

Aus dem Institut für Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. Carsten Scholz)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Der Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße
und seine Beeinflussung durch sympathische Denervierung**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:

Saskia Mahl, geb. Pfannkuch

geb. am: 24.12.1992

in: Fritzlär

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Olaf Grisk

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Patzak

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straße,
Seminarraum für Innere Medizin A (EG; Flur 7; Raum 7.0.15/17)

Tag der Disputation: 21.03.2023

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Definition und Folgen des Bluthochdrucks..... | 1 |
| 1.2 | Bedeutung der Niere für die Blutdruckregulierung | 2 |
| 1.3 | Grundlagen der Mikrozirkulation..... | 3 |
| 1.3.1 | Bedeutung des Gefäßdurchmessers für den Gefäßwiderstand | 3 |
| 1.3.2 | Entstehung des Membranpotenzials..... | 4 |
| 1.4 | Vaskuläre Kaliumkanäle..... | 6 |
| 1.4.1 | K _{Ca} -Kanäle | 7 |
| 1.4.2 | K _V -Kanäle..... | 8 |
| 1.4.3 | K _{ir} -Kanäle | 8 |
| 1.4.4 | K _{ATP} -Kanäle..... | 9 |
| 1.4.5 | K _{2P} -Kanäle | 9 |
| 1.5 | Gefäßtonusänderungen durch vasokonstriktorische und -dilatatorische Stimuli | 9 |
| 1.5.1 | Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion | 9 |
| 1.5.2 | cAMP-vermittelte Vasodilatation | 10 |
| 1.6 | Bedeutung der sympathischen Innervation der Niere für den Bluthochdruck und renale Denervierung als Behandlungsoption | 11 |
| 1.7 | Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße | 14 |
| 1.8 | Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen..... | 16 |
| 1.9 | Ziele der vorliegenden Arbeit | 17 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 18 |
| 2.1 | Material..... | 18 |
| 2.2 | Methoden..... | 22 |
| 2.2.1 | Versuchstiere und Tierhaltung | 22 |
| 2.2.2 | Sympathektomie der Ratten..... | 22 |
| 2.2.3 | Lokale renale Denervierung der Ratten..... | 22 |
| 2.2.4 | Entnahme der Rattennieren | 23 |
| 2.2.5 | Humanes Gewebe..... | 23 |
| 2.2.6 | Präparation der Gefäße | 23 |
| 2.2.7 | Drahtmyographie..... | 24 |
| 2.2.8 | Untersuchungen der mRNA-Gehalte der K _{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen der Ratte..... | 29 |
| 2.2.9 | Untersuchungen der mRNA-Gehalte der K _{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen | 35 |
| 2.2.10 | Reinheit der qPCR-Daten | 37 |
| 2.2.11 | Statistik | 37 |
| 3 | ERGEBNISSE | 40 |
| 3.1 | Untersuchungen zum Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte..... | 40 |
| 3.1.1 | Effekt der Kaliumkanalblockade auf den Ruhetonus..... | 40 |
| 3.1.2 | Effekt der Kaliumkanalblockade auf die S-(-)-BayK-induzierte Vasokonstriktion | 41 |
| 3.1.3 | Effekt der Kaliumkanalblockade auf die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion | 46 |
| 3.1.4 | Effekt der Kaliumkanalblockade auf die Forskolin-induzierte Vasodilatation | 53 |
| 3.1.5 | Untersuchung der Iloprost-induzierten Vasodilatation..... | 57 |
| 3.1.6 | Zusammenfassung der Untersuchungen zum Effekt der Kaliumkanalblockade auf den Gefäßtonus renaler Widerstandsgefäße der Ratte | 58 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2 | Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte..... | 59 |
| 3.2.1 | Effekt der sympathischen Denervierung auf die Noradrenalinsensitivität..... | 59 |
| 3.2.2 | Effekt der Hyperpolarisation (K_{ATP} -Kanalaktivierung) auf die Noradrenalinsensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten..... | 59 |
| 3.2.3 | Effekt der K_{ATP} -Kanalblockade auf die Noradrenalinsensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten..... | 63 |
| 3.2.4 | mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten..... | 66 |
| 3.2.5 | Vergleich der Folgen von systemischer Sympathektomie und lokaler renaler Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte..... | 70 |
| 3.3 | Untersuchungen an renalen Widerstandsgefäßen des Menschen | 71 |
| 3.3.1 | K_{ATP} -Kanäle in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen | 71 |
| 3.3.2 | Effekt der K_v7 -Kanalblockade auf die Iloprost-induzierte Vasokonstriktion..... | 76 |
| 4 | DISKUSSION..... | 77 |
| 4.1 | Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte | 77 |
| 4.1.1 | Beitrag von Kaliumkanälen zum Ruhetonus | 77 |
| 4.1.2 | Beteiligung von Kaliumkanälen an der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion | 82 |
| 4.1.3 | Beteiligung von Kaliumkanälen an der cAMP-vermittelten Vasodilatation | 86 |
| 4.1.4 | Zusammengefasste Erkenntnisse zum Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte..... | 89 |
| 4.2 | Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte..... | 89 |
| 4.2.1 | Eigenschaften der Gefäße lokal renal denervierter Ratten im Vergleich zu denen systemisch sympathektomierter Tiere..... | 90 |
| 4.2.2 | Ursachen der Membranpotenzialdepolarisation | 90 |
| 4.2.3 | Ursachen der Noradrenalinhypersensitivität | 92 |
| 4.2.4 | Zusammenfassung der Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte und Anmerkungen zum klinischen Bezug..... | 94 |
| 4.3 | Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen..... | 95 |
| 4.3.1 | Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur Expression und Funktionalität der K_{ATP} -Kanäle | 95 |
| 4.3.2 | Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur Agonist-induzierten Vasodilatation | 97 |
| 4.3.3 | Folgen der gewonnenen Erkenntnisse zur Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen | 98 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 99 |
| I | LITERATURVERZEICHNIS..... | 100 |
| II | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 110 |
| III | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 113 |
| IV | TABELLENVERZEICHNIS | 115 |
| V | KONGRESSBEITRÄGE..... | 117 |
| VI | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | 118 |
| VII | DANKSAGUNG..... | 119 |

1 Einleitung

1.1 Definition und Folgen des Bluthochdrucks

Der Blutdruck ist der Druck des Blutes in einem Gefäßsystem. Für einen erwachsenen Menschen definiert die Europäische Gesellschaft für Kardiologie einen arteriellen Druck von unter 120/80 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) als optimalen Blutdruck¹. Ab einem systolischen Druck von über 140 mmHg und/oder einem diastolischen Druck von über 90 mmHg liegt ein Bluthochdruck (arterielle Hypertonie) vor¹. Weltweit findet sich bei circa (ca.) 1,1 Milliarden Menschen ein Bluthochdruck¹. Der erhöhte Druck im Gefäßsystem stellt einen der Hauptrisikofaktoren für Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt und chronische Nierenerkrankungen dar² und steht somit im Zusammenhang mit etwa einem Drittel der weltweiten Todesfälle³. Umgekehrt zeigen Bluthochdruckstudien der letzten Jahre, dass eine Minderung des systolischen Blutdrucks um 10 mmHg das Auftreten von relevanten kardiovaskulären Erkrankungsereignissen um 20 Prozent (%) reduziert⁴. Ziel sollte es daher sein, einen erhöhten Blutdruck zu senken. Neben lebensstilverändernden Maßnahmen stehen hierbei auch verschiedene pharmakologische Ansätze zur Verfügung³. Es bleibt jedoch eine gewisse Anzahl an Patienten, deren Blutdruck trotz der Einnahme verschiedenster Medikamentenkombinationen nicht auf die gewünscht niedrigen Werte zu senken ist^{5,6}. Ebenso geht die systemische Einnahme von Medikamenten oft mit verschiedenen unerwünschten Nebenwirkungen einher. Aus diesen Gründen bleiben neben den medikamentösen auch die nicht-medikamentösen interventionellen Ansätze eine attraktive Option in der Hypertoniebehandlung⁶. Einer dieser Ansätze, der vor ca. zehn Jahren in die Klinik eingeführt wurde, ist die sogenannte lokale Denervierung der Niere⁷. Bei diesem Verfahren wird ein Katheter über einen transkutanen Zugang in die Nierenarterie eingeführt und die perivaskulären Nervenfasern von der luminalen Seite der Gefäßwand mittels hochfrequentem Strom verödet⁷. Aufgrund der unterschiedlichen, in den letzten Jahren teils gegensätzlichen Studienergebnisse zum Erfolg dieser Methode^{6,8-10} ist das Interesse an der physiologischen Blutdruckregulation sowie den Pathomechanismen des Bluthochdrucks und dabei insbesondere der Rolle der Niere und des sympathischen Nervensystems neu aufgeflammt.

1.2 Bedeutung der Niere für die Blutdruckregulierung

Eine Vielzahl von Systemen im Körper dient der Regulation des Blutdrucks. Auch die Niere spielt dabei eine entscheidende Rolle. Tierexperimentelle Transplantationsstudien zeigten, dass bei hypertensiven Ratten, denen die Niere eines normotensiven Spenders eingesetzt wurde, der Blutdruck fiel¹¹. Umgekehrt entwickelten normotensive Tiere, die die Niere eines hypertensiven Spenders erhielten, vermehrt einen Bluthochdruck¹¹.

Im Allgemeinen hängt der Blutdruck von drei Komponenten ab: 1. der Kontraktionskraft des Herzens, 2. dem Tonus der Gefäßwände und 3. dem Blutvolumen⁵. Die Niere beeinflusst zwei dieser drei Komponenten, denn zum einen nimmt sie durch verschiedene vasoaktive Substanzen Einfluss auf den Tonus der Gefäßwände (vergleiche (vgl.) 2.), zum anderen reguliert sie über die Natrium- und Wasserausscheidung das zirkulierende Blutvolumen (vgl. 3.)⁵. Vor allem dieser Ausscheidungsfunktion der Niere fällt in der langfristigen Blutdruckregulation eine wichtige Rolle zu^{12,13}. An dieser Stelle zeigt sich auch ein Zusammenhang zwischen der renalen Mikrozirkulation und der Blutdruckregulierung: Die Ausscheidung der Niere wird durch die Balance zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der tubulären Reabsorption beeinflusst¹⁴. Die glomeruläre Filtrationsrate wiederum ist abhängig von dem Blutfluss durch die einzelnen Nephrone und dem hydrostatischen Druck der glomerulären Kapillaren¹⁴. Diese Variablen sind direkt abhängig von der Funktion der renalen Mikrozirkulation, sodass deutlich wird, wie Veränderungen im renalen Gefäßbett Einfluss auf die Lage des systemischen Blutdrucks nehmen¹⁴ (Abbildung 1).

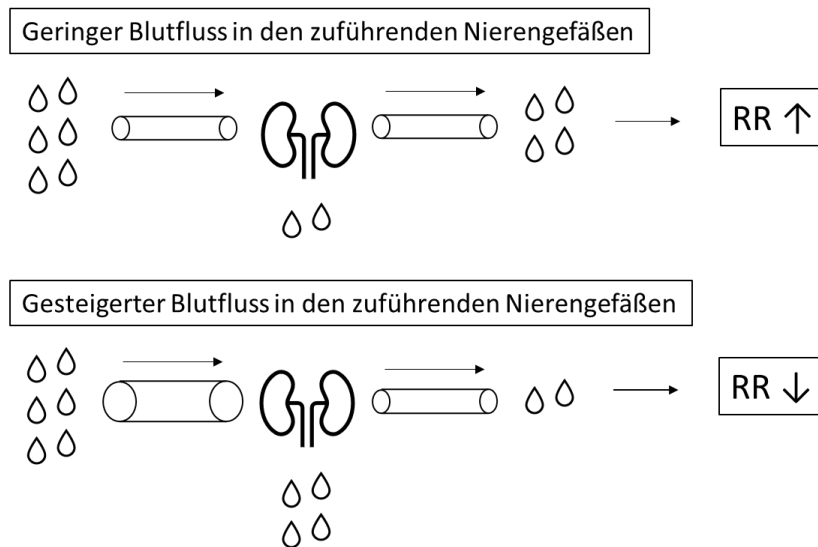


Abbildung 1: Vereinfacht dargestellter Zusammenhang zwischen dem renalen Blutfluss und dem systemischen Blutdruck

Ein großer Durchmesser der zuführenden Nierengefäße (siehe untere Bildhälfte) führt zu einem hohen renalen Blutfluss. Je höher der Blutfluss in den Nieren ist, desto größer ist das glomerulär filtrierte Volumen. Bei unveränderter tubulärer Reabsorption führt dies zu einer vermehrten Ausscheidung von Natrium und Wasser und zu einem verringerten zirkulierenden Blutvolumen im systemischen Kreislauf. Die Folge ist eine Verringerung des Blutdrucks.

1.3 Grundlagen der Mikrozirkulation

1.3.1 Bedeutung des Gefäßdurchmessers für den Gefäßwiderstand

Um die Bedeutung von Veränderungen in der Mikrozirkulation, die auch einigen blutdruckregulierenden Mechanismen der Niere zugrunde liegen, einordnen zu können, müssen zunächst die Grundlagen der Funktion und Regulationsmechanismen der Mikrozirkulation im Allgemeinen näher beleuchtet werden. Als Mikrozirkulation bezeichnet man die Einheit aus Arteriolen, Kapillaren und kleinen Venolen¹⁵. In diesem Abschnitt findet sich der größte Widerstand im Gefäßsystem¹⁶. In Anlehnung an das Hagen-Poiseuillesche Gesetz ergibt sich eine Art Widerstandsgesetz für strömende Flüssigkeiten in einem Gefäßabschnitt auf folgende Weise¹⁵:

$$R = \frac{8 * \eta * l}{r^4 * \pi}$$

R = Gefäßwiderstand

η = Viskosität der Flüssigkeit

l = Länge des Gefäßabschnitts

r = Radius des Gefäßabschnitts

Im Wesentlichen zeigt die Formel, dass der Gefäßwiderstand umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Radius ist und macht deutlich, dass kleine Änderungen des

Gefäßdurchmessers bereits große Auswirkungen auf den Widerstand in einem Gefäßsystem haben ¹⁵.

Blutgefäße sind durch glatte Muskelzellen in ihrer Wand zur aktiven Regulierung ihrer Gefäßweite befähigt. Vor allem kleine Arterien und Arteriolen haben im Verhältnis zu ihrem Durchmesser eine sehr muskelstarke Wand und stellen damit eine wichtige Stellschraube für Veränderungen des Widerstands im Kreislaufsystem dar ¹⁶. Auch in der Niere zeigt sich, dass der Widerstand der afferenten Arteriolen den größten Anteil des gesamten renalen Gefäßwiderstands ausmacht ¹⁷. Der für den Widerstand entscheidende Kontraktionszustand der glatten Gefäßwandmuskulatur hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase und der Phosphorylierungsgrad der leichten Kette des Myosins ¹⁸ (Abbildung 2). Diese Faktoren können durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden ¹⁸. Die Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration erfolgt beispielsweise durch Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum ¹⁹. Dabei vermitteln spannungsabhängige Calciumkanäle in der Zellmembran, vor allem L-Typ-Calciumkanäle, einen wesentlichen Anteil des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum ¹⁹. Die Aktivität dieser Kanäle ändert sich je nach Lage des Membranpotenzials, sodass Depolarisationen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit und damit einem vermehrten Calciumioneneinstrom führen. Auf diese Weise können über Veränderungen des Membranpotenzials der Tonus der glatten Muskulatur und die Gefäßweite beeinflusst werden ²⁰ (Abbildung 2).

1.3.2 Entstehung des Membranpotenzials

Das Membranpotenzial einer Zelle entsteht infolge einer ungleichen Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum ²¹ und den sich daraus ergebenden Ionengradienten ²⁰. Mithilfe der Nernst-Gleichung, die die Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulären Kompartiment berücksichtigt, lässt sich für jede Ionenart das Gleichgewichtspotenzial errechnen ²⁰. Am Gleichgewichtspotenzial sind Diffusions- und elektrische Triebkraft gleich groß, aber entgegengesetzt gerichtet, sodass netto kein Strom durch die Zellmembran fließt ²¹. Beispielsweise ergibt sich bei den üblichen extra- und intrazellulären Konzentrationen für die Kaliumionen ein Gleichgewichtspotenzial von -90 mV ²⁰. Ist das aktuelle Membranpotenzial positiver als das Gleichgewichtspotenzial, strömen Kaliumionen vermehrt

aus der Zelle aus; ist es negativer, überwiegt der Kaliumioneneinstrom²¹. Das aktuelle Membranpotenzial einer Zelle lässt sich anhand der Konzentrationen der wichtigsten Ionenarten und deren relativen Membranpermeabilitäten mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung errechnen²¹:

$$V_m = -61 \text{ mV} * \log \frac{P_{K^+} * [K^+]_i + P_{Na^+} * [Na^+]_i + P_{Cl^-} * [Cl^-]_o}{P_{K^+} * [K^+]_o + P_{Na^+} * [Na^+]_o + P_{Cl^-} * [Cl^-]_i}$$

| | |
|---|-----------------------|
| V_m = aktuelles Membranpotenzial | K^+ = Kaliumionen |
| P = relative Membranpermeabilität | Na^+ = Natriumionen |
| i = intrazelluläre Ionenkonzentration | Cl^- = Chloridionen |
| o = extrazelluläre Ionenkonzentration | |

Da sich die Membranpermeabilität für die einzelnen Ionenarten in unterschiedlichen Zelltypen unterscheidet, sind auch deren Membranpotenziale verschieden²¹. Die Permeabilität der Zellmembran ruhender Säugetierzellen ist für Kaliumionen in der Regel viel höher als für andere Ionenarten, weshalb das Ruhemembranpotenzial größtenteils durch die Kaliumpermeabilität bestimmt wird²¹. Durch den zusätzlichen Einfluss der anderen Ionenarten ist das Ruhemembranpotenzial der meisten Zellen aber etwas positiver als das Kaliumgleichgewichtspotenzial²¹. In Gefäßmuskelzellen von Interlobararterien der Ratte zum Beispiel liegt es bei ca. -65 mV²². In der ruhenden Zelle besteht deshalb eine Kraft, die die positiv geladenen Kaliumionen aus der Zelle hinaustreibt. Eine selektive Erhöhung der Permeabilität für Kaliumionen führt folglich zu einem vermehrten Kaliumionenausstrom und damit zu einer Hyperpolarisation, also einer Verschiebung des Membranpotenzials in den negativeren Bereich²⁰. Eine verringerte Kaliumpermeabilität hingegen führt zu einer Depolarisation, also einer Verschiebung des Membranpotenzials in weniger negative Bereiche²⁰ (Abbildung 2). Die dafür notwendigen Ionenströme werden durch kaliumionenselektive Kanäle vermittelt²¹.

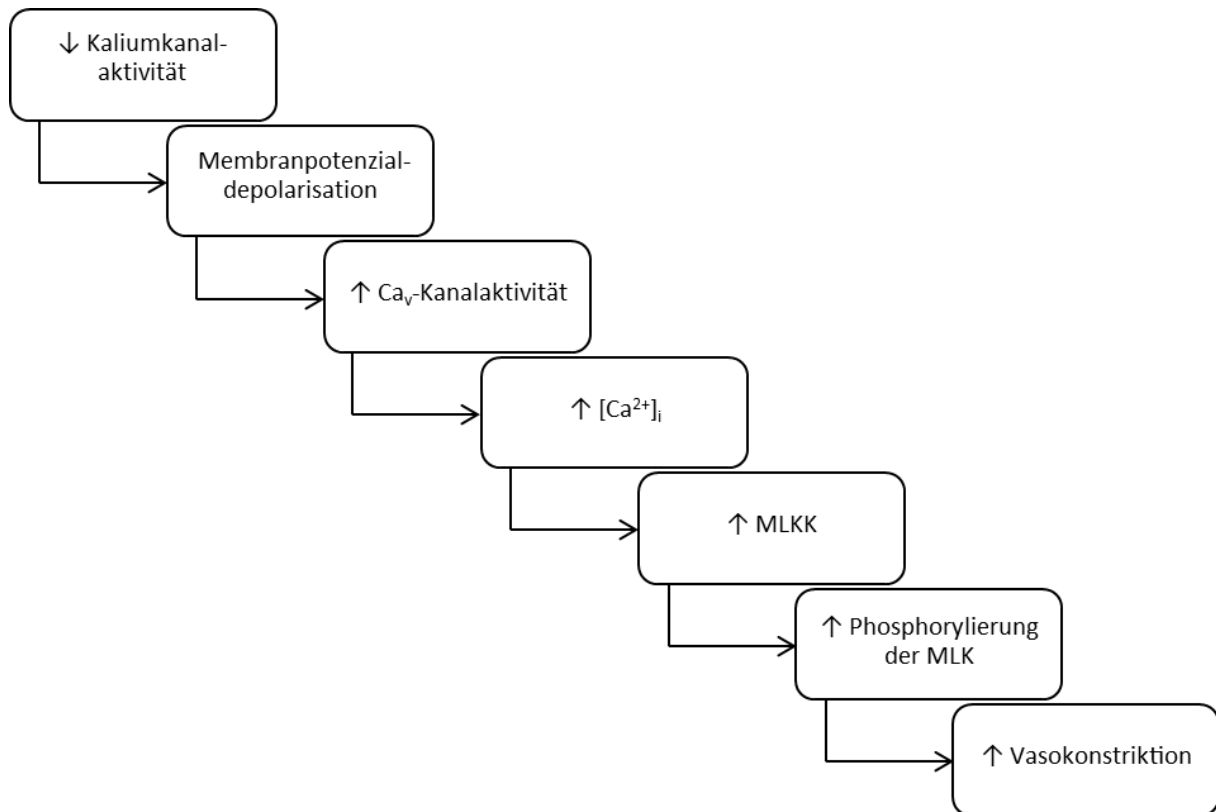


Abbildung 2: Folgen einer verminderten Kaliumkanalaktivität

Da das Membranpotenzial zu einem Großteil von der Membranpermeabilität für Kaliumionen abhängt, hat eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen eine Depolarisation des Membranpotenzials aufgrund der Akkumulation von positiv geladenen Kaliumionen im Zellinneren zur Folge. Infolge dieser Depolarisation wird die Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle (Ca_v) in der Zellmembran erhöht, was zu einem vermehrten Calciumioneneinstrom in die Zelle und damit zu einer erhöhten intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt. Diese wiederum steigert die Aktivität der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLKK), die die leichte Myosinkette (MLK) vermehrt phosphoryliert und damit die Kontraktion der glatten Muskelzelle in der Gefäßwand ermöglicht. Bei gleichzeitigem Durchlaufen dieser Vorgänge in vielen glatten Gefäßmuskelzellen resultiert daraus eine Verengung des Gefäßlumens (Vasokonstriktion) und ein Anstieg des Gefäßwiderstands im Gefäßbett (modifiziert nach Heumann et al. ²²).

1.4 Vaskuläre Kaliumkanäle

Kaliumkanäle stellen die größte Klasse der Ionenkanäle dar ²³ und sind in glatten Gefäßmuskelzellen die vorherrschenden Kationenkanäle ²⁰. Sie bestehen aus membrandurchspannenden Proteinen, welche sich so zusammenlagern, dass sie eine Pore bilden, durch die Kaliumionen passiv vom Intra- in den Extrazellulärraum und umgekehrt fließen können ²⁴. Eine Aminosäuresequenz innerhalb dieser porenbildenden Proteinanteile, welche mit wenigen Ausnahmen allen Kaliumkanalklassen gemein ist, bildet die Grundlage des sogenannten Selektivitätsfilters ²⁴. Dieser gewährleistet, dass die Leitfähigkeit der Kanäle für Kaliumionen höher ist als für andere Kationen ²⁴. Den membrandurchspannenden Segmenten eines Kanals können verschiedene andere Proteine angelagert sein, welche die

Eigenschaften dieses Kanals beeinflussen²³. Auch können die C- und N-Termini der Kanalproteine Ansatzstellen für verschiedene endogene und exogene Kanalmodulatoren darstellen. Für einige Kaliumkanäle ist beispielweise eine Erhöhung ihrer Aktivität durch Phosphorylierung mittels Proteinkinase A (PKA) oder G beschrieben^{20, 25, 26}, während eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die Kaliumkanalaktivität hemmen kann^{20, 27}. Ihrem Aufbau und den Eigenschaften entsprechend werden Kaliumkanäle in vier Klassen eingeteilt: die calciumaktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}), die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v), die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir}), zu denen auch die ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP}) gehören, und die Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P}). In den renalen Blutgefäßen, auf deren Untersuchung in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk gelegt wird, konnten alle genannten Kaliumkanalklassen nachgewiesen werden²⁰. Ihre spezifischen Funktionen und die Signalkaskaden, in die sie in diesem Gefäßbett eingebunden sind, sind Gegenstand aktueller Forschungen, die dazu dienen, die Grundlagen der Gefäßphysiologie näher zu charakterisieren und einen Grundstock für sich anschließende weiterführende und spezifischere Fragestellungen aufzubauen.

1.4.1 K_{Ca} -Kanäle

Die calciumaktivierten Kaliumkanäle sind die am häufigsten vorkommenden Kaliumkanäle in der Zellmembran glatter Gefäßmuskelzellen²⁸. Je nach ihrer Leitfähigkeit werden sie unterteilt in calciumaktivierte Kaliumkanäle mit großer (BK-Kanäle), mittlerer (IK-Kanäle) und geringer Leitfähigkeit (SK-Kanäle)²⁰.

Die Aktivität der BK-Kanäle wird sowohl durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration als auch durch eine Membranpotenzialdepolarisation verstärkt²⁹. Ebenso beeinflusst der intrazelluläre pH-Wert die Aktivität der BK-Kanäle, indem eine erhöhte Protonenanzahl zu einer verminderten Aktivität der Kanäle führt³⁰. Durch alternatives Spleißen und unterschiedliche Kombinationen ihrer Untereinheiten können sich die BK-Kanäle je nach Gewebe in ihrer Funktion und Regulation unterscheiden³¹.

Im Gegensatz zu den BK-Kanälen sind IK- und SK-Kanäle weder spannungsabhängig noch besitzen sie einen intrinsischen Calciumsensor. Aufgrund einer Interaktion mit Calmodulin wird ihre Aktivität aber dennoch von der intrazellulären Calciumionenkonzentration bestimmt²⁹. Vaskuläre IK- und SK-Kanäle wurden sowohl in den glatten Gefäßmuskelzellen als

auch in den Endothelzellen nachgewiesen³², wo sie als Bestandteil des „Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF)“ zu Endothel-vermittelten Vasodilatationen beitragen^{33, 34}.

1.4.2 K_v-Kanäle

K_v-Kanäle bestehen aus einem Komplex zusammengelagerter porenbildender Untereinheiten, bei denen jeweils eine der Transmembrandomänen einen Spannungssensor enthält²⁸. Aufgrund dieses Spannungssensors führen Veränderungen im Membranpotenzial zu Konformationsänderungen des Kanals, sodass Depolarisationen eine verstärkte und Hyperpolarisationen eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit der K_v-Kanäle bewirken²⁸. In den letzten Jahren wurde eine große Vielfalt spannungsabhängiger Kaliumkanäle beschrieben, die auf eine Vielzahl von kodierenden Genen, unterschiedliche Kombinationen der beteiligten Untereinheiten, sowie alternatives Spleißen, posttranslationale Modifikationen und verschiedene angelagerte Proteine zurückzuführen ist²⁸. In den renalen Blutgefäßen werden vor allem die Kanalunterklassen K_v1, K_v2 und K_v7 als bedeutsam für die Tonusregulation angesehen³⁵. Den K_v-Kanälen wird vor allem eine Art Pufferfunktion zugeschrieben: Depolarisationen der Zellmembran werden durch sie abgefangen und damit eine höhere Stabilität des Gefäßruhetonus gewährleistet²⁰.

1.4.3 K_{ir}-Kanäle

Die K_{ir}-Kanäle werden in sieben Familien eingeteilt²⁸, wobei Mitglieder der sechsten Familie (K_{ir}6) am Aufbau der ATP-abhängigen Kaliumkanäle beteiligt sind¹⁴. Der Name „einwärts gerichteter Kaliumkanal“ basiert auf der Tatsache, dass die Kanäle bei Membranpotenzialen, die negativer als das Kaliumgleichgewichtspotenzial sind, Kaliumionen in die Zelle einströmen lassen, während der physiologisch nach außen gerichtete Kaliumauswärtsstrom bei positiveren Potenzialen limitiert wird²⁸. Grundlage dafür sind Polyamine und Magnesiumionen, die die Kanalpore bei Depolarisationen zunehmend blockieren²⁸. Bei Werten in der Nähe des üblichen Ruhemembranpotenzials werden die Kanäle jedoch als ausreichend geöffnet beschrieben, um Kaliumionen durch sie hindurch fließen zu lassen²¹. Somit wurde für einige Gefäßbetten eine Beteiligung der K_{ir}-Kanäle am Ruhemembranpotenzial beschrieben²⁸. K_{ir}-Kanäle werden durch eine leichte Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration aktiviert, weshalb sie eine bedeutende Rolle bei der metabolischen Regulation des Blutflusses, zum Beispiel im Rahmen der reaktiven Hyperämie³⁶, und der EDHF-vermittelten Vasodilatation in manchen Gefäßgebieten

spielen³⁴. Weiterhin werden sie durch eine Hyperpolarisation aktiviert²⁸. Da ihre Aktivierung selbst zu einer Hyperpolarisation führt, können über diese Kanäle induzierte Erhöhungen des Membranpotenzials verstärkt werden²⁸.

1.4.4 K_{ATP} -Kanäle

Die K_{ATP} -Kanäle setzen sich aus Mitgliedern der K_{ir6} -Familie und aus Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) zusammen. Je vier K_{ir6} -Untereinheiten bilden die Kanalpore und je vier SUR-Untereinheiten übernehmen regulatorische Funktionen²⁸. Für die vaskulären K_{ATP} -Kanäle wird die $K_{ir6.1}/SUR2B$ -Isoform als die am häufigsten vorkommende beschrieben^{37,38}. Die K_{ATP} -Kanäle werden über das Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat (ATP/ADP)-Verhältnis einer Zelle reguliert. Durch Interaktion von Magnesiumionen-bindendem ADP und den SUR-Untereinheiten wird der Kanal aktiviert, über eine Interaktion zwischen ATP und den K_{ir} -Kanaluntereinheiten hingegen gehemmt³⁹. Auf diese Weise sind sie ein Bindeglied zwischen dem metabolischen Status und der Gefäßweite in einem Gewebegebiet²⁰. Ob K_{ATP} -Kanäle einen Beitrag zum Gefäßruhetonus leisten, wird für verschiedene Gefäßbetten unterschiedlich diskutiert¹⁶.

1.4.5 K_{2P} -Kanäle

Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber chemischen Faktoren wie mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Sauerstoff (O_2) und dem pH-Wert wird den K_{2P} -Kanälen eine Bedeutung für die Tonusregulation von Widerstandsgefäßen des Herzkreislaufsystems zugesprochen⁴⁰. Auch in den Blutgefäßen der Niere wurden die K_{2P} -Kanäle nachgewiesen²⁰. Im Gegensatz zu den anderen Kaliumkanalklassen sind für die K_{2P} -Kanäle jedoch nur wenige und keine die gesamte Klasse blockierenden Kanalinhhibitoren bekannt. Sie sind somit nicht auf gleiche Weise wie die anderen Kaliumkanäle zu untersuchen und deshalb nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.5 Gefäßtonusänderungen durch vasokonstriktorische und -dilatatorische Stimuli

1.5.1 Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion

Wie oben bereits beschrieben, ist der Gefäßtonus eine bedeutsame Determinante für den Blutdruck¹⁶. Die dabei entscheidende Aktivität der glatten Gefäßmuskelzellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener vasokonstriktorischer und -dilatatorischer Stimuli beeinflusst¹⁶. So ergeben sich Gefäßtonusänderungen unter anderem durch die Freisetzung

von Noradrenalin nach Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Noradrenalin gehört zur Gruppe der Katecholamine und kann sowohl an α - als auch an β -adrenerge Rezeptoren binden. Über die Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren führt Noradrenalin zu einer Vasodilatation⁴¹, die Bindung an α -adrenerge Rezeptoren hingegen zieht eine Vasokonstriktion nach sich⁴²⁻⁴⁴. Im renalen Gefäßbett werden die β -Rezeptoren nur geringfügig exprimiert⁴², für α_1 -Rezeptoren aber wurde eine starke Expression⁴² und eine deutliche Beteiligung an der Noradrenalinantwort gezeigt^{43,44}. Die Bindung an α_1 -Rezeptoren führt zu einer Aktivierung von G_q -Proteinen und einer vermehrten Aktivität der Phospholipase C, welche in der Zellmembran befindliches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin spaltet^{45,46}. Das Diacylglycerin aktiviert daraufhin die PKC⁴⁶, was schlussendlich zu einer Vasokonstriktion führt⁴⁷. Ein Mechanismus solch prokontraktiler Wirkung der PKC ist beispielsweise die Phosphorylierung des in glatten Gefäßmuskelzellen vorliegenden Peptids CPI-17, welches in phosphorylierter Form die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase hemmt⁴⁸. In Kapitel 1.4 wird jedoch auch beschrieben, dass die Aktivität einiger Kaliumkanalklassen durch Phosphorylierung mittels PKC gehemmt wird^{20,27}. Es ist somit denkbar, dass Noradrenalin über die PKC auch zu einer Inhibition von Kaliumkanälen führt, darüber eine Depolarisation bewirkt und so eine Vasokonstriktion auslöst. In glatten Muskelzellen des Vas deferens des Meerschweinchens konnten Wakui et alii (et al.) nach Noradrenalinapplikation tatsächlich eine Verringerung der Membranleitfähigkeit für Kaliumionen aufzeigen⁴⁹. Diese Beobachtung deutet auf eine Inhibition von Kaliumkanälen als Teil der Noradrenalin-Signaltransduktionsmechanismen hin. Der Frage, inwiefern diese These auch auf das renale Gefäßbett der Ratte und des Menschen zutrifft, wird in der vorliegenden Arbeit weiter nachgegangen.

1.5.2 cAMP-vermittelte Vasodilatation

Neben den angesprochenen Vasokonstriktionen sind auch Vasodilatationen wichtige Änderungen im Tonus der Gefäße. Eine verminderte Fähigkeit zur Vasodilatation stellt zum Beispiel die Ursache einiger Hypertonieformen dar^{50,51}. Bei der Vermittlung von Vasodilatationen ist das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) ein wichtiger sogenannter „second messenger“. Eine Erhöhung des cAMPs durch Aktivierung der Adenylatcyclase ist beispielweise Teil des gefäßerweiternden Mechanismus verschiedener endogener Substanzen wie dem „Calcitonin Gene-Related Peptide“, Adrenalin und Adenosin⁵². Da cAMP unter

anderem die PKA aktiviert^{46,53} und beschrieben ist, dass die Aktivität einiger Kaliumkanäle durch Phosphorylierung mittels PKA gesteigert werden kann^{25,52,54}, ist eine Einbindung der Kaliumkanäle in die cAMP-abhängige Vasodilatation renaler Widerstandsgefäße vorstellbar und Gegenstand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Das Prostacyclinanalogon Iloprost ist ein Medikamentenwirkstoff, der aufgrund seiner gefäßerweiternden Wirkung am Patienten eingesetzt wird. Unter anderem wird er genutzt, um den renalen Blutfluss zu erhöhen⁵⁵. Damit soll unerwünschten Konstriktionen der Nierenarterien, wie sie beispielsweise bei Bypass-Operationen^{56,57} oder nach Kontrastmittelgabe im Rahmen einer Angiographie⁵⁸ auftreten können, entgegengewirkt werden. An isolierten Gefäßmuskeln präglomerulärer Arteriolen der Ratte zeigten Purdy et al., dass Iloprost über die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA einer Angiotensin II-Antwort entgegenwirkte⁵⁹. Dies geschah sowohl über eine direkte Inhibition der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern als auch über eine indirekte Inhibition der Calciummobilisation⁵⁹. Als Ursache für diese verminderte indirekte Calciummobilisation könnte eine PKA-abhängige Aktivierung von Kaliumkanälen mit nachfolgender Hyperpolarisation der Zellmembran und verminderter Aktivität spannungsabhängiger Calciumkanäle in Betracht gezogen werden. In den Schwanzarterien der Ratte ist bereits eine Beteiligung der K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle an der Iloprostwirkung beschrieben⁶⁰. Inwiefern dies auch für einzelne Kaliumkanalklassen im renalen Gefäßbett zutrifft, wird in dieser Arbeit untersucht.

1.6 Bedeutung der sympathischen Innervation der Niere für den Bluthochdruck und renale Denervierung als Behandlungsoption

Wie Arthur Guyton vor rund 50 Jahren postulierte, spielt die Niere eine Schlüsselrolle bei der langfristigen Blutdruckregulation^{12,13,61}. Er ging davon aus, dass die langfristige Einstellung des Blutdrucks allein auf der Kontrolle der extrazellulären Flüssigkeit mittels Druck-Natriuresis basiert und sich ein Bluthochdruck nur einstellt, wenn diese Fähigkeit der renalen Ausscheidung gestört ist¹². Viele weitere, modernere Studien bestätigen, dass der renalen Ausscheidungsfunktion eine entscheidende Rolle zufällt^{13,61}. Doch entgegen Guytons Hypothese wird die Ausscheidung von Natrium und Wasser parallel durch verschiedene Systeme kontrolliert und nicht allein durch druckabhängige Effekte¹³. Vorrangig volumenabhängige neurohumorale Mechanismen werden in diesem Zusammenhang

betont¹³. Außerdem zeigen weitere molekulare Studien, dass auch primäre Defekte in der Gefäßfunktion zu langfristigen Veränderungen des Blutdrucks führen können, teilweise auch ohne dabei die Ausscheidung der Niere zu beeinflussen^{13, 61}.

Einer der Mechanismen, die den Blutdruck beeinflussen, ist das sympathische Nervensystem^{61, 62}. Die efferenten Fasern des sympathischen Nervensystems laufen entlang der Nierenarterien und haben direkten Kontakt zu den Nierentubuli, den juxtaglomerulären Zellen und der Gefäßmuskulatur¹⁷. Eine Sympathikusaktivierung steigert somit die renale Natrium- und Wasserreabsorption, stimuliert die Reninfreisetzung und erhöht den renalen Gefäßwiderstand¹⁷ (Abbildung 3). Die Erhöhung des renalen Gefäßwiderstands wiederum kann zur Abnahme des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate führen¹⁷ (Abbildung 3). Diese Effekte der renalen sympathischen Innervation bewirken durch Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens und des peripheren Gefäßwiderstands eine Steigerung des arteriellen Blutdrucks (Abbildung 3).

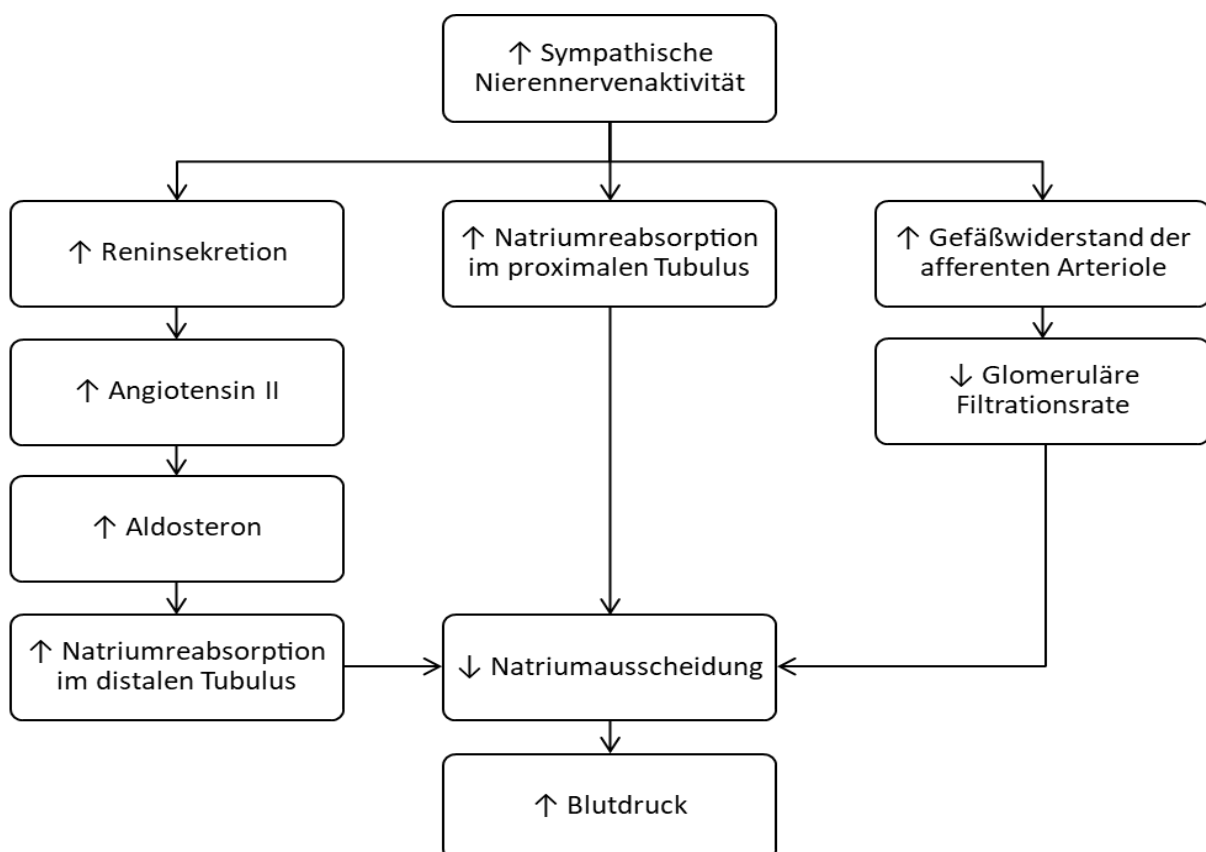


Abbildung 3: Beeinflussung der Nierenfunktion durch das sympathische Nervensystem

Eine Erhöhung der Aktivität der sympathischen Fasern entlang der Nierenarterien führt zu einer erhöhten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, einer erhöhten Natriumreabsorption und führt über einen erhöhten Gefäßwiderstand der Nierengefäße zu einer verminderten glomerulären Filtrationsrate. Diese Mechanismen wirken allesamt hemmend auf die Natrium- und Wasserausscheidung und bewirken somit eine Erhöhung des Blutdrucks (modifiziert nach Laffin et al.⁶³).

