und XE991 verstärkten die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 22A). BeKm hatte in Anwesenheit von IBTX und XE991 keinen Einfluss auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion (Abb. 22 B,C).



**Abb. 22:** Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion der *A. saphena* der Maus in Anwesenheit von IBTX und XE991

**A:** MX-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit von Kaliumkanal-aktiven Substanzen (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}$  M IBTX und  $3 \times 10^{-6}$  M XE991 (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=11$ )

**B:** absolut gemessene MX-induzierte Kontraktionen in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}$  M IBTX und  $3 \times 10^{-6}$  M XE991 (schwarze Kurve) und in Anwesenheit einer Kombination von  $10^{-7}$  M IBTX,  $3 \times 10^{-6}$  M XE991 und  $10^{-7}$  M BeKm (blaue Kurve) (ANOVA mit Messwiederholung,  $n=11$ )

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Expression von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Ratte

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Ratte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) untersucht.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal  $K_{V11.1}$ -Kanäle in einer systemischen Arterie der Ratte nachweisen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass  $K_{V11.1}$ -Kanäle die am stärksten exprimierten Kaliumkanäle aus der KCNH-Familie in der A. saphena der Ratte sind. Die hohe Expression lässt vermuten, dass der Kanal eine funktionelle Rolle in glatter Gefäßmuskulatur von Arterien einnimmt. Somit eignet sich die A. saphena der Ratte zur weiteren Untersuchung der Rolle des  $K_{V11.1}$ -Kanals in der Tonusregulation von Arterien mittels isometrischer Myographie.

### 4.2 Expression von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Maus

Neben dem Expressionsprofil in der Ratte wurde auch das Expressionsprofil von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Maus untersucht. Auch hier konnten wir die Expression des  $K_{V11.1}$ -Kanals nachweisen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass über die bloße Expression des  $K_{V11.1}$ -Kanals in der A. saphena der Maus hinaus der  $K_{V11.1}$ -Kanal im Vergleich zu allen anderen untersuchten KCNH-Kanälen am stärksten exprimiert wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Barrese et al., welche in anderen systemischen Arterien der Maus (A. carotis, A. femoralis, Aorta) nachweisen konnten, dass neben der starken Expression von  $K_{V11.1}$ -Kanälen die Expression von  $K_{V11.2}$ -Kanälen (KCNH6) und  $K_{V11.3}$ -Kanälen (KCNH7) vernachlässigbar klein war, andere Mitglieder der KCNH-Familie wurden in der Arbeit nicht untersucht (Barrese et al., 2017).

Auch hier könnte die hohe Expression von  $K_{V11.1}$ -Kanälen bedeuten, dass der Kanal eine wichtige Rolle in der glatten Muskulatur von Arterien spielt. Daher ist die A. saphena der Maus ebenfalls ideal, um die Rolle des  $K_{V11.1}$ -Kanals in der Tonusregulation von Arterien mittels isometrischer Myographie zu erforschen.

#### 4.3 Wahl der Methode zur Untersuchung der funktionellen Rolle des Kv11.1-Kanals

Die Gefäßaktivität einer Arterie wird in vivo von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Scherkräfte und der transmurale Druck wirken auf die Gefäße ein. Außerdem spielen Interaktionen zwischen dem Endothel und der glatten Muskulatur genauso eine Rolle wie der Einfluss von Hormonen, vaso-aktiven Faktoren aus freien Nervenendigungen und der Ansammlung von Metaboliten (Schubert, 2005).

Viele dieser Parameter können mithilfe der in der vorliegenden Arbeit benutzten Methode der isometrischen Myographie kontrolliert werden, wodurch die Untersuchung der Funktion einzelner Ionenkanäle in vitro ermöglicht wird. Um den Einfluss auf die Gefäßaktivität auszuschalten, wurde das Endothel entfernt. Der spontane Gefäßtonus, die myogene Antwort und die Wirkung von Vasokonstriktoren sind nicht auf das Vorhandensein des Endothels angewiesen (Meininger and Davis, 1992).

Da Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Funktion eines Kaliumkanals durch einen anderen dominanten Kaliumkanal maskiert werden kann (Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020), wurden mithilfe von spezifischen Kaliumkanal-Blockern andere am Membranpotential beteiligte Kaliumkanäle funktionell ausgeschaltet, um einen Effekt des Kv11.1-Kanal-Blockers BeKm auf den Gefäßtonus zu untersuchen. BeKm ist das Toxin des Skorpions *Buthus eupeus* und bindet in der Nähe der Kanalpore, wobei es zur Interaktion mit der S5-Transmembrandomäne kommt. BeKm bindet bevorzugt an geschlossenen Kanälen (Korolkova et al., 2001; Zhang et al., 2003). Nach Blockade der Kaliumkanäle wurde unter Zuhilfenahme des  $\alpha$ 1-Adrenorezeptor-Agonisten Methoxamin (MX) in steigenden Konzentrationen Kontraktionen induziert. Dies ermöglichte es, einen potentiellen Effekt in einem breiten Bereich des Gefäßtonus zu beobachten.

Auf der anderen Seite wurden Kontraktionen mit Kombinationen aus unterschiedlichen Kaliumkanal-Blockern induziert, damit anschließend der Effekt des Kv11.1-Kanal-Öffners NS3623 in aufsteigenden Konzentrationen auf den Gefäßtonus untersucht werden konnte. Durch die Blockade der Kaliumkanäle sollte einerseits der Effekt von NS3623 auf den Kv11.1-Kanal demaskiert werden. Andererseits konnte nach Blockade spezifischer Kaliumkanäle die Selektivität von NS3623 überprüft werden.

NS3623 wirkt durch Beeinflussung der Kanal-Kinetik, in dem es zu einer Rechtsverschiebung der spannungsabhängigen Kanal-Inaktivierung führt. Auf diese Weise befinden sich bei physiologischen Membranpotentialen mehr Kanäle in einem

aktiven Zustand. Zudem begünstigt NS3623 eine verzögerte Inaktivierung des  $K_v11.1$ -Kanals (Hansen et al., 2006). Ursprünglich war NS3623 dafür bekannt, als Chlorid-Kanal-Blocker in Erythrozyten zu wirken (Bennekou et al., 2001).

#### 4.4 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Vorkontraktion der A. saphena der Ratte

Voruntersuchungen aus unserem Labor (Krauth, 2017), sowie die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass durch alleinige Blockade des  $K_v11.1$ -Kanals durch den spezifischen Blocker BeKm keine Verstärkung der MX-induzierten Kontraktion erreicht werden konnte.

