

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

Die Regulation des Gefäßtonus der Arteria saphena von adulten Ratten
durch TASK-1-Kanäle

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

vorgelegt von
Daniel Neubeck

aus
Weinheim
2023

Dekan: Prof. Dr. med. S. Goerd
Referent: Prof. Dr. med. R. Schubert

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Das kardiovaskuläre System.....	3
1.2 Anatomie der Blutgefäße	3
1.3 Die glatte Muskelzelle	4
1.3.1 Mechanismen der Kontraktion.....	4
1.3.2 Mechanismen der Relaxation.....	5
1.4 Das Membranpotential	6
1.5 Konventionelle Kaliumkanäle	6
1.5.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v).....	6
1.5.2 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}).....	7
1.5.3 Calcium- und spannungsabhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}).....	7
1.5.4 Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR}).....	7
1.6 Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P})	8
1.6.1 Entdeckung	8
1.6.2 Struktureller Aufbau	8
1.6.3 Klassifikation	9
1.6.4 Funktionelle Eigenschaften	10
1.6.5 Regulation und Pathophysiologie.....	10
1.6.6 Pharmakologie	10
1.7 TASK-Kanäle	11
1.7.1 TASK-1-Kanäle und pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)	12
1.7.2 TASK-1-Kanäle und Vorhofflimmern	13
1.7.3 TASK-Kanäle und das Glomus caroticum.....	15
1.7.4 TASK-Kanäle und primärer Hyperaldosteronismus.....	16
1.8 Fragestellung und Zielsetzung des Projekts	17

2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	Versuchstiere	19
2.2	Chemikalien	19
2.3	Geräte	20
2.4	Freilegung der Arteria saphena.....	21
2.5	Gefäßpräparation	22
2.6	Isometrische Draht-Myographie	22
2.7	Montage der Gefäßsegmente	24
2.8	Normalisierung	25
2.9	Standardversuchsprotokoll.....	26
2.10	Versuchsprotokolle.....	27
2.11	Auswertung und Statistik.....	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK _{Ca} -Kanälen	32
3.2	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K _v 7-Kanälen	33
3.3	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK _{Ca} - und K _v 7-Kanälen.....	35
3.4	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K _v 1.5-Kanälen	37
3.4.1	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K _v 1.5-Kanälen durch DPO-1	37
3.4.2	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K _v 1.5-Kanälen durch Psora-4	40
3.4.3	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K _v 1.5-Kanälen durch PAP-1.....	42
3.5	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK _{Ca} -, K _v 2.1- und K _v 1.5-Kanälen	44
4	DISKUSSION	47
4.1	Der kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231	47
4.2	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK _{Ca} -Kanälen	49

4.3	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K_v7 -Kanälen	50
4.4	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} - und K_v7 -Kanälen	51
4.5	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen	52
4.5.1	Kanalblockade durch DPO-1	52
4.5.2	Kanalblockade durch Psora-4	54
4.5.3	Kanalblockade durch PAP-1	55
4.6	Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} , $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanälen	56
4.7	Schlussfolgerung.....	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	59
7	LEBENS LAUF	73
8	DANKSAGUNG	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BK _{Ca} -Kanal	Calciumabhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
CaCl ₂	Calciumchlorid
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DAG	Diacylglycerol
DPO-1	Diphenylphosphinoxid-1
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBTX	Iberiotoxin
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K _{2P} -Kanal	Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KCNK	Potassium two pore domain channel subfamily K member
K _{IR} -Kanal	Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
kPa	Kilopascal
K _v -Kanal	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
l	Liter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mN	Millinewton
mV	Millivolt
Mx	Methoxamin
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
nM	Nanomolar
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP-1	5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PKC	Proteinkinase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Psora-4	5-(4-Phenylbutoxy)psoralen
RhoA	Rho (Ras homologue)-GTPase
siRNA	Small interfering RNA
STX	Stromatoxin-1
TALK	TWIK-related Alkaline-pH-activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related Acid-Sensitive K ⁺ channel
THIK	Tandem-pore-domain Halothane-Inhibited K ⁺ channel

TRAAK	TWIK-related arachidonic acid stimulated K ⁺ channel
TREK	TWIK-related K ⁺ channel
TRESK	TWIK-related spinal-cord K ⁺ channel
TWIK	Tandem of pore domains in a Weak Inwardly rectifying K ⁺ channel

1 EINLEITUNG

1.1 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System besteht aus dem Herzen sowie den arteriellen und venösen Blutgefäßen. Der Blutfluss, der durch den Auswurf des linken Ventrikels generiert wird, erfolgt durch sich verzweigende arterielle Gefäße bis zum Kapillarsystem. Dort erfolgt auf einer Fläche von circa 1000 m² der Gas- und Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe. Anschließend gelangt das Blut über das venöse System zurück zum Herzen und schließlich zur Lunge. Nach der Reoxygenierung des Blutes in der Lunge wird dieses durch den linken Ventrikel in die Peripherie ausgeworfen und der Kreislauf beginnt erneut (Pugsley and Tabrizchi, 2000). Die zentrale Funktion des Herzkreislaufsystems besteht dabei in der Versorgung der peripheren Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem Abtransport von anfallendem Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselendprodukten. Durch das funktionelle Zusammenspiel von Herz und Blutgefäßen gelingt eine suffiziente Blutversorgung der unterschiedlichen Gewebe (Guyton, 1981). Die Adaptation des zur Verfügung gestellten Blutvolumens an den regionalen Bedarf wird durch Widerstandsgefäße des arteriellen Schenkels ermöglicht. Diese nehmen durch eine Variation ihres Gefäßradius direkten Einfluss auf den peripheren Widerstand und damit den Blutfluss und den Blutdruck (Touyz et al., 2018). Der Blutdruck ergibt sich dabei aus dem Produkt von Herzzeitvolumen und dem systemischen vaskulären Widerstand (Brozovich et al., 2016). Der periphere Widerstand und der daraus resultierende Blutfluss wird im Wesentlichen durch den Radius und die Länge eines Gefäßes sowie die Viskosität des Blutes bestimmt. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille verhält sich der Gefäßwiderstand umgekehrt proportional zum Gefäßradius in der vierten Potenz. Daraus ergibt sich die enge Beziehung zwischen der Regulation des Vasotonus der Widerstandsgefäße und dem daraus resultierenden peripheren Blutfluss (Touyz et al., 2018).

1.2 Anatomie der Blutgefäße

Die Wand der Blutgefäße ist aus drei unterschiedlichen Schichten aufgebaut. Die innerste Schicht wird als Tunica intima bezeichnet und besteht vorwiegend aus Endothelzellen. Sie sind einer Basalmembran aufgelagert, die eine Abgrenzung zum subendothelialen Raum darstellt. Dieser besteht vor allem aus Bindegewebe und wird durch die Membrana elastica interna abgeschlossen. Neben ihrer Barrierefunktion sind Endothelzellen auch an der Regulation des Vasotonus und der Blutgerinnung beteiligt (Pugsley and Tabrizchi, 2000). Die mittlere Schicht bezeichnet man als Tunica media. Sie wird hauptsächlich von glatten Muskelzellen gebildet (Pugsley and Tabrizchi, 2000; Seidelmann, Lighthouse and Greif, 2014). Um eine Erregungsweiterleitung zwischen den einzelnen Zellen zu ermöglichen, sind sie durch Nexus elektrisch miteinander gekoppelt (Khalil et al., 1987). Die Adventitia bildet die äußerste Gewebeschicht und besteht hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix, Nerven sowie Lymph- und kleinen Blutgefäßen (Pugsley and Tabrizchi, 2000; Seidelmann, Lighthouse and Greif, 2014).

1.3 Die glatte Muskelzelle

Glatte Muskulatur ist ein Bestandteil verschiedenster Organsysteme. Unter anderem kommt sie im respiratorischen, gastrointestinalen und kardiovaskulären System vor. In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation erfüllt sie unterschiedliche lebenserhaltende Funktionen. Während sie etwa im Respirationstrakt an der Regulation der Atemwegsweite beteiligt ist, beeinflussen glatte Muskelzellen in kleinen Arterien und Arteriolen den peripheren Widerstand und konsekutiv den Blutfluss. Glatte Muskulatur kann im Gegensatz zu quergestreifter Muskulatur nicht willentlich gesteuert werden (Hafen and Burns, 2021), da sie der Kontrolle durch das autonome Nervensystem bestehend aus Sympathikus und Parasympathikus unterliegt (Hafen, Shook and Burns, 2021). Glatte Muskelzellen bilden keine Sarkomere aus und erscheinen deshalb mikroskopisch homogen. Diese Eigenschaft unterscheidet sie von der quergestreiften Muskulatur und war dementsprechend namensgebend. Funktionell von Relevanz sind das sarkoplasmatische Retikulum, welches als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert, sowie die im zytoplasmatischen Raum befindlichen Aktin- und Myosinfilamente, deren Interaktion essentiell für den Kontraktionsprozess glatter Muskelzellen ist (Hafen and Burns, 2021). Glatte Muskelzellen können hinsichtlich ihres Kontraktionsverhaltens in einen tonischen und einen phasischen Typ unterschieden werden. Während tonische Kontraktionsmuster in großen Gefäßen vorkommen, sind glatte Muskelzellen mit phasischem Kontraktionsmuster vor allem teilweise in kleinen Widerstandsgefäßen sowie im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt lokalisiert (Fisher, 2010; Reho, Zheng and Fisher, 2014). Hinsichtlich ihrer Innervation können glatte Muskelzellen in einen single-unit und einen multi-unit Typ unterschieden werden. Beim single-unit Typ erfolgt die Innervation mehrerer Muskelzellen durch einen einzelnen Nerven. Dabei sind die Muskelzellen untereinander durch Connexine elektrisch gekoppelt, wodurch sie ein funktionelles Synzytium bilden. Davon abzugrenzen ist der multi-unit Typ, bei dem die Innervation durch mehrere Nerven erfolgt (Hafen and Burns, 2021).

1.3.1 Mechanismen der Kontraktion

Die Kontraktion glatter Muskelzellen unterliegt der Regulation durch das autonome Nervensystem, humorale Botenstoffe (z. B. Hormone), autokrine und parakrine Signalmoleküle sowie mechanische Einwirkungen (Webb, 2003; Woodrum and Brophy, 2001).

Die gemeinsame Endstrecke der molekularen Signalkaskaden der glattmuskulären Kontraktion besteht in einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit einem konsekutiven Ablauf des Querbrückenzyklus. Die Kontraktion wird dabei durch die Interaktion der Proteine Aktin und Myosin vermittelt und durch die katalytische Aktivität der Myosin-ATPase energetisch unterhalten (Webb, 2003). Durch ihre Möglichkeit zur Kontraktion und Relaxation beeinflussen glatte Muskelzellen unmittelbar die Gefäßlumenweite und damit auch den Blutfluss (Brozovich et al., 2016; Woodrum and Brophy, 2001). Die Initiierung des Kontraktionszyklus erfolgt entweder rezeptorvermittelt, durch eine Depolarisation der Zellmembran oder dehnungsabhängig (Webb, 2003). Grundsätzlich kann zwischen einer elektromechanischen Kopplung durch eine Depolarisation der Zellmembran und einer pharmakomechanischen Kopplung durch die Einwirkung verschiedener Liganden unterschieden werden (Ogut and Brozovich, 2003). Die zugrundeliegenden zellulären Signalkaskaden sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Kommt es zu einer

Aktivierung von spannungs- oder dehnungsabhängigen Calciumkanälen führt dies zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Webb, 2003). Da unter Ruhebedingungen die Konzentration von Calcium im Extrazellulärraum und im sarkoplasmatischen Retikulum 10 000-fach höher ist als im Zytoplasma, kommt es durch diesen Konzentrationsgradienten schnell zu einer Verschiebung von Calcium in den zytoplasmatischen Raum (Khalil et al., 1987). In der Folge kommt es zu einer vermehrten Bindung von Calcium an das zytoplasmatisch gelöste Protein Calmodulin. Dieser Komplex führt zu einer Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase mit einer konsekutiven Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins, wodurch eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht wird (Webb, 2003; Woodrum and Brophy, 2001).

Wenn es zur Bindung eines Agonisten, wie Noradrenalin, Angiotensin II oder Endothelin-1, an seinen membranständigen Rezeptor kommt, dann führt dies zu einer G-Protein vermittelten Aktivierung der Phospholipase C. Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in seine Spaltprodukte Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bewirkt rezeptorvermittelt die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und führt damit ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Der Komplex aus Calcium und DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine kontraktionsfördernd wirkt. Neben der prokontraktil wirkenden Myosin-leichte-Ketten-Kinase existiert eine gegensätzlich funktionierende Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase. Diese führt gemäß ihrer katalytischen Funktion zu einer Dephosphorylierung und Relaxation glatter Muskelzellen. Kommt es durch den Einfluss eines Agonisten (z. B. Angiotensin II) zu einer Aktivierung des G-Proteins RhoA und einer damit verbundenen Stimulierung der Rho-Kinase, führt dies zu einer Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase. Dadurch wird die Bindung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase an die leichte Kette des Myosins inhibiert, wodurch die Kontraktion gefördert wird (Webb, 2003). Über die beschriebenen Signalkaskaden hinaus bestimmt die Calciumsensitivität des kontraktiles Apparates den Myotonus (Nilsson, 1998).

1.3.2 Mechanismen der Relaxation

Die Relaxation der glatten Muskelzelle kann sowohl durch die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration als auch durch eine gesteigerte Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase erreicht werden. Die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration wird durch verschiedene Enzyme und Transporter realisiert.

Die Calcium-Magnesium-ATPase katalysiert die Translokation von Calcium aus dem Zytosol in das Innere des sarkoplasmatischen Retikulums. Ein ähnliches Enzym befindet sich in der Zellmembran und bewirkt dort eine Ausschleusung von Calcium aus der Zelle. Ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert ist ein Natrium-Calcium-Antiport, der gleichzeitig Calcium aus der Zelle und Natrium in die Zelle transportiert. Eine Senkung der zytosolischen Calciumkonzentration durch die calciumbindenden Proteine Calsequestrin und Calreticulin ist ebenfalls beschrieben worden (Webb, 2003).

1.4 Das Membranpotential

Das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen liegt in vivo im Bereich von -40 mV bis -55 mV (Nelson and Quayle, 1995). Es resultiert aus der selektiven Permeabilität der Zellmembran für die beteiligten Ionen und ihren jeweiligen elektrochemischen Gradienten. Aufgrund der ausgeprägten Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen wird das Ruhemembranpotential hauptsächlich durch sie bestimmt (Hirst and Edwards, 1989). Deshalb nehmen sie eine tragende Rolle bei der Regulation des Membranpotentials und damit der Exzitabilität verschiedener Zellen ein. Eine erhöhte Leitfähigkeit führt dabei zu einem gesteigerten Kaliumefflux und zu einer Hyperpolarisation. Die Blockade von Kaliumkanälen führt dagegen zu einer Depolarisation (Nelson and Quayle, 1995). Resultiert eine Depolarisation der Zellmembran, kann dies zu einer Öffnung von membranständigen, spannungsabhängigen Calciumkanälen führen. Die konsekutive Verschiebung der Calciumionen von extrazellulär nach intrazellulär führt schließlich zu einer Kontraktion, wie es vorher bereits ausführlich beschrieben wurde. Daraus ergibt sich die enge Beziehung zwischen dem Membranpotential und der Regulation des glattnuskulären Tonus (Somlyo and Somlyo, 1994).

1.5 Konventionelle Kaliumkanäle

Kaliumkanäle nehmen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Membranpotentials von glatten Gefäßmuskelzellen ein. Durch eine Modulation des Membranpotentials nehmen sie Einfluss auf die Gefäßlumenweite und die Blutversorgung der nachgeschalteten Gewebe. Eine Blockade von Kaliumkanälen führt zu einem verminderten Kaliumefflux mit konsekutiver Depolarisation und daraus folgender Kontraktion der glatten Muskulatur. Gegensätzlich dazu bewirkt eine Erhöhung der Leitfähigkeit bzw. eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit eine Verschiebung von Kaliumionen nach extrazellulär. Es kommt zur Hyperpolarisation und Relaxation (Nelson and Quayle, 1995). Bisher wurden fünf verschiedene Kaliumkanalklassen beschrieben. Dabei handelt es sich um spannungsabhängige (K_v), calciumabhängige (BK_{Ca}), einwärts gleichrichtende (K_{IR}) und ATP-sensitive (K_{ATP}) Kaliumkanäle und um die neuartige Familie der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P}) (Dogan et al., 2019; Nelson and Quayle, 1995; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017).

1.5.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v -Kanäle) werden durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Dabei besteht zwischen der Depolarisation des Membranpotentials und der Öffnungswahrscheinlichkeit eine positive Korrelation. Der sich in diesem Zusammenhang verändernde elektrochemische Gradient bedingt eine zusätzliche Steigerung des Kaliumausstroms bei Kanalaktivierung. Neben der Aktivierung führt die Depolarisation der Zellmembran auch zu einer Inaktivierung von K_v -Kanälen. Die Inaktivierung verläuft allerdings langsamer als die Aktivierung, sodass es zunächst zu einem erhöhten Fluss mit einer resultierenden Hyperpolarisation kommt (Nelson and Quayle, 1995). Aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften tragen K_v -Kanäle wesentlich zur Limitierung von Depolarisationsvorgängen und zu einer Repolarisation des Membranpotentials bei (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995). Außerdem nehmen sie Einfluss auf das Ruhemembranpotential und sind Antagonisten

des myogenen Tonus im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus (Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Eine relativ selektive Blockade von K_V -Kanälen ist mit 4-Aminopyridin (4-AP) möglich (Nelson and Quayle, 1995). Durch die Verwendung von 4-AP gelingt insbesondere die experimentelle Abgrenzung gegenüber den calciumabhängigen Kaliumkanälen mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca} -Kanäle), die ebenfalls eine spannungsabhängige Flusskinetik aufweisen (Ko et al., 2008). Weitere selektivere Blockersubstanzen sind Diphenylphosphinoxid-1 (DPO-1), Psora-4, PAP-1 und Stromatoxin-1 (STX) (Tykocki, Boerman and Jackson, 2017).

1.5.2 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP})

ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) werden durch Adenosintriphosphat (ATP) blockiert und durch Adenosindiphosphat aktiviert. Dadurch kann der Zellmetabolismus Einfluss auf das Membranpotential und konsekutiv auch auf den Kontraktionszustand von Gefäßen nehmen (Nelson and Quayle, 1995). K_{ATP} -Kanäle weisen eine hohe Variation in ihrer Leitfähigkeit auf und werden aus diesem Grund gemäß ihrer Konduktivität in verschiedene Gruppen eingeteilt (Ko et al., 2008). Eine pharmakologische Blockade kann durch Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid oder Tolbutamid, erreicht werden (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995).

1.5.3 Calcium- und spannungsabhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca})

BK_{Ca} -Kanäle werden ähnlich wie K_V -Kanäle durch eine Depolarisation des Membranpotentials aktiviert. Ein zusätzlicher Mechanismus der Aktivierung besteht in einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Wie ihr Name bereits suggeriert, besitzt diese Kanalklasse eine besonders hohe Kaliumleitfähigkeit (Ko et al., 2008; Nelson and Quayle, 1995). BK_{Ca} -Kanäle sind an der myogenen Autoregulation von Widerstandsgefäßen beteiligt. Erhöht sich der intravasale Druck führt dies zu einer Depolarisation und einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen. Durch die calciumgetriggerte Vasokonstriktion wird der Flusswiderstand bei erhöhter treibender Kraft (Blutdruck) gesteigert und damit eine konstante Blutversorgung gewährleistet. BK_{Ca} -Kanäle wirken der beschriebenen Vasokonstriktion im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus entgegen (Nelson and Quayle, 1995). Eine Blockade der BK_{Ca} -Kanäle ist mit Tetraethylammonium, Charybdotoxin und Iberitoxin (IBTX) möglich. Zur gezielten Untersuchung dieses Kanaltyps eignet sich insbesondere IBTX, da es selektiv wirkt und andere Kaliumkanäle unbeeinflusst lässt (Ko et al., 2008; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zur selektiven Blockade der BK_{Ca} -Kanäle IBTX verwendet.

1.5.4 Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

Das Verhalten einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle (K_{IR} -Kanäle) wird durch das aktuell bestehende Membranpotential bestimmt. Ist das Membranpotential negativer als das Gleichgewichtspotential von Kalium, dann kommt es zu einem Einstrom von Kalium in die Zelle. Bei einem Membranpotential positiver als das Gleichgewichtspotential von Kalium, resultiert ein Kaliumfluss aus der Zelle (Goldstein et al., 2001; Nelson and Quayle, 1995). Aufgrund einer Kanalblockade durch Magnesium und Polyamine fällt der Kaliumefflux allerdings nur gering aus. Ein

Kaliuminflux bewirkt dagegen eine Aufweichung der Blockade mit einer resultierenden Erhöhung der Leitfähigkeit (Goldstein et al., 2001). K_{IR} -Kanäle scheinen das Ruhemembranpotential von Widerstandsgefäßen zu beeinflussen und an der durch extrazelluläres Kalium induzierten Vasodilatation, in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies, maßgeblich beteiligt zu sein (Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Pharmakologisch werden sie bereits in geringen Konzentrationen durch extrazelluläres Barium blockiert (Nelson and Quayle, 1995; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017).

1.6 Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P})

1.6.1 Entdeckung

Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P} -Kanäle) stellen eine neuartige und in den letzten Jahren zunehmend erforschte Gruppe von Ionenkanälen dar (Lesage and Lazdunski, 2000; Renigunta, Schlichthorl and Daut, 2015). Mit der Entdeckung von TOK1 im Jahr 1995 wurde der erste K_{2P} -Kanal in Hefepilzen (*Saccharomyces cerevisiae*) beschrieben (Ketchum et al., 1995). Der erste Nachweis in Säugetieren erfolgte 1996 mit der Entdeckung des TWIK-1 (Tandem of pore domains in a Weak Inwardly rectifying K^+ channel) (Lesage et al., 1996a). Bis zum Jahr 2003 wurden 14 weitere Mitglieder identifiziert, sodass bisher 15 K_{2P} -Kaliumkanal-Subgruppen in Säugetieren nachgewiesen werden konnten (Goldstein et al., 2005). Die Expression von K_{2P} -Kanälen ist nahezu ubiquitär und konnte bereits in den unterschiedlichsten Organsystemen, wie dem kardiovaskulären, gastrointestinalen, respiratorischen und urogenitalen System und dem zentralen Nervensystem, gefunden werden (Fink et al., 1996; Girard et al., 2001; Inglis et al., 2007; Lei et al., 2014; Lesage et al., 1996a; Limberg et al., 2011).

1.6.2 Struktureller Aufbau

Die Untereinheiten der K_{2P} -Kanäle setzen sich aus vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei porenbildenden Domänen (P1 und P2) und zwei extrazellulär gelegenen Kappen (C1 und C2) zusammen. Die porenbildenden Domänen werden dabei von je zwei Transmembrandomänen flankiert (Lesage and Lazdunski, 2000; Renigunta, Schlichthorl and Daut, 2015). Die extrazellulär gelegenen Kappen scheinen für die Resistenz von K_{2P} -Kanälen gegenüber konventionellen Kanalblockern verantwortlich zu sein (Brohawn, del Mármol and MacKinnon, 2012). Des Weiteren verfügt jede Untereinheit über einen kurzen N-Terminus und einen langen C-Terminus, die beide im zytoplasmatischen Raum lokalisiert sind (Lesage and Lazdunski, 2000). Der spezifische Aufbau der Untereinheiten aus zwei porenbildenden Domänen war namensgebend und unterscheidet sie von konventionellen Kaliumkanalklassen. Im Gegensatz zu K_{2P} -Kanälen besitzen diese pro Untereinheit nur eine porenbildende Domäne und bilden aus diesem Grund Tetramere (Bayliss and Barrett, 2008; Lesage and Lazdunski, 2000). Darüber hinaus lagern sich die jeweiligen Untereinheiten der K_{2P} -Kanäle meistens zu Homodimeren zusammen, wobei auch eine Bildung eines K_{2P} -Kanals aus unterschiedlichen Untereinheiten möglich ist. Die SID (self-interacting domain) innerhalb der M1P1-Schlinge ermöglicht eine Dimerisierung durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den jeweiligen Untereinheiten (Blin et al., 2014; Czirják and Enyedi, 2002; Gurney and Manoury, 2009; Lesage et al., 1996b). Nach Dimerisierung bilden die vier porenbildenden Domänen der beiden

Untereinheiten die Transitzone für Kaliumionen und ermöglichen damit die Funktionsfähigkeit des Kanals (Decher et al., 2021; Doyle et al., 1998). Außerdem können K_{2P}-Kanäle durch eine alternative Ausbildung von Heterodimeren in ihrer Funktion moduliert und an ihre jeweiligen Aufgaben angepasst werden. Daneben existieren kanalasoziierte Proteine, die ebenfalls Einfluss auf die Kanalaktivität nehmen können (Feliciangeli et al., 2015). Größtenteils zeigen die K_{2P}-Kaliumkanal-Subgruppen den gleichen strukturellen Aufbau. TASK-1- und TASK-3-Kanäle weichen durch das Fehlen einer Disulfidbrückenbildung bei der Dimerisierung leicht davon ab (Feliciangeli et al., 2015). Kristallstrukturanalysen liegen zum aktuellen Zeitpunkt nur für den TWIK-1- und den TRAAK-Kanal vor (Brohawn, del Marmol and MacKinnon, 2012; Miller and Long, 2012).

