

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 KCNQ-Kanälen bei der Regulation des arteriellen Gefäßtonus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Johanna Schleifenbaum

aus Würzburg

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. M. Gollasch
2. Prof. Dr.rer.nat. M. Bünemann
3. Prof. Dr.rer.nat. F. le Noble

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	2
2 Zielstellungen	3
3 Material und Methoden	4
3.1 Tiere.....	4
3.2 Isometrische Kontraktionsmessungen in Ratten- und Mausgefäßen.....	4
3.3 Telemetrische Blutdruckmessung und pharmakologische Tests in SPL-defizienten, NZO- und Kontrollmäusen.....	4
3.4 Western Blots	5
3.5 Genexpressionsanalyse.....	5
3.6 Nierenperfusion	5
3.7 Material.....	5
4 Ergebnisse.....	5
4.1 Projekt 1: Systemische periphere Arterien werden durch KCNQ-Öffner und H ₂ S relaxiert.....	5
4.2 Projekt 2: Unterschiedliche Effekte des CSE-abhängigen H ₂ S in der periadventitiellen Vasoregulation bei Ratten- und Mauseorten	7
4.3 Projekt 3: Spinophilin reguliert den zentralen Angiotensin II-Effekt auf den Blutdruck	7
5 Diskussion	8
6 Referenzen	14
7 Anteilserklärung	18
8 Publikationen	19
9 Lebenslauf	48
10 Publikationsliste.....	49
10.1 Manuskripte	49
10.2 Vorträge	50
10.3 Poster und Abstracts	50
11 Erklärung	52
12 Danksagung	

Zusammenfassung

Adiposithypertonie ist die häufigste sekundäre Hypertonie im Menschen. Die Mechanismen des zugrundeliegenden erhöhten systemischen arteriellen Widerstandes sind nicht ausreichend bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 1) die Rolle von K_v -Kanälen des KCNQ-Subtyps bei der periadventitiellen Gefäßregulation durch das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) untersucht, 2) welche Rolle endogener Schwefelwasserstoff (H_2S) und 3) Spinophilin (SPL) als Regulator des G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR)-Signalwegs bei der Gefäßregulation spielen. Die Untersuchungen fokussierten sich auf Cystathionin- γ -Lyase (CSE), die die Bildung von H_2S aus L-Cystein im PVAT katalysiert, und neuartige KCNQ-Kanalöffner. Es wurden isometrische Kontraktionsmessungen an systemischen Arterien von Ratten und Mäusen sowie telemetrische Blutdruckmessungen durchgeführt. Die Öffnung von KCNQ-Kanälen stellte sich als potenter Mechanismus für die Auslösung einer Vasorelaxation in systemischen Arterien von Ratten und Mäusen heraus, auch spielen die Kanäle eine bedeutende Rolle in der parakrinen Kontrolle des vaskulären Tonus durch PVAT. Eine partielle Modulation durch H_2S scheint vorzuliegen, denn im Falle einer reduzierten H_2S -Freisetzung aus dem PVAT konnten die parakrinen Effekte durch synthetische KCNQ-Kanalöffner nachgeahmt werden. Synthetische KCNQ-Kanalöffner senkten den systemischen Blutdruck in normotensiven und adipösen (New Zealand Obese) Mäusen. CSE- H_2S scheint den ADRF-Effekt nur in Ratten-, nicht aber in Mausearten zu modulieren. Abwesenheit von SPL induzierte eine sympathisch vermittelte arterielle Hypertonie in SPL-gendefizienten (SPL $^{-/-}$) Mäusen. Hier zeigte sich, dass SPL die Angiotensin II (AngII)-vermittelte Aktivierung des sympathischen Nervensystems einschränkt und die vaskuläre Gefäßkontraktion auf AngII nicht beeinflusst. Die vorliegenden Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis von Mechanismen der systemischen Gefäßregulation bei und eröffnen neue Forschungsansätze für zukünftige Studien zu Mechanismen der Adiposithypertonie.

1 Einleitung

KCNQ-Kanäle (K_v7-Kanäle) sind eine Unterfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v)^{1, 2}. Die fünf Subtypen (KCNQ1-5) weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf; im vaskulären System dominieren KCNQ1, 4 und 5³. Eine Beteiligung von KCNQ4 an der Regulation des pulmonären vaskulären Tonus konnte kürzlich nachgewiesen werden^{4, 5}. Pulmonararterien besitzen jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen Arterien kein umgebendes Fettgewebe.

Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT) verringert die kontraktile Antwort auf Noradrenalin und andere Vasokonstriktoren in Ringpräparaten aus isolierten Rattenaorten auf parakrine Weise⁶⁻¹⁰. Dieser antikontraktile Effekt wird durch einen transferablen „Adipocyte derived relaxing factor“ (ADRF)⁸ vermittelt, der in Gefäßmuskelzellen über die Öffnung von K_v-Kanälen eine Membranhyperpolarisation^{7, 8, 10} einleitet, welche wiederum zu einer Vasorelaxation führt (ADRF-K_v-Signalweg)^{7, 10}. Störungen in diesem Signalweg bei Adipositas bzw. Hypertonie gehen mit einer erhöhten vaskulären Reaktivität einher. Der antikontraktile Effekt kann über verschiedene Spezies hinweg in unterschiedlichen Gefäßtypen beobachtet werden^{11, 12}. Wenn auch bereits Proteinbanden bestimmter Größe vorliegen, so ist die molekulare Identität von ADRF dennoch bisher unbekannt. Verschiedene potentielle ADRF-Kandidaten (u. a. Adiponectin, Ang1-7^{13, 14}) wurden bereits vorgeschlagen, ein endgültiger Nachweis fehlt jedoch noch. Die Expression des Schwefelwasserstoff (H₂S)-produzierenden Enzyms Cystathionin-γ-Lyase (CSE) im PVAT^{15, 16} und das vasorelaxierende Potential von H₂S legen eine Rolle im ADRF-K_v-Signalweg nahe¹⁷.

Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation des vaskulären Tonus spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Sie tragen über verschiedene Effekte auf Herz und Vaskulatur zur arteriellen Hypertonie bei. In dieser Hinsicht besonders bedeutsam ist Angiotensin II (AngII), das an den AngII-Rezeptor Typ 1 (AT1R) bindet. Neben renalen und vaskulären Effekten aktiviert AngII bei Applikation in das Hirn auch das sympathische Nervensystem¹⁸⁻²⁰. Die Sympathoexzitation wird teilweise durch die Stimulation neuronaler AT1Rs erreicht²¹. Der molekulare Mechanismus, durch den AngII die sympathische Aktivierung vorantreibt, ist noch nicht komplett verstanden. Proteine wie z.B. Spinophilin (SPL), die die GPCR-Signalstärke und -dauer regulieren, können auch die Sensitivität für AngII beeinflussen und dadurch der arteriellen Hypertonie Vorschub leisten^{22, 23}. SPL interagiert mit GPCRs, u. a. α-adrenergen Rezeptoren^{24, 25}, D2 (Dopamin)-Rezeptoren²⁶ und M1 (muskarinischen Acetylcholin)-Rezeptoren²⁷. SPL scheint einen dualen Effekt auf die GPCR-Regulation zu haben. Es konkurriert mit Arrestin um die GPCR-Bindung, was *in vitro*

und *in vivo* zu einer längeren Signaldauer führt²⁸⁻³⁰. Gegensätzlich dazu bindet SPL direkt an das „Regulator of G protein signaling 2“ (RGS2)-Protein bzw. rekrutiert es an den GPCR-Komplex, was mit einer erhöhten Dephosphorylierungsrate einhergeht²⁵. Hierdurch wird das GPCR-Signal terminiert. Die Deletion des SPL-codierenden Gens in Mäusen ist assoziiert mit erhöhtem Blutdruck, möglicherweise aufgrund eines Anstiegs des zentralsympathischen Tonus³¹.

