

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

DISSERTATION

Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett:  
H<sub>2</sub>S, Cystathionin  $\gamma$ -Lyase und Kaliumkanäle

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Köhn  
aus Rostock

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

Datum der Promotion: 23.06.2013

## **Abstract (english)**

The metabolic syndrome plays an increasing role in daily clinical procedure as well as in clinical research. Many cardiovascular risks – among this arterial hypertension – go along with the metabolic syndrome. As late as in the 1990ies first papers reported the importance of visceral fat in the regulation of vascular tone. Löhn et al. first showed that adipokines mediate the vascular tone in a paracrine manner. Research has shown that a so-called Adipocyte-Derived Relaxing Factor (ADRF) plays a key role in this regulation. However, some obesity and hypertension models lack the anticontractile effect of perivascular fat. Some attention has been paid to the nature of ADRF and molecular signalling. However, the nature of ADRF remains unknown. Its pathway and molecular targets are poorly understood. Hence this study tested the hypotheses that (1) CO and H<sub>2</sub>S might be potential ADRF candidates and that (2) KCNQ-channels play a role in the ADRF pathway as putative target molecules.

Small vessel myography in rat and mice was used to investigate these hypotheses.

Myography in rats showed that CO is not involved in the ADRF effect of rat aorta. However, H<sub>2</sub>S played – at least in part – a role in the regulation of vascular tone by perivascular fat. Whether H<sub>2</sub>S is a direct ADRF candidate in rat aorta or rather a modulator remains to be investigated by further research.

In mouse aortic rings, a direct relation between CSE-dependent H<sub>2</sub>S and the anticontractile effect of perivascular fat could not be verified. However, exogenous H<sub>2</sub>S seems to modulate the vascular tone of mouse aorta. It might be assumed that mouse aorta uses H<sub>2</sub>S from an unknown source, for instance from 3-Mercaptopyruvatsulfurtransferase, to mimic the ADRF effect. This observation might identify the missing link of a putative correlation between ADRF and H<sub>2</sub>S, suggesting that H<sub>2</sub>S rather modulates ADRF than being a direct candidate. Further study needs to be performed in order to test this hypothesis.

Small vessel myography of rat and mouse aortic rings revealed new insights into the role of potassium channels in the regulation of vascular tone. KCNQ channels could be identified as important target structures of both, ADRF and H<sub>2</sub>S. Recent investigation shows that they may play a role in pathophysiology of vascular dysfunction in hypertension as well as in obesity-associated malfunction of perivascular adipose tissue. Thus, KCNQ channels may be a putative target in the pharmacological treatment of obesity-related hypertension. Further research needs to investigate this hypothesis.

This study's results pose new questions that need to be investigated in order to fully understand the complex regulation of vascular tone by adipose tissue, including adipokines, RAAS and H<sub>2</sub>S. However, this study presents new insight into the complex regulatory circuit and provides the basis for future investigation as well as for new pharmacological targets in the treatment of vascular dysfunction in obesity-associated hypertension.

## **Abstract (deutsch)**

Das metabolische Syndrom gewinnt im klinischen Alltag wie in der aktuellen Forschung zunehmend an Bedeutung. Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren, inklusive der arteriellen Hypertonie, sind mit ihm vergesellschaftet. In den 1990er Jahren wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen perivaskulärem Fett und dem Tonus viszeraler Gefäße beschrieben. Löhn et al. zeigten erstmals, dass ein vom Fett sezernierter Faktor (Adipocyte derived relaxing factor, ADRF) den Tonus viszeraler Arterien auf parakrine Weise beeinflussen kann, indem er die Gefäßantwort auf prokontraktile Faktoren reduziert. In Hypertonie- und Adipositas-Tiermodellen geht dieser antikontraktile Effekt jedoch verloren. Trotz intensiver Forschung konnte die Natur des ADRF bislang nicht aufgedeckt werden. Einige involvierte Zielstrukturen und potenzielle Signalkaskaden werden diskutiert, jedoch wird der komplexe Regelkreis nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob 1. CO und H<sub>2</sub>S potenzielle ADRF-Kandidaten darstellen und ob 2. KCNQ-Kanäle an der ADRF-Wirkung beteiligt sind.

Um diese Hypothesen zu testen, wurden Kontraktionsmessungen an Maus- und Rattenaortenringen durchgeführt.

Die Gefäßantwort der Rattenaortenringe zeigte keinen Einfluss von CO auf den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettes. H<sub>2</sub>S konnte den ADRF-Effekt jedoch imitieren. Ob H<sub>2</sub>S in der Rattenaorta ein ADRF-Kandidat ist oder als ADRF-Modulator fungiert, muss durch weitere Studien geklärt werden.

In der Mousaorta konnte kein direkter Zusammenhang zwischen H<sub>2</sub>S und perivaskulärem Fett hergestellt werden. Exogenes H<sub>2</sub>S konnte jedoch den Gefäßtonus von Mousaorten modulieren. Eventuell übernimmt hier ein H<sub>2</sub>S aus anderer Quelle, z.B. der endothelialen 3-

Mercaptopyruvatsulfurtransferase, den ADRF-Effekt. Weitere Studien müssen diese Hypothese prüfen.

Die Gefäßmyographie an Aortenringen beider Tierspezies lieferte neue Erkenntnisse über die Natur der beteiligten Kaliumkanäle. KCNQ-Kanäle wurden als ADRF- und H<sub>2</sub>S-Zielstrukturen identifiziert. Erste Befunde weisen darauf hin, dass sie in der Gefäßdysfunktion bei Hypertonie und in der Adipositas-assoziierten Fehlfunktion von perivaskulärem Fettgewebe von Bedeutung sind. Diese Hypothese muss jedoch weiter erforscht werden, um zu klären, ob KCNQ-Kanal-Öffnung ein potenzieller pharmakologischer Angriffspunkt in der Behandlung von Gefäßdysfunktion und Hypertonie sein könnte.

Die vorgestellten Ergebnisse werfen neue Fragen auf, die für das Verständnis der komplexen Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett von Bedeutung sind. Jedoch stellt diese Arbeit neue Erkenntnisse zum Verständnis des komplexen Regelkreises vor und liefert somit die Basis für weitere Forschungen, sowie mögliche pharmakologische Ansatzpunkte zur Therapie der Adipositas-assoziierten Hypertonie.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	8
1.1 Perivaskuläres Fett in viszeralen Gefäßen .....	8
1.2. CO als vasoaktiver Gasotransmitter .....	11
1.3 H <sub>2</sub> S als vasoaktiver Gasotransmitter .....	13
1.4 Spannungsabhängige Kaliumkanäle vom Typ KCNQ .....	14
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	15
2 Methoden .....	17
2.1 Versuchstiere .....	17
2.2 Präparation der untersuchten Aortenringe .....	17
2.3 Histologie der Aortenpräparate .....	17
2.4 Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessung der Rattenaorta .....	19
2.5 Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessung der Mauseaorta .....	22
2.6 Versuchstiere für die Untersuchungen an CSE-defizienten Mäusen .....	24
2.7 Materialien .....	27
2.8 Statistische Auswertung .....	28
3 Ergebnisse .....	29
3.1 HE-Färbung der Aortensegmente .....	29
3.2 Kontraktionsmessungen der Rattenaorten .....	30
3.2.1 Kontraktionskraft der Rattenaortenringe auf hochmolekulare Kaliumlösung .....	30
3.2.2 Serotoninkontraktilität in Abhängigkeit vom perivaskulären Fettgehalt .....	31
3.2.3 Einfluss von HO1-Inhibitoren auf Rattenaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett .....	32
3.2.4 Einfluss von CSE-Inhibitoren auf Rattenaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett .....	33
3.2.5 Wirkung von KCNQ-Kanal-Inhibition in der NaHS-abhängigen Relaxation Serotonin-kontrahierter Aortenringe der Ratte .....	35
3.2.6 Bedeutung der K <sub>ATP</sub> -Kanal-Inhibition in der NaHS-vermittelten Relaxation Serotonin-kontrahierter Aorten .....	36
3.3 Kontraktionsmessungen an CSE +/+ Mauseaortenringen .....	37
3.3.1 Kontraktionskraft der Mauseaortenringe auf hochmolare Kaliumchloridlösung .....	37

3.3.2 Einfluss des perivaskulären Fettgewebes auf Serotoninkontraktionen.....	38
3.3.3 Einfluss der CSE-Inhibition auf Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett..	39
3.3.4 Einfluss der CBS-Inhibition auf Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett .	40
3.3.5 Modulation der antikontraktilen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes durch KCNQ-Inhibition .....	41
3.3.6 Relaxation isolierter Mauseaortenringe durch exogene H <sub>2</sub> S-Donoren.....	42
3.3.7 Rolle von KCNQ-Kanälen in der Gefäßrelaxation durch exogenes H <sub>2</sub> S.....	43
3.3.8 Dosisabhängige Relaxation Serotonin-kontrahierter Mauseaorten durch L-Cystein ....	45
3.4 Kontraktionsmessungen an CSE -/- Mauseaorten .....	46
3.4.1 Kontraktionskraft der Mauseaortenringe auf hochmolare Kaliumchloridlösung .....	46
3.4.2 Einfluss des CSE-Genotyps auf fettabhängige Serotoninkontraktionen.....	47
4 Diskussion .....	48
4.1 Perivaskuläres Fett in den verschiedenen Tiermodellen .....	48
4.2 Neue Erkenntnisse zum ADRF .....	56
4.3 Kaliumkanäle in der fettabhängigen Kontraktilität von Maus- und Rattenaortenringen ....	58
4.4 Perivaskuläres Fett in Hypertonie, Adipositas und Entzündung.....	59
5 Zusammenfassung.....	64
Literaturverzeichnis.....	66
Danksagung.....	71
Eidesstattliche Erklärung.....	72
Tabellarischer Lebenslauf .....	73
Anhang .....	75

# 1 Einleitung

## 1.1 Perivaskuläres Fett in viszeralen Gefäßen

Parakrine Mediatoren des perivaskulären Fettgewebes regulieren den Tonus viszeraler Gefäße [1]. Soltis und Cassis führten erstmals Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen in Anwesenheit von perivaskulärem Fettgewebe durch. Zuvor wurde perivaskuläres Fett zu Kontraktionsmessungen routinemäßig entfernt. Soltis und Cassis untersuchten die Kontraktilität der Aortenringe auf Noradrenalin und konnten zeigen, dass diese in Anwesenheit von perivaskulärem Fettgewebe abgeschwächt war. Sie vermuteten, dass die neuronale Aufnahme von Noradrenalin eine Schlüsselrolle bei der antikontraktilen Wirkung des Fettgewebes spielt [2]. Löhn et al. wiesen nach, dass perivaskuläres Fett einen antikontraktilen Effekt ausübt, der mit zunehmendem Fettgehalt steigt und durch einen transferablen Mediator (Adventitia-derived relaxing factor = Adipocyte-derived relaxing factor, ADRF) vermittelt wird [3]. Mittlerweile ist der antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes zentraler Aspekt in aktuellen Forschungsfragestellungen der Herz-Kreislaufforschung. Er ist ein neuer Gesichtspunkt zur Erklärung vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in der Kreislaufregulation. So sind New Zealand Obese Mäuse (NZO-Mäuse) ein verbreitetes Tiermodell der aktuellen Adipositasforschung [4]. Ihre Gefäße sind von überdurchschnittlich viel perivaskulärem Fett umgeben. NZO-Mäuse sind hypertensiv [5]. Interessanterweise sprechen glatte Gefäßmuskelzellen von NZO-Mäusen nur vermindert bis gar nicht auf die parakrine Modulation des perivaskulären Fettgewebes an [5]. Ein anderes, weit verbreitetes Modell der Adipositas- und Hochdruckforschung ist die Spontan-Hypertensive Ratte (SHR). SHR sind hypertensiv und schlank [6]. Arterielle mesenteriale Gefäße von SHR weisen einen geringen perivaskulären Fettgehalt auf und zeigen eine reduzierte antikontraktile Wirkung [6].

Die arterielle Hypertonie hat als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen eine wichtige Bedeutung. Typische Endorganschäden sind u.a. Kardiomyopathien, Nephropathie und retinale Gefäßveränderungen. Vorhofflimmern wird durch die arterielle Hypertonie begünstigt. 80% der Schlaganfälle sind auf Bluthochdruck zurückzuführen.

Adipositas ist ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Zudem spielt sie eine wichtige Rolle in der Hypertoniegenese [7]. Über Freisetzung vasoaktiver und proinflammatorischer Substanzen begünstigt sie eine endotheliale Dysfunktion sowie eine

Sympathikusaktivierung [8]. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung (Abb.) 1 zusammengefasst (modifiziert nach [8]). Die Abbildung gibt einen Überblick über vermutete Wechselwirkungen zwischen vasoaktiven und proinflammatorischen Substanzen bei der Adipositas-Hypertonie.

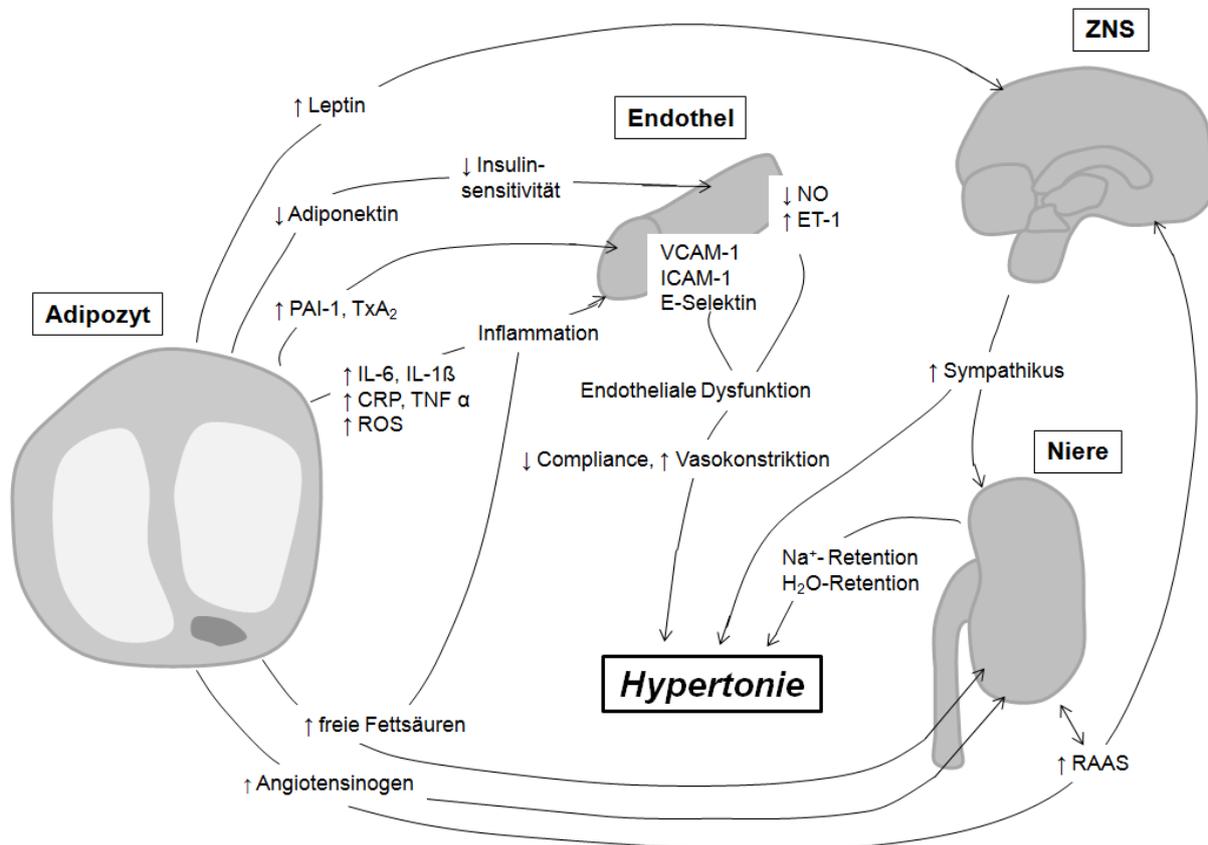


Abb. 1 Pathophysiologische Grundlagen im Zusammenspiel zwischen Adipositas und Hypertonie (Abbildung modifiziert nach [8]). CRP, C-reaktives Peptid; ET-1, Endothelin-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL-1β, Interleukin-1β; IL-6, Interleukin-6; PAI-1, Plasminogenaktivator-Inhibitor; RAAS, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; TNFα, Tumornekrose-Faktor α; TxA<sub>2</sub>, Thromboxan A<sub>2</sub>; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1.

In dem in Abb. 1 dargestellten komplexen Regelkreis werden viele weitere potenzielle Interaktionen diskutiert. Die genauen pathophysiologischen Prozesse sind bisher jedoch nicht vollständig geklärt. Ebenso fehlt ein Verständnis der Zusammenhänge im Gesunden.

Die Forschung am antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes könnte helfen, die auf molekularer Ebene noch nicht vollständig bekannten physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Adipositas und Hypertonie zu erklären und damit die Entwicklung neuer Therapieoptionen zu fördern.

Der antikontraktile Effekt perivaskulären Fettgewebes wurde bislang an Aorten [3] und Mesenterialarterien [9] untersucht. Diese Studien zeigten, dass perivaskuläres Fett die Kontraktilität viszeraler Gefäße gegenüber verschiedener physiologisch relevanter Substanzen reduziert, u.a. Serotonin, Angiotensin II, Endothelin I, Phenylephrin [3, 9]. Löhn et al. zeigten durch ihre Untersuchungen an Gefäßen mit perivaskulärem Fett, dass die Zugabe vasokonstringierender Moleküle in ein Organbad in Adipozyten die Sekretion eines bestimmten Moleküls (ADRF) stimulieren kann. Ein Transfer des ADRF-enthaltenden Aliquots in Organbäder der Gefäße ohne perivaskuläres Fett führte zu einer Relaxation dieser [3]. Die Untersuchungen ergaben, dass zwar organabhängig verschiedene Transduktionswege am antikontraktilen Effekt beteiligt sein können, dieser seine modulierende Wirkung jedoch sowohl in den Windkessel- als auch in den Widerstandsgefäßen entfaltet. ADRF wirkt antikontraktil, indem es in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) Kaliumkanäle aktiviert und diese somit hyperpolarisiert. Im mesenterialen Gefäßbett scheinen vorwiegend die spannungsabhängigen ( $K_v$ ) Kaliumkanäle angesprochen zu werden [3]. Auch in der Aorta sind  $K_v$ -Kanäle an dem antikontraktilen Effekt beteiligt, darüberhinaus wurden jedoch auch unspezifische Effekte ATP-abhängiger Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) beobachtet [9, 10].

Die ADRF-Wirkung ist nicht NO- oder endothelabhängig und wird weder über Cyclooxygenase- noch über Cytochrom-P450-Mechanismen vermittelt. Adenosin- oder Leptinrezeptoren sind ebenfalls nicht beteiligt [3]. Tyrosinkinasen und Proteinkinase A-vermittelte Prozesse scheinen bei der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen [3, 11]. Die Sekretion von ADRF erfolgt Calciumionen-abhängig. Natriumkanäle und Vanilloid/Cannabinoid-Rezeptoren sind jedoch unbeteiligt, so dass die Sekretion nicht aus dem perivaskulären Nervengewebe erfolgt bzw. moduliert wird [11]. ADRF ist also kein Faktor des autonomen Nervensystems. Auf Grundlage der beobachteten Transduktionswege (siehe Abb. 2) wurden verschiedene Kandidaten daraufhin untersucht, ob sie ADRF sein könnten [3, 5]. Die molekulare Struktur des ADRF bleibt jedoch bislang jedoch ungeklärt. Gasförmige Moleküle könnten neue ADRF-Kandidaten darstellen.

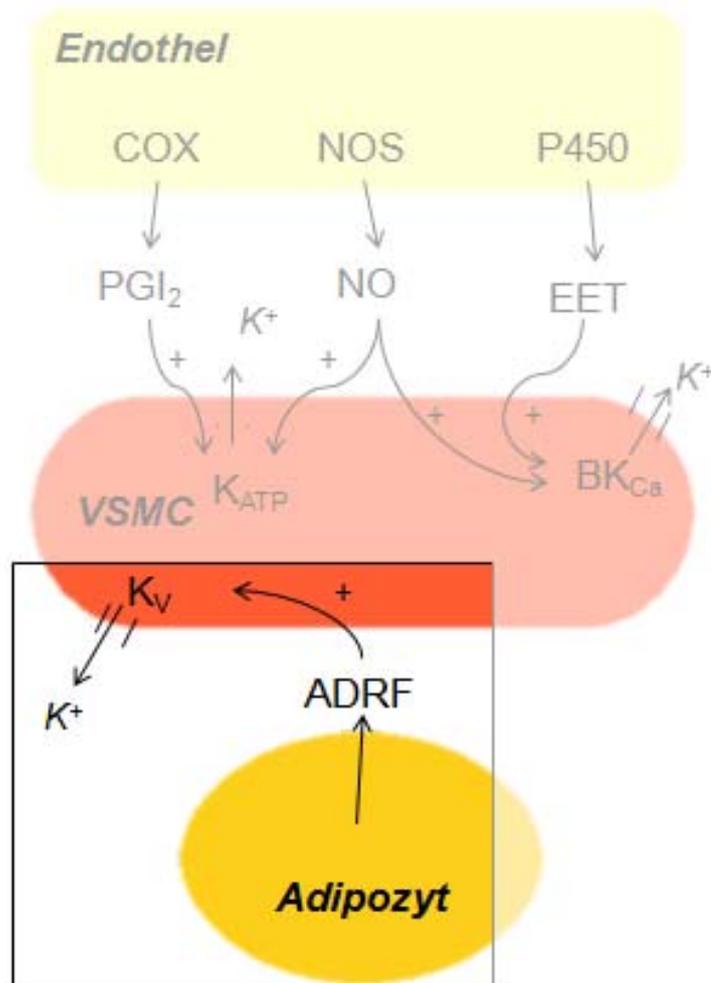


Abb. 2: Parakrine Gefäßtonusmodulation durch perivaskuläres Fett (modifiziert nach [12]). COX, Cyclooxygenase; NOS, NO-Synthase; P450, Cytochrom-P450; PGI<sub>2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub>; EET, Epoxyeicosatriensäure; VSMC, vascular smooth muscle cell; K<sub>ATP</sub>, ATP-abhängiger Kaliumkanal; K<sub>V</sub>, spannungsabhängiger Kaliumkanal; BK<sub>Ca</sub>, Calcium-abhängiger Kaliumkanal; ADRF, Adipozyten-derived Relaxing Factor.

## 1.2. CO als vasoaktiver Gasotransmitter

1978 wurde erstmals die vasoaktive Wirkung von CO beschrieben. Sylvester et al. zeigten, dass CO bei normalen O<sub>2</sub>-Partialdrücken (pO<sub>2</sub>) Pulmonalarterien relaxieren kann [13]. Bei reduziertem pO<sub>2</sub> war es in der Lage die hypoxische Vasokonstriktion umzukehren [13].

Johnson et al. beschrieben zudem einen konzentrationsabhängigen vasokonstringierenden Effekt von CO [14].

CO ist ein Nebenprodukt des Hämoglobinstoffwechsels. Beim Abbau des Häm-Moleküls zu Biliverdin wird es durch die Hämoxigenase (HO) freigesetzt (siehe Abb. 3). Freies CO soll eine anti-inflammatorische, anti-proliferative sowie eine anti-apoptotische Wirkung entfalten [15]. Abb. 3 gibt einen Überblick über den CO-Stoffwechsel sowie potenzielle Erklärungsansätze zur Gefäßtonusmodulation (Abbildung modifiziert nach [16]).

