

**Untersuchungen zur Regulation des Blutdrucks durch  
Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit in der  
Maus (*Mus musculus*, LINNAEUS 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Gregor Sachse**

geboren in Marburg an der Lahn

Hamburg 2010

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. O. PONGS  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. C. LOHR  
Tag der Disputation: 10. September 2010

Hamburg, den 24. August 2010



*A. Temming*  
Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

*Die Letzte war für Skeptiker, die viel nachdenken.*

*Diese ist für Zyniker,  
die mit einem Schmunzeln  
trotzdem weitermachen.*

♻ Gedruckt auf säurefreiem Papier (ISO 9706)

## Inhaltsübersicht

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vorarbeiten</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung / abstract</b> .....	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Appendix</b> .....	<b>72</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vorarbeiten</b> .....	<b>2</b>
	2.1 Hyperaldosteronismus in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen.....	3
	2.2 Normale adrenale Aldosteronsekretion bei Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen .....	4
	2.3 Das RAAS beeinflusst den Bluthochdruck in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen .....	5
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>9</b>
	4.1 Materialien .....	9
	4.2 Geräte .....	9
	4.3 Generierung genetisch veränderter Mauslinien.....	10
	4.4 Zucht und Haltung der Versuchstiere.....	12
	4.5 Realtime PCR.....	13
	4.6 Western Blot .....	14
	4.7 Einzelkanalmessungen an primären VSMCs .....	15
	4.8 Kraftmessung an Aortenringen .....	16
	4.9 Chronische Katheter.....	17
	4.10 Blutentnahmen .....	18
	4.11 Aldosteron Bestimmung.....	19
	4.12 Renin Bestimmung.....	20
	4.13 Angiotensin II Bestimmung .....	21
	4.14 Adrenomedullin Bestimmung .....	21

4.15	Endothelin-1 Bestimmung .....	22
4.16	Telemetrische Blutdruckmessung .....	22
4.17	Herz zu Körpergewicht Bestimmung .....	24
4.18	Statistik .....	24
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
5.1	Unverändertes Renin und Angiotensin II in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen.....	26
5.2	Keine Expression von BK $\beta$ 1-E unter dem 441 bp sm22 $\alpha$ Promotor .....	28
5.3	BK $\beta$ 1 R Mäuse exprimieren BK $\beta$ 1-E in der glatten Muskulatur .....	30
5.4	Wiederhergestellte BK Kanalaktivität in BK $\beta$ 1 R Mäusen .....	32
5.5	Normalisierter vaskulärer Tonus in B6 BK $\beta$ 1 R Mäusen.....	36
5.6	Normaler Blutdruck bei BK $\beta$ 1 KO Mäusen auf dem C57BL/6J genetischen Hintergrund.....	35
5.7	Myogene Blutdrucksenkung in Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen .....	39
5.8	Erhöhtes Plasma Adrenomedullin in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen.....	40
5.9	Myogen erhöhtes Plasma Endothelin-1 in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen .....	42
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
7.1	Hormonelle Regulation des systemischen Blutdrucks durch BK $\beta$ 1 .....	46
7.2	Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den BK $\beta$ 1 Knockout Phänotyp.....	49
7.3	Myogene Blutdruckregulation durch BK Kanäle .....	50
7.4	Modell.....	54
7.5	Relevanz für die Blutdruckregulation im Menschen .....	59
7.6	Schlussbetrachtung .....	61
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung / abstract.....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>72</b>
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	72
10.2	Sequenzen und PCR .....	74
10.2.1	Transgenes Konstrukt <i>Acta2-BK<math>\beta</math>1E</i> .....	74
10.2.2	Transgenes Konstrukt <i>Tagln-BK<math>\beta</math>1E</i> .....	75
10.2.3	PCR Amplifikation von <i>Acta2</i> p2600Int aus genomischer DNA der Maus .....	77
10.2.4	PCR Amplifikation von <i>Tagln</i> 441 bp sm22 $\alpha$ aus genomischer DNA der Maus .....	77
10.2.5	Sonde zum genomischen Nachweis von <i>Acta2-BK<math>\beta</math>1E</i> mittels Southern Blotting .....	78
10.2.6	Genotypisierung <i>Kcnmb1</i> .....	79
10.2.7	Genotypisierung <i>Acta2-BK<math>\beta</math>1E</i> .....	79
10.2.8	Genotypisierung <i>Ren-1 / Ren-2</i> .....	80
10.2.9	Peptidsubstrat für die Renin Bestimmung.....	80
10.2.10	Realtime PCR TaqMan Sonden und Primer.....	81
10.3	Material und Methoden der Vorarbeiten .....	82
10.4	Individuelles SNP Markerset.....	83
10.5	Danksagung .....	85

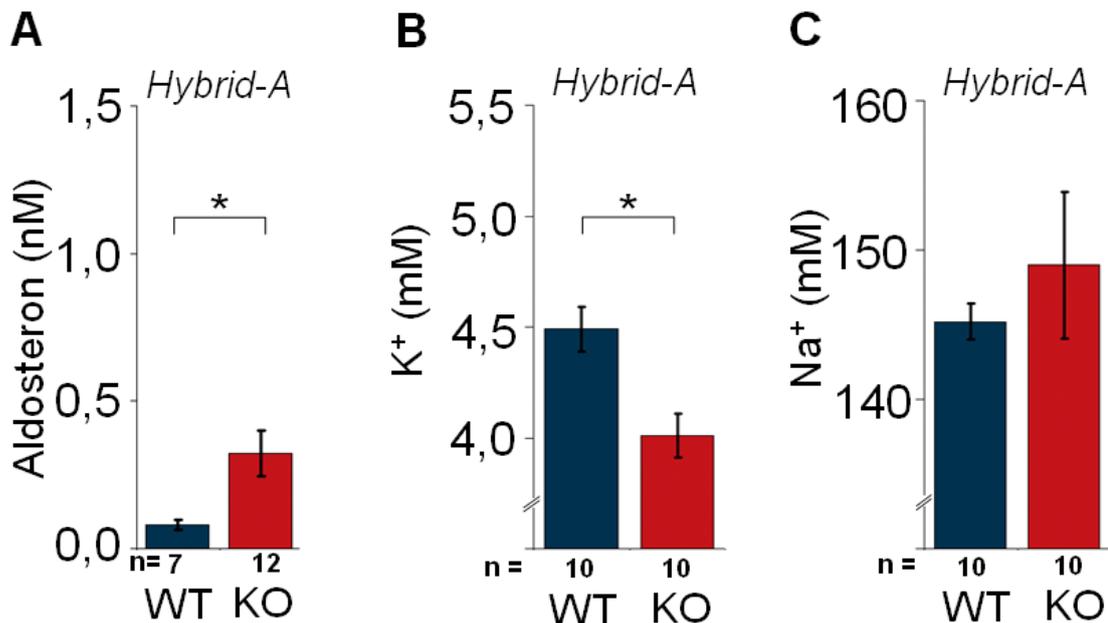
## 1 Einleitung

Arterielle Hypertonie ist ein Hauptrisikofaktor für Herz-Kreislaufkrankungen, der weltweit häufigsten Todesursache (WHO, 2008). Für jede Erhöhung des diastolischen Blutdrucks um 10 mmHg über 75 mmHg hinaus verdoppelt sich das Risiko einer Herz-Kreislaufkrankung (Chobanian *et al.*, 2003). Im eklatanten Missverhältnis zu ihrer großen klinischen Bedeutung ist die Ätiologie der Hypertonie weitgehend ungeklärt: In über 90% aller Fälle gibt es keine klare Ursache (Oparil *et al.*, 2003). Aus Zwillingsstudien ist bekannt, dass essentielle Hypertonie eine starke genetische Komponente besitzt (Hottenga *et al.*, 2005), deren spezifische Natur jedoch bislang unbekannt ist. Die Suche nach den Ursachen für primäre Hypertonie wird dadurch erschwert, dass die Blutdruckregulation unter der simultanen Kontrolle kardialer, nervöser, vaskulärer und renaler Mechanismen steht und sich vereinigte Modelle, wie das Guyton-Coleman Modell von 1967, nur bedingt auf den Menschen anwenden lassen (Chau *et al.*, 1979). Physikalisch ist der Blutdruck das Produkt aus dem Herzzeitvolumen und dem totalen peripheren Gefäßwiderstand, der unter anderem durch den vaskulären Tonus (Muskelspannung) des arteriellen Gefäßbaumes bestimmt wird (vgl. Boulpaep & Boron, 2003).

Kalziumregulierte Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (BK Kanäle) reduzieren den Tonus der Gefäßmuskulatur, indem sie die Muskelzellmembran als Antwort auf hohe lokale Kalziumkonzentrationen hyperpolarisieren (Faraci & Sobey, 1998). Für diesen negativen Rückkopplungsmechanismus ist die modulatorische BK Kanal Untereinheit BK $\beta$ 1 notwendig, welche in Tiermodellen für *Diabetes mellitus* (McGahon *et al.*, 2007) und Bluthochdruck (Amberg *et al.*, 2003; Amber & Santana, 2003) herabreguliert ist. Darüber hinaus spielt die BK $\beta$ 1 Untereinheit eine Rolle bei der Blutdruckregulation: Einerseits zeigen Mäuse, bei denen BK $\beta$ 1 genetisch ausgeschaltet wurde, einen moderat erhöhten Blutdruck (Plüger *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2000). Andererseits ist eine funktionsgesteigerte allelische Variante von BK $\beta$ 1 bei spanischen und amerikanischen – nicht jedoch bei japanischen und afroamerikanischen - Patienten, die mit Blocker der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren („Betablockern“) behandelt werden, mit einer niedrigen Prävalenz diastolischen Bluthochdrucks verknüpft (Kelley-Hedgpeth *et al.*, 2008). Die diesen Effekten zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang nicht geklärt.

## 2 Vorarbeiten

In Zusammenarbeit mit J. Faulhaber, M. Buddack und H. Ehmke aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des UKE in Hamburg und H.-G. Knaus vom Department für Medizinische Genetik, Molekulare und Klinische Pharmakologie der Universität Innsbruck wurden bislang unveröffentlichte Vorarbeiten durchgeführt, welche die Bedeutung renaler Mechanismen für die Fehlregulation des Blutdrucks in BK $\beta$ 1 KO<sup>1</sup> Mäusen belegen. Alle Vorarbeiten wurden mit Mäusen durchgeführt, die einen (C57BL/6J x 129S1/129X1) hybriden genetischen Hintergrund hatten (zuerst veröffentlicht von Plüger *et al.*, 2000). Dieser genetische Hintergrund wird im Folgenden als „Hybrid-A“ bezeichnet. Zusätzliche Informationen zu Material und Methoden der Vorarbeiten finden sich im Appendix (10.3).



**Abb. 1: Plasma Aldosteron und Elektrolyte bei Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen**

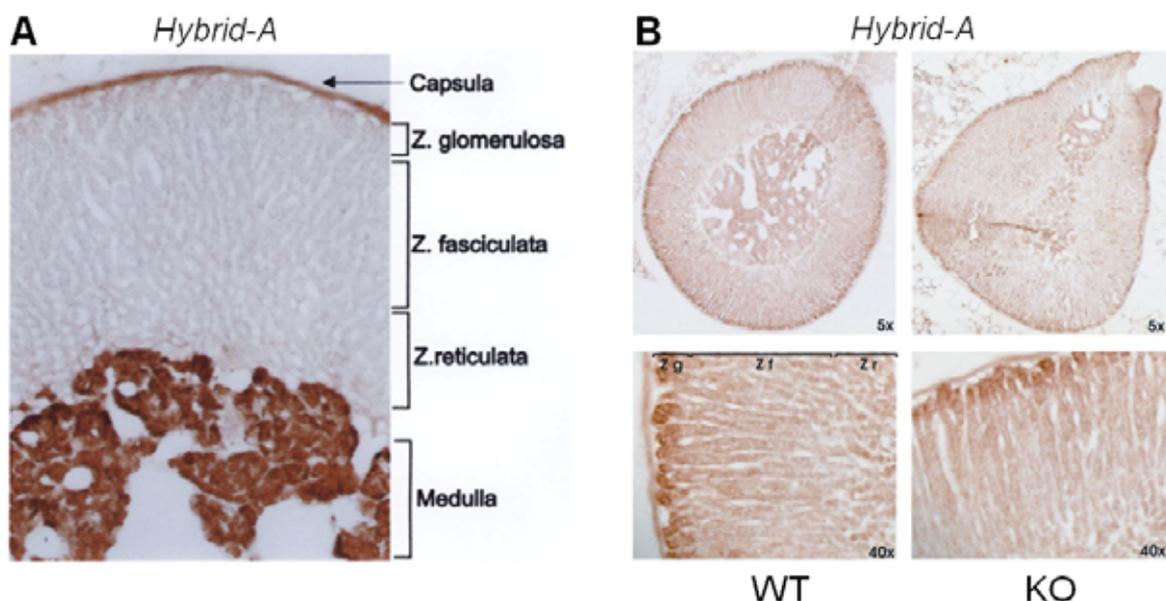
**A:** BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren wurde über chronische Katheter Blut entnommen und die Aldosteronkonzentration im Plasma mittels RIA bestimmt. **B** und **C:** BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren wurde unter Narkose ohne Wiedererwachen Blut über einen Femoralkatheter entnommen und die Plasmaelektrolyte wurden potentiometrisch bestimmt. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; Zahl der Tiere = n; \* = statistisch signifikanter Unterschied.

<sup>1</sup> "BK $\beta$ 1 KO" steht im Folgenden für den Genotyp *Kcnmb1*<sup>-/-</sup>, bei dem das Gen für die BK $\beta$ 1 Untereinheit fehlt. Der Genotyp *Kcnmb1*<sup>+/+</sup> bei Kontrolltieren wird als "BK $\beta$ 1 WT" bezeichnet.

## 2.1 Hyperaldosteronismus in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Der in BK $\beta$ 1 KO Mäusen gefundene erhöhte Blutdruck wurde bisher als eine unmittelbare Konsequenz des höheren vaskulären Tonus dieser Mäuse gesehen (Brenner *et al.*, 2000; Standen, 2000). Diese Hypothese lässt allerdings hormonell gesteuerte renale Mechanismen der Blutdruckregulation außer Acht. Alternativ wurde kürzlich ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem defiziente Kaliumsekretion und Hyperaldosteronismus zu Bluthochdruck in BK $\beta$ 1 KO Mäusen führen (Grimm *et al.*, 2009a; Grimm *et al.*, 2009b).

Jörg Faulhaber und Mareike Buddack haben daher die Konzentration des blutdruckregulierenden Hormons Aldosteron im Plasma von Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen bestimmt. Das Ergebnis war eine deutliche Erhöhung um das Vierfache von  $0.08 \pm 0.02$  nM ( $n = 7$ ) in BK $\beta$ 1 WT Kontrollen auf  $0.32 \pm 0.08$  nM ( $n = 12$ ) in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen (Abb. 1A). Hyperaldosteronismus alleine kann Bluthochdruck erzeugen, z. B. beim Conn-Syndrom (Conn & Louis, 1955). Ergänzend konnte Jörg Faulhaber eine statistisch signifikante Senkung der Plasmakaliumkonzentration (Abb. 1B) und eine Trend zu erhöhten Plasmanatriumkonzentrationen (Abb. 1C) nachweisen, wie sie für einen



**Abb. 2: Expression von Untereinheiten des BK Kanals in Nebennieren von *Mus musculus***

Repräsentative immunhistochemische DAB Färbungen an Nebennierenschnitten. **A:** BK $\beta$ 1 Expression in Nebennierenmark und Kapsel, aber nicht in der Nebennierenrinde eines BK $\beta$ 1 WT Tiers. **B:** Unveränderte BK $\alpha$  Expression in einer BK $\beta$ 1 defizienten Maus. WT: BK $\beta$ 1 WT Maus; KO: BK $\beta$ 1 KO Maus.

Hyperaldosteronismus typisch sind, da Aldosteron die Ausscheidung von Natrium in der Niere hemmt und die von Kalium steigert. Diese Ergebnisse belegen eine deutliche Fehlregulation des Plasmaaldosteronspiegels in BK $\beta$ 1 KO Mäusen, da Hypokalämie und Hypernaträmie aldosteronsenkende Stimuli sind. Diese Daten schließen einen rein vaskulären Mechanismus für den erhöhten Blutdruck von BK $\beta$ 1 KO Mäusen aus, stehen jedoch auch partiell im Widerspruch zu einem Mechanismus auf der Basis defekter Kaliumsekretion und daraus resultierender Hyperkalämie.

## 2.2 Normale adrenale Aldosteronsekretion bei Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Plasma Aldosteron wird in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde gebildet. Eine mögliche Ursache für die Fehlregulation der Plasmaaldosteronkonzentration in BK $\beta$ 1 KO Mäusen wäre demnach eine funktionelle Störung in dieser Zellschicht durch die Abwesenheit der BK $\beta$ 1 Untereinheit, wie sie bereits für den Knockout der BK $\alpha$  Untereinheit gezeigt wurde (Sausbier *et al.*, 2005). BK Kanäle werden in der *Zona glomerulosa* von *Mus musculus* exprimiert (ebd.), jedoch war bisher unklar, ob sie die BK $\beta$ 1 Untereinheit enthalten.

Zur Klärung dieser Frage führte H. G. Knaus Immunfärbungen an Nebennierenschnitten durch und konnte zeigen, dass die BK $\beta$ 1 Untereinheit im Nebennierenmark, aber nicht in der Nebennierenrinde (einschließlich der *Zona glomerulosa*) von *Mus musculus* exprimiert wird (Abb. 2A). Die Verteilung der BK $\alpha$  Untereinheit in BK $\beta$ 1 KO Tieren war nicht verändert (Abb. 2B). Ergänzend hierzu zeigten von J. Faulhaber durchgeführte Experimente an dissoziierten Nebennieren, dass die Regulation der Aldosteronsekretion in BK $\beta$ 1 KO Mäusen unverändert ist. Die adrenale Aldosteronsekretion kann sowohl durch Angiotensin II, Kalium

**Tabelle 1. Agonistenkonzentrationen bei halbmaximaler Aldosteronsekretion in dissoziierten Nebennieren von Mäusen der Hybrid-A Sub-Linie.**

		BK $\beta$ 1 WT	BK $\beta$ 1 KO
Agonist	Testbereich	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>
Angiotensin II	0,1 nM – 10 $\mu$ M	15,7 $\pm$ 6,2 nM	9,7 $\pm$ 4,8 nM
K <sup>+</sup>	4 mM – 11 mM	5,44 $\pm$ 0,23 mM	5,46 $\pm$ 0,44 mM
ACTH	0,1 pM – 100 nM	108 $\pm$ 31 pM	76 $\pm$ 18 pM

Präparationen dissoziierter Nebennieren wurden mit steigenden Konzentrationen der Agonisten behandelt, die resultierende Aldosteronsekretion gemessen und aus der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve die Agonisten-Konzentration bei halbmaximaler Stimulation der Aldosteronsekretion (EC<sub>50</sub>) bestimmt. Alle Ergebnisse  $\pm \sigma_n$  mit n = 10.

als auch Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) reguliert werden. Bei BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen war die Sensitivität gegenüber keinem dieser Agonisten verändert (Tabelle 1). Auch das mittlere Gewicht der untersuchten Nebennieren war in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen nicht erhöht (ohne Abb.).

Diese Ergebnisse widersprachen der Hypothese, es handele sich um einen primären Hyperaldosteronismus, bedingt durch die Abwesenheit der BK $\beta$ 1 Untereinheit in der *Zona glomerulosa*.

### 2.3 Das RAAS beeinflusst den Bluthochdruck in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Die Erhöhung des Aldosteronspiegels in BK $\beta$ 1 KO Mäusen bei normaler Regulation der Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde deutet darauf hin, dass die übermäßige Freisetzung von Aldosteron durch einen extra-adrenalen Faktor bedingt ist.

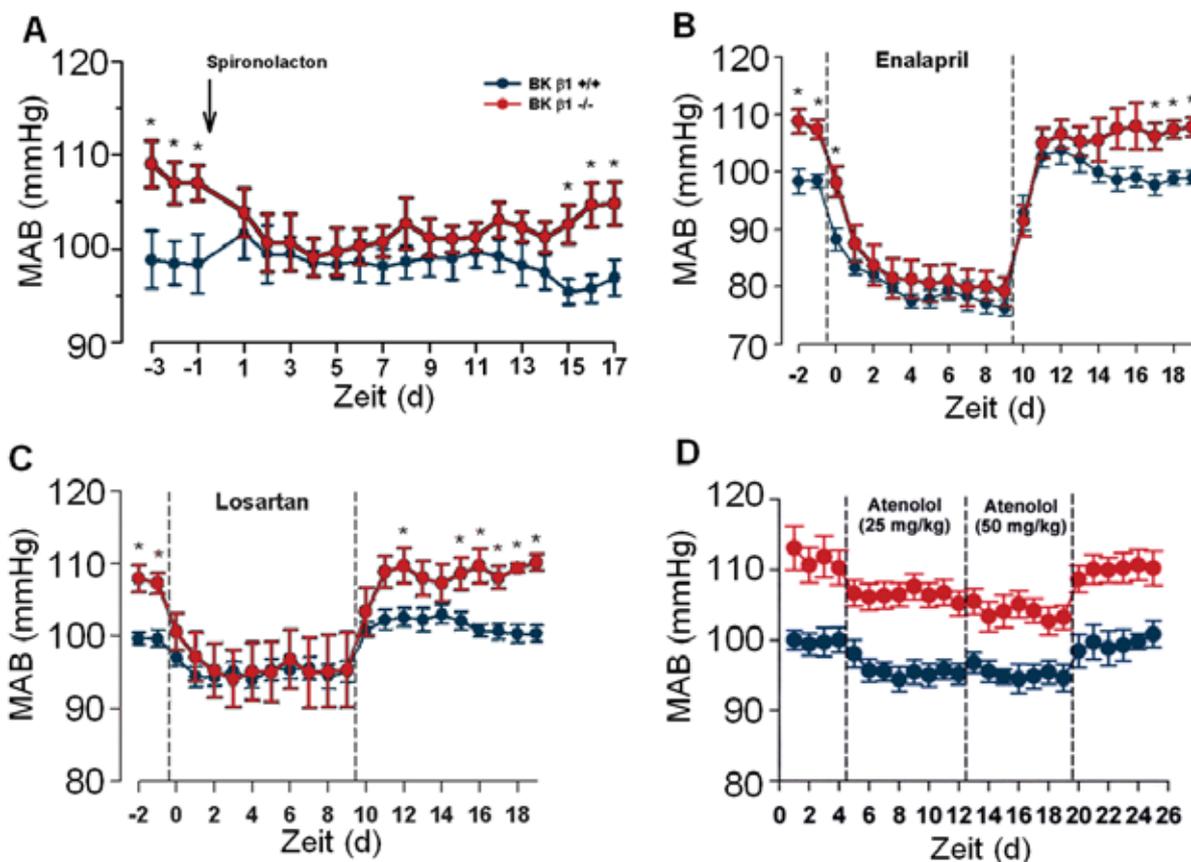
Im gesunden Organismus erfolgt die Stimulation der Aldosteronsekretion hauptsächlich im Rahmen des sogenannten Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), das an der Langzeitregulation des Blutdrucks über die Niere maßgeblich beteiligt ist. Geschwindigkeitsbestimmend ist dabei die Sekretion der Endopeptidase Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere als Reaktion auf Blutdruckabfall, Hyponaträmie oder Blutvolumenverlust. Renin spaltet das von der Leber gebildete Angiotensinogen (AGT) in der Blutbahn und setzt damit das Dekapeptid Angiotensin I frei, welches in direktem Anschluss vom *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) zum Oktapeptid Angiotensin II umgesetzt wird. Angiotensin II stimuliert daraufhin über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere, welches wiederum in der Niere an Mineralocorticoidrezeptoren bindet und so die Expression von Proteinen induziert, welche die Reabsorption von Natrium fördern und damit zu einer Blutdruckerhöhung führen (vgl. Boulpaep & Boron, 2003).

Um den Einfluss des RAAS auf den erhöhten Blutdruck in BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu evaluieren implantierte Jörg Faulhaber telemetrische Blutdruckmessgeräte in BK $\beta$ 1 KO Tiere und BK $\beta$ 1 WT Kontrollen und behandelte die Mäuse nach einer Erholungsphase von 1-2 Wochen mit Medikamenten, die das RAAS manipulieren (Abb. 3).

Eine Behandlung mit dem Mineralocorticoidrezeptorblocker Spironolacton normalisierte den systemischen Blutdruck von BK $\beta$ 1 KO Mäusen (Abb. 3A), ohne dass der Blutdruck von

BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren beeinflusst wurde. Der Effekt war bereits nach weniger als einem Tag zu beobachten und nach dem Ende der Behandlung reversibel. Dies war ein deutliches Indiz dafür, dass der beobachtete erhöhte Blutdruck über den nachgewiesenen Hyperaldosteronismus vermittelt wird.

Die Verabreichung von Losartan, einem AT $_1$ -Rezeptor Antagonisten, führte ebenfalls zu einem Wegfall der Blutdruckdifferenz zwischen BK $\beta$ 1 KO und BK $\beta$ 1 WT Tieren, ging aber im Gegensatz zur Spironolacton-Behandlung mit einer leichten Blutdrucksenkung auch in Kontrolltieren einher (Abb. 3B). Ebenso ließ sich der Blutdruckunterschied durch eine Behandlung mit Enalapril, einem ACE-Hemmer, beheben, der jedoch zudem eine drastischen Blutdrucksenkung in beiden Genotypen bewirkte (Abb. 3C). Diese Ergebnisse untermauerten die entscheidende Rolle von Aldosteron für die Langzeitregulation des Blutdrucks in



**Abb. 3: Pharmakologische Behandlung des Bluthochdrucks in BK $\beta$ 1 KO Mäusen**

Telemetrische Blutdruckmessung an BK $\beta$ 1 KO (-/-) Mäusen und BK $\beta$ 1 WT (+/+) Kontrolltieren. Messbeginn war 1-2 Wochen nach der Implantation der Sender. **A:** Implantation eines subkutanen Spironolacton-Pellets an Tag 4 (Pfeil). Der Wirkstoff wurde auf  $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{KG}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  dosiert und über mind. 14 Tage freigesetzt. **B:** Behandlung mit Losartan ( $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{KG}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) über das Trinkwasser ab Tag 0 bis Tag 9. **C:** Behandlung mit Enalapril ( $60 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{KG}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) über das Trinkwasser ab Tag 0 bis Tag 9. **D:** Behandlung mit Atenolol ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{KG}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  und  $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{KG}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) über das Trinkwasser von Tag 5 bis 12 und 13 bis 19. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; \* = statistisch signifikanter Unterschied.

BK $\beta$ 1 KO Mäusen und zeigten, dass die Renin-Angiotensin Signalkaskade und die Aldosteronsekretion in BK $\beta$ 1 KO Mäusen nicht entkoppelt sind.

Wirkstoffe, die nicht am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ansetzen, konnten in weiteren von Jörg Faulhaber durchgeführten Experimenten den Blutdruckunterschied nicht aufheben. Die Behandlung von telemetrisch blutdrucküberwachten Tieren mit Atenolol, einem selektiven  $\beta_1$ -Adrenorezeptorenblocker, über das Trinkwasser führte zu einer leichten Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks, ohne den Unterschied zwischen den Genotypen zu beeinflussen (Abb. 3D).

Auch die akute Regulation des Blutdrucks war in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen nicht beeinflusst. Hexamethonium (HM), ein spezifischer neuronaler Antagonist des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, senkte im akuten Experiment (einmalig 25 mg/kg über 10 s) bei chronisch katheterisierten Tieren den mittleren arteriellen Blutdruck gleichermaßen in beiden Genotypen (n = 7 je Gruppe):

BK $\beta$ 1 WT: 104 $\pm$ 2 mmHg	HM:	52 $\pm$ 2 mmHg
BK $\beta$ 1 KO: 112 $\pm$ 1 mmHg	HM:	59 $\pm$ 4 mmHg

Ebenso erhalten blieb der Blutdruckunterschied bei Behandlung mit dem Stickstoffmonoxid-Donor Nitroprussid oder dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME (ohne Abbildung).

Diese Resultate deuteten darauf hin, dass die Blutdruckerhöhung in BK $\beta$ 1 KO Mäusen nicht über das autonome Nervensystem oder Stickstoffmonoxid-Signalwege vermittelt wird, wohingegen dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System eine zentrale Bedeutung zuzukommen schien. Die Behandlung mit Spironolacton belegte, dass der Hyperaldosteronismus in BK $\beta$ 1 KO Mäusen ursächlich für die beobachtete Blutdruckerhöhung ist.