Weitere Studien zeigen, dass auch die afferenten Nervenfasern, die entlang der Nierenarterien ziehen, eine Rolle bei der Blutdruckregulation spielen, in dem sie mit mechano- und chemosensitiven Rezeptoren in der Niere verbunden sind und zu den Hirnnervenkernen des autonomen Nervensystems ziehen, die für die Blutdruckregulation zuständig sind ⁶⁴.

Die oben dargestellten Mechanismen sind wichtig, um auf physiologische Weise den Blutdruck zu regulieren, im pathologischen Zustand können sie jedoch zu einer Hypertonie führen oder diese unterhalten ^{17, 62}. In der Tat ist bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie die Aktivität des sympathischen Nervensystems einschließlich der sympathischen Nierennervenaktivität häufig erhöht ^{17, 65, 66}. Tierexperimentell wurde wiederholt gezeigt, dass renale Denervierung die Entwicklung einiger Hypertonieformen abschwächen oder sogar unterbinden kann ^{17, 65}. Dabei konnten positive Ergebnisse sowohl in diversen Spezies als auch bei Bluthochdruck, der auf unterschiedliche Weise (zum Beispiel durch Nierenarterienstenose, Salzfütterung, et cetera) entstanden ist, verzeichnet werden ¹⁷. Die Überaktivität des sympathischen Nervensystems scheint folglich eine gemeinsame Teilstrecke in der Pathogenese verschiedener Hypertoniearten zu sein ^{17, 63}. Basierend auf diesen Überlegungen wurde vor über zehn Jahren die lokale renale Denervierung als Behandlungsstrategie bei Patienten mit therapieresistentem Bluthochdruck eingeführt ⁶, um gezielt den sympathischen Einfluss auf die Niere auszuschalten. In den ersten Jahren nach Einführung der Methode konnten in einigen Studien deutliche Blutdrucksenkungen in Patienten nach lokaler renaler Denervierung nachgewiesen werden, die über mindestens drei Jahre konstant gehalten wurden ^{6, 8, 67}. Auch die Noradrenalinausschüttung renaler Nervenfasern als Maß für die sympathische Aktivität konnte um durchschnittlich 46 % gesenkt werden ⁷. Eine große scheinkontrollierte Studie aus dem Jahr 2014 (SYMPPLICITY HTN-3) hingegen beobachtete keinen signifikanten Unterschied zwischen den Blutdrucksenkungen in der behandelten Gruppe und den Ergebnissen einer scheinbehandelten Gruppe ^{9, 10}. Bis zum Vorliegen weiterer Evidenz bezüglich der Wirksamkeit und Sicherheit der Methode zieht die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) ihre Empfehlung der Hypertoniebehandlung mittels renaler Denervierung in den 2018 erschienen Leitlinien zum Management der arteriellen Hypertonie zurück ¹. Aktuelle Forschungsarbeiten untersuchen nun, wie es zu diesen kontroversen Studienergebnissen kam und wie die invasive Methode zur Blutdrucksenkung letztendlich zu bewerten ist. Zurzeit wird beispielsweise diskutiert, ob es konzeptionelle Störfaktoren gab (anderes Patienten Klientel, Unterschiede im Medikamenteneinnahmeverhalten zwischen der

scheinbehandelten und der denervierten Patientengruppe, fehlende Erfahrung der durchführenden Ärzte) und ob die damals angewandte Operationsmethode ungeeignet war, um ausreichend Nervenfasern entlang der Nierenarterie zu zerstören^{10, 63, 68}. Neben diesen klinischen Überlegungen bedarf es außerdem weiterer Grundlagenforschung, um die neuralen Mechanismen, die an der Niere wirken und hierüber langfristig den Blutdruck regulieren, weiter zu beleuchten und eventuelle unerwünschte Nebeneffekte und Langzeitfolgen der sympathischen Denervierung zu klären⁶⁵.

1.7 Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße

Die Eigenschaften der Blutgefäße werden maßgeblich vom Phänotyp der jeweiligen Gefäßmuskelzellen bestimmt, die sich in ihren Kontraktionsmustern und Antwortverhalten auf äußere Stimuli unterscheiden^{18, 69}. Das sympathische Nervensystem trägt zur Entwicklung und Erhaltung des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen bei^{70, 71}. Dementsprechend zeigen Gefäße, die nicht mehr unter sympathischem Einfluss stehen, aufgrund einer modifizierten Gefäßmuskelzellfunktion veränderte Eigenschaften. Für intrarenale Arterien der Ratte konnte beispielsweise gezeigt werden, dass generalisierte sympathische Denervierung (neonatale Sympathektomie) aufgrund eines depolarisierten Membranpotenzials zu einer erleichterten L-Typ-Calciumkanalaktivierbarkeit der Gefäßmuskelzellen führte²². Die sympathische Innervation scheint folglich chronisch hyperpolarisierende Ströme in glatten Gefäßmuskelzellen zu unterstützen²². Unklar ist jedoch, welche Mechanismen der Membranpotenzialdepolarisation nach sympathischer Denervierung zugrunde liegen. In Anbetracht des großen Einflusses der Kaliumkanalleitfähigkeit auf das Membranpotenzial⁴⁶ sollte eine verringerte Membranpermeabilität für Kaliumionen als Ursache der Depolarisation in Betracht gezogen und eine potenziell veränderte Kaliumkanalaktivität berücksichtigt werden. Heumann et al. zeigten, dass sich die erhöhte L-Typ-Calciumkanalaktivierbarkeit in Gefäßen sympathektomierter Ratten durch die Gabe des K_{ATP} -Kanalaktivators Levromakalim vollständig aufheben ließ²². Basierend auf diesem Forschungsergebnis ist weiterführend zu untersuchen, ob sich der Wegfall der sympathischen Innervation auf die Expression oder Funktion der K_{ATP} -Kanäle auswirkte oder ob das Fehlen der erhöhten Calciumkanalaktivierbarkeit nach Levromakalimgabe nur auf die Hyperpolarisation zurückzuführen ist, die auf die Aktivierung eines Kaliumkanals folgt.

Neben der erleichterten L-Typ-Calciumkanalaktivierbarkeit ist für denervierte Gefäße weiterhin eine vermehrte Sensitivität gegenüber verschiedenen vasokonstriktorischem Stimuli, darunter auch Noradrenalin, nachgewiesen^{22, 72-74}. In Gefäßen sympathektomierter Ratten konnten Heumann et al. zusätzlich zeigen, dass der Einsatz des Calciumkanalblockers Nifedipin zu einer größeren Abnahme der Noradrenalinempfindlichkeit führte als in Gefäßen scheinsympathektomierter Kontrollen²². Unter diesen Bedingungen der Calciumkanalblockade war auch die erhöhte Noradrenalinempfindlichkeit der sympathektomierten Ratten nicht länger zu beobachten²². Dies legt nahe, dass die Noradrenalinhypersensitivität nach Sympathektomie auf eine vermehrte Beteiligung Nifedipin-sensitiver Calciumkanäle zurückzuführen ist²². Zwischen den beiden Rattengruppen wurde jedoch kein Unterschied im Gehalt der „messenger“ Ribonukleinsäure (mRNA) oder der Proteinmenge der porenbildenden α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals $Ca_v1.2$ nachgewiesen²². Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese weiterverfolgt, dass die Grundlage der Noradrenalinhypersensitivität nach Sympathektomie nicht in Veränderungen der Calciumkanäle liegt, sondern durch die oben bereits erwähnte Depolarisation der Gefäßmuskelzellen der sympathektomierten Ratten vermittelt wird. In diesem Fall käme es indirekt zu einer vermehrten Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle, die wiederum eine erleichterte Noradrenalinantwort nach sich zöge.

Die Arbeiten von Heumann et al.²² beziehen sich ausschließlich auf neonatal sympathektomierte Ratten und ihre Kontrollen. Diese Sympathektomiemethode unterscheidet sich in mehreren Punkten von der am Patienten durchgeführten lokalen renalen Denervierung: Bei der gewählten systemischen Sympathektomie mittels Guanethidingabe und chirurgischer Entfernung des Nebennierenmarks werden lediglich die efferenten sympathischen Zuflüsse ausgeschaltet⁷⁵, die afferenten Nervenbahnen bleiben bestehen. Bei der lokalen renalen Denervierung hingegen werden alle Nervenfasern entlang der Nierenarterien ablädiert und damit sowohl die afferente Versorgung als auch die efferenten Bahnen unterbrochen. Weiterhin sind bei der totalen Sympathektomie verringerte Plasmakatecholaminkonzentrationen zu messen, während dies bei der lokalen renalen Denervierung nicht der Fall ist⁷⁶. Aus diesen Gründen ist zunächst zu untersuchen, ob die lokale renale Denervierung die gleichen Veränderungen an den renalen Gefäßen bewirkt wie die systemische Sympathektomie. Ist dies der Fall, schließt sich die Frage an, ob diese

Veränderungen an den Nierenarterien dem blutdrucksenkenden Effekt der sympathischen Denervierung entgegenwirken und damit eine langfristige Blutdrucksenkung nach renaler Denervierung verhindern.

1.8 Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen

Viele vergangene und gegenwärtige Studien zum Thema der Blutdruckregulation basieren auf Ergebnissen, die an Versuchstieren gewonnen wurden und erlauben deshalb nur bedingt Rückschlüsse auf die Vorgänge im menschlichen Körper. Vor allem die Ratte und die Maus haben sich als Modellorganismen bewährt⁷⁷. Nicht für alle Ergebnisse ist jedoch geklärt, ob die Übertragbarkeit der durch Tierexperimente gewonnenen Daten auf den Menschen tatsächlich gegeben ist, weshalb es vergleichender Untersuchungen an menschlichem Gewebe bedarf, um eben diese Übertragbarkeit zu verifizieren.

1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

Basierend auf den oben genannten Studien und daraus weiterführenden Fragen, ergaben sich folgende Aufgaben für die vorliegende Arbeit:

Erstens wurde mithilfe pharmakologischer Kaliumkanalblocker und -aktivatoren getestet, welchen Beitrag Kaliumkanäle der Klassen K_{Ca} , K_v , K_{ir} und K_{ATP} zum Ruhetonus sowie zur Agonist-induzierten Konstriktion und Dilatation intrarenaler Arterien der Ratte leisten.

Zweitens wurde getestet, ob die Noradrenalinüberempfindlichkeit, die für Gefäße systemisch sympathektomierter Ratten beschrieben ist, auch in renalen Widerstandsgefäßen lokal denervierter Ratten nachgewiesen werden kann und ob eine partielle Depolarisation des Membranpotenzials der Gefäßmuskelzellen zu dieser Noradrenalinüberempfindlichkeit beiträgt. Weiterhin wurde untersucht, ob sich infolge der sympathischen Denervierung der Beitrag von K_{ATP} -Kanälen zur Tonusregulation der renalen Widerstandsgefäße verändert.

Drittens wurde das Vorhandensein von K_{ATP} -Kanälen in menschlichen intrarenalen Arterien untersucht und zur Überprüfung der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Daten auch in menschlichen Gefäßen getestet, welchen Beitrag spezifische Kaliumkanalklassen zum Ruhetonus sowie zur Agonist-induzierten Vasokonstriktion und -dilatation leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Materialien für die Tierhaltung

| Material | Bezugsquelle |
|---------------|--|
| Wistar Ratten | Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich |
| Wistar Ratten | Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland |
| Pelletfutter | ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland |
| Tierkäfige | EHRET Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen, Deutschland |
| Einstreu | ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland |

Tabelle 2: Verwendete Pharmaka in der Myographie

| Substanzname | Bezugsquelle |
|---|---|
| 1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazol (TRAM-34) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| 10,10-bis(4-pyridinyl-methyl)-9(10H)-anthracenone (XE991) | Tocris, Wiesbaden, Deutschland |
| 4-Aminopyridin | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Apamin | Tocris, Wiesbaden, Deutschland |
| Bariumchlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ * 2H ₂ O) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| D-(+)-Glucose | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid ≥ 99,5 % (DMSO) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol Rotipuran ≥ 99,8 % | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Forskolin | Tocris, Wiesbaden, Deutschland |
| Glibenclamid | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Guanethidin Monosulfat | Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland |
| Iberiotoxin | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Ilomedin (Wirkstoff: Iloprost) | Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Levcromakalim | Tocris, Wiesbaden, Deutschland |
| L-Norepinephrine hydrogen L-tartrate monohydrate | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

| Substanzname | Bezugsquelle |
|---|---|
| L-Phenylephrin Hydrochlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| S-(-)-BayK8644 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Salzsäure rauchend, 37 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Tetraethylammonium | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |

Verwendete Pufferlösungen

Sowohl die Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung (KRB-Lösung) als auch die kaliumreiche Pufferlösung (K125) wurden an dem jeweiligen Versuchstag frisch angesetzt und auf einen pH-Wert von 7,44 eingestellt. Während der Myographieexperimente wurden sie dauerhaft auf 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) erwärmt, um mögliche durch Temperaturschwankungen bedingte Artefakte zu minimieren. Die Zusammensetzung der beiden Lösungen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung und der kaliumreichen Pufferlösung

| | Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung (KRB); Konzentration [mmol/L] | Kaliumreiche Pufferlösung (K125); Konzentration [mmol/L] |
|---|--|---|
| NaCl | 118,5 | 0 |
| KCl | 4,7 | 125 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,2 | 1,2 |
| KH_2PO_4 | 1,2 | 1,2 |
| $\text{NaHCO}_3^{\#}$ | 25 | 25 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,5 | 2,5 |
| Glucose | 5,6 | 5,6 |

Die Stammlösung wurde vor Verwendung eine Stunde lang mit Carbogen begast.

Noradrenalin, Iloprost, Iberiotoxin, Apamin, Bariumchlorid, 4-Aminopyridin und XE991 wurden in 0,9 %iger Natriumchloridlösung gelöst, Forskolin, Levromakalim, Glibenclamid und TRAM-34 in DMSO. Für eine Badkonzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ lag S-(-)-BayK8644 in DMSO gelöst vor, die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten in 0,9 %iger Natriumchloridlösung.

Tabelle 4: Materialien für die Expressionsanalysen

| Substanzname | Bezugsquelle |
|---|--|
| 50x Tris/Acetic Acid/EDTA Puffer | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Direct-zol™ RNA MicroPrep | Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland |
| DNase aus RNAqueous™-Micro Kit | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| peqGOLD TriFast™ | peqlab VWR Company, Erlangen, Deutschland |
| Primer Haushaltsgene (Ratte: YWHAZ, PBGD) | TIB Molbiol, Berlin, Deutschland |
| Primer K _{ATP} -Kanäle (human: K _{ir} 6.2, SUR1, SUR2A, SUR2B, Ratte: K _{ir} 6.1, K _{ir} 6.2, SUR1, SUR2) | Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| RNase-Inhibitor | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Roti®-GelStain | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| SeaKem LE agarose | FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA |
| Ribonukleinsäure linkes Herzohr, Mensch | Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland |

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Geräte

| Material / Gerät | Bezugsquelle |
|---|---|
| Carbogen 5 % Kohlenstoffdioxid (CO ₂) in O ₂ | AIR LIQUIDE, Düsseldorf, Deutschland |
| ChemiDoc XRS+ Imaging Systems | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| chirurgische Scheren | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Diethylether | Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland |
| DS-11 Spectrophotometer | DeNovix, Wilmington, Delaware, USA |
| Ein-Kanal-Drahtmyograph, Confocal Wire Myograph System, Model 120CW | Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark |
| Gelelektrophorese-Apparatur | MBT Brand, Gießen, Deutschland |
| Kaltlichtlampe KL 1500 mit Schwanenhals | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Magnetrührer: Heidolph MR 3001 und Heidolph MR 1000 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Minizentrifuge: Fuge-Vortex 2400 | Biosan, Riga, Lettland |
| PCR Reagiergefäße; 0,2 ml | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| PCR Reagiergefäße; 0,1 ml | Qiagen, Hilden, Deutschland |

| Material / Gerät | Bezugsquelle |
|---|--|
| pH-Meter PB-11 | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Pinzetten | Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Research, Wesseling-Berzdorf, Deutschland und Brand, Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen, unterschiedliche Größen | gestopfte Spitzen von SurPhob von Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland; nichtgestopfte Spitzen von Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| PowerLab 26T | ADInstruments, Oxford, Großbritannien |
| Reagiergefäße; 1,5 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Rotor-Disc 100 | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Rotor-Gene Q | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Stereomikroskop, LEICA MZ6 | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| SureCycler 8800 Thermal Cycler | Integrated Sciences, Willoughby, Australia |
| Vortexer Heidolph Reax 2000 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Waage MC1, Laboratory LC 220 S | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Wägebapier | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| Zentrifuge: Heraeus™ Pico™ 21 Centrifuge | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Zwei-Kanal-Drahtmyograph, Myograph Model 410A | Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark |

Tabelle 6: **Verwendete Programme**

| Programm | Bezugsquelle |
|---|---|
| Citavi 6.8.0.0 | Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz |
| GraphPad Prism 9.2.0 | GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA |
| LabChart 8, LabChart Reader 8.1.18 | ADInstruments, Oxford, Großbritannien |
| Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (Version 2111 Build 16.0.14701.20240) | Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA |
| Microsoft® Word® für Microsoft 365 MSO (Version 2111 Build 16.0.14701.20240) | Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA |
| Quantity One | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Rotor Gene Q Series Software | Qiagen, Hilden, Deutschland |

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierversuche in der vorliegenden Arbeit wurden an männlichen Wistar Ratten vorgenommen. Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Vorgaben des Tierschutzgesetzes nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern durchgeführt. Für Organentnahmen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kaliumkanalklassen auf den Tonus renaler Gefäße unbehandelter Ratten wurden Tiere von Charles River Laboratories verwendet, deren Alter 10 – 18 Wochen (meist 13 – 15 Wochen) betrug. Für die Versuche an sympathektomierten und lokal denervierten Tieren sowie den entsprechenden Kontrollen wurden Zuchttiere von Janvier Labs bezogen und deren hausintern gezüchteten Nachkommen für die Experimente verwendet. Die Tiere waren in der Tierhaltung des Instituts für Physiologie der Universitätsmedizin Greifswald untergebracht. Sie wurden in Makrolonkäfigen gehalten und hatten stets freien Zugang zu frischem Trinkwasser sowie zu Futter in Pelletform. Die Temperatur in den Tierräumen betrug 22 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 60 %. Ein Hell-/ Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden pro Phase wurde über eine Zeitschaltanlage geregelt.

2.2.2 Sympathektomie der Ratten

Männliche Nachkommen aus der ersten Generation der Tiere von Janvier Labs wurden einer chemischen und chirurgischen Sympathektomie unterzogen. Dafür wurden den Jungtieren vom 5. bis zum 28. postnatalen Tag täglich 50 µg Guanethidinmonosulfat pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Am postnatalen Tag 29 erfolgte die bilaterale Entfernung des Nebennierenmarks durch einen operativen Eingriff in Äthernästhesie. Anstatt des Guanethidinmonosulfats wurde den Kontrolltieren täglich eine Kochsalzlösung injiziert. Am 29. postnatalen Tag erhielten sie eine Scheinoperation, in der die Nebenniere zwar dargestellt, das Mark allerdings in ihr belassen wurde. Die Organentnahmen für die anschließenden Experimente erfolgten im Alter von 10 – 14 Wochen (siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.3 Lokale renale Denervierung der Ratten

Für die Versuche zur lokalen Denervierung wurde ebenfalls mit männlichen Nachkommen aus der ersten Generation der Janvier Labs Ratten gearbeitet. Im Alter von 8 Wochen wurden über einen mittleren Bauchschnitt die Nierenarterien freigelegt und die dort entlanglaufenden

Nerven durchtrennt. Anschließend wurden die Gefäße mit einer Lösung aus 10 % Phenol in Ethanol bestrichen, um auch kleine bisher undurchtrennte Nervenstränge zu zerstören. Danach wurde die Wunde schichtweise vernäht. Die Operation der Kontrolltiere erfolgte bis zur Darstellung der Nierenarterien auf gleiche Weise. In diesem Fall blieben die Nervenbündel intakt und die Tiere wurden wieder zugenäht. 10 – 12 Wochen nach der Geburt erfolgten auch bei diesen Tieren die Organentnahmen (siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.4 Entnahme der Rattennieren

Für die Entnahme der Nieren für die Myographieexperimente und zur Isolation der mRNA wurden die Tiere narkotisiert. Über einen Medianschnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Nieren freigelegt und von den zu- und abführenden Strukturen getrennt. Anschließend konnten die Nieren aus dem umliegenden Bindegewebe geschnitten und in ein Gefäß mit gekühlter KRB-Lösung gegeben werden. Die Ratten starben bei dieser Prozedur aufgrund des großen Blutverlusts beim Durchtrennen der Nierengefäße an Verblutung in tiefer Narkose.

2.2.5 Humanes Gewebe

Aus Resektatmaterial von Nephrektomien und Nierenteilresektionen, die durch die Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt wurden, wurde humanes tumorfreies Gewebe für die Experimente dieser Arbeit bereitgestellt. Der Grund für die Nierenoperation war häufig ein renaler Tumor. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Greifswald (Aktenzeichen BB 138/15) sowie Einverständniserklärungen der Patienten zur Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke lagen vor. Es wurden Gefäße von sechs Patienten und zwei Patientinnen untersucht. Ihr Alter lag zwischen 60 und 87 Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung: 71 ± 9 Jahre).

2.2.6 Präparation der Gefäße

Für die Präparation der Rattengefäße wurden die Nieren mittels Longitudinalschnitt in zwei Hälften geteilt und in einer Petrischale ständig von gekühlter KRB-Lösung umspült. Sowohl für die Myographieversuche als auch für die mRNA-Präparation wurden Interlobararterien aufgesucht, die einen mittleren Lumendurchmesser von 150 – 200 μm aufwiesen. Für die Experimente an menschlichen Gefäßen wurden distale Abschnitte der Arteriae (Aa.) arcuatae sowie Aa. interlobulares verwendet, die einen ähnlichen Lumendurchmesser hatten wie die Rattengefäße.

Zur Vorbereitung der Arterien für die Myographie wurde jeweils durch das Lumen eines ca. 2 mm langen distalen Gefäßabschnitts ein 40 µm dicker Draht geschoben. Nach Durchtrennung der anhaftenden Strukturen ragte der Draht zu beiden Seiten aus dem Lumen des Gefäßes, sodass dieses aus der Niere entnommen und in einem Gefäß mit KRB-Lösung der Myographie zugeführt werden konnte.

Die Gefäße für die mRNA-Isolation wurden nach ihrer Präparation in einem Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.7 Drahtmyographie

Die Drahtmyographie ist eine Methode, mit deren Hilfe die isometrische Wandspannung isolierter Gefäße in einer Organbadlösung gemessen werden kann. Während der Experimente wurde die Kammer des Myographen dauerhaft auf 37 °C erwärmt, mit KRB-Lösung gefüllt und kontinuierlich mit Carbogen, einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, begast. Die Arterien wurden mittels zweier längs durch ihr Lumen verlaufender Drähte in den Myographen eingespannt, sodass es möglich war, über den Abstand der beiden parallelen Drähte die Weite des Gefäßlumens zu regulieren. Mithilfe einer Mikrometerschraube wurde so in mehreren Schritten der Abstand zwischen den beiden Drähten vergrößert. In den Rattengefäßen wurde anschließend über das Programm LabChart 8 nach jedem dieser Dehnungsschritte die Spannung der Gefäßwand gemessen. Über die so entstandene Ruhedehnungskurve konnte diejenige Wandspannung ermittelt werden, die die Gefäße im entspannten Zustand unter einem mittleren arteriellen Druck von 100 mmHg aufweisen würden. Die Gefäße wurden auf 90 % dieser ermittelten Spannung vorgedehnt, sodass zum einen eine gewisse Vorspannung anlag, aus der heraus sie in den Versuchen optimal kontrahieren konnten und zum anderen die Kräfte der Gefäße untereinander besser vergleichbar waren⁷⁸. Die gemessene Kraft wurde zunächst in Millinewton (mN) angegeben. Um sie unabhängig von der Segmentlänge des eingesetzten Gefäßes beurteilen zu können und darüber weiter eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurde über die Division der Kraft durch die jeweilige Gefäßlänge die Wandspannung mit der Einheit mN/mm berechnet.

Im Anschluss an die Vordehnung der Gefäßsegmente wurde die KRB-Lösung kurzzeitig gegen eine Pufferlösung mit einer Kaliumkonzentration von 125 mmol/L (K125) ausgetauscht. Dieser Schritt führte an einem lebenden Gefäß immer zu einer starken Kontraktion, sodass er

einerseits als Vitalitätsnachweis, andererseits als Referenz für alle nachfolgenden an diesem Gefäß durchgeführten Experimente diente. So sind die Angaben zur aktiven Wandspannung in den anschließenden Teilen dieser Arbeit relative Angaben, für die das Kontraktionsmaximum während der K125-Zugabe als 1 definiert wurde.

Das Ruhe-Dehnungs-Verhalten menschlicher Nierengefäße gestattet aufgrund ihres hohen Bindegewebsgehalts und gehäuft auftretender Vasomotionen oft nicht die Ermittlung eines optimalen Vordehnungszustands anhand einer exponentiell verlaufenden Ruhe-Dehnungs-Kurve. Um sich schrittweise einer optimalen Vorkontraktion zu nähern, wurde deshalb bei den menschlichen Gefäßen nach jedem Dehnungsschritt eine Kontraktion mittels kaliumreicher Pufferlösung (K125) ausgelöst. Anschließend wurde stets wieder KRB-Lösung in das Organbad gegeben. Zwischen den einzelnen Dehnungsschritten lagen jeweils 5 Minuten (min). Für die nachfolgenden Experimente wurden die Gefäße in dem Vordehnungszustand belassen, bei welchem das Maximum der Kalium-induzierten Kontraktion ermittelt wurde.

Nach einer Wartezeit von mindestens 10 min nach Erreichen des Grundtonus wurden alle Ratten- und menschlichen Gefäße noch einmal vorkontrahiert. Dieser Schritt diente der Aktivierung der Gefäße. In den Versuchsteilen, in denen die Vasodilatation untersucht werden sollte, geschah dies mit Phenylephrin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$, in allen anderen Teilen mit Noradrenalin ebenfalls in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$.

2.2.7.1 Verwendete Kaliumkanalmodulatoren

In den Myographieexperimenten wurden die in Tabelle 7 genannten Kaliumkanalmodulatoren eingesetzt:

Tabelle 7: Pharmakologische Kaliumkanalblocker und -aktivatoren zur Beeinflussung der Kaliumkanalaktivität in intrarenalen Arterien der Ratte und des Menschen

| Substanz | Konzentration [$\mu\text{mol/L}$] | Funktion |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Iberiotoxin | 0,1 | blockiert BK-Kanäle |
| TRAM-34 | 1 | blockiert IK-Kanäle |
| Apamin | 1 | blockiert SK-Kanäle |
| 4-Aminopyridin (4-AP) | 1000 | blockiert K_v -Kanäle |
| XE991 | 1 und 3 | blockiert K_{v7} -Kanäle |
| Bariumchlorid (BaCl_2) | 30 | blockiert K_{ir} -Kanäle |
| Glibenclamid | 1 | blockiert K_{ATP} -Kanäle |
| Levcromakalim | 1 | aktiviert K_{ATP} -Kanäle |
| Tetraethylammonium (TEA) | 1000 | blockiert nicht selektiv Kaliumkanäle |

2.2.7.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasokonstriktion

Um den Beitrag der Kaliumkanäle zu einer Vasokonstriktion zu untersuchen, wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven (K-W-Kurven) mit S(-)-BayK8644 (S(-)-BayK) oder Noradrenalin mit und ohne Kaliumkanalmodulation erstellt (Abbildung 4). S(-)-BayK, ein Aktivator spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle, wurde dafür kumulativ in aufsteigender Konzentration dem Organbad zugesetzt. Die geringste Badkonzentration betrug 10 nmol/L und wurde halblogarithmisch im Abstand von jeweils 5 min auf 1 $\mu\text{mol/L}$ gesteigert. Noradrenalin wurde ebenfalls kumulativ in halblogarithmisch gesteigerten Badkonzentrationen von 10 nmol/L bis 10 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt. Der zeitliche Abstand zwischen den Noradrenalingaben betrug jeweils 3 min.

Für die Ermittlung der K-W-Kurven mit Kaliumkanalmodulation wurde der Inhibitor beziehungsweise (bzw.) Aktivator dem Organbad des Myographen direkt zugesetzt. Lediglich 4-Aminopyridin, welches zu einer Erhöhung des pH-Werts der Pufferlösung führte, wurde bereits außerhalb des Myographen in 10 ml KRB-Lösung gegeben, der pH-Wert auf 7,44

zurückgestellt und nachfolgend die gesamte Organbadlösung ausgewechselt. Bei dem aus allen Inhibitoren bestehenden Cocktail wurde auf dieselbe Weise verfahren.

Die zeitliche Differenz zwischen dem Hinzufügen des Kaliumkanalmodulators und erster S(-)-BayK- beziehungsweise Noradrenalingabe betrug für XE991 30 min, für alle anderen Substanzen 15 min. Bei Einsatz des Kanalblockercocktails wurde gewartet, bis ein stabiler Tonus aufgebaut war (längstens 30 min) und erst danach mit der Erstellung der K-W-Kurven begonnen.

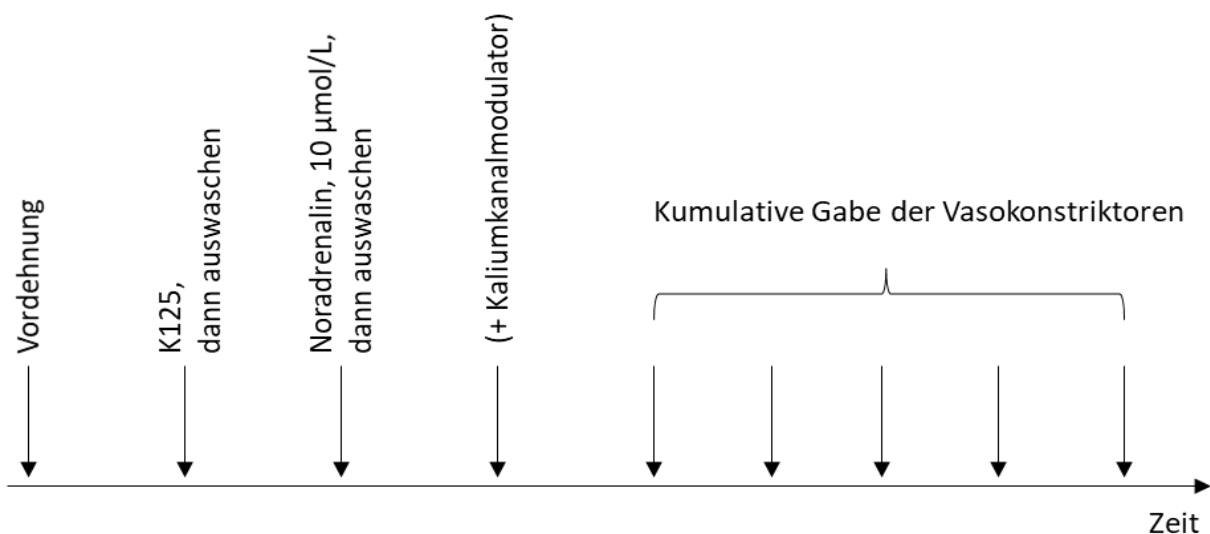


Abbildung 4: Allgemeines Myographie-Protokoll für die Erstellung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasokonstriktion renaler Widerstandsgefäße der Ratte und des Menschen

Als Vasokonstriktoren wurden S(-)-BayK8644 in Konzentrationen von 10 nmol/L bis 1 µmol/L und Noradrenalin in Konzentrationen von 10 nmol/L bis 10 µmol/L (jeweils halblogarithmisch gesteigert) eingesetzt.

Pro Gefäß wurde je eine kumulative Noradrenalingabe mit und eine ohne Kanalmodulation durchgeführt. Nur für die Telexperimente mit Kaliumkanalblockercocktail und dessen Kontrolle wurden separate Gefäße verwendet. Um zeitabhängige Effekte auszuschließen, wurde die Reihenfolge der jeweiligen Teilveruche regelmäßig getauscht. Auch für die S(-)-BayK-Versuche erfolgte jeweils die Ermittlung einer K-W-Kurve mit und einer Kurve ohne Kaliumkanalblockade. Da S(-)-BayK nicht vollständig aus den Gefäßen auswaschbar ist, wurden die einzelnen Teilveruche hier ebenfalls an separaten Gefäßen durchgeführt.

2.2.7.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasodilatation

Um den Beitrag verschiedener Kaliumkanäle zur cAMP-abhängigen Vasodilatation zu untersuchen, wurde der Adenylatcyclaseaktivator Forskolin verwendet. Dabei wurden die

Rattengefäße zunächst entweder mit dem α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/L}$ oder mit einer kaliumreichen Pufferlösung mit einer Kaliumionenkonzentration von 64 mmol/L (K64) vorkontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Tonus, meist nach 3 bis 5 min, längstens aber nach 15 min, wurde mit der kumulativen Zugabe von Forskolin begonnen. Die Substanz wurde in Badkonzentrationen von 10 nmol/L, 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ und 10 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Zwischen den einzelnen Gaben lag stets eine Wartezeit von 10 min. Um Zeitkontrollläufe zu erstellen, wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten statt des Forskolins nur dessen Lösungsmittel DMSO in das Organbad gegeben. Die Erstellung der Forskolin-K-W-Kurven und die Zeitkontrollläufe mit DMSO wurden an denselben Gefäßen in wechselnder Reihenfolge durchgeführt. Nachfolgend wurde der Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die Forskolin-induzierte Vasodilatation an separaten mit Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßen getestet (Abbildung 5). Als Kaliumkanalinhibitoren wurden Iberiotoxin, 4-Aminopyridin, XE991 und Glibenclamid (1 $\mu\text{mol/L}$ und 10 $\mu\text{mol/L}$) eingesetzt. Die Inkubationszeit für XE991 betrug 30 min, für alle anderen 15 min.

Neben dem experimentellen Ansatz der Untersuchung der cAMP-abhängigen Vasodilatation mittels Forskolin wurde auch die Vasodilatation nach Gabe des Medikamentenwirkstoffs Iloprost untersucht. Dafür wurden die Gefäße mit Phenylephrin vorkontrahiert. Bei den Rattengefäßen wurde eine Phenylephrinkonzentration von 3 $\mu\text{mol/L}$ gewählt, bei den humanen Gefäßen 10 $\mu\text{mol/L}$. Iloprost wurde kumulativ in halblogarithmischen Konzentrationsschritten in das Organbad gegeben. Die Anfangsbadkonzentration betrug 1 nmol/L, die Endkonzentration 0,3 $\mu\text{mol/L}$. Zwischen den einzelnen Iloprostgaben lag eine Einwirkzeit von jeweils 3 min. Um zu testen, inwiefern Kaliumkanäle an der Iloprost-vermittelten Vasodilatation beteiligt sind, wurden in den humanen Gefäßen zusätzlich Iloprost-K-W-Kurven nach vorheriger Zugabe des K_v7 -Kanalblockers XE991 erstellt (Abbildung 5). Die Zeit zwischen der XE991- und der ersten Iloprostgabe betrug 30 min. Die Ermittlung der Iloprost-K-W-Kurven mit und ohne Kanalinhibition fand an denselben Gefäßen statt. Die Reihenfolge dieser Teilerperimente variierte stets.

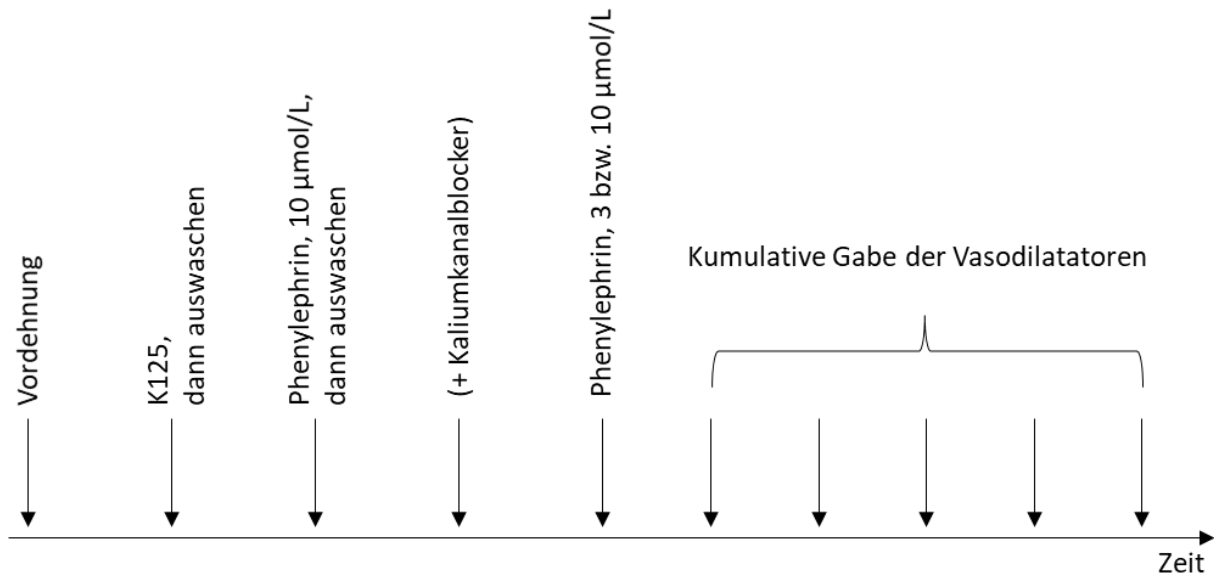


Abbildung 5: Allgemeines Myographie-Protokoll für die Erstellung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasodilatation renaler Widerstandsgefäße der Ratte und des Menschen

Zur Vordehnung vor Gabe der Vasodilatoren wurden bei den Rattengefäßen 3 µmol/L Phenylephrin und bei den menschlichen Gefäßen 10 µmol/L Phenylephrin verwendet. Als Vasodilatoren dienten Forskolin in logarithmisch gesteigerten Konzentrationen von 10 nmol/L bis 10 µmol/L und Iloprost in halblogarithmisch gesteigerten Konzentrationen von 1 nmol/L bis 0,3 µmol/L.

2.2.8 Untersuchungen der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen der Ratte

Um Aussagen über die mRNA-Gehalte der verschiedenen K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in den renalen Widerstandsgefäßen machen zu können, wurde zunächst die RNA isoliert, in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben und anschließend die zu untersuchenden Gene mittels „Real-time“ Polymerasekettenreaktion (qPCR) vervielfältigt.

2.2.8.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des „Direct-zol™ RNA MicroPrep-Kits“ der Firma Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland. Zunächst wurden alle zu untersuchenden Gefäße eines Tieres in einem Eppendorfgefäß in 150 µl TriFast mittels Pistill homogenisiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach zwei weiteren Homogenisierungsschritten ohne erneute TriFast-Gabe und einer dazwischen liegenden Wartezeit von 5 min folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10.000-facher Erdbeschleunigung (xg), um die Gewebetrümmer als Pellet am Gefäßboden zu sammeln. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 150 µl 99 %iger Ethanol hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren so lange vermischt, bis eine homogene

Lösung entstand. Diese Lösung wurde auf die in einem Auffangbehälter befindliche Säule des RNA-Isolationskits gegeben und 1 min bei 13.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt.

Um in den anschließenden Versuchsschritten nur die RNA der Gefäße und keine Reste genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu amplifizieren, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Dafür wurden zunächst 400 µl RNA-Waschpuffer auf die Säule gegeben und 1 min bei 13.000 xg zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl DNase I in 35 µl DNA-Verdauungspuffer und eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur.

Nach dem DNase-Verdau erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 400 µl RNA-Vorwaschpuffer und anschließender Zentrifugation von 1 min bei 13.000 xg. Daran schloss sich ein Waschschrte mit 700 µl RNA-Waschpuffer und 3-minütiger Zentrifugation bei 13.000 xg an. Nachfolgend wurde die Säule in ein RNase-freies, autoklaviertes Eppendorfgefäß überführt, die RNA mithilfe von 10 µl DNase/RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die isolierte RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Diese kann anschließend als Matrize für PCRs dienen. Die RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde unmittelbar vor der cDNA-Synthese mithilfe eines 1 µl UV/Vis-Spektrophotometers bestimmt und anschließend berechnet, welches Volumen einzusetzen war, um pro Probe 250 ng RNA umzuschreiben. Anschließend wurde für die cDNA-Synthese der Proben mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland laut Herstellerangaben gearbeitet. Pro Probe wurden die in Tabelle 8 genannten Reagenzien in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

Tabelle 8: Reagenzien für die cDNA-Synthese der renalen Widerstandsarterien

| | |
|---------|---|
| 10,0 µl | RNA-Wasser-Gemisch mit einer RNA-Konzentration von 250 ng |
| 2,0 µl | 10x RT-Puffer |
| 0,8 µl | 25x dNTP Mix (100 mmol/L) |
| 2,0 µl | 10x RT Random Primers |
| 1,0 µl | RNase Inhibitor |
| 3,2 µl | Nuclease-freies Wasser |
| 1,0 µl | Reverse Transkriptase |

Die Proben wurden dem Thermocycler zugeführt. In diesem startete die reverse Transkription mit einer initialen Phase von 10 min bei 25 °C. Anschließend folgte eine 120-minütige Phase bei 37 °C, in der der cDNA-Strang synthetisiert wurde und ein DNA-RNA-Hybridstrang entstand. Die Reaktion endete durch eine Inkubation für 5 min bei 85 °C, um die Reverse Transkriptase zu denaturieren. Nach diesen Schritten wurden die Proben im Thermocycler heruntergekühlt und bis zur Entnahme bei einer Temperatur von 4 °C gehalten. Anschließend wurden die Proben mit DNase/RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 70 µl aufgefüllt. Die weitere Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.8.3 Quantitative „Real-time“ Polymerasekettenreaktion

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung und semiquantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge spezifischer Sequenzen eines cDNA-Strangs⁷⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um auf das Expressionsprofil der verschiedenen Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle in renalen Widerstandsarterien zu schließen. Hintergrund ist, dass das verwendete SYBR Green nur in der Lage ist, sich in doppelsträngige, nicht jedoch in einzelsträngige DNA einzulagern, wobei es in Kombination mit der doppelsträngigen DNA ein stärkeres Fluoreszenzsignal produziert als im nicht eingelagerten Zustand^{79,80}. Bei der qPCR wird zeitgleich zur laufenden Reaktion das produzierte Fluoreszenzsignal gemessen⁸⁰. In Abhängigkeit von der Menge der amplifizierten DNA steigt die Fluoreszenzintensität an⁸⁰. Bei initial hohen cDNA-Mengen werden folglich weniger Zyklen benötigt, bis das gemessene Fluoreszenzsignal der Probe einen definierten Grenzwert („threshold cycle“ (C_t -Wert)) überschreitet.