2 Zielstellungen

Im **ersten Teil** (Projekt 1) der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung vaskulärer KCNQ-Kanäle. Es sollte herausgefunden werden, ob die Öffnung der Kanäle eine Vasorelaxation systemischer peripherer Arterien bewirkt. Hierzu standen neuartige KCNQ-Kanalöffner unterschiedlicher chemischer Struktur zur Verfügung. Es sollte überprüft werden, ob diese Kanäle eine Rolle in der parakrinen Kontrolle des Gefäßtonus durch ADRF spielen und pharmakologische Öffnung von KCNQ-Kanälen den systemischen Blutdruck in der Maus senken kann.

Im **zweiten Teil** (Projekt 2) sollte geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen ADRF und dem gasförmigen Molekül H₂S gibt. Dieser experimentelle Teil diente der Aufklärung der Identität von ADRF. In diesem Teilprojekt sollte zunächst überprüft werden, ob die Freisetzung von H₂S über eine Öffnung von KCNQ-Kanälen zu einer Vasodilatation führen kann. Mögliche Zusammenhänge zwischen H₂S und KCNQ sollten durch die Nachahmung des H₂S-Effekts durch die synthetischen Kanalöffner ermittelt werden. Durch den Einsatz pharmakologischer Blocker sollte hierbei die Freisetzung von H₂S aus dem PVAT inhibiert werden.

Im **dritten Teil** der Arbeit (Projekt 3) wurde überprüft, welchen Einfluss SPL durch die Regulation der AngII-Aktivität auf den systemischen Blutdruck und die Gefäßregulation ausübt. Hierfür stand ein SPL-defizienter Mausstamm zur Verfügung, in dem die AngII-Aktivität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* analysiert wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Die durchgeführten Versuche wurden von der Berliner Tierversuchskommission genehmigt. Verwendet wurden bei Charles River (Berlin/Sulzfeld) erworbene Sprague-Dawley- (SD) Ratten (200-300 g, 6-8 Wochen alt) und C57Bl6-Wildtypmäuse (20-25 g, 8-12 Wochen alt). Aus Zuchtpaaren mit C57Bl6/129SvJ-Hintergrund wurden SPL-defiziente und Wildtypmäuse gezüchtet³², die im Alter von 12-16 Wochen verwendet wurden. Alle Tiere bekamen Standardfutter (0.25% Natrium, SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest) und hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Außerdem kamen männliche New Zealand Obese (NZO) Mäuse (40-60 g, 34 Wochen alt) zum Einsatz, die vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE) Potsdam-Rehbrücke (Dr. R. Kluge) zur Verfügung gestellt wurden. Für Details hierzu siehe Referenz 13.

3.2 Isometrische Kontraktionsmessungen in Ratten- und Mausgefäßen

Es wurden isometrische Kontraktionsstudien an systemischen Arterien aus Ratten und Mäusen durchgeführt. Als H₂S-Donoren dienten NaHS und 5-(4-Hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiol-3-thion (ADTOH). KCNQ-Kanäle wurden durch XE991 inhibiert. Als Blocker für Cystathionin- γ -Lyase (CSE) wurden 4-Propargylglycin (PPG) und β -Cyano-L-alanin (BCA), für Cystathionin- β -Synthase (CBS) 2-Aminooxyacetat (AOAA) verwendet.

3.3 Telemetrische Blutdruckmessung und pharmakologische Tests in SPL-defizienten, NZO- und Kontrollmäusen

SPL-defizienten Mäusen und Kontrolltieren wurden telemetrische Sender implantiert und mittels Minipumpen Angiotensin II (1 mg/kg/d) oder per Sondenfütterung der AT1R- Blocker Valsartan (50 mg/kg/d) zugeführt. Die Aktivität des autonomen Nervensystems wurde durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Trimethaphan, Metoprolol und Atropin bestimmt. Auch die Auswirkungen intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Gabe von AngII auf den Blutdruck SPL-defizienter Tiere und Kontrollmäuse wurde untersucht. In einer weiteren Versuchsserie wurde der systemische Blutdruck in New Zealand Obese (NZO)-Mäusen telemetrisch gemessen. Die Effekte von KCNQ-Kanalöffnern wurden in NZO-Mäusen und Kontrolltieren, u. a. nach Ganglienblockade durch Hexamethonium, analysiert. Hierfür wurde nach einer Stunde Baselinemessung 10 mg/kg Hexamethonium i.p. appliziert. Nach 15 Minuten kontinuierlicher Messung wurde den Tieren entweder 30 mg/kg Retigabine oder

VRX0621688 (jeweils gelöst in 0.9% NaCl mit 0.5% Methylcellulose) i.p. injiziert. Anschließend wurde wiederum eine Stunde kontinuierlich gemessen.

3.4 Western Blots

Für den Nachweis der CSE-Expression wurden frisch präparierte Aorten aus Maus oder Ratte verwendet. Aus SPL-defizienten und Wildtypmäusen wurden Stammhirn, Hypothalamus, Kleinhirn und Hirnrinde isoliert. Die aus den Homogenaten extrahierten Proteine wurden für eine Expressionsanalyse von AT1R, AT2R und SPL verwendet.

3.5 Genexpressionsanalyse

Die Analysen der Genexpression von AT1R, AT2R, AVP, AVP1AR, nNOS und eNOS wurde in Gehirnen von SPL-defizienten und Wildtypmäusen durchgeführt. In Gehirnen von weiteren Wildtypmäusen, die mit Vehikel oder AngII behandelt worden waren, wurde ebenfalls die SPL-Expression gemessen.

3.6 Nierenperfusion

Isolierte Nieren aus männlichen SPL-defizienten und Wildtypmäusen wurden in einer Kammer mittels einer peristaltischen Pumpe bei konstantem Flow (0.9–1.9 ml/min) mit oxygeniertem (95% O₂/5% CO₂) PSS perfundiert³³. Der Pufferlösung wurde während des Experiments AngII oder Phenylephrin zugesetzt.

3.7 Material

Retigabine, VRX0530727, VRX0621238 (ICA-27243) und VRX0621688 wurden von Valeant Research North America (Aliso Viejo, California) zur Verfügung gestellt (siehe auch Schleifenbaum et al 2010; Manuskript ab S.20).