Analog zu unseren Untersuchungen präsentieren sich die Ergebnisse von Barrese et al., bei denen nach Vorkontraktion der A. carotis und der Aorta der Maus mittels des  $\alpha 1$ -Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin der  $K_v11.1$ -Kanal-Blocker Dofetilid keine Verstärkung der Kontraktion erzielen konnte. Die Arbeitsgruppe argumentierte, dass unter diesen Bedingungen der  $K_v11.1$ -Kanal keine Beteiligung an dem Membranpotential der untersuchten Arterien habe (Barrese et al., 2017). Neben dieser Begründung könnte aber auch als Ursache dieser und unserer Ergebnisse eine Maskierung des Effekts von BeKm auf den  $K_v11.1$ -Kanal durch andere dominante Kaliumkanäle vorliegen, wie es bei analogen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gefunden wurde (Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020).

Es wäre also denkbar, dass nach Blockade mehrerer anderer Kaliumkanäle ein Effekt von BeKm auf den  $K_v11.1$ -Kanal demaskiert werden könnte. Allerdings ist hier ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen von Barrese et al. und den von uns erhobenen Ergebnissen nur eingeschränkt möglich, da bei Barrese et al. ein anderer  $K_v11.1$ -Kanal-Blocker, ein anderer  $\alpha 1$ -Adrenorezeptor-Agonist in nur einer Konzentration und andere systemische Arterien benutzt wurden.

Dass BeKm als Blocker des  $K_v11.1$ -Kanals ungeeignet ist, ist aufgrund der Ergebnisse von Yeung & Greenwood unwahrscheinlich. Sie konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass BeKm hoch selektiv für den  $K_v11.1$ -Kanal ist (Yeung and Greenwood, 2007).

#### 4.5 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Vorkontraktion der A. saphena der Ratte nach Blockade einzelner Kalium Kanäle

Voruntersuchungen aus unserem Labor untersuchten, ob ein Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion nach Ausschaltung einzelner Kaliumkanäle wie (i) des  $K_{IR2}$ -Kanals, (ii) des  $K_V1$ -Kanals, (iii) des  $K_V2$ -Kanals, (iv) des  $K_V7$ -Kanals und (v) des  $BK_{Ca}$ -Kanals demaskiert werden kann. Die einzelne Blockade der genannten Kaliumkanäle war jedoch nicht in der Lage eine Verstärkung der MX-induzierten Kontraktion durch BeKm zu erreichen (Krauth, 2017).

Nicht untersucht war bislang die Wirkung des TASK-1-Kanal-Blockers AVE1231 und die Wirkung des  $K_{IR6}$ -Kanal-Blockers Glibenclamid für die Wirkung von BeKm.

#### 4.6 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle in der A. saphena der Ratte

##### 4.6.1 Blockade des TASK-1-Kanals und des $K_{IR6}$ -Kanals

Durch die Blockade des TASK-1-Kanals mittels AVE1231 konnte die MX-induzierte Kontraktion nicht durch BeKm verstärkt werden.

Auch nach Blockade des  $K_{IR6}$ -Kanals durch Glibenclamid war kein Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion darstellbar.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Voruntersuchungen, bei denen nach Blockade einzelner Kaliumkanäle kein Effekt von BeKm nachweisbar war (Krauth, 2017). Ein Grund dafür könnte sein, dass die Blockade einzelner Kaliumkanäle nicht ausreicht, um die funktionelle Rolle des  $K_V11.1$ -Kanals sichtbar zu machen. Dies würde bedeuten, dass der Anteil des  $K_V11.1$ -Kanals am Membranpotential so gering ist, dass er möglicherweise nur zur Geltung kommt, wenn mehrere Kaliumkanäle zum gleichen Zeitpunkt funktionell ausgeschaltet werden. Andererseits wäre es denkbar, dass der  $K_V11.1$ -Kanal funktionell gar keine Beteiligung am Membranpotential hat.

Auf Grundlage unserer bisherigen Ergebnisse entschieden wir uns dazu mehrere unterschiedliche Kaliumkanal-Blocker gleichzeitig zu inkubieren, um zu untersuchen, ob durch die funktionelle Ausschaltung mehrerer Kaliumkanäle der Effekt von BeKm auf den  $K_V11.1$ -Kanal demaskiert werden kann.

#### 4.6.2 Blockade des $K_{IR2}$ -Kanals, des $BK_{Ca}$ -Kanals, des $K_V1$ -Kanals sowie des $K_V2$ -Kanals

Nach Blockade des  $K_{IR2}$ -Kanals durch  $BaCl_2$  und des  $BK_{Ca}$ -Kanals durch IBTX hatte BeKm keinen Einfluss auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion.

Nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR2}$ -Kanals durch  $BaCl_2$ , des  $BK_{Ca}$ -Kanals durch IBTX, des  $K_V1$ -Kanals durch DPO-1 sowie des  $K_V2$ -Kanals durch STX verstärkte BeKm die MX-induzierte Vorkontraktion.

Zum einen zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass nach funktioneller Ausschaltung mehrerer Kaliumkanäle die Blockade des  $K_V11.1$ -Kanals durch BeKm Einfluss auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion hat. Zum anderen wird verdeutlicht, dass aufgrund der Tatsache, dass es nötig war vier unterschiedliche Kaliumkanal-Blocker zu benutzen, bis ein Effekt von BeKm sichtbar gemacht werden konnte, darauf geschlossen werden kann, dass die funktionelle Rolle des  $K_V11.1$ -Kanals in der Tonusregulation von Arterien durch kontraktile Agonisten einen geringen Stellenwert einnimmt.

Da erst durch die Kombination mehrerer Kaliumkanal-Blocker BeKm einen sichtbaren Effekt zeigte, muss betont werden, dass diese Ergebnisse nur unter speziellen Rahmenbedingungen entstanden sind, die nicht die physiologischen Mechanismen in einer systemischen Arterie darstellen. Dies spricht jedoch nicht gegen eine mögliche Beteiligung des  $K_V11.1$ -Kanals an pathophysiologischen Prozessen, bei denen Einfluss auf den Gefäßtonus genommen werden könnte.

Es sind einige Kreislauferkrankungen bekannt, bei denen die Expression von Kaliumkanälen reduziert ist und eine größere Rolle des  $K_V11.1$ -Kanals denkbar wäre. Beispielsweise wurde eine Downregulation des  $BK_{Ca}$ -Kanals (Yang et al., 2013) und des  $K_V7.4$ -Kanals (Jepps et al., 2011; Zavaritskaya et al., 2013) bei arterieller Hypertonie beobachtet.

Des Weiteren zeigt sich eine verminderte Expression des  $BK_{Ca}$ -Kanals bei Diabetes mellitus (Fernández-Velasco et al., 2014).