Primeretablierung

Die Ausführung der qPCR zur Analyse des mRNA-Gehalts der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in Rattengefäßen erforderte das Design spezifischer Primer. Für die Gene der Kanaluntereinheiten $K_{ir}6.1$, SUR1 und SUR2 wurden Primersequenzen anhand veröffentlichter mRNA-Sequenzen⁸¹ mithilfe des Primer Designing Tools des National Center for Biotechnology Information (NCBI)⁸² entwickelt. Für den Kanal $K_{ir}6.2$ wurde die Primersequenz der Arbeit von Tricarico et al.⁸³ entnommen. Die Größe der entstehenden Amplifikate liegt bei allen Untereinheiten zwischen 110 und 150 Basenpaaren. Um das Anlagern an genomische DNA und damit falsch positive Ergebnisse zu verhindern, wurden die Primersequenzen so gewählt, dass sie Exon-Exon-Grenzen überspannen. Einzige Ausnahme bildet $K_{ir}6.2$, da die

RNA-Sequenz für diese Kanaluntereinheit nur ein Exon enthält. Zur Normierung der Expressionsraten in den Rattengefäßen wurde die Expression der Haushaltsgene „Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta“ (YWHAZ) und „Porphobilinogen Deaminase“ (PBGD) als Referenz verwendet. Die Primersequenzen für diese Haushaltsgene folgten dem hausinternen Standard und waren bereits etabliert. Die Primer der Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten wurden von der Firma Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland bezogen, die der Haushaltsgene von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland. Alle Primersequenzen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Primersequenzen der Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten und Haushaltsgene intrarenaler Arterien der Ratte

| Gen | Genbank-Zugangsnummer ⁸¹ | Richtung | Sequenz in 5' -> 3'-Richtung |
|--|-------------------------------------|-----------------------|--|
| potassium voltage-gated channel subfamily J member 8 = KCNJ8 (K _{ir} 6.1) | NM_017099 | vorwärts rückwärts | ATGTCAGGTCATTCACTTCTGC TCAAACCGTGATGGCCAGA |
| potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 = KCNJ11 (K _{ir} 6.2) | NM_031358 | vorwärts rückwärts | CTCATCATCTACCACGTCATCGA GGGTGGTAATGCCTGTGGTT |
| ATP binding cassette subfamily C member 8 = ABCC8 (SUR1) | NM_013039 | vorwärts rückwärts | CAAGTTCTACGACCACGCCA AGAAGACGTATCTCCTCACCC |
| ATP binding cassette subfamily C member 9 = ABCC9 (SUR2) | NM_013040 | vorwärts rückwärts | TAAACACGACGAGATTTTCAGAGACA GTTGATGCCGGTCTCTATGGT |
| tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ) | NM_013011.3 | vorwärts rückwärts | CATCTGCAACGACGTACTIONGTCTCT CACAATTCCTTTCTTGTCATCACCA |
| porphobilinogen deaminase (PBGD) | NM_X06827 | vorwärts rückwärts | TGGGCACCCGGAAGAGT CCTGTGGTGGACATAGCAATGAT |

Um die Spezifität der Primer vorab zu prüfen, wurden Vorexperimente an Geweben durchgeführt, in denen die Expression der jeweiligen Kanaluntereinheit bereits beschrieben wurde. In der Ratte waren dies für K_{ir}6.1 Aortengewebe^{84,85}, für K_{ir}6.2 und SUR2 Herzgewebe⁸⁵ und für SUR1 Nierengewebe³⁷. Diese Testgewebe wurden einer narkotisierten

Ratte entnommen, in flüssigem Stickstoff gemörsert, die RNA aus dem entstandenen Gewebepulver nach der in Kapitel 2.2.8.1 beschriebenen Methode isoliert, in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.8.2) und der qPCR zugeführt (Kapitel 2.2.8.3). Die dabei entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Agarosegel (Kapitel 2.2.8.4) aufgetragen. Die Größe der Fragmente entsprach in allen Fällen den Erwartungen. Negativkontrollen (-RT und NTC, siehe Kapitel 2.2.10) erzeugten im Agarosegel keine oder nur schwache Banden. Da die schwachen Banden von Fragmenten kleinerer Größe stammten, wurde darauf geschlossen, dass sie auf Primerdimerisierungsprodukte zurückzuführen waren. Die Funktionalität und Spezifität der Primer wurden somit als gegeben angenommen.

qPCR-Protokoll

Für die Durchführung der qPCR wurde das Gerät Rotor Gene Q, Qiagen, Hilden, Deutschland, verwendet. In jede Kavität des 100-Loch-Rings wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Reagenzien pipettiert. Die Endkonzentration der Vorwärts- und Rückwärtsprimer betrug stets 900 nmol/L. Um während der qPCR Verdunstungen zu vermeiden, wurde abschließend auf den Ring eine Verdunstungsschutzfolie laminiert.

Tabelle 10: Reagenzien für die qPCR zur Analyse der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsarterien

| | |
|--------|--|
| 7,5 µl | SYBR Green Master Mix |
| 3,7 µl | DNase/RNase-freies Wasser |
| 0,7 µl | Stammlösung (20 µmol/L) des Vorwärtsprimers |
| 0,7 µl | Stammlösung (20 µmol/L) des Rückwärtsprimers |
| 2,5 µl | cDNA |

Im Thermocycler wurde die qPCR nach dem in Tabelle 11 genannten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 11: Protokoll der qPCR zur Analyse der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsarterien

| | | | |
|--|------------|-----------------------|---------------|
| Initiale Denaturierung und Aktivierung | 95 °C | 5 min | |
| Denaturierung | 95 °C | 5 Sekunden (s) | } x 40 Zyklen |
| Primeranlagerung und Strangsynthese | 60 °C | 30 s | |
| Erstellung der Schmelzkurve | 50 – 90 °C | schrittweise Erhöhung | |

Die Erstellung der Schmelzkurve dient der Suche nach Artefakten durch Primerdimerisierung und der Überprüfung der Reaktionsspezifität⁷⁹. Wird die gemessene Fluoreszenzintensität über die jeweilige Temperatur aufgetragen, ist im Bereich der Schmelztemperatur ein plötzlicher Abfall des Fluoreszenzsignals zu verzeichnen, da die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA übergeht und die DNA-SYBR Green-Komplexe zerfallen⁷⁹. Da die Schmelztemperatur von der Länge, dem Guanin-Cytosin-Gehalt und anderen Eigenschaften der Nukleinsäure abhängt, können verschiedene PCR-Produkte oft durch den Vergleich ihrer Schmelzkinetik unterschieden werden^{79, 86}.

Nach Abschluss der Schmelzkurvenerstellung wurden die PCR-Produkte entnommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8.4 Gelelektrophorese

Zur Analyse der in der qPCR entstandenen PCR-Produkte, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, in der die DNA-Stränge entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt wurden⁸⁷. Zunächst wurde ein 2 %iges Agarosegel in Tris/Acetic Acid/EDTA Puffer (TAE Puffer) gegossen, welches die Substanz Roti®-GelStain enthielt, die sich an Nukleinsäurestränge anlagert und sie unter Anwendung von Ultraviolettlicht (UV-Licht) im Agarosegel sichtbar macht. Das Gel polymerisiert zu einer Netzstruktur⁸⁷, welche mit dem Laufpuffer TAE übergossen wurde. Anschließend wurden Einkerbungen im Gel mit dem Probenmaterial aus den PCR-Ringen beladen. In jede Tasche wurden 15 µl Probenmaterial und 4 µl DNA Ladepuffer pipettiert. Als Referenz wurden in einer weiteren Tasche 7,5 µl des Größenstandards „Bioline Hyperladder 100 bp“ eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 45 bis 60 min bei einer Spannung von 120 V, bevor mithilfe des ChemiDoc XRS+ und der Quantity One Software, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland, UV-Licht-Aufnahmen angefertigt wurden. Die Höhe, auf der die jeweiligen Banden im Gel zu sehen waren, wurde mit den Referenzbanden des Markers verglichen, sodass Aussagen über die Anzahl der Basenpaare der PCR-Produkte getroffen werden konnten.

2.2.9 Untersuchungen der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen

2.2.9.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus humanen Aa. arcuatae und Aa. interlobulares erfolgte mithilfe des Direct-zol™ RNA MicroPrep-Kits der Firma Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland wie für die Rattengefäße in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben. Folgende Abweichungen des Protokolls wurden jedoch vorgenommen: Auf den DNase-Verdau direkt auf der Säule wurde verzichtet, stattdessen schloss sich an die Elution der RNA ein DNase-Verdau an. Dafür wurde die DNase des RNAqueous™-Micro Kits der Firma Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland verwendet. Zu 15 µl Probe wurden 1 µl DNase I und 1,5 µl DNase I Puffer gegeben, bevor der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl DNase-Inaktivierungsreagenz gestoppt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 14.000 xg wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorfgesäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.9.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte in gleicher Weise wie für die Rattengefäße in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben.

2.2.9.3 Quantitative „Real-time“ Polymerasekettenreaktion

Primeretablierung

Für die Expressionsanalysen der humanen Gefäße wurden mithilfe der NCBI-Primer-Blast-Plattform⁸² genspezifische Primersequenzen für die Gene der Kanaluntereinheiten $K_{ir}6.2$, SUR1, SUR2A und SUR2B erstellt und von der Firma Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland bezogen. Da sich für die $K_{ir}6.1$ -Untereinheit die Basensequenz des humanen Gens im Bereich der Primerbindungsstelle nur in einer Base von der Sequenz der Ratte unterscheidet, wurde für $K_{ir}6.1$ für beide Spezies der gleiche Primer (siehe Kapitel 2.2.8.3) verwendet. Mit Ausnahme von $K_{ir}6.2$, dessen Gen nur ein Exon aufweist, wurden die Primersequenzen so gewählt, dass sie Exon-Exon-Grenzen überspannen. Die Primersequenzen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Primersequenzen der Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien des Menschen

| Gen | Genbank-Zugangsnummer ⁸¹ | Richtung | Sequenz in 5' -> 3' – Richtung | Größe [bp] |
|---|-------------------------------------|-----------------------|--|---------------|
| potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 = KCNJ11 (K _{ir} .6.2) | NM_000525.3 | vorwärts rückwärts | CCAACAGCCCACTCTACGAC CCTTCCAGGATGACGATGATCT | 79 |
| ATP binding cassette subfamily C member 8 = ABCC8 (SUR1) | NM_001287174 | vorwärts rückwärts | ATCCTCTTCATTGGATGGGGAAG ATGAAGGTCAGGATCCACCG | 182 |
| ATP binding cassette subfamily C member 9 = ABCC9 (SUR2A) | NM_005691 | vorwärts rückwärts | TGACAATAGCTCACCGTGTCT CATTCTTGTGGGCGAGCAA | 114 |
| ATP binding cassette subfamily C member 9 = ABCC9 (SUR2B) | NM_020297 | vorwärts rückwärts | AGGCAACAGCTTCCATTGACA AATAGTGTGTACTCGATGAGCTATT | 110 |

Größe = Größe des entstehenden Amplifikats in Basenpaaren (bp)

Zur Überprüfung der Funktionalität und Spezifität der Primer wurde isolierte RNA aus humanem Herzvorhofgewebe⁸⁸ (bezogen von Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) genommen, in cDNA umgeschrieben und der qPCR zugeführt. Die entstandenen Amplifikationsprodukte zeigten nach Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.8.4) die erwartete Größe, die Kontrollen (-RT und NTC, siehe Kapitel 2.2.10) fielen negativ aus. Die Funktionsfähigkeit der Primer wurde somit als gegeben angenommen.

qPCR-Protokoll

Die qPCR wurde mithilfe des Geräts Rotor Gene Q durchgeführt. Sowohl das Protokoll der Reagenzien als auch die Verfahrensweise im Rotor Gene Q glichen den Beschreibungen für die

Rattengefäße in Kapitel 2.2.8.3. Zusätzlich wurde jeder PCR-Lauf mit einer Positivkontrolle, bestückt mit der aus dem humanen Herzvorhof isolierten RNA, ergänzt.

2.2.10 Reinheit der qPCR-Daten

Wegen der Exon-Exon-grenzüberspannenden Lage der verwendeten Primer sollte ein Anlagern an genomische DNA nicht möglich sein. Um das Vorhandensein genomischer DNA dennoch weitestgehend auszuschließen, wurde bei der RNA-Isolierung der DNase-Verdau integriert. Zur Überprüfung der Reinheit der Proben wurden qPCR-Läufe mit Negativkontrollen (-RT) durchgeführt, bei denen im Protokoll der cDNA-Synthese die Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wurde, sodass kein Enzym für die Synthese der cDNA vorhanden war. Weiterhin wurden in der qPCR zusätzliche Ansätze mitgeführt, in die anstatt der cDNA Wasser pipettiert wurde (NTC = no template control). In der anschließenden Auswertung der qPCR dieser Negativkontrollen sollte der C_t -Wert mindestens sieben Zyklen größer sein als derjenige der cDNA-enthaltenden Proben (+RT). Auf diese Weise würden Restbestände genomischer DNA nur einen Anteil von $< 1\%$ des Amplifikationssignals ausmachen.

Trotz der Maßnahmen zur RNA-Reinheit der Proben wiesen in den Rattengefäßen die -RT-Kontrollen der Gene $K_{ir}6.1$ und $K_{ir}6.2$ C_t -Werte auf, die sich nicht oder nur gering von den +RT-Proben unterschieden. Im Agarosegel erschienen die Banden der Amplifikationsprodukte dieser -RT- und +RT-Proben ebenfalls auf gleicher Höhe. Gleichfalls ergaben sich bei den humanen Gefäßen für die Gene $K_{ir}6.1$, $K_{ir}6.2$ und SUR1 nur geringe Unterschiede zwischen den -RT- und +RT-Proben in Bezug auf die C_t -Werte und Bandenlängen.

2.2.11 Statistik

2.2.11.1 Auswertung der Myographieexperimente

Basislinienverschiebung

Um den Einfluss eines Kaliumkanalaktivators beziehungsweise -inhibitors auf den Ruhetonus der Gefäße zu untersuchen, wurde die Spannung der Gefäße direkt vor Zugabe des Kaliumkanalmodulators und am Ende der jeweiligen Inkubationszeit gemessen. Die Differenz der beiden Basislinien ($\Delta BL = BL_2 - BL_1$) erlaubt somit Aussagen über eine Erhöhung oder Verringerung des Ruhetonus im Verlauf der Einwirkzeit der jeweiligen Substanz.

Konzentrations-Wirkungs-Kurven

K-W-Kurven wurden mit den Substanzen S(-)-BayK, Noradrenalin, Forskolin und Iloprost erstellt, indem die Substanzen in aufsteigender Konzentration kumulativ in das Organbad gegeben und die erzeugte Gefäßwandspannung über die Zeit gemessen wurde. Mit diesen K-W-Kurven konnten die maximale Vasokonstriktion beziehungsweise Vasodilatation und die Sensitivität gegenüber dem Agonisten ermittelt werden. Zum Ausmaß der Vasokonstriktion nach Gabe von S(-)-BayK und Noradrenalin wurden jeweils relative Angaben gemacht, die sich auf das Maximum der Wandspannung beziehen, die das Gefäß in der K125-Lösung erreicht hat. Das Ausmaß der Vasodilatation durch Forskolin und Iloprost hingegen wurde beschrieben, indem die Vorspannung vor der ersten Forskolin- beziehungsweise Iloprostgabe als 1 definiert wurde und sich die weiteren Messungen als relative Angaben auf diesen Wert beziehen.

Die K-W-Kurven mit sigmoidalem Verlauf wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 9, GraphPad Software, Kalifornien, USA an eine vier parametrische logistische Funktion mit folgender Formel angepasst:

$$y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) * Hill Slope}}$$

- Bottom = minimale Gefäßwandspannung
- Top = maximale Gefäßwandspannung
- logEC₅₀ = Agonistkonzentration, bei der genau die Hälfte der maximal möglichen Spannung aufgebaut wird
- Hill Slope = Steilheit der Kurve

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Werte logEC₅₀ und die maximale Gefäßwandspannung (im Folgenden E_{max} abgekürzt) verwendet. Intergruppenvergleiche wurden anhand dieser Parameter mithilfe des Student's t-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben (je nach Studiendesign) und mithilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt.

K-W-Kurven, die keinem sigmoidalen Verlauf folgten, wurden mithilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen in GraphPad Prism 9 ausgewertet. Bei signifikanten Unterschieden schloss sich ein Post-Hoc-Test nach Sidak an.

Statistische Signifikanz

Die Daten der Myographieexperimente sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. In allen Versuchsteilen wurden Ergebnisse ab einem p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

2.2.11.2 Quantifizierung der mRNA-Gehalte

Quantifizierung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen der Ratte

Für jedes Gefäß wurde der mittlere C_t -Wert zweier technischer Replikate bestimmt. Wies die Standardabweichung dabei Werte $\geq 0,4$ auf, wurde das Ergebnis dieses Gefäßes in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Die C_t -Werte der einzelnen Gefäße wurden auf das geometrische Mittel der C_t -Werte der Referenzgene YWHAZ und PBGD der jeweiligen Gefäße bezogen und mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Dalal-Wilkinson-Lilliefors-P-Wertanpassung wurde auf Normalverteilung getestet. Da die Normalverteilung für alle Daten gegeben war, wurden die Expressionsprofile der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in den Gefäßen der sympathektomierten, denervierten und scheinbehandelten Ratten mithilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben verglichen. Ab einem p-Wert von $< 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

Quantifizierung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen

Für jedes menschliche Gefäß wurde ein technisches Triplikate angefertigt und mit dem Mittelwert der C_t -Werte dieser Dreifachbestimmung gerechnet. Werte mit einer Standardabweichung von $\geq 0,4$ wurden aus der Wertung genommen. Bei der Untersuchung der mRNA-Gehalte der humanen renalen Gefäße stand kein Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen im Vordergrund, sondern ein genereller Hinweis auf das Vorhandensein der mRNA der einzelnen K_{ATP} -Kanaluntereinheiten. Deshalb wurden keine auf Haushaltsgene normierten Daten ermittelt, sondern direkt auf die jeweiligen gemittelten C_t -Werte Bezug genommen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte

3.1.1 Effekt der Kaliumkanalblockade auf den Ruhetonus

Um den Beitrag von Kaliumkanälen zum Grundtonus der Interlobararterien der Ratte zu untersuchen, wurde gemessen, ob sich nach der Gabe verschiedener Kaliumkanalblocker die Ruhegefäßwandspannung veränderte. Dabei führte die gleichzeitige Blockade aller untersuchten Kaliumkanalklassen durch gemeinsame Gabe der Kanalinhhibitoren Iberiotoxin, TRAM-34, Apamin, 4-Aminopyridin, Bariumchlorid und Glibenclamid zu einer starken Erhöhung des Gefäßtonus, wobei die Gefäßwandspannung so weit zunahm, dass Werte von 56 % der K125-induzierten Spannung erreicht wurden (Tabelle 13). Die einzelne Blockade der jeweiligen Kaliumkanalklassen mithilfe der spezifischen Inhibitoren hingegen führte in den intrarenalen Arterien der Ratte nur zu geringen Anstiegen des Tonus (Tabelle 13).

Tabelle 13: Relativer Anstieg des Gefäßtonus intrarenaler Arterien der Ratte nach Blockade der Kaliumkanäle der Klassen K_{Ca} , K_v , K_{ir} und K_{ATP}

| Kaliumkanalklasse | Kanalblocker | Anstieg des Gefäßtonus bezogen auf K125-Maximum [%] |
|---|---|---|
| K_{Ca} , K_v , K_{ir} , K_{ATP} | Apamin, TRAM-34, Iberiotoxin, 4-Aminopyridin, $BaCl_2$, Glibenclamid | $56,3 \pm 8,8^{**}$ |
| BK | Iberiotoxin | $3,5 \pm 3,7$ |
| IK | TRAM-34 | $1,3 \pm 0,5^*$ |
| SK | Apamin | $1,9 \pm 0,6^{**}$ |
| K_v | 4-Aminopyridin | $-0,2 \pm 0,6$ |
| K_{v7} | XE991 | $5,8 \pm 1,6^{**}$ |
| K_v , K_{v7} , BK | 4-Aminopyridin, XE991, Iberiotoxin | $28,6 \pm 3,7^{**}$ |
| K_{ir} | $BaCl_2$ | $3,3 \pm 1,8$ |
| K_{ATP} | Glibenclamid | $1,6 \pm 1,1$ |

Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied im Gefäßtonus vor und nach der Gabe der Kaliumkanalblocker (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$). Die dargestellten Daten wurden aus den Versuchen zur Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion gewonnen (Kapitel 3.1.3), nur die Daten zur alleinigen K_{v7} -Kanalblockade (XE991) entstammen dem Versuch zur Forskolin-induzierten Vasodilatation (Kapitel 3.1.4).

3.1.2 Effekt der Kaliumkanalblockade auf die S(-)-BayK-induzierte Vasokonstriktion

3.1.2.1 K_{Ca} -Kanalblockade

Zur weiteren Charakterisierung des Effekts der Kaliumkanalblockade auf das Ruhemembranpotenzial in den Zellen der renalen Gefäße, wurden K-W-Kurven des L-Typ-Calciumkanalaktivators S(-)-BayK mit und ohne Kaliumkanalblockade durchgeführt. In den Gefäßen der Ratte führte die Gabe von S(-)-BayK kaum zu Kontraktionen. Unter Blockade der BK-Kanäle mittels Iberiotoxin jedoch wurden deutliche Tonuszunahmen nach den jeweiligen S(-)-BayK-Gaben verzeichnet ($p < 0,001$) (Abbildung 6). Ebenso führte die IK-Kanalblockade mit TRAM-34 zu signifikant stärkeren Kontraktionen ($p = 0,02$) (Abbildung 7). Die Gabe von Apamin zur Blockade der SK-Kanäle hingegen führte zu keiner veränderten S(-)-BayK-Antwort (Abbildung 8).

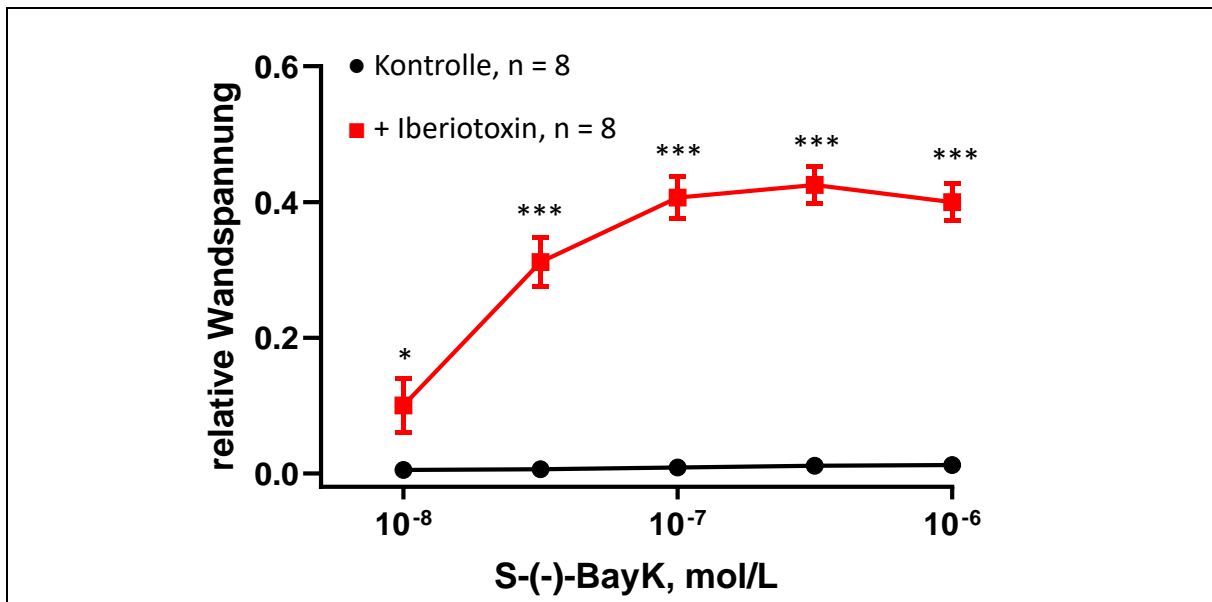


Abbildung 6: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade

Zur Blockade der BK-Kanäle wurde Iberiotoxin ($0,1 \mu\text{mol/L}$) verwendet. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Gefäßwandspannung zwischen den Iberiotoxin-behandelten und den Kontrollgefäßen (* $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$).

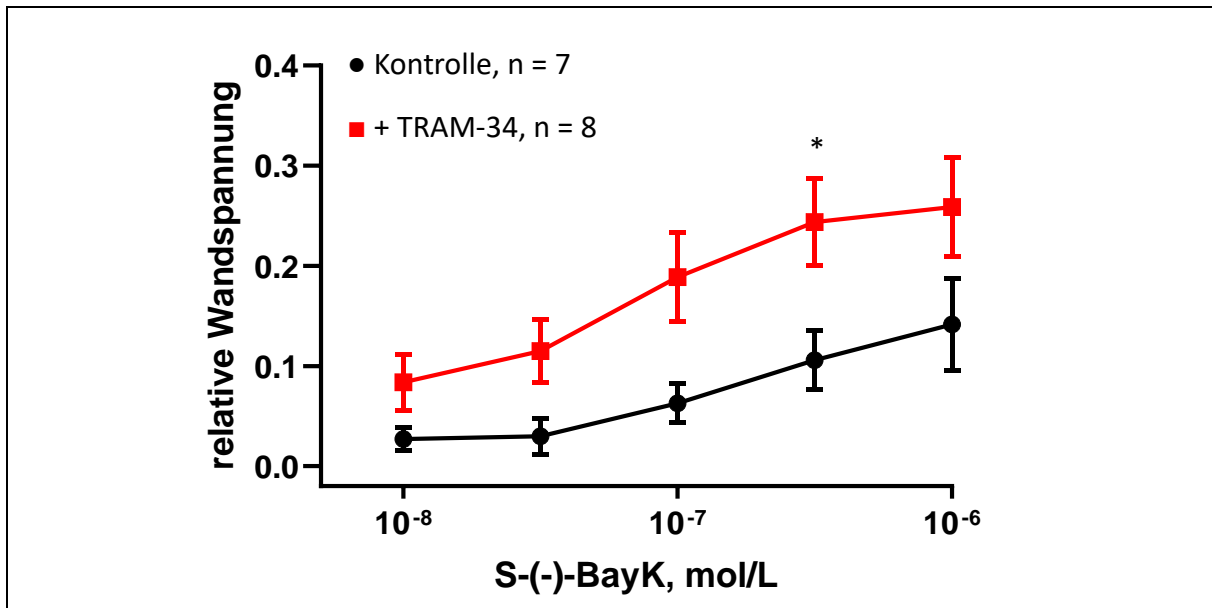


Abbildung 7: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne IK-Kanalblockade

Zur Blockade der IK-Kanäle wurde TRAM-34 (1 $\mu\text{mol/L}$) verwendet. Das Sternchen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in der Gefäßwandspannung zwischen den TRAM-34-behandelten und den Kontrollgefäßen (* $p < 0,05$).

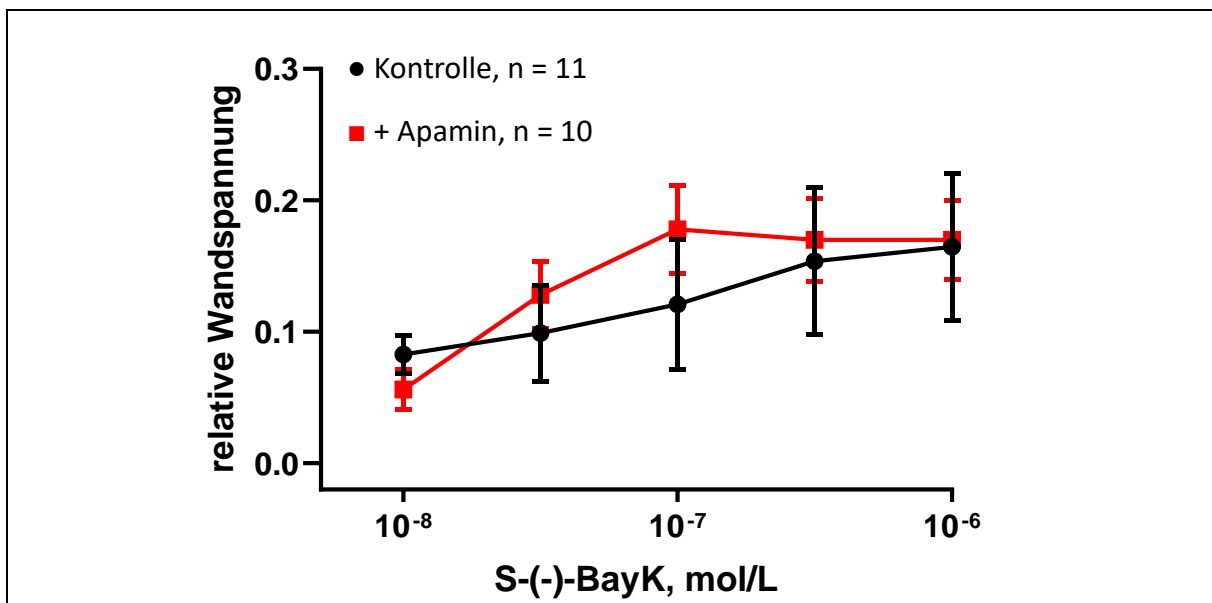


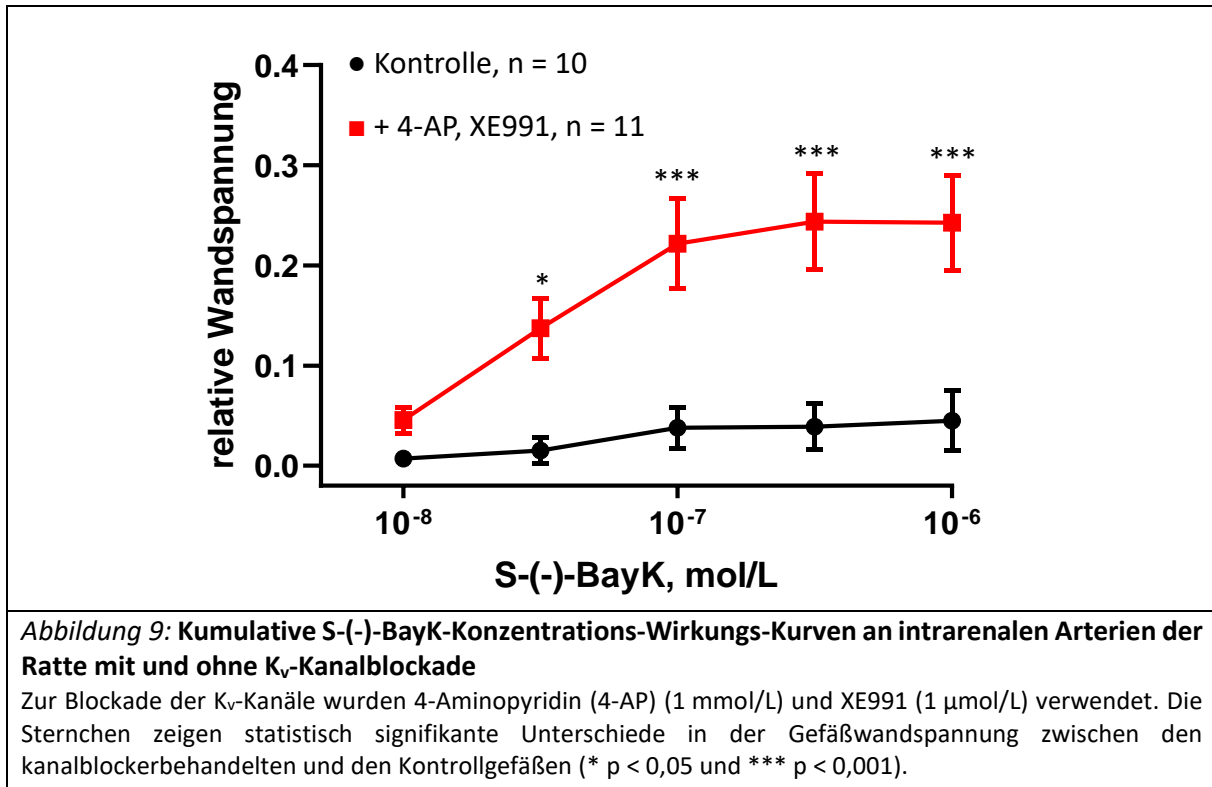
Abbildung 8: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne SK-Kanalblockade

Zur Blockade der SK-Kanäle wurde Apamin (1 $\mu\text{mol/L}$) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne SK-Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Daten überlassen von Vanessa Veltum, bereits präsentiert in der Bachelorarbeit „Einfluss der sympathischen Innervation auf die Aktivierbarkeit von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen renaler Widerstandsgefäße“⁸⁹

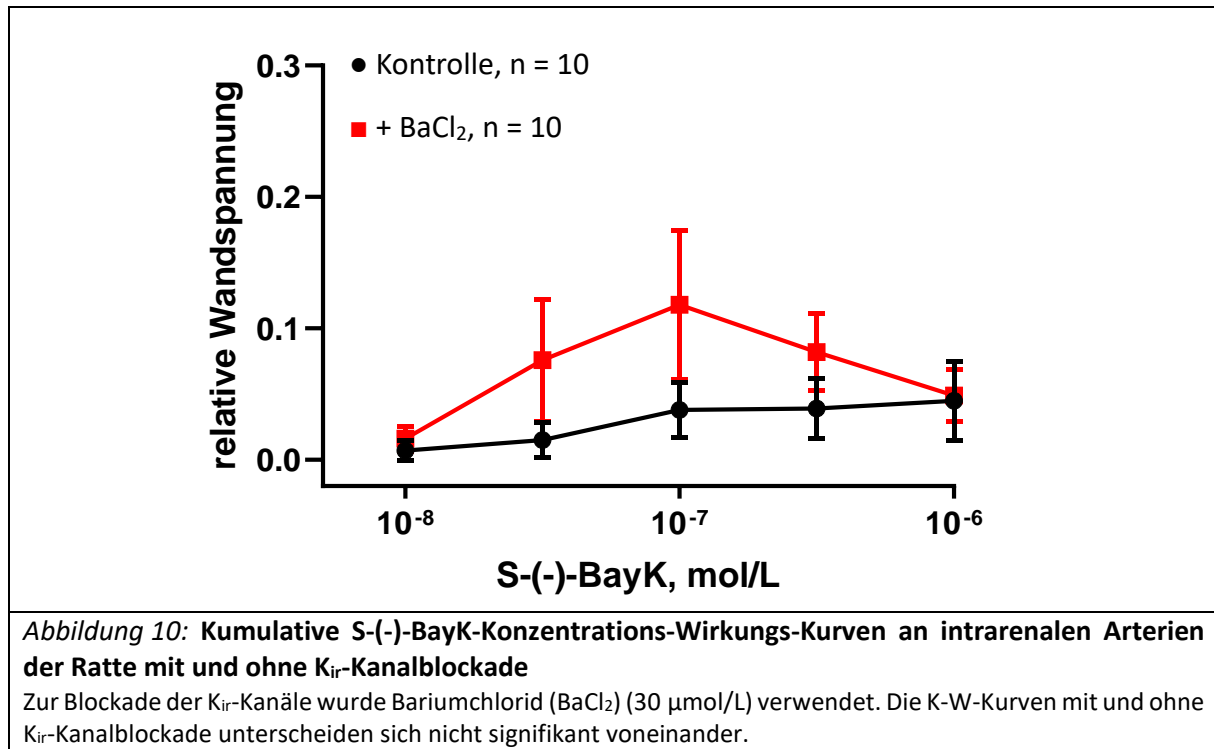
3.1.2.2 K_v -Kanalblockade

Zur Blockade der K_v -Kanäle wurde eine Kombination aus 4-Aminopyridin und XE991 eingesetzt. 4-Aminopyridin blockiert vorrangig die Unterklassen K_{v1} - K_{v4} und XE991 die K_{v7} -Kanäle. Diese Kombination bewirkte eine signifikante Steigerung der S(-)-BayK-induzierten Vasokonstriktionen ($p = 0,002$) (Abbildung 9).



3.1.2.3 K_{ir} -Kanalblockade

Um die K_{ir} -Kanäle zu inhibieren, wurde Bariumchlorid verwendet. Nach Gabe dieses Kanalblockers zeigte sich keine signifikante Veränderung der S(-)-BayK-K-W-Kurve (Abbildung 10).



3.1.2.4 K_{ATP} -Kanalblockade

Unter K_{ATP} -Kanalblockade mittels Glibenclamid wurden leicht verstärkte Vasokonstriktionen nach S(-)-BayK-Gabe gemessen, doch waren diese nicht statistisch signifikant (Abbildung 11). Eine kombinierte Blockade durch den nicht-selektiven Kaliumkanalblocker Tetraethylammonium, der in der eingesetzten Konzentration vorrangig BK- und K_v -Kanäle blockiert, und Glibenclamid führte zu einer signifikanten Verstärkung der S(-)-BayK-induzierten Vasokonstriktionen ($p < 0,001$) (Abbildung 11). Da die alleinige Blockade mittels Tetraethylammonium aber zu ähnlich verstärkten Vasokonstriktionen führte ($p < 0,001$) (Abbildung 11), konnte kein additiver Effekt der K_{ATP} -Kanalblockade nachgewiesen werden.

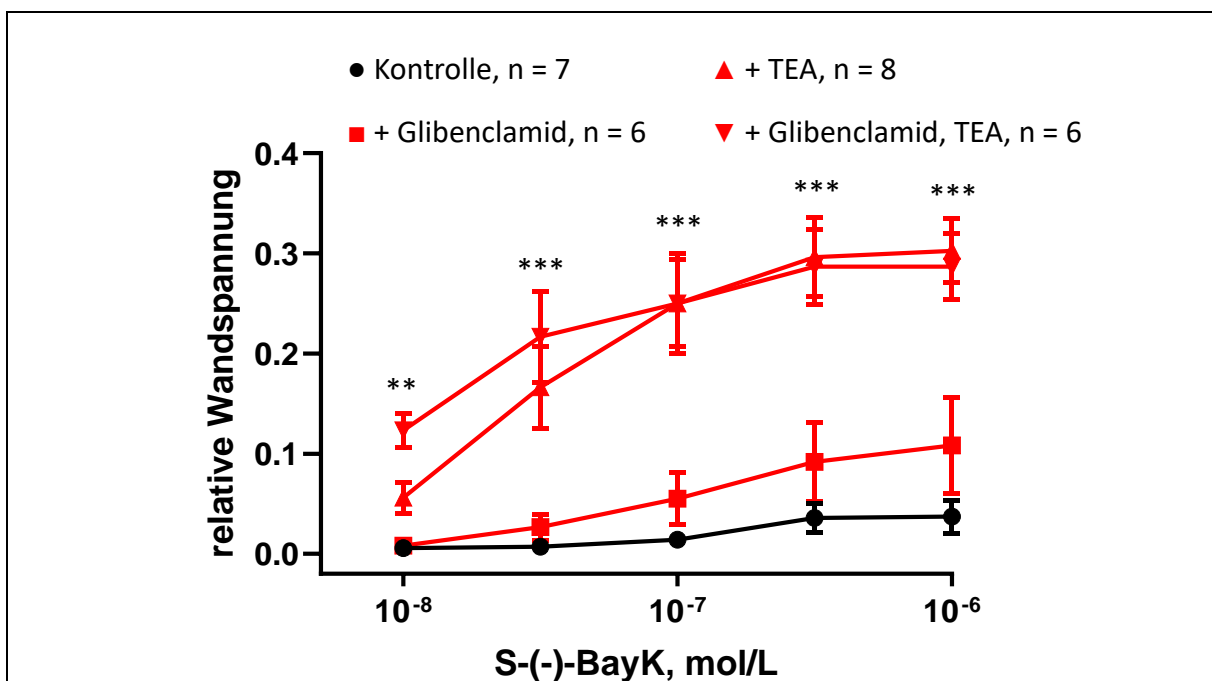


Abbildung 11: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade

Die K-W-Kurven wurden an Kontrollgefäßen (●) erstellt und an Gefäßen, die entweder nur mit dem K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid ($1 \mu\text{mol/L}$) (■) oder nur mit dem nicht selektiven Kaliumkanalblocker Tetraethylammonium (TEA) (1mmol/L) (▲) oder mit einer Kombination aus Glibenclamid und TEA (▼) behandelt wurden. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Gefäßwandspannung zwischen den TEA- beziehungsweise Glibenclamid+TEA-behandelten und den Kontrollgefäßen (** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

3.1.3 Effekt der Kaliumkanalblockade auf die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion

Die kumulative Gabe von Noradrenalin (NE) führte in den Interlobararterien der Ratte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Gefäßwandspannung. Um eine Beteiligung von Kaliumkanälen an dieser Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion zu untersuchen, wurden die K-W-Kurven in An- und Abwesenheit verschiedener Kaliumkanalinhibitoren ermittelt.

