

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

„Die Relevanz des vaskulären TMEM16A für die Blutdruckregulation bei kreislaufwirksamen Bedingungen“

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maik von der Forst
aus Heinsberg

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.07.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrich Wenzel

Inhaltsverzeichnis

1	FRAGESTELLUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	DER ARTERIELLE HYPERTONUS	2
2.2	PHYSIOLOGIE DES BLUTDRUCKS	4
2.2.1	Kurzfristige Blutdruckregulation	5
2.2.2	Langfristige Blutdruckregulation	6
2.3	CHLORID IN DER GLATTEN GEFÄßMUSKULATUR	7
2.3.1	Calcium aktivierte Chloridkanäle – TMEM16A	9
2.3.2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ Transporter – NKCC	11
2.4	EFFEKTE VON MIT DER NAHRUNG ZUGEFÜHRTEM KOCHSALZ AUF DEN BLUTDRUCK	14
2.5	TMEM16A UND BLUTDRUCK – STAND DER IN VIVO FORSCHUNG	15
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	VERSUCHSTIERE	18
3.1.1	TMEM16A SMMHC-CreER ^{T2}	18
3.1.2	TMEM16A-Flox	19
3.1.3	Tierversuchsantrag	19
3.1.4	Haltung und Versuchsvoraussetzungen	19
3.1.5	Euthanasie	20
3.2	VERSUCHSPROTOKOLLE	20
3.2.1	Protokoll Standarddiät	21
3.2.2	Protokoll Salzdiäten	22
3.2.2.1	GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Salzdiät	23
3.2.2.2	Hormonbestimmung unter Salzdiät	23
3.2.3	Protokoll Furosemid	23
3.2.3.1	GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Furosemid	24
3.2.3.2	Hormonbestimmung unter Furosemid	24
3.2.3.3	Metabolischer Käfig unter Furosemid	25
3.2.3.4	Telemetrie unter Furosemid	25
3.2.3.5	Echokardiographie unter Furosemid	25
3.3	METHODEN	25
3.3.1	Telemetrie	25
3.3.2	Transkutane „Non Invasive Clearance (NIC)“- Messung	27
3.3.3	Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue	31
3.3.4	Hormonbestimmung mit der Trainingsmethode	33
3.3.5	Elektrolytmessungen im metabolischen Käfig	34
3.3.6	Echokardiographie	34
3.3.7	Organentnahme	35
3.3.8	mRNA-Bestimmung aus Aorten	36
3.4	MATERIALIEN	37
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	RENALE EINFLÜSSE DES TMEM16A-KO BEI STIMULIERTEM ODER SUPPRIMIERTEM RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	40
4.1.1	Gewichtsentwicklung unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	41
4.1.2	Trinkmenge unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	42
4.1.3	Renale Filtration unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	44
4.1.4	Organgewichte unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	46
4.1.5	Reaktion der Hormone des RAAS unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	47
4.1.6	Plasmavolumen unter Hoch- und Niedrigsalzdiät	49

4.2	ROLLE DES TMEM16A-KO UNTER SALZ- BZW. VOLUMENVERLUST UND VASODILATATION DURCH FUROSEMIDGABE.....	52
4.2.1	<i>Gewichtsentwicklung & Trinkmenge unter Furosemid</i>	52
4.2.2	<i>Telemetrie unter Furosemid.....</i>	54
4.2.3	<i>Organgewichte unter Furosemidgabe</i>	59
4.2.4	<i>Funktionelle Anpassungen des Herzens unter Furosemidgabe.....</i>	60
4.2.5	<i>Reaktion der Hormone des RAAS auf die Furosemidgabe</i>	62
4.2.6	<i>Elektrolytbestimmung in Plasma & Urin unter Furosemidgabe</i>	64
4.2.7	<i>Plasmavolumen unter Furosemidgabe.....</i>	66
4.2.8	<i>Renale Filtration unter Furosemidgabe</i>	67
4.2.9	<i>mRNA-Bestimmung in Aorten unter Furosemidgabe</i>	68
5	DISKUSSION	70
5.1	BETEILIGUNG RENALER EFFEKTE AM BLUTDRUCKABFALL DES TMEM16A-KO	70
5.2	ABHÄNGIGKEIT DER AUSWIRKUNGEN DES TMEM16A-KO VOM SALZKONSUM	72
5.3	ADDITIVE NKCC-BLOCKADE BEI TMEM16A-KO: WIE WIRD DAS KOMPENSIERT?	74
5.4	BLUTDRUCKABHÄNGIGKEIT DER AKTIVITÄT VON TMEM16A.....	77
5.5	FAZIT DER STUDIEN	79
5.6	METHODENKRITIK.....	80
5.7	QUO VADIS – OFFENE FRAGEN, WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	90
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	92
9	LITERATURVERZEICHNIS	93
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
11	TABELLENVERZEICHNIS	107
12	DANKSAGUNG	108
13	LEBENS LAUF	109
14	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	110

1 Fragestellung

Die Kenntnis aller für den peripheren Gefäßwiderstand bedeutsamen Komponenten ist enorm wichtig für ein besseres Verständnis der Blutdruckregulation und eine effektive Therapie der arteriellen Hypertonie. Ein weiteres entscheidendes Puzzleteil scheinen in diesem Kontext die Calcium aktivierten Chlorid Kanäle (CaCC) bzw. deren momentan wichtigster Vertreter TMEM16A zu sein. In vitro konnte gezeigt werden, dass CaCC's in Gefäßmuskelzellen zu einem Chloridausstrom führen, welcher für die Zelldepolarisation wichtig ist und damit zur Kontraktion beiträgt (Large and Wang, 1996; Davis *et al.*, 2013). In vivo zeigten sich übereinstimmende Erkenntnisse insofern, dass ein vaskulärer Knockout von TMEM16A in Mäusen zu einer eindrucklichen Blutdrucksenkung führt (Heinze *et al.*, 2014), während eine Überexpression bei Ratten mit hypertonen Blutdruckwerten einhergeht (Wang *et al.*, 2015).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Stellenwert des Calcium aktivierten Chlorid Kanals TMEM16A für den Blutdruck in vivo weiter zu charakterisieren. Dafür wurden verschiedene Versuchsprotokolle an einem Mausmodell mit einem induzierbaren selektiv glattmuskulären TMEM16A Knockout durchgeführt.

Es sollten folgende Aspekte beleuchtet werden:

- 1) Hat der beobachtete Blutdruckabfall bei glattmuskulärem TMEM16A-KO auch direkte renale Ursachen?
- 2) Warum besitzt die Funktion des glattmuskulären TMEM16A unter Salzrestriktion einen größeren Stellenwert für die Blutdruckregulation des Organismus als in Situationen von erhöhtem Salzkonsum („Western Diet“)?
- 3) Hat das Fehlen von TMEM16A bei gleichzeitiger Blockade der für den Salzhaushalt sowie den Gefäßtonus wichtigen Transporter NKCC1 und NKCC2 stärkere Auswirkungen auf den Blutdruck und mit welchen Kompensationsmechanismen reagiert der Organismus?

Die Betrachtung dieser Fragestellungen soll neue Erkenntnisse über die Einflüsse von TMEM16A auf die Nierenfunktion bzw. den Wasser- und Elektrolythaushalt sowie das kardiovaskuläre System bringen. Außerdem soll genauer untersucht werden, über welche Mechanismen die beobachteten blutdruckwirksamen Effekte im Rahmen des glattmuskulären TMEM16A Knockout bei Mäusen vermittelt werden.

2 Einleitung

2.1 Der arterielle Hypertonus

Die arterielle Hypertonie ist in den westlichen Industriestaaten eines der häufigsten chronischen Erkrankungsbilder. Eine Studie, die die Prävalenz des Bluthochdrucks in Europa, den Vereinigten Staaten und Kanada untersucht hat kommt zu dem Ergebnis, dass 44 % der europäischen Bevölkerung im Alter von 35 bis 74 Jahren an einem arteriellen Hypertonus leidet (Wolf-Maier *et al.*, 2015).

Es konnte außerdem in vielen nationalen und internationalen Studien gezeigt werden, dass der Hypertonus insbesondere als unabhängiger Risikofaktor für Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt oder Schlaganfall eine entscheidende Rolle spielt (Grundy *et al.*, 1999). Laut einer Veröffentlichung im Lancet Anfang dieses Jahrtausends können etwa die Hälfte aller Schlaganfälle und ischämischen Herzerkrankungen mit Bluthochdruck assoziiert werden (Lawes, Hoorn and Rodgers, 2008). Diese Zahlen dürften mittlerweile sogar noch angestiegen sein, die direkten und indirekten Folgen des arteriellen Hypertonus gehören damit zu den wichtigsten Todesursachen, im Folgenden beispielhaft aufgeführt für Deutschland (Abb. 1) (Mathers *et al.*, 2009).

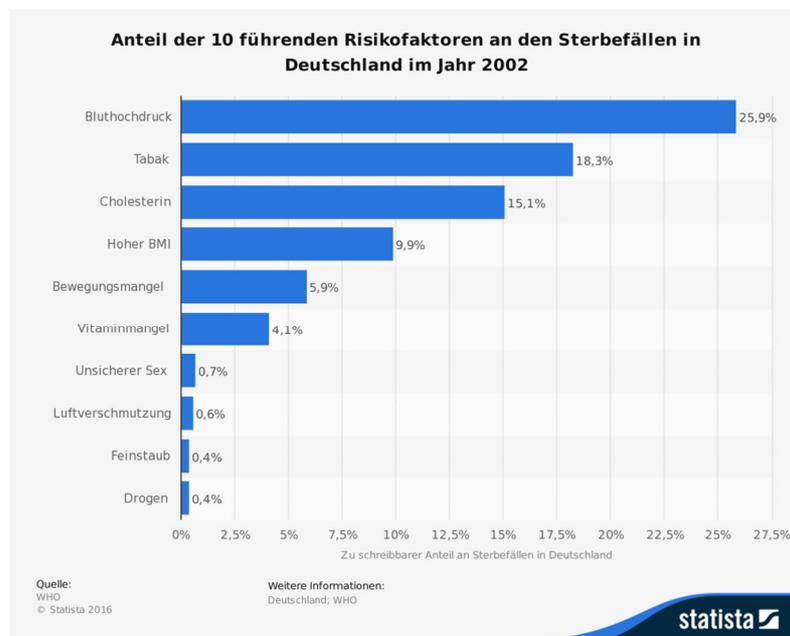


Abbildung 1: Todesursachenstatistik

Wichtigste Risikofaktoren orientiert an Sterbefällen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2002, Anteile in %, Quelle: aus WHO/Europäischer Gesundheitsbericht 2005, ©Statista.

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man von einem arteriellen Hypertonus, wenn bei wiederholten Messungen ein systolischer Blutdruck ab 140 mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck ab 90 mmHg gemessen wird. Weiterhin lässt sich die Hypertonie ebenfalls nach einer von der WHO definierten Klassifikation in verschiedene Stadien einteilen (Tabelle 1) (Guidelines Sub-committee 1999).

Tabelle 1: Stadien der arteriellen Hypertonie nach WHO-Klassifikation

Stadium	Systolischer Blutdruck		Diastolischer Blutdruck
Optimal	<120	und	<80
Normal	120-129	und / oder	80-84
Hochnormal	130-139	und / oder	85-89
Grad I - Hypertonie	140-159	und / oder	90-99
Grad II - Hypertonie	160-179	und / oder	100-109
Grad III - Hypertonie	≥180	und / oder	≥110
Isoliert syst. Hypertonie	≥140	und	<90

Je nach Schweregrad der Erkrankung stehen unterschiedliche Therapieregime im Vordergrund, welche von einer Lebensstiländerung über eine zusätzliche Mono- oder Kombinationstherapie mit Medikamenten bis hin zum Einsatz diverser invasiver Verfahren wie z.B. einer Nierenarteriendenervation reichen (Mancia *et al.*, 2013).

Betrachtet man die Ursachen dieser Erkrankung, so kann in primäre und sekundäre Hypertonien differenziert werden. Bei einem sekundären Hypertonus liegt eine organische, meist renovaskuläre (z.B. Nierenarterienstenose) oder endokrinologische (z.B. primärer Hyperaldosteronismus) Ursache zugrunde, die in der Regel kausal therapierbar ist.

Die primäre oder essenzielle Hypertonie hingegen kann nicht auf ein einzelnes organisches Korrelat zurückgeführt werden, sondern weist eine komplexe multifaktorielle Genese auf. Es gibt in diesem Kontext vor allem familiäre Assoziationen. Außerdem haben die betroffenen Patienten häufig auch einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand, bei einem meist normalen Herzminutenvolumen. Verschiedene Patientenkollektive zeigen auch Veränderungen der Renin-Plasma-Aktivität und der Aldosteronspiegel. Insgesamt scheint es

wahrscheinlich, dass die essentielle Hypertonie eine Art „Überbegriff“ für verschiedene Pathomechanismen ist, die letzten Endes in einer Erhöhung des Blutdrucks münden (Kotchen, 2010).

Trotz langjähriger intensiver Forschungsbemühungen in diesem Sektor sind auch heute bei weitem noch nicht alle Ursachen und pathophysiologischen Komponenten dieses Krankheitsbildes verstanden. Dies macht die essentielle Hypertonie, an der über 85% der an Bluthochdruck erkrankten Patienten leiden, zu einer immensen Herausforderung für das Gesundheitssystem und die Forschung.

2.2 Physiologie des Blutdrucks

Der Blutdruck ist die treibende Kraft des Blutkreislaufes, welcher vornehmlich der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen dient, aber auch eine entscheidende Rolle für den Abtransport von Kohlendioxid und anderen Stoffwechselprodukten spielt.

Viele Komponenten des Blutdrucks sind bereits hinlänglich bekannt. Eine Formel, die diese Stellgrößen gut veranschaulicht, ist das auf den Kreislauf angepasste Ohm'sche-Gesetz, welches normalerweise in der Elektrizitätslehre Anwendung findet. Es besagt, dass sich die elektrische Spannung (U) als treibende Kraft aus der Multiplikation des Stromflusses (I) und des elektrischen Widerstandes (R) ergibt. Auf den Körperkreislauf angewendet bedeutet dies, dass sich die als treibende Kraft wirkende Blutdruckdifferenz (ΔP) aus der Multiplikation des Herzminutenvolumens (HMV) als Größe für den Blutfluss und des peripheren Gefäßwiderstandes (R) ergibt (Brandes und Busse, 2011).

Wie bereits erwähnt scheint insbesondere der Gefäßwiderstand eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer essenziellen Hypertonie zu spielen. Der physiologisch wichtigste Einflussfaktor auf den peripheren Widerstand ist die Veränderung des Gefäßdurchmessers. Am besten demonstrieren lässt sich dies mit der Betrachtung des Gesetzes nach Ohm und des Hagen-Poiseuille-Gesetzes (1), welches zur Herleitung der Stromstärke einer laminaren Strömung in einem zylindrischen Gefäß dient. Aus diesen Beiden ergibt sich die in (2) abgebildete Formel, wobei die Viskosität des Blutes (η), die Gefäßlänge (l) sowie der Faktor 8 und π als konstant angesehen werden können. Vereinfacht lässt sich also sagen: Der Blutdruck entwickelt sich umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßdurchmessers (3) (Brandes und Busse, 2011).

$$(1) \Delta P = R \times HMV \quad \& \quad R = \frac{8 \times \eta \times l}{r_i^4 \times \pi}$$

$$(2) \Delta P = \frac{8 \times \eta \times l}{r_i^4 \times \pi} \times HMV$$

$$(3) \Delta P \sim \frac{1}{r_i^4} \times HMV$$

Natürlich sind diese physikalischen Formeln nur Näherungen und gelten unter idealisierten Bedingungen, dennoch liefern sie wichtige Informationen über die Gewichtung der einzelnen Faktoren bei der Regelung des Blutdrucks. Körpereigene Regulationsmechanismen sind für die Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdrucks von grundlegender Bedeutung und nur durch den ständigen Ausgleich von akuten und chronischen Druckänderungen kann eine ausreichende Perfusion aller Organe gewährleistet werden. Bei den beteiligten Regelkreisen werden dementsprechend kurz- und langfristige Steuerungsmechanismen unterschieden.

2.2.1 Kurzfristige Blutdruckregulation

Entsprechend ihres momentanen Bedarfs reagieren die einzelnen Organe auf lokaler Ebene mit einer Steigerung oder einer Verminderung des Gefäßmuskeltonus. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vor allem die druckabhängige myogene Reaktion und die Wirkung von lokal anfallenden Metaboliten. Die akute Kompensation dieser Widerstandsveränderungen und die Verhinderung von Blutdruckentgleisungen ist deshalb eine wichtige Aufgabe zur Aufrechterhaltung der zentralen Körperfunktionen.

Sichergestellt wird dies vor allem durch arterielle und kardiale Rezeptoren, die druck- bzw. dehnungssensibel sind oder auf Stoffwechselprodukte reagieren. Die dafür zuständigen sogenannten Pressorezeptoren finden sich vor allem im Karotissinus und dem Aortenbogen. Eine veränderte Aktivierung dieser Rezeptoren aufgrund eines Blutdruckanstiegs oder -abfalls führt dazu, dass über afferente Bahnen der Sympathikotonus moduliert wird. Bei zu niedrigem Blutdruck kommt es durch eine Enthemmung des Sympathikus zu positiv chronotropen sowie inotropen Wirkungen und damit zu einer Zunahme des Herzminutenvolumens. Zusätzlich wird auch der Gefäßmuskeltonus gesteigert. Zusammen bedingt dies eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Bei starker Aktivierung der

Rezeptoren durch einen hohen Blutdruck ist das Gegenteil der Fall und die Sympathikus Aktivität wird zusätzlich gehemmt, während der Parasympathikotonus steigt. (Ehmke, 2014).

Unterstützt wird der sogenannte „Pressorezeptorenreflex“ durch Typ A und Typ B Dehnungsrezeptoren in den Herzvorhöfen. Letztere werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Herzkontraktion erregt und messen vor allem Veränderungen im Niederdrucksystem. Während Typ A vor allem kardial auf den Sympathikus wirkt, sind die Effekte der B-Rezeptoren auf eine Steigerung der Flüssigkeitsausscheidung durch eine Vasodilatation der renalen Gefäße sowie eine Hemmung der Reninsekretion zurückzuführen. Weiterhin gibt es noch verschiedene Dehnungsrezeptoren in den Herzkammern sowie chemosensitive Afferenzen im Glomus Caroticum und den Koronararterien, welche jedoch nur in geringem Maße zur Blutdruckregulation beitragen. Außerdem sollte auch die sogenannte Druckdiurese d.h. eine vermehrte Flüssigkeitsekretion aufgrund einer verstärkten Nierenmarkdurchblutung bei erhöhtem Blutdruck nicht vernachlässigt werden. Hierbei ist insbesondere wichtig, dass es sich um eine von Mediatoren unabhängige Möglichkeit der Blutdruckregulation handelt (Brandes und Busse, 2011).

2.2.2 Langfristige Blutdruckregulation

Der Übergang von der kurz- in die langfristige Blutdruckregulation ist fließend, da in beiden Fällen der arterielle Blutdruck die entscheidende Regelgröße ist und die Prozesse eng miteinander verzahnt sind. Während allerdings kurzfristig vor allem die Herzfunktion und der Gefäßmuskeltonus beeinflusst werden, ist das wichtigste Stellglied der langfristigen Regulation der Wasser-Elektrolyt-Haushalt.

Wichtigster „Player“ in diesem Kontext ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), dessen Effektoren durch eine Reihe von Umwandlungsprozessen entstehen. Renin wird in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet und ausgeschüttet, es spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I, letzteres wiederum wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II ist der wichtigste Effektor des RAAS und für einen Großteil der Wirkungen verantwortlich. So wirkt es fördernd auf die Aldosteronausschüttung und damit indirekt auf die Natriumresorption, hat aber auch direkte Effekte im proximalen Tubulus. Des Weiteren ist es verantwortlich für Durst sowie Salzappetit und nimmt Einfluss auf die Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH). Außerdem ist Angiotensin II in der Lage eine direkte Vasokonstriktion auszulösen (Brandes und Busse, 2011).