#### 4.6.3 Blockade des $K_V7$ -Kanals und des $BK_{Ca}$ -Kanals

Nach funktioneller Ausschaltung des  $K_V7$ -Kanals durch XE991 und des  $BK_{Ca}$ -Kanals durch IBTX hatte BeKm keinen Effekt auf die MX-induzierte Vorkontraktion. Auf Grundlage der zuvor gewonnenen Erkenntnisse, dass der Effekt von BeKm auf den

K<sub>V</sub>11.1-Kanal erst bei gleichzeitiger Blockade mehrerer Kaliumkanäle erkennbar wird, lässt dies den Schluss zu, dass die funktionelle Ausschaltung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals und des K<sub>V</sub>7-Kanals nicht ausreicht, um den Effekt von BeKm auf die Gefäßkontraktion sichtbar zu machen.

#### 4.7 Beteiligung des K<sub>V</sub>11.1-Kanals an der Relaxation der A. saphena der Ratte

##### 4.7.1 Dilatation durch NS3623 nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle

Voruntersuchungen aus unserem Labor zeigten, dass K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffner, wie NS3623, die Kontraktion abschwächen. Allerdings wurde dieser Effekt nicht durch die Anwesenheit von K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Blockern beeinflusst, wodurch nicht sicher war, ob auch andere Kanäle durch den K<sub>V</sub>11.1-Öffner aktiviert wurden und dadurch der Effekt auf den K<sub>V</sub>11.1-Kanal durch Öffnung anderer Kanäle maskierten (Krauth, 2017).

Die Vorkontraktion durch Blockade des BK<sub>Ca</sub>-Kanals mittels IBTX, des K<sub>V</sub>1-Kanals mittels DPO-1, des K<sub>V</sub>2-Kanals mittels STX, des K<sub>V</sub>7-Kanals mittels XE991, des K<sub>IR</sub>2-Kanals mittels BaCl<sub>2</sub>, des K<sub>IR</sub>6-Kanals mittels Glibenclamid und des K<sub>V</sub>11.1-Kanals mittels BeKm konnte mit NS3623 konzentrationsabhängig abgeschwächt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass NS3623 unabhängig von den geblockten Kaliumkanälen in hohen Konzentrationen einen Gefäß-dilatierenden Effekt besitzt.

Analog hierzu zeigen sich die Ergebnisse von Yeung et al., welche in der Portalvene der Maus beobachteten, dass nach Gabe des K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffners PD-118057 der erhöhte Kalium-Auswärtsstrom durch K<sub>V</sub>11.1-Blocker wie Dofetilid und BeKm kaum beeinflusst wurde. Die Autoren vermuteten als Ursache, dass in der Portalvene der Maus unterschiedliche Isoformen des K<sub>V</sub>11.1-Kanals exprimiert sind, deren Deaktivierungskinetik sich teilweise unterscheidet und deren Beeinflussung durch K<sub>V</sub>11.1-Kanal-Öffner nicht bekannt ist. Außerdem verwiesen sie auf die unterschiedliche Gewebs-Expression von Kanal-modifizierenden Proteinen, welche die Kanalfunktion mit beeinflussen (Yeung and Greenwood, 2007).

Da NS3623 zunächst als Chlorid-Kanal-Blocker in Erythrozyten entdeckt wurde (Bennekou et al., 2001), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Modulation von Chlorid-Kanälen durch NS3623 Einfluss auf den Gefäßtonus nimmt. Auch die Beeinflussung anderer Ionenkanäle kann letztlich nicht ausgeschlossen werden.

Zwar wurde NS3623 auch als Aktivator von  $K_v4$ -Kanälen identifiziert (Calloe et al., 2016). Diese Isoform konnte allerdings bisher nicht in glatter Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden, sodass dies als Ursache der Dilatation unwahrscheinlich ist.

#### 4.7.2 Dilatation durch NS3623 ohne Blockade des $BK_{Ca}$ -Kanals

Die Kontraktion durch Blockade des  $K_v1$ -Kanals mittels DPO-1, des  $K_v2$ -Kanals mittels STX, des  $K_v7$ -Kanals mittels XE991, des  $K_{IR2}$ -Kanals mittels  $BaCl_2$ , des  $K_{IR6}$ -Kanals mittels Glibenclamid und des  $K_v11.1$ -Kanals mittels BeKm konnte mit NS3623 konzentrationsabhängig abgeschwächt werden. Auf die Blockade des  $BK_{Ca}$ -Kanals wurde dabei verzichtet. Die Dilatation war in Abwesenheit von IBTX ausgeprägter als in Anwesenheit von IBTX.

Diese Ergebnisse offenbaren zum ersten Mal, dass der  $K_v11.1$ -Aktivator NS3623 auch  $BK_{Ca}$ -Kanäle aktiviert, da die Dilatation durch NS3623 in Abwesenheit des  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blockers IBTX stärker war als in seiner Anwesenheit. Weil keine anderen Faktoren in dieser Versuchsreihe verändert wurden, außer der Exposition der Gefäße gegenüber IBTX, kann der zusätzliche dilatierende Effekt nur durch die Wirkung von NS3623 auf den  $BK_{Ca}$ -Kanal erklärt werden. Barrese et al. machten ähnliche Beobachtungen mit  $K_v11.1$ -Kanal-Öffnern. Die Gabe der  $K_v11.1$ -Öffner PD118057 und NS1643 führte in der A. carotis der Maus zu einem Kalium-Auswärtsstrom, der durch Hinzufügen des  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blockers Paxillin aufgehoben wurde (Barrese et al., 2017).

Auf Grundlage unserer Beobachtungen muss daher in zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden, dass die Nutzung von NS3623 nicht selektiv für  $K_v11.1$ -Kanäle ist.

#### 4.7.3 Dilatation durch NS3623 ohne Blockade des $K_v11.1$ -Kanals

Die Kontraktion durch Blockade des  $BK_{Ca}$ -Kanals mittels IBTX, des  $K_v1$ -Kanals mittels DPO-1, des  $K_v2$ -Kanals mittels STX, des  $K_v7$ -Kanals mittels XE991, des  $K_{IR2}$ -Kanals mittels  $BaCl_2$  und des  $K_{IR6}$ -Kanals mittels Glibenclamid konnte mit NS3623 konzentrationsabhängig abgeschwächt werden. Auf die Blockade des  $K_v11.1$ -Kanals wurde dabei verzichtet. Die Dilatation war in dieser Versuchsreihe in Abwesenheit des  $K_v11.1$ -Kanal-Blockers BeKm stärker als in seiner Anwesenheit.