3.1.3.1 K_{Ca}-Kanalblockade

Bei den calciumabhängigen Kaliumkanälen hatte weder der BK-Kanalinhistor Iberiotoxin noch der IK-Kanalinhistor TRAM-34 Einfluss auf die logEC₅₀ oder die maximale Kontraktionskraft E_{max} der Noradrenalin-K-W-Kurve (Tabelle 14; Abbildung 12 + 13). Der SK-Kanalinhistor Apamin hingegen verschob die Kurve signifikant in Richtung niedrigerer Noradrenalin-Konzentrationen (p = 0,0004), die maximale Kontraktionskraft E_{max} blieb hingegen unverändert (Tabelle 14; Abbildung 14).

Tabelle 14: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der K_{Ca}-Kanalblocker

| Ratte | logEC ₅₀ [mol/L] | E _{max} [relativ] |
|------------------|-----------------------------|----------------------------|
| NE | -6,07 ± 0,14 | 1,43 ± 0,07 |
| NE + Iberiotoxin | -5,90 ± 0,20 | 1,69 ± 0,15 |
| NE | -6,11 ± 0,10 | 1,49 ± 0,05 |
| NE + TRAM-34 | -6,17 ± 0,10 | 1,46 ± 0,05 |
| NE | -6,07 ± 0,07 | 1,32 ± 0,03 |
| NE + Apamin | -6,34 ± 0,06 *** | 1,33 ± 0,04 |

*** p < 0,001 NE + Apamin versus (vs.) NE

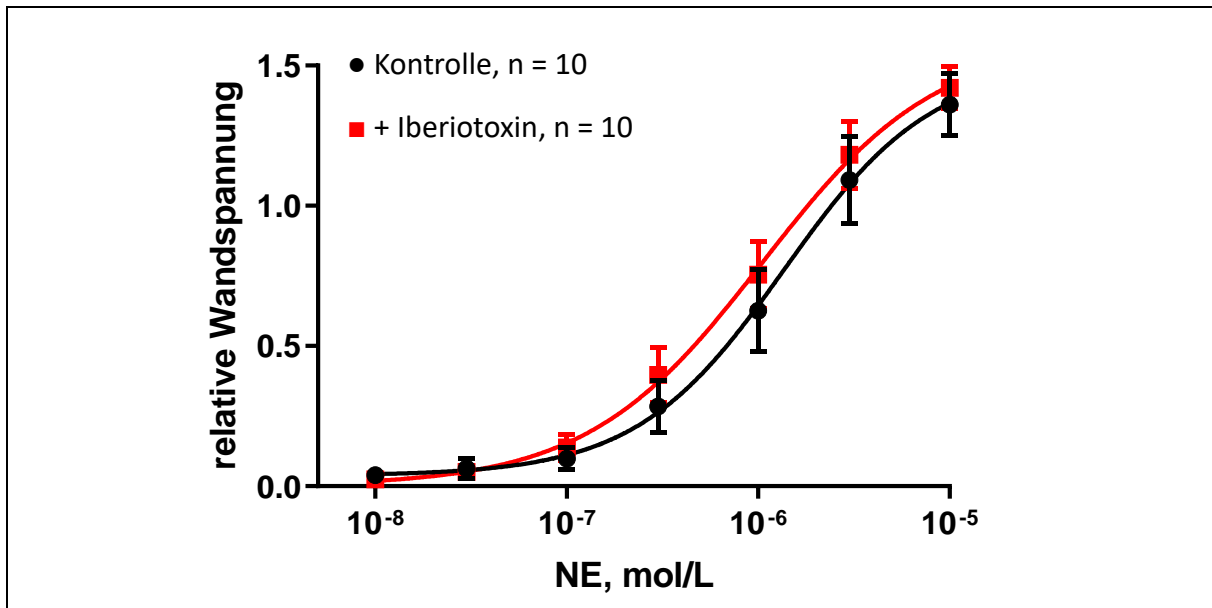


Abbildung 12: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade

Zur Blockade der BK-Kanäle wurde Iberiotoxin ($0,1 \mu\text{mol/L}$) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne BK-Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

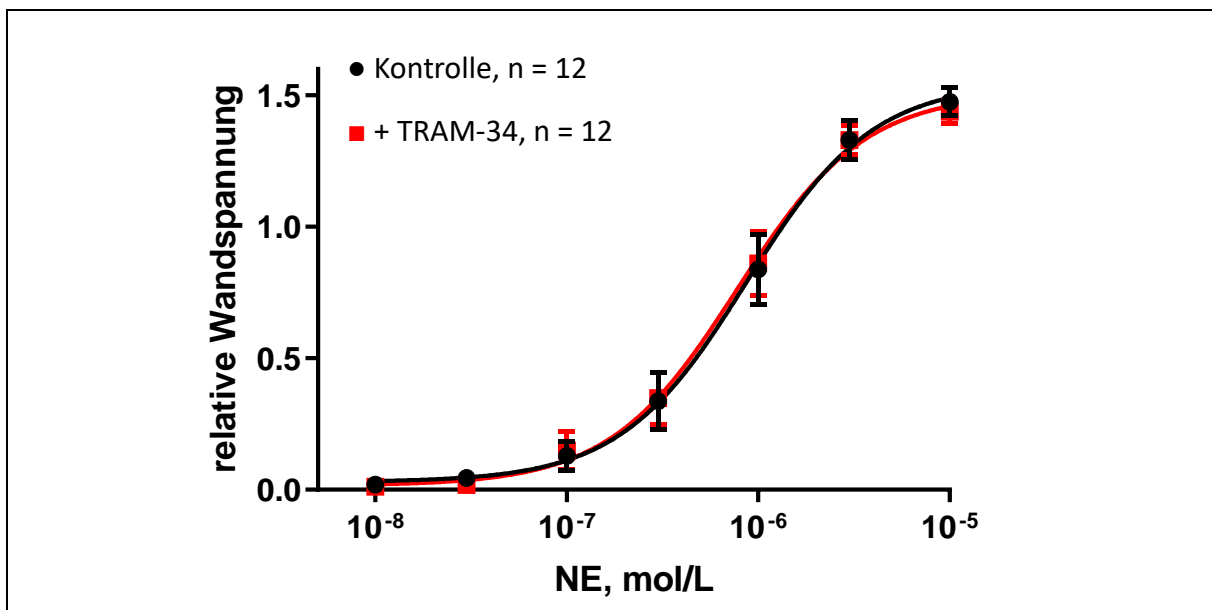


Abbildung 13: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne IK-Kanalblockade

Zur Blockade der IK-Kanäle wurde TRAM-34 ($1 \mu\text{mol/L}$) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne IK-Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

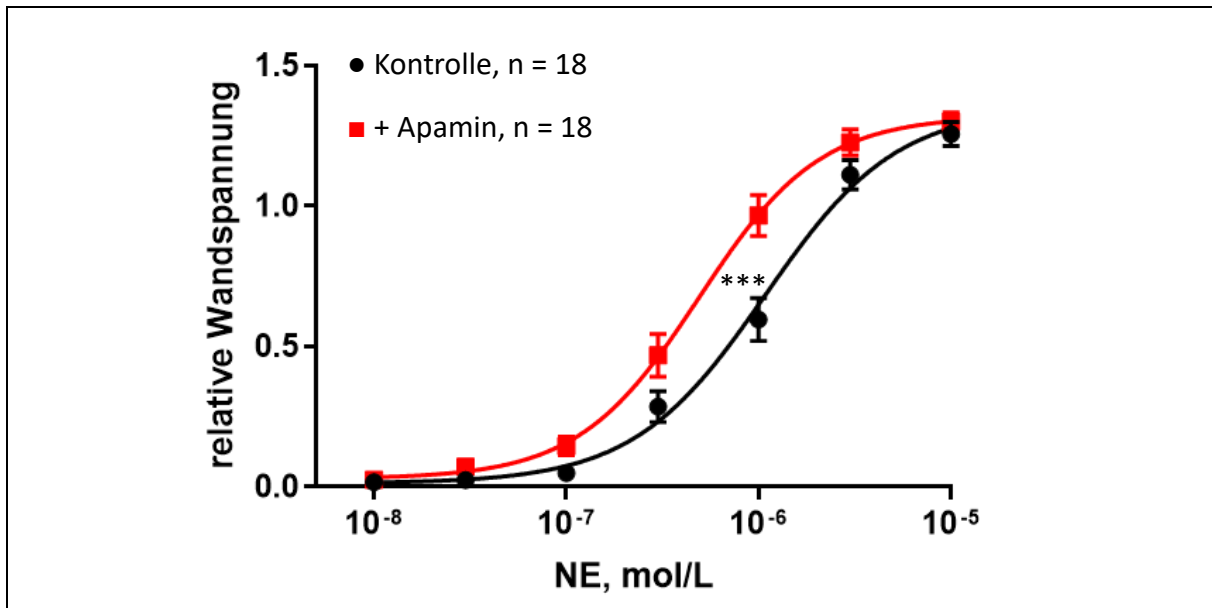


Abbildung 14: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne SK-Kanalblockade

Zur Blockade der SK-Kanäle wurde Apamin ($1 \mu\text{mol/L}$) verwendet. Die Sternchen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied in der $\log EC_{50}$ zwischen den Apamin-behandelten und den Kontrollgefäßen (***) ($p < 0,001$).

3.1.3.2 K_v-Kanalblockade

Der K_v-Kanalblocker 4-Aminopyridin zeigte graphisch die Tendenz einer Rechtsverschiebung der K-W-Kurve, doch erreichte diese das Signifikanzniveau nicht ($p = 0,12$). Auf die maximale Spannungsentwicklung nahm 4-Aminopyridin keinen Einfluss (Tabelle 15; Abbildung 15).

4-Aminopyridin inhibiert vorrangig die K_v-Kanäle der Unterklassen K_{v1} - K_{v4}, wirkt jedoch aktivierend auf die Unterklasse K_{v7}³⁵. Deshalb wurde den Noradrenalinexperimenten zusätzlich zu 4-Aminopyridin der K_{v7}-Kanalinh inhibitor XE991 hinzugefügt. Auch hier zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Rechtsverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve (Tabelle 15; Abbildung 16). Wegen der beschriebenen Aktivierung der BK-Kanäle durch 4-Aminopyridin^{35,90} und aufgrund einer möglichen kompensatorischen Aktivierung der BK-Kanäle wurde zusätzlich der BK-Kanalinh inhibitor Iberiotoxin gegeben. Diese Kombination aus Kaliumkanalinh inhibitoren führte zu einem signifikanten Anstieg des Gefäßtonus um $29 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$). Die Parameter der Noradrenalin-K-W-Kurve $\log EC_{50}$ und E_{max} änderten sich dabei nicht (Tabelle 15; Abbildung 16).

Tabelle 15: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der K_v-Kanalblocker

| Ratte | $\log EC_{50}$ [mol/L] | E_{max} [relativ] |
|---|------------------------|---------------------|
| NE | $-6,22 \pm 0,09$ | $1,51 \pm 0,09$ |
| NE + 4-Aminopyridin | $-6,00 \pm 0,10$ | $1,44 \pm 0,11$ |
| NE | $-6,15 \pm 0,11$ | $1,27 \pm 0,06$ |
| NE + 4-Aminopyridin, XE991 | $-5,95 \pm 0,14$ | $1,31 \pm 0,04$ |
| NE | $-6,15 \pm 0,11$ | $1,27 \pm 0,06$ |
| NE + 4-Aminopyridin, XE991, Iberiotoxin | $-5,94 \pm 0,07$ | $1,30 \pm 0,06$ |

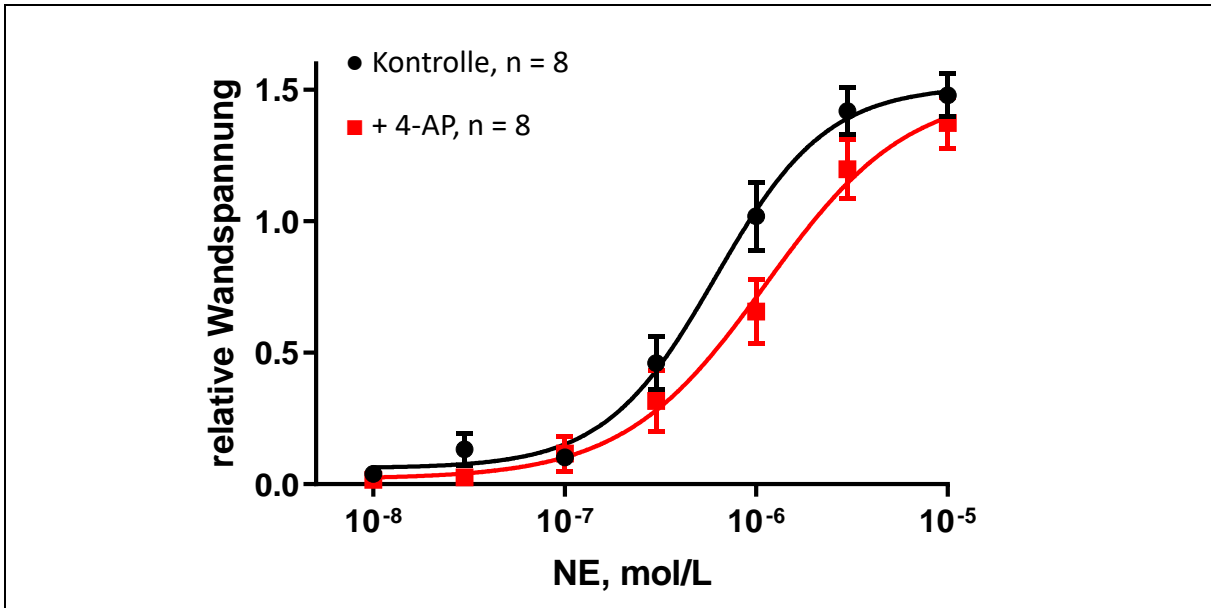


Abbildung 15: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v -Kanalblockade

Zur Blockade der K_v -Kanäle wurde 4-Aminopyridin (4-AP) (1 mmol/L) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne K_v -Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

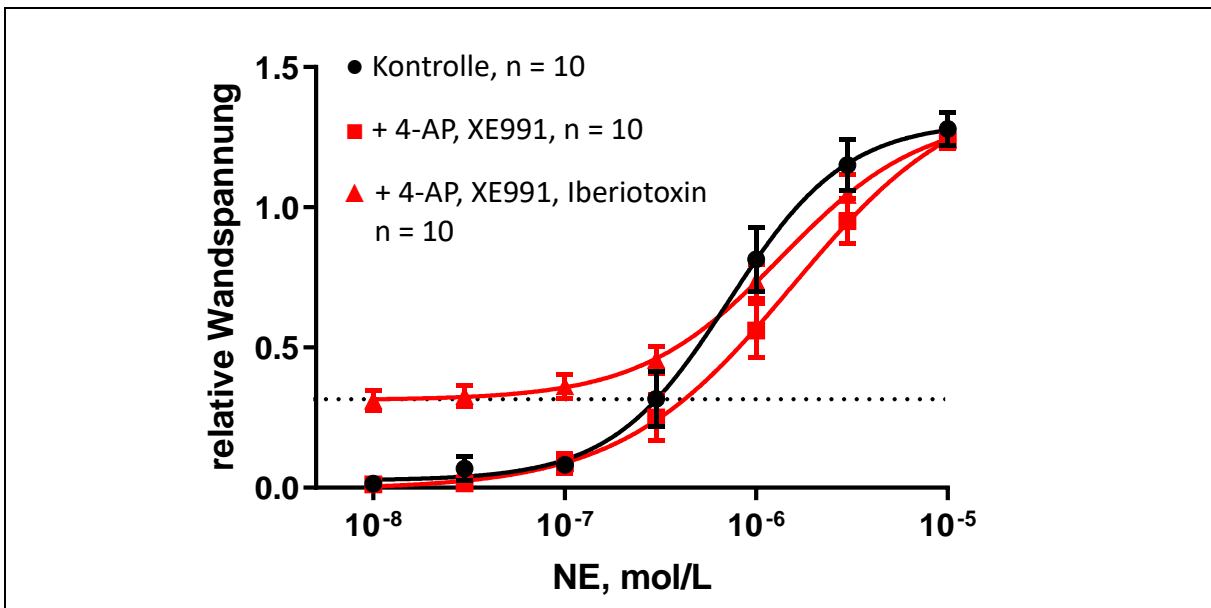


Abbildung 16: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v - und BK-Kanalblockade

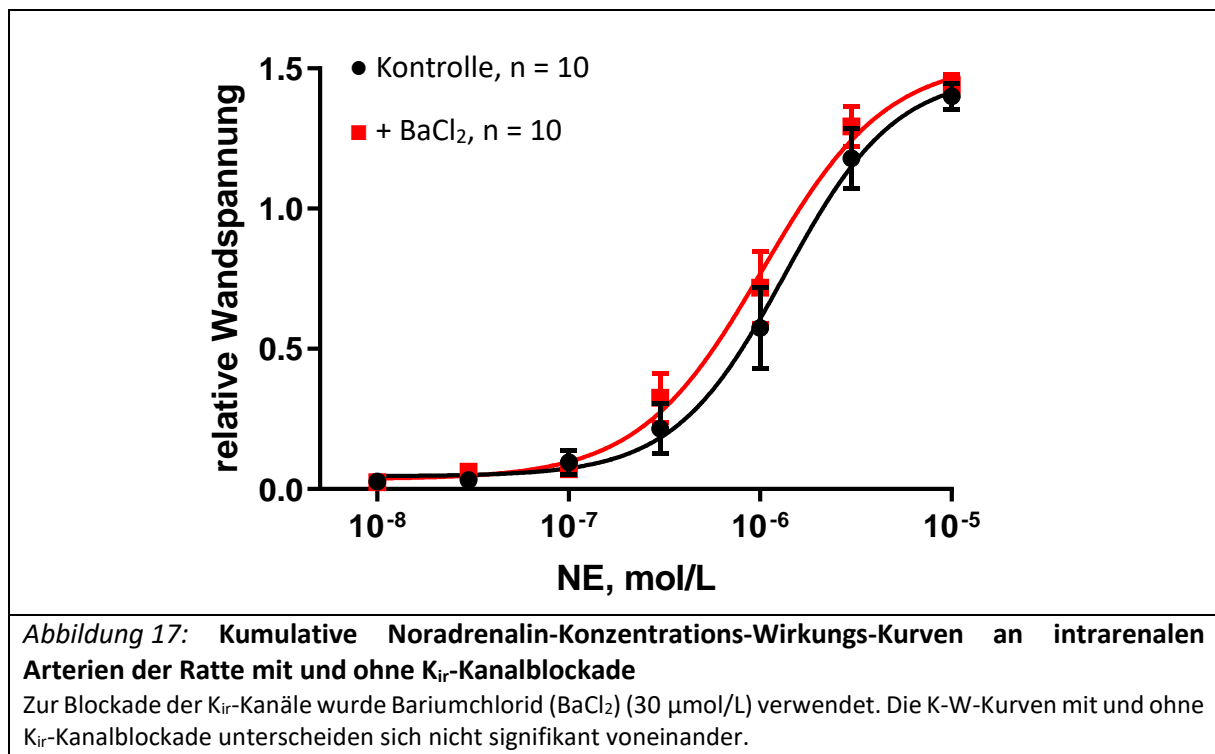
Die K-W-Kurven wurden an Kontrollgefäßen (●) erstellt und an Gefäßen, die mit einer Kombination aus dem K_v -Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) (1 mmol/L) und dem K_v7 -Kanalblocker XE991 (3 μ mol/L) (■) oder einer Kombination aus 4-Aminopyridin (1 mmol/L), XE991 (3 μ mol/L) und dem BK-Kanalblocker Iberiotoxin (0,1 μ mol/L) (▲) behandelt wurden. Die gepunktete Linie zeigt einen erhöhten Tonus der Gefäße nach Zugabe der Dreierkombination. Abgesehen von dieser Grundtonuszunahme unterscheiden sich die K-W-Kurven unter Blockade mittels 4-AP und XE991 beziehungsweise 4-AP, XE991 und Iberiotoxin nicht signifikant von den Kontrollgefäßen.

3.1.3.3 K_{ir} -Kanalblockade

Zur Blockade der K_{ir} -Kanäle wurde der Kanalinhibitor Bariumchlorid eingesetzt. Der Kanalblocker beeinflusste weder die $\log EC_{50}$ noch die E_{max} der Noradrenalin-K-W-Kurve (Tabelle 16; Abbildung 17).

Tabelle 16: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit des K_{ir} -Kanalblockers Bariumchlorid

| Ratte | $\log EC_{50}$ [mol/L] | E_{max} [relativ] |
|------------------------|------------------------|---------------------|
| NE | $-5,93 \pm 0,12$ | $1,44 \pm 0,05$ |
| NE + BaCl ₂ | $-6,02 \pm 0,10$ | $1,48 \pm 0,10$ |



3.1.3.4 K_{ATP} -Kanalblockade

Die Inhibition der K_{ATP} -Kanäle hatte keinen Einfluss auf die K-W-Kurve von Noradrenalin. Die zugehörigen Daten sind bei den scheinbehandelten Tieren im Kapitel „3.2.3 Effekt der K_{ATP} -Kanalblockade auf die Noradrenalinsensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten“ einzusehen.

3.1.3.5 Gemeinsame Blockade der Kaliumkanalklassen K_{Ca} , K_v , K_{ir} und K_{ATP}

Die gemeinsame Gabe der Kanalinhibitoren Iberiotoxin (BK-), TRAM-34 (IK-), Apamin (SK-), 4-Aminopyridin (K_v -), Bariumchlorid (K_{ir} -) und Glibenclamid (K_{ATP} -Kanäle) führte zu einer deutlichen Zunahme des Grundtonus der Gefäße ($56 \pm 9\%$ der K125-Spannung). Die $\log EC_{50}$ und die E_{max} der anschließenden Noradrenalin-K-W-Kurve wurden unter dem Einfluss des Kanalblockercocktails nicht verändert (Tabelle 17; Abbildung 18).

Tabelle 17: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der Kaliumkanalblocker der Klassen K_{Ca} , K_v , K_{ir} und K_{ATP}

| Ratte | $\log EC_{50}$ [mol/L] | E_{max} [relativ] |
|---------------------------------|------------------------|---------------------|
| NE | $-6,21 \pm 0,08$ | $1,57 \pm 0,06$ |
| NE + Kaliumkanalblockercocktail | $-6,07 \pm 0,16$ | $1,45 \pm 0,19$ |

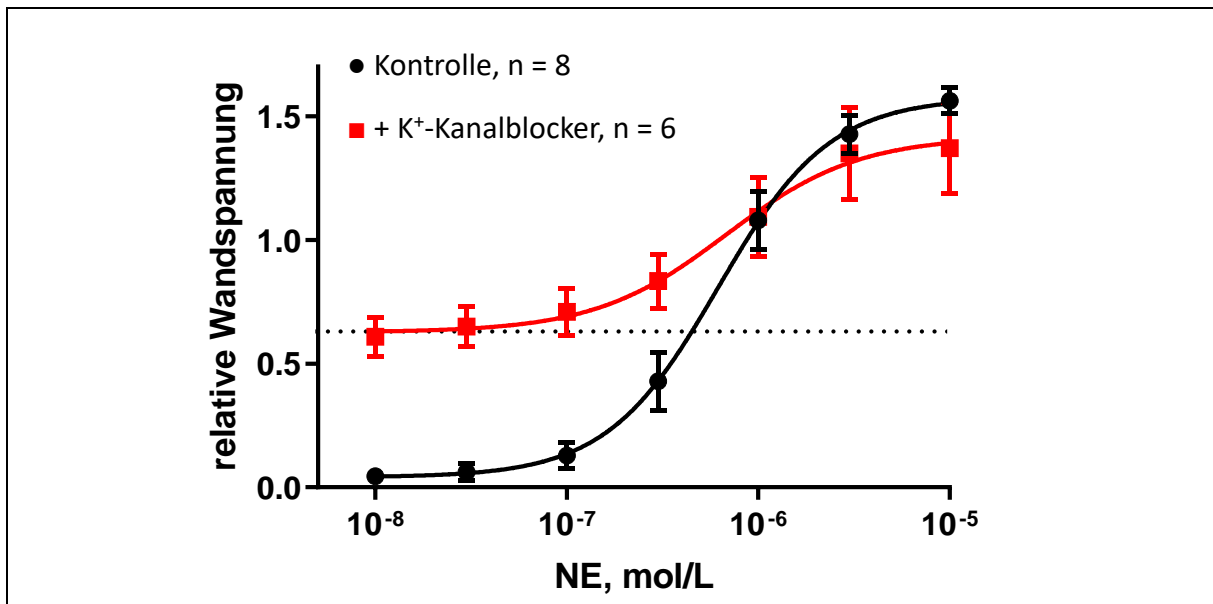


Abbildung 18: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne kombinierte Kaliumkanalblockade

Eingesetzt wurde ein Kaliumkanalblockercocktail bestehend aus Iberiotoxin ($0,1 \mu\text{mol/L}$), TRAM-34 ($1 \mu\text{mol/L}$), Apamin ($1 \mu\text{mol/L}$), 4-Aminopyridin (1mmol/L), Bariumchlorid ($30 \mu\text{mol/L}$) und Glibenclamid ($1 \mu\text{mol/L}$). Die Kontrollgefäße wurden mit der gleichen Menge DMSO behandelt, wie sie im Kanalblockercocktail auch eingesetzt wurde. Die gepunktete Linie zeigt den erhöhten Tonus der Gefäße nach Zugabe der Kaliumkanalblocker. Abgesehen von dieser Zunahme des Gefäßtonus unmittelbar nach Blockergabe unterscheiden sich die K-W-Kurven mit und ohne Kaliumkanalblockade nicht signifikant voneinander.

3.1.4 Effekt der Kaliumkanalblockade auf die Forskolin-induzierte Vasodilatation

Um den Beitrag der Kaliumkanäle zu der cAMP-abhängigen Vasodilatation renaler Widerstandsgefäße zu untersuchen, wurde der Adenylatcyclaseaktivator Forskolin (For) in das Organbad des Myographen zu vorkontrahierten Rattengefäßen gegeben. Dabei wurden die Gefäße mit 3 $\mu\text{mol/L}$ des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin vorkontrahiert. Diese Vorkontraktion glich in ihrer Ausprägung der maximalen K125-induzierten Kontraktion. Durch die kumulative Gabe von Forskolin konnte die Vorkontraktion vollständig aufgehoben werden (Abbildung 19). Als Kontrolle wurden an denselben Gefäßen Versuche durchgeführt, bei denen zu den entsprechenden Zeiten nur äquivalente Mengen des Lösungsmittels DMSO dem Organbad hinzugefügt wurden. Unter diesen Umständen wurde der durch Phenylephrin induzierte Tonus konstant gehalten, die Gefäße wurden durch das DMSO nicht geweitet (Abbildung 19).

Eine weitere Reihe von Gefäßen wurde nicht mit Phenylephrin, sondern mit einer kaliumreichen Pufferlösung mit einer Kaliumionenkonzentration von 64 mmol/L (K64) vorkontrahiert. Diese Konzentration wurde gewählt, da die Gefäße in der K64-Lösung so stark kontrahierten wie unter den Bedingungen der K125-Lösung, im Gegensatz zu dieser aber über einen längeren Zeitraum in der Lage waren, eine höhere Spannung zu halten. In diesem kaliumreichen Milieu führte die kumulative Forskolingabe zu einem signifikanten Abfall der Gefäßwandspannung ($p = 0,0003$) (Abbildung 19). Im Vergleich zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßen war die Vasodilatation jedoch signifikant schwächer ($p < 0,001$).

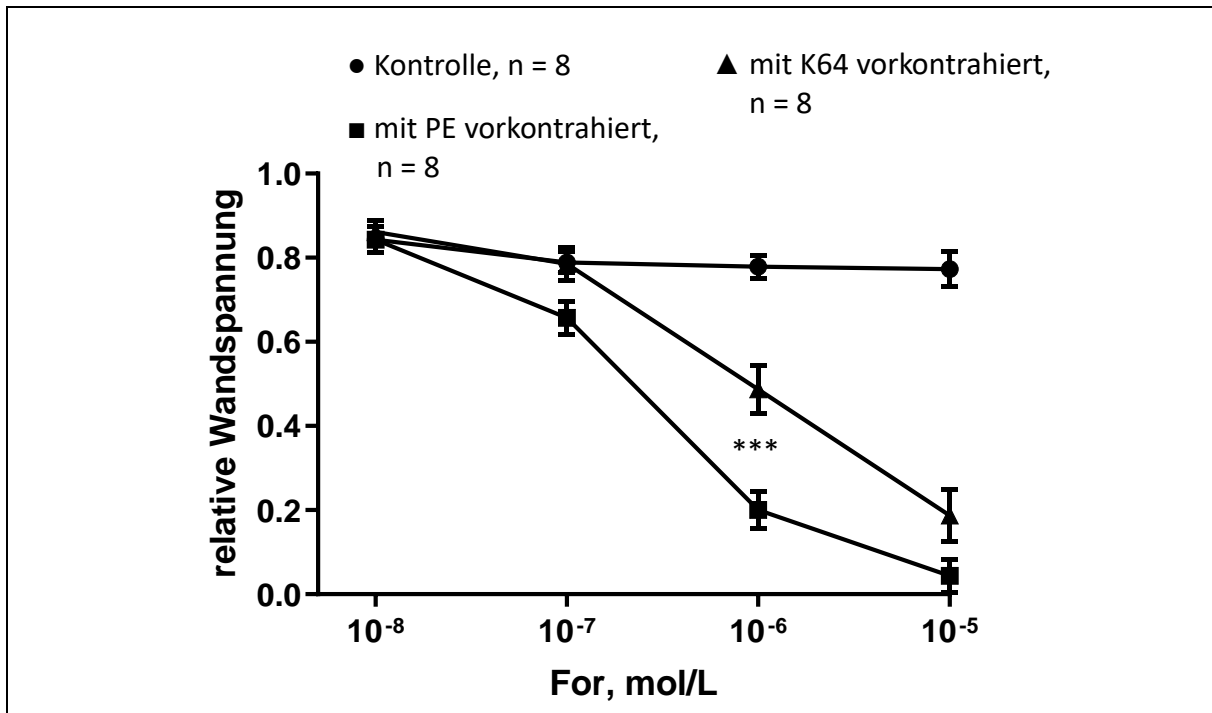


Abbildung 19: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte

Die Gefäße wurden entweder mit Phenylephrin (PE) (3 $\mu\text{mol/L}$) (■) oder mit einer 64 mmol/L K^+ -reichen Pufferlösung (K64) (▲) vorkontrahiert. Die Sternchen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied des Ausmaßes der Vasodilatation nach Forskolingabe zwischen den Gefäßen der Phenylephrin-Vorkontraktion und der K64-Vorkontraktion (***) ($p < 0,001$). Die Kontrollgefäße (●) wurden mit Phenylephrin (3 $\mu\text{mol/L}$) vorkontrahiert. Ihnen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten nur DMSO hinzugegeben. An den Kontrollgefäßen kam es zu keiner Vasodilatation.

Die abgeschwächte Vasodilatation unter den depolarisierten Bedingungen der K64-Lösung legt nahe, dass der Mechanismus der Hyperpolarisation bei der cAMP-vermittelten Vasodilatation eine entscheidende Rolle spielt. Um eine Beteiligung von Kaliumkanälen an diesem Mechanismus genauer zu untersuchen, wurden weitere Forskolin-K-W-Kurven unter Kaliumkanalblockade erstellt.

Die Blockade der BK-Kanäle mittels Iberiotoxin beeinflusste die Dilatation als Gefäßantwort auf die kumulative Forskolingabe nicht (Abbildung 20). Auch Glibenclamid, sowohl in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ als auch von 10 $\mu\text{mol/L}$, und 4-Aminopyridin hatten keinen Einfluss auf die Vasodilatation (Abbildung 21 + 22). Eine gemeinsame Blockade der K_{ATP} - und K_v -Kanäle erbrachte ebenfalls keinen Unterschied. Statistisch signifikant dagegen unterschied sich die Vasodilatation nach vorheriger Inkubation der Gefäße mit dem K_v7 -Kanallocker XE991 ($p = 0,0002$). Hierbei kam es sowohl zu einer Rechtsverschiebung der K-W-Kurve als auch zu einer insgesamt abgeschwächten Vasodilatation (Abbildung 23).

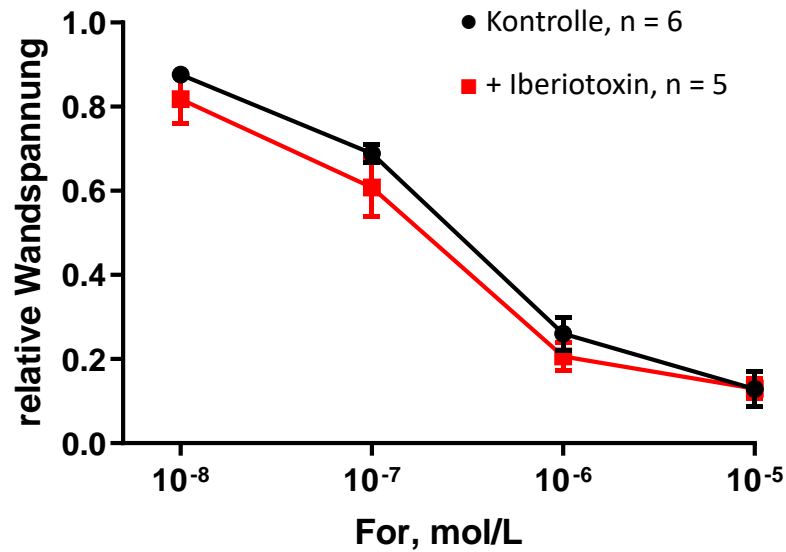


Abbildung 20: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade

Die Gefäße wurden mit Phenylephrin (3 $\mu\text{mol/L}$) vorkontrahiert. Zur Blockade der BK-Kanäle wurde Iberiotoxin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne BK-Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

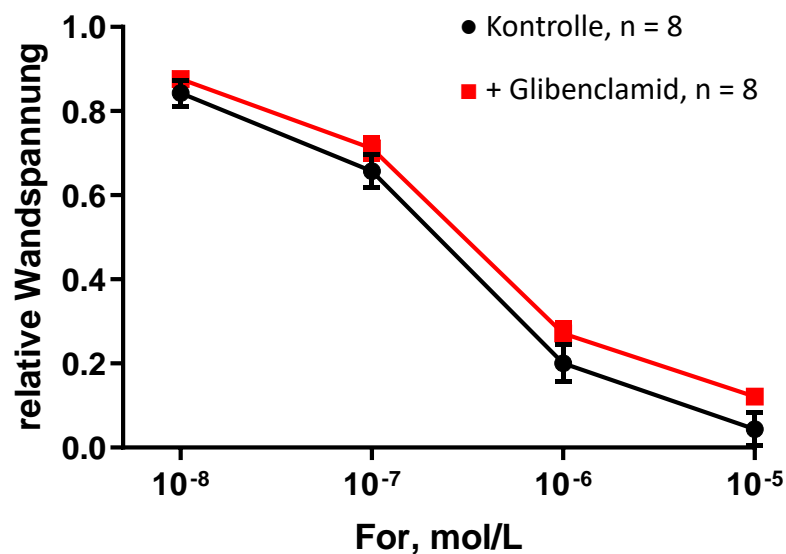


Abbildung 21: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ATP}-Kanalblockade

Die Gefäße wurden mit Phenylephrin (3 $\mu\text{mol/L}$) vorkontrahiert. Zur Blockade der K_{ATP}-Kanäle wurde Glibenclamid (1 $\mu\text{mol/L}$) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne K_{ATP}-Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

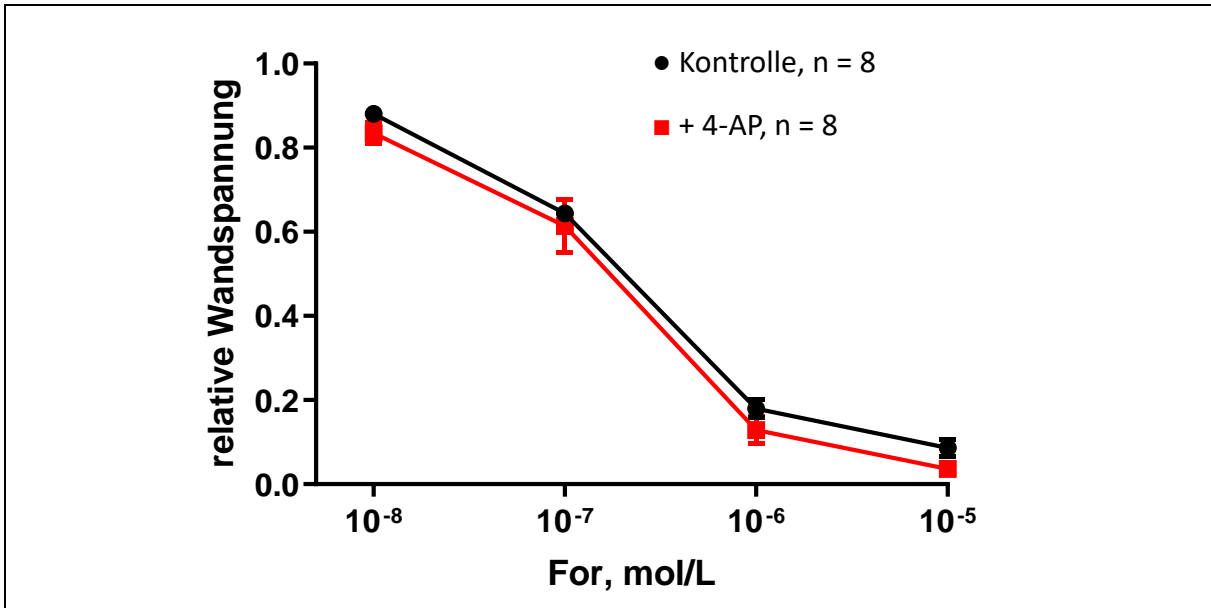


Abbildung 22: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v -Kanalblockade

Die Gefäße wurden mit Phenylephrin ($3 \mu\text{mol/L}$) vorkontrahiert. Zur Blockade der K_v -Kanäle wurde 4-Aminopyridin (4-AP) (1 mmol/L) verwendet. Die K-W-Kurven mit und ohne K_v -Kanalblockade unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

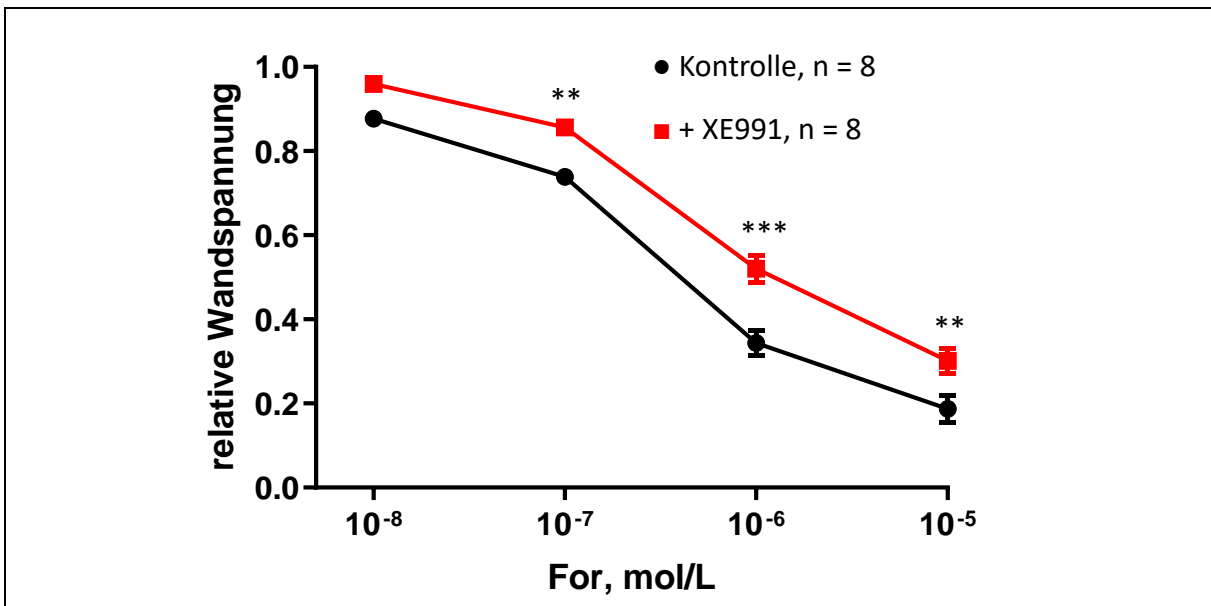
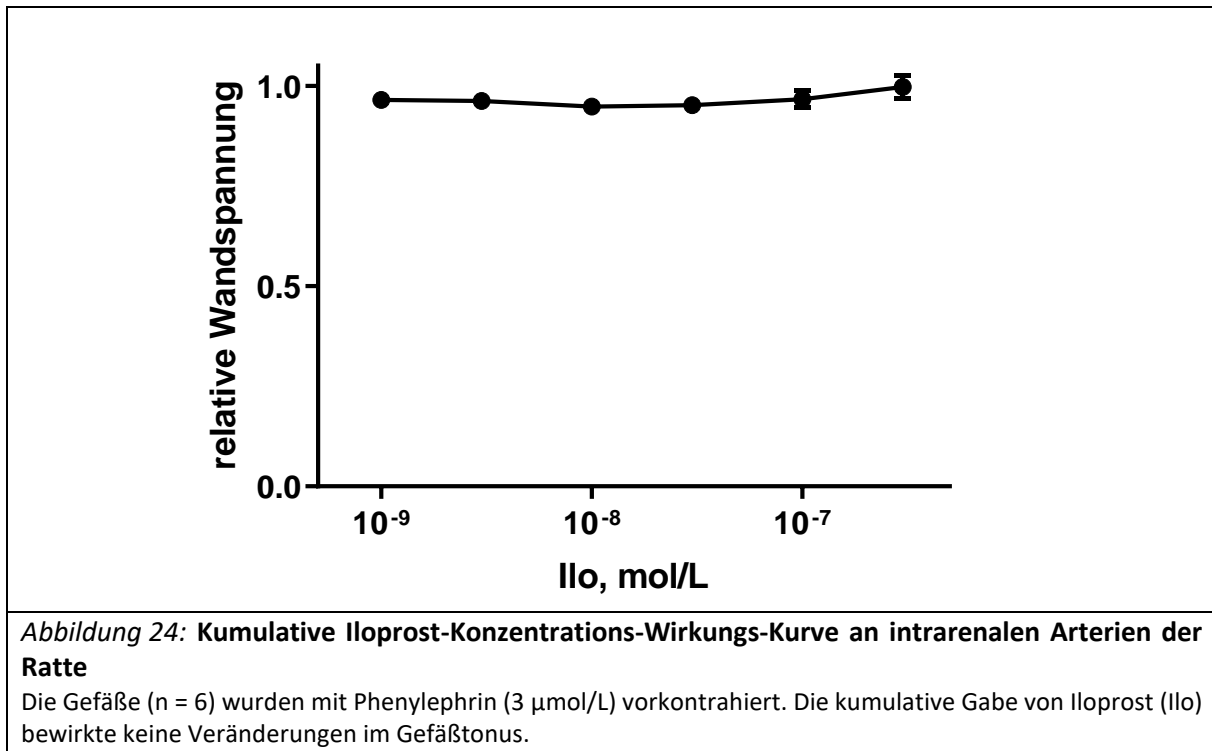


Abbildung 23: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v7 -Kanalblockade

Die Gefäße wurden mit Phenylephrin ($3 \mu\text{mol/L}$) vorkontrahiert. Zur Blockade der K_v7 -Kanäle wurde XE991 ($3 \mu\text{mol/L}$) verwendet. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Vasodilatation zwischen den XE991-behandelten und den Kontrollgefäßen (** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

3.1.5 Untersuchung der Iloprost-induzierten Vasodilatation

Als weitere Substanz zur Testung der Mechanismen der cAMP-abhängigen Vasodilatation in renalen Gefäßen wurde das Prostacyclinanalogon Iloprost (Ilo) eingesetzt. Eine kumulative Gabe dieser Substanz hatte bei den renalen Widerstandsarterien der Ratte keine Auswirkung auf den Tonus der Gefäße. Die Gefäßwandspannung wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten (Abbildung 24).