Trotz der zentralen Rolle des RAAS setzt sich die Blutdruckregulation aus einem komplexen Zusammenspiel an verschiedenen Mediatoren zusammen. So kommt ADH eine essenzielle Rolle für die Flüssigkeitsretention zu, darüber hinaus erhöht es auch den Gefäßmuskeltonus. Antagonistisch dazu kann man das atriale natriuretische Peptid (ANP) sehen, welches bei starker Dehnung der Vorhöfe ausgeschüttet wird und zu einer vermehrten Diurese sowie einer Vasodilatation führt (Lang, 2011).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zwar eine Vielzahl verschiedener Mechanismen an der Konstanthaltung des Blutdrucks beteiligt sind, dennoch sind es immer dieselben Stellgrößen die beeinflusst werden. Die wichtigsten sind: das Herzminutenvolumen und der periphere Gefäßwiderstand. Ersteres wird vor allem über die Herzfrequenz, die Inotropie und das vorhandene Blutvolumen verändert, Zweiteres hingegen überwiegend durch die direkte Wirkung von Hormonen, Mediatoren und Stoffwechselprodukten. Der periphere Gefäßwiderstand ist damit, wie bereits dargestellt, eine entscheidende Größe in der Blutdruckregulation (s.o.).

2.3 Chlorid in der glatten Gefäßmuskulatur

Schon seit geraumer Zeit spielen vor allem die Kationen Natrium, Kalium und Calcium eine tragende Rolle in den Modellen über die Erregbarkeit und die Kontraktilität von glatten Muskelzellen, aber erst langsam gerieten Anionen, allen voran das Chlorid in den Fokus der Forschung (Bulley and Jaggar, 2013). Zwar gab es schon seit den achtziger Jahren Hinweise und Publikationen die darauf hindeuteten, dass Chlorid in der Gefäßmuskulatur von Bedeutung ist, dennoch gestaltete sich der Fortschritt auf diesem Gebiet schwierig. Erst in den letzten Jahren wurden z.B. spezifische Kanalblocker entwickelt und obwohl durch die Aufklärung der molekularen Strukturen einiges Licht ins Dunkel gebracht wurde handelt es sich um ein hochkomplexes Gebiet, in dem noch viel Arbeit geleistet werden muss (Oh *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2013).

Der aktuelle Wissenstand zu dieser Thematik wurde erst kürzlich von Hübner *et al.* (2015) zusammengefasst, so findet sich in Abbildung 2 eine Übersicht der momentan bekannten Protagonisten des Chlorid Stoffwechsels in Gefäßmuskelzellen und ihrer Wirkung. Ferner sind auch viele weitere Eigenschaften der einzelnen Kanäle und Transporter bereits bekannt. Betrachtet man die intrazelluläre Konzentration von Chlorid in glatten Muskelzellen fällt auf, dass diese mit etwa 30-50 mM deutlich über dem erwarteten Gleichgewichtspotential (15-16,5 mM) von Chlorid liegt (Davis *et al.*, 2000; Lamb, Kooy and Lewis, 2000;

Rust *et al.*, 2006). Erzeugt wird dieses Konzentrationsgefälle durch mindestens zwei Komponenten: einen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Transporter (NKCC) und einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Antiporter (AE), welche Chlorid in die Zelle befördern und ubiquitär in der glatten Muskulatur vorkommen (O'Donnell and Owen, 1994; Davis *et al.*, 2000). Es gibt auch Hinweise auf einen dritten Transporter, dessen Struktur und genaue Eigenschaften allerdings noch unklar sind und der deshalb aktuell als „Pump III“ bezeichnet wird (Davis *et al.*, 2000). Die durch diese „Pumpen“ erzeugte Akkumulation von Chlorid in der Zelle führt dazu, dass es bei der Öffnung volumenregulierter (VRAC) oder Calcium aktivierter Chloridkanäle (CaCC) zu einem Chloridausstrom kommt, welcher mit einer Depolarisation einhergeht. Im weiteren Verlauf öffnen sich spannungssensitive Calciumkanäle (VDCC) und es wird zusätzliches Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt, diese Kaskade mündet letztendlich in einer auf die Depolarisation folgenden Kontraktion der Muskelzelle (Criddle *et al.*, 1996; Boedtkjer *et al.*, 2008).

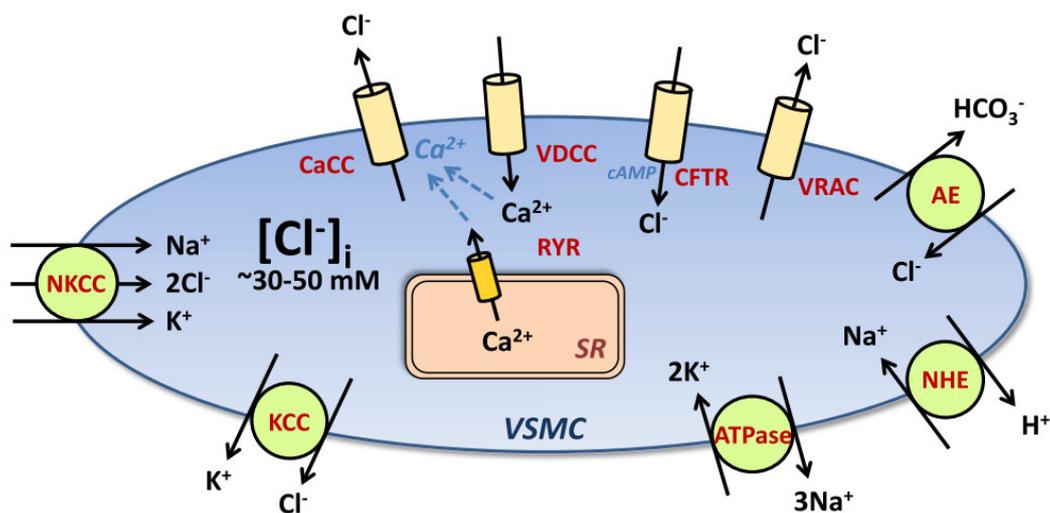


Abbildung 2: Chlorid in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur

Die Graphik liefert einen Überblick über die wichtigsten Chloridtransporter und Kanäle die in der glatten Gefäßmuskelzelle (VSMC) vorkommen (Fig. 1, Hübner, Schroeder and Ehmke, 2015).

Im Rahmen einer Vielzahl an Publikationen zeigten sich vor allem zwei dieser Komponenten als vielversprechend im Sinne eines signifikanten Einflusses auf den Blutdruck. Es handelt sich hierbei um den Transporter NKCC und den erst vor kurzem entdeckten CaCC TMEM16A. Der NKCC ist bereits seit langem ein etabliertes „Target“ in der Therapie der arteriellen Hypertonie, da er sich durch Schleifendiuretika wie Furosemid oder Bumetanid hemmen lässt, was zu einer erfolgreichen Blutdrucksenkung führt (Cantarovich *et al.*, 1974). TMEM16A hingegen spielt in der Klinik momentan noch eine untergeordnete Rolle, konnte aber in diversen Veröffentlichungen bei Überexpression mit arteriellem Bluthochdruck und

pulmonaler Hypertonie assoziiert werden (Forrest *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Der Fokus dieser Arbeit richtet sich deshalb insbesondere auf TMEM16A, aber auch dessen synergistische Wirkung mit NKCC im glattmuskulären Chlorid Stoffwechsel, welche im Folgenden näher erläutert wird.

2.3.1 Calcium aktivierte Chloridkanäle – TMEM16A

Schon seit ihrer Erstbeschreibung in *Xenopus* Oozyten 1983 durch Barish *et al.* stellen die sogenannten CaCC`s ein wichtiges Forschungsobjekt dar. Trotz einer großen Anzahl an Publikationen und wissenschaftlichen Arbeiten sind jedoch immer noch viele Fragen offen. Ein großer Durchbruch gelang 2008 mit der nahezu gleichzeitigen Erstbeschreibung und molekularen Entschlüsselung des Proteins TMEM16A durch drei verschiedene Forschergruppen (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). In ihren Experimenten konnten die Forscher nachweisen, dass es sich bei ihrer Entdeckung tatsächlich um den in *Xenopus* Oozyten beschriebenen CaCC – TMEM16A handelt.

TMEM16A, welcher auch Ano1 genannt wird, gehört zur Familie der Anoctamine, die ihren Namen durch die acht („octa“) Transmembrandomänen bekam. Die zehn von verschiedenen Genen kodierten Proteine dieser Familie scheinen ubiquitär im Organismus vorzukommen und haben unterschiedlichste Aufgaben. Als einige der wichtigsten wurden Einflüsse auf Zellvolumenregulation, Darmperistaltik, Entwicklung der Atemwege, Förderung des Zellwachstums und sekretorische Funktionen beschrieben (Kunzelmann *et al.*, 2011). Die beiden wichtigsten Vertreter der Anoctamine scheinen TMEM16 A & B zu sein, es sind die zwei einzigen Proteine bei denen bis dato feststeht, dass es sich um CaCC`s handelt, während dieser Nachweis für die anderen Mitglieder der Anoctamin Familie noch aussteht (Scudieri *et al.*, 2012). Es wird allerdings stark bezweifelt, dass diese ebenfalls CaCC`s bilden, TMEM16 F wurde mittlerweile als Calcium aktivierter Kationenkanal beschrieben (Yang *et al.*, 2012). Über die Funktion der Anoctamine 3,4,9 herrscht zur Zeit noch Unklarheit, da die Datenlage keine endgültigen Schlüsse zulässt (Duran und Hartzell, 2011; Picollo *et al.*, 2014).

TMEM16B kommt in Neuronen sowie insbesondere in olfaktorischen Sinneszellen vor und ist damit in andere Prozesse eingebunden als TMEM16A, welcher nicht nur für die Zellproliferation, die Darmmotilität, die Sekretion in Epithelien und einiges mehr ein wichtiger Faktor ist, sondern auch explizit in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommt und dort nach heutigen Erkenntnissen an der Modulation des Gefäßwiderstands beteiligt ist

(Huang *et al.*, 2009; Stephan *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010). Bei einer Quantifizierung von glattmuskulärem TMEM16A im Gefäßsystem mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) konnte der Kanal in absteigender Menge in Pfortader, thorakaler Aorta und A. carotis detektiert werden (Davis *et al.*, 2010). Tatsächlich wurde bereits 1996 postuliert, dass die CaCC's in der glatten Gefäßmuskulatur eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des peripheren Widerstands spielen und ein Teil des Mechanismus für eine Agonisten getriggerte Vasokonstriktion sind. Aufgrund der Chloridakkumulation in der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) kommt es zu einem Chloridausstrom und zunehmender Depolarisation. Weitere spannungsgesteuerte Calciumkanäle (VDCC) öffnen sich, Calcium wird zusätzlich aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt und es kommt zur Vasokonstriktion (Abb. 3) (Large and Wang, 1996; Kitamura and Yamazaki, 2001; Kunzelmann *et al.*, 2011). Das damals noch unbekannte Korrelat dieser Ergebnisse ist der Calcium aktivierte Chloridkanal TMEM16A, der aufgrund dieser Eigenschaften in den Fokus unserer Forschung geriet.

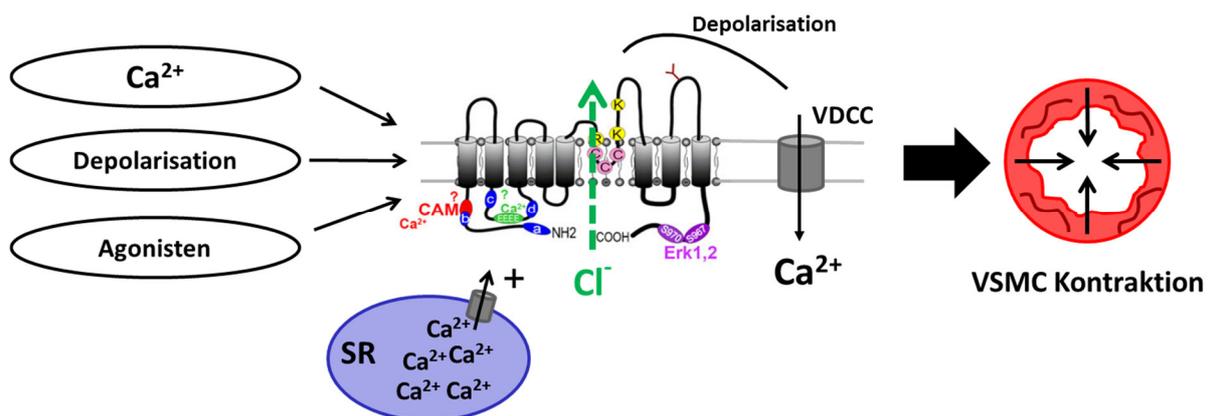


Abbildung 3: Aktivierung und Struktur von TMEM16A in der Gefäßmuskulatur

Calcium, Depolarisation und direkte Agonisten sind in der Lage den acht Transmembrandomänen umfassenden CaCC TMEM16A zu aktivieren. Glatte Gefäßmuskulatur (VSMC), spannungsgesteuerte Calciumkanäle (VDCC), sarkoplasmatisches Retikulum (SR) (Large und Wang 1996; mod. Kunzelmann et al. 2011).

TMEM16A ist ein Protein welches als Homo-Dimer vorliegt und einen Calcium aktivierten Chloridkanal bildet (Sheridan *et al.*, 2011). Anfangs gab es zwar die Vermutung, dass Ano 1 lediglich ein CaCC regulierendes Protein sein könnte, dies wurde aber nach Experimenten mit TMEM16A Knockdown durch siRNA's verworfen, da ein nahezu vollkommenes verschwinden des vorher gemessenen Chloridstromes gezeigt werden konnte (Caputo *et al.*, 2008). Von TMEM16A scheinen mindestens vier Spleißvarianten zu existieren, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Ferrera *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011). Generell handelt es sich bei diesem Kanal um einen auswärtsgerichteten Chloridkanal, für

dessen Aktivierung Calcium essenziell notwendig ist. Bei maximaler Präsenz von Calcium wird der Chloridfluss allerdings linear spannungsabhängig (Schroeder *et al.*, 2008).

Der genaue Mechanismus der Aktivierung durch Calcium bleibt jedoch unklar, da z.B. eine Calciumbindungsstelle bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte. TMEM16A scheint des weiteren verschiedene Öffnungszustände zu haben, da seine Permeabilität für diverse Ionen von $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Aspartate}$ variiert (Greenwood, Ledoux and Leblanc, 2001). Darüber hinaus gibt es auch direkte Agonisten, die in der Lage sind den Kanal zu aktivieren. Bekannt sind unter anderem Endothelin-1, Histamin, ATP, Angiotensin II. Der Mechanismus dahinter basiert wahrscheinlich auf einer G-Protein gekoppelten Signalkaskade (Large and Wang, 1996; Dai and Zhang, 2001, 2002). Insgesamt handelt es sich um einen komplex regulierten Kanal, der durch unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten, Splicevarianten und Permeabilitäten sehr vielfältig zu sein scheint. Die Zusammenschau von getroffenen Hypothesen, in vitro Experimenten und ersten in vivo Versuchen mit diversen Knockouts, welche in einem der folgenden Absätze erläutert werden, zeigen, dass TMEM16A ohne Zweifel eine physiologische Relevanz im Rahmen der Modulation des Gefäßmuskeltonus und damit der Blutdruckregulation hat. Diese soll in der vorliegenden Arbeit weiter aufgeschlüsselt werden.

2.3.2 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$ Transporter – NKCC

Der Natrium-Kalium-2-Chlorid Co-Transporter und dessen Funktionen werden schon seit vielen Jahren erfolgreich beforscht. Bereits 1994 konnten die zwei Subtypen NKCC1 und NKCC2 ausgemacht werden. Beide Isoformen des Transporters sorgen für einen elektroneutralen Symport von je einem Natrium-, einem Kalium- und zwei Chloridionen (Haas and Forbush, 2000).

Der NKCC2 kommt vor allem im dicken Teil der aufsteigenden Henle-Schleife in der Niere vor und ist für die Resorption von Elektrolyten zuständig. Ein Defekt des NKCC2 ist außerdem ursächlich für das sogenannte Bartter-Syndrom, welches mit Elektrolyt- und Flüssigkeitsverlusten einhergeht (Simon *et al.*, 1996). Die zweite wichtige Funktion des NKCC2 betrifft das tubuloglomeruläre Feedback. Der Transporter wurde im juxtaglomerulären Apparat in den apikalen Zellen der Macula Densa gefunden und scheint dort vor allem an der Messung des Elektrolytgehaltes beteiligt zu sein. Er hat an dieser Stelle entscheidenden Einfluss auf den Wasser-Elektrolyt Haushalt, da es bei einer erhöhten Elektrolytkonzentration im Harn über ein negatives Feedback zu einer Vasokonstriktion des

Vas afferens und damit zu einer verminderten GFR kommt (Orlov *et al.*, 2015; Schnermann und Briggs 2008).

Anders als beim streng renal exprimierten NKCC2 verhält es sich mit dem NKCC1, der in vielen Epithelien, sekretorischen Zellen, Neuronen aber auch in der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden konnte und verschiedenste Aufgaben wahrnimmt (Markadieu and Delpire, 2014). Wichtig ist in diesem Kontext die Rolle des im sekretorischen Epithel des Innenohrs vorkommenden NKCC1, dessen nicht selektive Blockade z.B. durch Schleifendiuretika, zu Taubheit führen kann (Delpire *et al.*, 1999; Flagella *et al.*, 1999). Insbesondere im Zusammenhang mit Blutdruckregulation und Hypertonie scheint der NKCC1 eine wichtige Rolle zu spielen. Seine physiologische Funktion in der glatten Gefäßmuskulatur ist der Transport von zwei Chloridionen mit einem Natrium- und einem Kaliumäquivalent in die Zelle. Letzteres sorgt für eine intrazelluläre Chloridakkumulation und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Hierdurch wird die Membrandepolarisation sowie die Öffnung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen unterstützt und eine Steigerung des Gefäßwiderstands erzeugt, während ein Ausschalten des Kanals zu einer Hyperpolarisation führt (Davis, Chipperfield and Harper, 1993; Orlov *et al.*, 2012).

Es wurden Experimente unter anderem an Aorten von Ratten durchgeführt, die zeigen konnten, dass der Transporter durch Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, aber auch z.B. Angiotensin II aktiviert wird und dass dessen Expression bei spontanhypertensiven Ratten chronisch hochreguliert ist (Bianchi *et al.*, 1985; Owen and Ridge, 1989; Lee *et al.*, 2010). Im Hinblick auf die gewonnenen Erkenntnisse scheint es sich bei dem glattmuskulären NKCC1 um ein wichtiges Zielprotein für die Regulation des Gefäßtonus zu handeln, da sowohl eine Hemmung durch Nitrovasodilatoren, als auch eine Aktivierung durch Vasokonstriktoren möglich ist (Akar *et al.*, 1999). In anderen Versuchen konnte sogar eine von der Höhe des Blutdrucks abhängige Aktivität des NKCC1 nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 2004).

Bei der Gabe von Schleifendiuretika im klinischen Alltag wird bereits kurzfristig ein Blutdruckabfall beobachtet, also noch bevor überhaupt eine gesteigerte Diurese auftreten kann. Dieser Effekt scheint vor allem auf eine Erniedrigung des peripheren Gefäßwiderstands und eine Vasodilatation zurückzuführen zu sein, da die Gabe des Schleifendiuretikums Bumetanid zwar bei Wildtypmäusen zu einem akuten Blutdruckabfall führt, bei NKCC1-Knockouttieren hingegen keinen Effekt zeigt (Garg *et al.*, 2007). Unabhängig davon zeigten Untersuchungen von NKCC1 *-/-* Mäusen einen signifikant niedrigeren Blutdruck als die jeweilige Kontrollgruppe (Meyer *et al.*, 2002).