### 3 Fragestellung

Die Langzeitregulation des arteriellen Blutdrucks benötigt laut dem Guyton-Coleman Modell von 1967 eine Veränderung der renalen Funktion oder der Aufnahme von Salz und Wasser (Chau *et al.*, 1979) - eine Forderung, die durch die ersten beschriebenen genetischen Formen von Hypertonie bestätigt wurde (Lifton *et al.*, 2001). Neuere Publikationen über Mäusen mit vaskulären genetischen Defekten, die zugleich an Hypertonie leiden, haben das Modell jedoch in Frage gestellt (Dietrich *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2006). Auch BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse gehören in diese Kategorie, da vermutet wurde, dass der gesteigerte arterielle Tonus dieser Tiere verantwortlich für ihren erhöhten Blutdruck ist (Brenner *et al.*, 2000; Plüger *et al.*, 2000; Standen *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde ein alternativer Mechanismus vorgeschlagen, dem zufolge ein durch mangelhafte Kaliumsekretion induzierter Hyperaldosteronismus verantwortlich für die Zunahme des Blutdrucks in BK $\beta$ 1 KO Mäusen sei (Grimm *et al.*, 2009a; Grimm *et al.*, 2009b). Die Gewebespezifität des blutdrucksteigernden Effekts in BK $\beta$ 1 KO Mäusen ist bisher jedoch nicht auf genetischem Wege untersucht worden. Unklar blieb auch, warum die renale Blutdruckregulation in Mausmodellen für myogene Hypertonie versagt.

Darum stellte ich die Hypothese auf, die anormale Langzeitregulation des Blutdrucks in BK $\beta$ 1 KO Mäusen habe ihren Ursprung in der glatten Muskulatur und involviere zugleich Plasmahormone, welche die Nierenfunktion beeinflussen. Um diese Hypothese zu testen nutzte ich eine selektive transgene Re-Expression von BK $\beta$ 1 in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 KO Mäusen. Ferner prüfte ich auf die Beteiligung renaler Mechanismen, indem ich die Plasmakonzentrationen von Hormonen bestimmte, die an der Blutdruckregulation der Niere beteiligt sind. Angeregt durch entsprechende Effekte beim Menschen (Kelley-Hedgpeth *et al.*, 2008) war es zudem ein Aspekt meiner Untersuchungen zum Mechanismus der Blutdruckregulation durch BK Kanäle, nach möglichen Ansatzpunkten für eine Wechselwirkung mit dem genetischen Hintergrund und mit  $\beta$ -adrenergen Signalwegen in *Mus musculus* zu suchen.

## 4 Methoden

### 4.1 Materialien

Sofern nicht explizit anders erwähnt, stammten Chemikalien und Gebrauchsmaterialien von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Becton Dickinson & Co (Heidelberg), Fluka (jetzt: Sigma-Aldrich, München), GE Healthcare (München), Gibco (jetzt: Invitrogen, Darmstadt), Hanna Instruments (Ann Arbor, Michigan, USA), Invitrogen (Darmstadt), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach/Ts.), Perbio (Bonn), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Thermo Scientific (Bonn), TH Geyer (Hamburg) und VWR (Hannover). Chemikalien hatten p.A.- Qualität oder die höchste verfügbare Reinheit. Gase und flüssiger Stickstoff stammten von Air Products (Hamburg), Enzyme von Fermentas (St. Leon-Rot), Oligonukleotide (Sequenzen siehe Appendix 10.2) von MWG (Ebersberg), Invitrogen und Biomers (Ulm). Radioaktiv markierte Nukleotide wurden bei Amersham Biosciences geordert. Plastikmaterial stammte von Sarstedt (Nümbrecht) und medizinisches Verbrauchsmaterial (Spritzen, Kanülen, Heparin, Isofluran) von der Hausapotheke des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Chirurgische Werkzeuge wurden von Fine Science Tools (Heidelberg) bezogen. Wasser stammte aus den Reinstwasseranlagen der jeweiligen Institute und hatte eine Leitfähigkeit von  $\leq 55$  nS/cm.

### 4.2 Geräte

*Inkubatoren:* (B.Braun Biotech International, Melsungen) Certomat BS-4; (Heraeus Instruments, Hanau) Function Line.

*Mikroskopie:* Zeiss System (Axioskop 2 MOT, AxioCam HRC & MRm, Axiovision Software) von Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen); Leica Confocal Systems DM IRBE / TCS SP2 von Leica Mikrosysteme Vertrieb (Wetzlar).

*Schüttler:* Eppendorf (Hamburg) Thermomixer 5436; (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) VortexGenie-2; (IKA Labortechnik, Staufen) KS 125 Basic.

*Stromquellen:* (Bio-Rad, München) Power Pac 200; (Pharmacia, jetzt: Pfizer, Berlin) LKB GPS 200/400.

*Thermocycler:* (MJ Research, Waltham, MA, USA) PTC-200 Thermocycler; (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 2720 Thermal Cycler.

*Waagen:* Mettler (Giessen ) PM4000; (Sartorius AG, Göttingen) R180D Feinwaage.

*Zentrifugen:* Eppendorf Centrifuge 5415R; Sigma 2K15; (Heraeus Sepatech) Minifuge RF; (Sorvall Instruments, jetzt: Thermo Scientific) RC5C; (Sorvall Instruments) RC M120.

*Sonstige Geräte:*

Eismaschine: Scotsman AF-20 (Milan, IT)

Geldokumentation: (Biometra, Göttingen) BioDoc II

Gelkammer: (Owl Separation Systems, jetzt: Thermo Scientific) Model B2

Mikropipetten: (Gilson, Middleton, WI, USA) 10/20/200/1000  $\mu$ l

Mikrowelle: Toshiba (Neuss) ER-7600

pH-Meter: WTW (Weilheim) pH 523

Pipettierhilfe: (TecNoMara, jetzt: Vitaris, Baar) PIPETBOYacu

Speed-Vac: CHRIST LOC-1 ALPHA 1-4 & SAVANT SPEEDVAC Concentrator (Thermo Scientific)

Sterilwerkbank: (The Baker Company, Sanford, ME, USA) Sterilgard Class II Type A/B3

Verdampfer: (Harvard Apparatus, March-Hugstetten) Fluovac & Mss Isoflurane

$\gamma$ -Counter: (Packard, Schwadorf, Österreich) RIASTAR

### 4.3 Generierung genetisch veränderter Mauslinien

Die Erzeugung der *Kcnmb1*<sup>-/-</sup> Mauslinie (abgekürzt mit "BK $\beta$ 1 KO"), bei der die BK $\beta$ 1 Untereinheit des BK Kanals durch Deletion des ersten Exons des *Kcnmb1* Gens entfernt wurde, ist von Saskia Plüger und Kollegen in 2000 beschrieben worden (Plüger *et al.*, 2000 und Plüger-Stegemann, 2000). Dabei wurden R1 ES Zellen hybriden genetischen Ursprungs (129S1/129X1 Mauslinie) in C57BL/6J Blastozysten injiziert. Durch die Verpaarung von heterozygoten Chimären mit Wurfgeschwistern wurden homozygote BK $\beta$ 1 KO Mäuse und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltiere erhalten. Im Weiteren wird der hybride (C57BL/6J x 129S1/129X1) genetische Hintergrund dieser Tiere als "Hybrid-A" bezeichnet. Für die Zucht der Hybrid-A

Sublinie wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Mäuse eingesetzt. Parallel zur Generierung der Transgenen Linien (siehe unten) wurde die Hybrid-A Sub-Linie wiederholt auf die Inzuchtlinie C57BL/6J (The Jackson Laboratory, ME, USA) rückgekreuzt, woraus die "B6" Sublinie resultierte. Sie wurde durch konsequente Verpaarung von heterozygoten Knockouttieren mit C57BL/6J Mäusen aufrechterhalten. Die verwendeten B6 BK $\beta$ 1 KO and BK $\beta$ 1 WT Mäuse stammten aus der Verpaarung von heterozygoten Mäusen, die mindestens dreimal (Durchschnitt: siebenmal) auf C57BL/6J zurückgekreuzt worden waren. Über eine SNP Analyse mit einem individuell zusammengestelltem 76 SNP Markerset (siehe Appendix 10.4) von KBiosciences (Hoddesdon, GB), wurde bestimmt, dass der genetische Hintergrund der B6 Sublinie zu 98% identisch (Standardabweichung: 1%, n = 12) mit dem von reinen C57BL/6J Tieren war. Die Sublinie "Hybrid-B" stammt aus der Revitalisierung kryokonservierter heterozygoter BK $\beta$ 1 KO Tiere der Hybrid-A Sublinie, die zumindest zweimal auf den C57BL/6J Stamm zurückgekreuzt worden waren. Sie wurde inzüchtig durch die Verpaarung heterozygoter Knockout Tiere aufrechterhalten. Der genetische Hintergrund von Hybrid-B Mäusen war laut SNP Analyse zu 77% identisch (Standardabweichung: 5%, n = 9) mit dem C57BL/6J Stamm. Sowohl die B6 als auch die Hybrid-B Sublinie hatten im Rahmen der Rückkreuzung das für 129 Mauslinien charakteristische zweite Renin Gen (*Ren-2*) verloren (Bestimmung mittels PCR, siehe 10.2.8).

Transgene Linien, welche die EGFP-markierte BK $\beta$ 1 Untereinheit in der glatten Muskulatur überexprimieren, wurden durch Pronukleusinjektion in der Servicegruppe "Transgene Technologien" des ZMNH (Hamburg) generiert (vgl. Palmiter & Brinster, 1985). Dabei wurde linearisierte aufgereinigte DNA des von mir klonierten Konstruktes *Acta2-BK $\beta$ 1E* (Klonkarte und Sequenz siehe Appendix 10.2.1) in die Vorkerne von (DBA/2J x C57BL/6J)F1-hybriden, einzelligen Embryonen injiziert. Wie durch PCR (siehe 4.4 und 10.2.7) und Southern Blotting (siehe 10.2.5) verifiziert, war bei 3 von 20 geborenen Tieren das Transgen genomisch integriert (Nummer 5, 9 und 13). Die Tiere 9 und 13 wurden anschließend auf die BK $\beta$ 1 KO Line rückgekreuzt, um heterozygot transgene, homozygot BK $\beta$ 1-defiziente Tiere zu erhalten. Der resultierende Genotyp "*Kcnmb1<sup>-/-</sup> Tg(Acta2-BK $\beta$ 1E)9Pong*" wird im Folgenden mit "BK $\beta$ 1 R9" und "*Kcnmb1<sup>-/-</sup> Tg(Acta2-BK $\beta$ 1E)13Pong*" mit "BK $\beta$ 1 R13" abgekürzt. Die Abkürzung "BK $\beta$ 1 R" bezeichnet im Folgenden die Gesamtheit beider Genotypen, BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13.

Der *Acta2* Promotor des Transgens wurde durch PCR-Amplifikation aus C57BL/6J genomischer DNA kloniert (siehe Appendix 10.2.3). Er wurde bereits 1999 von Mack und Owens unter dem Namen p2600Int charakterisiert. Das Transgen codiert die Expression eines Fusionsproteins aus BK $\beta$ 1 und EGFP (BK $\beta$ 1-E), welches über einen Polyglycinlinker C-terminal angefügt wurde. Die BK $\beta$ 1-codierende Sequenz stammt aus dem Vektor pcDNA3/KCNMB1 von Andreas Nolting (Nolting, 2000), die EGFP-codierende Sequenz aus dem pEGFP-N1 Vektor von Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Die Generierung der transgenen Linien mit dem Konstrukt *Tagln-BK $\beta$ 1E* (Klonkarte und Sequenz siehe Appendix 10.2.2) erfolgte analog zu *Acta2-BK $\beta$ 1E*. Von 44 geborenen Tieren waren 3 transgen (Nummer 27, 30 und 31). Das *Tagln-BK $\beta$ 1E* Konstrukt entspricht dem *Acta2-BK $\beta$ 1E* Konstrukt, enthält aber anstelle des *Acta2* ein *Tagln* Promotor Fragment und wird von Insulator Sequenzen aus dem pWhere Vector von Invivogen (Toulouse, Frankreich) flankiert. Das *Tagln* Promotor Fragment wurde durch PCR-Amplifikation aus C57BL/6J genomischer DNA kloniert (siehe Appendix 10.2.4) und von Kim *et al.* unter dem Namen "441 bp sm22 $\alpha$ " charakterisiert (Kim *et al.*, 1997). Zur Klonierung des Transgens und zur Kontrolle der Keimbahntransmission mittels Southern Blotting wurden übliche molekularbiologische Methoden nach Sambrook und Russel verwendet (Sambrook & Russel, 2001).

Die Vermehrung von BK $\beta$ 1 R Tieren erfolgte nach einer einmaligen Verpaarung mit C57BL/6J durch kontinuierliche Rückkreuzung des Transgens auf frische BK $\beta$ 1 KO Tiere des jeweiligen genetischen Hintergrunds. Für Versuche wurden BK $\beta$ 1 R Tiere der F3- oder späteren Generation verwendet.

#### 4.4 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien und Vorschriften gehalten und versorgt. Es herrschten spezifiziert pathogenfreie (SPF) Bedingungen, Temperatur und Luftfeuchtigkeit lagen bei 19-25°C und 45-60%. Die Mäuse erhielten Haltungsfutter (Ssniff R/M-H, Natriumgehalt 0,24% von ssniff Spezialdiäten, Soest) und Wasser *ad libitum*. Sie wurden in einem 12h/12h Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Genotypisierungen der Tiere

erfolgte zuerst kurz nach der Entwöhnung und erneut zur Kontrolle *post mortem* nach beendeter Versuchsdurchführung. Zur Aufreinigung der genomischen DNA wurde das REDEExtract-N-Amp tissue PCR Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet (Oligonukleotide und PCR Protokolle siehe Appendix 9.2).

Alle Tierversuche wurden durch das Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt und gemäß dem Tierschutzgesetz in der jeweils geltenden Fassung durchgeführt (Genehmigungs-Nr. 106/04; 82/05; 35/06; 03/09). Sofern nicht anders erwähnt wurden männliche Tiere eingesetzt.

#### 4.5 Realtime PCR

Zur Charakterisierung der organspezifischen Expression über die Konzentration verschiedener mRNAs wurden Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt, dann durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe direkt nach der Präparation in 1,5 ml Plastikgefäßen in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die Organe einzeln aufgearbeitet. Organe wurden mit Plastikpistillen zermörsert und Gesamt-RNA mit Trizol Reagenz (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA wurde mit "SuperScript II Reverse Transcriptase" von Invitrogen entsprechend dem Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben und für die Realtime Detektion mittels TaqMan PCR (Applied Biosystems) verwendet.

Für den Nachweis der mRNA von transgenem und endogenem BK $\beta$ 1 wurden die in Anhang 10.2.10 beschriebenen Sonden und Primer verwendet, Polymerase und Puffer waren im "TaqMan Gene Expression Master Mix" enthalten, die Echtzeitdetektion erfolgte im "ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System" (von Applied Biosystems). Sonden, "Master Mix" und Detektionssystem stammten von Applied Biosystems, die Primer von Invitrogen. Zur Detektion von GAPDH wurde der "TaqMan Gene Expression Assay, GAPDH ID: Mm99999915\_g1" von Applied Biosystems eingesetzt. Die mit Verdünnungsreihen festgestellte Amplifikationseffektivität der Tests (in %) betrug für GAPDH:  $102 \pm 4$ , für *Acta2-BK $\beta$ 1E*:  $97 \pm 6$  und für endogenes BK $\beta$ 1:  $95 \pm 3$  (jeweils  $n = 3$ ).

#### 4.6 Western Blot

Zum Nachweis der Expression des BK $\beta$ 1-E Fusionsproteins wurden Mäuse beider Geschlechter mit Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe sofort in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermörsert. Anschließend erfolgte ein weiterer Aufschluss mit einem 2 ml Potter S Homogenisator (B.Braun Biotech, Melsungen) unter Zugabe von 500  $\mu$ l Probenpuffer (10% (v/v) Glycerol, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 60 mM Tris, pH 6.8) und 5  $\mu$ l "Protease Inhibitor Mix" von GE Healthcare. Der Aufschluss wurde daraufhin für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, bei 16000 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Es wurden Novex 4-12% Tris-Glycin Gradientengele von Invitrogen verwendet, die Auftragsmenge betrug 20-80  $\mu$ g pro Spur (bestimmt mit dem BCA Test von Thermo Scientific). Anschließend wurde nass auf Nitrozellulosemembranen (Protran von Whatman, jetzt: GE Healthcare) geblottet und mit Anti-GFP-Antikörper und mittels Chemolumineszenz nachgewiesen. Die Schritte im Einzelnen waren:

NACHWEIS MITTELS HYPERFILM ECL (AMERSHAM): Blockieren (5% (w/v) Magermilchpulver); Anti-GFP-Antikörper (Invitrogen, A11122, Kaninchen 1:1000-1:4000; 1% (w/v) Magermilchpulver); Waschen; Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Vector Laboratories, Orton Southgate, GB; PI-1000, 1:1000; 1% (w/v) Magermilchpulver); Waschen; "Supersignal West Dura" ECL Substrat von Pierce (jetzt: Thermo Scientific).

NACHWEIS MIT DEM BIO-RAD CHEMIDOC SYSTEM: Gleicher Ablauf, aber mit Zweitantikörperverdünnung 1:4000.

Für die Detektion von  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle wurden die Blots nach der GFP-Detektion zunächst von Antikörpern befreit (2% (w/v) SDS, 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 63 mM Tris pH 6,8, 50°C, 45') und dann wie oben beschrieben behandelt, aber mit Anti-Aktin-Antikörper (Sigma-Aldrich, A2066, Kaninchen, 1:4000).

Basispuffer für die Antikörperdetektion war PBS (Sambrook & Russell, 2001) mit 0,05% (v/v) Polysorbat 20.

#### 4.7 Einzelkanalmessungen an primären VSMC

Vaskuläre Muskelzellen (VSMC) wurden prinzipiell, wie von Brenner *et al.* (2000) beschrieben, isoliert und BK Einzelkanalmessungen unterzogen. Der generelle Ablauf der Methode war der folgende:

- Schnelle Präparation der thorakalen Aorta und Überführung in ein sauerstoffbegastetes, pH-gepuffertes Organbad
- Befreiung von Bindegewebe und Zerkleinerung
- Enzymatischer Verdau mit Proteasen und Collagenasen
- *Inside-out Patch Clamp* unter symmetrischen Pufferbedingungen an den isolierten Myozyten
- Stabile Einzelkanalmessungen bei verschiedenen Membranpotentialen und internen Kalziumkonzentrationen über 1-3 Minuten je Bedingung
- Statistische Auswertung der Einzelkanalmessungen über Histogramme mit der Software "Igor" von Wavemetrics

Bei der Präparation der Aorta wurde diese zunächst vom Rückrat mit einer Wecker Federschere von Fine Science Tools abgelöst, bevor sie nahe Herz und Zwerchfell abgetrennt wurde. Es wurde darauf geachtet, die mechanische Belastung auf die Aorta so gering wie möglich zu halten.

Das Protokoll von Brenner *et al.* (2000) wurde dahingehend modifiziert, dass neben höheren Papainkonzentrationen (6 mg/ml Papain, Fluka, 76220) statt Collagenase F/H die Enzymmischung Liberase Blendzyme 1 (120  $\mu$ g/ml) + Blendzyme 2 (60  $\mu$ g/ml) von Roche (Grenzach-Wyhlen) zum Einsatz kam. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug für Papain 10 Minuten und für die Liberase Enzymmischung 15, 18 und 21 Minuten für je ein Drittel der Aorta. Gut messbare Myozyten waren an drei Eigenschaften zu erkennen: Gerade (d.h. unkontrahierte) Stäbchenform, hohe optische Dichte (Lichtkranz-Effekt) und schnelle Ausbildung eines *Gigaseals*.

Die Kalziumkonzentrationen der Bad- und Pipettenlösungen wurden mit dem Farbstoff Fluo4FF und dem "Calcium Calibration Buffer Kit with Magnesium #1" (Invitrogen) eingestellt, die Aufbewahrung erfolgte in Plastikgefäßen. Für die Messpipetten wurden Kapillaren aus dickwandigem Borosilicatglas von Harvard Apparatus verwendet, der Eingangswiderstand betrug 4-6 M $\Omega$ . Die Kanaldichte zeigte eine stark asymmetrische

Verteilung. Der Median der Kanalzahl pro *patch* war 2, unteres Quartil war 1 und oberes Quartil war 9,375. Das Haltepotential zwischen den Messreihen betrug 0 mV. Mess- und primäre Auswertungssoftware war Pulsefit von HEKA (Lambrecht/Pfalz). Weitere Analysen erfolgten mit Igor (Wavemetrics, Hamburg) und MathCad 13 (Mathsoft, Cambridge, MA, USA). Messstandgeräte: HEKA EPC 9; ValveBank 8 II (AutoMate Scientific/Science Products, Hofheim); Axiovert 35 (Zeiss); WR-88 Hydraulischer Mikromanipulator (Narishige, London, GB). Messungen erfolgten verblendet gegenüber den Genotypen.

#### 4.8 Kraftmessungen an Aortenringen

Die Messungen zur vaskulären Kontraktilität in BK $\beta$ 1 KO, BK $\beta$ 1 WT, BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13 Mäusen wurden generell wie von Saskia Plüger beschrieben durchgeführt (Plüger *et al.*, 2000; Plüger-Stegemann, 2000, 25 ml Organbad). Anstelle von Norepinephrin (Konzentrationsreihe von 0,1 nM bis 10  $\mu$ M) wurde jedoch Phenylephrin (PE), ein spezifischer Agonist für den  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor, eingesetzt (10 nM bis 100  $\mu$ M). Die Präparation der Aortenringe erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für den enzymatischen Verdau vor den Einzelkanalmessungen (siehe 4.18). Nach dem graduellen Aufbau einer Vorspannung von 8 mN über 90 Minuten wurde die Kraftentwicklung der 2-3 mm langen Aortenringe unter isometrischen Bedingungen gemessen. Zunächst wurde mit 30 mM KCl auf generelle Funktionalität getestet und anschließend die Kraftentwicklung unter steigenden PE-Konzentrationen ermittelt. Die Unversehrtheit des Gefäßendothels wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ M Acetylcholin getestet, welches zu einer endothel-abhängigen Relaxation der kontrahierten Ringe um 70-100% führte. Alle verwendeten Lösungen wurden täglich frisch angesetzt. Messungen erfolgten verblendet gegenüber den Genotypen.

Zur Analyse wurden Näherungen für die individuellen Messreihen mit der EC50 Dosis-Wirkungskurve durchgeführt und die Maxima für die Genotypen gemittelt:

$$y = \text{MIN} + (\text{MAX} - \text{MIN}) / (1 + (x / \text{EC}_{50})^{\text{slope}})$$

MIN = Minimum, MAX = Maximum, EC<sub>50</sub> = Konzentration für halbmaximale Kraft, *slope* = Hill Koeffizient.

Aus den Arbeiten von Plüger *et al.* (2000) ist der Unterschied des vaskulären Tonus zwischen BK $\beta$ 1 KO und BK $\beta$ 1 WT bereits bekannt, daher wurde auf statistische Signifikanz zwischen den Maxima mit dem einseitigen T-Test nach Welch getestet.

Die Messreihen wurden mit freundlicher Unterstützung von Ariane Schmechel und Thomas Eschenhagen am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

#### 4.9 Chronische Katheter

Die Implantation von chronischen venösen und arteriellen Kathetern erfolgte in folgenden Schritten:

1. Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (120  $\mu\text{g} / \text{g}_{\text{KG}}$ ) und Xylazin (11  $\mu\text{g} / \text{g}_{\text{KG}}$ )
2. Überprüfen auf völliges Fehlen von Reflexen und Kneifen mit der Pinzette (Schmerzreiz) vor Beginn des Eingriffs und in regelmäßigen Abständen während des Eingriffs; gegebenenfalls weitere Gabe von Ketamin, Desinfektion.
3. Analgesie durch subkutane Injektion von Carprofen (8  $\mu\text{g} / \text{g}_{\text{KG}}$ )
4. Subkutane Antibiotikaphylaxe mit Enrofloxacin (5  $\mu\text{g} / \text{g}_{\text{KG}}$ )
5. Inzision (5-7 mm) in der linken Leiste
6. Durchtrennung der Haut und des Subkutangewebes
7. Freipräparieren der Gefäß-Nerven-Straße
8. Trennung des *Nervus femoralis* von *Arteria* und *Vena femoralis*
9. Untertunnelung und Trennung der Arterie von der Vene
10. Einführen eines Katheters in die *Vena femoralis* und anschließend in die *Arteria femoralis*
11. Fixierung der beiden Katheter mittels Mersilene 6.0 Haltefaden
12. Untertunnelung des subkutanen Hautgewebes und Ausführung der beiden Katheter im Nacken
13. Einnah einer Metallfeder im Nackenfell als Katheterschutz
14. Hautnaht

Die Tiere benötigten 2-3 Tage, um sich vollständig von der Operation zu erholen. Nach drei Tagen zeigten sie normales Trink- und Essverhalten und normale Trinkmengen. Trotz der leichten Einschränkung der Beweglichkeit durch die Metallfeder waren die Mäuse aktiv und betrieben Nestbau. Blutdruck und Puls konnten jederzeit unbemerkt mit Transducern (Typ TBD-1222) der Firma FMI Föhr Medical Instruments (Seeheim-Ober Beerbach) gemessen werden. Die Messdaten wurden kontinuierlich mit dem Softwareprogramm "Labtech

Notebook" (Omega Engineering; Deckenpfronn) aufgezeichnet. Die anschließende Auswertung erfolgte durch das Datenverarbeitungsprogramm "Igor" (Wavemetrics). Die Katheter wurden durch Ausziehen von Polyurethanschläuchen (Braintree Scientific, MA, USA; Micro-Renathane Type MRE-040; 0.040 O.D.; 0.025 I.D.) über einem Heißluftstrom der Firma Leister (Kaegiswil/Switzerland; Triac S 230 V, 50/60 Hz, 7A, 1600 W, *setting* 5,25) handgefertigt. Operationen und Blutabnahmen erfolgten verblendet gegenüber den Genotypen.

#### 4.10 Blutentnahmen

PUNKTION DER WANGE: Durchführung nach Golde *et al.*, 2005. Mäuse wurden im Haltegriff fixiert, die Wange am Venenplexus mit einer 5 mm Lanzette (Akku-check Softclix Pro von Roche Diagnostics) angestochen und das austropfende Blut in einem Plastikgefäß, das 5  $\mu$ l EDTA (300 mM) enthält, aufgefangen. Nach Lockerung des Haltegriffs endete die Blutung durch den Wegfall des Blutstaus. Abhängig von der zu bestimmenden Plasmakomponente wurden die Mäuse vor der Abnahme durch 2,5% Isofluran (Trärgas: Sauerstoff) oder CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> Gemisch (80:20) vorübergehend betäubt. Bei einigen Experimenten wurde ein Teil der Blutentnahmen freundlicherweise von Mareike Buddack (Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des UKE in Hamburg) durchgeführt (Renin Bestimmung, Abb. 4; Angiotensin II Bestimmung, Abb. 5).

UNTER NARKOSE OHNE WIEDERERWACHEN: Mäuse wurden durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (120  $\mu$ g / g<sub>KG</sub>) und Xylazin (16  $\mu$ g / g<sub>KG</sub>) anästhesiert. Nach dem vollständigen Eintritt der Narkose erfolgte eine Inzision (5-7 mm) in der linken Leiste und das Freipräparieren der Gefäß-Nerven-Straße. Arterie und Vene wurden untertunnelt und getrennt. Anschließend wurde ein Katheter in die *Arteria femoralis* eingeführt und mittels Haltfäden fixiert. Durch diesen Katheter lief das Blut in ein Plastikgefäß mit 10  $\mu$ l EDTA (300 mM). Nach Abschluss der Blutentnahme wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Es wurden die gleichen handgefertigten Katheter wie für chronische Messungen verwendet.

AUS DEM HERZ POST MORTEM: Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> Gemisch (80:20) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach dem Öffnen des Brustkorbs erfolgte die Abnahme des Blutes aus dem rechten Ventrikel mit einer 0,9 mm Kanüle bei zeitgleicher Punktion des linken Ventrikels. Spritzen enthielten vorab 5  $\mu$ l EDTA (300 mM).

BEI TIEREN MIT CHRONISCH IMPLANTIERTEN KATHETERN: Der Plastikschlauch der arteriellen Katheter wurde von den Mäusen unbemerkt durchtrennt, woraufhin durch den endogenen Druck das Blut der Mäuse in den Katheter stieg. Bei 250  $\mu$ l Volumen wurde die Entnahme durch Abklemmen des Katheters gestoppt und die Blutprobe in ein Plastikgefäß mit 5  $\mu$ l EDTA (300 mM) überführt. Anschließend wurden die Tiere durch Injektion von Pentobarbital (300  $\mu$ g / g<sub>KG</sub>) in den venösen Katheter getötet.

Alle von mir durchgeführten Abnahmen erfolgten verblendet gegenüber den Genotypen. Außer bei den Abnahmen für Aldosteronbestimmungen wurde das gewonnene Blut umgehend auf Eis gekühlt. Plasma wurde durch Abnahme des Überstandes nach Zentrifugation des Blutes bei 600g und 4°C für 10 Minuten gewonnen. Bei den Abnahmen über chronische Katheter und über submandibuläre Punktion wurden die Tiere zuvor für mindestens 2 Stunden in absoluter Ruhe gehalten. Alle Abnahmen lagen innerhalb der ersten drei Stunden der Dunkelphase.