3.1.6 Zusammenfassung der Untersuchungen zum Effekt der Kaliumkanalblockade auf den Gefäßtonus renaler Widerstandsgefäße der Ratte

Die in Kapitel 3.1.1 bis 3.1.5 dargestellten Myographieexperimente zum Effekt der Kaliumkanalblockade auf den Gefäßtonus der Interlobararterien der Ratte sind in Tabelle 18 noch einmal zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 18: Effekte der Kaliumkanalblockaden auf den Gefäßtonus intrarenaler Arterien der Ratte

| Blockierter Kaliumkanal | Ruhtonus | S(-)-BayK-induzierte Vasokonstriktion | Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion | Forskolin-induzierte Vasodilatation |
|---|----------|---------------------------------------|--|-------------------------------------|
| BK | X | ✓ | X | X |
| IK | ✓ | ✓ | X | - |
| SK | ✓ | X | ✓ | - |
| K _v | X | gemeinsame Blockade ✓ | X | X |
| K _{v7} | ✓ | | - | ✓ |
| K _{ir} | X | X | X | - |
| K _{ATP} | X | X | X | X |
| K _{Ca} + K _v + K _{ir} + K _{ATP} | ✓ | - | X | - |

- ✓ : In dem Experiment ist ein signifikanter Effekt der Kaliumkanalblockade im Vergleich zur Kontrolle ohne Kanalblockade aufgetreten.
- X : In dem Experiment ist kein signifikanter Effekt der Kaliumkanalblockade im Vergleich zur Kontrolle ohne Kanalblockade aufgetreten.
- : Diese Versuchsbedingungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

3.2 Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte

Um die Folgen einer sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße und deren Tonusregulation zu untersuchen, wurden die verwendeten Ratten in vier verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt, in denen sie entweder sympathektomiert, scheinsympathektomiert, lokal renal denerviert oder scheindenerviert wurden. Die anschließend entnommenen Gefäße dieser Ratten wurden mittels Myographieexperimenten und qPCR-Analysen untersucht.

3.2.1 Effekt der sympathischen Denervierung auf die Noradrenalinsensitivität

Sowohl an den Gefäßen der sympathektomierten als auch an denen der lokal denervierten Ratten und ihrer jeweiligen Kontrollen wurden Noradrenalin-K-W-Kurven erstellt. Die Gefäße der sympathektomierten Gruppe zeigten dabei signifikant geringere $\log EC_{50}$ - und signifikant höhere E_{max} -Werte als die Gefäße der scheinsympathektomierten Tiere ($p = 0,01$ und $p = 0,006$) (Tabelle 19; Abbildung 25). Auch die Gefäße der lokal denervierten Tiere wiesen signifikant geringere $\log EC_{50}$ -Werte im Vergleich zu ihren Kontrollen auf ($p = 0,003$), in Bezug auf die E_{max} unterschieden sie sich nicht von den scheindenervierten Tieren (Tabelle 20; Abbildung 26).

3.2.2 Effekt der Hyperpolarisation (K_{ATP} -Kanalaktivierung) auf die Noradrenalinsensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten

Um zu testen, ob die beobachtete erhöhte Noradrenalinsensitivität der sympathektomierten und lokal denervierten Tiere auf einem depolarisierten Membranpotenzial beruht, wurde die Erstellung der K-W-Kurven unter dem Einfluss eines hyperpolarisierenden Stimulus, dem K_{ATP} -Kanalaktivator Levromakalim, wiederholt. Levromakalim führte in den Gefäßen der sympathektomierten, scheinsympathektomierten und lokal denervierten Tiere zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der K-W-Kurve ($p \log EC_{50}$ sympathektomiert = 0,00001, scheinsympathektomiert = 0,0002, denerviert = 0,00003). In der Gruppe der scheindenervierten Ratten zeigte sich ebenfalls die Tendenz einer Rechtsverschiebung, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($p = 0,1$) (Tabelle 19 + 20, Abbildung 25 + 26).

Um zu beurteilen, ob der Effekt der K_{ATP} -Kanalaktivierung an den Gefäßen der verschiedenen Rattengruppen unterschiedlich stark ausfiel, wurde untersucht, wie weit die

Noradrenalin-K-W-Kurve jeweils infolge der Levchromakalimgabe nach rechts verschoben wurde. Hierfür wurde der Delta-Wert der $\log EC_{50}$ -Werte ($\Delta \log EC_{50}$) bestimmt. Dieser gibt die Differenz zwischen den $\log EC_{50}$ -Werten der Noradrenalin-K-W-Kurven mit und ohne Levchromakalim an. Beim Vergleich der Delta-Werte der einzelnen Behandlungsgruppen wurde kein signifikant größerer Wert für die Gefäße sympathektomierter beziehungsweise lokal denervierter Ratten im Vergleich zu denen scheinbehandelter Ratten beobachtet (Tabelle 19 + 20).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Noradrenalin-K-W-Kurven ohne Levchromakalim (vgl. Kapitel 3.2.1) wiesen die Gefäße der lokal denervierten Tiere unter hyperpolarisierten Bedingungen keine erhöhte Noradrenalinsensitivität im Vergleich zu den Gefäßen ihrer scheinbehandelten Kontrolltiere auf (Tabelle 20). Auch bei den Gefäßen der sympathektomierten Ratten zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen $\log EC_{50}$ -Werte. Die E_{\max} -Werte der Gefäße sympathektomierter Tiere waren aber signifikant größer als die der Kontrolltiere ($p = 0,03$) (Tabelle 19).

Tabelle 19: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalaktivators Levcromakalim

| | logEC ₅₀ [mol/L] | E _{max} [relativ] | Δ logEC ₅₀ |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>sympathektomiert</i> | | | |
| NE | -6,46 ± 0,07 # | 1,88 ± 0,09 ## | |
| NE + Levcromakalim | -6,02 ± 0,06 *** | 1,70 ± 0,07 ***,+ | 0,44 |
| <i>scheinsympathektomiert</i> | | | |
| NE | -6,15 ± 0,08 | 1,56 ± 0,06 | |
| NE + Levcromakalim | -5,87 ± 0,07 *** | 1,46 ± 0,06 *** | 0,28 |

p < 0,05 und ## p < 0,01 sympathektomiert (DMX) vs. scheinsympathektomiert (S-DMX)

+ p < 0,05 DMX vs. S-DMX nach Levcromakalimgabe

*** p < 0,001 NE + Levcromakalim vs. NE

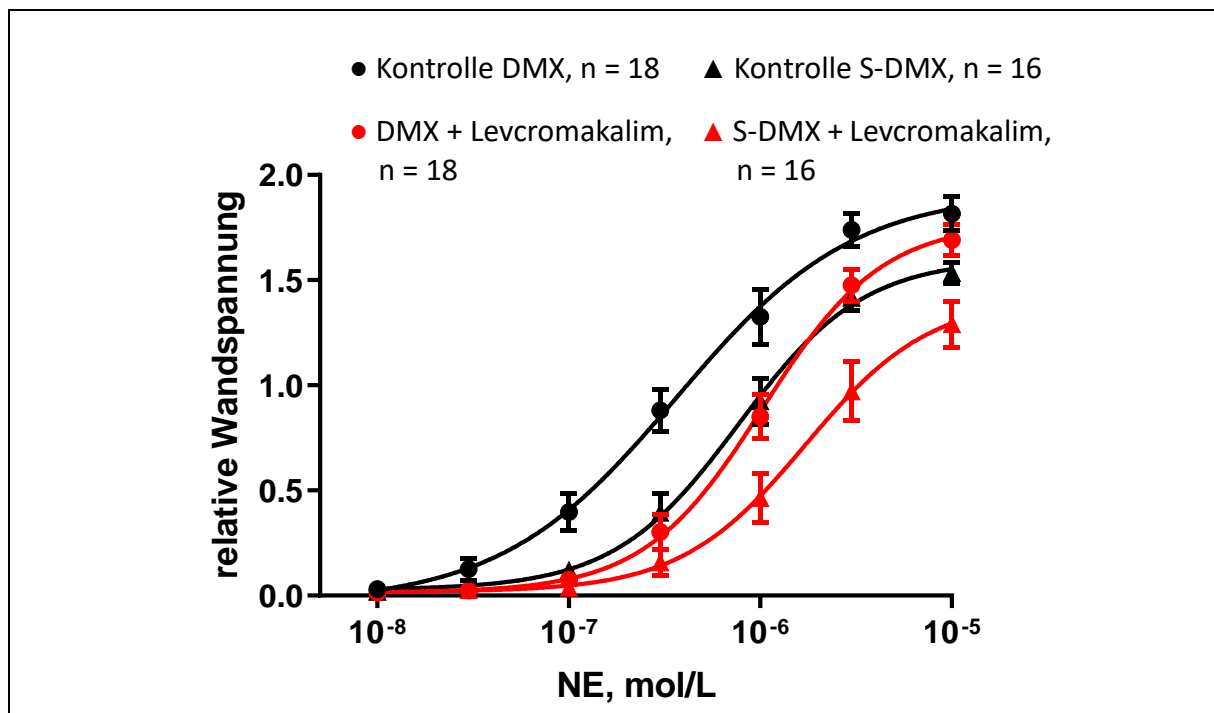


Abbildung 25: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne hyperpolarisierendem Stimulus (K_{ATP}-Kanalaktivierung)

Die K-W-Kurve ohne Levcromakalim an den Gefäßen der sympathektomierten Ratten (DMX) ist signifikant nach links verschoben im Vergleich zu den scheinsympathektomierten Kontrollen (S-DMX) (p < 0,05). Der K_{ATP}-Kanalaktivator Levcromakalim (1 µmol/L) führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve (p < 0,001).

Tabelle 20: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP} -Kanalaktivators Levchromakalim

| | $\log EC_{50}$ [mol/L] | E_{max} [relativ] | $\Delta \log EC_{50}$ |
|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>denerviert</i> | | | |
| NE | $-6,62 \pm 0,08$ ## | $1,60 \pm 0,06$ | |
| NE + Levchromakalim | $-6,04 \pm 0,05$ *** | $1,48 \pm 0,05$ ** | 0,58 |
| <i>scheindenenerviert</i> | | | |
| NE | $-6,13 \pm 0,13$ | $1,77 \pm 0,17$ | |
| NE + Levchromakalim | $-5,85 \pm 0,09$ | $1,47 \pm 0,06$ | 0,28 |

$p < 0,01$ denerviert vs. scheindenenerviert

** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ NE + Levchromakalim vs. NE

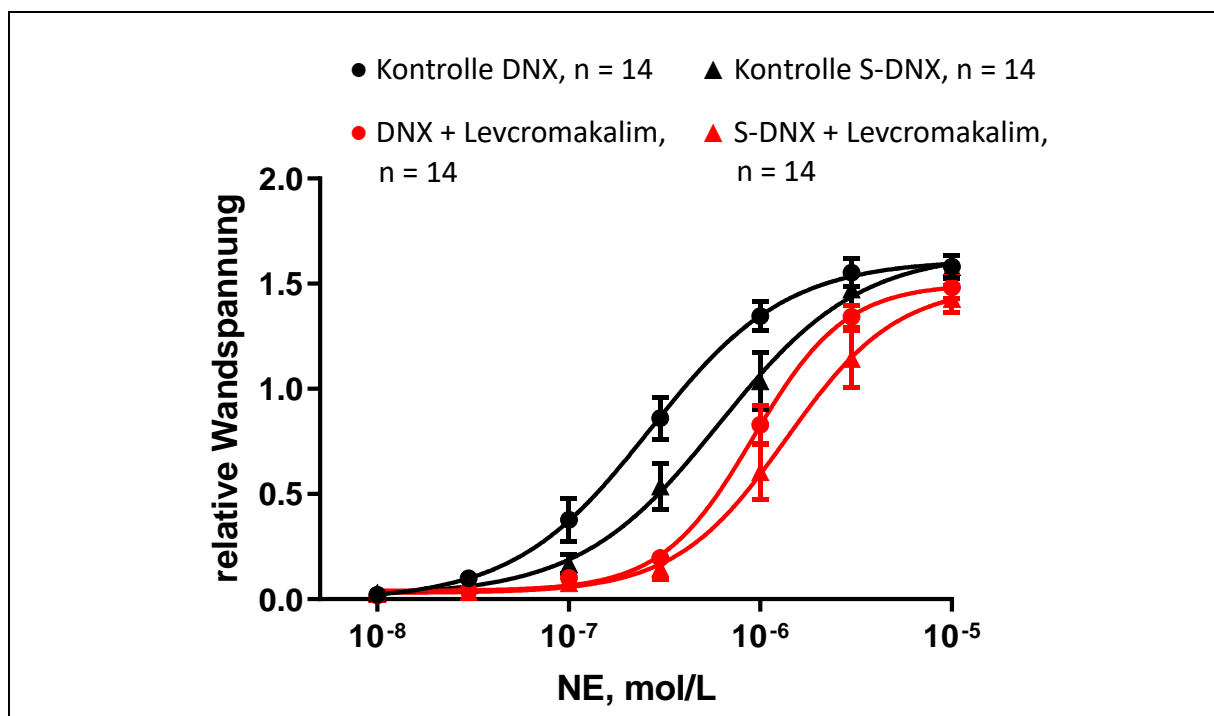


Abbildung 26: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne hyperpolarisierendem Stimulus (K_{ATP} -Kanalaktivierung)

Die K-W-Kurve ohne Levchromakalim an den Gefäßen der lokal denervierten Ratten (DNX) ist signifikant nach links verschoben im Vergleich zu den scheindenenervierten Kontrollen (S-DNX) ($p < 0,01$). Der K_{ATP} -Kanalaktivator Levchromakalim ($1 \mu\text{mol/L}$) führte an den Gefäßen der lokal denervierten Ratten zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve ($p < 0,001$), in den Gefäßen der scheindenenervierten Ratten zeigte sich nur eine Tendenz der Rechtsverschiebung.

Die K_{ATP} -Kanalaktivierung mittels Levchromakalim führte in den Gefäßen lokal denervierter Tiere zu einer Verringerung des Ruhetonus ($-1,7\%$, $p = 0,004$). In allen anderen Gruppen wurde dies nicht beobachtet. Eine Zwei-Faktoren-Varianzanalyse und der Vergleich der

Delta-Werte der Ruhetonusänderungen (Δ Basislinie = BL nach Levromakalim – BL vor Levromakalim) zwischen den Gefäßen denervierter Tiere und ihrer Kontrollen zeigte, dass diese Unterschiede im Effekt der K_{ATP} -Kanalaktivierung auf den Ruhetonus keine statistische Signifikanz erreichten.

3.2.3 Effekt der K_{ATP} -Kanalblockade auf die Noradrenalinsensitivität renaler Widerstandsgefäße sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten

Teile aus der Arbeit von Heumann et al.²² könnten auf einen veränderten Beitrag der K_{ATP} -Kanäle zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße nach sympathischer Denervierung hindeuten. Zur Analyse eines veränderten Einflusses der K_{ATP} -Kanäle wurden deshalb Noradrenalin-K-W-Kurven in An- und Abwesenheit des K_{ATP} -Kanalblockers Glibenclamid erstellt. Dabei zeigte sich, dass die Blockade der K_{ATP} -Kanäle weder in den Gefäßen der sympathektomierten oder lokal denervierten Ratten noch in ihren jeweiligen Kontrollen einen Einfluss auf die Noradrenalin-K-W-Kurve hatte (Tabelle 21 + 22; Abbildung 27 + 28). Zudem konnte in keiner der Gruppen ein signifikanter Einfluss auf den Gefäßruhetonus nachgewiesen werden.

Tabelle 21: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalblockers Glibenclamid

| | logEC ₅₀ [mol/L] | E _{max} [relativ] |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>sympathektomiert</i> | | |
| NE | -6,52 ± 0,09 ### | 1,92 ± 0,06 ### |
| NE + Glibenclamid | -6,53 ± 0,09 ## | 1,98 ± 0,05 ### |
| <i>scheinsympathektomiert</i> | | |
| NE | -6,11 ± 0,05 | 1,54 ± 0,05 |
| NE + Glibenclamid | -6,11 ± 0,11 | 1,54 ± 0,04 |

p < 0,01 und ### p < 0,001 sympathektomiert vs. scheinsympathektomiert

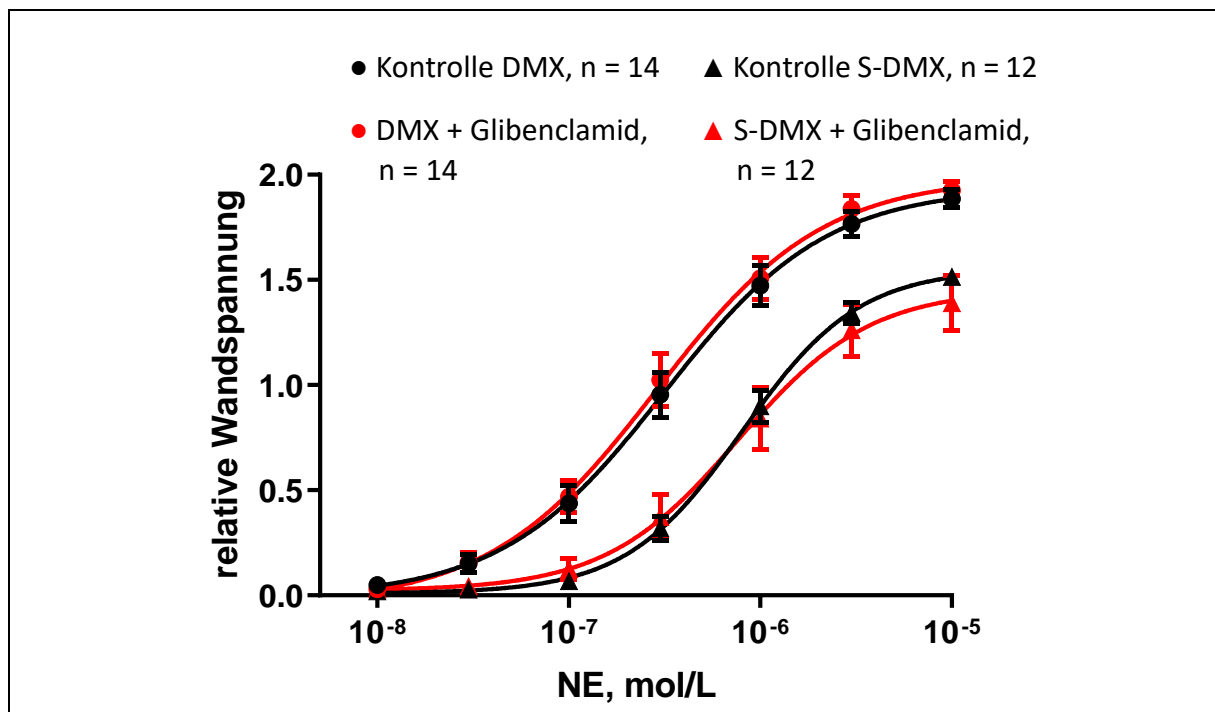


Abbildung 27: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne K_{ATP}-Kanalblockade

Die K-W-Kurven an den Gefäßen der sympathektomierten Ratten (DMX) sind signifikant nach links verschoben im Vergleich zu den scheinsympathektomierten Kontrollen (S-DMX) (p < 0,001). Der K_{ATP}-Kanalblocker Glibenclamid (1 μmol/L) führte in beiden Gruppen zu keiner Verschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve.

Tabelle 22: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalblockers Glibenclamid

| | logEC ₅₀ [mol/L] | E _{max} [relativ] |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>denerviert</i> | | |
| NE | -6,85 ± 0,10 ### | 1,67 ± 0,07 |
| NE + Glibenclamid | -6,85 ± 0,10 ### | 1,68 ± 0,07 |
| <i>scheindenerviert</i> | | |
| NE | -6,14 ± 0,10 | 1,66 ± 0,14 |
| NE + Glibenclamid | -6,20 ± 0,12 | 1,48 ± 0,07 |

p < 0,001 denerviert vs. scheindenerviert

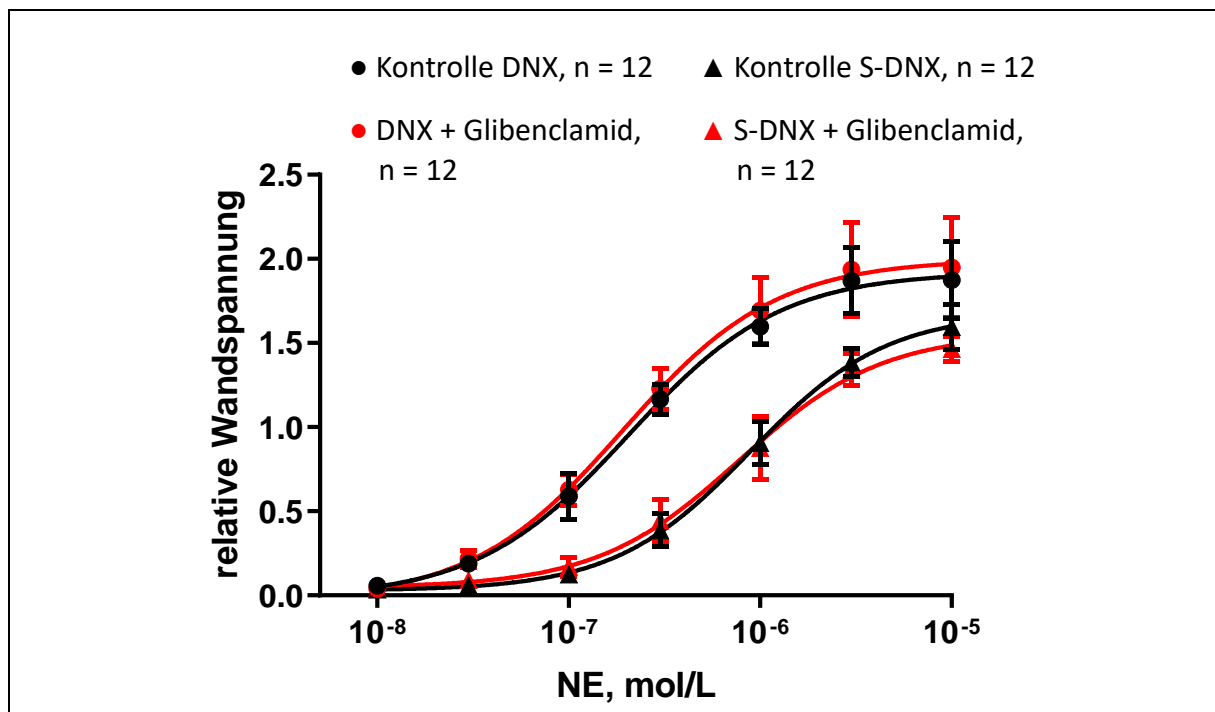


Abbildung 28: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne K_{ATP}-Kanalblockade

Die K-W-Kurven an den Gefäßen der lokal denervierten Ratten (DNX) sind signifikant nach links verschoben im Vergleich zu den scheindenervierten Kontrollen (S-DNX) (p < 0,001). Der K_{ATP}-Kanalblocker Glibenclamid (1 µmol/L) führte in beiden Gruppen zu keiner Verschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve.

3.2.4 mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen sympathektomierter, denervierter und scheinbehandelter Ratten

Zur Untersuchung der Expression der einzelnen Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle $K_{ir6.1}$, $K_{ir6.2}$, SUR1 und SUR2 wurden qPCR-Untersuchungen an den Gefäßen der sympathektomierten Ratten und der jeweiligen Kontrolltiere durchgeführt.

Für jede der genannten Kanaluntereinheiten wurde ein C_t -Wert, der von der Ausgangsmenge an cDNA und somit indirekt von der mRNA-Menge abhängt, bestimmt. Die niedrigsten C_t -Werte fanden sich für die Kanaluntereinheiten $K_{ir6.1}$ und SUR2, die höchsten für $K_{ir6.2}$ und SUR1. Die ermittelten C_t -Werte sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: C_t -Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten (n = 6) und ihrer Kontrollen (n = 5)

| | C_t-Werte sympathektomierter Ratten [Zyklen] | C_t-Werte schein sympathektomierter Ratten [Zyklen] |
|-------------------------------|--|---|
| $K_{ir6.1}$ | 22,6 | 22,4 |
| $K_{ir6.2}$ | 24,6 | 25,3 |
| SUR1 | 26,7 | 26,2 |
| SUR2 | 21,8 | 21,4 |

Nach Normierung der Daten auf die Expressionsrate der Haushaltsgene YWHAZ und PBGD ergab sich für keine der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten ein signifikanter Unterschied im mRNA-Gehalt zwischen den Gefäßen der sympathektomierten und denen der schein sympathektomierten Tiere (Abbildung 29).

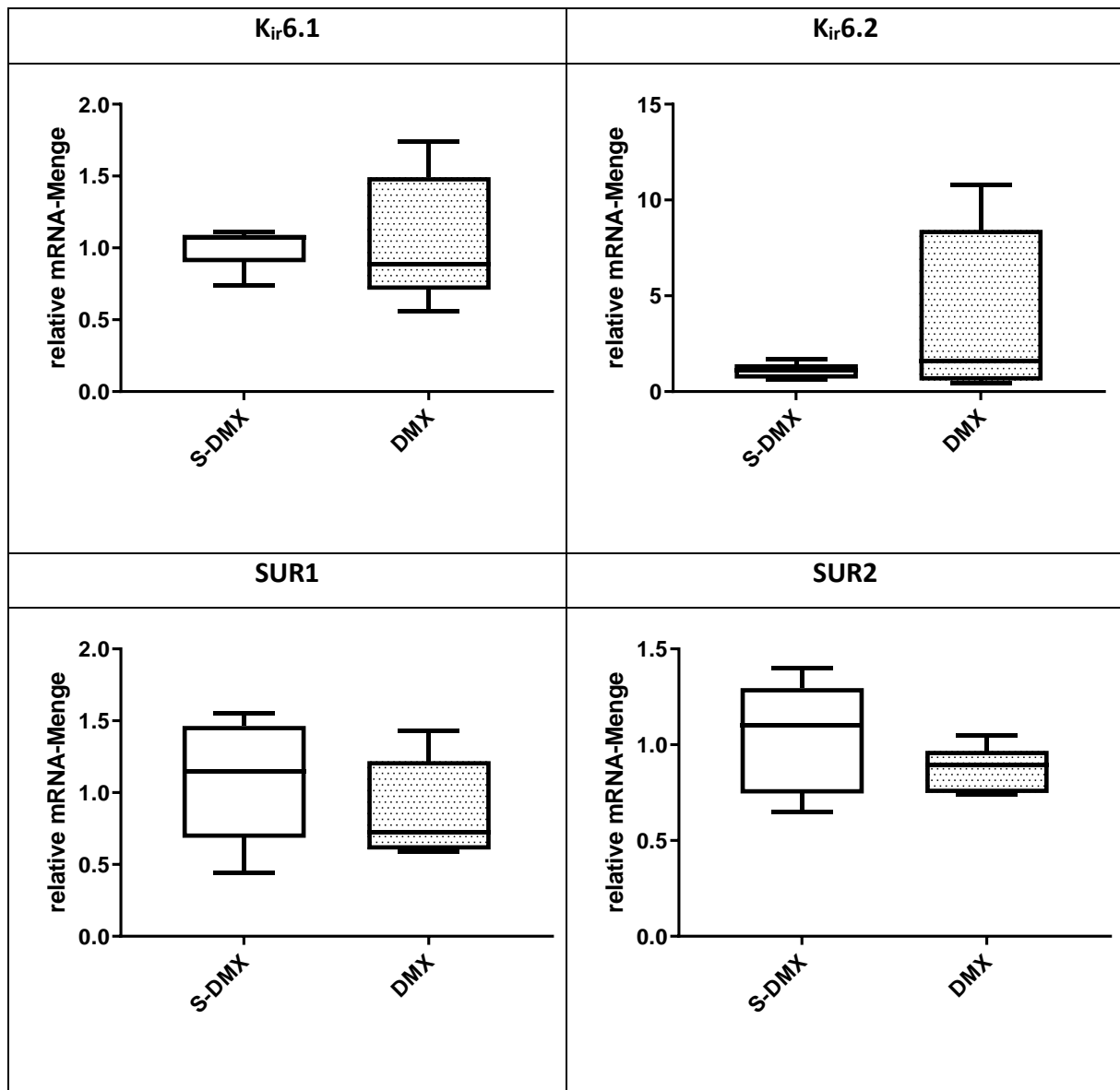


Abbildung 29: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen

Es wurden Gefäße von sympathektomierten (DMX, n = 6) und scheinsympathektomierten (S-DMX, n = 5) Ratten untersucht. Der mRNA-Gehalt der einzelnen Untereinheiten ist jeweils als relativer mRNA-Gehalt bezogen auf die gemessenen mRNA-Gehalte der Haushaltsgene YWHAZ und PBGD dargestellt. Die mittlere Linie einer Box zeigt den Medianwert an, die Antennen stellen das 2,5 %- beziehungsweise das 97,5 %-Perzentil dar. Für keine der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten ergab sich ein signifikanter Unterschied der mRNA-Gehalte zwischen den sympathektomierten und scheinsympathektomierten Tieren.

Auch in den Gefäßen der lokal denervierten Ratten und ihrer Kontrollen wurden qPCR-Untersuchungen durchgeführt und die Amplifikation aller K_{ATP} -Kanaluntereinheiten nachgewiesen. Für $K_{ir6.1}$ und SUR2 ergaben sich dabei die niedrigsten C_t -Werte. Die C_t -Werte aller K_{ATP} -Kanaluntereinheiten sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: C_t -Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten (n = 5-6) und ihrer Kontrollen (n = 5-6)

| | C_t-Werte lokal denervierter Ratten [Zyklen] | C_t-Werte scheindenervierter Ratten [Zyklen] |
|-------------------------------|--|--|
| $K_{ir6.1}$ | 22,6 | 22,5 |
| $K_{ir6.2}$ | 24,5 | 24,4 |
| SUR1 | 27,7 * | 26,6 |
| SUR2 | 22,5 | 21,9 |

* $p < 0,05$ denerviert vs. scheindenerviert

Nach Normierung der Daten auf die Expressionsrate der Haushaltsgene YWHAZ und PBGD zeigten die Gefäße der denervierten Tiere ein signifikant geringeres mRNA-Level für SUR1 als die Gefäße der scheindenervierten Tiere ($p = 0,01$). Die mRNA-Gehalte der anderen drei Kanaluntereinheiten unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abbildung 30).

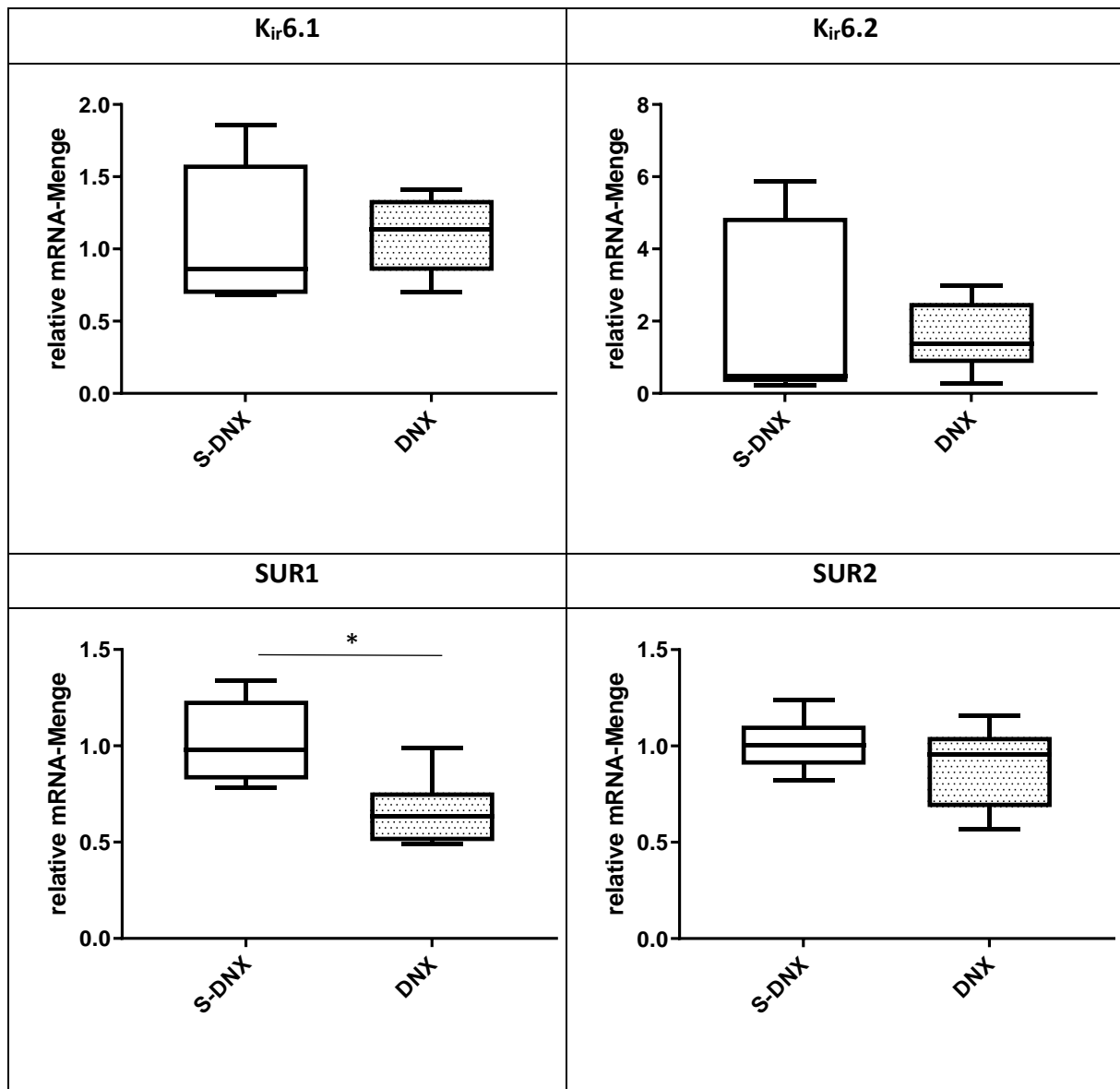


Abbildung 30: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen

Es wurden Gefäße von lokal denervierten (DNX, $n = 5-6$) und scheidenervierten (S-DNX, $n = 5-6$) Ratten untersucht. Der mRNA-Gehalt der einzelnen Untereinheiten ist jeweils als relativer mRNA-Gehalt bezogen auf die gemessenen mRNA-Gehalte der Haushaltsgene YWHAZ und PBGD dargestellt. Die mittlere Linie einer Box zeigt den Medianwert an, die Antennen stellen das 2,5 %- beziehungsweise das 97,5 %-Perzentil dar. Das Sternchen zeigt einen signifikanten Unterschied des relativen mRNA-Gehalts für SUR1 in den Gefäßen der denervierten Tiere im Vergleich zu den Gefäßen der scheidenervierten Ratten (* $p < 0,05$). Für die anderen K_{ATP} -Kanaluntereinheiten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5 Vergleich der Folgen von systemischer Sympathektomie und lokaler renaler Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte

Der Einfluss der sympathischen Denervierung auf die renalen Widerstandsgefäße und ihre Tonusregulation wurde sowohl an Gefäßen neonatal sympathektomierter Ratten als auch an Gefäßen lokal renal denervierter Ratten untersucht. Ein Vergleich der an den unterschiedlich behandelten Gruppen erhobenen Befunde zeigt, dass sich weder für die Depolarisations-induzierten Maxima (gemessen nach Zugabe der K125-Lösung) noch für die $\log EC_{50}$ und die E_{\max} der Noradrenalin-K-W-Kurven signifikante Unterschiede zwischen den Gefäßen der sympathektomierten Tiere und denen lokal denervierter Tiere ergaben (Tabelle 25). Weiterhin reagierten alle Gefäße auf die Aktivierung und Blockade der K_{ATP} -Kanäle in gleicher Weise. Bei den Untersuchungen der mRNA-Gehalte zeigte sich für die Kanaluntereinheit SUR1 ein signifikant geringerer mRNA-Gehalt in den Gefäßen der denervierten Tiere im Vergleich zu denen sympathektomierter Ratten ($p = 0,02$). Für die anderen K_{ATP} -Kanaluntereinheiten wurden keine Unterschiede im mRNA-Gehalt gemessen.

Tabelle 25: Vergleich der K125-Maxima und der $\log EC_{50}$ - und E_{\max} -Werte der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion zwischen intrarenalen Arterien systemisch sympathektomierter und lokal renal denervierter Ratten

| | K125-Maximum [mN/mm] | $\log EC_{50}$ [mol/L] | E_{\max} [relativ] |
|-------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| sympathektomiert | 2,47 ± 0,23 | - 6,57 ± 0,06 | 1,8 ± 0,05 |
| denerviert | 2,07 ± 0,21 | - 6,67 ± 0,06 | 1,67 ± 0,1 |

3.3 Untersuchungen an renalen Widerstandsgefäßen des Menschen

3.3.1 K_{ATP} -Kanäle in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen

Um das Vorhandensein und die Funktionalität von K_{ATP} -Kanälen in menschlichen intrarenalen Widerstandsarterien zu testen, wurden sowohl qPCR-Analysen als auch Myographieexperimente an Aa. arcuatae und Aa. interlobulares durchgeführt.

3.3.1.1 mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsgefäßen des Menschen

Die qPCR-Experimente zeigten das Vorhandensein von mRNA der einzelnen Untereinheiten $K_{ir6.1}$, $K_{ir6.2}$, SUR1, SUR2A und SUR2B der vaskulären K_{ATP} -Kanäle sowohl in den Aa. arcuatae als auch in den Aa. interlobulares der menschlichen Niere. Die niedrigsten C_t -Werte ergaben sich für $K_{ir6.1}$ und SUR2B, der höchste für SUR2A. Die C_t -Werte sind in Tabelle 26 und Abbildung 31 dargestellt.