Insgesamt scheint der im Vergleich zu NKCC2 ubiquitär vorkommende NKCC1 für Vasotonus und Blutdruck die größere Rolle zu spielen. Durch seine vielfältigen Funktionen führt eine Blockade unter Umständen auch zu schwereren Nebenwirkungen. So kann, wie bereits erwähnt, bei einer Überdosierung auch eine Innenohrschädigung auftreten. Ein weiterer möglicher Nachteil der NKCC1-Blockade wurde kürzlich in einem Review von Orlov *et al.* (2015) diskutiert: vermutet wird eine nephroprotektive Wirkung durch den von NKCC1 vermittelten Bayliss-Effekt im Vas afferens. Insbesondere bei arterieller Hypertonie könnte dieser Mechanismus vor einer glomerulären Hyperfiltration und damit vor einem erhöhten Risiko für ein chronisches Nierenversagen schützen, eine längerfristige Blockade des Kanals durch Schleifendiuretika wäre damit kontraproduktiv (Orlov *et al.*, 2012; Orlov *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2007). Die Erkenntnisse bleiben jedoch widersprüchlich, da unter dem Einfluss von Schleifendiuretika in anderen Studien auch ein verminderter renaler Blutfluss detektiert werden konnte (Oppermann and Hansen, 2007).

Wie bereits angedeutet wurde bei der Erforschung der NKCC's auch viel mit den sogenannten Schleifendiuretika experimentiert. Häufig kamen die zwei wichtigsten Vertreter Bumetanid oder Furosemid zum Einsatz. Um die in 2.5 getroffenen Annahmen näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit Furosemid zur Blockade der NKCC's verwendet. Die Halbwertszeit beträgt beim Menschen etwa 6-8 Stunden (Hutcheon and Leonard, 1967). Es handelt sich um ein etabliertes Medikament, welches in der Alltagsmedizin als Diuretikum bei der Ausschwemmung von Ödemen bzw. in der Therapie der arteriellen Hypertonie oder der Herzinsuffizienz Anwendung findet. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist die Hemmung der Transporter NKCC1 und NKCC2, als Konsequenz kommt es zu einer vermehrten Salz- und Wasserausscheidung sowie zu einer Vasodilatation (Hutcheon and Leonard, 1967). Eine Vielzahl an vaskulären Effekten durch die Gabe von Schleifendiuretika wurde bereits 1996 in einem Review durch Dormans *et al.* aufgearbeitet. Es gibt demnach Hinweise auf Einflüsse im arteriellen sowie im venösen Gefäßsystem, dies unterstreicht wie wichtig NKCC1 für den Erhalt des Gefäßmuskeltonus und den Blutdruck ist.

2.4 Effekte von mit der Nahrung zugeführtem Kochsalz auf den Blutdruck

Das Thema Kochsalzzufuhr (NaCl) und dessen Einfluss auf den Blutdruck wird bereits seit Jahren in Wissenschaft und klinischer Medizin diskutiert. Die meisten Studien berücksichtigen vor allem den Natriumkonsum. Natrium ist ein sehr gut erforschter Bestandteil des Elektrolythaushalts mit vielfältigen Wirkungen im Organismus, allen voran die Zelldepolarisation von Nervenzellen bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen. Es handelt sich hierbei um ein überwiegend extrazelluläres Ion. Im Blutplasma ist Natrium das am stärksten vertretene Kation und hat durch osmotische Effekte entscheidenden Einfluss auf den Blutdruck. Aufgrund dieser Relevanz wird die Natriumkonzentration im Plasma streng durch ein Zusammenspiel von verschiedenen, weiter oben bereits beschriebenen, Blutdruckregulationsmechanismen wie ANP, ADH und allen voran dem RAAS mitbeeinflusst (Brandes und Busse, 2011; Ehmke, 2014).

Die Einflüsse von veränderter Kochsalzzufuhr konnten bereits in mehreren Studien dargestellt werden, insbesondere der Anstieg der Renin- und Aldosteronspiegel unter reduziertem Natriumkonsum ist gut dokumentiert (Oliver, Cohen and Neel, 1975; Graudal, Galløe and Garred, 1998). In vielen Studien und darauffolgenden Metaanalysen konnte auch der indirekt blutdrucksenkende Effekt von gemäßigttem Natriumkonsum ermittelt werden. Dieser konnte sowohl bei normotensiven Probanden als auch bei Hypertonikern gezeigt werden, fiel bei letzteren allerdings größer aus (Aburto *et al.*, 2013; He, Li and Macgregor, 2013). In einer weiteren Analyse konnten auch die Folgen des hohen Salzkonsums quantifiziert werden, so geben Mozaffarian *et al.* (2014) an, im Jahre 2010 weltweit 1,65 Mio. Todesfälle aufgrund von einer Natriumzufuhr >2g/ Tag ermittelt zu haben. Aufgrund dieser und anderer Ergebnisse hat eine Empfehlung zur Reduktion der Kochsalzzufuhr auch längst Eingang in nationale Ernährungsempfehlungen und Leitlinien wie z.B. der European Society of Cardiology gefunden (Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water and Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, 2005; Mancia *et al.*, 2013). Neuere Studien zweifeln ausschließlich positive Effekte eines reduzierten Salzkonsums an. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde eine, in der PURE-Studie bereits ermittelte, U-Kurve von Salzkonsum und negativen Effekten bestätigt. Es wurde des Weiteren herausgefunden, dass ein erhöhter Salzkonsum lediglich bei Hypertonikern zum vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen führt, während zu wenig Natriumzufuhr zusätzlich auch in der normotensiven Population eine erhöhte Rate an kardiovaskulären Ereignissen zur Folge hatte (Mente *et al.*, 2014, 2016).

Die endgültigen Empfehlungen für eine Kochsalzzufuhr sind damit noch nicht abschließend geklärt, die Bedeutung für die Höhe des Blutdrucks sowie für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen ist jedoch offensichtlich. Zur Erforschung der Relevanz des TMEM16A bei der Blutdruckregulation wurden deshalb Experimente mit erhöhter (sog. Western Diet) und erniedrigter Kochsalzzufuhr sowie einem erhöhten Salzverlust (durch Furosemid) durchgeführt. Erste Hinweise auf eine veränderte Auswirkung von unterschiedlicher Salzzufuhr auf den TMEM16A-KO wurden bereits publiziert und werden im folgenden Absatz näher erläutert (Heinze *et al.*, 2014). Ziel war es deshalb, die Unterschiede der Kanalfunktion bzw. des Stellenwerts für den Organismus bei verändertem Salzkonsum besser zu erforschen.

2.5 TMEM16A und Blutdruck – Stand der in vivo Forschung

Die meisten der heute vorliegenden Informationen über TMEM16A wurden mit verschiedenen unspezifischen (z.B. Niflumic Acid (Chen *et al.* 2011)) oder spezifischen (z.B. T16A inh -A01 und Ani9 (Boedtkjer *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2016)) Kanalblockern, elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden gewonnen (Davis *et al.*, 2013). Entscheidende Hinweise auf die vaskuläre Funktion und die Übertragung auf die Funktion im Körper liefern aber auch Experimente an isolierten Gefäßen (Bulley *et al.*, 2012; Dam *et al.*, 2014). Insgesamt bedeutet dies, dass die meisten Ergebnisse aus der in vitro Forschung stammen. Die Bestätigung sowie die Evaluation des vorliegenden Wissens und der Zusammenhänge im lebenden Organismus ist deshalb ein nächster wichtiger Schritt im Erkenntnisgewinn über die CaCC's. Erste Versuche ein Mausmodell zu etablieren gestalteten sich jedoch schwierig, da die Tiere bei einem totalen Knockout von TMEM16A innerhalb der ersten Lebensstage an einer Tracheomalazie verstarben (Rock, Futtner and Harfe, 2008).

Mittlerweile wird mit verschiedenen selektiven Knockoutmodellen gearbeitet und erst kürzlich wurde auch der Blocker T16A inh -A01 in vivo bei Ratten eingesetzt. Mit eben diesem Protokoll konnte bei spontan hypertensiven Ratten eine Blutdrucksenkung durch TMEM16A Blockade gezeigt werden. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Tiere im Vergleich mit Wildtypen TMEM16A überexprimieren und hypertrophe Widerstandsgefäße aufwiesen, was mit dem positiven Effekt von TMEM16A auf das Zellwachstum assoziiert wurde (Li and Cai, 2015; Wang *et al.*, 2015). Auch die Rolle von TMEM16A in der Niere ist kaum erforscht, bereits vor einiger Zeit in medullären Sammelrohren nachgewiesene CaCC's, konnten kürzlich als TMEM16A identifiziert werden (Boese *et al.*, 2000; Qu, Wei and Hartzell, 2003;

Svenningsen *et al.*, 2014). Bei in vivo Experimenten mit einem spezifisch tubulären Knockout von TMEM16A konnte weiterhin ein Einfluss auf die Regulation der Nierenfunktion nachgewiesen werden (Faria *et al.*, 2014).

Übereinstimmend mit den o.g. Befunden bei spontan hypertensiven Ratten konnte eine signifikante Blutdrucksenkung auch bei einem spezifischen glattmuskulären Knockout in der Maus bereits nachgewiesen werden (Heinze *et al.*, 2014). Vorerst ist jedoch unklar inwiefern das Ergebnis die vollständigen Kreislaufeffekte des TMEM16A widerspiegelt, da einige der Wirkungen wahrscheinlich bereits während der Versuche durch Kompensationsmechanismen des Organismus beeinflusst wurden. Zwar konnten keine Veränderungen im RAAS, dem Elektrolythaushalt und der Echokardiografie festgestellt werden (Heinze *et al.*, 2014). Trotzdem sollten mit Hinblick auf die Ergebnisse von Faria *et al.* (2014) Nierenfunktion und Volumenstatus in vivo untersucht werden, um weitere Auswirkungen des glattmuskulären Knockouts von TMEM16A auf die blutdruckregulierenden Systeme zu erkennen.

Einen ersten Anhalt für einen Einfluss auf renale Mechanismen durch den glattmuskulären TMEM16A lieferte das Blutdruckverhalten der Knockoutmäuse unter Salzdeprivation und erhöhter Salzzufuhr („Western Diet“). Es zeigte sich, dass der unter Standardbedingungen bestehende Blutdruckunterschied zwischen Wildtypen und Knockouts bei einer Niedrigsalzdiät weiter zunimmt. Nach der Umstellung auf eine Hochsalzdiät erreicht der Blutdruck der TMEM16A-KO Mäuse hingegen die Werte der Wildtypiere (Abb. 4) (Heinze *et al.*, 2014). Dies lässt vermuten, dass die Funktion des RAAS durch den Knockout beeinträchtigt sein könnte, was aber unter Standardbedingungen „maskiert“ blieb. Eine These die unter Berücksichtigung der Tatsache, dass CaCC's ebenfalls in den Renin produzierenden epitheloiden Myozyten des juxtaglomerulären Apparates nachgewiesen wurden und dort die Reninausschüttung hemmen durchaus denkbar wäre (Kurtz und Penner, 1989; Kurtz, 2011).

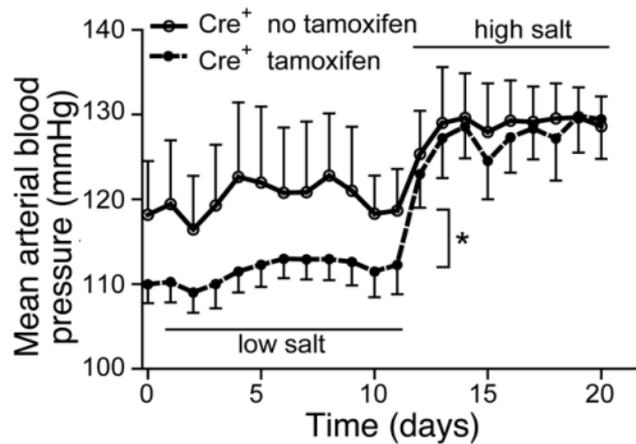


Abbildung 4: Blutdruckentwicklung unter Niedrig- und Hochsalzdiät bei TMEM16A-KO

Die Graphik zeigt den Vergleich des telemetrisch gemessenen mittleren arteriellen Blutdrucks von Wildtyp- und TMEM16A-KO Mäusen unter Niedrig- und Hochsalzdiät. Jeweils $n=4$, statistische Testung mittels Two-way ANOVA, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$. (Figure 2 E, Heinze *et al.*, 2014)

Es sollte außerdem der Gedanke weiterverfolgt werden, dass eventuelle Folgen eines TMEM16A Knockouts bereits auf molekularer Ebene (z.B. durch erhöhte Expression/ Aktivität anderer Ionentransporter/ -kanäle) kompensiert werden und damit durch die Messung von Surrogatparametern nicht detektiert werden können. In diesem Kontext dürfen zusätzlich zu renalen und kardialen Mechanismen auch andere regulatorische Einflüsse auf den Gefäßmuskeltonus nicht außer Acht gelassen werden. Der Transporter NKCC1 stellt durch seine nachgewiesene Relevanz für den glattmuskulären Chloridhaushalt sowie seine Auswirkungen auf Gefäßmuskeltonus und Blutdruck einen dem Kanal TMEM16A im Gefäßsystem funktionell sehr ähnlichen Akteur dar. Insbesondere die bereits gezeigte Abhängigkeit der NKCC Aktivität vom Blutdruck macht einen Einfluss im Sinne einer Kompensation der TMEM16A-KO Effekte wahrscheinlich (Jiang *et al.*, 2004).

In den im Folgenden durchgeführten Experimenten wurde deshalb mit einer einwöchigen Furosemidgabe über das Trinkwasser das Ziel einer kontinuierlichen NKCC Blockade verfolgt. Die Gründe für das Ausschalten gerade dieser Transporter waren vor allem die bereits beschriebene, mit TMEM16A synergistische Wirkung auf den Chloridhaushalt der glatten Muskelzellen und deren vielfach nachgewiesene Relevanz für Gefäßmuskeltonus und Blutdruck (Meyer *et al.*, 2002; Garg *et al.*, 2007; Hübner, Schroeder and Ehmke, 2015). Durch die Hemmung des NKCC sollten ein Salz-/Wasserverlust und eine ausgeprägte Vasodilatation („Kreislaufstress“) induziert werden, um die anderen Mechanismen der Kreislaufregulation soweit zu beanspruchen, dass die Effekte des TMEM16A-KO deutlicher sichtbar werden.

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt den Ablauf der Versuche und verschafft einen Überblick über die verwendeten Mausgenotypen sowie die benutzten Medikamente und Utensilien. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der genauen Erläuterung von Durchführung und Auswertung der angewendeten Methoden.

3.1 Versuchstiere

Für die *in vivo* Experimente wurden als Versuchstiere ausschließlich Mäuse benutzt. Im speziellen handelte es sich hierbei um in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums eigens gezüchtete Tiere mit einem C57BL/6 Mischhintergrund, die inzüchtigt gehalten wurden. Um standardisierte Versuchsbedingungen zu gewährleisten und auf Grund des speziellen Genotyps, der für unsere Versuche das Enzym chimäre CreER^{T2}-Rekombinase erforderte, konnten die Versuche lediglich an männlichen Tieren durchgeführt werden. Die Experimente erfolgten an den zwei Genotypen TMEM16A-Flox und TMEM16A-SMMHC, die im Folgenden näher erläutert werden.

3.1.1 TMEM16A SMMHC-CreER^{T2}

Mit dem Genotyp TMEM16A SMMHC-CreER^{T2} wurde unter Benutzung des Cre-LoxP Systems eine Mauslinie kreiert, bei der durch Fütterung mit Tamoxifen haltigem Futter ein selektiver Knockout des Kanalproteins TMEM16A in der glatten Muskulatur induziert werden kann. Dafür wurde die ursprüngliche DNA-Sequenz der Cre-Rekombinase mit der eines veränderten Östrogen-Rezeptors gekoppelt, welcher auch Tamoxifen binden kann. Das entstandene Enzym heißt chimäre CreER^{T2}-Rekombinase (Cre). In verschiedenen weiteren Verfahrensschritten wurde zum einen das Exon 21 auf Chromosom 7, welches Teil des Genlocus für TMEM16A ist mit sogenannten LoxP-Domänen flankiert und außerdem die Cre hinter dem smooth muscle heavy chain (SMMHC) Promotor platziert. Die LoxP-Domänen dienen als Erkennungssequenz und markieren die Schnittstellen für die Cre. Das Einbringen der Cre hinter dem SMMHC-Promotor sorgt dafür, den Knockout spezifisch für glatte Muskulatur zu machen.

3.1.2 TMEM16A-Flox

Bei den TMEM16A-Flox Mäusen wurde wie vorher bereits beschrieben in Anlehnung an das Cre-LoxP System auf dem Chromosom 7 im TMEM16A Locus das Exon 21 von sogenannten LoxP-Domänen flankiert. Letztere sind charakteristische Basensequenzen, die von der Cre erkannt werden. Der Teil des Gens der zwischen zwei solchen Sequenzen liegt, wird entsprechend durch Aktivierung der Cre entfernt. Die Besonderheit an den TMEM16A-Flox Tieren ist jedoch, dass diese keine Cre besitzen. Somit haben die Mäuse zwar denselben genetischen Hintergrund wie die TMEM16A SMMHC-CreER^{T2} Tiere, es kann aber durch Gabe von Tamoxifen Futter kein Knockout induziert wird. Letzteres war vor allem wichtig um zu differenzieren, ob festgestellte Effekte durch den Knockout verursacht wurden oder lediglich eine Nebenwirkung des Tamoxifens waren. Beide Mauslinien TMEM16A SMMHC-CreER^T und TMEM16A-Flox wurden von Stefan Offermanns (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland) und seiner Arbeitsgruppe konzipiert und uns freundlicherweise zur experimentellen Nutzung zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Tierversuchsantrag

Alle durchgeführten Experimente wurden in einem Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von der verantwortlichen Leiterin des Versuchsvorhabens Dr. med. Anika Seniuk erläutert und sind durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz Bereich - Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen – (Billstraße 80 (Turm), 20539 Hamburg) genehmigt worden. Die entsprechenden Genehmigungsnummern der Anträge lauten: **G 29/11** und **G 138/13**.

Die operativen Eingriffe und Injektionen wurden aufgrund der Qualifikation und Genehmigung durch die Behörde federführend durch die Betreuerin dieser Promotion Frau Dr. med. Anika Seniuk durchgeführt. Der Doktorand erwarb entsprechende Qualifikationen (Mauskurs, Felasa B) sowie eine Ausnahmegenehmigung und assistierte in diesem Rahmen bei allen Eingriffen.

3.1.4 Haltung und Versuchsvoraussetzungen

Die Versuchstiere waren in nach §11 Tierschutzgesetz zugelassenen Räumen untergebracht. Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurden elektronisch überwacht und

dokumentiert, die Raumkonditionen waren mit 45-65 % relativer Luftfeuchte und einer Temperatur von 20-24°C festgelegt. Der Tag-Nacht-Rhythmus war in je zwölf Stunden unterteilt, wobei regelhaft die Zeit von 7-19 Uhr Tag (=hell) und von 19-7 Uhr Nacht (=dunkel) entsprach.

Die Tiere wurden einzeln in dafür vorgesehenen Käfigen (Makrolon Typ II) gehalten, die zusätzlich geeignetes Einstreu und entsprechendes „Cage Enrichment“ (Haus, Tücher, o.Ä.) enthielten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (LAS Vendi, LASQCdiet Rod 16, Rad), wobei die Käfige samt Einstreu und das Frischwasser je einmal pro Woche erneuert wurden. Es wurde außerdem eine tägliche Kontrolle der Tiere und der Tierhaltungsräume durchgeführt.