#### **4.11 Aldosteron Bestimmung**

Der Aldosterongehalt von Plasmaproben aus chronisch katheterisierten oder an der Wange punktierten Mäusen wurde mittels *Radioimmunoassay* (RIA) bestimmt. Dazu wurde das Kit "Coat-A-Count Aldosterone" von DPC Biermann (Bad Nauheim) eingesetzt. Das Nachweisprinzip ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem Aldosteron von den Bindungsstellen festphasenfixierter Aldosteron-Antikörper durch das Aldosteron der Probe. Die Kreuzreaktivität zu Corticosteron betrug laut Hersteller 0,002%. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

Aufgrund der geringen Plasmamengen wurde das Probenvolumen auf 75  $\mu$ l reduziert und auf 200  $\mu$ l mit Nullstandard aufgefüllt. Der Nachweis von zugegebenem Aldosteron wurde durch Mausplasma nicht beeinflusst (*recovery*) und die Nachweisgrenze des Assays (2  $\sigma$  über Hintergrund) betrug 50 pM.

### 4.12 Renin Bestimmung

Zur Bestimmung der Reninkonzentration im Plasma von BK $\beta$ 1 KO und BK $\beta$ 1 WT Mäusen wurden eine von mir entwickelte Methode verwendet, die auf der Umsetzung eines fluoreszenzmarkierten Peptidsubstrats durch Renin basiert. Als Vorlage diente dazu eine analoge Methode für humanes Renin (Wang *et al.*, 1993). Die Sequenz des Peptidsubstrats (siehe Appendix 10.2.9) wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der von Ratten-Angiotensinogen angeglichen.

Plasmaproben wurden zu Beginn um den Faktor 4 mit MalTris-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Natriummaleat, 33 mM Tris, pH 8,0) vorverdünnt. Die Messung erfolgte mit dem Lumineszenz Spektrometer LS50B der Firma PerkinElmer (Rodgau) in 150  $\mu$ l Reaktionspuffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% (v/v) DMSO, 50 mM Tris pH 8,0) mit einer Plasmaendkonzentration von 1,0% oder 3,0% und einer Peptidsubstratkonzentration von 20  $\mu$ M. Der apparente  $K_M$ -Wert für das Substrat unter diesen Bedingungen betrug 1  $\mu$ M. Die Reaktion ließ sich durch Zugabe von Pepstatin, einem Inhibitor für Aspartatproteasen, unterdrücken. Als Einheit diente Picokatal pro mL, also die Umsetzung von einem Picomol Substrat pro Sekunde pro Milliliter. Die Umsetzung erfolgte nicht unter Standardbedingungen - dieser Umstand wurde in der Einheit mit einem Apostroph kenntlich gemacht ( $\text{pkat}'\cdot\text{mL}^{-1}$ ). 1  $\text{pkat}'\cdot\text{mL}^{-1}$  entspricht  $4,666 \mu\text{g}_{\text{AngI}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Es wurde 4 Stunden im Dunkeln bei 37°C inkubiert und anschließend anhand der Standards die Geschwindigkeit der Angiotensin I Bildung aus der Fluoreszenzintensität errechnet. Als Standards dienten ungespaltenes Substrat (Basissignal) und mit Proteinase K vollständig gespaltenes Substrat (maximales Signal). Alle Messwerte lagen im linearen Bereich der Funktion von Fluoreszenz in Abhängigkeit der Standardkonzentration. Die Nachweisgrenze des Assays ( $2 \sigma$  über Hintergrund) war abhängig von der Verdünnung und betrug bei 10% Plasmaendkonzentration  $0,015 \text{ pkat}'\cdot\text{mL}^{-1}$ . Messergebnisse bei der Fluoreszenzassay Methode waren deutlich höher als bei der Rattenangiotensinogen Methode (Faktor  $6.0 \pm 0.8$  bei Doppelbestimmung gleicher Proben mit beiden Assays;  $n = 11$ ).

### 4.13 Angiotensin II Bestimmung

Die Angiotensin II (Ang II) Konzentration in Plasmaproben von CO<sub>2</sub> betäubten Mäusen wurde mittels EIA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) bestimmt. Die Abnahme erfolgte durch Punktion der Wange. Für den EIA wurde das Kit "Angiotensin II EIA-Kit Host: Rabbit high Sensitivity" von Bachem (St. Helens, GB) eingesetzt. Das Detektionsprinzip ist die Verdrängung von biotinyliertem Ang II von den Bindungsstellen festphasenfixierter Ang II - Antikörper durch das Ang II der Probe und anschließende Bindung von HRP-gekoppeltem Streptavidin und Umsetzung eines chromogenen Substrats. Der Assay differenzierte nicht zwischen Angiotensin II und Angiotensin III, das auch adrenale *Zona Glomerulosa* AII Rezeptoren binden kann (Braley, 1983) und aldosteronstimulierende Wirkung hat (Zager & Luetscher, 1982).

Für den Test wurde das Plasma zuvor mit dem "S5000 Extraction Kit" von Bachem über Umkehrphasenchromatographie extrahiert, lyophilisiert und in 125  $\mu$ l Wasser rekonstituiert. Jede Probe wurde doppelt bestimmt, das Einzelvolumen betrug 50  $\mu$ l.

Der Nachweis von zugegebenem Angiotensin II wurde durch den Vorgang der Extraktion und die Anwesenheit von Mausplasma nicht beeinflusst (*recovery*). Die Nachweisgrenze des Assays (2  $\sigma$  über Hintergrund) betrug bei 50  $\mu$ l Plasmavolumen 100 pM (5 fmol).

### 4.14 Adrenomedullin Bestimmung

Die Plasmakonzentration von Adrenomedullin (ADM) wurde mittels RIA bestimmt. Die Abnahme des Blutes erfolgte durch Punktion der Wange unter Isoflurannarkose, da eine CO<sub>2</sub> Narkose einen starken Anstieg der Adrenomedullinkonzentration induziert. Es wurde das Kit "Adrenomedullin (rat) - RIA Kit, Host: Rabbit" von Bachem eingesetzt. Das Detektionsprinzip ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem ADM von den Bindungsstellen festphasenfixierter Anti-ADM-Antikörper durch das ADM der Probe. Für den Test wurde das Plasma zuvor mit dem "S5000 Extraction Kit" von Bachem über Umkehrphasenchromatographie extrahiert, lyophilisiert und je nach zu erwartender ADM-Konzentration in 300  $\mu$ l oder 500  $\mu$ l Wasser rekonstituiert. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

Der Nachweis von zugegebenem ADM wurde durch den Vorgang der Extraktion und die Anwesenheit von Mausplasma nicht beeinflusst (*recovery*). Die Nachweisgrenze des Assays ( $2\sigma$  über Hintergrund) betrug 30 pM.

#### **4.15 Endothelin-1 Bestimmung**

Endothelin-1 (ET-1) Konzentrationen im Blutplasma von Mäusen wurden mit Hilfe des Kits "Quantiglo Human Endothelin-1 Immunoassay" von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) bestimmt. Die Abnahme des Blutes erfolgte durch Punktion der Wange unter Isoflurannarkose. Das Detektionsprinzip ist die Bindung von ET-1 an festphasenfixierte Anti-ET-1-Antikörper und anschließende Bindung von HRP-gekoppeltem monoklonalem Zweitantikörper, der durch den Umsatz eines Luminol- / peroxidhaltigen Substrats nachgewiesen wird. Zur Lumineszenzmessung wurde der "Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter" von Perkin Elmer eingesetzt. Es wurden Plasmaproben zwischen 20 und 150  $\mu$ l Volumen berücksichtigt, bei mehr als 90  $\mu$ l wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Werte eines jeden Tieres gingen mit dem arithmetischen Mittel seiner Werte in die statistische Auswertung ein. Der Nachweis von zugegebenem ET-1 wurde durch die Anwesenheit von Mausplasma nicht beeinflusst (*recovery*). Die Nachweisgrenze des Assays ( $2\sigma$  über Hintergrund) betrug 70 fM.

#### **4.16 Telemetrische Blutdruckmessung**

Zur Blutdruckmessung an wachen, frei beweglichen Mäusen wurden miniaturisierte PhysioTel PA-C10 Telemetrie-Sender der Firma Data Sciences International (Minnesota, USA) eingesetzt. Da das Gewicht des Telemetrie-Senders nur 1,4 g betrug, erfolgte die Messung der Tiere stressfrei und völlig unbemerkt. Die Sender ermöglichten die Aufzeichnung von Pulsrate, Blutdruck und motorischer Aktivität der Mäuse. Die notwendigen Katheter wurden analog zu den chronischen Kathetermessungen durch Ausziehen von Polyurethanschläuchen über einem Heißluftstrom handgefertigt.

Die Implantation der Telemetrie-Sender erfolgte in folgenden Schritten:

1. Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (120  $\mu\text{g}$  / g<sub>KG</sub>) und Xylazin (16  $\mu\text{g}$  / g<sub>KG</sub>)
2. Überprüfen auf völliges Fehlen von Reflexen und Kneifen mit der Pinzette (Schmerzreiz) vor Beginn des Eingriffs und in regelmäßigen Abständen während des Eingriffs; gegebenenfalls weitere Gabe von Ketamin. Desinfektion.
3. Analgesie durch subkutane Injektion von Carprofen (8  $\mu\text{g}$ /g<sub>KG</sub>)
4. Subkutane Antibiotikaprophylaxe mit Enrofloxacin (5  $\mu\text{g}$  / g<sub>KG</sub>)
5. Ventrale Inzision (~3cm) submandibulär beginnend bis zum *Sternum*
6. Durchtrennung der Haut und des Subkutangewebes
7. Freipräparieren der Gefäß-Nerven-Straße der linken *Arteria carotis*
8. Trennung der *Arteria carotis* von der Gefäß-Nerven-Straße
9. Untertunnelung und Trennung der Arterie von der Vene
10. Einführen des Katheters des Telemetrie-Senders in die *Arteria carotis*
11. Fixierung des Katheters mit Hilfe eines Haltefadens
12. Präparation einer kleinen Tasche (1,5 x 1,5 cm) im rechten Flankenbereich unterhalb der Vorderläufe
13. Platzierung des Telemetrie-Senders in der Tasche
14. Hautnaht

Nach Implantation der Telemetrie-Sender wurden die Tiere wieder in ihre ursprünglichen Käfige gesetzt und verblieben bis zum Versuchsende dort. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* und konnten sich frei im Käfig bewegen. Messbeginn war 1-2 Wochen nach Implantation des Senders. Bis dahin hatten sich die Tiere vom operativen Eingriff vollständig erholt und die Wundheilung war vollständig abgeschlossen. Der Tag/Nachtrhythmus, der in den ersten Tagen nach der Operation noch verändert war, war bis zu diesem Zeitpunkt wieder völlig normal (siehe auch: Butz & Davisson, 2001).

Während der für die Tiere unbemerkbaren Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz wurden die gemessenen Daten über den Sender kontinuierlich auf einen Computer übertragen (Registrierung von 60 Sekunden Intervallen alle 5 Minuten). Die Auswertung geschah mit Hilfe der Software "Dataquest ART Data Aquisition" (Data Sciences International) und "Igor" (Wavemetrics). Operationen und Messungen erfolgten verblendet gegenüber den Genotypen.

#### 4.17 Herz zu Körpergewicht Bestimmung

Zur Quantifizierung kardialer Hypertrophie wurden Mäusen nach Betäubung mit Isofluran gewogen und anschließend dekapitiert. Die vollständigen Herzen wurden entnommen, von umliegendem Bindegewebe und hervorstehenden Gefäßenden befreit, auf Fließpapier ausgeblutet und ungetrocknet gewogen. Das Durchschnittsalter betrug 20-25 Wochen bei allen Genotypen und Mauslinien.

#### 4.18 Statistik

*Datenverteilung und Signifikanztests:* Die Verteilung der Daten wurde im Histogramm evaluiert. Die meisten Größen in lebenden Organismen, insbesondere physiologische, zeigen eine logarithmische Normalverteilung (siehe dazu Zhang & Popp, 1994). Bei relativ kleinen Stichproben ( $< 50$ ) können daher in erster Näherung parametrische Methoden wie Varianzanalyse und der Student'sche T-Test effektiv zur Auswertung verwendet werden. Da bei der Dysregulation physiologischer Werte oft nicht nur der Mittelwert, sondern auch die Streuung der Werte beeinflusst ist, wurde Welchs T-Test verwendet. Dies ist eine Modifikation des Student'schen T-Test, die auch ungleiche Varianz zwischen Gruppen berücksichtigt.  $\alpha < 0,05$  galt als Kriterium für statistische Signifikanz (Risiko eines Fehlers 1. Art sei unter 5%).

*Korrektur bei Mehrfachvergleichen:* Wenn von mehreren Vergleichen eines experimentellen Ansatzes ein einzelner Vergleich zum Belegen einer Aussage herangezogen wurde, aber andere Vergleiche als Beleg für die gleiche oder eine gleichrangige Aussage hätte dienen können, so wurde das Signifikanzkriterium  $\alpha$  nach Bonferroni korrigiert. Die Markierung eines Wertes oder Vergleiches mit einem Asterisk (\*) impliziert immer eine Aussage.

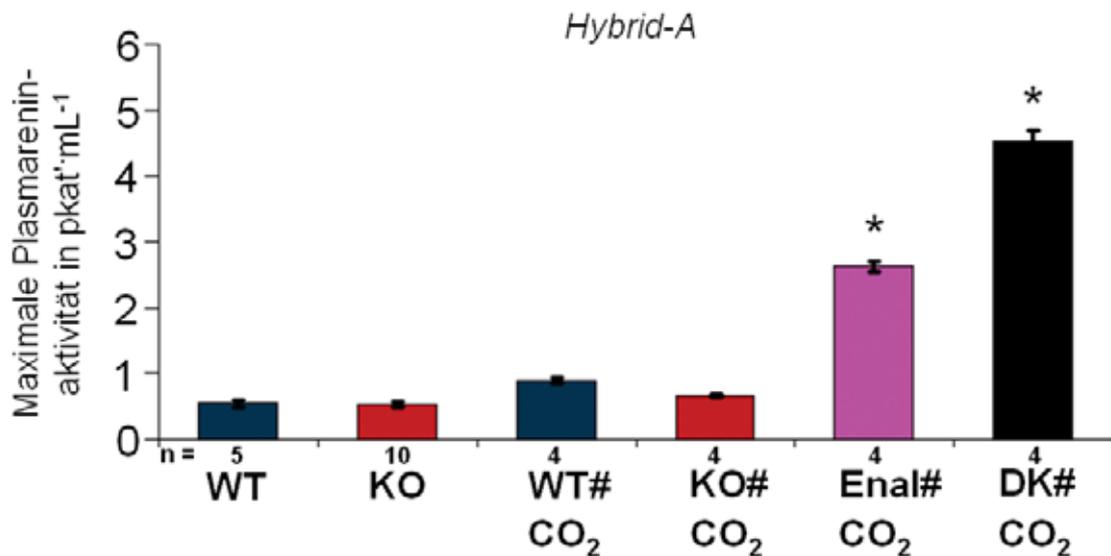
*Darstellungen:* Durchschnittswerte bezeichnen das arithmetische Mittel und Fehlerbalken den Standardfehler der Stichproben, ein Asterisk in Abbildungen markiert statistisch signifikante Unterschiede. Der Ausdruck "signifikant" im Text bezeichnet nur eine statistische Einschätzung, dass ein Ergebnis nicht durch Zufall entstanden ist und soll *eo ipso* keine Bedeutsamkeit implizieren.

*Verwendete Software:* Statistica Professionell (StatSoft), Microsoft Office Excel (Microsoft), KaleidaGraph 3.0 (Synergy Software).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Unverändertes Renin und Angiotensin II in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Wie in den Vorarbeiten gezeigt wurde, ist ein primärer Hyperaldosteronismus in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen aufgrund der unveränderten Aldosteronsekretion (2.2.) und der pharmakologischen Experimente (2.3) unwahrscheinlich. Eine einfache Erklärung für die erhöhten Plasmaaldosteronwerte wäre eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Renin und damit auch von Angiotensin II. Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar, zum Beispiel eine - durch den in BK $\beta$ 1 KO Tieren gesteigerten Vasotonus - verminderte renale Durchblutung, die wie von Goldblatt *et al.* (1934) beschrieben zu einer Hypertonie führen kann, oder ein direkter oder parakriner Effekt auf juxtaglomeruläre Zellen, die entwicklungsbiologisch aus der glatten Muskulatur der renalen Arteriolen



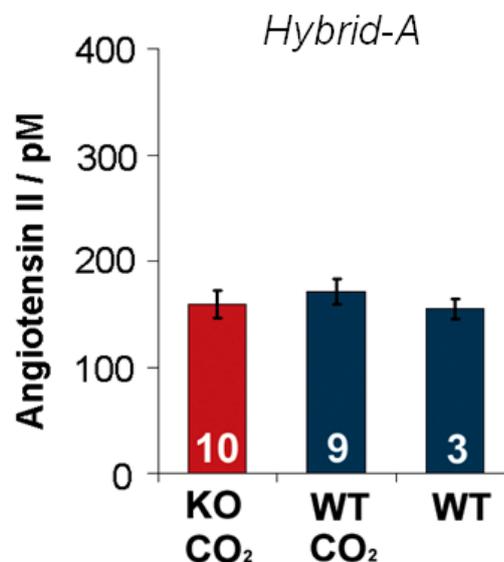
**Abb. 4: Renin im Plasma von Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen**

**BK $\beta$ 1 KO** Mäusen und **BK $\beta$ 1 WT** Kontrolltieren wurde über Punktion der Wange ohne Narkose Blut entnommen und die Plasmapareninaktivität unter Substratsättigung mittels Fluoreszenzassay (siehe 4.12) bestimmt. 1 pkat' entspricht 4,666  $\mu\text{g}_{\text{AngI}}\cdot\text{h}^{-1}$ ; Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; Zahlen im Balken = Tierzahl. **Kontrollen (#)**: Plasmapools von Mäusen unter folgenden Bedingungen: **CO<sub>2</sub>**: Abnahme unter CO<sub>2</sub>-Narkose; **Enal**: Enalapril Behandlung vor Entnahme, 4 Tage, 60  $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{KG}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; **DK**: Dekapitation und Blutentnahme *post mortem* aus dem Herzen. Fehlerbalken =  $\sigma_n$  der Messwiederholungen; Zahlen im Balken = Messwiederholungen; \* = statistisch signifikant unterschiedlich zu "WT # CO<sub>2</sub>".

hervorgehen (Hackenthal *et al.*, 1990). Zur Überprüfung dieser Annahme bestimmte ich die Plasmakonzentration von Renin und Angiotensin II im Blut von BK $\beta$ 1 KO Tieren und BK $\beta$ 1 WT Kontrollen der Sub-Linie Hybrid-A.

Die Mäuse wurden für die Reninbestimmungen für mindestens zwei Stunden vor der Abnahme in absoluter Ruhe gehalten, um zu vermeiden, dass die Werte durch Stress bei der Blutabnahme verfälscht wurden. Die Blutabnahmen erfolgten über Punktion der Wange. Ein Vorabtest zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Abnahmen unter CO<sub>2</sub> oder Isofluran Narkose. Schnelle Abnahmen ohne Narkose (25-40 Sekunden) lieferten tendenziell erhöhte Werte (ohne Abbildung), die niedrigsten Reninwerte ergaben sich mit sehr schnellen (< 25 Sekunden) Abnahmen ohne Narkose. Mit der letztgenannten Abnahmemethode wurden die Plasmareninkonzentrationen sowohl von BK $\beta$ 1 KO Mäusen als auch von BK $\beta$ 1 WT Kontrollen bestimmt (Abb. 4). Als Maß für die Reninkonzentration galt dabei die enzymatische Aktivität unter Substratsättigung. Die Nachweismethode war ein von mir selbst entwickelter Fluoreszenzassay (siehe Methoden 4.12).

Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied feststellbar (BK $\beta$ 1 WT:  $0,54 \pm 0,06$  pkat $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, n = 5; BK $\beta$ 1 KO:  $0,52 \pm 0,04$  pkat $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, n = 10), obwohl die Methode für Unterschiede in der Plasmareninkonzentration sensitiv war, wie



**Abb. 5: Plasma Angiotensin II Konzentration in BK $\beta$ 1 KO Mäusen**

BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren wurde unter CO<sub>2</sub> Narkose Blut mittels Punktion der Wange entnommen und die Angiotensin II Konzentration im Plasma mittels EIA bestimmt. Als Kontrolle wurde BK $\beta$ 1 WT Mäusen über chronische Katheter ohne Narkose Blut entnommen. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; Zahlen im Balken = n.

Kontrollen mit Plasmapools von CO<sub>2</sub> - narkotisierten, Enalapril-behandelten oder dekapitierten Mäusen zeigten (Abb. 4).

Zur Bestimmung der Plasmakonzentration von Angiotensin II in BK $\beta$ 1 KO Mäusen wurde Proben über Punktion der Wange unter CO<sub>2</sub>-Narkose entnommen. Wie für Renin war auch für Angiotensin II kein signifikanter Unterschied der Plasmakonzentration zwischen BK $\beta$ 1 KO Mäusen ( $159 \pm 13$  pM, n = 10) und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren ( $172 \pm 12$  pM, n = 9) nachweisbar (Abb. 5). Um auszuschließen, dass eine durch die CO<sub>2</sub> Narkose hervorgerufene Aktivierung des sympathischen Nervensystems zu artifiziell erhöhten Angiotensin II Werten geführt hatte, wurde auch die Angiotensin II Konzentration im Plasma von nicht narkotisierten, chronisch katheterisierten BK $\beta$ 1 WT Tieren bestimmt. Sie war im Vergleich zu den CO<sub>2</sub> narkotisierten Tieren unverändert ( $155 \pm 9$  pM, n = 3).

Zusammengenommen ließ sich feststellen, dass die Plasmakonzentration von Hormonen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die dem Aldosteron vorgeschaltet sind, in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen nicht erhöht waren und somit nicht die Ursache des beobachteten Hyperaldosteronismus waren.

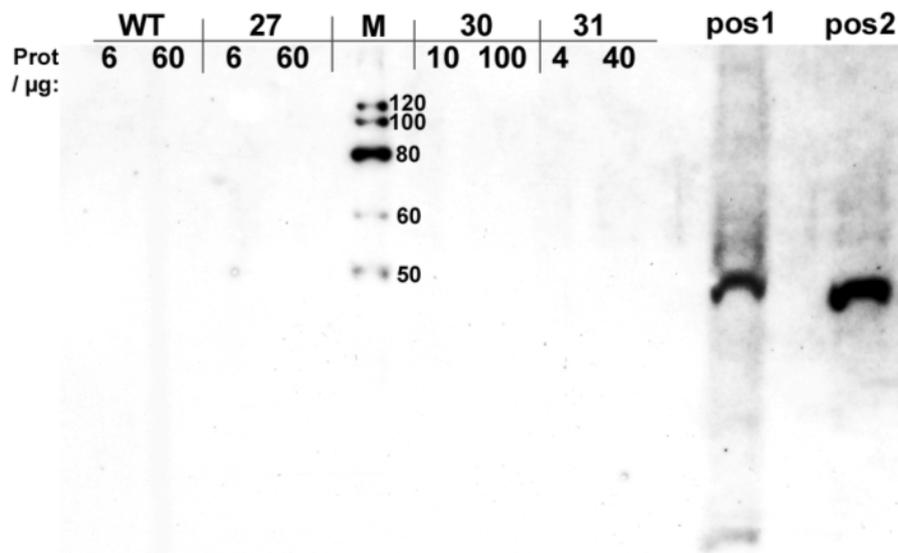
## 5.2 Keine Expression von BK $\beta$ 1-E unter dem 441 bp sm22 $\alpha$ Promotor

Eine andere mögliche Ursache für Hyperaldosteronismus in BK $\beta$ 1 KO Mäusen wäre ein renaler Mechanismus über eine defekte Kaliumsekretion (Grimm *et al.*, 2009a; Grimm *et al.*, 2009b), die Gewebespezifität des aldosteron- und blutdrucksteigernden Effekts in BK $\beta$ 1 KO Mäusen ist bisher jedoch nicht auf genetischem Wege untersucht worden. Eine Möglichkeit zur Klärung der Langzeitregulation des Blutdrucks durch die  $\beta$ 1 Untereinheit des BK Kanals in der glatten Muskulatur ist, die BK $\beta$ 1 Untereinheit ausschließlich in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu re-exprimieren und die Auswirkungen dieser Re-Expression auf Aldosteron und Blutdruck zu überprüfen. Dazu generierte ich transgene Mäuse, bei denen die BK $\beta$ 1 Untereinheit unter der Kontrolle eines für glatte Muskulatur spezifischen Promotorfragments stand, mit dem Ziel, sie anschließend in die BK $\beta$ 1 KO Mauslinie einzukreuzen. Um transgenes BK $\beta$ 1 von endogenem BK $\beta$ 1 unterscheiden zu können und da

keine tauglichen Antikörper gegen die BK $\beta$ 1 Untereinheit zur Verfügung standen, wurde die transgene Untereinheit C-terminal mit EGFP markiert (BK $\beta$ 1-E).

Als Promotor für das Transgen wurde zunächst das Fragment "441 bp sm22a" des Transgelin/sm22a Promotors verwendet, welches auch ein Intron enthält (siehe Appendix 10.2.2). Für dieses Fragment wurde eine bevorzugte Expression in arterieller vaskulärer Muskulatur beschrieben (Moessler *et al.*, 1996). Es konnte jedoch in keiner der drei Founderlinien mit genomisch integriertem Transgen eine Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 6). Auch der Nachweis über Immunfluoreszenzfärbungen an Aorta, dissoziierten Myozyten und Embryonalschnitten war negativ (ohne Abbildung).

Obwohl für das verwendete Promotorfragment eine Expression in adulten Tieren publiziert ist (Li *et al.*, 1996), wurde für das homologe Fragment aus dem humanen Transgelin Gen eine graduelle Abschaltung in der adulten Maus berichtet (Xu *et al.*, 2003). Neuere Berichte beschreiben auch für andere transgene Konstrukte mit Fragmenten des Transgelinpromotors Probleme bei der Expression und hohe Variabilität zwischen Founderlinien (Lee *et al.* & Handa *et al.*, 2005). Es war daher für die Fortführung des transgenen Ansatzes notwendig, ein anderes Promotorfragment einzusetzen.



**Abb. 6: Expression von BK $\beta$ 1-E in der Aorta von *Tagln-BK $\beta$ 1E* transgenen Mäusen**

Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der Expression des transgenen BK $\beta$ 1-E Proteins mit Anti-EGFP Antikörpern und Chemolumineszenznachweis. **WT**: Kontrolltier; **27,30,31**: Nachkommen der drei Founder; **M**: Magicmark Proteinmarker (Invitrogen), Größen in kD; **pos1**: BK $\beta$ 1-E aus Zellkulturaufschluss; **pos2**: EGFP Fusionsprotein aus Hirnlysat. **Prot**: Gesamtprotein aus Aorta in den angegebenen Auftragsmengen pro Gelbahn. Die höhere Zahl entspricht der jeweils höchstmöglichen Auftragsmenge.

### 5.3 BK $\beta$ 1 R Mäuse exprimieren BK $\beta$ 1-E in der glatten Muskulatur

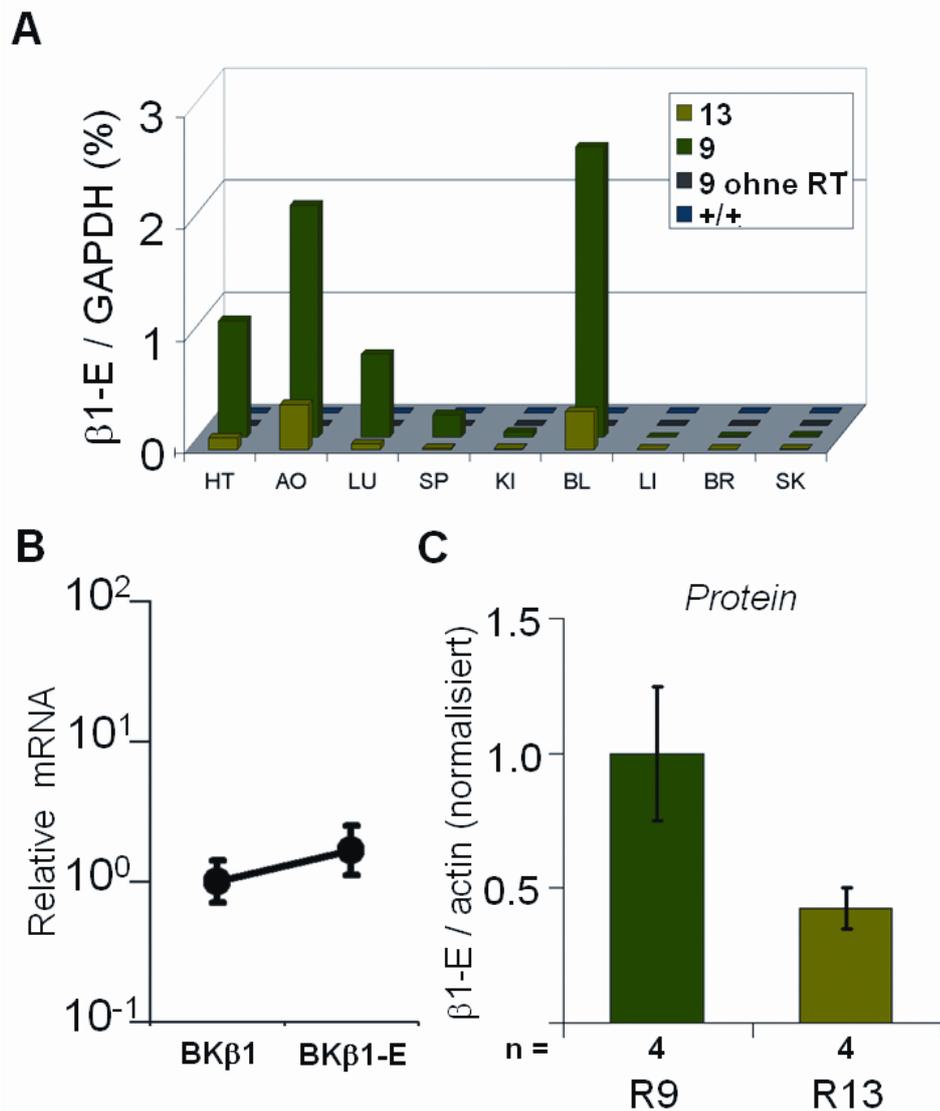
Ich verwendete daraufhin ein Konstrukt mit dem Promotorfragment "p2600Int" des *Acta2* Gens, für welches eine intensive Expression in sowohl vaskulärer als auch viszeraler glatter Muskulatur beschrieben wurde (Mack & Owens, 1999). Nach einer vorausgehenden Erhaltungsverpaarung mit C57BL/6J Mäusen wurde das Transgen anschließend in die Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mauslinie eingekreuzt. Der so entstandene Genotyp wird im Folgenden mit BK $\beta$ 1 R abgekürzt. Es wurden zwei unabhängige Founderlinien eingesetzt, deren Benennung nach ihren Geburtsnummern erfolgte: BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13.<sup>2</sup> Abbildung 7A zeigt repräsentative Expressionsmuster des BK $\beta$ 1-E Transgens auf mRNA Ebene für je ein Tier der Linie BK $\beta$ 1 R9, BK $\beta$ 1 R13 und BK $\beta$ 1 WT, die mit TaqMan PCR bestimmt wurden. Zur Quantifizierung wurde auf das mRNA-Niveau des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Gewebeproben eines transgenen Tieres ohne reverse Transkription dienten als Negativkontrolle auf Amplifikation genomischer DNA. Das Ergebnis stand im Einklang mit der für diesen Promotor publizierten selektiven Expression in der glatten Muskulatur (Mack & Owens, 1999).