4 Ergebnisse

4.1 Projekt 1: Systemische periphere Arterien werden durch KCNQ-Öffner und H₂S relaxiert

In Mesenterialarterien und Aorten ohne perivaskuläres Fettgewebe (PVAT) induzierten die KCNQ-Kanalöffner Retigabine, VRX0530727, VRX0621238 und VRX0621688 dosisabhängige Vasorelaxationen. VRX0621688 war hierbei am potentesten. Der KCNQ-Kanalblocker XE991 (30 µM) inhibierte sowohl die durch die Substanzen induzierten Vasorelaxationen als auch den antikontraktilen Effekt des PVAT. Die Blocker der

Cystathionin- γ -Lyase (CSE) β -Cyano-L-alanin (BCA, 5 mM) und 4-Propargylglycin (PPG, 10 mM) inhibierten die Relaxationen ebenfalls. Der H₂S-Donor NaHS löste durch XE991 inhibierbare Vasorelaxationen aus. Die vasodilatatorischen Fähigkeiten von Retigabine, VRX0530727, VRX0621238 und VRX0621688 blieben nach einer Inhibition der H₂S-Freisetzung im PVAT erhalten.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 1 findet sich in Schleifenbaum et al. „Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide.“ *Journal of Hypertension*. 2010, 28:1875-1882. Eine Kopie dieser Publikation findet sich ab S.20.

Retigabine und VRX0621688 senkten den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) sowohl in C57BL6-Kontrollmäusen als auch in NZO-Mäusen (Abbildung 1). Die Herzfrequenz wurde dabei nicht beeinflusst. Der blutdrucksenkende Effekt von Retigabine bzw. VRX0621688 war nicht beeinflussbar durch Ganglienblockade mittels Hexamethonium (Abbildung 1).

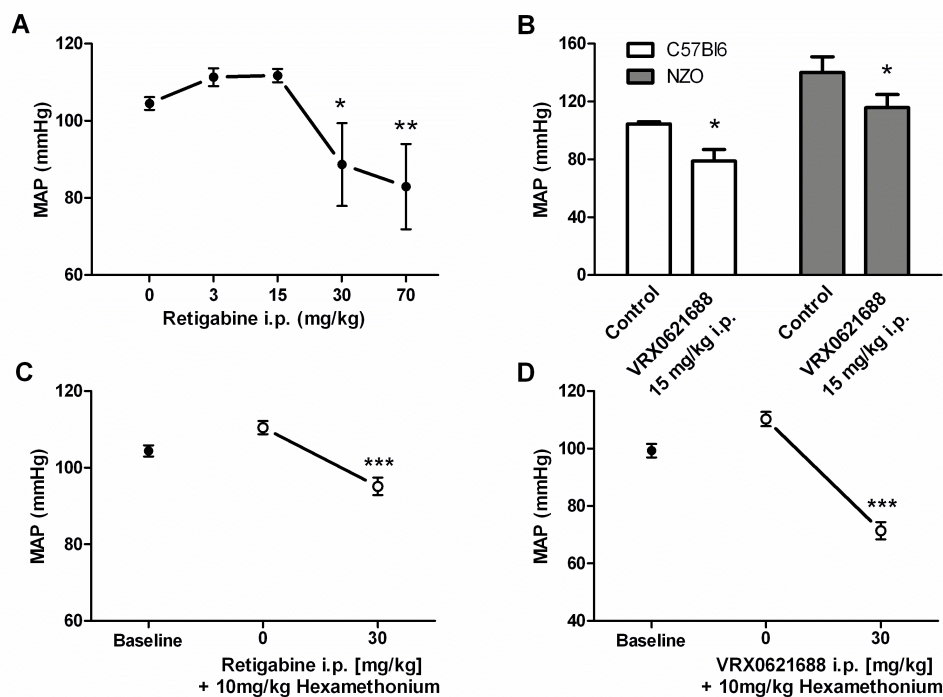


Abbildung 1: Effekte von KCNQ-Kanalöffnern in NZO-Mäusen. (A) Mittlerer arterieller Blutdruck (Mean arterial blood pressure; MAP) in Kontrollmäusen nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von Retigabine. (B) MAP von Kontroll- und NZO-Mäusen nach Injektion von VRX0621688 (15 mg/kg i.p.). MAP von Kontrollmäusen nach Injektion von Retigabine (C) und VRX0621688 (D), 30 mg/kg i.p. jeweils nach Behandlung der Tiere mit 10 mg/kg Hexamethonium; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.005$**

4.2 Projekt 2: Unterschiedliche Effekte des CSE-abhängigen H₂S in der periadventitiellen Vasoregulation bei Ratten- und Mausaorten

NaHS und ADTOH induzierten in Ratten- und Mausaorten eine starke Vasorelaxation, welche durch XE991 inhibiert werden konnte. Das PVAT zeigte in diesen Arterien einen antikontraktilen Effekt, der durch CSE-Blockade mittels BCA und PPG in Rattenaorten reduziert wurde, in Mausaorten hingegen nicht. Eine Blockade der Cystathionin-β-Synthase (CBS) mittels AOAA hatte keinen Einfluss auf den antikontraktilen PVAT-Effekt. XE991 jedoch inhibierte diesen Effekt in beiden Spezies beinahe vollständig. Exogenes L-Cystein, das Substrat für die endogene Produktion von H₂S, induzierte Vasorelaxationen nur in Konzentrationen über 5 mM, was auch durch CSE-Blockade nicht verändert werden konnte.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 2 findet sich in Köhn et al. „Differential effects of cystathionine-γ-lyase-dependent vasodilatory H₂S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas.“ *PLoS ONE*. 2012. Eine Kopie dieser Publikation findet sich ab S.28.

4.3 Projekt 3: Spinophilin reguliert den zentralen Angiotensin II-Effekt auf den Blutdruck

Chronische Infusion von AngII führte zu einer Hochregulation der SPL-Expression im Hypothalamus von Kontrolltieren. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten die SPL-defizienten Mäuse nach Behandlung mit AngII einen größeren Anstieg im diurnalen Blutdruck (19.2±0.8 vs. 13.5±1.6 mmHg, p<0.05) sowie einen größeren Abfall nach Valsartangabe. Trimethaphan und Metoprolol induzierten in mit AngII behandelten SPL-defizienten Tieren einen stärkeren Abfall von Blutdruck und Herzfrequenz als in den ebenso behandelten Kontrolltieren. Auch zeigten die SPL-defizienten Tiere eine stärkere Antwort auf icv. appliziertes AngII. Im Hirnstamm SPL-defizienter Mäuse war die Expression sowohl von AT1R als auch von AT2R reduziert, was aber durch Behandlung mit AngII normalisierbar war. Die renalen Gefäßkontraktionen auf AngII waren normal in SPL-defizienten Tieren.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 3 findet sich in da Costa Goncalves et al. „Spinophilin regulates central angiotensin II-mediated effect on blood pressure.“ *J Mol Med*. (2011) 89: 1219-1229. Eine Kopie dieser Publikation findet sich ab S.37.