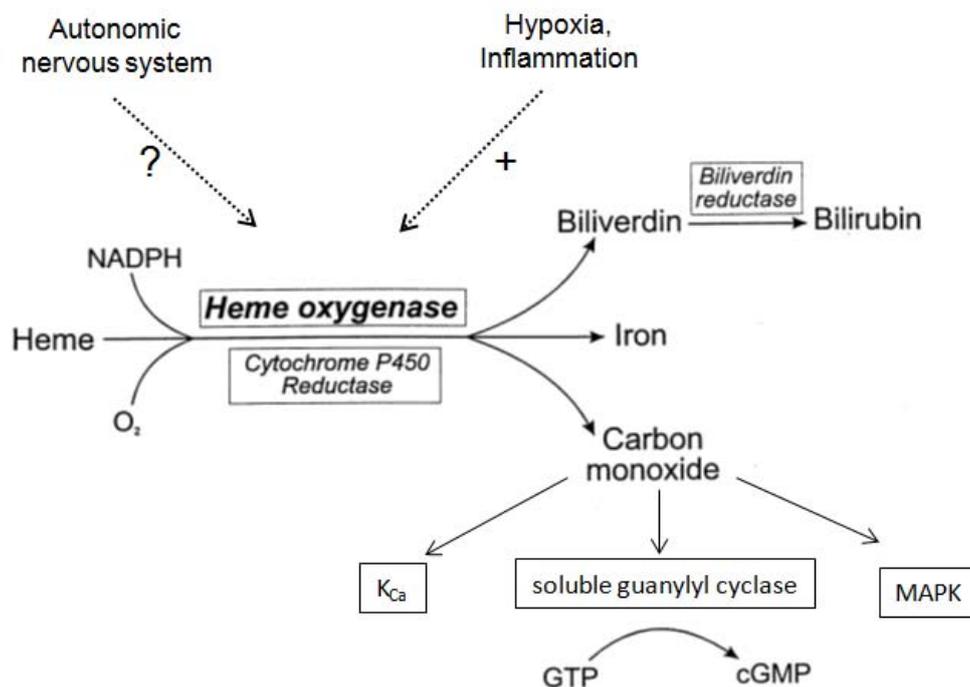


Abb 3: Endogene CO-Produktion und mögliche Gefäßtonusmodulation (modifiziert nach [16]). cGMP, zyklisches Guanidinmonophosphat; GTP, Guanidintriphosphat; K<sub>Ca</sub>, Calcium-abhängige Kaliumkanäle; MAPK, Mitogen-aktivierte Phosphokinasen.

Von besonderer Bedeutung der vaskulären CO-Produktion ist die induzierbare Hämoxigenase-Isoform HO-1. Sie wird u.a. durch Hypoxie und Entzündungsprozesse stimuliert [17]. Eine Beteiligung des autonomen Nervensystems in der CO-abhängigen Gefäßtonusmodulation wird vermutet [14]. CO übt seine Wirkung auf den Gefäßtonus u.a. über das zyklische Nukleotid cGMP, Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K<sub>Ca</sub>) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aus [15]. Es wurden Wechselwirkungen mit NO beschrieben. Hier steht die

endothelabhängige vasokonstriktorische Wirkung von CO im Mittelpunkt [18]. Eine Rolle von CO bei der fettabhängigen Vasorelaxation wurde bisher nicht untersucht.

### **1.3 H<sub>2</sub>S als vasoaktiver Gasotransmitter**

Als sogenannter „dritter“ gasförmiger Botenstoff in der parakrinen Gefäßtonusregulation gewinnt Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) neben CO und NO in vielen Bereichen der kardiovaskulären Forschung an Bedeutung. Es soll Entzündungsprozesse modulieren, an der Reperfusion nach Verletzung und bei Kreislaufschock beteiligt sein, sowie eine Hypothermie induzieren [19]. Jin et al. beschrieben zusätzlich einen anti-hypertensiven Effekt, der durch Unterdrückung vaskulärer Entzündungsreaktionen vermittelt werden soll [20].

H<sub>2</sub>S wird endogen aus der Aminosäure L-Cystein gebildet, ein Prozess, der durch die Cystathionin-γ-Lyase (CSE) und die Cystathionin-β-Synthase (CBS) katalysiert wird [19, 21]. Weitere H<sub>2</sub>S-Quellen, u.a. eine erythrozytäre H<sub>2</sub>S-Produktion, werden diskutiert [22]. Im Gefäßsystem scheint besonders die CSE eine wichtige Rolle bei der Bildung von H<sub>2</sub>S zu spielen [19]. Die Produktion von H<sub>2</sub>S ist abhängig vom Cofaktor Pyridoxalphosphat [21] und wird durch den Calcium-Calmodulin-Komplex reguliert [23]. Einen größeren Einfluss auf die H<sub>2</sub>S-Produktion scheint jedoch das derzeitige Sauerstoffangebot im Gewebe zu haben. Ein geringer pO<sub>2</sub> fördert die H<sub>2</sub>S-Synthese [24]. Auch die H<sub>2</sub>S-Wirkung scheint in einigen Organen sauerstoffabhängig zu sein [25].

Für H<sub>2</sub>S-vermittelte Prozesse werden verschiedene Transduktionsmechanismen beschrieben. Hierzu gehören u.a. der cAMP-Weg über die Proteinkinase A [26], endogene Prostaglandine [27] sowie K<sub>ATP</sub>-Kanäle und den Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter [25, 28]. In niedrigen Konzentrationen (< 100 μM) kann H<sub>2</sub>S durch Hemmung des cAMP-Wegs [26] sowie durch NO-Bindung [29] vasokonstriktorisch wirken. Abb. 4 soll einen Überblick über die H<sub>2</sub>S-Synthese sowie bisher untersuchter Zielstrukturen geben (Abbildung modifiziert nach [19]). Die Rolle von H<sub>2</sub>S in der Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett wurde bislang nicht untersucht.

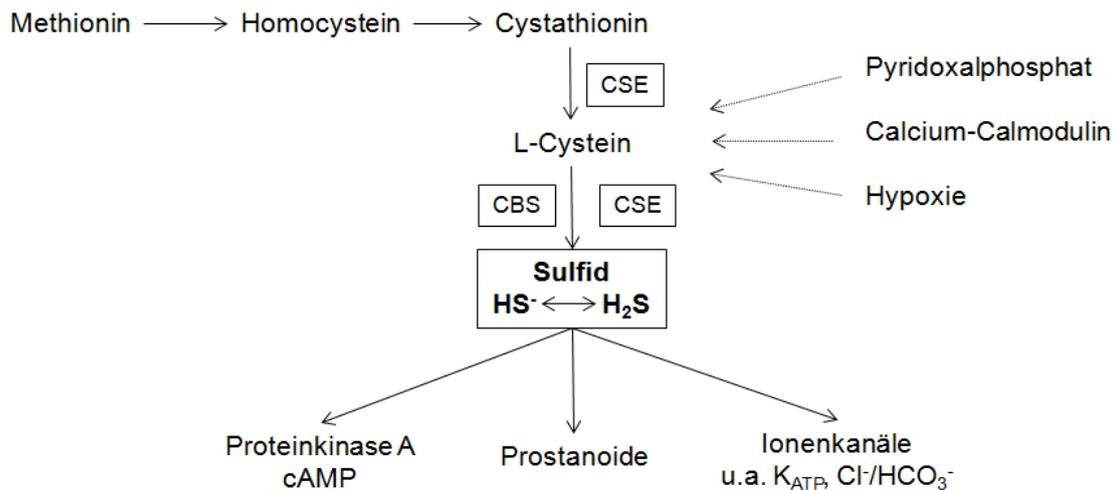


Abb. 4: Endogene  $H_2S$ -Produktion und seine Wirkung auf glatte Gefäßmuskulatur (modifiziert nach [19]). *cAMP*, zyklisches Adenosinmonophosphat; *CBS*, Cystathionin- $\beta$ -Synthase; *CSE*, Cystathionin- $\gamma$ -Lyase.

#### 1.4 Spannungsabhängige Kaliumkanäle vom Typ KCNQ

Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_v$ -Kanäle) sind maßgeblich an der Einstellung des Membranpotenzials von Zellen beteiligt. In glatter Muskulatur führt eine Öffnung von  $K_v$ -Kanälen über eine Hyperpolarisation zur Relaxation.

KCNQ-Kanäle sind  $K_v$ -Kanäle vom Typ  $K_v7.1-5$  [30]. KCNQ 2, KCNQ 3 und KCNQ 5 sind an muskarinergen Ionenströmen neuronaler Zellen beteiligt [31]. KCNQ 2 und 3 scheinen an der Genese der idiopathischen Epilepsie beteiligt zu sein [32]. KCNQ 4-Expression findet sich am Innenohr und zentralen Strukturen der Hörbahn [33]. KCNQ 1 werden zudem in Kardiomyozyten exprimiert [34]. Neue Untersuchungen zeigen ebenfalls eine Expression der KCNQ-Kanäle im Gefäßsystem [35]. Hier sind, zumindest auf mRNA-Ebene, insbesondere KCNQ 1,4 und 5 weit verbreitet [36].

Joshi et al. wiesen in Pulmonalarterien erstmals eine physiologische Bedeutung der KCNQ-Kanäle in der Gefäßrelaxation nach [37]. Sie zeigten, dass KCNQ-Kanal-Öffnung bzw. -Inhibition mittels Retigabine bzw. XE991 eine kontraktile Gefäßantwort induziert [37].

Abb. 5 gibt einen Überblick über derzeit angenommene Mechanismen der vasoaktiven Wirkung von KCNQ-Kanälen (Abbildung aus [31]). Eine Bedeutung in der Gefäßtonusregulation systemischer Gefäße durch perivaskuläres Fettgewebe wurde bisher jedoch nicht untersucht.

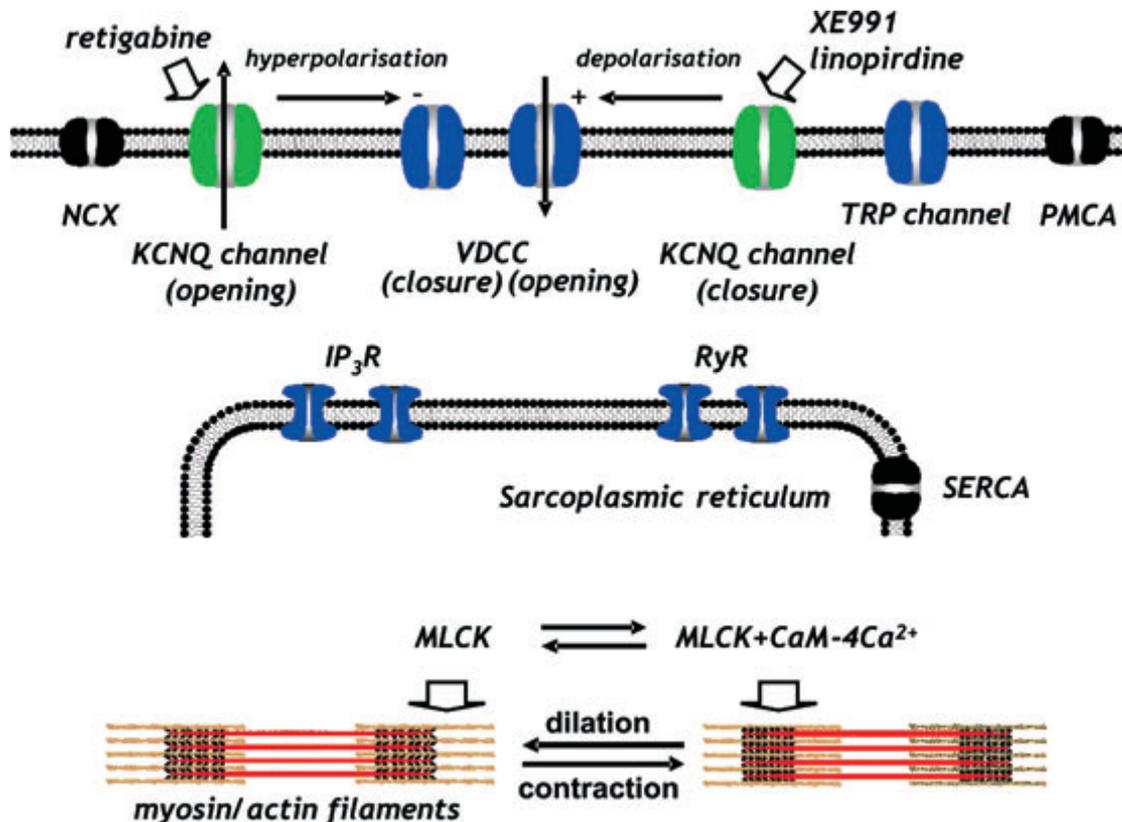


Abb. 5: KCNQ-Kanäle in der Gefäßtonusregulation (Abbildung aus [31]). CaM, Calmodulin; IP<sub>3</sub>R, Inositoltriphosphatrezeptor; MLCK, Myosin-Leichtketten-Kinase; RyR, Ryanidinrezeptor; TRP, Transient Receptor Potential; VDCC, spannungsabhängige Calcium-Kanäle.

### 1.5 Ziel dieser Arbeit

Intensive Forschung in den letzten Jahren konnte die parakrine Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett (ADRF) identifizieren. Die chemische Identität des ADRF und seiner Zielstrukturen sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Bei der großen Bedeutung von Hypertonie und Adipositas für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität besteht dringender

Bedarf, diese Moleküle zu identifizieren, um die komplexen physiologischen und pathophysiologischen Regulationskreise zu verstehen und gegebenenfalls neue Therapieoptionen zu entwickeln.

In dieser Arbeit sollen die Hypothesen untersucht werden, ob (1) CO und H<sub>2</sub>S als neue, potentielle ADRF-Kandidaten, sowie (2) KNCQ-Kanäle als mögliche ADRF-Zielstrukturen fungieren.

## **2 Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Alle Tierexperimente erfolgten entsprechend den „Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“. Die Tötung der Tiere zur Organentnahme wurde von der Berliner Landesbehörde genehmigt (Aktenzeichen: T 0195/04). Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Lebendgewicht: 200-300 g, Alter: ungefähr 8 Wochen) sowie männliche C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (Lebendgewicht: 25-30 g, Alter: 12-16 Wochen) und CSE-defiziente C57BL/6-Mäuse (CSE -/-) verwendet. Die Tiere wurden entsprechend der geltenden Standardlaborbedingungen des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin und bei Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchte von 40-60 % und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ein Teil der Versuche wurde an der Chinese University of Hongkong unter gleichartigen Tierhaltungs- und Versuchsbedingungen durchgeführt.

### **2.2 Präparation der untersuchten Aortenringe**

Die Tiere wurden unter Isofluran oder CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend dekapitiert. Auf Eis wurde die Aorta freipräpariert und in kalte (4 °C), oxygenierte (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) physiologische Kochsalzlösung (PSS) überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Gefäße in Ringe mit einer Länge von 2-3 mm geschnitten. Perivaskuläres Fett wurde entweder mit einer Schere entfernt ((-) Fett) oder intakt gelassen ((+) Fett). Anschließend wurden die Präparate entweder histologisch untersucht oder, wie von Lohn et al. und Fesüs et al. beschrieben, in die Gefäßmyographen eingespannt [3, 5].

### **2.3 Histologie der Aortenpräparate**

Um den Fettgehalt der untersuchten Aorten einschätzen zu können und die sachgemäße Präparation der Aortenringe zu bestätigen, wurden Hämatoxylin-Eosin-(HE)-gefärbte histologische Bilder einiger Aorten angefertigt. Die hier beschriebene Methodik der histologischen Aufbereitung basiert auf Protokollen der AG Bachmann, Institut für Vegetative Anatomie die Charité Berlin Mitte [38], und wurde entsprechend der Präparation der Aortenringe modifiziert.

Die gewonnenen Präparate wurden wie in 2.2. beschrieben präpariert und über Nacht bei 3 °C in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend erfolgte die Paraffineinbettung. Zur HE-Färbung wurden 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf dem Objektträger bis Raumtemperatur erwärmt. Vor der eigentlichen HE-Färbung wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

1. 3 x Puffer based saline-(PBS)-Bad für je 5 Minuten (min)
2. 3 x Xylol-Bad (je 10 min)
3. 2 x 100 % Alkohol (je 5 min)
4. 2 x 96 % Alkohol (je 5 min)
5. 1 x 80 % Alkohol (5 min)
6. 1 x 70 % Alkohol (5 min)
7. 3 x PBS-Bad (je 5 min)
8. Aufkochen in Citratpuffer (6 min)

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurde mit der HE-Färbung begonnen (Schritte 1 bis 5). Anschließend wurden die Präparate dehydriert (Schritte 6 bis 10).

1. Kernfärbung nach Hämalaun (6-8 min)
2. Spülung mit Aqua bidest.
3. Bläuen unter Leitungswasser (10 min)
4. Färbung in 0,1 % Eosin in Aqua bidest. (10 min)
5. Auswaschen unter Leitungswasser (5 min)
6. 3 x PBS-Bad (je 5 min)
7. 1 x 70 % Alkohol (5 min)
8. 1 x 80 % Alkohol (5 min)
9. 2 x 96 % Alkohol (je 5 min)
10. 2 x 100% Alkohol (je 5 min)
11. 3 x Xylol-Bad (je 10 min)
12. Eindeckeln

Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop, Leica DMRB (Leica, Wetzlar).

## 2.4 Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessung der Rattenaorta

Zu Beginn der Kontraktionsmessungen wurden die Rattenaorten in ein Hugo Sachs Organbad eingespannt (Hugo Sachs, Freiburg), dessen Kammern mit 20 ml vorgewärmter (37 °C) physiologischer Kochsalzlösung (PSS) gefüllt waren (siehe Abb. 6). Hierzu wurden zwei schmale Drähte in das Lumen der Aortensegmente eingebracht. Einer der beiden Drähte war mit einem Kraftaufnehmer (Hugo Sachs, Freiburg) verbunden, um die isometrische Kraft zu messen. Die Datenausgabe des Gerätes wurde mit Hilfe des Windows-Programmes Chart 5 für Powerlab (AD Instruments, Spechbach) dargestellt. Während des gesamten Versuches wurden die Gefäße mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> oxygeniert.

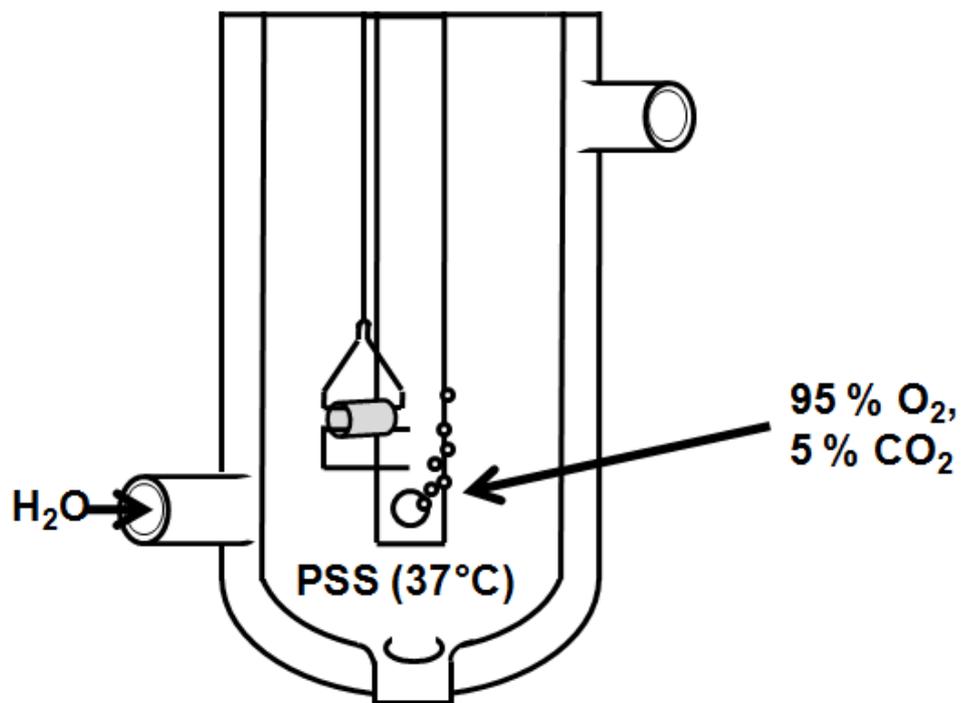


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Kammer des Hugo Sachs Organbades (Hugo Sachs, Freiburg). Erläuterungen siehe Text.

Die Kontraktionskraft der Aortenringe wurde kontinuierlich isometrisch gemessen. Während einer einstündigen Äquilibration wurden die Aortensegmente, wie von Löhn et al. beschrieben, schrittweise auf einen Grundtonus von ca. 1 g eingestellt [3]. Zu Beginn der Versuche wurde die Kontraktionsfähigkeit der Präparate bestimmt. Hierzu wurde die PSS-Badlösung durch eine

60 mM KCl-Lösung (20 ml) ausgetauscht. Nachdem ein Gleichgewicht in der Gefäßantwort erreicht war, wurden die Präparate dreimal mit PSS gespült. Vor weiteren Applikationen wurde gewartet, bis die Präparate wieder vollständig relaxiert waren.

An den Rattenaorten wurden zwei Versuchsgruppen durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurde jedes Mal die Kontraktionskraft der Gefäße mit 60 mM KCl-Lösung geprüft (siehe oben). Die Antwort der Präparate auf 60 mM KCl wurde als Referenzwert für die folgenden Versuche auf 100 % gesetzt. Im Anschluss wurde 1.) das Kontraktions- oder 2.) das Relaxationsverhalten der Aortenringe auf verschiedene Substanzen untersucht. Nach den einzelnen Versuchen wurden die Kammern mehrmals mit PSS gespült und gewartet bis sich der Ruhetonus erneut einstellte. Das allgemeine Versuchsprotokoll ist in Abb. 7 exemplarisch dargestellt.

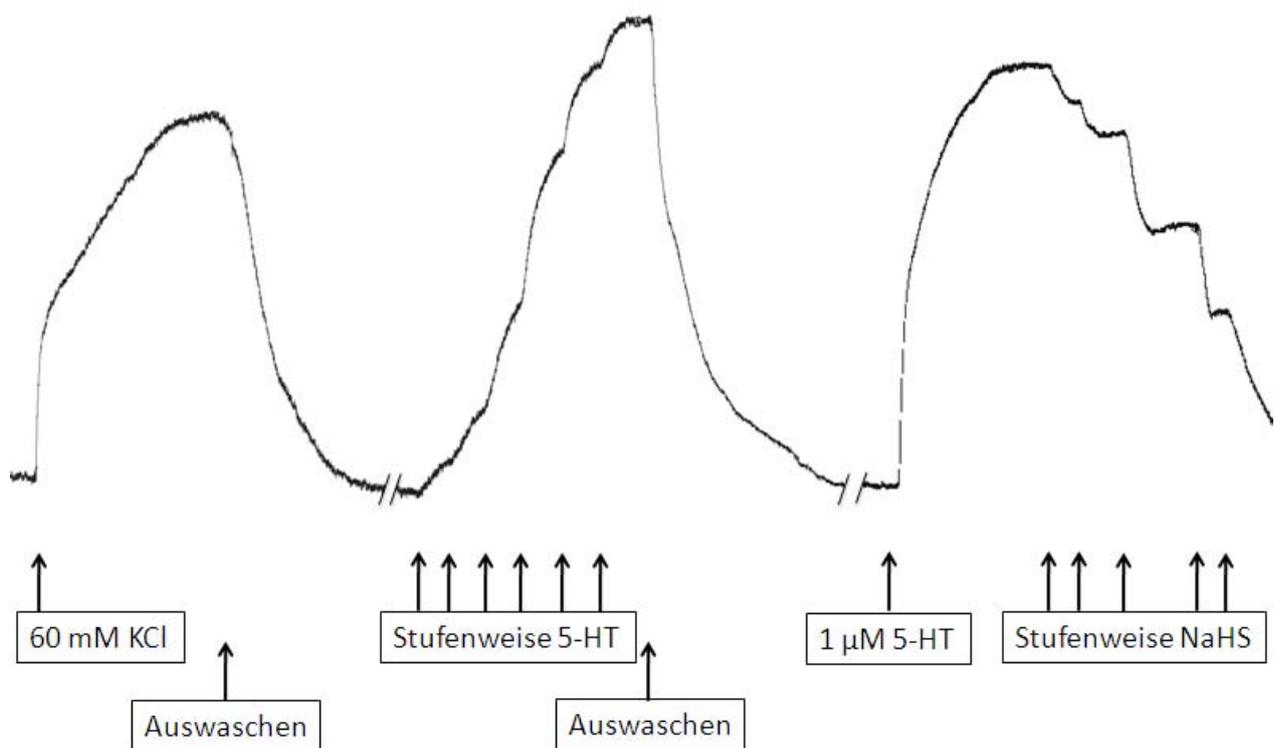


Abb. 7: Spannungsaufnahme mit Chart 5 am Beispiel der Kontraktilitätsprüfung mit 60 mM KCl, anschließender dosisabhängiger Kontraktion mit Serotonin (5-HT) sowie stufenweiser Relaxation mit NaHS. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Gefäße mehrmals mit PSS gewaschen. Erläuterungen siehe Text.