1.6.3 Klassifikation

K_{2P}-Kanäle werden entsprechend ihrer Sequenzhomologie in sechs Subgruppen eingeteilt (Goldstein et al., 2005). Die jeweilige Subgruppenbezeichnung ergibt sich dabei aus den spezifischen akronymisierten Kanaleigenschaften. In einer alternativen Einteilung der Human Genome Organization wird die Bezeichnung KCNK (Potassium two pore domain channel subfamily K member) verwendet. Dabei handelt es sich um das codierende Gen der jeweiligen Untereinheit (Bayliss and Barrett, 2008). Die K_{2P}-Kaliumkanal-Subgruppen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: K_{2P}-Kaliumkanal-Subgruppen

TWIK: Tandem of pore domains in a Weak Inwardly rectifying K⁺ channel

TREK: TWIK-related K⁺ channel

TRAAK: TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel

TASK: TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channel

TALK: TWIK-related Alkaline-pH-activated K⁺ channel

THIK: Tandem-pore-domain Halothane-Inhibited K⁺ channel

TRESK: TWIK-related spinal-cord K⁺ channel

K _{2P} -Kaliumkanal-Subgruppen	
TWIK	TWIK-1 (KCNK1, K _{2P} 1.1)
	TWIK-2 (KCNK6, K _{2P} 6.1)
	TWIK-3 (KCNK7, K _{2P} 7.1)
TREK	TREK-1 (KCNK2, K _{2P} 2.1)
	TREK-2 (KCNK10, K _{2P} 10.1)
	TRAAK (KCNK4, K _{2P} 4.1)
TASK	TASK-1 (KCNK3, K _{2P} 3.1)
	TASK-3 (KCNK9, K _{2P} 9.1)
	TASK-5 (KCNK15, K _{2P} 15.1)
TALK	TASK-2 (KCNK5, K _{2P} 5.1)
	TALK-1 (KCNK16, K _{2P} 16.1)
	TALK-2 (KCNK17, K _{2P} 17.1)
THIK	THIK-1 (KCNK13, K _{2P} 13.1)
	THIK-2 (KCNK12, K _{2P} 12.1)
TRESK	TRESK (KCNK18, K _{2P} 18.1)

Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf: (Bayliss and Barrett, 2008; Olschewski et al., 2017; Renigunta, Schlichthorl and Daut, 2015)

1.6.4 Funktionelle Eigenschaften

K_{2P}-Kanäle befinden sich unabhängig von der aktuell herrschenden Membranspannung in einem geöffneten Zustand (Dogan et al., 2019; Lesage and Lazdunski, 2000; Schmidt et al., 2012). Sie besitzen eine selektive Permeabilität für Kaliumionen und weisen keine intrinsische inaktivierende Kanalkinetik auf. Dadurch scheinen sie als Hintergrund- oder Leckkanal wesentlich an der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials vieler Zellen beteiligt zu sein. Gemäß ihrer funktionellen Eigenschaften bewirken sie eine Modulation des Membranpotentials in Richtung des Gleichgewichtspotentials von Kalium. Dieses liegt näherungsweise bei -90 mV und ist somit negativer als das Ruhemembranpotential von Kardiomyozyten mit -80 mV oder von glatten Gefäßmuskelzellen mit etwa -50 mV (Gurney and Manoury, 2009; Lesage and Lazdunski, 2000; Nelson and Quayle, 1995; Powell, Terrar and Twist, 1980). Der durch K_{2P}-Kanäle generierte Fluss wird dabei vom vorhandenen Konzentrationsgradienten der Kaliumionen über der Zellmembran beeinflusst. Unter physiologischen Bedingungen ist deshalb der durch den Konzentrationsgradienten bedingte Kaliumefflux größer als der durch das Membranpotential bedingte Kaliuminflux (Schmidt et al., 2012). Die Bezeichnung als reine Hintergrund- oder Leckkanäle erscheint jedoch unvollständig, da viele K_{2P}-Kanäle eine spannungsabhängige Aktivierung zeigen. Sie besitzen allerdings keinen klassischen Spannungssensor im Sinne einer dafür vorgesehenen funktionellen Domäne. Ihre spannungsabhängige Aktivierung wird durch die Interaktion der Kaliumionen mit dem elektrischen Feld des jeweiligen Kanals vermittelt (Schewe et al., 2016).

1.6.5 Regulation und Pathophysiologie

Die Leitfähigkeit von K_{2P}-Kanälen und konsekutiv die Exzitabilität der sie exprimierenden Zellen wird durch zahlreiche physikalische und chemische Einflüsse reguliert. In Abhängigkeit von der Subgruppe spielen unterschiedliche Modulatoren, wie mechanische Dehnung, pH-Wert, pO₂, Phospholipide, G-Proteine oder Neurotransmitter, eine bedeutende Rolle (Goldstein et al., 2005). Beispielsweise werden K_{2P}-Kanäle der TWIK-Subgruppe durch die Aktivität der PKC aktiviert und durch azidotische Stoffwechsellagen inhibiert (Lesage et al., 1996a). K_{2P}-Kanäle der TALK-Subgruppe zeigen dagegen erhöhte Leitfähigkeiten bei alkalischen pH-Werten (Reyes et al., 1998) und K_{2P}-Kanäle der THIK-Subgruppe reagieren auf die Anwesenheit von Arachidonsäure und werden durch Halothan inhibiert (Rajan et al., 2001). Neben den beschriebenen chemischen Einflüssen kann auch eine mechanische Dehnung zur Modulation der K_{2P}-Kanal-Aktivität führen (Dedman et al., 2009; Patel, Lazdunski and Honoré, 2001). Diese Vielfalt an unterschiedlichen Regulationsmechanismen lässt eine Involvierung von K_{2P}-Kanälen in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse vermuten. K_{2P}-Kanäle werden außerdem mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie beispielsweise kardialen Arrhythmien, Depressionen, der pulmonalarteriellen Hypertonie, dem Birk-Barel-Syndrom, Migräne und der Tumorgenese, in Verbindung gebracht (Feliciangeli et al., 2015; Mu et al., 2003).

1.6.6 Pharmakologie

In pharmakologischer Hinsicht unterscheiden sich K_{2P}-Kanäle von konventionellen Kaliumkanälen durch ihre Resistenz gegenüber den herkömmlichen

Blockersubstanzen (Feliciangeli et al., 2015; Lesage and Lazdunski, 2000), wobei eine Blockade von K_{2P} -Kanälen durch quartäre Ammoniumverbindungen gelingen kann (Decher et al., 2021). Die Resistenz von K_{2P} -Kanälen gegenüber den klassischen Kanalblockern und das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung dieser neuen Kaliumkanalfamilie machte die Entwicklung neuer spezifischer Blocker notwendig. Mit Ausnahme der TASK- (Maingret et al., 2001; Putzke et al., 2007b) und TREK-Subgruppen (Mazella et al., 2010) stehen jedoch zum aktuellen Zeitpunkt weiterhin nur wenige spezifische Wirkstoffe zur Verfügung (Decher et al., 2021).

1.7 TASK-Kanäle

Die TASK-Kanäle (TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel) bilden eine Subgruppe der K_{2P} -Kanäle, deren Aktivität maßgeblich durch den extrazellulären pH-Wert (Duprat et al., 1997) und Abweichungen des pO_2 beeinflusst wird (Lewis et al., 2001). Ausgehend von einem Aktivitätsniveau von etwa 50 % bei physiologischen pH-Werten werden TASK-Kanäle bei azidotischen Stoffwechsellagen inhibiert und bei alkalischen pH-Werten aktiviert (Duprat et al., 1997; Olschewski et al., 2017). Auf molekularer Ebene scheint für dieses Verhalten unter anderem die Protonierung von Histidin verantwortlich zu sein (Morton et al., 2003). Des Weiteren kann die Leitfähigkeit von TASK-Kanälen durch inhalative Anästhetika gesteigert werden (Patel and Honoré, 2001; Putzke et al., 2007a). Innerhalb der TASK-Subgruppe kann zwischen TASK-1 (KCNK3), TASK-3 (KCNK9) und TASK-5 (KCNK15) unterschieden werden. Im Gegensatz zu TASK-1 und TASK-3 scheint die TASK-5 Untereinheit keine funktionelle Bedeutung zu haben (Kim and Gnatenco, 2001; Lesage, 2003; Olschewski et al., 2017). TASK-1-Kanäle zeigen eine vielfältige Expression und sind unter anderem im zentralen Nervensystem, im Glomus caroticum, in den Vorhöfen des Herzens, im Lungengewebe sowie in der glatten Muskulatur pulmonaler Gefäße vorhanden (Olschewski et al., 2017). Dadurch sind sie in unterschiedliche pathophysiologische Prozesse involviert und werden unter anderem mit dem Krankheitsbild der pulmonalerteriellen Hypertonie (PAH) oder Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (Antigny et al., 2016; Limberg et al., 2011). Auch eine Beteiligung an der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion ist wahrscheinlich (Olschewski et al., 2017). Darüber hinaus wird eine Involvierung von TASK-Kanälen in nozizeptiven Prozessen vermutet (Cooper, Johnson and Rau, 2004). Neben den bereits beschriebenen Regulationsmechanismen können TASK-1-Kanäle über die Bindung von Signalmolekülen an G-Protein gekoppelte Rezeptoren moduliert werden. Auf diesem Weg können TASK-1-Kanäle Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit oder die Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde nehmen (Chen et al., 2015; Czirják et al., 2000; Davies et al., 2008; Enyeart and Enyeart, 2021; Heitzmann et al., 2008; Olschewski et al., 2017). Des Weiteren beeinflussen sie den Glucosestoffwechsel durch Modulation der Glucagonsekretion (Dadi et al., 2015). Im Zusammenhang mit genomischem Imprinting führt die Mutation der maternalen Kopie von KCNK9 zum Birk-Barel-Syndrom. Dabei handelt es sich um ein seltenes erbliches Krankheitsbild mit mentaler Retardierung, Hypotonie und typischen Gesichtsdysmorphien (Barel et al., 2008). Die pharmakologische Blockade von TASK-1-Kanälen gelingt durch die Verwendung von A293 (Putzke et al., 2007b) oder durch das Endocannabinoid Anandamid (Maingret et al., 2001). TASK-3-Kanäle können durch extrazelluläre Polyamine und den Farbstoff Rutheniumrot blockiert werden (Czirják and Enyedi, 2003; Musset et al., 2006).

1.7.1 TASK-1-Kanäle und pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

Eine pulmonale Hypertonie liegt vor, wenn der pulmonalarterielle Mitteldruck (mPAP) unter Ruhebedingungen bei 25 mmHg oder darüber liegt. Durch den erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand kommt es zu einer Mehrbelastung des rechten Ventrikels und langfristig zum Rechtsherzversagen (Galiè et al., 2015). Aufgrund der Heterogenität des Krankheitsbildes wird die pulmonale Hypertonie nach zugrundeliegender Ätiologie in 5 Subgruppen unterteilt. Dabei wird zwischen dem Krankheitsbild der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH), der pulmonalen Hypertonie infolge von Linksherzkrankungen, der pulmonalen Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen oder Hypoxie, der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) und der pulmonalen Hypertonie mit unklarer Ätiologie unterschieden. Ursachenspezifisch ergeben sich dabei unterschiedliche therapeutische Möglichkeiten (Simonneau et al., 2013).

Die PAH stellt eine der genannten Unterformen der pulmonalen Hypertonie dar. Es handelt sich um eine präkapilläre Form der pulmonalen Hypertonie, definiert durch einen Lungenkapillarenverschlussdruck kleiner oder gleich 15 mmHg und einen pulmonalen Gefäßwiderstand von über 3 (mmHg x min)/l. Zur Klassifizierung als PAH müssen zudem andere zugrundeliegende Ursachen, wie zum Beispiel Lungenerkrankungen oder eine CTEPH, zuvor ausgeschlossen werden (Galiè et al., 2015). Des Weiteren kann die PAH in eine idiopathische und eine hereditäre Form subklassifiziert werden. Zusätzlich bestehen Assoziationen mit zahlreichen weiteren Krankheitsbildern, wie HIV oder Sklerodermie (Cunningham et al., 2019).

Die familiäre Häufung der PAH ist mit verschiedenen Genen assoziiert, wie BMPR2, ALK1, ENG, SMAD9 und CAV1 (Ma et al., 2013). Neben diesen bereits bekannten Mutationen, rücken Kaliumkanäle und deren genetische Alteration zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung (Boucherat et al., 2015; Le Ribeuz et al., 2020; Yuan et al., 1998). Wissenschaftliches Interesse weckte insbesondere der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.5$ (Remillard et al., 2007) und der K_{2P} -Kanal TASK-1 (Ma et al., 2013). Im Kontext dieser Arbeit soll im Folgenden ausschließlich auf die Rolle der TASK-1-Kanäle näher eingegangen werden. Diese werden unter anderem in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen exprimiert, beeinflussen das Membranpotential dieser Zellen und sind dadurch an der Regulation des pulmonalvaskulären Gefäßtonus beteiligt (Gurney et al., 2003; Olschewski et al., 2006; Seyler et al., 2012; Wiedmann et al., 2020b).

Im Zusammenhang mit der PAH sind zum aktuellen Zeitpunkt zwölf verschiedene Mutationen im KCNK3-Gen bekannt (Le Ribeuz et al., 2020). Die Vererbung erfolgt dabei autosomal dominant mit unvollständiger Penetranz (Girerd et al., 2014; Morrell et al., 2019). Durch Whole-Exome-Sequencing von Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie konnten zunächst 6 heterozygote Missense-Mutationen im codierenden Gen von TASK-1 (KCNK3) nachgewiesen werden. Diese Loss-of-Function-Mutationen führten zu einer verringerten Kanalleitfähigkeit, die jedoch durch die Applikation des Phospholipase-Inhibitors ONO-RS-082 mutationsspezifisch gesteigert werden konnte (Ma et al., 2013). In einer spanischen Kohorte gelang zudem auch der Nachweis zweier homozygoter Mutationen mit Assoziation zu einem schwereren Krankheitsverlauf (Navas et al., 2016; Navas Tejedor et al., 2017), welche ebenfalls eine reduzierte Leitfähigkeit der TASK-1-Kanäle bedingten (Cunningham et al., 2019).

Bis zum Jahr 2020 wurden schließlich vier weitere Mutationen identifiziert (Le Ribez et al., 2020).

In einer ergänzenden Studie zur Untersuchung genetischer Aspekte der pulmonalarteriellen Hypertonie aus dem Jahr 2016 konnte zudem im Monocrotalin (MCT) Rattenmodell der pulmonalen Hypertonie und bei Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie eine verringerte Expression des KCNK3-Gens sowie eine konsekutiv reduzierte Leitfähigkeit der TASK-1-Kanäle in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Antigny et al., 2016). Darüber hinaus konnte durch eine iatrogene Ausschaltung des KCNK3-Gens im Rattenmodell der pathophysiologische Zusammenhang zwischen Loss-of-Function-Mutation und pulmonalarterieller Hypertonie bestätigt werden (Lambert et al., 2019). Außerdem konnte bereits vor der eigentlichen Entwicklung einer rechtsventrikulären Hypertrophie im Rahmen der pulmonalen Hypertonie eine verringerte funktionelle Expression von TASK-1-Kanälen im ventrikulären Myokard nachgewiesen werden. Somit kann auch ein Zusammenhang zwischen der Mutation im KCNK3-Gen und rechtsventrikulärer Hypertrophie bei pulmonaler Hypertonie vermutet werden (Lambert et al., 2018).

Neben den beschriebenen Mutationen mit Einfluss auf den Vasotonus, sind TASK-1-Kanäle auch Zielstrukturen von gängigen medikamentösen Therapeutika der PAH und könnten an deren Wirkung maßgeblich beteiligt sein. In einer Studie von Cunningham et al. konnte ein Effekt von Riociguat, einem etablierten Medikament der PAH (Ghofrani et al., 2017; Hill, Cawley and Heggen-Peay, 2016), auf Wildtyp TASK-1-Kanäle nachgewiesen werden. Die mutierten Kanäle blieben dagegen von Riociguat unbeeinflusst (Cunningham et al., 2019). TASK-1-Kanäle können darüber hinaus durch eine Rho-Kinase vermittelte Phosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Diese unterliegt der regulatorischen Kontrolle durch Endothelin-1. Dabei handelt es sich um einen potenten Vasokonstriktor, der selbst ein Ziel pharmakologischer Therapien der pulmonalarteriellen Hypertonie ist und in Endothelzellen von Erkrankten verstärkt exprimiert wird (Giaid et al., 1993; Seyler et al., 2012; Tang et al., 2009). Außerdem können TASK-1-Kanäle durch Treprostinil via Proteinkinase A aktiviert werden. Auf diese Weise könnten TASK-1-Kanäle an der pharmakologischen Wirkung von Prostanoiden beteiligt sein (Olschewski et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TASK-1-Kanäle bei einer integrativen Betrachtung der gesammelten Evidenz ein vielversprechendes Ziel für zukünftige gezielte Arzneimitteltherapien der pulmonalarteriellen Hypertonie darstellen könnten. Dabei gilt es weitere Forschungsergebnisse abzuwarten.

1.7.2 TASK-1-Kanäle und Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung. Sie weist eine Prävalenz von circa 1 % auf und zeigt eine altersabhängige Epidemiologie mit steigender Prävalenz im fortschreitenden Alter. Ätiologisch werden auf die Vorhofebene begrenzte ektope Erregungsbildungen und Reentrykreisläufe verantwortlich gemacht. Vorhofflimmern bedingt multiple Komplikationen und kann im Falle einer nicht ausreichenden Antikoagulation das Risiko eines ischämischen Schlaganfalls signifikant erhöhen. Durch den häufig symptomarmen Verlauf verschlechtert sich die Prognose weiter. Die Behandlung des Vorhofflimmerns umfasst unterschiedliche Therapiekonzepte. Neben ablativen Verfahren mit variierender Erfolgsrate stehen auf pharmakologischer Ebene verschiedene Substanzen zur

Rhythmus- und/oder Frequenzkontrolle zur Verfügung (Hindricks et al., 2021; Schmidt et al., 2011). Gängige und in der klinischen Praxis häufig verwendete Pharmaka, wie beispielsweise Amiodaron (Klasse III Antiarrhythmikum), wirken über eine nichtselektive Blockade unterschiedlicher Kaliumkanäle antiarrhythmisch (Schmidt et al., 2014), wodurch sie unter anderem auch Einfluss auf K_{2P} -Kanäle wie TASK-1 nehmen (Gierten et al., 2010; Staudacher et al., 2011). Die nichtselektive Kaliumkanalblockade führt dabei zu einer Verlängerung des atrialen Aktionspotentials, wodurch eine Vorbeugung von Reentrykreisläufen ermöglicht wird. Es besteht somit ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktionspotentialdauer und kardialen Rhythmusstörungen (Schmidt et al., 2014). Neben der erwünschten Wirkung auf die Atrien kann es aufgrund der vorhofüberschreitenden Wirkung gängiger Antiarrhythmika aber auch zu einer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials mit dem damit verbundenen Risiko ventrikulärer Arrhythmien kommen (Limberg et al., 2011).

Aufgrund der begrenzten Effektivität und dem beachtlichen Nebenwirkungspotential von konventionellen Antiarrhythmika können diese allerdings nur von einem limitierten Patientenkollektiv genutzt werden. Daraus abgeleitet ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung neuer innovativer Pharmaka mit besseren pharmakologischen Wirkprofilen. In diesem Zusammenhang rückte der TASK-1-Kanal zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung (Schmidt et al., 2011; Schmidt et al., 2012).

TASK-1-Kanäle zeigen eine weitgehend selektive atriale Expression in humanen Kardiomyozyten (Limberg et al., 2011; Schmidt et al., 2015) und beeinflussen zudem wesentlich die Hintergrundleitfähigkeit dieser Zellen (Limberg et al., 2011). Dadurch vermitteln sie eine Stabilisierung des Membranpotentials und tragen zur Repolarisation von Aktionspotentialen bei (Schmidt et al., 2012). In elektrophysiologischen Untersuchungen an isolierten humanen atrialen Kardiomyozyten führte die Blockade von TASK-1-Kanälen durch A293 zu einer Verlängerung der atrialen Aktionspotentialdauer. Demgegenüber bewirkte die Erhöhung des atrialen Ganzzellstroms der TASK-1-Kanäle eine verkürzte Aktionspotentialdauer (Limberg et al., 2011).

In zeitlich vorangegangenen Studien konnte bereits das Vorkommen von TASK-1-Kanälen in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte und eine selektive Inhibition des Kanals in *Xenopus* Oozyten durch A293 nachgewiesen werden. Auch in diesem Zusammenhang konnte eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch eine TASK-1 Kanalblockade registriert werden. Diese Beobachtungen decken sich also mit den späteren Versuchen an menschlichem Gewebe. Außerdem scheint eine Blockade von TASK-1-Kanälen auch durch $\alpha 1A$ -Rezeptoren möglich zu sein (Kim, Bang and Kim, 1999; Liu and Saint, 2004; Putzke et al., 2007b).

Die Untersuchung des atrialen Gewebes von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern zeigte zudem eine erhöhte Expression des TASK-1-Kanals im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die erhöhte Kanaldichte führte zu einer signifikanten Verkürzung der Aktionspotentialdauer, die durch die Applikation von A293 antagonisiert werden konnte. Korrespondierende Resultate bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern konnten nicht nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2015). Darüber hinaus konnten drei Varianten des *KCNK3*-Gens bei Patienten mit Vorhofflimmern nachgewiesen werden. Inwiefern diese Varianten Einfluss auf die

Pathogenese des Vorhofflimmerns nehmen, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Liang et al., 2014).

In nachfolgenden Studien an narkotisierten Hausschweinen mit dem Ziel einer pharmakologischen Beeinflussung von TASK-1-Kanälen führte die intravenöse Applikation von A293 zu einer Terminierung eines iatrogen induzierten paroxysmalen Vorhofflimmerns. Des Weiteren bewirkte A293 eine Verlängerung der atrialen effektiven Refraktärzeit, ohne dabei einen Einfluss auf die ventrikuläre effektive Refraktärzeit zu nehmen (Wiedmann et al., 2020a). Eine ergänzende Studie konnte einen vergleichbaren Effekt von A293 auf Hausschweine mit persistierendem Vorhofflimmern nachweisen (Wiedmann et al., 2020b). Neben A293 führte auch die intravenöse Applikation von Doxapram, einem weiteren spezifischen Inhibitor des TASK-1-Kanals, sowohl zur Kardioversion des akuten Vorhofflimmerns als auch zu einer signifikanten Reduktion der Vorhofflimmerlast im Rahmen des persistierenden Vorhofflimmerns (Wiedmann et al., 2021).

Ergänzend zur beschriebenen pharmakologischen Blockade von TASK-1-Kanälen könnte auch die Gentherapie in der Behandlung des Vorhofflimmerns erfolgsversprechend sein. Durch Transfektion von Anti-TASK-1-siRNA in Hausschweine, bei denen zuvor über implantierte Schrittmacher Vorhofflimmern induziert wurde, konnte ebenfalls eine antiarrhythmische Wirkung nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2019).

Hinsichtlich der dargelegten Studienlage wird deutlich, dass TASK-1-Kanäle ein interessantes Targetmolekül für zukünftige medikamentöse Therapien sowohl des paroxysmalen als auch des persistierenden Vorhofflimmerns sein könnten. Durch ihre zielgerichtete Wirkung könnte die Effektivität antiarrhythmischer Pharmaka verbessert und das Nebenwirkungspotential erheblich gesenkt werden (Schmidt et al., 2014).

1.7.3 TASK-Kanäle und das Glomus caroticum

Das Atemzentrum ist in der Medulla oblongata des Hirnstamms lokalisiert und integriert Informationen aus dem Glomus caroticum und den zentralen Chemorezeptoren. Zur Überwachung der Sauerstoffversorgung des Körpers bestimmen sie kontinuierlich den pO_2 , pCO_2 und den pH-Wert des arteriellen Blutes (Nattie, 1999). Wie ihr Name bereits suggeriert befinden sich die peripheren Chemorezeptoren des Glomus caroticum in anatomischer Beziehung zu den Karotiden. Funktionell registrieren Glomuszellen vom Typ 1 Abweichungen des arteriellen pH-Wertes sowie des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrucks. Kommt es zu hypoxischen oder azidotischen Zuständen resultiert eine Depolarisation dieser Zellen. Dadurch kommt es zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und einem konsekutiven Calciumeinstrom in die Zelle. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer Freisetzung von Neurotransmittern und anschließend zur Signalweiterleitung ins zentrale Nervensystem via afferenter Leitungsbahnen (Buckler, 2015).

In Glomuszellen der Ratte konnte eine Kalium-Hintergrundleitfähigkeit mit den funktionellen Eigenschaften der TASK-Kanäle nachgewiesen werden. Während Azidose und Hypoxie die Kanalfunktion herabsetzten, führte die Applikation von Halothan zu einem gesteigerten Ionenfluss (Buckler, Williams and Honore, 2000; Kim et al., 2009). Sowohl die funktionelle Expression von TASK-1- als auch von TASK-3-

Kanälen konnte im Glomus caroticum der Ratte dokumentiert werden. Dabei zeigte sich, dass hauptsächlich die Heterodimere der beiden Untereinheiten die Kalium-Hintergrundleitfähigkeit der Glomuszellen bestimmen (Kim et al., 2009). Dieser Zusammenhang konnte zudem in einem Versuch an transgenen Mäusen bestätigt werden (Turner and Buckler, 2013).