Die mRNA Expressionsstärke des BK $\beta$ 1 R9 Transgens und der endogenen BK $\beta$ 1 mRNA in Organen mit hohem Anteil an glatter Muskulatur (Aorta, Niere, Blase und Dickdarm) waren vergleichbar (Abb. 7B), mit einem tendenziell, aber statistisch nicht signifikant erhöhtem Wert für die mRNA des Transgens. Um Fehlerquellen zu minimieren wurden hierbei transgene BK $\beta$ 1 WT Tiere verwendet, so dass die mRNAs beider Proteine aus den gleichen Proben amplifiziert werden konnte.

Wie schon für die mRNA war auch auf Proteinebene die Expressionstärke des BK $\beta$ 1 R13 Transgens tendenziell schwächer als die des BK $\beta$ 1 R9 Transgens, der Unterschied zwischen den beiden Founderlinien war jedoch nicht statistisch signifikant (R9:  $1,00 \pm 0,25$ ; R13:  $0,42 \pm 0,08$ ; n = 4; p = 0,10; Abb. 7C). Zur Quantifikation diente ein densitometrischer Nachweis HRP-gekoppelter Antikörper per Chemolumineszenz auf Anti-GFP Western Blots. Ausgangsmaterial war Gesamtprotein aus der Blase, Anti-Aktin diente zur Normalisierung.

<sup>2</sup> Die offizielle Nomenklatur für den Genotyp BK $\beta$ 1 R9 ist "*Kcnmb1*<sup>-/-</sup> Tg(*Acta2-BK $\beta$ 1E*)9Pong" und die für den Genotyp BK $\beta$ 1 R13 ist "*Kcnmb1*<sup>-/-</sup> Tg(*Acta2-BK $\beta$ 1E*)13Pong"

Diese Ergebnisse zeigten, dass die transgene BK $\beta$ 1-E Untereinheit in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 R Mäusen exprimiert wurde und deuteten auf eine vergleichbare Expressionsstärke von endogenem BK $\beta$ 1 und transgenem BK $\beta$ 1-E in diesen Tieren hin.



**Abb. 7: Expressionsprofil des BK $\beta$ 1-E Transgens**

**A:** Repräsentatives Expressionsmuster auf mRNA Ebene für je ein Tier der Linie BK $\beta$ 1 R9, BK $\beta$ 1 R13 und BK $\beta$ 1 WT. Bestimmung durch TaqMan Realtime PCR. **ohne RT:** Negativkontrollen für transgenes Tier ohne reverse Transkription. **HT:** Herz; **AO:** Aorta; **LU:** Lunge; **SP:** Milz; **KI:** Niere; **BL:** Blase; **LI:** Leber; **BR:** Gehirn; **SK:** Skelettmuskulatur. **B:** Relative Expressionsstärke von BK $\beta$ 1-E Transgen und endogenem BK $\beta$ 1 in *Kcnmb1<sup>+/+</sup> Tg(Acta2-BK $\beta$ 1E)9Pong* Mäusen. Bestimmung wie bei A. Gemittelt aus je 4 Organen (AO, KI, BL und Dickdarm) aus je 3 Tieren. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ . **C:** Relative Proteinexpression in der glatten Muskulatur (Blase) von BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13 Mäusen. Chemolumineszenz-densitometrischer Nachweis auf Anti-EGFP Western Blots. Anti-Actin Banden dienten als Ladekontrolle. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ , Zahlen der Tiere = n.

#### 5.4 Wiederhergestellte BK Kanalaktivität in BK $\beta$ 1 R Mäusen

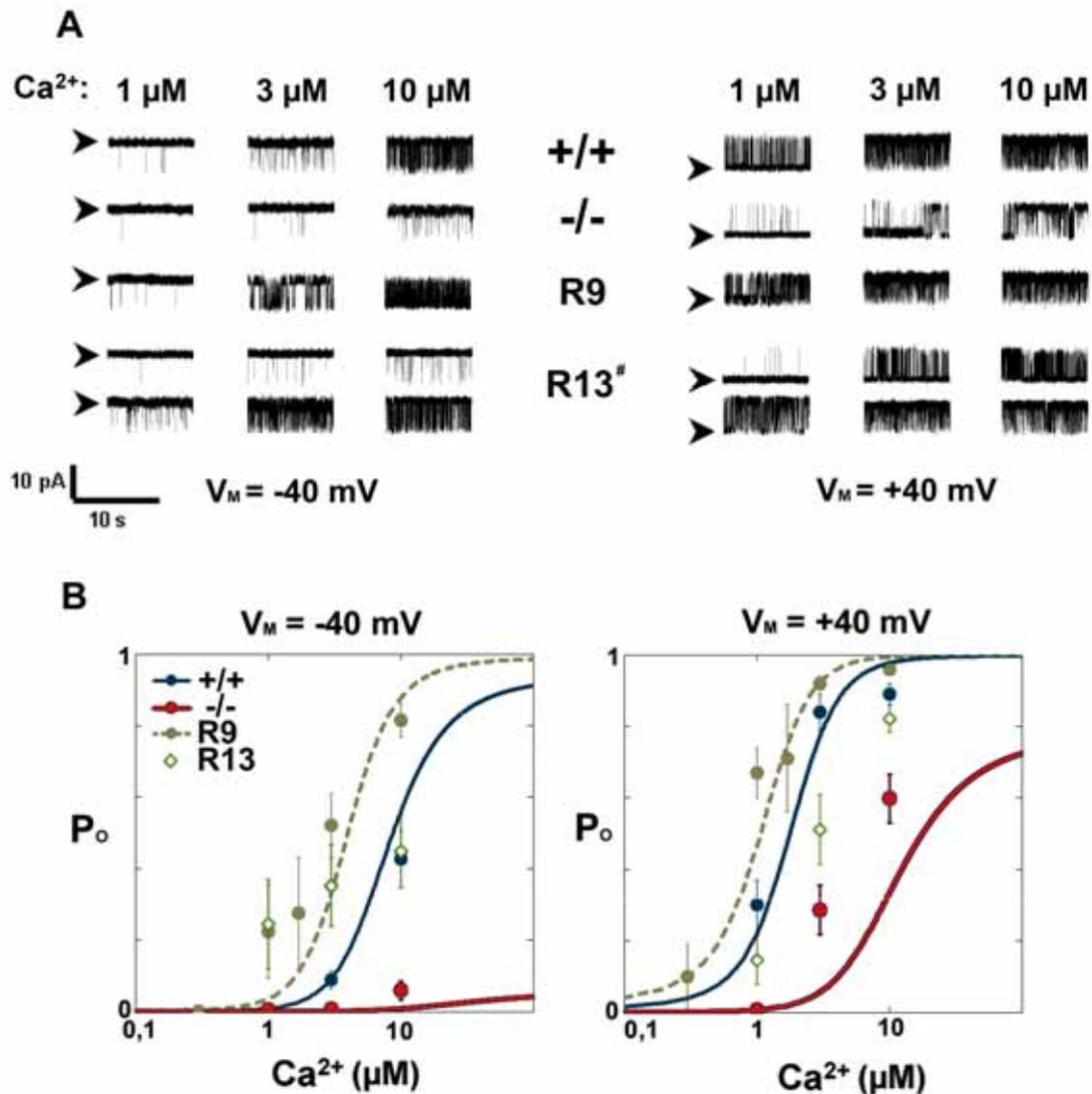
Der Nachweis von BK $\beta$ 1-E Protein in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 R Mäusen war alleine nicht ausreichend, um durch Blutdruck- oder Aldosteronmessungen Aussagen über die Rolle vaskulärer BK Kanäle in der glatten Muskulatur für die Blutdruckregulation machen zu können. Die vaskulären BK Kanäle in BK $\beta$ 1 R Mäusen mussten auch funktionell wiederhergestellt sein.

Um dies zu testen, führte ich Einzelkanalmessungen an primären vaskulären Myozyten durch. Dazu wurden Aorten von BK $\beta$ 1 WT, BK $\beta$ 1 KO, BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13 Mäusen der Hybrid-A Sublinie präpariert, mit Kollagenase und Protease behandelt und im direkten Anschluss in der *inside-out patch clamp* Konfiguration elektrophysiologisch untersucht.

Die einzeln in ihrem Öffnungs- und Schließverhalten beobachtbaren Kanäle leiteten bei negativem Membranpotential Einwärtsströme und bei positivem Membranpotential Auswärtsströme, wie von Kaliumkanälen unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen zu erwarten (Abb. 8A). Die Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_O$ ) der Kanäle stieg mit steigenden Kalziumkonzentrationen und höherem Membranpotential in Übereinstimmung mit den für BK Kanäle publizierten Werten (Brenner *et al.*, 2000; Cox & Aldrich, 2000). Die Einzelkanalleitfähigkeit war in allen Genotypen gleich und betrug im Mittel  $283 \pm 7$  pS ( $n = 168$ ).

Kanäle aus BK $\beta$ 1 WT Mäusen zeigten eine weitaus höhere Öffnungswahrscheinlichkeit als Kanäle von BK $\beta$ 1 KO Tieren, besonders bei 3 und 10  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ . Kanäle aus BK $\beta$ 1 R9 Mäusen zeigten unter allen Bedingungen die höchste  $P_O$  aller Genotypen. Kanäle aus Myozyten von BK $\beta$ 1 R13 Tieren waren heterogen reguliert, daher sind in Abb. 8A zwei exemplarische Sätze an Einzelkanalstromspuren abgebildet. Die obere Zeile zeigt Stromspuren für einen Kanal aus einem BK $\beta$ 1 R13 Tier, der wie die Kanäle aus BK $\beta$ 1 KO Tieren eine geringe  $P_O$  aufweist, dies war in 3 von 14 *patches* der Fall. In der unteren Zeile sind Ströme eines Kanals aus einer anderen Myozyte eines BK $\beta$ 1 R13 Tiers abgebildet, der unter den verschiedenen Bedingungen eine  $P_O$  hatte, die mit der von Kanälen aus BK $\beta$ 1 R9 Tieren vergleichbar war (3 von 14 *patches*). In 8 von 14 *patches* war die Regulation durch  $V_M$  und  $Ca^{2+}$  intermediär zwischen diesen beiden Extremen.

Die arithmetischen Mittelwerte der Öffnungswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration bei -40 mV und +40 mV sind als Punkte in Abb. 8B zu sehen. Die



**Abb. 8: Öffnungswahrscheinlichkeit von BK Kanälen in vaskulären Myozyten**

Primäre vaskuläre Myozyten wurden aus der Aorta von Mäusen präpariert und elektrophysiologisch durch Einzelkanalmessungen untersucht. Es wurde unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen in der *inside-out patch clamp* Konfiguration gemessen. Die Kalziumkonzentrationen auf der ehemals intrazellulären Membranseite und die Membranpotentiale wurden für jedes *patch* variiert und die Stromspuren für jede Kombination über 1-3 Minuten aufgezeichnet. +/+ : BK $\beta$ 1 WT, -/- : BK $\beta$ 1 KO, R9: BK $\beta$ 1 R9 und R13: BK $\beta$ 1 R13. **A**: Repräsentative Einzelkanalmessungen für die Genotypen bei verschiedenen Bedingungen. Pfeile markieren den geschlossenen Zustand. #: Kanäle aus BK $\beta$ 1 R13 Tieren waren heterogen reguliert und variierten zwischen niedrigen (obere Zeile) und hohen (untere Zeile) Öffnungswahrscheinlichkeiten. **B**: Punkte zeigen die mittleren Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) der verschiedenen BK Kanäle, berechnet aus den Einzelkanalmessungen. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ,  $n = 6-12$  *patches* von je 4-7 Tieren. Durchgezogene Kurven zeigen die theoretische Kalziumabhängigkeit von  $P_o$  nach dem 50-Zustände Modell für BK Kanäle (Cox & Aldrich, 2000). Die gestrichelte Kurve ist die Extrapolation eines 140%igen BK $\beta$ 1-Effekts auf die Koeffizienten des Modells (ohne  $z$ ).

Werte für BK $\beta$ 1 WT entsprachen den Erwartungswerten aus dem 50-Zustände BK Kanal Modell von Cox und Aldrich, 2000 (durchgezogene blaue Kurve in Abb. 8B). Auch die Öffnungswahrscheinlichkeiten für BK $\beta$ 1 KO Kanäle entsprachen näherungsweise dem Modell (durchgezogene rote Kurve), waren jedoch tendenziell erhöht.

Die Abhängigkeit der  $P_O$  von der intrazellulären  $Ca^{2+}$  Konzentration war für BK $\beta$ 1 R9 Kanäle bei beiden Potentialen gegenüber BK $\beta$ 1 WT Kanälen zu geringeren Konzentrationen hin verschoben. Extrapoliert man die Wirkung der  $\beta$ 1 Untereinheit auf alle Koeffizienten (außer  $z$ ) des BK Modells zu 140%, so erhält man eine Abhängigkeit, die gut zu den gemessenen Werten passt (gestrichelte Kurve in Abb. 8B). Bei einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration von 10  $\mu$ M entspricht dies einer Verschiebung des Membranpotentials der halbmaximalen Öffnungswahrscheinlichkeit um 40 mV ( $\Delta V_{1/2} = -40$  mV bei 10  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>).

Aufgrund des heterogenen Charakters der BK $\beta$ 1 R13 Kanäle zeigten sie gemittelt eine abgeschwächte Abhängigkeit der  $P_O$  von sowohl  $Ca^{2+}$  als auch von  $V_M$ . Unter allen untersuchten Bedingungen war die mittlere  $P_O$  jedoch vergleichbar oder höher als die von BK $\beta$ 1 WT Kanälen.

Typische Ruhepotentiale von vaskulären Myozyten liegen um -40 mV (Faraci & Sobey, 1998). Die transienten lokalen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen, denen BK Kanäle bei diesem Membranpotential im Komplex mit spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen ausgesetzt sind, liegen um 3  $\mu$ M (Berkefeld *et al.*, 2006). Unter diesen Bedingungen lagen die Öffnungswahrscheinlichkeiten

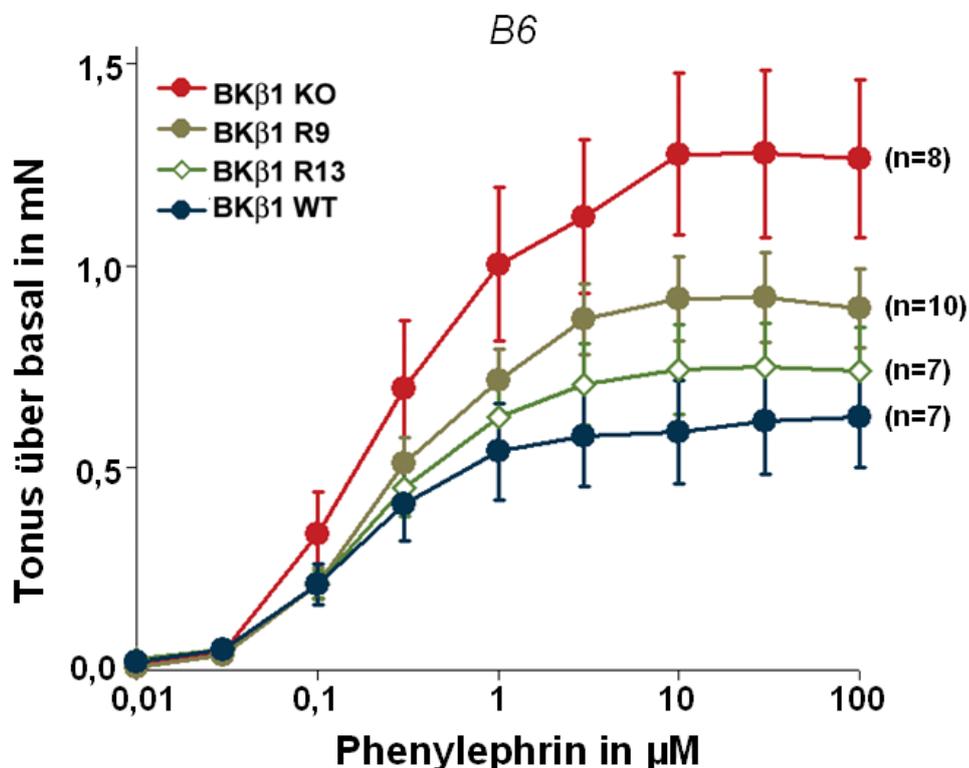
- für BK $\beta$ 1 KO Kanäle bei  $P_O = 0,008 \pm 0,005$ ,
  - für BK $\beta$ 1 WT Kanäle bei  $P_O = 0,09 \pm 0,03$  ( $p = 0,01$ ),
  - für BK $\beta$ 1 R9 Kanäle bei  $P_O = 0,52 \pm 0,09$  ( $p = 0,0002$ ) und
  - für BK $\beta$ 1 R13 Kanäle bei  $P_O = 0,36 \pm 0,11$  ( $p = 0,01$ ).
- ( $n = 6-12$  patches von je 4-7 Tieren)

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 R Mäusen nicht nur das BK $\beta$ 1-E Transgen exprimiert wird, sondern auch die BK Kanalfunktion wiederhergestellt ist. Es liegt zudem bei negativen Membranpotentialen für sowohl BK $\beta$ 1 R9 als auch BK $\beta$ 1 R13 und bei positiven Membranpotentialen für BK $\beta$ 1 R9 eine Aktivitätssteigerung der BK Kanäle gegenüber BK $\beta$ 1 WT Myozyten vor.

### 5.5 Normalisierter vaskulärer Tonus in B6 BK $\beta$ 1 R Mäusen

Um festzustellen, ob durch die Wiederherstellung der BK Kanal Funktion auf molekularer Ebene - wie unter 5.4 gezeigt - auch die Funktion im vaskulären Gewebe wiederhergestellt wurde, führte ich Kraftmessungen an frisch isolierten Aortenringen von BK $\beta$ 1 R Mäusen durch. Es wurde geprüft, ob der in BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu beobachtende erhöhte Vasotonus (Plüger *et al.*, 2000) durch die Funktionswiederherstellung der BK Kanäle in der glatten Muskulatur normalisiert wurde. Sowohl die transgenen Linien als auch die Knockout Mauslinie wurden vor den Kraftmessungen auf die Inzuchtlinie C57BL/6J rückgekreuzt (Sublinie B6).

Die Konzentration des selektiven  $\alpha$ -adrenergen Agonisten Phenylephrin im Organbad der Aortenringe wurde stufenweise von 10 nM bis 100  $\mu$ M erhöht (Abb. 9). Für die individuellen



**Abb. 9:  $\alpha$ -Adrenerge Stimulation des Vasotonus in Aortenringen aus B6 Mäusen**

Aortenringe von BK $\beta$ 1 R9, BK $\beta$ 1 R13, BK $\beta$ 1 KO und BK $\beta$ 1 WT Mäusen der Sub-Linie B6 wurden *ex vivo* im Organbad steigenden Konzentrationen an Phenylephrin ausgesetzt und der resultierende Kraftzuwachs gemessen. Pro Tier wurden 2 bis 3 Aortenringe präpariert und das arithmetische Mittel der Messwerte gebildet. Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; n = Tierzahl.

Messreihen der einzelnen Aortenringe wurden Näherungen mit der EC<sub>50</sub> Dosis-Wirkungs-Gleichung durchgeführt und die Maxima für die Genotypen gemittelt (siehe 4.8).

Die maximale Kraftentwicklung war für Aortenringe aus BK $\beta$ 1 KO Mäusen mit  $1,23 \pm 0,20$  mN ( $n = 8$ ) mehr als doppelt so hoch wie für Aortenringe aus BK $\beta$ 1 WT Mäusen mit  $0,57 \pm 0,12$  mN ( $n = 7$ ;  $p = 0,008$ ). Die maximale Kraftentwicklung von Aortenringen aus BK $\beta$ 1 R13 Tieren betrug  $0,70 \pm 0,11$  mN ( $n = 7$ ; zu KO:  $p = 0,04$ ), was einer 80%igen Wiederherstellung entspricht. Bei den Aortenringen von BK $\beta$ 1 R9 Mäusen waren es  $0,88 \pm 0,10$  mN ( $n = 8$ ; zu KO:  $p = 0,07$ ) und damit eine Wiederherstellung um 53%.

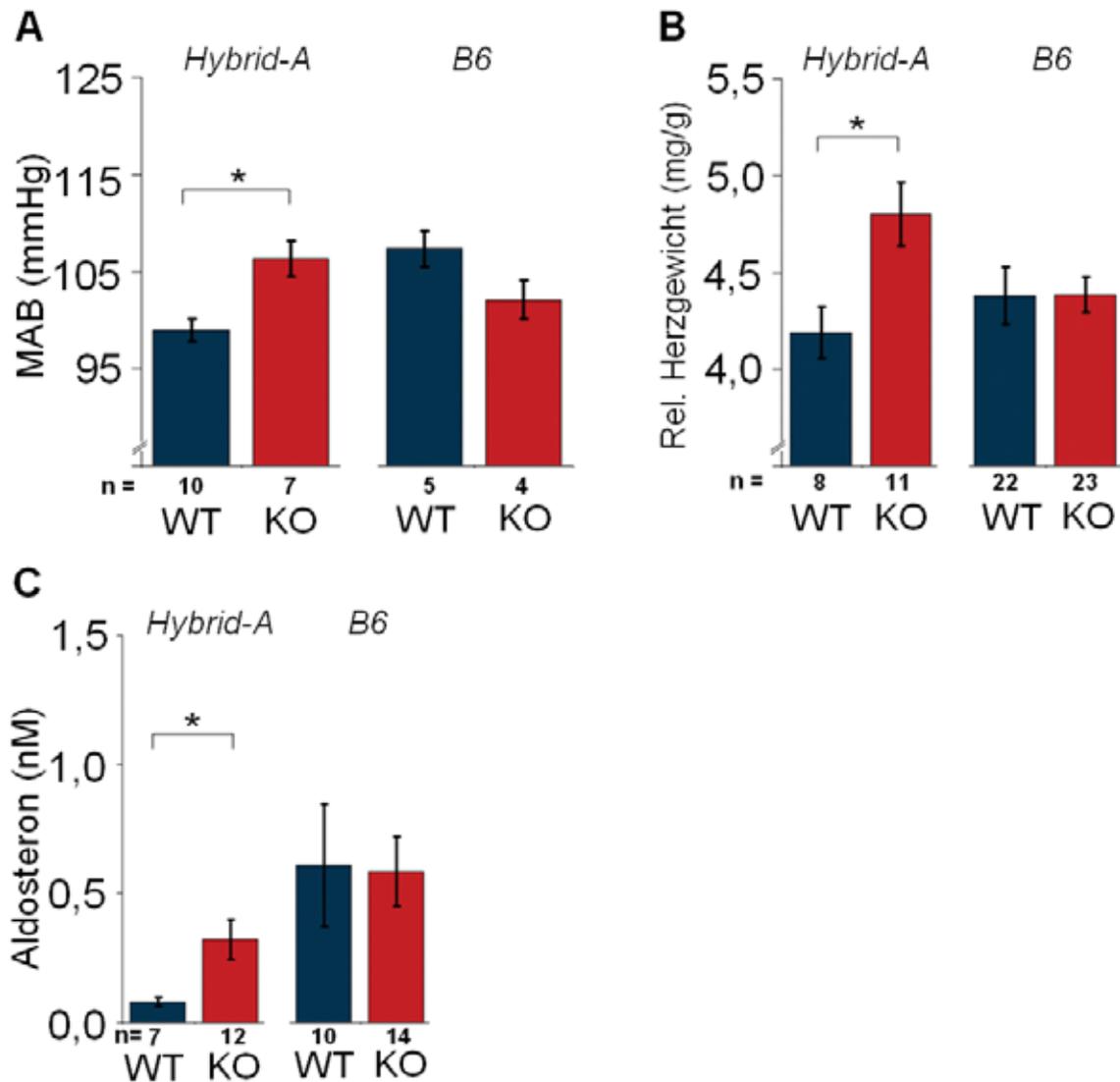
Das Experiment zeigte somit eine weitgehende Normalisierung der vaskulären Kontraktilität in BK $\beta$ 1 R Mäusen im Vergleich zu BK $\beta$ 1 KO Tieren, die kein BK $\beta$ 1-E in der glatten Muskulatur exprimieren. Da durch die selektive transgene Re-Expression von  $\beta$ 1 in der glatten Muskulatur somit sowohl der zelluläre als auch der vaskuläre Phänotyp der BK $\beta$ 1 KO Mäuse wiederhergestellt werden konnte, wurde als nächstes geprüft, ob auch die veränderte Langzeitregulation des Blutdrucks in BK $\beta$ 1 R Mäusen normalisiert war.

## **5.6 Normaler Blutdruck bei BK $\beta$ 1 KO Mäusen auf dem C57BL/6J genetischen Hintergrund**

Als Vorsichtsmaßnahme gegen störende Effekte durch unterschiedliche genetische Hintergründe von transgenen und BK $\beta$ 1 KO Mäusen wurden beide Linien vor den Blutdruckmessungen auf die Inzuchtlinie C57BL/6J rückgekreuzt (Sublinie B6). Für die Rückkreuzung wurde die Linie C57BL/6J aus drei Gründen gewählt. Erstens ist sie die erste Mauslinie, deren Genom komplett sequenziert wurde, zweitens ist sie als Labormaus weltweit am weitesten verbreitet und schließlich sind Mäuse der Linie C57BL/6J motorisch sehr aktiv und daher gut für aktivitäts- und verhaltensrelevante Experimente geeignet.

Aus der Rückkreuzung auf C57BL/6J resultierte eine partielle Normalisierung des Phänotyps von BK $\beta$ 1 KO Mäusen im Vergleich zu BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren. Auf dem C57BL/6J Hintergrund entsprachen sowohl mittlerer arterieller Blutdruck als auch das auf das Körpergewicht normalisierte Herzgewicht und die Plasma Aldosteronkonzentration von BK $\beta$ 1 defizienten Mäusen denen der BK $\beta$ 1 WT Kontrolltiere (Abb. 10). Auffällig war

zudem, dass die Plasmakonzentration von Aldosteron von Mäusen der B6 Sublinie durchgängig höher war als bei der Sublinie Hybrid-A (Abb. 10C;  $p = 0,005$ ).



**Abb. 10: Blutdruckrelevante Parameter bei BK $\beta$ 1 defizienten Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen**

Messungen an BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren mit dem Hybrid-A oder dem B6 genetischen Hintergrund **A**: Telemetrische Blutdruckmessungen. Durchschnittswert über 3 Tage. MAB: Mittlerer arterieller Blutdruck. **B**: *Post-mortem* Herzgewicht, ungetrocknet und über das Körpergewicht normalisiert. **C**: Plasmakonzentration von Aldosteron. Blut wurde über chronische Femoralkatheter unbemerkt vom wachen Tier entnommen. WT: BK $\beta$ 1 WT Mäuse; KO: BK $\beta$ 1 KO Mäuse; Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; n = Tierzahl; \*: statistisch signifikanter Unterschied. Werte für Hybrid-A stammen aus den Vorarbeiten und sind zum Vergleich dargestellt.