Für Kontraktionsmessungen mit Serotonin (5-HT) wurden schrittweise 1-10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin durch Zugabe in die Badlösung appliziert. Vor jeder Applikation wurde gewartet, dass sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktion mit 10  $\mu\text{mol/l}$  5-HT wurden die Gefäße mehrmals mit PSS gespült und bis zur erneuten Einstellung des Ruhetonus gewartet, bevor mit neuen Messungen begonnen wurde. Je nach Protokoll wurden die Gefäße vor der Serotonin-Applikation mit den entsprechenden Substanzen inkubiert.

Für die Studien zum Relaxationsverhalten wurden Rattenaorten ohne perivaskuläres Fett verwendet. Die Gefäße wurden mit 2  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin vorkontrahiert und durch schrittweise Zugabe von 0,01 bis 1  $\text{mmol/l}$  NaHS in die Badlösung relaxiert. Nach der Applikation von 1  $\text{mmol/l}$  NaHS wurden die Gefäße mit PSS gewaschen. Als Referenzwert der NaHS-induzierten Relaxation galt die entwickelte Kontraktionskraft auf 2  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin. Je nach Versuchsplanung wurden die Gefäße vor der Applikation von 2  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin mit den entsprechenden Substanzen inkubiert.

Die Protokolle der isometrischen Kontraktionsmessungen an der Rattenaorta sind in Tabelle (Tab.) 1 und 2 dargestellt.

	<b>Kontraktionskraft</b>	<b>Präinkubation</b>	<b>Kontraktion</b>
<b>Kontraktion</b>	KCl (60 mM)	-	5-HT (1-10 $\mu\text{M}$ )
		SnMP (20 $\mu\text{M}$ , 60 min)	
		ZnDP (20 $\mu\text{M}$ , 60 min)	
		BCA (5 mM, 30 min)	
		PPG (10 mM, 30 min)	

*Tab. 1: Protokoll der Kontraktionsmessungen an der Rattenaorta. Die Chemikalien der Präinkubation sowie 5-HT waren in Aqua bidest. gelöst. SnMP = Zinn-IV-mesoporphyrin-IX, ZnDP = Zink-II-deuteroporphyrin, BCA =  $\beta$ -Cyano-L-Alanin, PPG = 4-Aminopropargylglycin. In Klammern stehen die Angaben zur Molarität und Inkubationsdauer.*

<i>Relaxation</i>	<i>Kontraktionskraft</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Vorspannung</i>	<i>Relaxation</i>
	KCl (60 mM)	Glibenclamid (3 $\mu$ M, 15 min)	5-HT (2 $\mu$ M)	NaHS (0,01-1 mM)
		4-Aminopyridin (2 mM, 10 min)		
XE991(30 $\mu$ M, 15 min)				

Tab. 2: Protokoll der Relaxationsmessungen an der Rattenaorta. 4-Aminopyridin und XE991 sowie 5-HT waren in Aqua bidest., Glibenclamid in DMSO gelöst. In Klammern stehen die Angaben zur Molarität und Inkubationsdauer.

## 2.5 Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessung der Mauseorta

Die Mauseorten wurden für die Kontraktionsmessungen in einen DMT Gefäßmyographen eingespannt (DMT Technologies, Dänemark), dessen Kammern mit 5 ml PSS gefüllt waren und ebenfalls auf 37 °C vorgewärmt wurden (siehe Abb. 8). Während des gesamten Versuches wurden die Kammern mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast [5]. Unter dem Mikroskop wurden zwei Drähte in das Gefäßlumen eingeführt, die später zur isometrischen Kraftmessung mit einem Kraftaufnehmer verbunden wurden. Die Äquilibration der Mauseortenringe folgte dem gleichen Protokoll, das in Kapitel 2.4 vorgestellt wurde. Zur Datenausgabe wurde das Windows-Programm Chart 5 für Powerlab (ADInstruments, Spechbach) verwendet.

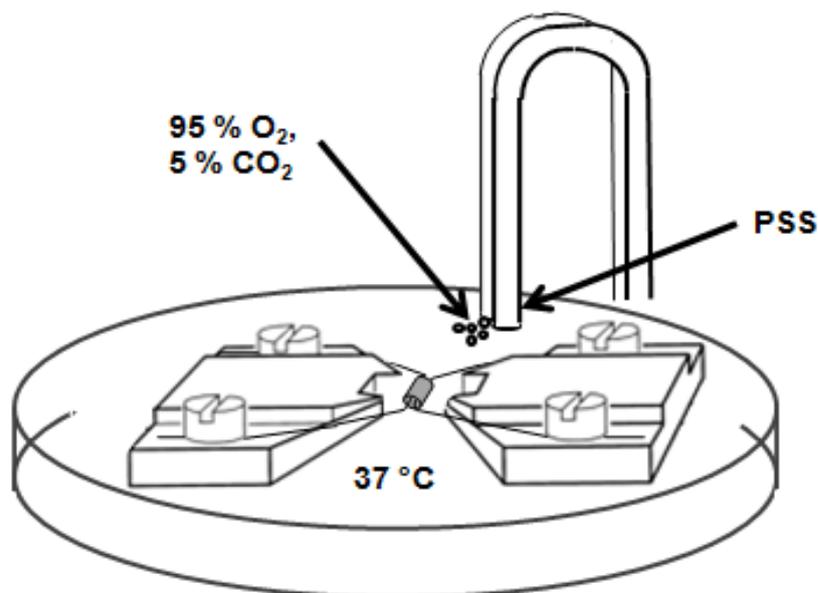


Abb. 8: Schematische Darstellung des Small Vessel Myographen DMT (DMT Technologies, Dänemark). Erläuterungen siehe Text.

An der Mauseorta wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurde analog zu den Rattenaorten die Kontraktionskraft der Gefäße mit 60 mM KCl-Lösung geprüft. Im Anschluss folgten Kontraktions- oder Relaxationsmessungen wie in Abb. 7 dargestellt. Zusätzlich wurde die Kontraktionskraft von Aorten von CSE -/- Mäusen untersucht.

Für die Kontraktionsmessungen wurde den Kammern schrittweise 0,01-3  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin zugefügt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gleichgewicht abgewartet. Nach der Applikation von 3  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin wurden die Gefäße mehrmals mit PSS gewaschen und gewartet, dass sich der Ruhetonus erneut einstellte, bevor weitere Messungen durchgeführt wurden. Die Kontraktionskraft der Gefäße wurde als Spannung in mN/mm dargestellt, d.h. sie wurde auf die jeweilige Länge des Aortenringes bezogen. Vor der Serotoninapplikation wurden die Gefäße je nach Protokoll mit dem KCNQ-Kanal-Inhibitor XE991, dem CSE-Inhibitor 4-Aminopropargylglycin (PPG) oder dem CBS-Inhibitor Aminoxyessigsäure (AOAA) inkubiert.

Das Protokoll der isometrischen Kontraktionsmessung an Mauseorten ist in Tab. 3 dargestellt.

<i>Kontraktionskraft</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Kontraktion</i>
<b>KCl (60 mM)</b>	CSE +/+	-	<b>5-HT (0,01-1 <math>\mu\text{M}</math>)</b>
	CSE +/+	PPG (10 mM, 30 min)	
	CSE +/+	AOAA (1 mM, 30 min)	
	CSE +/+	XE991(30 $\mu\text{M}$ , 15 min)	
	CSE -/-	-	
	CSE -/-	XE991(30 $\mu\text{M}$ , 15 min)	

*Tab. 3: Protokoll der Kontraktionsmessungen an der Mauseorta. PPG und XE991 sowie 5-HT waren in Aqua bidest. gelöst. CSE = Cystathionin- $\gamma$ - Lyase, PPG = 4-Aminopropargylglycin, AOAA = Aminoxyessigsäure. In Klammern stehen die Angaben zur Molarität und Inkubationsdauer.*

Für die Relaxationsmessungen wurden nur Wildtyp Mauseorten ohne perivaskuläres Fett verwendet. Die Aortenringe wurden mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin vorkontrahiert. Nach Erreichen des Gleichgewichtes wurde dann stufenweise je nach Protokoll die exogenen H<sub>2</sub>S-Donoren NaHS

(0,1-3 mmol/l) und 5-(4-hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiol-3-thionin (ADTOH, 10-100  $\mu$ mol/l) oder L-Cystein (1-10 mmol/l) als Substrat für die endogene H<sub>2</sub>S-Synthese appliziert. Nach Erreichen der Endkonzentrationen wurden die Gefäße mehrmals mit PSS gewaschen und gewartet bis erneut der Grundtonus erreicht wurde. Je nach Protokoll wurden die Gefäße vor der Serotoninapplikation mit PPG oder XE991 inkubiert.

Das Protokoll der Relaxationsstudien an Mausaorten ist in Tab. 4 dargestellt.

<i>Relaxation</i>	<i>Kontraktionskraft</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Vorspannung</i>	<i>Relaxation</i>
	KCl (60 mM)	PPG (10 mM, 30 min)	5-HT (1 $\mu$ M)	L-Cystein (1-10 mM)
		XE991(30 $\mu$ M, 15 min)		NaHS (0,1-3 mM)
		XE991(30 $\mu$ M, 15 min)		ADTOH (1-100 $\mu$ M)

*Tab. 4: Protokoll der Relaxationsmessungen an der Wildtyp-Mausaorta. Alle Chemikalien waren in Aqua bidest. gelöst. PPG = 4-Aminopropargylglycin. In Klammern stehen die Angaben zur Molarität und Inkubationsdauer.*

## **2.6 Versuchstiere für die Untersuchungen an CSE-defizienten Mäusen**

Der Effekt endogen produzierten H<sub>2</sub>S auf die fettabhängige Kontraktionsbereitschaft der Aorten wurde an CSE-defizienten Mäusen untersucht. Die Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe um Ishii et al. hergestellt [39] und als Zuchtpaar unserer AG zur Verfügung gestellt. Heterozygote Männchen und Weibchen im Alter von 8-10 Wochen wurden miteinander verpaart. Nur homozygote männliche Tiere im Alter von 12-16 Wochen wurden für die Versuche verwendet.

Die Genotypisierung der C57BL/6-Mäuse erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) an Hand der bei der Ohrlochmarkierung anfallenden Hautreste. Dem Protokoll des QIAamp DNA Mini Kits entsprechend wurde die DNA wie folgt aus dem Gewebe gewonnen:

1. Untersuchungsmaterial mit 180  $\mu$ l Gewebslysepuffer in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß platzieren.
2. Hinzufügen von 20  $\mu$ l Proteinase K, anschließend vortexen.

3. Inkubation bei 56 °C bis Gewebe vollständig lysiert ist (1-3 Stunden).
4. Zentrifugieren der Eppendorf-Gefäße.
5. Zufügen von 200 µl Guanidinhydrochlorid, anschließend puls-vortexen: Inkubation bei 70 °C (10 min) mit anschließender Zentrifugation.
6. Zufügen von 200 µl Ethanol (96-100%), anschließend puls-vortexen und zentrifugieren.
7. Übertragen der Lösung auf die QIAamp Mini Spin Säule: Zentrifugation bei 8.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 1 min, anschließend Umsetzen der Mini Spin Säule auf ein neues Eppendorfgefäß.
8. Zufügen von 500 µl Guanidinhydrochlorid: Zentrifugation bei 8.000 rpm (1 min), anschließend Umsetzen der Mini Spin Säule auf ein neues Eppendorfgefäß.
9. Zufügen von 500 µl Waschpuffer: Zentrifugation bei 14.000 rpm (3 min), anschließend Umsetzen der Mini Spin Säule auf ein neues Eppendorfgefäß.
10. Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min, anschließend Umsetzen der Mini Spin Säule auf ein neues Eppendorfgefäß.
11. Zufügen von 200 µl Aqua bidest.: Inkubation bei Raumtemperatur (5 min), anschließend Zentrifugation bei 8.000 rpm (1min).

Zur Amplifikation der DNA-Proben wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den folgenden Primern durchgeführt:

1. CSE-F2 (5- TGC CGA CCA ATA AGC AGG GCG -3; 20 mer, Tm 64)
2. CSE-e1-3 (5- CCG AGG ACT GGC CCG GGA AGT -3; 21 mer, Tm 72)
3. CSE-PCR-2 (5- CCA GAC CGG CAA CGA AAA TCA -3; 21 mer, Tm 64)

Pro DNA-Probe wurde in folgender Mischung ein PCR-Mastermix angefertigt, der aus den drei Primern und einer Taq-Polymerase (RedTaq PCR Mix, Sigma Aldrich, Schnellendorf) bestand:

Primer (je 10 µM): 1,00 µl CSE-F2 + 1,75 µl CSE-e1-3 + 0,25 µl CSE-PCR-2  
 Polymerase: 10,00 µl RedTaq PCR Mix

Zu je 13 µl PCR-Mastermix wurden 7 µl der DNA-Probe zugesetzt, sodass die Kammern mit je 20 µl Lösung gefüllt waren. Diese wurden bei 3.220 rpm für 2-3 min zentrifugiert. Anschließend

wurden die Proben in einen PCR-Cycler (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Die PCR lief nach dem unten aufgeführten Programm ab. Die Schritte 2-6 wurden 40 x wiederholt.

1. Initiale Denaturierung (95 °C, 10 min)
2. Denaturierung (94 °C, 30 Sekunden)
3. Primerbindung (56-58 °C, 30 Sekunden)
4. Elongation (72 °C, 30 Sekunden)
5. Finale Elongation (72 °C, 5 min)
6. Endphase (4 °C)

Im Anschluss wurden die Proben auf Agarosegel (3 % in Rotiphorese TAE-Puffer, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) aufgetragen. Zur späteren Darstellung der DNA-Banden wurde dem Agarosegel zur Kernfärbung 7 µl RedSafe<sup>TM</sup> Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea) beigelegt.

Zur Gelelektrophorese wurden die Banden mit einer DNA-Leiter (100 Basenpaare, bp) markiert, die 1:10 in 5 µl Ladepuffer verdünnt wurde. Zusätzlich zu den DNA-Proben des Untersuchungsmaterials wurden Aqua bidest. als Negativ- und bekannte Genotypen als Positivkontrollen auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 70-100 V für ca. 30 min. Anschließend wurden die Ergebnisse unter fluoreszierendem Licht dargestellt (siehe Abb. 9) und ausgewertet. Die Primer CSE-F2 + CSE-e1-3 entsprachen 299 bp (CSE-Wildtyp), die Primer CSE-F2 + CSE-PCR-2 entsprachen 194 bp (CSE-knock-out, CSE -/-).

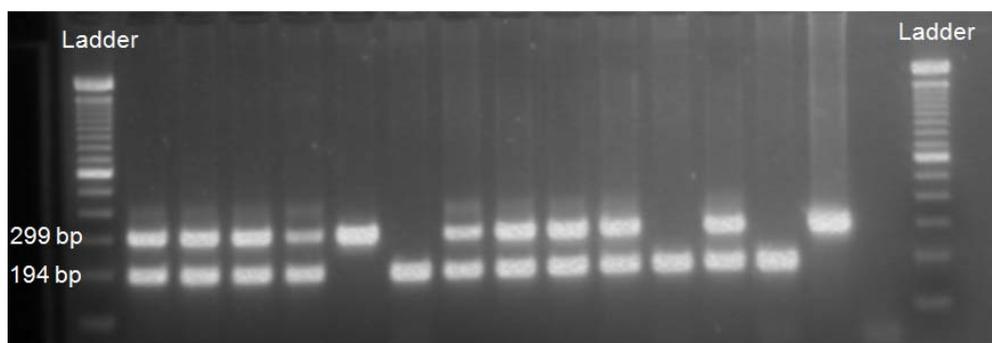


Abb. 9: DNA-Banden nach PCR und Gelelektrophorese. Ladder = Markierung der bp-Sequenzen. Säulen 5 und 14: CSE +/+, Säulen 6, 11 und 13: CSE -/-. Die restlichen Säulen: CSE +/-.

## 2.7 Materialien

Im Rahmen der histologischen Aufarbeitung der Präparate wurden PBS-Puffer, PFA und Citratpuffer als Basislösungen verwendet. Der PBS-Puffer entspricht in seiner Zusammensetzung der PSS des Organbades (Zusammensetzung siehe unten). 4 % PFA wurde in Aqua bidest. gelöst. Für den Citratpuffer wurden 9 ml Zitronensäure (0,1 mmol/l) und 41 ml Natriumnitrat (0,1 mmol/l) mit 450 ml Aqua bidest. verdünnt. Mit 2 mmol/l NaOH wurde die Lösung anschließend auf pH = 6,0 eingestellt.

Im Organbad der Maus- und Rattenaorten wurde PSS verwendet. Diese setzte sich wie folgt zusammen (Angaben in mmol/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 11,1 Glucose, 1,6 CaCl<sub>2</sub>.

Die Zusammensetzung der 60 mmol/l-KCl-Lösung war wie folgt (Angaben in mmol/l): 119 NaCl, 60 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 11,1 Glucose, 1,6 CaCl<sub>2</sub>.

Das Volumen der Badlösungen betrug 5 bzw. 20 ml. Sie wurden kontinuierlich mit einem Gemisch aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast, sowie bei 37,7 °C (pH 7,4) konstant gehalten.

Zur Genotypisierung verwendete Primer wurden von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Berlin) synthetisiert. Die hierfür notwendigen Primersequenzen wurden von Ishii et al. zur Verfügung gestellt, ebenso das zur Amplifikation notwendige PCR-Protokoll [39].

Die Elektrophorese der untersuchten DNA-Proben erfolgte auf Agarosegel. Deren Herstellung ist in Kapitel 2.6 beschrieben. Der 50 x TAE-Puffer bestand aus Aqua bidest., 0,05 mol/l EDTA und 2 mol/l Tris-Acetat.

Die Bestandteile der PSS und KCl-Lösung wurden von der Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland, bezogen, ebenso Serotonin. ADTOH wurde von Prof. Dr. Tsikas von der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Klinische Pharmakologie, zur Verfügung gestellt. Die Herkunft weiterer verwendeter Chemikalien ist in Tabelle 5 dargestellt.

<i>Herkunft</i>	<i>Chemikalie</i>
Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland	Isofluran
Ascent Scientific Ltd., Bristol, Großbritannien	XE991
Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	NaHS
	Rotiphorese® TAE-Puffer
Frontier Scientific Inc., Logan, UT (USA)	SnMP
	ZnDP
Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland	4-AP
	BCA
	L-Cystein
	Glibenclamid
	PPG
Tianjin Dihao Chemicals Co., Ltd., Tianjin, China	AOAA

*Tab. 5: Herkunft der verwendeten Chemikalien.*

## **2.8 Statistische Auswertung**

Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Für den Vergleich von Gruppen wurde one-way ANOVA sowie der Student's t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.  $n$  repräsentiert die Anzahl der untersuchten Aortenringe.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 HE-Färbung der Aortensegmente

Um eine Aussage über das perivaskuläre Fettgewebe der verwendeten Aortenringe und um eine Interpretation der im Gefäßmyographen gewonnenen Ergebnisse zu erlauben, wurde die Präparation der Gefäßsegmente histologisch überprüft (siehe Abb. 10). Abb. 10 zeigt, dass Aortenringe der Ratte, deren umgebendes Fettgewebe mit einer feinen Schere entfernt wurde, nur noch aus Intima, Media und Adventitia bestanden (Abb. 10 a und b). Die Gefäßringe selbst waren nicht verletzt. Präparate, deren Fettgewebe intakt gelassen wurde, waren zusätzlich von überwiegend weißem Fettgewebe umgeben (Abb. 10 c und d). Um die Gefäßringe herum befanden sich zudem braunes Fettgewebe und Nervengewebe.

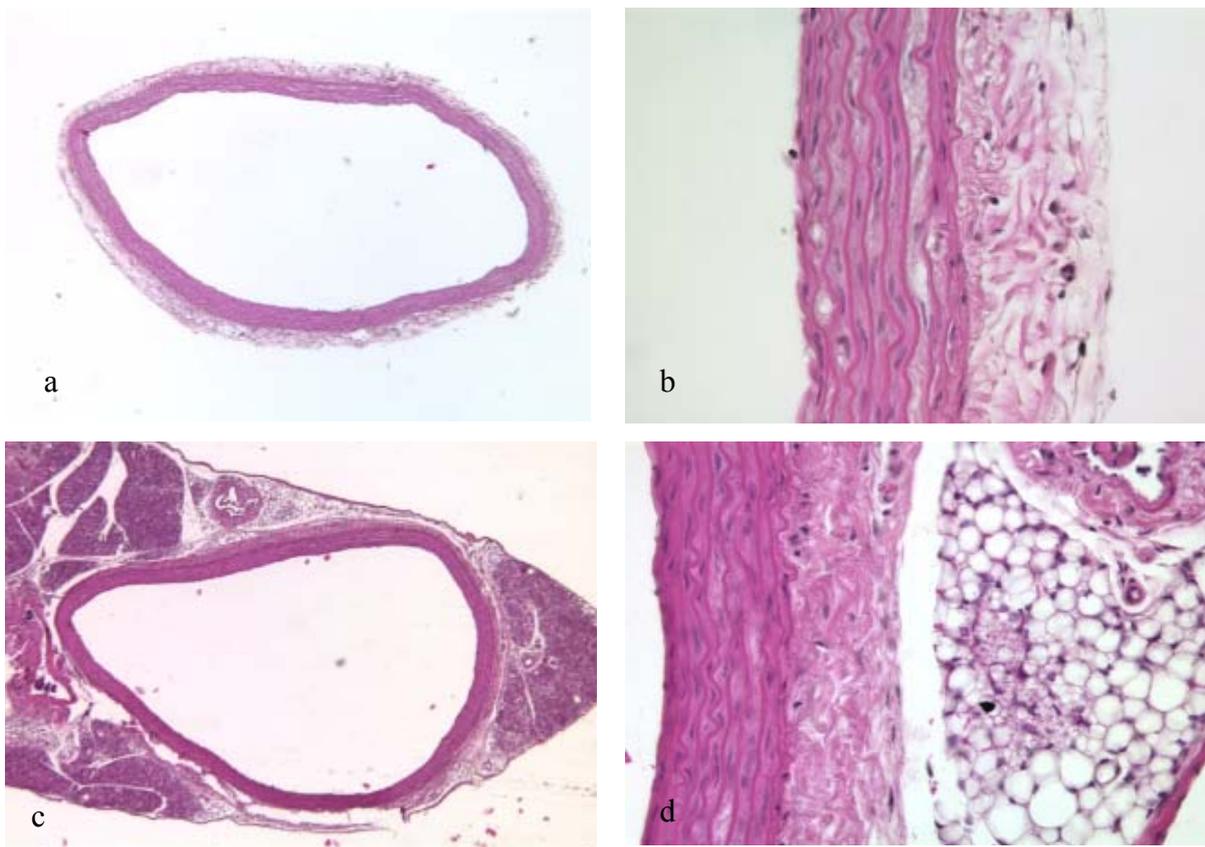


Abb. 10: HE-Färbung der Aortenringe ohne (Abb. 10 a, b) und mit perivaskulärem Fett (Abb. 10 c, d). SD-Ratte.

### 3.2 Kontraktionsmessungen der Rattenaorten

#### 3.2.1 Kontraktionskraft der Rattenaortenringe auf hochmolekulare Kaliumlösung

Um die Funktionsfähigkeit und die Kontraktionskraft der Rattenaortenringe zu bestimmen, wurden diese mit 60 mmol/l KCl behandelt. Die Spannungsaufnahme erfolgte nach 10 min.