5 Diskussion

In dieser Studie wurde mit Hilfe mehrerer strukturell unterschiedlicher KCNQ-Kanalöffner die funktionelle Bedeutung dieser Kaliumkanäle in systemischen peripheren Arterien untersucht. Die drei 3-Aminopyrazole (Retigabine, VRX0530727, VRX0621688) und 2-Chlor-5-[(4,5-difluorbenzoyl)amino]pyridin (VRX0621238) wirkten als potente Vasodilatoren in *A. tibialis*, *A. mesenterica superior* und in *Aorta thoracica*, wobei VRX0621688 am potentesten war. Die Relaxationen konnten durch den KCNQ-Inhibitor XE991 gehemmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass KCNQ-Kanäle in Glattmuskelzellen systemischer peripherer Arterien von Ratten und Mäusen exprimiert werden und durch synthetische Öffner aktiviert werden können. Zuvor wurde bereits in Mesenterialarterien, Aorta, *A. carotis* und *A. femoralis* von Mäusen mRNA von KCNQ1, 4 und 5 detektiert, wobei KCNQ4 dominant war³. Der selektive KCNQ1-Kanalöffner R-L3 und Meclofenaminsäure, eine nichtsteroidale, entzündungshemmende Substanz, die KCNQ2 und 3, nicht aber KCNQ1 aktiviert, verursachten unspezifische Dilatationen³. Diese pharmakologischen Experimente unterstützen zusammengenommen die Idee, dass KCNQ-Kanäle als Zielmoleküle für endogene und synthetische Vasodilatoren dienen, durch deren Aktivierung der periphere arterielle Tonus beeinflusst werden kann. Bemerkenswert ist hierbei, dass K_v -Kanäle wie KCNQ nicht als Zielmoleküle für „Endothelium derived relaxing factors“ (EDRF) sowie Stickstoffmonoxid, Prostazykline und „Endothelium derived hyperpolarization factors“ (EDHF) dienen. Hieraus kann gefolgert werden, dass KCNQ-Kanäle in systemischen peripheren Arterien nicht durch aus dem Endothel freigesetzte physiologische Vasodilatoren angesteuert werden.

Somit lag es nahe, die Rolle der KCNQ-Kanäle bei der Beeinflussung des arteriellen Tonus durch aus dem perivaskulären Fett (PVAT) freigesetztes ADRF zu untersuchen. In Ringpräparaten aus Ratten- und Mauseorten reduziert PVAT die kontraktile Antwort auf verschiedene Vasokonstriktoren wie Serotonin, Phenylephrin und Angiotensin II^{8, 10, 13}. Die Stärke der Reduktion korreliert hierbei mit der Masse des perivaskulären Fettgewebes, das Endothel ist unbeteiligt^{8, 10}. In Experimenten setzt PVAT ADRF in das Organbad frei, wodurch eine Vasorelaxation mittels Öffnung glattmuskulärer Kaliumkanäle induziert wird^{6, 34}. Bei diesen Kanälen handelt es sich um K_v -Kanäle. In Mesenterialarterien und Aorten kann der antikontraktile Effekt des PVAT durch XE991 gehemmt werden (K_v -ADRF-Signalweg)^{10, 13}. Diese Daten legen nahe, dass es sich bei KCNQ-Kanälen um diejenigen K_v -Kanäle handelt, die am ADRF-Effekt beteiligt sind. Bisher wurden KCNQ-Kanäle in A7r5-Zellen (Kulturzellen aus Glattmuskelzellen der Aorta) als Ziel für Vasopressin beschrieben³⁵.

Beteiligte KCNQ-Subtypen sind unbekannt. Weitere Studien mit Gene-Silencing-Technologie könnten jedoch helfen, diese Beobachtungen zu bestätigen und die von ADRF aktivierten KCNQ-Kanalsubtypen zu spezifizieren.

Bislang ist es unserer Arbeitsgruppe nicht gelungen, ADRF aufzureinigen. Es ist möglich, dass es sich bei ADRF um eine gasförmige Verbindung handelt, die während der Aufreinigung in die Atmosphäre flüchtet und deshalb nicht mehr nachweisbar ist. Dass Stickstoffmonoxid (NO) nicht ADRF ist, wurde bereits früher gezeigt^{8, 10}; nun wurde untersucht, ob ein anderes biologisch aktives gasförmiges Molekül wie Schwefelwasserstoff (H₂S) oder Kohlenmonoxid (CO) in Frage kommen könnte. H₂S ist ein Vasorelaxans¹⁷. Es wird u. a. durch das Enzym Cystathionin- γ -Lyase (CSE) generiert, welches im PVAT die Synthese aus L-Cystein katalysiert¹⁵.

In Ringpräparaten aus Rattenaorten inhibierte eine Blockade der CSE durch β -Cyano-L-alanin (BCA) und 4-Propargylglycin (PPG) den antikontraktilen PVAT-Effekt. Exogenes H₂S aus Donoren wie NaHS induzierte eine XE-sensitive Vasorelaxation, die durch Inhibition von KCNQ- und K_{ATP}-Kanälen blockiert wurde. Im Gegensatz dazu hatten die Hämoxigenaseinhibitoren Zinnmesoporphyrin und Zinkdeuteroporphyrin IX keinen Einfluss auf den PVAT-Effekt³⁶. Hämin, ein Substrat der Hämoxigenase, induzierte eine Vasodilatation in Tibial- und Mesenterialarterien, die weder durch XE991 noch durch 4-AP und Iberiotoxin, einen Blocker des Ca²⁺-aktivierten BK-Kanals, gehemmt werden konnte³⁷. Dies ist bemerkenswert, da in Hirnarterien durch Astrozyten freigesetztes CO eine Vasodilatation mittels BK-Kanalöffnung auslösen kann³⁸. Die Daten deuten an, dass H₂S in Rattenaorten als Kandidat bzw. Modulator von ADRF KCNQ-Kanäle aktivieren kann, die in die parakrine Regulation des Gefäßtonus durch PVAT involviert sind.

Als nächstes wurde nun untersucht, ob KCNQ-Kanalöffner eine gefäßerweiternde Kapazität bei verminderter H₂S-Freisetzung aus dem PVAT haben. CSE wurde mittels BCA gehemmt. Es stellte sich heraus, dass alle vier Substanzen, nämlich Retigabine, VRX0530727, VRX0621238 und VRX0621688, ihre gefäßerweiternde Kapazität bewahren konnten. Retigabine und VRX0621688 senkten den systemischen Blutdruck bei Adipositashypertonie in der Maus (NZO-Mäuse); diese Effekte waren auch nach Ganglienblockade zu beobachten. Diese Daten zeigen, dass KCNQ-Kanäle in glatten Muskelzellen als wichtige Zielmoleküle für eine antihypertensive Therapie dienen können, u. a. wenn die Produktion von H₂S (ADRF) im PVAT vermindert ist. KCNQ-Kanäle stellen aufgrund ihrer Präsenz in Glattmuskelzellen systemischer peripherer Arterien, ihrer Regulation durch ADRF (H₂S) und der Fehlfunktion des ADRF-KCNQ-Signalwegs in einer Hypertonie vielversprechende

neuartige antihypertensive Zielmoleküle dar. Eine Fehlfunktion des ADRF-KCNQ-Signalwegs ist ein Kennzeichen der vaskulären Dysfunktion bei verschiedenen Formen der systemischen arteriellen Hypertonie³⁹.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in alternden Ratten die endogene H₂S-Produktion in Aortengewebe und isoliertem PVAT reduziert, die CSE-Expression hingegen erhöht war⁴⁰. In spontan hypertensiven Ratten (SHR) waren Genexpression und Aktivität von CSE in der thorakalen Aorta verschwindend gering, wobei die Plasmaspiegel von H₂S verringert waren⁴¹. Auch ADRF zeigt mit zunehmendem Alter der Tiere Funktionsstörungen in SHR-Ratten und adipösen New Zealand Obese-Mäusen (NZO)^{13, 39, 42}. Obwohl in diesen Tiermodellen weder CSE-Expression noch endogene H₂S-Produktion untersucht wurden, tragen die Ergebnisse zur Vorstellung bei, dass eine Fehlfunktion des CSE/H₂S-Signalwegs an der Pathogenese der Hypertonie beteiligt sein könnte. Mit Stickstoffmonoxid als Vorreiter stehen nun Gasmoleküle wie H₂S im Blickpunkt aktueller Herz-Kreislaufforschung.

