

Aus dem Experimental and Clinical Research Center (ECRC) und der
Medizinischen Klinik m.S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von K_V -Kanälen und PI3K-Kinase bei der Regulation des
arteriellen Blutgefäßtonus von Mäusen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dmitry Tsvetkov

aus Rostow am Don, Russland

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	
1.1. Abstract (English).....	3
1.2. Abstract (Deutsch).....	4
2. Einführung.....	5
3. Ziele und Hypothesen.....	6
4. Methodik	7
5. Ergebnisse	9
5.1 Teil 1.....	9
5.2 Teil 2.....	11
5.3 Teil 3.....	12
6. Diskussion.....	12
7. Literaturverzeichnis.....	15
8. Eidesstattliche Versicherung.....	19
9. Anteilserklärung.....	20
10. Ausgewählte Publikationen.....	21
11. Lebenslauf.....	53
12. Komplette Publikationsliste.....	55
13. Danksagung.....	58

1.1. Abstract (English)

The anti-contractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) is an important mechanism in the modulation of vascular tone in peripheral arteries. Recent evidence has implicated a possible role of XE991-sensitive voltage-gated K_V (KCNQ) channels in this process, with $K_V7.1$ and $K_V1.5$ channels representing likely candidates. PI3K-AKT-mTOR pathway is involved in regulation of numerous important cellular processes, including cell growth, differentiation, and metabolism. However, the nature and *in vivo* pharmacology of K^+ channels contributing to PVAT-mediated relaxation, and the role of PI3Kalpha and other class I isoforms, i.e. PI3Kbeta, gamma, delta, in the regulation of vascular tone are largely unknown.

Kcnq1^{-/-}, *Kcna5^{-/-}*, *Pik3cg^{-/-}/Pik3cd^{-/-}* deficient mice, pharmacological tools and myography on mesenteric arterial rings were used to determine the role of $K_V7.1$, $K_V1.5$ and PI3K in the regulation of arterial vascular tone.

The putative $K_V7.1$ opener R-L3 produced similar concentration-dependent relaxations ($EC_{50} \sim 1.4 \mu M$) of wild-type (*Kcnq1^{+/+}*) and *Kcnq1^{-/-}* mesenteric arteries pre-contracted with either phenylephrine (PE) or 60mM KCl. This relaxation was not affected by 10 μM chromanol 293B ($K_V7.1$ -blocker), 10 μM HMR1556 ($K_V7.1$ -blocker) or 30 μM XE991 (pan- K_V7 -blocker). The anti-contractile effects of PVAT were normal in *Kcnq1^{-/-}* arteries. Chromanol 293B and HMR1556 did not affect the anti-contractile effects of PVAT. Isolated VSMCs from *Kcnq1^{-/-}* and *Kcna5^{-/-}* mesenteric arteries exhibited normal peak K_V currents. The $K_V7.2-5$ opener retigabine caused similar relaxations in *Kcnq1^{-/-}* and wild-type vessels. XE991 at 30 μM reduced the anti-contractile response of PVAT. Similar effects were observed for XE991 at 0.3 μM , which is known to almost completely inhibit mesenteric artery VSMC K_V currents. 30 μM XE991 did not affect VSMC BK_{Ca} channel currents. *Kcna5^{-/-}* arteries and wild-type mesenteric arteries incubated with 1 μM DPO-1 ($K_V1.5$ -blocker) showed normal vasoconstrictions in response to PE in the presence and absence of PVAT. PE-dependent contractions were inhibited by the pan PI3K inhibitors wortmannin (100nM) and LY294002 (10 μM). These vasoconstrictions were also inhibited by the PI3Kalpha isoform inhibitors A66 (10 μM) and PI-103 (1 μM), but not by the PI3Kbeta isoform inhibitor TGX 221 (100nM). *Pik3cg^{-/-}/Pik3cd^{-/-}*-arteries showed normal vasoconstrictions.

It is concluded that PI3Kalpha is an important downstream element in vasoconstrictor G protein-coupled receptor (GPCR) signaling, which contributes to arterial vasoconstriction at least *via* α_1 -adrenergic receptors. BK_{Ca} -channels are not downstream mediators of the

XE991 effects in PVAT vasoregulation. $K_V7.1$ and $K_V1.5$ -channels play no role in the control of arterial tone by α_1 -adrenergic vasoconstrictors and PVAT. In addition, R-L3 is a potent vasodilator in mouse mesenteric arteries, which dilates independently on native vascular $K_V7.1$ -channels.

1.2. Abstract (Deutsch)

Der antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes (PVAT) ist ein wichtiger Mechanismus der Regulation des Gefäßtonus in den peripheren Arterien. Die Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass XE991-sensitive spannungsabhängige (K_V) K_V7 -Kaliumkanäle (KCNQ), mit möglicher Beteiligung von $K_V7.1$ und $K_V1.5$ -Kanälen, eine wichtige Rolle bei der Regulation des arteriellen Tonus durch PVAT spielen. Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg ist an der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen involviert. Jedoch sind gegenwärtig die PVAT-regulierten K_V -Kanal-Zielstrukturen, deren pharmakologische Eigenschaften *in situ* und die Rolle der PI3K-Isoformen (alpha, beta, gamma, delta) bei der Regulation des Gefäßtonus noch nicht ausreichend bekannt.

Es wurden insgesamt drei genetisch veränderte Mauslinien (*Kcnq1*^{-/-}; *Kcna5*^{-/-}; *Pik3cg*^{-/-}/*Pik3cd*^{-/-}) und pharmakologische Hilfsmittel in myographischen Untersuchungen an isolierten Mesenterialarterien eingesetzt, um diese Fragen abzuklären.

Der vermeintliche $K_V7.1$ -Öffner R-L3 verursachte eine Dosis-abhängige Relaxation ($EC_{50} \sim 1.4 \mu\text{M}$) in Wildtyp (*Kcnq1*^{+/+}) und *Kcnq1*^{-/-} mesenterialarteriellen Gefäßringen, die sowohl mit Phenylephrin (PE) als auch mit 60mM KCl vorkontrahiert worden waren. Diese Relaxation wurde weder durch 10 μM Chromanol 293B ($K_V7.1$ -Blocker), 10 μM HMR1556 ($K_V7.1$ -Blocker) noch 30 μM XE991 (pan- K_V7 -Hemmer) beeinflusst. Der antikontraktile Effekt von PVAT war unverändert in *Kcnq1*^{-/-} Mesenterialarterien. Chromanol 293B und HMR1556 beeinflussten den antikontraktilen Effekt von PVAT nicht. Isolierte Gefäßmuskelnzellen (VSMC) von *Kcnq1*^{-/-} und *Kcna5*^{-/-} aus Mesenterialarterien zeigten normale K_V -Ströme. Der $K_V7.2-5$ -Kanalöffner Retigabin induzierte eine Relaxation von *Kcnq1*^{-/-} Gefäßen. Eine Inkubation der Gefäße mit 30 μM XE991 reduzierte den antikontraktilen Effekt von PVAT nach PE-Applikation. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Inkubation von Gefäßen mit 0.3 μM XE991 beobachtet. Diese Dosis ist dafür bekannt den K_V -Kanal-Strom in VSMC nahezu komplett zu hemmen. XE991 hatte keinen Einfluss auf den BK_{Ca} -Kanal-Strom in VSMC. Sowohl in den *Kcna5*^{-/-} als auch in den Wildtyp-Arterien, die zuvor mit 1 μM DPO-1 ($K_V1.5$ -Blocker) inkubiert worden waren, zeigte sich eine normale PE-

induzierte Vasokontraktion. Dieses traf sowohl auf Gefäße mit als auch ohne PVAT zu. Die Inkubation von Gefäßringen sowohl mit Wortmannin (100nM) als auch mit LY294002 (10 μ M) reduzierte PE-induzierte Gefäßkontraktionen. Diese Vasokontraktion wurde auch durch PI3Kalpha Hemmstoffe, wie A66 (10 μ M) und PI-103 (1 μ M), reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten der PI3Kbeta Hemmstoff TGX 221 (100nM) und *Pik3cg*^{-/-}/*Pik3cd*^{-/-}-Arterien eine normale Kontraktilität.