Des Weiteren konnte ein inhibitorischer Effekt von Doxapram, einer atemstimulierenden Substanz mit Wirkung im Glomus caroticum, auf TASK-1- und TASK-3-Kanäle in *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden. Damit stellen TASK-Kanäle mögliche Effektoren der Wirkung von Doxapram dar (Cotten et al., 2006). Weitere Inhibitoren der TASK-Kanäle des Glomus caroticum sind A1899, PK-THPP und ML365. Sie führten in Typ 1 Glomuszellen von neonatalen Ratten zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, mutmaßlich induziert durch Depolarisation und konsekutiven Calciuminflux (O'Donohoe et al., 2018). PK-THPP und A1899 zeigten darüber hinaus im Tierversuch eine atemstimulierende Wirkung (Cotten, 2013). Die bisher gesammelte Evidenz macht deutlich, dass TASK-Kanäle maßgeblich in Signaltransduktionsprozessen des Glomus caroticum involviert sind. Sie stellen damit ein mögliches Ziel bei der Behandlung von Atemstörungen dar.

Auch beim Krankheitsbild der obstruktiven Schlafapnoe könnte die Inhibition von TASK-Kanälen erfolgsversprechend sein. Pathophysiologisch kommt es dabei zu einer verringerten nervalen Stimulation der Zungenmuskulatur in der Nacht und einer konsekutiven Verlegung der oberen Atemwege. In vitro konnten bereits ein inhibitorischer Effekt verschiedener Neurotransmitter auf TASK-1- und TASK-3-Kanäle in Motorneuronen des Nervus hypoglossus und eine konsekutive neuronale Entladung nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung der Kerngebiete des Nervus hypoglossus durch eine Modulation von TASK-Kanälen konnte allerdings in vivo nicht nachgewiesen werden (Gurges, Liu and Horner, 2021).

1.7.4 TASK-Kanäle und primärer Hyperaldosteronismus

Die arterielle Hypertonie bezeichnet ein ernstzunehmendes Krankheitsbild mit multiplen Endorganschäden und konsekutiv erhöhter Morbidität und Mortalität. Sie wird durch einen Ruheblutdruck ab 140/90 mmHg systolisch zu diastolisch definiert. Nach ätiologischen Gesichtspunkten kann die primäre von der sekundären Hypertonie abgegrenzt werden. Die primäre oder auch essentielle Hypertonie tritt idiopathisch auf und betrifft mit circa 90 % den Großteil aller Hypertoniker. Im Gegensatz dazu liegt bei der sekundären Hypertonie, die einen Anteil von circa 10 % ausmacht, eine ursächliche Grunderkrankung vor. Neben dem Schlafapnoesyndrom oder renalen Pathologien können auch endokrine Erkrankungen eine sekundäre Hypertonie bedingen (Williams et al., 2018). Der primäre Hyperaldosteronismus, eine Form der endokrin bedingten Hypertonie, stellt die häufigste Ursache sekundärer Hypertonien dar und ist durch eine autonome Überproduktion des Mineralkortikoids Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde definiert (Davies et al., 2008).

Bei den pathogenetischen Prozessen des nicht durch einen Tumor bedingten primären Hyperaldosteronismus nehmen TASK-Kanäle eine zentrale Rolle ein. Die Ausschaltung der codierenden Gene *KCNK3* (TASK-1) und *KCNK9* (TASK-3) im Knockout-Maus-Modell führte zu einer Depolarisation der Zellen der Zona glomerulosa sowie zur Entwicklung eines primären Hyperaldosteronismus der genetisch modifizierten Tiere (Davies et al., 2008; Heitzmann et al., 2008). Neben dem

Vorkommen in Mäusen konnte ihre Expression auch bei Ratten (Czirják et al., 2000) und beim Menschen nachgewiesen werden. Zellen der Zona glomerulosa des Menschen exprimieren dabei vorwiegend die TASK-1 Untereinheit. Funktionell wirken TASK-1-Kanäle dabei über eine durch Calcium getriggerte Aktivierung der calciumabhängigen Calmodulin-Kinase (CaMK) und eine konsekutive Steigerung der Expression der Aldosteronsynthese (Nogueira et al., 2010). Darüber hinaus bestehen Assoziationen zwischen KCNK3-Einzelnukeotid-Polymorphismen und Hyperaldosteronismus sowie der arteriellen Hypertonie (Manichaikul et al., 2016).

Auch die gezielte Deletion des TASK-3 Gens führte zu Alterationen der Aldosteronsekretion (Penton et al., 2012). In vorangegangenen Studien konnte bereits das Vorkommen von TASK-3-Kanälen in der H295R-Zelllinie nachgewiesen werden. Sie beeinflussten dort sowohl das Membranpotential als auch die Aldosteronproduktion (Brenner and O'Shaughnessy, 2008).

In Anbetracht der gesammelten Evidenz zur funktionellen Expression von TASK-Kanälen in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde könnte eine pharmakologische Beeinflussung dieser Kanäle bei der Behandlung des arteriellen Hypertonus und insbesondere der sekundären Hypertonie erfolgsversprechend sein.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung des Projekts

Seit ihrer Entdeckung Ende des 20. Jahrhunderts erfahren K_{2P} -Kanäle zunehmendes wissenschaftliches Interesse. Aufgrund ihres ubiquitären Expressionsmusters und ihrer vielfältigen Regulationsmechanismen nehmen sie eine zentrale Rolle in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ein.

TASK-1-Kanäle werden unter anderem im humanen Vorhofmyokard exprimiert. Sie führen dort bei einer gesteigerten Expression zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer mit konsekutiv proarrhythmogener Wirkung. Durch ihre vorwiegend atriale Expression könnten TASK-1-Kanäle die medikamentöse Therapie des Vorhofflimmerns nachhaltig verändern (Kiper et al., 2015; Limberg et al., 2011; Wiedmann et al., 2020a; Wiedmann et al., 2020b; Wiedmann et al., 2021). Des Weiteren sind TASK-Kanäle im Glomus caroticum, im Rahmen der chemoelektrischen Kopplung, an der Überwachung der Blutgase beteiligt und stellen dadurch ein mögliches Ziel bei der Therapie von Atemstörungen dar (Kim et al., 2009). Darüber hinaus stehen sie durch ihre funktionelle Expression in Motoneuronen des Nervus hypoglossus in enger Beziehung zum Krankheitsbild der obstruktiven Schlafapnoe mit möglichem therapeutischen Angriffspunkt (Gurges, Liu and Horner, 2021; Kiper et al., 2015). Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Synthese von Aldosteron und sind in diesem Zusammenhang an der Regulation des Blutdrucks beteiligt (Nogueira et al., 2010). Auch konnte ihr Vorkommen in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Dort tragen sie über eine Modulation des Ruhemembranpotentials zum vaskulären Tonus bei, wodurch sie eine mögliche Zielstruktur für die Behandlung der PAH darstellen (Seyler et al., 2012).

Obwohl viel wissenschaftliche Evidenz hinsichtlich der TASK-1-Kanäle und dem pulmonalen Kreislauf existiert, bleibt ihre Rolle in der systemischen Zirkulation noch weitgehend unklar. TASK-1-Kanäle konnten bereits in mesenterialen Arterien der Ratte nachgewiesen werden. Anandamid (Maingret et al., 2001), ein selektiver Blocker des TASK-1-Kanals, antagonisierte die durch Alkalose induzierte Hyperpolarisation

der untersuchten mesenterialen Gefäße. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine funktionelle Rolle von TASK-1-Kanälen bei der Regulation des mesenterialen Gefäßtonus sein (Gardener et al., 2004). Außerdem gibt es Evidenz über die Expression in der humanen plazentalen Zirkulation (Wareing et al., 2006). Aufgrund der spezifischen Regulation von TASK-1-Kanälen könnten diese wesentlich am Phänomen der hypoxischen fetoplazentalen Vasokonstriktion beteiligt sein (Howard, Hosokawa and Maguire, 1987). Des Weiteren konnte im Jahr 2006 bei einem Vergleich zwischen hypertensiven und normotensiven Wistar-Kyoto Ratten eine reduzierte funktionelle Expression von TASK-1-Kanälen in aortalen glatten Muskelzellen der hypertensiven Kohorte nachgewiesen werden (Kiyoshi et al., 2006).

In einer kürzlich publizierten Studie konnten außerdem Untersuchungen der Arteria saphena von 10 bis 15 Tagen alten Ratten eine funktionelle Expression von TASK-1-Kanälen nachweisen. Der TASK-1-Kanal-Inhibitor AVE1231 induzierte sowohl eine Erhöhung des basalen Gefäßtonus als auch eine Verstärkung der Methoxamin (Mx)-induzierten Kontraktionen. Darüber hinaus führte die intravenöse Applikation von AVE1231 zu einer Erhöhung des arteriellen Mitteldrucks der untersuchten Ratten. Im Vergleich mit der beschriebenen Kohorte zeigten adulte Ratten jedoch eine reduzierte Expression und verringerte bzw. nicht vorhandene kontraktile Reaktionen auf AVE1231 (Shvetsova et al., 2020).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dominante Kaliumkanäle die Funktion anderer Kaliumkanäle maskieren können (Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020). Damit bleibt unklar, ob TASK-1-Kanäle in systemischen Arterien adulter Ratten gar keinen Einfluss auf die Regulation des Gefäßtonus haben oder ob ihre funktionelle Rolle erst bei einer Inhibition dominanter Kaliumkanäle sichtbar wird.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, dass TASK-1-Kanäle systemischer Arterien adulter Ratten die Kontraktilität dieser Arterien bei einer Blockade von dominierenden Kaliumkanälen mitbestimmen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Arteria saphena von männlichen Wistar-Kyoto Ratten verwendet. Diese wurden vom Züchter Janvier Labs (Frankreich) bezogen. Um einen Einfluss des weiblichen Hormonzyklus zu vermeiden wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung zwischen 8 und 12 Wochen alt und wurden im hauseigenen Tierstall unter standardisierten Umweltbedingungen bei freiem Zugang zu Nahrung und Trinkwasser gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 °C und es wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden eingehalten. Vor der Organentnahme erfolgte zunächst die Anästhesie mit Kohlenstoffdioxid und anschließend die Exekution durch Abtrennung des Kopfes. Die Versuche waren dem Regierungspräsidium Karlsruhe angezeigt (I-17/17) und wurden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2 Chemikalien

Für die Präparation und die myographischen Messungen war es entscheidend, ein geeignetes umgebendes Milieu zu gewährleisten. Dazu wurden drei in ihrer Zusammensetzung verschiedene Lösungen verwendet (Tab. 2). Diese wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen neu angesetzt. Für die Gefäßisolation, Gefäßpräparation und Normalisierung wurde eine Präparationslösung verwendet, für die nachfolgenden myographischen Messungen wurde die Präparationslösung durch eine Arbeitslösung ausgetauscht. Vor der eigentlichen Versuchsdurchführung erfolgte die Erwärmung der Arbeitslösungen auf 37 °C sowie eine Feineinstellung des pH-Wertes durch sorgfältige Titration mit Chlorwasserstoff bzw. Natronlauge. Zur pH-Pufferung diente das in den Lösungen enthaltene HEPES und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3). Hierbei enthielt die Präparationslösung ausschließlich HEPES, wohingegen die Arbeitslösungen zusätzlich NaHCO_3 beinhalten. Durch eine kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) während der gesamten Versuchsdurchführung konnte eine weitere Stabilisierung des pH-Wertes erreicht werden. Eine Begasung war während der Gefäßisolation und Gefäßpräparation nicht möglich. Als Energieträger für die glattmuskuläre Kontraktion diente die in den Arbeitslösungen enthaltene Glukose.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden verschiedene vasoaktive Substanzen verwendet (Tab. 3). Diese wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gelagert, zu Stammlösungen angesetzt und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Stammlösungen aufgetaut und nachfolgend auf die benötigten Wirkkonzentrationen verdünnt.

Tab. 2: Versuchslösungen

	Reagenz	Konzentration (mM)	Hersteller
Arbeitslösung	CaCl ₂	1,6	Merck
	EDTA	0,025	Carl-Roth
	Glukose	5,5	Carl-Roth
	HEPES	5	Carl-Roth
	KCl	4,5	Carl-Roth
	MgSO ₄	1	Merck
	NaCl	120	Carl-Roth
	NaHCO ₃	26	Carl-Roth
	NaH ₂ PO ₄	1,2	Merck
Modifizierte kaliumreiche Arbeitslösung (KCl 120 mM)	CaCl ₂	1,6	Merck
	EDTA	0,025	Carl-Roth
	Glukose	5,5	Carl-Roth
	HEPES	5	Carl-Roth
	KCl	120	Carl-Roth
	MgSO ₄	1	Merck
	NaCl	4,5	Carl-Roth
	NaHCO ₃	26	Carl-Roth
	NaH ₂ PO ₄	1,2	Merck
Präparationslösung	CaCl ₂	0,1	Merck
	EDTA	0,025	Carl-Roth
	HEPES	5	Carl-Roth
	KCl	4,5	Carl-Roth
	MgSO ₄	1	Merck
	NaCl	145	Carl-Roth
	NaH ₂ PO ₄	1,2	Merck

Tab. 3: Vasoaktive Substanzen

Substanz	Wirkungsweise	Hersteller
Acetylcholin	Cholinergere Rezeptoragonist	Sigma-Aldrich
AVE1231	TASK-1-Kanal-Inhibitor	Sanofi
DPO-1	K _v 1.5-Kanal-Inhibitor	Tocris
Iberiotoxin (IBTX)	BK _{Ca} -Kanal-Inhibitor	Alomone Labs
Methoxamin (Mx)	α1-Rezeptoragonist	Sigma-Aldrich
PAP-1	K _v 1-Kanal-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Psora-4	K _v 1-Kanal-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Stromatoxin-1 (STX)	K _v 2.1-Kanal-Inhibitor	Alomone Labs
XE991	K _v 7-Kanal-Inhibitor	Tocris

2.3 Geräte

Tab. 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CPA 225D	Sartorius
Edelstahldraht 0,04 mm	Danish Myo Technology
Federschere G-19760	Geuder
Gefrierschrank	Philipp Kirsch

Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer RH basic 2	IKA
Magnetrührstäbe	VWR
Mikroreaktionsgefäße	Starlab
Mikroskop Stemi 2000-CS	Zeiss
Multi-Wire-Myograph 620M	Danish Myo Technology
pH-Meter HI 2211	HANNA
Pinzette	Dumont
Pipettenspitzen	Biozym
PowerLab	AD Instruments GmbH
Präzisionswaage ED 822	Sartorius
Vakuumpumpe	Danish Myo Technology
Vortexer Lab Dancer	IKA
Wasserbad Typ ED	Julabo

2.4 Freilegung der Arteria saphena

Zur Freilegung der Arteria saphena war es erforderlich, in einem ersten Schritt den Oberschenkel vom Rumpf abzutrennen. Die anschließende Fixation des isolierten Schenkels erfolgte in einer mit Präparationslösung (Temperatur 4 °C) gefüllten Petrischale. Die Präparationslösung diente dabei der Vitalitätserhaltung und der pH-Pufferung. Vor der eigentlichen Gefäßpräparation unter dem Mikroskop wurden Fell, Binde- und Fettgewebe an der Oberschenkelinnenseite entfernt. Dadurch gelang eine makroskopische Darstellung der oberflächlich verlaufenden Arteria saphena mit der begleitenden Vene und dem dazugehörigen Nerven (Abb. 1).

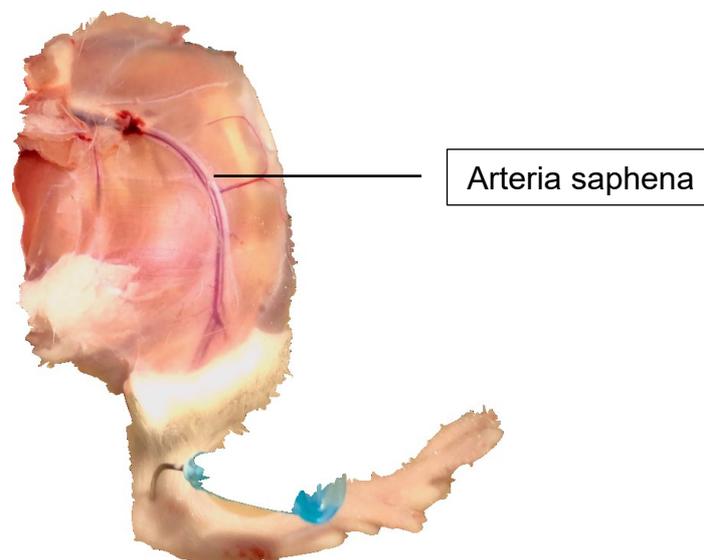


Abb. 1: Oberschenkelinnenseite mit Darstellung der Arteria saphena der Ratte

Quelle: Eigene Darstellung

Abgebildet ist die Oberschenkelinnenseite des linken Hinterbeins der Ratte. Das Fell wurde bereits entfernt, sodass die Arteria saphena mit begleitender Vene und dem dazugehörigen Nerven eingesehen werden kann.

2.5 Gefäßpräparation

Die Gefäßpräparation erfolgte unter dem Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle bei ausreichender Beleuchtung mit Federschere und Pinzette. Nach der Entfernung des oberflächlichen Bindegewebes an der Oberschenkelinnenseite musste die Arteria saphena zunächst von der parallel verlaufenden Vene und dem dazugehörigen Nerven getrennt werden. Anschließend konnte die Arterie aus ihrem Bett gelöst und mittels Federschere isoliert werden. Um eine Messung durch die isometrische Draht-Myographie zu ermöglichen, wurde die Arterie abschließend in circa 2 mm lange Arteriensegmente aufgeteilt und für eine weitere Präparation in die Kammern des Myographen transferiert. Während der gesamten Präparation galt es, eine Irritation der Gefäße durch die verwendeten Instrumente zu vermeiden.

2.6 Isometrische Draht-Myographie

Die isometrische Draht-Myographie ermöglichte die Messung des kontraktile Verhaltens von aufgespannten Gefäßsegmenten. Dabei wurden gemäß dem Prinzip der isometrischen Kontraktion, Änderungen der Kraft bzw. der Wandspannung bei konstantem Gefäßdurchmesser aufgezeichnet. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein Multi-Wire-Myograph (Abb. 2) (Danish Myo Technology, Dänemark) verwendet. Die vier Messeinheiten des Myographen konnten separat mit einer Steuerkonsole bedient werden, wodurch die Aufzeichnung paralleler Messungen möglich wurde. Eine Messeinheit beinhaltete ein System aus einer Edelstahlkammer mit zwei gegenüberliegenden Trägerbacken. Eine der Trägerbacken war mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der die aktuell wirkende Kraft registrierte. Durch die mit der zweiten Trägerbacke gekoppelten Mikrometerschraube konnte die Distanz der Trägerbacken und damit die passive Gefäßvorspannung moduliert werden (Abb. 3). Zwischen den Trägerbacken wurde unter Verwendung von zwei feinen Edelstahldrähten das zu untersuchende Gefäßsegment aufgespannt (Abb. 4). Der Myograph verfügte zudem über eine Heizplatte, wodurch eine Erwärmung der einzelnen Messkammern und eine Aufrechterhaltung der Temperatur während der Versuchsdurchführung ermöglicht wurde. Über eine Messsonde gelang eine genaue Kontrolle der Temperatur. Die Absaugung der Lösungen (Volumen je Messkammer 5 ml) und der gelösten Reagenzien war mit einer Vakuumpumpe möglich. Über ein Begasungsrohr erfolgte die kontinuierliche Applikation von Carbogen. Die einzelnen Messkammern verfügten außerdem über eine Plastikabdeckung, wodurch ein Wärmeerhalt und eine Reduktion der Verdunstung des Messkammerinhaltes erreicht werden konnte. Nach Versuchsende wurden die Kammern regelmäßig ausgespült und mit verdünnter Essigsäure gesäubert. Die erhobenen Daten wurden schließlich mit dem Datenerfassungssystem PowerLab (AD Instruments) und der Analysesoftware LabChart 7 (AD Instruments) weiterverarbeitet.



Abb. 2: Multi-Wire-Myograph 620M, Danish Myo Technology (www.dmt.dk, Stand 06.08.2021)

Abgebildet ist der Multi-Wire-Myograph 620M mit den vier Messeinheiten und der Steuerkonsole.

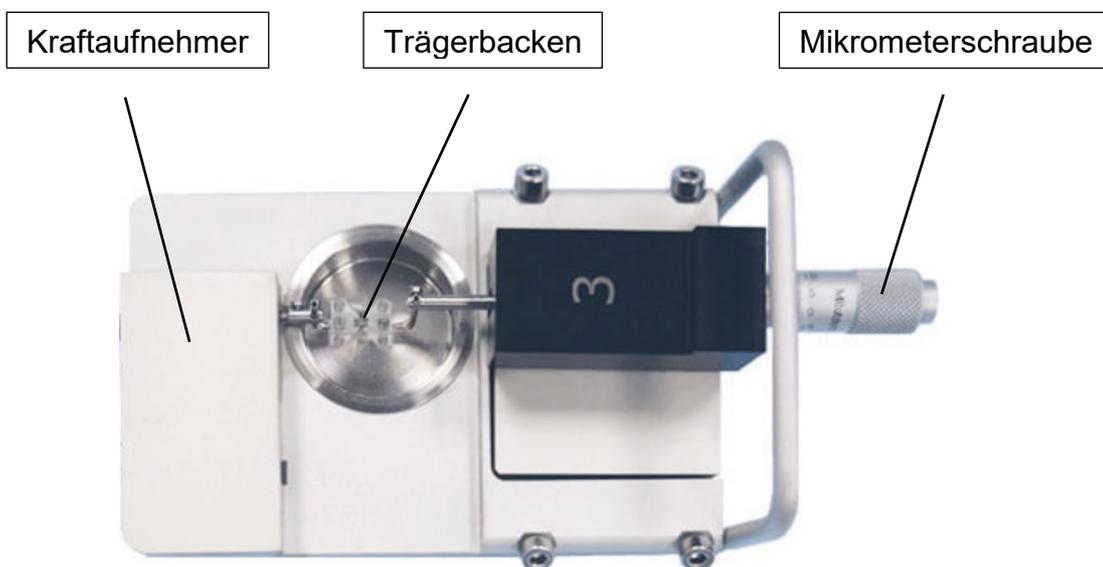


Abb. 3: Messeinheit des Multi-Wire-Myographen 620M (www.dmt.dk, Stand 03.03.2023), modifizierte Darstellung

Abgebildet ist eine Messeinheit des Multi-Wire-Myographen 620M mit den in der Messkammer lokalisierten gegenüberliegenden Trägerbacken. Eine Trägerbacke (rechts) ist mit der Mikrometerschraube verbunden, die eine Veränderung des Abstandes zwischen den Backen ermöglicht. Die zweite Trägerbacke (links) ist mit dem Kraftaufnehmer verbunden, der die aktuell wirkende Kraft registriert.

2.7 Montage der Gefäßsegmente

Zur Montage der Gefäßsegmente wurde ein rostfreier Edelstahldraht (Durchmesser 40 μm) zwischen den Trägerbacken eingeklemmt und mit einer Schraube an einer Seite einer Trägerbacke befestigt. Anschließend wurde über das freie Ende des Drahtes ein circa 2 mm langes Gefäßstück aufgefädelt. Dabei war es wichtig, eine unnötige Irritation des Gefäßes mit der Pinzette bzw. dem Draht zu vermeiden. Danach wurde das freie Drahtende durch eine weitere Schraube an der gleichen Trägerbacke fixiert. Im Anschluss daran wurde ein zweiter Draht durch das Gefäßlumen geführt und an der gegenüberliegenden Trägerbacke an beiden Enden verschraubt. Danach erfolgte die Entfernung des Gefäßendothels durch kreisende intraluminale Bewegungen mit einem Rattenbarthaar. Anschließend wurden die Drähte über die Mikrometerschraube aneinander angenähert, ohne sich jedoch zu berühren (Abb. 4). Die einzelnen Messkammern wurden nun mit dem Myographen verbunden und über die integrierte Heizplatte auf 37 °C erwärmt. Abschließend wurde die Begasung mit Carbogen eingeschaltet.

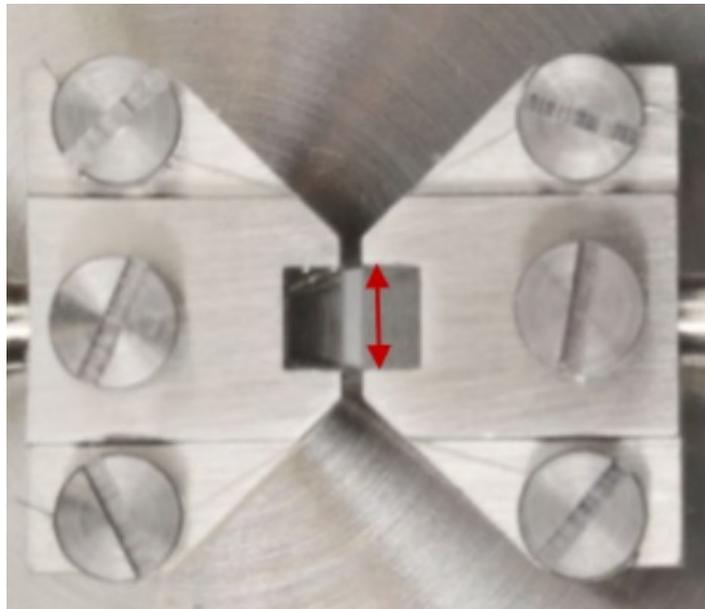


Abb. 4: Trägerbacken mit einem aufgespannten Gefäßsegment (www.dmt.dk, Stand 09.08.2021)

Abgebildet sind zwei gegenüberliegende Trägerbacken mit einem aufgespannten Gefäßsegment. Durch das Gefäßlumen verlaufen zwei Drähte, die jeweils durch zwei Schrauben an einer der beiden Trägerbacken fixiert sind. Durch Veränderung des Abstandes zwischen den Drähten über die Mikrometerschraube (nicht dargestellt) kann die passive Gefäßvorspannung eingestellt werden.