Der Mechanismus der KCNQ-Kanalaktivierung durch endogenes H₂S aus PVAT ist unklar. Es scheint möglich, dass H₂S die Kanäle direkt aktiviert. Alternativ kann H₂S Sulphydrylradikale produzieren [HS(*)/S*(-)], wahrscheinlich gekoppelt mit der Bildung von Superoxidradikalanionen⁴³, die potente Stimulatoren von KCNQ-Kanälen sind⁴⁴. Weitere Studien sind erforderlich, um die KCNQ-Kanalaktivierung durch H₂S zu zeigen und die molekularen Mechanismen der Aktivierung aufzuklären.

Die hier erhobenen Daten stellen allerdings infrage, ob CSE-H₂S auch in Aorten von Mäusen ein primärer ADRF-Kandidat ist. Die CSE-Inhibition durch PPG hatte in Mauseorten keinen Einfluss auf den antikontraktilen Effekt von PVAT, was ein Gegensatz zu den Befunden in Rattenaorten ist. Cystathionin-β-synthase (CBS) ist ein weiteres Enzym, das die Bildung von H₂S katalysiert^{45, 46}. Die Hemmung von CBS zeigte auch keinen Einfluss auf den Effekt von ADRF in Mauseorten. Jedoch war exogenes H₂S in der Lage, eine starke Vasorelaxation zu induzieren. Ähnlich wie bei Rattenaorten wurde dieser Effekt durch KCNQ-Kanalblockade mit XE991 inhibiert.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten zusammengenommen darauf hin, dass endogenes, durch CSE (oder CBS) generiertes H₂S in Mauseorten nicht am antikontraktilen PVAT-Effekt beteiligt ist. Die Daten schließen allerdings die Möglichkeit nicht aus, dass von externen, nichtvaskulären Quellen wie 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3MST)⁴⁷ oder roten Blutkörperchen⁴⁸ erzeugtes H₂S den Gefäßtonus von Mauseorten modulieren kann.

Hemmung von XE991-sensitiven KCNQ-Kanälen reduzierte die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fetts sowohl in Ratten- als auch in Mauseorten, was darauf

hindeutet, dass es sich bei Öffnung dieser Kanäle um einen gemeinsamen Mechanismus des ADRF handelt. Außerdem wurde die H₂S-induzierte Relaxation in Ratten- und Mauseorten fast vollständig durch XE991 gehemmt. Somit könnte KCNQ-Kanalöffnung einen wichtigen Mechanismus darstellen für das Induzieren einer Vasorelaxation bei mit Fehlfunktionen des ADRF assoziierter Hypertonie, Diabetes und Adipositas, auch könnte es ein vielversprechendes neues Zielmolekül für die Entwicklung neuartiger therapeutischer Strategien bei kardiovaskulären Erkrankungen sein.

Offensichtlich gibt es Unterschiede in der CSE-Expression in verschiedenen Gefäßen. Bisher wurde eine signifikante CSE-Expression in periadventitiellen Adipozyten und glatten Muskelzellen nachgewiesen, nicht aber im Endothel von Rattenaorten⁴⁰, während in Mauseorten eine CSE-Expression im Endothel, nicht aber in glatten Muskelzellen gefunden wurde¹⁷. Die Expression der CSE im PVAT von Mäusen wurde bisher nicht untersucht. Dennoch zeigen die funktionellen Studien, dass CSE-H₂S nicht an den antikontraktile Effekten von PVAT in Mauseorten beteiligt ist. Die Daten unterstützen die Vorstellung, dass, zumindest in der Mauseorta, CSE-H₂S nicht als primäres ADRF fungiert, sondern es sich wohl eher um einen ADRF-Modulator handelt. Bei der Interpretation der Daten müssen die starken Limitierungen der verfügbaren CSE-Hemmer und potenzielle Nebenwirkungen im Auge behalten werden. So werden künftig genetische Ansätze erforderlich sein, um die komplexe Interaktion zwischen perivaskulärem Fett und Schwefelwasserstoff zu untersuchen. CSE-defiziente Mäuse wurden kürzlich entwickelt und können in weiteren Studien hilfreich sein^{17, 46}.

In dieser Studie induzierte ADTOH (100 nM) eine Relaxation von mehr als 95%. ADTOH ist ein Dithiol-3-thion-Bestandteil des H₂S-freisetzenden Aspirins. ADTOH kann allerdings nicht nur H₂S freisetzen, sondern auch die Thromboxan A₂-Aktivität⁴⁹ unterdrücken. Frühere Studien untersuchten bereits verschiedene proinflammatorische Zytokine, die während einer Ischämie und Hypoxie durch das PVAT sezerniert werden. Diese Studien identifizierten die Beteiligung von Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, IL-1, IL-6, TNF- α und C-reaktives Protein (CRP)^{50, 51}. Zusätzliche Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht oxidativen Stress, der in Kombination mit einer Entzündung vaskuläre Dysfunktionen verstärken kann⁵². Es wurde bereits gezeigt, dass Fehlfunktionen des Fettgewebes bei Adipositas mit der Freisetzung von Thromboxan A₂ und anderen proinflammatorischen Molekülen verbunden ist⁵¹. Daher hat diese Studie nicht nur Auskunft über H₂S als potenten ADRF-Modulator gegeben, sondern präsentiert eine neuartige Verbindung zwischen seiner gefäßerweiternden und entzündungshemmenden Funktion bei

ADRF-Fehlfunktionen. Deshalb unterstützt diese Studie die Idee, dass neue H₂S-freisetzende Hybride wie ADTOH von Interesse sein könnten als Substanzen, die der Progression von vaskulärer Dysfunktion bei Herz-Kreislaufkrankungen und Bluthochdruck entgegenstehen.

In dieser Studie wurde untersucht, ob SPL den Blutdruck senkt, indem es über AngII-Rezeptor Subtyp 1 (AT1R)/ Angiotensin II (AngII)-Signalwege den zentralen sympathischen Antrieb dämpft und ob vaskuläre Mechanismen beteiligt sind. Die wichtigste Beobachtung hierbei war die durch intraperitoneale Infusion von AngII induzierte Hochregulation der SPL-Expression im Hypothalamus von Wildtypmäusen. Sowohl systemisches und intracerebroventrikulär appliziertes AngII als auch systemische Gabe des AT1R-Blockers Valsartan induzierten eine größere Veränderung des Blutdrucks in SPL-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch der durch den Ganglienblocker Trimethaphan verursachte Blutdruckabfall sowie die Abnahme der Herzfrequenz als Reaktion auf den selektiven β_1 -Rezeptorblocker Metoprolol waren in den mit AngII behandelten SPL-defizienten Tieren stärker als in ebenso behandelten Kontrollen. Diese Daten deuten darauf hin, dass SPL den zentralnervös vermittelten Pressoreffekt von AngII abschwächt. Vaskuläre Mechanismen spielen eine untergeordnete Rolle. Der gezeigte, durch sympathische Aktivierung induzierte Blutdruckanstieg in SPL-defizienten Mäusen führte zu der Hypothese, dass der regulierende Einfluss von SPL auf den pressorischen Effekt von AngII zentral vermittelt sein könnte.