Unter den gegebenen Bedingungen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der  $K_V11.1$ -Kanal durch Aktivierung mittels NS3623 in Arterien zu einer Abschwächung der Vorkontraktion führte.

Dies wurde schon im Vorfeld durch unsere Voruntersuchungen angedeutet. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass andere Kaliumkanäle durch NS3623 aktiviert werden. Da nun in der vorliegenden Arbeit der  $BK_{Ca}$ -Kanal als weitere Zielstruktur von NS3623 identifiziert wurde, konnte durch funktionelle Ausschaltung des  $BK_{Ca}$ -Kanals mittels IBTX der Effekt von NS3623 auf den  $K_V11.1$ -Kanal beobachtet werden. Zwar ist auch hier ein Einfluss auf die Gefäßkontraktion durch Blockierung von Chloridkanälen mittels NS3623 nicht ausgeschlossen. Allerdings wurde in dieser Versuchsreihe nur die Funktion des  $K_V11.1$ -Kanals durch BeKm beeinflusst, sodass der gezeigte Effekt eindeutig auf das Vorhandensein von BeKm zurück zu führen ist. Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass nach Blockade sechs unterschiedlicher Kaliumkanäle keine physiologischen Bedingungen mehr bestehen. Trotz dessen ist eine Beteiligung in pathophysiologischen Prozessen dadurch nicht ausgeschlossen. Abschließend kann auf Grundlage unserer Ergebnisse NS3623 nicht als selektiver Öffner des  $K_V11.1$ -Kanals genutzt werden, da auch als weitere Zielstruktur der  $BK_{Ca}$ -Kanal geöffnet wird. Zudem induzierte NS3623 trotz Blockade des  $K_V11.1$ -Kanals durch BeKm und des  $BK_{Ca}$ -Kanals mittels IBTX eine Dilatation, was die Vermutung zulässt, dass weitere hier nicht explizit untersuchte Mechanismen von NS3623 bestehen könnten, die den Gefäßtonus beeinflussen.

#### 4.8 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion der A. saphena der Maus nach Blockade einzelner Kaliumkanäle

##### 4.8.1 Blockade des $K_{IR2}$ -Kanals und des $BK_{Ca}$ -Kanals

Nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR2}$ -Kanals mittels  $BaCl_2$  konnte die MX-induzierte Kontraktion in der A. saphena der Maus nicht durch BeKm verstärkt werden. Auch nach Blockade des  $BK_{Ca}$ -Kanals durch IBTX verstärkte BeKm nicht die MX-induzierte Kontraktion.

Da wir den Effekt von BeKm auf die Kontraktion nach funktioneller Ausschaltung des  $K_{IR2}$ -Kanals oder des  $BK_{Ca}$ -Kanals untersuchten, gingen wir einen Schritt weiter als Barrese et al., welche einen  $K_V11.1$ -Kanal-Blocker als einzigen Blocker benutzten. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt des  $K_V11.1$ -Kanal-Blockers Dofetilid (i) auf

den Ruhetonus der A. carotis der Maus und (ii) auf die mittels des  $\alpha$ 1-Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin induzierte Kontraktion der A. carotis und der Aorta der Maus. In keiner Versuchsreihe war Dofetilid in der Lage den Gefäßtonus zu ändern (Barrese et al., 2017).

Da in unserer Versuchsreihe auch nach Blockade eines weiteren Kaliumkanals kein Effekt erkennbar war, lässt sich daraus schlussfolgern, dass auf der einen Seite der  $K_V11.1$ -Kanal in der A. saphena der Maus eine geringe funktionelle Rolle spielen könnte, sodass wohlmöglich eine Verstärkung der Kontraktion durch BeKm erst nach gleichzeitiger Blockade mehrerer Kaliumkanäle auftreten könnte. Eine ähnliche Beobachtung wurde schon in der vorliegenden Arbeit gemacht, als erst nach Blockade von vier unterschiedlichen Kaliumkanälen BeKm in der Lage war, die Kontraktion der A. saphena der Ratte zu verstärken. Ein ähnliches Phänomen wäre in der A. saphena der Maus damit durchaus denkbar.

Auf der anderen Seite könnten die Ergebnisse ein Hinweis dafür sein, dass der  $K_V11.1$ -Kanal gar keine funktionelle Rolle in der Regulation des Gefäßtonus in der A. saphena der Maus spielt. Um diese beiden Vermutungen genauer zu überprüfen, entschieden wir uns dazu den Effekt von BeKm auf die Kontraktion nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle zu untersuchen.

#### 4.9 Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle in der A. saphena der Maus

Nach funktioneller Ausschaltung des  $BK_{Ca}$ -Kanals mittels IBTX und des  $K_V7$ -Kanals mittels XE991 hatte BeKm keinen Effekt auf die MX-induzierte Kontraktion.

Nach Blockade des  $BK_{Ca}$ -Kanals mittels IBTX und des  $K_{IR2}$ -Kanals mittels  $BaCl_2$  konnte BeKm ebenfalls die MX-induzierte Gefäßkontraktion nicht verstärken. Daher kombinierten wir in einer weiteren Versuchsreihe den  $K_{IR2}$ -Kanal-Blocker  $BaCl_2$ , den  $BK_{Ca}$ -Kanal-Blocker IBTX, den  $K_V1$ -Kanal-Blocker DPO-1, sowie den  $K_V2$ -Kanal-Blocker STX und untersuchten den Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Kontraktion nach funktioneller Ausschaltung der genannten Kaliumkanäle. Diese Kombination demaskierte einen Effekt von BeKm auf die Vorkontraktion in der A. saphena der Ratte. Jedoch war in dieser Konstellation BeKm nicht in der Lage, die Kontraktion der A. saphena der Maus zu verstärken.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass auch nach gleichzeitiger Blockade mehrerer Kaliumkanäle kein Effekt von BeKm auf den Gefäßtonus in der A. saphena der Maus gezeigt werden kann. Somit scheint der  $K_v11.1$ -Kanal keine relevante Rolle in der Tonusregulation in der A. saphena der Maus zu spielen.

#### 4.10 Schlussfolgerung

Unsere Untersuchungen ergaben, dass der  $K_v11.1$ -Kanal sowohl in der A. saphena der Ratte als auch der Maus exprimiert wird und dort das am häufigsten vorkommende Mitglied der KCNH-Familie bildet. Die starke Expression lässt die Vermutung zu, dass der  $K_v11.1$ -Kanal eine zu beachtende Funktion innerhalb der glatten Gefäßmuskulatur spielt.