Tabelle 26: C_t -Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in Aa. arcuatae (n = 6-7) und Aa. interlobulares (n = 6-7) des Menschen

| | C_t -Werte in Aa. arcuatae [Zyklen] | C_t -Werte in Aa. interlobulares [Zyklen] |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|
| $K_{ir6.1}$ | 24,9 | 25,6 |
| $K_{ir6.2}$ | 27,7 | 27,6 |
| SUR1 | 27,4 | 27,7 |
| SUR2A | 32,8 | 33,3 |
| SUR2B | 23,8 | 24,5 |

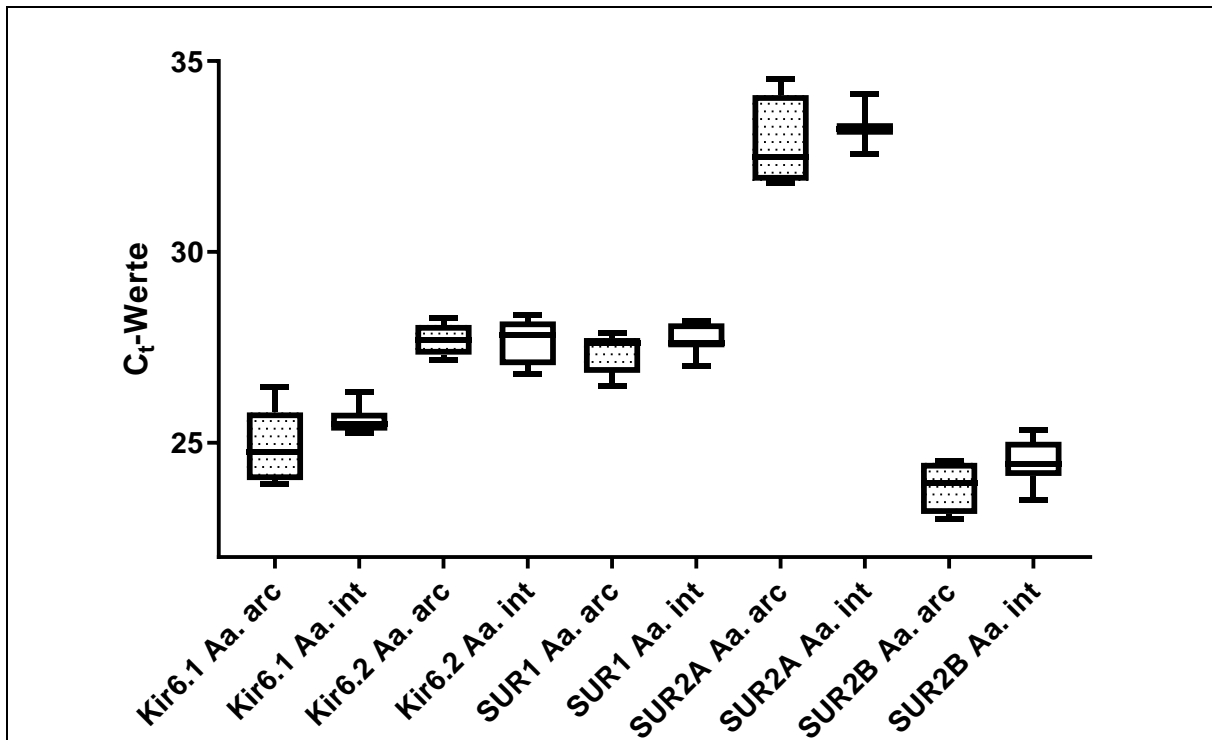


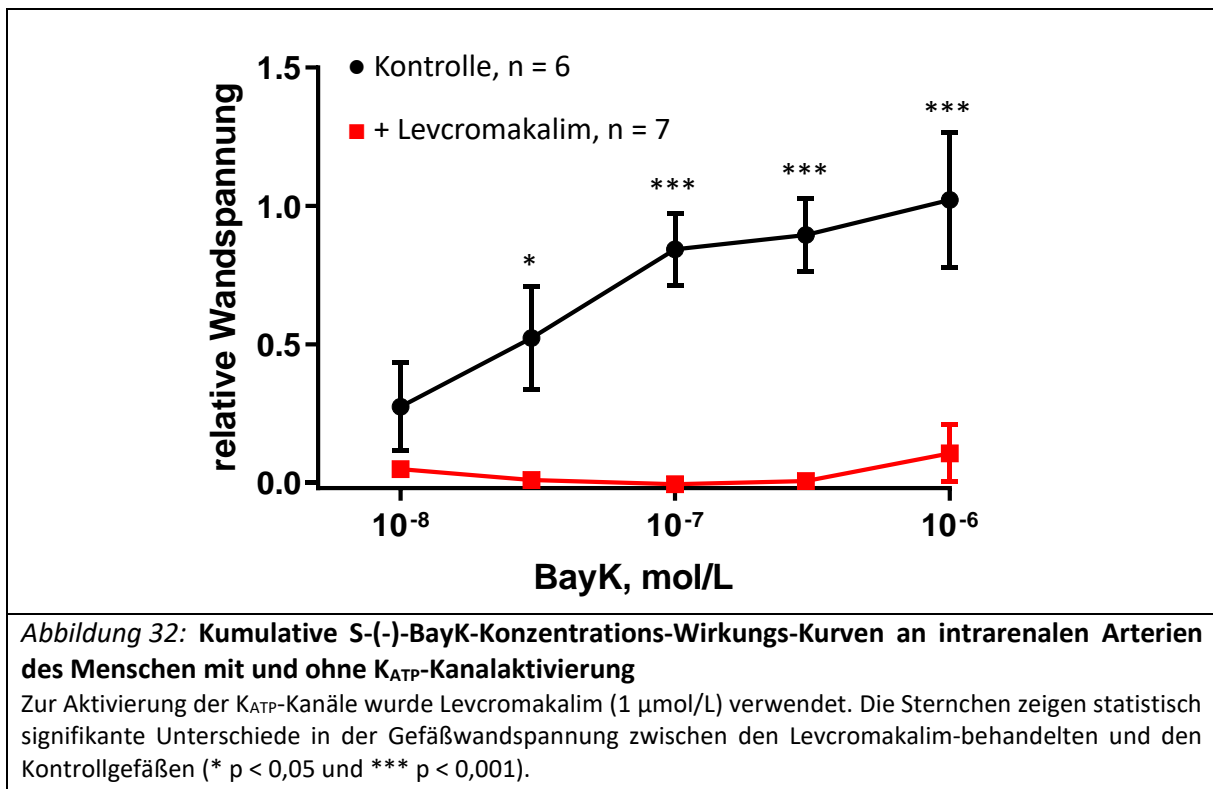
Abbildung 31: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien des Menschen

Untersucht wurden die mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in Aa. arcuatae (Aa. arc, n = 6-7) und Aa. interlobulares (Aa. int, n = 6-7) des Menschen. Die absoluten C_t -Werte der einzelnen Untereinheiten sind als Boxplots dargestellt. Die mittlere Linie einer Box zeigt den Medianwert an, die Antennen stellen das 2,5 %- beziehungsweise das 97,5 %-Perzentil dar.

3.3.1.2 Effekt der K_{ATP} -Kanalaktivierung auf die S(-)-BayK-induzierte Vasokonstriktion

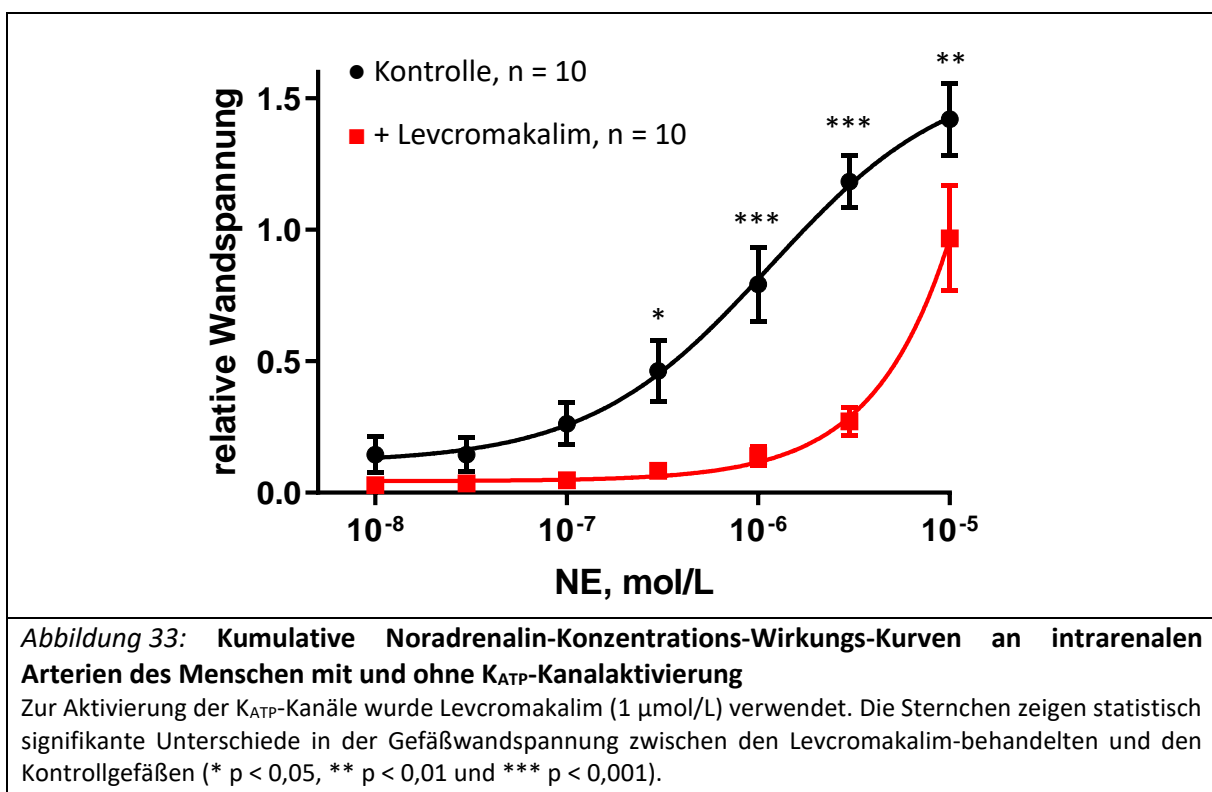
Da sich die Aa. arcuatae in den Ergebnissen der Myographieexperimente nicht signifikant von den Aa. interlobulares unterschieden, wurden die gemessenen Werte beider Arteriensegmente zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet.

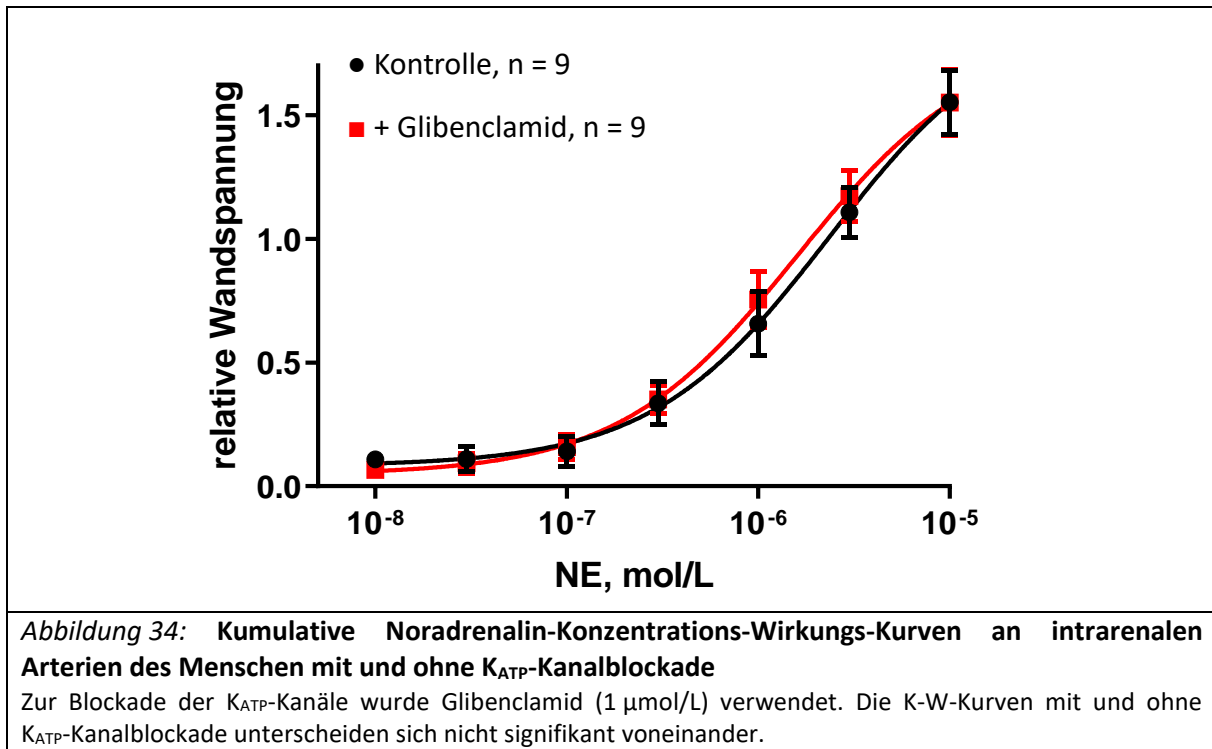
In der Myographie kam es durch die kumulative Zugabe von S(-)-BayK zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Gefäßtonus der menschlichen intrarenalen Arterien. Der K_{ATP} -Kanalaktivator Levchromakalim führte zu keiner signifikanten Zunahme des Ruhetonus der Gefäße, verhinderte aber nahezu vollständig die Gefäßkonstriktion nach den S(-)-BayK-Gaben ($p = 0,0005$) (Abbildung 32).



3.3.1.3 Effekt der K_{ATP} -Kanalaktivierung und -blockade auf die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion

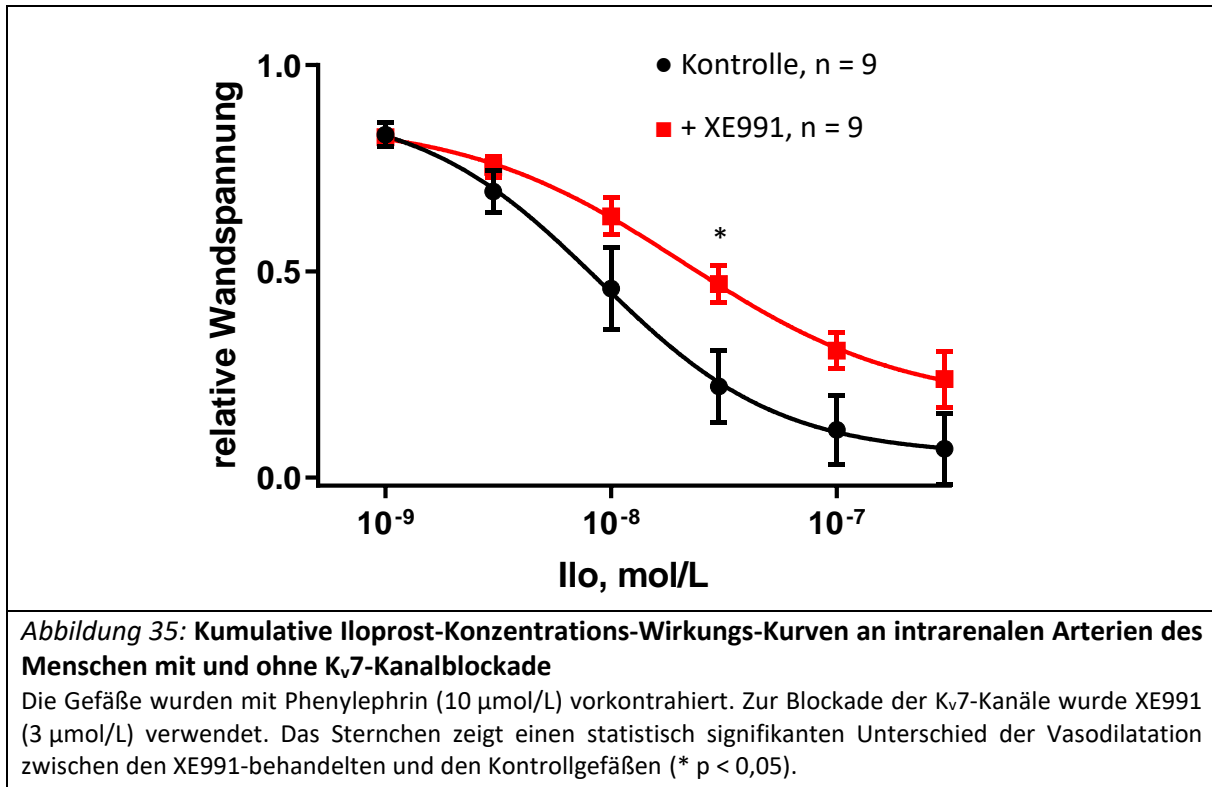
Die Gabe von Noradrenalin in aufsteigender Konzentration führte in den menschlichen Widerstandsarterien zu einer konzentrationsabhängigen Tonuszunahme. Nach Applikation von Levromakalim kam es zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve und es zeigte sich eine signifikante Abschwächung der maximalen Gefäßwandspannung ($p = 0,0002$) (Abbildung 33). Die Blockade der K_{ATP} -Kanäle mittels Glibenclamid hingegen führte nicht zu veränderten Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktionen (Abbildung 34).





3.3.2 Effekt der K_v7 -Kanalblockade auf die Iloprost-induzierte Vasokonstriktion

Die cAMP-abhängige Vasodilatation in den intrarenalen Arterien des Menschen wurde mittels Iloprost untersucht. An Phenylephrin-vokontrahierten Gefäßen zeigte sich bei kumulativer Iloprost-Gabe eine deutliche, konzentrationsabhängige Vasodilatation. Der K_v7 -Kanalblocker XE991 schwächte diese Dilatation signifikant ab ($p = 0,047$) (Abbildung 35).



4 Diskussion

Den Kaliumkanälen in den Widerstandsgefäßen der Niere wird eine Bedeutung in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, unter anderem der Hypertonie, zugeschrieben²⁰. Um diese Krankheiten besser zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist es von Bedeutung, die Funktionsweisen der verschiedenen Kanäle unter physiologischen Bedingungen zu kennen und zu wissen, in welche funktionellen Abläufe sie eingebunden sind. Der Besatz der Endothel- und Gefäßmuskelzellmembran mit den unterschiedlichen Kaliumkanalklassen differiert zwischen verschiedenen Arteriensegmenten und Organkreisläufen^{29,91}, sodass sich Arterien aus unterschiedlichen Körperregionen hinsichtlich der an der Tonusregulation beteiligten Mechanismen unterscheiden. Aufgrund der eingangs erläuterten Bedeutung der Widerstandsgefäße der Niere für die Blutdruckregulation wurde in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf dieses Gefäßbett gelegt. Als Teil umfangreicherer Forschungsarbeiten sollen die thematisierten Fragestellungen und die dargestellten Ergebnisse langfristig dazu beitragen, die Beteiligung der Kaliumkanäle an der Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße besser zu charakterisieren und die Bedeutung der sympathischen Innervation dieses Gefäßbetts für den Bluthochdruck zu definieren.

4.1 Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte

4.1.1 Beitrag von Kaliumkanälen zum Ruhetonus

Der basale Tonus (Ruhetonus) der renalen Widerstandsgefäße spielt eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System, da er unter anderem zur Lage des arteriellen Blutdrucks beiträgt. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, hängt der Widerstand in einem Gefäßsystem entscheidend vom Gefäßdurchmesser und somit vom Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen, also vom Gefäßtonus, ab. Der Kontraktionszustand wiederum wird durch das Membranpotenzial in den Muskelzellen bestimmt, auf dessen Höhe die Offenwahrscheinlichkeit verschiedener Ionenkanäle einen Einfluss hat. In den in Kapitel 3.1.1 dargestellten Myographieexperimenten zeigte sich eine deutliche Zunahme des Ruhetonus der renalen Widerstandsgefäße der Ratte nach gemeinsamer Blockade der K_{Ca} -, K_v -, K_{ir} - und K_{ATP} -Kanäle. Dies weist auf eine starke Beteiligung dieser Kanäle an der Aufrechterhaltung des Ruhetonus im genannten Gefäßbett hin. Die Tatsache, dass Kaliumkanalblocker zu einem sichtbaren Effekt führten, deutet darauf

hin, dass zumindest ein Teil der Kaliumkanäle unter physiologischen Bedingungen im offenen Zustand vorliegt. Durch diese geöffneten Kanäle können Kaliumionen aus der Zelle ausströmen und über die dabei stattfindende Verschiebung von positiven Ladungen Potenzialänderungen herbeiführen. Diese Potenzialänderungen bewirken Veränderungen im Tonus der glatten Muskulatur und haben damit schließlich einen Effekt auf die Gefäßweite und den Gefäßwiderstand. Um diese Annahme für einzelne Kaliumkanalklassen im Speziellen zu überprüfen, wurden die Kaliumkanalklassen jeweils mit spezifischen Blockern inhibiert und der Einfluss auf den Gefäßtonus in den intrarenalen Arterien der Ratte gemessen. Aus diesen Untersuchungen wurden die nachfolgenden Erkenntnisse gezogen:

Die alleinige Blockade calciumaktivierter Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit (BK-Kanäle) führte in den Myographieexperimenten zu keiner Zunahme des Grundtonus der Gefäße. Dies bestätigt In-vivo-Experimente von Magnusson et al., bei denen nach Infusion des BK-Kanalinhibitors Iberiotoxin keine Änderung des renalen Blutflusses verzeichnet wurde⁹². Allerdings steht dieser Beobachtung die Tatsache gegenüber, dass die BK-Kanalblockade Vasokonstriktionen erleichterte, die bei der kumulativen Gabe des L-Typ-Calciumkanalaktivators S(-)-BayK auftraten (siehe Kapitel 3.1.2). Diese genannten L-Typ-Calciumkanäle sind spannungsabhängig⁹³, sodass eine im Experiment gemessene erleichterte Aktivierung auf das Vorliegen eines depolarisierten Membranpotenzials hindeutet. Die Depolarisation infolge einer BK-Kanalblockade scheint folglich ein Ausmaß zu haben, das zu gering ist, um den Kontraktionszustand der Gefäßmuskelzellen direkt zu verändern, aber groß genug, um die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle bei einem externen Stimulus zu erleichtern. Dies deutet auf einen nur geringen Beitrag der BK-Kanäle zur Lage des Ruhemembranpotenzials hin. Gestützt wird diese Überlegung dadurch, dass BK-Kanäle bei Membranpotenzialen zwischen -50 und -70 mV eine intrazelluläre Calciumkonzentration zwischen 1 und 10 $\mu\text{mol/L}$ für ihre Aktivierung benötigen¹⁴. Diese Konzentration ist höher, als sie üblicherweise im Intrazellulärraum ruhender Zellen vorkommt⁴⁶, und macht deshalb eine hohe Ruheaktivität der Kanäle unwahrscheinlich. Pérez et al. weisen aber darauf hin, dass durch Calciumionen, die aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in der Nähe der Zellmembran ausströmen, lokal begrenzt eine ausreichend hohe Calciumkonzentration erreicht werden kann, um die BK-Kanäle zu aktivieren⁹⁴. Dies bedeutet, dass ein Teil der BK-Kanäle unter physiologischen Bedingungen

im offenen Zustand vorliegt und erklärt den geringen Beitrag am Membranpotenzial der Zellen.

Eine größere Bedeutung als für den Aufbau des Membranpotenzials wird den BK-Kanälen für die Stabilisierung des Membranpotenzials im Sinne eines Feedback-Mechanismus zugeschrieben^{95,96}. Auch Ergebnisse dieser Arbeit stützen eine solche These: Während unter K_v -Kanalblockade keine oder nur geringe (K_v7) Veränderungen des Ruhetonus auftraten, konnte nach zusätzlicher Blockade der BK-Kanäle ein Anstieg des Grundtonus auf 29 % der maximalen K125-Spannung verzeichnet werden. Dies ist zum Teil der Ausschaltung der BK-Kanal aktivierenden Eigenschaft des eingesetzten K_v -Kanalblockers 4-Aminopyridin zuzuschreiben^{35,90}, gibt aber auch einen Hinweis darauf, dass es bei Inhibition der K_v -Kanäle zu einer simultanen kompensatorischen Aktivierung der BK-Kanäle zur Stabilisierung des Grundtonus gekommen sein kann.

Unter Blockade der IK-Kanäle mittels TRAM-34 kam es zu leichten, aber statistisch signifikanten Zunahmen der Gefäßwandspannung. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die IK-Kanäle an der Aufrechterhaltung des Basistonus der intrarenalen Gefäße beteiligt sind. Ebenso wurde es bereits für Parenchymarteriolen des Gehirns beschrieben⁹⁷. Dass unter IK-Kanalblockade außerdem eine Verstärkung der S(-)-BayK-induzierten Vasokonstriktionen verzeichnet wurde, spricht für eine Depolarisation des Membranpotenzials im Zusammenhang mit der IK-Kanalblockade und weist damit auf einen Beitrag der Kanäle zur Lage des Ruhemembranpotenzials hin. Ebenso liefern Experimente, die zeigen, dass bei Knock-out-Mäusen, die IK-Kanäle nicht exprimieren, ein höherer systemischer Blutdruck gemessen wurde⁵¹, einen weiteren Hinweis auf eine globale Beteiligung der IK-Kanäle am Gefäßruhetonus. Auch die Tatsache, dass sowohl in kleinen als auch in großen Arteriolen dieser Knock-out-Tiere ein erhöhter Ruhetonus beschrieben wurde⁹⁸, lässt Rückschlüsse darauf zu, dass IK-Kanäle, wenn sie exprimiert werden, unter Ruhebedingungen aktiv sind und einen tonisch gefäßerweiternden Einfluss haben⁹⁸.

Wie oben bereits für die IK-Kanäle beschrieben, kam es auch nach Blockade der SK-Kanäle mittels Apamin zu leichten signifikanten Zunahmen der Gefäßwandspannung. Dies zeigten auch Experimente von Kurtz et al., bei denen der Einsatz von Apamin an der isolierten perfundierten Rattenniere zu einem geringen Anstieg des Gefäßwiderstands führte⁹⁹. Da in unseren Experimenten durch die Blockade der SK-Kanäle jedoch die L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierten Vasokonstriktionen nicht verstärkt wurden, ist nur von

einer geringen Bedeutung der SK-Kanäle am Ruhemembranpotenzial und damit an der Aufrechterhaltung des Ruhegefäßtonus im untersuchten Gefäßbett auszugehen.

Um den Einfluss der K_v -Kanäle auf den Grundtonus der Gefäße näher zu untersuchen, wurde sowohl die Substanz 4-Aminopyridin als auch XE991 eingesetzt. Die alleinige Blockade mittels 4-Aminopyridin hatte gemäß diesen Messungen keinen Einfluss auf den Gefäßtonus. Auch In-vivo-Experimente von Sorensen et al., bei denen 4-Aminopyridin direkt in die Nierenarterie injiziert wurde, kamen zu diesem Ergebnis³². Über 4-Aminopyridin ist bekannt, dass es vorrangig K_v1 - bis K_v4 -Kanäle blockiert, während die Kanäle der Kanalunterklasse K_v7 aktiviert werden³⁵. Aus diesem Grund wurde der selektive K_v7 -Kanalinhistor XE991 eingesetzt. Die alleinige Gabe von XE991 führte zu einem signifikanten Anstieg des Ruhetonus bis auf 6 % der maximalen K125-Antwort. Da die Aktivierungsschwelle für die K_v7 -Kanalunterklasse bei Membranpotenzialwerten nahe des Ruhemembranpotenzials von glatten Gefäßmuskelzellen liegt²⁰, ist anzunehmen, dass die Kanäle in Ruhe im geöffneten Zustand vorliegen und somit zum Ruhetonus beitragen. Experimente von Salomonsson et al. an Ratten und Mäusen deuten sowohl in-vitro als auch in-vivo ebenfalls in diese Richtung¹⁰⁰. Unter der Kombination aus 4-Aminopyridin und XE991 wurden weiterhin L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierte Vasokonstriktionen signifikant verstärkt, sodass dies auf ein depolarisiertes Membranpotenzial unter den Bedingungen der gemeinsamen Kanalblockade und damit ergänzend auf einen Beitrag zumindest einzelner Unterklassen der K_v -Kanäle zum Ruhemembranpotenzial der Gefäße hinweist.

Bei Vorliegen einer Blockade der K_{ir} -Kanäle mittels Bariumchlorid konnte in den durchgeführten Experimenten keine Veränderung des Grundtonus der Gefäße festgestellt werden. Auch die L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierten Vasokonstriktionen wurden nicht signifikant gesteigert. Dies führt zu der Annahme, dass die Kanäle unter Ruhebedingungen nicht maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt sind. Entgegen dieser Annahme fanden sowohl Kurtz et al.⁹⁹ in der isolierten perfundierten Rattenniere als auch Sorensen et al.³² in In-vivo-Versuchen an Ratten eine signifikante Erhöhung des renalen Gefäßwiderstands beziehungsweise des renalen Blutflusses nach K_{ir} -Kanalblockade mittels Bariumchlorid. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der K_{ir} -Kanäle am Grundtonus der Gefäße. Für die K_{ir} -Kanäle ist bekannt, dass ihre Expression und Funktion stark vom Gefäßsegment abhängen. Für die Arteria arcuata beispielsweise konnte nur eine sehr geringe K_{ir} -Kanalichte gefunden werden¹⁰¹, in den afferenten Arteriolen hingegen, die die

wichtigsten Widerstandsgefäße der Niere darstellen, scheinen K_{ir} -Kanäle die Hauptdeterminanten für den vaskulären Tonus zu sein¹⁰². Es liegt folglich nahe, dass der Einfluss der K_{ir} -Kanäle auf den Basistonus der renalen Widerstandsarterien von proximal nach distal zunimmt. In der Tat konnte für Interlobulararterien der Ratte im Verlauf eines Gefäßes eine Zunahme der Bedeutung der K_{ir} -Kanäle am Gefäßtonus nachgewiesen werden¹⁰³. Unterschiede zwischen den angesprochenen Experimenten anderer Arbeitsgruppen und unseren Ergebnissen können folglich darauf zurückzuführen sein, dass in den beiden erstgenannten Experimenten stets alle Gefäßsegmente betrachtet wurden und, wie beschrieben, K_{ir} -Kanäle in Teilen davon durchaus eine überragende Rolle bei der Tonusregulation spielen. In unseren Versuchen hingegen wurde mit den Interlobulararterien nur ein bestimmter Gefäßabschnitt ausgewählt, an dem die K_{ir} -Kanäle keine große Bedeutung für den Ruhetonus haben.

Unter der Annahme, dass sich die scheinoperierten Tiere nicht von unbehandelten Ratten unterscheiden, werden die an den schein sympathektomierten Ratten erhobenen Daten für die Beurteilung des Beitrags der K_{ATP} -Kanäle zur Tonusregulation renaler Widerstandsarterien der Ratte herangezogen. Die Inhibition der K_{ATP} -Kanäle bewirkte keine Veränderung des Ruhetonus und auch die L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierten Vasokonstriktionen wurden nicht verstärkt. Dies zeigt, dass auch diese Kanäle als spezielle Untergruppe der K_{ir} -Kanäle keine große Rolle bei der Aufrechterhaltung des Grundtonus der Interlobulararterien spielen. Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass sich auf der zytoplasmatischen Seite der K_{ir} -Untereinheit Bindestellen für ATP und PIP_2 befinden. Die Bindung von ATP stabilisiert den geschlossenen Zustand des Kanals, PIP_2 hingegen den geöffneten³⁹. Die Konzentration an ATP ist unter normalen Bedingungen in einer Zelle so hoch, dass sich über 90 % der K_{ir} -Untereinheiten in einem geschlossenen Zustand befinden³⁹. Zudem zeigt der gesamte K_{ATP} -Kanal erst eine Öffnung, wenn jede der vier Untereinheiten im geöffneten Zustand vorliegt³⁹. Die Beobachtung, dass eine Blockade der K_{ATP} -Kanäle keine Veränderungen des Ruhetonus bewirkte, stützt folglich die Annahme, dass die Kanäle größtenteils in einem geschlossenen Zustand vorliegen.

Zu dem Einfluss der K_{ATP} -Kanäle auf den Ruhetonus verschiedener Gefäße in der Mikrozirkulation gibt es weitere unterschiedliche Befunde¹⁶: In einigen Untersuchungen führte die Blockade der Kanäle zu einer Membranpotenzialdepolarisation und Vasokonstriktion^{104, 105}, während sie in anderen Experimenten keinen Einfluss zu haben

schien^{32, 106, 107}. Die Gegensätzlichkeit dieser Aussagen ist aber wohl auf die Herkunft aus unterschiedlichen Gefäßbetten der jeweils untersuchten Arterien, auf unterschiedliche Tierarten und auf abweichende experimentelle Bedingungen zurückzuführen¹⁶.

Bei Experimenten, in denen Inhibitoren einzelner Kaliumkanalklassen eingesetzt werden, können kompensatorische Leitfähigkeitserhöhungen nicht blockierter Kaliumkanäle das Membranpotenzial so weit stabilisieren, dass es kaum zu anhaltenden Veränderungen des Gefäßtonus kommt. Dadurch können die Effekte einzelner Kanalinhhibitoren maskiert werden³². Wenn beispielsweise die Aktivität der K_{ir} -Kanäle durch entsprechende Blockade vermindert würde und diese Kanäle tatsächlich zu einem großen Teil der negativen Lage des Membranpotenzials beitragen, käme es durch ihre Inhibition zu einer Depolarisation der Zellmembran. Überschreite diese Depolarisation den Schwellenwert zur Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, käme es zur Öffnung eben dieser Kanäle und zu einem Ausstrom von Kaliumionen, die die Zellmembran wieder hyperpolarisierten. Im Myographieexperiment wäre keine Tonusänderung zu sehen und folglich sähe es so aus, als ob die K_{ir} -Kanäle keinen Einfluss auf den Grundtonus der Gefäße hätten. Um diesen Faktor auszuschließen, wurde das eingangs bereits erwähnte Experiment durchgeführt, bei dem der Einfluss der gleichzeitigen Blockade der K_{Ca} -, K_V -, K_{ir} - und K_{ATP} -Kanäle auf den Tonus der Interlobararterien untersucht wurde. Die Tatsache, dass die gemessene Zunahme der Gefäßwandspannung in diesem Experiment größer war als die Summe aller in den Einzelversuchen beobachteten Tonuserhöhungen, bestätigt die Annahme, dass während dieser Versuche in der Tat ausgleichende hyperpolarisierende Mechanismen aufgetreten sind. Um den speziellen Einfluss einer einzelnen Kanalklasse auf die Tonusregulation der Gefäße weiter zu untersuchen, müssten deshalb Experimente durchgeführt werden, in denen der Kaliumkanalblockercocktail jeweils um einen Inhibitor reduziert und der Effekt dieses verkleinerten Cocktails mit demjenigen des gesamten Cocktails verglichen wird.

4.1.2 Beteiligung von Kaliumkanälen an der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion

Trotz intensiver Forschung ist bisher nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen den Agonist-induzierten Vasokonstriktionen glatter Muskulatur zugrunde liegen. Arbeiten von Wakui et al. deuten auf eine Beteiligung von Kaliumkanälen an der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion in glatten Muskelzellen des Vas deferens des Meerschweinchens hin⁴⁹. Um diese These auch auf das renale Gefäßbett der Ratte auszuweiten, wurde in der vorliegenden

Arbeit getestet, ob der Einsatz von verschiedenen Kaliumkanalblockern einen Einfluss auf die Noradrenalin-K-W-Kurve hat. Dabei lag den Experimenten folgende Annahme zugrunde: Würde eine Noradrenalin-induzierte Hemmung der jeweiligen Kaliumkanalklasse in die Signaltransduktion eingebunden sein und zu einer Vasokonstriktion beitragen, fördere die Blockade dieser Kanalklasse die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion. Die Gefäßantwort auf den Agonisten würde folglich früher einsetzen und zu einer Linksverschiebung der K-W-Kurve führen oder stärker ausfallen, als dies im nicht blockierten Zustand der Fall wäre.

Die Experimente zeigten, dass sich nur nach Blockade der SK-Kanäle mittels Apamin eine Linksverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve und damit eine signifikant höhere Sensitivität der Gefäße gegenüber dem Agonisten ergab. Die alleinige Blockade der anderen Kaliumkanalklassen veränderte die Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktionen nicht. Ob der Effekt der SK-Kanalblockade durch direkte Einbindung der Kanäle in die Signalkaskade des Noradrenalins zustande kam oder ob sich die signifikante Verschiebung der K-W-Kurve nur auf eine durch die Kaliumkanalblockade hervorgerufene unspezifische Depolarisation zurückführen lässt, ist mit diesem Versuchsansatz nicht abschließend zu klären.

Bei der gleichzeitigen Gabe von Kaliumkanalblockern mit unterschiedlichen Zielstrukturen (K_{Ca} - (= BK-, IK-, SK-), K_V -, K_{ir} - und K_{ATP} -Kanäle) nahm die Gefäßwandspannung unter Ruhebedingungen deutlich zu. Dieser Befund spricht für eine deutliche Depolarisation des Membranpotenzials der Gefäßmuskelzellen. Unter diesen Bedingungen kam es nicht zu einer Linksverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve. Auch die maximale Gefäßwandspannung, die Noradrenalin unter diesen Bedingungen induzierte, unterschied sich nicht statistisch signifikant von den zugehörigen Kontrollexperimenten ohne Kaliumkanalblockade.

Das Fehlen einer Linksverschiebung der K-W-Kurve unter den Bedingungen der kombinierten Kaliumkanalblockade ist möglicherweise Folge einer sequenziellen Aktivierung calciummobilisierender und calciumsensitivierender Mechanismen der Gefäßmuskulatur. Experimente von Mulvany et al. zeigten, dass die Gabe niedriger Konzentrationen von Noradrenalin zu einer Depolarisation des Membranpotenzials führte¹⁰⁸. Bei schrittweiser Erhöhung der Noradrenalin-Konzentration erreichten die Veränderungen des Membranpotenzials ein Plateau, sodass unabhängig von zusätzlichen Konzentrationserhöhungen das Membranpotenzial nicht stärker als bis auf ca. -30 mV depolarisiert werden konnte¹⁰⁸. Bei vorherigem depolarisierendem Stimulus mittels kaliumreicher Lösung bewirkte eine zusätzliche Noradrenalingabe nur eine schwache

zusätzliche Depolarisation und war ebenfalls nicht in der Lage, das Membranpotenzial über Werte um ca. -30 mV hinaus zu verringern¹⁰⁸. Auf denselben Effekt können unsere Experimente mit der kombinierten Kaliumkanalblockade zurückgeführt werden. Ausgelöst durch die Kanalblockade kommt es bereits zu einer starken Depolarisation der Zellmembran, die durch Noradrenalin nicht wesentlich gesteigert werden kann. Auf diese Depolarisation folgt vermittelt durch spannungsabhängige Calciumkanäle ein starker Anstieg des intrazellulären Calciums^{32, 109}. Da die positiv geladenen Calciumionen bei Vorliegen eines verringerten Membranpotenzials einen geringeren Antrieb haben, in das Zellinnere zu strömen⁴⁹, kann Noradrenalin auch diesen Schritt nicht wesentlich verstärken. Bei der Rekrutierung des Calciums überschneiden sich folglich die Effekte der Kanalblocker-induzierten Depolarisation und die Noradrenalin-induzierten Signalwege und ergänzen sich nicht¹⁰⁹, sodass kein additiver Effekt in Form einer verstärkten Noradrenalinantwort auftritt. Um dennoch Kontraktionen zu ermöglichen, die über die bereits erhöhte Gefäßwandspannung hinausgehen, führt Noradrenalin unter derartigen Umständen im Wesentlichen zu einer Aktivierung calciumsensitiverender Mechanismen, wie dem RhoA-Rho-Kinase Signalweg¹¹⁰. Experimente von Heumann et al. zeigten, dass die Noradrenalin-K-W-Kurve in renalen Widerstandsgefäßen der Ratte durch den Rho-Kinaseinhibitor Y27623 nach rechts verschoben wurde²². Dies deutet auf die Beteiligung dieses Systems an der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion im untersuchten Gefäßbett hin. Die Aktivierung der Rho-Kinase führt dabei zu einer Inhibition der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase, welche den phosphorylierten Zustand der leichten Myosin-Kette stabilisiert und so die glatte Muskelzelle in einem kontraktilem Zustand hält^{110, 111}.

Die Beobachtung, dass die Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktionen durch die Blockade einer einzelnen Kaliumkanalklasse (= leicht verringertes Membranpotenzial) nicht jedoch durch die kombinierte Blockade mehrerer Kanalklassen (= stark verringertes Membranpotenzial) verstärkt wurden, spiegelt sich auch in Experimenten von Wakui et al. am Vas deferens des Meerschweinchens wider⁴⁹. Die Gruppe um Wakui stellte dabei die These auf, dass eine starke Membranpotenzialdepolarisation vor Noradrenalinapplikation diejenigen Faktoren inaktiviert, welche essentiell für das Erzeugen einer additiven Depolarisation durch das Noradrenalin sind⁴⁹. Bei einer leichten Membranpotenzialdepolarisation spielt diese Inaktivierung noch keine Rolle, sodass Noradrenalin in diesem Fall zu verstärkten Vasokonstriktionen führen kann. Welche Faktoren

dies zusätzlich zu dem oben angeführten verringerten Calciumioneneinstrom sind und wie genau die Inaktivierung aussieht, muss in weiteren Studien untersucht werden ⁴⁹.

Auch wenn die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion nur bedingt durch eine vorherige Depolarisation gesteigert werden kann, wird sie durch eine vorherige Hyperpolarisation abgeschwächt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle mittels Levromakalim, welches eine deutliche Hyperpolarisation bewirkt ^{112, 113}, sowohl eine verminderte Sensitivität gegenüber Noradrenalin als auch abgeschwächte Kontraktionsmaxima auftraten. Die Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktionen sind folglich nicht unabhängig vom aktuellen Membranpotenzial. Dies lässt sich über die Einbindung spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle in die Noradrenalin-Signalkaskade erklären ^{19, 22, 32, 114} und ist ein Hinweis darauf, dass unter physiologischen Umständen neben den oben beschriebenen calciumsensitivierenden auch calciummobilisierende Mechanismen eine Rolle spielen.

Neben Aussagen zur Abhängigkeit vom Membranpotenzial lassen die Experimente mit Levromakalim auch Aussagen bezüglich einer direkten Einbindung der K_{ATP} -Kanäle in Noradrenalin-abhängige Signaltransduktionsprozesse zu. Levromakalim öffnet über direkte Bindung an die SUR-Untereinheit die K_{ATP} -Kanäle ¹¹³ und kann somit einer Noradrenalin-induzierten Inhibition der Kanäle entgegenwirken, was sich experimentell in einer Rechtsverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve zeigt. Auch Sorensen et al. deuten in der Auswertung ihrer In-vivo-Experimente, in denen der K_{ATP} -Kanalaktivator Pinacidil zu einer signifikanten Erhöhung des renalen Blutflusses führte, eine Beteiligung der Kanäle an Agonist-induzierten Vasokonstriktionen in intrarenalen Arterien der Ratte an ³². In Rattenschwanzarterien scheint Noradrenalin über die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren, welche über inhibitorische G-Proteine die Synthese von cAMP hemmen, einen PKA-vermittelten stimulierenden Einfluss auf K_{ATP} -Kanäle zu verringern und darüber zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle zu führen ¹¹³. Dieser Mechanismus ist jedoch für die renalen Arterien der Ratte nicht denkbar, da wiederholt nachgewiesen wurde, dass α_2 -Rezeptoren nicht an der Noradrenalin-signaltransduktion dieses Gefäßbetts beteiligt sind ^{43, 44}. Für α_1 -Rezeptoren hingegen wurde eine starke Beteiligung an der Noradrenalinantwort gezeigt ^{43, 44}. Über G_q -vermittelte Wege kommt es durch Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer Aktivierung der PKC, die die K_{ATP} -Kanäle phosphorylieren und darüber ihre Aktivität hemmen kann ^{115, 116}. Der G_q -Signaltransduktionsweg führt neben der

Aktivierung der PKC über die Bildung von Inositoltrisphosphat auch zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration⁴⁶. Wilson et al. haben gezeigt, dass in glatten Gefäßmuskelzellen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer verminderten Aktivität der K_{ATP} -Kanäle führte, sodass auch dieser Weg ein möglicher Mechanismus ist, um die Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktionen unter Einbeziehung der K_{ATP} -Kanäle zu bewirken¹¹⁷.