Numerische Darstellung:

### Mittlere Arterieller Blutdruck\* (Abb. 10A)

#### *Sub-Linie Hybrid-A*

BK $\beta$ 1 WT	99 $\pm$ 1 mmHg	(n = 10)	
BK $\beta$ 1 KO	106 $\pm$ 2 mmHg	(n = 7)	p = 0,006

#### *Sub-Linie B6*

BK $\beta$ 1 WT	107 $\pm$ 2 mmHg	(n = 4)	
BK $\beta$ 1 KO	102 $\pm$ 2 mmHg	(n = 4)	n.s.d.

\*: Die Pulsamplitude war in Mäusen beider Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Daher wurde auf eine Darstellung systolischer und diastolischer Werte verzichtet.

### Herz zu Körpergewicht (Abb. 10B)

#### *Sub-Linie Hybrid-A*

BK $\beta$ 1 WT	4,2 $\pm$ 0,1 mg/g	(n = 11)	
BK $\beta$ 1 KO	4,8 $\pm$ 0,2 mg/g	(n = 8)	p = 0,010

#### *Sub-Linie B6*

BK $\beta$ 1 WT	4,4 $\pm$ 0,2 mg/g	(n = 22)	
BK $\beta$ 1 KO	4,4 $\pm$ 0,1 mg/g	(n = 23)	n.s.d.

### Plasma Aldosteronkonzentration (Abb. 10C)

#### *Sub-Linie Hybrid-A*

BK $\beta$ 1 WT	0,08 $\pm$ 0,02 nM	(n = 7)	
BK $\beta$ 1 KO	0,32 $\pm$ 0,08 nM	(n = 12)	p = 0,011

#### *Sub-Linie B6*

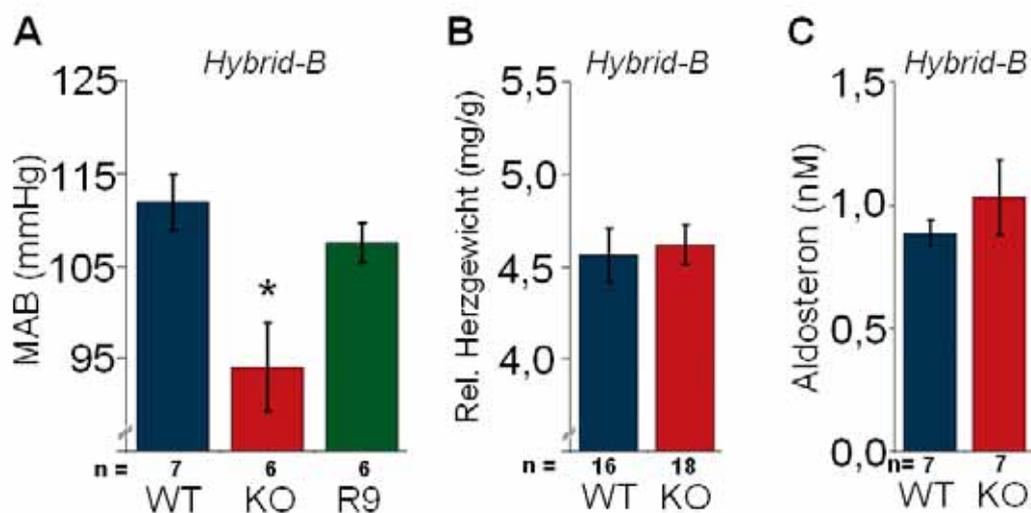
BK $\beta$ 1 WT	0,61 $\pm$ 0,24 nM	(n = 10)	
BK $\beta$ 1 KO	0,59 $\pm$ 0,14 nM	(n = 14)	n.s.d.

Diese Normalisierung systemischer Parameter stand im Gegensatz zu der erhöhten vaskuläre Kontraktilität von BK $\beta$ 1 KO Mäusen, wie sie 2000 von Plüger und Kollegen berichtet wurde, die auf dem neuen genetischen Hintergrund erhalten blieb (siehe 5.5; Abb. 9). Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse auf dem

genetischen Hintergrund der C57BL/6J Linie trotz einer nach wie vor gesteigerten vaskulären Kontraktilität normoton sind und weder eine kardiale Hypertrophie noch gesteigerte Plasmaaldosteronkonzentrationen aufweisen, der systemphysiologische Phänotyp also durch die Rückkreuzung wieder normalisiert wurde.

### 5.7 Myogene Blutdrucksenkung in Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Um die Modulation des BK $\beta$ 1 KO Phänotyps durch den genetischen Hintergrund eingehender zu erkunden untersuchte ich daraufhin den Effekt von BK $\beta$ 1 Defizienz auf einem dritten genetischen Hintergrund. Dazu wurde das BK $\beta$ 1 Knockout Allel auf eine alternative Sublinie „Hybrid-B“ zurückgekreuzt, deren genetischer Hintergrund zu etwa einem Viertel aus R1 ES Zellen (129S1/129X1 Hybrid) und zu drei Vierteln aus der C57BL/6J Mauslinie stammt (siehe 4.3). BK $\beta$ 1 defiziente Mäuse auf diesem Hintergrund zeigten sogar eine Hypotonie, im deutlichen Gegensatz zum bisher bekannten Phänotyp einer



**Abb. 11: Blutdruckrelevante Parameter bei BK $\beta$ 1 defizienten Mäusen der Sublinie Hybrid-B**

**A.** Telemetrische Blutdruckmessungen von BK $\beta$ 1 KO, BK $\beta$ 1 WT und BK $\beta$ 1 R Mäusen. Durchschnittswert über 3 Tage. **B.** *Post-mortem* Herzgewicht von BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren, ungetrocknet und über das Körpergewicht normalisiert. **C.** Plasma Aldosteronkonzentration von BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren. Blut wurde durch Punktion der Wange entnommen. MAB: Mittlerer arterieller Blutdruck; WT: BK $\beta$ 1 WT Mäuse; KO: BK $\beta$ 1 KO Mäuse; Fehlerbalken =  $\sigma_n$ ; n = Tierzahl; \*: statistisch signifikant unterschiedlich zu beiden anderen Gruppen.

Blutdruckerhöhung. Der mittlere arterielle Blutdruck in Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen war mit  $94 \pm 5$  mmHg ( $n = 6$ ) um 18 mmHg niedriger ( $p = 0,01$ ) als der von Hybrid-B BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren ( $112 \pm 3$  mmHg;  $n = 7$ ; Abb. 11A). Ebenso wie für die B6 Sublinie gab es in der Hybrid-B Sublinie keinen Hinweis auf kardiale Hypertrophie oder Hyperaldosteronismus bei BK $\beta$ 1 KO Mäusen (Abb. 11B und 11C).

Nach einer Rückkreuzung des BK $\beta$ 1-E Transgens auf den Hybrid-B genetischen Hintergrund beobachtete ich eine Normalisierung des niedrigen Blutdrucks durch die Re-Expression von BK $\beta$ 1 in der glatten Muskulatur von BK $\beta$ 1 R9 Mäusen, deren mittlerer arterieller Blutdruck  $108 \pm 2$  mmHg ( $n = 6$ ;  $p = 0,04$ ) betrug (Abb. 11A). Um auszuschließen, dass diese Blutdruckerhöhung nicht durch die ektopische genomische Integration des BK $\beta$ 1-E Transgens oder die artifizielle Re-Expression der BK $\beta$ 1-E Untereinheit in der glatten Muskulatur verursacht wurde, führte ich zudem Kontrollmessungen auf dem B6 genetischen Hintergrund durch. Der mittlere arterielle Blutdruck von B6 BK $\beta$ 1 R Mäusen ( $106 \pm 2$  mmHg,  $n = 3$ ) war gegenüber dem von B6 BK $\beta$ 1 WT Mäusen ( $107 \pm 2$  mmHg,  $n = 5$ ) oder B6 BK $\beta$ 1 KO Mäusen ( $102 \pm 2$  mmHg,  $n = 4$ ) nicht verändert (ohne Abb.).

Diese Daten weisen darauf hin, dass speziell die BK Kanäle der glatten Muskulatur verantwortlich für die Absenkung des Blutdrucks in Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen sind, also ein myogener Mechanismus der Blutdruckregulation vorliegt. Da die Plasmakonzentration von Aldosteron in der Sub-Linie Hybrid-B durch BK $\beta$ 1-Defizienz nicht verändert wird (Abb. 11C) scheint dieser myogene Mechanismus aldosteronunabhängig zu sein – anders als der blutdrucksteigernde Effekt des BK $\beta$ 1 Knockouts in der Sub-Linie Hybrid-A. Es stellt sich daher die Frage, welcher Mechanismus in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu einem Hyperaldosteronismus führt, und ob dieser ebenfalls mit der BK Kanalfunktion in der glatten Muskulatur im Zusammenhang steht.

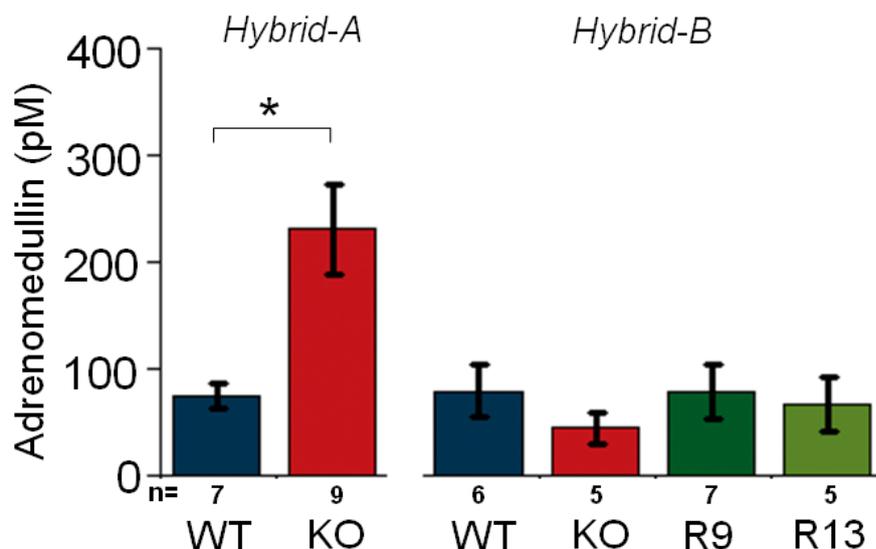
### 5.8 Erhöhtes Plasma Adrenomedullin in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Anhand der Vorarbeiten wurde deutlich, dass der Hyperaldosteronismus von Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen unmittelbare Ursache ihres erhöhten Blutdrucks war (siehe 2.3) und höchstwahrscheinlich nicht durch eine Fehlfunktion der Nebenniere hervorgerufen wurde (siehe 2.2). Die Plasmareninkonzentration war nicht erhöht (siehe Abb. 4), zugleich waren

Aldosteronsekretion und die Renin-Angiotensin-Achse nicht entkoppelt (siehe 2.3). Es lag daher nahe, nach Veränderungen von Faktoren in BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu suchen, die mit dem Renin-Angiotensin-System interagieren. Dazu wurden Mäuse mit den genetischen Hintergründen Hybrid-A und Hybrid-B untersucht, da Mäuse der Sub-Linie B6 keine Veränderungen des Blutdrucks oder der Plasma Aldosteronkonzentration aufwiesen.

Ein Faktor, der die Aldosteronsekretion unter Angiotensin II Stimulation modulieren kann, ist Adrenomedullin. Dieses Peptidhormon, welches in glatter Muskulatur, im Gefäßendothel und im Nebennierenmark gebildet wird, hat einen dämpfenden Effekt auf durch Angiotensin II induzierte Aldosteronsekretion (Charles *et al.*, 2003). In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Aldosteron die Freisetzung von Adrenomedullin stimuliert (Uemura *et al.*, 2002), und es wird vermutet, dass dies die Basis für einen negativen Rückkopplungsmechanismus sein könnte, der die Freisetzung von Aldosteron begrenzt (Fallo, 2002). Es wäre also denkbar, dass eine Reduktion der Adrenomedullinsekretion in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu einer Verstärkung der Angiotensin II induzierten Aldosteronfreisetzung und damit zum beobachteten erhöhten Blutdruck geführt hat.

Um diese Hypothese zu testen, bestimmte ich die Konzentration von Adrenomedullin im Plasma von Hybrid-A und Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen mittels RIA. Blutentnahmen erfolgten über Punktion der Wange unter Isoflurannarkose, da Vorabexperimente ergaben,



**Abb. 12: Plasma Adrenomedullin in BK $\beta$ 1 KO Mäusen der Sub-Linien B6 und Hybrid-B** Mäusen wurde mittels Punktion der Wange unter Isoflurannarkose Blut entnommen und die Plasmakonzentration von Adrenomedullin mittels RIA bestimmt. Genotypen: WT: BK $\beta$ 1 WT; KO: BK $\beta$ 1 KO; R9: BK $\beta$ 1 R9; R13: BK $\beta$ 1 R13. n = Tierzahl; Fehlerbalken =  $\sigma_n$ . \*: Statistisch signifikanter Unterschied.

dass bereits eine kurze Narkose mit CO<sub>2</sub> zu einer Verzwanzigfachung des Plasmaadrenomedullinspiegels führt. Entgegen der oben aufgestellten Hypothese hatte das Plasma von Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen mit  $233 \pm 49$  pM ( $n = 9$ ) nicht eine niedrigere, sondern eine dreifach erhöhte Adrenomedullinkonzentration im Vergleich zu Hybrid-A BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren mit  $75 \pm 12$  pM ( $n = 7$ ;  $p = 0,01$ ). In der Sub-Linie Hybrid-B kam es dagegen zu keiner Veränderung der Adrenomedullinkonzentration. Alle Genotypen waren zueinander und auch zu Hybrid-A BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 12). Dies spricht dafür, dass die veränderte Adrenomedullinkonzentration in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen eine Folge des systemischen Phänotyps und nicht der vaskulären oder zellulären BK Kanal Dysfunktion ist.

Die Ergebnisse zeigten somit, dass Plasma Adrenomedullin in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen der Sub-Linie Hybrid-A, um das Dreifache erhöht ist, was der Hypothese eines Adrenomedullinmangels als Ursache des Hyperaldosteronismus in diesen Tieren direkt widerspricht. Die Plasma Adrenomedullinkonzentration war in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen der Sub-Linie Hybrid-B unverändert und spielte daher bei der Entstehung des gesenkten Blutdrucks auf diesem genetischen Hintergrund keine Rolle.

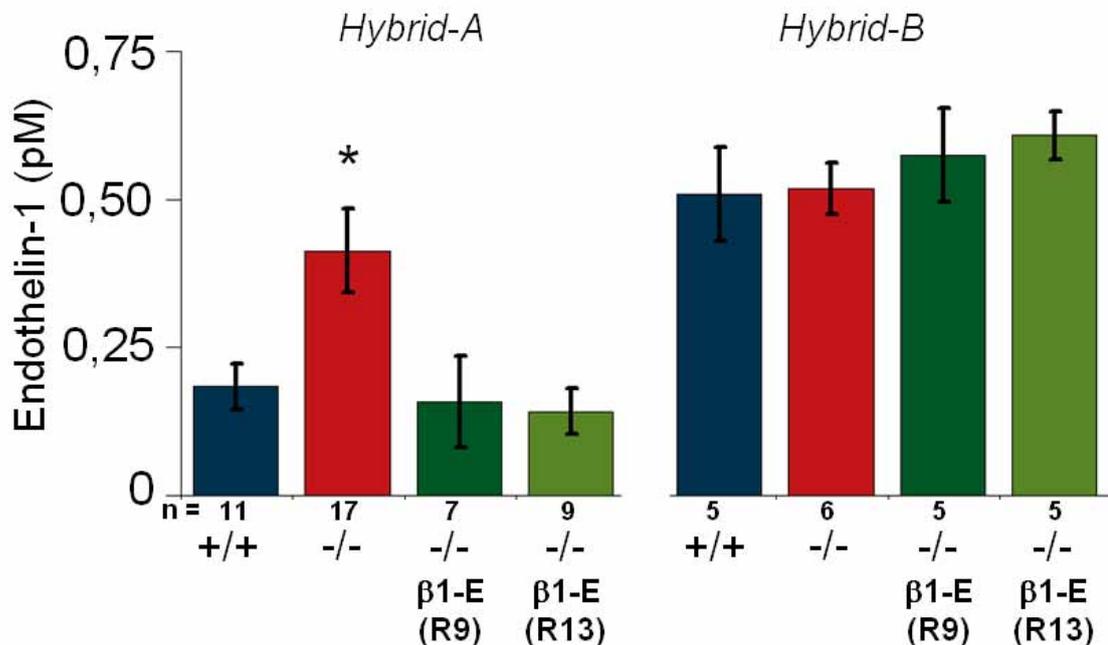
### 5.9 Myogen erhöhtes Plasma Endothelin-1 in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen

Ein Hormon, das *in vitro* bereits in femtomolarer Konzentration die Aldosteronsekretion aus *Zona Glomerulosa* Zellen der Nebenniere induzieren kann, ist Endothelin-1 (Hinson *et al.*, 1991). Es wird aus dem vaskulären Endothel freigesetzt und unter anderem durch die Scherkraft des Blutstroms reguliert (Morawietz *et al.*, 2000). Chronische Infusion von Endothelin-1 (ET-1) erzeugte Bluthochdruck in Ratten (Elmarakby *et al.*, 2004) und in vielen Formen des experimentellen Bluthochdrucks ist die Plasmakonzentration von ET-1 erhöht (Schiffrin, 1999).

Es wäre demnach vorstellbar, dass die vaskuläre Dysfunktion in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu einer erhöhten Endothelin-1 Sekretion aus dem Gefäßendothel führte, die wiederum ursächlich für den beobachteten Hyperaldosteronismus war.

Um diese Hypothese zu testen, bestimmte ich die ET-1 Konzentration im Plasma von Isofluranbetäubten Mäusen der Sub-Linien Hybrid-A und Hybrid-B mittels chemolumineszenzgekoppeltem EIA (Abb. 13). Bei der Sub-Linie Hybrid-A betrug die ET-1 Konzentration im Plasma von BK $\beta$ 1 KO Mäusen  $413 \pm 71$  fM, bei BK $\beta$ 1 WT waren es  $184 \pm 35$  fM, das entspricht einer Erhöhung um 125%. Des Weiteren war die Plasma ET-1 Konzentration auf dem Hybrid-A genetischen Hintergrund bei Mäusen beider BK $\beta$ 1 R Linien im Vergleich zu BK $\beta$ 1 KO Mäusen stark reduziert, sogar noch niedriger als in BK $\beta$ 1 WT Tieren. Dies weist auf eine myogene Regulation der Endothelin-1 Plasmakonzentration hin. Der Hybrid-B genetischen Hintergrund war mit durchgängig erhöhten Plasma ET-1 Konzentrationen assoziiert (Abb. 13;  $p = 0,006$ ), die durch die An- oder Abwesenheit der BK $\beta$ 1 Untereinheit nicht weiter beeinflusst wurden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Plasmakonzentration von Endothelin-1 in Mäusen der Sub-Linie Hybrid-A deutlich niedriger als in der Sub-Linie Hybrid-B war. Die Abwesenheit von BK $\beta$ 1 selektiv in der glatten Muskulatur führte auf dem genetischen



**Abb. 13: Plasma Endothelin-1 in BK $\beta$ 1 KO Mäusen der Sub-Linien B6 und Hybrid-B**

BK $\beta$ 1 KO, BK $\beta$ 1 WT, BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13 Mäusen wurde mittels Punktion der Wange unter Isoflurannarkose Blut entnommen und die Plasmakonzentration von Endothelin-1 mittels Chemolumineszenz-EIA bestimmt. Balken = arithmetisches Mittel; Offene Symbole = unterhalb der Nachweisgrenze. p-Werte als Maß für die statistische Signifikanz wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test bestimmt.

Hintergrund der Sub-Linie Hybrid-A, aber nicht der Sub-Linie Hybrid-B, zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration von Endothelin-1. Die Erhöhung ist somit myogen und korreliert mit dem Phänotyp eines erhöhten Blutdrucks. Diese Ergebnisse passen in soweit zu der Hypothese, dass Endothelin-1 ursächlich für den Hyperaldosteronismus und damit den erhöhten Blutdruck in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen sei.

## 6 Schlussfolgerungen

Die Daten belegen, dass der Knockout von BK $\beta$ 1 in *Mus musculus* je nach genetischem Hintergrund deutlich unterschiedliche Phänotypen hervorrufen kann.

BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse der Sub-Linie Hybrid-A zeigten erhöhten systemischen Blutdruck als Folge einer erhöhten Plasma Aldosteronkonzentration (siehe 2.3). Dieser Hyperaldosteronismus beruhte weder auf erhöhten Renin oder Angiotensin II Konzentrationen im Plasma (siehe 5.1) noch auf einer adrenalen Dysfunktion (siehe 2.2) und blieb trotz erniedrigter K<sup>+</sup> Konzentration (siehe 2.1) und einer erhöhten Adrenomedullinkonzentration (siehe 5.8) im Plasma bestehen. Darüber hinaus kam es spezifische bei BK $\beta$ 1 KO Tieren der Hybrid-A Sub-Linie zu einer relativen Erhöhung der Plasmakonzentration von Endothelin-1 (siehe 5.8).

Der Phänotyp BK $\beta$ 1-defizienter Mäuse der Sub-Linie Hybrid-A konnte partiell durch Rückkreuzung auf den C57BL/6J Inzuchtstamm gerettet werden. Auf diesem genetischen Hintergrund verschwanden erhöhter Blutdruck, kardiale Hypertrophie und Hyperaldosteronismus (siehe 5.6), während der vaskuläre Teil des Phänotyps erhalten blieb (siehe 5.5). Abhängig vom genetischen Hintergrund konnte die Abwesenheit von BK $\beta$ 1 sogar zu einer Erniedrigung des systemischen Blutdrucks führen, wie Messungen an Tieren der Hybrid-B Sub-Linie zeigten (siehe 5.7).

BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse, die eine transgene BK $\beta$ 1 Untereinheit selektiv in der glatten Muskulatur re-exprimieren (siehe 5.3), zeigten eine wiederhergestellte vaskuläre BK Kanalaktivität (siehe 5.4) und einen normalisierten vaskulären Tonus (siehe 5.5). Sie waren somit dazu geeignet, den myogenen Beitrag des BK Kanals zur Langzeitregulation des Blutdrucks zu untersuchen.

Die Daten belegten in zweierlei Hinsicht myogene Mechanismen für den Einfluss von BK Kanälen bei der systemischen Blutdruckregulation in der Maus: Zum einen normalisierte in der Sub-Linie Hybrid-B die genetische Wiederherstellung der BK Kanal Funktion in der glatten Muskulatur den erniedrigten Blutdruck in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen (siehe 5.7). Zum anderen hatte die spezifische Erhöhung der Plasmakonzentration von Endothelin-1 in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen der Hybrid-A Sub-Linie, die auch Hyperaldosteronismus und erhöhten Blutdruck hatten, einen myogenen Ursprung (siehe 5.8).

## 7 Diskussion

Aufgrund ihrer aktivierenden Wirkung auf den BK Kanal ist die BK $\beta$ 1 Untereinheit notwendig für einen der Mechanismen, die den Tonus der Gefäßmuskulatur regulieren. In Form einer negativen Rückkopplung reduzieren BK Kanäle dabei den Muskeltonus, indem sie die Zellmembran als Antwort auf lokale Kalziumsignale hyperpolarisieren (Faraci & Sobey, 1998). Zudem deuten Ergebnisse von BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen, genetischen Populationsstudien und Tiermodellen für Diabetes und Bluthochdruck darauf hin, dass die BK $\beta$ 1 Untereinheit an der Regulation des systemischen Blutdrucks beteiligt ist (Brenner *et al.*, 2000; Plüger *et al.*, 2000; Amberg *et al.*, 2003; Amber & Santana, 2003; McGahon *et al.*, 2007; Kelley-Hedgpeth *et al.*, 2008). Welcher Mechanismus der Regulation des arteriellen Blutdrucks durch BK $\beta$ 1 zugrunde liegt und in welcher Weise er mit der Funktion vaskulären BK Kanäle zusammenhängt ist bislang noch ungeklärt.

### 7.1 Hormonelle Regulation des systemischen Blutdrucks durch BK $\beta$ 1

Eine Hypothese ist, dass die BK Kanalaktivität direkt auf den systemischen Blutdruck wirkt, indem sie den peripheren Gesamtwiderstand über ihren Einfluss auf den vaskulären Muskeltonus verändert (Brenner *et al.*, 2000; Standen, 2000). Wie in der Fragestellung erwähnt, gehören BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse zu den ersten Mausmodellen, für deren monogenetische Hypertonie ein myogener Mechanismus vorgeschlagen wurde und damit das Guyton-Coleman Modell von 1967 in Frage stellen, das für die Langzeitregulation des Blutdrucks eine Änderung der Nierenfunktion oder der Salz- und Wasseraufnahme fordert (Chau *et al.*, 1979). Inzwischen sind auch andere Mausmodelle publiziert, in denen monogenetische Hypertonie anscheinend über myogene Mechanismen vermittelt wird, beispielsweise bei selektiver Dysfunktion einer Interaktionsdomäne der Protein Kinase G - I $\alpha$  (Michael *et al.*, 2008), bei TRPC6 Kanal-Defizienz (Dietrich *et al.*, 2005) und bei Dysregulation der vaskulären Stickstoffmonoxid-Signalwege durch RGS2-Defizienz (Tang *et al.*, 2006). Allerdings wurde bisher in keinem dieser Modelle eruiert, warum sich die Hypertonie einer Korrektur durch renale Mechanismen entzieht.

Als alternative Hypothese wurde ein renaler Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die BK Kanalfunktion im distalen Tubulus des Nephrons über veränderte Kaliumsekretion mit der Konzentration von Plasmaaldosteron und dadurch mit der Blutdruckregulation verknüpft wird (Grimm et al., 2009b). Die Daten aus den Vorarbeiten passten in sofern zu dieser alternativen Hypothese, als dass sie klar zeigten, dass bei Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen Hyperaldosteronismus ursächlich für die beobachtete Blutdruckerhöhung ist (siehe 2.1 und 2.3). Unvereinbar mit der Hypothese waren allerdings die Werte der Plasmakaliumkonzentration (siehe 2.1). Auch eine abnormale Funktion des adrenalen Kortex, wie für BK $\alpha$  Knockout Mäuse publiziert (Sausbier *et al.*, 2005) erschien unwahrscheinlich (siehe 2.2).

Im scheinbaren Widerspruch zu den pharmakologischen Daten, die eine Beteiligung des RAAS bei der Entstehung des Hyperaldosteronismus in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen suggerierten (siehe 2.3) war die Plasmakonzentration der Hormone des RAAS, die dem Aldosteron vorgeschaltet sind, nicht erhöht (siehe 5.1). Da die Reninausschüttung ähnlich der Aldosteronsekretion bei Blutentnahmen einer schnellen stressabhängigen Erhöhung unterliegt, wie Unterschiede zwischen verschiedenen Abnahmegeschwindigkeiten in Vorabexperimenten zeigten, wäre denkbar, dass tatsächlich vorliegende Unterschiede zwischen den Genotypen durch die Abnahmemethode maskiert wurden. Dagegen spricht jedoch, dass Positivkontrollen hervorragend nachweisbar waren und auch unter Betäubung kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen war (siehe 5.1, Abb. 4). Zudem wurde in bisher unveröffentlichten Messungen am Blut von chronisch katheterisierten Tieren von Jörg Faulhaber und Mareike Budack (Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des UKE in Hamburg) ebenfalls nachgewiesen, dass keine erhöhten Reninwerte für Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäuse gegenüber BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren vorlagen, sowie der Befund für Angiotensin II dadurch untermauert, dass auch die Konzentration an in der Blutbahn zirkulierendem Angiotensinogen in BK $\beta$ 1 KO Mäusen unverändert war.

Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen mit den unveränderten Werten für Angiotensin II (siehe 5.1, Abb. 5), die auch an chronisch katheterisierten Mäusen validiert wurden, so gibt es keine Indizien für eine Veränderung der eigentlichen Renin-Angiotensin-Signalkaskade in Hybrid-A BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen.

Wenn keine Störung der Signalkaskade oberhalb der Aldosteronsekretion vorliegt, so wäre in Mäusen mit erhöhtem Blutdruck eine merkbare Reduktion der Reninausschüttung durch den gestiegenen renalen Perfusionsdruck plausibel (vgl. Hackenthal *et al.*, 1990). Die

Plasmareninkonzentration bei Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen war jedoch unverändert. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet hier die nachgewiesene starke Erhöhung von Plasmaadrenomedullin in Hybrid-A BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen (siehe 5.8). Adrenomedullin wirkt nicht nur in der Vaskulatur und der Nebenniere als Gegenspieler des Angiotensin II, sondern auch in der Niere, wo es Renin induziert (vgl. Charles *et al.*, 2003). Adrenomedullin könnte daher einer potentiell blutdruckkorrigierenden Reninsenkung entgegenwirken, stellt aber auch einen weiteren aldosteronsenkenden Faktor dar, dem zum Trotz der Hyperaldosteronismus in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen persistiert.