Alle Tiere wurden des Weiteren mit einer „Käfigkarte“ ausgestattet, um eine genaue Zuordnung zu gewährleisten. Auf dieser wurden durchgeführte Interventionen/ Diäten sowie die Genehmigungsnummer und die verantwortliche Person mit telefonischer Erreichbarkeit dokumentiert.

In die Versuche wurden nur männliche, gesunde Mäuse ohne weitere Auffälligkeiten und ab einem Alter von etwa acht Wochen eingeschlossen. Sämtliche Tiere stammten aus der Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

3.1.5 Euthanasie

Nach Abschluss der Messungen wurden alle Tiere fachgerecht getötet. Die Euthanasie erfolgte entweder durch eine cervikale Disklokation in tiefer Isofluran Narkose oder durch Gabe von Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, i.p. 300 mg/ kg KG).

3.2 Versuchsprotokolle

In den Versuchsreihen wurden TMEM16A SMMHC-CreER^{T2} Tiere mit induziertem Knockout (durch Gabe von Tamoxifen Futter LASCRDiet™ CreActive TAM400, LASvendi) verglichen mit einer Kontrollgruppe aus Geschwistern gleichen Genotyps, die kein Tamoxifen Futter erhielten und bei denen der Kanal TMEM16A dementsprechend noch funktionierte. Bei einigen Experimenten wurde außerdem mit TMEM16A-Flox Tieren gearbeitet, wobei ebenfalls immer eine Gruppe mit Tamoxifen Futter gegen eine Kontrollgruppe ohne

Tamoxifen Futter verglichen wurde, auch hier waren alle Mäuse Geschwister. Aufgrund bereits erfolgreich publizierter Vorversuche haben wir uns entschieden, das bisherige Protokoll beizubehalten, sodass die Knockout-Gruppe über mindestens vier Wochen nur Tamoxifen-Futter ad libitum erhielt und nach diesem Zeitraum als „induziert“ galt. Die Kontrollgruppe bekam während dieser Zeit weiterhin das Standardfutter.

3.2.1 Protokoll Standarddiät

Unter Standarddiät wurden Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie des Plasmavolumens durchgeführt (Abb. 5). Es sind induzierte („Knockout“) mit nicht induzierten („Wildtyp“) Tieren verglichen worden. Zusätzlich wurden diese Experimente bei einer Gruppe TMEM16A-Flox mit Tamoxifen („Flox + Tam“) ausgeführt.

Daraus ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

Knockout vs. Wildtyp vs. Flox + Tam je GFR- und Plasmavolumenbestimmung

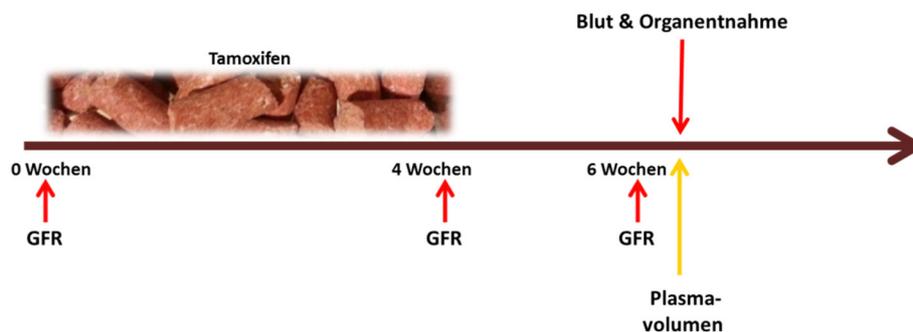


Abbildung 5: Zeitstrahl Standarddiät

Überblick über die verschiedenen Zeitpunkte sowie die Dauer von Diäten und Interventionen im Rahmen des Protokolls für die Standarddiät.

GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Standarddiät

Am Tag 0 erfolgte bei allen Tieren eine erste GFR-Basismessung, danach wurde die Hälfte der Tiere auf Tamoxifen Futter umgestellt. Nach abgeschlossener Induktion wurde am Tag 28 vor Absetzen des Tamoxifen-Futters ein zweiter GFR Wert erhoben. Die dritte und letzte GFR Messung fand am Tag 42 statt, nachdem alle Tiere wieder 14 Tage Standardfutter bekommen hatten. Am Tag 43 fanden die Plasmavolumenbestimmung sowie die Euthanasie und die Organentnahmen statt (Abb. 5).

3.2.2 Protokoll Salzdiäten

Bei je einer Gruppe induzierter und nicht induzierter TMEM16A SMMHC-CreER^{T2} Tiere wurden GFR und Plasmavolumen unter Hoch- (Altromin, Sonderdiät C 1036 mod. 30000 mg Natrium/ kg Diät) oder Niedrigsalzdiät (Altromin, Sonderdiät C1036 mod. 200 mg Natrium/ kg Diät) bestimmt. Außerdem wurden ebenfalls je unter Hoch- und Niedrigsalzdiät die Hormonspiegel von Renin, Aldosteron und ANP zwischen induzierten und nicht induzierten Tieren miteinander verglichen (Abb. 6).

Daraus ergaben sich folgende Versuchskonstellationen:

Knockout vs. Wildtyp GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Hochsalzdiät

Knockout vs. Wildtyp GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Niedrigsalzdiät

Knockout vs. Wildtyp Hormonbestimmung unter Hochsalzdiät

Knockout vs. Wildtyp Hormonbestimmung unter Niedrigsalzdiät

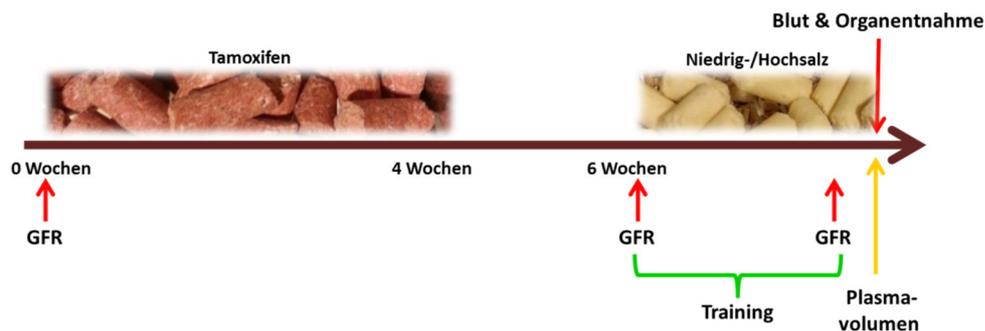


Abbildung 6: Zeitstrahl Salzdiät

Überblick über die verschiedenen Zeitpunkte sowie die Dauer von Diäten und Interventionen im Rahmen des Protokolls für die Hoch- und die Niedrigsalzdiät.

Nach abgeschlossener Induktion des Knockouts mit Tamoxifenfutter bekamen alle Tiere für 14 Tage eine Kontrolldiät (Altromin, Sonderdiät C1036 mod. 3000 mg Natrium/ kg Diät), danach wurde das Futter für 10 Tage entweder auf Hoch- oder Niedrigsalzdiät ad libitum umgestellt (Abb. 6). Unter der Kontroll- und den Salzdiäten wurden über das Flaschengewicht zusätzlich noch die Trinkmengen bestimmt, um einen Surrogatparameter zur Futteraufnahme zu haben.

3.2.2.1 GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Salzdiät

Die Bestimmung der GFR fand insgesamt an drei verschiedenen Zeitpunkten statt. Am Tag 0 erfolgte eine Basismessung, die zweite Messung folgte sechs Wochen später unmittelbar vor Ansetzen der Salzdiäten. Die letzte GFR Bestimmung wurde nach Applikation von 10 Tagen Hoch-/ Niedrigsalzdiät durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde dann das Plasmavolumen in einem finalen Versuch gemessen, schließlich wurden die Tiere euthanasiert und die Organe/ Proben entnommen.

3.2.2.2 Hormonbestimmung unter Salzdiät

Die zuvor bereits erwähnten Hormone Renin, Aldosteron und ANP wurden mithilfe der weiter unten beschriebenen sog. Trainingsmethode gemessen. Die Abnahme der entsprechenden Blutproben erfolgte am letzten Tag der Hoch-/ Niedrigsalzdiät. Danach folgten die Euthanasie und die Organentnahme bei den Tieren.

3.2.3 Protokoll Furosemid

Die Gabe von Furosemid (Lasix Liquidum 100 ml 10 mg/ml, Sanofi-Aventis) erfolgte ad libitum über das Trinkwasser in einer Konzentration von 1 mg/ml. Zusätzlich zur Gabe des Medikaments erhielten die Tiere eine zweite Trinkflasche, ebenfalls ad libitum, mit einer isotonischen Lösung aus 0,8% NaCl (0,9% NaCl, Braun) und 0,1% KCl (1 M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi) zum Ausgleich des Elektrolytverlusts. Unter Furosemidgabe wurden zum einen telemetrische Parameter erhoben sowie echokardiographische Messungen durchgeführt und zum anderen die Hormone Renin, Aldosteron und ANP, aber auch die GFR und das Plasmavolumen bestimmt. Zusätzlich wurden die Tiere zur Urinprobengewinnung für ca. 3 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt (Abb. 7).

Wir führten die Experimente in den folgenden Gruppen durch:

Knockout vs. Wildtyp GFR und Plasmavolumenbestimmung unter Furosemid

Knockout vs. Wildtyp Hormonbestimmung unter Furosemid

Knockout vs. Wildtyp Elektrolytbestimmung in Plasma und Urin unter Furosemid

Knockout vs. Wildtyp Telemetrie unter Furosemid

Knockout vs. Wildtyp Echokardiographie unter Furosemid

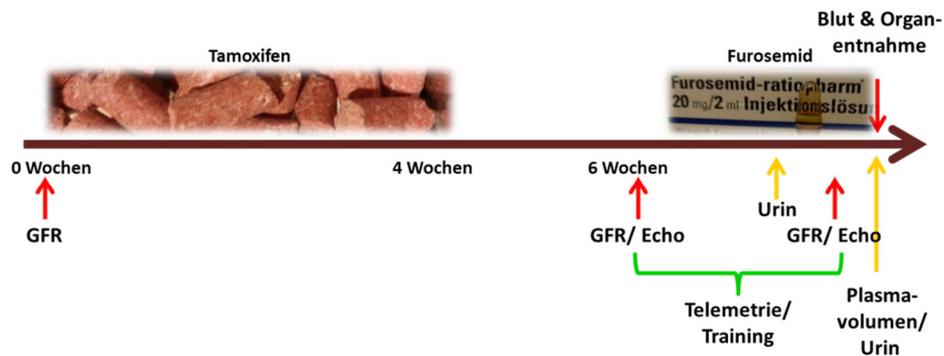


Abbildung 7: Zeitstrahl Furosemidgabe

Überblick über die verschiedenen Zeitpunkte sowie die Dauer von Diäten und Interventionen im Rahmen des Protokolls für die Furosemidgabe.

Furosemid wurde ab Woche sechs nach abgeschlossener Induktion des Knockouts und nach zwei Wochen unter Standarddiät über sieben Tage lang appliziert. Vor und während der Verabreichung von Furosemid wurden außerdem die Trinkmengen der Tiere über das Flaschengewicht bestimmt, um festzustellen, ob eine ausreichende Aufnahme des Medikaments erfolgte.

3.2.3.1 GFR- und Plasmavolumenbestimmung unter Furosemid

Auch für die GFR-Bestimmung unter Furosemid wurden drei Messzeitpunkte gewählt. Alle Tiere bekamen eine Basismessung an Tag 0 sowie zwei weitere Messungen, etwa eine Woche vor Beginn und am Ende des siebten Tages der Furosemidgabe. Einen Tag später erfolgte dann die Messung des Plasmavolumens, die Euthanasie der Tiere und im Anschluss die Organentnahmen.

3.2.3.2 Hormonbestimmung unter Furosemid

Das Training für die Hormonbestimmung nach der sog. Trainingsmethode wurde vierzehn Tage nach dem Ende der Tamoxifengabe begonnen. Ab dem vierten Trainingstag wurde die Wasserflasche gegen eine Flasche mit Furosemid und eine Flasche mit Elektrolytlösung wie weiter oben beschrieben ausgetauscht. Am 10. Trainingstag und zugleich 8. Tag der Furosemidgabe wurden die Blutproben für die Hormonbestimmung entnommen. Am selben Tag erfolgten auch die Euthanasie und die Organentnahmen bei den Tieren.

3.2.3.3 Metabolischer Käfig unter Furosemid

Am vierten sowie am achten Tag der Furosemidgabe wurden Knockout- und Wildtypmäuse über einen Zeitraum von etwa drei Stunden zur Uringewinnung in sogenannten Stoffwechselkäfigen gehalten. Nach Abschluss der Urinsammlung an Tag 8 wurden die Tiere euthanasiert und Blutplasma für eine Blutgasanalyse bzw. Kreatininbestimmung gewonnen.

3.2.3.4 Telemetrie unter Furosemid

Die Implantation der Telemetriesender erfolgte wie weiter unten im entsprechenden Abschnitt beschrieben. In den letzten zwei Tagen vor Beginn der Furosemidgabe wurden die Sender eingeschaltet und es erfolgte eine achtundvierzigstündige Basismessung. Direkt im Anschluss, ohne die Sender auszuschalten, wurde mit der Furosemidapplikation für sieben Tage begonnen. Im gesamten Messintervall erfolgte alle fünf Minuten eine einminütige Messung. Es wurden die Parameter: Systolischer Blutdruck, Diastolischer Blutdruck, Arterieller Mitteldruck, Druckamplitude, Herzfrequenz und Aktivität erhoben.

3.2.3.5 Echokardiographie unter Furosemid

In Woche 6 wurde die erste echokardiographische Messung der Knockout- und der Kontrollgruppe durchgeführt. Danach erfolgte die Furosemidgabe laut Protokoll für sieben Tage. Am letzten Tag der Medikamentenapplikation fand die zweite Echokardiographie statt.

3.3 Methoden

3.3.1 Telemetrie

Nach erfolgter Implantation eines Senders vom Typ PA C-10 der Firma Data Sciences International (DSI) (Abb. 8 A) kann der Blutdruck in Echtzeit telemetrisch bestimmt werden. Die Methode hat gegenüber dem sogenannten Schwanzmanschetten (=Tailcuff) Verfahren den großen Vorteil, dass sie verlässlichere Werte liefert, da die Messung an wachen Mäusen ohne Beeinträchtigung und von den Tieren unbemerkt durchgeführt werden kann (Butz and Davisson, 2001).

Implantieren der Sender

Vor Beginn der Implantation wurden die Sender in NaCl 0,9% (Braun) eingelegt, eingeschaltet und über ca. 12 Stunden geeicht, wobei maximale Abweichungen von -4 bis +4 mmHg toleriert wurden.

Die Versuchstiere wurden mit einer gewichtsadaptierten, intraperitonealen Narkose bestehend aus einem Xylazin/Ketamin (Rompun 2%®, Bayer / Ketamin Gräub®, Albrecht GmbH) Gemisch anästhesiert. Nach dem Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere für den Eingriff vorbereitet: der Operationssitus wurde von Fell befreit, mit Jodlösung desinfiziert, die Maus mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert und mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe®, Bayer) versorgt. Vor Beginn des Eingriffs erfolgte außerdem noch die subkutane, gewichtsadaptierte Verabreichung von Enrofloxacin (Baytril®, Bayer) als Antibiotikaprophylaxe und Carprofen (Rimadyl®, Zoetis Dtschl. GmbH) für die postoperative Analgesie.

Nach dem Eröffnen der Haut durch einen Schnitt im Halsbereich wurde die große Speicheldrüse der Maus beiseitegeschoben. Die darunterliegende linke Arteria carotis wurde dargestellt, schonend frei präpariert und mit einem Faden kranial und zwei Fäden kaudal angezügelt. Es folgte die Eröffnung der Arterie mit einer Kanüle (25G x 1" (0,5mm x 25mm), BD Microlance™ 3) und das Verschieben des entlüfteten Katheters des Senders mit einer Spezialpinzette im Inneren des Gefäßes bis in den Aortenbogen (ca. 10 mm). Daraufhin wurde der Sender eingeschaltet und Signal sowie seine Lage über das live Monitoring am PC überprüft. Bei korrektem Sitz schloss sich die Fixierung des Katheters mit zwei Knoten sowie Gewebekleber (Histoacryl®, Braun) an (Abb. 8 B). Im Flankenbereich der Maus wurde eine subkutane Tasche für den Sender präpariert, dieser dort verstaut und die Wunde mit einer Einzelknopfnah (Mersilene® 5-0, Ethicon) verschlossen.

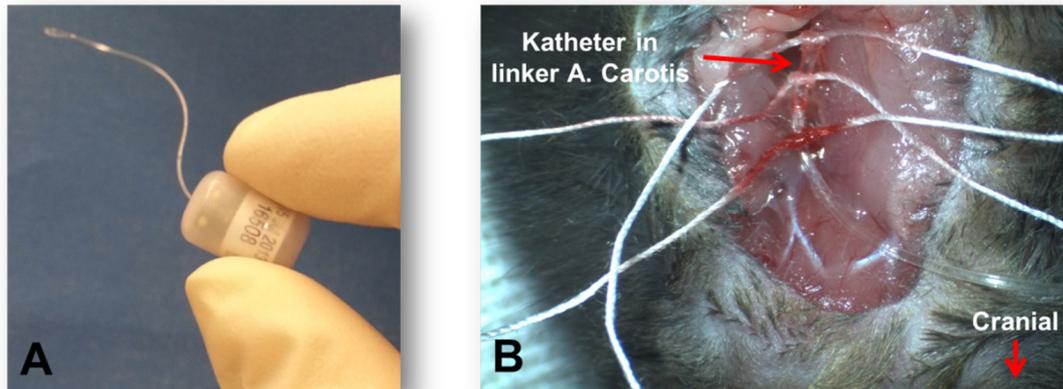


Abbildung 8: Telemetriesender der Firma DSI & Op-Situs Senderimplantation

A Zeigt einen der Sender vom Typ PA C-10 der Firma DSI, welche für die Erhebung der telemetrischen Daten benutzt wurden. In **B** ist der Situs einer Senderimplantation zu sehen. Auf dem Bild ist der Katheter des Senders gerade in die linke A. carotis vorgeschoben und mit drei Ligaturen befestigt worden. Die Spitze des Katheters liegt direkt am Aortenbogen der Maus.

Post-OP

Zur besseren Erholung von der OP erfolgte die postoperative Gabe von einem Milliliter Glucose 5% und NaCl 0,9% im Verhältnis 1:1 als s.c. Injektion. Im Anschluss an die Intervention wurden die Käfige zur Hälfte auf eine Wärmeplatte gestellt, um den Tieren die Wahl der angenehmeren Temperatur zu ermöglichen. Zudem wurden eingeweichtes Futter und Glucoselösung 5% (Braun) in einem „Napf“ am Boden des Käfigs ad libitum angeboten. Das Cage Enrichment wurde für ca. 24 h nach der Operation entfernt, um die Verletzungsgefahr gering zu halten. Die frisch operierten Tiere wurden mehrmals täglich visitiert und auf Komplikationen (z.B. Schlaganfall) sowie Schmerzen untersucht.

Die Messungen begannen nach einer Erholungszeit von etwa 10 Tagen nach dem Eingriff. Es wurde in der Regel im „Scheduled- Modus“ gemessen, d.h. es erfolgte alle 5 Minuten eine Messung über eine Minute. Die Aufzeichnung und das Abrufen der gewonnenen Daten wurde mit der Software „Dataquest A.R.T. Data Aquisition“, ebenfalls von der Firma DSI, vollzogen.

3.3.2 Transkutane „Non Invasive Clearance (NIC)“- Messung

Mit dem NIC-Kidney (Non-invasive-Clearance) Verfahren der Firma Mannheim Pharma & Diagnostics kann die Halbwertszeit von FITC (Fluorescein-Isothiocyanate) –Sinistrin im Blut

an wachen Tieren bestimmt und daraus die GFR abgeleitet werden. Die Basis hierfür ist die transkutane photometrische Messung der Ausscheidungsdynamik des vorher i.v. applizierten Farbstoffs FITC-Sinistrin (Schock-Kusch *et al.*, 2009; Schreiber *et al.*, 2012; Schock-Kusch *et al.*, 2013).