Zusammenfassend gibt es Hinweise darauf, dass Noradrenalin auf verschiedenen Wegen über die Inhibition einzelner Kaliumkanalklassen eine Vasokonstriktion bewirken kann. Direkte Leitfähigkeitsmessungen in Zellen des untersuchten Gefäßbetts vor und nach Noradrenalinzugabe könnten diese Ergebnisse kontrollieren und somit die Wirkung des Noradrenalins auf die Kaliumkanäle noch einmal gezielter darstellen.

4.1.3 Beteiligung von Kaliumkanälen an der cAMP-vermittelten Vasodilatation

Für verschiedene endogene Vasodilatoren, wie beispielsweise das „Calcitonin Gene-Related Peptide“ und Prostacyclin, ist bekannt, dass ihre Wirkung unter anderem von einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts abhängt^{52,118}. Die Mechanismen der Signalkaskade der Agonist-induzierten Vasodilatation nach Erhöhung des cAMP-Spiegels sind bisher nicht ausreichend bekannt. Um sie näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit K-W-Kurven mit Forskolin erstellt. Forskolin ist als Aktivator der Adenylatcyclase in der Lage, den intrazellulären cAMP-Gehalt um ein Vielfaches zu steigern¹¹⁹. Die Beobachtung, dass Forskolin in den untersuchten Rattenarterien zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation führte, zeigt, dass in dem renalen Gefäßbett eine Gefäßweitstellung über den cAMP-vermittelten Weg erfolgen kann. In den Forskolinexperimenten, in denen die extrazelluläre Kaliumkonzentration von 4,7 mmol/L auf 64 mmol/L erhöht wurde, ist davon auszugehen, dass es über die Veränderung des transmembranösen Kaliumionengradienten zu einer Depolarisation des Membranpotenzials kam, wie es auch Wakui et al. in ihren Experimenten bei einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration beschrieben⁴⁹. Auf diese Weise wurden induzierte hyperpolarisierende Mechanismen während des Experiments ausgeschaltet. Die Beobachtung, dass in dieser kaliumreichen Umgebung die Forskolinantwort abgeschwächt wurde, deutet darauf hin, dass sie unter physiologischen Umständen zum Teil auf ebensolchen hyperpolarisierenden Mechanismen beruht. Direkte Potenzialmessungen von Prieto et al. zeigten ebenfalls, dass die Gabe von Forskolin eine

Hyperpolarisation von Gefäßmuskelzellen bewirkte¹¹⁹. Eine Erklärung für diese Potenzialänderungen könnten Forskolin-induzierte erhöhte Offenwahrscheinlichkeiten für Kaliumkanäle liefern, die über den vermehrten Ausstrom von positiv geladenen Kaliumionen zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und nachfolgend vermindertem Gefäßtonus führen.

Für einige Kaliumkanalklassen ist bekannt, dass sie durch Phosphorylierung mithilfe einer cAMP-abhängigen Proteinkinase aktiviert werden²⁰. Bei Einbindung in die cAMP-abhängige Vasodilatation sollte die experimentelle Blockade dieser Kaliumkanäle die Forskolinantwort abschwächen und zu einer Rechtsverschiebung der K-W-Kurve führen. In den durchgeführten Experimenten konnte weder für die Blockade der BK-Kanäle, noch der K_{ATP} - oder der K_v1 - bis K_v4 -Kanäle ein solcher Effekt nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten ähnliche Befunde. Beispielsweise konnten Rembold et al. in Rattenschwanzarterien weder durch Glibenclamid, noch durch Iberiotoxin, Tetraethylammonium, Bariumionen oder 4-Aminopyridin veränderte Forskolinantworten zeigen¹²⁰. Auch an pulmonalen Rattenarterien¹²¹ und an der Rattenaorta¹²² konnte kein Effekt von Glibenclamid auf die Forskolin-induzierte Vasodilatation nachgewiesen werden. Prieto et al. hingegen zeigten mit demselben K_{ATP} -Kanalinhibitor eine Depolarisation und nachfolgend deutlich abgeschwächte Forskolinantwort in Mesenterialgefäßen der Ratte¹¹⁹. Auch konnte, im Gegensatz zu unseren renalen Untersuchungen, sowohl in Basilararterien¹²³ als auch in Koronararterien der Ratte¹²⁴ eine starke Beteiligung der BK-Kanäle an der cAMP-vermittelten Gefäßweitstellung gefunden werden. Da diese unterschiedlichen Befunde auf Gefäßen aus unterschiedlichen Herkunftsgebieten beruhen, ist zu vermuten, dass der Beitrag der Kaliumkanäle an der cAMP-abhängigen Vasodilatation in verschiedenen Gefäßbetten unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Zumindest für das renale Gefäßbett scheinen BK-, K_{ATP} - und K_v1 - bis K_v4 -Kanäle keine große Rolle zu spielen.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit weisen hingegen auf eine Beteiligung der K_v7 -Kanalunterklasse an der cAMP-abhängigen Vasodilatation in renalen Widerstandsgefäßen hin. Die Blockade dieser Gruppe mittels XE991 führte zu einer signifikanten Abschwächung der Forskolinantwort. Passend zu unseren Beobachtungen stellten Chadha et al. in Rattennierenarterien eine Beteiligung der K_v7 -Kanäle an der β -Adrenozeptor-vermittelten Vasodilatation fest¹²⁵. Da β -Rezeptoren über stimulatorische G-Proteine und nachfolgende Aktivierung der Adenylatcyclase ihre Wirkung entfalten⁴⁶, ist auch dieses Resultat ein Hinweis

auf die Beteiligung der K_v7 -Kanäle an einer cAMP-vermittelten Vasodilatation. Weiterhin konnten Chadha et al. zeigen, dass sowohl Tiere mit primärer als auch mit sekundärer Hypertonie eine verminderte $K_v7.4$ -Kanalaktivität aufwiesen^{125, 126}. Dies könnte zu einem verminderten Einfluss der β -Adrenozeptoren und zu einem gleichzeitigen Überwiegen der α -Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion geführt haben, was zur Aufrechterhaltung des Bluthochdrucks beigetragen haben könnte¹²⁵. Eine solche Erwägung weist auf die Wichtigkeit der K_v7 -Kanäle nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter pathophysiologischen Umständen hin. Um den Mechanismus der Beteiligung der K_v7 -Kanäle an der cAMP-vermittelten Vasodilatation genauer zu erforschen und eine Phosphorylierung mittels PKA zu bestätigen, können Myographieexperimente durchgeführt werden, in denen selektive PKA-Inhibitoren eingesetzt werden. Der Effekt der PKA-Blockade kann dabei größer ausfallen als der alleinige Effekt der K_v7 -Kanalblockade, weil die PKA zusätzlich noch andere Zielstrukturen haben kann. Der Effekt eines PKA-Inhibitors mit zeitgleicher K_v7 -Kanalblockade sollte aber nicht größer sein als der Effekt bei alleiniger PKA-Blockade, wenn die K_v7 -Kanäle tatsächlich hauptsächlich durch Phosphorylierung mittels PKA aktiviert würden.

Eine weitere Substanz, die eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt, ist das Prostacyclinanalogon Iloprost^{59, 127}. Für diverse Kaliumkanäle, wie beispielsweise K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle, ist durch Tierversuche bereits bekannt, dass sie an einer Iloprost-induzierten Vasodilatation beteiligt sind^{60, 128}. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Interlobararterien der Ratte führte die Gabe von Iloprost jedoch zu keiner Gefäßerweiterung. Dieser Umstand wurde bereits von Heesen et al. beschrieben, die ihn unter anderem auf das Fehlen von Prostacyclinrezeptoren in dem untersuchten Gefäßgebiet zurückführten¹²⁹. Eine weitere mögliche Ursache für das Ausbleiben der Gefäßerweiterung nach Iloprostgabe liegt in der geringen Rezeptorselektivität des Prostacyclins. Es bindet zwar stark an den Prostacyclinrezeptor IP, über den es auch den Anstieg im intrazellulären cAMP-Gehalt bewirken kann, doch ist es zusätzlich in der Lage, nicht nur die synergistisch wirkenden Prostaglandinrezeptoren EP2, EP4 und DP1, sondern ebenfalls die G_q - beziehungsweise G_i -gekoppelten Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP3 zu aktivieren¹³⁰. Letztere führen zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (EP1-Rezeptor) beziehungsweise dem Abfall des cAMP-Spiegels (EP3-Rezeptor)¹³⁰, wodurch in beiden Fällen einer Relaxation des glatten Muskels entgegengewirkt wird. Laborinterne Folgeuntersuchungen konnten zeigen, dass Iloprost nach vorheriger EP3-Rezeptorblockade mittels L798 tatsächlich zumindest eine

geringe Relaxation von Interlobararterien der Ratte bewirkte. Dass Iloprost aber auch ohne L798-Zugabe Pulmonalarterien¹³¹, Schwanzarterien⁶⁰ sowie Meningealarterien der Ratte¹³² relaxieren kann, weist darauf hin, dass das weitestgehende Ausbleiben der Iloprost-vermittelten Gefäßweitstellung in den Nierengefäßen eine Eigenheit dieses Gefäßgebiets ist und nicht generell für Rattengefäße gilt.

4.1.4 Zusammengefasste Erkenntnisse zum Beitrag von Kaliumkanälen zur Tonusregulation renaler Widerstandsgefäße der Ratte

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass Kaliumkanäle einen Beitrag zum Ruhetonus intrarenaler Widerstandsarterien der Ratte leisten. Vor allem K_v7 -Kanäle und in geringerem Maße IK-Kanäle spielen für den basalen Gefäßtonus eine Rolle. BK-Kanäle hingegen scheinen kompensatorisch aktiviert zu werden, um den Gefäßtonus im Sinne eines Feedback-Mechanismus konstant zu halten. Die Beobachtung, dass die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion nicht durch die gleichzeitige Blockade mehrerer Kaliumkanäle beeinflusst wurde, deutet darauf hin, dass die Noradrenalinantwort nicht durch eine vorherige starke Depolarisation gesteigert werden kann. Geringe Depolarisationen, beispielsweise durch Einzelkanalblockade, können die Noradrenalin-sensitivität jedoch erhöhen. Ebenso kann sie durch Kaliumkanalaktivierung und dadurch induzierter Hyperpolarisation abgeschwächt werden. Weiterhin ist zu verzeichnen, dass die Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Widerstandsgefäßen zu einer Vasodilatation führt, die zum Teil auf hyperpolarisierenden Mechanismen beruht. Eine Öffnung von K_v7 -Kanälen scheint in diese cAMP-vermittelte Vasodilatation eingebunden zu sein.

4.2 Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte

Für die Ausprägung und Aufrechterhaltung des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen spielt die Innervation durch sympathische Nervenfasern eine bedeutende Rolle^{70,71}. Eine Unterbrechung der sympathischen Innervation verändert die Gefäßfunktion daher langfristig. Ergebnisse vorheriger Arbeiten konnten zum Beispiel eine erleichterte L-Typ-Calciumkanalaktivierbarkeit, ein verringertes Membranpotenzial in glatten Gefäßmuskelzellen und eine erhöhte Sensitivität gegenüber vasokonstriktorisches Agonisten, wie Noradrenalin, in renalen Widerstandsgefäßen neonatal sympathektomierter Ratten zeigen²². Die durchgeführten Experimente im Rahmen der aktuellen Arbeit dienen der

Untersuchung, inwiefern die Auswirkungen der lokalen renalen Denervierung mit denen der systemischen Sympathektomie vergleichbar sind. Außerdem wurden Ansätze gesucht, die eine Erklärung für die beobachteten Phänomene der Membranpotenzialdepolarisation und der Noradrenalinhypersensitivität nach Unterbrechung der sympathischen Innervation bieten.

4.2.1 Eigenschaften der Gefäße lokal renal denervierter Ratten im Vergleich zu denen systemisch sympathektomierter Tiere

Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine lokale renale Denervierung ähnliche Auswirkungen auf die renalen Widerstandsgefäße der Ratte hat wie die neonatale Sympathektomie. Insofern reagierten die Gefäße der lokal denervierten Ratten - vergleichbar mit denen systemisch sympathektomierter Tiere - sensitiver auf Noradrenalin als die Gefäße der scheindenervierten Kontrollen, was zu einer signifikanten Linksverschiebung der Noradrenalin-K-W-Kurve führte. Ebenso kam es - ebenfalls vergleichbar zu den Untersuchungen an systemisch sympathektomierten Tieren²² - nach Gabe des L-Typ-Calciumkanalaktivators S(-)-BayK in den Gefäßen der denervierten Ratten zu stärkeren Vasokonstriktionen als in den Kontrollgefäßen (dargestellt in der Bachelorarbeit von V. Veltum⁸⁹). L-Typ-Calciumkanäle sind spannungsabhängig und werden durch Depolarisationen aktiviert⁹³. Die Beobachtung, dass der Calciumkanalaktivator eine stärkere Vasokonstriktion in den Gefäßen der denervierten Tiere als in denen der scheindenervierten Tiere bewirkte, deutet darauf hin, dass die Gefäße der denervierten Tiere ähnlich denen der sympathektomierten Ratten²² ein verringertes Membranpotenzial aufwiesen als die Gefäße der scheinbehandelten Ratten. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Calciumkanalaktivator-induzierten Vasokonstriktionen vollständig durch einen hyperpolarisierenden Stimulus (K_{ATP} -Kanalaktivierung mittels Levromakalim) aufgehoben werden konnten⁸⁹.

4.2.2 Ursachen der Membranpotenzialdepolarisation

Einige Resultate der Arbeit von Heumann et al. weisen auf eine mögliche Beteiligung der K_{ATP} -Kanäle an der beobachteten Membranpotenzialdepolarisation nach Wegfall der sympathischen Innervation hin²². Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Denervierung entweder zu einer Verringerung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten oder zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit dieser

Kanäle führt, infolgedessen es zu einem verminderten Kaliumausstrom und folglich zu einer Verringerung des Membranpotenzials käme.

Mittels qPCR konnte in den Interlobararterien der Ratten die mRNA aller vier Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle ($K_{ir}6.1$, $K_{ir}6.2$, SUR1, SUR2) nachgewiesen werden. Die durchgeführte Sympathektomie führte nicht zu statistisch signifikanten Unterschieden der mRNA-Gehalte der einzelnen Kanaluntereinheiten im Vergleich zu den Gefäßen schein sympathektomierter Tiere. Auch nach lokaler renaler Denervierung wurde lediglich für SUR1 eine signifikante Verringerung der Transkriptmenge festgestellt. Die SUR-Untereinheiten werden aber nur selten alleine in die Plasmamembran eingebaut³⁹ und stellen für sich genommen keinen Kanal dar. Deshalb ist nicht davon auszugehen, dass die verringerte Transkriptmenge für SUR1 nach der Denervation ursächlich für die veränderten Gefäßeigenschaften ist.

Auch wenn die Anwesenheit der Untereinheiten nachgewiesen wurde, sollen die Ergebnisse der Negativkontrollen (-RT) der qPCR nicht unberücksichtigt bleiben. Dass für die -RT-Kontrollen von $K_{ir}6.1$ und $K_{ir}6.2$ C_t -Werte ermittelt wurden, die im Bereich der C_t -Werte der eigentlichen Proben (+RT) liegen, kann verschiedene Ursachen haben. Ursächlich in Betracht gezogen wird, dass die Gensequenz von $K_{ir}6.2$ keine Introns aufweist, wodurch sich die synthetisierte cDNA nicht von der genomischen DNA unterscheidet. Aus diesem Grund sollte mithilfe eines zusätzlichen DNase-Verdau während der RNA-Isolierung das Vorhandensein von Restbeständen genomischer DNA ausgeschlossen werden. Bei nicht erfolgreicher Degradierung der genomischen DNA mittels DNase könnten jedoch entsprechende Sequenzen mit amplifiziert worden sein. Für $K_{ir}6.1$ gilt dieser Umstand nicht und der Einsatz eines exongrenzüberspannenden Primers schließt ein Anlagern an einfache genomische DNA aus. Möglicherweise lag jedoch ein prozessiertes Pseudogen¹³³ vor, an dessen Sequenz der Primer gebunden haben könnte, wenn der DNase-Verdau nicht erfolgreich war. Diese Tatsachen erfordern eine weitere Optimierung der Methode, um die getroffenen Annahmen bezüglich der Genexpression der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten zu bestätigen. Beispielsweise könnte eine qPCR durchgeführt werden, die speziell Intronsequenzen genomischer DNA vervielfältigt und somit Rückschlüsse auf den Erfolg des DNase-Verdau zulässt.

Lassen sich die Ergebnisse zu Membranpotenzialveränderungen aus der Arbeit von Heumann et al.²² nicht durch eine Veränderung auf mRNA-Ebene erklären, so wäre doch eine

Verminderung der Funktion der K_{ATP} -Kanäle, beispielsweise durch Phosphorylierung²⁰ oder durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber intrazellulärem ATP¹⁰⁵, nicht ausgeschlossen. Unsere Untersuchungen zeigten aber, dass sich der Einfluss auf den Ruhetonus der Gefäße der behandelten Tiere weder unter K_{ATP} -Kanalaktivierung mittels Levromakalim noch unter K_{ATP} -Kanalblockade mittels Glibenclamid signifikant von jenem an den Gefäßen der scheinbehandelten Tiere unterschied. Folglich scheint es keinen veränderten Beitrag der K_{ATP} -Kanäle zum Grundtonus der Gefäße gegeben zu haben. Diese Tatsache liefert einen indirekten Hinweis darauf, dass der Wegfall der sympathischen Innervation zu keiner veränderten Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle und damit zu keinem veränderten Beitrag zum Membranpotenzial geführt hat. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen notwendig, um die der Membranpotenzialdepolarisation zugrunde liegenden Mechanismen zu klären. Ein möglicher Ansatz wäre eine verringerte Aktivität von Natrium-Kalium-ATPasen (Na^+ - K^+ -ATPasen) in den Gefäßmuskelzellen. Da die Na^+ - K^+ -ATPase drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen in die Zelle hinein befördert, kann eine verringerte Aktivität dieser Pumpe zu einer Depolarisation des Membranpotenzials beitragen⁴⁶. Dieses Phänomen wurde im Vas deferens des Meerschweinchens nach chemischer Sympathektomie durch Herabregulation der α -Untereinheit der Na^+ - K^+ -ATPase nachgewiesen¹³⁴ und dabei ein verringertes Membranpotenzial gemessen¹³⁵.

4.2.3 Ursachen der Noradrenalinhypersensitivität

Wie bereits beschrieben, konnte sowohl für die Gefäße systemisch sympathektomierter als auch für die lokal renal denervierter Ratten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Noradrenalin im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgefäßen festgestellt werden. Unabhängig von dem Mechanismus der oben diskutierten Membranpotenzialdepolarisation könnte die Tatsache, dass eine Verringerung des Membranpotenzials nach Wegfall der sympathischen Innervation vorliegt, einen Ansatz für das Zustandekommen dieser Noradrenalinhypersensitivität liefern. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit an Noradrenalin-K-W-Kurven unter hyperpolarisierenden Bedingungen mithilfe von Levromakalim untersucht. Da Levromakalim als K_{ATP} -Kanalaktivator in der eingesetzten Konzentration in der Lage ist, eine bedeutende Hyperpolarisation zu bewirken (-25 mV¹³⁶), und zudem die S(-)-BayK-Versuche mit Levromakalim zeigten, dass nach Gabe des K_{ATP} -Kanalaktivators die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen aufgehoben waren^{22, 89}, ist davon

auszugehen, dass das Membranpotenzial in den Experimenten dieser Arbeit durch Levromakalim in allen Gruppen auf ein ähnliches Niveau herabgesenkt wurde. Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass die erhöhte Sensitivität gegenüber Noradrenalin nur zum Teil aufrechterhalten war. Die Gefäße der behandelten Tiere zeigten noch immer eine Tendenz zu stärkeren Noradrenalin-Antworten im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrollen, doch wurde nur noch in Bezug auf die maximale Kontraktionskraft der Gefäße der sympathektomierten Tiere im Vergleich zu den schein sympathektomierten Ratten eine statistische Signifikanz erreicht. Die erhöhte Sensitivität wird folglich durch das Hyperpolarisieren der Zellmembran gemindert, was im Umkehrschluss darauf hindeutet, dass das depolarisierte Membranpotenzial in den Gefäßmuskelzellen sympathektomierter und lokal denervierter Ratten zum Teil zu der beobachteten Agonistsensitivität beigetragen hat. Dieser Umstand könnte erklären, warum die erleichterte Agonistantwort trotz nachgewiesener Heraufregulation der α_1 -Rezeptoren in denervierten renalen Gefäßen¹³⁷ nicht auf Agonisten dieses Rezeptors beschränkt, sondern auch für andere Substanzen nachweisbar ist^{72,74}. Gestützt werden kann diese Hypothese durch die Experimente von Wakui et al.⁴⁹ und den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Noradrenalinexperimenten, aus denen hervorgeht, dass die Noradrenalin sensivität zwar nicht durch starke, doch aber durch eine leichte Depolarisation gesteigert werden kann. Wie von Heumann et al. gemessen, ist das Membranpotenzial glatter Gefäßmuskelzellen intrarenaler Arterien der Ratte nach systemischer Sympathektomie um ca. -7 mV verringert im Vergleich zu schein sympathektomierten Kontrollen²². Damit liegt es in einem Bereich, in dem es zu einer erhöhten Noradrenalin sensivität beitragen kann⁴⁹.

Die Beobachtung aber, dass die induzierte Hyperpolarisation nicht in der Lage war, die Hypersensitivität gegenüber Noradrenalin gänzlich aufzuheben, lässt vermuten, dass neben dem verringerten Membranpotenzial noch weitere Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen. Hinweise liefern zum Beispiel die schon angesprochenen Experimente von Woodcock et al., die eine Heraufregulation der α_1 -Rezeptoren in den renalen Gefäßen nach Denervierung finden konnten¹³⁷. Tripovic et al. deuten außerdem an, dass der Verlust von neuronalen Noradrenalintransportern zu einer erhöhten Noradrenalin konzentration an den Rezeptoren der Muskelzellen denervierter Gefäße führt und darüber eine erhöhte Noradrenalin sensivität bewirkt⁷³. Eine nach Sympathektomie vorliegende Verstärkung calciumsensitivierender Mechanismen in den Gefäßmuskelzellen, wie von Puzdrova et al.

beobachtet⁷¹, könnte weiterhin eine Erklärung für die unspezifische und nicht auf Noradrenalin beschränkte Hypersensitivität der Gefäße liefern. Ebenso zeigten Heumann et al. zwar, dass sich die mRNA- und Proteingehalte der α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals $Ca_v1.2$ in sympathektomierten Ratten nicht von denen in scheinsympathektomierten Kontrollen unterschieden²², doch könnten unterschiedliche Einbauraten in die Plasmamembran vorliegen oder posttranslationale Veränderungen zu einer erleichterten Aktivierbarkeit des Kanals führen und somit einen verstärkten Effekt verschiedener vasokonstriktorischer Stimuli in den denervierten Gefäßen erklären. Ausgeschlossen hingegen werden kann mit den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten die Vermutung eines veränderten Beitrags der K_{ATP} -Kanäle zur Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion. Die Versuche, in denen die Noradrenalin-K-W-Kurven nach Gabe des K_{ATP} -Kanalaktivators Levromakalim durchgeführt wurden, zeigten, dass der Betrag, um den Levromakalim die Noradrenalin-K-W-Kurve nach rechts verschob, sich nicht signifikant zwischen den Gefäßen der behandelten und denen unbehandelter Tiere unterschied. Somit ist nicht von einem differentiellen Beitrag der K_{ATP} -Kanäle an der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion auszugehen.

4.2.4 Zusammenfassung der Folgen der sympathischen Denervierung für renale Widerstandsgefäße der Ratte und Anmerkungen zum klinischen Bezug

Zusammenfassend zeigen unsere experimentell gewonnenen Daten, dass es sowohl nach systemischer Sympathektomie als auch nach lokaler renaler Denervierung zu veränderten Eigenschaften der renalen Widerstandsarterien der Ratte kommt. Die erleichterte L-Typ-Calciumkanalaktivierbarkeit lässt dabei indirekt auf das Vorliegen eines verringerten Membranpotenzials in den Muskelzellen der Gefäße der behandelten Tiere schließen. Ebenso ist eine verstärkte Sensitivität der Gefäße sympathektomierter und denervierter Tiere gegenüber Noradrenalin nachzuweisen. Diese ist nicht gänzlich, aber zu einem gewissen Teil durch das Vorliegen der Membranpotenzialdepolarisation zu erklären, nicht jedoch durch Veränderungen in Bezug auf die Expressionsrate und Funktionalität der K_{ATP} -Kanäle in den renalen Widerstandsgefäßen.

Im Hinblick auf einen klinischen Bezug dieser Untersuchungen ist festzuhalten, dass die beobachtete erhöhte Noradrenalinsensitivität und erleichterte Aktivierbarkeit durch vasokonstriktorisches Stimuli einem blutdrucksenkenden Effekt der renalen Denervierung

entgegenwirken kann. Aus anderen Arbeitsgruppen gibt es weiterhin Hinweise, dass die Durchtrennung der afferenten Bahnen bei der lokalen renalen Denervierung und die somit unterbrochenen reno-renalen Reflexe unter bestimmten Umständen eher eine Steigerung des Blutdrucks unterhalten als eine Senkung zu initiieren^{62, 138}. Neuere Patientenstudien zur renalen Denervierung deuten aber nach Optimierung der interventionellen Methode in eine erfolgsversprechendere Richtung, indem sie geringe, aber klinisch relevante Blutdrucksenkungen (-5 bis -10 mmHg) in der denervierten Patientengruppe im Vergleich zu einer scheinbehandelten Kontrollgruppe aufweisen^{10, 68}. Somit scheinen die in Kapitel 1.6 postulierten blutdrucksenkenden Mechanismen nach Unterbrechung der sympathischen Innervation der Nieren auch im menschlichen Körper zu wirken. Die Tatsache, dass der Erfolg aber nicht so stark ausfällt wie einst erhofft, kann unter anderem auf die hier diskutierten Veränderungen nach Wegfall der sympathischen Innervation zurückzuführen sein.

4.3 Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen

Da es nicht immer möglich ist, mit menschlichem Material zu arbeiten und vor allem In-vivo-Studien oft an ethische Grenzen stoßen, muss in wissenschaftlichen Studien oftmals auf Experimente an tierischen Modellen zurückgegriffen werden. Diese ermöglichen die Erforschung grundlegender Mechanismen und geben wichtige Hinweise, wie die komplex regulierten Prozesse auch im menschlichen Körper ablaufen könnten. Aufgrund der Tatsache aber, dass sich die physiologischen Vorgänge in unterschiedlichen Spezies durchaus unterscheiden können, muss anschließend die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Tiermodelle auf den Menschen überprüft werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit neben den Aa. interlobares der Ratte auch menschliche Aa. arcuatae und Aa. interlobulares einbezogen.

4.3.1 Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur Expression und Funktionalität der K_{ATP} -Kanäle

Zur Prüfung der Übertragbarkeit der gewonnenen K_{ATP} -Kanalinformationen wurde die Expression der K_{ATP} -Kanäle in den intrarenalen Widerstandsarterien des Menschen mittels qPCR getestet und untersucht, aus welchen Untereinheiten die Kanäle zusammengesetzt sind. Für menschliche K_{ATP} -Kanäle sind die Kanaluntereinheiten $K_{ir}6.1$, $K_{ir}6.2$, SUR1, SUR2A und SUR2B beschrieben¹³⁹. Die durchgeführten qPCR-Experimente zeigten, dass sowohl in den Aa. arcuatae als auch in den Aa. interlobulares mRNA-Gehalte aller Untereinheiten

nachgewiesen wurden. Die niedrigsten C_t -Werte, und daraus geschlossen die höchsten Expressionsraten, ergaben sich für $K_{ir6.1}$ und SUR2B. SUR2A wurde in den menschlichen Gefäßen hingegen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen, während sich für $K_{ir6.2}$ und SUR1 mittlere Expressionsraten ergaben. Die hier aufgeführten Resultate deuten folglich darauf hin, dass die Kombination aus $K_{ir6.1}$ und SUR2B in den intrarenalen Gefäßen des Menschen die vorherrschende ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten und von Ploug et al.³⁷ zuvor bereits beschriebenen Erkenntnissen über die K_{ATP} -Kanalexpression in den renalen Gefäßen der Ratte.

Auffällig ist, dass sich die C_t -Werte der Negativkontrollen der Expressionsanalysen (-RT) von $K_{ir6.1}$, $K_{ir6.2}$ und SUR1 nicht weit von den C_t -Werten der eigentlichen Proben (+RT) unterscheiden. Der in der RNA-Isolierung durchgeführte DNase-Verdau sollte verhindern, dass es zu einer unbeabsichtigten Amplifikation genomischer DNA in der qPCR kommt. Außerdem weisen die mRNA-Sequenzen der Gene von $K_{ir6.1}$ und SUR1 große Introns auf, sodass das Anlagern der exongrenzüberspannenden Primer an genomische DNA selbst dann unwahrscheinlich erscheint, wenn der DNase-Verdau nicht erfolgreich gewesen wäre. Als Ursache für die dennoch aufgetretene Ähnlichkeit der C_t -Werte zwischen den -RT-Kontrollen und den +RT-Proben wurde deshalb wie bei den Rattenergebnissen in Betracht gezogen, dass prozessierte Pseudogene¹³³ vorlagen.

Wie bereits für die Expression der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten beobachtet, unterscheiden sich die Resultate der Experimente an menschlichen Gefäßen auch in den myographischen K_{ATP} -Kanaluntersuchungen nicht von den Ergebnissen der Rattengefäße. In den menschlichen Widerstandsarterien führte weder die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle mittels Levromakalim noch ihre Inhibition mittels Glibenclamid zu Änderungen der Gefäßwandspannung in Ruhe. Daraus lässt sich schließen, dass die K_{ATP} -Kanäle unter Ruhebedingungen nicht zum Grundtonus der menschlichen Gefäße beitragen. Levromakalim verhinderte jedoch nahezu vollständig L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierte Vasokonstriktionen. Dies zeigt, dass die K_{ATP} -Kanäle in den menschlichen Gefäßen aktivierbar sind und legt nahe, dass ihre Aktivierung zu einer deutlichen Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Ebenso kam es nach Zugabe des K_{ATP} -Kanalaktivators zu einer deutlichen Abschwächung der Noradrenalinempfindlichkeit. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass, wie bereits in den Rattengefäßen beobachtet, auch in den menschlichen Gefäßen die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion durch eine

Hyperpolarisation der Zellmembran abgeschwächt werden kann. Die Blockade der K_{ATP} -Kanäle hingegen hatte keinen Einfluss auf die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion.

4.3.2 Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur Agonist-induzierten Vasodilatation

Weitere Vergleiche zwischen den Ergebnissen der Ratte und des Menschen wurden in Bezug auf die cAMP-vermittelte Vasodilatation in intrarenalen Arterien angestellt. Im Gegensatz zu den Experimenten an Rattengefäßen führte das Prostacyclinanalogon Iloprost in den Widerstandsarterien des Menschen zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, welche die angelegte Vorspannung weitestgehend aufhob. Nach Applikation des K_v7 -Kanalblockers XE991 wurde eine signifikante Abschwächung dieser Iloprost-induzierten Vasodilatation verzeichnet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Iloprost unter anderem über die Aktivierung der K_v7 -Kanäle seine Wirkung entfaltet. Vermutlich bewirkt es auf diese Weise eine Hyperpolarisation der Zellmembran¹⁴⁰, die wiederum zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle führt. Aufgrund der daraufhin abfallenden intrazellulären Calciumkonzentration kann die glatte Muskulatur in der Gefäßwand weniger stark kontrahieren und die Gefäße werden weitgestellt. Li et al. konnten in Patch-Clamp-Experimenten an glatten Muskelzellen humaner pulmonaler Arterien außerdem zeigen, dass Iloprost cAMP-abhängig sowohl TASK-1, einen Vertreter der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle, als auch IK-Kanäle öffnet¹⁴¹. Somit sind mehrere Hinweise gegeben, dass Iloprost bei Gefäßen des Menschen über die Aktivierung vaskulärer Kaliumkanäle wirkt.

Die Unfähigkeit des Iloprost, die renalen Gefäße der Ratte weitzustellen, und die gegensätzlichen Befunde in den menschlichen Gefäßen sind ein Beispiel dafür, dass nicht alle tierexperimentellen Befunde auf den Menschen übertragbar sind. Ebenso zeigten unsere Untersuchungen zum Einfluss der K_v7 -Kanalblockade auf den Grundtonus der renalen Widerstandsgefäße speziesabhängige Unterschiede. Während es in den Rattengefäßen zu einer signifikanten Tonuszunahme nach K_v7 -Kanalblockade kam und Salomonsson et al. diesen Befund speziesübergreifend sowohl in Ratten als auch in Mäusen verzeichneten¹⁰⁰, zeigten unsere Untersuchungen an menschlichen Gefäßen keinen Einfluss der K_v7 -Kanalblockade auf den Ruhetonus.

4.3.3 Folgen der gewonnenen Erkenntnisse zur Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen

Die Resultate der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass manche Daten von Ratte und Mensch vergleichbar sind. Andere wiederum sind speziesspezifisch und lassen sich nicht einfach übertragen. Es wird also weiterhin nötig sein, initiale tierexperimentelle Daten an humanem Gewebe zu prüfen, bevor die daraus gewonnenen Erkenntnisse zum Einsatz am Menschen bereit sind. Kooperationen zwischen den einzelnen Disziplinen einer Klinik können dazu beitragen, humanes Gewebe für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen und somit durch Ex-vivo-Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag zur Grundlagenforschung über Funktionsvorgänge im menschlichen Körper zu leisten.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihres Einflusses auf das Membranpotenzial wird vaskulären Kaliumkanälen eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und damit an der Blutdruckregulation zugeschrieben^{20, 28}. In der vorliegenden Arbeit wurde der Beitrag von Kaliumkanälen an der Gefäßtonusregulation in intrarenalen Widerstandsgefäßen der Ratte und des Menschen mittels Drahtmyographie untersucht. Zur Untersuchung der Expressionsrate der ATP-abhängigen Kaliumkanäle wurden außerdem qPCR-Experimente durchgeführt.

Die Myographieexperimente zeigten, dass die kombinierte Blockade der calciumabhängigen (BK-, IK-, SK-), spannungsabhängigen (K_V -), einwärts gleichrichtenden (K_{ir} -) und ATP-abhängigen (K_{ATP} -) Kaliumkanäle zu einem starken Anstieg des Gefäßtonus führte. Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktionen wurden dadurch nicht verändert. L-Typ-Calciumkanalaktivator-induzierte Vasokonstriktionen wurden durch die Blockade der BK-, IK- und K_V -Kanäle erleichtert, die cAMP-abhängige Vasodilatation hingegen durch die Inhibition von K_V7 -Kanälen vermindert. Die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle führte zu einer deutlichen Abschwächung der Noradrenalinantwort. Mittels qPCR-Analysen wurden die Untereinheiten $K_{ir6.1}$ und SUR2B als die vorherrschenden Einheiten der K_{ATP} -Kanäle im untersuchten Gefäßgebiet ausgemacht. Somit lässt sich schlussfolgern, dass Kaliumkanäle, vor allem K_{Ca} -, K_V - und K_{ATP} -Kanäle, an der Aufrechterhaltung des Ruhetonus beziehungsweise an Tonusänderungen intrarenaler Arterien der Ratte und des Menschen beteiligt sind.

Der Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen und darauf basierend die Gefäßeigenschaften hängen unter anderem von einer dauerhaften sympathischen Innervation ab^{69, 71}. Nach Sympathektomie zeigen glatte Muskelzellen intrarenaler Rattenarterien ein depolarisiertes Membranpotenzial im Vergleich zu scheinsympathektomierten Kontrollen²². In Myographieversuchen wurde sowohl für Gefäße systemisch sympathektomierter als auch lokal renal denervierter Tiere eine erhöhte Noradrenalinsensitivität im Vergleich zu Kontrollgefäßen beobachtet. Diese war unter hyperpolarisierten Bedingungen vermindert und ist folglich zum Teil auf ein verringertes Membranpotenzial zurückzuführen. Veränderungen in Bezug auf die Expressionsrate und Funktionalität der K_{ATP} -Kanäle in den Gefäßen hingegen ergaben sich nicht, sodass die Auswirkungen der sympathischen Denervierung demzufolge nicht auf Veränderungen der K_{ATP} -Kanäle beruhen.