In der A. saphena der Ratte konnte erst dann ein kontraktiler Effekt von BeKm auf die MX-induzierte Gefäßkontraktion beobachtet werden, nachdem vier weitere Kaliumkanäle gleichzeitig durch spezifische Blocker funktionell ausgeschaltet wurden. Ein Effekt von BeKm in der A. saphena der Maus war auch nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle nicht nachweisbar.

Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass der  $K_v11.1$ -Kanal zumindest in systemischen Arterien der Maus keine funktionelle Rolle in der Tonusregulation einnimmt und in systemischen Arterien der Ratte, wenn überhaupt, nur eine geringe Rolle für die Regulation des Membranpotentials spielt, da die Ergebnisse unter unphysiologischen Bedingungen erhoben wurden.

Zwar konnten wir feststellen, dass nach Blockade mehrerer Kaliumkanäle NS3623 in der Lage war, in der A. saphena der Ratte eine Gefäßdilataion zu induzieren.

Jedoch waren auch hier die gegebenen Bedingungen aufgrund der Blockade anderer Kaliumkanäle unphysiologisch. Dies spricht ebenfalls für eine sehr geringe Beteiligung des  $K_v11.1$ -Kanals an der Regulation des Membranpotentials in systemischen Arterien der Ratte. Allerdings bleibt denkbar, dass pathophysiologische Mechanismen existieren, in denen der  $K_v11.1$ -Kanal Einfluss auf den Gefäßtonus nimmt.

Offen bleibt die Frage, welche Funktion der  $K_v11.1$ -Kanal in systemischen Arterien der Maus sowie der Ratte einnimmt. Barrese et al. beobachteten, dass durch Blockade des  $K_v11.1$ -Kanals in Zellkulturen mit glatter Gefäßmuskulatur der Maus die Proliferationsrate abnahm. Auf der anderen Seite konnte durch Öffnung des Kanals

die Proliferationsrate gesteigert werden. Die gleichzeitige Gabe von Blocker und Öffner löscht die Effekte gegenseitig aus (Barrese et al., 2017).

Wie zuvor beschrieben ist der  $K_V$ -11.1-Kanal wesentlich in der Tonusregulation und Stabilisierung des Membranpotentials glatter Muskulatur einiger Organe beteiligt, darunter u.a. im Ösophagus (Akbarali et al., 1999), Magen (Ohya et al., 2002a), Jejunum (Lillich et al., 2003), Gallenblase (Parr et al., 2003) und Myometrium (Greenwood et al., 2009).

Der  $K_V$ 11.1-Kanal spielt außerdem in diversen Prozessen der Onkogenese eine Rolle, darunter auch in der Angiogenese (Pardo and Stuhmer, 2014). Daher scheint die Rolle des  $K_V$ 11.1-Kanals in Arterien mehr im Bereich der Zellregulation zu liegen. Eine Rolle in der Tonusregulation von systemischen Arterien scheint zumindest unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich zu sein.

Zukünftige Untersuchungen sollten daher ihren Fokus auf die Beteiligung des  $K_V$ 11.1-Kanals an der Zellproliferation in systemischen Arterien richten, da eine Rolle in der Regulation des Gefäßtonus als gering zu betrachten ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch Kontraktion und Relaxation spielen systemische Arterien eine entscheidende Rolle in der Regulation von Gefäßwiderstand und Blutdruck. Wesentlich daran beteiligt sind die in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommenden Kaliumkanäle, die durch ihre spezifische Kinetik den Gefäßtonus modulieren und das Membranpotential regulieren. Zu den fünf Gruppen in glatter Gefäßmuskulatur vorkommenden Kaliumkanälen zählen auch spannungsabhängige Kaliumkanäle. Einen Vertreter dieser Gruppe stellt der zur KCNH-Gen-Familie gehörende  $K_v11.1$ -Kanal dar, welcher schon in einer Vielzahl von Organen mit glatter Muskulatur nachgewiesen werden konnte, wie unter anderem im Ösophagus, Portalvene, Gallenblase und Uterus, und welcher dort einen entscheidenden Einfluss auf die Repolarisation des Membranpotentials nimmt. Bislang ist die Rolle des  $K_v11.1$ -Kanals in glatter Gefäßmuskulatur von Arterien kaum bekannt. Voruntersuchungen aus unserem Labor konnten durch Blockade des  $K_v11.1$ -Kanals allein oder nach funktioneller Ausschaltung einzelner weiterer Kaliumkanäle keinen Effekt auf den Gefäßtonus beobachten. Nicht untersucht war bisher eine mögliche Maskierung des Effektes durch andere an der Repolarisation beteiligter Kaliumkanäle. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass der  $K_v11.1$ -Kanal eine Rolle in der Kontraktilität glatter Gefäßmuskulatur nach Blockade von dominierenden Kaliumkanälen in Arterien des großen Kreislaufs spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die A. saphena von männlichen Wistarratten sowie männlichen und weiblichen, nicht geschlechtsreifen C57BL/6Jrj-Mäusen isoliert. Durch Nutzung eines Multi-Wire-Myographen wurde der Effekt des  $K_v11.1$ -Kanal-Blockers BeKm auf die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion alleine und nach Ausschaltung mehrerer an der Repolarisation beteiligter Kaliumkanäle untersucht. Weiterhin wurde der Effekt des  $K_v11.1$ -Kanal-Aktivators NS3623 auf eine zuvor durch die Blockade mehrerer an der Repolarisation beteiligter Kaliumkanäle induzierte Gefäßkontraktion untersucht. Mittels qPCR wurde das Expressionsmuster von KCNH-Kanälen in der A. saphena der Ratte und der Maus analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in der A. saphena der Ratte, als auch der Maus der  $K_v11.1$ -Kanal den am stärksten exprimierten Kanal aus der KCNH-Gruppe darstellt. Die Untersuchungen an der A. saphena der Ratte zeigten, dass nach Blockade nur des TASK-1-Kanals mittels AVE1231, oder des  $K_{IR6}$ -Kanals mittels Glibenclamid, sowie nach Gabe der Kombination des  $K_{IR2}$ -Kanal-Blockers  $BaCl_2$  und