Gefäße mit perivaskulärem Fettgewebe ((+) Fett) reagierten auf die isomolare Zugabe von 60 mmol/l KCl mit einer Kontraktion von 15,89 mN (n = 20). Gefäße ohne perivaskuläres Fett ((-) Fett) kontrahierten mit 15,41 mN (n = 22). Der Unterschied in der entwickelten Kontraktionskraft beider Gruppen auf die hochmolekulare Kaliumchloridlösung war nicht signifikant (p = 0,68, siehe Abb. 11).

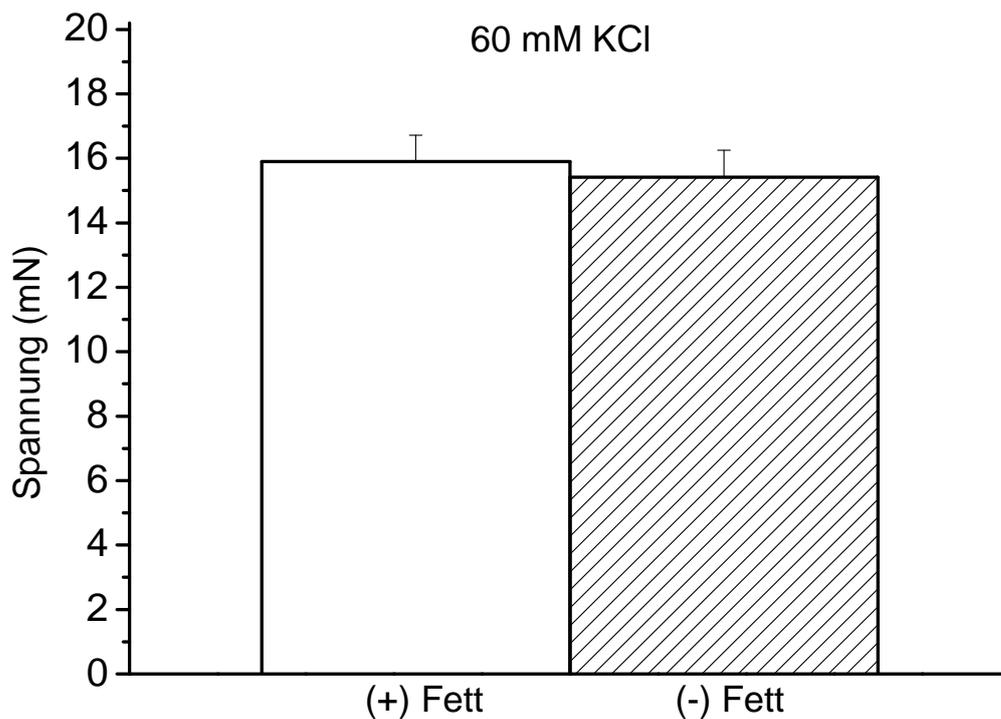


Abb. 11: Kontraktion von Aortenringen der SD-Ratte mit und ohne perivaskuläres Fett in Anwesenheit von 60 mM KCl-Lösung.  $p > 0,05$ .

### 3.2.2 Serotoninkontraktilität in Abhängigkeit vom perivaskulären Fettgehalt

Um die Serotonin-induzierte Kontraktilität der Rattenaortenringe in Abhängigkeit vom perivaskulären Fett zu untersuchen, wurden (-) und (+) Fett-Gefäßringe stufenweise mit 1-10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin (5-HT) kontrahiert.

(-) Fett-Gefäße erreichten für alle applizierten Serotoninkonzentrationen eine signifikant stärkere Spannung als (+) Fett-Gefäße ( $n = 9$  für beide Gruppen;  $p = 0,049$  für 1  $\mu\text{mol/l}$  5-HT bis  $p = 3,89\text{E-}8$  für 10  $\mu\text{mol/l}$  5-HT; Abb. 12).

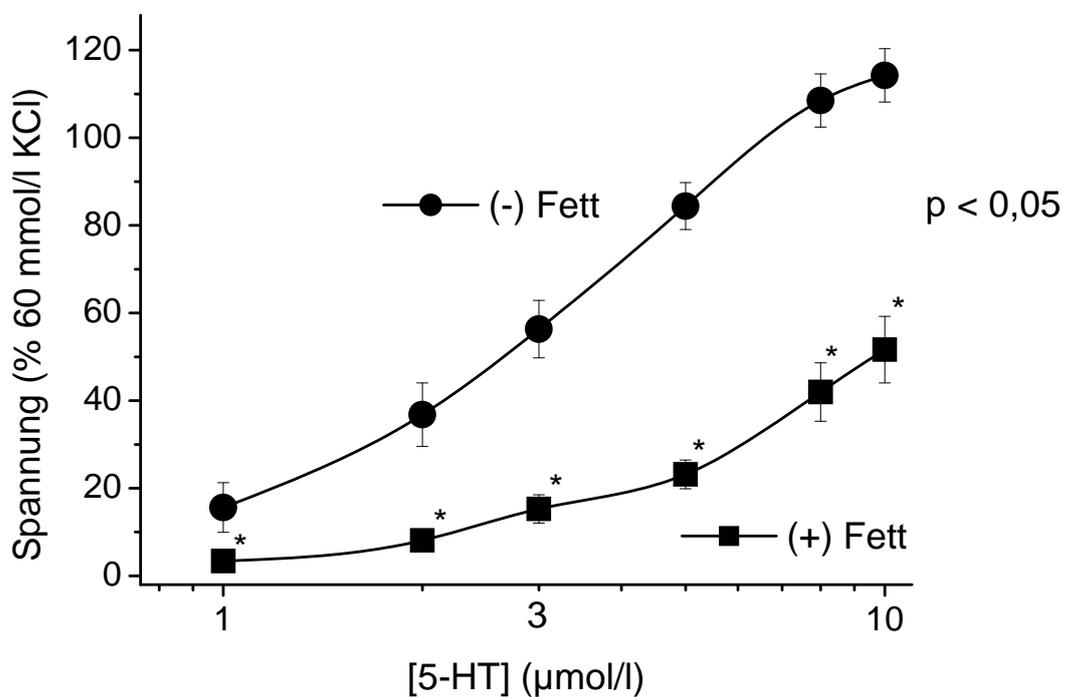


Abb. 12: Dosis-Wirkungskurven der SD-Rattenaorten mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT). \*  $p < 0,05$  für alle Werte.



### 3.2.4 Einfluss von CSE-Inhibitoren auf Rattenaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett

Um die Wirkung der CSE-Inhibitoren 4-Aminopropargylglycin (PPG) und  $\beta$ -Cyanoalanin (BCA) auf die Kontraktilität der Rattenaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett zu untersuchen, wurden die Gefäßringe für 30 Minuten mit 10 mmol/l PPG oder 5 mmol/l BCA inkubiert und anschließend stufenweise mit 1-10  $\mu$ mol/l Serotonin kontrahiert.

PPG-Inkubation steigerte die Kontraktilität der Gefäße mit perivaskulärem Fett deutlich (n = 9 für (+) Fettkontrollen, n = 8 für (+) Fett mit PPG;  $p < 0,05$  für 3 bis 10  $\mu$ mol/l Serotonin; Abb. 14). Auf Gefäße ohne perivaskuläres Fettgewebe hatte die PPG-Inkubation keinen Einfluss (n = 9 für (-) Fettkontrollen, n = 8 für (-) Fett mit PPG;  $p > 0,05$  für alle Werte; Abb. 14).

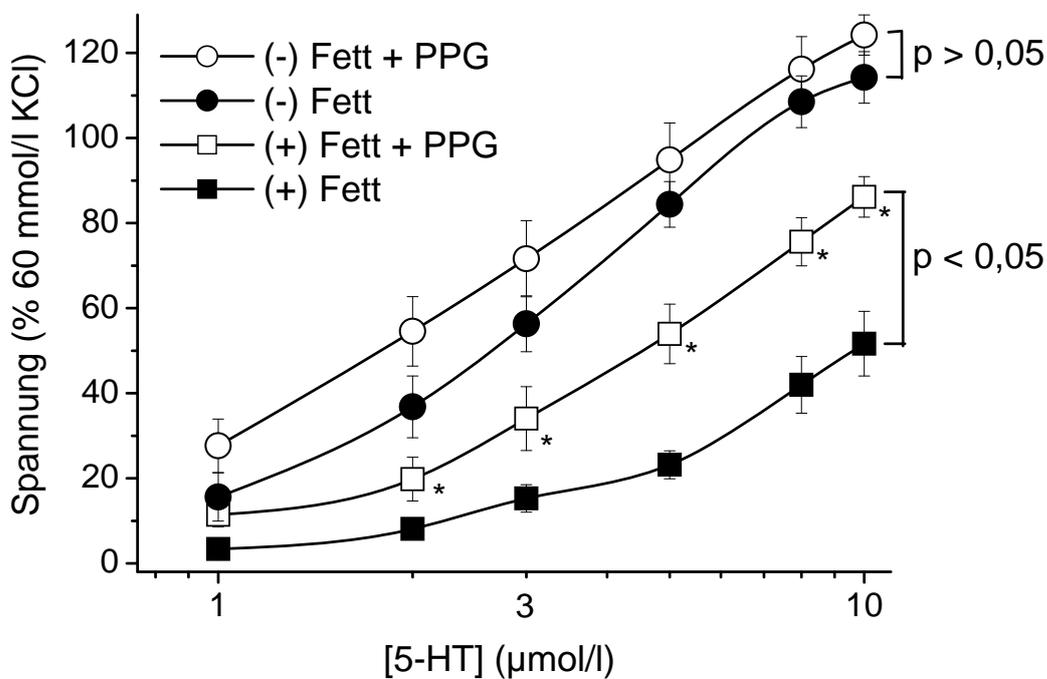


Abb. 14: Dosis-Wirkungskurven der SD-Rattenaorten mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT) mit und ohne 30-minütiger Inkubation mit 10 mM PPG. \*  $p < 0,05$  für 3-10  $\mu$ mol/l Serotonin.

BCA-Inkubation steigerte ebenfalls die Kontraktilität der (+) Fett-Gefäße auf 1-10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin ( $n = 9$  für (+) Fettkontrollen,  $n = 8$  für (+) Fett mit BCA;  $p < 0,05$  für 2 bis 10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin; Abb. 15). BCA zeigte keinen Einfluss auf die Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Gefäße auf Serotonin ( $n = 9$  für (-) Fettkontrollen,  $n = 8$  für (-) Fett mit BCA;  $p > 0,05$  für alle Werte; Abb. 15).

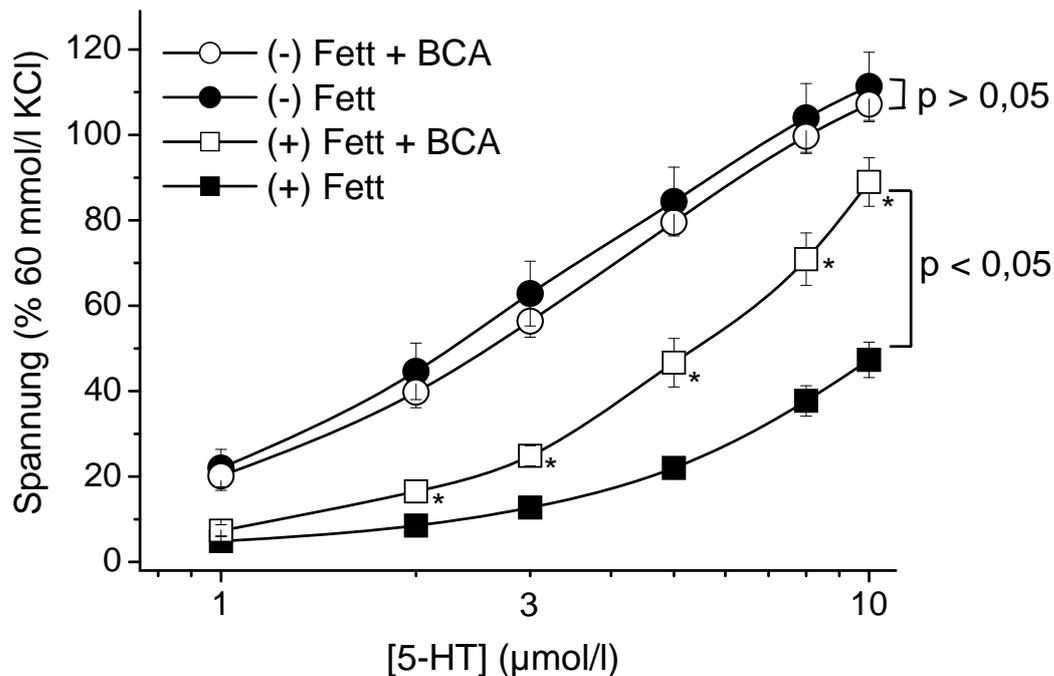


Abb. 15: Dosis-Wirkungskurven der SD-Rattenaorten mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT) mit und ohne 30-minütiger Inkubation mit 5 mM BCA. \*  $p < 0,05$  für 2-10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit 4-Aminopyridin (4-AP, 2 mmol/l) als auch der KCNQ-Kanal-Inhibitor XE991 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) bei 2-10  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettes in der Rattenaorta hemmen. Diese Ergebnisse sind in Schleifenbaum et al. beschrieben [10].

### 3.2.5 Wirkung von KCNQ-Kanal-Inhibition in der NaHS-abhängigen Relaxation Serotonin-kontrahierter Aortenringe der Ratte

Um die Bedeutung der KCNQ-Kanäle in der NaHS-vermittelten Gefäßrelaxation zu untersuchen, wurden (-) Fett-Aortenringe für 15 min mit 30  $\mu\text{mol/l}$  XE991 präinkubiert und mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin kontrahiert. Anschließend wurde stufenweise mit 0,1-1 mmol/l NaHS relaxiert.

Die Inkubation der Gefäße mit XE991 inhibierte die NaHS-vermittelte Relaxation deutlich (n = 6 für NaHS, n = 10 für NaHS plus XE991;  $p < 0,05$  für 0,03-1 mmol/l NaHS; Abb. 16).

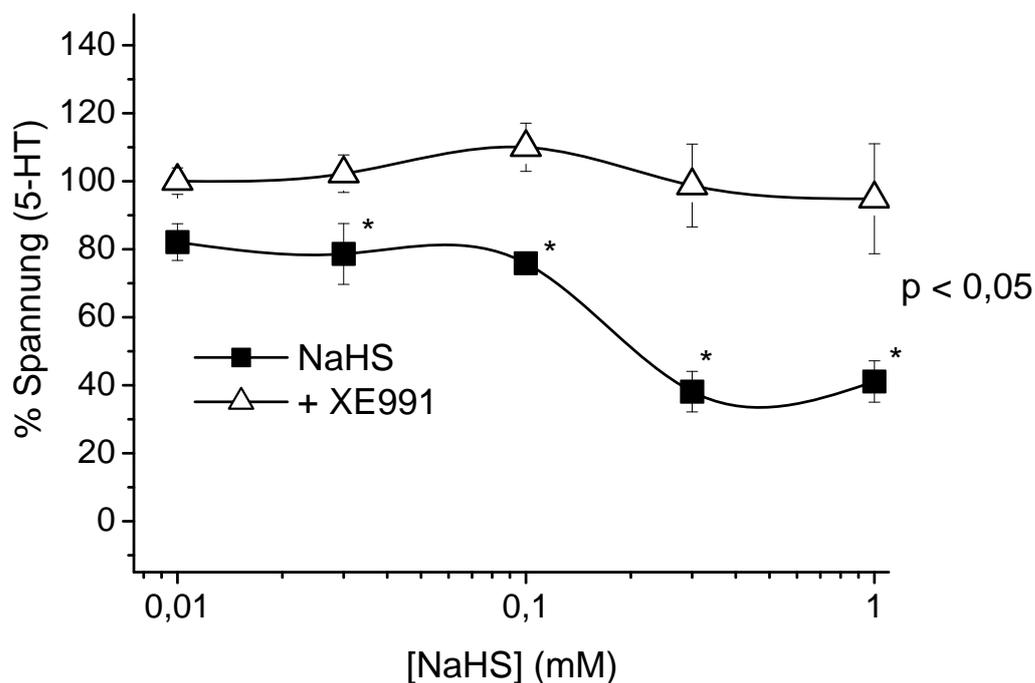


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Rattenaortenringe auf NaHS mit und ohne 15-minütiger Präinkubation mit XE991. Alle Gefäße wurden mit Serotonin vorkontrahiert.

\*  $p < 0,05$  für 0,03-1 mmol/l NaHS.

Um die Rolle der  $K_v$ -Kanäle weiter abzuklären, wurden Gefäße vor der NaHS-Relaxation mit 4-Aminopyridin (2 mmol/l; 10 min) inkubiert. 4-AP schwächte ebenfalls die Relaxation durch NaHS (n = 6 für NaHS, n = 7 für NaHS plus 4-AP;  $p < 0,05$ ; Applikation von 0,1 – 30  $\mu\text{mol/l}$  NaHS in beiden Gruppen; Daten nicht gezeigt).

### 3.2.6 Bedeutung der $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibition in der NaHS-vermittelten Relaxation Serotonin-kontrahierter Aorten

Um ein mögliche Beteiligung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der NaHS-vermittelten Relaxation kontrahierter Aortenringe zu untersuchen, wurden Gefäße ohne perivaskuläres Fett mit 3  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid inkubiert und dann mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin kontrahiert. Anschließend wurden Dosis-Wirkungskurven auf 0,1-1 mmol/l NaHS produziert.

Glibenclamid inhibierte die NaHS-vermittelte Relaxation ( $n = 6$  für NaHS,  $n = 10$  für NaHS plus Glibenclamid;  $p < 0,05$  für 0,03 bis 1 mmol/l NaHS; Abb. 17).

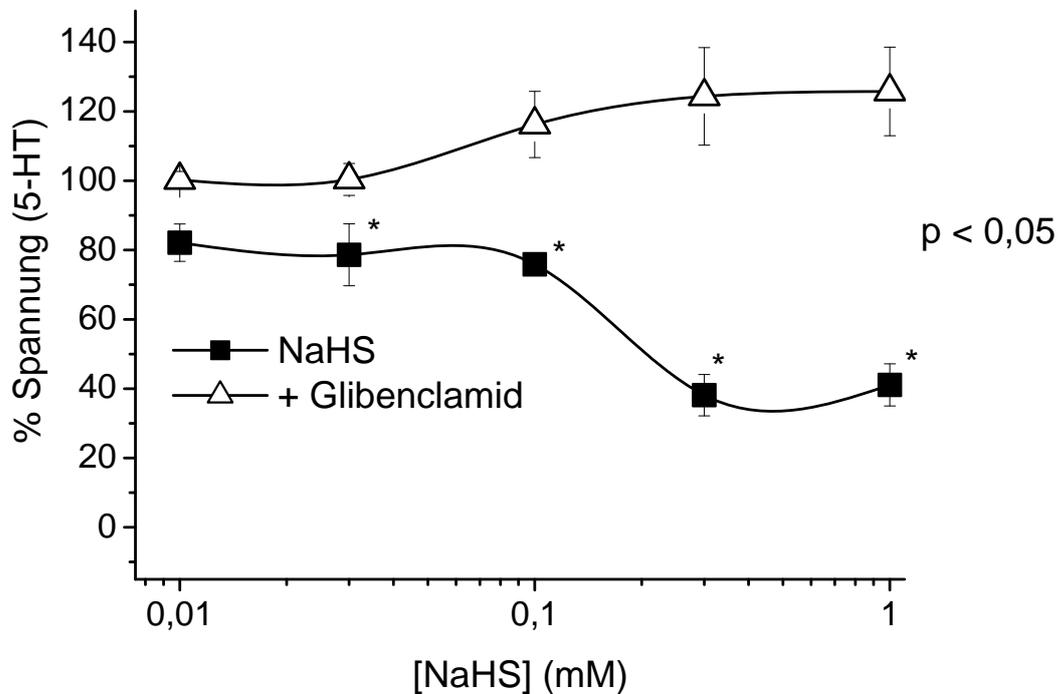


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Rattenaortenringe auf NaHS mit und ohne 15-minütiger Präinkubation mit Glibenclamid. Alle Gefäße wurden mit Serotonin vorkontrahiert. \*  $p < 0,05$  für 0,03-1 mmol/l NaHS.

### 3.3 Kontraktionsmessungen an CSE +/- Mauseaortenringen

#### 3.3.1 Kontraktionskraft der Mauseaortenringe auf hochmolare Kaliumchloridlösung

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit und Bestimmung der Kontraktionskraft der Mauseaortenringe wurden diese für 10 Minuten isomolarer 60 mmol/l Kaliumchloridlösung ausgesetzt.

CSE +/- Mauseaortenringe ohne perivaskuläres Fett zeigten eine deutlich geringere Kontraktionskraft auf die Gabe von 60 mmol/l KCl als nicht frei präparierte Gefäße (n = 78 für (-) Fett, n = 67 für (+) Fett; p = 2,64 E-11; Abb. 18).

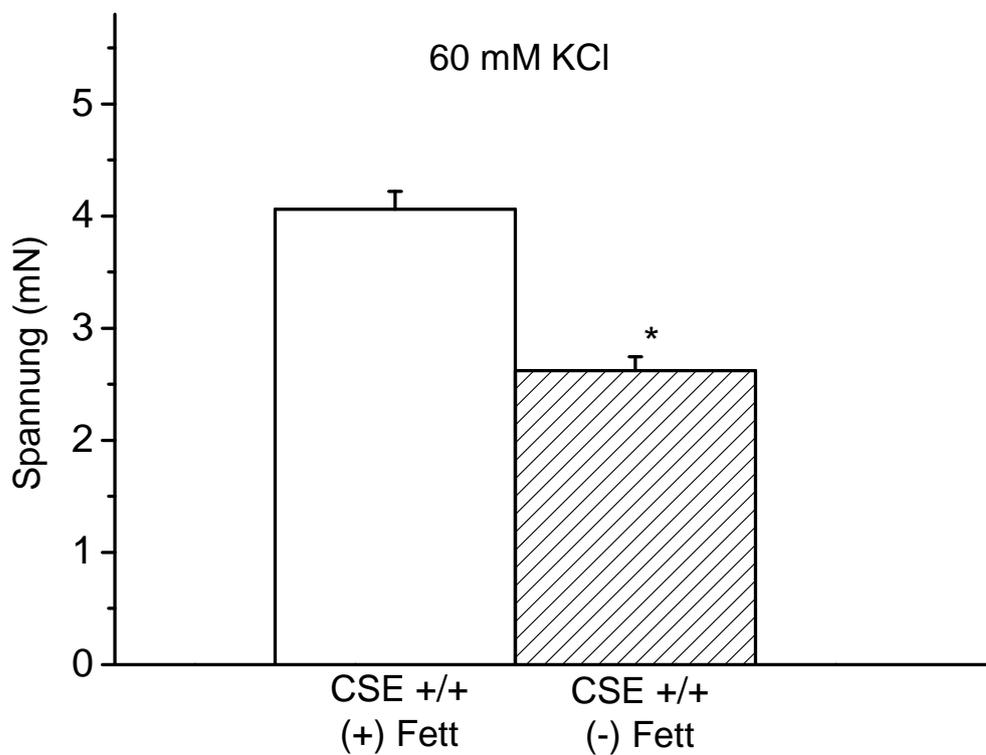


Abb. 18: Kontraktion von Aortenringen der CSE +/- Maus mit und ohne perivaskuläres Fett in Anwesenheit von 60 mM KCl-Lösung. Die Spannungsaufnahme erfolgte nach 10 min. \* p < 0,05.

### 3.3.2 Einfluss des perivaskulären Fettgewebes auf Serotoninkontraktionen

Um Serotonin-abhängige Kontraktionen der Mauseaortenringe in Abhängigkeit vom perivaskulären Fettgewebe zu untersuchen, wurden (-) und (+) Fett-Gefäßringe stufenweise mit 0,01-1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin kontrahiert.

Die Dosis-Wirkungskurve der CSE +/- Mauseaortenringe ohne perivaskuläres Fett zeigte eine deutliche Linksverschiebung gegenüber der von Gefäßen mit Fett (n = 21 für (-) Fett, n = 23 für (+) Fett;  $p < 0,02$  für 0,1-0,3  $\mu\text{mol/l}$  5-HT; Abb. 19).

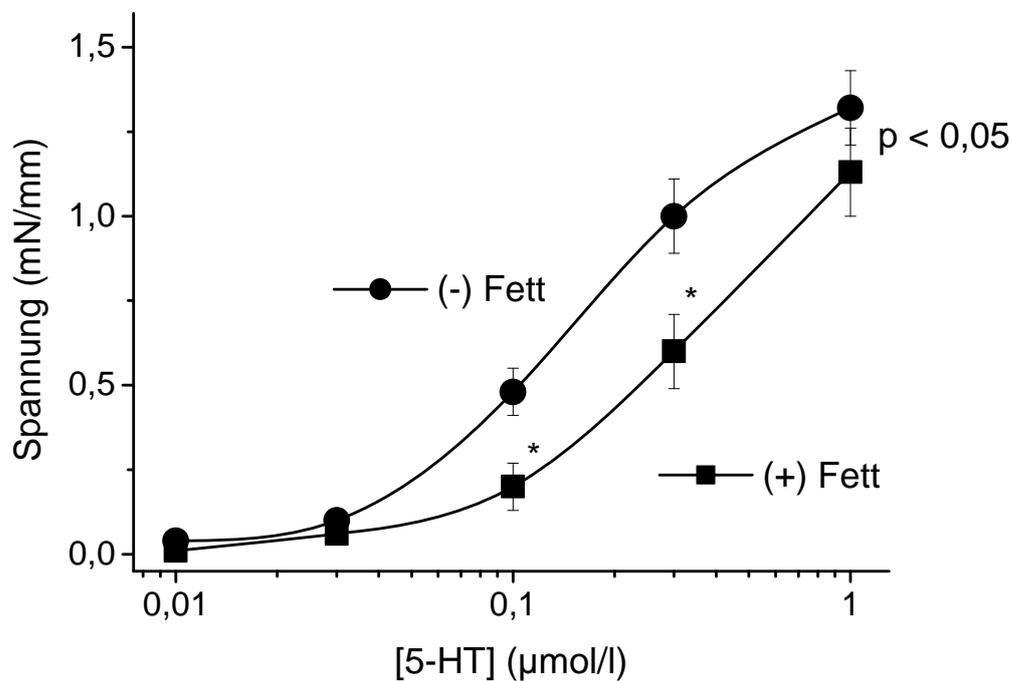


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurven der CSE +/- Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT). \*  $p < 0,05$  für 0,1 bis 0,3  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin.

### 3.3.3 Einfluss der CSE-Inhibition auf Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett

Um die Wirkung des CSE-Inhibitors 4-Aminopropargylglycin (PPG) auf die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes in CSE +/+ Mauseaortenringen zu untersuchen, wurden die Gefäßringe für 30 Minuten mit 10 mmol/l PPG inkubiert und anschließend stufenweise mit 0,01-1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin kontrahiert.

PPG-Inkubation zeigte weder bei (+) noch bei (-) Fett-Gefäßen einen Einfluss auf die Kontraktionskraft der Gefäßringe (n = 21 für (-) Fettkontrollen, n = 13 für (-) Fett plus PPG, n = 23 für (+) Fettkontrollen, n = 14 für (+) Fett plus PPG;  $p > 0,4$  für alle Konzentrationen; Abb. 20).

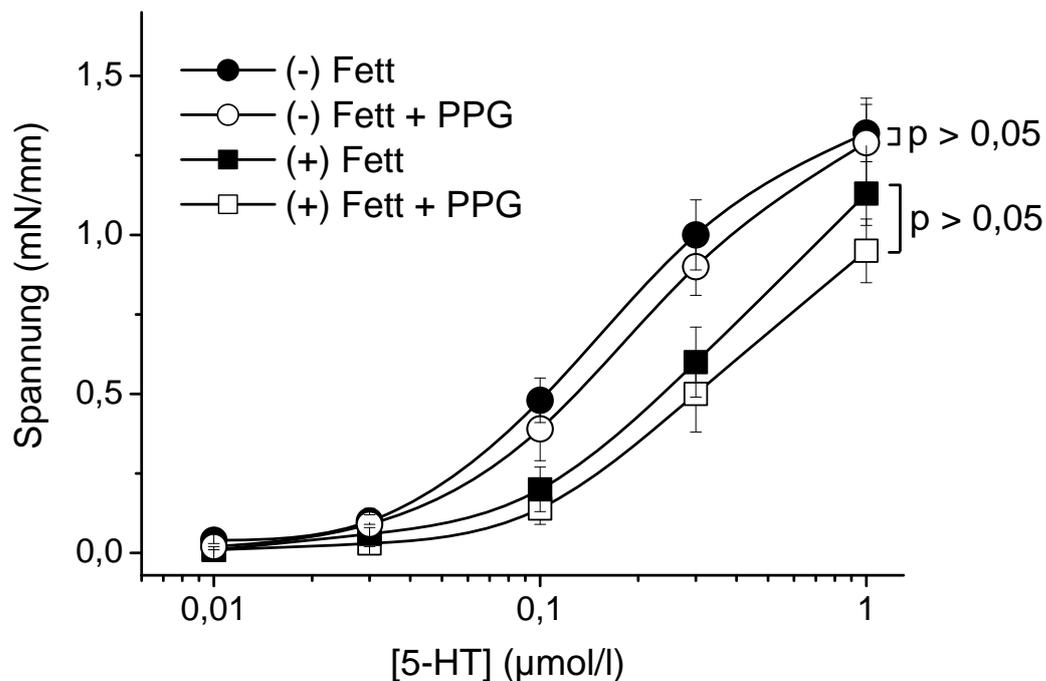


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven der CSE +/+ Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT), zum Teil nach 30-minütiger Inkubation mit PPG (1-10 mmol/l).  $p > 0,4$  für alle Konzentrationen.

### 3.3.4 Einfluss der CBS-Inhibition auf Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett

Um die Rolle von CBS-H<sub>2</sub>S in der antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes zu untersuchen, wurden Gefäße mit 1 mmol/l Aminooxyessigsäure (AOAA) inkubiert (30 min), bevor die Dosis-Wirkungskurven auf 0,01-1 µmol/l Serotonin erstellt wurden.

Inkubation mit AOAA zeigte keinen Einfluss auf die Serotonin-induzierte Kontraktionen der (-) und (+) Fett-Gefäßringe (n = 21 für (-) Fettkontrollen, n = 5 für (-) Fett mit AOAA, n = 23 für (+) Fettkontrollen, n = 5 für (+) Fett mit AOAA; p > 0,2 für alle Konzentrationen; Abb. 21).

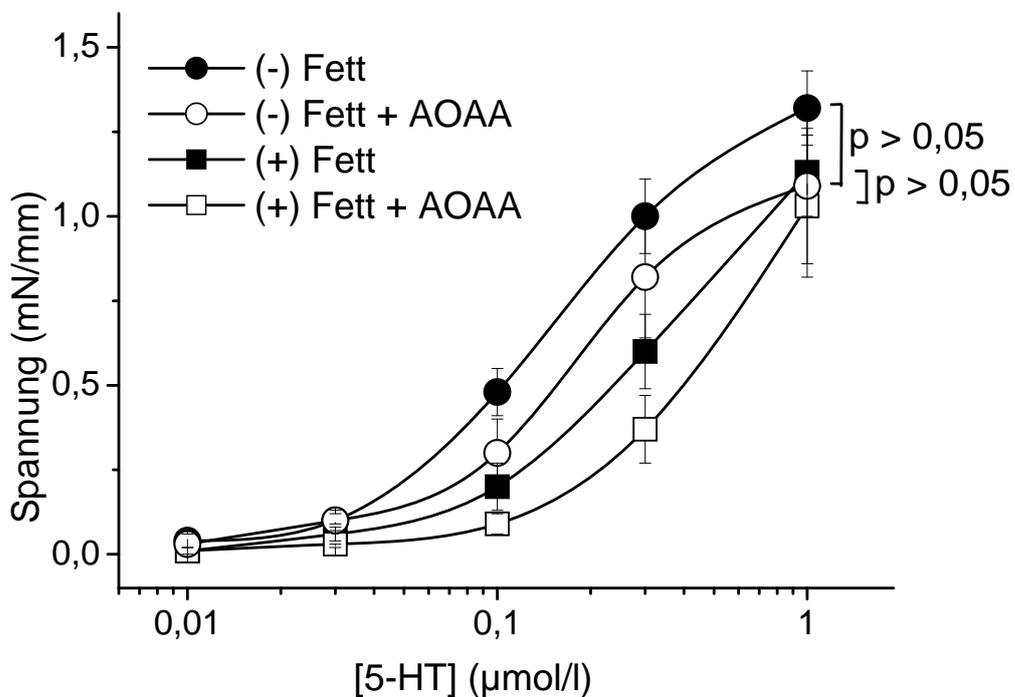


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurven der CSE ++ Mauseaortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett auf 5-HT, zum Teil nach 30-minütiger Inkubation mit AOAA (1 mmol/l). p > 0,2 für alle Konzentrationen.

### 3.3.5 Modulation der antikontraktiven Wirkung des perivaskulären Fettgewebes durch KCNQ-Inhibition

Um die Bedeutung von KCNQ-Kanälen bei dem antikontraktiven Effekt des perivaskulären Fettgewebes in Mauseorten zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungskurven auf 0,01-1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin erstellt. Zuvor wurden die (+) Fett und (-) Fett-Gefäße jeweils mit 30  $\mu\text{mol/l}$  XE991 (15 min) inkubiert.

Die Inkubation der Gefäßringe mit XE991 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf Serotonin-induzierte Kontraktionen der (-) Fett-Gefäßringe ( $n = 10$  für (-) Fettkontrollen,  $n = 6$  für (-) Fett mit XE991;  $p > 0,05$  für alle Konzentrationen; Abb. 22). In (+) Fett-Gefäßringen steigerte eine XE991-Inkubation die Kontraktion jedoch deutlich ( $n = 10$  für (+) Fettkontrollen,  $n = 6$  für (+) Fett mit XE991;  $p < 0,04$  für 0,03-0,3  $\mu\text{mol/l}$  5-HT; Abb. 22).

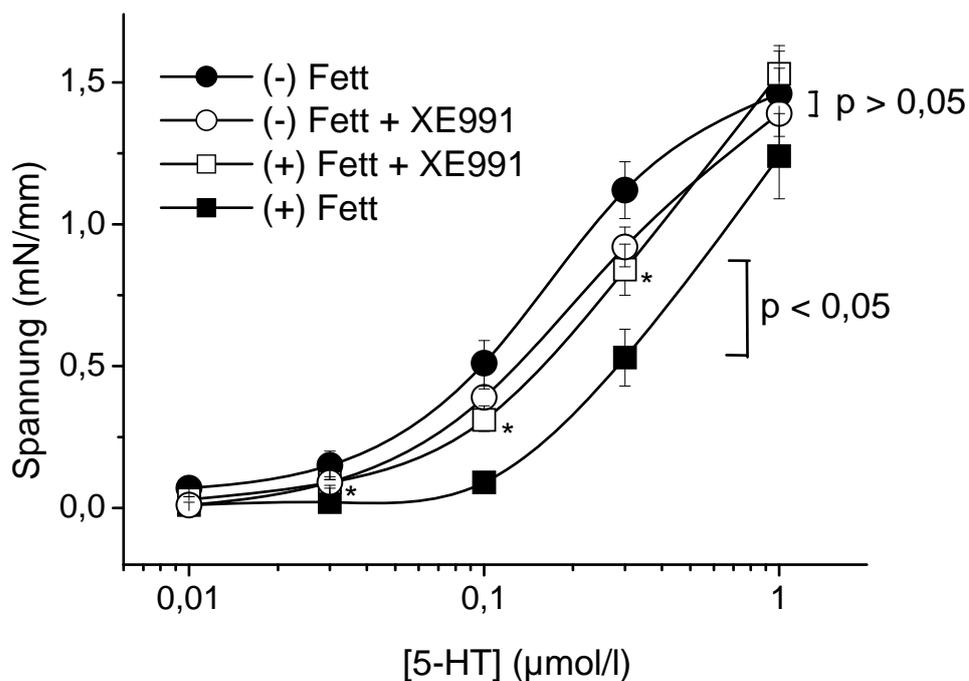


Abb. 22: Dosis-Wirkungskurven der CSE +/+ Mauseortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT), zum Teil nach 15-minütiger Inkubation mit XE991. \*  $p < 0,05$  für 0,03 – 0,3  $\mu\text{mol/l}$  5-HT.

### 3.3.6 Relaxation isolierter Mauseaortenringe durch exogene H<sub>2</sub>S-Donoren

Um das Relaxationsverhalten isolierter Mauseaortenringe auf H<sub>2</sub>S zu untersuchen, wurden die Gefäße mit 1 µmol/l Serotonin kontrahiert. Anschließend wurde entweder der natürliche Spannungsabfall beobachtet oder durch exogene H<sub>2</sub>S-Donoren eine Relaxation induziert. Die Spannungsaufnahme erfolgte jeweils nach 30 Minuten (siehe Abb. 23).

Gefäßringe mit perivaskulärem Fett zeigten eine stabile Kontraktion auf 1 µmol/l 5-HT (n = 18). Gefäßringe ohne perivaskuläres Fett wiesen einen Spannungsabfall um 34,3 % auf (n = 16). Exogenes NaHS (3 mmol/l) induzierte eine Relaxation um 65,82 % (n = 11), ADTOH um 98,96 % (n = 8). Die Relaxationen durch NaHS und ADTOH waren stärker als die Spontanrelaxationen der (+) bzw. (-) Fett-Gefäßringe (jeweils p < 0,05).

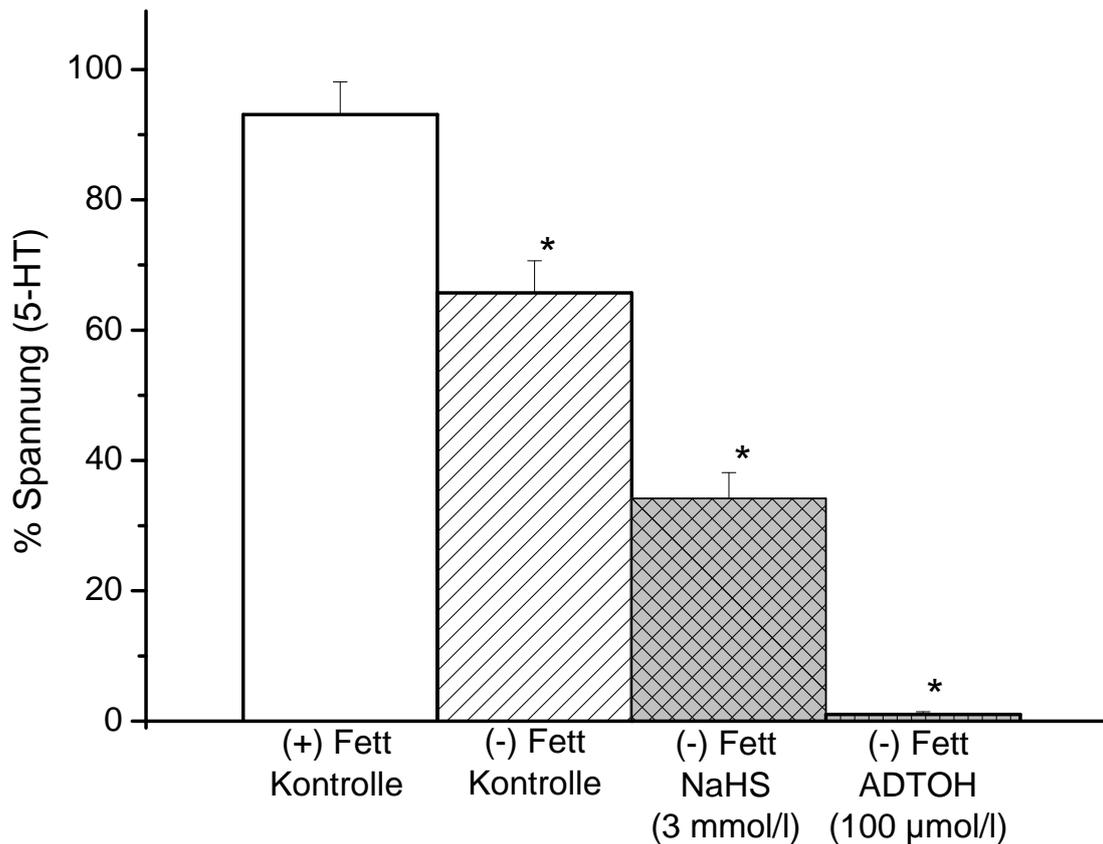


Abb. 23: Natürlicher Spannungsabfall der CSE +/- Mauseaorten mit und ohne perivaskuläres Fett sowie Relaxation der (-) Fettgefäße nach Applikation von NaHS oder ADTOH. Alle Gefäße wurden mit Serotonin (1 µmol/l) vorkontrahiert. Die Spannungsaufnahme erfolgte nach 30 min.

\* p < 0,05.

### 3.3.7 Rolle von KCNQ-Kanälen in der Gefäßrelaxation durch exogenes H<sub>2</sub>S

Um die dosisabhängige Relaxation durch exogenes H<sub>2</sub>S in Abhängigkeit von KCNQ-Kanälen zu beurteilen, wurden vorkontrahierte (-) Fett-Mausaortenringe mit NaHS (0,01-3 mmol/l) bzw. ADTOH (0,01-100 µmol/l) relaxiert. Zuvor wurden einige Aortenringe mit XE991 (30 µmol/l, 15 min) inkubiert.

Exogenes NaHS produzierte eine dosisabhängige Relaxation auf 34,81 % der ursprünglichen Spannung (n = 8). Inkubation mit XE991 inhibierte diese Relaxation (n = 9; p < 0,05 für 0,3 mmol/l NaHS, p < 0,002 für 1-3 mmol/l NaHS; Abb. 24).

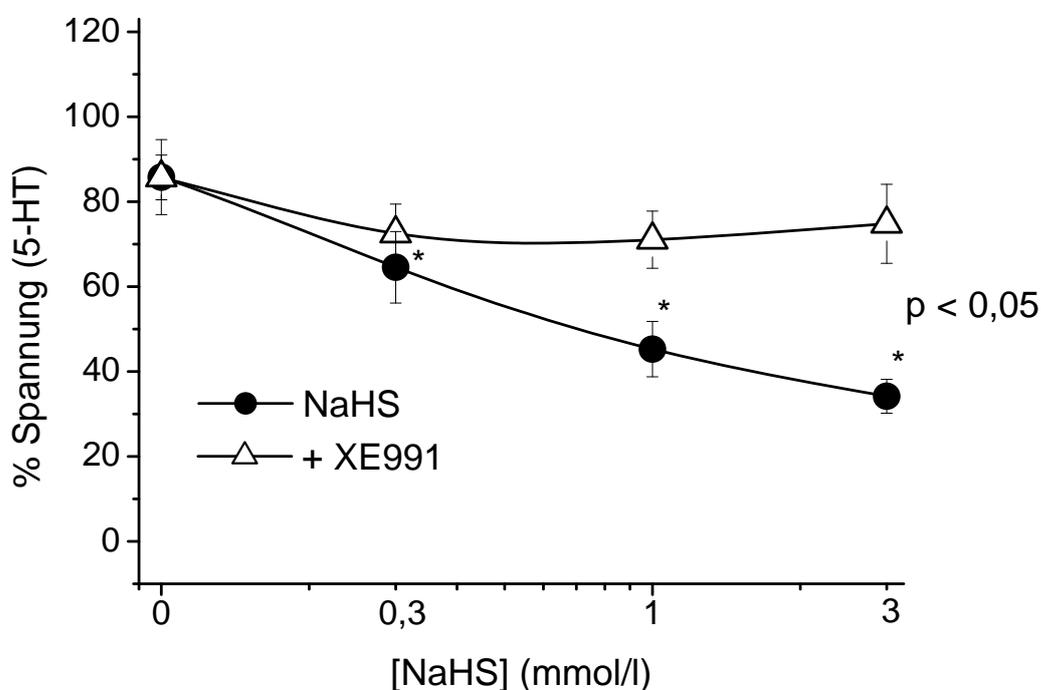


Abb. 24: Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Aortenringe (CSE +/+) auf NaHS mit und ohne 15-minütiger Präinkubation mit XE991. Alle Gefäßringe wurden mit Serotonin (1 µmol/l) vorkontrahiert. \* p < 0,05 für 0,3-3 mmol/l NaHS.

Der H<sub>2</sub>S-Donor ADTOH produzierte dosisabhängig eine fast vollständige Relaxation der vorkontrahierten Mauseortenringe ohne perivaskuläres Fett (n = 6). Die Dosis-Wirkungskurve der mit XE991 inkubierten Gefäßringe zeigte eine deutliche Rechtsverschiebung (n = 6;  $p \leq 0,001$  für 10-30  $\mu\text{mol/l}$  ADTOH; Abb. 25).

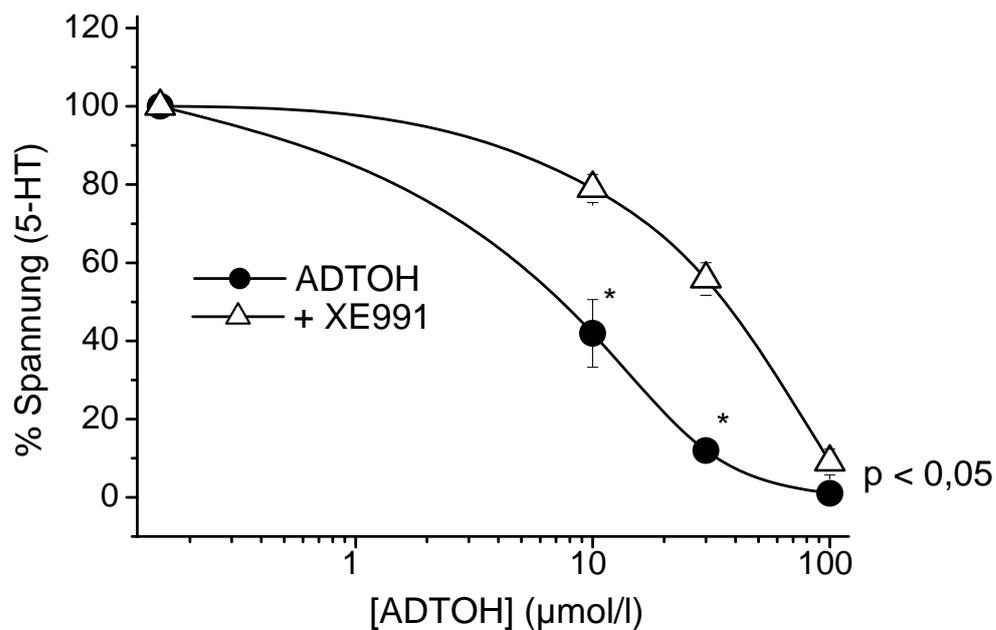


Abb. 25: Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Aortenringe (CSE +/+) auf ADTOH mit und ohne 15-minütiger Präinkubation mit XE991 (30  $\mu\text{mol/l}$ ). Alle Gefäßringe wurden mit Serotonin (1  $\mu\text{mol/l}$ ) vorkontrahiert. \*  $p \leq 0,001$  für 10-30  $\mu\text{mol/l}$  ADTOH.

### 3.3.8 Dosisabhängige Relaxation Serotonin-kontrahierter Mauseorten durch L-Cystein

Um die stufenweise Relaxation durch L-Cystein in Abhängigkeit der CSE-Inhibition zu untersuchen, wurden Gefäßringe mit 0,01-10 mmol/l L-Cystein relaxiert. Eine Gruppe von Präparaten wurde mit dem CSE-Inhibitor PPG (1 mmol/l, 30 min) inkubiert.

L-Cystein relaxierte (-) Fett-Gefäßringe auf 46,72 % der ursprünglichen Spannung (n = 11). Die Inkubation von Gefäßringen mit PPG hatte keinen Einfluss auf diese Relaxation (n = 5;  $p > 0,1$  für alle Werte; Abb. 26).

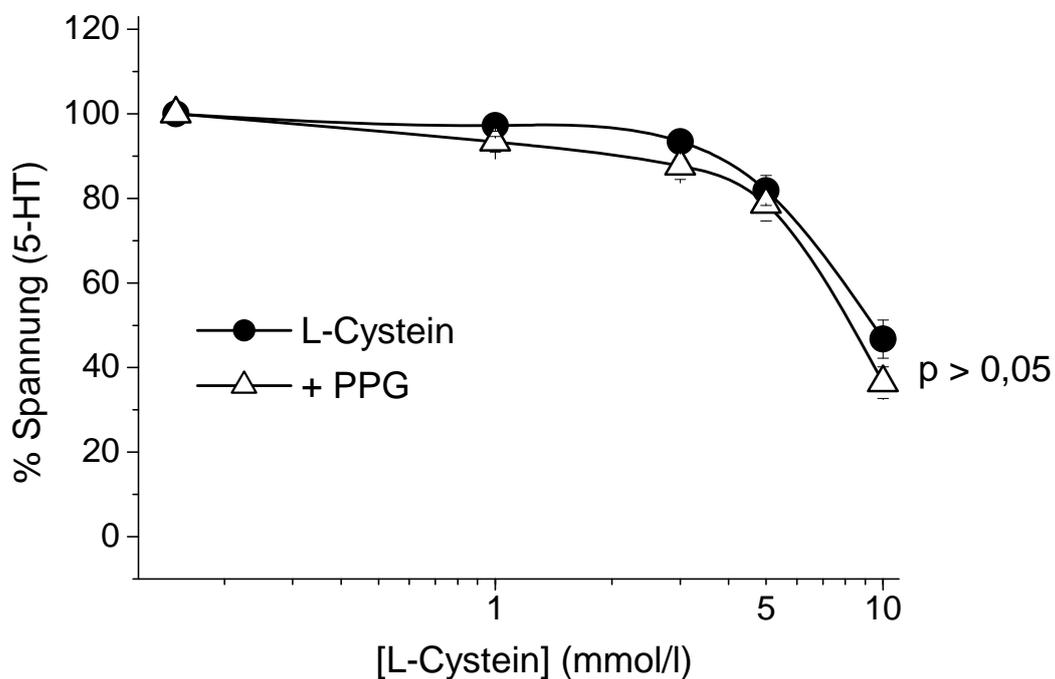


Abb. 26: Dosis-Wirkungskurven der (-) Fett-Aortenringe (CSE +/+) auf L-Cystein mit und ohne Präinkubation mit PPG (1 mmol/l). Alle Gefäße wurden mit Serotonin (1  $\mu\text{mol/l}$ ) vorkontrahiert.  $p > 0,1$  für alle Konzentrationen.

### 3.4 Kontraktionsmessungen an CSE -/- Mausearten

#### 3.4.1 Kontraktionskraft der Mauseartenringe auf hochmolare Kaliumchloridlösung

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit und Bestimmung der Kontraktionskraft der Mausearten wurden diese für 10 Minuten isomolarer 60 mmol/l KCl-Lösung ausgesetzt.

CSE +/+ und CSE -/- Mausearten ohne perivaskuläres Fett zeigten eine deutlich geringere Kontraktilität auf 60 mmol/l KCl als die Gefäße mit periadventitiellem Fettgewebe (n = 27 für CSE +/+ (+) Fett, n = 22 für CSE +/+ (-) Fett, n = 23 für CSE -/- (+) Fett, n = 18 für CSE -/- (-) Fett;  $p < 1,2 \cdot 10^{-4}$ ; Abb. 27). Allerdings gab es keine Unterschiede zwischen CSE +/+ und CSE -/- in den jeweiligen Gruppen mit bzw. ohne perivaskuläres Fett.

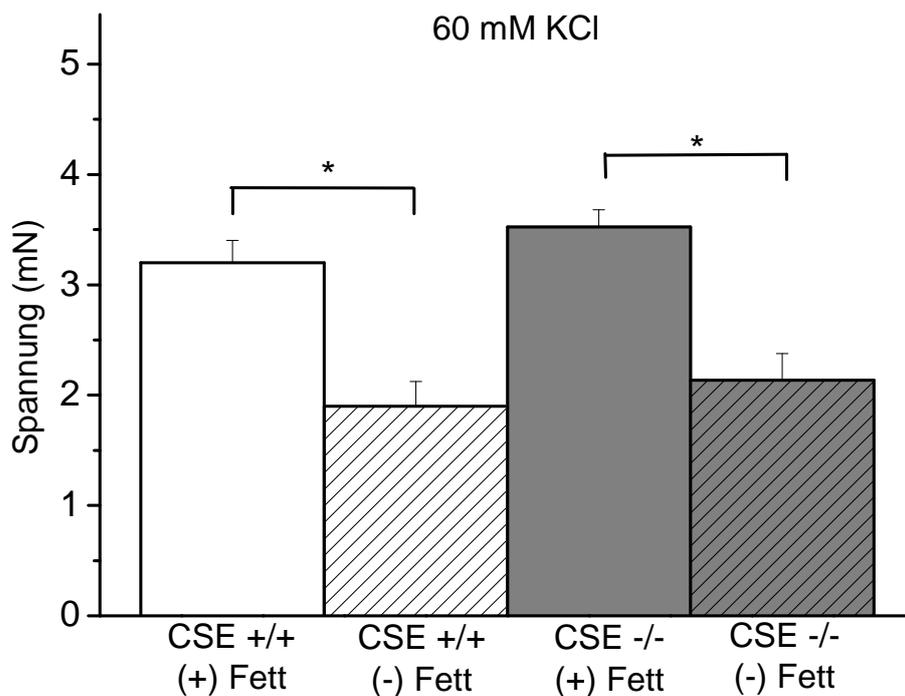


Abb. 27: Kontraktion von Aortenringen der CSE -/- Maus mit und ohne perivaskuläres Fett im Vergleich zu entsprechenden Präparaten der CSE +/+ Aortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett. Die Spannungsaufnahme erfolgte nach 15 min. \*  $p < 1,2 \cdot 10^{-4}$

### 3.4.2 Einfluss des CSE-Genotyps auf fettabhängige Serotoninkontraktionen

Um die Rolle von CSE bei der antikontraktilen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes zu untersuchen, wurden Serotonin-Dosis-Wirkungskurven von CSE +/+ und CSE -/- Aortenringen je mit und ohne perivaskuläres Fett erstellt.

Die Dosis-Wirkungskurven auf Serotonin der CSE -/- Gefäße ohne perivaskuläres Fett zeigten gegenüber dem Wildtyp keinen Unterschied (Abb. 28). Auch die Gefäße mit intaktem Fettgewebe reagierten unabhängig vom Genotyp gleich stark auf 0,01-1  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin ( $p > 0,05$  für alle Werte) (Abb. 28). In CSE -/- Mäusen und im Wildtyp zeigten die Gefäße mit perivaskulärem Fett eine deutlich reduzierte Kontraktilität auf 0,03-0,3  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin verglichen zu den Gefäßen ohne perivaskuläres Fett ( $n = 15$  für CSE +/+ (+) Fett,  $n = 12$  für CSE +/+ (-) Fett,  $n = 16$  für CSE -/- (+) Fett,  $n = 11$  für CSE -/- (-) Fett;  $p \leq 0,005$  für 0,03-0,3  $\mu\text{mol/l}$  5-HT; Abb. 28).

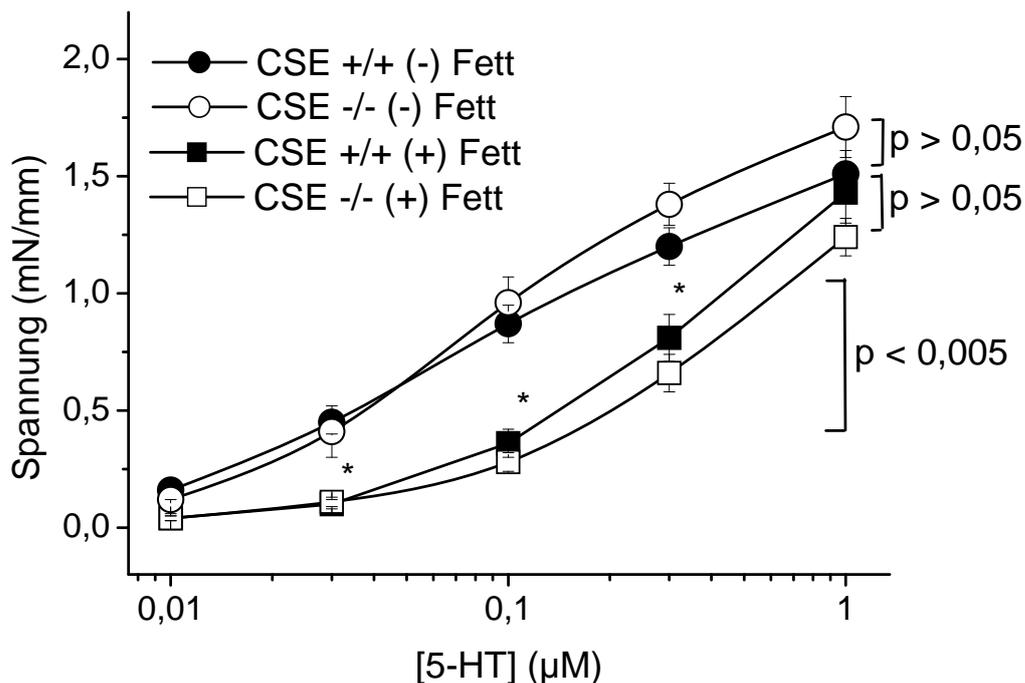


Abb. 28: Dosis-Wirkungskurven der CSE +/+ Mauseortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett sowie der CSE -/- Mauseortenringe mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin (5-HT).

\*  $p \leq 0,005$  für 0,03-0,3  $\mu\text{mol/l}$  Serotonin.

## 4 Diskussion

Perivaskuläres Fettgewebe spielt eine entscheidende Rolle in der parakrinen Gefäßtonusregulation [2]. Es vermittelt den ADRF-Effekt in isolierten Gefäßen. Dieser wird nicht von neuronalen Signalen beeinflusst [11]. Auch Endothelzellen haben keinen Einfluss [3]. Dagegen kommen antikontraktile Effekte des perivaskulären Fettes durch eine parakrine Interaktion zwischen Adipozyten und Gefäßmuskelzellen zustande. In der Aorta und in Mesenterialarterien bilden vorwiegend  $K_v$ -Kanäle die ADRF-Zielstruktur [3, 9]. Tyrosinkinasen scheinen an dieser Signaltransduktion beteiligt zu sein [3].

Die ADRF-Signalwege haben vermutlich eine allgemeine pathophysiologische Bedeutung bei Hypertonie und Adipositas: In Hypertonie-Modellen der Ratte konnte ein verminderter ADRF-Effekt bei reduziertem perivaskulärem Fettgehalt nachgewiesen werden [6]. In einem Adipositas-Hypertonie-Modell der Maus zeigte sich kürzlich trotz erhöhten viszeralen Fettgehaltes ein abgeschwächter ADRF-Effekt in Mesenterialarterien [5].

In der Literatur ergeben sich weitere Hinweise, dass die Funktion und Dysfunktion parakriner Mediatoren des perivaskulären Fettgewebes eine entscheidende Rolle in der Genese der Adipositas-assoziierten Hypertonie spielen [7]. Bisher sind jedoch weder die Natur des ADRFs noch sein genauer Wirkmechanismus bekannt. Entsprechend fehlen auch Hinweise auf mögliche Dysfunktionen im Rahmen der Adipositas-assoziierten Hypertonie. Zum Verständnis dieser sowie zur Planung neuer Therapiestrategien ist die Kenntnis der zugrunde liegenden physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge jedoch von entscheidender Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es daher, 1. CO und  $H_2S$  als potentielle ADRF-Kandidaten zu untersuchen, sowie 2. die Bedeutung der verschiedenen Kaliumkanäle als Zielstrukturen dieser Gasotransmitter und ADRF zu identifizieren.

### 4.1 Perivaskuläres Fett in den verschiedenen Tiermodellen

Sowohl in Maus- als auch in Rattenaorten zeigen die Untersuchungen der Kontraktilität in Abhängigkeit vom perivaskulären Fett einen deutlichen antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes.

In ersten Studien wurde CO als ADRF-Kandidat untersucht. In den Rattenaorten hatte weder ZnDP- noch SnMP-Inkubation der Gefäße einen Einfluss auf den antikontraktilen Effekt. Beide Stoffe werden in der Literatur als potente Inhibitoren der Hämoxigenase-1 beschrieben [40], ein Enzym, das entscheidend an der Produktion von vaskulär wirksamem CO beteiligt ist [41]. Mehrfach wurde die Gefäßtonusmodulation durch endogenes CO beschrieben [14, 18, 42]. Giordano et al. wiesen eine Expression sowohl der induzierbaren HO-1 als auch der konstitutiven HO-2 im braunen Fettgewebe der Ratte nach [43]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der induzierbaren Isoform HO-1 in der parakrinen Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der HO-1 keinen Einfluss auf den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettes hat. Es kann also angenommen werden, dass CO zumindest in der Rattenaorta nicht am ADRF-Effekt beteiligt ist.

In einem nächsten Schritt wurde die Hypothese untersucht, ob H<sub>2</sub>S ein ADRF-Kandidat ist. Für die endogene H<sub>2</sub>S-Produktion wurden bisher zwei Enzyme beschrieben: Cystathionin-γ-Lyase (CSE) und Cystathionin-β-Synthase (CBS). CBS-H<sub>2</sub>S ist u.a. an der zerebralen Tonusregulation beteiligt, die CSE gilt als Hauptenzym der systemischen vaskulären H<sub>2</sub>S-Produktion [19]. Hinweise auf H<sub>2</sub>S als Modulator der parakrinen Gefäßtonusregulation tauchten in der Literatur erstmals 1997 auf [44]. Bisher untersuchte H<sub>2</sub>S-Effekte wiesen auf eine Endothel-Abhängigkeit hin [44]. Diese Arbeit untersuchte die fettabhängige Wirkung von H<sub>2</sub>S. Eine Inhibition der Cystathionin-γ-Lyase mit PPG und BCA in Rattenaorten reduzierte den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettes für alle applizierten Serotoninkonzentrationen deutlich. In Gefäßen ohne perivaskuläres Fett zeigte keiner der beiden CSE-Inhibitoren einen Einfluss. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass CSE-H<sub>2</sub>S zumindest teilweise eine Rolle als ADRF in der Rattenaorta spielt.

Die durchgeführten Relaxationsstudien an vorkontrahierten Rattenaorten zeigen, dass exogenes H<sub>2</sub>S in Form von NaHS in Gefäßen ohne perivaskuläres Fett eine starke vasorelaxierende Wirkung hat. Dieser Effekt lässt sich besonders im niedrigen mmol/l-Bereich beobachten. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Relaxation ab oder kehrt sich sogar um (nicht gezeigt). Die zunehmende Vasokonstriktion bei Konzentrationen über 3 mM NaHS wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, jedoch ist eine Bedeutung in der Gefäßtonusregulation auf Grund der unphysiologisch hohen Konzentration fraglich.

Verschiedene Arbeiten bestätigen jedoch einen konzentrationsabhängigen vasorelaxierenden bis -konstringierenden Effekt von H<sub>2</sub>S in niedrigen Konzentrationen [26, 29]. Lim et al. zeigten eine Vasokonstriktion bei Applikation von 10-100 µmol/l NaHS, was ungefähr 3-30 µmol/l an freigesetztem H<sub>2</sub>S entsprechen soll. Dieser vasokonstringierende Effekt ist durch Inhibition der NO-Synthase oder Endothelentfernung reversibel [26]. Desweiteren scheint der Adenylylcyclase/cAMP-Pathway eine Rolle zu spielen [26].

Studien von Webb et al. zeigten, dass auch der Tonus menschlicher Gefäße durch H<sub>2</sub>S moduliert werden kann. Hier kontrahierten niedrige NaHS-Konzentrationen (ca. 10-150 µmol/l) die A. thoracica interna, wahrscheinlich über eine NO-Inaktivierung als Nitrosothiol. Höhere Konzentrationen relaxierten die Gefäße, u.a. über eine Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle [29]. Somit scheint es stark ausgeprägte Spezies- und Konzentrations-abhängige Effekte von H<sub>2</sub>S auf die Gefäßmuskulatur zu geben.

Als H<sub>2</sub>S-Zielstrukturen wurden bisher besonders K<sub>ATP</sub>-Kanäle [45] identifiziert. Desweiteren sollen Änderungen des pH-Wertes über Modulation des Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporters durch H<sub>2</sub>S einen Einfluss auf den Gefäßtonus haben [25, 46]. In den hier aufgeführten Untersuchungen ließ sich die H<sub>2</sub>S induzierte Vasorelaxation fast vollständig durch Inkubation mit XE991 hemmen, sodass zusätzlich eine Bedeutung der KCNQ-Kanäle als H<sub>2</sub>S-Zielstrukturen in Aortenringen der Ratte und Maus angenommen werden muss.

Die gefäßtonusregulierende Bedeutung von KCNQ-Kanälen wurde erstmals 2006 in Pulmonalarterien beschrieben [37]. Allerdings haben diese Gefäße kein perivaskuläres Fettgewebe. Die Rolle von diesen Kanälen bei der parakrinen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes auf den Gefäßtonus wurde erstmals in unserer Arbeitsgruppe untersucht und beschrieben [10]. Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse sind Bestandteil dieser Publikation. Diese Befunde und die hier zusätzlich erhobenen Ergebnisse zeigen erstmalig eine Beteiligung der KCNQ-Kanäle in der H<sub>2</sub>S-abhängigen Relaxation von Aortenringen von Ratte und Maus. In Übereinstimmung mit Schleifenbaum et al. [10] kann festgestellt werden, dass der antikonstraktile Effekt des perivaskulären Fettes durch KCNQ-Inhibition in der Aorta fast vollständig reversibel ist.

4-Aminopyridin ist ein potenter Inhibitor der  $K_v$ -Kanäle. Er wirkt jedoch weniger spezifisch auf KCNQ-Kanäle [35]. Inkubation von Aortenringen mit 4-AP zeigte eine dosisabhängige Inhibition der  $H_2S$ -induzierten Relaxation. Nichtsdestotrotz fiel der Effekt der  $K_v$ -Inhibition mit 4-Aminopyridin deutlich geringer als die KCNQ-Kanal-Inhibition aus (nicht gezeigt).

Inkubation mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitor Glibenclamid hemmte die  $H_2S$ -abhängige Relaxation deutlich. Diese Beobachtung bestätigt einerseits die bereits gewonnenen Ergebnisse von Zhao et al., in denen ein  $K_{ATP}$ -abhängiger Wirkmechanismus von  $H_2S$  vorgestellt wurde [45]. Andererseits scheinen  $K_{ATP}$ -Kanäle als ADRF-Zielstrukturen in der Rattenaorta eine geringe Rolle zu spielen [3].

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung von KCNQ-Kanälen als ADRF-Zielstruktur durch Membranhyperpolarisation der Gefäßmuskelzellen antikontraktil wirkt. Weitere Studien müssen diese Vermutung bestätigen.

Die hier beschriebenen Befunde zeigen, dass  $H_2S$  in Rattenaorten ohne funktionelles perivaskuläres Fett den ADRF-Effekt imitieren kann.  $H_2S$  kann eine Relaxation vorkontrahierter Aorten induzieren, die der antikontraktilen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes entspricht.  $H_2S$  könnte hierbei zumindest teilweise ein ADRF in der Rattenaorta sein. Diese Interpretation wird durch eine Publikation von Fang et al. bestätigt. Sie zeigten immunhistologisch (Peroxidasefärbung) und molekularbiologisch (Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR) die Expression der CSE in periaortalen Adipozyten. Darüberhinaus wiesen sie mittels Spektrophotometrie und Sulfid-sensitiven Elektroden eine  $H_2S$ -Produktion in verschiedenen Geweben, einschließlich in der Aorta, nach, die diese Erkenntnis bestätigt. Auch in den Versuchen von Fang et al. haben CSE-Hemmstoffe (PPG und BCA) die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes gehemmt [47].

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls versucht, einen Zusammenhang zwischen ADRF und CSE immunhistochemisch zu begründen. Die bisher verfügbaren und in der Literatur beschriebenen Antikörper gegen CSE und CBS zeigten jedoch unspezifische Färbungen (nicht gezeigt), vorwiegend der glatten Muskulatur der Rattenaorta, sodass die Ergebnisse von Fang et al. nicht bestätigt werden konnten. Nichtsdestotrotz hemmten CSE-Inhibitoren (PPG und BCA) auch in den vorliegenden Versuchen die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes

in der Rattenaorta partiell, so dass CSE-generiertes H<sub>2</sub>S zumindest teilweise am ADRF-Effekt in der Rattenaorta beteiligt sein könnte.

Verschiedene Autoren haben Arbeiten zur Histologie der H<sub>2</sub>S-Enzymexpression publiziert. Zhao et al. zeigten, dass die CSE nicht im Endothel sondern in der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert ist [45]. Yang et al. hingegen wiesen eine nur geringe CSE-Expression in Gefäßmuskelzellen (VSMC), dafür aber eine starke Expression im Endothel, nach [23]. Die verschiedenen Publikationen legen nahe, dass die Lokalisation der CSE scheinbar nicht auf einen Zelltyp allein beschränkt ist. Möglicherweise sind auch die Methoden der Lokalisation noch nicht spezifisch genug.

Es liegen mehrere Publikationen vor, in denen versucht wurde, die H<sub>2</sub>S-Produktion in verschiedenen Geweben zu messen. In der Regel werden Sulfid-sensitive Elektroden zur Messung der Serum-H<sub>2</sub>S-Konzentrationen verwendet [45]. Um die H<sub>2</sub>S-Syntheserate von Geweben zu ermitteln, werden Absorptionsmessungen mittels Spektrophotometer durchgeführt, deren Ergebnisse anschließend mit einer Kalibrierungskurve standardisierter H<sub>2</sub>S-Lösungen verrechnet werden [45]. Oft liegen jedoch verschiedene Protokolle vor, z.B. fehlt oft die Bestimmung der basalen H<sub>2</sub>S-Produktion, sodass die Ergebnisse der verschiedenen Autoren untereinander schwer vergleichbar sind [19]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von der Messung der H<sub>2</sub>S-Syntheserate durch perivaskuläres Fett auf Grund der unzureichenden Zuverlässigkeit und Standardisierbarkeit der derzeit verfügbaren H<sub>2</sub>S-Messmethoden abgesehen.

Zusätzlich zu Immunhistochemie und H<sub>2</sub>S-Messungen untersuchten Fang et al. einen Zusammenhang zwischen perivaskulärem Fett und H<sub>2</sub>S durch Aliquottransfer, Transplantation periadventitiellen Gewebes und Adipozyten-Zellkulturen [47]. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass H<sub>2</sub>S ein Faktor des ADRF-Komplexes in der Rattenaorta ist, sodass sich im Zusammenspiel mit den hier gewonnenen Ergebnissen verschiedene Regelkreise zwischen ADRF und H<sub>2</sub>S ergeben könnten. Dabei wird berücksichtigt, dass H<sub>2</sub>S auch ein Modulator von ADRF sein könnte. In Abb. 28 sind mögliche Wechselwirkungen dargestellt. Abb. 28 a zeigt, dass H<sub>2</sub>S den ADRF freisetzt, welcher Gefäße durch Öffnung von KCNQ-, K<sub>ATP</sub>-Kanälen und/oder Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter relaxiert. Abb. 28 b zeigt, dass H<sub>2</sub>S nicht direkt als ADRF, sondern als Modulator von ADRF und des Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporters fungiert. Abb. 28 c zeigt, dass ADRF und H<sub>2</sub>S als unabhängige Faktoren die glatte Gefäßmuskulatur relaxieren. Hierbei relaxiert ADRF

durch Öffnung von KCNQ- und/oder  $K_{ATP}$ -Kanälen.  $H_2S$  relaxiert dagegen durch die Öffnung von KCNQ-,  $K_{ATP}$ -Kanälen und/oder  $Cl^-/HCO_3^-$ -Transporter.