2.8 Normalisierung

Die Normalisierung erfolgte nach abgeschlossener Kammerpräparation und der Erwärmung der Messkammern auf 37 °C. Sie diente der Einstellung einer optimalen Gefäßvorspannung. Durch den Normalisierungsprozess konnte die Aktin-Myosin-Interaktion der glatten Gefäßmuskulatur optimiert und eine Vergleichbarkeit der Versuchsreihen erreicht werden. Der optimale Gefäßinnenumfang (IC_1) errechnete sich hierbei aus dem Gefäßinnenumfang eines relaxierten Gefäßes bei einem transmuralen Druck von 100 mmHg bzw. 13,3 kPa (IC_{100}) multipliziert mit dem Normalisierungsfaktor k . Dieser ist abhängig von Spezies und Gefäßart. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Arteria saphena der adulten Ratte ein Normalisierungsfaktor von 0,9 verwendet (Mulvany and Halpern, 1977).

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

Im Rahmen des Normalisierungsprozesses wurden die Drähte durch die Mikrometerschraube sukzessiv voneinander entfernt und die daraus resultierenden Kräfte (mN) gemessen. Nach jeder Vergrößerung des Abstandes wurde jeweils 90 Sekunden gewartet und der gemessene Kraftwert sowie der entsprechende Mikrometerwert notiert.

Nachfolgend wurde mit unten genannter Formel die Wandspannung T (mN/mm) berechnet. Hierbei bezeichnet F die gemessene Kraft und L die Länge des untersuchten Gefäßes.

$$T = F / (2 \times L)$$

Der aktuelle innere Gefäßumfang (IC) konnte mit nachfolgend aufgeführter Formel berechnet werden. Hierbei bezeichnet d den Drahtdurchmesser und b den Abstand zwischen den Drähten.

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

Durch die Bestimmung des Schnittpunktes zwischen der entstandenen Exponentialfunktion $T = f(IC)$ und der Isobarenkurve ergab sich unter Anwendung des Gesetzes von Laplace der IC_{100} (Abb. 5). Hierbei bezeichnet P den effektiven Druck.

$$P = (2\pi \times T) / IC$$

Bei nun bekanntem IC_{100} konnte IC_1 berechnet werden. Der Mikrometerwert X_1 , der IC_1 entsprach, wurde anschließend durch die Software kalkuliert. Abschließend konnte das Gefäßsegment durch Zurückdrehen der Mikrometerschraube auf IC_1 eingestellt werden.

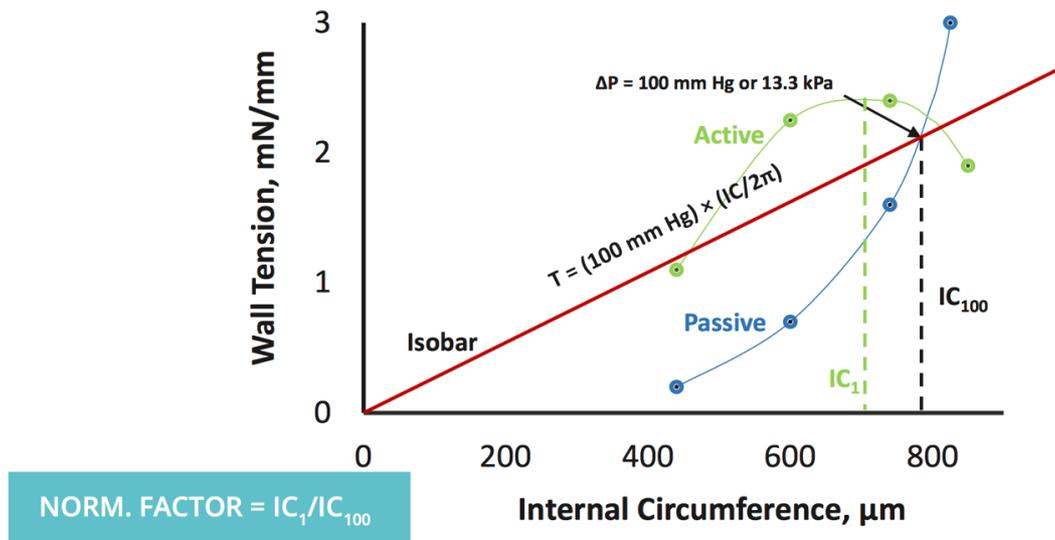


Abb. 5: $T = f(IC)$ (www.dmt.dk, Stand 09.08.2021)

Abgebildet ist die passive Dehnungskurve $T = f(IC)$ (blau), die im Rahmen des Normalisierungsprozesses durch eine sukzessive Vergrößerung des Abstandes zwischen den Trägerbacken über die Mikrometerschraube entsteht. Der Schnittpunkt genannter Kurve mit der Isobaren (rot) ergibt IC_{100} . Durch Multiplikation mit dem Normalisierungsfaktor k ergibt sich schließlich IC_1 , also der optimale Gefäßinnenumfang. Daneben ist eine aktive Kontraktionskurve (grün) dargestellt, die ihr Maximum bei IC_1 hat.

2.9 Standardversuchsprotokoll

Nach dem Erreichen der optimalen Vorspannung durch den Prozess der Normalisierung wurde die Präparationslösung durch die Arbeitslösung ausgetauscht. Zur Vitalitätskontrolle schloss sich das Standardversuchsprotokoll (Tab. 5) an, welches vor jedem Versuchsprotokoll obligat durchzuführen war. Dabei wurde zunächst Mx in der Konzentration 10^{-5} M in die mit Arbeitslösung gefüllten Messkammern gegeben und 5 min inkubiert. Um die vollständige Entfernung des Endothels zu überprüfen, erfolgte danach die zusätzliche Applikation von Acetylcholin in der Konzentration von 10^{-5} M, wobei eine Vasodilatation auf noch vorhandenes Endothel hinwies. Nach dem Feststellen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurden drei Waschschrte (Inkubationszeit jeweils 5 min) mit der Arbeitslösung durchgeführt, wobei der erste Waschschrte einen dreimaligen Austausch der Arbeitslösung beinhaltete. Wurde die Grundlinie nach den drei Waschvorgängen nicht erreicht, konnten weitere Waschschrte erfolgen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation einer modifizierten kaliumreichen Arbeitslösung, die nach 5 min mit der Arbeitslösung ausgewaschen wurde. Durch diese Prozeduren gelang eine gegebenenfalls nötige Revitalisierung der Gefäßsegmente.

Tab. 5: Standardversuchsprotokoll

Dargestellt ist das Standardversuchsprotokoll. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentrationen der Substanzen in den Messkammern. In Bezug auf die modifizierte kaliumreiche Arbeitslösung wurde ein Volumen von 5 ml in den Messkammern inkubiert.

Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
5 min	Mx 10^{-5} M			
5 min	Acetylcholin 10^{-5} M			
3 x 5 min	Waschschritt mit der Arbeitslösung			
5 min	KCl 120 mM			
3 x 5 min	Waschschritt mit der Arbeitslösung			
5 min	Mx 10^{-5} M			
3 x 5 min	Waschschritt mit der Arbeitslösung			
10 min	H ₂ O			
3 min je Konzentrations- schritt	Erste Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Mx 1)			

2.10 Versuchsprotokolle

Die Bestimmung der maximalen Kontraktionsfähigkeit (F_{\max}) des untersuchten Gefäßsegmentes erfolgte initial durch die Applikation von Mx in der Konzentration 10^{-5} M. Damit war es möglich, die später erhobenen Werte der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mit F_{\max} in Relation zu setzen. Nach dem Auswaschen und der Inkubation mit H₂O schloss sich die erste Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Mx 1) an (Tab. 5). Dazu wurden aufsteigende Mx-Konzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-4} M in halblogarithmischen Schritten für jeweils 3 min in die Messkammern gegeben. Die beschriebene Verdünnungsreihe der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurde zuvor aus einer Stammlösung (10^{-4} M) mit Aqua dest. hergestellt. Die einzelnen Pipettierschritte mit den korrespondierenden Mx-Konzentrationen sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Aufsteigende Konzentrationen von Mx (Konzentrations-Wirkungs-Beziehung)

Pipettierschritt (Inkubationszeit je Konzentrations- schritt 3 min)	Konzentration von Mx in den Messkammern
1	Mx 10^{-8} M
2	Mx 3×10^{-8} M
3	Mx 10^{-7} M
4	Mx 3×10^{-7} M
5	Mx 10^{-6} M
6	Mx 3×10^{-6} M
7	Mx 10^{-5} M
8	Mx 3×10^{-5} M
9	Mx 10^{-4} M

Im Anschluss an Mx 1 wurde der Effekt von verschiedenen Kaliumkanal-Inhibitoren auf die Mx-induzierte Vasokonstriktion untersucht. Durch einen Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mit und ohne Zugabe der Wirksubstanzen war es möglich, auf den Effekt der jeweiligen Kaliumkanal-Inhibitoren zu schließen. Dabei wurden stets eine Substanz A und eine Substanz B sowohl getrennt als auch in Kombination untersucht. Bei den applizierten Substanzen handelte es sich um einzelne Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen. Die Substanzen der

Wirkstoffkombinationen wurden stets zeitgleich inkubiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen sind in Tab. 3 dargestellt. In allen Versuchsserien der vorliegenden Arbeit war eine der applizierten Substanzen der TASK-1-Kanal-Inhibitor AVE1231. AVE1231 wurde entweder in den aufsteigenden Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M oder ausschließlich in der Konzentration 10^{-6} M inkubiert. Wurde AVE1231 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen appliziert, war die Konzentration der anderen Substanz konstant. Bei gleichbleibender Konzentration von AVE1231 wurde entsprechend die andere Substanz in ihrer Konzentration verändert. Das Versuchsprotokoll 1 mit AVE1231 als Substanz A und IBTX als Substanz B wird im Folgenden dargestellt (Tab. 7). In Tab. 8 werden sämtliche Versuchsprotokolle der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

Tab. 7: Versuchsprotokoll 1 mit AVE1231 als Substanz A und IBTX als Substanz B

DMSO: Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)

H₂O: Wasser (Lösungsmittel)

Mx 2-4: 2.-4. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Mx

Dargestellt ist das Versuchsprotokoll 1 mit AVE1231 als Substanz A und IBTX als Substanz B. In diesem Protokoll wurde AVE1231 in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Die Konzentration von IBTX blieb konstant. Wurde Substanz A inkubiert, erfolgte in den übrigen Kammern die Inkubation des Lösungsmittels von Substanz A. Wurde Substanz B inkubiert, erfolgte entsprechend in den übrigen Kammern die Inkubation des Lösungsmittels von Substanz B. Die Auswaschphasen sind zur besseren Übersicht nicht dargestellt.

Versuchsprotokoll 1				
Inkubationszeit	Kammer 1 (Kontrolle)	Kammer 2 (AVE1231)	Kammer 3 (IBTX)	Kammer 4 (IBTX + AVE1231)
10 min	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10^{-7} M	DMSO	AVE1231 10^{-7} M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10^{-6} M	DMSO	AVE1231 10^{-6} M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Tab. 8: Versuchsprotokolle

Versuchsprotokoll 1				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10^{-7} M	DMSO	AVE1231 10^{-7} M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10^{-6} M	DMSO	AVE1231 10^{-6} M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10^{-7} M	IBTX 10^{-7} M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 2				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
10 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	XE991 3 x 10 ⁻⁶ M	XE991 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	H ₂ O	H ₂ O	XE991 3 x 10 ⁻⁶ M	XE991 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 3				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	H ₂ O	H ₂ O	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M XE991 3 x 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 4				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
10 min	DMSO	DMSO	DPO-1 10 ⁻⁶ M	DPO-1 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	DPO-1 10 ⁻⁶ M	DPO-1 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	DPO-1 3 x 10 ⁻⁶ M	DPO-1 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 5				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
10 min	DMSO	DMSO	DPO-1 10 ⁻⁵ M	DPO-1 10 ⁻⁵ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	DPO-1 10 ⁻⁵ M	DPO-1 10 ⁻⁵ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			

Versuchsprotokoll 6				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
10 min	DMSO	DMSO	Psora-4 10 ⁻⁶ M	Psora-4 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	Psora-4 10 ⁻⁶ M	Psora-4 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	Psora-4 3 x 10 ⁻⁶ M	Psora-4 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 7				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
10 min	DMSO	DMSO	PAP-1 10 ⁻⁶ M	PAP-1 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	PAP-1 10 ⁻⁶ M	PAP-1 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	DMSO	PAP-1 3 x 10 ⁻⁶ M	PAP-1 3 x 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

Versuchsprotokoll 8				
Inkubationszeit	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
10 min	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
10 min	DMSO	DMSO	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 2			
10 min	DMSO	DMSO	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁷ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 3			
10 min	DMSO	DMSO	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M	IBTX 10 ⁻⁷ M STX 10 ⁻⁷ M DPO-1 10 ⁻⁶ M
10 min	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M	DMSO	AVE1231 10 ⁻⁶ M
3 min je Konzentrationsschritt	Mx 4			

2.11 Auswertung und Statistik

Die Datensätze der durch PowerLab/LabChart aufgezeichneten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurden zunächst in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel übertragen. Dort erfolgte die Berechnung der Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen und deren graphische Visualisierung. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. In diesem Zusammenhang erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA) sowie die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) mit nachfolgendem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben. Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) ausgegeben; bei n handelte es sich um die Anzahl der biologischen Replikate (Anzahl der untersuchten Ratten). Das festgelegte Signifikanzniveau lag bei einem α -Wert von 0,05.

3 ERGEBNISSE

Für die Untersuchung der kontraktile Funktion der Arteria saphena der Ratte wurde der α_1 -adrenerge Rezeptoragonist Methoxamin (Mx) verwendet. Mx induzierte in allen Gefäßsegmenten eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Wandspannung. Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals im Kontext Mx-induzierter Kontraktionen wurde mit Hilfe des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 (Putzke et al., 2007b) untersucht. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von AVE1231 verwendet, um die Konzentrationsabhängigkeit seines Effekts zu untersuchen. In Abhängigkeit von der Versuchsreihe erfolgte die Blockade von weiteren Kaliumkanälen durch ihre spezifischen Blockersubstanzen.

3.1 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} -Kanälen

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-7} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 6 A). Die Blockade der BK_{Ca} -Kanäle mittels IBTX (Galvez et al., 1990; Ma et al., 2020; Zhang et al., 2021) verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 6 A). Auch in Anwesenheit von IBTX verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 6 A). IBTX induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M (Abb. 6 B). IBTX verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 6 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von IBTX nicht (Abb. 6 C).

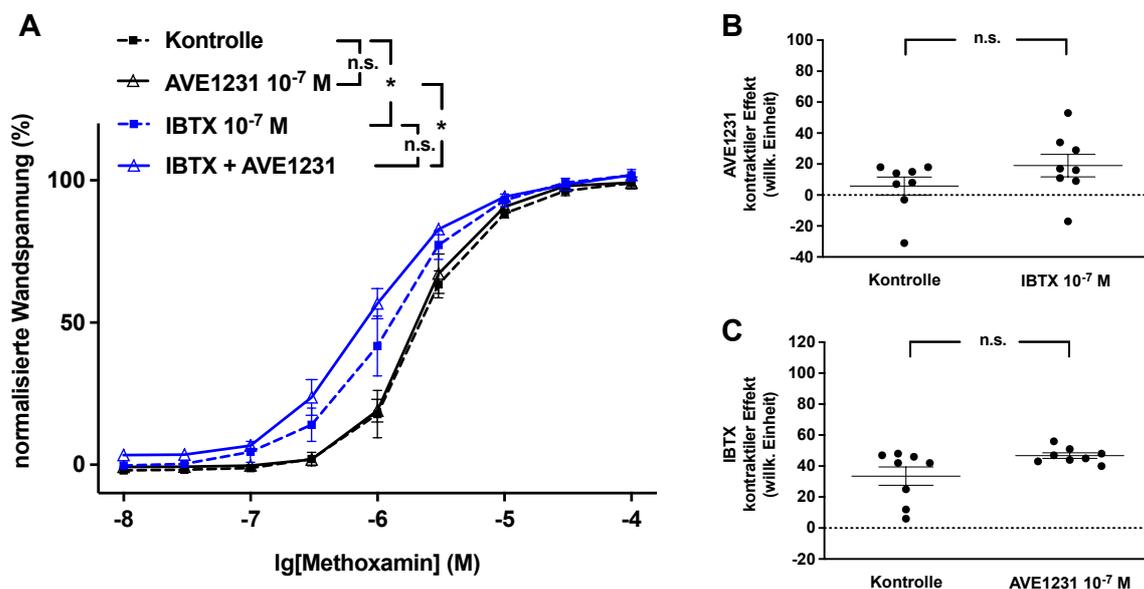


Abb. 6: Effekt von IBTX und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M), in Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX und AVE1231 (IBTX + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=8$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$)

C) Kontraktiler Effekt von IBTX (IBTX 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion ebenfalls nicht (Abb. 7 A). Die Blockade der BK_{Ca}-Kanäle mittels IBTX verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 7 A). In Anwesenheit von IBTX verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 7 A). IBTX induzierte somit einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 7 B). IBTX verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 7 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von IBTX (Abb. 7 C).

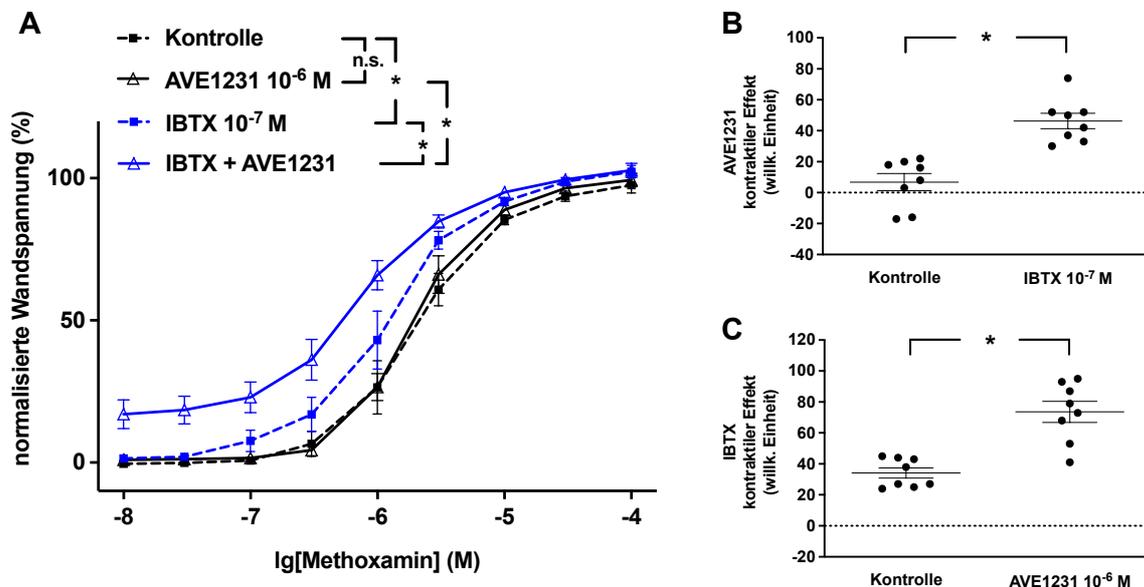


Abb. 7: Effekt von IBTX und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX und AVE1231 (IBTX + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=8$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$; * : $p<0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von IBTX (IBTX 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$; * : $p<0,05$)

3.2 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K_v7-Kanälen

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-7} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 8 A). Die Blockade der K_v7-Kanäle mittels XE991 (Ma et al., 2020; Tsvetkov et al., 2016; Zhang et al., 2021) verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 8 A). Auch in Anwesenheit von XE991 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 8 A). XE991 induzierte einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M (Abb. 8 B). XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 8 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von XE991 nicht (Abb. 8 C).

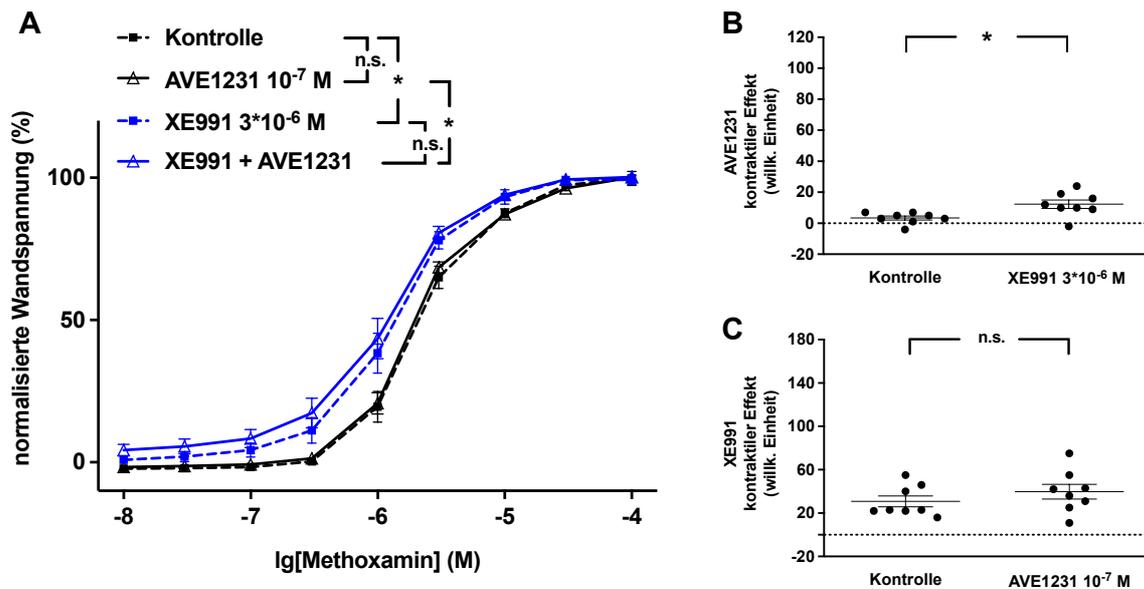


Abb. 8: Effekt von XE991 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M), in Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von XE991 und AVE1231 (XE991 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=8$; * : $p < 0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$; * : $p < 0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion ebenfalls nicht (Abb. 9 A). Die Blockade der K_v7 -Kanäle mittels XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 9 A). In Anwesenheit von XE991 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 9 A). XE991 induzierte somit einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 9 B). XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 9 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von XE991 (Abb. 9 C).

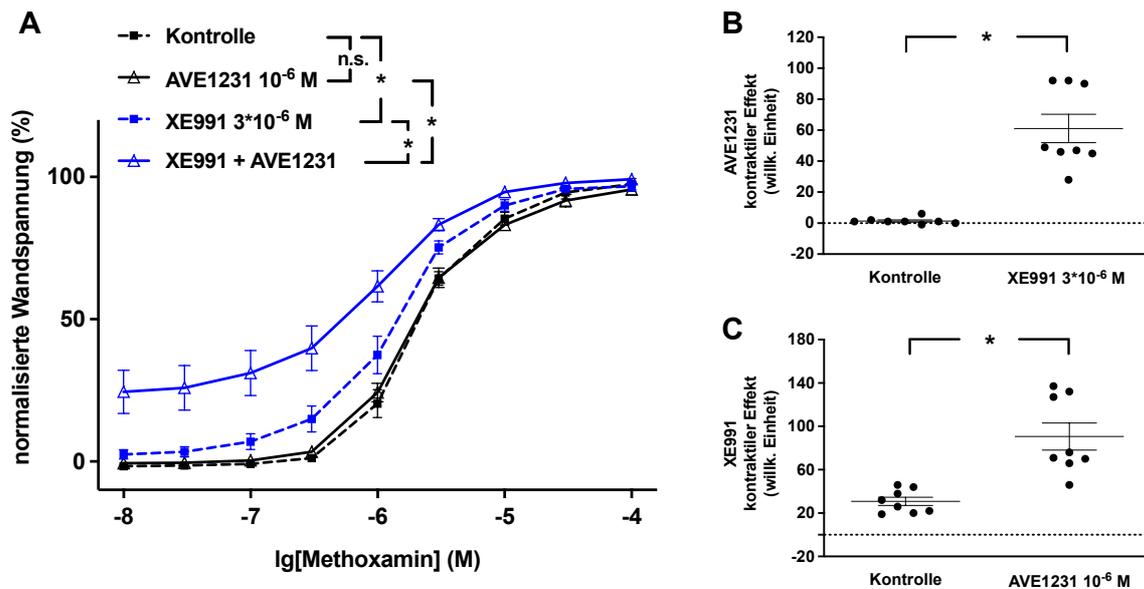


Abb. 9: Effekt von XE991 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von XE991 und AVE1231 (XE991 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=8$; * : $p < 0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$; * : $p < 0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$; * : $p < 0,05$)

3.3 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} - und K_v7 -Kanälen

Bei Mx-Konzentrationen ab circa $3 \cdot 10^{-7}$ M wurde in Anwesenheit der Kombination von IBTX und XE991 eine fast maximale Kontraktion beobachtet (Abb. 10 A). Unter diesen Bedingungen würde eine mögliche weitere Kontraktion durch AVE1231 nicht zu beobachten sein. Deshalb wurde die Analyse auf den Bereich geringerer Kontraktionen bei niedrigen Mx-Konzentrationen beschränkt (grau hinterlegter Bereich).

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-7} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 10 A). Die Blockade der BK_{Ca} - und K_v7 -Kanäle mittels der Kombination von IBTX und XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion sehr stark (Abb. 10 A). Auch in Anwesenheit der Kombination von IBTX und XE991 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 10 A). Die Kombination von IBTX und XE991 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M (Abb. 10 B). Die Kombination von IBTX und XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 10 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt der Kombination von IBTX und XE991 nicht (Abb. 10 C).