des BK<sub>Ca</sub>-Kanal-Blockers IBTX, sowie nach Gabe der Kombination von IBTX und des K<sub>v</sub>7-Kanal-Blockers XE991 BeKm nicht in der Lage war, die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion zu verstärken. Nach gleichzeitiger Gabe von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, des K<sub>v</sub>1-Kanal-Blockers DPO-1, sowie des K<sub>v</sub>2-Kanal-Blockers STX konnte BeKm die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion verstärken. Nach durch eine Kombination von IBTX, DPO-1, STX, XE991, BaCl<sub>2</sub>, Glibenclamid und BeKm induzierter Gefäßkontraktion hatte NS3623 einen dilatierenden Effekt. Der dilatierende Effekt von NS3623 war bei Abwesenheit von IBTX im Blockermix stärker. Die Dilatation war bei Anwesenheit von BeKm im Blockermix schwächer. In der A. saphena der Maus war BeKm sowohl alleine, als auch nach Gabe von BaCl<sub>2</sub> oder IBTX, nach Gabe von BaCl<sub>2</sub> zusammen mit IBTX, nach Gabe von BaCl<sub>2</sub>, IBTX, DPO-1 und STX und nach Gabe von IBTX und XE991 nicht in der Lage, die Methoxamin-induzierte Gefäßkontraktion zu verstärken.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der K<sub>v</sub>11.1-Kanal den am stärksten exprimierten Kanal aus der KCNH-Familie in systemischen Arterien der Ratte und Maus darstellt, was auf eine wichtige funktionelle Rolle in glatter Gefäßmuskulatur schließen lässt. Der Einfluss auf den Gefäßtonus scheint jedoch sehr begrenzt zu sein, da in der A. saphena der Ratte erst nach Blockade von vier weiteren an der Repolarisation beteiligten Kaliumkanälen ein Effekt von BeKm auf den Gefäßtonus beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung konnte in der A. saphena der Maus nicht gemacht werden. Die Ergebnisse schließen jedoch eine Beteiligung an mit einer Reduktion der Expression von Kaliumkanälen einhergehenden pathophysiologischen Prozessen nicht aus. Zudem konnte die vorliegende Arbeit nachweisen, dass NS3623 nicht spezifisch für den K<sub>v</sub>11.1-Kanal ist und damit nicht als selektiver Öffner genutzt werden kann.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. und Goldstein, S.A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97, 175-187. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80728-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80728-x)

Akbarali, H.I., Thatte, H., He, X.D., Giles, W.R. und Goyal, R.K. (1999). Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *The American journal of physiology* 277, C1284-1290. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1284>

Alagem, N., Dvir, M. und Reuveny, E. (2001). Mechanism of Ba(2+) block of a mouse inwardly rectifying K+ channel: differential contribution by two discrete residues. *The Journal of physiology* 534, 381-393. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00381.x>

Barrese, V., Ciudad, P., Yeung, S.Y., Lopez-Lopez, J.R., McNeish, A.J., Ohya, S., Perez-Garcia, M.T. und Greenwood, I.A. (2017). Proliferative Role of Kv11 Channels in Murine Arteries. *Frontiers in physiology* 8, 500. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00500>

Bauer, C.K. und Schwarz, J.R. (2018). Ether-a-go-go K(+) channels: effective modulators of neuronal excitability. *The Journal of physiology* 596, 769-783. <https://doi.org/10.1113/jp275477>

Beech, D.J. und Bolton, T.B. (1987). The effects of tetraethylammonium ions, 4-aminopyridine or quinidine on K+-currents in single smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *Biomedica biochimica acta* 46, S673-676.

Beech, D.J. und Bolton, T.B. (1989). Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *The Journal of physiology* 418, 293-309. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017841>

Bennekou, P., de Franceschi, L., Pedersen, O., Lian, L., Asakura, T., Evans, G., Brugnara, C. und Christophersen, P. (2001). Treatment with NS3623, a novel Cl-conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease. *Blood* 97, 1451-1457. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.5.1451>

Calloe, K., Di Diego, J.M., Hansen, R.S., Nagle, S.A., Treat, J.A. und Cordeiro, J.M. (2016). A dual potassium channel activator improves repolarization reserve and normalizes ventricular action potentials. *Biochemical pharmacology* 108, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.03.015>

Candia, S., Garcia, M.L. und Latorre, R. (1992). Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K+ channel. *Biophysical journal* 63, 583-590. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(92\)81630-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(92)81630-2)

Cole, W.C. und Clement-Chomienne, O. (2003). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 14, 94-103.

Covarrubias, M., Wei, A., Salkoff, L. und Vyas, T.B. (1994). Elimination of rapid potassium channel inactivation by phosphorylation of the inactivation gate. *Neuron* 13, 1403-1412.

Cox, R.H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell biochemistry and biophysics* 42, 167-195.  
<https://doi.org/10.1385/cbb:42:2:167>

Cui, J., Kagan, A., Qin, D., Mathew, J., Melman, Y.F. und McDonald, T.V. (2001). Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *The Journal of biological chemistry* 276, 17244-17251.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010904200>

Deller, T. (2018). *Histologie : Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*, 5. Auflage Aufl. (München: Elsevier, Urban & Fischer).

Drain, P., Dubin, A.E. und Aldrich, R.W. (1994). Regulation of Shaker K<sup>+</sup> channel inactivation gating by the cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 12, 1097-1109.

Escoubas, P., Diochot, S., Celerier, M.L., Nakajima, T. und Lazdunski, M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Molecular pharmacology* 62, 48-57.  
<https://doi.org/10.1124/mol.62.1.48>

Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. und Morita, F. (1995). A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem* 118, 1104-1107.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124993>

Fernández-Velasco, M., Ruiz-Hurtado, G., Gómez, A.M. und Rueda, A. (2014). Ca<sup>2+</sup> handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium* 56, 397-407.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.007>

Ganetzky, B. und Wu, C.F. (1983). Neurogenetic analysis of potassium currents in *Drosophila*: synergistic effects on neuromuscular transmission in double mutants. *J Neurogenet* 1, 17-28. <https://doi.org/10.3109/01677068309107069>

Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzun, I., Rojas, P., Naranjo, D. und Latorre, R. (2012). K<sup>+</sup> channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology* 2, 2087-2149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>

Greenwood, I.A., Yeung, S.Y., Tribe, R.M. und Ohya, S. (2009). Loss of functional K<sup>+</sup> channels encoded by ether-a-go-go-related genes in mouse myometrium prior to labour onset. *The Journal of physiology* 587, 2313-2326.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171272>

Gribble, F.M., Tucker, S.J., Seino, S. und Ashcroft, F.M. (1998). Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes* 47, 1412-1418. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.9.1412>