Die Apparatur zur Messung besteht aus einer Lithium-Ionen-Batterie sowie einem kleinen Sensor, der mit zwei LED (470 nm) und einer Photodiode (525 nm) bestückt ist und damit transkutan die zeitliche Dynamik der FITC-Sinistrin Extinktion im Blut misst. Das Verfahren wurde mit dem nachfolgenden Protokoll zum ersten Mal am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) etabliert.

Durchführung

Am Tag vor der Messung wurden die Tiere in leichter inhalativer Anästhesie (Isofluran, Forene[®], AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG) auf der Flanke eine der Sensorgröße angepasste Stelle rasiert und das übriggebliebene Fell mit Enthaarungscreme (Veet sensitive[®]) entfernt (Abb. 9 A).

Zur eigentlichen Messung erfolgte eine erneute Isofluran-Narkose und das „Messpaket“, bestehend aus Batterie und Sensor wurde mit einem speziellen doppelseitigen Klebeband auf der kahlen Stelle des Tieres fixiert (Abb. 9 B). Nach diesem Schritt wurde min. 2 Minuten abgewartet, um das Hintergrundsignal der Haut als Baseline zu detektieren. Im Anschluss wurde dem Versuchstier gewichtsadaptiert eine FITC-Sinistrin Lösung (2,5 mg/ 100 µl für ca. 30 gKG, Fresenius Kabi, Austria) mit einer Kanüle (30G ½“ 0,3 x 13 mm) in den retrobulbären Venenplexus i.v. injiziert. Danach erwachte das Tier im eigenen Käfig aus der Narkose (Einzelhaltung ohne Cage Enrichment) und hatte freien Zugang zu Wasser und Futter. Mindestens sechzig Minuten später erfolgte wiederum eine kurze Anästhesie mit Isofluran, um die Messapparatur von der Maus zu entfernen.

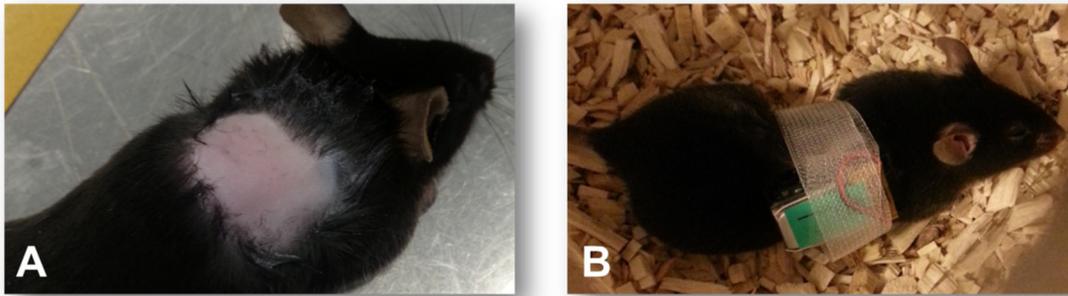


Abbildung 9: Vorbereitung GFR-Messung & Maus während der GFR-Messung

In A ist die vorbereitete Maus am Tag vor der GFR-Messung zu sehen. Es wurde ein Areal auf dem Rücken des Tieres enthaart. Auf diesem wurde dann der GFR-Sensor während der Messung, wie in B zu sehen, positioniert.

Auswertung

Zur Auswertung wurde der Sensor per USB-Anschluss mit dem PC verbunden und mit dem Programm „Sensor_ctrl_appV15“ die FITC-Sinistrin Kurve dargestellt. Nach Markieren des Hauthintergrundes als Baseline („Marker-Offset“), des 60 Minuten Zeitpunktes als Ende der Messung („Marker-Crop“) sowie des 15 Minuten Zeitpunktes nach Injektion als Messbeginn („Marker-Start“) wurde durch einen im Programm hinterlegten Algorithmus die FITC-Sinistrin Halbwertszeit im exponentiell abfallenden Intervall mit einem One-Compartment-Modell berechnet (Abb. 10).



Abbildung 10: Beispielkurve einer GFR-Messung am PC

Die Abbildung zeigt den typischen Kurvenverlauf nach einer korrekt ausgeführten venösen FITC-Sinistrin Injektion, dargestellt am PC. Zu sehen ist, dass direkt nach der Injektion der FITC-Lösung die Kurve steil ansteigt. Nach dem Erreichen des Maximums beginnt ein exponentieller Abfall, der auf die renale Exkretion der Substanz zurückzuführen ist. In diesem Zeitraum liegt auch das Messintervall. Wird lange genug gemessen erreicht die Kurve wieder das Niveau der anfänglichen „Baseline“.

Es kam in einzelnen Fällen vor, dass die Messkurven unter die Baseline des Hauthintergrundes fielen. Wahrscheinlichste Ursache hierfür ist ein veränderter Druck auf den Sensor durch die Bewegung des Tieres. In diesem Fall wurde eine zweite Baseline auf Höhe der am Ende gerade auslaufenden Messkurve gewählt und wiederum der 15 bzw. 60 Minuten Zeitpunkt markiert, um damit eine zweite Halbwertszeit zu berechnen.

Zur Bestimmung der GFR wurde der Mittelwert beider Halbwertszeiten in die folgende vom Hersteller des Verfahrens ermittelte Formel eingesetzt (Schock-Kusch *et al.*, 2013):

$$GFR [\mu\text{l}/\text{min}/100\text{gKG}] = \frac{14616,8 [\mu\text{l}/100\text{gKG}]}{t_{1/2}(\text{FITC} - \text{Sinistrin})[\text{min}]}$$

3.3.3 Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue

Die Evans Blue Methode ist zur Bestimmung des Plasmavolumens geeignet, da ein inerte Farbstoff verwendet wird, der das Gefäßsystem nur sehr langsam verlässt (Dawson et al., 1920). Das Plasmavolumen der Versuchstiere wurde nach i.v. Injektion einer Evans Blue (=T1824, 50 µg/ 100 µl, Sigma) Lösung in den retrobulbären Venenplexus bestimmt. Das Verfahren der Plasmavolumenbestimmung wurde vielerorts bereits erfolgreich angewandt und ist in diversen Publikationen beschrieben (Gibson and Evans, 1937; Crooke and Morris, 1942; Zhang *et al.*, 2005), in unserem Institut wurde es zum ersten Mal durchgeführt und mit dem im folgenden Absatz beschriebenen Protokoll etabliert.

Vorbereitung

Damit gewonnene Ergebnisse ausgewertet werden konnten, wurde zu Anfang eine Eichkurve erstellt. Es wurden die Evans Blue Konzentrationen: 0-100 µg/ml in 10 µg Schritten steigender Konzentration mit Pool-Plasma von Mäusen *in vitro* jeweils zweimal angesetzt. Von jeder der zwei Proben pro Konzentration wurden je 150 µl und 200 µl in verschiedene Kammern einer 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc™ MicroWell™ Thermo Scientific™) pipettiert, diese wurde mit einer speziellen Abdeckfolie (Seal Plate®, Excel Scientific Inc.) beklebt. Danach wurden Extinktionsmessungen mit dem Multiskan FC von Thermo Scientific bei dem Extinktionsmaximum von 620 nm mit 5 s vorherigem Schütteln durchgeführt (Schneider and Otto, 1962).

Mit den Werten der Extinktionen bei den entsprechenden Konzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt und eine Regressionslinie ($r^2 = 0,99$) gezogen (Abb. 11). Aus dieser Eichgerade wurden die Formeln $y = 0,03255 \cdot x + 0,1912$ für 200 µl Probenmenge und $y = 0,02555 \cdot x + 0,0746$ für 150 µl Probenmenge extrahiert, wobei x der Konzentration (µg/ml) und y der Extinktion entspricht.

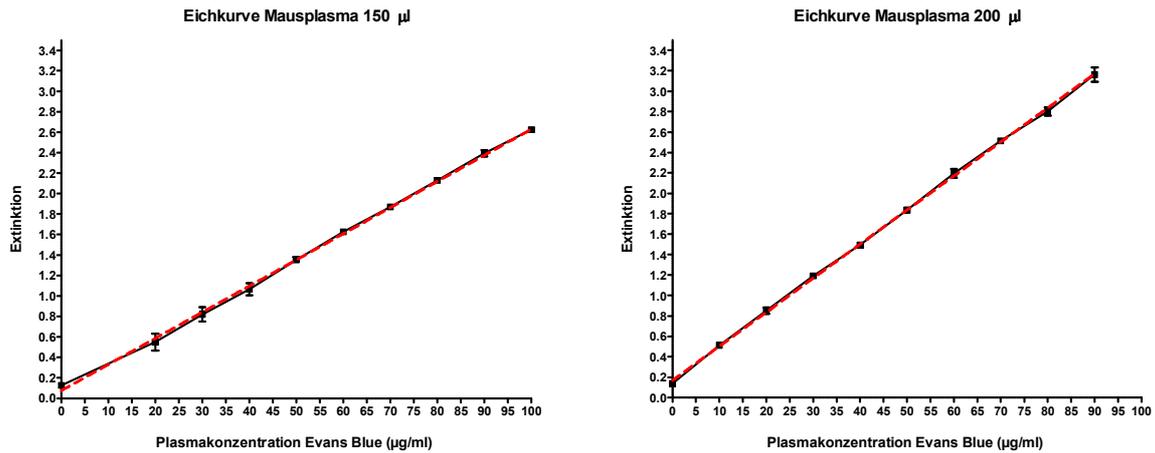


Abbildung 11: Eichkurven Plasmavolumenbestimmung

Dargestellt sind zwei Extinktionskurven bei steigender Evans Blue Plasmakonzentration (0-100 µg/ml), mit Einsatz von entweder 150 µl (li.) oder 200 µl (re.) Probe. Die Werte auf der schwarzen Linie wurden in vitro durch Zusatz einer definierten Menge Evans Blue zu einem Poolplasma von Mäusen und anschließender Extinktionsmessung ermittelt. Die rote Linie stellt die angelegte Regressionsgerade dar.

Durchführung

Für die Bestimmung des Plasmavolumens wurden die Mäuse mit Isofluran inhalativ in Narkose versetzt. Sobald der Zwischenzehenreflex erloschen war, erfolgte die retrobulbäre i.v. Injektion von 100 µl (50 µg/100 µl) einer Evans Blue Lösung mit einer Kanüle (30G ½“ 0,3 x 13 mm).

Danach folgte eine Wartezeit von etwa sieben Minuten, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes im Blutkreislauf der Maus zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde an dem Tier mit einer Glaskapillare in tiefer Narkose, eine finale retrobulbäre Blutentnahme in ein Lithium-Heparin Röhrchen am anderen Auge durchgeführt und das Tier danach zusätzlich cervical disloziert. Die Blutprobe wurde anschließend für 10 min bei 3600 RPM und 4°C (Eppendorf 5417 R) zentrifugiert und das Plasma, sofern nicht hämolysiert, ab pipettiert.

Es folgten das pipettieren der Proben in Mengen von 150 µl und 200 µl in eine 96-Well Mikrotiterplatte und die Extinktionsmessung des Plasmas bei 620 nm mit dem Multiskan FC von Thermo Scientific nach 5 s vorherigem Schütteln. Zum Schluss wurde die Evans Blue Konzentration mit Hilfe der Formel aus der Eichgerade bestimmt.

Auswertung

Über die anfangs injizierte Menge und die nach Verteilung des Farbstoffes erhaltene Konzentration wurde das Plasmavolumen der Maus errechnet, indem die injizierten 50 µg durch die gemessene Konzentration geteilt wurden. Das Ergebnis entspricht dem Plasmavolumen des Tieres inklusive der zur Messung injizierten 100 µl, die deshalb in der Folge noch abgezogen wurden.

3.3.4 Hormonbestimmung mit der Trainingsmethode

Die Bestimmung der Hormone Renin, Aldosteron und ANP mit der sogenannten Trainingsmethode wurde in unserem Institut durch Frau Dr. rer. nat. Helga Vitzthum etabliert. Publierte Vorversuche aus unserem Labor (Gröger *et al.*, 2012) zeigten hervorragende Ergebnisse. Das Prinzip der Methode ist, dass die Tiere vor der Blutentnahme überwiegend stressfrei durch eine CO₂-Narkose (CO₂ 80%/ O₂ 20%) sediert werden, um stressbedingte Veränderungen der endogenen Hormonspiegel zu vermeiden.

Training

Es wurde der Tag-Nacht-Rhythmus umgestellt (Dunkelphase 11-23 Uhr), da die Hormonspiegel ca. 2 Stunden vor dem Erwachen der Tiere am höchsten sind und die Blutentnahme um ca. 9:00 Uhr erfolgen sollte (Zeman *et al.*, 2008; Nikolaeva *et al.*, 2012).

Um den Stress möglichst gering zu halten wurden die Tiere außerdem in ihrem Käfig ab zehn Tagen vor der Blutentnahme jeden Tag zur gleichen Zeit (9:00 Uhr) mit Druckluft, bei gleichem Flow (12 l/ min) wie für die CO₂-Narkose nötig, für 30 Sekunden begast, um einen Gewöhnungseffekt zu erzielen.

Blutentnahme & Messung

Am Tag der Blutentnahme wurden die Tiere wie beim Training begast, statt mit Druckluft allerdings mit einem Kohlendioxid-Sauerstoff-Gemisch (CO₂ 80%/ O₂ 20%). Außerdem verblieb die Person, die die Mäuse auch trainiert hatte während der Prozedur durchgehend im Tierraum und machte lediglich die Narkosen. Die narkotisierten Tiere wurden sofort in Isoflurannarkose überführt. Nach der retrobulbären Blutentnahme wurden die Tiere ohne Wiedererwachen euthanasiert.

Aus dem Plasma für die Reninbestimmung (5 µl in 0,3 M Na-EDTA) wurde der Wert der Renin Plasmaaktivität mit einem Radioimmunoassay (RIA)-KIT nach Hersteller-Protokoll gemessen (RENCTK Dia Sorin # P2721). Der Wert des Aldosteron Plasmaspiegels wurde

aus 50 µl Plasma in Li-Heparin mit einem RIA-KIT nach Anleitung des Herstellers (Immunotech Beckmann Coulter # IM 1664) bestimmt. Die Messung der ANP Plasmaspiegel erfolgte aus 25 µl Plasma (in K-EDTA) nach Anleitung des Herstellers mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Phoenix Pharmaceuticals # EK-005-24).

Die Durchführung von RIA und ELISA übernahm freundlicherweise Telse Kock (MTA).

3.3.5 Elektrolytmessungen im metabolischen Käfig

Zur Untersuchung der Elektrolyte im Urin der Mäuse wurden die Tiere über einen Zeitraum von etwa drei Stunden in speziell zu Versuchszwecken entwickelten metabolischen Käfigen (Fa. Tecniplast) gehalten.

Aus den Urinproben wurden Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration mit dem Gerät Spotchem™EL SE-1520 von Axonlab bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Kreatininmessung mit den Reflotron®Creatinine-Streifen im Reflotron®Plus (Roche).

Um die Serumelektrolyte mittels Blutgasanalyse (ABL 90, Radiometer) zu bestimmen wurde bei den Tieren im Rahmen der Organentnahme am Ende des Versuchsprotokolls eine retrobulbäre Blutentnahme unter Isoflurannarkose vorgenommen. Weiterhin wurden Plasmaproben (in Li-Heparin) im Folgenden zur Kreatininmessung an ein externes Labor versendet.

3.3.6 Echokardiographie

Eine Ultraschalluntersuchung ist wenig belastend, da nicht invasiv. Die Echokardiografie erlaubt es diverse kardiale Parameter zu messen und damit Informationen z.B. über Ejektionsfraktion oder das Herzzeitvolumen zu erlangen. Es stellt deshalb ein ideales Verfahren für eine Bildgebung des Herzens und die Messung der Herzfunktion dar.

In dem durchgeführten Versuch wurden mit einem Ultraschallgerät sowie den dazugehörigen Ultraschallköpfen speziell für Kleintiere (VisualSonics Vevo ® 2100 Imaging System) diverse standardisierte Schallfenster dargestellt und diese nach festgelegten Parametern ausgewertet. Die Messungen erfolgten an zwei Zeitpunkten.

Zu Beginn wurden die Mäuse gewogen und mit einer Inhalationsnarkose (Isofluran) anästhesiert. Im Folgenden wurde jedes Tier auf einer speziellen Wärmeplatte an den Extremitäten in Rückenlage fixiert (Abb. 12). Über diese Vorrichtung erfolgte auch ein Monitoring von Atemfrequenz, EKG mit Herzfrequenz sowie Körpertemperatur. In einem nächsten Schritt wurde der Brustkorb mit Enthaarungscreme (VEET sensitive®) von Fell befreit. Danach begann die eigentliche Messung, welche etwa fünf Minuten dauerte. Die Durchführung der Echokardiographie und die Umwandlung der Bilder in die kardialen Parameter erfolgten durch einen speziell geschulten Techniker (Peter Bassalay).



Abbildung 12: Echokardiographische Messungen

Fixierte Maus auf dem „Tisch“ des Echokardiographiergerätes unter Isoflurannarkose vor und während der Messung mit aufgesetztem Schallkopf.

3.3.7 Organentnahme

Im Anschluss an alle Experimente wurde bei den Tieren eine Organentnahme zur Sicherung des biologischen Materials durchgeführt. In der Regel wurden die für unsere Zwecke relevanten und in direktem Zusammenhang mit dem Herz-Kreislauf-System stehenden Organe Nieren, Herz sowie Aorta entnommen und asserviert. Außerdem wurden regelhaft die Tibialängen der Mäuse gemessen, um eine Referenzgröße zu Normierungszwecken zu haben, sollte das Körpergewicht unter den verschiedenen Interventionen zwischen den Gruppen stark schwanken.

Das Herz wurde frei präpariert, mit NaCl 0,9% gespült sowie abgetupft, um restliches Blut zu entfernen. Nach dem Abtrocknen wurden Vorhöfe und Herzohren unter dem Mikroskop abgetrennt und das Organ mit einer Feinwaage (Sartorius) gewogen.

Die Nieren wurden in Situ dargestellt, abgesetzt, von nicht zugehörigem Gewebe befreit und nach dem Entfernen der Nierenkapsel mit einer Feinwaage (Sartorius) gewogen (Nierengesamtgewicht).

Die Aorta thoracalis wurde vom Ansatz am Herz entlang der Wirbelsäule vorsichtig ohne mechanische Beanspruchung frei präpariert und dann kurz über dem Zwerchfell abgesetzt.

Die Entnahmen erfolgten direkt nach Euthanasie des Tieres und die präparierten Organe wurden entweder zu histologischen Zwecken in einer Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4 %) fixiert oder sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach in einen -80°C Gefrierschrank überführt.

Die Länge der Tibia wurde nach dem Entfernen von Fell, Haut, Weichteilgewebe und dem Abtrennen des Unterschenkels mit einem Messschieber festgestellt.

3.3.8 mRNA-Bestimmung aus Aorten

Einzelne Aorten wurden bereits für eine RNA Bestimmung verwendet. Es sollte die Menge an TMEM16A normalisiert auf das Haushaltsgen L32 bestimmt werden. Hierfür wurde die RNA der Aorten nach einem standardisierten Verfahren unter RNase freien Bedingungen isoliert. Danach wurde die mRNA durch eine reverse Transkriptase Reaktion in cDNA überführt und anschliessend mittels real time PCR (Lightcycler ® 480 Software, Roche) der Gesamtgehalt ermittelt. Sämtliche Schritte erfolgten nach den Standardprotokollen, die in unserem Institut hinterlegt sind. Die Quantifizierung erfolgte freundlicherweise durch Dr. Helga Vitzthum.