Um diese These zu beweisen wurden pharmakologische Ansätze zur Bestimmung der Aktivität des vegetativen Nervensystems verwendet. Chronisch mit AngII infundierte SPL-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte zentralsympathische Aktivität, was durch eine im Vergleich zu Kontrollmäusen stärker ausgeprägte blutdrucksenkende und bradykarde Reaktion auf Trimethaphan nachweisbar war. Dies legt nahe, dass systemisches AngII den Blutdruck teilweise durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems erhöht. In Anwesenheit von SPL ist diese Reaktion gedämpft. Die Interpretation der Ergebnisse ist womöglich dadurch limitiert, dass die Tätigkeit des sympathischen Nervensystems nur indirekt gezeigt wurde. Allerdings war eine gleichzeitige Erhöhung von Blutdruck und Herzfrequenz, typischerweise auftretend bei Aktivierung des zentralen Sympathikus^{53, 54}, in AngII-behandelten SPL-defizienten, nicht aber in den ebenso behandelten Kontrolltieren beobachtbar. Hierdurch wird die Hypothese weiter unterstützt.

Bereits früher wurde gezeigt, dass die AngII-induzierte Vasokonstriktion isolierter Mesenterialarterien aus SPL-defizienten Mäusen ähnlich der aus Kontrolltieren ist³¹. In dieser

Studie wurde nun der durch AngII und Phenylephrin verursachte Anstieg des renalen Perfusionsdrucks unter Verwendung isolierter Nieren aus SPL-defizienten und Kontrollmäusen gemessen. Hier gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen. Tendenziell war die Antwort auf AngII in den isolierten Nieren SPL-defizienter Tiere zwar größer, allerdings war diese Beobachtung statistisch nicht signifikant. Dieser Befund legt nahe, dass SPL kein wichtiger Regulator der AT1R-Aktivität in systemischen peripheren Arterien der Maus ist. In RGS2-defizienten Tieren waren durch AngII induzierte myogener Tonus und Vasoreaktivität erhöht in isolierten renalen Interlobararterien⁵⁵. Diese Mäuse zeigten auch eine im Vergleich zu Wildtypmäusen mit langandauernder Vasokonstriktion einhergehende Hypertonie⁵⁶, ebenso wie einen größeren Blutdruckanstieg bei chronischer AngII-Gabe⁵⁵. Darüber hinaus war die renale sympathische Aktivität abgeschwächt, während Plasmaspiegel von Norepinephrin und Steigerung des sympathischen Baroreflexes in beiden Stämmen ähnlich war⁵⁷. Also scheinen die peripheren Effekte des AngII durch RGS2 reguliert zu werden, während bei der zentralnervösen Wirkung von AngII SPL eine wichtigere Rolle bei der Regulation des Blutdrucks spielt. Es ist unbekannt, ob ADRF-Effekte durch SPL reguliert werden. Durch die Daten kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass SPL Ang II-induzierte antinatriuretische Effekte oder Effekte auf andere GPCRs im zentralen Nervensystem moduliert. Der größere Blutdruckanstieg nach AngII-Gabe in SPL-defizienten Mäusen ist möglicherweise auf eine erhöhte Expression und/oder Aktivität von AT1R zurückzuführen. Vor kurzem wurde mit Hilfe eines neuronalen CATH.a- Zellmodells gezeigt, dass sich durch AngII eine Hochregulation von AT1R induzieren lässt⁵⁸. Desweiteren führte chronische Infusion von AngII zu einer Erhöhung des AT1R-mRNA-Levels in der rostralen ventrolateralen Medulla (RVLM), aber zu einer Reduktion im Subfornikalorgan⁵⁹. Dies führt zu der Annahme, dass AT1R nach AngII-Stimulation im Hirn unterschiedlich reguliert wird. Mit diesen Daten einhergehend wurde auch eine unterschiedliche Regulation von AT1R in SPL-defizienten Mäusen und nach chronischer Ang II-Infusion beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Produkt des Gens *spl* die Reaktion des Blutdrucks auf AngII dämpft; dieses Phänomen beruht zumindest teilweise auf der Dämpfung der zentral generierten sympathischen Aktivität und findet ohne Beteiligung von direkten vaskulären Mechanismen statt. Weiterhin unterstützen die Ergebnisse die Idee, dass GPCR-regulierende Proteine wichtig sind für die Kontrolle des Blutdrucks, besonders bei AngII-vermittelter Hypertonie. Tatsächlich führt die Deletion von RGS2 zu AngII-abhängiger Hypertonie, wohl durch Erhöhung der Sensitivität von AT1R auf AngII⁵⁵. Im

paraventriculären Nukleus hat AT1R eine erregende Wirkung auf die renale sympathische Nervenentladung und erhöht so den Blutdruck²⁰. Die Deletion von SPL sensibilisiert vermutlich AT1R für AngII, was sympathoexzitatorisch wirkt. Bisher wurden noch keine Interaktionen von SPL und GPCRs in der kardiovaskulären Regulation beschrieben. Die Befunde sind klinisch relevant, da eine Dysfunktion von SPL zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen könnte. SPL sollte als Zielmolekül neu zu entwickelnder pharmakologischer Mittel zur Behandlung arterieller Hypertonie und begleitender kardiovaskulärer Erkrankungen in Erwägung gezogen werden.

6 Referenzen

1. Brown DA, Passmore GM. Neural *kcq* (kv7) channels. *Br J Pharmacol*. 2009;156:1185-1195
2. Jentsch TJ. Neuronal *kcq* potassium channels: Physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1:21-30
3. 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;151:758-770
4. Joshi S, Balan P, Gurney AM. Pulmonary vasoconstrictor action of *kcq* potassium channel blockers. *Respir Res*. 2006;7:31
5. Joshi S, Sedivy V, Hodyc D, Herget J, Gurney AM. *Kc*q modulators reveal a key role for *kcq* potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329:368-376
6. Dubrovskaja G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of *adrf* release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1107-1113
7. Gollasch M, Dubrovskaja G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:647-653
8. Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002;16:1057-1063
9. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A*. 1991;13:277-296
10. Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 2004;44:271-276
11. Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol*. 2012;165:633-642
12. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: More than just structural support. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122:1-12
13. Fesus G, Dubrovskaja G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007;75:719-727
14. Lee RM, Lu C, Su LY, Gao YJ. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertens*. 2009;27:782-790
15. Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380:153-159

16. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Atanasova P, Chalakov GN, Chylinska-Kula B, Beltowski J. Differential effects of statins on endogenous h2s formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacol Res.* 2011;63:68-76
17. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H2s as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *SCIENCE.* 2008;322:587-590
18. Zucker IH. Brain angiotensin ii: New insights into its role in sympathetic regulation. *Circ Res.* 2002;90:503-505
19. Zucker IH, Wang W, Pliquett RU, Liu JL, Patel KP. The regulation of sympathetic outflow in heart failure. The roles of angiotensin ii, nitric oxide, and exercise training. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;940:431-443
20. Li YF, Wang W, Mayhan WG, Patel KP. Angiotensin-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the pvn: Role of nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290:R1035-1043
21. Rabbitts JA, Strom NA, Sawyer JR, Curry TB, Dietz NM, Roberts SK, Kingsley-Berg SM, Charkoudian N. Influence of endogenous angiotensin ii on control of sympathetic nerve activity in human dehydration. *J Physiol.* 2009;587:5441-5449
22. Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, Chidiac P. Rgs proteins have a signalling complex: Interactions between rgs proteins and gpcrs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal.* 2006;18:579-591
23. Brady AE, Limbird LE. G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal.* 2002;14:297-309
24. Richman JG, Brady AE, Wang Q, Hensel JL, Colbran RJ, Limbird LE. Agonist-regulated interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. *J Biol Chem.* 2001;276:15003-15008
25. Wang X, Zeng W, Soyombo AA, Tang W, Ross EM, Barnes AP, Milgram SL, Penninger JM, Allen PB, Greengard P, Muallem S. Spinophilin regulates ca2+ signalling by binding the n-terminal domain of rgs2 and the third intracellular loop of g-protein-coupled receptors. *Nat Cell Biol.* 2005;7:405-411
26. Smith FD, Oxford GS, Milgram SL. Association of the d2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J Biol Chem.* 1999;274:19894-19900
27. Bernstein LS, Ramineni S, Hague C, Cladman W, Chidiac P, Levey AI, Hepler JR. Rgs2 binds directly and selectively to the m1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate gq/11alpha signaling. *J Biol Chem.* 2004;279:21248-21256
28. Kimura T, Allen PB, Nairn AC, Caplan MJ. Arrestins and spinophilin competitively regulate na+,k+-atpase trafficking through association with a large cytoplasmic loop of the na+,k+-atpase. *Mol Biol Cell.* 2007;18:4508-4518
29. Wang Q, Limbird LE. Regulated interactions of the alpha 2a adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3. *J Biol Chem.* 2002;277:50589-50596
30. Wang Q, Zhao J, Brady AE, Feng J, Allen PB, Lefkowitz RJ, Greengard P, Limbird LE. Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at g protein-coupled receptors. *SCIENCE.* 2004;304:1940-1944
31. da Costa-Goncalves AC, Tank J, Plehm R, Diedrich A, Todiras M, Gollasch M, Heuser A, Wellner M, Bader M, Jordan J, Luft FC, Gross V. Role of the multidomain protein spinophilin in blood pressure and cardiac function regulation. *Hypertension.* 2008;52:702-707
32. Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9287-9292

33. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J*. 2008;27:3092-3103
34. Gao YJ, Zeng ZH, Teoh K, Sharma AM, Abouzahr L, Cybulsky I, Lamy A, Semelhago L, Lee RM. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1130-1136
35. Brueggemann LI, Moran CJ, Barakat JA, Yeh JZ, Cribbs LL, Byron KL. Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase c-dependent inhibition of kcnq5 in a7r5 rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1352-1363
36. Gollasch M, Dubrovskaja, G. Adventitia-derived relaxing factor. *MOVD 2009; 1:SSY-5; 96*. 2009
37. Essin KS, J.; Luft, F. C.; Gollasch M. Carbon monoxide targets the poreforming bk alpha subunit in vascular smooth muscle ca2+ activated large- conductance k+ channels. *FASEB J* 2008; 22: 1206.1205. 2008
38. Li A, Xi Q, Umstot ES, Bellner L, Schwartzman ML, Jaggar JH, Leffler CW. Astrocyte-derived co is a diffusible messenger that mediates glutamate-induced cerebral arteriolar dilation by activating smooth muscle cell kca channels. *Circ Res*. 2008;102:234-241
39. 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;26:1297-1302
40. Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C, Liu X, Geng B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens*. 2009;27:2174-2185
41. Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:22-27
42. Galvez-Prieto B, Dubrovskaja G, Cano MV, Delgado M, Aranguiz I, Gonzalez MC, Ruiz-Gayo M, Gollasch M, Fernandez-Alfonso MS. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2008;31:1415-1423
43. Stasko A, Brezova V, Zalibera M, Biskupic S, Ondrias K. Electron transfer: A primary step in the reactions of sodium hydrosulphide, an h2s/hs(-) donor. *Free Radic Res*. 2009;43:581-593
44. Gamper N, Zaika O, Li Y, Martin P, Hernandez CC, Perez MR, Wang AY, Jaffe DB, Shapiro MS. Oxidative modification of m-type k(+) channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *EMBO J*. 2006;25:4996-5004
45. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:917-935
46. Ishii I, Akahoshi N, Yamada H, Nakano S, Izumi T, Suematsu M. Cystathionine gamma-lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *J Biol Chem*. 2010;285:26358-26368
47. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem*. 2009;146:623-626
48. Zhao J, Fang LP, Xu GY, Tang CS, Geng B. [assay of endogenous hydrogen sulfide from erythrocytes]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2007;39:449-452
49. Giustarini D, Del Soldato P, Sparatore A, Rossi R. Modulation of thiol homeostasis induced by h2s-releasing aspirin. *Free Radic Biol Med*. 2010;48:1263-1272

50. 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;119:1661-1670
51. Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res*. 2010;33:386-393
52. Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese c57bl/6 mice. *Circulation Journal*. 2010;74:1479-1487
53. Samson WK, Bagley SL, Ferguson AV, White MM. Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: Role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R382-387
54. Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*. 2011;184:64-74
55. Hercule HC, Tank J, Plehm R, Wellner M, da Costa Goncalves AC, Gollasch M, Diedrich A, Jordan J, Luft FC, Gross V. Regulator of g protein signalling 2 ameliorates angiotensin ii-induced hypertension in mice. *Exp Physiol*. 2007;92:1014-1022
56. Heximer SP. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in rgs2-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111:445-452
57. Tank J, Obst M, Diedrich A, Brychta RJ, Blumer KJ, Heusser K, Jordan J, Luft FC, Gross V. Sympathetic nerve traffic and circulating norepinephrine levels in rgs2-deficient mice. *Auton Neurosci*. 2007;136:52-57
58. Mitra AK, Gao L, Zucker IH. Angiotensin ii-induced upregulation of at(1) receptor expression: Sequential activation of nf-kappab and elk-1 in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299:C561-569
59. Nunes FC, Braga VA. Chronic angiotensin ii infusion modulates angiotensin ii type i receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12:440-445

7 Anteilserklärung

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, Dubrovskaja G, Zavaritskaja O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R and Gollasch M, "Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide", Journal of Hypertension, 2010, 28:1875-1882

65 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf von Versuchsprotokollen, Isometrische Kontraktionsmessungen an Mausexperimenten, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes, Interpretation der Ergebnisse.

Publikation 2:

Köhn C, **Schleifenbaum J**, Szijarto IA, Marko L, Dubrovskaja G, Huang Y, Gollasch M, „Differential effects of cystathionine- γ -lyase-dependent vasodilatory H₂S in periaortic vasoregulation of rat and mouse aortas“, PLoS ONE, 2012; 7 (8) e41951

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf und Design von Versuchsprotokollen, Isometrische Kontraktionsmessungen an Rattenaorten, Auswertung und Interpretation der Daten, Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes, Interpretation der Ergebnisse.