- Guasti, L., Cilia, E., Crociani, O., Hofmann, G., Polvani, S., Becchetti, A., Wanke, E., Tempia, F. und Arcangeli, A. (2005). Expression pattern of the ether-a-go-go-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *The Journal of comparative neurology* 491, 157-174. <https://doi.org/10.1002/cne.20721>
- Gurney, A. und Manoury, B. (2009). Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *European biophysics journal* : EBJ 38, 305-318. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0326-8>
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57, 473-508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Guyton, A.C. (1981). The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation* 64, 1079-1088. <https://doi.org/10.1161/01.cir.64.6.1079>
- Hansen, R.S., Diness, T.G., Christ, T., Wettwer, E., Ravens, U., Olesen, S.P. und Grunnet, M. (2006). Biophysical characterization of the new human ether-a-go-go-related gene channel opener NS3623 [N-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl)-N'-(3'-trifluoromethylphenyl)urea]. *Molecular pharmacology* 70, 1319-1329. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026492>
- Harley, C.A., Starek, G., Jones, D.K., Fernandes, A.S., Robertson, G.A. und Morais-Cabral, J.H. (2016). Enhancement of hERG channel activity by scFv antibody fragments targeted to the PAS domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 9916-9921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601116113>
- Hirst, G.D. und Edwards, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiological reviews* 69, 546-604. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.2.546>
- Huffaker, S.J., Chen, J., Nicodemus, K.K., Sambataro, F., Yang, F., Mattay, V., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Song, J., Rujescu, D., *et al.* (2009). A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nature medicine* 15, 509-518. <https://doi.org/10.1038/nm.1962>
- Imai, T., Okamoto, T., Yamamoto, Y., Tanaka, H., Koike, K., Shigenobu, K. und Tanaka, Y. (2001). Effects of different types of K<sup>+</sup> channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *Acta physiologica Scandinavica* 173, 323-333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2001.00908.x>
- Jackson, W.F. (2018). KV channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* (New York, NY : 1994) 25. <https://doi.org/10.1111/micc.12421>
- Jensen, M.O., Jogini, V., Borhani, D.W., Leffler, A.E., Dror, R.O. und Shaw, D.E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* (New York, NY) 336, 229-233. <https://doi.org/10.1126/science.1216533>

Jepps, T.A., Chadha, P.S., Davis, A.J., Harhun, M.I., Cockerill, G.W., Olesen, S.P., Hansen, R.S. und Greenwood, I.A. (2011). Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation* 124, 602-611. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.032136>

Kaplan, W.D. und Trout, W.E., 3rd (1969). The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* 61, 399-409.

Kiper, A.K., Rinne, S., Rolfes, C., Ramirez, D., Seebohm, G., Netter, M.F., Gonzalez, W. und Decher, N. (2015). Kv1.5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea? *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467, 1081-1090. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1665-1>

Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D. und Park, W.S. (2008). Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi* 44, 65-81. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.65>

Korolkova, Y.V., Kozlov, S.A., Lipkin, A.V., Pluzhnikov, K.A., Hadley, J.K., Filippov, A.K., Brown, D.A., Angelo, K., Strobaek, D., Jespersen, T., *et al.* (2001). An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. *The Journal of biological chemistry* 276, 9868-9876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005973200>

Krauth, S. (2017). Rolle der Kv11-Kanäle in der Arteria Saphena der Ratte. Bachelor-Arbeit (Mannheim: Hochschule Mannheim).

Lagrutta, A., Wang, J., Fermini, B. und Salata, J.J. (2006). Novel, potent inhibitors of human Kv1.5 K<sup>+</sup> channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317, 1054-1063. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101162>

Leung, Y.M. (2012). Involvement of C-type inactivation gating in the actions of voltage-gated K<sup>+</sup> channel inhibitors. *Pharmacology & therapeutics* 133, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.10.005>

Lillich, J.D., Rakestraw, P.C., Roussel, A.J., Finley, M.R., Ganta, S. und Freeman, L.C. (2003). Expression of the ether-a-go-go (ERG) potassium channel in smooth muscle of the equine gastrointestinal tract and influence on activity of jejunal smooth muscle. *American journal of veterinary research* 64, 267-272.

Ma, D. (2018). Interaction of voltage-gated potassium channels and large-conductance calcium-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg. <https://doi.org/10.11588/heidok.00024068>

Ma, D., Gaynullina, D., Schmidt, N., Mladenov, M. und Schubert, R. (2020). The Functional Availability of Arterial Kv7 Channels Is Suppressed Considerably by Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in 2- to 3-Month Old but Not in 10- to 15-Day Old Rats. *Frontiers in physiology* 11, 597395. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.597395>

McCrossan, Z.A. und Abbott, G.W. (2004). The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 47, 787-821. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.018>

- McDonald, T.V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M.B., Wang, K.W., Goldstein, S.A. und Fishman, G.I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* 388, 289-292. <https://doi.org/10.1038/40882>
- Meininger, G.A. und Davis, M.J. (1992). Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *The American journal of physiology* 263, H647-659. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.3.H647>
- Mewe, M., Wulfsen, I., Schuster, A.M., Middendorff, R., Glassmeier, G., Schwarz, J.R. und Bauer, C.K. (2008). Erg K<sup>+</sup> channels modulate contractile activity in the bovine epididymal duct. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 294, R895-904. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00521.2007>
- Milner, R.E., Baksh, S., Shemanko, C., Carpenter, M.R., Smillie, L., Vance, J.E., Opas, M. und Michalak, M. (1991). Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 266, 7155-7165.
- Morais Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li, M. und Mackinnon, R. (1998). Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 95, 649-655. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81635-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81635-9)
- Mulvany, M.J. und Halpern, W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 260, 617-619. <https://doi.org/10.1038/260617a0>
- Mulvany, M.J. und Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research* 41, 19-26. <https://doi.org/10.1161/01.res.41.1.19>
- Nelson, M.T. und Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 268, C799-822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>
- Ng, C.A., Phan, K., Hill, A.P., Vandenberg, J.I. und Perry, M.D. (2014). Multiple interactions between cytoplasmic domains regulate slow deactivation of Kv11.1 channels. *The Journal of biological chemistry* 289, 25822-25832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558379>
- Ohya, S., Asakura, K., Muraki, K., Watanabe, M. und Imaizumi, Y. (2002a). Molecular and functional characterization of ERG, KCNQ, and KCNE subtypes in rat stomach smooth muscle. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 282, G277-287. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00200.2001>
- Ohya, S., Horowitz, B. und Greenwood, I.A. (2002b). Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 283, C866-877. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00099.2002>
- Okabe, K., Kitamura, K. und Kuriyama, H. (1987). Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 409, 561-568. <https://doi.org/10.1007/bf00584654>