3.4 Materialien

Die folgenden Tabellen enthalten die wichtigsten für die durchgeführten Experimente verwendeten Utensilien, Medikamente/ Chemikalien sowie die verschiedenen Diäten mit denen die Mäuse gefüttert wurden.

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Medikamente und Chemikalien

Wirkstoff/ Chemikalie:	Bezeichnung/Hersteller:
Carprofen	Rimadyl® 50 mg/ml, Pfizer
Dexpanthenol	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer
Druckluft	Technische Medizinische Gas GmbH
Enbucrilat	Histoacryl® 0,5 mg Gewebekleber, Braun
Enfloxacin	Baytril® 5%, Bayer
Evan`s Blue	Evans-Blue, Sigma-Aldrich®
FITC-Sinistrin	FITC-Sinistrin 1g, Fresenius Kabi (Austria)
Formaldehyd, phosphatgepuffert	Roti-Histofix® 4%, Karl Roth GmbH + Co KG
Furosemid	Lasix® liquidum 10 mg/ml, Sanofi
Glucose-Lösung	Glucose 5%, Braun
Isofluran	Forene®, AbbVie Dtschl. GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid 74,5 mg/ml, Braun
Natriumchlorid	Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Braun
Natrium-EDTA	Fluca® Analytical, LOT: #BCBC6314V
O ₂ (20%) / CO ₂ (80%) -Gemisch	Technische Medizinische Gas GmbH
Pentobarbital-Natrium	Narcoren® 16g/ 100ml, Merial GmbH
S-Ketamin	Ketamin 100 mg/ml, Gräub
Xylazin	Rompun® 2%, Bayer

Tabelle 3: Auflistung der zur Versuchsdurchführung verwendeten Utensilien und Geräte

Bezeichnung:	Verwendung:
ABL90, Radiometer	Gerät zur Blutgasanalyse
Aldosteron RIA-KIT, Beckmann Coulter™	Bestimmung der Aldosteron Plasmakonzentration
EIA-KIT ANP, # EK-005-24, Phoenix Pharmaceuticals™	Bestimmung der ANP Plasmakonzentration
Feinwaage: Excellence, Sartorius™	Organgewichte, Chemikalien
GFR-Sensor + Akku, Mannheim Pharma & Diagnostics	GFR-Bestimmung
Hämatokrit Zentrifuge Hettich	Zentrifugation der Blutproben zur Renin-Messung
Isofluran-Verdampfer, Föhr Medical Instruments GmbH	Inhalationsnarkosen
Kanüle 25G x 1" (0,5mm x 25mm), BD Microlance™ 3	Einführen des Telemetriekatheters in das Gefäß
Kanüle 27G x ¾" (0,4mm x 20mm), Sterican®, Braun	S.c. Injektionen
Kanüle 30G x ½" (0,3mm x 13mm), BD Microlance™ 3	Retrobulbare Injektion
K-EDTA Mikro-Blutentnahmegefäß, REF 20.1341, Sarstedt™	Blut für ANP Bestimmung
Lightcycler © 480 Software, Roche	mRNA Quantifizierung
Li-Heparin Mikro-Blutentnahmegefäß, REF 41.1393.005, Sarstedt™	Blut für Plasmavolumenbestimmung/ Aldosteronbestimmung
Makrolon Typ II	Mauskäfig
Mersilene® 5-0, Ethicon	Hautnaht
Messschieber	Messung der Tibialänge
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren; Brand GmbH + Co KG; Kat-No. 749321	Blut für Reninbestimmung
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf™	Probenaufbewahrung
Multiskan FC, Thermo Scientific™	Extinktionsmessung
Pipetten diverse Volumina: PIPETMAN Classic™ (P20, P100, P200, P1000), Gilson®	Pipettieren quantifizierbarer Volumina
Reflotron®Plus (Roche) + Creatinine-Streifen	Kreatininbestimmung
RENCTK, Diasorin	Bestimmung der Renin Plasmaaktivität
Seal Plate®, Excel Scientific Inc.	Abdecken der Mikrotiterplatte
Spotchem™EL SE-1520 (Axonlab)	Elektrolytmessung
Spritzen 1-10ml Injekt®, Braun	Medikamentenapplikation
Stoffwechselkäfig (Tecniplast)	Uringewinnung
Telemetrie Sender Typ PA C-10, Data Sciences International	Telemetrische Messungen
Veet sensitive®	Enthaarungscreme für GFR-Messung
VisualSonics Vevo ® 2100 Imaging System	Sonographie-Gerät für Echokardiographie
Waage: Excellence Plus®, Mettler Toledo™	Mausgewichte, Trinkflaschen
Zentrifuge 5417 R, Eppendorf	Zentrifugation von Li-Heparin- und EDTA-Küvetten
96-Well Mikrotiterplatte, Nunc™ MicroWell™ Thermo Scientific™	Plasmavolumenmessung

Tierfutter:

Normaldiät:

LASQCdiet[®] Rod 16, Rad (bestrahlt), Hersteller: LASvendi

Tamoxifendiät:

LASCRdiet[™] CreActive TAM400 (10mm, Rad), Hersteller: LASvendi

Salzdiät:

Kontrolldiät: Sondermischung C1036mod. Enthält 3000mg Natrium/kg Diät, Hersteller: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG

Hochsalz: Sondermischung C1036mod. Enthält 30000mg Natrium/kg Diät, Hersteller: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG

Niedrigsalz: Sondermischung C1036mod. Enthält 200mg Natrium/kg Diät, Hersteller: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG

3.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Messwerte und Daten wurden digitalisiert und größtenteils in Microsoft Excel Tabellen erfasst. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit dem Programm Prism 5 von der Firma Graph Pad. Zur Auswertung wurden Student`s T-test sowie one- / und two-way-ANOVA gepaart und ungepaart genutzt. Bei der one-way ANOVA schloss sich standardmäßig ein Newman-Keuls Post-Test an. In jedem Fall wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. In den Abbildungen und im Text wurde außerdem regelhaft noch der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mit aufgeführt.

Signifikante Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$ / ** = $p < 0,01$ / *** = $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

Das nachfolgende Kapitel enthält eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der durchgeführten Versuchsprotokolle. Im ersten Teil werden die Resultate unter Stimulation und Suppression des RAAS durch Niedrig- und Hochsalzdiät erläutert, der Fokus liegt somit auf der Wirkung des TMEM16A-KO auf die renalen Mechanismen der Blutdruckregulation. In einem zweiten Schritt werden die Ergebnisse der Studien unter zusätzlichem „Kreislaufstress“ im Sinne von Elektrolyt-/Volumenverlust und Vasodilatation durch Furosemid dargestellt. Die Untersuchungen sollten zeigen, inwiefern die Knockouttiere in der Aufrechterhaltung des Blutdrucks beeinträchtigt sind und welche Kompensationsmechanismen aktiviert werden, um die durch Ausfall von TMEM16A hervorgerufenen Effekte zu kompensieren.

4.1 Renale Einflüsse des TMEM16A-KO bei stimuliertem oder supprimiertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Versuche unter Standardbedingungen konnten einen ausgeprägten Blutdruckabfall nach TMEM16A-KO demonstrieren. Im Rahmen der weiteren Untersuchung dieses Blutdruckeffektes wurden Experimente unter Hoch- („RAAS-Suppression“) und Niedrigsalzdiät („RAAS-Stimulation“) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Salzdeprivation zu keiner weiteren Blutdrucksenkung führte, während es unter erhöhtem Salzangebot zu einem Verschwinden des Blutdruckunterschiedes kam. Die unter Standarddiät bestimmten Hormone des RAAS zeigten interessanterweise keine Gruppenunterschiede (Heinze *et al.*, 2014).

Im folgenden Abschnitt wurde mittels Gabe einer Niedrigsalzdiät untersucht, ob die RAAS-Aktivierung durch den Knockout beeinflusst wird. Außerdem sollten die Messungen unter Hoch- und Niedrigsalzdiät zeigen, ob eine veränderte Nierenfunktion oder eine Volumenretention für die Blutdruckergebnisse im Rahmen der Salzdiäten verantwortlich waren. Zum direkten Vergleich wurden dieselben Parameter zusätzlich unter Standardbedingungen erhoben.

4.1.1 Gewichtsentwicklung unter Hoch- und Niedrigsalzdiät

Um eventuelle Einflüsse des Körpergewichts auf die weiteren erhobenen Daten berücksichtigen zu können, wurden die Tiere mindestens einmal wöchentlich gewogen (Abb. 13). Außerdem diente dies als Monitoring einer adäquaten Entwicklung sowie des Wohlbefindens der Tiere.

Zu Beginn der Versuche lag das Gewicht der Tiere in der Knockout-Gruppe bei durchschnittlich $27,04 \pm 0,39$ g (n=50) und damit nahezu gleichauf mit dem der Wildtyp- ($27,12 \pm 0,49$ g, n=42) bzw. der Flox+Tam-Gruppe ($27,7 \pm 1,2$ g, n=8). Der weitere Gewichtsverlauf zeigte eine kontinuierliche Gewichtszunahme, wie sie unter optimalen Haltungsbedingungen zu erwarten ist. Auffällig war ein Stagnieren der Gewichtszunahme insbesondere von Knockout- und Flox+Tam-Gruppe unter Tamoxifendiät, welche jedoch nicht zu signifikanten Gewichtsunterschieden zwischen den verglichenen Gruppen führte und nach Absetzen aufgeholt wurde. Somit ergaben die letzten gemessenen Gewichte im Rahmen der Organentnahme eine ähnliche Konstellation (Knockout: $31,07 \pm 0,55$ g, Wildtyp: $29,70 \pm 0,48$ g, Flox+Tam: $30,10 \pm 0,93$ g). Zusammenfassend zeigte das Körpergewicht zwischen den verschiedenen Gruppen unter Standardfutter keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 13 A).

Wie in Abbildung 13 B dargestellt, starteten Wildtypen und Knockouts in der Niedrigsalzkohorte bei Tamoxifenbeginn mit nahezu identischem Gewicht (Knockout: $24,73 \pm 0,48$ g, n=21, Wildtyp: $25,02 \pm 0,49$ g, n=23) und nahmen im weiteren Verlauf der Experimente altersentsprechend an Gewicht zu. Unter Tamoxifen war die Steigerung des Körpergewichts in der Knockoutgruppe im Vergleich zu den Wildtypen etwas gemäßiger, die sich daraus ergebende Gewichts Differenz wurde aber bei der Rückkehr zur Normaldiät ab Woche vier bis zum Beginn der Niedrigsalzdiät wieder ausgeglichen. Während der zehn Tage unter Niedrigsalzdiät verhielten sich beide Gruppen identisch. Der Gewichtsunterschied zum Zeitpunkt der Organentnahme war somit vernachlässigbar (Knockout: $29,15 \pm 0,73$ g, n=21, Wildtyp: $28,81 \pm 0,71$ g, n=23) und in der two-way ANOVA zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

Der Gewichtsverlauf im Hochsalzprotokoll gestaltete sich bei beiden Gruppen ähnlich wie bereits für die Niedrigsalztiere beschrieben. Knockout- und Wildtypmäuse gingen zum Zeitpunkt „Null“ mit ähnlichem, wenn auch im Durchschnitt etwas höherem Gewicht als die Niedrigsalztiere in den Versuch (Knockout: $25,77 \pm 0,57$ g, n=20, Wildtyp: $26,01 \pm 0,74$ g, n=22). Auch bei diesem Experimentablauf kam es durch den Futterwechsel auf Tam-Futter

zu einer gebremsten Gewichtszunahme in der Knockoutgruppe. Letztere wurde jedoch von Woche vier bis sechs wieder aufgeholt und sogar etwas überkompensiert. Dies führte dazu, dass beide Gruppen zum Zeitpunkt der Organentnahme keinen signifikanten Gewichtsunterschied aufwiesen (Knockout: $31,29 \pm 0,57$ g, $n=20$, Wildtyp: $29,94 \pm 0,70$ g, $n=22$) (Abb. 13 C).

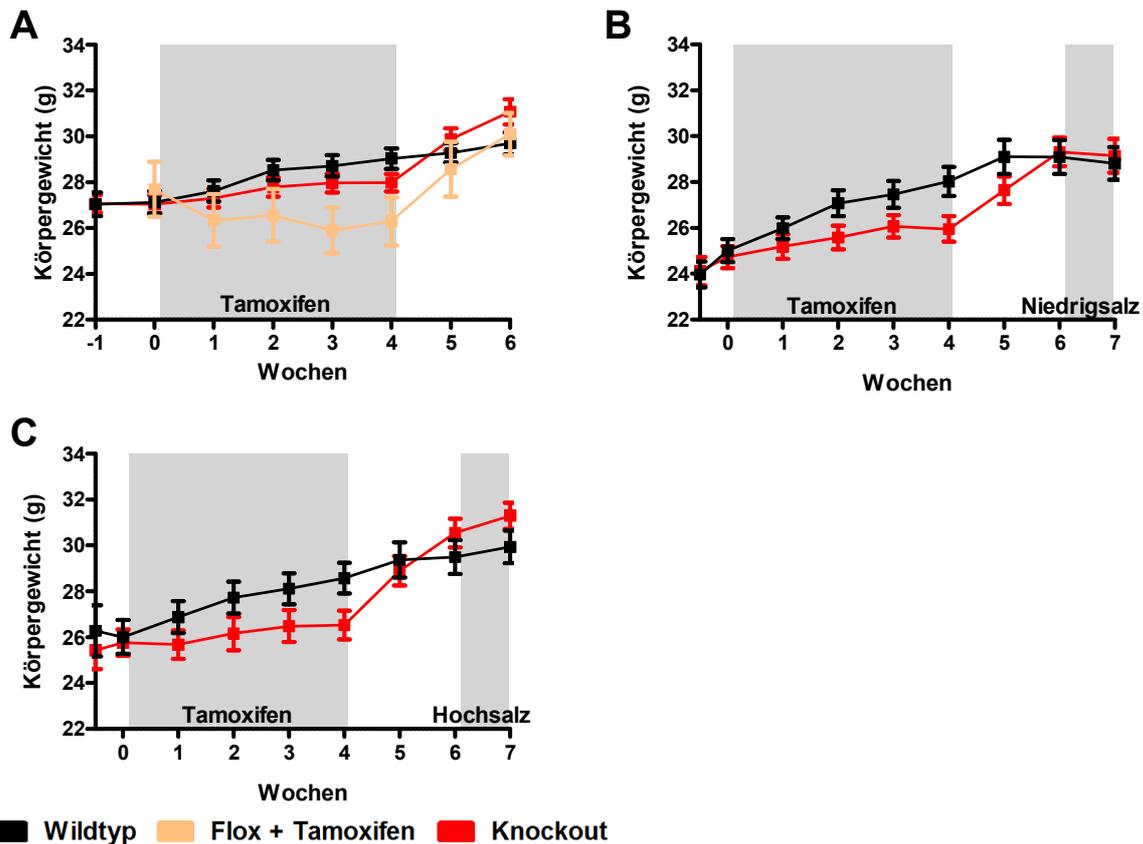


Abbildung 13: Gewichtsentwicklung bei Standard und Salzdiäten

A Gewichtsentwicklung der Mäuse unter Standarddiät in Wochen. Wildtyp: $n=42$, Flox+Tam: $n=8$, Knockout: $n=50$, statistische Testung mit einer two-way ANOVA. **C** Entwicklung der wöchentlich gemessenen Mausgewichte im Verlauf des Protokolls für die Niedersalzdiet. Wildtyp: $n=23$, Knockout: $n=21$, statistische Testung mit two-way ANOVA. **D** Gewichtsverlauf von Wildtyp- ($n=22$) und Knockoutgruppe ($n=20$) im Hochsalzprotokoll bei wöchentlicher Wägung, die statistische Testung erfolgte mittels two-way ANOVA.

4.1.2 Trinkmenge unter Hoch- und Niedersalzdiet

Die Trinkmenge diente als erster Surrogatparameter für Unterschiede im Wasser- und Elektrolythaushalt zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen. Außerdem sollte durch die Berechnung der täglichen Trinkmenge in Gramm mittels Trinkflaschengewichtsmessung eine ausreichende Aufnahme der Salzdiät dokumentiert werden.

Bereits die Induktion des Knockouts führte im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine deutliche Steigerung der Trinkmenge herbei. Die Analyse der täglichen Trinkmenge in Abbildung 14 A ergab, dass Mäuse mit induziertem Knockout ($4,71 \pm 0,21$ g/24h, n=25) etwa 25% mehr tranken als die Wildtyptiere ($3,72 \pm 0,13$ g/24h, n=22) sowie die Flox+Tam Tiere ($3,98 \pm 0,29$ g/24h, n=8), was einen signifikanten Unterschied ausmachte.

Die Trinkmenge unter Kontrolldiät in Abbildung 14 B lag bei $4,43 \pm 0,24$ g/24h in der Knockout-Gruppe (n=25) bzw. bei $4,10 \pm 0,19$ g/24h in der Wildtypgruppe (n=26). Unter Niedrigsalzdiät zeigten sich wie zu erwarten ähnliche Werte (Knockout: $4,37 \pm 0,28$ g/24h, n=23, Wildtyp: $3,85 \pm 0,17$ g/24h, n=22). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht ersichtlich. Unter der das RAAS supprimierenden Hochsalzdiät kam es jedoch zu einer mehr als Verdreifachung der Trinkmenge im Vergleich zur Kontrolldiät, wobei die Zunahme in der Knockoutgruppe (n=20) auf $16,06 \pm 0,51$ g/24h signifikant stärker ausfiel als bei den Wildtyptieren (n=23), welche durchschnittlich $14,92 \pm 0,49$ g/24h Wasser zu sich nahmen (Abb. 14 B).

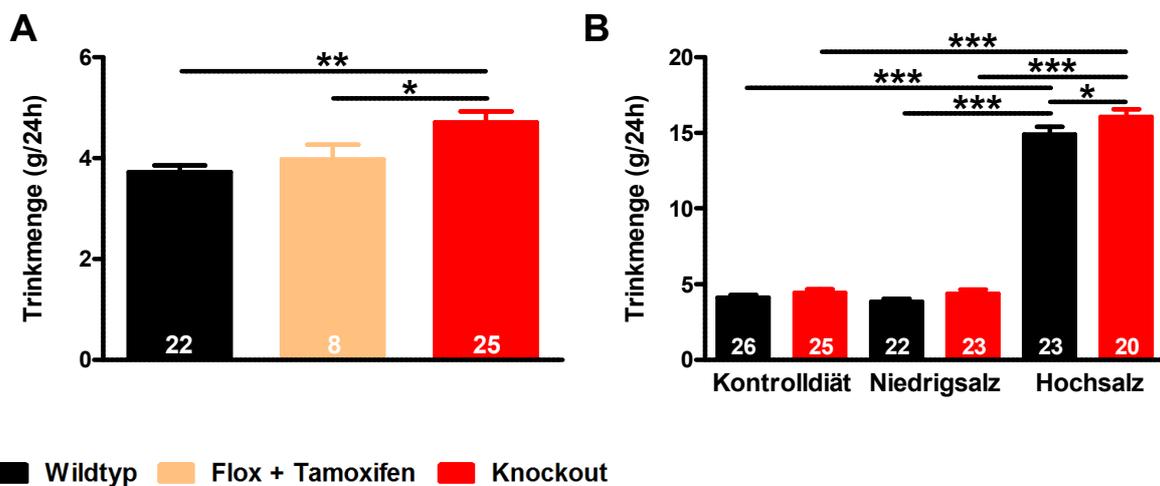


Abbildung 14: Trinkmenge unter Standard- und Salzdiät

A Ermittlung der Trinkmenge in Gramm pro Tag, Wildtyp: n=22, Flox+Tam: n=8, Knockout: n=25, statistische Testung mit one-way ANOVA. **B** Vergleich der Trinkmengen pro Tag von Mäusen unter Kontrollfutter und Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. Statistische Testung mittels one-way ANOVA.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.1.3 Renale Filtration unter Hoch- und Niedrigsalzdiät

In allen Gruppen wurde des Weiteren die GFR als Maß für die Nierenfunktion mit der Non-Invasive-Clearance Methode gemessen. Die Ergebnisse wurden als filtriertes Volumen in vierundzwanzig Stunden pro hundert Gramm Mausgewicht berechnet. Damit sollte eine Verfälschung der ermittelten Daten durch Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen ausgeschlossen werden.