Die erhöhte Plasmakonzentration von Adrenomedullin in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen bedarf einer Erklärung. Es bieten sich zwei Hypothesen an. Zum einen könnte es sich um eine sekundäre Folge des Hyperaldosteronismus handeln, denn Aldosteron kann die Freisetzung von Adrenomedullin *in vitro* stimulieren (Uemura *et al.*, 2002), was als negativer Rückkopplungsmechanismus zur Begrenzung der Freisetzung von Aldosteron diskutiert wird (Fallo, 2002). Eine alternative Hypothese ist, dass die Adrenomedullinsekretion primär durch die Fehlfunktion von BK Kanälen im Nebennierenmark oder der glatten Muskulatur stimuliert wird, da die BK $\beta$ 1 Untereinheit in beiden Geweben exprimiert wird (siehe 2.2, Abb. 2 und Behrens *et al.*, 2000). Die glatte Muskulatur gehört neben dem Endothel zu den Hauptquellen von Adrenomedullin (Minamino *et al.*, 2002). Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass es in der Sub-Linie Hybrid-B zu keiner Erhöhung des Plasmaadrenomedullinspiegels in BK $\beta$ 1 KO Mäusen kam.

Ein Kandidat für die unmittelbare Ursache der Dysregulation von Aldosteron in Hybrid-A BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen ist das erhöhte Endothelin-1 (ET-1) im Plasma (siehe 5.9). Für *Zona Glomerulosa* Präparationen aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769) ist beschrieben, dass bereits femtomolare ET-1 Konzentrationen eine Aldosteronausschüttung *in vitro* bewirken können und das sowohl ET<sub>A</sub> als auch ET<sub>B</sub> Rezeptoren an der Stimulation beteiligt sind (Hinson *et al.*, 1991). Außerdem wurde eine starke Expression beider Endothelinrezeptortypen in der *Zona glomerulosa* und von ET-1 direkt im Endothel der Widerstandsgefäße der humanen Nebenniere nachgewiesen (Davenport *et al.*, 1996). Obwohl die erhöhten ET-1 Konzentrationen in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen im Vergleich mit Literaturwerten (Kurihara *et al.*, 1994) relativ gering waren, ist daher eine potenzierende Wirkung des ET-1 auf die angiotensinvermittelte Aldosteronsekretion denkbar.

Die Erhöhung der Plasmakonzentration von Endothelin-1 in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen wurde durch die Re-Expression der BK $\beta$ 1 Untereinheit in der glatten Muskulatur aufgehoben (siehe 5.8). Zudem trat sie nur zusammen mit erhöhtem Blutdruck auf dem genetischen Hintergrund der Hybrid-A Sub-Linie auf, nicht aber auf dem genetischen Hintergrund der Sub-Linie Hybrid-B, auf dem BK $\beta$ 1 KO Tiere einen niedrigeren Blutdruck als Kontrolltiere zeigen (ebd.). Plasma Endothelin-1 stellt somit potentiell eine Verknüpfung zwischen der vaskulären BK Kanalfunktion und erhöhtem Blutdruck dar.

Die Rolle des Endothelin-1 in der essentiellen Hypertonie beim Menschen ist noch unklar. Endothelin-1 ist zwar in einer Vielzahl von Tiermodellen für Bluthochdruck und bei Patienten mit schwerer Hypertonie erhöht, in den meisten Fällen von humaner Hypertonie ist die Plasmakonzentration von ET-1 aber normal (vgl. Schiffrin, 1999). Eine chronische Infusion von ET-1 führt zu Hypertonie in Ratten (Elmarakby *et al.*, 2005). Transgene Überexpression von Endothelin-1 in Mäusen allein verändert den Blutdruck nicht, kombiniert mit einem Funktionsverlust der endothelialen NO Synthase führt sie aber zu einer Verstärkung der Hypertonie (Quaschnig *et al.*, 2007). In Anbetracht der umstrittenen Rolle von ET-1 in der Ätiologie der primären Hypertonie wäre es demnach wichtig, telemetrisch blutdrucküberwachte Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäuse und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltiere pharmakologische mit einem spezifischen Blocker von sowohl ET<sub>A</sub>- als auch ET<sub>B</sub>-Rezeptoren, z. B. Bosentan, zu behandeln. So könnte geklärt werden, ob sich die Veränderung des Plasma ET-1 im Signalweg stromaufwärts oder stromabwärts des Hyperaldosteronismus befindet oder einen unabhängigen Effekt darstellt.

## 7.2 Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den BK $\beta$ 1 Knockout Phänotyp

Genetische Populationsstudien konnten einen Einfluss der BK $\beta$ 1 Untereinheit auf den Blutdruck beim Menschen nachweisen. Der Effekt war allerdings nur unter Behandlung mit blutdrucksenkenden Betablockern und auf dem genetischen Hintergrund bestimmter Ethnien nachweisbar (Kelley-Hedgepeth *et al.*, 2008). Obwohl der Blutdruck von BK $\beta$ 1 KO Mäusen bereits umfangreich untersucht worden ist (Brenner *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2009a; Grimm *et al.*, 2009b; Plüger *et al.*, 2000), gab es bisher keine Berichte über eine Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund in *Mus musculus*. Gründe hierfür sind schwer festzumachen, da

Zuchtschema, Methode der Blutdruckmessung und experimenteller Aufbau sich zwischen den Studien unterscheiden. Ein *File-Drawer*-Effekt ist ebenfalls möglich (vgl. Scargle, 2000).

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass erhöhter Blutdruck, Hyperaldosteronismus und kardiale Hypertrophie des Phänotyps von Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen durch die Rückkreuzung auf den C57BL/6J Inzuchtstamm normalisiert werden konnten (siehe 5.6), während der vaskuläre Phänotyp unbeeinflusst blieb (siehe 5.5). Die Abhängigkeit des Phänotyps von genetischen Kofaktoren, die sich zwischen der C57BL/6J und der 129S1/129X1 Linie unterscheiden, wird durch die Daten von BK $\beta$ 1 KO Mäusen aus der Hybrid-B Sub-Linie untermauert. Auf diesem genetischen Hintergrund zeigten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse sogar einen deutlich erniedrigten Blutdruck im Vergleich zu Wildtyp Kontrolltieren ( $\Delta_{\text{MAB}} = -18$  mmHg; siehe 5.7). Offenbar moduliert in der Maus der genetische Hintergrund wie im Menschen den Einfluss einer veränderten BK Kanalfunktion in der glatten Muskulatur auf die Regulation des Blutdrucks. Es wäre daher interessant herauszufinden, ob in einer Mauspopulationskopplungsanalyse genetische Kofaktoren für die Blutdruckregulation durch BK $\beta$ 1 sichtbar werden.

### 7.3 Myogene Blutdruckregulation durch BK Kanäle

In den Vorarbeiten wurde gezeigt, dass BK $\beta$ 1-defizienten Mäuse der Sub-Linie Hybrid-A unter Hyperaldosteronismus leiden und eine pharmakologische Blockade der Mineralocorticoidrezeptoren zu einer Normalisierung des Blutdrucks führt (siehe 2.1 und 2.3). Ein in ähnlicher Weise hormoneller Mechanismus wurde auch von Grimm und Kollegen beschrieben, dem zufolge ein durch mangelhafte Kaliumsekretion induzierter Hyperaldosteronismus verantwortlich für die Zunahme des Blutdrucks in BK $\beta$ 1 KO Mäusen sei (Grimm *et al.*, 2009a; Grimm *et al.*, 2009b). Dies stellt die myogene Natur der Dysfunktion der Blutdruckregulation in Frage, die in Mäusen ohne BK $\beta$ 1 Untereinheit auf verschiedenen genetischen Hintergründen auftritt. Da die BK $\beta$ 1 Untereinheit des BK Kanals am prominentesten in der glatten Muskulatur exprimiert wird (Behrens *et al.*, 2000), formulierte ich die Hypothese, dass sowohl die abnormale Blutdruckregulation in Hybrid-A und Hybrid-B BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen als auch die assoziierten hormonellen Veränderungen gleichermaßen myogenen Ursprungs seien.

Die zur Prüfung dieser Hypothese generierten Mauslinien mit selektiver Re-expression der BK $\beta$ 1 Untereinheit in der glatten Muskulatur erfüllten die notwendigen Kriterien, um eine Aussage über die Rolle vaskulärer BK Kanäle für die Langzeitregulation des Blutdrucks treffen zu können: Das Expressionsniveau in der glatten Muskulatur dieser Tiere entsprach dem von endogenem BK $\beta$ 1 (siehe 5.3), die vaskuläre BK Kanalaktivität war nicht nur wiederhergestellt, sondern gegenüber den Kontrolltieren sogar gesteigert (siehe 5.4) und der vaskuläre Tonus in Aortenringen war weitgehend normalisiert (siehe 5.5).

Die Daten zur Expression der transgenen BK $\beta$ 1-E Untereinheit stimmen mit dem zu erwartenden Expressionsmuster überein, das für den verwendeten transgenen Promotor publiziert ist (Mack & Owens, 1999), so dass es soweit keinen Anlass gibt, Expression außerhalb der glatten Muskulatur zu vermuten. Die verwendeten Methoden sind zu grob, um Expressionsorte außerhalb der Muskulatur ausschließen zu können, da durch die Vaskulatur in jedem Gewebe ein gewisses Mindestsignal zu erwarten ist. Wollte man also einen bestimmten Verdacht auf ektopische Expression ausschließen, so müssten höher auflösende Methoden der Immunhistologie oder Einzelzell-PCR verwendet werden.

Es kann als gesichert gelten, dass die Einzelkanalmessungen (siehe 5.4) tatsächlich BK Kanalaktivität aufgezeichnet haben, da die Messlösungen fast ausschließlich K<sup>+</sup> als Kationen enthielten, die Einzelkanalleitfähigkeit den für BK Kanäle charakteristisch hohen Wert von  $283 \pm 7$  pS ( $n = 168$ ) hatte und die Regulation sowohl durch Membranspannung als auch durch Kalzium auf der intrazellulären Seite möglich war.

Warum in transgenen BK $\beta$ 1-E exprimierenden Mäusen eine Funktionssteigerung der BK Kanalaktivität auftrat, lässt sich nicht ohne weiterführende Experimente sicher bestimmen. Zwei alternative Erklärungen bieten sich aber an: Graduelle Effekte der BK $\beta$ 1 Modulation in Abhängigkeit der relativen Expressionsstärke in vaskulärer Muskulatur sind publiziert (Amberg *et al.*, 2003). Es könnte sich daher um eine direkte Folge der etwas höheren Expressionsstärke handeln. Voraussetzung dafür wäre, dass BK Kanäle der Kontrolltiere in der glatten Muskulatur nicht restlos mit BK $\beta$ 1 abgesättigt sind. Kanäle von Tieren der Linie BK $\beta$ 1 R9 hätten dementsprechend eine stärkere Absättigung und wären deshalb leichter unter physiologischen Bedingungen zu öffnen, Tiere der Linie BK $\beta$ 1 R13 hätten dann eine eher mit den Kontrolltieren vergleichbare Absättigung ihrer BK Kanäle mit modulierenden BK $\beta$ 1-E Untereinheiten. Für diese Erklärung spricht, dass der Grad der Funktionssteigerung mit der

relativen Expressionsstärke auf Proteinebene korreliert (vergleiche 5.3, Abb. 7 und 5.4, Abb. 8). Gegen diese Hypothese spricht, dass bei Tieren der BK $\beta$ 1 R13 Linie eine heterogene BK Kanalpopulation vorlag, bei den Kontrolltieren aber nicht. Eine andere mögliche Ursache ist, dass das transgene BK $\beta$ 1-E Fusionsprotein an sich einen stärkeren Effekt auf die BK Kanalaktivität vermittelt, als das unmodifizierte BK $\beta$ 1 Protein und die BK Kanalpopulation bei BK $\beta$ 1 R13 Tieren somit eine Mischung aus Kanälen mit gesteigerter und geminderter Öffnungswahrscheinlichkeit darstellt. Hierfür spräche indirekt, dass die Daten für BK Kanäle aus Kontrolltieren sehr genau mit den Daten übereinstimmen, die für restlos abgesättigte BK Kanäle in heterologen *Xenopus Laevis* Oozyten publiziert sind (siehe 5.4, Abb. 8B).

Die Ursache der beobachteten Funktionssteigerung ist allerdings nicht relevant dafür, ob BK $\beta$ 1 R Mäuse zur Aufklärung des myogenen Charakters der Hypertonie in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen geeignet sind - entscheidend ist hierfür die Tatsache, dass die vaskuläre BK Kanalaktivität in BK $\beta$ 1 R Mäusen wiederhergestellt werden konnte.

Die Messungen des vaskulären Tonus zeigten für BK $\beta$ 1 R Mäuse eine weitgehende, aber nicht vollständige Normalisierung (siehe 5.5). Außerdem ist der absolute Tonus in den durchgeführten Aortenringpräparationen für alle Genotypen deutlich geringer als im Jahr 2000 von Plüger und Kollegen publiziert. Letzteres kann die Folge des veränderten genetischen Hintergrunds sein, da vor dem Experiment eine Rückkreuzung auf die C57BL/6J Inzuchtlinie erfolgte. Eine Reihe anderer Ursachen kommen zudem in Frage, wie zum Beispiel der Wechsel des Agonisten von Noradrenalin zu Phenylephrin, die Verwendung anderer Organbäder, Abweichungen bei Thermostat und pH-Meter, Variabilität in der Aortenringlänge oder unbemerkte Unterschiede in der Durchführung durch den Experimentator. Da das Endothel in allen Aortenringen funktionell intakt war - getestet durch Zugabe von Acetylcholin - und der publizierte relative Unterschied zwischen BK $\beta$ 1-defizienten und Kontrolltieren reproduziert werden konnte, ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die Verringerung der absoluten Werte das Ergebnis qualitativ verfälscht hat.

Warum die Normalisierung des vaskulären Tonus nicht vollständig ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Expressionsstärke der transgenen BK $\beta$ 1-E Untereinheiten und die Funktionssteigerung der BK Kanäle sind nicht mit dem Grad der Normalisierung des vaskulären Tonus korreliert, da Aortenringe aus BK $\beta$ 1 R13 Tieren eine geringere Muskelspannung als Aortenringe aus BK $\beta$ 1 R9 Tieren zeigten. Eine Erklärung wäre, dass die

Funktionssteigerung der BK Kanäle in BK $\beta$ 1 R9 Myozyten kompensatorische Mechanismen induziert hat, eine andere wäre, dass die stärkere Expression eines Fremdproteins zu einer leichten Hypertrophie führt, die der funktionellen Normalisierung entgegen wirkt. Auch ist es vorstellbar, dass die Wiederherstellung der vaskulären Funktion durch eine fehlerhafte Lokalisierung der BK Kanäle mit EGFP-markierten Untereinheiten behindert wird.

Dessen ungeachtet ist die Normalisierung des vaskulären Tonus in BK $\beta$ 1 R Aortenringe mit über 50% für beide Mauslinien deutlich (siehe 5.5, Abb. 9). Da in den BK $\beta$ 1 R Mauslinien wie beschrieben eine distinkte Normalisierung der BK Kanalfunktion auf zellulärer Ebene und im Gewebe vorliegt, sind sie geeignet, den myogenen Beitrag des BK Kanals zur Langzeitregulation des Blutdrucks zu untersuchen.

Indem ich durch Einkreuzen des BK $\beta$ 1-E Transgens die BK Kanalfunktion spezifisch in der glatten Muskulatur von Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen wiederherstellte, konnte ich den auf diesem genetischen Hintergrund deutlich gesenkten Blutdruck der BK $\beta$ 1 KO Tiere wieder auf ein mit BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren vergleichbares Niveau steigern (siehe 5.7, Abb. 11). Dies belegt eine myogene Komponente der Blutdruckregulation durch BK Kanäle in der Maus. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch der Phänotyp gesteigerten Blutdrucks, den BK $\beta$ 1-Defizienz auf anderen genetischen Hintergründen bewirkt, seinen Ursprung in der glatten Muskulatur hat oder ob es sich um separate Mechanismen handelt.

Weitere Studien sind nötig, um die Ursache der Blutdrucksenkung in Hybrid-B BK $\beta$ 1 KO Mäusen zu klären. Zwar ist der Effekt wie oben beschrieben nachweislich myogen, jedoch wäre als direkte Wirkung des in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen auftretenden erhöhten Vasotonus eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und damit des Blutdrucks zu erwarten (Brenner *et al.*, 2000; Standen, 2000). Während mit der renalen Funktion assoziierten Plasmahormone in BK $\beta$ 1 KO Mäusen der Hybrid-A Sub-Linie erhöht sind, war kein Unterschied zwischen BK $\beta$ 1 KO und WT auf dem Hybrid-B genetischen Hintergrund festzustellen (Aldosterone, Abb. 1A / Abb. 11C; Endothelin-1, Abb. 13 und Adrenomedullin, Abb. 12). Es ist möglich, dass Unterschiede aufgrund der höheren genetischen Variabilität der Sub-Linie Hybrid-B schwieriger zu bestimmen sind. Zumindest ist es aber als unwahrscheinlich einzuschätzen, dass der erniedrigte Blutdruck auf einen Effekt flankierender Gene zurückzuführen ist, da der Phänotyp erfolgreich in BK $\beta$ 1 R Mäusen gerettet werden konnte, die über identische, das *Kcnmb1* Gen flankierende, Chromosomenabschnitte wie

BK $\beta$ 1 KO Mäuse verfügen (für eine ausführlichere Besprechung von Effekten flankierender Gene in genetischen Mausmodellen siehe Markel *et al.*, 1997). Auch konnte ich ausschließen, dass die Blutdruckerhöhung durch die ektopische genomische Integration des BK $\beta$ 1-E Transgens oder die artifizielle Re-Expression der BK $\beta$ 1-E Untereinheit in der glatten Muskulatur verursacht wurde, da Kontrollmessungen auf dem B6 genetischen Hintergrund keine Erhöhung des mittleren arterielle Blutdruck bei BK $\beta$ 1 R Mäusen gegenüber BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren ergaben (siehe 5.7).

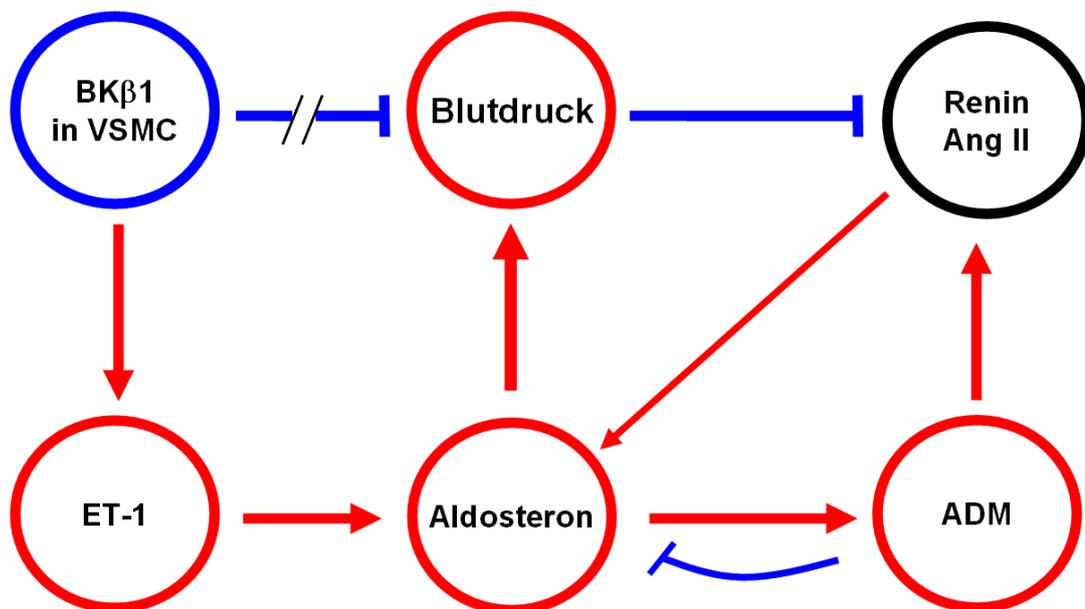
#### 7.4 Modell

Systemphysiologische Parameter im Allgemeinen und der Blutdruck im Speziellen unterliegen dem Einfluss von vielen Regulationsmechanismen, so dass es schwierig ist, im Gegensatz zum kontrollierten akuten Experiment im Tiermodell alle für die Langzeitregulation *in vivo* relevanten Parameter zu erfassen. Es ist jedoch möglich, Schlüsselparameter für wichtige Mechanismen zu überprüfen, wie zum Beispiel die Plasmakonzentration von Aldosteron als Maß für die Aktivität des RAAS, und davon ausgehend die Veränderungen der vorhandenen Signalwege gegenüber der Situation im Kontrolltier aufzuklären. Am Abschluss einer solchen Untersuchung kann ein Modell stehen, das die verfügbaren Befunde in einen sinnvollen, plausiblen Zusammenhang stellt und damit wiederum den Ausgangspunkt für weiterführende Experimente bildet.

Die Tatsache, dass der Effekt der BK $\beta$ 1-Defizienz auf den Blutdruck seine Richtung abhängig vom genetischen Hintergrund umkehren kann, die Belege für einen myogenen Mechanismus und die Beteiligung von Hormonen, welche die Nierenfunktion beeinflussen legen nahe, dass es sich bei der systemischen Blutdruckregulation durch die BK Kanalfunktion um einen komplexe Mechanismus handelt. Möglicherweise sind multiple Signalwege beteiligt, die in unterschiedlicher Weise durch genetische Kofaktoren moduliert werden und dadurch in einer veränderten Sensitivität des Blutdrucks gegenüber der veränderten BK Kanalaktivität resultieren. Eine vom BK Kanal unabhängige Funktion der BK $\beta$ 1 Untereinheit kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Unter dem Vorbehalt, rein hypothetischer Natur zu sein, lassen sich die Ergebnisse jedoch in einem Modell vereinen, wie es in Abbildung 14 und 15 dargestellt ist.

Abbildung 14 zeigt das Modell für die Situation in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen mit erhöhtem Blutdruck, z.B. in der Sub-Linie Hybrid-A. Da in dieser Sub-Linie die Behandlung von BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen mit einem Mineralocorticoidrezeptorblocker den Blutdruckunterschied zu Kontrolltieren aufheben konnte (siehe 2.3), ist das erhöhte Aldosteron in diesen Tieren wahrscheinlich über Veränderung der renalen Salzaufnahme die unmittelbare Ursache für die Hypertonie. Es ist daher im Modell dem Blutdruck direkt vorgeschaltet dargestellt.

Eine Aktivierung des RAAS konnte nicht nachgewiesen werden (siehe 5.1), jedoch ist die Blutdruckregulation nicht vom diesem System entkoppelt (siehe 2.3), weshalb Plasma Renin und Angiotensin II im Modell (rechts oben) als unverändert und das Aldosteron moderat stimulierend (schmaler roter Pfeil) dargestellt sind. Der erhöhte Blutdruck, sowie auch die Hyperkalämie (siehe 2.1), inhibieren für gewöhnlich das RAAS (blauer stumpfer Pfeil rechts oben), dieser Einfluss wird jedoch möglicherweise durch das stark erhöhte Adrenomedullin ausgeglichen (dargestellt rechts unten), dass die Reninfreisetzung stimulieren kann (siehe 5.8). Es wird möglicherweise durch die erhöhte Aldosteronkonzentration im Plasma



**Abb. 14: Modell zur myogenen Blutdruckregulation durch BK Kanäle (Sub-Linie Hybrid-A)**

Das Modell stellt die hypothetische Situation in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen für die Sub-Linie Hybrid-A dar. Rote Kreise stehen für eine Erhöhung gegenüber Kontrolltieren, blaue Kreise stehen für eine Senkung gegenüber Kontrolltieren und schwarze Kreise symbolisieren unveränderte Werte. Rote Pfeile stehen für Stimulation, blaue stumpfe Pfeile stehen für Hemmung. VSMC: Vaskuläre Myozyten; ET-1: Endothelin-1; ADM: Adrenomedullin; Ang II: Angiotensin II.

direkt induziert (roter Pfeil von Aldosteron zu Adrenomedullin).

Da Adrenomedullin negative rückkoppelnd hemmend auf Aldosteron wirkt (gebogener blauer stumpfer Pfeil) und auch ein primärer Hyperaldosteronismus ausgeschlossen werden konnte, braucht das Modell einen plausiblen aldosteronstimulierenden Faktor, der die Brücke zwischen vaskulärer BK Kanalfunktion und Plasmaaldosteron schlägt. Für diesen Faktor wird Endothelin-1 vorgeschlagen, das in BK $\beta$ 1-defizienten, aber nicht in BK $\beta$ 1 R Mäusen erhöht ist (siehe 5.8) und das zumindest *in vitro* aldosteronstimulierend wirkt (Hinson *et al.*, 1991). Da eine chronische Behandlung mit Losartan sowohl in *Rattus norvegicus* als auch im Menschen das Plasma Endothelin-1 dauerhaft reduziert (Cottone *et al.*, 1998; Slaninka-Miceska *et al.*, 2003), ist es wahrscheinlich, dass dies auch in *Mus musculus* der Fall ist. Daher ist Endothelin-1 als aldosteronstimulierender Faktor auch mit den pharmakologischen Vorarbeiten vereinbar, die einen vollständigen Wegfall des Blutdruckunterschieds zu den Kontrolltieren bei Blockade des RAAS zeigten (siehe 2.3).

Aus den Ergebnissen der Blutdruckmessungen an BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen in der Sub-Linie Hybrid-B ist bekannt, dass die Abwesenheit von BK $\beta$ 1 in der glatten Muskulatur auch einen blutdrucksenkenden Effekt haben kann (siehe 5.7), der nicht mit einer Dysregulation von Plasmahormonen assoziiert ist, wie dies in der Sub-Linie Hybrid-A der Fall ist (Abb. 1A; Abb. 12; Abb. 13). Da dieser Effekt aufgrund des genetischen Hintergrunds in der Sub-Linie Hybrid-A nicht auftritt, ist er als durchbrochener blauer stumpfer Pfeil links oben dargestellt. Man kann spekulieren, dass der blutdrucksenkende Effekt auf diesem genetischen Hintergrund nicht auftritt, weil der Blutdruck bei BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren bereits relativ gering ist (MAB:  $99 \pm 1$  mmHg,  $n = 10$ ), während er in der Hybrid-B Sub-Linie deutlich höher ausfällt (MAB:  $112 \pm 3$  mmHg,  $n = 7$ ).

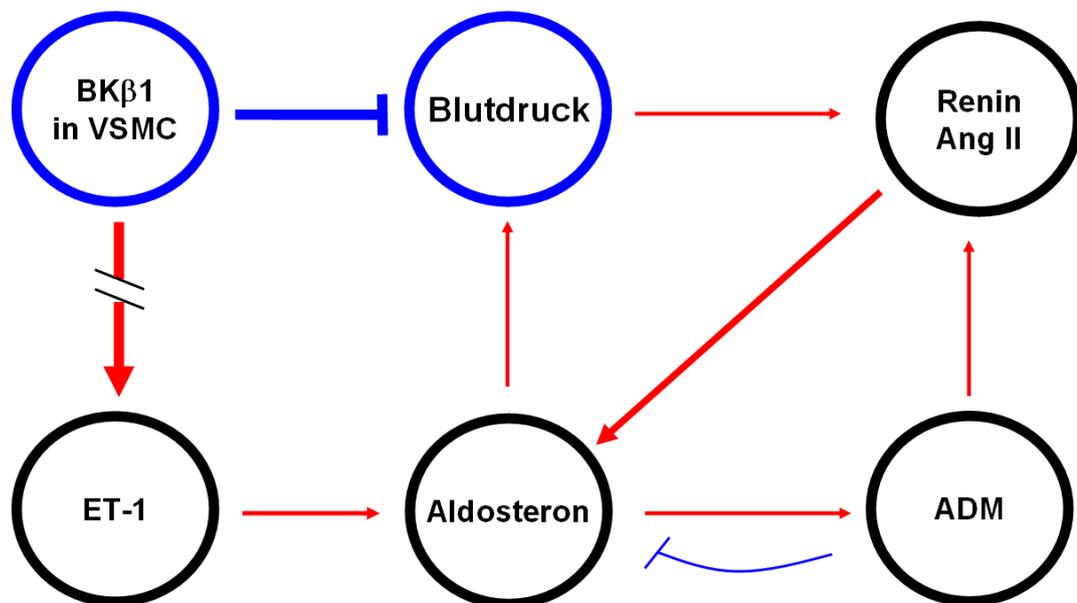
Für die Sub-Linie Hybrid-B, in der BK $\beta$ 1-defiziente Mäuse einen deutlich erniedrigten Blutdruck zeigen (siehe 5.7), stellt sich das Modell entsprechend anders dar (Abb. 15).

Auf dem veränderten genetischen Hintergrund der Sub-Linie Hybrid-B ist Plasma Endothelin-1 in BK $\beta$ 1 KO Mäusen gegenüber den Kontrolltieren unverändert (schwarzer Kreis links unten), der die Stimulation symbolisierende rote Pfeil links ist daher durchbrochen dargestellt. Plasma Aldosteron und Adrenomedullin sind ebenfalls unverändert (schwarze Kreise mittig unten und rechts unten), so dass auch von einer unveränderten Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems ausgegangen werden kann (schwarzer Kreis rechts oben). Statt der den Blutdruck steigernden Wirkung der BK $\beta$ 1-Defizienz über hormonelle Mechanismen

kommt es stattdessen zu einer blutdrucksenkenden Wirkung auf diesem genetischen Hintergrund (blauer stumpfer Pfeil links oben). Man kann spekulieren, dass der blutdrucksteigernde Signalweg über ET-1 und Aldosteron in der Sub-Linie Hybrid-B nicht zum Tragen kommt, weil Tiere dieser Linie bereits von sich aus höhere Plasmakonzentrationen an Endothelin-1 (siehe 5.8) und Aldosteron (man vergleiche Abb. 1A mit Abb. 11C) aufweisen.