Publikation 3:

da Costa Goncalves AC, Fontes MA, Klusmann E, Qadri F, Janke J, Gollasch M, **Schleifenbaum J**, Müller D, Jordan J, Tank J, Luft FC, Gross V, „Spinophilin regulates central angiotensin II-mediated effect on blood pressure“, Journal of Molecular Medicine, 2011, 89:1219-1229

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf und Design von Versuchsprotokollen, Messung, Analyse und Interpretation der AngiotensinII- und Phenylephrinantworten in isolierten perfundierten Nieren und an Arterien aus SPL- defizienten Mäusen und Kontrolltieren. Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripttextes, Interpretation der Ergebnisse.

Johanna Schleifenbaum

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch

8 Publikationen

Publikation 1 (Seite 20-27):

Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, Dubrovskaja G, Zavaritskaja O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R and Gollasch M, "Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide", Journal of Hypertension, 2010, 28:1875-1882

ISI Impact Factor: 4.021

Publikation 2 (Seite 28-36):

Köhn C, **Schleifenbaum J**, Szijarto IA, Marko L, Dubrovskaja G, Huang Y, Gollasch M, „Differential effects of cystathionine- γ -lyase-dependent vasodilatory H₂S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas"; PLoS ONE, 2012, 7(8): e1951

ISI Impact Factor: 4.092

Publikation 3 (S.37-47):

da Costa Goncalves AC, Fontes MA, Klusmann E, Qadri F, Janke J, Gollasch M, **Schleifenbaum J**, Müller D, Jordan J, Tank J, Luft FC, Gross V, „Spinophilin regulates central angiotensin II-mediated effect on blood pressure", Journal of Molecular Medicine, 2011, 89:1219-1229

ISI Impact Factor: 4.668

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

10.1 Manuskripte

Veröffentlicht

Köhn C, **Schleifenbaum J**, Szijarto IA, Marko L, Dubrovskaja G, Huang Y, Gollasch M, „Differential effects of cystathionine- γ -lyase-dependent vasodilatory H₂S in periaortic vasoregulation of rat and mouse aortas.“, PLoS ONE, 2012, 7(8): e1951

da Costa Goncalves AC, Fontes MA, Klusmann E, Qadri F, Janke J, Gollasch M, **Schleifenbaum J**, Müller D, Jordan J, Tank J, Luft FC, Gross V, „Spinophilin regulates central angiotensin II-mediated effect on blood pressure.“, Journal of Molecular Medicine, 2011, 89:1219-1229

Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, Dubrovskaja G, Zavaritskaya O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R and Gollasch M, “Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide.“, Journal of Hypertension, 2010, 28:1875-1882

Akzeptiert

Zavaritskaya O, Zhuravleva N, **Schleifenbaum J**, Gloe T, Devermann L, Kluge R, Mladenov M, Gagov H, Fesüs G, Crean CS, Gollasch M, Schubert R “Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periaortic vascular dysfunction.” *akzeptiert von Hypertension*

In Vorbereitung/ Revision

Schleifenbaum J, Hercule HC, Kassmann M, Anistan YM, Alenina N, Luft FC, Bader M, Gollasch M, “Angiotensin II type 1a receptors coupled to Gq/11 proteins control myogenic tone of resistance arteries.” *in Vorbereitung*

Cristofaro B, Shi Y, Faria M, Suchting S, Leroyer A, Trindade A, Duarte A, Zovein A, Iruela-Arispe L, Nih L, Kubis N, Henrion D, Loufrani L, Todiras M, **Schleifenbaum J**, Gollasch M, Zhuang Z, Simons M, Eichmann A, “Dll4-Notch signaling modulates arteriogenesis and functional recovery in arterial occlusion models in mice.” *in Revision*

10.2 Vorträge

“Angiotensin II type 1a receptors coupled to Gq/11 proteins control myogenic resistance arterial tone.”, Wollenberger-Seminarreihe, MDC Berlin, 2012

“Role of KCNQ channels, H₂S and leptin in periadventitial regulation of visceral arteries.”, 10. International Symposium on Resistance Arteries, Rebild, Dänemark, 2011 (Reisestipendium)

“KCNQ channel openers and hydrogen sulfide mediate relaxation of systemic peripheral arteries.”, Hypertonie Berlin, 2010

“Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulphide.”, Smooth Muscle Meeting, Lübeck, 2009

„GRK2/3 increase the distance between Gαq and Gβγ subunits during activation.”, 48th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Mainz, 2007

10.3 Poster und Abstracts

Schleifenbaum J; Hercule HC; Kaßmann M; Anistan YM; Alenina N; Luft FC; Bader M; Gollasch M, „Regulation of myogenic tone in small resistance arteries by Gq protein-coupled angiotensin II type 1a receptors.“, 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg, 2012

Köhn C; **Schleifenbaum J**; Szijarto IA; Dubrovskaja G; Huang Y; Gollasch M, “Differentielle Effekte des Cystathion-gamma-Lyase-abhängigen H₂S bei der periadventitiellen Vasoregulation von Ratten- und Mauseortenringen.“, 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg, 2012

Zavaritskaya O; Zhuravleva N; **Schleifenbaum J**; Gloe T; Kluge R; Mladenov M; Gagov H; Fesüs G; Gollasch M; Schubert R, “Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction.”, 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg, 2012

Schleifenbaum J, Hercule HC, Kassmann M, Anistan Y, Alenina N, Luft FC, Bader M, Gollasch M, “Essential role of angiotensin II type 1a receptors in control of myogenic resistance arterial tone.”, Force Transduction and Emerging Ion Channels 2012, Berlin

Schleifenbaum J, Hercule HC, Kassmann M, Anistan YM, Alenina N, Luft FC, Bader M, Gollasch M, “Angiotensin II Type 1a receptors (AT1aR) coupled to Gq/11 proteins regulate myogenic tone of resistance arteries.”, HBPR 2011, Orlando, Florida, USA

Schleifenbaum J, Zavaritskaya O, Voblova N, Gloe T, Kluge R, Mladenov M, Gagov H, Fesüs G, Crean CS, Gollasch M, Schubert R, “Opening of KCNQ channels improves periadventitial dysfunction and associated hypertension.”, Hypertonie Berlin, 2010

Schleifenbaum J, Zavaritskaya O, Voblova N, Gloe T, Kluge R, Mladenov M, Gagov H, Fesüs G, Crean C, Gollasch M, Schubert R, „Role of KCNQ channels in impaired periadventitial vasoregulation and associated hypertension.”, HBPR 2010, Washington DC, USA

Schleifenbaum J, Köhn 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.“, HBPR 2010, Washington DC, USA

Zavaritskaya O, Voblova N, **Schleifenbaum J**, Gloe T, Kluge R, Fesüs G, Gross V, Crean C, Gollasch M & Schubert R, “Vascular and antihypertensive effects of synthetic KCNQ channel openers in SHR rats and NZO mice.”, Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies Copenhagen, Denmark, 2010

Essin K, **Schleifenbaum J**, Luft FC, Gollasch M, “Carbon monoxide targets the pore-forming BK alpha subunit in vascular smooth muscle Ca²⁺-activated large-conductance K⁺ channels.” FASEB J 22: 1206.5–1206, 2008

Schleifenbaum J, Kreile AK, Lohse MJ, Bünemann M, “G protein coupled receptor kinase 2/3 separate G α q and G $\beta\gamma$ subunits during G protein activation.“, Biophysical Journal, Vol. 94, Issue 2, 665-667

11 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Johanna Schleifenbaum, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die Rolle von KCNQ-Kanälen bei der Regulation des arteriellen Gefäßtonus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift