

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Nephrologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Joachim Hoyer
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Rolle von TRPM8 und TRPA1 Kanälen bei der Regulation des Gefäßtonus

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Felix Kurtz aus Uster (Zürich)

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14.09.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:

Referent:

1. Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	4
Summary	6
1. Einleitung	7
1.1 Der Gefäßtonus	7
1.1.1 Die glatte Gefäßmuskulatur	7
1.1.1.1 Zentrale Rolle von Calcium für die Kontraktilität der glatten Muskulatur	8
1.1.1.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern	9
1.1.1.3 Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum	9
1.1.2 Das vaskuläre Endothel	11
1.1.2.1 Rolle des Endothels bei der Gefäßtonusregulation	11
1.1.2.2 Der vasodilatierende Effekt von Stickstoffmonoxid	12
1.1.2.3 Der vasodilatierende Effekt von Prostacyclin	14
1.1.2.4 Der vasodilatierende Effekt von EDHF	15
1.2 Nichtselektive Kationenkanäle in der Gefäßwand	17
1.2.1 Die Familie der TRP-Kanäle	18
1.2.2 Der TRPM8-Kanal	20
1.2.3 Der TRPA1-Kanal	22
2. Zielsetzung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Verwendete Geräte und Chemikalien	25
3.1.1 Geräte und Bezugsquellen	25
3.1.2 Chemikalien und Bezugsquellen	25
3.2 Versuche am Myographen	26
3.2.1 Der Druckmyograph	26
3.2.2 Gefäßpräparation	27
3.2.3 Lösungen für Myographie-Experimente	27
3.2.4 Der Versuchsaufbau	28
3.2.5 Der Versuchsablauf	29
3.2.6 Datenaufzeichnung und –präsentation	30
3.3 Patch-Clamp Experimente	31

3.3.1	Die Patch-Clamp Technik	31
3.3.2	Isolation und Kurzzeitprimärkultur von Endothelzellen	33
3.3.3	Lösungen für Patch-Clamp-Experimente	34
3.3.4	Der Patch-Clamp-Messstand	34
3.3.5	Der Versuchsablauf der Patch-Clamp-Messungen	35
3.3.6	Datenauswertung	36
3.4	Statistische Analysen	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Experimente am Druckmyographen zu TRPM8 und TRPA1	37
4.1.1	Wirkung von Icilin	37
4.1.2	Wirkung von Menthol	39
4.1.3	Wirkung von AITC	42
4.2	Patch-Clamp-Experimente zu TRPM8 und TRPA1	45
4.2.1	Untersuchungen zu TRPM8 und TRPA1 an A7R5 Zellen	46
4.2.1.1	Wirkung von Icilin	46
4.2.1.2	Wirkung von Menthol	46
4.2.1.2	Wirkung von AITC	48
4.2.2.	Untersuchungen zu TRPM8 und TRPA1 an isolierten Endothelzellen der Mauscarotis	49
4.2.2.1	Wirkung von Icilin	49
4.2.2.2	Wirkung von Menthol	50
4.2.2.3	Wirkung von AITC	54
5.	Diskussion	55
5.1	Myographische Messungen zu TRPM8	55
5.2	Myographische Messungen zu TRPA1	56
5.3	Patch-Clamp Experimente zu TRPM8 und TRPA1 an A7R5 Zellen	57
5.4	Patch-Clamp Experimente zu TRPM8 und TRPA1 an Endothelzellen	58
5.5	Mentholinduzierte Hyperpolarisation in Endothelzellen	60
6.	Zusammenfassung	61
7.	Literaturverzeichnis	62
8.	Lebenslauf	67

9.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	69
10.	Eidesstattliche Erklärung	70

Zusammenfassung

Über den endothelabhängigen Hyperpolarisation-Faktor (EDHF) induziert das Gefäßendothel eine Hyperpolarisation der direkt benachbarten Gefäßmuskelzellen und bewirkt so deren Relaxation. Gleichwohl die chemische Identität des EDHF noch nicht geklärt ist, geht man davon aus, dass die EDHF Wirkung zunächst durch eine Aktivierung calciumregulierter Kaliumkanäle (K_{Ca}) im Endothel initiiert wird. Der hierfür erforderliche Anstieg der lokalen Calciumkonzentration in der Umgebung von K_{Ca} Kanälen kann über verschiedene Signalwege induziert werden. Ein bedeutsamer Weg dabei ist die Aktivierung von plasmalemalen Kationenkanälen aus der Transient-Rezeptor-Potential (TRP)- Kanalfamilie, welche einen lokalen transmembranären Calciumeinstrom ermöglichen.

Aufgrund präliminärer Literaturhinweise auf eine mögliche bedeutsame Rolle von TRPM8 und TRPA1 Kanälen für die endothelvermittelte Gefäßdilataion wurde in dieser Arbeit die Funktion dieser Kanäle als potentielle EDHF Induktoren pharmakologisch und elektrophysiologisch charakterisiert.

Dazu wurde zunächst die Wirkung etablierter TRMP8 Aktivatoren (Menthol und Icilin) und eines TRPA1 Aktivators (AITC) auf den Gefäßwiderstand isoliert perfundierter Arteriae carotides der Maus untersucht. Alle genannten Substanzen induzierten konzentrationsabhängig Dilatationen, in unterschiedlichem Ausmaß, wobei die stärkste Dilatation mit Icilin zu beobachten war. Die gefäßdilatierende Wirkung dieser Substanzen blieb allerdings auch nach mechanischer Endotheldenudierung erhalten, was für eine endothelunabhängige Dilatation spricht. In Einklang damit konnten mit den genannten TRP-Kanalaktivatoren auch keine TRP-charakteristischen Transmembranströme in isolierten Endothelzellen aus den Arteriae carotides induziert werden, was gegen eine wesentliche funktionelle Rolle von TRMP8 und TRPA1 Kanälen in Endothelzellen spricht.

Beobachtet wurde die Aktivierung eines kräftigen Kationenausstromes durch Menthol in isolierten Endothelzellen, sowie eine nahezu komplette Hemmung eines Kationeneinstromes (wahrscheinlich L-Typ Calciumkanäle) durch Menthol in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (A7R5 Zellen). Die Hemmung der L-Typ Calciumkanäle durch Menthol könnte eine Erklärung für endothelunabhängige vasodilatierende Wirkung von Menthol bieten.

Eine Beteiligung endothelialer TRPM8 und TRPA1 Kanäle bei der Regulation des Gefäßtonus konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Summary

The vascular endothelium induces hyperpolarization and in consequence relaxation of vascular smooth muscle cells via the generation of endothelium-derived-hyperpolarizing factor (EDHF). Although the structural identity of EDHF has not yet been unequivocally clarified, there is agreement that the generation of EDHF is initiated by the activation of calcium regulated potassium channels (K_{Ca}) in endothelial cells. The local increases of calcium required to activate K_{Ca} can be brought by several signaling pathways. One among these is the activation of calcium permeable TRP-channels in the plasma membrane of endothelial cells.

Based on preliminary evidence found in the literature this work aimed to define the roles of TRPM8 and of TRPA1 channels for endothelium mediated vasodilatation by means of pharmacology and electrophysiology.

It was found that the established TRPM8 channel activators menthol and icilin and the TRPA1 channel activator AITC all caused dose-dependent vasodilations of isolated perfused mouse carotid arteries. The vasodilatory effects of these drugs, however, were maintained even after mechanical removal of the endothelium, suggesting that the observed vasodilations were not mediated by the endothelium. Moreover, the before mentioned channel activators did not induce TRP-like currents in endothelial cells isolated from mouse carotid arteries, again suggesting that TRPM8 and TRPA1 do not play major functional roles in endothelial cells.

Menthol, however, induced a prominent cation current in isolated endothelial cells. Additionally menthol almost completely blocked an L-type channel like current in cultured vascular smooth muscle cells (A7R5). The latter effect likely explains the endothelium independent vasodilatation induced by menthol.

In summary, the present work does not support a role of endothelial TRPM8 and TRPA1 channels for the regulation of vessel diameter and in consequence of vascular resistance.

1. Einleitung

1.1 Der Gefäßtonus

Das Gefäßsystem des Menschen besteht aus Gefäßen unterschiedlicher Bauweise. Die Arterien und Arteriolen, die dem Kapillarbett bzw. einem Organ vorgeschaltet sind, besitzen im Vergleich zu anderen Gefäßabschnitten eine relativ dicke muskulöse Media-Schicht. Kontrahieren diese glatten Muskelzellen, so verringert sich der Gefäßdurchmesser und der Perfusionswiderstand steigt. Da die Durchblutung eines Organs gemäß dem Ohm'schen Gesetz dem Quotienten aus Perfusionsdruck und Strömungswiderstand entspricht, regulieren vor allem die muskelstarken Arteriolen die Organdurchblutung. Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz beeinflusst der

Gefäßradius in seiner 4. Potenz den Strömungswiderstand: $R \sim \frac{1}{r^4}$ (R:

Strömungswiderstand; r: Gefäßradius). Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese Gefäße als Widerstandsgefäße bezeichnet. In Ihrer Gesamtheit regulieren diese Gefäße damit den totalen peripheren Kreislaufwiderstand (TPR). Die richtige Einstellung des Kontraktionszustandes der Widerstandsgefäße, und damit letztlich des totalen peripheren Widerstands, ist essentiell um den systemarteriellen Druck, der für die Organperfusion wichtig ist, auf ausreichendem Niveau zu halten. Ist der TPR zu niedrig, führt dies zu einem Abfall des arteriellen Druckes mit der Gefahr der Minderperfusion auch zentraler Organe, wie z.B. dem Gehirn mit entsprechenden Konsequenzen wie Schwindel und Synkopen. Ist der TPR zu hoch, erhöht dies die Druckerbeit des Herzens, was mit erhöhtem kardialen Energieumsatz und Sauerstoffverbrauch einhergeht. Entsprechend steigt das Risiko einer myokardialen Minderversorgung mit Sauerstoff. Weisen die Widerstandsgefäße dauerhaft einen erhöhten Tonus auf, so verlieren diese ihre elastischen Eigenschaften und zusätzliche Umbauprozesse führen zur Versteifung der Gefäßwände. Daraus resultiert das Krankheitsbild des Bluthochdrucks, dessen Inzidenz in der Wohlstandsgesellschaft zunimmt. Gefährliche Folgen des Bluthochdrucks können Schlaganfall, Herzinfarkt und/oder Schädigung der Nieren sein.

1.1.1 Die glatte Gefäßmuskulatur

Die Wände des arteriellen Gefäßsystems enthalten ähnlich anderer Hohlorgane wie Harnblase, Darm oder Bronchialsystem glatte Muskulatur. Die Kontraktionen der

glatten Muskulatur entstehen aus einer Querbrückenbildung dünner und dicker Myofilamente, bestehend aus Aktin und Myosin (Panner and Honig 1967; Heumann 1973). In glatten Muskelzellen sind Aktin Filamente an α -actininreichen Strukturen der Zellmembran, den sogenannten „dense bodies“, verankert. Die Koordination dieser Strukturen zum dreidimensionalen kontraktilem Komplex erfolgt durch Intermediärfilamente, bestehend aus den Proteinen Desmin und Vimentin (Schmid, Osborn et al. 1982; Fujimoto, Tokuyasu et al. 1987).

Der Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur wird hauptsächlich durch zwei gegenspielende Enzymsysteme reguliert, nämlich der Myosin-leichte-Ketten-Kinase auf der einen Seite und der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase auf der anderen. Die Aktivität dieser Enzymsysteme hängt entscheidend von der intrazellulären Calciumkonzentration ab, welche ihrerseits wesentlich durch Transmitter des vegetativen Nervensystems und Metaboliten des Energiestoffwechsels gesteuert wird.

1.1.1.1 Die zentrale Rolle von Calcium für die Kontraktilität der glatten Muskelzelle

In glatten Gefäßmuskelzellen bindet Calcium entsprechend seiner zytosolischen Konzentration an Calmodulin, ein Calcium bindendes Protein. Ca-Calmodulin bildet dann einen Komplex mit der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (Malencik, Anderson et al. 1982). Diese Bindung führt zur Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, welche die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin Ketten einleitet (Adelstein, Conti et al. 1980; Mizuno, Isotani et al. 2008). Im phosphorylierten Zustand bilden diese Myosinfilamente Querbrücken mit den Aktinfilamenten und die Aktin-Myosin-Komplexe verkürzen sich, was sich makroskopisch in einer Kontraktion der glatten Muskelzelle äußert. Bei niedriger zytosolischer Calciumkonzentration ist die Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase gering und die regulatorischen leichten Myosin Ketten verhindern im nichtphosphorylierten Zustand eine Wechselwirkung der Aktin- und Myosinfilamente (Longbottom, Luckas et al. 2000).

Durch die elementare Rolle von Calcium für die Kontraktionsentwicklung in glatten Muskelzellen kommen calciumpermeablen Ionenkanälen, sowie Faktoren, die die Aktivität dieser Ionenkanäle beeinflussen, eine zentrale Rolle für die Physiologie der glatten Muskulatur zu. Diese calciumpermeablen Kanäle finden sich sowohl in der

Membran intrazellulärer Calciumspeicher wie dem sarko(endo)plasmatischen Retikulum, als auch in der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskelzelle.

Der zytoplasmatischen Konzentration des ionisierten Calciums von ca 0.1 $\mu\text{Mol/L}$ steht eine extrazelluläre Konzentration von ca 1-2 mMol/L gegenüber, was einen starken einwärts gerichteten Diffusionsgradienten mit einem Faktor von 10,000 erzeugt. Auch intrazelluläre Organellen, wie das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat können Calcium in millimolarer Konzentration speichern und so einen starken Konzentrationsgradienten zum Zytoplasma aufbauen.

1.1.1.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern

Die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wird durch Aktivierung von Ryanodin Rezeptoren (RyR) oder IP_3 Rezeptoren getriggert. Die Ryanodin Rezeptoren selbst sind auch calciumabhängig. Sie öffnen bei erhöhter zytosolischer Calciumkonzentration und verstärken somit einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Fill and Copello 2002). Der IP_3 Rezeptor wird durch seinen Liganden Inositol-triphosphat (IP_3) stimuliert. Dieses entsteht als Spaltprodukt aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2), vermittelt durch die Aktivität der Phospholipase C (PLC) (Rittenhouse and Sasson 1985). Das hierbei gleichzeitig entstehende Spaltprodukt Diacylglycerol (DAG) kann durch Aktivierung von Ionenkanälen in der Zellmembran weitere kontraktionssynergistische Effekte auslösen (Aires, Hichami et al. 2007).

1.1.1.3 Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum

Ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration kann neben der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern auch durch transmembranären Einstrom aus dem Extrazellulärraum induziert werden. Für diesen Einstrom sind vor allem drei Gruppen von Ionenkanälen relevant.

Zum einen können leere oder sich entleerende intrazelluläre Calciumspeicher (stores) Calciumkanäle in der Plasmamembran aktivieren. Aufgrund dieses Aktivierungsverhaltens werden diese Ionenkanäle als store-operated-calcium-channels (SOCCs) bezeichnet. Nachdem die molekulare Identität der SOCCs lange Zeit spekulativ war, hat sich in den letzten Jahren der ORAI-Kanal als ein Hauptkandidat für SOCCs herauskristallisiert (Guo and Huang 2008).

Daneben existieren in der glatten Gefäßmuskelzelle spannungsaktivierte Calciumkanäle (VDCC) (Gollasch and Nelson 1997; Thorneloe and Nelson 2005). Unter diesen scheint der sogenannte L-Typ Calcium-Kanal in der glatten Muskulatur eine Vorrangstellung zu besitzen. Dieser Kanal wird durch Membrandepolarisation der Zelle über -30mV stimuliert (**Abbildung 1**). Mit einem Peak-Strom, bei einem Membranpotential von ca. 0mV unter physiologischen Bedingungen, inaktiviert dieser Kanaltyp bei stärker positiven Membranpotentialen sowie bei bestehender Dauerdepolarisation und ist erst wieder durch vorgängige Hyperpolarisation erneut aktivierbar.

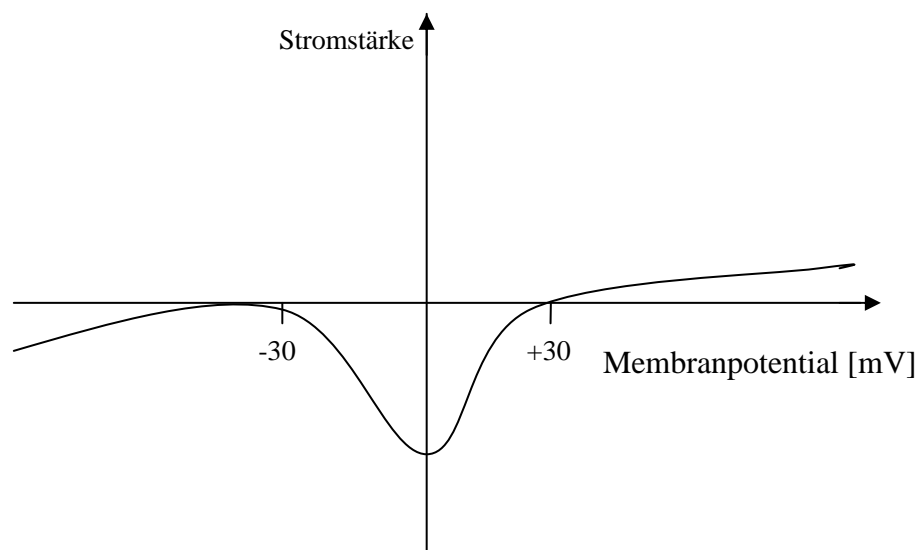


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Strom-Spannungs-Kurve des L-Typ Calcium-Kanals

Neben den SOCCs und den spannungsabhängigen Calciumkanälen können auch TRP Kanäle zu einem Calciumeinstrom in glatte Muskelzellen führen (Landsberg and Yuan 2004). Bei den TRP Kanälen handelt es sich um eine Kanalfamilie aus größtenteils nichtselektiven Kationenkanälen, die durch definierte mechanische oder chemische Stimuli sowie intrazelluläre Signalkaskaden stimuliert werden können. Die Rolle solcher TRP-Kanäle für die Regulation der Gefäßkontraktion soll im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

1.1.2 Das vaskuläre Endothel

Das vaskuläre Endothel der Arterien/Arteriolen moduliert den Kontraktionszustand der benachbarten Muskelzellschicht und somit den Gefäßtonus. Das Endothel besteht aus einer Schicht von Zellen, die die Innenseite aller Blutgefäße auskleidet. Je nach Organ und damit verbundener Funktion weist das vaskuläre Endothel einen unterschiedlichen Aufbau auf (Escoubet and Dosne 1979). So ist es in metabolisch aktiven Organen wie Leber und Milz diskontinuierlich. In den Nierenglomeruli, als Filterorgane des Blutes, ist das Endothel fenestriert (Kamenskaia 1955). In der typischen Arterie/Arteriole jedoch ist das Endothel kontinuierlich ausgebildet, was die Permeabilität auch kleinerer Moleküle stark einschränkt. Angesichts dieser organspezifisch verschiedenen Erscheinungsformen des Endothels stand lange dessen Barrierefunktion im Vordergrund. Erst gegen Ende der 70er Jahre rückte das Endothel mit einem neuen Funktionsaspekt in das Interesse der Wissenschaft und schließlich wurde die Entdeckung von Stickstoffmonoxid als endothelabhängigem Vasodilatator 1998 mit dem Nobelpreis honoriert.

Mittlerweile kennt man zahlreiche elementare Funktionen des Endothels. So spielt das Endothel neben seiner Barrierefunktion auch eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, der Kontrolle von Gefäßentwicklung und -wachstum sowie bei Entzündungsvorgängen. Das Endothel fungiert als Sensor sowohl endokriner Mediatoren als auch mechanischer Stimuli, welche sie an die umgebende Gefäßmuskulatur in Form von Tonusänderungen weiterleitet (Chappey, Wautier et al. 1997). Dem Endothel kommt daher ein wichtiger Stellenwert in der Steuerung und Aufrechterhaltung der Blutzirkulation des Gesamtorganismus zu.

1.1.2.1 Rolle des Endothels bei der Gefäßtonusregulation

Durch die Möglichkeit den Gefäßtonus zu regulieren, beeinflusst das Endothel sowohl die Durchblutung bestimmter Organe und somit deren Sauerstoff und Nährstoffangebot, wie auch den totalen peripheren Widerstand (TPR) der Gefäße und somit den systemischen Blutdruck. Die Freisetzung vasoaktiver Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO) und auch Prostacyclin (PGI-2) aus dem Endothel induziert eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (**Abbildung 2**). Entsprechend sinkt der TPR und damit der systemische Blutdruck. Zusätzlich zu NO und PGI-2 kann das Endothel auch die benachbarte Muskelzellen hyperpolarisieren, was ebenfalls eine

relaxierende Wirkung hat. Dieser Effekt wird durch den Endothelium-Derived-Hyperpolarization-Faktor (EDHF) vermittelt (Ledoux, Werner et al. 2006) (**Abbildung 2**), wobei nicht klar ist, ob es sich dabei um ein einziges chemisch klar definiertes Molekül handelt oder eher um das Wirkprinzip der Hyperpolarisation, welches von verschiedenen Signalen vermittelt werden kann.

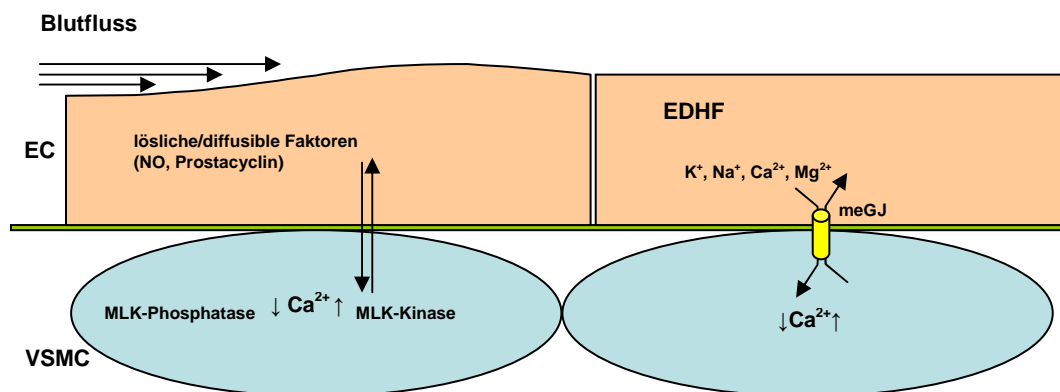


Abbildung 2: Darstellung der endothelvermittelten Vasodilatationsmechanismen. EC: Endothelzelle; VSMC: glatte Gefäßmuskelzelle; meGJ: myoendotheliale Gap Junctions; MLC: Myosin-Leichtkette

Auch der EDHF setzt den Gefäßtonus und somit auch den totalen peripheren Widerstand (TPR) herab. Im Gegensatz zum Stickstoffmonoxid- und Prostacyclinsystem, die sich als Angriffspunkte für bestimmte Medikamente klinisch bereits etablieren konnten, stellt sich der EDHF - wie bereits angesprochen - noch immer als partiell unverstanden dar (Busse, Edwards et al. 2002).

1.1.2.2 Der vasodilatierende Effekt von Stickstoffmonoxid

Erstmals beschrieb Robert Furchgott 1980 einen endothelabhängigen Faktor der direkt den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur herabsetzen kann. Nach Stimulation des Endothels mit Acetylcholin konnte er einen kurzlebigen Faktor ausmachen, der die Gefäßmuskulatur relaxiert (Furchgott and Zawadzki 1980). Er beschrieb damit den endothelium-derived-relaxation-Faktor (EDRF). Spätere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um das Gas Stickstoffmonoxid handelt. Die Freisetzung dieses Gases erfolgt aus L-Citrullin, das, katalysiert durch das Enzymsystem der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), aus der Aminosäure L-Arginin hervorgeht (Moncada, Palmer et al. 1989) (**Abbildung 3**). Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase ist ein konstitutiv im Endothel exprimiertes

membrangebundenes Enzym, dessen Aktivität hauptsächlich durch die zytosolische Calciumkonzentration und die luminaire Schubspannung reguliert wird. Steigt die Calciumkonzentration im Zellinneren entweder durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern oder durch Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum, so nimmt die Aktivität der eNOS zu. Das Calciumbindeprotein Calmodulin übernimmt hierbei die Aufgabe des Calciumsensors der eNOS (Bredt and Snyder 1990).

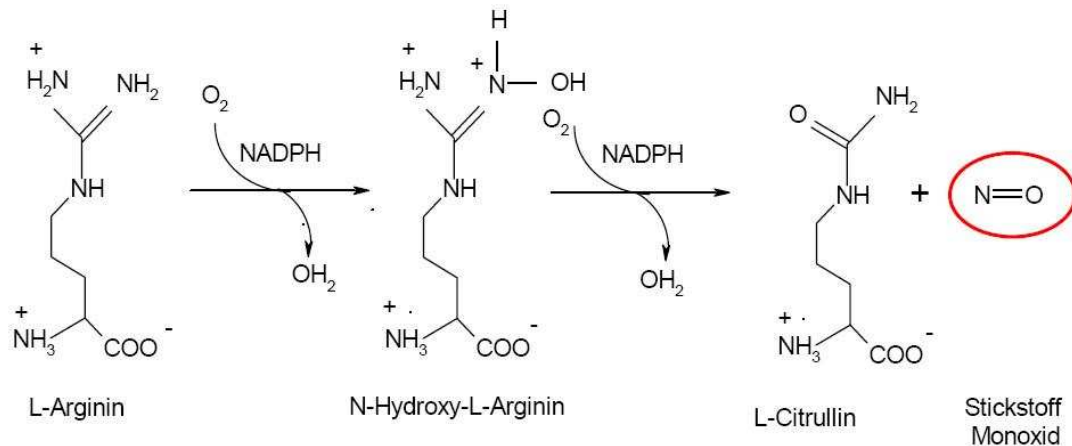


Abbildung 3: Die eNOS katalysiert die zweifache Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin. Dabei wird glattmuskulär wirksames Stickstoffmonoxid frei.

Als Gas vermag Stickstoffmonoxid durch die Zellmembran in die glatte Gefäßmuskelzelle zu diffundieren. Dort aktiviert es die lösliche Guanylatzyklase, wodurch vermehrt cyclisches Guanolatmonophosphat (cGMP) aus Guanosintrisphosphat (GTP) gebildet wird (Rees, Palmer et al. 1989), (Rapoport, Draznin et al. 1983). Durch den zytosolischen Anstieg des cyclischen Guanosinmonophosphats wird die cGMP – abhängige Proteinkinase (PKG) aktiviert, was zur Absenkung der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zur Minderung der Aktivität der glattmuskulären Myosinleichtenkettenkinase führt (Fiscus, Rapoport et al. 1983). In der Folge löst sich der Aktin/Myosin-Komplex, der Tonus der Muskulatur sinkt und das Gefäß relaxiert (Carvajal, Germain et al. 2000). Durch L-Arginin-Analoga wie N-ω-Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA), das, strukturell dem L-Arginin ähnlich, von der eNOS erkannt wird und diese funktionell blockiert, kann die endotheliale Produktion von Stickstoffmonoxid gehemmt werden. Damit wird die physiologische vasodilatorische Rolle der endothelialen NOs aufgehoben, was zur Tonuserhöhung der Gefäßmuskulatur und damit zum Anstieg des systemischen Blutdrucks führt (Rees, Palmer et al. 1989). Allerdings kann man auch

nach Ausschalten der endothelialen NO Produktion noch endothelvermittelte Gefäßrelaxationen beobachten, was die Rolle weiterer Mechanismen wie z.B. Prostanoiden und EDHF bei der Tonusregulation nahelegt.

1.1.2.3 Der vasodilatierende Effekt von Prostacyclin

Arachidonsäure stellt das Ausgangssubstrat für die Prostacyclinsynthese dar. Sie ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die durch das Enzym Phospholipase A2 aus Esterbindungen mit Phospholipiden der Zellmembran hydrolysiert wird und somit freigesetzt werden kann. Freie Arachidonsäure kann durch zwei verschiedene Enzymsysteme weiterprozessiert werden. Durch die Aktivität der Lipooxygenase (LO) entstehen Leukotriene, deren Funktion hauptsächlich in der Steuerung von Immunprozessen besteht, die jedoch, bei verstärkter lokaler Bildung, auch den Gefäßtonus beeinflussen können. Durch die Aktivität der Cyclooxygenasen (COX) wird Arachidonsäure zunächst zu zyklischen Endoperoxiden umgewandelt, woraus dann durch die Aktivität spezifischer Prostanoidsynthasen Thromboxane, Prostaglandine oder Prostacycline entstehen (Moncada and Vane 1978). Letztgenannte haben darunter die größte vasodilatatorische Potenz (Moncada and Vane 1978). Prostacyclin bindet an spezifische Oberflächenrezeptoren an glatten Muskelzellen, wodurch die Adenylatcyclase aktiviert wird. Dies führt zur Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Cyclo-AMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche über Phosphorylierung die Myosinleichtkettenkinaseaktivität hemmt. Somit vermindert Prostacyclin den Gefäßtonus und wirkt vasodilatatorisch. Die Bildung von Prostacyclin kann durch nichtsteroidale Antirheumatika wie Indomethacin, welches die Cyclooxygenasen blockiert, gehemmt werden. Im Gesamtorganismus führt Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität jedoch nicht regelmäßig zu einem Blutdruckanstieg, was die Rolle des Prostacyclins für die Vasoregulation vor allem für lokale Durchblutungsänderungen nahelegt.

1.1.2.4 Der vasodilatierende Effekt von EDHF

Die Beobachtung, dass sowohl nach pharmakologischer Inhibition des NO- wie auch des Prostacyclinsystems noch endothelbedingte Vasodilationen in arteriellen Widerstandsgefäßen beobachtet werden können, führte zum Postulat eines weiteren vasodilatativ wirksamen endothelialen Systems (Feletou and Vanhoutte 2006).

Weiterführende Untersuchungen in dieser Richtung führten zur Beobachtung, dass bei gehemmter NO und PGI₂ Produktion endothel-induzierte Gefäßrelaxationen, wie z.B. Aktivierung des Endothels mit Acetylcholin, stets mit einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle einhergehen. Dieses Phänomen wurde daher einem endothelium-derived-hyperpolarisation-factor (EDHF) zugeschrieben (Chen, Suzuki et al. 1988; Feletou and Vanhoutte 1988; Feletou and Vanhoutte 2006). Dieser EDHF scheint vor allem in kleineren Arteriolen mit einem Durchmesser von weniger als 500 µm, also den eigentlichen Widerstandsgefäßen, zur Gefäßtonusregulation beizutragen (Shimokawa, Yasutake et al. 1996). Wie bereits erwähnt, konnte diesem Effekt jedoch noch keine eindeutige chemische Identität zugeordnet werden. Die gegenwärtige Tendenz geht dahin den Effekt des EDHF einem komplexen elektrophysiologischen Zusammenspiel zwischen Endothel und Gefäßmuskulatur zuzuschreiben.

Bindet der Transmitter des parasympathischen Nervensystems, Acetylcholin (ACh), an den muskarinergen ACh Rezeptor auf Endothelzellen, einen G-Proteingekoppelten Rezeptor, so führt dies zur Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylbisphosphat in IP₃ und Diazylglyzerin spaltet. IP₃ führt zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und damit zum Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Durch diesen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wird, wie bereits erwähnt, die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und damit die endotheliale NO Produktion aktiviert. Zusätzlich werden auch calciumregulierte Kaliumkanäle aktiviert. Ähnlich der eNOS besitzen diese Kalium Kanäle (K_{Ca}) in ihrer zytoplasmatischen Domäne eine Bindestelle für Calmodulin, welches als Calciumsensor fungiert. Entsprechend erhöht ein intrazellulärer Calciumanstieg die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kaliumkanäle. Aktivierung dieser Kaliumkanäle führt zum Kaliumausstrom und damit zur Hyperpolarisation der Endothelzelle. Vermutet wird, dass diese Hyperpolarisation nun über Gap junctions an die benachbarten Gefäßmuskelzellen weitergeleitet wird. Gap junctions sind großlumige interzelluläre Kanalkomplexe.

Dabei bildet jede Zelle einen Halbkanal, der jeweils aus sechs Connexinproteinen zusammengesetzt ist. Je nach Zusammensetzung dieser Gap junctions aus unterschiedlichen Connexinproteinen wird ein gerichteter oder ungerichteter Transport von Molekülen bzw. Ladungsträgern erreicht. Für die Regulation des Gefäßtonus scheinen vor allem die Connexine (Cx) Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 bedeutsam zu sein.

Die über Gap junctions in die glatten Gefäßmuskelzelle weitergeleitete Hyperpolarisation reduziert dort die Offenwahrscheinlichkeit von spannungsaktivierten L-Typ Calcium Kanälen. Durch die Verminderung des transmembranären Calciumeinstromes in die glatte Muskelzelle vermindert sich in der Folge die Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase und somit der Kontraktionszustand der Zelle. Die Hyperpolarisation der Muskelzelle führt so zum Tonusverlust der Muskulatur und zur Relaxation des Gefäßes.

Vor allem die endothelialen K_{Ca} -Kanäle scheinen, wie die Arbeitsgruppe von Köhler und Hoyer zeigen konnte, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser durch Hyperpolarisation indizierten Gefäßantwort zu spielen (Brahler, Kaistha et al. 2009). Ob dabei die Hyperpolarisation tatsächlich über eine Diffusion von Ladungsträgern via Gap junctions von der Endothelzelle an die benachbarte Muskelzelle weitergegeben wird, ist noch nicht definitiv geklärt. Ebenso ist noch nicht ausreichend verstanden, ob sich diese endotheliale Hyperpolarisation auch über endothel-endotheliale Gap junctions in longitudinaler Richtung ausbreiten kann. Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass durch die pharmakologische Hemmung dieser Interzellulärkanäle die EDHF induzierte Vasodilatation gestört ist (Figuroa and Duling 2009; Lopez, Rodriguez-Sinovas et al. 2009). Mäuse mit genetischen Connexin 40 Defekten weisen in der Tat eine gestörte Ausbreitung endothelialer Hyperpolarisation auf (de Wit, Roos et al. 2000) und sie sind hypertensiv, wobei allerdings der Bluthochdruck eher indirekt auf einer Störung des Renin-Angiotensin-Systems beruht. (Kurtz, Schweda et al. 2007).

Zu den weiteren Faktoren, die als EDHF diskutiert werden, zählen auch die Epoxyeicosatriensäuren, die sogenannten EETs. Diese werden in der Endothelzelle aus Arachidonsäure gebildet. Die Freisetzung von EETs wird sowohl durch mechanische Stimuli, wie Scherkräfte am Endothel, oder auch durch Mediatoren wie z.B. Bradykinin stimuliert, welches das Schlüsselenzym der EET-Synthese, nämlich die Cytochrom-P450-Epoxygenase aktiviert. Diese EETs können aufgrund ihrer

lipophilen Eigenschaften durch die Zellmembran in die Muskelzelle diffundieren und dort den Kaliumkanal $K_{Ca}1.1$ aktivieren, wodurch es wiederum zur Hyperpolarisation dieser Zelle kommt (Archer, Gragasin et al. 2003). Zusätzlich wird vermutet, dass die EETs auch endotheliale calciumpermeable Kanäle öffnen können, sodass es hier zu einer Aktivitätssteigerung der bereits genannten endothelialen K_{Ca} -Kanäle kommen kann und somit die hyperpolarisierende Wirkung verstärkt wird.

1.2 Nichtselektive Kationenkanäle in der Gefäßwand

Unter diesen calciumpermeablen Kanälen misst man vor allem den Transient-receptor-potential Kanälen, den TRP-Kanälen, eine wesentliche Bedeutung bei. Bei diesen handelt es sich um eine Familie von nichtselektiven Kationen-Kanälen, die neben den quantitativ dominierenden Kationen Kalium und Natrium auch für bivalente Kationen wie Calcium und Magnesium permeabel sind. Es gibt gute Hinweise dafür, dass endotheliale TRP-Kanäle bei Endozytose, Transzytose, Endothelzellproliferation und Angiogenese eine Rolle spielen (Nilius and Droogmans 2001). Jüngere Arbeiten zeigen weiterhin, dass endotheliale, wie auch an der glatten Muskelzelle lokalisierte TRP-Kanäle wesentlich zur Einstellung des Gefäßtonus beitragen (Yao and Garland 2005). Im Endothel spielt dabei der TRPV4 Kanal eine wichtige Rolle, wie die Arbeitsgruppe von Köhler und Hoyer zeigen konnte (**Abbildung 4**). Die Aktivität dieses Kanales wird indirekt durch Veränderungen der Osmolarität und der Viskosität des Blutes beeinflusst. Man vermutet, dass eine erhöhte Blutviskosität und eine erhöhte Fließgeschwindigkeit des Blutes zu einer gesteigerten Wandschubspannung an der Plasmamembran der Endothelzelle führt, wodurch in dieser vermehrt Arachidonsäure freigesetzt wird. Arachidonsäure aktiviert den TRPV4 Kanal direkt (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007). Der folgende Calciumeinstrom durch den TRPV4 Kanal in die Endothelzelle führt dann durch Stimulierung von K_{Ca} -Kanälen zur Initiierung der bereits beschriebenen Kaskade, welche letztlich zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führt. Im Gegensatz dazu können TRP-Kanäle, die in der Zellmembran der Gefäßmuskelzelle sitzen, über den Calciumeinstrom Kontraktionen auslösen bzw. verstärken. Ein Beispiel hierfür ist der TRPC6 Kanal, welcher durch Diacylglycerin (DAG) aktiviert wird (**Abbildung 4**). DAG entsteht beispielsweise bei der G_q vermittelten Aktivierung der Phospholipase C durch den Vasokonstriktor Angiotensin II. Der dabei über TRPC6 vermittelte Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum wirkt synergistisch mit der

Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch IP_3 , welches zusammen mit DAG bei der Aktivierung der Phospholipase C entsteht.

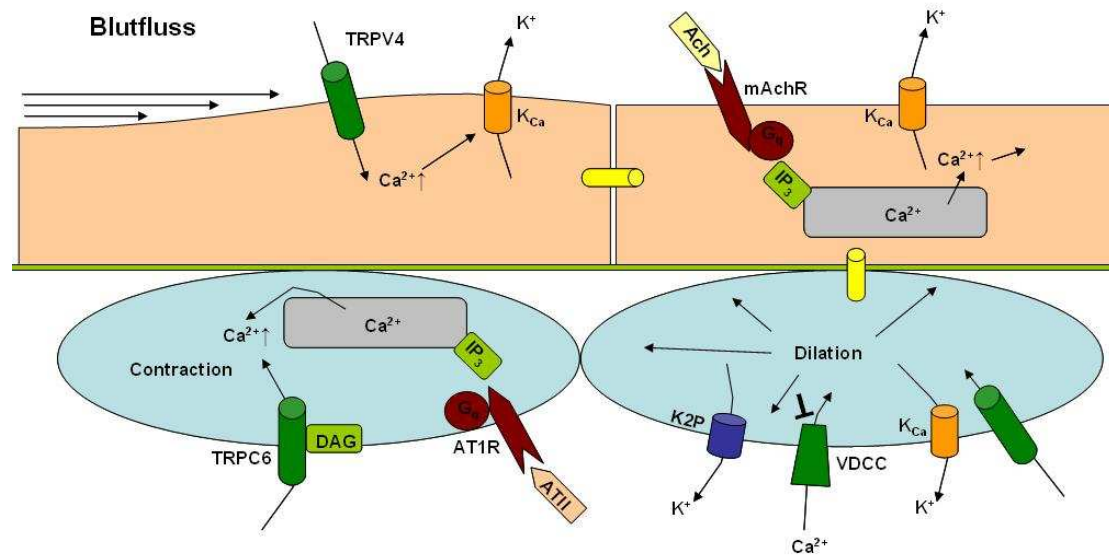


Abbildung 4: Darstellung der vermuteten Rolle unselektiver Kationenkanäle an der Regulation des Gefäßtonus. VDCC: Spannungsabhängige Calcium-Kanäle; mAChR: muskarinerge Acetylcholinrezeptor

1.3 Die Familie der TRP-Kanäle

TRP (transient receptor potential)-Kanäle kommen in einer großen Zahl von Spezies vor. Dazu zählen unter anderem Würmer, Fruchtfliegen, Zebrafische, Mäuse und Menschen. Das erste TRP Gen wurde von der Taufliege, *Drosophila melanogaster* kloniert. Mittlerweile unterteilt man die Familie der TRP-Kanäle in zwei Gruppen, die insgesamt nochmal sieben Subgruppen bilden. Zur Gruppe 1 dieser Kanäle zählt man jene fünf TRP-Kanäle, die in ihrer Struktur und ihrem Aufbau dem *Drosophila* TRP am nächsten stehen. Dazu gehören TRPA (ankyrin), TRPC (cannonical), TRPM (melasatin), TRPV (vanilloid) und TRPN, benannt nach dem Gründungsmitglied der Familie, dem *Drosophila* NOMPC-Kanal. Letztgenannter Kanal kommt in Säugetieren nicht vor. Die Gruppe 2 der TRP-Kanäle besteht aus den kanalbildenden Proteinen der TRPP (polycystin) und TRPML (mucolipin) Subfamilien (Montell, Birnbaumer et al. 2002). Alle TRP-Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen. Zwischen der fünften und der sechsten Domäne findet sich die sogenannte Porenregion (Voets and Nilius 2003). Die Aminosäuren dieser Region sind verantwortlich für Selektivität und Leitfähigkeiten der jeweiligen Kanäle

für bestimmte Ionen. Die Kanäle der TRP Gruppe 2 besitzen zusätzlich zu diesem gemeinsamen Aufbau noch eine große extrazelluläre Schleife, die möglicherweise als regulatorisch bedeutende Region die erste Domäne von der zweiten trennt. Der TRP-Kanal selbst besteht wiederum aus vier dieser TRP-Proteine, ist also ein Tetramer. Ob, und inwieweit TRP-Proteine unterschiedlicher Subfamilien physiologischerweise funktionelle Kanäle, sogenannte heterotetramere Kanäle bilden können, ist noch unklar. Unter den genannten Kanälen gehören die Kanäle der TRPM, TRPV und TRPC-Subgruppen, aufgrund ihrer starken Expression im Menschen, zu den am besten untersuchten. Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion, beim programmierten Zell-Tod, bei der Einstellung des Gefäßtonus, bei der Reizaufnahme von Schmerz, Geschmack, sowie von Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur und der Osmolarität (Owsianik, D'Hoedt et al. 2006).

Das ubiquitäre Vorkommen und die breitgefächerten Funktionen dieser Kanäle lassen auf ein relativ frühes Auftreten dieser Proteine in der Phylogese schließen. So sind TRP-Kanäle in der sensorischen Registrierung von extrazellulären Noxen bereits bei Hefen und Nematoden involviert. Desweiteren bilden Mäuse Pheromon-sensitive TRP-Kanäle aus, die ihnen die Unterscheidung zwischen ihren männlichen und weiblichen Artgenossen ermöglicht (Montell, Birnbaumer et al. 2002). TRP-Kanäle sind in der Regel nicht selektiv permeabel für Kationen. Nur ein kleinerer Anteil der TRP Kanäle unterscheidet selektiver zwischen mono- und divalenten Kationen. Dazu zählen die TRPV5 und TRPV6 Kanäle, die eine außergewöhnlich hohe Selektivität für Calcium aufweisen und die TRPM4 und TRPM5 Kanäle, die ausschließlich monovalente Ionen wie Natrium und Kalium passieren lassen.

1.3.1 Der TRPM8-Kanal

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der Kanal aus der Melastatin Familie der TRP-Kanäle, TRPM8 (**Abbildung 5**). Zu den TRPM- Kanälen zählt man heute acht Mitglieder, TRPM1-8, die allesamt im Menschen exprimiert sind (Fonfria, Murdock et al. 2006). Benannt wurde diese Familie nach Identifikation ihres ersten Mitglieds, TRPM1. Für die Namensgebung entscheidend war dabei eine hohe Korrelation des Expressionslevels dieses Kanals mit der Potenz zur Metastasenbildung in Zell-Linien von Melanomen (Duncan, Deeds et al. 1998; Zhiqi, Soltani et al. 2004). Wie bereits erwähnt bilden TRPM4 und TRPM5 Besonderheiten, da diese als einzige TRP-Kanäle selektiv für monovalente Kationen sind (Nilius, Prenen et al. 2005). TRPM8 hat, wegen seiner hohen Leitfähigkeit für Calcium, die ungefähr dreimal so groß ist wie die für Natrium, als der TRPM-Kanal mit der größten Calciumleitfähigkeit auch eine physiologisch bedeutsame Stellung. Das Gen des TRPM8 Kanals liegt beim Menschen auf Chromosom 2q37.1, bei der Maus auf Chromosom 1 D. Aktiviert wird dieser Kanal durch physikalische Reize, wie Temperaturabfall unter 28°C, durch pflanzliche Verbindungen wie Menthol, Linalool, Geraniol und Hydroxycitronella sowie durch das synthetische „supercooling agent“ Icilin (McKemy 2005; Bautista, Siemens et al. 2007; Vriens, Nilius et al. 2008). Diese speziellen Eigenschaften gaben diesem Kanal vor Einführung der TRP-Nomenklatur, den Namen CMR1, „cold and Menthol receptor 1“. Interessanterweise wirken die Kanalaktivierungen durch Temperaturabfall und die Agonisten Menthol oder Icilin nicht additiv, sondern potenzierend (Voets, Owsianik et al. 2007). Dies legt unterschiedliche regulatorische Domänen im Kanalprotein als Angriffspunkte der verschiedenen Stimuli nahe.

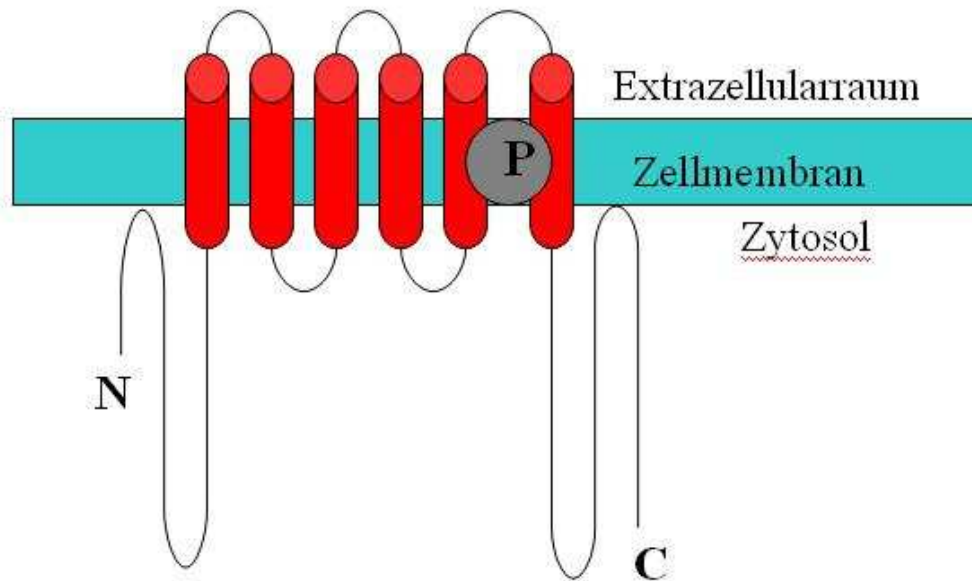


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur von TRPM8. P: Poren-region; N: N-Terminus; C: C-Terminus

Synthetische Substanzen wie BCTC, thio-BCTC, sowie Capsazepin, die ursprünglich als Rezeptorantagonisten des durch Capsaicin stimulierten TRPV1-Kanals entwickelt wurden, inaktivieren auch den TRPM8 Kanal. Weiterhin wird die TRPM8 Kanalaktivität durch chemische Reize wie pH-Änderungen und Ethanol, durch Konzentrationsänderungen des intrazellulären Calciums, sowie durch das Membranphospholipid PIP_2 moduliert (Benedikt, Teisinger et al. 2007; Daniels, Takashima et al. 2009). Der Regulation durch PIP_2 scheint dabei eine negative Rückkopplung zu Grunde zu liegen. PIP_2 wird durch die Phospholipase C (PLC) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) gespalten. Die Aktivität von PLC steigt mit erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration. Der Verbrauch an PIP_2 führt dann zu einer verminderten Aktivität von TRPM8 und einem folglich reduzierten Calciumeinstrom (Liu and Qin 2005).

Dieses breite Spektrum an Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmöglichkeiten sowie das gewebespezifische Expressionsmuster des TRPM8 Kanales, lassen Spekulationen über seine physiologischen Funktionen zu. Eine hohe Kanaldichte wurde in Ganglienzellen der spinalen Hinterwurzel, sowie in Ganglienzellen des Trigemini Nervs (Nealen, Gold et al. 2003; Hayashi, Kondo et al. 2009) nachgewiesen. Das Vorkommen in diesen hauptsächlich neuronal-sensorischen Geweben, die Aktivierung des Kanales durch moderate Kälte, sowie durch das bekannte Phänomen, dass oberflächliche Applikation von Menthol eine Kälteempfindung auslöst, ließen

vermuten, dass die Hauptrolle des TRPM8-Kanals in der Temperaturwahrnehmung liegt (Dhaka, Murray et al. 2007). Tiere, bei denen dieser Kanal genetisch ausgeschaltet wurde zeigen tatsächlich stark abgeschwächte Reaktionen auf Kälte, sowie auf Kälteempfindung auslösende Stoffe, wie Menthol (Liu, Lubin et al. 2006; Colburn, Lubin et al. 2007). Außer in Neuronen konnte die Expression von TRPM8 in glatten Muskelzellen der Prostata und bestimmter Gefäße, sowie in kultivierten Endothelzellen nachgewiesen werden. Ob, und welche physiologische Funktionen der Kanal in diesen Geweben ausübt, ist jedoch bisher noch unklar (Bidaux, Roudbaraki et al. 2005; Zhang and Barritt 2006).

1.3.2 Der TRPA1-Kanal

Das einzige Mitglied der TRPA Familie, ursprünglich auch als ANKTM1 (ankyrin-like protein with transmembrane domains1) benannt, weist einige Gemeinsamkeiten mit dem bereits genannten TRPM8 Kanal auf. Auch dieser Kanal gehört funktionell zur Gruppe der Thermo-TRP-Kanäle, da auch er, wie TRPM8, durch Kälte aktiviert werden kann. Ebenso wird dieser Kanal hauptsächlich im trigeminalen Ganglion und im Ganglion der hinteren Rückenmarkswurzeln exprimiert. Im Gegensatz jedoch zum TRPM8 Kanal, der bereits durch moderates Kühlen unter 28°C aktiviert wird, erfordert die Aktivierung des TRPA1 Kanals deutliche stärkere Temperaturerniedrigungen unter 17°C (Karashima, Talavera et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPA1 in Neuronen stark mit der Expression von TRPV1, dem Hitzerezeptor korreliert, während eine entsprechende Co-Expression mit TRPV1 nur in einem Bruchteil der TRPM8 exprimierenden Neurone nachgewiesen werden konnte. Die physiologische Aufgabe dieser TRPV1/TRPA1 koexprimierenden Neurone wird deshalb in der polymodalen Schmerzwahrnehmung vermutet, die sowohl durch toxische Hitze, wie auch bedrohliche Kälte stimuliert werden (Kwan, Allchorne et al. 2006; Kwan and Corey 2009). Genau wie TRPM8 wird auch TRPA1 durch die „kühlenden Substanzen“ wie Icilin und Menthol aktiviert (Karashima, Damann et al. 2007; Rawls, Gomez et al. 2007). Während für die Stimulierung des TRPA1 Kanals durch Icilin deutlich höhere Konzentrationen als für TRPM8 notwendig sind, zeigt Menthol relativ paradoxe Effekte. So scheinen Konzentrationen im niedrigen $\mu\text{molaren}$ (1 – 100 μM) Bereich den TRPA1 Kanal zu aktivieren, wohingegen Konzentrationen über 100 μM die Kanalaktivität hemmen (Karashima, Damann et al. 2007). Als weitere Agonisten des

TRPA1 Kanäle gelten die pflanzlichen Wirkstoffe Zimtaldehyd, Eugenol, Gingerol und Allylthiocyanat (AITC) (Vriens, Nilius et al. 2008). AITC, besser bekannt als Senföl, das in manchen Kulturen bei der Zubereitung von Speisen einen hohen Stellenwert einnimmt, und Zimtaldehyd sind selektive Agonisten für TRPA1 und besitzen keine Wirkung auf andere TRP-Kanäle. Wie auch TRPM8 scheint der TRPA1 Kanal durch Verbrauch von intrazellulärem PIP₂ in seiner Aktivität gemindert zu werden (Karashima, Prenen et al. 2008).

2. Zielsetzung der Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass endotheliale TRPV4 Kanäle den Vasotonus beeinflussen, indem sie die Signalkaskade des EDHF vermitteln oder unterstützen. Eine Beteiligung weiterer TRP-Kanäle, bei der EDHF induzierten Vasodilatation, konnte noch nicht ausreichend gesichert werden. PCR-Analysen von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC), ergaben neben TRPV4 auch eine Expression von TRPA1 und TRPM8. Entsprechend könnten auch diese Kanäle als mögliche Kandidaten für die Vermittlung des EDHF-Effektes in Frage kommen. Vor kurzem publizierte Arbeiten anderer Arbeitsgruppen postulieren in der Tat einen vasodilatatorischen, endothelvermittelten Effekt durch Stimulierung von TRPA1 Kanälen (Earley, Gonzales et al. 2009). Auch durch Aktivierung von vaskuläre TRMP8 Kanälen wurden Gefäßantworten beschrieben, die allerdings eher endothelunabhängig sein könnten (Johnson, Melanaphy et al. 2009). In diesen Studien wurden die Schlussfolgerungen über die Einbeziehung der jeweiligen TRP Kanäle jedoch nur indirekt über pharmakologische Ansätze gezogen. Der direkte Nachweis der Kanalfunktion durch elektrophysiologische Untersuchungen wurde bislang nicht erbracht. Somit steht der eigentliche Nachweis einer funktionellen Beteiligung von TRPA1 und TRPM8 bei der Regulation des Gefäßtonus, speziell bei der Vasodilatation noch aus.

Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Führt eine intraluminale Aktivierung von TRP-Kanälen, also durch Applikation des TRPA1-Aktivators AITC, sowie der TRPM8-Aktivatoren Menthol und Icilin zu einer Veränderung des Gefäßtonus? Dies soll durch Myographieexperimente an isolierten Gefäßen untersucht werden. Die mögliche Endothelbeteiligung am Effekt soll durch mechanische Deaktivierung des Endothels bestimmt werden.
2. In patch Clamp Untersuchungen an frisch isolierten Endothelzellen der Maus soll untersucht werden, ob die TRPA1 und TRPM8 Aktivatoren Ströme und Membranpotentialänderungen induzieren, welche mit dem EDHF-Mechanismus konform sind.
3. In patch Clamp Untersuchungen an Zellen der Muskelzelllinie A7R5 soll untersucht werden, ob die TRPM8 und TRPA1 Aktivatoren AITC, Menthol sowie Icilin zu Membranströmen und Membranpotentialänderungen führen.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte und Bezugsquellen

- Borosilikatglaskapillaren (Harvard Apparatus, Kent), Innendurchmesser: 0,86mm, Außendurchmesser: 1,5mm
- Computerprogramm Pulse (HEKA Elektronik, Lambrecht; Pfalz)
- Computerprogramm Origin Version 6.1G (OriginLab Corporation, Guangzhou; Kanada)
- Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- EPC 9 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht; Pfalz)
- Experimentierbad, Volumen 2 ml (Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)
- Invertmikroskop Axiovert 135 (Zeiss)
- Laborwaage (Sartorius BP310P, Göttingen)
- Messelektroden, chloridierter Silberdraht, Stärke: 250 µm
- Mikrofilter (Sarstedt, Nürnberg)
- Patch-Clamp-Mikromanipulator (Luigs und Neumann GmbH, Reitingen)
- Petrischalen, Durchmesser: 30 mm
- Pipettenziehgerät; DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instruments, München)
- Pipettiergerät Pipetboy acu (Integra-biosciences, Chur)
- Präparierbesteck (Pinzetten, Mikrodissektionsscheren)
- Schwingungsgedämpfter Mikroskopiertisch (Physik Instrumente, Waldborn)
- Stereomikroskop (Zeiss, Jena)
- Zellkulturflaschen, 50 ml (Bio-One Frickenhausen)

3.1.2 Chemikalien und Bezugsquellen

- CaCl₂ (Sigma)
- D-(+)-Glukose (Sigma)
- Diethylether (Roth, Karlsruhe)
- DMEM-Kulturmedium (*Dulbeccos` s modified Eagle`s medium*, PAA Laboratories, Pasching)
- EGTA (Sigma)
- Menthol (Sigma)
- HEPES (Sigma)

- Icilin (BioTrend)
- Allylisothiocyanat (AITC) (Sigma)
- Capsazepine (BioTrend)
- DMSO(Sigma)
- KCl (Sigma)
- MEM-Earle Medium (Biochrom, Berlin)
- MgCl₂ (Life Technologies, Eggstein)
- Na₂ATP (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- NH₄Cl₂ (Merck)
- PBS-Puffer mit und ohne Kalzium & Magnesium (PAA Laboratories, Pasching)
- Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching)
- Fötales Kälberserum (PAA Laboratories, Pasching)
- Trypsin 0,5 % + EGTA (PAA Laboratories, Pasching)
- TRAM-34 (freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Heike Wulff, University of California, zur Verfügung gestellt)
- UCL1684 (Tocris)

3.2 Versuche am Myographen

3.2.1 Der Druckmyograph

Myographische Untersuchungen dienen der Messung von Kontraktionskraft bzw. des Kontraktionszustandes der glatten Muskulatur. Dabei gilt es grundsätzlich zwei Arten der Messung zu unterscheiden. Bei der isometrischen Myographie wird das zu messende Gewebe ringförmig präpariert und über zwei sich in einer Versuchskammer mit Physiologischer Salzlösung befindlichen Metallhaken gespannt. Über diese Metallhaken kann die Kraftentwicklung der glatten Muskulatur gemessen werden. Durch Beimischung von vasoaktiven Stoffen zur Badlösung können etwaige Veränderungen der Kraftentwicklung erfasst und dargestellt werden. Bei dieser Art der Myographie kann jedoch ein Wirkstoff nicht getrennt intra- oder extraluminal angeboten werden.

Für solche separaten Applikationen ist es erforderlich mit dem isobaren Druckmyographen zu arbeiten, der nicht mehr direkt die Spannungsentwicklung der

glatten Muskulatur, sondern den Gefäßdurchmesser in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck misst. Hierbei dient ein isoliertes Blutgefäß als Überbrückung eines Perfusionskreislaufes. Durch Anpassung des intraluminalen Drucks, sowie Anlegen eines gerichteten Flusses werden die Messungen unter quasi physiologischen Bedingungen durchgeführt.

3.2.2 Gefäßpräparation

Die Mäuse wurden in tiefer Äthernarkose betäubt und durch Entnahme des Herzens getötet. Unter einem Binokular wurden die linke und rechte Arteria carotis communis dargestellt und herauspräpariert. Zur Orientierung diente die Trachea, die Clavicula, sowie der Nervus vagus, der in einer gemeinsamen Faszie mit der Carotis verläuft. Direkte Berührung und Zugausübung auf die Gefäße wurden vermieden. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden diese im Kühlschrank bis zu 3 Stunden bei ca. 4°C in PBS gelagert.

3.2.3 Lösungen für Myographie-Experimente

Für sämtliche Myographie Experimente wurde eine Pufferlösung verwendet. Diese diente sowohl als intraluminale Perfusionsflüssigkeit wie auch als Pufferlösung des Experimentierbades.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Myographiepuffers

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in mmol/l</i>
NaCl	145
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	2
Glucose	5
NaH ₂ PO ₄	1,2
Pyruvat	2
MOPS	3
KCl	4,7
pH-Wert (mit NaOH justiert)	7,4

3.2.4 Der Versuchsaufbau

Die frisch isolierte Arteria carotis communis der Maus wurde auf zwei, sich im Experimentierbad befindlichen Glaskapillaren möglichst gleichen Durchmessers aufgezogen. Diese Kapillaren standen mit ihrem freien Ende in Verbindung mit einem Puffer-Flüssigkeitsreservoir, welches zur Variation des intraluminalen Druckes höhenverstellbar war. Sowohl im Experimentierbad wie auch in diesem Reservoir befand sich der unter 3.2.3 beschriebene Puffer mit möglichst physiologischer Zusammensetzung. Desweiteren befanden sich am Zu- und Ablaufsystem des Experimentierbades Sensoren zur kontinuierlichen Aufzeichnung des zugeführten Druckes. Über einen Temperaturmessfühler wurde die Temperatur im Experimentierbad konstant auf 37°C gehalten. Das Experimentierbad selbst war auf einem invertierten Mikroskop mit Kreuztisch befestigt um das Gefäß bestmöglich fokussieren zu können. Unter dem Experimentierbad befand sich eine Kamera, welche die Variationen des Gefäßdurchmessers in Echtzeit erfasste und an den Computer weitergab. Mit Hilfe der Analysesoftware VesselView 1.0®, das auf Dichtemessungen basiert, konnten die Gefäßdurchmesser auf 2µm genau bestimmt werden. Über einen Drei-Wege-Hahn am Zuflusssystem konnten Substanzen selektiv intraluminal angeboten werden. Das Applikationsgefäß befand sich dabei in gleicher Höhe wie das Puffer-Zulaufgefäß, sodass der intraluminale Druck konstant blieb.

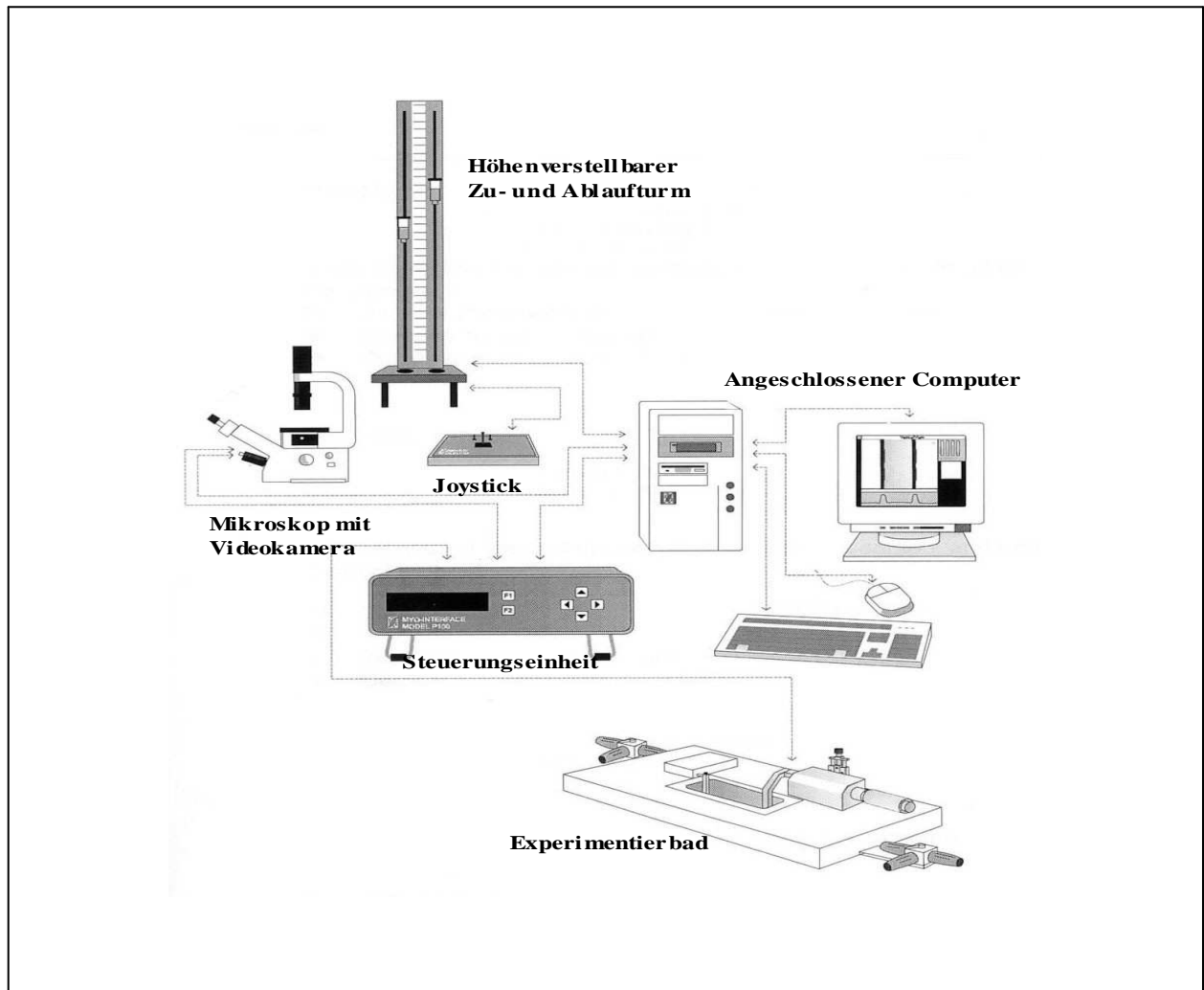


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus des Druckmyographen (nach: Pressure Myograph-Model P100 J.P.Trading Bedienungsanleitung)

3.2.5 Versuchsablauf

Nach Montage des Gefäßes auf die beiden Glaskapillaren wurde gewartet bis im Bad die Arbeitstemperatur von 37°C erreicht wurde. Durch Niveauerhöhung der Flüssigkeitsreservoirs des Zu- und Ablaufes konnte der Druck langsam, auf 80 mmHg, mit Einstellung einer geringen Flussrate, erhöht werden. Nach einer etwa 20-minütigen Equilibrierungsphase, wurde dem Badpuffer Phenylephrin (Endkonzentration $1\mu\text{Mol/L}$) beigemischt, worauf das Gefäß dauerhaft kontrahierte, was sich in einer Abnahme des Gefäßdurchmessers äußerte. Gefäße, die auf Phenylephrin nicht oder nur mit einer Durchmesserreduktion von $<10\%$ des

Ausgangswertes reagierten, wurden nicht weiter verwendet. Anschließend wurden der Perfusionslösung die chemischen TRP-Aktivatoren Menthol (2 μ Mol/L - 200 μ Mol/L), Icilin (1 μ Mol/L - 100 μ Mol/L) oder AITC (10 μ Mol/L - 100 μ Mol/L) jeweils in aufsteigenden Konzentrationsreihen beigemischt und Änderungen des Gefäßdurchmessers registriert. Zur Überprüfung der funktionellen Integrität des Endothels wurde der Perfusionslösung Acetylcholin (Ach) (Endkonzentration 100 nMol/L) beigefügt, welches typischerweise endothelabhängig zu einer starken Dilatation der vorkontrahierten Gefäße führt. Um den möglichen Anteil endothelvermittelter Reaktionen bei den Effekten der genannten TRP-Modulatoren zu bestimmen, wurde durch gezieltes Einschleusen einer definierten Luftmenge in das Perfusionssystem für 3 – 5 Minuten ein mechanischer Schaden an der Gefäßintima induziert, dessen funktionelle Wirksamkeit wiederum durch eine erneute Applikation von Ach (100nMol/L) geprüft wurde. Falls die Ach induzierte Vasodilatation stark abgeschwächt war, wurde dies als Zeichen einer effektiven Endothelschädigung gewertet. Anschließend wurde durch erneute Applikation der bereits genannten TRP-Aktivatoren, deren Gefäßeffekte bestimmt. Die Differenz der Effekte vor und nach Endothelschädigung wurde als die endothelabhängige Komponente der Wirkung dieser Substanzen interpretiert. Zur Beurteilung der maximalen Kontraktionsfähigkeit des Gefäßes wurde die Badlösung durch einen isotonen Puffer ausgetauscht, in dem die Kaliumkonzentration auf 60 mMol/L erhöht war. Zur Beurteilung der maximalen Dilatationsfähigkeit des Gefäßes wurde dem Organbad der NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP, 1 μ Mol/L) beigefügt.

3.2.6 Datenaufzeichnung und -präsentation

Mit dem Programm VesselView 1.0 konnten kontinuierlich Veränderungen im Gefäßdurchmesser registriert und aufgezeichnet werden. Dabei beobachtete Vasodilatationen wurden als Prozentzahlen der maximalen Vasodilatation (Reaktion auf 1 μ Mol/l SNP) angegeben.

3.3 Patch-Clamp-Experimente

3.3.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1978 von den Physiologen Neher u. Sakmann entwickelt. Sie dient der Erfassung von Ionenströmen, die über Zellmembranen fließen. Diese Technik ist eine weit etablierte Methode zur Charakterisierung zellulärer Ionenkanäle in isolierten Zellen oder Zellmembranen. Die Zellen befinden sich dabei in einer Messkammer, die mit Extrazellularpuffer gefüllt ist. In diesem Puffer befindet sich die „Referenzelektrode“. Mit einer anderen Elektrode, der „Messelektrode“, wird über eine Glaskapillare, die mit Intrazellulärpuffer gefüllt ist und an ihrer Spitzenöffnung einen Durchmesser von etwa 1µm aufweist, ein elektrischer Kontakt zur jeweiligen Zelle hergestellt (Neher, Sakmann et al. 1978). Durch Anbringen eines leichten Unterdruckes in der Glaskapillare wird die Zellmembran gegen die Kapillaröffnung angesaugt und der vom Kapillarlumen eingeschlossene Membranfleck (*engl. Patch*) der Zelle wird dadurch gegen den umgebenden Puffer abgedichtet. Die hierbei erreichbaren elektrischen Widerstände liegen im Giga - Ohm Bereich, das Abdichtmanöver wird daher auch als *Gigaseal* bezeichnet. Das *Gigaseal* ist besonders bedeutsam bei der Messung meist kleiner zellulärer Ströme um die Verrauschung durch Leckströme möglichst gering halten zu können. Ionenströme, die am gegriffenen Patch über die Zellmembran fließen, können nun bereits dargestellt werden. Man spricht vom *cell-attached Modus*. Um die Summe der Ströme, die über die gesamte Membran der Zelle fließen, darzustellen, wird entweder über einen kurzen Spannungsimpuls zwischen den beiden Elektroden oder durch kurzzeitigen Unterdruck in der Glaspipette der kontaktierte Fleck in der Zellmembran aufgerissen und somit ein Zugang zum Intrazellularraum hergestellt (*whole-cell Modus*). Spontane bzw. induzierte Änderungen der Ganzzellströme können anhand von Membranpotentialänderungen bei konstanten Strominjektionen (*current clamp Modus*) oder anhand von Kompensationstrominjektionen erfasst werden, die erforderlich sind um das Membranpotential konstant zu halten (*voltage clamp Modus*). Durch definierte Strominjektionen in das Zellinnere kann das Membranpotential der Zellen auch gezielt moduliert werden. So lassen sich z.B. Stromstärke-Spannungskennlinien definierter Membranströme charakterisieren. Weiterhin kann man Informationen über die Permeabilität sowie das Öffnungs- und Schließverhalten der zu Grunde liegenden Ionenkanäle gewinnen. Um ein möglichst

vollständiges Bild über die zellulären Kanalaktivitäten zu gewinnen, können weitreichende Spannungsrampen angelegt werden, um den gesamten physiologischen Membranpotentialbereich einer Zelle zu analysieren. Wie bereits erwähnt, können die beiden Elektroden auch als Spannungssensoren eingesetzt werden, um das Membranpotential der Zelle zu bestimmen.

Alternativ kann vom cell-attached Modus ausgehend der Membranfleck (patch) unter der Kapillaröffnung auch isoliert elektrophysiologisch charakterisiert werden. Hierzu wird dieser Fleck, wie **Abbildung 7** zeigt, mit Hilfe der Messpipette aus der Zellmembran herausgerissen. Die vorher dem Zytoplasma exponierte Seite des Membranfleckes befindet sich nun im Extrazellulärpuffer (*inside-out Modus*). Das Öffnungsverhalten von sich im Zellfleck befindenden Ionenkanälen bleibt nun unbeeinflusst von möglichen intrazellulären Signal-Kaskaden.

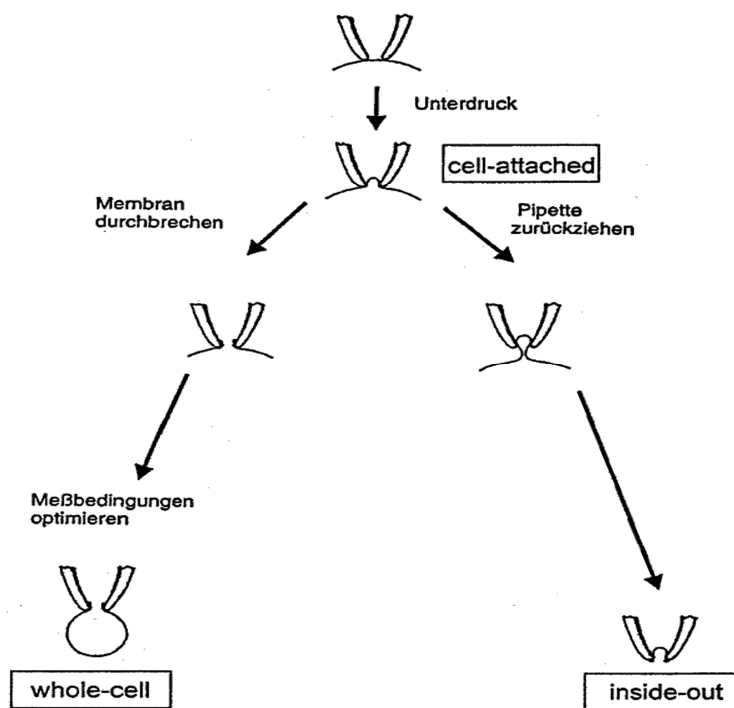


Abbildung 7: Beschreibung der Ausführung bzw. der verschiedenen Modi der Patch-Clamp Technik, erstmals beschrieben von Neher u. Sakmann 1978

3.3.2 Isolation und Kurzzeitprimärkultur von Endothelzellen

Für die Endothelzellisolation wurden die entnommenen Mauscarotiden mit Hilfe von Fäden mit einer Öffnungsseite auf spezielle Kapillaren aufgezogen. Die Badlösung bestand aus calciumfreiem PBS. Die Glaskapillaren selbst waren mit einem Puffer aus calciumfreier PBS Lösung gefüllt, welche mit 0.5% Trypsin und 0.02% EGTA supplementiert war. Über ein Schlauchsystem konnte der Druck innerhalb der Kapillare variiert werden. Durch leichte Druckerhöhung wurden im Gefäß verbliebene Blutreste ausgespült. Schließlich wurden die Carotiden an ihrem freien Ende zugeknotet und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Carotiden in eine mit DMEM-Medium gefüllte Petri-Schale überführt, in welche kleine Glasplättchen ausgelegt waren. In der Petrischale wurde das Gefäß mit speziellen Mikropräparationsscheren in longitudinaler Richtung aufgeschnitten und die Zellen der luminalen Seite mit einer feinen Pinzette abgeschabt. Gewebs- und Fadenreste wurden vollständig aus dem Puffer entfernt.

Um die isolierten Endothelzellen auf den Glasplättchen anhaften zu lassen, wurden die Petrischalen für mindestens 1 Stunde in einem Gewebebrutschrank bei 5% CO₂ in Raumluft bei 37 Grad inkubiert. Alle Experimente mit isolierten Endothelzellen wurden innerhalb von 1-4 Stunden nach Isolation der Zellen durchgeführt.

3.3.3 Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente

Tabelle 2: Badlösung mit Calcium

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in mmol/l</i>
NaCl	137
MgCl ₂	0,4
CaCl ₂	0,7
Glucose	10
NaH ₂ PO ₄	4,5
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	3
pH-Wert (mit NaOH justiert)	7,4

Tabelle 3: Badlösung ohne Calcium u. Magnesium

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in mmol/l</i>
NaCl	137
EGTA	10
Glucose	10
NaH ₂ PO ₄	4,5
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	3
pH-Wert (mit NaOH justiert)	7,4

Tabelle 4: Pipettenlösung mit 0,1 µMol/l freiem Calcium

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in mmol/l</i>
KCl	140
MgCl ₂	1
EGTA	2
CaCl ₂	0,72
Na ₂ ATP	1
HEPES	5
pH-Wert (mit KOH justiert)	7,2

Die Berechnung der freien Kalziumkonzentrationen erfolgte nach Fabiato & Fabiato (1979) unter Nutzung der Software: *WEBMAXC STANDARD* (<http://maxchelator.stanford.edu/maxc.html>).

3.3.4 Der Patch-Clamp-Messstand

Für Patch-Clamp-Experimente befindet sich der gesamte Versuchsaufbau in einem aus Kupferdraht angefertigten Käfig zur Abschirmung elektrischer Störungen aus der Umgebung. Sämtliche metallische Komponenten innerhalb des Käfigs werden über niederohmige Kabel an einer gemeinsamen Stelle geerdet. Weiterhin dient ein schwingungsgedämpfter Tisch der Neutralisation mechanischer Erschütterungen, welche die Experimente beeinflussen bzw. unterbrechen könnten. Die Messkammer selbst befindet sich in der Objektträgerhalterung im Strahlengang eines invertierten Lichtmikroskops. So kann eine beliebige Zelle unter mikroskopischer Kontrolle

ausgewählt und anvisiert werden. Grundsätzlich wurden ausschließlich auf Glasplättchen adhärente und dem Anschein nach intakte Zellen für die Messungen verwendet. Mithilfe elektrischer Mikromanipulation kann die Messelektrode in sämtliche Richtungen bewegt werden. Referenz- und Messelektrode bestehen aus ca. 0.1 mm starkem Silberdraht, der zur besseren Leitfähigkeit durch Anlegen einer Spannung von 9V in 150 millimolarer KCl-Lösung chloriert wurde. Unter- bzw. Überdruck in der Messglaskapillare wurden mit Hilfe eines Schlauchsystems über eine manuell bediente Glasspritze reguliert.

Zur Verstärkung der elektrischen Signale wurde ein EPC 9 Patch-Clamp-Verstärker benutzt. Zur Darstellung und Auswertung der Ströme auf dem Computermonitor diente das Programm Pulse bzw. Pulsefit.

3.3.5 Der Versuchsablauf der Patch-Clamp-Messungen

Patch-Clamp-Experimente wurden sowohl an Zellen der A7R5-Zelllinie, sowie an frisch isolierten Carotis Endothelzellen der Maus durchgeführt. Die A7R5 Zellen wurden zunächst in DMEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 2% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Sie mussten für die Versuche aus den Kulturflaschen in, mit Glasplättchen (Größe, etwa 4 x 4mm) ausgelegte, 30-mm-Petrischalen überführt werden. Während die frisch isolierten Endothelzellen direkt nach dem Isolationsvorgang auf diesen Glasplättchen ausgesät werden, mussten die Zellen der A7R5-Zelllinie zuerst aus den Zellkulturflaschen herausgelöst werden. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden zunächst mit calciumfreiem PBS gespült. Anschließend wurden sie in calciumfreiem PBS mit 0,5% Trypsin supplementiert und bei 37 Grad für circa 2 Minuten inkubiert. Dabei löste sich der Zellverband in den Zellkulturflaschen auf und die Zellen wurden mit calciumhaltigem DMEM-Medium resuspendiert und wie für die Endothelzellen beschrieben in die Petrischalen ausgesät. Kurz vor der elektrophysiologischen Messung wurde der DMEM-Puffer durch MEM-EARLE-Puffer ausgetauscht. Als Extrazellularpuffer bei der Messung diente eine auf Phosphatpuffer basierende physiologische Lösung mit bzw. ohne Calcium. (**Tabelle 2, 3**). Nach Fokussierung einer intakt erscheinenden Zelle wurde eine Glaskapillare mit Intrazellularpuffer (**Tabelle 4**) gefüllt und auf die Messelektrode gestülpt. Nach Anlegen eines leichten Überdrucks von ca. 5cm Wassersäule auf die Messpipette, um Kontamination mit Extrazellularpuffer zu verhindern, wurde die Elektrode mit

Makromanipulation in die Nähe der Zelle und schließlich mithilfe des Mikromanipulators auf die Zelloberfläche manövriert. Anfängliche Pipettenwiderstände betragen 2 - 4 M Ω . Nach Kontakt mit der Zellmembran wurde der leichte Überdruck aufgehoben und ein leichter Sog auf die Zellmembran ausgeübt. Nach Erreichen des Gigaseals (s.o.) wurde die Zellmembran an der Kontaktstelle eröffnet. Durch Messung der elektrischen Membrankapazität der Zelle, die mit der Oberfläche der Zelle korreliert, konnte die Größe der Zelle abgeschätzt werden. Eventuell aufgetretene Änderungen der Leckeigenschaften des Pipetten-Zell-Kontaktes konnten mithilfe eines Abgleiches verrechnet werden. Während der Messung und insbesondere nach Applikation von Substanzen wurde kein erneuter Abgleich durchgeführt. Anschließend wurde die Zelle mit Spannungsrampen von -140 mV bis +100 mV stimuliert. Die Applikation einer bestimmten Substanz und ihre homogene Verteilung im Versuchsbad erfolgte mithilfe einer 100 μ l Pipette. Die Strom-Spannungs-Kurve wurde durch das Programm Pulse registriert und abschließend mithilfe des Programms Origin® dargestellt.

3.3.6 Datenauswertung

Die Aufzeichnung der Gesamtzellströme erfolgte durch das Programm „Pulse“ (Fa. HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland). Die Messdaten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm „PulseFit“ (ebenfalls HEKA Elektronik). Für die statistische Datenauswertung erfolgte stets die Normierung der Ströme auf die Größe der Zelle. Hierbei wurde der Quotient aus Stromamplitude und Kapazität der Zelle, die mit der Oberfläche korreliert, gebildet. Es ergibt sich die Einheit pA/pF.

3.4 Statistische Analysen

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Analyse wurde mit dem gepaarten t-Test durchgeführt. Ein P-Wert <0.05 wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Experimente am Druckmyographen zu TRPM8 und TRPA1

Um die funktionelle Bedeutung von TRPM8 sowie TRPA1 für die Regulation des Gefäßtonus zu untersuchen, wurden zunächst Experimente im Druckmyographen an der isolierten Arteria carotis communis der Maus durchgeführt. Nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin ($1\mu\text{Mol/L}$) wurden die Testsubstanzen in aufsteigender Konzentration intraluminal appliziert. Dabei auftretende Änderungen im Gefäßdurchmesser wurden kontinuierlich aufgezeichnet und wurden relativ (in %) zur maximalen Dilatation angegeben, welche durch Gabe von Natriumnitroprussid (SNP, $1\mu\text{Mol/L}$) in die Badlösung erzielt wurde.

4.1.1 Wirkung von Icilin

Icilin ist als TRPM8-Agonist beschrieben (Andersson, Chase et al. 2004; Rawls, Gomez et al. 2007) und wurde daher auf vasodilatierende Effekte geprüft. Die Substanz wurde nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe ($10\mu\text{Mol/L}$ – $50\mu\text{Mol/L}$ – $100\mu\text{Mol/L}$) der Gefäßperfusionslösung zugegeben. Es wurde bei jeder Konzentration für 5 Minuten perfundiert. Icilin induzierte robuste Vasodilatationen, die mit einer Latenzzeit von ca. 60 Sekunden Perfusionszeit einsetzten (**Abbildung 8**). Diese Dilatation war durch Auswaschen der Substanz innerhalb von 5 Minuten reversibel und durch erneute Applikation der gleichen Dosis reproduzierbar (**Abbildung 8**). Icilin hatte in einer Konzentration von $50\mu\text{Mol/L}$ eine vergleichbare vasodilatorische Wirkung wie 100 nMol/L Acetylcholin, einem etablierten endothelabhängigen Vasodilatator (**Abbildung 8**).

Die Auswertung aller Experimente zeigte, dass die Wirkung von Icilin deutlich konzentrationsabhängig war und bei einer Konzentration von $100\mu\text{Mol/L}$ eine Wirkung entfaltete, die etwa 60% der Wirksamkeit von Natriumnitroprussid entsprach (**Abbildung 9**).

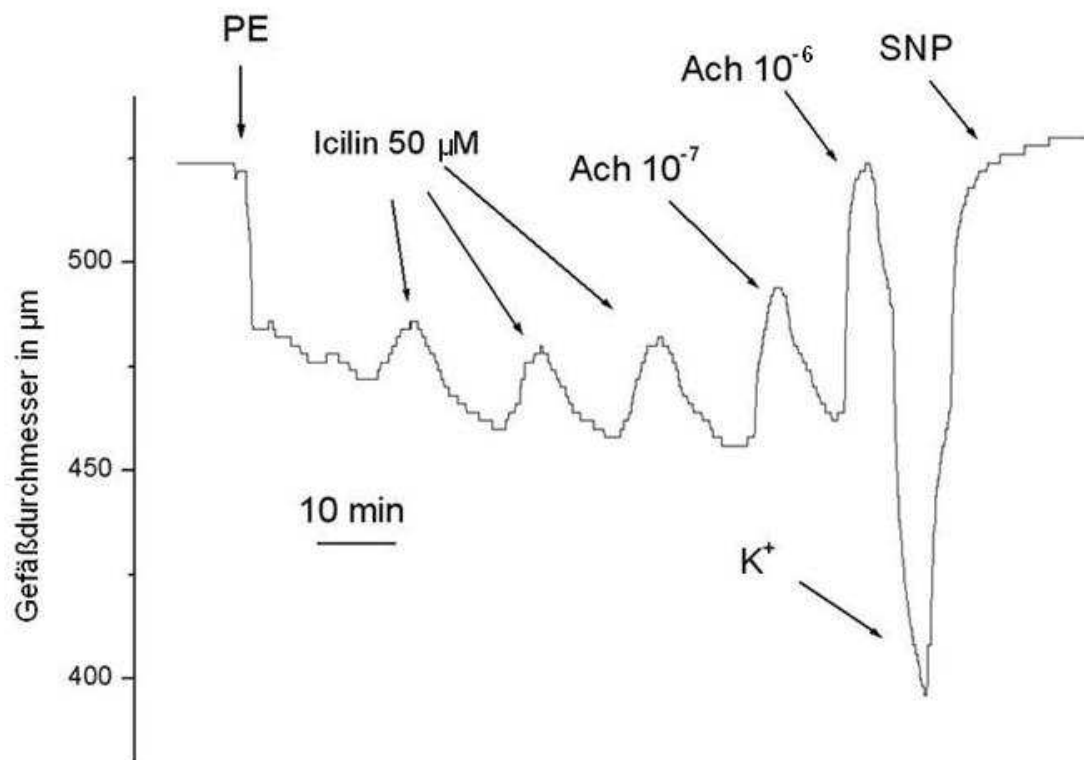


Abbildung 8: Gefäßdurchmesser einer isoliert perfundierten Arteria carotis der Maus (Perfusionsdruck 80mm Hg) nach Zugabe von Phenylephrin (1µMol/L), Icilin (50µMol/L), Acetylcholin (100nMol/L) und Nitroprussidnatrium (SNP, 1µMol/L) sowie nach isoosmolarer Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Badlösung auf 60 mMol/L (KCl). Icilin induzierte eine reversible und nicht adaptierende Vasodilatation. Im Vergleich sind die dilatorischen Wirkungen von Acetylcholin und Nitroprussidnatrium sowie die konstriktorische Wirkung einer Kaliumdepolarisation (60mMol/L) dargestellt.

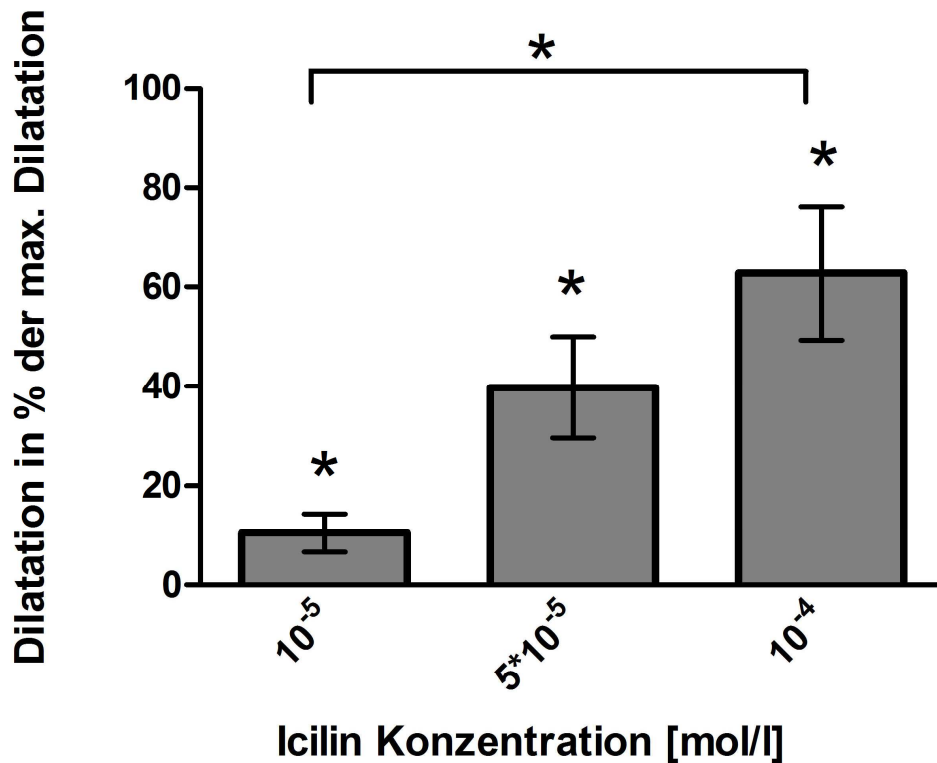


Abbildung 9: Konzentrationsabhängigkeit der Icilin-induzierten Vasodilatation. Die Dilatationen sind als %-Werte der maximalen Dilatation angegeben, welche mit Nitroprussidnatrium erzielt wurde. Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (n=4) dargestellt. *p<0.05

4.1.2 Wirkung von Menthol

Als nächstes wurde Menthol als weiterer TRPM8 Agonist in aufsteigender Konzentrationsreihe (2µMol/L – 20µMol/L – 100µMol/L – 200µMol/L) intraluminal appliziert. Auch mit Menthol wurde eine Perfusionsdauer von stets 5 Minuten eingehalten. Mit Menthol wurde ab einer Konzentration von 20µMol/L ebenfalls eine dosisabhängige Vasodilatation beobachtet (**Abbildung 10**). Mit dem Auswaschen der Substanz ging der Gefäßdurchmesser auf initiale Werte zurück. Die Menthol induzierten Vasodilatationen waren ebenfalls reversibel und zeigten keine Ermüdbarkeit. Die maximalen Antworten dabei waren von geringerem Ausmaß als die durch Icilin induzierten. So wurde mit einer Menthol-Konzentration von

200 μ Mol/L nur etwa 16% der SNP induzierten Dilatation erzielt (**Abbildung 10**). Auch war die Latenzzeit, die bis zum Einsetzen der ersten Gefäßreaktionen verstrich, mit ca. 100 Sekunden etwas länger als die mit Icilin beobachtete.

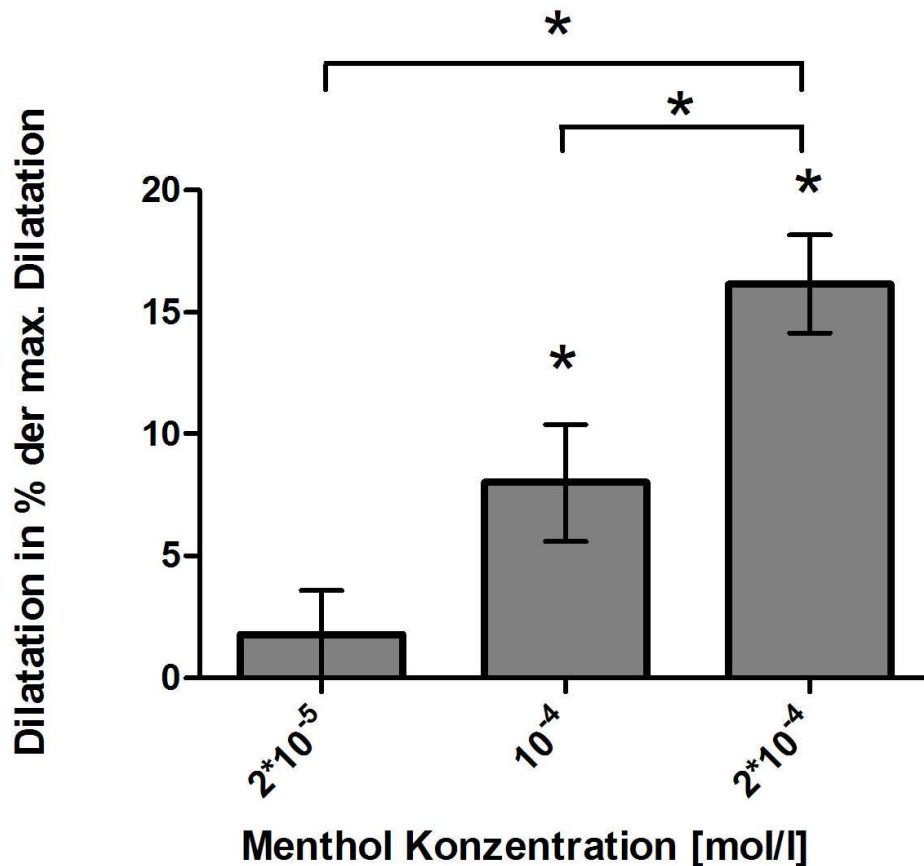


Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der menthol-induzierten Vasodilatation. Die Dilatationen sind als %-Werte der maximalen Dilatation angegeben, welche mit Nitroprussidnatrium erzielt wurde. Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (n=6) dargestellt. * p<0.05

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit die durch Menthol induzierte Vasodilatation endothelvermittelt ist. Dazu wurde durch intraluminale Luftapplikation ein mechanischer Schaden am Endothel gesetzt. Das Ausmaß der endothelialen Funktionsschädigung wurde mit Acetylcholin überprüft, welches bekanntermaßen eine endothelvermittelte Vasodilatation hervorruft. Dazu wurde die vasodilatorische Wirkung von Acetylcholin in einer Konzentration von 1 μ Mol/L zunächst vor und dann nach Luftapplikation überprüft. Wie **Abbildung 11 (rechts)**

darstellt, wurde durch diese Art der Endothelschädigung die vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin um 85% reduziert. Die vasodilatierende Wirkung von Menthol wurde durch die Endothelschädigung allerdings nur recht moderat von 18% des SNP induzierten Effektes auf 13% vermindert (**Abbildung 11, links**).

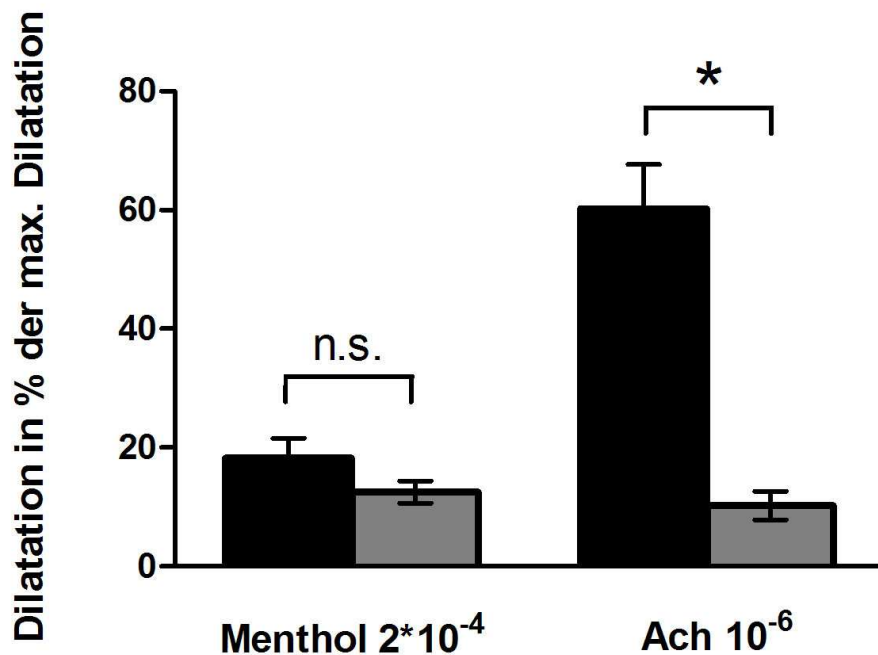


Abbildung 11:

Links:

Gefäßantworten auf Menthol 2*10⁻⁴ Mol/L vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) Endotheldenenudierung.

Rechts:

Gefäßantworten auf Acetylcholin 10⁻⁶ Mol/L vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) Endotheldenenudierung.

Die Dilatationen sind als %-Werte der maximalen Dilatation angegeben, welche mit Natriumnitroprussid erzielt wurde. Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (n=4) dargestellt. * p<0.05

4.1.3 Wirkung von AITC

Allylisothiocyanat (AITC) wird bislang als selektiver Agonist für TRPA1 – Kanäle betrachtet. In dieser Arbeit wurde deshalb die Wirkung von AITC auf die Gefäßdilatation untersucht. Dazu wurde AITC in aufsteigender Konzentration (10µMol/L – 50µMol/L – 100µMol/L) intraluminal appliziert. Ab einer Konzentration von 50µMol/L trat eine konzentrationsabhängige Vasodilatation auf (**Abbildung 12**). Erste Effekte dieser Dilatation konnten frühestens nach ca. 150 Sekunden beobachtet werden. Der Prozess setzte sich noch wenige Minuten nach Auswaschen der Substanz bis zum Erreichen einer Plateauphase fort (**Abbildung 13**). Der Effekt erreichte bei einer Konzentration von 100µM etwa 15% des SNP induzierten Effektes (**Abbildung 12, 13**). Im Gegensatz zu den Gefäßreaktionen, die durch Icilin und Menthol ausgelöst wurden, war dieser Effekt auch nach dreiminütigem Auswaschvorgang nicht reversibel. Es wurde immer beginnend mit 50µMol/l AITC stimuliert. Somit handelt es sich bei den Dilatationen durch 100µMol/L um den Effekt, der nach Vordilatation mit 50µMol/L AITC noch zusätzlich ausgelöst werden konnte. Auch nach mechanischer Schädigung des Endothels mit Luft war die durch AITC induzierte Vasodilatation unverändert (**Abbildung 14**). Ausmaß und Kinetik der Dilatation unterschieden sich dabei kaum vom Vorgang mit intaktem Endothel.

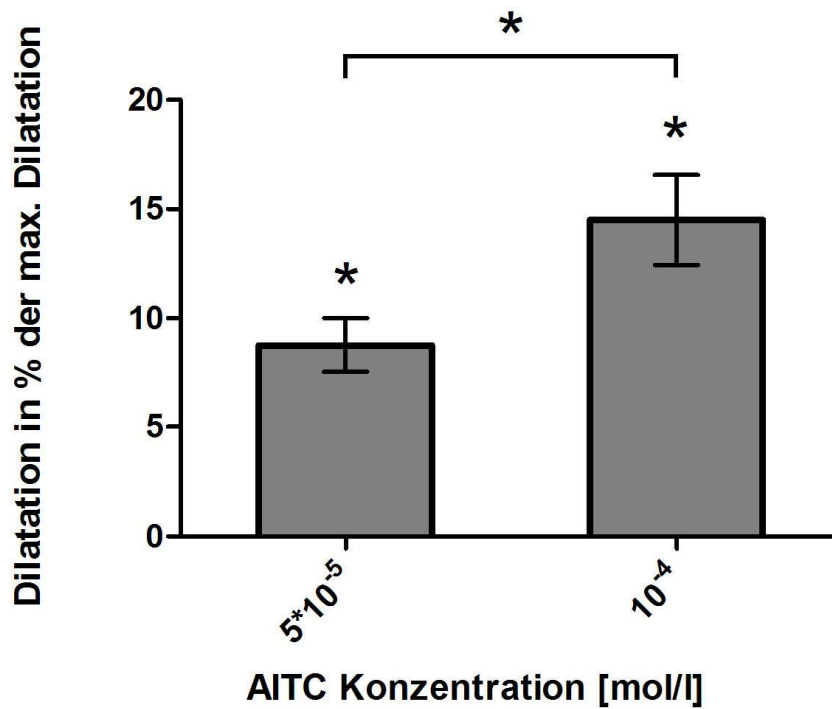


Abbildung 12: Konzentrationabhängigkeit der vasodilatorischen Wirkung von AITC. Die Dilatationen sind als %-Werte der maximalen Dilatation angegeben, welche mit Nitroprussidnatrium erzielt wurde. Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (n=4) dargestellt. * p<0.05

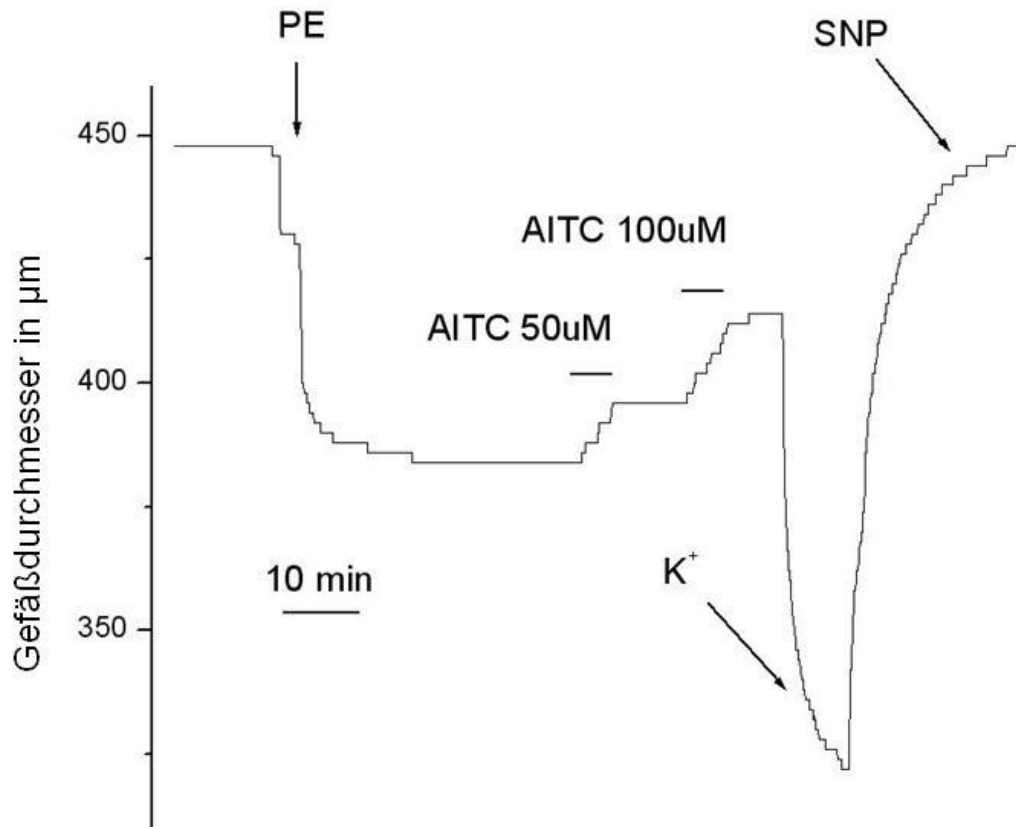


Abbildung 13: Gefäßdurchmesser einer isoliert perfundierten Arteria carotis der Maus (Perfusionsdruck 80mm Hg) nach Zugabe von Phenylephrin (PE, 1µMol/L), AITC (50 und 100 µMol/L), und Natriumnitroprussid (SNP, 1µMol/L) sowie nach isoosmolarer Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Badlösung auf 60 mMol/L (KCl). AITC induziert eine nicht reversible und nicht adaptierende Vasodilatation.

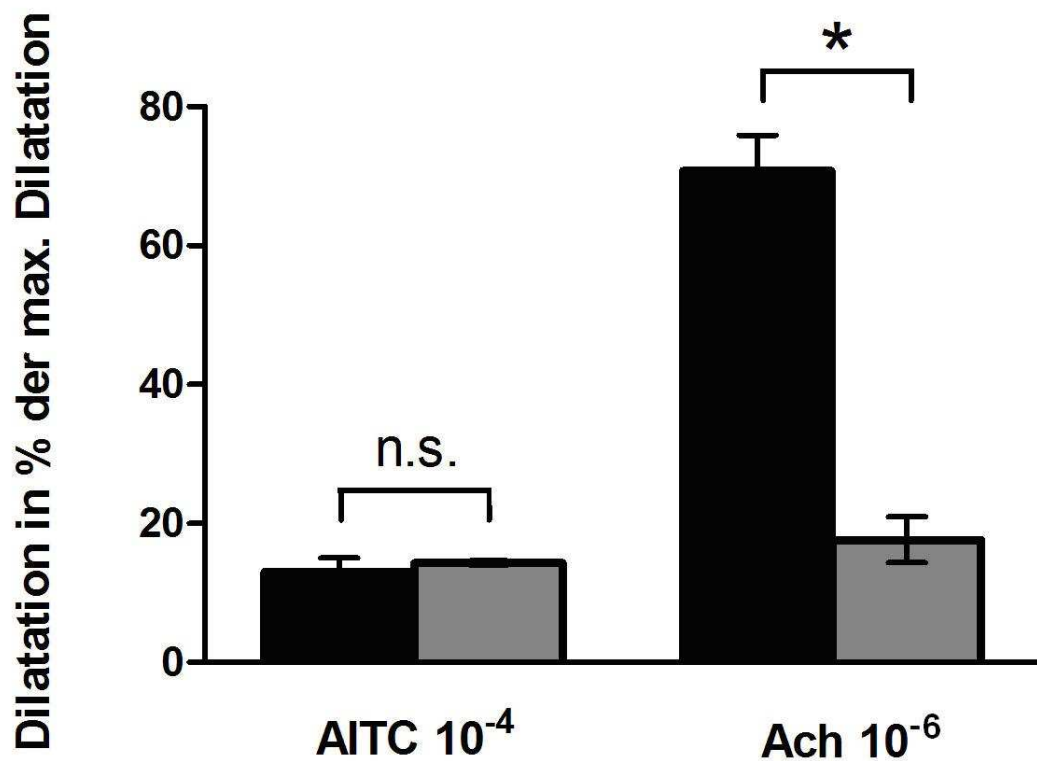


Abbildung 14:

Links:

Gefäßantworten auf AITC $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/L vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) Endotheldenuerung.

Rechts:

Gefäßantworten auf Acetylcholin 10^{-6} Mol/L vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) Endotheldenuerung.

Die Dilatationen sind als %-Werte der maximalen Dilatation angegeben, welche mit Nitroprussidnatrium erzielt wurde. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) dargestellt. * $p < 0.05$; n.s.: nicht signifikant

4.2 Patch-Clamp-Experimente zu TRPM8 und TRPA1

Bei den druckmyographischen Experimenten konnte ein Effekt auf den Vasotonus durch die Testsubstanzen beobachtet werden. Um diesen Gewebsreaktionen mögliche Ionenkanalaktivitäten zuzuordnen zu können, wurden Patch-Clamp-Versuche sowohl an kultivierten glatten A7R5 Gefäßmuskelzellen der Ratte als auch an isolierten Endothelzellen der Arteria carotis communis der Maus durchgeführt.

4.2.1 Untersuchungen zu TRPM8 und TRPA1 an A7R5-Zellen

4.2.1.1 Wirkung von Icilin

Bei Stimulierung der Zellen mit Spannungsrampen zeigten diese deutliche basale Einwärtsströme im Bereich von ca. -30mV bis ca. +30mV (**Abbildung 15**). Nach Applikation von Icilin 10 μ Mol/L konnte eine Reduktion der Amplitude dieser Ströme beobachtet werden. Als Referenzwert für die Auswertung diente die Stromamplitude bei 0mV. Applikation von Icilin 10 μ Mol/L führte zu einer Reduktion des Stromes um $44 \pm 8 \%$ (n=5; Mittelwert +/- SEM) (**Abbildung 15**). Die Induktion eines zusätzlichen Stromes konnte nicht beobachtet werden.

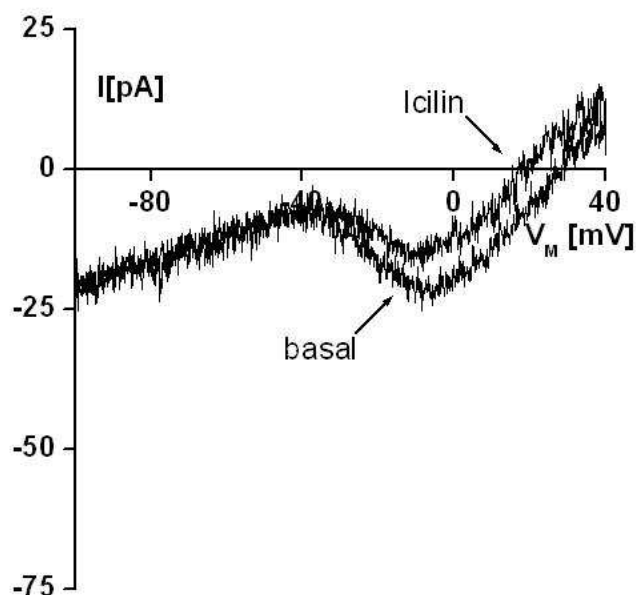


Abbildung 15. Strom-Spannungskurve einer A7R5 Zelle vor und nach Applikation von Icilin 10 μ Mol/l. Der Einwärtsstrom im Potentialbereich zwischen -30 bis + 30 mV wird durch Icilin deutlich reduziert.

4.2.1.2 Wirkung von Menthol

Wie durch Icilin konnte auch durch Menthol eine Reduktion des Einwärtsstromes im Potentialbereich zwischen -30 und +30 mV beobachtet werden (**Abbildung 16**). Durch Konzentrationssteigerung von Menthol (10 μ Mol/L -50 μ Mol/L -100 μ Mol/L) konnte dieser Effekt verstärkt werden (**Abbildung 17**). Bei einer Endkonzentration von Menthol 100 μ Mol/L wurde die Stromamplitude bei 0 mV um $83 \pm 19 \%$ (n=5, Mittelwert +/- SEM) reduziert. Ähnlich zu Icilin führte auch Menthol zu keiner Induktion zusätzlicher Ströme (**Abbildung 18**).

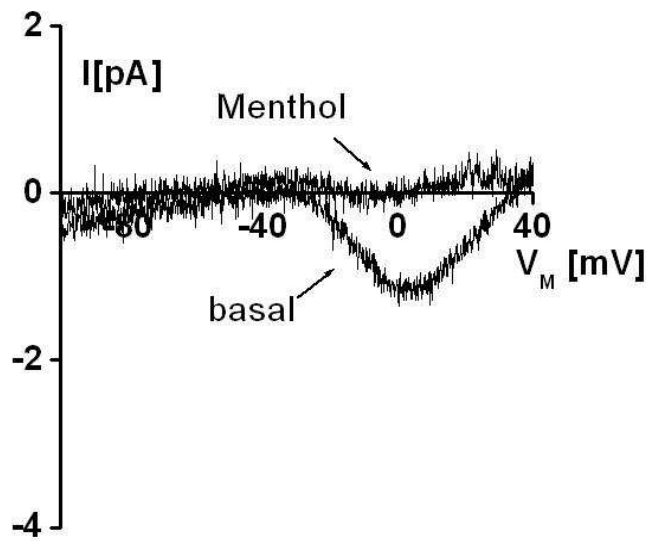


Abbildung 16: Strom-Spannungskurve einer A7R5 Zelle vor und nach Applikation von Menthol 100 μ Mol/l. Der Einwärtsstrom im Potentialbereich zwischen -30 bis + 30 mV wird durch Menthol nahezu aufgehoben.

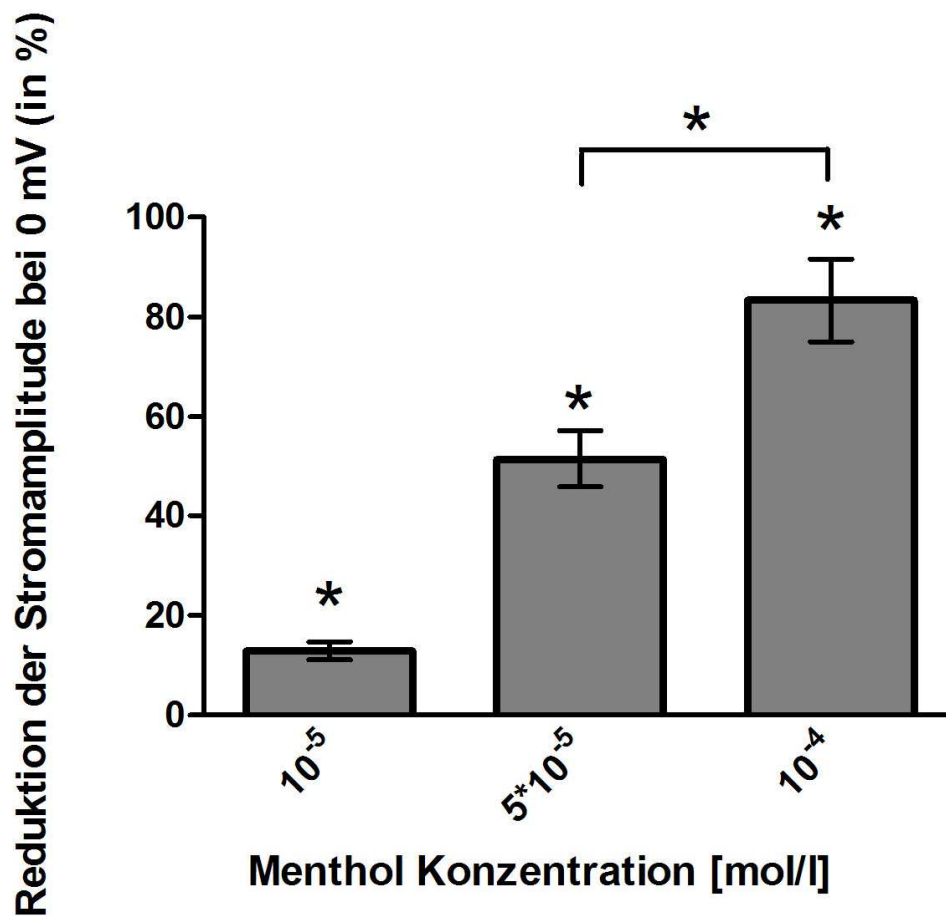


Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion des Einwärtsstromes in A7R5 – Zellen durch Menthol. Werte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (n=5) dargestellt. *p<0.05.

4.2.1.3 Wirkung von AITC

Um eine Beteiligung von TRPA1 bei den Vasodilatationsprozessen zu untersuchen wurden A7R5 – Zellen mit dem spezifischen TRPA1 Aktivator Allylisothiocyanat (AITC) stimuliert. Auch hier konnte eine Reduktion des Einwärtsstroms zwischen -30 und +30 mV beobachtet werden (**Abbildung 18**). Die Applikation von AITC 100 $\mu\text{Mol/L}$ reduzierte die Einwärtsstromamplitude bei 0 mV um $71 \pm 21 \%$ (n=5). Auch bei diesen Experimenten konnte ebenfalls keine Aktivierung anderer Ströme beobachtet werden.

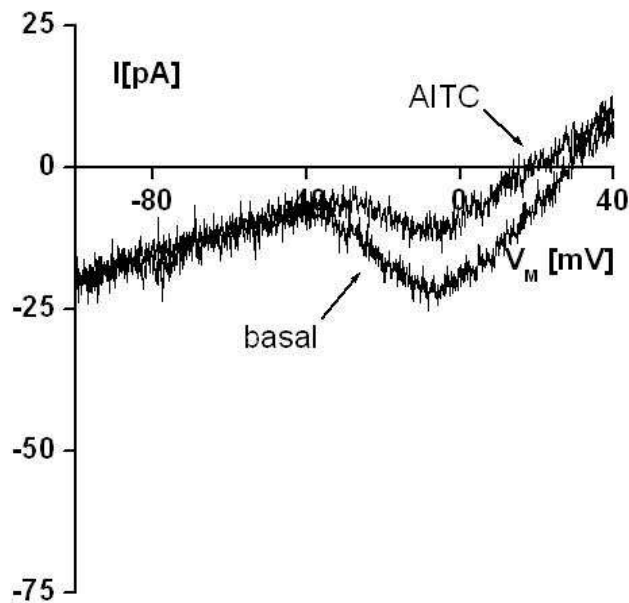


Abbildung 18: Strom-Spannungskurve einer A7R5 Zelle vor und nach Applikation von AITC 100 μ Mol/l. Der Einwärtsstrom im Potentialbereich zwischen -30 bis + 30 mV wird durch AITC deutlich reduziert.

4.2.2 Untersuchungen zu TRPM8 und TRPA1 an isolierten Endothelzellen der Maus

Um eine mögliche Beteiligung von TRPM8 bzw. TRPA1 bei einer allfälligen endothelvermittelten Vasodilatation zu untersuchen, wurden im Folgenden Patch-Clamp-Experimente an isolierten Endothelzellen der Arteria carotis communis der Maus durchgeführt.

4.2.2.1 Wirkung von Icilin

Um gegebenenfalls endothelial exprimierte TRPM8 – Kanäle zu aktivieren, wurden die Endothelzellen zunächst mit Icilin 10 μ Mol/L behandelt. Hierbei konnte allerdings weder eine Aktivierung zusätzlicher Ströme, noch eine Modulation des Basalstroms beobachtet werden (**Abbildung 19**).

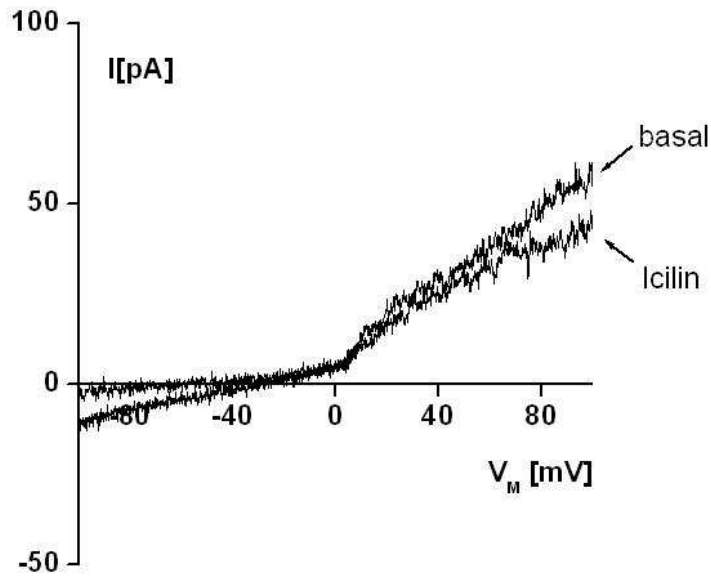


Abbildung 19: Strom-Spannungskurve einer isolierten Endothelzelle aus der Arteria carotis communis der Maus vor und nach Applikation von Icilin $10\mu\text{Mol/l}$.

4.2.2.2 Wirkung von Menthol

Um eine endotheliale Beteiligung von TRPM8 bei der menthol-induzierten Vasodilatationen weiter abzuklären, wurden die Endothelzellen mit Menthol $100\mu\text{Mol/L}$ inkubiert. Menthol induzierte einen starken nichtgleichrichtenden Strom mit einem Umkehrpotential von -80mV (Abbildung 20).

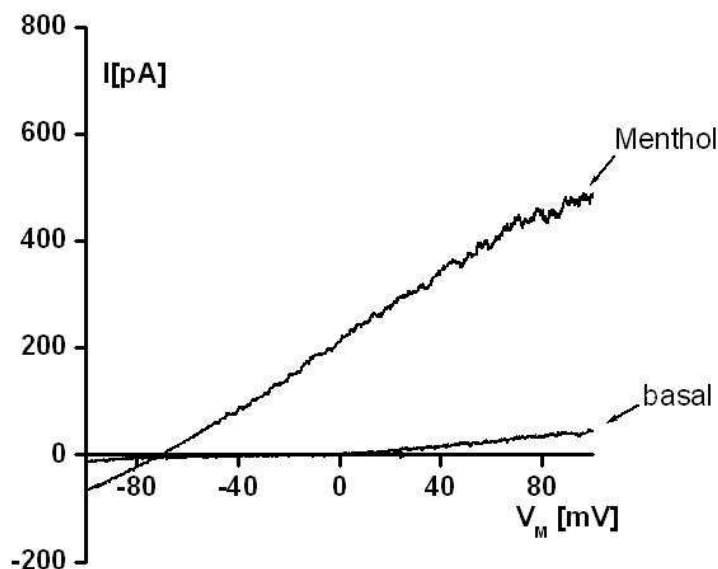


Abbildung 20: Strom-Spannungskurve einer isolierten Endothelzelle aus der Arteria carotis communis der Maus vor und nach Applikation von Menthol (100

$\mu\text{Mol/L}$). Menthol induziert einen starken nichtgleichrichtenden Strom mit einem Umkehrpotential von -80 mV .

Diese Ströme entwickelten sich mit einer Latenz von ca. 20 Sekunden nach Zugabe von Menthol und waren in der Regel transient d.h. sie verschwanden nach ca. 100 Sekunden trotz Persistenz von Menthol im Bad und ohne die Zugabe weiterer Substanzen (**Abbildung 21**). Um zu überprüfen inwieweit der durch Menthol induzierte Strom entweder direkt oder indirekt an einen transmembranären Calciumeinstrom gekoppelt ist, wurden Experimente in calciumfreier Extrazellulärflüssigkeit (Badlösung) durchgeführt. Hierzu wurde ein nominell calciumfreier Puffer noch zusätzlich mit 10mMol/L EGTA versetzt. Auch unter diesen calciumfreien Bedingungen konnte eine Aktivierung ähnlicher Ströme durch Menthol $100\ \mu\text{Mol/L}$ beobachtet werden (**Abbildung 21**). Diese Ströme waren in ihrer maximalen Amplitude allerdings im Mittel nur halb so groß wie in der calciumhaltigen Badlösung (**Abbildung 21, 22**).

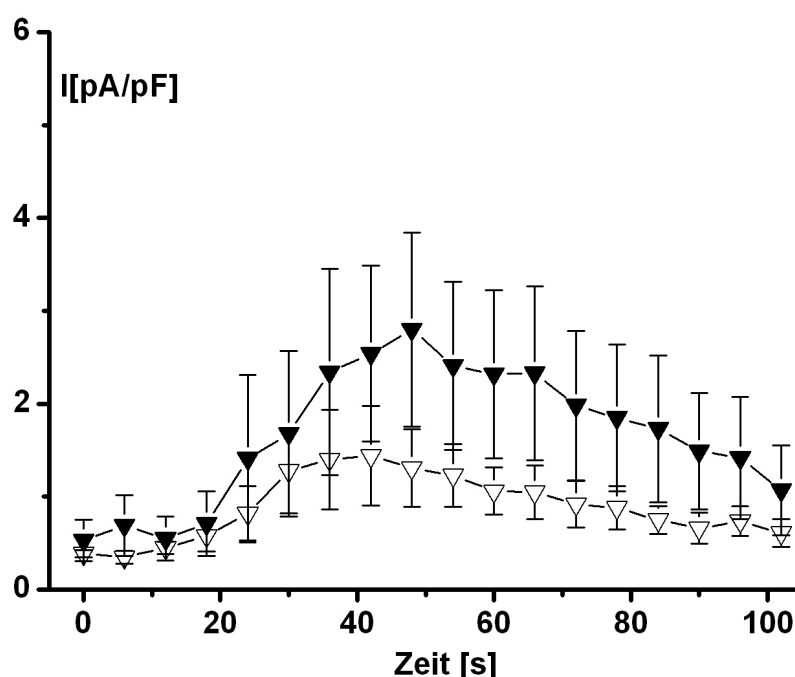


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Stromamplitude bei 0mV , die durch Menthol ($100\ \mu\text{M}$) induziert wurde. Die gefüllten Symbole bezeichnen die Experimente mit normalem calciumhaltigem Extrazellulärpuffer, die offenen Symbole Experimente mit calciumfreiem Extrazellulärpuffer. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM ($n=4$) angegeben.

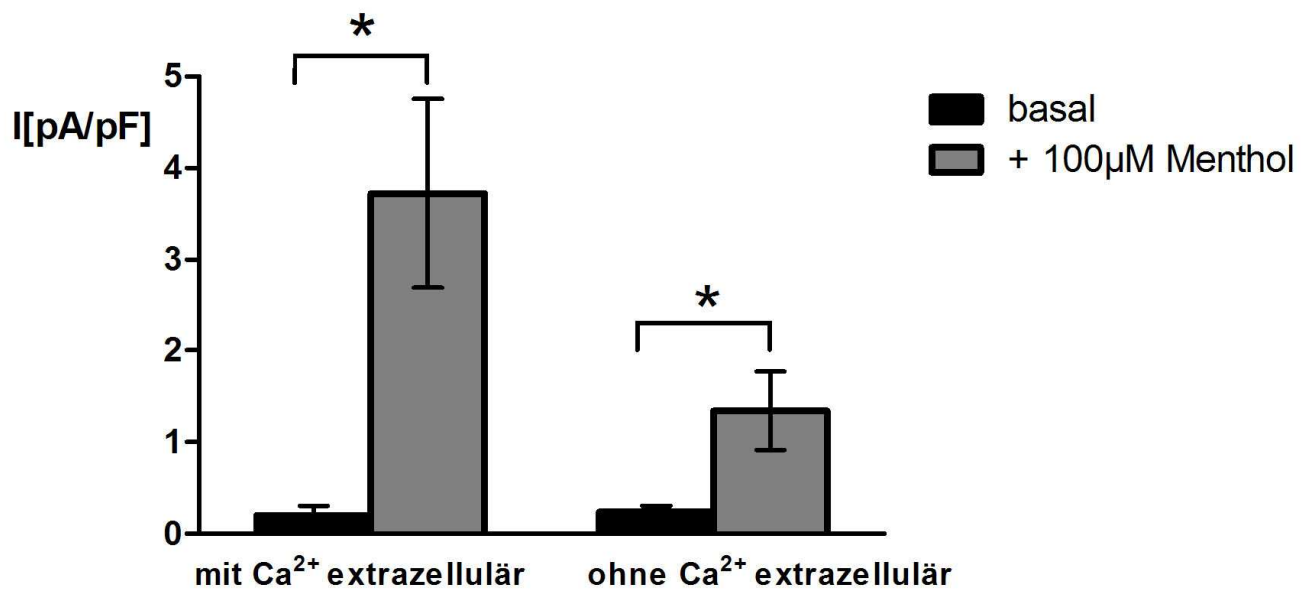


Abbildung 22:

Links

Kapazitätsnormierte Stromamplituden isolierter Endothelzellen bei 0 mV vor (schwarzer Balken) und nach Applikation (grauer Balken) von Menthol (100 µMol/L) bei normaler extrazellulärer Calciumkonzentration.

Rechts

Kapazitätsnormierte Stromamplituden isolierter Endothelzellen bei 0 mV vor (schwarzer Balken) und nach Applikation (grauer Balken) von Menthol (100 µMol/L) in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium.

Werte sind als Mittelwerte +/- SEM (n=5) dargestellt. * p<0.05

Um zu untersuchen, ob diese durch Menthol induzierten Ströme Änderungen im Membranpotential der Endothelzelle hervorrufen, wurde in der Patch-Clamp-Konfiguration in den Current-clamp-Modus gewechselt. Das Ruhemembranpotential wurde damit zu ca. -5 mV gemessen. Menthol induzierte deutliche Hyperpolarisationen von ca. 25mV (**Abbildung 23**). Entsprechend der verzögerten Stromentwicklung nach Applikation von Menthol setzte auch die Hyperpolarisation mit einer Verzögerung von ca. 20 Sekunden ein. Die Hyperpolarisation war

biphasisch, mit einer raschen Phase einer maximalen Hyperpolarisation, die von einer langsameren Phase der Repolarisation gefolgt wurde.

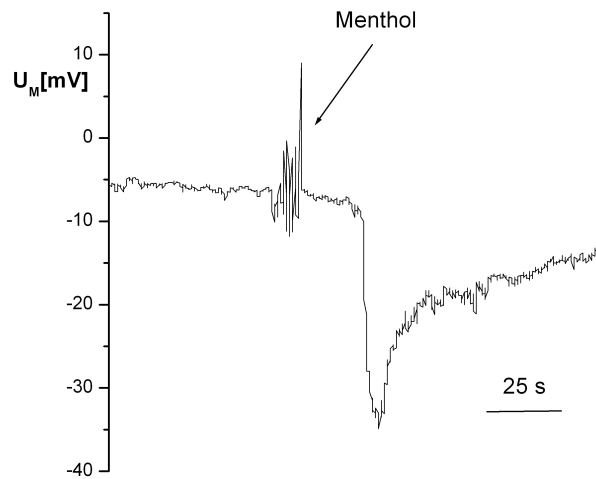


Abbildung 23: Verlauf des Membranpotentials einer isolierten Endothelzelle nach Applikation von 100 μ Mol/L Menthol

Auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium induzierte Menthol (100 μ Mol/L) eine deutliche transiente Hyperpolarisation von ca. 20mV (**Abbildung 24**).

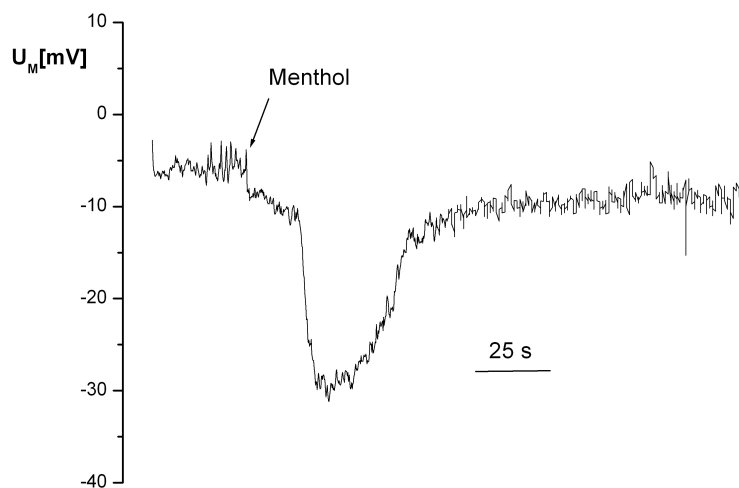


Abbildung 24: Verlauf des Membranpotentials einer isolierten Endothelzelle nach Applikation von 100 μ Mol/L Menthol in Abwesenheit von extrazellulärem

Calcium. Die Badlösung war nominell calciumfrei und enthielt zusätzlich 10 mMol/l EGTA.

Auch diese Hyperpolarisationen gingen spontan zurück und so wurde meist nach einer Zeit von 80 Sekunden das anfängliche Membranpotential wieder erreicht.

4.2.2.3 Wirkung von AITC

Um die mögliche Funktion von TRPA1 in Endothelzellen zu untersuchen, wurden isolierte Endothelzellen der Arteria carotis communis der Maus mit AITC 100 μ M inkubiert. AITC führte allerdings zu keinen Veränderungen der Membranströme in den Endothelzellen (**Abbildung 25**).

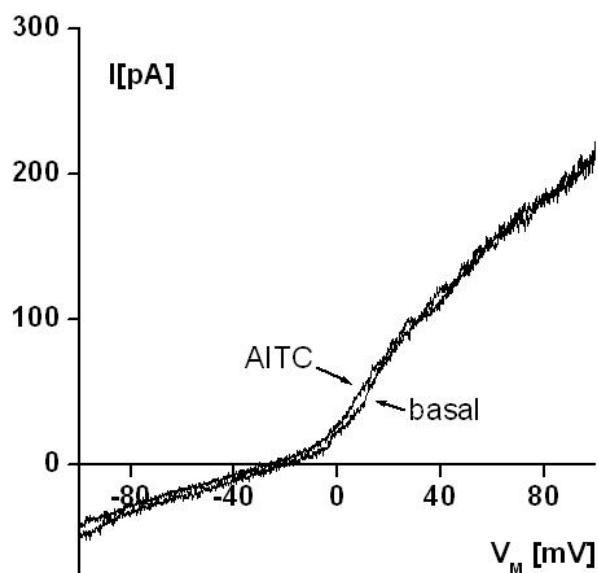


Abbildung 25: Strom-Spannungskurve einer isolierten Endothelzelle aus der Arteria carotis communis der Maus vor und nach Applikation von AITC (100 μ Mol/L). AITC zeigte keinen Einfluss auf die Membranströme.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung von TRPM8 bzw. TRPA1 Kanälen bei der Modulation des Gefäßtonus untersucht. Bisher ist bekannt, dass Kanäle vom TRP-Typ sowohl endothelvermittelt wie auch direkt in der glatten Gefäßmuskulatur den Gefäßtonus mitbestimmen können (Di and Malik ; Yao and Garland 2005; Kwan, Huang et al. 2007). Aktivierung oder Blockade dieser Kanäle führt zu entsprechenden Veränderungen des Gefäßdurchmessers, was von hoher (patho)physiologischer Relevanz für die Blutdruckregulation sein könnte. Während der Durchführung, der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente, wurde durch andere Arbeitsgruppen publiziert, dass chemische Substanzen, welche als Aktivatoren von TRPA1 und TRPM8 betrachtet werden, tatsächlich den Gefäßtonus in vitro beeinflussen können. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass TRPA1-Aktivatoren eine endothelvermittelte Vasodilatation induzieren (Earley, Gonzales et al. 2009), während Aktivatoren von TRPM8 zu einer eher endothelunabhängigen Vasodilatation führen (Johnson, Melanaphy et al. 2009). In diesen Arbeiten wurde die Existenz von TRPA1- und TRPM8 mRNAs in Zellen der Gefäßwand nachgewiesen, nicht aber die Existenz der entsprechenden Proteine, noch entsprechende Kanalfunktionen. Der funktionelle Hinweis auf eine Rolle dieser Kanäle für die Vasodilatation wurde lediglich aus pharmakologischen Experimenten mit den Agonisten Icilin und Menthol für TRPM8, sowie Allylisothiocyanat für TPRA1 gezogen. Ziel dieser Dissertation war es deshalb zunächst zum einen die beschriebenen vasodilatierenden Effekte dieser Substanzen zu validieren und anschließend die Effekte dieser Agonisten für TRPM8 und TRPA1 auf die elektrischen Eigenschaften von glatten Gefäßmuskelzellen und Gefäßendothelzellen zu charakterisieren.

5.1 Myographische Messungen zu TRPM8

Um die Beteiligung von TRPM8 für den Gefäßtonus zu untersuchen, wurden die Arteriae carotis communis mit unterschiedlichen Konzentrationen der bekannten Agonisten Icilin und Menthol perfundiert. Hierbei konnten in der Tat die bereits beschriebene vasodilatatorische Wirkung dieser Substanzen bestätigt werden (Johnson, Melanaphy et al. 2009). Auch konnte bestätigt werden, dass es sich dabei weitgehend um einen endothelunabhängigen, d.h. direkten Effekt auf die glatte Gefäßmuskelzelle handelt (Johnson, Melanaphy et al. 2009). Der

Konzentrationsbereich und die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Icilin und Menthol wären dabei durchaus kompatibel mit einem Effekt auf den TRPM8 Kanal, der durch Icilin mit EC_{50} -Werten zwischen $1,4\mu\text{Mol/L}$ und $29,1\mu\text{Mol/L}$ und durch Menthol zwischen $10,4\mu\text{Mol/L}$ und $80\mu\text{Mol/L}$ aktiviert wird (McKemy, Neuhausser et al. 2002; Chuang, Neuhausser et al. 2004; Bodding, Wissenbach et al. 2007). Auch die Beobachtung, dass bei gleicher Dosis die Gefäßdilatation nach Applikation von Icilin etwa fünfmal so stark war wie die für Menthol, würde zu der Vorstellung passen, dass die Vasodilatation durch Icilin und Menthol durch TRMP8-Kanäle vermittelt wird. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente mit etablierten TRPM8 Blockern, wie Capsazepin (Behrendt, Germann et al. 2004) durchgeführt. Da Capsazepin alleine bereits deutliche vasodilatierende Wirkungen ausübte, waren die Kombinationseffekte allerdings nicht mehr aussagekräftig. So wurden die Untersuchungen mit Capsazepin nicht mehr systematisch weitergeführt und daher in dieser Arbeit auch nicht dargestellt. Nach mechanischer Zerstörung des Endothels konnte durch Applikation von Menthol ein nur unwesentlich verringerter Effekt beobachtet werden. Eine logische Schwierigkeit in der Erklärung eines vasodilatierenden Effektes von TRPM8 liegt allerdings darin, dass die Aktivierung glattmuskulärer calciumpermeabler Kanäle wie TRPM8 in den Muskelzellen eigentlich eher kontraktionsverstärkend wirken sollte. Denkbar wäre allerdings, dass es TRP-Kanäle gibt, die in der Membran der glatten Gefäßmuskelzellen funktionelle Komplexe mit Kalium-Kanälen, wie dem Gardos-Kanal, dem $K_{Ca}1.1$ bilden. Ein Calciumeinstrom durch diese Kanäle würde dann zu lokalen Calciumkonzentrationserhöhungen am Gardos-Kanal führen, deren weitere Ausbreitung durch intrazelluläre Calcium-Puffersysteme um diesen Komplex herum limitiert werden könnte. Somit könnte die zytosolische Calciumkonzentration nahezu konstant bleiben, während die lokale Erhöhung der Calciumkonzentration ausreichen könnte um den calciumaktivierten Gardos-Kanal zu stimulieren. Dessen Aktivierung würde zu einem Kaliumausstrom, einer Membranhyperpolarisation und in Folge zur Relaxation der Gefäßmuskelzelle führen.

5.2 Myographische Messungen zu TRPA1

Mithilfe des selektiven TRPA1-Agonisten Allylisothiocyanat (AITC) sollte die Modulation des Gefäßtonus durch Aktivierung von TPRA1 untersucht werden. Durch

Applikation von AITC zum Perfusat kam es ab Konzentrationen von $50\mu\text{Mol/L}$ zu konzentrationsabhängigen Vasodilatationen in den isolierten Carotiden. Auch hierbei wurde, um endothelunabhängige Vorgänge zu untersuchen, das Endothel mechanisch inaktiviert. Die vasodilatierende Wirkung von AITC wurde allerdings durch die Endothelschädigung nur wenig beeinflusst, was damit für eine direkte glattmuskuläre Wirkung von AITC spricht. Diese Befunde und Schlussfolgerungen widersprechen allerdings der kürzlich von Earley et al. publizierten Arbeit (Earley, Gonzales et al. 2009). In dieser Arbeit wird eine ausschließlich endothelvermittelte Vasodilatation durch AITC in Hirnarterien der Ratte beschrieben. In der Vermittlung dieser Vasoreaktion wird die Beteiligung von endothelialen calciumaktivierten Kalium-Kanälen vermutet, in erster Linie dem $K_{\text{Ca}2.3/\text{SK}}$ -Kanal. Dessen Aktivierung sollte zur Hyperpolarisation der Endothelzelle und der Gefäßmuskulatur über den EDHF-Signalweg, und damit zur Relaxation des Gefäßes führen. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass in der zitierten Studie zwar ein ausschließlich endothelmediierter Signalweg durch Aktivierung von endothelialen TRPA1-Kanälen postuliert wurde, die Applikation des Agonisten AITC jedoch nie intraluminal, sondern stets über das Bad erfolgte.

Es wurde auch beschrieben, dass Menthol in niedrigen mikromolaren Konzentrationen den TRPA1-Kanal aktivieren könnte (Karashima, Damann et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch erst bei recht hohen Konzentrationen von Menthol ($100\mu\text{Mol/L}$ und mehr) relevante Vasodilatationen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen daher nicht für eine Beteiligung von TRPA1 bei der vasodilatorischen Modulation des Gefäßtonus.

5.3 Patch-Clamp-Experimente zu TRPM8 und TRPA1 an A7R5 Zellen

Um die offenbar glattmuskulär vermittelten Effekte der TRPM8 und TRPA1 Aktivatoren auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Messungen an der A7R5 Zelllinie durchgeführt, die sich von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte ableitet. Diese Zellen boten unter physiologischen Elektrolytkonstellationen einen prominenten Einwärtsstrom im Bereich von -30mV bis $+30\text{mV}$ dar, der in seiner Kinetik am ehesten dem glattmuskulären L-Typ Calcium-Kanal entspricht. Nach Applikation der TRPM8 und TRPA1 Aktivatoren zur Badlösung konnte bei allen

Experimenten eine Reduktion dieses Stroms beobachtet werden. Am ausgeprägtesten war diese Inhibition durch Menthol (100 $\mu\text{Mol/L}$), wodurch der Strom fast komplett blockiert wurde. Es ist daher naheliegend zu vermuten, dass die verwendeten Substanzen den L-Typ Calciumkanal blockiert haben und so auf Ebene der glatten Muskelzelle direkt relaxierend wirkten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Thymol, eine strukturell sehr ähnliche Substanz zu Menthol, ebenfalls L-Typ Calcium Kanäle in Myokardzellen inhibieren kann (Magyar, Szentandrassy et al. 2002; Szentandrassy, Szigeti et al. 2004). Desweiteren wurde schon beschrieben, dass Menthol sowie auch Thymol in der Lage sind spannungsabhängige Natriumkanäle in erregbaren Zellen zu blockieren (Haeseler, Maue et al. 2002). Auf diese Weise kann sogar die Entstehung von Aktionspotentialen unterdrückt werden. Die Hemmung dieser spannungsabhängigen Natriumkanäle als auch des spannungsabhängigen Calciumkanals könnte so auch die analgetische Teilwirkung von Menthol erklären. Hinweise für eine zusätzliche Stimulierung bzw. Inhibition anderer Ströme konnte in den untersuchten A7R5-Zellen nicht erhalten werden. Diese Ergebnisse lassen sich mit den myographischen Messungen vereinbaren. Die beobachteten Vasodilatationen könnten möglicherweise durch Inhibition der glattmuskulären L-Typ Calciumkanäle erklärt werden. Diese Beobachtungen legen daher einen eher nicht TRP-vermittelten Wirkmechanismus dieser Substanzen bei der Beeinflussung des Gefäßtonus nahe.

5.4 Patch-Clamp-Experimente zu TRPM8 und TRPA1 an Endothelzellen

Die bislang diskutierten Experimente legen nahe, dass die verwendeten TRPM8 und TRPA1 Aktivatoren eher über endothelunabhängige Mechanismen vasodilatierend wirken. Um eine mögliche Beteiligung des Endothels bei diesen Gefäßreaktionen auf zellulärer Ebene direkter zu bestimmen, wurden Patch-Clamp-Experimente an isolierten Endothelzellen der Arteria carotis communis der Maus durchgeführt. Weder durch den TRPA1 Agonisten AITC noch durch den potenten TRPM8 Agonisten Icilin konnten hier TRP-ähnliche Ströme ausgelöst werden. Menthol hingegen induzierte einen kräftigen nichtgleichrichtenden Strom mit einem Umkehrpotential von -80mV , was auf einen Kaliumstrom hinweist. Aufgrund seiner Kinetik und der Blockierbarkeit der dadurch bedingten Hyperpolarisation durch die selektiven Blockersubstanzen UCL (10nM) und Tram (100nM), siehe **Abbildung 26**, ist zu

vermuten, dass dieser Strom wahrscheinlich von calciumregulierten Kaliumkanälen getragen wird. Es handelt sich dabei um Kanäle, die wahrscheinlich ab einer intrazellulären Calciumkonzentration von über $0.4 \mu\text{Mol/L}$ aktiviert werden (Xia, Fakler et al. 1998; Khanna, Chang et al. 1999). Es ist vorstellbar, dass Behandlung der Endothelzellen mit Menthol zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Um zu differenzieren, ob das Calcium dabei durch Kanäle von extrazellulär nach intrazellulär einströmt oder ob die Applikation von Menthol eher zu einer Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher führt, wurden Experimente in calciumfreier Badlösung durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen waren die Kaliumströme noch existent, wenngleich ihre Amplitude um 50% reduziert war. Da durch den potenten TRPM8 Aktivator Icilin keine derartigen Ströme ausgelöst werden, ist aus der Gesamtschau der Ergebnisse anzunehmen, dass Menthol zu einer TRPM8-unabhängigen Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führte. Ähnliche Beobachtungen nach Applikation von Menthol konnten auch bereits für andere Zellen gemacht werden (Mahieu, Owsianik et al. 2007).

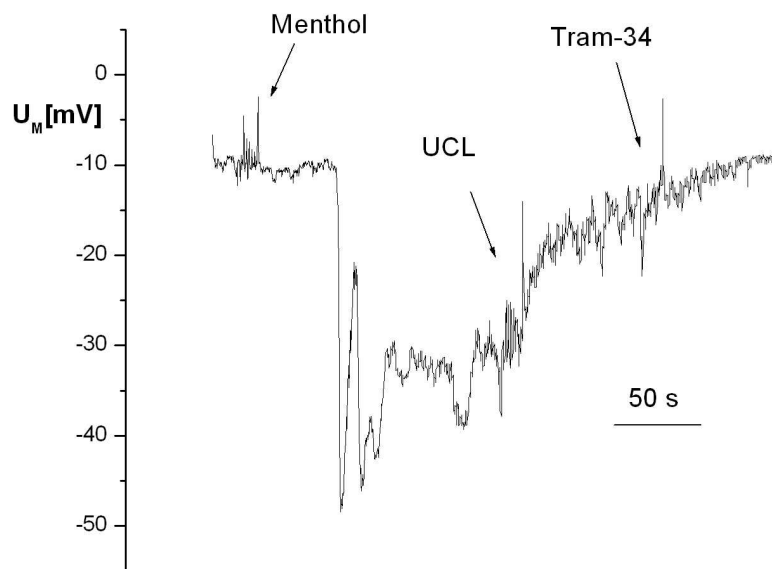


Abbildung 26: Die durch Mentholapplikation ausgelöste Hyperpolarisation der Endothelzelle wird durch UCL (10nM) und Tram-34 (100nM) aufgehoben.

5.5 Mentholinduzierte Hyperpolarisation der Endothelzellen

Neben der Darstellung der Aktivierung dieser calciumaktivierten Kaliumkanäle in isolierten Endothelzellen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass Stimulierung der Endothelzellen mit Menthol zu einer Hyperpolarisation dieser führt. Diese Hyperpolarisation konnte sowohl bei calciumhaltiger wie auch bei calciumfreier Extrazellulärflüssigkeit beobachtet werden. Der zeitliche Verlauf und die Kinetik dieser Hyperpolarisation lassen vermuten, dass diese als Folge der Aktivierung der calciumaktivierten Kaliumkanäle entsteht. Auch Acetylcholin induziert in der Endothelzelle eine intrazelluläre Calciumfreisetzung mit nachfolgender Aktivierung calciumaktivierter Kaliumkanäle, die dann zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle führt (Carter and Ogden 1994). Im Gefäßverband wird diese Hyperpolarisation nach der Hypothese des EDHF über Gap-junctions an die benachbarten Gefäßmuskelzellen weitergegeben. In Myographenexperimenten führte Acetylcholin so zu einer relativ raschen und ausschließlich endothelvermittelten Gefäßdilatation. Die Gefäßdilatation auf Menthol dagegen war eher träge und nach Endothelinaktivierung kaum gemindert. Warum es also hier, trotz der Aktivierung der calciumaktivierten Kaliumkanäle und der darauffolgenden Hyperpolarisation nicht zu einer Gefäßdilatation im Sinne des EDHF-Prinzips kommt, bleibt unklar.

6. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass eine intraluminale Applikation des TRPA1-Aktivators AITC, sowie der TRPM8-Aktivatoren Menthol und Icilin zu einer Vasodilatation isolierter Carotisarterien der Maus führt. Diese Effekte sind weitgehend unabhängig von einer intakten Endothelfunktion. Patch-Clamp-Untersuchungen an einer glattmuskulären Zelllinie zeigten, dass die TRPA1 und TRPM8 Aktivatoren mit großer Wahrscheinlichkeit den L-Typ Calciumkanal blockieren.

Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten Endothelzellen aus der Mauscarotis zeigten, dass Menthol, nicht aber Icilin und AITC sehr wahrscheinlich einen calciumaktivierten Kaliumstrom induzieren, der durch eine intrazelluläre Calciumfreisetzung ausgelöst wird. Die dabei auftretende Endothelhyperpolarisation trägt jedoch nicht nennenswert zur vasodilatatorischen Wirkung von Menthol bei.

Die bereits in der Literatur beschriebenen vasodilatierenden Wirkungen der TRP-Aktivatoren AITC, Menthol sowie Icilin sind daher wahrscheinlich auf Hemmung der L-Typ Calciumkanäle in den glatten Muskelzellen zurückzuführen. So bleibt schließlich die Beteiligung von endothelialen TRPM8 und TRPA1 Kanälen bei der Regulation des Gefäßtonus fraglich, wenn nicht sogar unwahrscheinlich.

7. Literaturverzeichnis

- Adelstein, R. S., M. A. Conti, et al. (1980). "Regulation of myosin light chain kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin." Ann N Y Acad Sci **356**: 142-50.
- Aires, V., A. Hichami, et al. (2007). "Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: a comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid." Biochimie **89**(8): 926-37.
- Andersson, D. A., H. W. Chase, et al. (2004). "TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH." J Neurosci **24**(23): 5364-9.
- Archer, S. L., F. S. Gragasin, et al. (2003). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels." Circulation **107**(5): 769-76.
- Bautista, D. M., J. Siemens, et al. (2007). "The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold." Nature **448**(7150): 204-8.
- Behrendt, H. J., T. Germann, et al. (2004). "Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay." Br J Pharmacol **141**(4): 737-45.
- Benedikt, J., J. Teisinger, et al. (2007). "Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." J Neurochem **100**(1): 211-24.
- Bidaux, G., M. Roudbaraki, et al. (2005). "Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement." Endocr Relat Cancer **12**(2): 367-82.
- Bodding, M., U. Wissenbach, et al. (2007). "Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor." Cell Calcium **42**(6): 618-28.
- Brahler, S., A. Kaistha, et al. (2009). "Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension." Circulation **119**(17): 2323-32.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.
- Busse, R., G. Edwards, et al. (2002). "EDHF: bringing the concepts together." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 374-80.
- Carter, T. D. and D. Ogden (1994). "Acetylcholine-stimulated changes of membrane potential and intracellular Ca²⁺ concentration recorded in endothelial cells in situ in the isolated rat aorta." Pflugers Arch **428**(5-6): 476-84.
- Carvajal, J. A., A. M. Germain, et al. (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." J Cell Physiol **184**(3): 409-20.
- Chappey, O., M. P. Wautier, et al. (1997). "[Structure and functions of the endothelium]." Rev Prat **47**(20): 2223-6.
- Chen, G., H. Suzuki, et al. (1988). "Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels." Br J Pharmacol **95**(4): 1165-74.
- Chuang, H. H., W. M. Neuhusser, et al. (2004). "The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel." Neuron **43**(6): 859-69.

- Colburn, R. W., M. L. Lubin, et al. (2007). "Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice." Neuron **54**(3): 379-86.
- Daniels, R. L., Y. Takashima, et al. (2009). "Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate." J Biol Chem **284**(3): 1570-82.
- de Wit, C., F. Roos, et al. (2000). "Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice." Circ Res **86**(6): 649-55.
- Dhaka, A., A. N. Murray, et al. (2007). "TRPM8 is required for cold sensation in mice." Neuron **54**(3): 371-8.
- Di, A. and A. B. Malik "TRP channels and the control of vascular function." Curr Opin Pharmacol **10**(2): 127-32.
- Duncan, L. M., J. Deeds, et al. (1998). "Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis." Cancer Res **58**(7): 1515-20.
- Earley, S., A. L. Gonzales, et al. (2009). "Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels." Circ Res **104**(8): 987-94.
- Escoubet, B. and A. M. Dosne (1979). "[Endothelium - structure and function]." Nouv Rev Fr Hematol Suppl: XXVIII.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (1988). "Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle." Br J Pharmacol **93**(3): 515-24.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1215-25.
- Figuroa, X. F. and B. R. Duling (2009). "Gap junctions in the control of vascular function." Antioxid Redox Signal **11**(2): 251-66.
- Fill, M. and J. A. Copello (2002). "Ryanodine receptor calcium release channels." Physiol Rev **82**(4): 893-922.
- Fiscus, R. R., R. M. Rapoport, et al. (1983). "Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res **9**(6): 415-25.
- Fonfria, E., P. R. Murdock, et al. (2006). "Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family." J Recept Signal Transduct Res **26**(3): 159-78.
- Fujimoto, T., K. T. Tokuyasu, et al. (1987). "Direct morphological demonstration of the coexistence of vimentin and desmin in the same intermediate filaments of vascular smooth muscle cells." J Submicrosc Cytol **19**(1): 1-9.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Gollasch, M. and M. T. Nelson (1997). "Voltage-dependent Ca²⁺ channels in arterial smooth muscle cells." Kidney Blood Press Res **20**(6): 355-71.
- Guo, R. W. and L. Huang (2008). "New insights into the activation mechanism of store-operated calcium channels: roles of STIM and Orai." J Zhejiang Univ Sci B **9**(8): 591-601.
- Haeseler, G., D. Maue, et al. (2002). "Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol." Eur J Anaesthesiol **19**(8): 571-9.
- Hartmannsgruber, V., W. T. Heyken, et al. (2007). "Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression." PLoS ONE **2**(9): e827.

- Hayashi, T., T. Kondo, et al. (2009). "Expression of the TRPM8-immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder." Neurosci Res.
- Heumann, H. G. (1973). "Smooth muscle: contraction hypothesis based on the arrangement of actin and myosin filaments in different states of contraction." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **265**(867): 213-7.
- Johnson, C. D., D. Melanaphy, et al. (2009). "Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel involvement in the regulation of vascular tone." Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- Kamenskaia, N. L. (1955). "[Structure of the endothelium of the renal arteries and veins.]" Dokl Akad Nauk SSSR **103**(3): 495-8.
- Karashima, Y., N. Damann, et al. (2007). "Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1." J Neurosci **27**(37): 9874-84.
- Karashima, Y., J. Prenen, et al. (2008). "Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate manipulators." Pflugers Arch **457**(1): 77-89.
- Karashima, Y., K. Talavera, et al. (2009). "TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1273-8.
- Khanna, R., M. C. Chang, et al. (1999). "hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation." J Biol Chem **274**(21): 14838-49.
- Kurtz, L., F. Schweda, et al. (2007). "Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium." J Am Soc Nephrol **18**(4): 1103-11.
- Kwan, H. Y., Y. Huang, et al. (2007). "TRP channels in endothelial function and dysfunction." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 907-14.
- Kwan, K. Y., A. J. Allchorne, et al. (2006). "TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction." Neuron **50**(2): 277-89.
- Kwan, K. Y. and D. P. Corey (2009). "Burning cold: involvement of TRPA1 in noxious cold sensation." J Gen Physiol **133**(3): 251-6.
- Landsberg, J. W. and J. X. Yuan (2004). "Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation." News Physiol Sci **19**: 44-50.
- Ledoux, J., M. E. Werner, et al. (2006). "Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone." Physiology (Bethesda) **21**: 69-78.
- Liu, B. and F. Qin (2005). "Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." J Neurosci **25**(7): 1674-81.
- Liu, Y., M. L. Lubin, et al. (2006). "Molecular identification and functional characterization of a temperature-sensitive transient receptor potential channel (TRPM8) from canine." Eur J Pharmacol **530**(1-2): 23-32.
- Longbottom, E. R., M. J. Luckas, et al. (2000). "The effects of inhibiting myosin light chain kinase on contraction and calcium signalling in human and rat myometrium." Pflugers Arch **440**(2): 315-21.
- Lopez, D., A. Rodriguez-Sinovas, et al. (2009). "Replacement of Cx43 by Cx32 in a knock-in mice model attenuates aortic EDHF-mediated relaxation." Exp Physiol.
- Magyar, J., N. Szentandrassy, et al. (2002). "Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes." Br J Pharmacol **136**(2): 330-8.

- Mahieu, F., G. Owsianik, et al. (2007). "TRPM8-independent menthol-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum and Golgi." J Biol Chem **282**(5): 3325-36.
- Malencik, D. A., S. R. Anderson, et al. (1982). "Functional interactions between smooth muscle myosin light chain kinase and calmodulin." Biochemistry **21**(17): 4031-9.
- McKemy, D. D. (2005). "How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation." Mol Pain **1**: 16.
- McKemy, D. D., W. M. Neuhauser, et al. (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416**(6876): 52-8.
- Mizuno, Y., E. Isotani, et al. (2008). "Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo." Am J Physiol Cell Physiol **295**(2): C358-64.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1989). "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication." Biochem Pharmacol **38**(11): 1709-15.
- Moncada, S. and J. R. Vane (1978). "Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin." Pharmacol Rev **30**(3): 293-331.
- Moncada, S. and J. R. Vane (1978). "Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis." Br Med Bull **34**(2): 129-35.
- Montell, C., L. Birnbaumer, et al. (2002). "The TRP channels, a remarkably functional family." Cell **108**(5): 595-8.
- Montell, C., L. Birnbaumer, et al. (2002). "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." Mol Cell **9**(2): 229-31.
- Nealen, M. L., M. S. Gold, et al. (2003). "TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat." J Neurophysiol **90**(1): 515-20.
- Neher, E., B. Sakmann, et al. (1978). "The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes." Pflugers Arch **375**(2): 219-28.
- Nilius, B. and G. Droogmans (2001). "Ion channels and their functional role in vascular endothelium." Physiol Rev **81**(4): 1415-59.
- Nilius, B., J. Prenen, et al. (2005). "The selectivity filter of the cation channel TRPM4." J Biol Chem **280**(24): 22899-906.
- Owsianik, G., D. D'Hoedt, et al. (2006). "Structure-function relationship of the TRP channel superfamily." Rev Physiol Biochem Pharmacol **156**: 61-90.
- Panner, B. J. and C. R. Honig (1967). "Filament ultrastructure and organization in vertebrate smooth muscle. Contraction hypothesis based on localization of actin and myosin." J Cell Biol **35**(2): 303-21.
- Rapoport, R. M., M. B. Draznin, et al. (1983). "Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." Trans Assoc Am Physicians **96**: 19-30.
- Rawls, S. M., T. Gomez, et al. (2007). "Differential behavioral effect of the TRPM8/TRPA1 channel agonist icilin (AG-3-5)." Eur J Pharmacol **575**(1-3): 103-4.
- Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1989). "A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation." Br J Pharmacol **96**(2): 418-24.

- Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1989). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3375-8.
- Rittenhouse, S. E. and J. P. Sasson (1985). "Measurement of IP₃ mass as a monitor of phospholipase C activation in stimulated human platelets." Nouv Rev Fr Hematol **27**(4): 239-42.
- Schmid, E., M. Osborn, et al. (1982). "Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle tissue of mammalian and avian aorta." Exp Cell Res **137**(2): 329-40.
- Shimokawa, H., H. Yasutake, et al. (1996). "The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation." J Cardiovasc Pharmacol **28**(5): 703-11.
- Szentandrassy, N., G. Szigeti, et al. (2004). "Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium." Life Sci **74**(7): 909-21.
- Thorneloe, K. S. and M. T. Nelson (2005). "Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility." Can J Physiol Pharmacol **83**(3): 215-42.
- Voets, T. and B. Nilius (2003). "The pore of TRP channels: trivial or neglected?" Cell Calcium **33**(5-6): 299-302.
- Voets, T., G. Owsianik, et al. (2007). "Trpm8." Handb Exp Pharmacol(179): 329-44.
- Vriens, J., B. Nilius, et al. (2008). "Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels." Curr Neuropharmacol **6**(1): 79-96.
- Xia, X. M., B. Fakler, et al. (1998). "Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels." Nature **395**(6701): 503-7.
- Yao, X. and C. J. Garland (2005). "Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels." Circ Res **97**(9): 853-63.
- Zhang, L. and G. J. Barritt (2006). "TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function?" Endocr Relat Cancer **13**(1): 27-38.
- Zhiqi, S., M. H. Soltani, et al. (2004). "Human melastatin 1 (TRPM1) is regulated by MITF and produces multiple polypeptide isoforms in melanocytes and melanoma." Melanoma Res **14**(6): 509-16.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kurtz
Vorname: Felix

Geburtsdatum: 01.10.1984
Geburtsort: Uster (Schweiz)

Adresse: Gertrud-von-Le-Fort Straße 28, 93051 Regensburg

Ausbildung:

September 1991 – Juli 1995 Grundschule Ittling u. St. Joseph Straubing
September 1995 – Juni 2004 Ludwigsgymnasium Straubing, Abschluss: Abitur
(Gesamtnote 1,7)

Oktober 2004 –
Dezember 2010 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität
Marburg

September 2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2006 – Juli 2009 klinischer Studienabschnitt, Wahlfach „Niere und
Transplantationsmedizin“

Seit Dezember 2007 experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für
Nephrologie/ Biomedizinisches Forschungszentrum des
Uniklinikums Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof.
Dr. Joachim Hoyer

August 2009 bis Juli 2010 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Marburg
September 2009 –
September 2010 studentische Hilfskraft, Klinik für Innere Medizin –
Nephrologie, Universitätsklinikum Marburg

Dezember 2011 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit Januar 2011 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin II an der
Universitätsklinik Regensburg

Fremdsprachen: Englisch, fließend in Wort und Schrift
Latein, Abschluss Latinum

Praktika/Famulaturen:

Juli/August 2004 zweimonatiges Praktikum: St. Elisabeth Krankenhaus
Straubing

Februar/März 2005 einmonatiges Praktikum: St. Elisabeth Krankenhaus
Straubing

Februar/März 2007 Famulatur St. Elisabeth Krankenhaus Straubing

August/September 2007 Famulatur Ev. Krankenhaus Dinslaken

September 2008 Famulatur Universitätsklinikum Marburg

April 2009 Famulatur Universitätsklinikum Marburg –
Nephrologische Ambulanz

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Aumüller, Barth, Bartsch, Baum, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Feuser, Fuchs
– Winkelmann, Grzeschik, Gress, Gudermann, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kann, Klose,
Köhler, Koolman, Lill, Lohoff, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer,
Oertel, Pagenstecher, Plant, Röhm, Röper, Rothmund, Schneider, Seitz, Steiniger,
Voigt, Vogelmaier, Weihe, Werner, Westermann, Wulff

10. Eidesstattliche Erklärung:

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Beteiligung von TRPM8 und TRPA1 bei der Regulation des Gefäßtonus“ im Institut für Innere Medizin/Nephrologie unter Leitung von PD Dr. R. Köhler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.