Es kann gefolgert werden, dass PI3Kalpha in G-Protein-gekoppelte-Rezeptor (GPCR)-Signalwege integriert ist, die zumindest die Kontraktilität von Mesenterialarterien über adrenerge Alpha₁-Rezeptoren mitreguliert. Die XE991-Downstream Effekte bei der PVAT Gefäßregulation laufen unabhängig von vaskulären BK_{Ca}-Kanälen ab. K_V7.1 und K_V1.5-Kanäle spielen keine Rolle bei der Gefäßtonusregulation von Mesenterialarterien der Maus durch adrenerge Alpha₁-Rezeptoren und PVAT. R-L3 ist ein potenter Vasodilator, der Mesenterialarterien der Maus unabhängig von nativen vaskulären K_V7.1-Kanälen relaxiert.

2. Einführung.

Das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) ist ein endokrines Organ [1], das in der Lage ist, die Gefäßkontraktion auch durch parakrine Mechanismen zu reduzieren [2]. Dieser antikonstraktile Effekt stellt einen allgemeinen Mechanismus der Regulation des Gefäßtonus dar, der sich in verschiedenen Gefäßtypen mit verschiedenen Agonisten von GPCR (wie Phenylephrin, Angiotensin II, Serotonin, Noradrenalin) beobachten lässt [2] [3] [4] [5] [6] [7]. Die abgeschwächte Kontraktilität scheint durch einen transferablen Faktor (ADRF) vermittelt zu sein [5], dessen molekulare Natur noch nicht geklärt ist. Die Aktualität dieses Aspekts in der Herz-Kreislaufforschung ist aus folgendem Grund besonders hoch anzusehen: eine reduzierte antikonstraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes ist assoziiert mit einem erhöhten systemischen Blutdruck [6] [8]. Die bisherige Forschung ergab, dass die Reaktion von arteriellen Gefäßen auf ADRF sowohl im Tiermodell (SHR-Ratte und NZO-Maus) als auch bei Patienten mit primärer Hypertonie vermindert ist [6] [7] [9] [10]. All dies deutet darauf hin, dass die Dysfunktion von PVAT, neben dem Konzept der Endothelschädigung und der endothelialen Dysfunktion, eine offensichtlich prominente Rolle [11] bei der Entstehung von Bluthochdruck und chronischen Gefäßerkrankungen spielen könnte [12]. Folglich könnte die Aufklärung von ADRF-Signalwegen sowie von regulierten Zielstrukturen neue Behandlungsmöglichkeiten für die Hypertonie eröffnen [11] [12].

Viele Forschungsgruppen setzen sich mit genau dieser Problematik auseinander, indem sie eine Reihe von Hypothesen entwickelt und getestet haben, welche zeigen, dass vorwiegend spannungsabhängige (K_v) Kaliumkanäle an der PVAT-abhängigen Gefäßregulation beteiligt sind [5] [13]. Es wird angenommen, dass PVAT zur verstärkten Öffnung von K_v Kanälen in den glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) führt, dass Kalium (K^+) Ausstrom und dadurch eine Membranhyperpolarisation verursacht wird, welche letztendlich L-Typ $Ca_v1.2$ Kanäle schließt, und zur Relaxation von VSMC führt [14]. VSMC in den Widerstandsgefäßen (z.B. in Mesenterialarterien) exprimieren mehrere Unterfamilien von K_v -Kanälen, vor allem K_v7 und K_v1 , die sich durch ihre molekulare Biologie und Gen-Homologie unterscheiden. Die Ergebnisse der Studien von Schleifenbaum et al. 2010., und Zavaritskaya et al. 2013., [4] [8] zeigen, dass vermutlich K_v7 (KCNQ) eine entscheidende Rolle bei der Regulation des arteriellen Tonus durch PVAT spielen. Diese Schlussfolgerung basiert auf Experimenten mit dem ($30 \mu\text{M}$) pan K_v7 -Hemmer XE991, der den antikonstraktiven Effekt von PVAT blockierte [4]. Außerdem verbesserten K_v7 -Kanalöffner, wie Retigabin, die Dysfunktion von PVAT bei arterieller Hypertonie im Tiermodell [8].

Obwohl $K_v7.1$ (KCNQ1) Kanäle nicht zum Ruhetonus von Arterien beitragen zu scheinen, wurde der KCNQ1-Öffner RL-3 als ein effektiver Vasodilatator beschrieben [15]. Jedoch wirkt XE991 in verschiedenen Konzentrationen relativ unspezifisch auf alle fünf KCNQ1-5 Subtypen; die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) variierte in Untersuchungen von 0.8 bis $65 \mu\text{M}$ [16] [17] [18] [19]. Zudem konnten sich diese Wirkungen auch bei anderen K_v -Kanälen, wie z.B. K_v11 [20] oder $K_v1.2/1.5$, $K_v2.1/K_v9.3$, auch beobachten lassen [21]. Im Fokus intensiver Forschung stehen neuerdings auch $K_v1.5$ -Kanäle, da diese bei der Regulation des mikrovaskulären Tonus und der Hypertonie eine wichtige Rolle spielen könnten [22] [23].

3. Ziele und Hypothesen

Daraus ergaben sich drei wichtige Hypothesen, die in dieser Arbeit überprüft werden sollten:

1. Es sollte geprüft werden, ob $K_v7.1$ -Kanäle eine Rolle bei der Regulation des arteriellen Tonus spielen (Teil 1).
2. Es sollte getestet werden, ob $K_v1.5$ -Kanäle ebenfalls an der Regulation des arteriellen Tonus beteiligt sind; und ob niedrigere Konzentrationen von XE991 den

anti-kontraktile Effekt des perivaskulären Fettes blockieren. Dabei sollte überprüft werden, ob BK_{Ca}-Kanäle in dem Prozess involviert sein könnten (Teil 2).

3. Es sollte herausgefunden werden, ob der PI3K-Signalweg zur Regulation des arteriellen Gefäßtonus beiträgt (Teil 3).

4. Methodik

Tiere

Der überwiegende Teil der Versuche wurde an Mäusen durchgeführt [24] [25] [26]. Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. Sie hatten einen 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus und freien Zugang zu Pressfutter (0.25% Natrium, SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser. Die durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Berliner Behörde (LAGESO) genehmigt. Insgesamt kamen drei genetisch veränderte Mauslinien zum Einsatz: *Kcnq1*^{-/-}; *Kcna5*^{-/-}; *Pik3cg*^{-/-}/*Pik3cd*^{-/-}, die von Prof. Dr. Florian Lang (Institut für Physiologie, Tübingen), Prof. Dr. Helmut Kettenmann (MDC Berlin) bzw. Prof. Dr. Bernd Nürnberg (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere im Alter von 8-12 Wochen wurden nach dem Narkotisieren mit Isofluran schmerzlos durch zervikale Dislokation getötet [24] [25] [26]. Nach der Eröffnung der Bauchdecke wurde der Darm separiert. In einer Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Salzlösung (PSS) wurden die Mesenterialarterien erster Ordnung unter einem Stereomikroskop (Nikon, SMZ645) entweder mit oder ohne perivaskuläres Fett präpariert [24] [25] [26].