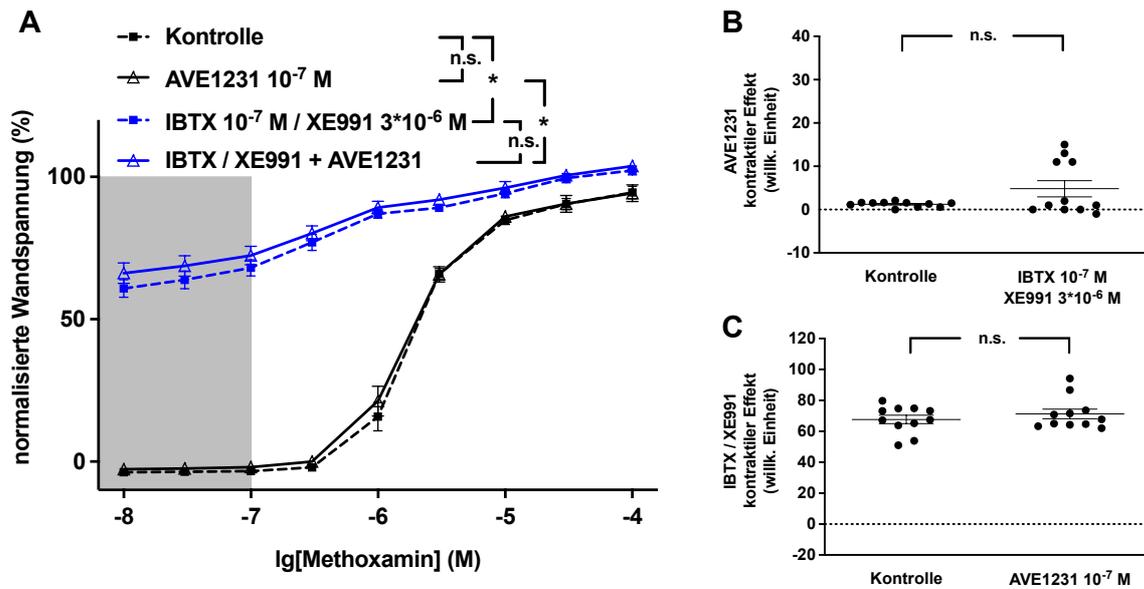


Abb. 10: Effekt der Kombination von IBTX / XE991 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M), in Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 und AVE1231 (IBTX / XE991 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=11$; *: $p < 0,05$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=11$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

C) Kontraktiler Effekt der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=11$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 11 A). Die Blockade der BK_{Ca} - und K_{v7} -Kanäle mittels der Kombination von IBTX und XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion sehr stark (Abb. 11 A). In Anwesenheit der Kombination von IBTX und XE991 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion ebenfalls (Abb. 11 A). Die Kombination von IBTX und XE991 vergrößerte somit den Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 11 B). Die Kombination von IBTX und XE991 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 11 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt der Kombination von IBTX und XE991 nicht (Abb. 11 C).

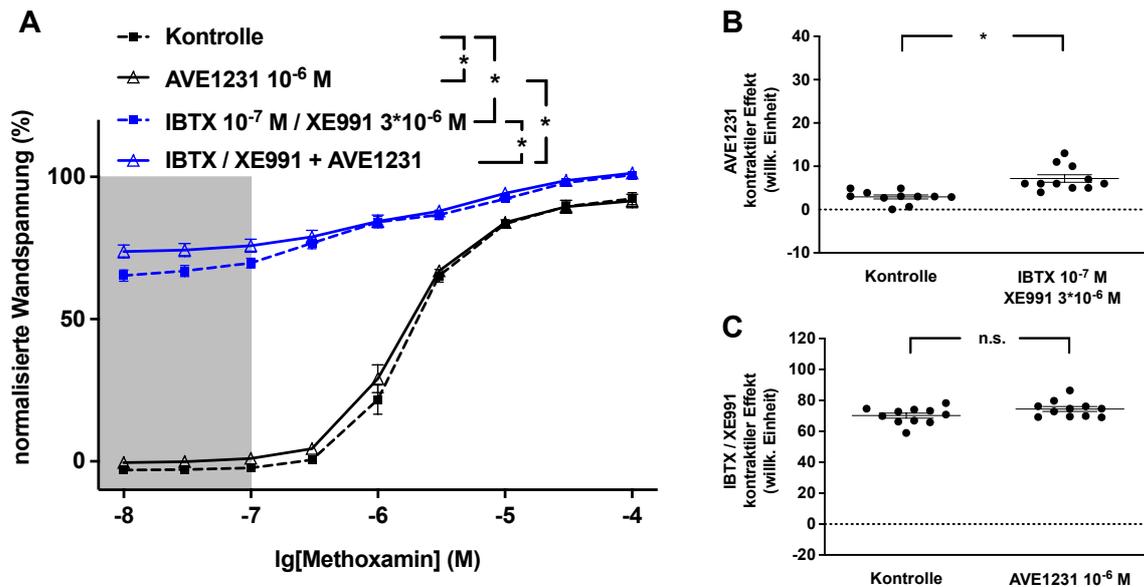


Abb. 11: Effekt der Kombination von IBTX / XE991 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 und AVE1231 (IBTX / XE991 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=11$; *: $p < 0,05$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=11$; *: $p < 0,05$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

C) Kontraktiler Effekt der Kombination von IBTX / XE991 (IBTX 10^{-7} M / XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=11$; beschränkt auf Daten im grau hinterlegten Bereich)

3.4 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen

3.4.1 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen durch DPO-1

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 12 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels DPO-1 (Tsvetkov et al., 2016; Zhang et al., 2021) in der Konzentration 10^{-6} M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 12 A). Auch in Anwesenheit von DPO-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 12 A). DPO-1 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 12 B). DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 12 A). AVE1231 beeinflusste den Effekt von DPO-1 nicht (Abb. 12 C).

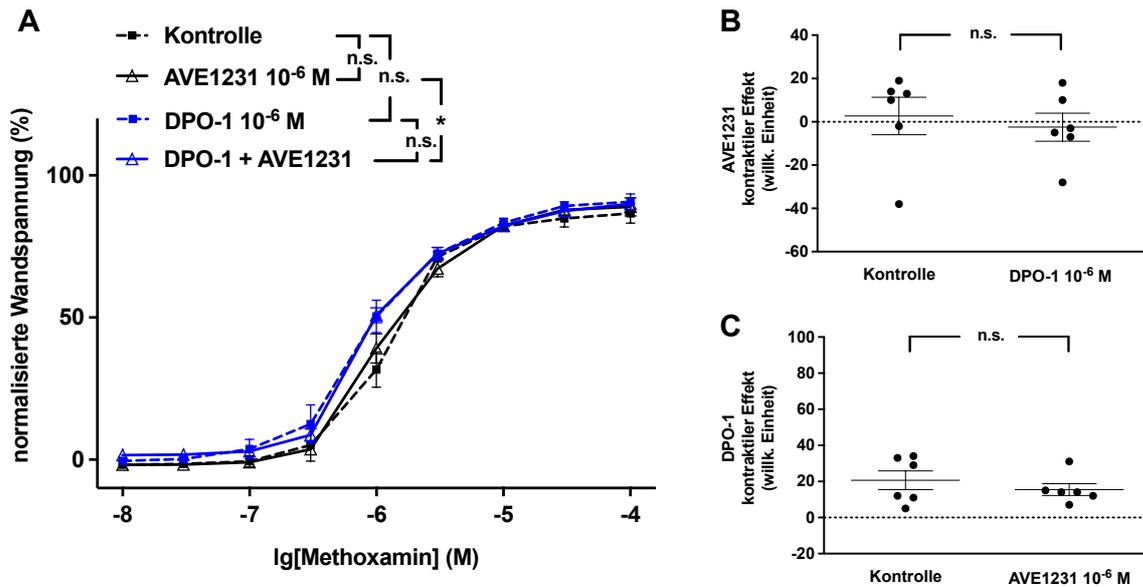


Abb. 12: Effekt von DPO-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-6} M) und in Anwesenheit der Kombination von DPO-1 und AVE1231 (DPO-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=6$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$)

C) Kontraktiler Effekt von DPO-1 (DPO-1 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 13 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels DPO-1 in der Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 13 A). Auch in Anwesenheit von DPO-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 13 A). DPO-1 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 13 B). DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 13 A). AVE1231 beeinflusste den Effekt von DPO-1 nicht (Abb. 13 C).

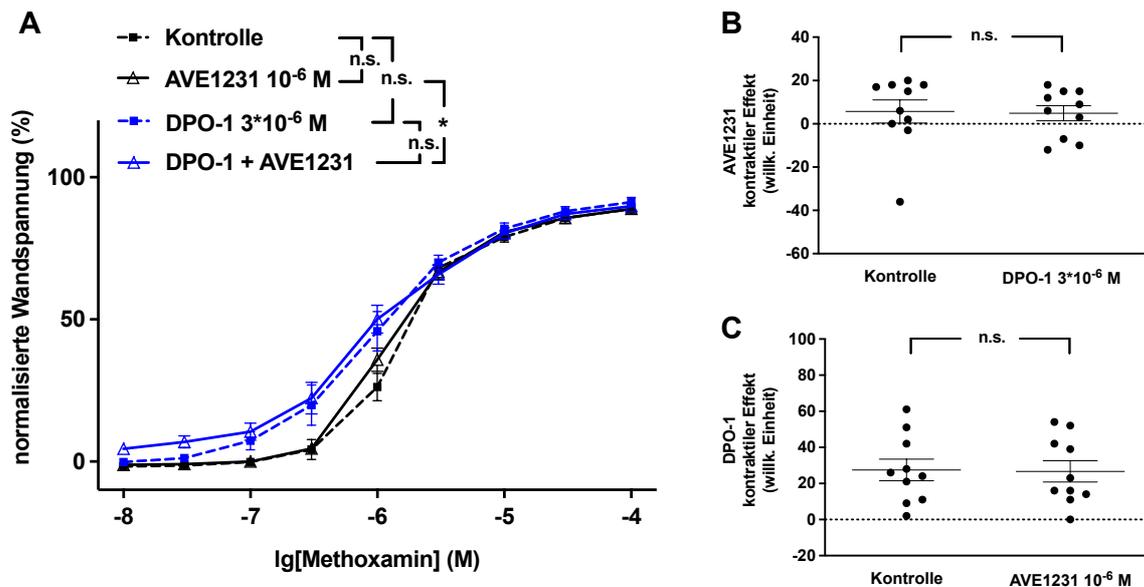


Abb. 13: Effekt von DPO-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von DPO-1 und AVE1231 (DPO-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=10$; * : $p < 0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=10$)

C) Kontraktiler Effekt von DPO-1 (DPO-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=10$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 14 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels DPO-1 in der Konzentration 10^{-5} M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 14 A). Auch in Anwesenheit von DPO-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 14 A). DPO-1 induzierte einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 14 B). DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 14 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von DPO-1 nicht (Abb. 14 C).

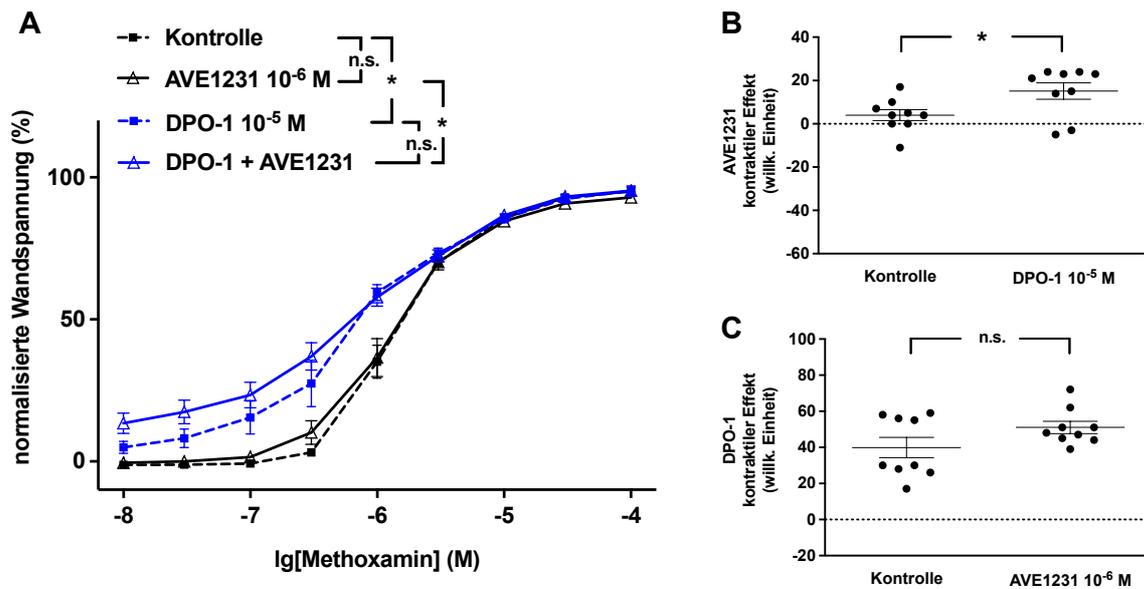


Abb. 14: Effekt von DPO-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-5} M) und in Anwesenheit der Kombination von DPO-1 und AVE1231 (DPO-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=9$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von DPO-1 (DPO-1 10^{-5} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=9$; * : $p<0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von DPO-1 (DPO-1 10^{-5} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=9$)

3.4.2 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen durch Psora-4

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 15 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels Psora-4 (Kidd, Bulley and Jaggar, 2017; Tobin et al., 2009) in der Konzentration 10^{-6} M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 15 A). Auch in Anwesenheit von Psora-4 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 15 A). Psora-4 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 15 B). Psora-4 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 15 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von Psora-4 nicht (Abb. 15 C).

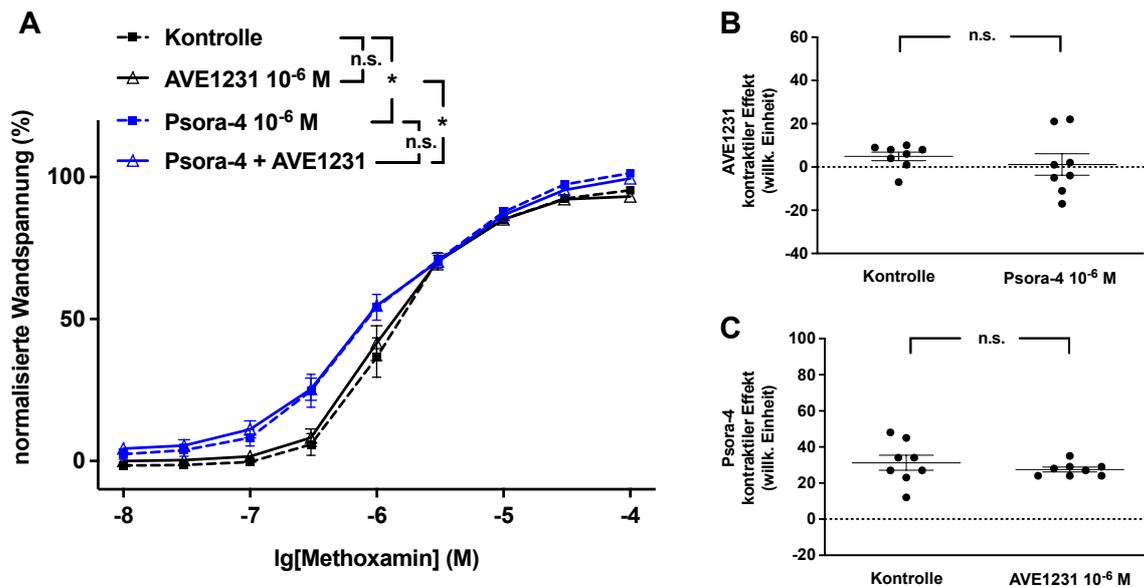


Abb. 15: Effekt von Psora-4 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10⁻⁶ M), in Anwesenheit von Psora-4 (Psora-4 10⁻⁶ M) und in Anwesenheit der Kombination von Psora-4 und AVE1231 (Psora-4 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; n=8; * : p<0,05)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10⁻⁶ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Psora-4 (Psora-4 10⁻⁶ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; n=8)

C) Kontraktiler Effekt von Psora-4 (Psora-4 10⁻⁶ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10⁻⁶ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; n=8)

AVE1231 in einer Konzentration von 10⁻⁶ M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 16 A). Die Blockade der K_v1.5-Kanäle mittels Psora-4 in der Konzentration 3·10⁻⁶ M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 16 A). Auch in Anwesenheit von Psora-4 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 16 A). Psora-4 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M (Abb. 16 B). Psora-4 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 16 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von Psora-4 nicht (Abb. 16 C).

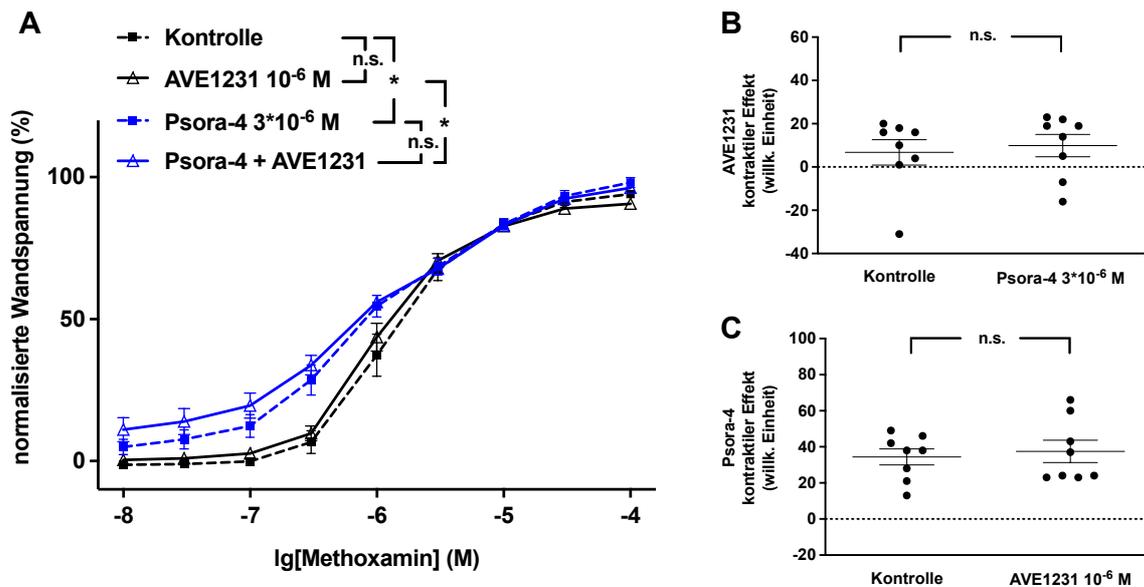


Abb. 16: Effekt von Psora-4 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von Psora-4 (Psora-4 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von Psora-4 und AVE1231 (Psora-4 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=8$; * : $p < 0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Psora-4 (Psora-4 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$)

C) Kontraktiler Effekt von Psora-4 (Psora-4 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=8$)

3.4.3 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen durch PAP-1

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 17 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels PAP-1 (Schmitz et al., 2005) in der Konzentration 10^{-6} M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 17 A). Auch in Anwesenheit von PAP-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 17 A). PAP-1 induzierte einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 17 B). PAP-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 17 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von PAP-1 (Abb. 17 C).

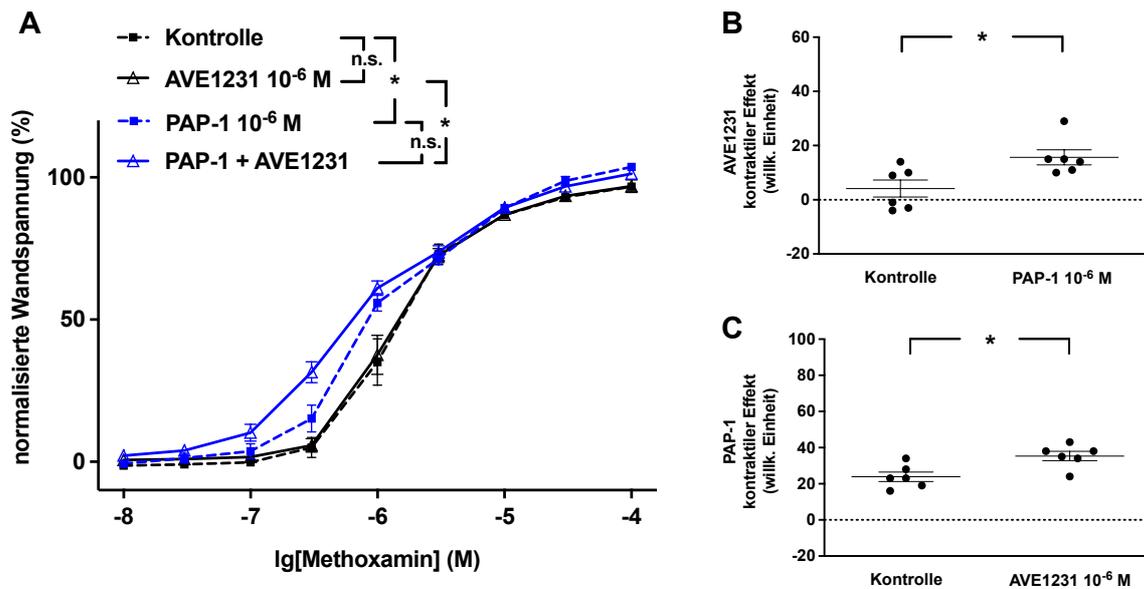


Abb. 17: Effekt von PAP-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von PAP-1 (PAP-1 10^{-6} M) und in Anwesenheit der Kombination von PAP-1 und AVE1231 (PAP-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=6$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von PAP-1 (PAP-1 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$; * : $p<0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von PAP-1 (PAP-1 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$; * : $p<0,05$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 18 A). Die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle mittels PAP-1 in der Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ M verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 18 A). In Anwesenheit von PAP-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 18 A). PAP-1 induzierte somit einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 18 B). PAP-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 18 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt von PAP-1 (Abb. 18 C).

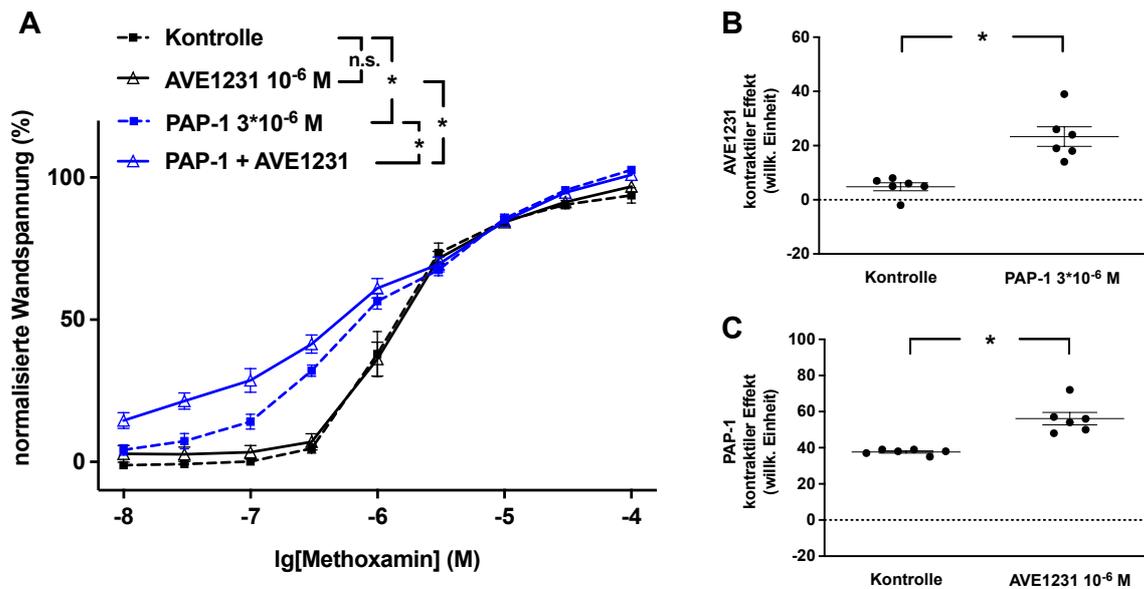


Abb. 18: Effekt von PAP-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit von PAP-1 (PAP-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M) und in Anwesenheit der Kombination von PAP-1 und AVE1231 (PAP-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=6$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von PAP-1 (PAP-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$; * : $p<0,05$)

C) Kontraktiler Effekt von PAP-1 (PAP-1 $3 \cdot 10^{-6}$ M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=6$; * : $p<0,05$)

3.5 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} -, $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanälen

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-7} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 19 A). Die Blockade der BK_{Ca} -, $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanäle mittels der Kombination von IBTX, STX (Hristov et al., 2012; Zhang et al., 2021) und DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion stark (Abb. 19 A). Auch in Anwesenheit der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion nicht (Abb. 19 A). Die Kombination von IBTX, STX und DPO-1 induzierte somit keinen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M (Abb. 19 B). Die Kombination von IBTX, STX und DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 19 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 nicht (Abb. 19 C).