Eine Basismessung bei allen Tieren erfolgte zum Zeitpunkt „Null“, d.h. vor Gabe des Tamoxifen Futters bei der Knockout- und der Flox+Tam-Gruppe. Die Werte dieser ersten Erhebung in Abbildung 15 A zeigen, dass die die GFR bei allen Gruppen zu Beginn des Versuchs in einem vergleichbaren Bereich lag (Knockout: $2173 \pm 64,41$ ml/24h/100gKG, n=52, Wildtyp: $2166 \pm 69,22$ ml/24h/100gKG, n=51, Flox+Tam: $2339 \pm 210,70$ ml/24h/100gKG, n=8).

In der zweiten GFR- Messung sechs Wochen später und vierzehn Tage nach dem Absetzen des Tamoxifen Futters stellte sich in der Wildtyp- sowie der Flox+Tam-Gruppe eine im Vergleich zum Basiswert erniedrigte GFR dar (Wildtyp: $1856 \pm 70,64$ ml/24h/100gKG, n=51, Flox+Tam: $1810 \pm 266,30$ ml/24h/100gKG, n=8). In der Knockoutgruppe hingegen erschien die GFR nahezu unverändert (Knockout: $2205 \pm 88,48$ ml/24h/100gKG, n=52). Die Abnahme der Nierenfunktion bei den Kontrolltieren war im Verlauf hoch signifikant (Wildtyp: $-303,7 \pm 82,33$ ml/24h/100gKG, n=51, $p < 0,01$) (Abb. 15 B). Gegenüber den Flox+Tam-Mäusen ließ sich dieser Unterschied ebenfalls nachweisen, da diese ähnlich wie die Wildtypgruppe im Verlauf eine signifikante Reduktion der GFR zeigte (Flox+Tam: $-528,8 \pm 238,3$ ml/24h/100gKG, n=8, $p < 0,001$) (Abb. 15 B). Dadurch ergibt sich bei stabiler GFR der Knockoutmäuse ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach Induktion.

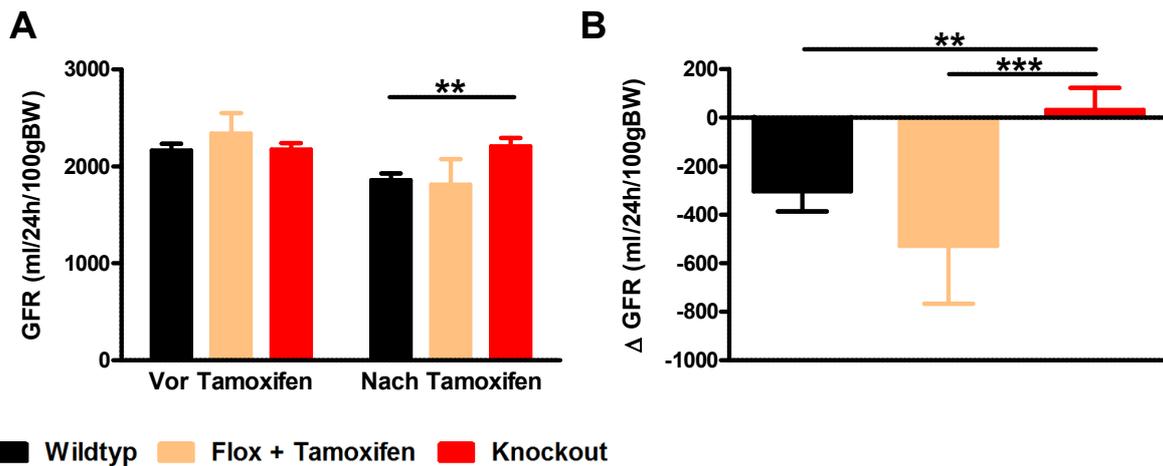


Abbildung 15: Bestimmung der GFR unter Standarddiät

A Darstellung der GFR-Ergebnisse „vor Tamoxifen“ an Tag 0 und „nach Tamoxifen“ an Tag 42. Die Resultate wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf hundert Gramm Mausgewicht und 24 Std. normalisiert. Es wurden Wildtyp- ($n=51$), mit Flox+Tam- ($n=8$) und Knockouttieren ($n=52$) verglichen. Die statistische Testung erfolgte mit einer two-way ANOVA. **B** Zeigt die Änderung der GFR bei den unterschiedlichen von der ersten zur zweiten Messung die in A dargestellt sind. Es wurden ebenfalls Wildtyp- ($n=51$), mit Flox+Tam- ($n=8$) und Knockouttieren ($n=52$) verglichen. Die statistische Testung erfolgte mittels two-way ANOVA.

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$

In den Abbildungen 16 A/B schien ebenfalls (s.o.) jeweils die Knockoutgruppe unter Normaldiät eine bessere Filtrationsleistung zu haben. Dies bestätigte sich bei den Tieren des Hochsalzprotokolls nach der statistischen Überprüfung durch eine Zwei-Variate-Analyse, die signifikant ausfiel (Knockout: $2316 \pm 231,50$ ml/24h/100gKG, $n=11$, Wildtyp: $1527 \pm 93,95$ ml/24h/100gKG, $n=12$, $p<0,05$). Bei der eigentlichen Messung unter Salzdiät, zeigte sich in Abb. 16 A, dass unter Niedrigsalzdiät eine Angleichung der GFR zwischen den Gruppen stattfand (Knockout: $1818 \pm 138,80$ ml/24h/100gKG, $n=13$, Wildtyp: $1879 \pm 270,60$ ml/24h/100gKG, $n=10$). In dem Zeitraum bis zur zweiten Messung schien die GFR der Knockoutgruppe abzunehmen, auch wenn sich dies im durchgeführten Student's t-Test knapp als nicht signifikant erweist ($p=0,0538$).

Die in Abb. 16 B dargestellten Tiere unter Hochsalzdiät verhielten sich ähnlich, es fand eine Angleichung der Filtrationsraten statt und der unter Normaldiät augenscheinlich bestehende Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp (Knockout: $2316 \pm 231,50$ ml/24h/100gKG, $n=11$, Wildtyp: $1527 \pm 93,95$ ml/24h/100gKG, $n=12$, $p<0,05$) war unter Hochsalzgabe verschwunden (Knockout: $2206 \pm 255,80$ ml/24h/100gKG, $n=11$, Wildtyp: $1977 \pm 166,50$ ml/24h/100gKG, $n=12$).

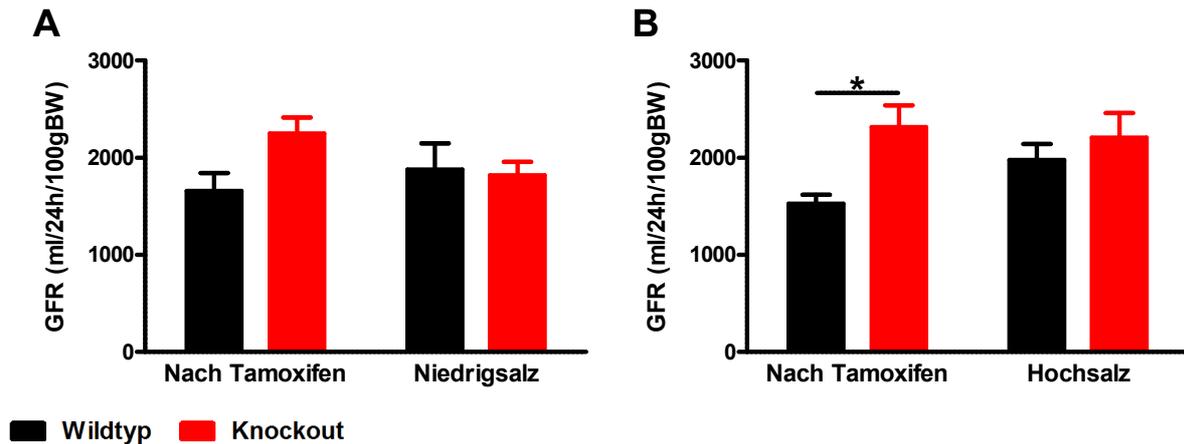


Abbildung 16: GFR-Vergleich vor und während Salzdiät

A/B Gegenüberstellung der GFR-Ergebnisse 14 Tage nach Ende der Tamoxifengabe unter Kontrolldiät und nach 10 Tagen Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf 24 Std. und 100 Gramm Mausgewicht standardisiert. Wildtyp-Niedrigsalz: $n=10$, Knockout-Niedrigsalz: $n=13$, Wildtyp-Hochsalz: $n=12$, Knockout-Hochsalz: $n=11$. Die statistische Testung erfolgte mittels two-way ANOVA.

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$

4.1.4 Organgewichte unter Hoch- und Niedrigsalzdiät

Bei der Analyse der Organgewichte wurde der Fokus insbesondere auf kreislaurelevante Organe gelegt. Es sollte in den Protokollen unter Salzdiät untersucht werden, ob die publizierte relative Hypotonie der Knockouttiere ebenfalls eine Minderbelastung und eine damit einhergehende Herzhypotrophie verursacht (Heinze *et al.*, 2014). Außerdem wurden die Nieren gewogen, um einen Parameter für eine Parenchymveränderung z.B. als Hinweis für entzündliche Prozesse bzw. ein Nierenversagen zu erhalten. Die Ergebnisse wurden absolut ermittelt, da das Körpergewicht der Tiere keine signifikanten Unterschiede aufwies.

Bei der Auswertung der Herzgewichte zeigten sich zwar zwischen Wildtypen und Knockouts keine bedeutenden Unterschiede, dafür wiesen die Gewichte zwischen den verschiedenen Protokollen Hoch- und Niedrigsalzdiät signifikante Differenzen auf. Das absolute Herzgewicht der Tiere unter Hochsalzdiät war im Gegensatz zur entsprechenden Gruppe unter Niedrigsalzfutter bei Knockouts ($p<0,01$) und Wildtypen ($p<0,001$) deutlich höher (Abb. 17 A). Im direkten Vergleich mit den entsprechenden Daten der Tiere unter Normaldiät (als Linien im Hintergrund dargestellt) bewegten sich die Niedrigsalztiere (Knockout: $116,70 \pm 2,65$ g, $n=15$, Wildtyp: $110,00 \pm 2,52$ g, $n=17$) leicht unter bzw. die Hochsalztiere (Knockout: $132,70 \pm 3,70$ g, $n=16$, Wildtyp: $128,20 \pm 3,18$ g, $n=18$) leicht über den durchschnittlich ermittelten Werten (Abb. 17 A).

Die Nierengewichte von Wildtyp- und Knockoutgruppe lagen unter Nidrigsalzdiät dicht beieinander (Wildtyp: $349,5 \pm 10,62$ mg, $n=21$, Knockout: $323,9 \pm 6,60$ mg, $n=18$) und unterschieden sich damit nicht signifikant. Eine ähnliche Konstellation zeigte sich auch unter Hochsalzdiät, allerdings waren alle Werte etwas nach oben verschoben (Wildtyp: $382,0 \pm 12,30$ mg, $n=21$, Knockout: $367,4 \pm 10,92$ mg, $n=19$). Im Hintergrund wurden die Linien als Referenz für das ermittelte Gewicht der Nieren von Wildtyp- und Knockouttieren unter Standarddiät eingefügt. Es zeigt sich insgesamt eine Tendenz zu schwereren Nieren je stärker die RAAS-Suppression ist, diese ist aber statistisch nicht signifikant (Abb. 17 B).

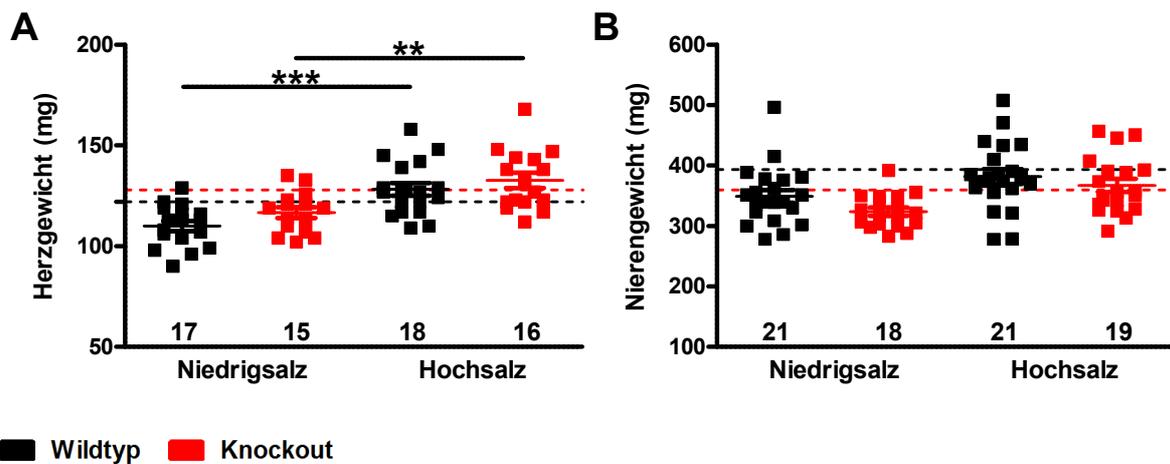


Abbildung 17: Herz- und Nierengewichte unter Salzdiät

A Darstellung der absoluten Herzgewichte der Mäuse nach 10 Tagen Niedrig- bzw. Hochsalzfutter. Wildtyp-Niedrigsalz: $n=17$, Knockout-Niedrigsalz: $n=15$, Wildtyp-Hochsalz: $n=18$, Knockout-Hochsalz: $n=16$. Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA. **B** Nierengewichte absolut aufgetragen zum Zeitpunkt der Organentnahme nach 10 Tagen Salzfutter. Im Vergleich: Wildtyp-Niedrigsalz ($n=21$), Knockout-Niedrigsalz ($n=18$), Wildtyp-Hochsalz ($n=21$), Knockout-Hochsalz ($n=19$). Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA.

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$

4.1.5 Reaktion der Hormone des RAAS unter Hoch- und Nidrigsalzdiät

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt eine entscheidende Rolle für die Blutdruckregulation im Organismus. Deshalb wurden die Aktivitäten von zwei der wichtigsten Effektoren Renin und Aldosteron bestimmt. Auf der einen Seite ließen diese Daten Schlüsse auf die Aktivität des RAAS im Rahmen der Salzdiäten zu und ermöglichten somit eine bessere Interpretation der anderen Ergebnisse, auf der anderen Seite wurden diverse in vitro Experimente publiziert, die einen Einfluss von TMEM16A auf die RAAS Aktivität suggerieren

(Kurtz and Penner, 1989). Nachdem sich dieser Einfluss unter Normaldiät in vivo bisher nicht zeigte (Heinze *et al.*, 2014), sollten die Experimente unter Salzdiät, dazu dienen einen möglicherweise bestehenden Effekt durch äußere Stimulation/ Suppression des RAAS aufzuzeigen. Außerdem wurde die ANP Aktivität im Plasma bestimmt, um zusammen mit dem Plasmavolumen eine genauere Aussage über den Volumenstatus der jeweiligen Versuchsgruppe treffen zu können.

In Abbildung 18 A sind die Ergebnisse der Plasma-Renin-Aktivität dargestellt. Bereits auf den ersten Blick fällt das supprimierte Renin unter der Hochsalzdiät auf (Knockout: $17,11 \pm 8,22$ ng*ml/hr, n=8, Wildtyp: $8,63 \pm 1,52$ ng*ml/hr, n=11). Unter Salzdeprivation zeigte sich im Vergleich zum Salzüberangebot eine etwa dreifach erhöhte Reninaktivität bei der Knockout, wie auch bei der Wildtypgruppe (Knockout: $58,59 \pm 14,32$ ng*ml/hr, n=6, Wildtyp: $60,76 \pm 14,43$ ng*ml/hr, n=11). Zwischen den Genotypen bestanden keine Unterschiede.

Das Bild der Aldosteronbestimmung war noch etwas drastischer, trotz der angepassten Achsenskalierung ließen sich die Aldosteronwerte der Gruppen unter Hochsalzdiät aufgrund der kleinen Werte in der Graphik nur erahnen (Knockout: $0,36 \pm 0,22$ pg/ml, n=9, Wildtyp: $0,60 \pm 0,24$ pg/ml, n=11). Die Werte bei den Tieren unter Niedrigsalzdiät waren hingegen um ein vielfaches höher. Darüber hinaus ergab sich unter Niedrigsalzfutter ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhtes Aldosteron der Knockouttiere im Vergleich zur Wildtypgruppe (Knockout: $494,70 \pm 128,60$ pg/ml, n=7, Wildtyp: $328,70 \pm 45,75$ pg/ml, n=11) (Abbildung 18 B). Die gestrichelt dargestellten Linien in Abbildung 18 A/B zeigen unter Standarddiät ermittelte Hormonwerte (Heinze *et al.*, 2014). Diese stellen entsprechend den Erwartungen sehr gut dar, dass das RAAS bei Niedrigsalzdiät stärker aktiviert und unter Hochsalzdiät deutlich supprimiert wurde. Diese grundsätzlichen Wirkungen der Diäten auf das RAAS waren augenscheinlich vom Genotyp unabhängig.

Die in Abbildung 18 C aufgetragenen Werte der ANP-Messung zeigten weder unter Niedrig- noch unter Hochsalzdiät signifikante Unterschiede zwischen den beiden zu vergleichenden Genotypen. Die kleine Tierzahl von n=6-9 und die relativ große Streuung machten eine Auswertung schwierig, es schien jedoch augenscheinlich eine Tendenz zu höheren ANP-Werten bei den Wildtyptieren insbesondere in der Hochsalzgruppe (Knockout: $11,08 \pm 1,72$ ng/ml, n=9, Wildtyp: $26,33 \pm 8,73$ ng/ml, n=10) zu geben.