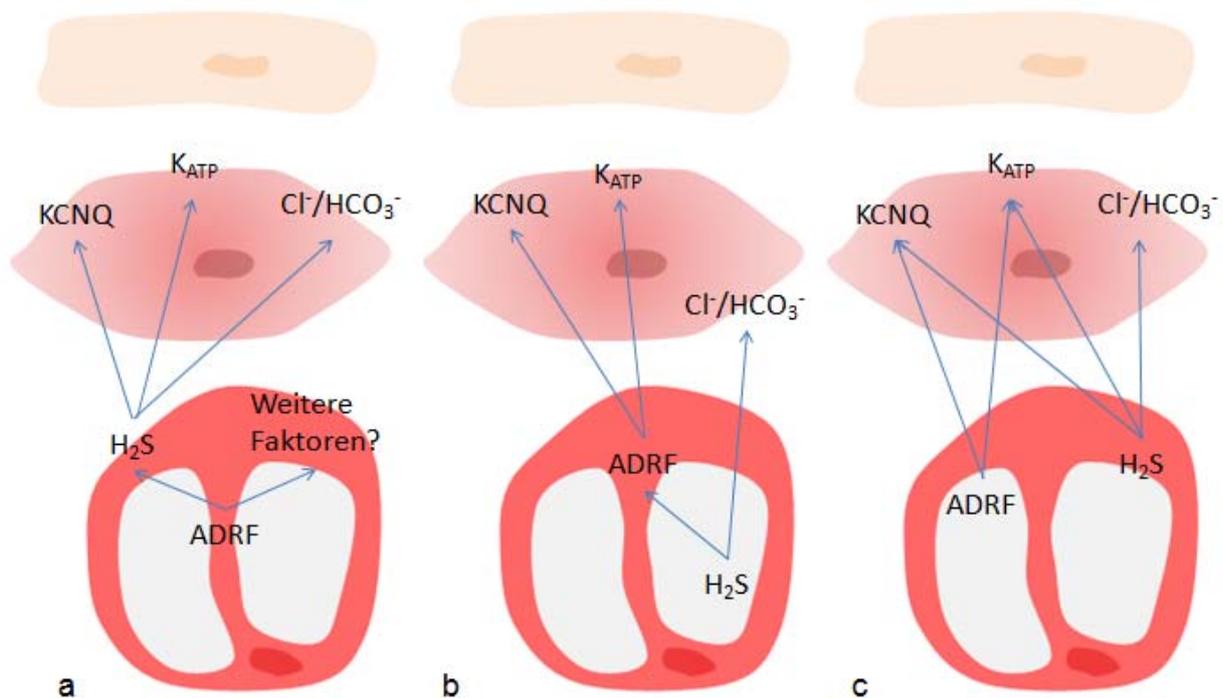


Abb. 28: Potenzielle Wechselwirkungen zwischen ADRF und  $H_2S$  in der Rattenaorta. a,  $H_2S$  als ADRF-Kandidat. b,  $H_2S$  als ADRF-Modulator. c,  $H_2S$  und ADRF als unabhängige Gefäßtonusmodulatoren mit gleichen Zielstrukturen.

In der C57BL/6-Wildtyp Mauseorta zeigte sich ein deutlich antikontraktiler Effekt des perivaskulären Fettes. Im Gegensatz zur Ratte konnte dieser Effekt in der Maus jedoch nicht durch CSE-Inhibition mit PPG gehemmt werden. Auch eine Blockade der CBS reduzierte den ADRF-Effekt nicht. Da CSE als hauptverantwortliches Enzym in der Produktion des vasoaktiven  $H_2S$  gilt [19], wurden Kontraktionsmessungen an CSE  $-/-$  Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass in CSE-defizienten Mäusen ein deutlicher antikontraktiler Effekt existiert, der sich nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheidet. Daher kann gefolgert werden, dass CSE- $H_2S$  nicht als ADRF in Mauseorten fungiert.

Die Untersuchungen bestätigen jedoch, dass exogenes  $H_2S$  die vorkontrahierten Gefäße ohne perivaskuläres Fett relaxieren kann. Somit könnte exogenes  $H_2S$  die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes in Gefäßen modulieren (Abb. 28b und c). Auch L-Cystein, die

Hauptquelle von endogenem  $H_2S$ , kann vorkontrahierte Aorten relaxieren. Dieser Effekt ist unter CSE-Inhibition mit PPG unverändert. L-Cystein und  $H_2S$  scheinen also CSE-unabhängig den Tonus viszeraler Gefäße senken zu können. Die Befunde erhärten die Folgerung, dass exogenes  $H_2S$  die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes in Gefäßen durch Einschaltung anderer Signalwege modulieren kann (Abb. 28b und c).

Neuere Ergebnisse von Shibuya und Tanizawa könnten hierfür eine Möglichkeit aufzeigen. Die Autoren untersuchten die Bedeutung der 3-Mercaptopyruvatsulfurtransferase (3MST) und der Cystein-Aminotransferase (CAT) in der Gefäßtonusregulation [48, 49]. Beide Enzyme haben bisher einen geringen Stellenwert in der Diskussion zum  $H_2S$ -Stoffwechsel eingenommen. Die Cystein-Aminotransferase ist identisch mit der Aspartat-Aminotransferase (ASAT). Sie produziert 3-Mercaptopyruvat aus L-Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat. Die 3MST setzt über mehrere Zwischenschritte, die u.a. Glutathion beinhalten,  $H_2S$  aus 3-Mercaptopyruvat frei. Fehlt Aspartat, wird L-Cystein verstoffwechselt [48] (siehe Abb. 29).

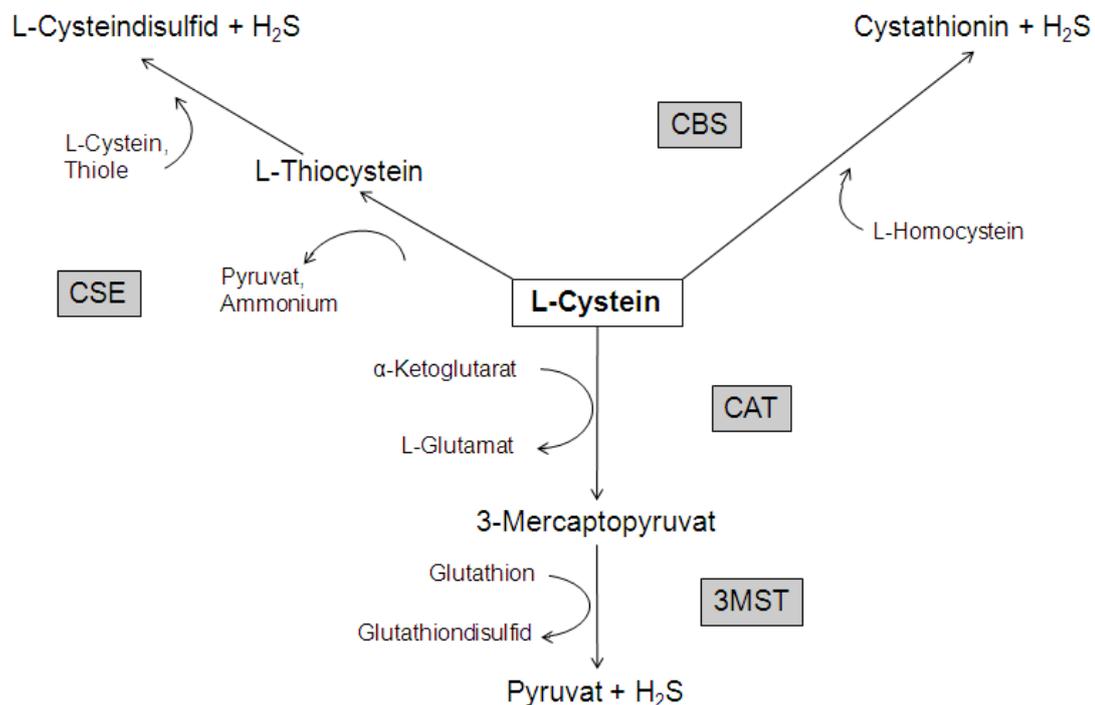


Abb. 29:  $H_2S$ -Stoffwechsel (Abbildung modifiziert nach [49]). CAT, Cystein-Aminotransferase; CBS, Cystathionin- $\beta$ -Synthase; CSE, Cystathionin- $\gamma$ -Lyase; 3MST, 3-Mercaptopyruvat-sulfurtransferase.

Die in Abb. 29 dargestellte endogene Synthese von H<sub>2</sub>S zeigt drei Möglichkeiten der Produktion: 1. Cystathionin- $\gamma$ -Lyase, 2. Cystathionin- $\beta$ -Synthase und 3. 3-Mercaptopyruvatsulfurtransferase. Anders als bisher angenommen scheint 3MST eine zur CSE fast gleichwertige Rolle in der endogenen Produktion von vasoaktivem H<sub>2</sub>S einzunehmen [48]. 3MST könnte somit unabhängig von CSE H<sub>2</sub>S bilden und den Gefäßtonus modulieren (Abb. 28). Diese Möglichkeit ist im Einklang mit den hier erzielten Ergebnissen, die eine CSE-unabhängige Gefäßtonusregulation durch exogenes und endogenes H<sub>2</sub>S zeigen. In der Mauseorta könnte 3MST anstelle von CSE als Schlüsselenzym für die Produktion von H<sub>2</sub>S aus Adipozyten wirken. Jedoch liegen zu diesem Ansatz bislang keine Arbeiten vor, sodass weitere Untersuchungen zur Prüfung dieser Hypothese folgen müssen.

Yang et al. untersuchten CSE  $-/-$  Mäuse und konnten in den Tieren gegenüber der Kontrollgruppe reduzierte H<sub>2</sub>S-Konzentrationen im Herzen, in Gefäßen und in anderen Geweben messen [23]. Weiterhin zeigten sie, dass CSE  $-/-$  Mäuse hypertensiv sind und CSE an der endothelabhängigen Relaxation beteiligt ist [23]. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen, in denen CSE bei der Vasorelaxation der Mauseorta durch perivaskuläres Fettgewebe keine Rolle spielt. Die Befunde von Yang et al. zeigen eine physiologische Bedeutung der CSE bei der Gefäßrelaxation, die für die 3MST bisher nicht belegt wurde. Ob 3MST in der Vasoregulation systemischer Gefäße eine Rolle spielt und eventuell einen H<sub>2</sub>S-abhängigen ADRF in der Maus vermittelt, müssen zukünftige Studien zeigen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass KCNQ-Kanal-Blockade in der Ratten- und Mauseorta sowohl die H<sub>2</sub>S-abhängige Relaxation als auch den ADRF-Effekt hemmt. Hingegen ist CSE vermutlich partiell an der Vasorelaxation von Aortenringen der Ratte, jedoch nicht der Maus beteiligt.

Die beobachteten speziesabhängigen Unterschiede könnten sich wie folgt erklären:

1. 3MST-abhängiges H<sub>2</sub>S könnte in der Mauseorta die Rolle des CSE-H<sub>2</sub>S in der Rattenaorta einnehmen. Um diesen Ansatz zu untersuchen, müssen Versuche nach ähnlichem Protokoll durchgeführt werden, in denen die Kontraktilität von Gefäßen mit und ohne perivaskuläres Fett auf Serotonin nach Inhibition der 3MST gemessen wird.
2. In der Literatur finden sich vermehrt Hinweise, dass die H<sub>2</sub>S-Wirkung Sauerstoff-abhängig ist [24, 25]. So wirkt H<sub>2</sub>S bei hohem O<sub>2</sub>-Angebot prokontraktile [24]. In der

verwendeten Versuchsanordnung wurden mit Carbogen gesättigte Lösungen verwendet. Diese methodische Limitation könnte also die gewonnenen Ergebnisse beeinflusst haben, in dem eine zu starke Sauerstoffzufuhr während der Versuche die H<sub>2</sub>S-Wirkungen moduliert haben könnte.

Darüberhinaus verstärkt Hypoxie auch den ADRF-Effekt [1], sodass bei zukünftigen Studien auch die Zufuhr exogenen Sauerstoffs stärker berücksichtigt werden muss.

3. In der vorliegenden Arbeit diente die Aorta als Modell für viszerale Arterien. In der Blutdruckregulation durch Modulation des peripheren Widerstandes spielt sie jedoch keine Rolle. Desweiteren zeigt die Aorta eine reduzierte Sensitivität gegenüber H<sub>2</sub>S [28], was zu falsch negativen Ergebnissen führen könnte. Ein geeigneteres Modell wäre das Mesenterialarteriengefäßbett, da Mesenterialarterien eine 5fach erhöhte Sensitivität gegenüber H<sub>2</sub>S aufweisen als die Aorta [28] und geringlumige Arterien repräsentieren. Die Bedeutung dieser Gefäßbett-abhängigen Zusammenhänge wird derzeit im Labor untersucht.

#### **4.2 Neue Erkenntnisse zum ADRF**

Die aktuelle ADRF-Forschung zeigt, dass es verschiedene Mediatoren gibt, die aus dem perivaskulären Fettgewebe freigesetzt werden können und gefäßaktiv sind. Zum Beispiel wurde durch Lohn et al. ADRF beschrieben, dessen Wirkung Endothel-unabhängig vermittelt wird [3]. Lee et al. fanden Hinweise für eine antikontraktile Wirkung von Angiotensin 1-7 aus dem perivaskulären Fettgewebe, dessen Wirkung vom Endothel vermittelt wird [50]. Kürzlich beschrieben Li et al. eine vasorelaxierende Wirkung des Adiponektins aus perivaskulären Adipozyten [51]. Fésüs et al. zeigten 2004 jedoch, dass Adiponektin-defiziente Mäuse einen normalen ADRF-Effekt aufweisen [5]. Im Einklang mit Fang et al. weisen die hier erhobenen Versuche darauf hin, dass zumindest aortale perivaskuläre Adipozyten der Ratte H<sub>2</sub>S produzieren können und H<sub>2</sub>S als ADRF wirken kann [47]. Die These, dass H<sub>2</sub>S in Gefäßen *per se* gebildet und Vasorelaxation auslösen kann, wird dadurch unterstützt, dass andere Autoren eine endotheliale H<sub>2</sub>S-Produktion identifiziert haben, die parakrin eine Hyperpolarisation der VSMC induzieren kann [52]. In Anbetracht der hier vorgestellten Ergebnisse sowie weiterer neuer Ergebnisse anderer Autoren muss ADRF als Komplex mehrerer Faktoren verstanden werden. Scheinbar ist neben Adiponektin auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS-System) in die Gefäßtonusregulation involviert. H<sub>2</sub>S könnte ebenfalls eine Komponente

repräsentieren, scheint jedoch in Anbetracht der Lokalisation über fast die gesamte Gefäßwand eher den ADRF-Effekt zu modulieren. Ein Regelkreis potenzieller Wechselwirkungen und Zielstrukturen in der gefäßtonusmodulierenden Wirkung von  $H_2S$  und ADRF ist in Abb. 30 dargestellt.

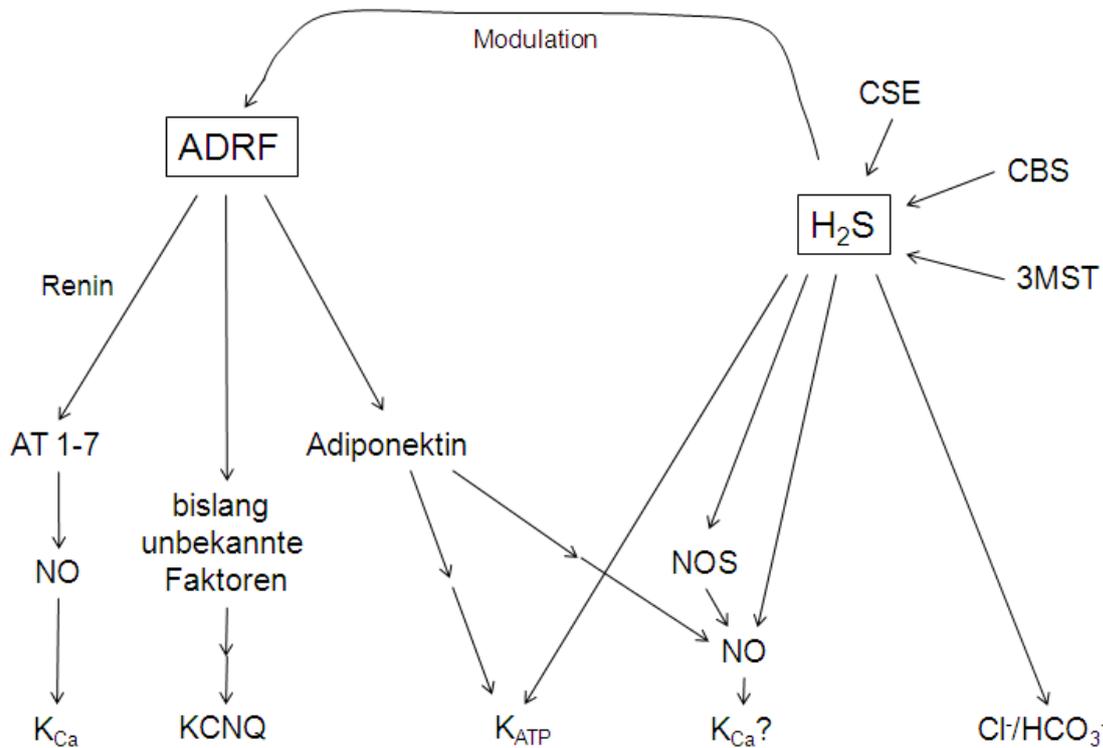


Abb. 30: Potenzielle Modulation einiger ADRFs durch  $H_2S$  in der Mauseorta. AT 1-7, Angiotensinogen 1-7; CBS, Cystathionin- $\beta$ -Synthase; CSE, Cystathionin- $\gamma$ -Lyase; 3MST, 3-Mercaptopyruvatsulfurtransferase; NOS, NO-Synthase.

Abb. 30 soll mögliche ADRF-Kandidaten sowie eine potenzielle Interaktion mit  $H_2S$  vorstellen. Um die Physiologie beider Faktoren endgültig zu klären und gegebenenfalls neue Zusammenhänge zu untersuchen, sind jedoch weitere Versuche notwendig. Zudem können möglicherweise Modelle des Alterungsprozesses und Krankheitsmodelle der Adipositas und Hypertonie helfen, bislang nur vermutete Pathomechanismen zwischen ADRF und  $H_2S$  zu bestätigen.

### 4.3 Kaliumkanäle in der fettabhängigen Kontraktilität von Maus- und Rattenaortenringen

Die Funktionsprüfung in präparierten SD-Rattenaorten zeigte eine fettunabhängige starke Kontraktionsbereitschaft der Aorten auf die hochmolare Kaliumchloridlösung. In den C57BL/6 Wildtyp- und CSE  $+/+$  Mauseorten zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Kontraktionsbereitschaft der Gefäße gegenüber hochmolarer Kaliumchloridlösung (60 mmol/l KCl). Gefäße mit perivaskulärem Fett erreichten eine deutlich höhere Spannung als die Gefäße, deren Fett entfernt wurde. Diese Beobachtung blieb auch in CSE  $-/-$  Mäusen erhalten. Frühere Studien an Mesenterialgefäßen der Maus zeigten eine fettunabhängige starke Kontraktion dieser auf hochmolekulare Kaliumlösung [9]. Im perivaskulären Fett der Mauseorta scheint es somit einen prokontraktilen Faktor zu geben, der Kaliumkanal-unabhängig agiert. Die Natur dieses Faktors ist unbekannt und die Aufklärung bedarf weiterer Studien. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um Komponenten des RAAS handelt.

Seit einiger Zeit wird in der Literatur die Expression von Angiotensinogen und Enzymen des RAAS in Adipozyten diskutiert [53]. Die Bedeutung des adipozytären RAAS in der parakrinen Blutdruckregulation wird von vielen Autoren akzeptiert. Der genaue Einfluss auf den lokalen Gefäßtonus wird jedoch kontrovers diskutiert, ebenso der Beitrag zur systemischen RAAS-Wirkung. Folgende Hypothesen sind Gegenstand dieser Diskussionen.

- Vasokonstriktion durch RAAS-Aktivität in Adipozyten

Massiéra et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass Mäuse mit einer Überexpression des Angiotensingens in Adipozyten einen erhöhten Spiegel an zirkulierendem Angiotensinogen aufweisen, was zu erhöhten Blutdruckwerten führte [54].

Faloia et al. bestätigten zwar eine Aktivität des RAAS-Systems im Fettgewebe, zeigten jedoch, dass adipozytäre Angiotensinogen-Synthese die systemischen RAAS-Spiegel nicht beeinflusst. Nichtsdestotrotz zeigten Adipozyten von hypertonen Patienten eine höhere Angiotensin-I-Genexpression als normotone Patienten [55].

- Vasodilatation durch RAAS-Aktivität in Adipozyten

In der aktuellen Literatur wurde erstmals die parakrine Wirkung des Angiotensins 1-7 aus perivaskulärem Fett auf den Gefäßtonus untersucht [50]. Hier wird eine relaxierende Wirkung des Angiotensin 1-7 beschrieben, indem es über NO-Aktivierung im Endothel Calcium-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ -Kanäle) aktiviert [50].

Insgesamt scheint die fettabhängige parakrine Gefäßtonusregulation durch RAAS ähnlich zur systemischen RAAS-abhängigen Blutdruckregulation zu sein. Die Komponenten können

Rezeptor-abhängig, u.a. vasodilatierende, z.B. AT II über AT<sub>2</sub>-Rezeptoren, oder vasokonstringierende Effekte entfalten, z.B. AT II über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung der NADPH-Oxidase [56]. Neu ist die endothelabhängige vasodilatierende Wirkung des Angiotensin 1-7 aus perivaskulärem Fett. Lee et al. schlagen ihn daher als ADRF-Kandidaten vor [50].

Welche Rolle das RAAS-System zur Erklärung der vorgestellten Ergebnisse insgesamt einnimmt oder ob andere prokontraktile Faktoren identifiziert werden können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

#### **4.4 Perivaskuläres Fett in Hypertonie, Adipositas und Entzündung**

Zur Erforschung der Pathophysiologie und Therapie der Hypertonie stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Das am häufigsten angewandte stellen die spontan hypertensiven Ratten (SHR) dar [57]. Sie wurden in den 1960er Jahren von Okamoto und Aoki entwickelt, indem Geschwistertiere mit leicht ausgeprägtem Hypertonus über mehrere Generationen untereinander verpaart wurden [58]. Die Hypertonie in diesen Tieren entwickelt sich im Alter von ca. 10 Wochen mit bis zu systolischen Blutdruckwerten von ca. 180-190 mmHg [59]. Die Hypertonie der SHR entspricht der essenziellen Hypertonie des Menschen. Auch die Endorganschäden der Tiere sind ähnlich zu denen, die im Menschen beobachtet werden [57]. Beide Punkte begründen, dass die Forschung an SHR momentan das am häufigsten angewandte Tiermodell der Hypertonie darstellt. Kontrollgruppe sind z.B. die normotensiven Wistar Kyoto Ratten (WKY) [6].

Tiermodelle der Adipositas sind diätisch gezüchtete Mäuse und Ratten oder z.B. die New Zealand Obese Mäuse (NZO-Mäuse). NZO-Mäuse wurden in den 1950er Jahren entwickelt. Sie repräsentieren eine hyperglykämische, polygenetische Adipositas mit gestörtem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und Hypertonie [4]. Diätisch gezüchtete adipöse Mäuse entstehen oft auf Basis einer High-Fat-Diät, sodass sie ebenfalls ein Modell des Diabetes mellitus Typ II abbilden [60].