Isometrische Kontraktionsmessungen

Die Kontraktionsmessungen an isolierten Blutgefäßen wurden am Wire-Myograph-System (DMT Danish Myotechnology, Denmark) durchgeführt [24] [25] [26]. Der DMT Myograph besteht aus vier Messkammern, die mit bis zu 10 ml einer Lösung gefüllt werden können. In jeder Kammer befinden sich zwei Träger, zwischen denen ein arterieller Ring fixiert werden kann. Eine Träger ist mit einem Kraftmesser verbunden, so dass die Kontraktionskraft des Arterienringes durch ein „Powerlab“ (ADInstruments, Sprechbach)-Interface übertragen und gemessen werden kann. Die Kammern wurden mit 5 ml physiologischer Salzlösung (PSS) gefüllt, die während des gesamten Experiments mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Dies bewirkt einen konstanten pH-Wert von 7.4. Die PSS enthielt (jeweils in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 1.2 MgSO₄, 11.1

Glucose, 1.6 CaCl₂. Außerdem wurde eine modifizierte stark kaliumhaltige (60 mM) Lösung (KPSS) eingesetzt, bei der NaCl mit äquimolarem KCl ausgetauscht wurde. Zur Bestückung der Kammern wurden die Gefäße in 2-mm-Ringe geschnitten und durch sie 2 Edelstahldrähte geführt, die dann im Gerät fixiert wurden. Um die Vergleichbarkeit der Kontraktion der Ringe zu erreichen, wurde das DMT-Normalization Modul genutzt [24] [25] [26]. Die Ringe wurden schrittweise gedehnt, bis die Vorspannung dem transmuralen Druck von 100 mm Hg entsprach [24] [25] [26].

Elektrophysiologische Messungen (Patch-Clamp)

Die elektrophysiologischen Untersuchungen (Patch-Clamp) an frisch isolierten glatten Muskelzellen (VSMC) aus Mesenterialarterien wurden mit Hilfe eines Axopatch 200B Verstärkers (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) oder eines EPC 7 Verstärkers (List, Darmstadt, Germany) und eines Digidata 1440A Interface (Axon CNS, Molecular Devices) sowie pClamp software (Versions 10.1 und 10.2) durchgeführt [24] [25]. VSMC wurden isoliert, wie zuvor beschrieben [27] [28]. Nach der Präparation wurden die Mesenterialarterien in Ca²⁺-freier Hank's Lösung (jeweils in mM): 55 NaCl, 80 Mononatriumglutamat, 5.6 KCl, 2 MgCl₂, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Taufkirchen), 10 Glukose, 10 HEPES (pH 7.4 mit NaOH), 0.5 mg/ml Papain (Sigma, Deutschland), und 1.0 mg/ml DDT über 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die arteriellen Segmente in Hank's Lösung mit 1 mg/ml Kollagenase (Sigma, Type F und H, Verhältnis 30% zu 70%) und 0.1 mM CaCl₂ für 10 Minuten bei 37°C platziert. Nach dem Auswaschen mit Ca²⁺-freier Hank's Lösung, die 1 mg/ml BSA enthielt, wurden die isolierten Zellen bei 4°C aufbewahrt. Spannungsabhängige Kalium-Ströme (K_V-Strom) wurden in der Whole-Cell-Konfiguration gemessen [29]. Die Patch-Pipetten (Widerstand 3-5 MΩ) wurden mit einer Pipetten-Lösung (130 KCl, 1 MgCl₂, 3 Na₂-ATP, 0.1 Na₃-GTP, 10 HEPES und 5 EGTA, pH 7.2) gefüllt. Die Zusammensetzung der externen Lösung war (in mM): 126 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 10 HEPES, 11 Glukose, pH 7.2) [24] [25].

Real Time PCR

Genexpressionsanalysen von K_V7.2-5-Kanälen wurde in den mesenterialen Gefäßen von Wildtyp- und K_V7.1-defizienten Mäusen durchgeführt [24]. Diese Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Experimente richteten sich nach den MIQE-Leitlinien [30]. Für die Gewinnung der Ribonukleinsäuren (RNA) wurde RNeasy RNA Isolation Kit (Qiagen,

Hamburg, Deutschland) verwendet. Reinheit und Konzentration der RNA wurden mit einem Spectrophotometer (NanoDrop-1000, PeqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Für die Synthese der genomischen DNA (cDNA) wurde TaqMan Reverse Transcription Reagents #N8080234 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Real time PCR wurde im Volumen von 25 μ L mit dem Faststart Universal SYBR green Master Mix (Roche, #04913850001) an einem Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt [24]. Das Primerdesign erfolgte mittels Primer 3 Software an unterschiedlichen Exonen, um DNA-Kontamination auszuschließen. Die Spezifität der amplifizierten Produkte wurde sowohl *in silico* (BLAST) als auch empirisch (Agarose-Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse) überprüft. Folgendes PCR-Programm wurde benutzt: 10-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C, dann: 40 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung bei 95°C über 15 Sekunden, Annealing/Elongation bei 60°C über 1 Minute. Bei den Negativkontrollen wurde DNA-freies Wasser anstatt cDNA zugegeben. *18s* wurde als Referenz-Gen verwendet, dessen Expression unter unseren experimentellen Bedingungen konstant war. Die $\Delta\Delta$ Ct-Methode [31] diente zur Auswertung und Bestimmung der Expression von *Kcnq3*, *Kcnq4*, *Kcnq5* bei *Kcnq1^{+/+}* und *Kcnq1^{-/-}*-Mäusen [24].

Alle experimentellen Details sind ausführlich in Tsvetkov et al., 2016, [24] [25] [26] beschrieben. Kopien der Publikationen befinden sich im Anhang.

5. Ergebnisse

5. 1. Rolle von $K_V7.1$ -Kanälen bei der Regulation des arteriellen Tonus (Teil 1)

Zuerst wurden Effekte von der Substanz R-L3 (einem putativen $K_V7.1$ -Kanalöffner) getestet. R-L3 produzierte eine Dosis-abhängige Relaxation der mesenterialen Arterien, die von der Maus isoliert wurden. Im Gegensatz bewirkte ein anderer $K_V7.1$ -Kanalöffner (ML277) keine potente Relaxation. Die Vorkontraktionen wurden mit 1 μ M Phenylephrin (PE) erzeugt. Zwei $K_V7.1$ -Hemmer (Chromanol 293B und HMR1556) beeinflussten die PE-induzierten Kontraktionen nicht. Weder 10 μ M Chromanol 293B noch 30 μ M XE991 (pan K_V7 -Hemmer) oder 0.5 mM 4-Aminopyridin (4-AP) (unspezifischer K_V -Hemmer) konnten die RL-3-erzeugten Relaxationen umkehren; Effekte, die in Mesenterialarterien der Ratte ebenfalls zu beobachten waren. Die Versuche an den Rattenarterien dienen als Kontrollversuche. Eine Inkubation der Arterien der Maus mit 10 μ M Chromanol 293B konnte

die RL-3-induzierte Relaxation nicht verhindern. Gleichartige Ergebnisse sind in den Mesenterialarterien der Ratten zu verzeichnen. Nach der Zugabe von 10 μM Chromanol 293B und 10 μM HMR1556 blieb der Ruhetonus sowohl in den Maus- als auch in den Rattenarterien unverändert.

Daraus war zu schließen, dass die vasodilatorischen R-L3 Effekte nicht von der Öffnung von $\text{K}_\text{V}7.1$ und anderen K^+ -Kanälen abhängig sind. Um diese Teilhypothese zu überprüfen, wurde Gefäßringe mit einer 60 mM KCl-Lösung vorkontrahiert, wodurch das K^+ Umkehrpotenzial (K^+ -Nernstpotenzial) der VSMCs in einen positiven Membranpotenzialbereich verschoben wird, das L-Type $\text{Ca}_\text{V}1.2$ -Kanäle aktiviert, und dadurch Gefäßkontraktionen induziert, die durch zusätzliche Kaliumkanalöffnung nicht oder kaum beeinflussbar sind [32] [33]. Die durch R-L3 verursachte Vasodilatation blieb in den kontrahierten Gefäßringen mit KCl erhalten. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Nierenarterien beobachtet. Eine Konzentration von 30 μM XE991 inhibierte ebenfalls nicht die R-L3-induzierte Vasodilatation in den arteriellen Ringen, die zuvor mit KCl vorkontrahiert wurden. Gleichartige relaxierende Effekte von R-L3 waren auch in den Mesenterialarterien von *Kcnq1*^{-/-} Mäusen zu beobachten; dabei betragen die mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50}) für die Gefäße von *Kcnq1*^{+/+} und von *Kcnq1*^{-/-} Mäusen jeweils $\sim 1.4 \mu\text{M}$. Dieser Prozess war Endothel-unabhängig. Es wurde gefolgert, dass die vorher in der Literatur als spezifische $\text{K}_\text{V}7.1$ -Kanalöffner beschriebene Substanz R-L3 eine Vasodilatation induziert, die nicht durch die Aktivierung von $\text{K}_\text{V}7.1$ -Kanälen verursacht wird.

Darüber hinaus wurde die Teilhypothese überprüft, ob $\text{K}_\text{V}7.1$ Kanäle eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus durch PVAT spielen. Es wurden Experimente mit $\text{K}_\text{V}7.1$ -Hemmern und der genetisch veränderten *Kcnq1*^{-/-} Mauslinie durchgeführt. PVAT wurde entweder entfernt ((-) PVAT) oder intakt gelassen ((+) PVAT). Chromanol 293B und HMR1556 hatten keinen Einfluss auf die dosisabhängige PE-induzierte Kontraktion der (-) PVAT und (+) PVAT Mesenterialarterien, welche von *Kcnq1*^{+/+} Mäusen stammten. Ebenso zeigten sich identische Effekte von PVAT in Mesenterialarterien von *Kcnq1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Kongruent mit den oben beschriebenen Ergebnissen war die Beobachtung, dass der K_V -Strom in den VSMC von *Kcnq1*^{-/-} Mäusen nicht unterschiedlich zu K_V -Strömen von Wildtyp-VSMCs ist. Es gab keinen Unterschied zwischen den *Kcnq1*^{+/+} und *Kcnq1*^{-/-} VSMC-Zellen bzgl. der normalisierten Peak- K_V -Ströme, der Zell-Kapazität und der Hemmung von K_V -Strömen durch XE991 (30 μM). Außerdem zeigten sich weder beim Ruhestrom, noch bei Stromaktivierung von +20 mV und +40 mV signifikante Unterschiede.

Um eine mögliche kompensatorische Überexprimierung von anderen K_V7 -Kanälen, zum Beispiel $K_V7.2-5$, in den $Kcnq1^{-/-}$ Gefäßen, auszuschließen, wurde die Genexpression von $Kcnq3$, $Kcnq4$ und $Kcnq5$ in $Kcnq1^{-/-}$ und $Kcnq1^{+/+}$ Mesenterialarterien analysiert, wobei $Kcnq2$ in diesem Versuchsaufbau nicht nachweisbar war. Bei beiden Genotypen wurden nicht unterschiedliche Expressionsniveaus von $Kcnq3$, $Kcnq4$ und $Kcnq5$ mRNA detektiert, damit gibt es keine Hinweise für eine funktionelle Überexprimierung von $K_V7.2-5$ -Kanälen in Folge des Fehlens von KCNQ1 in $Kcnq1^{-/-}$ Mesenterialarterien. Eine weitere Bestätigung dafür ist, dass der pan $K_V7.2-5$ -Kanalöffner Retigabin [34] eine normale Vasodilatation in den $Kcnq1^{-/-}$ Gefäßen induzierte.

5. 2. Rolle von $K_V1.5$ und anderen K-Kanälen bei der Regulation des arteriellen Tonus (Teil 2)

Es wurde abgeklärt, ob $K_V1.5$ -Kanäle an der α_1 -adrenergen-Vasostimulation durch PE beteiligt sind. Dafür wurde ein $K_V1.5$ -Hemmer (DPO-1) eingesetzt, der als potent und spezifisch beschrieben worden ist [35]. Die mit $1\mu\text{M}$ DPO-1 inkubierten mesenterialarteriellen (-) PVAT Gefäßringe erreichten das Kontraktionsniveau der (-) PVAT Kontrollringe. Das 95%-Konfidenzintervall der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) für PE der zuvor mit DPO-1 inkubierten Ringe war $1.21-1.79\mu\text{M}$ und bemaß sich auf $0.78-1.40\mu\text{M}$ bei den Kontrollringen. Die Koinkubation der Ringe mit $1\mu\text{M}$ DPO-1 veränderte den antikontraktilen Effekt von PVAT dennoch nicht. Das 95%-Konfidenzintervall der (+) PVAT Kontrollringe und der mit $1\mu\text{M}$ DPO-1 inkubierten (+) PVAT Ringe bemaßen sich auf $3.99-8.14\mu\text{M}$ bzw. $4.99-10.05\mu\text{M}$. Um diese Daten, die durch das Einsetzen eines $K_V1.5$ -Kanalhemmers erhoben worden sind, zu bestätigen, wurden vergleichbare Experimente mit $Kcna5^{-/-}$ Mäusen durchgeführt, bei denen der $K_V1.5$ gentechnisch durch Ablation ausgeschaltet wurde [36]. PE-induzierte Vasokontraktionen unterschieden sich nicht zwischen $Kcna5^{-/-}$ und $Kcna5^{+/+}$ Mesenterialarterien. Die kumulative Dosiswirkungskurve auch für Serotonin (5-HT) blieb unverändert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass $K_V1.5$ -Kanäle keine Funktion in der Regulation des arteriellen Tonus von PVAT, α_1 -AR und 5-HT Agonisten spielen. Ähnliche Ergebnisse wurden in Kontrolluntersuchungen an Mesenterialarterien der Ratte erzielt.

Die Dosis von $1\mu\text{M}$ DPO-1 hatte keinen Einfluss auf den Ruhetonus der $Kcna5^{+/+}$ Mesenterialarterien mit (+) PVAT und (-) PVAT. Überraschenderweise bewirkte die Zugabe von $10\mu\text{M}$ DPO-1 nur in den (-) PVAT Ringen eine Vasokonstriktion. Dieser Effekt blieb

stabil über einen Zeitraum von 30 Minuten und wurde auch in den *Kcna5*^{-/-} Ringen beobachtet. Daraus ergibt sich die Folgerung, dass DPO-1 sensitive Kanäle, die sich von *K_V1.5* unterscheiden, zum vaskulären Tonus von Mesenterialarterien beitragen können.

Die gemessenen *K_V*-Ströme in den VSMC, die aus *Kcna5*^{-/-} und *Kcna5*^{+/+} Mesenterialarterien isoliert worden waren, unterschieden sich nicht. In beiden Genotypen war eine Hemmung der *K_V*-Ströme nach Applikation von 30 µM XE991 zu beobachten. In parallel durchgeführten Experimenten veränderte 30 µM XE991 den Ruhetonus der Mesenterialarterien nicht. Um die Effekte von XE991 besser zu verstehen, wurden auch *BK_{Ca}*-Ströme gemessen. Während XE991 keinen Einfluss auf den *BK_{Ca}*-Strom hatte, inhibierte 100 nM Iberiotoxin (ein *BK_{Ca}*-Kanalhemmer, als Positivkontrolle) den *BK_{Ca}*-Strom.