Schwächere Punkte des Modells sind die sehr vereinfacht integrierte blutdrucksenkende Wirkung der BK $\beta$ 1 Defizienz und die Stimulation des Plasma Aldosterons über Endothelin-1 in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen durch die vaskuläre BK Kanal Dysfunktion.

Da hämodynamische Effekte des BK $\beta$ 1 Knockouts durch den gesteigerten vaskulären Myotonus nur blutdrucksteigernd und nicht blutdrucksenkend plausibel wären, stellt sich die Frage nach hormonellen oder parakrinen Faktoren, die den blutdrucksenkenden Effekt vermitteln könnten. Ein Kandidat wäre zum Beispiel gasförmiger Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S), der in der glatten Muskulatur und dem Endothel der Vaskulatur gebildet wird. Mäuse, denen das vaskuläre Enzym zur Bildung dieses Botenstoffes (Cystathionine Gamma-Lyase) fehlt,



**Abb. 15: Modell zur myogenen Blutdruckregulation durch BK Kanäle (Sub-Linie Hybrid-B)**

Das Modell stellt die hypothetische Situation in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen der Sub-Linie Hybrid-B dar. Blaue Kreise stehen für eine Senkung gegenüber Kontrolltieren und schwarze Kreise symbolisieren unveränderte Werte. Rote Pfeile stehen für Stimulation, blaue stumpfe Pfeile stehen für Hemmung. VSMC: Vaskuläre Myozyten; ET-1: Endothelin-1; ADM: Adrenomedullin; Ang II: Angiotensin II.

haben Bluthochdruck (Yang *et al.*, 2008). Eine Hypothese wäre demnach, dass in der Sub-Linie Hybrid-B die Bildung von H<sub>2</sub>S in der glatten Muskulatur durch die Dysfunktion der BK Kanäle gesteigert wurde und so den Blutdruck von BK $\beta$ 1 KO, aber nicht BK $\beta$ 1 WT oder BK $\beta$ 1 R Mäusen senkte. Es wäre daher interessant, die Plasmakonzentration von H<sub>2</sub>S in BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen zu messen und sie mit Cystathionine Gamma-Lyase KO Tieren zu verpaaren, um den Blutdruck der Nachkommen zu untersuchen.

In Bezug auf Endothelin-1 ist für die Gültigkeit des Modells noch zu prüfen, ob sich die Erhöhung des Plasma Endothelin-1 in der Sub-Linie Hybrid-A ursächlich oder sekundär zur Erhöhung des Blutdrucks verhält. Dazu wären Blutdruckmessungen an BK $\beta$ 1 KO Mäusen und BK $\beta$ 1 WT Kontrolltieren geeignet, die mit einem Endothelin-Rezeptorblocker, zum Beispiel Bosentan, oder Placebo behandelt werden. Ebenso fehlt noch ein direkter Nachweis, dass der erhöhte Blutdruck in Hybrid-A Mäusen myogen ist, wie für den erniedrigten Blutdruck auf dem genetischen Hintergrund der Sub-Linie Hybrid-B gezeigt (siehe 5.7). Da die Hybrid-A Mauslinie nicht mehr zur Verfügung steht, bietet es sich dazu an, den Blutdruck in BK $\beta$ 1 R Mäusen einer anderen Linie zu bestimmen, deren BK $\beta$ 1 KO Tiere ebenfalls erhöhten Blutdruck zeigen. Auch ist der Signalweg zwischen glatter Muskulatur und Endothelin-1 noch zu klären. Endothelin-1 wird fast ausschließlich im Gefäßendothel gebildet, das selbst keine BK $\beta$ 1 Untereinheit exprimiert. Jedoch befinden sich Gefäßendothel und vaskuläre glatte Muskulatur in direktem Kontakt und zeigen einen regen Signalaustausch, zum Beispiel über Stickstoffmonoxid (Palmer *et al.*, 1987), Prostaglandine (Parkington *et al.*, 1993), Endothelin-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), die Kaliumkonzentration im interzellulären Raum (Knot *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1998) oder Schwefelwasserstoff (Zhao *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2008). Eine myogene Stimulation der endothelialen ET-1 Produktion wäre über verschiedene Mechanismen denkbar. Da Endothelin-1 stark über Scherkräfte reguliert wird (Morawietz *et al.*, 2000), könnte eine generelle Verringerung der Scherkräfte in den Gefäßen durch die vaskuläre Dysfunktion zu einer gesteigerten Produktion von ET-1 und einer verlangsamten Entfernung aus dem Blutstrom führen. Ebenso denkbar ist eine direkte Stimulation des Endothels durch die vaskuläre Muskulatur über Connexine, die in Widerstandsgefäßen auch zwischen diesen beiden unterschiedlichen Geweben Verbindungskanäle bilden (vgl. Rummery & Hill, 2004). Um dies eingehender zu prüfen, bieten sich Messungen an der Mikrovaskulatur des *Musculus cremaster* (vgl. Rodenwaldt *et al.*, 2007) und Verpaarungen mit Connexin-defizienten Mäusen an.

### 7.5 Relevanz für die Blutdruckregulation im Menschen

Wie zuvor beschrieben ist beim Menschen ein Einfluss des BK Kanals auf den Blutdruck aus Populationsstudien bekannt. BK Kanäle, welche die seltenere allelische Variante BK $\beta$ 1 E65K enthalten, haben im Vergleich zu BK Kanälen mit der herkömmlichen BK $\beta$ 1 Untereinheit eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit (Fernández-Fernández *et al.*, 2004). Diese allelische Variante ist bei spanischen und amerikanischen – nicht jedoch bei japanischen und afroamerikanischen - Patienten mit einer niedrigen Prävalenz diastolischen Bluthochdrucks assoziiert. Der Effekt ist zudem beschränkt auf Patienten, die mit Blocker der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren („Betablockern“) behandelt werden (Kelley-Hedgepeth *et al.*, 2008).

Es wurde vorgeschlagen, dass diese Beschränkung auf einen Einfluss des BK Kanals auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege zurückzuführen sein könnte (ebd.). Zumindest für den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor wird diese Hypothese nicht durch die Daten der Vorarbeiten unterstützt, da in Hybrid-A Mäusen keine Interaktion zwischen den Effekten des BK $\beta$ 1 Genotyps und der Behandlung mit dem  $\beta$ 1-adrenergen Betablocker Atenolol gefunden wurde (siehe Abb. 3D). Allerdings korrelierte interessanterweise in der Sub-Linie Hybrid-A der blutdrucksteigernder Effekt der BK $\beta$ 1-Defizienz mit Aldosteronwerten, die deutlich niedriger als in den Sub-Linien B6 und Hybrid-B waren (siehe Abb. 10C und 11C). Dies ähnelt der Situation in Patienten unter Behandlung mit Betablockern, deren Renin-Angiotensin-System durch Inhibition der Reninsekretion in der Niere supprimiert ist (vgl. Hackenthal *et al.*, 1990). Es wäre daher von hohem Interesse, ob auch auf einem homogenen genetischen Hintergrund wie der B6 Sub-Linie ein blutdrucksteigernder Phänotyp durch eine Behandlung mit Betablockern zum Vorschein gebracht werden kann. Dies würde ein Mausmodell für die Blutdruckveränderung durch BK $\beta$ 1 E65K zur Verfügung stellen, die man in menschlichen Patienten unter Betablockerbehandlung sieht. Dieses pharmakologisch-genetische Modell könnte Aufschluss darüber geben, warum sich bestimmte Fälle von Bluthochdruck nicht durch die Medikation mit Betablockern kontrollieren lassen.

Mechanistisch ist es schwierig zu evaluieren, in welcher Weise BK Kanäle in der glatten Muskulatur relevant für die Regulation des systemischen Blutdrucks im Menschen sind. Da eine funktionsgesteigerte Variante der BK $\beta$ 1 Untereinheit im Menschen mit niedrigem

Blutdruck assoziiert ist, ist anzunehmen, dass Mauslinien, bei denen ein Funktionsverlust der BK $\beta$ 1 Untereinheit mit einer Blutdrucksteigerung einhergeht (Hybrid-A), eher als Modell der Situation im Menschen dienen können als solche, bei denen der Effekt umgekehrt ist (Hybrid-B). Die Ergebnisse der Sub-Linie Hybrid-A sollen daher noch einmal genauer hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen geprüft werden.

Es ist nicht trivial, von einem Mausmodell für erhöhten Blutdruck auf die Situation im Menschen zu schließen, denn gerade die physiologischen Parameter sind zwischen den zwei Spezies sehr unterschiedlich. So ist die Plasmareninkonzentration in Mäusen etwa um das hundertfache höher als beim Menschen, die Plasmakonzentration von Angiotensinogen dagegen um den Faktor zehn niedriger, mit einer resultierenden Plasmareninaktivität, die dem Menschen sehr ähnlich ist (vgl. Meneton *et al.*, 2000). Dies entspricht auch der Situation in den Kontrolltieren dieser Arbeit, wobei nur Plasmareninkonzentration und nicht Plasmareninaktivität direkt bestimmt wurde. Die gemessenen Werte für Angiotensin II lagen etwas niedriger als bei anderen publizierten Mauslinien (Gurley *et al.*, 2006) und damit nahe dem Referenzbereich für Menschen ( $\sim 10$ - $50$  pM). Da keine Veränderung des Renin-Angiotensin-Systems in Hybrid-A BK $\beta$ 1 KO Mäusen nachgewiesen werden konnte, und der über Angiotensin II vermittelte Einfluss des Systems auf Aldosteron und die Vaskulatur vergleichbar zwischen Maus und Mensch ist, gibt es keinen Anlass, eine Übertragbarkeit auf den Menschen nur aufgrund der Abweichungen für Plasma Renin anzuzweifeln.

Die in den Hybrid-A Kontrolltieren gemessenen Plasmaaldosteronkonzentrationen waren im Vergleich zu anderen Mauslinien sehr niedrig (vgl. Meneton *et al.*, 2000). Da andere Mäuse einen sehr viel höheren Aldosteronspiegel im Blut haben als Menschen (klinischer Referenzwert:  $\sim 7$  -  $50$  pM), erhöht diese Besonderheit eher die Vergleichbarkeit.

Adrenomedullin war in den Kontrolltieren vergleichbar zu anderen publizierten Werten für die Maus ( $35$  pM; Shimosawa *et al.*, 2002) und damit deutlich höher als beim Menschen ( $2$  pM; Ishimitsu *et al.*, 1994). Dadurch könnte diesem Hormon eine größere Bedeutung in der Maus zukommen als im Menschen, für den bislang wenig über die kardiovaskuläre Bedeutung von Adrenomedullin bekannt ist. Allerdings ist die Konzentration von Adrenomedullin in Patienten mit Bluthochdruck erhöht (Ishimitsu *et al.*, 1994).

Die publizierten Plasmakonzentrationen von Endothelin-1 in Mäusen liegen zwischen  $700$  fM (Kurihara *et al.*, 1994) und  $8$  pM (Lund *et al.*, 2008) und damit höher als bei den von mir verwendeten Kontrolltieren. Dies kann von der Abnahmemethode beeinflusst sein, da Endothelin-1 sehr schnell aus der Blutbahn entfernt wird (Gasic *et al.*, 1992) und daher

anzunehmen ist, dass sich die lokalen Konzentrationen je nach Position im Gefäßbaum und organotypisch unterscheiden, oder die Ursache kann im genetischen Mischhintergrund liegen. Auch hier ist wieder auffällig, dass die Hybrid-A BK $\beta$ 1 WT Kontrolltiere sehr nah an den Werten im Menschen liegen ( $252 \pm 24$  fM; Morelli *et al.*, 1995).

Keine bedeutenden Unterschiede zum Menschen gab es für die Plasmakonzentrationen von Natrium und Kalium und den mittleren arteriellen Blutdruck. Im Vergleich zu anderen Mauslinien sind die Konzentrationen von mit der Blutdruckregulation assoziierten Plasmahormonen in der Hybrid-A Sub-Linie also als für die Vergleichbarkeit mit dem Menschen gut geeignet zu bewerten.

Besonders interessant wird der für die Situation in Hybrid-A Mäusen vorgeschlagene Mechanismus (siehe Abb. 14), wenn man berücksichtigt, dass die BK $\beta$ 1 Untereinheit in Tiermodellen für *Diabetes mellitus* (McGahon *et al.*, 2007) und Bluthochdruck (Amberg *et al.*, 2003) herabreguliert ist, und dass Insulinresistenz als Kennzeichen des *Diabetes mellitus* Typ 2 sowohl mit Bluthochdruck (vgl. Kahn *et al.*, 2005) als auch erhöhtem Plasma Endothelin-1 (Kirilov *et al.*, 1993) assoziiert ist. Da die beobachtete Erhöhung des Blutdrucks in Hybrid-A BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen mit nur etwa 10 mmHg sehr moderat ist, könnte man daher über eine Rolle des vorgeschlagenen Mechanismus bei der frühen Entstehung von Bluthochdruck im Rahmen der frühen Insulinresistenz und des "metabolischen Syndroms" (vgl. Kahn *et al.*, 2005) spekulieren. Diese Spekulation wird durch das Auftreten von hohen Endothelin-1 Plasmakonzentrationen in einer Vielzahl von Tiermodellen für präklinischen Bluthochdruck unterstützt (vgl. Warner, 2001, S. 422ff).

## 7.6 Schlussbetrachtung

Abschließend folgere ich aus meinen Ergebnissen, dass der genetische Hintergrund in der Maus vergleichbar zum Menschen einen bedeutenden Modulator des BK $\beta$ 1 Knockout Phänotyps darstellt. Des Weiteren zeigen die Daten, dass die Modulation auf der systemischen Ebene stattfindet, während vaskulärer und zellulärer Phänotyp unbeeinflusst bleiben. Darüber hinaus deuten meine Befunde darauf hin, dass die Blutdruckregulation durch BK Kanäle sowohl myogen als auch hormonell über Aldosteron vermittelt sein kann – möglicherweise über separate Mechanismen. Basierend auf diesen Daten eröffnen sich neue Ansätze für die Aufklärung der systemischen Blutdruckregulation durch BK Kanäle in Form

eines pharmakologischen Tierversuchsmodells und einer genetischen Kopplungsanalyse in *Mus musculus*. Als letzter Aspekt schließlich erweckt die enge Assoziation zwischen Plasmahormonen, welche die Nierenfunktion beeinflussen und myogenen Effekten der BK Kanalfunktion die Frage danach, ob und in welchem Ausmaß hormonale Mechanismen auch in anderen, glatte Muskulatur spezifischen, Mausmodellen für Bluthochdruck involviert sind.

## 8 Zusammenfassung / abstract

### English

*Modulation of vascular tone by large-conductance calcium-regulated potassium (BK) channels requires auxiliary BK $\beta$ 1 subunits expressed in smooth muscle. BK $\beta$ 1 knockout (BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup>) mice have elevated blood pressure. Comparably, BK $\beta$ 1 gain-of-function allelic variant E65K confers lower risk of diastolic hypertension in Spanish and American, but not Japanese or African-American, patients under treatment with beta blockers. However, how BK $\beta$ 1 modulates long-term blood pressure and whether it originates in smooth muscle is unclear. The nature of its connection to genetic background and beta blocker treatment is equally obscure.*

*Preliminary results showed that BK $\beta$ 1 knockout mice of a hybrid (C57BL/6J x 129S1/129X1) sub-strain suffer from hyperaldosteronism, a likely cause of elevated blood pressure. Here, I demonstrated that increased aldosterone levels are associated with high plasma concentrations of endothelin-1 and adrenomedullin independent from activation of the renin-angiotensin-system. Repeated backcrossing of BK $\beta$ 1 deficient mice to the C57BL/6J inbred strain normalized hyperaldosteronism and high blood pressure while vascular phenotype was unaffected. Unexpectedly I observed even a low blood pressure phenotype in BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> animals of a second hybrid sub-strain, confirming the importance of genetic co-factors for expressing BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> blood pressure phenotypes. Selective re-expression of BK $\beta$ 1 under a smooth-muscle-specific promoter restored vascular BK channel function in BK $\beta$ 1 knockout mice, resulting in normalised vascular tone and rescue of low blood pressure phenotype in the second hybrid sub-strain. The results demonstrated a myogenic regulation of blood pressure linked to the  $\beta$ 1 subunit of the smooth muscle BK channel. Complementary, I found a myogenic increase of plasma endothelin-1 concentration in BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> mice specifically on the genetic background associated with elevated blood pressure. I conclude from the data that in mouse like in humans, long-term blood pressure regulation by smooth muscle BK channels is modulated by genetic background and involves increase in plasma hormones that target renal function. Finally, the results indicate that modulation takes place on the integrative systemic level without alterations to vascular or cellular phenotype.*

## Deutsch

Die Modulation des vaskulären Muskeltonus durch den kalziumregulierten Kaliumkanal großer Leitfähigkeit (BK Kanal) erfordert die zusätzliche Kanaluntereinheit BK $\beta$ 1, die in der glatten Muskulatur exprimiert wird. BK $\beta$ 1 *Knockout* (BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup>) Mäuse haben einen erhöhten Blutdruck. Gleichmaßen senkt die funktionsgesteigerte allelische Variante BK $\beta$ 1 E65K das Risiko von diastolischem Bluthochdruck bei spanischen und amerikanischen, aber nicht bei japanischen und afroamerikanischen Patienten, die mit Betablockern behandelt werden. Es ist unklar, ob die Langzeitregulation des Blutdrucks durch BK $\beta$ 1 über die glatte Muskulatur vermittelt wird und in welcher Weise sie mit dem genetischen Hintergrund und der Behandlung durch Betablocker verknüpft ist.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäuse aus einer hybriden (C57BL/6J x 129S1/129X1) Sub-Linie Hyperaldosteronismus aufwiesen, einer wahrscheinlichen Ursache für erhöhten Blutdruck. In der vorliegenden Arbeit konnte ich nun nachweisen, dass dieser Hyperaldosteronismus mit einer erhöhten Plasmakonzentration der Hormon Endothelin-1 und Adrenomedullin einhergeht, unabhängig von einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Hyperaldosteronismus und erhöhter Blutdruck von BK $\beta$ 1-defizienten Mäusen konnten durch wiederholte Rückkreuzung auf die C57BL/6J Inzuchtlinie normalisiert werden, während der vaskuläre Phänotyp unbeeinflusst blieb. Die Bedeutung genetischer Ko-Faktoren für die Ausbildung von BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Phänotypen wurde durch das unerwartete Auftreten eines deutlich erniedrigten Blutdrucks in BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäusen einer zweiten hybriden Sub-Linie zusätzlich bestätigt. Selektive Re-Expression von BK $\beta$ 1 unter der Kontrolle eines für die glatte Muskulatur spezifischen Promotors konnte die vaskuläre BK Kanalfunktion wiederherstellen, den vaskulären Muskeltonus normalisieren und die Blutdrucksenkung der zweiten hybriden Sub-Linie aufheben. Die Ergebnisse belegten eine von der BK $\beta$ 1 Untereinheit des BK Kanals der glatten Muskulatur ausgehende myogene Langzeitregulation des Blutdrucks. Ergänzend hierzu konnte ich eine myogene Erhöhung der Plasmakonzentration des Hormons Endothelin-1 spezifisch in BK $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Mäusen derjenigen Sub-Linie nachweisen, die mit einem erhöhten Blutdruck assoziiert war. Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass die Langzeitregulation durch BK Kanäle in der glatten Muskulatur in *Mus musculus* ähnlich wie im Menschen durch den genetischen Hintergrund

moduliert wird und mit einem Anstieg von Plasmahormonen einhergeht, welche die renale Funktion beeinflussen. Zum Schluss weisen die Ergebnisse darauf hin, dass diese Modulation auf der integrativen systemischen Ebene stattfindet, ohne den vaskulären oder zellulären Phänotyp zu verändern.

## 9 Literaturverzeichnis

- (Amberg *et al.*, 2003): Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, Santana LF. *Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+) activated K(+) channels in vascular smooth muscle during hypertension. J Clin Invest. 2003 Sep; 112(5):717-24.*
- (Amberg & Santana, 2003): Amberg GC, Santana LF. *Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension. Circ Res. 2003 Nov 14; 93(10):965-71.*
- (Behrens *et al.*, 2000): Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschütz R, Pongs O. *hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. FEBS Lett. 2000 May 26; 474(1):99-106.*
- (Berkefeld *et al.*, 2006): Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte U, Fakler B. *BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca2+-activated K+ signaling. Science. 2006 Oct 27; 314(5799):615-20.*
- (Braley *et al.*, 1983): Braley LM, Menachery AI, Underwood RH, Williams GH. *Is the adrenal angiotensin receptor angiotensin II--or angiotensin III like? Acta Endocrinol (Copenh). 1983 Jan; 102(1):116-21.*
- (Brenner *et al.*, 2000): Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. *Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. Nature. 2000 Oct 19; 407(6806): 870-6.*
- (Boulpaep & Boron, 2003): Boulpaep, Emile L.; Boron, Walter F.. *Medical Physiology. W.B. Saunders Company; Philadelphia, Pennsylvania, United States. 2003, 1<sup>st</sup> ed.*
- (Butz & Davisson, 2001): Butz GM, Davisson RL. *Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. Physiol Genomics. 2001 Mar 8; 5(2):89-97.*
- (Charles *et al.*, 2003): Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Rademaker MT, Richards AM, Troughton RW. *Adrenomedullin and the renin-angiotensin-aldosterone system. Regul Pept. 2003 Apr 15; 112(1-3): 41-9.*
- (Chau *et al.*, 1979): Chau NP, Safar ME, London GM, Weiss YA. *Essential hypertension: an approach to clinical data by the use of models. Hypertension. 1979 Mar-Apr; 1(2):86-97.*
- (Chobanian *et al.*, 2003): Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003 Dec; 42(6):1206-52.*
- (Conn & Louis, 1955): CONN JW, LOUIS LH. *Primary aldosteronism: a new clinical entity. Trans Assoc Am Physicians. 1955; 68: 215-31; discussion, 231-3.*

- (Cottone *et al.*, 1998): Cottone S, Vadalà A, Vella MC, Nardi E, Mulé G, Contorno A, Riccobene R, Cerasola G. *Changes of plasma endothelin and growth factor levels, and of left ventricular mass, after chronic AT1-receptor blockade in human hypertension.* **Am J Hypertens.** 1998 May; 11(5):548-53.
- (Cox & Aldrich, 2000): Cox DH, Aldrich RW. *Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca(2+) sensitivity.* **J Gen Physiol.** 2000 Sep; 116(3): 411-32.
- (Davenport *et al.*, 1996): Davenport AP, Hoskins SL, Kuc RE, Plumpton C. *Differential distribution of endothelin peptides and receptors in human adrenal gland.* **Histochem J.** 1996 Nov; 28(11):779-89.
- (Dietrich *et al.*, 2005): Dietrich A, Mederos Y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. *Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice.* **Mol Cell Biol.** 2005 Aug; 25(16):6980-9.
- (Edwards *et al.*, 1998): Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. *K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.* **Nature.** 1998 Nov 19; 396(6708):269-72.
- (Elmarakby *et al.*, 2005): Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. *NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1.* **Hypertension.** 2005 Feb; 45(2):283-7.
- (Fallo, 2002): Fallo F. *Aldosterone-adrenomedullin: a new feedback regulation in blood vessels?* **J Hypertens.** 2002 Jun; 20(6): 1081-2.
- (Faraci & Sobey, 1998): Faraci FM, Sobey CG. *Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone.* **J Cereb Blood Flow Metab.** 1998 Oct; 18(10):1047-63.
- (Fernández-Fernández *et al.*, 2004): Fernández-Fernández JM, Tomás M, Vázquez E, Orio P, Latorre R, Sentí M, Marrugat J, Valverde MA. *Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension.* **J Clin Invest.** 2004 Apr; 113(7):1032-9.
- (Goldblatt *et al.*, 1934): Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. *STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA.* **The Journal of Experimental Medicine.** 1934, Vol 59, 347-379.
- (Golde *et al.*, 2005): Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. *A Rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet.* **Lab Animal Europe.** 2005, 5(9): 29-34.
- (Grimm *et al.*, 2009): Grimm PR, Irsik DL, Liu L, Holtzclaw JD, Sansom SC. *Role of BK $\beta$ 1 in Na+ reabsorption by cortical collecting ducts of Na+-deprived mice.* **Am J Physiol Renal Physiol.** 2009 May 20. [Epub ahead of print]
- (Grimm *et al.*, 2009b): Grimm PR, Irsik DL, Settles DC, Holtzclaw JD, Sansom SC. *Hypertension of Kcnmb1-/- is linked to deficient K secretion and aldosteronism.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009 Jul 14; 106(28):11800-5.

- (Gurley *et al.*, 2006): Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. *Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice.* **J Clin Invest.** 2006 Aug; 116(8):2218-25.
- (Hackenthal *et al.*, 1990): Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion.* **Physiol Rev.** 1990 Oct; 70(4):1067-116.
- (Hansen *et al.*, 2004): Hansen PB, Yang T, Huang Y, Mizel D, Briggs J, Schnermann J. *Plasma renin in mice with one or two renin genes.* **Acta Physiol Scand.** 2004 Aug; 181(4):431-7.
- (Hinson *et al.*, 1991): Hinson JP, Kapas S, Teja R, Vinson GP. *Effect of the endothelins on aldosterone secretion by rat zona glomerulosa cells in vitro.* **J Steroid Biochem Mol Biol.** 1991; 40(1-3):437-9.
- (Hottenga *et al.*, 2005): Hottenga JJ, Boomsma DI, Kupper N, Posthuma D, Snieder H, Willemsen G, de Geus EJ. *Heritability and stability of resting blood pressure.* **Twin Res Hum Genet.** 2005 Oct; 8(5):499-508.
- (Ishimitsu *et al.*, 1994): Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H. *Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure.* **J Clin Invest.** 1994 Nov; 94(5):2158-61.
- (Kahn *et al.*, 2005): Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. *The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.* **Diabetes Care.** 2005 Sep; 28(9):2289-304.
- (Kim *et al.*, 1997): Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. *A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages.* **Mol Cell Biol.** 1997 Apr; 17(4):2266-78.
- (Kirilov *et al.*, 1993): Kirilov G, Dakovska L, Borisova AM, Krivoshiev S, Nentchev N. *Increased plasma endothelin levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage vascular complications.* **Horm Metab Res.** 1994 Feb; 26(2):119-20.
- (Knot *et al.*, 1996): Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT. *Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels.* **J Physiol.** 1996 Apr 15; 492 ( Pt 2):419-30.
- (Kurihara *et al.*, 1994): Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao W, Kamada N, Jishage K, Ouchi Y, Azuma S, Toyoda Y, Ishikawa T, Kumada M, Yazaki Y. *Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1.* **Nature.** 1994 Apr 21; 368(6473):703-10.
- (Lee *et al.* & Handa *et al.*, 2005): Lee S, Agah R, Xiao M, Frutkin AD, Kremen M, Shi H, Dichek DA. *Regulated transgene expression in vascular smooth muscle.* AUTHORS REPLY: Handa S, Momen AM, Sadi AM, Afroze T, Wang C, Husain M. **Circ Res.** 2005 Oct 14; 97(8):e85; author reply e85-7.

- (Li *et al.*, 1996): Li L, Miano JM, Mercer B, Olson EN. *Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells.* **J Cell Biol.** 1996 Mar; 132(5):849-59.
- (Lifton *et al.*, 1992): Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. *Molecular mechanisms of human hypertension.* **Cell.** 2001 Feb 23; 104(4):545-56.
- (Lund *et al.*, 2008): Lund AK, Agbor LN, Zhang N, Baker A, Zhao H, Fink GD, Kanagy NL, Walker MK. *Loss of the aryl hydrocarbon receptor induces hypoxemia, endothelin-1, and systemic hypertension at modest altitude.* **Hypertension.** 2008 Mar; 51(3):803-9.
- (Mack & Owens, 1999): Mack CP, Owens GK. *Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CARG elements within the 5' and first intron promoter regions.* **Circ Res.** 1999 Apr 16; 84(7):852-61.
- (Markel *et al.*, 1997): Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, et al. *Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains.* **Nat Genet** 1997; 17(3):280-4.
- (McGahon *et al.*, 2007): McGahon MK, Dash DP, Arora A, Wall N, Dawicki J, Simpson DA, Scholfield CN, McGeown JG, Curtis TM. *Diabetes downregulates large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium beta 1 channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle.* **Circ Res.** 2007 Mar 16; 100(5):703-11.
- (Meneton *et al.*, 2000): Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. *Renal physiology of the mouse.* **Am J Physiol Renal Physiol.** 2000 Mar; 278(3): F339-51.
- (Michael *et al.*, 2008): Michael SK, Surks HK, Wang Y, Zhu Y, Blanton R, Jamnongjit M, Aronovitz M, Baur W, Ohtani K, Wilkerson MK, Bonev AD, Nelson MT, Karas RH, Mendelsohn ME. *High blood pressure arising from a defect in vascular function.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 May 6; 105(18):6702-7.
- (Minamino *et al.*, 2002): Minamino N, Kikumoto K, Isumi Y. *Regulation of adrenomedullin expression and release.* **Microsc Res Tech.** 2002 Apr 1; 57(1):28-39.
- (Morawietz *et al.*, 2000): Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. *Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells.* **J Physiol.** 2000 Jun 15; 525 Pt 3:761-70.
- (Morelli *et al.*, 1995): Morelli S, Ferri C, Poletini E, Bellini C, Gualdi GF, Pittoni V, Valesini G, Santucci A. *Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension, and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis.* **Am J Med.** 1995 Sep; 99(3):255-60.
- (Moessler *et al.*, 1996): Moessler H, Mericskay M, Li Z, Nagl S, Paulin D, Small JV. *The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice.* **Development.** 1996 Aug; 122(8):2415-25.
- (Nolting, 2000): Nolting, Andreas. *Klonierung und Charakterisierung neuer potentieller  $\beta$ -Untereinheiten von BK-Kanälen im Säuger-ZNS.* **Diplomarbeit, Universität Hamburg, Studienfach Biologie.** 2000.
- (Oparil *et al.*, 2003): Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. *Pathogenesis of hypertension.* **Ann Intern Med.** 2003 Nov 4; 139(9):761-76.

- (Palmer *et al.*, 1987): Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. **Nature**. 1987 Jun 11-17; 327(6122):524-6.
- (Palmiter & Brinster, 1985): Palmiter RD, Brinster, RL. *Transgenic mice*. **Cell**. 1985. 41(2):343-5.
- (Parkington *et al.*, 1993): Parkington HC, Tare M, Tonta MA, Coleman HA. *Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine*. **J Physiol**. 1993 Jun; 465:459-76.
- (Plüger-Stegemann, 2000): Plüger-Stegemann, Saskia. *Untersuchung der Physiologie des spannungsaktivierten und calciumabhängigen Kaliumkanals großer Leitfähigkeit (Kcnm) nach gerichteter Keimbahnmutation der Gene für dessen alpha- (Kcnma) bzw. beta1- (Kcnmb1) Untereinheit in der Maus*. **Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie**. 2000.
- (Plüger *et al.*, 2000): Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Löhn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O. *Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca<sup>(2+)</sup> spark/STOC coupling and elevated blood pressure*. **Circ Res**. 2000 Nov 24; 87(11): E53-60.
- (Quaschnig *et al.*, 2007): Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B. *Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. **J Am Soc Nephrol**. 2007 Mar; 18(3):730-40.
- (Rodenwaldt *et al.*, 2007): Rodenwaldt B, Pohl U, de Wit C. *Endogenous and exogenous NO attenuates conduction of vasoconstrictions along arterioles in the microcirculation*. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2007 May; 292(5):H2341-8.
- (Rummery & Hill, 2004): Rummery NM, Hill CE. *Vascular gap junctions and implications for hypertension*. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2004 Oct; 31(10):659-67.
- (Sambrook & Russell, 2001): Sambrook, Joseph; Russell, David W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York**. 2001, Bd. I-III, 3. Ausgabe.
- (Sausbier *et al.*, 2005): Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M, Ruth P. *Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice*. **Circulation**. 2005 Jul 5; 112(1): 60-8.
- (Schiffrin, 1999): Schiffrin EL. *State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension*. **Hypertension**. 1999 Oct; 34(4 Pt 2):876-81.
- (Seburn, 2001): Seburn, Kevin L.. *Project: Seburn1 - Metabolic characterization*. **Mouse Phenome Database**, 2001, MPD:92, water\_adj, <http://phenome.jax.org/pub/cgi/phenome/mpdcgi?rtn=projects/dsdownload&projsym=Seburn1&mode=animaltable>.
- (Shimosawa *et al.*, 2002): Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T. *Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage*. **Circulation**. 2002 Jan 1; 105(1):106-11.

- (**Slaninka-Miceska et al., 2003**): Slaninka-Miceska M, Bogdanska J, Korneti P, Kostova E, Jovanoska E, Petrov S. *Effect of angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist on the endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats in correlation with the nitric oxide system.* **Bratisl Lek Listy.** 2003; 104(11):342-6.
- (**Standen, 2000**): Standen N. *Tuning channels for blood pressure.* **Nature.** 2000; 19;407(6806):845, 847-8.
- (**Tang et al., 2006**): Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME. *Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure.* **Nat Med.** 2003 Dec; 9(12):1506-12.
- (**Uemura et al., 2002**): Uemura T, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K, Kangawa K, Eto T. *Aldosterone augments adrenomedullin production without stimulating pro-adrenomedullin N-terminal 20 peptide secretion in vascular smooth muscle cells.* **J Hypertens.** 2002 Jun; 20(6): 1209-14.
- (**Wang et al., 1993**): Wang GT, Chung CC, Holzman TF, Krafft GA. *A continuous fluorescence assay of renin activity.* **Anal Biochem.** 1993 May 1; 210(2): 351-9.
- (**Warner, 2001**): Warner, Timothy D (Hrsg). *Endothelin and Its Inhibitors. Handbook of Experimental Pharmacology, Band 152.*: Springer-Verlag, Heidelberg, Deutschland. 2001.
- (**WHO, 2008**): World Health Organization - Department of Measurement and Health Information Systems of the Information, Evidence and Research Cluster (Hrsg.). *World Health Statistics 2008.* WHO Press, Geneva, Switzerland. 2008.
- (**Xu et al., 2003**): Xu R, Ho YS, Ritchie RP, Li L. *Human SM22 alpha BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages.* **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2003 Apr; 284(4):H1398-407.
- (**Yanagisawa et al., 1988**): Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* **Nature.** 1988 Mar 31; 332(6163):411-5.
- (**Yang et al., 2008**): Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. *H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase.* **Science.** 2008 Oct 24; 322(5901):587-90.
- (**Zager & Luetscher, 1982**): Zager PG, Luetscher JA.. *Effects of angiotensin III and ACTH on aldosterone secretion.* **Clin Exp Hypertens A.** 1982; 4(9-10):1481-504.
- (**Zhang & Popp, 2009**): Zhang CL, Popp FA. *Log-normal distribution of physiological parameters and the coherence of biological systems.* **Med Hypotheses.** 1994 Jul; 43(1):11-6.
- (**Zhao et al., 2001**): Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. *The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.* **EMBO J.** 2001 Nov 1; 20(21):6008-16.

## 10 Appendix

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenanteil
% (w/v)	g/ml
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
<i>Acta2</i>	Gen des $\alpha$ Aktins der glatten Muskulatur in <i>Mus musculus</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADM	Adrenomedullin
AGT	Angiotensinogen
BK $\beta$ 1 R	Genotyp BK $\beta$ 1 R9 und BK $\beta$ 1 R13
BK $\beta$ 1 R13	Genotyp <i>Kcnmb1</i> <sup>-/-</sup> <i>Tg(Acta2-BK<math>\beta</math>1E)13Pong</i>
BK $\beta$ 1 R9	Genotyp <i>Kcnmb1</i> <sup>-/-</sup> <i>Tg(Acta2-BK<math>\beta</math>1E)9Pong</i>
BK $\beta$ 1	$\beta$ 1 Untereinheit des Kaliumkanals großer Leitfähigkeit
BK $\beta$ 1-E	Fusionsprotein aus BK $\beta$ 1 und EGFP
bp	Basenpaare
DABCYL	4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl]azo]-benzoesäure
EDANS	5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalen-1-sulfonsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
ET-1	Endothelin-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g <sub>KG</sub>	Gramm Körpergewicht
HM	Hexamethonium
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
kb	Kilobasenpaare
<i>Kcnmb1</i>	Gen der BK $\beta$ 1 Untereinheit in <i>Mus musculus</i>
KO	Knockout (Bezeichnet das Ausschalten eines Gens)
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Argininmethylester
MAB	Mittlerer arterieller Blutdruck
MGBNFQ	<i>minor groove binder non-fluorescent quencher</i>
n	Anzahl (meint i.d.R. Stichprobenumfang)

PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phenylephrin
P <sub>O</sub>	Öffnungswahrscheinlichkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RIA	<i>Radio Immuno Assay</i>
V <sub>M</sub>	Membranpotential
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> (Vaskuläre Myozyten)
$\sigma$	Standardabweichung
$\sigma_n$	Standardfehler (= Standardabweichung / $\sqrt{N}$ )
$\Delta$	Differenz







**10.2.3** PCR Amplifikation von *Acta2* p2600Int aus genomischer DNA der Maus

*Äußere Primer SMaA\_s*: GGGCAATGAATTATAATATGGGTTC (100  $\mu$ M)

*Äußere Primer SMaA\_as*: TGCTGTCTTCCTCTTCACACATAG (100  $\mu$ M)

*Amplikon*: 5468 bp

*PCR Ansatz*: 3  $\mu$ l genomische DNA (Invisorb Kit, Invitex); 1,5  $\mu$ l je Primer; 1  $\mu$ l dNTPs (je 20 mM); 1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ l DMSO; 2  $\mu$ l pfu Polymerase, 5  $\mu$ l pfu Puffer (Fermentas); 33,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll*: 94°C 5'; 11x (94°C 35"; 62°C -0,3°C/Zyk 35"; 72°C 9'); 24x (94°C 35"; 59°C 35"; 72°C 10'); 72°C 10'; 4°C.

Agarose-Gelelektrophorese (1,5%, 30' bei 100V); Ausschneiden 4-7 kb Bereich; Gelextraktion.

*Innere Primer SMaA\_s\_Bam*: GGATCCGAACATTGGAATTTGTTAAGCC (100  $\mu$ M)

*Innere Primer SMaA\_as\_Xho*: CTCGAGTAGCTGGAGCAGCGTCTCAG (100  $\mu$ M)

*Amplikon*: 5395 bp

*PCR Ansatz*: 3  $\mu$ l Gelextrakt als Template; 1,5  $\mu$ l je Primer; 1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ l dNTPs (je 20 mM); 1  $\mu$ l DMSO; 2  $\mu$ l pfu Polymerase, 5  $\mu$ l pfu Puffer (Fermentas); 33,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll*: 94°C 5'; 11x (94°C 35"; 63°C -0,3°C/Zyk 35"; 72°C 11'); 25x (94°C 35"; 60°C 35"; 72°C 11'); 72°C 10'; 4°C.

**10.2.4** PCR Amplifikation von *Tagln* 441 bp sm22 $\alpha$  aus genomischer DNA der Maus

*Äußere Primer sm22\_nested\_s*: CAACTGTAAATGGGGTGGTAACTGC (10  $\mu$ M)

*Äußere Primer sm22\_nested\_as*: TTGTTGGCCATGTTGAGGCAGAGC (10  $\mu$ M)

*Amplikon*: 4681 bp

*PCR Ansatz*: 3  $\mu$ l genomische DNA (Invisorb Kit, Invitex); 1,5  $\mu$ l je Primer; 1  $\mu$ l dNTPs (je 20 mM); 1  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5  $\mu$ l DMSO; 2  $\mu$ l pfu Polymerase, 5  $\mu$ l pfu Puffer (Fermentas); 32,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll*: 95°C 5'; 30x (95°C 35"; 54°C 35"; 72°C 9'); 72°C 10'; 4°C.

Agarose-Gelelektrophorese (1,5%, 30' bei 100V); Ausschneiden 4-7 kb Bereich; Gelextraktion.

*Innere Primer sm22\_bam\_s:*

ATGCGGATCCCGTTTGCATAGTGCCTGGTTGTGC (50  $\mu$ M)

*Innere Primer sm22\_xho\_as:*

ATGCCTCGAGCAGAGCTAAAGTATAGAGTGTGG (50  $\mu$ M)

*Amplikon:* 4683 bp

*PCR Ansatz:* 3  $\mu$ l Gelextrakt als Template; 0,5  $\mu$ l je Primer; 1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>;

1  $\mu$ l dNTPs (je 20 mM); 1  $\mu$ l DMSO; 2  $\mu$ l pfu Polymerase, 5  $\mu$ l pfu Puffer (Fermentas);

35,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll:* 94°C 5'; 11x (94°C 35"; 63°C -0,3°C/Zyk 35"; 72°C 11'); 25x (94°C 35"; 60°C 35"; 72°C 11'); 72°C 10'; 4°C.

### 10.2.5 Sonde zum genomischen Nachweis von *Acta2-BK $\beta$ 1E* mittels Southern Blotting

```

cacaccagccttgattcatatattaacacctcaccggctcacaagtcttagagccaaaagttttctcttttaaacatttaatatgagtaaacattttaa 0100
cattttcaaattctcacatgctgccattccttgaaaatctaccttgggtgggggggggggactatataatgtccctatagaactctgctctcta 0200
cactgcatctctcatctgtgctctgtgatctattcacacactaatgctctgaccagcttgagagtggtataagagcctgtgacactcccgtctttgtgc 0300
tgaggacttggtgttaacctggaagtcagggtttcggatcatcaaaaggctttacagcctagtgaagcatttcaagataaaaggggtgttagttgagaac 0400
tgtggagagcctccagctaaaataacacacacaggaccaagaaccctgtctgtgggtgggagtgga 0464

```

Die Sonde bindet an Position 4951-5414 des Transgens (siehe 10.2.1) und wurde mit folgendem PCR Protokoll hergestellt:

*Primer s:* CACACCCAGCCTTGATTCA (100  $\mu$ M)

*Primer as:* TCAACTCCCACCCACAGACA (100  $\mu$ M)

*Amplikon:* 464 bp

*PCR Ansatz:* 1  $\mu$ l (10 ng) *Acta2-BK $\beta$ 1E* im Vektor als Template; 0,5  $\mu$ l je Primer; 0,5  $\mu$ l

dNTPs (je 20 mM); 3  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ l taq Polymerase, 5  $\mu$ l PCR Puffer (200 mM

Tris/HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 38,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll:* 93°C 2'; 40x (93°C 30"; 51°C 30"; 72°C 45"); 72°C 10'; 4°C

Genomische DNA wurde mit dem Invisorb Kit von Invitex aufgereinigt und für den Southern Blot mit dem Enzym Bsp1407I verdaut. Endogene Bande: 1,05 kb. Transgene Bande: 1,9 kb.

### 10.2.6 Genotypisierung *Kcnmb1*

*Primer 11s*: GCTGAAACTCTGAAGCTACTC (200  $\mu$ M)

*Primer 17s*: GCTATGAGGCAACTAAACAGG (100  $\mu$ M)

*Primer 3as*: CACAGCTGATACATTGACCC (100  $\mu$ M)

*WT allel*: 719 bp Amplikon durch 11s + 3as

*KO allel*: 372 bp Amplikon durch 17s + 3as

*PCR Ansatz*: 4  $\mu$ l Biopsie-Extrakt; 0,1  $\mu$ l Primer 3a; 0,45  $\mu$ l Primer 11s; 0,2  $\mu$ l Primer 17s;  
10  $\mu$ l Sigma REExtract PCR Mix (2x); 5,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll*: 93°C 2'; 41x (93°C 30"; 55°C 30"; 72°C 45"); 72°C 10'; 4°C

### 10.2.7 Genotypisierung *Acta2-BK $\beta$ 1E*

*Primer BK $\beta$ \_s*: ACACTCGGGACCAGAACC (100  $\mu$ M)

*Primer EGFP\_as*: ACTTGTGGCCGTTTACGTCG (100  $\mu$ M)

*Primer TRD1*: CAAATGTTTCCTTGTCTGGTG (100  $\mu$ M)

*Primer TRD2*: GTCAGTCGAGTGCACAGTTT (100  $\mu$ M)

*Transgen*: 423 bp Amplikon durch BK $\beta$ \_s + EGFP\_as.

*Ladekontrolle*: 206 bp Amplikon durch TRD1 + TRD2 (T-Zell Rezeptor Gen *CT030634.12*  
(Clone-based (Ensembl)))

*PCR Ansatz*: 4  $\mu$ l Biopsie-Extrakt; 0,5  $\mu$ l je Primer; 10  $\mu$ l Sigma REExtract PCR Mix (2x);  
4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

*PCR Protokoll*: 94°C 5'; 13x (94°C 35"; 55°C -0,5°C/Zyk 45"; 72°C 45"); 28x (94°C 35";  
49°C 30"; 72°C 45"); 72°C 3'; 4°C.

**10.2.8** Genotypisierung *Ren-1* / *Ren-2*(modifiziert nach: Hansen *et al.*, 2004)*Primer Ren-1s*: GGAAGGCCTATTCCATGAC (100  $\mu$ M)*Primer Ren-1a*: GCCTCCTCCTCTCTCTTG (100  $\mu$ M)*Primer Ren-2s*: GTTCAAATCCCAGCAACCAC (100  $\mu$ M)*Primer Ren-2a*: CAGTTACCCTACAACAGCAA (100  $\mu$ M)*Ren-1*: 210 bp Amplikon durch *Ren-1s* + *Ren-1a*.*Ren-2*: 220 bp Amplikon durch *Ren-2s* + *Ren-2a*

→ getrennte Ansätze je Amplikon

*PCR Ansatz*: 4  $\mu$ l Biopsie-Extrakt; 0,5  $\mu$ l je Primer; 10  $\mu$ l Sigma REExtract PCR Mix (2x); 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.*PCR Protokoll*: 94°C 5'; 15x (94°C 35"; 62°C -0,5°C/Zyk 45"; 72°C 45"); 28x (94°C 35"; 55°C 30"; 72°C 45"); 72°C 3'; 4°C.**10.2.9** Peptidsubstrat für die Renin Bestimmung**DABCYL-gaba-IHPFHL!LYYS-EDANS****DABCYL**: 4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl]azo]-benzoesäure; nicht-fluoreszenter Farbstoff, der als *Quencher* fungiert, indem er die Fluoreszenz räumlich naher Farbstoffe wie EDANS, die bei 420-530 nm emittieren, absorbiert (siehe Abb. 16).**gaba**: Gamma-Aminobuttersäure.**!**: Spaltungsstelle für Renin**EDANS**: 5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalen-1-sulfonsäure; Fluoreszenzfarbstoff mit Anregungsmaximum bei 320-360 nm und Emissionsmaximum bei 460-540 nm.

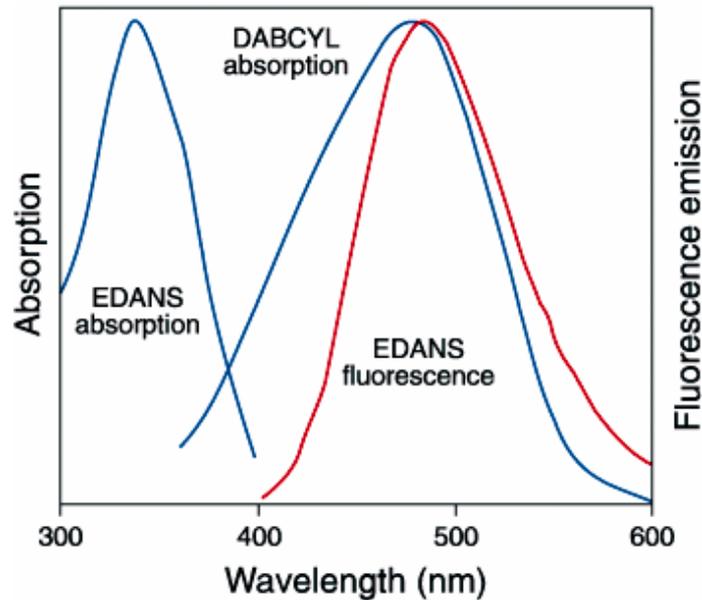


Abb. 16: Absorptionsspektrum des *Quenchers* DABCYL und Emissionsspektrum des Fluorophors EDANS überlappen fast vollständig. Modifiziert nach dem Produktkatalog von Molecular Probes, Invitrogen.

### 10.2.10 Realtime PCR TaqMan Sonden und Primer

#### Acta2-BK $\beta$ 1E

Primer OptF: AGCCAGTCGCTGTCAGGAA (300 nM Endkonzentration)

Primer Rev2: CTGGGCCATCACCAGCTT (900 nM)

TaqMan Sonde: ctgagacgtctcca (Markierung: 6-FAM MGBNFQ)

Dieses Primerpaar kann weder endogene BK $\beta$ 1 noch  $\alpha$  Aktin mRNA detektieren, da der Primer OptF im  $\alpha$  Aktin Transkript, der Primer Rev2 dagegen im BK $\beta$ 1 Transkript liegt. Eine Amplifikation von genomischer DNA ist unwahrscheinlich, da das Amplikon ein Intron überspannt, und konnte in nicht revers-transkribierten Proben auch nicht nachgewiesen werden.

#### endogenes BK $\beta$ 1

Primer BK $\beta$ 1-endo-FWD: CAGCGGAGACCCAGAGAACT (300 nM)

Primer BK $\beta$ 1-endo-REV: CTGGGCCATCACCAGCTT (900 nM)

TaqMan Sonde: aatgactgttgctccagt (Markierung: 6-FAM MGBNFQ)

Dieses Primerpaar kann die cDNA des Transgens *Acta2-BK $\beta$ 1E* nicht detektieren, da der Primer BK $\beta$ 1-endo-FWD im ersten Exon des BK $\beta$ 1 Transkripts liegt, das im Transgen nicht vorkommt. Eine Amplifikation von genomischer DNA ist unwahrscheinlich, da das Amplicon ein Intron überspannt, und konnte in nicht revers-transkribierten Proben auch nicht nachgewiesen werden.

Die Primer Rev2 und BK $\beta$ 1-endo-REV waren identisch, obwohl sie unabhängig voneinander etabliert wurden. Bei der Optimierung durch die "Primer Express" Software von Applied Biosystems und in Vorabexperimenten zeigten beide in Kombination mit den angegebenen Partnerprimern die besten Ergebnisse.

### 10.3 Material und Methoden der Vorarbeiten

Hier sind Material und Methoden der in Abschnitt 2 geschilderten Vorarbeiten dokumentiert, sofern sie sich nicht mit den Methoden der vorliegenden Arbeit überschneiden, die im Abschnitt 4 bereits erläutert wurden.

Telemetrische Blutdruckbestimmungen erfolgten wie unter 4.16 beschrieben, außerdem wurden zusätzlich pharmakologische Studien durchgeführt: Nach der Bestimmung des Ausgangsniveaus wurde der Blutdruck während der Gabe verschiedener Medikamente über des Trinkwasser kontinuierlich beobachtet. Im Einzelnen waren dies: Enalapril ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{KG}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), Losartan ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{KG}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) und Atenolol ( $25$  und  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{KG}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Dabei wurde eine Trinkmenge von 4 ml pro Tag und 30 g Körpergewicht angenommen (Seburn, 2001). Für die Behandlung mit Spironolacton wurde den Tieren nach der Erholungsphase in einer zweiten Operation subkutan Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, USA) implantiert, die über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen den Wirkstoff kontrolliert freisetzen ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{KG}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Die Bestimmung der Plasmaelektrolyte nach Blutentnahme unter Narkose ohne Wiedererwachen (siehe 4.10) erfolgte potentiometrisch durch die Firma Laboklin (Bad Kissingen). Die Immunohistochemie der Nebenniere erfolgte wie von Sausbier und Kollegen beschrieben (2005).

*Aldosteronfreisetzung an dissoziierten Nebennieren:* Aus den Versuchstieren wurden beide Nebennieren entnommen und von dem umgebenden Fettgewebe befreit. Anschließend wurden beide Nebennieren geviertelt und in 2 ml modifiziertem Medium 199 und Krebs-Ringer Lösung (20 mM HEPES; 0,68 mM L-Glutamin; 11,1 mM D-Glucose; 0,1% BSA;

pH 7,4; 290 mosmol/kg) bei 37°C und 95%O<sub>2</sub>//5%CO<sub>2</sub> in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach einer Akklimatisationsperiode von einer Stunde wurde das Medium ausgetauscht und die Aldosteronfreisetzung unter Zugabe der jeweiligen experimentellen Stimuli untersucht. Aldosteronkonzentrationen wurden mit dem Aldosteron RIA von Diagnostic Products (Los Angeles, USA) bestimmt.

#### 10.4 Individuelles SNP Markerset

Aus dem Angebot der Firma KBiosciences (Hoddesdon, GB) an etablierten chromosomalen Markern für Mauslinien wurden individuell 76 zusammengestellt, die sich zwischen dem hybriden 129S1/129X1 Hintergrund der R1 ES Zelllinie und dem von C57BL/6J Mäusen unterscheiden. Der Abstand wurde so gleichmäßig wie möglich gewählt (17-41 cM; Durchschnitt: 33 cM). Im Einzelnen hatten die Marker die folgenden SNP\_IDs (die erste Zahl steht für das Chromosom, die zweite für die Position):

01-016125198-M, 01-050957023-N, 01-089168561-M, 01-129114100-M, 01-162237105-M  
01-185013929-M, 02-012171555-M, 02-051174661-M, 02-078062303-M, 02-117015987-M  
02-152934935-M, 02-172943830-M, 03-017511270-N, 03-053161686-M, 03-088155864-N  
03-127463765-M, 03-148111378-M, 04-014657884-N, 04-053894587-M, 04-092052171-M  
04-131932869-M, 05-014236855-M, 05-050882266-M, 05-091950247-M, 05-130950804-M  
06-017592278-N, 06-058199906-M, 06-095139289-M, 06-128926170-M / 06-130055801-M,  
07-013208560-M, 07-041032053-M, 07-080974545-M, 07-118127386-M, 08-017931675-M,  
08-054093936-M, 08-092730657-N, 08-114059240-M, 09-017770060-M, 09-053790242-M,  
09-088834868-M, 09-113978459-M, 10-018064293-M, 10-053898997-M, 10-093476458-N,  
10-118296009-M, 11-011378766-M, 11-041505703-M, 11-072769004-N, 11-102928307-N,  
12-017285410-N, 12-046214872-M, 12-070670478-M, 12-107536049-N, 13-015609597-M,  
13-046957715-M, 13-077818021-M, 13-113057436-M, 14-013002953-M, 14-043010017-M,  
14-068974190-M, 14-103078760-M, 15-020280219-M, 15-057561875-M, 15-086076093-M,  
16-019621494-C, 16-057482753-C, 16-075684315-C, 17-013493244-M, 17-043164647-M,  
17-078140174-N, 18-005066417-M, 18-022053385-M, 18-054835717-M, 18-078158450-M,  
19-021081804-M, 19-060030696-N

Die korrespondierenden IDs der SNP Datenbank von NCBI (dbSNP) lauten:

rs3684370; rs3023914; rs3670389; rs3661721; rs4135672;  
rs3678548; rs4137557; rs3710476; rs3670874; rs3659112;  
rs3666533; rs3710327; rs4223752; rs3685081; rs4224040;  
rs3677929; rs3706762; rs3090919; rs3706659; rs4139384;  
rs3681494; rs3673475; rs3655838; rs3704889; rs3665335;  
rs3023064; rs3670441; rs3667765; rs3726801 / rs3702875;  
rs3661161; rs3720603; rs3686613; rs3660163; rs3664394;  
rs3661085; rs3089148; rs3658896; rs3663821; rs3685939;  
rs3669564; rs3679771; rs3696055; rs3696307; rs4228405;  
rs3693293; rs3723733; rs3704891; rs3023278; rs4229101;  
rs3023949; rs3699306; rs3663221; rs4229611; rs3701757;  
rs3724682; rs3673712; rs3724755; rs3678171; rs3691090;  
rs3693589; rs3712154; rs3662097; rs3702158; rs3708161;  
rs4165081; rs4189277; rs4205499; rs3664721; rs3677240;  
rs4231670; rs3706767; rs3707236; rs3715080; rs3725940;  
rs3692864; rs3023517

### 10.5 Danksagung

Zu den vielen Elementen, die eine Doktorarbeit möglich machen, gehören auch Menschen. Diese Personen sind mitunter erfreut, wenn man ihnen für diesen Beitrag Dank ausspricht. Sie lassen sich im Wesentlichen in drei Gruppen einteilen: Solche, die im Diskurs einen intellektuellen Beitrag zum Inhalt des Werkes geleistet haben, ferner jene, welche die Voraussetzungen für mein praktisches und theoretisches Arbeiten überhaupt erst geschaffen haben und zuletzt diejenigen, die bei der Durchführung geholfen haben.

Bezüglich des intellektuellen Beitrages zu dieser Arbeit ist sicherlich zuerst Olaf Pongs zu nennen, dessen wissenschaftliche Erfahrung und Kompetenz mir unerlässliche Unterstützung waren. Auch die aktiven Diskussionsteilnehmer der regelmäßigen Sitzungen unseres Instituts und der DFG Forschergruppe 604 gaben wertvolle Anregungen.

Die wichtigsten Vertreter der zweiten Gruppe sind meine Frau Elina Sachse und meine Eltern Birgit Menzel-Sachse und Reinhard Sachse, da sie essentiell für die Entfaltung meiner Persönlichkeit und Schärfung meiner kognitiven Leistungsfähigkeit waren. Christian Lohr, Olaf Pongs und Konrad Wiese seien hier für die Betreuung meiner Doktorarbeit ebenso genannt wie die Bevölkerung der BRD für die Finanzierung meiner Arbeit.

Hilfreich schließlich waren meine Kollegen vom Institut für Neurale Signalverarbeitung, besonders durch ein anregend internationales und produktives Arbeitsumfeld, meine Kollaborationspartner vom Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie aufgrund methodischer Anleitung und ergänzender Forschungsarbeit und das Team der Serviceabteilung "Transgene Tiere" des ZMNH.

Hiermit danke ich allen genannten Personen und auch jenen, die zu nennen ich vergessen haben sollte.