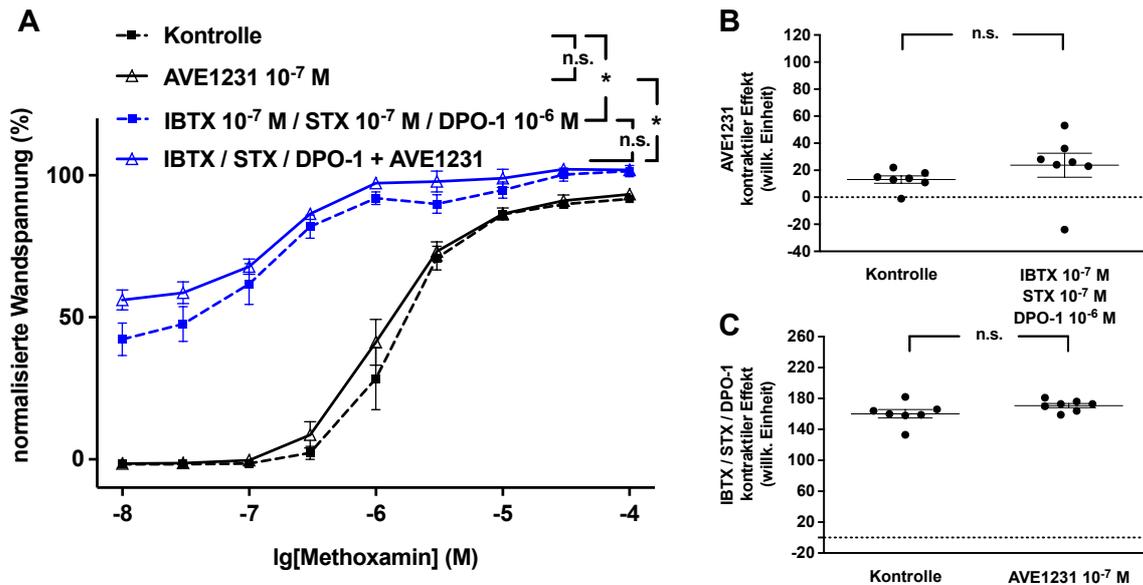


Abb. 19: Effekt der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M), in Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 und AVE1231 (IBTX / STX / DPO-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=7$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=7$)

C) Kontraktiler Effekt der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-7} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=7$)

AVE1231 in einer Konzentration von 10^{-6} M beeinflusste die Mx-induzierte Kontraktion ebenfalls nicht (Abb. 20 A). Die Blockade der BK_{Ca} -, $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanäle mittels der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion stark (Abb. 20 A). In Anwesenheit der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 verstärkte AVE1231 die Mx-induzierte Kontraktion (Abb. 20 A). Die Kombination von IBTX, STX und DPO-1 induzierte somit einen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M (Abb. 20 B). Die Kombination von IBTX, STX und DPO-1 verstärkte die Mx-induzierte Kontraktion auch in Anwesenheit von AVE1231 (Abb. 20 A). AVE1231 vergrößerte den Effekt der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 (Abb. 20 C).

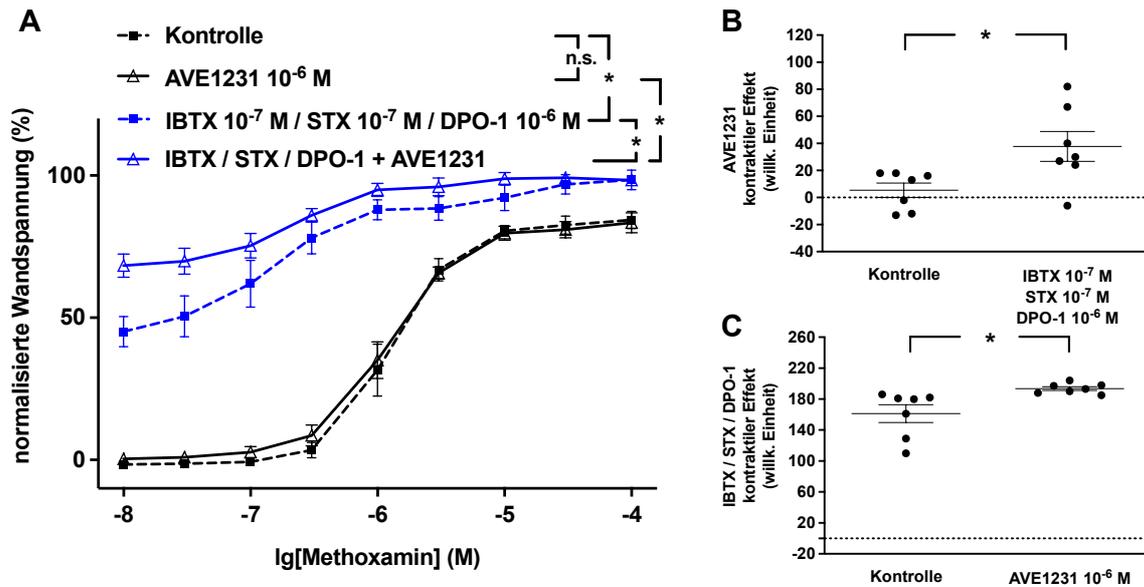


Abb. 20: Effekt der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 und AVE1231 auf Mx-induzierte Kontraktionen der Arteria saphena

A) Mx-induzierte Kontraktionen in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle), in Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M), in Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M) und in Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 und AVE1231 (IBTX / STX / DPO-1 + AVE1231).

(zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung; $n=7$; * : $p<0,05$)

B) Kontraktiler Effekt von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=7$; * : $p<0,05$)

C) Kontraktiler Effekt der Kombination von IBTX / STX / DPO-1 (IBTX 10^{-7} M / STX 10^{-7} M / DPO-1 10^{-6} M) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von AVE1231 (AVE1231 10^{-6} M).

(zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben; $n=7$; * : $p<0,05$)

4 DISKUSSION

4.1 Der kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten mit dem selektiven TASK-1-Kanal-Inhibitor AVE1231 (Putzke et al., 2007b) untersucht. Obwohl AVE1231 (A293) zunächst als $K_v1.5$ -Kanal-Inhibitor betrachtet wurde (Wirth et al., 2007), konnte in einer später publizierten Arbeit eine circa 43-fach selektivere Wirkung auf den TASK-1-Kanal festgestellt werden. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von AVE1231 auf in *Xenopus* Oozyten exprimierte humane TASK-1-Kanäle lag in der beschriebenen Studie bei circa $0,2 \mu\text{M}$ (Kiper et al., 2015). Zur Untersuchung eines potentiell dosisabhängigen Effekts wurde in der vorliegenden Arbeit AVE1231 in den Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M appliziert. Vergleichbare Konzentrationen von AVE1231 wurden bereits in anderen Arbeiten zur Untersuchung des TASK-1-Kanals sowohl in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (Antigny et al., 2016) als auch in Gefäßsegmenten der Arteria saphena der Ratte verwendet (Shvetsova et al., 2020; Shvetsova et al., 2022).

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass TASK-1-Kanäle systemischer Arterien adulter Ratten die Kontraktilität dieser Arterien unter der Bedingung der Blockade von dominant wirkenden Kaliumkanälen mitbestimmen, liegt in Erkenntnissen kürzlich publizierter Studien begründet, in denen eine funktionelle Interaktion zwischen verschiedenen exprimierten Kaliumkanälen beschrieben wurde (Ma et al., 2020; Mondéjar-Parreño et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020). Der Begriff der funktionellen Interaktion beschreibt in diesem Kontext, dass sich Kaliumkanäle abhängig von ihrem aktuellen Aktivitätsniveau in ihrer funktionellen Rolle wechselseitig beeinflussen können. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Blockade von BK_{Ca} -Kanälen in Gefäßsegmenten der Arteria saphena eine verstärkte funktionelle Rolle der ebenfalls exprimierten K_v7 -Kanäle induzierte und umgekehrt (Ma et al., 2020). Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass die funktionelle Rolle eines Kanals mit geringem Einfluss auf die Regulation des Vasotonus (z. B. des TASK-1-Kanals) durch einen dominant wirkenden Kanal mit hoher Aktivität (z. B. des BK_{Ca} -Kanals) maskiert werden könnte. Auf die Mechanismen und theoretischen Überlegungen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, wird in den folgenden Textpassagen näher eingegangen.

Für die Formulierung der Hypothese der vorliegenden Arbeit ist außerdem eine kürzlich publizierte Studie von Shvetsova et al. von Bedeutung. In genannter Studie wurde von keiner funktionellen Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion der Arteria saphena von adulten Ratten ausgegangen. Diese Annahme bezog sich allerdings auf Versuchsreihen mit einer isolierten Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 ohne eine zusätzliche Blockade weiterer Kaliumkanäle (Shvetsova et al., 2020; Shvetsova et al., 2022).

Unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur bleibt es somit unklar, ob TASK-1-Kanäle überhaupt keine funktionelle Rolle bei der Regulation des Vasotonus der Arteria saphena von adulten Ratten spielen oder ob ihre Funktion lediglich durch dominant wirkende Kaliumkanäle maskiert wird.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der kontraktile Effekt von AVE1231 auf Mx-induzierte Gefäßkontraktionen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von weiteren Kaliumkanal-Inhibitoren untersucht. Die systematische Blockade weiterer Kaliumkanäle zusätzlich zur Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 diente im Kontext der vorliegenden Arbeit einer potentiellen Demaskierung bzw. Verstärkung der funktionellen Rolle des TASK-1-Kanals in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten.

Bei funktioneller Verfügbarkeit aller Kaliumkanäle beeinflusste AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M die Mx-induzierten Kontraktionen nicht. Auch durch die isolierte Applikation von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M konnte, abgesehen von der Versuchsreihe zur Untersuchung der funktionellen Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} - und K_v7 -Kanälen, kein kontraktiler Effekt nachgewiesen werden. In der beschriebenen Versuchsreihe induzierte die gleichzeitige Blockade der BK_{Ca} -Kanäle durch IBTX und der K_v7 -Kanäle durch XE991 bereits bei Mx-Konzentrationen von 3×10^{-7} M ein fast maximales Kontraktionsniveau, sodass es nicht mehr möglich gewesen wäre, eine weitere Kontraktionssteigerung durch die zusätzliche Gabe von AVE1231 zu beobachten. Daher wurde die Datenanalyse dieser Messreihe auf einen Bereich niedriger Mx-Konzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-7} M beschränkt (siehe Kapitel 3.3). In Bezug auf den beobachteten kontraktilen Effekt von AVE1231 bei funktioneller Verfügbarkeit aller Kaliumkanäle dieser Versuchsreihe gilt es also zu berücksichtigen, dass dieser ebenfalls unter der Bedingung der Eingrenzung der Messwerte auf einen Bereich niedriger Mx-Konzentrationen zwischen 10^{-8} M und 10^{-7} M beschränkt war, weshalb keine allgemeingültige Aussage über den Bereich der gesamten Kontraktilität getroffen werden kann. Bei einer Übertragung der Messwerteingrenzung auf die restlichen Versuchsreihen konnte der kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M bei funktioneller Verfügbarkeit aller Kaliumkanäle in zwei weiteren Versuchsserien bestätigt werden (die Kurzanalysen der anderen Versuchsreihen sind in der vorliegenden Arbeit nicht enthalten). Dadurch kann ein Artefakt als Ursache für den kontraktilen Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Offensichtlich ist der Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M aber so klein, dass bei der für die sonstigen Aussagen der vorliegenden Arbeit angemessenen Stichprobengröße in Abhängigkeit leicht unterschiedlicher Versuchsbedingungen in einem Fall ein Effekt statistisch nachgewiesen werden konnte und in einem anderen Fall nicht. Diesem Befund wurde nicht weiter nachgegangen, da dieser kleine Effekt von AVE1231 für den Kontraktionszustand der Gefäße ohne eine funktionelle Relevanz ist.

Aus den erhobenen Daten ergeben sich zwei mögliche Erklärungsansätze. Zum einen könnte der TASK-1-Kanal in den untersuchten Gefäßen nicht vorkommen. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da die Expression des TASK-1-Kanals in der Arteria saphena von adulten Ratten bereits in einer vorangegangenen Studie von Shvetsova et al. nachgewiesen werden konnte (Shvetsova et al., 2020). Zudem konnte im Kontext der Kurzanalysen ein kontraktiler Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M dokumentiert werden, auch wenn dieser nur auf den Bereich niedriger Mx-Konzentrationen beschränkt war. Ein weiterer Erklärungsansatz besteht darin, dass die funktionelle Rolle der TASK-1-Kanäle durch dominant wirkende Kaliumkanäle lediglich maskiert wird. Solche dominanten Kaliumkanäle verschieben das Membranpotential in geöffnetem Zustand in Richtung des Gleichgewichtspotentials von Kalium. Ist das Membranpotential nahe dem Gleichgewichtspotential von Kalium, dann ist der Kaliumfluss bzw. die treibende Kraft für die Kaliumionen über die

Zellmembran gering. Kommt es zur Blockade eines Kaliumkanals, der nur wenig zur Gesamtmembranleitfähigkeit beiträgt (z. B. des TASK-1-Kanals), dann könnte dadurch seine funktionelle Rolle maskiert werden. Gegensätzlich dazu würde die Blockade von dominant wirkenden Kaliumkanälen zu einer Depolarisation und einer konsekutiven Entfernung des Membranpotentials vom Gleichgewichtspotential von Kalium führen. Dadurch würde der elektrochemische Gradient der Kaliumionen zunehmen und auch die Blockade eines nicht dominanten Kaliumkanals (z. B. des TASK-1-Kanals) könnte dann zu einer nachweisbaren Wirkung dieses Kanals führen (Coleman, Tare and Parkington, 2017; Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020).

4.2 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca}-Kanälen

Die Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX (Galvez et al., 1990) führte zu einer Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. Bei IBTX handelt es sich um einen selektiven Inhibitor des BK_{Ca}-Kanals mit einem IC₅₀-Wert von 1,7 nM (Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Um eine vollständige und gleichzeitig selektive Kanalblockade zu gewährleisten, wurde IBTX in der Konzentration 10⁻⁷ M verwendet. Somit bestätigt die vorliegende Arbeit die antikontraktile Funktion der BK_{Ca}-Kanäle in der negativen Feedbackregulation der Druck- und Agonisten-induzierten Vasokonstriktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen damit im Einklang mit bereits existierender Literatur (Brayden and Nelson, 1992; Ma et al., 2020; Nelson and Quayle, 1995; Shvetsova et al., 2019; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017).

In Anwesenheit von IBTX verstärkte AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M die Mx-induzierten Kontraktionen. Somit konnte nach Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX ein kontraktiler Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten damit eine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der Blockade von BK_{Ca}-Kanälen.

Zur Interpretation des kontraktilen Effekts von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M in Anwesenheit von IBTX ergeben sich zwei unterschiedliche Erklärungsansätze, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen nicht strikt voneinander zu trennen sind. Somit könnten diese auch gemeinsam zum beschriebenen Effekt von AVE1231 beigetragen haben.

Zum einen könnte der kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M durch eine Depolarisation des Membranpotentials infolge der Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX und eine sich daraus ergebende spannungsabhängige Aktivierung der TASK-1-Kanäle erklärt werden. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von Schewe et al. gestützt, in der eine spannungsabhängige Aktivierung des TASK-1-Kanals postuliert wurde (Schewe et al., 2016). Zum anderen könnte der kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M durch den verstärkten elektrochemischen Gradienten der Kaliumionen im Rahmen der durch IBTX induzierten Kanalblockade bedingt sein (siehe Kapitel 4.1). Die Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX führt dabei zunächst zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Dadurch entfernt sich das Membranpotential vom Gleichgewichtspotential von Kalium mit resultierender Erhöhung der treibenden Kraft der Kaliumionen über der Zellmembran. Kommt es nun zur Blockade eines Kaliumkanals mit einem geringeren Beitrag zur Gesamtmembranleitfähigkeit, so kann

es in der Folge zu einer Demaskierung bzw. Verstärkung seiner funktionellen Rolle kommen (Coleman, Tare and Parkington, 2017; Ma et al., 2020; Mondéjar-Parreño et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020). Diese beiden Prinzipien können ebenfalls zur Interpretation der anderen Versuchsreihen mit Blockade unterschiedlicher Kaliumkanäle herangezogen werden und werden in den folgenden Kapiteln zur Vermeidung unnötiger Redundanz nicht mehr detailliert ausgeführt.

Außerdem verstärkte die Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M den kontraktile Effekt von IBTX. Somit führte die Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 zu einer verstärkten funktionellen Rolle der BK_{Ca} -Kanäle. Konsekutiv konnte eine wechselseitige funktionelle Interaktion der TASK-1- und BK_{Ca} -Kanäle nachgewiesen werden.

Ein kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M nach Blockade der BK_{Ca} -Kanäle konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung kann bei Berücksichtigung des beschriebenen IC_{50} -Wertes von AVE1231 mit einer unzureichenden Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M erklärt werden.

4.3 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K_v7 -Kanälen

Die Blockade der K_v7 -Kanäle durch XE991 (Yeung and Greenwood, 2005) führte zu einer Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. Bei XE991 handelt es sich um einen selektiven Inhibitor des K_v7 -Kanals mit einer prädominanten Wirkung auf den $K_v7.4$ -Subtyp. Der IC_{50} -Wert für den $K_v7.4$ -Kanal beträgt hierbei $5,5 \mu\text{M}$ (Søgaard et al., 2001). Um eine möglichst starke Blockade bei erhaltener Selektivität zu erreichen, wurde in der vorliegenden Studie XE991 in einer Konzentration von 3×10^{-6} M verwendet (Ma et al., 2020; Shvetsova et al., 2019; Zavaritskaya et al., 2020). Somit bestätigt die vorliegende Arbeit die antikraktile Funktion der K_v7 -Kanäle in der negativen Feedbackregulation der Druck- und Agonisten-induzierten Vasokonstriktion. Dies wird durch bestehende Literatur unterstützt (Jackson, 2018; Ma et al., 2020; Shvetsova et al., 2019; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017).

In Anwesenheit von XE991 verstärkte sowohl AVE1231 in der Konzentration 10^{-7} M als auch AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen. Somit konnte nach Blockade der K_v7 -Kanäle durch XE991 ein kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten zeigten damit eine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der Blockade von K_v7 -Kanälen. Der kontraktile Effekt von AVE1231 nach Blockade der K_v7 -Kanäle war darüber hinaus in seiner Ausprägung vergleichbar mit dem Effekt von AVE1231 nach Blockade der BK_{Ca} -Kanäle. Die potentiellen funktionellen Mechanismen, die diesem Verhalten zugrundeliegen, sind bereits in Kapitel 4.2 detailliert ausgeführt und können auf diese Versuchsreihe übertragen werden.

Außerdem verstärkte die Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M den kontraktile Effekt von XE991. Somit führte die Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 zu einer verstärkten funktionellen Rolle der K_v7 -Kanäle, wodurch eine wechselseitige funktionelle Interaktion der TASK-1- und K_v7 -Kanäle nachgewiesen werden konnte.

4.4 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca}- und K_v7-Kanälen

Die gleichzeitige Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX und der K_v7-Kanäle durch XE991 führte sowohl zu einer starken Erhöhung des basalen Vasotonus als auch zu einer Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. Dabei wurden sowohl für IBTX als auch für XE991 die gleichen Konzentrationen wie in den vorher beschriebenen Versuchsreihen verwendet (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). In Bezug auf den starken kontraktile Effekt der kombinierten Kanalblockade scheint es sich nicht um einen rein additiven Effekt, sondern um eine funktionelle Interaktion bzw. wechselseitige Verstärkung zu handeln. Diese Idee wurde in kürzlich publizierten Studien ausführlich diskutiert (Coleman, Tare and Parkington, 2017; Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020).

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen konsequent die dominante funktionelle Rolle der BK_{Ca}-Kanäle und der K_v7-Kanäle in der negativen Feedbackregulation der Druck- und Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten. Diese Ergebnisse können durch bestehende Literatur bestätigt werden (Ma et al., 2020; Nelson and Quayle, 1995; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Neben myographischen Messungen unterstreichen zudem Expressionsanalysen das dominante Vorkommen der BK_{Ca}-Kanäle und der K_v7-Kanäle in der Arteria saphena von adulten Ratten (Ma et al., 2020; Shvetsova et al., 2019).

In Anwesenheit der Kombination von IBTX und XE991 führte AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M zu einer zusätzlichen Verstärkung des basalen Vasotonus. Somit konnte nach gleichzeitiger Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX und der K_v7-Kanäle durch XE991 ein kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten damit eine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der kombinierten Blockade von BK_{Ca}- und K_v7-Kanälen. Im Kontext dieser Arbeit beschränkte sich dieser Effekt allerdings auf einen Bereich niedriger Mx-Konzentrationen zwischen 10⁻⁸ M und 10⁻⁷ M, sodass eine Aussage zur Wirkung von AVE1231 über die gesamte Kontraktilität der untersuchten Gefäße nicht getroffen werden kann. Hinsichtlich seiner Stärke war der Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M bei kombinierter Kanalblockade deutlich geringer als bei isolierter Blockade der BK_{Ca}- oder K_v7-Kanäle. Dieser Umstand und der Befund, dass der Effekt auf den Bereich geringerer Mx-Konzentrationen beschränkt war, können durch das bereits submaximale Kontraktionsniveau bei gleichzeitiger Blockade der BK_{Ca}- und K_v7-Kanäle erklärt werden.

Ein kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁷ M nach gleichzeitiger Blockade der BK_{Ca}- und K_v7-Kanäle konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung kann wie bereits in den anderen Versuchsreihen durch eine unzureichende Blockade der TASK-1-Kanäle erklärt werden.

4.5 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von K_v1.5-Kanälen

Die Blockade der K_v1.5-Kanäle erfolgte durch die K_v1.5-Kanal-Inhibitoren DPO-1, Psora-4 und PAP-1. Während DPO-1 seine inhibitorische Wirkung auf K_v1.5-Kanäle im Bereich submikromolarer Konzentrationen entfaltet (Lagrutta et al., 2006), führen Psora-4 und PAP-1 bereits im nanomolaren Bereich zu einer suffizienten Kanalblockade (Schmitz et al., 2005; Vennekamp et al., 2004). Werden Psora-4 oder PAP-1 wie in der vorliegenden Arbeit in mikromolaren Konzentrationen appliziert, können sie auch unspezifische inhibitorische Effekte auf weitere exprimierte Kaliumkanalklassen ausüben (Jackson, 2018; Tykocki, Boerman and Jackson, 2017). Auf diese Effekte von Psora-4 und PAP-1 und ihren Einfluss auf den kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 wird in den Kapiteln 4.5.2 und 4.5.3 näher eingegangen.

4.5.1 Kanalblockade durch DPO-1

Die Applikation des selektiven K_v1.5-Kanal-Inhibitors DPO-1 (Lagrutta et al., 2006; Regan et al., 2006; Stump et al., 2005) führte zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. In diesem Zusammenhang bezieht sich der Begriff der konzentrationsabhängigen Verstärkung auf die aufsteigenden Konzentrationen von DPO-1 in den drei unterschiedlichen Versuchsserien. Konkret verwendeten wir DPO-1 in den Konzentrationsstufen 10⁻⁶ M, 3 x 10⁻⁶ M und 10⁻⁵ M.

DPO-1 zeigte sowohl in der niedrigsten verwendeten Konzentration von 10⁻⁶ M als auch in der mittleren Konzentration von 3 x 10⁻⁶ M keinen kontraktile Effekt auf die Mx-induzierten Kontraktionen. Berücksichtigt man den submikromolaren IC₅₀-Wert von DPO-1 (Lagrutta et al., 2006) und nimmt man konsekutiv eine fast vollständige Kanalblockade durch die von uns gewählten deutlich höheren Konzentrationen an (Shvetsova et al., 2020), dann scheinen die K_v1.5-Kanäle keine wesentliche funktionelle Rolle in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten zu spielen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit werden unterstützt durch eine kürzlich publizierte Studie von Tsvetkov et al., welche ebenfalls keinen kontraktile Effekt von DPO-1 in der Konzentration 10⁻⁶ M auf durch Phenylephrin bzw. Serotonin induzierte Kontraktionen von Mesenterialarterien sowohl der Ratte als auch der Maus nachweisen konnten. Darüber hinaus zeigten Tsvetkov et al., dass Mesenterialarterien von KCNA5-Knockout-Mäusen keine verstärkten durch Phenylephrin induzierten Kontraktionen im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Konsekutiv folgerten Tsvetkov et al., dass K_v1.5-Kanäle keinen wesentlichen Einfluss auf den mesenterialen Gefäßtonus ausüben (Tsvetkov et al., 2016). Darüber hinaus zeigten kürzlich erschienene Arbeiten von Shvetsova et al. ebenfalls keinen kontraktile Effekt von DPO-1 in der Konzentration 10⁻⁶ M auf die Arteria saphena von adulten Ratten, wodurch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Shvetsova et al., 2020; Shvetsova et al., 2019).

Im Gegensatz zu DPO-1 in den Konzentrationen 10⁻⁶ M und 3 x 10⁻⁶ M führte die Applikation von DPO-1 in der Konzentration 10⁻⁵ M zu einer Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. Diese Beobachtung wird unterstützt durch die bereits erwähnte Studie von Tsvetkov et al., welche bei Verwendung von DPO-1 in der Konzentration 10⁻⁵ M eine Erhöhung des basalen Gefäßtonus von Mesenterialarterien der Maus nachweisen konnten. Des Weiteren zeigte sich die Wirkung von DPO-1 in

der Konzentration 10^{-5} M unabhängig von einer genetischen Deletion des $K_v1.5$ -Kanals, weshalb eine unspezifische Wirkung von DPO-1 in dieser Konzentration angenommen wurde (Tsvetkov et al., 2016). Unter Einbeziehung der zitierten Literatur ergeben sich insofern zwei unterschiedliche Erklärungsansätze für die Wirkung von DPO-1 in der Konzentration 10^{-5} M. Zum einen könnte der konzentrationsabhängige kontraktile Effekt von DPO-1 in einer zunehmenden Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle begründet sein. Der von Lagrutta et al. beschriebene IC_{50} -Wert von DPO-1 für humane $K_v1.5$ -Kanäle liegt allerdings deutlich unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen. Dies widerspricht der Annahme einer konzentrationsabhängig zunehmenden Blockade im verwendeten Konzentrationsbereich (Lagrutta et al., 2006; Shvetsova et al., 2020). Zum anderen könnte der Effekt von DPO-1 insbesondere bei höheren Konzentrationen durch eine zusätzliche unspezifische Wirkung auf andere K_v -Kanäle oder alternative Signalwege erklärt werden (Tsvetkov et al., 2016). In Übereinstimmung mit der Studie von Tsvetkov et al. vermuteten auch Fancher et al. weitere unspezifische Wirkungen von DPO-1 (Fancher et al., 2015). Bei Berücksichtigung der dargelegten Literatur unterstützt die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass die Wirkung von DPO-1 in der Konzentration 10^{-5} M wahrscheinlich auf einer unspezifischen Wirkung abseits einer $K_v1.5$ -Kanalblockade beruht.