Zusätzlich wurden Effekte von 30 µM und 0.3 µM XE991 auf den Gefäßtonus untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Applikation von 0.3 µM und 30 µM XE991, den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes abschwächt.

5. 3. Rolle des PI3K-Signalweges bei der Regulation des arteriellen Gefäßtonus (Teil 3)

In einem ersten Schritt wurden die Effekte von zwei strukturell unterschiedlichen PI3K-Klasse-I-Inhibitoren auf die adrenerge α_1 -Rezeptor-induzierte Kontraktion untersucht, nämlich Wortmannin und LY294002. Sowohl die Inkubation mit Wortmannin (100 nM) als auch mit LY294002 (10 µM) schwächten die PE-induzierte Kontraktion der Mesenterialarterien der Maus ab. Die Untersuchungen zeigen, dass Klasse I PI3K an der GPCR-induzierten Vasokonstriktion beteiligt ist, zumindest *via* den α_1 -AR-Signalweg.

Als nächstes sollte herausgefunden werden, welche Isoform innerhalb dieser Klasse dafür entscheidend ist. PI3Kalpha und PI3Kbeta sind ubiquitär exprimiert, PI3Kgamma und PI3Kdelta befinden sich grundsätzlich im hämatopoetischen System. Um die Frage der entscheidenden Isoform zu beantworten, analysierten wir Mesenterialgefäße von *Pik3cg*^{-/-}/*Pik3cd*^{-/-} Mäusen. PE induzierte eine normale Vasokontraktion, unabhängig davon, ob die PI3Kgamma- und PI3Kdelta-Isoformen eliminiert worden waren oder nicht. Die Dosiswirkungskurven hatten nicht unterschiedliche EC₅₀-Werte (0.98 ± 0.05 im Wildtyp und 0.93 ± 0.05 µM in den *Pik3cg*^{-/-}/*Pik3cd*^{-/-} Arterien). Daraus lässt sich folgern, dass diese beiden Isoformen (PI3Kgamma und PI3Kdelta) keine Rolle im α_1 -AR-Signalweg spielen.

Von den zwei anderen Isoformen ist PI3Kbeta direkt mit dem Gbeta-gamma-Komplex verknüpft, der über GPCR reguliert wird [37] [38]. Aus diesem Grund verwendeten wir die maximal effektive Konzentration des PI3Kbeta Inhibitors TGX 221 [39]. Die Dosis-

Wirkungskurve der mit TGX 221 inkubierten Gefäßringe zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollringen. Im Gegensatz dazu inhibierte der PI3Kalpha-Hemmer A66 die α_1 -AR-induzierte Vasokonstriktion. Weitere Ergebnisse mit einem anderen PI3Kalpha Inhibitor, hier PI-103, bestätigten diese Erkenntnis.

6. Diskussion

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass $K_V7.1$ -Kanäle keine oder eine eher unbedeutende Rolle bei der Regulation des arteriellen Gefäßtonus der Maus spielen. Wir beobachteten keine Funktionalität von $K_V7.1$ in der R-L3-induzierten Relaxation, die sowohl nach der genetischen Deletion als auch nach der pharmakologischen Blockade von *Kcnq1* gänzlich erhalten blieb. Die hier erhobenen Daten lassen die Interpretation zu, dass die $K_V7.1$ -Familie nicht an der PVAT Regulation des Gefäßtonus (ADRF-Signalweg) von Mesenterialarterien beteiligt ist. Diese Folgerungen wurden mit einem anderen potenten $K_V7.1$ -Kanalöffner (ML277) bestätigt. Stattdessen hat unser *Kcnq1*-Mausmodell gezeigt, dass R-L3 unerwartet die KCl-induzierte L-Typ $Ca_V1.2$ Kanal-abhängige Vasokontraktion über Kaliumkanal-unabhängige Mechanismen antagonisiert. Aus diesem Grund ist R-L3 im Mausmodell für die Untersuchung von nativen vaskulären $K_V7.1$ -Kanälen ungeeignet. Eine komplette Übersicht über diese Ergebnisse und detaillierte Diskussion findet sich in Tsvetkov et al., 2016 „Do $K_V7.1$ channels contribute to control of arterial vascular tone?“. Eine Kopie dieser Publikation befindet sich im Anhang.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass $K_V1.5$ -Kanäle sowohl den mikrovaskulären Tonus, als auch die Reaktion auf Vasokonstriktoren in Gefäßen von Ratten (Gehirnarterien) bestimmen [22] [40]. Außerdem sind $K_V1.5$ essenziell bei der Verknüpfung der Blutversorgung des Myokards zu dem kardialen Metabolismus [41]. Zudem ist die Hypertonie mit der veränderten $K_V1.5$ -Expression assoziiert [23] [42]. Infolgedessen entstand die Frage, ob $K_V1.5$ Kanäle bei der PVAT Gefäßregulation (ADRF-Signalweg) und in der adrenergen α_1 -Rezeptor-induzierten Kontraktion eine Rolle spielen könnten. In dieser Studie wurde gezeigt, dass $K_V1.5$ Kanäle bei der Regulation des Gefäßtonus von Mesenterialarterien der Maus und Ratte nicht involviert sind. Denn es gab keinen Unterschied im antikontraktilen Effekt von PVAT zwischen *Kcna5*^{-/-} und *Kcna5*^{+/+} Arterien. Zusätzlich zeigte der $K_V1.5$ -Kanalhemmer DPO-1 keinen Einfluss auf den Gefäßtonus, insbesondere auch auf den antikontraktilen PVAT Effekt. Diese Schlussfolgerungen widersprechen nicht

früher erhobenen Ergebnissen unserer Gruppe [8] [43], in denen demonstriert wurde, dass 100 nM XE991 nicht den heterolog exprimierten $K_V1.5$ -Strom in HEK293-Zellen blockierte. Weiterhin findet sich eine Bestätigung auch in bisherigen klinischen Befunden. Demzufolge wurden bei Patienten mit *KCNA5* Mutationen sowohl Herzrhythmusstörungen als auch eine pulmonale Hypertonie, jedoch keine systemische Hypertonie beobachtet [44] [45] [46]. Es konnte spekuliert werden, dass die beobachteten kontraktile Effekte von 10 μ M DPO-1 durch die Hemmung von $K_V1.3$ verursacht sein könnten. Die Studie von Zhao et al., 2013 zeigte, dass DPO-1 den $K_V1.3$ -Strom in T-Zellen mit EC_{50} 3.1 μ M blockiert [47]. Da *Kcna3* mRNA auch in den Mesenterialarterien detektierbar ist [48], sind zukünftige Untersuchungen angebracht, um dieser These weiter nachzugehen. Die Spezifität der XE991-Wirkung auf BK_{Ca} -Kanäle wurde bisher nicht untersucht. Dies ist aber höchst bedeutungsvoll, weil von einer anderen Arbeitsgruppe vermutet wurde, dass BK_{Ca} Kanäle bei der PVAT-Kontrolle des arteriellen Tonus involviert sein könnten [49] [50]. Die Untersuchungen an BK_{Ca} -defizienten Mäusen ergaben widersprüchliche Befunde [9]. Die hier erhobenen Befunde deuteten darauf hin, dass 30 μ M XE991 die Funktion der vaskulären BK_{Ca} -Kanäle nicht beeinflusst. Bereits in einer deutlich geringeren Konzentration (0.3 μ M) schwächt XE991 die antikrampfende Wirkung von PVAT ab. Eine komplette Übersicht der Ergebnisse und die detaillierte Diskussion zu diesen Ergebnissen findet sich in Tsvetkov et al., 2016 „The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone“. Eine Kopie dieser Publikation befindet sich im Anhang.