- Pardo, L.A. und Stuhmer, W. (2014). The roles of K(+) channels in cancer. *Nature reviews Cancer* 14, 39-48. <https://doi.org/10.1038/nrc3635>
- Parr, E., Pozo, M.J., Horowitz, B., Nelson, M.T. und Mawe, G.M. (2003). ERG K+ channels modulate the electrical and contractile activities of gallbladder smooth muscle. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 284, G392-398. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00325.2002>
- Robertson, B. (1997). The real life of voltage-gated K+ channels: more than model behaviour. *Trends in pharmacological sciences* 18, 474-483.
- Roeper, J., Lorra, C. und Pongs, O. (1997). Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K+ channel KV1.4 regulated by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 3379-3391.
- Rosati, B., Marchetti, P., Crociani, O., Lecchi, M., Lupi, R., Arcangeli, A., Olivotto, M. und Wanke, E. (2000). Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K(+) channels in firing and release. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14, 2601-2610. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0077com>
- Sanguinetti, M.C. und Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440, 463-469. <https://doi.org/10.1038/nature04710>
- Schafer, R., Wulfsen, I., Behrens, S., Weinsberg, F., Bauer, C.K. und Schwarz, J.R. (1999). The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *The Journal of physiology* 518 ( Pt 2), 401-416. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0401p.x>
- Schubert, R. (2005). Isolated vessels. In *Practical Methods in Cardiovascular Research* (Springer), S. 198-211.
- Schubert, R. und Nelson, M.T. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends in pharmacological sciences* 22, 505-512. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01775-2](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01775-2)
- Shiau, Y.S., Huang, P.T., Liou, H.H., Liaw, Y.C., Shiau, Y.Y. und Lou, K.L. (2003). Structural basis of binding and inhibition of novel tarantula toxins in mammalian voltage-dependent potassium channels. *Chemical research in toxicology* 16, 1217-1225. <https://doi.org/10.1021/tx0341097>
- Shibasaki, T. (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *The Journal of physiology* 387, 227-250. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016571>
- Smith, P.L., Baukowitz, T. und Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833-836. <https://doi.org/10.1038/379833a0>
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236. <https://doi.org/10.1038/372231a0>

- Spector, P.S., Curran, M.E., Zou, A., Keating, M.T. und Sanguinetti, M.C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *The Journal of general physiology* 107, 611-619. <https://doi.org/10.1085/jgp.107.5.611>
- Thiele, R.H., Nemergut, E.C. und Lynch, C., 3rd (2011). The physiologic implications of isolated alpha(1) adrenergic stimulation. *Anesth Analg* 113, 284-296. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182124c0e>
- Torres, Y.P., Morera, F.J., Carvacho, I. und Latorre, R. (2007). A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry* 282, 24485-24489. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700022200>
- Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. und Robertson, G.A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science (New York, NY)* 269, 92-95. <https://doi.org/10.1126/science.7604285>
- Tykocki, N.R., Boerman, E.M. und Jackson, W.F. (2017). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Comprehensive Physiology* 7, 485-581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y. und Hill, A.P. (2012). hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiological reviews* 92, 1393-1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>
- Warmke, J., Drysdale, R. und Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science (New York, NY)* 252, 1560-1562. <https://doi.org/10.1126/science.1840699>
- Warmke, J.W. und Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3438-3442. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3438>
- Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education* 27, 201-206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Wiedmann, F., Kiper, A.K., Bedoya, M., Ratte, A., Rinne, S., Kraft, M., Waibel, M., Anad, P., Wenzel, W., Gonzalez, W., *et al.* (2019). Identification of the A293 (AVE1231) Binding Site in the Cardiac Two-Pore-Domain Potassium Channel TASK-1: a Common Low Affinity Antiarrhythmic Drug Binding Site. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 52, 1223-1235. <https://doi.org/10.33594/000000083>
- Woodrum, D.A. und Brophy, C.M. (2001). The paradox of smooth muscle physiology. *Molecular and cellular endocrinology* 177, 135-143.
- Wu, K.D., Bungard, D. und Lytton, J. (2001). Regulation of SERCA Ca<sup>2+</sup> pump expression by cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology* 280, C843-851. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C843>
- Yang, Y., Li, P.Y., Cheng, J., Mao, L., Wen, J., Tan, X.Q., Liu, Z.F. und Zeng, X.R. (2013). Function of BKCa channels is reduced in human vascular smooth muscle cells

from Han Chinese patients with hypertension. *Hypertension* 61, 519-525. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.111.00211>

Yeung, S.Y. und Greenwood, I.A. (2005). Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* 146, 585-595. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706342>

Yeung, S.Y. und Greenwood, I.A. (2007). Pharmacological and biophysical isolation of K<sup>+</sup> currents encoded by ether-a-go-go-related genes in murine hepatic portal vein smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology* 292, C468-476. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00142.2006>

Zavaritskaya, O., Dudem, S., Ma, D., Rabab, K.E., Albrecht, S., Tsvetkov, D., Kassmann, M., Thornbury, K., Mladenov, M., Kammermeier, C., *et al.* (2020). Vasodilation of rat skeletal muscle arteries by the novel BK channel opener GoSlo is mediated by the simultaneous activation of BK and K(v) 7 channels. *British journal of pharmacology* 177, 1164-1186. <https://doi.org/10.1111/bph.14910>

Zavaritskaya, O., Zhuravleva, N., Schleifenbaum, J., Gloe, T., Devermann, L., Kluge, R., Mladenov, M., Frey, M., Gagov, H., Fésüs, G., *et al.* (2013). Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction. *Hypertension* 61, 151-159. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.112.197566>

Zhang, M., Korolkova, Y.V., Liu, J., Jiang, M., Grishin, E.V. und Tseng, G.N. (2003). BeKm-1 is a HERG-specific toxin that shares the structure with ChTx but the mechanism of action with ErgTx1. *Biophysical journal* 84, 3022-3036. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)70028-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(03)70028-9)

## 7 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Kaivers, Nick Fabian  
Geburtsdatum: 16.06.1995  
Geburtsort: Herne  
Familienstand: Ledig  
Vater: Dr. med. Peter Kaivers  
Mutter: Maike van Doorn-Kaivers

### SCHULISCHER WERDEGANG

2005 – 2013 Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums Herne  
05.07.2013 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2014/15 Beginn des Studiums der Humanmedizin  
An der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität  
Heidelberg  
16.09.2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)  
15.04.2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)  
11.06.2021 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

## 8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Schubert bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung zu erstellen. Die hervorragende Betreuung mit regelmäßiger Rücksprache und seinem offenen Ohr für Fragen waren mir eine enorme Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Labor-Kolleginnen, insbesondere bei Frau Dr. Dongyu Ma und Frau Dr. med. Angela Bachmann für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

Großer Dank gilt auch der Laborleiterin Frau Camela Jost, welche mich mit offenen Armen aufgenommen hat und für jedes Problem eine Lösung finden konnte.

Frau Dr. Nadine Schmidt danke ich für ihre Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, ohne deren Unterstützung und Zuversicht diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.