Die Forschung an beiden Tiermodellen bietet Erklärungsansätze für Studien, wonach sowohl Adipositas als auch Hypertonie mit einer erhöhten Entzündungsaktivität der Gewebe einhergeht

[61, 62]. Diese Modelle könnten als Tiermodelle geeignet sein, um neue Erkenntnisse über die Malfunktion von ADRF bei Adipositas und Hypertonie gewinnen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Relaxationsstudien an Aorten durchgeführt, für die einerseits NaHS und andererseits ADTOH als H<sub>2</sub>S-Donor verwendet wurde. NaHS ist ein oft genutzter H<sub>2</sub>S-Donor, der in wässriger Lösung über Na<sup>+</sup> und HS<sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>S reagiert. ADTOH gehört zu einer pharmakologisch relativ neuen Gruppe, in der nicht steroidale Antiphlogistika (NSAP) mit H<sub>2</sub>S verbunden sind. ADTOH ist der Dithiolethionrest des H<sub>2</sub>S-freisetzenden Aspirins [63]. Nicht steroidale Antiphlogistika sind Inhibitoren der Thromboxan-, Prostazyklin- und Prostaglandinsynthese und wirken somit u.a. anti-inflammatorisch. ADTOH entfaltet nicht die vollständige NSAP-Wirkung. So fehlt zum Beispiel die typische NSAP-Nebenwirkung der Magenschleimhautischämie. Die Suppression der Thromboxan A<sub>2</sub> bleibt jedoch erhalten, sodass ADTOH sowohl eine H<sub>2</sub>S-Freisetzung bewirkt als auch eine Vasokonstriktion inhibiert [63].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die NaHS-induzierte Relaxation vorkontrahierter Gefäße durch ADTOH noch übertroffen wurde. Es konnte die Gefäße fast vollständig relaxieren. Bisher wurden protektive vasorelaxierende Effekte der H<sub>2</sub>S-tragenden NSAP überwiegend im Magen-Darm-Trakt beschrieben. Fiorucci et al. zeigten, dass NSAP die H<sub>2</sub>S-Synthese sowie die CSE-Proteinexpression und -aktivität hemmen [64]. Desweiteren fanden sie heraus, dass NaHS die Ischämie der Mukosa reduziert und somit den Blutungskomplikationen unter NSAP vorbeugt [64]. Die vorgestellten Ergebnisse stellen jedoch möglicherweise auch einen therapeutischen Angriffspunkt bei der endothelialen Dysfunktion in Adipositas und Hypertonie dar, in der neben pro-inflammatorischen Molekülen auch Thromboxan A<sub>2</sub> von Adipozyten sezerniert wird (siehe Abb. 1) [8].

Die kombinierte antiinflammatorische und relaxierende Wirkung des H<sub>2</sub>S in systemischen Gefäßen gewinnt im Verständnis der Hypertoniegenese zunehmend an Bedeutung. Yang et al. konnten zeigen, dass CSE -/- Mäuse hypertone Blutdruckwerte aufwiesen, die sich im Alter von 7 Wochen entwickelten. Mit 12 Wochen erreichten sie systolische Werte von 135 mmHg. Die Kontrollgruppe lag bei 115 mmHg [23]. Studien von Jin et al. lieferten hierfür erste Erklärungsansätze auf molekularer Ebene. Sie konnten zeigen, dass H<sub>2</sub>S die Expression pro-inflammatorischer Proteine reduziert und somit einer Hypertonieentwicklung entgegenwirkt

[20]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus der anti-inflammatorischen Wirkung von H<sub>2</sub>S scheint die Reduktion von oxidativem Stress zu sein. Muzaffar et al. zeigten, dass exogenes H<sub>2</sub>S diesem vorbeugt, indem es via cAMP und Proteinkinase G die Expression der NADPH-Oxidase hemmt [65].

Auch in der Malfunktion von perivaskulärem Fett scheint oxidativer Stress eine Rolle zu spielen. Fésüs et al. beobachteten, dass NZO-Mäuse im Alter zwar einen hohen Gehalt an perivaskulärem Fettgewebe aufwiesen, der antikontraktile Effekt jedoch deutlich reduziert war. Sie nahmen daher eine Adipositas-assoziierte ADRF-Malfunktion an [5]. Greenstein et al. beobachteten eine ähnliche Dysfunktion in menschlichen Arterien. Sie untersuchten die vasoaktiven Eigenschaften von Adiponektin bei Adipositas [61]. Adiponektin wird von Adipozyten sezerniert [5] und wirkt über eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit vasorelaxierend [61]. Im Zustand der Adipositas geht diese Fähigkeit auf Grund von Adipozytenhypertrophie mit folgender Hypoxie, Ischämie und Entzündungsreaktion verloren [61]. Ketonen et al. erklären die möglichen Pathomechanismen auf molekularer Ebene. Sie nutzten durch Diät gezüchtete adipöse Mäuse, um einen Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett und Endothel zu untersuchen. Sie fanden heraus, dass perivaskuläres Fett eine endotheliale Dysfunktion in adipösen Mäusen hervorruft. Ursache hierfür scheint oxidativer Stress durch vermehrte Aktivität pro-inflammatorischer Zytokine und der NADPH-Oxidase zu sein [66].

Eine Ursache der Malfunktion perivaskulären Fettgewebes bei Adipositas könnten Veränderungen im RAAS-System der perivaskulären Adipozyten sein. Perivaskuläres Fett produziert Angiotensin 1-7 als vasoaktiven Modulator der, u.a. über eine NO-Freisetzung die glatte Gefäßmuskulatur hyperpolarisieren kann [50]. Jedoch sind Adipozyten auch Produzenten des parakrin wirksamen Angiotensin II, das normalerweise die vasorelaxierende Wirkung des endothelialen NO moduliert [56]. Durch ein Überangebot des Angiotensin II und folgender Dysbalance zwischen Angiotensin II und NO kann es durch Aktivierung der NADPH-Oxidase zu endothelialer Dysfunktion und Verlust der vasodilatierenden Eigenschaften kommen [1]. Desweiteren kann eine gesteigerte Angiotensin II-Produktion über eine vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und reduzierter Adiponektin-Sekretion hypertensiv wirken [1].

Gálvez et al. erforschten den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettes in SHR. Die untersuchten Tiere zeigten einen reduzierten viszeralen Fettgehalt. Desweiteren scheint das mesenteriale perivaskuläre Fett morphologisch und funktionell verändert zu sein, was u.a. über eine  $K_v$ -Kanal-Resistenz zu erhöhtem Grundtonus der Mesenterien führt. Bei erhöhtem Perfusionsdruck und Applikation von hochmolarer Kaliumchloridlösung reagierten die normotensiven Ratten mit einer deutlich geringeren Spannungszunahme als SHR. Gálvez et al. schlagen daher einen protektiven Effekt des ADRF vor, der bei SHR fehlt [6].

Du et al. untersuchten SHR bezüglich ihres Blutdruckes und der  $H_2S$ -Synthese in vivo. Sie maßen bei SHR im Alter von 9 Wochen (183 mmHg) einen deutlich höheren Blutdruck als in WKY (108 mmHg). Sowohl die  $H_2S$ -Syntheserate als auch basale  $H_2S$ -Konzentrationen der Aorta waren in den SHR erniedrigt. Durch Applikation von NaHS konnten sie den Blutdruck auf 153 mmHg senken. Auch die Reaktion der SHR-Aorten auf vasorelaxierende Substanzen wie Acetylcholin war in Anwesenheit von NaHS stärker ausgeprägt [67]. Sie nehmen daher an, dass die reduzierte  $H_2S$ -Syntheserate eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Hypertonie spielt [67].

Fang et al. identifizierten eine zunehmende endotheliale Dysfunktion und Steifigkeit der Aorta im Alter, die sie als unabhängigen Risikofaktor einer Hypertonieentstehung sehen, und konnten einen kompensatorisch erhöhten CSE/ $H_2S$ -Pathway in Rattenaorten nachweisen. Bei reduzierten  $H_2S$ -Serumkonzentrationen im Alter war die CSE-Proteinexpression erhöht [47]. Predmore et al. bestätigen diese Beobachtung. Sie zeigen, dass Aortenringe im Alter bei reduzierter  $H_2S$ -Konzentration eine erhöhte  $H_2S$ -Sensitivität und CSE- und CBS-Proteinexpression aufweisen [68].

Neue Studien zeigen darüber hinaus einen Zusammenhang von KCNQ-Kanälen und Hypertonie. Jepps et al. [69] untersuchten KCNQ Kanäle vom Typ  $K_v7.2$  bis  $K_v7.5$  in Aorten und Mesenterialarterien von Ratten. Sie fanden heraus, dass in primärer und sekundärer Hypertonie die Expression von  $K_v7.4$  herunter reguliert ist. Diese Befunde könnten die von Gálvez et al. beschriebene  $K_v$ -Resistenz der Mesenterien in SHR erklären. Die Öffnung von KCNQ-Kanälen in Situationen der ADRF-Malfunktion ist daher möglicherweise ein potenter Mechanismus, um eine systemische Vasorelaxation zu induzieren [10]. Hierzu müssen weitere Studien folgen. Die hier erhobenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Malfunktion perivaskulären Fettes als auch

der veränderte H<sub>2</sub>S-Metabolismus eine bedeutende Rolle in der Hypertoniegenese einnehmen könnte, sodass sich hier möglicherweise neue Therapiestrategien ableiten lassen. Hierfür müsste berücksichtigt werden, dass bei fehlendem perivaskulären Fett oder dessen Malfunktion vermutlich der H<sub>2</sub>S-Stoffwechsel kompensatorisch hochreguliert wird, um einer Gefäßdysregulation entgegenzuwirken. Eventuell ist H<sub>2</sub>S daher kein direkter ADRF-Kandidat, sondern entfaltet eher eine modulierende Wirkung auf den ADRF-Komplex.

## 5 Zusammenfassung

Das metabolische Syndrom gewinnt im klinischen Alltag wie in der aktuellen Forschung zunehmend an Bedeutung. Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren, inklusive der arteriellen Hypertonie, sind mit ihm vergesellschaftet. In den 1990er Jahren wurde erstmals eine Bedeutung des viszeralen Fettgewebes in der Gefäßtonusregulation beschrieben. Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass diverse Adipokine als parakrine Mediatoren den Gefäßtonus beeinflussen können. Im gesunden Organismus scheinen die vasorelaxierenden Eigenschaften zu überwiegen. Eine Schlüsselrolle spielt dabei Adipocyte-derived relaxing factor (ADRF). In verschiedenen Adipositas- und Hypertoniemodellen geht dieser antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes verloren. Trotz intensiver Forschung ist die Natur des ADRF bislang unklar. Auch seine Zielstrukturen und involvierte Signalkaskaden konnten bislang nur unzureichend aufgedeckt werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, 1. CO und H<sub>2</sub>S als potenzielle ADRF-Kandidaten zu untersuchen und 2. KCNQ-Kanäle als ADRF-Zielstrukturen zu identifizieren.

Es wurden Kontraktionsmessungen an Aortenringen der Ratte und Maus durchgeführt.

Die Messungen an Rattenaortenringen zeigten, dass CO kein ADRF-Kandidat ist. H<sub>2</sub>S spielte jedoch eine partielle Rolle in der parakrinen Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett. Ob H<sub>2</sub>S hier ein ADRF-Kandidat oder -Modulator ist, müssen weitere Studien zeigen.

In der Mauseorta gelang es nicht, einen direkten Zusammenhang zwischen CSE-abhängigem H<sub>2</sub>S und der antikontraktilen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes herzustellen. Dennoch konnte exogenes H<sub>2</sub>S den Tonus der Mauseorta modulieren. Eventuell übernimmt in der Mauseorta ein H<sub>2</sub>S aus anderer Quelle, z.B. 3-Mercaptopyruvatsulfurtransferase, den ADRF-Effekt. Eventuell ist diese Beobachtung der Schlüssel zum bisher fehlenden Nachweis eines Zusammenhangs zwischen ADRF und H<sub>2</sub>S, wonach H<sub>2</sub>S den ADRF eher moduliert als imitiert. Diese Hypothese muss durch weitere Studien geprüft werden.

Die Gefäßmyographie an Aortenringen beider Tierspezies lieferte auch neue Erkenntnisse über die Natur der beteiligten Kaliumkanäle. Es wurden KCNQ-Kanäle als ADRF- und H<sub>2</sub>S-Zielstrukturen identifiziert. Diese spannungsabhängigen Kaliumkanäle nehmen eine zentrale Rolle in der Gefäßtonusregulation beider Stoffe ein. Erste Befunde weisen darauf hin, dass sie

eine Bedeutung in der Pathophysiologie der Gefäßdysfunktion bei Hypertonie und Fehlfunktion von perivaskulärem Fettgewebe bei Adipositas spielen könnten. Diese Hypothese muss jedoch weiter erforscht werden, um zu klären, ob KCNQ-Kanal-Öffnung ein potenzieller pharmakologischer Angriffspunkt in der Behandlung von Gefäßdysfunktion und Hypertonie sein könnte.

Die Interpretation der vorgestellten Ergebnisse wirft neue Fragen auf, die für das Verständnis der Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett von Bedeutung sind. Weitere Forschung muss daher einen komplexen Regelkreis aufklären, der insbesondere verschiedene Adipokine, RAAS und H<sub>2</sub>S einschließt.

Diese Arbeit stellt neue Erkenntnisse zum Verständnis dieses komplexen Regelkreises vor und liefert somit die Basis für zukünftige Forschung, sowie für neue pharmakologische Ansatzpunkte zur Therapie der arteriellen Hypertonie und Gefäßdysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen.

## Literaturverzeichnis

1. Maenhaut, N. and J. Van de Voorde, Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*, 2011. **9**: p. 25.
2. Soltis, E.E. and L.A. Cassis, Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A*, 1991. **13**(2): p. 277-96.
3. Lohn, M., et al., Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J*, 2002. **16**(9): p. 1057-63.
4. Subrahmanyam, K., Metabolism in the New Zealand strain of obese mice. *Biochem J*, 1960. **76**(3): p. 548-56.
5. Fesus, G., et al., Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(4): p. 719-27.
6. Galvez, B., et al., Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1297-302.
7. Silventoinen, K., et al., Does obesity modify the effect of blood pressure on the risk of cardiovascular disease? A population-based cohort study of more than one million Swedish men. *Circulation*, 2008. **118**(16): p. 1637-42.
8. Kotsis, V., et al., Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res*, 2010. **33**(5): p. 386-93.
9. Verlohren, S., et al., Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*, 2004. **44**(3): p. 271-6.
10. Schleifenbaum, J., et al., Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens*, 2010. **28**(9): p. 1875-82.
11. Dubrovskaja, G., et al., Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(3): p. H1107-13.
12. Gollasch, M. and G. Dubrovskaja, Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(12): p. 647-53.
13. Sylvester, J.T. and C. McGowan, The effects of agents that bind to cytochrome P-450 on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circ Res*, 1978. **43**(3): p. 429-37.
14. Johnson, R.A., et al., A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension*, 1995. **25**(2): p. 166-9.

15. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 583-650.
16. Siow, R.C., H. Sato, and G.E. Mann, *Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? Cardiovasc Res*, 1999. **41**(2): p. 385-94.
17. Morita, T., et al., *Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1475-9.
18. Johnson, F.K. and R.A. Johnson, *Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(3): p. R536-41.
19. Szabo, C., *Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(11): p. 917-35.
20. Jin, H.F., et al., [*Hypotensive effects of hydrogen sulfide via attenuating vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats*]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2008. **36**(6): p. 541-5.
21. Sun, Y., et al., [*Hydrogen sulfide induce negative inotropic effect in isolated hearts via KATP channel and mitochondria membrane KATP channel*]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2009. **37**(2): p. 161-4.
22. Wagner, C.A., *Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. J Nephrol*, 2009. **22**(2): p. 173-6.
23. Yang, G., et al., *H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science*, 2008. **322**(5901): p. 587-90.
24. Koenitzer, J.R., et al., *Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O<sub>2</sub>-dependent manner. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1953-60.
25. Kiss, L., E.A. Deitch, and C. Szabo, *Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. Life Sci*, 2008. **83**(17-18): p. 589-94.
26. Lim, J.J., et al., *Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **295**(5): p. C1261-70.
27. Monjok, E.M., et al., *Inhibitory action of hydrogen sulfide on muscarinic receptor-induced contraction of isolated porcine irides. Exp Eye Res*, 2008. **87**(6): p. 612-6.

28. Cheng, Y., et al., Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(5): p. H2316-23.
29. Webb, G.D., et al., Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **324**(2): p. 876-82.
30. Jentsch, T.J., Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, 2000. **1**(1): p. 21-30.
31. Greenwood, I.A. and S. Ohya, New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(8): p. 1196-203.
32. Cooper, E.C., et al., Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4914-9.
33. Kharkovets, T., et al., Mice with altered KCNQ4 K<sup>+</sup> channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *Embo J*, 2006. **25**(3): p. 642-52.
34. Sanguinetti, M.C., et al., Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, 1996. **384**(6604): p. 80-3.
35. Ohya, S., et al., Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circ Res*, 2003. **92**(9): p. 1016-23.
36. Yeung, S., et al., Bimodal effects of the Kv7 channel activator retigabine on vascular K<sup>+</sup> currents. *Br J Pharmacol*, 2008. **155**(1): p. 62-72.
37. Joshi, S., P. Balan, and A.M. Gurney, Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 31.
38. Rosenberger, C., et al., Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(7): p. 1721-32.
39. Ishii, I., et al., Cystathionine gamma-Lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *J Biol Chem*, 2010. **285**(34): p. 26358-68.
40. Vreman, H.J., D.A. Cipkala, and D.K. Stevenson, Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996. **74**(3): p. 278-85.
41. Li Volti, G., et al., Carbon monoxide: vasoconstrictor or vasodilator? That's the question. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(4): p. F901-3.
42. Kozma, F., et al., Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 2): p. R1087-94.

43. Giordano, A., et al., *Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system. FEBS Lett*, 2000. **487**(2): p. 171-5.
44. Hosoki, R., N. Matsuki, and H. Kimura, *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(3): p. 527-31.
45. Zhao, W., et al., *The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. Embo J*, 2001. **20**(21): p. 6008-16.
46. Lee, S.W., et al., *Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **358**(4): p. 1142-7.
47. Fang, L., et al., *Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. J Hypertens*, 2009. **27**(11): p. 2174-85.
48. Shibuya, N., et al., *Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. J Biochem*, 2009. **146**(5): p. 623-6.
49. Tanizawa, K., *Production of H2S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. J Biochem*, 2011. **149**(4): p. 357-9.
50. Lee, R.M., et al., *Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. J Hypertens*, 2009. **27**(4): p. 782-90.
51. Li, F.Y., et al., *Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. Acta Physiol (Oxf)*, 2010. **203**(1): p. 167-80.
52. Skovgaard, N., et al., *The Role of Endogenous H(2)S in Cardiovascular Physiology. Curr Pharm Biotechnol*, 2011.
53. Karlsson, C., et al., *Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(11): p. 3925-9.
54. Massiera, F., et al., *Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. Faseb J*, 2001. **15**(14): p. 2727-9.
55. Faloiu, E., et al., *Comparison of circulating and local adipose tissue renin-angiotensin system in normotensive and hypertensive obese subjects. J Endocrinol Invest*, 2002. **25**(4): p. 309-14.
56. Zhang, C., et al., *Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. Circ Res*, 2003. **92**(3): p. 322-9.

57. Pinto, Y.M., M. Paul, and D. Ganten, *Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. Cardiovasc Res*, 1998. **39**(1): p. 77-88.
58. Okamoto, K. and K. Aoki, *Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J*, 1963. **27**: p. 282-93.
59. Yen, T.T., et al., *A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. Heredity*, 1974. **33**(3): p. 309-16.
60. Parekh, P.I., et al., *Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. Metabolism*, 1998. **47**(9): p. 1089-96.
61. Greenstein, A.S., et al., *Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. Circulation*, 2009. **119**(12): p. 1661-70.
62. Savoia, C., et al., *Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. Int J Hypertens*, 2011. **2011**: p. 281240.
63. Giustarini, D., et al., *Modulation of thiol homeostasis induced by H<sub>2</sub>S-releasing aspirin. Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(9): p. 1263-72.
64. Fiorucci, S., et al., *Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. Gastroenterology*, 2005. **129**(4): p. 1210-24.
65. Muzaffar, S., et al., *Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells. J Vasc Res*, 2008. **45**(6): p. 521-8.
66. Ketonen, J., et al., *Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. Circ J*, 2010. **74**(7): p. 1479-87.
67. Du, J., H. Yan, and C. Tang, *[Endogenous H<sub>2</sub>S is involved in the development of spontaneous hypertension]. Beijing Da Xue Xue Bao*, 2003. **35**(1): p. 102.
68. Predmore, B.L., et al., *The hydrogen sulfide signaling system: changes during aging and the benefits of caloric restriction. Age (Dordr)*, 2010. **32**(4): p. 467-81.
69. Jepps, T.A., et al., *Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. Circulation*, 2011. **124**(5): p. 602-11.

## **Danksagung**

Das Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Daher möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Maik Gollasch für die Bereitstellung des Themas danken sowie für die stetige Betreuung und Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit und die Förderung im Rahmen verschiedener Kongresse und Auslandsaufenthalte.

Desweiteren danke ich Dr. Galina Dubrowski, die mich besonders während meiner ersten Schritte im Labor und darüber hinaus immer wieder beim Überarbeiten der Kongressbeiträge geduldig begleitet hat.

Für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung im Labor möchte ich ausdrücklich Yoland-Marie Anistan, Lena Löhr, Johanna Schleifenbaum und Dr. Mario Kaßmann danken.

Für die Möglichkeit, einen Teil meiner Laborarbeit an der Chinese University of Hongkong durchzuführen, sowie für die Begleitung dieser möchte ich gern Dr. Yu Huang danken sowie Xiao Yu Tian und Wai San Cheang.

Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie, meinen Eltern Dr. Jörg und Antje Köhn sowie Frank-Stephan Hohberger, die mich über die Jahre in allen Bereichen stets unterstützt haben, sowie für die Hilfe bei der endgültigen Fertigstellung dieses Manuskriptes.

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Carolin Köhn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Gefäßtonusregulation durch perivaskuläres Fett: H<sub>2</sub>S, Cystathionin-γ-Lyase und Kaliumkanäle 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.“

Berlin, den 01.03.2012

Ort, Datum

Unterschrift

## **Tabellarischer Lebenslauf**

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



# Anhang

## Publikationen

J. Schleifenbaum, C. Köhn, N. Voblova, G. Dubrovskaya, O. Zavarirskaya, T. Gloe, C.S. Crean, F.C. Luft, Y. Huang, R. Schubert, M. Gollasch. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulphide; *J Hypertens*. 2010; 28:1875–1882.

C. Köhn, G. Dubrovskaya, Y. Huang, Maik Gollasch. Hydrogen sulfide: Potent regulator of vascular tone and stimulator of angiogenesis; *Int J Biomed Sci*. 2012; 8 (2): 81-86.

C. Köhn, J. Schleifenbaum, I.A. Szijártó, G. Dubrovskaya, Y. Huang, M. Gollasch. Differential effects of cystathionine- $\gamma$ -lyase dependent vasodilatory H<sub>2</sub>S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. *PLoS ONE*, 2012; 7(8): e41951.

## Ausgewählte Kongressbeiträge

C. Köhn, J. Schleifenbaum, N. Voblova, O. Zavarirskaya, G. Dubrovskaya, T. Gloe, C. S. Crean, F.C. Luft, Y. Huang, R. Schubert, M. Gollasch; Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Acta Physiologica 2010*; Volume 198, Supplement 677:O-TUE-1-3.

J. Schleifenbaum, G. Dubrovskaya, C. Köhn, N. Voblova, O. Zavarirskaya, R. Schubert, M. Gollasch (2011, Mai). Role of KCNQ channels, H<sub>2</sub>S and leptin in periadventitial regulation of visceral arteries. Free Communication presented at the 10th International Symposium on Resistant Arteries (ISRA), 10th International Symposium on Resistance Arteries, Rebild, Denmark.

C. Köhn, G. Dubrovskaya, J. Schleifenbaum, Y. Huang, N. Voblova, R. Schubert, M. Gollasch; Role of H<sub>2</sub>S and KCNQ channels in periadventitial arterial vasoregulation. *Mitteilungen der DGfN Heft 3/2011*, ISSN-Nr. 1869-9405 ZKZ 18874 (Deutsche Nationalbibliothek, Leipzig).

C. Köhn, G. Dubrovska, J. Schleifenbaum, Y. Huang, R. Schubert, M. Gollasch (2011, November). Putative role of cystathionine- $\gamma$ -lyase derived hydrogen sulfide in peradventitial vasoregulation. 35. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V.- Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Köln, Abstractbuch, Vortrag FV 11, doi:10.5882/10.5882\_hypertonie2011\_FV11, [http://data.datacite.org/10.5882/10.5882\\_HYPERTONIE2011\\_FV11](http://data.datacite.org/10.5882/10.5882_HYPERTONIE2011_FV11).