Die vorliegenden Messungen mit verschiedenen pharmakologischen PI3K-Hemmern zeigen, dass PI3Kalpha in den adrenergen α_1 -Rezeptor-Signalweg integriert ist, der die Kontraktilität von Mesenterialarterien reguliert. Interessanterweise zeigte eine kürzlich durchgeführte Transkriptomanalyse eine Überexpression von *Pik3r1*-mRNA-Transkripten (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1, p85alpha) bei Adipositas in der Ratte [51]. Somit könnte dieser Signalweg eine pathophysiologische Rolle bei der Gefäßtonusregulation im Menschen spielen. Es bleibt allerdings ungeklärt, wie PI3Kalpha von adrenergen α_1 -Rezeptoren und möglicherweise anderen GPCR reguliert werden kann. Möglicherweise ist PI3Kalpha mit $G_{q/11}$ gekoppelt, welches dafür bekannt ist, die α_1 -AR-Vasokontraktion zu vermitteln [52]. Solche Interaktionen wurden bislang nur für die PI3Kbeta- und gamma-Isoformen nachgewiesen [53] [54], wobei für die Aktivierung von PI3Kalpha hauptsächlich der tyrosine kinase receptor (TKR)-Signalweg verantwortlich ist [55]. Da adrenerge α_1 -

Rezeptor-induzierte Kontraktionen zu einer Transaktivierung des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) im intakten Gefäß führen können, ist es möglich dass dieser Signalweg und der ERK1/2-Signalweg bei den in unserer Studie beobachteten Effekten eine Rolle spielen [56]. Infolgedessen scheint es möglich, dass PI3Kalpha zu einer solchen Transaktivierung beitragen kann. Außerdem kann die Inhibierung von adrenergen alpha₁-Rezeptoren durch Doxazosin das Tumorwachstum und die Angiogenese über den PI3K-AKT-Signalweg beeinflussen [57]. Abschließend weisen die hier vorgelegten Ergebnisse darauf hin, dass PI3Kalpha eine Rolle bei der Regulation der Kontraktilität zumindest von Mesenterialarterien spielen kann. Eine komplette Übersicht der Ergebnisse und die detaillierte Diskussion zu diesem Teilthema findet sich in Tsvetkov et al., 2016 „Better Understanding of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathways in Vasculature: Towards Precision Therapy Targeting Angiogenesis and Tumor Blood Supply“. Eine Kopie dieser Publikation befindet sich im Anhang.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1621-30.
- [2] Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A.* 1991;13:277-96.
- [3] Verlohren S, Dubrovskaya G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension.* 2004;44:271-6.
- [4] Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, Dubrovskaya G, Zavaritskaya O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R, Gollasch M. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens.* 2010;28:1875-82.
- [5] Lohn M, Dubrovskaya G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* 2002;16:1057-63.
- [6] Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, Laing I, Yates AP, Pemberton PW, Malik RA, Heagerty AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009;119:1661-70.
- [7] Galvez-Prieto B, Somoza B, Gil-Ortega M, Garcia-Prieto CF, de Las Heras AI, Gonzalez MC, Arribas S, Aranguiz I, Bolbrinker J, Kreutz R, Ruiz-Gayo M, Fernandez-Alfonso MS. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Front Pharmacol.* 2012;3:103.
- [8] Zavaritskaya O, Zhuravleva N, Schleifenbaum J, Gloe T, Devermann L, Kluge R, Mladenov M, Frey M, Gagov H, Fesus G, Gollasch M, Schubert R. Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction. *Hypertension.* 2013;61:151-9.
- [9] Fesus G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res.* 2007;75:719-27.

- [10] Galvez B, de Castro J, Herold D, Dubrovskaja G, Arribas S, Gonzalez MC, Aranguiz I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M, Fernandez Alfonso MS. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1297-302.
- [11] Gollasch M. Adipose-Vascular Coupling and Potential Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;57:null.
- [12] Lian X, Gollasch M. A Clinical Perspective: Contribution of Dysfunctional Perivascular Adipose Tissue (PVAT) to Cardiovascular Risk. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18:82.
- [13] Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol.* 2012;165:633-42.
- [14] Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268:C799-822.
- [15] Chadha PS, Zunke F, Davis AJ, Jepps TA, Linders JT, Schwake M, Towart R, Greenwood IA. Pharmacological dissection of K(v)7.1 channels in systemic and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 2012;166:1377-87.
- [16] Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem.* 2000;275:24089-95.
- [17] Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science.* 1998;282:1890-3.
- [18] Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ, Yuan XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1997;100:2347-53.
- [19] Sogaard R, Ljungstrom T, Pedersen KA, Olesen SP, Jensen BS. KCNQ4 channels expressed in mammalian cells: functional characteristics and pharmacology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C859-66.
- [20] Elmedy P, Calloe K, Schmitt N, Hansen RS, Grunnet M, Olesen SP. Modulation of ERG channels by XE991. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100:316-22.
- [21] Zhong XZ, Harhun MI, Olesen SP, Ohya S, Moffatt JD, Cole WC, Greenwood IA. Participation of KCNQ (Kv7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol.* 2010;588:3277-93.
- [22] Fancher IS, Butcher JT, Brooks SD, Rottgen TS, Skaff PR, Frisbee JC, Dick GM. Diphenyl phosphine oxide-1-sensitive K(+) channels contribute to the vascular tone and reactivity of resistance arteries from brain and skeletal muscle. *Microcirculation.* 2015;22:315-25.
- [23] Cox RH, Rusch NJ. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation.* 2002;9:243-57.
- [24] Tsvetkov D, Kassmann M, Tano JY, Chen L, Schleifenbaum J, Voelkl J, Lang F, Huang Y, Gollasch M. Do KV 7.1 channels contribute to control of arterial vascular tone? *Br J Pharmacol.* 2017;174:150-62.
- [25] Tsvetkov D, Tano JY, Kassmann M, Wang N, Schubert R, Gollasch M. The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone. *Front Physiol.* 2016;7:335.
- [26] Tsvetkov D, Shymanets A, Huang Y, Bucher K, Piekorz R, Hirsch E, Beer-Hammer S, Harteneck C, Gollasch M, Nurnberg B. Better Understanding of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathways in Vasculature: Towards Precision Therapy Targeting Angiogenesis and Tumor Blood Supply. *Biochemistry (Mosc).* 2016;81:691-9.

- [27] Gollasch M, Wellman GC, Knot HJ, Jaggar JH, Damon DH, Bonev AD, Nelson MT. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ signals in cerebral arteries: Ca²⁺ sparks as elementary physiological events. *Circ Res.* 1998;83:1104-14.
- [28] Pluger S, Faulhaber J, Furstenaus M, Lohn M, Waldschutz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O. Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res.* 2000;87:E53-60.
- [29] Yeung SY, Greenwood IA. Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2005;146:585-95.
- [30] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611-22.
- [31] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- [32] Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW. Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther.* 2005;106:347-55.
- [33] Essin K, Welling A, Hofmann F, Luft FC, Gollasch M, Moosmang S. Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca²⁺ sparks in murine arterial smooth muscle cells. *J Physiol.* 2007;584:205-19.
- [34] Yeung SY, Pucovsky V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, Greenwood IA. Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol.* 2007;151:758-70.
- [35] Lagrutta A, Wang J, Fermini B, Salata JJ. Novel, potent inhibitors of human Kv1.5 K⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317:1054-63.
- [36] Pannasch U, Farber K, Nolte C, Blonski M, Yan Chiu S, Messing A, Kettenmann H. The potassium channels Kv1.5 and Kv1.3 modulate distinct functions of microglia. *Mol Cell Neurosci.* 2006;33:401-11.
- [37] Maier U, Babich A, Nurnberg B. Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem.* 1999;274:29311-7.
- [38] Dbouk HA, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo GL, Surve C, Hsueh C, Perisic O, Harteneck C, Shepherd PR, Harden TK, Smrcka AV, Taussig R, Bresnick AR, Nurnberg B, Williams RL, Backer JM. G protein-coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal.* 2012;5:ra89.
- [39] Chaussade C, Rewcastle GW, Kendall JD, Denny WA, Cho K, Gronning LM, Chong ML, Anagnostou SH, Jackson SP, Daniele N, Shepherd PR. Evidence for functional redundancy of class IA PI3K isoforms in insulin signalling. *Biochem J.* 2007;404:449-58.
- [40] Chen TT, Luykenaar KD, Walsh EJ, Walsh MP, Cole WC. Key role of Kv1 channels in vasoregulation. *Circ Res.* 2006;99:53-60.
- [41] Ohanyan V, Yin L, Bardakjian R, Kolz C, Enrick M, Hakobyan T, Kmetz J, Bratz I, Luli J, Nagane M, Khan N, Hou H, Kuppusamy P, Graham J, Fu FK, Janota D, Oyewumi MO, Logan S, Lindner JR, Chilian WM. Requisite Role of Kv1.5 Channels in Coronary Metabolic Dilatation. *Circ Res.* 2015;117:612-21.
- [42] Ciudad P, Novensa L, Garabito M, Batlle M, Dantas AP, Heras M, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Roque M. Erratum to: K(+) Channels Expression in Hypertension After Arterial Injury, and Effect of Selective Kv1.3 Blockade with PAP-1 on Intimal Hyperplasia Formation. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2015;29:199-200.