Sowohl in Anwesenheit von DPO-1 in der Konzentration 10^{-6} M als auch in Anwesenheit von DPO-1 in der Konzentration 3×10^{-6} M, den für $K_v1.5$ -Kanäle selektiven Konzentrationen, verstärkte AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen nicht. Somit konnte nach Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle durch DPO-1 kein kontraktiler Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten damit keine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen. Es kann angenommen werden, dass diese Beobachtung in der geringen Rolle für die Gesamtmembranleitfähigkeit bzw. der geringen funktionellen Rolle der $K_v1.5$ -Kanäle im untersuchten Gefäß begründet ist. Daraus abgeleitet würde die Blockade der $K_v1.5$ -Kanäle nur einen geringen Einfluss auf das Membranpotential und den elektrochemischen Gradienten nehmen und konsekutiv die funktionelle Rolle der TASK-1-Kanäle nicht demaskieren. Darüber hinaus unterstützt der fehlende kontraktile Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M in Anwesenheit von DPO-1, in den für $K_v1.5$ -Kanäle selektiven Konzentrationen, die geringe funktionelle Rolle der $K_v1.5$ -Kanäle in den untersuchten Gefäßen.

In Anwesenheit von DPO-1 in der Konzentration 10^{-5} M verstärkte AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen. Somit konnte nach Kanalblockade durch DPO-1 ein kontraktiler Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung liegt wahrscheinlich in einer zusätzlichen unselektiven Kanalblockade durch DPO-1 in der Konzentration 10^{-5} M begründet.

Daneben konnte in Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M ein kontraktiler Effekt von DPO-1 in den Konzentrationen 10^{-6} M und 3×10^{-6} M beobachtet werden. Somit konnte nach Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 ein kontraktiler Effekt von DPO-1 in den genannten Konzentrationen demaskiert werden.

4.5.2 Kanalblockade durch Psora-4

In einem zweiten Versuchsansatz wurde der K_v1 -Kanal-Inhibitor Psora-4 verwendet. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Psoralenderivat mit einer hochselektiven Wirkung auf $K_v1.3$ - und $K_v1.5$ -Kanäle. Die mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50}) betragen 3 nM für den $K_v1.3$ -Kanal und 7,7 nM für den $K_v1.5$ -Kanal, sodass bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten mikromolaren Konzentrationen eine vollständige Blockade dieser Kanäle angenommen werden kann. Darüber hinaus inhibiert Psora-4 auch andere K_v1 -Kanäle, wie beispielsweise den $K_v1.2$ -Kanal ($EC_{50} = 49$ nM), und weist bei der Verwendung mikromolarer Konzentrationen weitere unspezifische Wirkungen auf andere Kaliumkanalklassen auf (Tykocki, Boerman and Jackson, 2017; Vennekamp et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit verstärkte sowohl Psora-4 in der Konzentration 10^{-6} M als auch Psora-4 in der Konzentration 3×10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen. Unter Einbeziehung der vorhandenen Literatur und der Daten anderer Forschungsprojekte aus unserer Arbeitsgruppe ergeben sich mehrere mögliche Erklärungsansätze. Gemäß den pharmakologischen Eigenschaften von Psora-4 könnte der beobachtete kontraktile Effekt neben der Inhibition der $K_v1.5$ -Kanäle auch auf einer zusätzlichen Blockade der $K_v1.3$ -Kanäle beruhen. Expressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass in der Arteria saphena der Ratte K_v1 -Kanäle, mit Ausnahme des $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Subtyps, nur ein sehr geringes Vorkommen zeigen. Im Kontext der vorliegenden Arbeit erscheint deshalb eine Wirkung von Psora-4 auf $K_v1.3$ -Kanäle unwahrscheinlich. Darüber hinaus könnte der kontraktile Effekt von Psora-4 auf einer verstärkten Blockade von $K_v1.5$ -Kanälen beruhen. Diese Hypothese steht jedoch in einem Widerspruch zu den Befunden der DPO-1-Versuchsreihe und zur Evidenz der bestehenden Literatur (Lagrutta et al., 2006; Shvetsova et al., 2020; Shvetsova et al., 2019). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung von Psora-4 auf einer zusätzlichen Blockade von $K_v1.2$ -Kanälen beruht. Diese zeigten in den erwähnten Expressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe eine vergleichbar starke Expression wie $K_v1.5$ -Kanäle und werden durch Psora-4 in den verwendeten mikromolaren Konzentration effektiv inhibiert (Vennekamp et al., 2004). Darüber hinaus ist auch eine unspezifische Blockade weiterer Kaliumkanäle (z. B. des $K_v2.1$ -Kanals) denkbar (Vennekamp et al., 2004).

In Anwesenheit von Psora-4, unabhängig von der verwendeten Konzentration, verstärkte AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen nicht. Somit konnte nach Kanalblockade durch Psora-4 kein kontraktiler Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten damit keine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung einer Kanalblockade durch Psora-4. Es kann angenommen werden, dass diese Beobachtung durch die geringe Rolle für die Gesamtmembranleitfähigkeit bzw. die geringe funktionelle Rolle der durch Psora-4 (teil)blockierten Kanäle bedingt ist. Diese Schlussfolgerung wird durch das pharmakologische Wirkprofil von Psora-4 und von entsprechenden EC_{50} -Werten in der vorhandenen Literatur unterstützt (Vennekamp et al., 2004).

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so konnte weder durch die Applikation von DPO-1, in den für $K_v1.5$ -Kanäle selektiven Konzentrationen, noch

durch die Verwendung von Psora-4 eine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals demaskiert werden. Es kann angenommen werden, dass dies in der geringen Rolle für die Gesamtmembranleitfähigkeit bzw. in der geringen funktionellen Rolle der blockierten Kanäle begründet ist.

4.5.3 Kanalblockade durch PAP-1

Neben den Kanal-Inhibitoren DPO-1 und Psora-4 wurde in einem letzten Versuchsansatz das Psoralenderivat PAP-1 verwendet. Dabei handelt es sich um einen synthetisch hergestellten selektiven K_v1 -Kanal-Inhibitor, dessen molekulare Basis die Substanz Psora-4 darstellt. In Bezug auf K_v1 -Kanäle zeigt dieses Psoralenderivat eine hochgradige Selektivität für den $K_v1.3$ -Kanal mit einem EC_{50} -Wert von 2 nM. Im Vergleich dazu beträgt der EC_{50} -Wert für den $K_v1.5$ -Kanal lediglich 45 nM und für den $K_v1.2$ -Kanal 250 nM. Im Bereich mikromolarer Konzentrationen verliert PAP-1 allerdings zunehmend seine Selektivität für K_v1 -Kanäle und inhibiert dann auch andere spannungsabhängige Kaliumkanäle (z. B. $K_v2.1$). Daneben zeigt PAP-1 auch eine inhibitorische Wirkung auf BK_{Ca} -Kanäle mit einem EC_{50} -Wert von circa 2,5 μ M (Schmitz et al., 2005).

In der vorliegenden Studie verstärkte sowohl PAP-1 in der Konzentration 10^{-6} M als auch PAP-1 in der Konzentration 3×10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen. Unter der Annahme, dass K_v1 -Kanäle mit Ausnahme des $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Subtyps in der Arteria saphena der Ratte kaum exprimiert sind und $K_v1.5$ -Kanäle keine wesentliche Rolle in der Regulation des Vasotonus dieser Gefäße spielen, ergeben sich die im Folgenden genannten Erklärungsansätze bezüglich des kontraktileffekts von PAP-1.

Die Wirkung von PAP-1 in den Konzentrationen 10^{-6} M und 3×10^{-6} M kann neben der Blockade der $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Kanäle am ehesten durch eine Inhibition weiterer Kaliumkanäle bei mikromolaren Konzentrationen von PAP-1 erklärt werden. Insbesondere eine zusätzliche (Teil-)Blockade der $K_v2.1$ - ($EC_{50} = 3 \mu$ M) und der BK_{Ca} -Kanäle ($EC_{50} = 2,5 \mu$ M) könnte zu diesem Effekt beigetragen haben. Darüber hinaus könnte die erschwerte Lösung von PAP-1 aus seiner Kanalbindung bei repetitiver Applikation in unseren Versuchsprotokollen diesen Effekt mitbedingt haben (Schmitz et al., 2005).

Sowohl in Anwesenheit von PAP-1 in der Konzentration 10^{-6} M als auch in Anwesenheit von PAP-1 in der Konzentration 3×10^{-6} M verstärkte AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M die Mx-induzierten Kontraktionen. Konsekutiv konnte nach Kanalblockade durch PAP-1 ein kontraktileffekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte dies bei Anwesenheit der strukturell verwandten Substanz Psora-4, unabhängig von der verwendeten Konzentration, nicht festgestellt werden (siehe Kapitel 4.5.2). Diese Beobachtung ist möglicherweise durch eine funktionelle Interaktion der beteiligten Kaliumkanäle bedingt. Da PAP-1 ($EC_{50} = 2,5 \mu$ M) bereits in geringeren Konzentrationen zu einer Inhibition der BK_{Ca} -Kanäle führen kann als Psora-4 ($EC_{50} = 5 \mu$ M), könnte der beobachtete kontraktileffekt von AVE1231 in Anwesenheit von PAP-1 unter anderem durch eine PAP-1 bedingte (Teil-)Blockade der BK_{Ca} -Kanäle erklärt werden. Zudem ist für PAP-1 ein EC_{50} -Wert von 3 μ M für den $K_v2.1$ -Kanal dokumentiert, wodurch der kontraktileffekt von AVE1231 bei Anwesenheit von PAP-1 mitbedingt sein könnte. In diesem Zusammenhang wäre die Blockade der BK_{Ca} - und $K_v2.1$ -Kanäle durch PAP-1

jedoch nur unvollständig. Diese Annahme wird durch die EC_{50} -Werte (Schmitz et al., 2005) und die Ergebnisse der folgenden Versuchsreihe (siehe Kapitel 4.6) unterstützt.

Bei Betrachtung der Versuchsserie des anschließenden Kapitels (4.6) zeigte sich nach der anzunehmenden vollständigen Blockade der BK_{Ca} -, $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanäle durch IBTX, STX und DPO-1 ein deutlich höheres Kontraktionsniveau als bei der isolierten Applikation von PAP-1, weshalb eine komplette Blockade der $K_v2.1$ - und BK_{Ca} -Kanäle durch PAP-1 als unwahrscheinlich erscheint.

Da durch die mikromolare Applikation sowohl von PAP-1 als auch von Psora-4 eine suffiziente Kanalblockade der $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Kanäle angenommen werden kann und die Kanalblockade durch Psora-4 keinen kontraktile Effekt von AVE1231 induzierte, liegt die Vermutung nahe, dass die kombinierte Blockade der $K_v1.2$ - und $K_v1.5$ -Kanäle nicht ausreichend ist um einen kontraktile Effekt von AVE1231 hervorzurufen bzw. die funktionelle Rolle der TASK-1-Kanäle zu demaskieren.

Außerdem verstärkte die Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M den kontraktile Effekt von PAP-1. Somit führte die Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 zu einer verstärkten funktionellen Rolle der durch PAP-1 blockierten Kanäle. Konsekutiv konnte also eine wechselseitige funktionelle Interaktion der TASK-1-Kanäle und der durch PAP-1 blockierten Kanäle nachgewiesen werden.

4.6 Die funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals nach Blockade von BK_{Ca} -, $K_v2.1$ - und $K_v1.5$ -Kanälen

Die gleichzeitige Blockade der BK_{Ca} -Kanäle durch IBTX, der $K_v2.1$ -Kanäle durch STX (Escoubas et al., 2002) und der $K_v1.5$ -Kanäle durch DPO-1 führte sowohl zu einer starken Erhöhung des basalen Vasotonus als auch zu einer Verstärkung der Mx-induzierten Kontraktionen. Um eine möglichst vollständige und gleichzeitig selektive Kanalblockade zu gewährleisten, wurden IBTX in der Konzentration 10^{-7} M, STX in der Konzentration 10^{-7} M und DPO-1 in der Konzentration 10^{-6} M verwendet. In Bezug auf den $K_v2.1$ -Kanal verfügt STX über einen IC_{50} -Wert von 12,7 nM (Escoubas et al., 2002), sodass in der vorliegenden Arbeit eine suffiziente Kanalblockade durch STX angenommen werden kann. Die inhibitorischen Charakteristika von IBTX und DPO-1 sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben (siehe Kapitel 4.2 und 4.5.1).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Einfluss der kombinierten Kanalblockade auf den basalen Vasotonus und die Mx-induzierten Kontraktionen kann durch ein funktionelles Zusammenspiel (Ma et al., 2020; Zavaritskaya et al., 2020) zwischen den beteiligten Ionenkanälen erklärt werden (siehe Kapitel 4.4). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die isolierte Blockade der BK_{Ca} -Kanäle durch IBTX (10^{-7} M) nur einen geringen (siehe Kapitel 4.2) und die isolierte Blockade der $K_v2.1$ -Kanäle durch STX (10^{-7} M) und der $K_v1.5$ -Kanäle durch DPO-1 (10^{-6} M) keinen Einfluss (Shvetsova et al., 2019) auf die Mx-induzierten Kontraktionen der Arteria saphena von adulten Ratten hatte.

In Anwesenheit der Kombination von IBTX, STX und DPO-1 führte AVE1231 in der Konzentration 10^{-6} M zu einer zusätzlichen Verstärkung des basalen Vasotonus. Bei einer gleichzeitigen Blockade der BK_{Ca} -Kanäle durch IBTX, der $K_v2.1$ -Kanäle durch STX und der $K_v1.5$ -Kanäle durch DPO-1 konnte daher ein kontraktile Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden

Arbeit erhobenen Daten zeigten damit eine funktionelle Rolle des TASK-1-Kanals in der negativen Feedbackregulation der Agonisten-induzierten Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der kombinierten Blockade von BK_{Ca}-, K_v2.1- und K_v1.5-Kanälen. Hinsichtlich seiner Stärke entsprach der Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M in dieser Versuchsreihe circa dem Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M bei isolierter Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX oder isolierter Blockade der K_v7-Kanäle durch XE991.

Des Weiteren verstärkte die Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M den kontraktilen Effekt der kombinierten Kanalblockade. Somit führte die Blockade der TASK-1-Kanäle durch AVE1231 zu einer verstärkten funktionellen Rolle der durch IBTX, STX und DPO-1 blockierten Kanäle. Konsekutiv konnte auch eine wechselseitige funktionelle Interaktion zwischen den in dieser Versuchsreihe untersuchten Kanälen nachgewiesen werden.

Ein kontraktiler Effekt von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁷ M nach gleichzeitiger Blockade der BK_{Ca}-, K_v2.1- und K_v1.5-Kanäle konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den vorherigen Versuchsreihen und verweist auf eine konzentrationsabhängige Wirkung von AVE1231.

4.7 Schlussfolgerung

Bei funktioneller Verfügbarkeit aller Kaliumkanäle zeigte AVE1231 sowohl in der Konzentration 10⁻⁷ M als auch in der Konzentration 10⁻⁶ M keinen prokontraktilen Effekt auf Mx-induzierte Kontraktionen von isolierten Gefäßsegmenten der Arteria saphena adulter Ratten. Diese Aussage bezieht sich im Kontext der vorliegenden Arbeit auf den kompletten Kontraktilitätsbereich von basaler bis maximaler Kontraktilität der untersuchten Gefäße.

Die systematische Blockade weiterer Kaliumkanäle induzierte in Abhängigkeit von der jeweiligen spezifischen Kanalblockade einen unterschiedlich stark ausgeprägten kontraktilen Effekt des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231. Dieser Effekt zeigte sich allerdings nicht in allen Versuchsserien. Dies stützt die Annahme, dass der Effekt von AVE1231 von der Beteiligung an der Gesamtmembranleitfähigkeit bzw. von der funktionellen Rolle der zusätzlich blockierten Kanäle abhängt. So bewirkte die Blockade der BK_{Ca}-Kanäle durch IBTX oder die Blockade der K_v7-Kanäle durch XE991 einen starken kontraktilen Effekt von AVE1231, während beispielsweise die Blockade der K_v1.5-Kanäle durch DPO-1, in den für K_v1.5-Kanäle selektiven Konzentrationen, keine Wirkung von AVE1231 induzierte.

Zudem verstärkte die Anwesenheit von AVE1231 in der Konzentration 10⁻⁶ M bei den meisten Versuchsreihen den kontraktilen Effekt der anderen Kanal-Inhibitoren. Somit konnte eine wechselseitige Interaktion des TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 mit den anderen applizierten Blockersubstanzen nachgewiesen werden.

Es ist also gelungen, die funktionelle Rolle der TASK-1-Kanäle in Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Ratten unter der Bedingung der Blockade von dominant wirkenden Kaliumkanälen zu demaskieren, wodurch die angenommene Hypothese somit bestätigt werden konnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die zentrale Funktion des Herzkreislaufsystems besteht in der Versorgung des Organismus mit Nährstoffen und Sauerstoff und im Abtransport von anfallendem Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselendprodukten. Durch die Regulation ihres Kontraktionszustands bewirken arterielle Widerstandsgefäße eine Anpassung der regionalen Durchblutung und stellen dadurch eine bedarfsgerechte Versorgung der durch sie perfundierten Endorgane sicher. Die Kontraktilität der beschriebenen Gefäße resultiert wiederum aus dem aktuell bestehenden Membranpotential, welches wesentlich vom Aktivitätszustand der exprimierten Kaliumkanalklassen abhängt. Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle bilden eine neuartige Kanalklasse mit einem nahezu ubiquitären Expressionsmuster und vielfältigen Regulationsmechanismen. Die Leitfähigkeit der Subgruppe der TASK-1-Kanäle wird dabei vor allem durch den extrazellulären pH-Wert und Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks beeinflusst, weshalb eine Involvierung in zahlreiche pathophysiologische Prozesse vermutet wird. Während zahlreiche wissenschaftliche Evidenz hinsichtlich der TASK-1-Kanäle und dem pulmonalen Kreislauf existiert, bleibt ihre funktionelle Rolle in der systemischen Zirkulation noch weitgehend unklar. In einer vorangegangenen Studie bewirkte die Applikation des spezifischen TASK-1-Kanal-Inhibitors AVE1231 einen prokontraktilen Effekt auf isolierte Gefäßsegmente der Arteria saphena von 10 bis 15 Tage alten Ratten. Adulte Ratten zeigten dagegen verminderte beziehungsweise ausbleibende Reaktionen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Kaliumkanäle funktionell interagieren und sich in ihrer Aktivität wechselseitig beeinflussen können, sodass ein dominant wirkender Kaliumkanal die Aktivität eines anderen Kaliumkanals maskieren könnte. Deshalb bleibt unklar, ob TASK-1-Kanäle gar keine funktionelle Rolle in der Regulation des Gefäßtonus der Arteria saphena von adulten Ratten einnehmen oder ob ihre Funktion lediglich durch die Aktivität anderer Kaliumkanäle maskiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese durch myographische Messungen der Methoxamin-induzierten Kontraktionen von Gefäßsegmenten der Arteria saphena von adulten Wistar-Kyoto Ratten untersucht. Im Rahmen dieser Messungen erfolgte stets die Blockade der TASK-1-Kanäle durch die spezifische Blockersubstanz AVE1231. In Abhängigkeit von der durchgeführten Versuchsserie erfolgte dann zusätzlich die Blockade weiterer einzelner Kaliumkanäle beziehungsweise eine kombinierte Kanalblockade. Dabei demaskierte sich abhängig von der zusätzlich erwirkten Kanalblockade ein unterschiedlich stark ausgeprägter kontraktiler Effekt von AVE1231. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Beobachtung auf die unterschiedlichen Beiträge zur Gesamtmembranleitfähigkeit der zusätzlich blockierten Kanäle zurückzuführen ist. So führte etwa die zusätzliche Blockade von Kanälen mit einem höheren Beitrag zur Gesamtmembranleitfähigkeit, wie zum Beispiel der BK_{Ca} -Kanäle oder der K_v7 -Kanäle, zu einem starken kontraktilen Effekt von AVE1231, während die zusätzliche Blockade von Kanälen mit einem geringeren Beitrag zur Gesamtmembranleitfähigkeit, wie zum Beispiel der $K_v1.5$ -Kanäle, keine wesentliche Wirkung induzierte. Zusammenfassend konnte also die Hypothese bestätigt werden, dass TASK-1-Kanäle in Abhängigkeit von der Blockade weiterer exprimierter Kaliumkanäle eine funktionelle Rolle in der Regulation des Gefäßtonus der Arteria saphena von adulten Ratten einnehmen und ihre Funktion ohne die Blockade weiterer Kaliumkanäle somit lediglich maskiert wird.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Antigny, F., Hautefort, A., Meloche, J., Belacel-Ouari, M., Manoury, B., Rucker-Martin, C., Péchoux, C., Potus, F., Nadeau, V., Tremblay, E., *et al.* (2016). Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 133, 1371-1385. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.115.020951>

Barel, O., Shalev, S.A., Ofir, R., Cohen, A., Zlotogora, J., Shorer, Z., Mazor, G., Finer, G., Khateeb, S., Zilberberg, N. und Birk, O.S. (2008). Maternally inherited Birk Barel mental retardation dysmorphism syndrome caused by a mutation in the genomically imprinted potassium channel KCNK9. *Am J Hum Genet* 83, 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.07.010>

Bayliss, D.A. und Barrett, P.Q. (2008). Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* 29, 566-575. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.013>

Blin, S., Chatelain, F.C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F. und Bichet, D. (2014). Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel subunits THIK1 and THIK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* 289, 28202-28212. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.600437>

Boucherat, O., Chabot, S., Antigny, F., Perros, F., Provencher, S. und Bonnet, S. (2015). Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 46, 1167-1177. <https://doi.org/10.1183/13993003.00798-2015>

Brayden, J.E. und Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256, 532-535. <https://doi.org/10.1126/science.1373909>

Brenner, T. und O'Shaughnessy, K.M. (2008). Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1480-1486. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90652.2008>

Brohawn, S.G., del Marmol, J. und MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 335, 436-441. <https://doi.org/10.1126/science.1213808>

Brozovich, F.V., Nicholson, C.J., Degen, C.V., Gao, Y.Z., Aggarwal, M. und Morgan, K.G. (2016). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev* 68, 476-532. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010652>

Buckler, K.J. (2015). TASK channels in arterial chemoreceptors and their role in oxygen and acid sensing. *Pflügers Arch* 467, 1013-1025. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1689-1>

Buckler, K.J., Williams, B.A. und Honore, E. (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 525 Pt 1, 135-142. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00135.x>

Chen, A.X., Nishimoto, K., Nanba, K. und Rainey, W.E. (2015). Potassium channels related to primary aldosteronism: Expression similarities and differences between human and rat adrenals. *Mol Cell Endocrinol* 417, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.011>

Coleman, H.A., Tare, M. und Parkington, H.C. (2017). Nonlinear effects of potassium channel blockers on endothelium-dependent hyperpolarization. *Acta Physiol (Oxf)* 219, 324-334. <https://doi.org/10.1111/apha.12805>

Cooper, B.Y., Johnson, R.D. und Rau, K.K. (2004). Characterization and function of TWIK-related acid sensing K⁺ channels in a rat nociceptive cell. *Neuroscience* 129, 209-224. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.066>

Cotten, J.F. (2013). TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) tandem pore potassium channel antagonists stimulate breathing in isoflurane-anesthetized rats. *Anesth Analg* 116, 810-816. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318284469d>

Cotten, J.F., Keshavaprasad, B., Laster, M.J., Eger, E.I., 2nd und Yost, C.S. (2006). The ventilatory stimulant doxapram inhibits TASK tandem pore (K₂P) potassium channel function but does not affect minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 102, 779-785. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000194289.34345.63>

Cunningham, K.P., Holden, R.G., Escibano-Subias, P.M., Cogolludo, A., Veale, E.L. und Mathie, A. (2019). Characterization and regulation of wild-type and mutant TASK-1 two pore domain potassium channels indicated in pulmonary arterial hypertension. *J Physiol* 597, 1087-1101. <https://doi.org/10.1113/jp277275>

Czirják, G. und Enyedi, P. (2002). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277, 5426-5432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107138200>

Czirják, G. und Enyedi, P. (2003). Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol Pharmacol* 63, 646-652. <https://doi.org/10.1124/mol.63.3.646>

Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F. und Enyedi, P. (2000). TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol* 14, 863-874. <https://doi.org/10.1210/mend.14.6.0466>

Dadi, P.K., Luo, B., Vierra, N.C. und Jacobson, D.A. (2015). TASK-1 Potassium Channels Limit Pancreatic α -Cell Calcium Influx and Glucagon Secretion. *Mol Endocrinol* 29, 777-787. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1321>

Davies, L.A., Hu, C., Guagliardo, N.A., Sen, N., Chen, X., Talley, E.M., Carey, R.M., Bayliss, D.A. und Barrett, P.Q. (2008). TASK channel deletion in mice causes primary

hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2203-2208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712000105>

Decher, N., Rinné, S., Bedoya, M., Gonzalez, W. und Kiper, A.K. (2021). Molecular Pharmacology of K(2P) Potassium Channels. *Cell Physiol Biochem* 55, 87-107. <https://doi.org/10.33594/000000339>

Dedman, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H., Duprat, F., Patel, A. und Honoré, E. (2009). The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *Eur Biophys J* 38, 293-303. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0318-8>

Dogan, M.F., Yildiz, O., Arslan, S.O. und Ulusoy, K.G. (2019). Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundam Clin Pharmacol* 33, 504-523. <https://doi.org/10.1111/fcp.12461>

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>

Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C. und Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *Embo j* 16, 5464-5471. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5464>

Enyeart, J.J. und Enyeart, J.A. (2021). Human adrenal glomerulosa cells express K2P and GIRK potassium channels that are inhibited by ANG II and ACTH. *Am J Physiol Cell Physiol* 321, C158-c175. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00118.2021>

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

Fancher, I.S., Butcher, J.T., Brooks, S.D., Rottgen, T.S., Skaff, P.R., Frisbee, J.C. und Dick, G.M. (2015). Diphenyl phosphine oxide-1-sensitive K(+) channels contribute to the vascular tone and reactivity of resistance arteries from brain and skeletal muscle. *Microcirculation* 22, 315-325. <https://doi.org/10.1111/micc.12201>

Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bichet, D. und Lesage, F. (2015). The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* 593, 2587-2603. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287268>

Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C. und Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *Embo j* 15, 6854-6862.

Fisher, S.A. (2010). Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics* 42a, 169-187. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00111.2010>

Galiè, N., Humbert, M., Vachieri, J.L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., *et al.* (2015). 2015 ESC/ERS

Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J* 46, 903-975. <https://doi.org/10.1183/13993003.01032-2015>

Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J. und Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265, 11083-11090.

Gardener, M.J., Johnson, I.T., Burnham, M.P., Edwards, G., Heagerty, A.M. und Weston, A.H. (2004). Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 142, 192-202. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705691>

Ghofrani, H.A., Humbert, M., Langleben, D., Schermuly, R., Stasch, J.P., Wilkins, M.R. und Klinger, J.R. (2017). Riociguat: Mode of Action and Clinical Development in Pulmonary Hypertension. *Chest* 151, 468-480. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.05.024>

Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R.P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W.P. und Stewart, D.J. (1993). Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328, 1732-1739. <https://doi.org/10.1056/nejm199306173282402>

Gierten, J., Ficker, E., Bloehs, R., Schweizer, P.A., Zitron, E., Scholz, E., Karle, C., Katus, H.A. und Thomas, D. (2010). The human cardiac K2P3.1 (TASK-1) potassium leak channel is a molecular target for the class III antiarrhythmic drug amiodarone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 381, 261-270. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0454-4>

Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M. und Lesage, F. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 249-256. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4562>

Girerd, B., Perros, F., Antigny, F., Humbert, M. und Montani, D. (2014). KCNK3: new gene target for pulmonary hypertension? *Expert Rev Respir Med* 8, 385-387. <https://doi.org/10.1586/17476348.2014.909731>

Goldstein, S.A., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D. und Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 527-540. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.12>

Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. und Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2, 175-184. <https://doi.org/10.1038/35058574>

Gurges, P., Liu, H. und Horner, R.L. (2021). Modulation of TASK-1/3 channels at the hypoglossal motoneuron pool and effects on tongue motor output and responses to excitatory inputs in vivo: implications for strategies for obstructive sleep apnea pharmacotherapy. *Sleep* 44. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsaa144>

Gurney, A. und Manoury, B. (2009). Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J* 38, 305-318. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0326-8>

Gurney, A.M., Osipenko, O.N., MacMillan, D., McFarlane, K.M., Tate, R.J. und Kempson, F.E. (2003). Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 93, 957-964. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000099883.68414.61>

Guyton, A.C. (1981). The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation* 64, 1079-1088. <https://doi.org/10.1161/01.cir.64.6.1079>

Hafen, B.B. und Burns, B. (2021). Physiology, Smooth Muscle. In StatPearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.).

Hafen, B.B., Shook, M. und Burns, B. (2021). Anatomy, Smooth Muscle. In StatPearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.).

Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., *et al.* (2008). Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *Embo j* 27, 179-187. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601934>

Hill, N.S., Cawley, M.J. und Heggen-Peay, C.L. (2016). New Therapeutic Paradigms and Guidelines in the Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Manag Care Spec Pharm* 22, S3-21. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2016.22.3-a.s3>

Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J.J., Blomström-Lundqvist, C., Boriani, G., Castella, M., Dan, G.A., Dilaveris, P.E., *et al.* (2021). 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J* 42, 373-498. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa612>

Hirst, G.D. und Edwards, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69, 546-604. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.2.546>

Howard, R.B., Hosokawa, T. und Maguire, M.H. (1987). Hypoxia-induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1261-1266. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(87\)80307-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(87)80307-1)

Hristov, K.L., Chen, M., Soder, R.P., Parajuli, S.P., Cheng, Q., Kellett, W.F. und Petkov, G.V. (2012). KV2.1 and electrically silent KV channel subunits control excitability and contractility of guinea pig detrusor smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C360-372. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2010>

Inglis, S.K., Brown, S.G., Constable, M.J., McTavish, N., Olver, R.E. und Wilson, S.M. (2007). A Ba²⁺-resistant, acid-sensitive K⁺ conductance in Na⁺-absorbing H441 human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1304-1312. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00424.2006>

Jackson, W.F. (2018). K(V) channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* 25. <https://doi.org/10.1111/micc.12421>

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. und Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695. <https://doi.org/10.1038/376690a0>

Khalil, R., Lodge, N., Saida, K. und van Breemen, C. (1987). Mechanism of calcium activation in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl* 5, S5-15. <https://doi.org/10.1097/00004872-198712004-00003>

Kidd, M.W., Bulley, S. und Jaggar, J.H. (2017). Angiotensin II reduces the surface abundance of K(V) 1.5 channels in arterial myocytes to stimulate vasoconstriction. *J Physiol* 595, 1607-1618. <https://doi.org/10.1113/jp272893>

Kim, D., Cavanaugh, E.J., Kim, I. und Carroll, J.L. (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 587, 2963-2975. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171181>

Kim, D. und Gnatenco, C. (2001). TASK-5, a new member of the tandem-pore K(+) channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 923-930. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5064>

Kim, Y., Bang, H. und Kim, D. (1999). TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J Physiol* 277, H1669-1678. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1669>

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

Kiyoshi, H., Yamazaki, D., Ohya, S., Kitsukawa, M., Muraki, K., Saito, S.Y., Ohizumi, Y. und Imaizumi, Y. (2006). Molecular and electrophysiological characteristics of K⁺ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2723-2734. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00894.2005>

Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D. und Park, W.S. (2008). Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44, 65-81. <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.65>

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

Lambert, M., Boet, A., Rucker-Martin, C., Mendes-Ferreira, P., Capuano, V., Hatem, S., Adão, R., Brás-Silva, C., Hautefort, A., Michel, J.B., *et al.* (2018). Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 114, 880-893. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy016>

Lambert, M., Capuano, V., Boet, A., Tesson, L., Bertero, T., Nakhleh, M.K., Remy, S., Aneon, I., Pechoux, C., Hautefort, A., *et al.* (2019). Characterization of Kcnk3-Mutated Rat, a Novel Model of Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 125, 678-695. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.314793>

Le Ribeuz, H., Capuano, V., Girerd, B., Humbert, M., Montani, D. und Antigny, F. (2020). Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10091261>

Lei, Q., Pan, X.Q., Chang, S., Malkowicz, S.B., Guzzo, T.J. und Malykhina, A.P. (2014). Response of the human detrusor to stretch is regulated by TREK-1, a two-pore-domain (K2P) mechano-gated potassium channel. *J Physiol* 592, 3013-3030. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271718>

Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44, 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00339-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00339-8)

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J. (1996a). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo j* 15, 1004-1011.

Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F793-801. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.5.F793>

Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E. und Lazdunski, M. (1996b). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *Embo j* 15, 6400-6407.

Lewis, A., Hartness, M.E., Chapman, C.G., Fearon, I.M., Meadows, H.J., Peers, C. und Kemp, P.J. (2001). Recombinant hTASK1 is an O₂-sensitive K⁽⁺⁾ channel. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1290-1294. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5310>

Liang, B., Soka, M., Christensen, A.H., Olesen, M.S., Larsen, A.P., Knop, F.K., Wang, F., Nielsen, J.B., Andersen, M.N., Humphreys, D., *et al.* (2014). Genetic variation in the two-pore domain potassium channel, TASK-1, may contribute to an atrial substrate for arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 67, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.014>

Limberg, S.H., Netter, M.F., Rolfes, C., Rinné, S., Schlichthörl, G., Zuzarte, M., Vassiliou, T., Moosdorf, R., Wulf, H., Daut, J., *et al.* (2011). TASK-1 channels may modulate action potential duration of human atrial cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 28, 613-624. <https://doi.org/10.1159/000335757>

Liu, W. und Saint, D.A. (2004). Heterogeneous expression of tandem-pore K⁺ channel genes in adult and embryonic rat heart quantified by real-time polymerase chain reaction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 174-178. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.03964.x>

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

Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E.D., Eyries, M., Sampson, K.S., Soubrier, F., Germain, M., Trégouët, D.A., Borczuk, A., Rosenzweig, E.B., *et al.* (2013). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369, 351-361. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211097>

Maingret, F., Patel, A.J., Lazdunski, M. und Honoré, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁽⁺⁾ channel TASK-1. *Embo j* 20, 47-54. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.47>

Manichaikul, A., Rich, S.S., Allison, M.A., Guagliardo, N.A., Bayliss, D.A., Carey, R.M. und Barrett, P.Q. (2016). KCNK3 Variants Are Associated With Hyperaldosteronism and Hypertension. *Hypertension* 68, 356-364. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.116.07564>

Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., *et al.* (2010). Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol* 8, e1000355. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000355>

Miller, A.N. und Long, S.B. (2012). Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* 335, 432-436. <https://doi.org/10.1126/science.1213274>

Mondéjar-Parreño, G., Barreira, B., Callejo, M., Morales-Cano, D., Barrese, V., Esquivel-Ruiz, S., Olivencia, M.A., Macías, M., Moreno, L., Greenwood, I.A., *et al.* (2020). Uncovered Contribution of Kv7 Channels to Pulmonary Vascular Tone in Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* 76, 1134-1146. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.120.15221>

Morrell, N.W., Aldred, M.A., Chung, W.K., Elliott, C.G., Nichols, W.C., Soubrier, F., Trembath, R.C. und Loyd, J.E. (2019). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 53. <https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018>

Morton, M.J., O'Connell, A.D., Sivaprasadarao, A. und Hunter, M. (2003). Determinants of pH sensing in the two-pore domain K(+) channels TASK-1 and -2. *Pflugers Arch* 445, 577-583. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0901-2>

Mu, D., Chen, L., Zhang, X., See, L.H., Koch, C.M., Yen, C., Tong, J.J., Spiegel, L., Nguyen, K.C., Servoss, A., *et al.* (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 3, 297-302. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00054-0)

Mulvany, M.J. und Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41, 19-26. <https://doi.org/10.1161/01.res.41.1.19>

Musset, B., Meuth, S.G., Liu, G.X., Derst, C., Wegner, S., Pape, H.C., Budde, T., Preisig-Müller, R. und Daut, J. (2006). Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol* 572, 639-657. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.106898>

Nattie, E. (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59, 299-331. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00008-8)

Navas, P., Tenorio, J., Quezada, C.A., Barrios, E., Gordo, G., Arias, P., López Meseguer, M., Santos-Lozano, A., Palomino Doza, J., Lapunzina, P. und Escribano Subías, P. (2016). Molecular Analysis of BMPR2, TBX4, and KCNK3 and Genotype-Phenotype Correlations in Spanish Patients and Families With Idiopathic and Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69, 1011-1019. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2016.03.029>

Navas Tejedor, P., Tenorio Castaño, J., Palomino Doza, J., Arias Lajara, P., Gordo Trujillo, G., López Meseguer, M., Román Broto, A., Lapunzina Abadía, P. und Escribano Subía, P. (2017). An homozygous mutation in KCNK3 is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. *Clin Genet* 91, 453-457. <https://doi.org/10.1111/cge.12869>

Nelson, M.T. und Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>

Nilsson, H. (1998). Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164, 559-566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00435.x>

Nogueira, E.F., Gerry, D., Mantero, F., Mariniello, B. und Rainey, W.E. (2010). The role of TASK1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73, 22-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03738.x>

O'Donohoe, P.B., Huskens, N., Turner, P.J., Pandit, J.J. und Buckler, K.J. (2018). A1899, PK-THPP, ML365, and Doxapram inhibit endogenous TASK channels and excite calcium signaling in carotid body type-1 cells. *Physiol Rep* 6, e13876. <https://doi.org/10.14814/phy2.13876>

- Ogut, O. und Brozovich, F.V. (2003). Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 35, 347-355. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00045-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00045-2)
- Olschewski, A., Li, Y., Tang, B., Hanze, J., Eul, B., Bohle, R.M., Wilhelm, J., Morty, R.E., Brau, M.E., Weir, E.K., *et al.* (2006). Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98, 1072-1080. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9>
- Olschewski, A., Veale, E.L., Nagy, B.M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Czirjak, G., Enyedi, P. und Mathie, A. (2017). TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur Respir J* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.00754-2017>
- Patel, A.J. und Honoré, E. (2001). Anesthetic-sensitive 2P domain K⁺ channels. *Anesthesiology* 95, 1013-1021. <https://doi.org/10.1097/0000542-200110000-00034>
- Patel, A.J., Lazdunski, M. und Honoré, E. (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K⁽⁺⁾ channels. *Curr Opin Cell Biol* 13, 422-428. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00231-3](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00231-3)
- Penton, D., Bandulik, S., Schweda, F., Haubs, S., Tauber, P., Reichold, M., Cong, L.D., El Wakil, A., Budde, T., Lesage, F., *et al.* (2012). Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. *Endocrinology* 153, 4740-4748. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1527>
- Powell, T., Terrar, D.A. und Twist, V.W. (1980). Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol* 302, 131-153. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013234>
- Pugsley, M.K. und Tabrizchi, R. (2000). The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44, 333-340. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00125-8)
- Putzke, C., Hanley, P.J., Schlichthörl, G., Preisig-Müller, R., Rinné, S., Anetseder, M., Eckenhoff, R., Berkowitz, C., Vassiliou, T., Wulf, H. und Eberhart, L. (2007a). Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1319-1326. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00100.2007>
- Putzke, C., Wemhöner, K., Sachse, F.B., Rinné, S., Schlichthörl, G., Li, X.T., Jaé, L., Eckhardt, I., Wischmeyer, E., Wulf, H., *et al.* (2007b). The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 75, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.02.025>
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K.H., Daut, J., Karschin, A. und Derst, C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem* 276, 7302-7311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008985200>
- Regan, C.P., Wallace, A.A., Cresswell, H.K., Atkins, C.L. und Lynch, J.J., Jr. (2006). In vivo cardiac electrophysiologic effects of a novel diphenylphosphine oxide IKur

blocker, (2-Isopropyl-5-methylcyclohexyl) diphenylphosphine oxide, in rat and nonhuman primate. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 727-732. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.094839>

Reho, J.J., Zheng, X. und Fisher, S.A. (2014). Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H163-172. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00493.2013>

Remillard, C.V., Tigno, D.D., Platoshyn, O., Burg, E.D., Brevnova, E.E., Conger, D., Nicholson, A., Rana, B.K., Channick, R.N., Rubin, L.J., *et al.* (2007). Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1837-1853. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00405.2006>

Renigunta, V., Schlichthorl, G. und Daut, J. (2015). Much more than a leak: structure and function of K(2)p-channels. *Pflugers Arch* 467, 867-894. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1703-7>

Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N. und Lazdunski, M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem* 273, 30863-30869. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.30863>

Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B.L., Tucker, S.J., Rapedius, M. und Baukrowitz, T. (2016). A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell* 164, 937-949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.002>

Schmidt, C., Kisselbach, J., Schweizer, P.A., Katus, H.A. und Thomas, D. (2011). The pathology and treatment of cardiac arrhythmias: focus on atrial fibrillation. *Vasc Health Risk Manag* 7, 193-202. <https://doi.org/10.2147/vhrm.S10758>

Schmidt, C., Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhao, Z., El-Battrawy, I., Lan, H., Szabo, G., Li, X., Lang, S., Korkmaz-Icöz, S., *et al.* (2019). Genetic Ablation of TASK-1 (Tandem of P Domains in a Weak Inward Rectifying K(+) Channel-Related Acid-Sensitive K(+) Channel-1) (K(2P)3.1) K(+) Channels Suppresses Atrial Fibrillation and Prevents Electrical Remodeling. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 12, e007465. <https://doi.org/10.1161/circep.119.007465>

Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P.A., Katus, H.A. und Thomas, D. (2012). [Cardiac two-pore-domain potassium channels (K2P): Physiology, pharmacology, and therapeutic potential]. *Dtsch Med Wochenschr* 137, 1654-1658. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1305216>

Schmidt, C., Wiedmann, F., Schweizer, P.A., Katus, H.A. und Thomas, D. (2014). Inhibition of cardiac two-pore-domain K⁺ (K2P) channels--an emerging antiarrhythmic concept. *Eur J Pharmacol* 738, 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.056>

Schmidt, C., Wiedmann, F., Voigt, N., Zhou, X.B., Heijman, J., Lang, S., Albert, V., Kallenberger, S., Ruhparwar, A., Szabó, G., *et al.* (2015). Upregulation of K(2P)3.1 K⁺

Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation* 132, 82-92. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.114.012657>

Schmitz, A., Sankaranarayanan, A., Azam, P., Schmidt-Lassen, K., Homerick, D., Hänsel, W. und Wulff, H. (2005). Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* 68, 1254-1270. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015669>

Seidelmann, S.B., Lighthouse, J.K. und Greif, D.M. (2014). Development and pathologies of the arterial wall. *Cell Mol Life Sci* 71, 1977-1999. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1478-y>

Seyler, C., Duthil-Straub, E., Zitron, E., Gierten, J., Scholz, E.P., Fink, R.H., Karle, C.A., Becker, R., Katus, H.A. und Thomas, D. (2012). TASK1 (K(2P)3.1) K(+) channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation. *Br J Pharmacol* 165, 1467-1475. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01626.x>

Shvetsova, A.A., Gaynullina, D.K., Schmidt, N., Bugert, P., Lukoshkova, E.V., Tarasova, O.S. und Schubert, R. (2020). TASK-1 channel blockade by AVE1231 increases vasocontractile responses and BP in 1- to 2-week-old but not adult rats. *Br J Pharmacol* 177, 5148-5162. <https://doi.org/10.1111/bph.15249>

Shvetsova, A.A., Gaynullina, D.K., Tarasova, O.S. und Schubert, R. (2019). Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of K(v) 7 channels. *Acta Physiol (Oxf)* 225, e13176. <https://doi.org/10.1111/apha.13176>

Shvetsova, A.A., Lazarenko, V.S., Gaynullina, D.K., Tarasova, O.S. und Schubert, R. (2022). TWIK-Related Acid-Sensitive Potassium Channels (TASK-1) Emerge as Contributors to Tone Regulation in Renal Arteries at Alkaline pH. *Front Physiol* 13, 895863. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.895863>

Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., *et al.* (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62, D34-41. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.029>

Søgaard, R., Ljungstrøm, T., Pedersen, K.A., Olesen, S.P. und Jensen, B.S. (2001). KCNQ4 channels expressed in mammalian cells: functional characteristics and pharmacology. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C859-866. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C859>

Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236. <https://doi.org/10.1038/372231a0>

Staudacher, K., Staudacher, I., Ficker, E., Seyler, C., Gierten, J., Kisselbach, J., Rahm, A.K., Trappe, K., Schweizer, P.A., Becker, R., *et al.* (2011). Carvedilol targets human K2P 3.1 (TASK1) K⁺ leak channels. *Br J Pharmacol* 163, 1099-1110. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01319.x>

Stump, G.L., Wallace, A.A., Regan, C.P. und Lynch, J.J., Jr. (2005). In vivo antiarrhythmic and cardiac electrophysiologic effects of a novel diphenylphosphine oxide IKur blocker (2-isopropyl-5-methylcyclohexyl) diphenylphosphine oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1362-1367. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092197>

Tang, B., Li, Y., Nagaraj, C., Morty, R.E., Gabor, S., Stacher, E., Voswinckel, R., Weissmann, N., Leithner, K., Olschewski, H. und Olschewski, A. (2009). Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 476-483. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0412OC>

Tobin, A.A., Joseph, B.K., Al-Kindi, H.N., Albarwani, S., Madden, J.A., Nemetz, L.T., Rusch, N.J. und Rhee, S.W. (2009). Loss of cerebrovascular Shaker-type K(+) channels: a shared vasodilator defect of genetic and renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H293-303. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00991.2008>

Touyz, R.M., Alves-Lopes, R., Rios, F.J., Camargo, L.L., Anagnostopoulou, A., Arner, A. und Montezano, A.C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res* 114, 529-539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>

Tsvetkov, D., Tano, J.Y., Kassmann, M., Wang, N., Schubert, R. und Gollasch, M. (2016). The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone. *Front Physiol* 7, 335. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00335>

Turner, P.J. und Buckler, K.J. (2013). Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol* 591, 5977-5998. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262022>

Tykocki, N.R., Boerman, E.M. und Jackson, W.F. (2017). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 7, 485-581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>

Vennekamp, J., Wulff, H., Beeton, C., Calabresi, P.A., Grissmer, S., Hänsel, W. und Chandy, K.G. (2004). Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxyypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* 65, 1364-1374. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1364>

Wareing, M., Bai, X., Seghier, F., Turner, C.M., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Taggart, M.J. und Fyfe, G.K. (2006). Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R437-446. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00040.2006>

Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201-206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>

Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X., Büscher, A., Kraft, M., Nietfeld, J., Walz, T.P., Unger, L.A., Loewe, A., Schmack, B., *et al.* (2020a). Pharmacologic TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ Channel (TASK-1) Potassium Channel Inhibitor A293 Facilitates

Acute Cardioversion of Paroxysmal Atrial Fibrillation in a Porcine Large Animal Model. *J Am Heart Assoc* 9, e015751. <https://doi.org/10.1161/jaha.119.015751>

Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.B., Kraft, M., Foerster, K.I., El-Battrawy, I., Lang, S., Borggrefe, M., Haefeli, W.E., Frey, N. und Schmidt, C. (2020b). The Experimental TASK-1 Potassium Channel Inhibitor A293 Can Be Employed for Rhythm Control of Persistent Atrial Fibrillation in a Translational Large Animal Model. *Front Physiol* 11, 629421. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.629421>

Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.B., Kraft, M., Paasche, A., Jávorszky, N., Rinné, S., Sutanto, H., Büscher, A., Foerster, K.I., *et al.* (2021). Treatment of atrial fibrillation with doxapram: TASK-1 potassium channel inhibition as a novel pharmacological strategy. *Cardiovasc Res.* <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab177>

Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D.L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., *et al.* (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 36, 1953-2041. <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000001940>

Wirth, K.J., Brendel, J., Steinmeyer, K., Linz, D.K., Rütten, H. und Gögelein, H. (2007). In vitro and in vivo effects of the atrial selective antiarrhythmic compound AVE1231. *J Cardiovasc Pharmacol* 49, 197-206. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318032002f>

Woodrum, D.A. und Brophy, C.M. (2001). The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol* 177, 135-143. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00407-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00407-5)

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

Yuan, J.X., Aldinger, A.M., Juhaszova, M., Wang, J., Conte, J.V., Jr., Gaine, S.P., Orens, J.B. und Rubin, L.J. (1998). Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98, 1400-1406. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.14.1400>

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

Zhang, D., Krause, B.M., Schmalz, H.G., Wohlfart, P., Yard, B.A. und Schubert, R. (2021). ET-CORM Mediated Vasorelaxation of Small Mesenteric Arteries: Involvement of Kv7 Potassium Channels. *Front Pharmacol* 12, 702392. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.702392>

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Neubeck, Daniel
Geburtsdatum: 25.09.1994
Geburtsort: Weinheim
Familienstand: ledig
Vater: Wolfgang Neubeck
Mutter: Sonja Lieselotte Theuerl-Neubeck

SCHULISCHER WERDEGANG

2001 - 2004 Pestalozzi Grundschule Weinheim
2004 - 2013 Werner Heisenberg Gymnasium Weinheim
21.06.2013 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2014/15 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-
Universität Heidelberg
07.09.2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
WS 2016/17 Beginn des klinischen Abschnitts des Studiums der
Humanmedizin
15.04.2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
14.06.2021 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

8 DANKSAGUNG

Vorrangig gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Schubert für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragenden Möglichkeiten, dieses zu bearbeiten. Insbesondere bedanke ich mich für die stets konstruktive Kritik und die herausragende Betreuung, die maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Auch bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Angela Bachmann für die umfassende Einarbeitung in die Laborabläufe. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Peter Winkler und Herrn Peter Kaiser für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und wechselseitige Unterstützung.

Im Weiteren danke ich Frau Camela Jost für ihre tagtägliche Unterstützung bei den Arbeitsabläufen im Labor.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Mutter und bei meiner Partnerin, die mich während der experimentellen Phase und der Abfassung der vorliegenden Dissertation zu jeder Zeit unterstützt haben.