I Literaturverzeichnis

1. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Agabiti Rosei, E.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D. L.; Coca, A.; Simone, G. de; Dominiczak, A.; Kahan, T.; Mahfoud, F.; Redon, J.; Ruilope, L.; Zanchetti, A.; Kerins, M.; Kjeldsen, S. E.; Kreutz, R.; Laurent, S.; Lip, G. Y. H.; McManus, R.; Narkiewicz, K.; Ruschitzka, F.; Schmieder, R. E.; Shlyakhto, E.; Tsioufis, C.; Aboyans, V.; Desormais, I.: 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal* 39 (2018) Nr. 33, S. 3021–3104
2. Forouzanfar, M. H.; Liu, P.; Roth, G. A.; Ng, M.; Biryukov, S.; Marczak, L.; Alexander, L.; Estep, K.; Hassen Abate, K.; Akinyemiju, T. F.; Ali, R.; Alvis-Guzman, N.; Azzopardi, P.; Banerjee, A.; Bärnighausen, T.; Basu, A.; Bekele, T.; Bennett, D. A.; Biadgilign, S.; Catalá-López, F.; Feigin, V. L.; Fernandes, J. C.; Fischer, F.; Gebru, A. A.; Gona, P.; Gupta, R.; Hankey, G. J.; Jonas, J. B.; Judd, S. E.; Khang, Y.-H.; Khosravi, A.; Kim, Y. J.; Kimokoti, R. W.; Kokubo, Y.; Kolte, D.; Lopez, A.; Lotufo, P. A.; Malekzadeh, R.; Melaku, Y. A.; Mensah, G. A.; Misganaw, A.; Mokdad, A. H.; Moran, A. E.; Nawaz, H.; Neal, B.; Ngalesoni, F. N.; Ohkubo, T.; Pourmalek, F.; Rafay, A.; Rai, R. K.; Rojas-Rueda, D.; Sampson, U. K.; Santos, I. S.; Sawhney, M.; Schutte, A. E.; Sepanlou, S. G.; Shifa, G. T.; Shiue, I.; Tedla, B. A.; Thrift, A. G.; Tonelli, M.; Truelsen, T.; Tsilimparis, N.; Ukwaja, K. N.; Uthman, O. A.; Vasankari, T.; Venketasubramanian, N.; Vlassov, V. V.; Vos, T.; Westerman, R.; Yan, L. L.; Yano, Y.; Yonemoto, N.; Zaki, M. E. S.; Murray, C. J. L.: Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990–2015. *JAMA* 317 (2017) Nr. 2, S. 165–182
3. Wei, J.; Galaviz, K. I.; Kowalski, A. J.; Magee, M. J.; Haw, J. S.; Narayan, K. M. V.; Ali, M. K.: Comparison of Cardiovascular Events Among Users of Different Classes of Antihypertension Medications: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA network open* 3 (2020) Nr. 2, e1921618
4. Ettehad, D.; Emdin, C. A.; Kiran, A.; Anderson, S. G.; Callender, T.; Emberson, J.; Chalmers, J.; Rodgers, A.; Rahimi, K.: Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* 387 (2016) Nr. 10022, S. 957–967
5. Samuel S.A.; Francis A.O.; Anthony O.O.: Role of the Kidneys in the Regulation of Intra- and Extra-Renal Blood Pressure. *Ann Clin Hypertens* (2018) Nr. 2, S. 48–58
6. Krum, H.; Schlaich, M. P.; Sobotka, P. A.; Böhm, M.; Mahfoud, F.; Rocha-Singh, K.; Katholi, R.; Esler, M. D.: Percutaneous renal denervation in patients with treatment-resistant hypertension: final 3-year report of the Symplicity HTN-1 study. *The Lancet* 383 (2014) Nr. 9917, S. 622–629
7. Krum, H.; Schlaich, M.; Whitbourn, R.; Sobotka, P. A.; Sadowski, J.; Bartus, K.; Kapelak, B.; Walton, A.; Sievert, H.; Thambar, S.; Abraham, W. T.; Esler, M.: Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet (London, England)* 373 (2009) Nr. 9671, S. 1275–1281
8. Esler, M. D.; Krum, H.; Sobotka, P. A.; Schlaich, M. P.; Schmieder, R. E.; Böhm, M.: Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 376 (2010) Nr. 9756, S. 1903–1909
9. Bhatt, D. L.; Kandzari, D. E.; O'Neill, W. W.; D'Agostino, R.; Flack, J. M.; Katzen, B. T.; Leon, M. B.; Liu, M.; Mauri, L.; Negoita, M.; Cohen, S. A.; Oparil, S.; Rocha-Singh, K.; Townsend, R. R.; Bakris, G. L.: A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *The New England journal of medicine* 370 (2014) Nr. 15, S. 1393–1401

10. *Stavropoulos, K.; Patoulias, D.; Imprialos, K.; Doumas, M.; Katsimardou, A.; Dimitriadis, K.; Tsioufis, C.; Papademetriou, V.*: Efficacy and safety of renal denervation for the management of arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of randomized, sham-controlled, catheter-based trials. *Journal of clinical hypertension* (Greenwich, Conn.) (2020) Nr. 00, S. 1–13
11. *Rettig, R.; Grisk, O.*: The kidney as a determinant of genetic hypertension. Evidence from renal transplantation studies. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979) 46 (2005) Nr. 3, S. 463–468
12. *Guyton, A. C.; Coleman, T. G.; Cowley, A. V.; Scheel, K. W.; Manning, R. D.; Norman, R. A.*: Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *The American journal of medicine* 52 (1972) Nr. 5, S. 584–594
13. *Evans, R. G.; Bie, P.*: Role of the kidney in the pathogenesis of hypertension: time for a neo-Guytonian paradigm or a paradigm shift? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 310 (2016) Nr. 3, R217-29
14. *Sorensen, C. M.; Braunstein, T. H.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Salomonsson, M.*: Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *American journal of physiology. Renal physiology* 302 (2012) Nr. 5, F505-18
15. *Ehmke, H.*: Das Kreislaufsystem. In: *Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagel, S.; Klinke, R.; Brenner, B.* (Hrsg.): *Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Georg Thieme, Stuttgart 2014, S. 214–265
16. *Jackson, W. F.*: Ion channels and vascular tone. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979) 35 (2000) Nr. 1 Pt 2, S. 173–178
17. *Johns, E. J.; Kopp, U. C.; DiBona, G. F.*: Neural control of renal function. *Comprehensive Physiology* 1 (2011) Nr. 2, S. 731–767
18. *Reho, J. J.; Zheng, X.; Fisher, S. A.*: Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306 (2014) Nr. 2, H163-72
19. *Salomonsson, M.; Sorensen, C. M.; Arendshorst, W. J.; Steendahl, J.; Holstein-Rathlou, N.-H.*: Calcium handling in afferent arterioles. *Acta physiologica Scandinavica* 181 (2004) Nr. 4, S. 421–429
20. *Salomonsson, M.; Brasen, J. C.; Sorensen, C. M.*: Role of renal vascular potassium channels in physiology and pathophysiology. *Acta physiologica (Oxford, England)* 221 (2017) Nr. 1, S. 14–31
21. *Draguhn, A.*: Membranpotenzial und Signalübertragung in Zellverbänden. In: *Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagel, S.; Klinke, R.; Brenner, B.* (Hrsg.): *Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Georg Thieme, Stuttgart 2014, S. 86–131
22. *Heumann, P.; Koenen, A.; Zavaritskaya, O.; Schütze, K.; Ramm, A.; Schlüter, T.; Steinbach, A.; Rettig, R.; Schubert, R.; Grisk, O.*: Sympathetic denervation facilitates L-type Ca²⁺ channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries. *Journal of hypertension* 34 (2016) Nr. 4, S. 692–703
23. *Hebert, S. C.; Desir, G.; Giebisch, G.; Wang, W.*: Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiological reviews* 85 (2005) Nr. 1, S. 319–371
24. *McCoy, J. G.; Nimigean, C. M.*: Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochimica et biophysica acta* 1818 (2012) Nr. 2, S. 272–285
25. *Ye, D.; Zhou, W.; Lee, H.-C.*: Activation of rat mesenteric arterial KATP channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (2005) Nr. 1, H358-64

26. Archer, S. L.; Huang, J. M.; Hampl, V.; Nelson, D. P.; Shultz, P. J.; Weir, E. K.: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994) Nr. 16, S. 7583–7587
27. Schubert, R.; Noack, T.; Serebryakov, V. N.: Protein kinase C reduces the K Ca current of rat tail artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276 (1999) Nr. 3, C648-C658
28. Tykocki, N. R.; Boerman, E. M.; Jackson, W. F.: Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Comprehensive Physiology* 7 (2017) Nr. 2, S. 485–581
29. Jackson, W. F.: Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* (New York, N.Y. : 1994) 12 (2005) Nr. 1, S. 113–127
30. Schubert, R.; Krien, U.; Gagov, H.: Protons inhibit the BK(Ca) channel of rat small artery smooth muscle cells. *Journal of vascular research* 38 (2001) Nr. 1, S. 30–38
31. Lu, R.; Alioua, A.; Kumar, Y.; Eghbali, M.; Stefani, E.; Toro, L.: MaxiK channel partners. Physiological impact. *The Journal of Physiology* 570 (2006) Nr. 1, S. 65–72
32. Sorensen, C. M.; Giese, I.; Braunstein, T. H.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Salomonsson, M.: Closure of multiple types of K⁺ channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 462 (2011) Nr. 5, S. 655–667
33. Büssemaker, E.; Popp, R.; Binder, J.; Busse, R.; Fleming, I.: Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney international* 63 (2003) Nr. 5, S. 1749–1755
34. Rasmussen, K. M. B.; Braunstein, T. H.; Salomonsson, M.; Brasen, J. C.; Sorensen, C. M.: Contribution of K⁽⁺⁾ channels to endothelium-derived hypolarization-induced renal vasodilation in rats in vivo and in vitro. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468 (2016) Nr. 7, S. 1139–1149
35. Khammy, M. M.; Kim, S.; Bentzen, B. H.; Lee, S.; Choi, I.; Aalkjaer, C.; Jepps, T. A.: 4-Aminopyridine. A pan voltage-gated potassium channel inhibitor that enhances Kv 7.4 currents and inhibits noradrenaline-mediated contraction of rat mesenteric small arteries. *British journal of pharmacology* 175 (2018) Nr. 3, S. 501–516
36. Crecelius, A. R.; Richards, J. C.; Luckasen, G. J.; Larson, D. G.; Dinunno, F. A.: Reactive hyperemia occurs via activation of inwardly rectifying potassium channels and Na⁺/K⁺-ATPase in humans. *Circulation research* 113 (2013) Nr. 8, S. 1023–1032
37. Ploug, K. B.; Baun, M.; Hay-Schmidt, A.; Olesen, J.; Jansen-Olesen, I.: Presence and vascular pharmacology of KATP channel subtypes in rat central and peripheral tissues. *European journal of pharmacology* 637 (2010) Nr. 1-3, S. 109–117
38. Shi, W.-W.; Yang, Y.; Shi, Y.; Jiang, C.: K(ATP) channel action in vascular tone regulation. From genetics to diseases. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 64 (2012) Nr. 1, S. 1–13
39. Nichols, C. G.: KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440 (2006) Nr. 7083, S. 470–476
40. Gurney, A.; Manoury, B.: Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *European biophysics journal : EBJ* 38 (2009) Nr. 3, S. 305–318
41. Maman, S. R.; Vargas, A. F.; Ahmad, T. A.; Miller, A. J.; Gao, Z.; Leuenberger, U. A.; Proctor, D. N.; Muller, M. D.: Beta-1 vs. beta-2 adrenergic control of coronary blood flow during isometric handgrip exercise in humans. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 123 (2017) Nr. 2, S. 337–343

42. *DiBona, G. F.; Kopp, U. C.*: Neural control of renal function. *Physiological reviews* 77 (1997) Nr. 1, S. 75–197
43. *Chen, H.; Bischoff, A.; Schäfers, R. F.; Wambach, G.; Philipp, T.; Michel, M. C.*: Vasoconstriction of rat renal interlobar arteries by noradrenaline and neuropeptide Y. *Journal of autonomic pharmacology* 17 (1997) Nr. 3, S. 137–146
44. *Cooper, C. L.; Malik, K. U.*: Prostaglandin synthesis and renal vasoconstriction elicited by adrenergic stimuli are linked to activation of alpha-1 adrenergic receptors in the isolated rat kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 233 (1985) Nr. 1, S. 24–31
45. *Wu, D.; Katz, A.; Lee, C. H.; Simon, M. I.*: Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *The Journal of biological chemistry* 267 (1992) Nr. 36, S. 25798–25802
46. *Korbmacher, C.; Brenner, B.*: Funktion und Interaktion von Zellen. In: *Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagel, S.; Klinke, R.; Brenner, B.* (Hrsg.): *Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Georg Thieme, Stuttgart 2014, S. 39–84
47. *Kraft, T.; Brenner, B.*: Muskulatur. In: *Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagel, S.; Klinke, R.; Brenner, B.* (Hrsg.): *Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Georg Thieme, Stuttgart 2014, S. 133–169
48. *Li, L.; Eto, M.; Lee, M. R.; Morita, F.; Yazawa, M.; Kitazawa, T.*: Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *The Journal of Physiology* 508 (1998) Nr. 3, S. 871–881
49. *Wakui, M.; Fukushi, Y.*: Evidence for suppression of potassium conductance by noradrenaline in smooth muscle of guinea-pig vas deferens. *Tohoku J. Exp. Med.* 150 (1986) Nr. 4, S. 365–371
50. *Kurtz, T. W.; DiCarlo, S. E.; Pravenec, M.; Morris, R. C.*: The pivotal role of renal vasodysfunction in salt sensitivity and the initiation of salt-induced hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 27 (2018) Nr. 2, S. 83–92
51. *Si, H.; Heyken, W.-T.; Wölfle, S. E.; Tysiac, M.; Schubert, R.; Grgic, I.; Vilianovich, L.; Giebing, G.; Maier, T.; Gross, V.; Bader, M.; Wit, C. de; Hoyer, J.; Köhler, R.*: Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Circulation research* 99 (2006) Nr. 5, S. 537–544
52. *Brayden, J. E.*: Functional Roles Of KATP Channels In Vascular Smooth Muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 (2002) Nr. 4, S. 312–316
53. *Das, R.; Esposito, V.; Abu-Abed, M.; Anand, G. S.; Taylor, S. S.; Melacini, G.*: cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) Nr. 1, S. 93–98
54. *Carroll, M. A.; Doumad, A. B.; Li, J.; Cheng, M. K.; Falck, J. R.; McGiff, J. C.*: Adenosine2A receptor vasodilation of rat preglomerular microvessels is mediated by EETs that activate the cAMP/PKA pathway. *American journal of physiology. Renal physiology* 291 (2006) Nr. 1, F155-61
55. *Nielsen, C. B.; Bech, J. N.; Pedersen, E. B.*: Effects of prostacyclin on renal haemodynamics, renal tubular function and vasoactive hormones in healthy humans. A placebo-controlled dose-response study. *British journal of clinical pharmacology* 44 (1997) Nr. 5, S. 471–476
56. *Morgera, S.; Woydt, R.; Kern, H.; Schmutzler, M.; DeJonge, K.; Lun, A.; Rohde, W.; Konertz, W.; Kox, W. J.; Neumayer, H.-H.*: Low-dose prostacyclin preserves renal function

- in high-risk patients after coronary bypass surgery. *Critical Care Medicine* 30 (2002) Nr. 1, S. 107–112
57. *Darcin, O. T.; Zor, M. H.; Sahin, V.; Kara, I.; Bekmezci, M.; Sahsivar, O.*: Effect of Iloprost on Renal Function in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. A Clinical Study. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 19 (2013) Nr. 1, S. 12–17
58. *Kassis, H. M.; Minsinger, K. D.; McCullough, P. A.; Block, C. A.; Sidhu, M. S.; Brown, J. R.*: A Review of the Use of Iloprost, A Synthetic Prostacyclin, in the Prevention of Radiocontrast Nephropathy in Patients Undergoing Coronary Angiography and Intervention. *Clinical cardiology* 38 (2015) Nr. 8, S. 492–498
59. *Purdy, K. E.; Arendshorst, W. J.*: Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12 (2001) Nr. 1, S. 19–28
60. *Schubert, R.; Serebryakov, V. N.; Mewes, H.; Hopp, H. H.*: Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *The American journal of physiology* 272 (1997) Nr. 3 Pt 2, H1147-56
61. *Pao, A. C.*: Update on the Guytonian view of hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* 23 (2014) Nr. 4, S. 391–398
62. *Nishi, E. E.; Bergamaschi, C. T.; Campos, R. R.*: The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. *Experimental physiology* 100 (2015) Nr. 5, S. 479–484
63. *Laffin, L. J.; Bakris, G. L.*: Catheter-Based Renal Denervation for Resistant Hypertension: Will It Ever Be Ready for "Prime Time"? *American journal of hypertension* 30 (2017) Nr. 9, S. 841–846
64. *Solano-Flores, L.; Rosas-Arellano, M.; Ciriello, J.*: Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. *Brain Research* 753 (1997) Nr. 1, S. 102–119
65. *Grisk, O.*: Renal denervation and hypertension - The need to investigate unintended effects and neural control of the human kidney. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* (2017) Nr. 204, S. 119–125
66. *Esler, M.; Jennings, G.; Biviano, B.; Lambert, G.; Hasking, G.*: Mechanism of elevated plasma noradrenaline in the course of essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (1986) Nr. 8 Suppl 5, S. 39–43
67. *Sánchez-Álvarez, C.; González-Vélez, M.; Stilp, E.; Ward, C.; Mena-Hurtado, C.*: Renal sympathetic denervation in the treatment of resistant hypertension. *The Yale journal of biology and medicine* 87 (2014) Nr. 4, S. 527–535
68. *Dasgupta, I.; Sharp, A. S. P.*: Renal sympathetic denervation for treatment of hypertension: where are we now in 2019? *Current opinion in nephrology and hypertension* 28 (2019) Nr. 5, S. 498–506
69. *Fisher, S. A.*: Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological genomics* 42A (2010) Nr. 3, S. 169–187
70. *Reho, J. J.; Zheng, X.; Benjamin, J. E.; Fisher, S. A.*: Neural programming of mesenteric and renal arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307 (2014) Nr. 4, H563-73
71. *Puzdrova, V. A.; Kudryashova, T. V.; Gaynullina, D. K.; Mochalov, S. V.; Aalkjaer, C.; Nilsson, H.; Vorotnikov, A. V.; Schubert, R.; Tarasova, O. S.*: Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca(2+) sensitivity during early post-natal development in rats. *Acta physiologica (Oxford, England)* 212 (2014) Nr. 2, S. 128–141

72. *Abdulla, M. H.; Sattar, M. A.; Salman, I. M.; Abdullah, N. A.; Ameer, O. Z.; Khan, M. A. H.; Johns, E. J.*: Effect of acute unilateral renal denervation on renal hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic & autacoid pharmacology* (2008) Nr. 28, S. 87–94
73. *Tripovic, D.; Pianova, S.; McLachlan, E. M.; Brock, J. A.*: Transient supersensitivity to alpha-adrenoceptor agonists, and distinct hyper-reactivity to vasopressin and angiotensin II after denervation of rat tail artery. *British journal of pharmacology* 159 (2010) Nr. 1, S. 142–153
74. *Rizzoni, D.; Perlini, S.; Mircoli, L.; Porteri, E.; Franzelli, C.; Castellano, M.; Agabati Rosei, E.; Ferrari, A. U.*: Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. *Journal of hypertension* 18 (2000) Nr. 8, S. 1041–1049
75. *Picklo, M. J.*: Methods of sympathetic degeneration and alteration. *Journal of the Autonomic Nervous System* 62 (1997) Nr. 3, S. 111–125
76. *Grisk, O.; Lother, U.; Gabriëls, G.; Rettig, R.*: Influence of neonatal sympathectomy on proximal renal resistance artery function in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 449 (2005) Nr. 4, S. 364–371
77. Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2020. https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html, abgerufen am 08. Januar 2022
78. *Mulvany, M. J.*: The active tension-length curve of vascular smooth muscle related to its cellular components. *The Journal of General Physiology* 74 (1979) Nr. 1, S. 85–104
79. *Life Technologies Corporation - a Thermo Fisher Scientific Brand*: Real-Time PCR Handbook Thank You | Thermo Fisher Scientific - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-download/real-time-pcr-handbook-thank-you.html>, abgerufen am 22. April 2020
80. *Müller, H.-J.; Prange, D. R.*: Real-Time-PCR. In: *Müller, H.-J.; Prange, D. R.* (Hrsg.): *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2016, S. 65–76
81. Home - Nucleotide - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>, abgerufen am 04. Juli 2022
82. Primer designing tool. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, abgerufen am 04. Juli 2022
83. *Tricarico, D.; Mele, A.; Lundquist, A. L.; Desai, R. R.; George, A. L.; Conte Camerino, D.*: Hybrid assemblies of ATP-sensitive K⁺ channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) Nr. 4, S. 1118–1123
84. *Ploug, K. B.; Edvinsson, L.; Olesen, J.; Jansen-Olesen, I.*: Pharmacological and molecular comparison of K(ATP) channels in rat basilar and middle cerebral arteries. *European journal of pharmacology* 553 (2006) Nr. 1-3, S. 254–262
85. *Philyppov, I. B.; Golub, A. A.; Boldyriev, O. I.; Shtefan, N. L.; Totska, K.; Voitychuk, O. I.; Shuba, Y. M.*: Myorelaxant action of fluorine-containing pinacidil analog, flocalin, in bladder smooth muscle is mediated by inhibition of L-type calcium channels rather than activation of KATP channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389 (2016) Nr. 6, S. 585–592
86. *Arnemann, J.*: Schmelzkurvenanalyse. In: *Gressner, A. M.; Arndt, T.* (Hrsg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2019, S. 2121

87. Müller, H.-J.; Prange, D. R.: PCR für die Standardklonierung. In: Müller, H.-J.; Prange, D. R. (Hrsg.): PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2016, S. 21–28
88. Fedorov, V. V.; Glukhov, A. V.; Ambrosi, C. M.; KostECKI, G.; Chang, R.; Janks, D.; Schuessler, R. B.; Moazami, N.; Nichols, C. G.; Efimov, I. R.: Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51 (2011) Nr. 2, S. 215–225
89. Veltum, V.; Grisk, O.: Einfluss der sympathischen Innervation auf die Aktivierbarkeit von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen renaler WiderstandsgefäÙe. Bachelorarbeit an der Universität Greifswald, Institut für Physiologie 2017
90. Petkova-Kirova, P.; Gagov, H.; Krien, U.; Duridanova, D.; Noack, T.; Schubert, R.: 4-aminopyridine affects rat arterial smooth muscle BK(Ca) currents by changing intracellular pH. *British journal of pharmacology* 131 (2000) Nr. 8, S. 1643–1650
91. Li, L.; Wu, J.; Jiang, C.: Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats. *The Journal of membrane biology* 196 (2003) Nr. 1, S. 61–69
92. Magnusson, L.; Sorensen, C. M.; Braunstein, T. H.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Salomonsson, M.: Renovascular BK(Ca) channels are not activated in vivo under resting conditions and during agonist stimulation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292 (2007) Nr. 1, R345-53
93. Hofmann, F.; Flockerzi, V.; Kahl, S.; Wegener, J. W.: L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiological reviews* 94 (2014) Nr. 1, S. 303–326
94. Pérez, G. J.; Bonev, A. D.; Patlak, J. B.; Nelson, M. T.: Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *The Journal of General Physiology* 113 (1999) Nr. 2, S. 229–238
95. Brayden, J. E.; Nelson, M. T.: Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science (New York, N.Y.)* 256 (1992) Nr. 5056, S. 532–535
96. Dopico, A. M.; Bukiya, A. N.; Jaggar, J. H.: Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (2018) Nr. 9, S. 1271–1289
97. Cipolla, M. J.; Smith, J.; Kohlmeyer, M. M.; Godfrey, J. A.: SKCa and IKCa Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke* 40 (2009) Nr. 4, S. 1451–1457
98. Wölfle, S. E.; Schmidt, V. J.; Hoyer, J.; Köhler, R.; Wit, C. de: Prominent role of KCa_{3.1} in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo. *Cardiovascular research* 82 (2009) Nr. 3, S. 476–483
99. Kurtz, A.; Hamann, M.; Götz, K.: Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 440 (2000) Nr. 6, S. 889–895
100. Salomonsson, M.; Brasen, J. C.; Braunstein, T. H.; Hagelqvist, P.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Sorensen, C. M.: K(V)7.4 channels participate in the control of rodent renal vascular resting tone. *Acta physiologica (Oxford, England)* 214 (2015) Nr. 3, S. 402–414
101. Prior, H. M.; Webster, N.; Quinn, K.; Beech, D. J.; Yates, M. S.: K(+)-induced dilation of a small renal artery. No role for inward rectifier K⁺ channels. *Cardiovascular research* 37 (1998) Nr. 3, S. 780–790

102. *Chilton, L.; Loutzenhiser, R.*: Functional Evidence for an Inward Rectifier Potassium Current in Rat Renal Afferent Arterioles. *Circulation research* 88 (2001) Nr. 2, S. 152–158
103. *Chilton, L.; Smirnov, S. V.; Loutzenhiser, K.; Wang, X.; Loutzenhiser, R.*: Segment-specific differences in the inward rectifier K(+) current along the renal interlobular artery. *Cardiovascular research* 92 (2011) Nr. 1, S. 169–177
104. *Jackson, W. F.*: Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *The American journal of physiology* 265 (1993) Nr. 5 Pt 2, H1797-803
105. *Clapp, L. H.; Gurney, A. M.*: ATP-sensitive K+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *The American journal of physiology* 262 (1992) Nr. 3 Pt 2, H916-20
106. *Horiuchi, T.; Dietrich, H. H.; Tsugane, S.; Dacey, R. G.; Sobey, C. G.; Faraci, F. M.*: Role of Potassium Channels in Regulation of Brain Arteriolar Tone. *Comparison of Cerebrum Versus Brain Stem Editorial Comment: Comparison of Cerebrum Versus Brain Stem. Stroke* 32 (2001) Nr. 1, S. 218–224
107. *Ikenaga, H.; Bast, J. P.; Fallet, R. W.; Carmines, P. K.*: Exaggerated impact of ATP-sensitive K(+) channels on afferent arteriolar diameter in diabetes mellitus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11 (2000) Nr. 7, S. 1199–1207
108. *Mulvany, M. J.; Nilsson, H.; Flatman, J. A.*: Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *The Journal of Physiology* (1982) Nr. 332, S. 363–373
109. *Salomonsson, M.; Arendshorst, W. J.*: Calcium recruitment in renal vasculature: NE effects on blood flow and cytosolic calcium concentration. *The American journal of physiology* 276 (1999) Nr. 5, F700-10
110. *Wirth, A.*: Rho kinase and hypertension. *Biochimica et biophysica acta* 1802 (2010) Nr. 12, S. 1276–1284
111. *Somlyo, A. P.; Somlyo, A. V.*: Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *The Journal of Physiology* 522 (2000) Nr. 2, S. 177–185
112. *Wu, C. C.; Chen, S. J.; Garland, C. J.*: NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *British journal of pharmacology* 142 (2004) Nr. 3, S. 479–484
113. *Tan, J. H.; Al Abed, A.; Brock, J. A.*: Inhibition of KATP channels in the rat tail artery by neurally released noradrenaline acting on postjunctional alpha2-adrenoceptors. *The Journal of Physiology* 581 (2007) Nr. 2, S. 757–765
114. *Nelson, M. T.; Standen, N. B.; Brayden, J. E.; Worley, J. F.*: Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 336 (1988) Nr. 6197, S. 382–385
115. *Hayabuchi, Y.; Davies, N. W.; Standen, N. B.*: Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C. *The Journal of Physiology* 530 (2001) Nr. 2, S. 193–205
116. *Bonev, A. D.; Nelson, M. T.*: Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K+ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *The Journal of General Physiology* 108 (1996) Nr. 4, S. 315–323
117. *Wilson, A. J.; Jabr, R. I.; Clapp, L. H.*: Calcium modulation of vascular smooth muscle ATP-sensitive K(+) channels: role of protein phosphatase-2B. *Circulation research* 87 (2000) Nr. 11, S. 1019–1025

118. *Hellsten, Y.; Nyberg, M.; Jensen, L. G.; Mortensen, S. P.*: Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *The Journal of Physiology* 590 (2012) Nr. 24, S. 6297–6305
119. *Prieto, D.; Buus, C.; Mulvany, M. J.; Nilsson, H.*: Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries. Role of membrane potential. *The Journal of Physiology* 502 (1997) Nr. 2, S. 281–292
120. *Rembold, C. M.; Chen, X.-L.*: Mechanisms Responsible for Forskolin-Induced Relaxation of Rat Tail Artery. *Hypertension* 31 (1998) Nr. 3, S. 872–877
121. *Zhao, Y.-J.; Wang, J.; Rubin, L. J.; Yuan, X.-J.*: Roles of K⁺ and Cl⁻ Channels in Camp-Induced Pulmonary Vasodilation. *Experimental Lung Research* 24 (2009) Nr. 1, S. 71–83
122. *Ribeiro, L. A. A.; Alencar Filho, E. B.; Coelho, M. C.; Silva, B. A.*: The vasorelaxant effect of 8(17),12E,14-labdatrien-18-oic acid involves stimulation of adenylyl cyclase and cAMP/PKA pathway. Evidences by pharmacological and molecular docking studies. *European journal of pharmacology* (2015) Nr. 764, S. 363–371
123. *Kitazono, T.; Ibayashi, S.; Nagao, T.; Fujii, K.; Fujishima, M.*: Role of Ca(2+)-activated K⁺ channels in acetylcholine-induced dilatation of the basilar artery in vivo. *British journal of pharmacology* 120 (1997) Nr. 1, S. 102–106
124. *Price, J. M.; Cabell, J. F.; Hellermann, A.*: Inhibition of cAMP mediated relaxation in rat coronary vessels by block of Ca⁺⁺ activated K⁺ channels. *Life sciences* 58 (1996) Nr. 24, S. 2225–2232
125. *Chadha, P. S.; Zunke, F.; Zhu, H.-L.; Davis, A. J.; Jepps, T. A.; Olesen, S. P.; Cole, W. C.; Moffatt, J. D.; Greenwood, I. A.*: Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired β -adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 59 (2012) Nr. 4, S. 877–884
126. *Jepps, T. A.; Chadha, P. S.; Davis, A. J.; Harhun, M. I.; Cockerill, G. W.; Olesen, S. P.; Hansen, R. S.; Greenwood, I. A.*: Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation* 124 (2011) Nr. 5, S. 602–611
127. *Fuchikami, C.; Murakami, K.; Tajima, K.; Homan, J.; Kosugi, K.; Kuramoto, K.; Oka, M.; Kuwano, K.*: A comparison of vasodilation mode among selezipag (NS-304; 2-{4-(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)aminobutoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide), its active metabolite MRE-269 and various prostacyclin receptor agonists in rat, porcine and human pulmonary arteries. *European journal of pharmacology* (2017) Nr. 795, S. 75–83
128. *Nakhostine, N.; Lamontagne, D.*: Contribution of prostaglandins in hypoxia-induced vasodilatation in isolated rabbit hearts. Relation to adenosine and KATP channels. *Pflugers Arch.* 428 (1994) Nr. 5-6, S. 526–532
129. *Heesen, B.-J.; Mey, J. G.*: Effects of cyclic AMP-affecting agents on contractile reactivity of isolated mesenteric and renal resistance arteries of the rat. *British journal of pharmacology* 101 (1990) Nr. 4, S. 859–864
130. *Clapp, L. H.; Gurung, R.*: The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension. Role of membrane versus nuclear receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators* (2015) Nr. 120, S. 56–71
131. *Benyahia, C.; Ozen, G.; Orie, N.; Ledwozyw, A.; Louedec, L.; Li, F.; Senbel, A. M.; Silverstein, A.; Danel, C.; Longrois, D.; Clapp, L. H.; Norel, X.; Topal, G.*: Ex vivo relaxations of pulmonary arteries induced by prostacyclin mimetics are highly dependent of the precontractile agents. *Prostaglandins & other lipid mediators* 121 (2015) Nr. A, S. 46–52
132. *Myren, M.; Olesen, J.; Gupta, S.*: Pharmacological and expression profile of the prostaglandin I(2) receptor in the rat craniovascular system. *Vascular pharmacology* 55 (2011) Nr. 1-3, S. 50–58

133. Schmidt, O.: Genom von Eukaryoten. In: *Fritsche, O.* (Hrsg.): Genetik und Molekularbiologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2017, S. 27
134. Quintas, L. E. M.; Noël, F.: Mechanisms of adaptive supersensitivity in vas deferens. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 146 (2009) Nr. 1-2, S. 38–46
135. Urquilla, P. R.; Westfall, D. P.; Goto, K.; Fleming, W. W.: The effects of ouabain and alterations in potassium concentration on the sensitivity to drugs and the membrane potential of the smooth muscle of the guinea-pig and rat vas deferens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 207 (1978) Nr. 2, S. 347–355
136. Plane, F.; Garland, C. J.: Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *British journal of pharmacology* 110 (1993) Nr. 2, S. 651–656
137. Woodcock, E. A.; Morris, M. J.; McLeod, J. K.; Johnston, C. I.: Specific Increase in Renal α -Adrenergic Receptors Following Unilateral Renal Denervation. *Journal of receptor research* 5 (2008) Nr. 2-3, S. 133–146
138. Frame, A. A.; Carmichael, C. Y.; Kuwabara, J. T.; Cunningham, J. T.; Wainford, R. D.: Role of the afferent renal nerves in sodium homeostasis and blood pressure regulation in rats. *Experimental physiology* 104 (2019) Nr. 8, S. 1306–1323
139. Seino, S.; Miki, T.: Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81 (2003) Nr. 2, S. 133–176
140. Thapaliya, S.; Matsuyama, H.; Takewaki, T.: Bradykinin causes endothelium-independent hyperpolarisation and neuromodulation by prostanoid synthesis in hamster mesenteric artery. *European journal of pharmacology* 408 (2000) Nr. 3, S. 313–321
141. Li, Y.; Connolly, M.; Nagaraj, C.; Tang, B.; Bálint, Z.; Popper, H.; Smolle-Juettner, F. M.; Lindenmann, J.; Kwapiszewska, G.; Aaronson, P. I.; Wohlkoenig, C.; Leithner, K.; Olschewski, H.; Olschewski, A.: Peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ , the acute signaling factor in prostacyclin-induced pulmonary vasodilation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46 (2012) Nr. 3, S. 372–379

II Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---------------------------|---|
| % | Prozent |
| [Ca ²⁺] | Calciumionenkonzentration |
| °C | Grad Celsius (Temperatureinheit) |
| µg, ng | Mikro-, Nanogramm (Gewichtseinheit) |
| 4-AP | 4-Aminopyridin |
| Aa. | Arteriae |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BaCl ₂ | Bariumchlorid |
| BK-Kanäle | calciumabhängige Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit |
| BL | Basislinie |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calciumion |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| Ca _v | spannungsabhängiger Calciumkanal |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| C _t -Wert | Wert des „threshold cycle“ (PCR) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMX | sympathektomiert |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNX | lokal renal denerviert |
| DP-Rezeptor | Prostaglandin D Rezeptor |
| EDHF | „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| E _{max} | maximale Gefäßwandspannung |
| EP-Rezeptor | Prostaglandin E Rezeptor |
| et al. | et alii (und andere) |
| For | Forskolin |
| geb. | geboren |
| G _i -gekoppelt | an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt |
| G _q -gekoppelt | an ein G-Protein gekoppelt, das über IP ₃ und Diacylglycerin die Proteinkinase C aktiviert |
| H ₂ O | Wasser |
| IK-Kanäle | calciumabhängige Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit |
| Ilo | Iloprost |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---|--|
| IP-Rezeptor | Prostacyclinrezeptor |
| K ⁺ | Kaliumion |
| K125 | kaliumreiche Pufferlösung (125 mmol/L Kaliumionen) |
| K _{2P} -Kanäle | Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle |
| K64 | kaliumreiche Pufferlösung (64 mmol/L Kaliumionen) |
| K _{ATP} -Kanäle | ATP-abhängige Kaliumkanäle |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| K _{ir} -Kanäle | einwärtsgerichtete Kaliumkanäle |
| KRB-Lösung | Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung |
| K _v -Kanäle | spannungsabhängige Kaliumkanäle |
| K-W-Kurve | Konzentrations-Wirkungs-Kurve |
| L; µl | Liter, Mikroliter (Volumeneinheit) |
| logEC ₅₀ | Agonistkonzentration, bei der genau die Hälfte der maximal möglichen Spannung aufgebaut wird |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute (Zeiteinheit) |
| MLK | leichte Myosinkette |
| MLKK | Myosin-Leichte-Ketten-Kinase |
| mm, µm | Milli-, Mikrometer (Längeneinheit) |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit) |
| mol; mmol; µmol | Mol (Stoffmengeneinheit; 6,022 * 10 ²³ Teilchen); Millimol; Mikromol |
| mRNA | „messenger“ Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl der verwendeten Gefäße |
| Na ⁺ -K ⁺ -ATPase | Natrium-Kalium-ATPase |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NE | Noradrenalin |
| NTC | no template control |
| O ₂ | Sauerstoff |
| p | statistischer p-Signifikanzwert |
| PBGD | Porphobilinogen Deaminase |
| pH-Wert | Maß für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| qPCR | „Real-time“ Polymerasekettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s | Sekunde (Zeiteinheit) |
| S(-)-BayK | S(-)-BayK8644 (L-Typ-Calciumkanalaktivator) |
| S-DMX | scheinsympathektomiert |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| S-DNX | lokal renal scheindenerviert |
| SK-Kanäle | calciumabhängige Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit |
| SUR | Sulfonylharnstoffrezeptor |
| t ₁ | Zeitpunkt 1 |
| TAE Puffer | Tris/Acetic Acid/EDTA Puffer |
| TEA | Tetraethylammonium |
| TRAM-34 | 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol |
| UV-Licht | Ultraviolettlicht |
| vgl. | vergleiche |
| vs. | versus (gegen) |
| XE991 | 10,10-bis(4-pyridinyl-methyl)-9(10H)-anthracenone |
| xg | Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung (Zentrifuge) |
| YWHAZ | Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| Δ | Delta-Wert = Differenz zwischen zwei Werten |

III Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Vereinfacht dargestellter Zusammenhang zwischen dem renalen Blutfluss und dem systemischen Blutdruck | 3 |
| Abbildung 2: Folgen einer verminderten Kaliumkanalaktivität | 6 |
| Abbildung 3: Beeinflussung der Nierenfunktion durch das sympathische Nervensystem ... | 12 |
| Abbildung 4: Allgemeines Myographie-Protokoll für die Erstellung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasokonstriktion renaler Widerstandsgefäße der Ratte und des Menschen | 27 |
| Abbildung 5: Allgemeines Myographie-Protokoll für die Erstellung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Untersuchung der Vasodilatation renaler Widerstandsgefäße der Ratte und des Menschen | 29 |
| Abbildung 6: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade | 41 |
| Abbildung 7: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne IK-Kanalblockade | 42 |
| Abbildung 8: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne SK-Kanalblockade | 42 |
| Abbildung 9: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_V -Kanalblockade | 43 |
| Abbildung 10: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ir} -Kanalblockade | 44 |
| Abbildung 11: Kumulative S(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade | 45 |
| Abbildung 12: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade | 47 |
| Abbildung 13: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne IK-Kanalblockade | 47 |
| Abbildung 14: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne SK-Kanalblockade | 48 |
| Abbildung 15: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_V -Kanalblockade | 50 |
| Abbildung 16: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_V - und BK-Kanalblockade | 50 |
| Abbildung 17: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ir} -Kanalblockade | 51 |
| Abbildung 18: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne kombinierte Kaliumkanalblockade | 52 |
| Abbildung 19: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte | 54 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 20: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne BK-Kanalblockade | 55 |
| Abbildung 21: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade | 55 |
| Abbildung 22: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v -Kanalblockade | 56 |
| Abbildung 23: Kumulative Forskolin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien der Ratte mit und ohne K_v7 -Kanalblockade | 56 |
| Abbildung 24: Kumulative Iloprost-Konzentrations-Wirkungs-Kurve an intrarenalen Arterien der Ratte | 57 |
| Abbildung 25: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne hyperpolarisierendem Stimulus (K_{ATP} -Kanalaktivierung) | 61 |
| Abbildung 26: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne hyperpolarisierendem Stimulus (K_{ATP} -Kanalaktivierung) | 62 |
| Abbildung 27: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade | 64 |
| Abbildung 28: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade | 65 |
| Abbildung 29: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen..... | 67 |
| Abbildung 30: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen..... | 69 |
| Abbildung 31: qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP} -Kanaluntereinheiten in intrarenalen Arterien des Menschen..... | 72 |
| Abbildung 32: Kumulative S-(-)-BayK-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien des Menschen mit und ohne K_{ATP} -Kanalaktivierung..... | 73 |
| Abbildung 33: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien des Menschen mit und ohne K_{ATP} -Kanalaktivierung..... | 74 |
| Abbildung 34: Kumulative Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien des Menschen mit und ohne K_{ATP} -Kanalblockade | 75 |
| Abbildung 35: Kumulative Iloprost-Konzentrations-Wirkungs-Kurven an intrarenalen Arterien des Menschen mit und ohne K_v7 -Kanalblockade | 76 |

IV Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Materialien für die Tierhaltung | 18 |
| Tabelle 2: Verwendete Pharmaka in der Myographie | 18 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung und der kaliumreichen Pufferlösung | 19 |
| Tabelle 4: Materialien für die Expressionsanalysen | 20 |
| Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Geräte | 20 |
| Tabelle 6: Verwendete Programme | 21 |
| Tabelle 7: Pharmakologische Kaliumkanalblocker und -aktivatoren zur Beeinflussung der Kaliumkanalaktivität in intrarenalen Arterien der Ratte und des Menschen | 26 |
| Tabelle 8: Reagenzien für die cDNA-Synthese der renalen Widerstandsarterien | 30 |
| Tabelle 9: Primersequenzen der Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten und Haushaltsgene intrarenaler Arterien der Ratte | 32 |
| Tabelle 10: Reagenzien für die qPCR zur Analyse der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsarterien | 33 |
| Tabelle 11: Protokoll der qPCR zur Analyse der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten in renalen Widerstandsarterien | 33 |
| Tabelle 12: Primersequenzen der Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien des Menschen | 36 |
| Tabelle 13: Relativer Anstieg des Gefäßtonus intrarenaler Arterien der Ratte nach Blockade der Kaliumkanäle der Klassen K_{Ca}, K_v, K_{ir} und K_{ATP} | 40 |
| Tabelle 14: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der K_{Ca}-Kanalblocker | 46 |
| Tabelle 15: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der K_v-Kanalblocker | 49 |
| Tabelle 16: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit des K_{ir}-Kanalblockers Bariumchlorid | 51 |
| Tabelle 17: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien der Ratte in An- und Abwesenheit der Kaliumkanalblocker der Klassen K_{Ca}, K_v, K_{ir} und K_{ATP} | 52 |
| Tabelle 18: Effekte der Kaliumkanalblockaden auf den Gefäßtonus intrarenaler Arterien der Ratte | 58 |
| Tabelle 19: $\log EC_{50}$ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalaktivators Levromakalim | 61 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 20: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalaktivators Levromakalim | 62 |
| Tabelle 21: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalblockers Glibenclamid | 64 |
| Tabelle 22: logEC₅₀ und E_{max} der Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten und ihrer Kontrollen in An- und Abwesenheit des K_{ATP}-Kanalblockers Glibenclamid | 65 |
| Tabelle 23: C_t-Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien sympathektomierter Ratten (n = 6) und ihrer Kontrollen (n = 5) | 66 |
| Tabelle 24: C_t-Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten intrarenaler Arterien lokal renal denervierter Ratten (n = 5-6) und ihrer Kontrollen (n = 5-6) | 68 |
| Tabelle 25: Vergleich der K125-Maxima und der logEC₅₀- und E_{max}-Werte der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion zwischen intrarenalen Arterien systemisch sympathektomierter und lokal renal denervierter Ratten | 70 |
| Tabelle 26: C_t-Werte der qPCR zur Untersuchung der mRNA-Gehalte der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten in Aa. arcuatae (n = 6-7) und Aa. interlobulares (n = 6-7) des Menschen | 71 |

V Kongressbeiträge

1. *Pfannkuch, S.; Veltum, V.; Grisk, O.:* The contribution of ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) to renal vascular tone regulation. *6. Symposium der Jungen Physiologen, 09.2017, Jena (Vortrag)*
2. *Grisk, O.; Pfannkuch, S.; Veltum, V.; Witte, J.:* Renal Denervation Sensitizes Renal Resistance Arteries to L-type Ca^{2+} Channel Activation. *Experimental Biology, 04.2018, San Diego (Poster)*
3. *Pfannkuch, S.; Witte, J.; Rettig, R.; Schubert, R.; Grisk, O.:* L-type Ca^{2+} channel activation is sensitized in renal resistance arteries in response to renal denervation. *Europhysiology 2018 of The Physiological Society, 09.2018, London (Poster)*

VI Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 15.07.2022

Ort, Datum

Saskia Mahl

VII Danksagung

Hiermit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Grisk für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit. Vielen Dank, dass ich immer so unkompliziert mit meinen Fragen im Büro vorbeikommen konnte und so gut betreut wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Rettig bedanke ich mich für die Möglichkeit, am Institut für Physiologie promovieren zu dürfen und für die guten Seminare während meines Studiums, die mich überhaupt erst auf diese Idee haben kommen lassen. Ich danke ihm außerdem herzlich für die guten Gespräche über Gott und die Welt, die mir in Erinnerung bleiben werden.

Frau Dr. Jeannine Witte danke ich für die Unterstützung vor allem bei der Planung und Durchführung der qPCR-Analysen. Danke für das Einführen in für mich völlig neue Methoden und für das „Immer-ansprechbar-Sein“.

Doreen Nierath möchte ich Danke sagen für die große Unterstützung bei den Tierversuchen, auf die meine ganze Arbeit baut, und auch Svea Gerber gehört mein Dank für die Unterstützung im labortechnischen Bereich.

Außerdem bedanke ich mich bei Ulrike Ritter für das Korrekturlesen und die vielen guten Anmerkungen bei der Abfassung dieser Arbeit.

Meinem Ehemann Daniel Mahl gilt vor allem mein Dank dafür, dass er mir so oft den Rücken freigehalten hat, damit ich mich dem Schreiben widmen konnte. Danke auch für das wiederholte Kontrolllesen sowie die Zeit und Ausdauer, die in die Unterstützung zur Fertigstellung meiner Arbeit geflossen sind.

Ebenso möchte ich mich bei dem Gerhard Domagk-Nachwuchsförderprogramm der Universitätsmedizin Greifswald bedanken, das mich durch ein Stipendium finanziell und ideell während meines Forschungsjahres unterstützt hat.

Zuletzt gehört mein Dank Gott, der uns durch die Wissenschaft die Faszinationen der Welt erforschen lässt und der mich durch die Zeit des Studiums und der Promotion getragen hat und auch darüber hinaus begleiten wird.