- [43] Schleifenbaum J, Kassmann M, Szijarto IA, Hercule HC, Tano JY, Weinert S, Heidenreich M, Pathan AR, Anistan YM, Alenina N, Rusch NJ, Bader M, Jentsch TJ, Gollasch M. Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. *Circ Res.* 2014;115:263-72.
- [44] Yang Y, Li J, Lin X, Yang Y, Hong K, Wang L, Liu J, Li L, Yan D, Liang D, Xiao J, Jin H, Wu J, Zhang Y, Chen YH. Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. *J Hum Genet.* 2009;54:277-83.
- [45] Wipff J, Dieude P, Guedj M, Ruiz B, Riemekasten G, Cracowski JL, Matucci-Cerinic M, Melchers I, Humbert M, Hachulla E, Airo P, Diot E, Hunzelmann N, Caramaschi P, Sibilia J, Valentini G, Tiev K, Girerd B, Mouthon L, Ricciari V, Carpentier PH, Distler J, Amoura Z, Tarner I, Degano B, Avouac J, Meyer O, Kahan A, Boileau C, Allanore Y. Association of a KCNA5 gene polymorphism with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the European Caucasian population. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3093-100.
- [46] Machado RD, Southgate L, Eichstaedt CA, Aldred MA, Austin ED, Best DH, Chung WK, Benjamin N, Elliott CG, Eyries M, Fischer C, Graf S, Hinderhofer K, Humbert M, Keiles SB, Loyd JE, Morrell NW, Newman JH, Soubrier F, Trembath RC, Viales RR, Grunig E. Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum Mutat.* 2015;36:1113-27.
- [47] Zhao N, Dong Q, Du LL, Fu XX, Du YM, Liao YH. Potent suppression of Kv1.3 potassium channel and IL-2 secretion by diphenyl phosphine oxide-1 in human T cells. *PLoS One.* 2013;8:e64629.
- [48] Fountain SJ, Cheong A, Flemming R, Mair L, Sivaprasadarao A, Beech DJ. Functional up-regulation of KCNA gene family expression in murine mesenteric resistance artery smooth muscle. *J Physiol.* 2004;556:29-42.
- [49] Lynch FM, Withers SB, Yao Z, Werner ME, Edwards G, Weston AH, Heagerty AM. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304:H786-95.
- [50] Weston AH, Egner I, Dong Y, Porter EL, Heagerty AM, Edwards G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. *Br J Pharmacol.* 2013;169:1500-9.
- [51] Jenkins NT, Padilla J, Thorne PK, Martin JS, Rector RS, Davis JW, Laughlin MH. Transcriptome-wide RNA sequencing analysis of rat skeletal muscle feed arteries. I. Impact of obesity. *J Appl Physiol (1985).* 2014;116:1017-32.
- [52] Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem.* 1992;267:25798-802.
- [53] Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science.* 1995;269:690-3.
- [54] Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:8292-7.
- [55] Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal.* 2011;4:re2.
- [56] Ulu N, Gurdal H, Landheer SW, Duin M, Guc MO, Buikema H, Henning RH. alpha1-Adrenoceptor-mediated contraction of rat aorta is partly mediated via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol.* 2010;161:1301-10.
- [57] Park MS, Kim BR, Dong SM, Lee SH, Kim DY, Rho SB. The antihypertension drug doxazosin inhibits tumor growth and angiogenesis by decreasing VEGFR-2/Akt/mTOR signaling and VEGF and HIF-1alpha expression. *Oncotarget.* 2014;5:4935-44.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich Dmitry Tsvetkov, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von K_v-Kanälen und PI3K-Kinase bei der Regulation des Blutgefäßtonus von Mäusen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Anteilserklärung

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Dmitry Tsvetkov hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: *60 Prozent*

Tsvetkov, D., M. Kassmann, J. Y. Tano, L. Chen, J. Schleifenbaum, J. Voelkl, F. Lang, Y. Huang, and M. Gollasch. (2017). Do KV 7.1 channels contribute to control of arterial vascular tone? *Br J Pharmacol*, 174(2), 150-162. doi:10.1111/bph.13665

Beitrag im Einzelnen: Entwurf von Versuchsprotokollen, Isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Arterien, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes.

Publikation 2: *60 Prozent*

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

Beitrag im Einzelnen: Entwurf von Versuchsprotokollen, Isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Arterien, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes.

Publikation 3: *80 Prozent*

Tsvetkov, D., A. Shymanets, Y. Huang, K. Bucher, R. Piekorz, E. Hirsch, S. Beer-Hammer, C. Harteneck, M. Gollasch, and B. Nurnberg. (2016). Better Understanding of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathways in Vasculature: Towards Precision Therapy Targeting Angiogenesis and Tumor Blood Supply. *Biochemistry (Mosc)*, 81(7), 691-699. doi:10.1134/S0006297916070051

Beitrag im Einzelnen: Entwurf von Versuchsprotokollen, Isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Arterien, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes.

Maik Gollasch _____ Dmitry Tsvetkov _____

Publikation 1: Seite 21-33

Tsvetkov, D., M. Kassmann, J. Y. Tano, L. Chen, J. Schleifenbaum, J. Voelkl, F. Lang, Y. Huang, and M. Gollasch. (2017). Do K_V 7.1 channels contribute to control of arterial vascular tone? *Br J Pharmacol*, 174(2), 150-162. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13665>

Impact Factor: 5.259 ISI Journal Citation Report (2015)

Publikation 2: Seite 34-43

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

Impact Factor: 4.031 ISI Journal Citation Report (2015)

Publikation 3: Seite 44-52

Tsvetkov, D., A. Shymanets, Y. Huang, K. Bucher, R. Piekorz, E. Hirsch, S. Beer-Hammer, C. Harteneck, M. Gollasch, and B. Nurnberg. (2016). Better Understanding of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathways in Vasculature: Towards Precision Therapy Targeting Angiogenesis and Tumor Blood Supply. *Biochemistry (Mosc)*, 81(7), 691-699. <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297916070051>

Impact Factor: 1.421 ISI Journal Citation Report (2015)

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

- Tsvetkov, D.**, M. Kassmann, J. Y. Tano, L. Chen, J. Schleifenbaum, J. Voelkl, F. Lang, Y. Huang, and M. Gollasch. (2017). Do K_V 7.1 channels contribute to control of arterial vascular tone? *Br J Pharmacol*, 174(2), 150-162. doi:10.1111/bph.13665
- Tsvetkov, D.**, J. Y. Tano, M. Kassmann, N. Wang, R. Schubert, and M. Gollasch. (2016). The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone. *Front Physiol*, 7, 335. doi:10.3389/fphys.2016.00335
- Tsvetkov, D.**, A. Shymanets, Y. Huang, K. Bucher, R. Piekorz, E. Hirsch, S. Beer-Hammer, C. Harteneck, M. Gollasch, and B. Nurnberg. (2016). Better Understanding of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathways in Vasculature: Towards Precision Therapy Targeting Angiogenesis and Tumor Blood Supply. *Biochemistry (Mosc)*, 81(7), 691-699. doi:10.1134/S0006297916070051
- Chen, L., M. Kassmann, M. Sendeski, **D. Tsvetkov**, L. Marko, L. Michalick, M. Riehle, W. B. Liedtke, W. M. Kuebler, C. Harteneck, M. Tepel, A. Patzak, and M. Gollasch. (2015). Functional transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential vanilloid 4 channels along different segments of the renal vasculature. *Acta Physiol (Oxf)*, 213(2), 481-491. doi:10.1111/apha.12355

Buchbeitrag

- Tsvetkov D.**, Gollasch M. (2016). "Harrison Innere Medizin- 340 Tubulointerstitielle Nierenerkrankungen," in *Harrisons Innere Medizin Auflage*: 19

Review

- Novikov, P., N. Kozlovskaya, S. Moiseev, E. Shilov, I. Bobkova, A. Schreiber, **D. Tsvetkov**, M. Gollasch, N. Mah, K. El Amrani and A. Kurtz (2016). Therapeutic Complement Targeting in ANCA-Associated Vasculitides and Thrombotic Microangiopathy. *Biomedicine Hub*, 1(3), 7-7.
- Tsvetkov D.**, I.A. Szijártó, N. Wang, J.-Y. Tano, M. Gollasch. (2016). Vascular dysfunction and periadventitial adipose tissue. *Pacific Medical Journal*, No. 2, 31–33. doi:10.17238/1609-1175.2016.2.31

Case Report

- Tsvetkov, D.**, Hohmann, M., Anistan, Y. M., Manna, M., Harteneck, C., Rudolph, B., & Gollasch, M. (2016). A CD2AP Mutation Associated with Focal Segmental Glomerulosclerosis in Young Adulthood. *Clin Med Insights Case Rep*, 9, 15-19. doi:10.4137/CCRep.S30867

Vorträge

Perivascular adipose tissue and vasorelaxation: focus on Kv1.5 and KCNQ channels 40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention 01.-03. Dezember 2016 Berlin; FV 13 ausgewählt als freier Vortrag.

Die CD2AP Mutation p.T374A ist assoziiert mit Demenz und Fokal segmentaler Glomerulosklerose bei einem Patienten im Erwachsenenalter. 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 12.-15. September 2015 Berlin; FV32 ausgewählt als freier Vortrag.

Abstracts/Poster

Tsvetkov, D., A. Shymanets, Y. Huang, K. Bucher, R. Piekorz, E. Hirsch, S. Beer-Hammer, C. Harteneck, M. Gollasch and B. Nurnberg (2016) Putative role of PI3K pathways in alpha-adrenergic vasoconstriction 40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention 01.-03. Dezember 2016 Berlin; P45 ausgewählt als Posterpräsentation.

Tsvetkov, D., M. Kaßmann, J.-Y. Tano, L. Chen, J. Schleifenbaum, J. Voelkl, F. Lang, Y. Huang and M. Gollasch (2016). Do Kv7.1 channels contribute to control of arterial vascular tone? In 39. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V DHL® – Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, 19.-21. November 2015 Saarbrücken; ausgewählt als Posterpräsentation.

Tsvetkov, D., A. Shymanets, Y. Huang, K. Bucher, R. Piekorz, E. Hirsch, S. Beer-Hammer, C. Harteneck, M. Gollasch and B. Nurnberg (2016) Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) Signalweg in der Vaskulatur: Präzisionstherapie bezüglich Angiogenese und Tumorblutversorgung? In: 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 10.-13. September 2016 Berlin, Deutschland; P174 ausgewählt als Posterpräsentation.

Tsvetkov, D., J. Y. Tano, M. Kassmann, N. Wang, R. Schubert and M. Gollasch (2016). Diphenylphosphinoxid-1 (DPO-1) sensitive Kv Kanäle und Regulation des arteriellen Tonus durch perivaskuläres Fett-Gewebe In: 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 10.-13. September 2016 Berlin, Deutschland; P176 ausgewählt als Posterpräsentation.

Tsvetkov D., Hohmann M., Anistan Y. M., Mannaa M., Harteneck C., Rudolph, B., Gollasch M. (2015). A CD2AP Mutation (p.T374A) Associated with Cognitive Decline and Focal Segmental Glomerulosclerosis in Young Adulthood In: Proceedings of the ASN Kidney Week 2015 Annual Meeting, Nov 5-8; San Diego, CA. JASN Supplement 2015; FR-PO021 ausgewählt als Posterpräsentation.

Chen L., Kaßmann M., Sendeski M., **Tsvetkov D.**, Marko L., Michalick L., Riehle M., Wolfgang L., Wolfgang K., Harteneck C., Tepel M., Patzak A., Gollasch M. (2014). Functional TRPV1 and TRPV4 Channels Along Different Segments of the Renal Vasculature In: Proceedings of the ASN Kidney Week 2014 Annual Meeting, Nov 11-16; Philadelphia, PA. JASN Supplement 2014; FR-PO671 ausgewählt als Posterpräsentation.

Chen L., Kaßmann M., Sendeski M., **Tsvetkov D.**, Marko L., Michalick L., Riehle M., Wolfgang L., Wolfgang K., Harteneck C., Tepel M., Patzak A., Gollasch M. (2014). Verteilung funktioneller TRPV1- und TRPV4-Kanäle in verschiedenen Segmenten der renalen Vaskulatur. In: 6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Sept 6-9; Berlin, Deutschland; P259 ausgewählt als Posterpräsentation.

13. Danksagung

Für die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen geht zunächst mein großer Dank an Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch. Ich bin unendlich dankbar für die hervorragende Betreuung, sowie die Unterstützung und Förderung.

Ich möchte dem Team der Arbeitsgruppe Gollasch für die Unterstützung und die wunderbare Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere danke ich Yoland-Marie Anistan, Dr. Mario Kaßmann, Dr. Jean-Yves Tano, Dr. Szijártó István András, Sophie Nickel, Chen Lan, Ning Wang, Xiaoming Lian, Kornelia Buttke, Nadine Wittstruck, die mich während meiner Arbeit im Labor unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Friedrich C. Luft danke ich für die Möglichkeit wissenschaftlich am Experimental and Clinical Research Center (ECRC), mit der besten Verwaltung, arbeiten zu dürfen.

Ich bedanke mich bei allen externen Kooperationspartnern für die großartige Unterstützung, insbesondere Herrn Prof. Bernd Nürnberg, Herrn Prof. Huang Yu, Dr. Lajos Marko und Dr. Jakob Völkl.

Ich möchte mich auch bei meiner Deutschlehrerin Hella Stövesand bedanken, die mir die Schönheit der deutschen Sprache beibrachte.

Bei meinem Vermieter Malte Münte möchte ich mich für die Willkommenskultur und wunderschöne Unterhaltungsminuten bedanken, die ich während meines dreijährigen Aufenthalts erleben durfte.

Meinen Eltern Sergey Tsvetkov und Nataliya Tsvetkova danke ich für ihre liebevolle lebenslange Unterstützung.