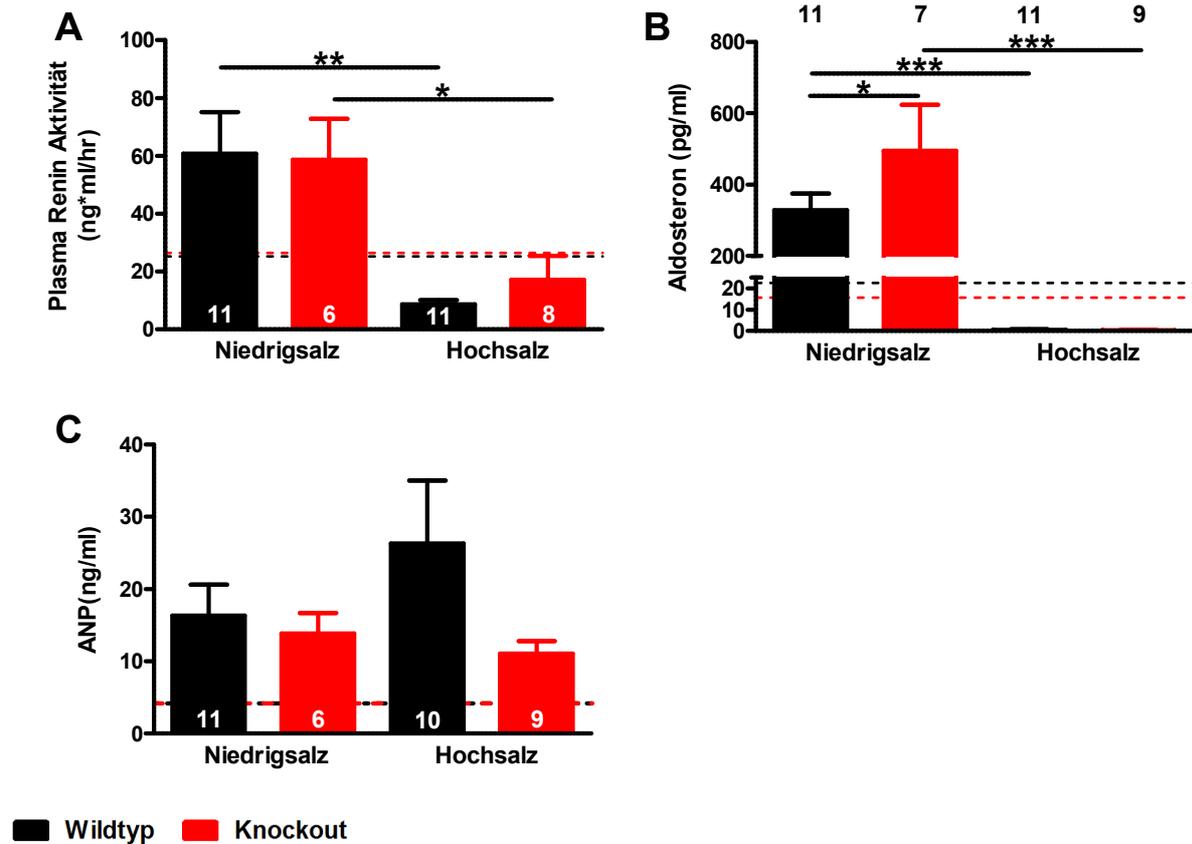


Abbildung 18: Auswertung der Hormone des RAAS & ANP

A Gemessene Reninaktivitäten im Plasma unter Niedrig- und Hochsalzfutter. Wildtyp-Niedrigsalz: n=11, Knockout-Niedrigsalz: n=6, Wildtyp-Hochsalz: n=11, Knockout-Hochsalz: n=8. **B** Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Aldosteron bei Niedrig- und Hochsalzdiät. Wildtyp-Niedrigsalzdiät: n=11, Knockout-Niedrigsalz: n=7, Wildtyp-Hochsalz: n=11, Knockout-Hochsalz: n=9. **C** Ergebnisse der ANP-Bestimmung, Niedrig- und Hochsalzprotokoll im Vergleich. Wildtyp-Niedrigsalzdiät: n=11, Knockout-Niedrigsalz: n=6, Wildtyp-Hochsalz: n=10, Knockout-Hochsalz: n=9. Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät (aus Heinze et al. 2014). Die statistische Testung wurde mittels one-way ANOVA durchgeführt.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.1.6 Plasmavolumen unter Hoch- und Niedrigsalzdiät

Zur Messung des Plasmavolumens wurde die bereits erwähnte Evans Blue Methode gewählt. Es sollte untersucht werden, ob der chronisch niedrigere Blutdruck bei den Knockout Mäusen (Heinze *et al.*, 2014) eine Zunahme des Plasmavolumens im Sinne eines kompensatorischen Prozesses hervorruft. Außerdem wären insbesondere in Bezug auf eine veränderte Aktivität des RAAS hier Veränderungen zu erwarten. Als Zeitpunkt für die

Messung wurde der letzte Tag kurz vor der Organentnahme gewählt, da hier der größtmögliche Effekt der Diäten erzielt wird.

Das gemessene Plasmavolumen unter Standarddiät belief sich auf durchschnittlich $1,49 \pm 0,07$ ml (n=13) bei den Wildtyptieren im Vergleich zu $1,55 \pm 0,04$ ml (n=14) bei den Knockout Mäusen. Es fanden sich weder bei den absoluten Werten, noch bei einer Normalisierung auf das Gewicht der Mäuse Gruppenunterschiede (Abb. 19 A & B).

Tatsächlich entsprachen die Ergebnisse nahezu den laut Literatur zu erwartenden Plasmavolumina (GV-SOLAS, 2009), wenn eine Blutmenge von 75 ml/kgKG und ein Hämatokrit von 40 % angenommen werden. Es gab lediglich eine leichte Abweichung zu höheren Werten (Knockout: $+10,4 \pm 2,3$ %, Wildtyp: $+16,0 \pm 4,9$ %), die jedoch im Gruppenvergleich nicht zu signifikanten Unterschieden führte.

Die in Abb. 19 A gezeigte Bestimmung der Plasmavolumina der jeweiligen Salzdiät lieferte ähnliche Werte für alle Gruppen. Die Mittelwerte lagen zwischen 1,23 und $1,30 \pm 0,04$ ml, es ergaben sich somit bei keiner Diät signifikante Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyptieren. Das körperrgewichtsspezifische Plasmavolumen war ebenfalls weitestgehend gleich zwischen den Knockout- und Wildtypgruppen der zwei Diäten (Abb. 19 B). Weder die zehntägige Salzdeprivation, noch die übermäßige Zufuhr schienen unter diesen Umständen Unterschiede in den Plasmavolumina zwischen Knockout- und Wildtyptieren zu erzeugen.

Interessanterweise gab es allerdings signifikante Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Diäten. Sowohl Niedrig- als auch Hochsalzdiät schienen bei Knockout- und Wildtypmäusen zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Verringerung des Plasmavolumens im Vergleich zur Standarddiät zu führen. Durch Normalisierung auf das Körpergewicht der Tiere war diese Differenz jedoch letztendlich nur noch bei den Wildtypen nachweisbar.

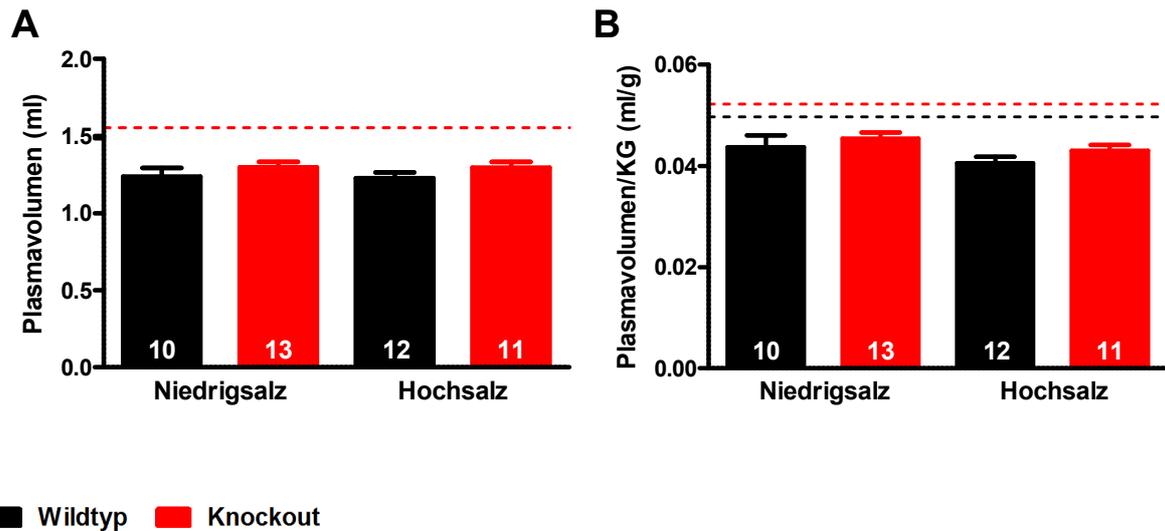


Abbildung 19: Plasmavolumen bei Standard-, Niedrig- und Hochsalzdiät

A Gegenüberstellung von Plasmavolumina bei Wildtyp- und Knockouttieren unter Standarddiät sowie am letzten Tag der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. **B** Auf das Mausgewicht am Tag der Organentnahme normalisierte Plasmavolumina. Wildtyp: n=13, Knockout: n=14, Wildtyp-Niedrigsalz: n=10, Knockout-Niedrigsalz: n=13, Wildtyp-Hochsalz n=12, Knockout-Hochsalz: n=11. Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät. Statistische Auswertung per one-way ANOVA.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.2 Rolle des TMEM16A-KO unter Salz- bzw. Volumenverlust und Vasodilatation durch Furosemidgabe

Der publizierte Blutdruckunterschied unter Standardbedingungen und Nidrigsalzdiät, welcher unter Hochsalzdiät (d.h. bei verminderter Beanspruchung der Blutdruckregulationsmechanismen wie z.B. des RAAS) verschwindet (Heinze *et al.*, 2014) deutet darauf hin, dass sich die Effekte des TMEM16A im lebenden Organismus vor allem bei Kreislaufbeanspruchung auswirken. Um dies zu zeigen, wurde eine siebentägige Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid bei den Tieren durchgeführt. Letztere sollte die Blutdruckregulation durch Elektrolyt-/Wasserverluste nochmal stärker beanspruchen als die Nidrigsalzdiät. Außerdem führt das Medikament zu einer Blockade von mit TMEM16A synergistisch wirkenden Regelmechanismen des Gefäßmuskeltonus (NKCC1) und bewirkt dadurch zusätzlich eine Vasodilatation. Dieser induzierte „Kreislaufstress“ sollte zur Folge haben, die Wirkungen des TMEM16A weiter zu demaskieren bzw. dessen steigende Relevanz für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks unter Extrembedingungen zu demonstrieren.

4.2.1 Gewichtsentwicklung & Trinkmenge unter Furosemid

Wie auch bei den anderen durchgeführten Versuchsprotokollen wurde die regelmäßige Gewichtskontrolle unter anderem dazu verwendet, das Wohlbefinden der einzelnen Tiere zu beobachten und eine unterschiedliche Entwicklung als Einflussgröße auf unsere erhobenen Daten auszuschließen. Im Verlauf unserer Experimente zeigte sich, dass die Tiere auch unter gegebenen Bedingungen von Versuchsbeginn bis Versuchsende im Schnitt etwa 4 Gramm an Gewichtszunahme verzeichnen konnten. Des Weiteren ist in Abbildung 20 A dargestellt, dass es abermals in der Knockoutgruppe zu einer leichten, aber nicht signifikanten Stagnation der Gewichtszunahme im Zeitraum der Gabe von Tamoxifen kam. Letztere wurde aber in den darauffolgenden zwei Wochen unter Standardfutter wieder ausgeglichen, so dass sich beide Gruppen nach sieben Tagen Furosemidgabe mit einem nahezu identischen Gewicht präsentierten (Knockout: $30,92 \pm 0,84$ g, $n=22$, Wildtyp: $30,98 \pm 0,62$, $n=18$). Es zeigte sich eine unter Furosemidgabe zu erwartende Gewichtsabnahme der Knockouttiere, während die Kontrollgruppe diesen Effekt kompensieren konnte.

Die Furosemidgabe erfolgte ad libitum über das Trinkwasser der Tiere. Jedes Tier bekam eine Flasche mit einer Furosemidmischung (1 mg/ml) und eine Weitere mit einer Elektrolytlösung. Die Gesamttrinkmenge der Mäuse wurde durch das Wiegen der

Trinkflaschen in Gramm ermittelt. Die in Abbildung 20 B aufgetragene Gesamttrinkmenge zeigt, dass Knockout- und Kontrollgruppe im Rahmen einer Basismessung unter Standarddiät ein reguläres Trinkverhalten aufwiesen. Bereits unter Normaldiät tranken die Knockouttiere mit $4,71 \pm 0,21$ g/24h (n=25) durchschnittlich etwa 25 % mehr als die Kontrolltiere mit $3,72 \pm 0,13$ g/24h (n=22). Im Rahmen der Furosemidintervention kam es bei beiden Gruppen zu einer drastischen Steigerung der Summe aus Furosemid- und Elektrolyttrinkmenge auf $13,77 \pm 0,93$ g/24h in der Knockoutgruppe (n=42) und auf $10,20 \pm 0,79$ g/24h in der Wildtypgruppe (n=34). Die Trinkmengendifferenz zwischen den Gruppen präsentierte sich hier nochmal deutlicher, während der durchschnittliche Unterschied unter Standardbedingungen bei ca. 1g/24h lag, wurde er mit 3,57 g/24h unter Furosemid mehr als verdreifacht (Abb. 20 B).

Als Ergänzung zu Abbildung 20 B, welche sich auf die Gesamttrinkmenge bezieht, wurde in Abbildung 20 C explizit die Furosemiddosis der Einzeltiere aus der Furosemidtrinkmenge berechnet und auf das Körpergewicht der Mäuse normiert. Die abgebildeten Daten lassen somit einen Vergleich der täglich pro Gramm Mausgewicht aufgenommenen Menge des Medikaments zu. Das Ergebnis dieser Berechnung demonstriert, dass trotz der ad libitum Gabe und der signifikant unterschiedlichen Gesamttrinkmenge zwischen Knockout- und Kontrolltieren eine vergleichbare Aufnahme von Furosemid bei allen Tieren erfolgte (Knockout: $0,147 \pm 0,016$ mg/gKG/24h, n=42, Wildtyp: $0,134 \pm 0,015$ mg/gKG/24h, n=34).

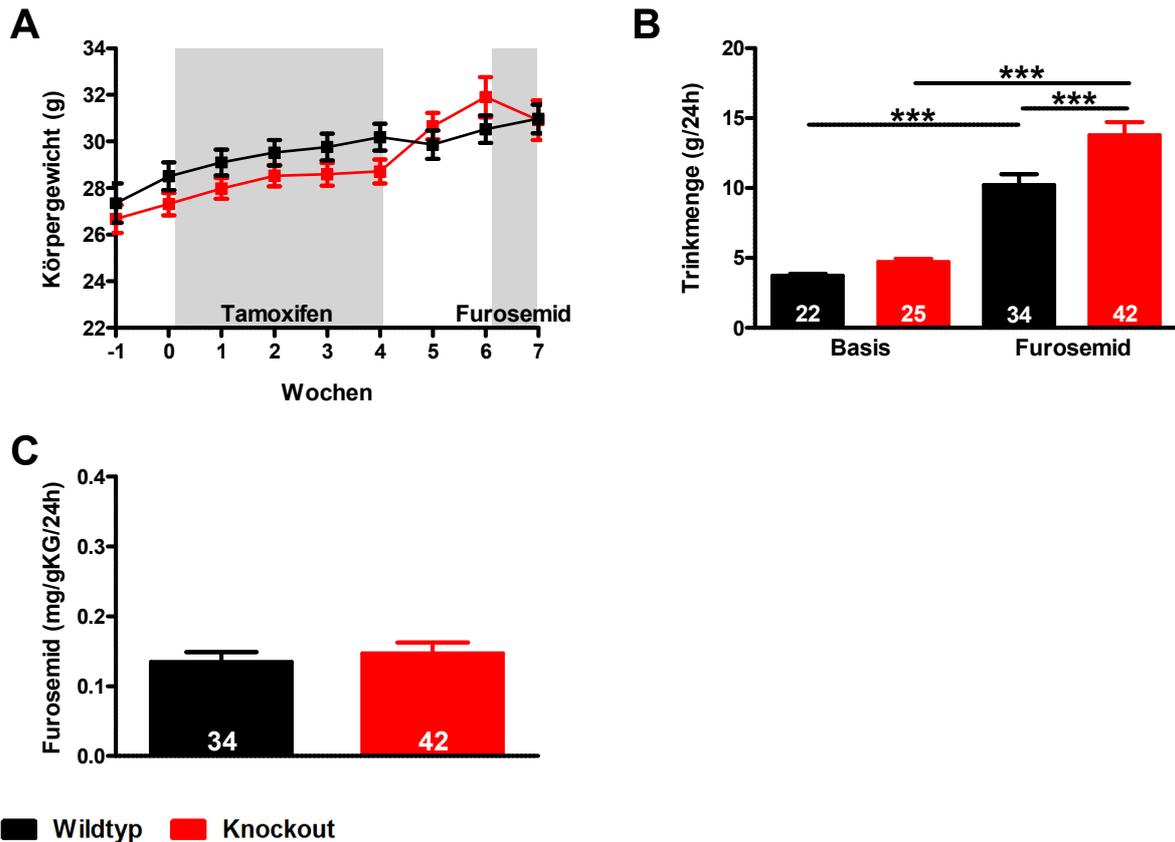


Abbildung 20: Gewichtsverlauf und Trinkmengenbestimmung unter Furosemidgabe

A Darstellung der Gewichtsentwicklung im Verlauf des Furosemidprotokolls mit wöchentlichen Mittelwerten. Wildtyp: $n=18$, Knockout: $n=22$. Statistische Testung mittels two-way ANOVA. **B** Vergleich der Trinkmenge vor („Basis“) und während der Furosemidgabe („Furosemid“) in getrunkenen Gramm pro Tag. Wildtyp-Basis: $n=22$, Knockout-Basis: $n=25$, Wildtyp-Furosemid: $n=34$, Knockout-Furosemid: $n=42$. Die Statistische Auswertung erfolgte mit einer one-way ANOVA. **C** Abbildung der mit dem Trinkwasser aufgenommenen Furosemidmenge in mg pro Körpergewicht und Tag. Wildtyp: $n=34$, Knockout: $n=42$. Statistische Testung mittels Student's t-Test. $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$

4.2.2 Telemetrie unter Furosemid

Zur Bestimmung diverser kreislaurelevanter Parameter wie z.B. Blutdruck und Herzfrequenz, aber auch um die Aktivität der untersuchten Tiere ohne äußerliche Stressoren zu quantifizieren, wurden den Mäusen Telemetriesender implantiert (vgl. Methoden 3.3.1), die uns über den gesamten Versuchszeitraum Messdaten lieferten, ohne das Tier zu beeinträchtigen.

Vor Beginn der Furosemidgabe wurde bei den Tieren eine Basismessung aller Parameter durchgeführt. In Abbildung 21 sind die gemittelten Werte des arteriellen Mitteldrucks (Mean arterial pressure= MAP) während der Nacht- bzw. Tagphasen der Tiere beider

Gruppen gegeneinander aufgetragen. Die Werte der Basis- wie auch die der Messung unter Furosemid wurden aus je zwei Nächten/Tagen à 12 Stunden (19 - 7 Uhr oder 7 – 19 Uhr) d.h. insgesamt 24 Stunden Messung pro Tier ermittelt. Dafür wurde aus den stündlichen Mittelwerten pro Tier ein Gesamtmittelwert gebildet.

Wie zu sehen ist, konnte bereits in der Basismessung nachts eine Blutdruckdifferenz (Abbildung 21 A, Knockout: $105,80 \pm 4,59$ mmHg, $n=8$, Wildtyp: $111,50 \pm 2,85$ mmHg, $n=7$) festgestellt werden. Letztere war aufgrund bereits publizierter Ergebnisse in diesem Rahmen zu erwarten (Heinze *et al.*, 2014), auch wenn der Unterschied im vorliegenden Versuch aufgrund der geringen Gruppengröße statistisch nicht signifikant ausfiel. Tagsüber zeigt sich ein äquivalentes Bild, da es sich um die Ruhephase der Tiere handelt sind die Blutdruckwerte erwartungsgemäß geringer (Abbildung 21 B, Knockout: $93,56 \pm 2,48$ mmHg, $n=8$, Wildtyp: $98,97,50 \pm 1,46$ mmHg, $n=7$). Bei der Messung unter Furosemid wurden die mittleren Werte der Nächte 6 und 7 ausgewertet. Verglichen mit der jeweiligen Basismessung zeigte sich unter Furosemid ein nahezu unveränderter mittlerer Blutdruck bei den Wildtyptieren (Nacht: $112 \pm 3,61$ mmHg, Tag: $97,21 \pm 2,27$, $n=7$), während bei den Knockouts ($n=8$) nachts eine Reduktion um etwa 10 mmHg auf $96,05 \pm 5,99$ mmHg stattfand und die Werte tagsüber um ca. 8 mmHg auf $85,18 \pm 4,14$ mmHg fielen. Die Auswertung mit der Two-way ANOVA ergab im Bonferroni post-Test unter Furosemidgabe einen signifikanten ($p<0,05$) Gruppenunterschied zwischen Knockouts und Wildtypen in der aktiven wie auch in der Ruhephase (Abb. 21).

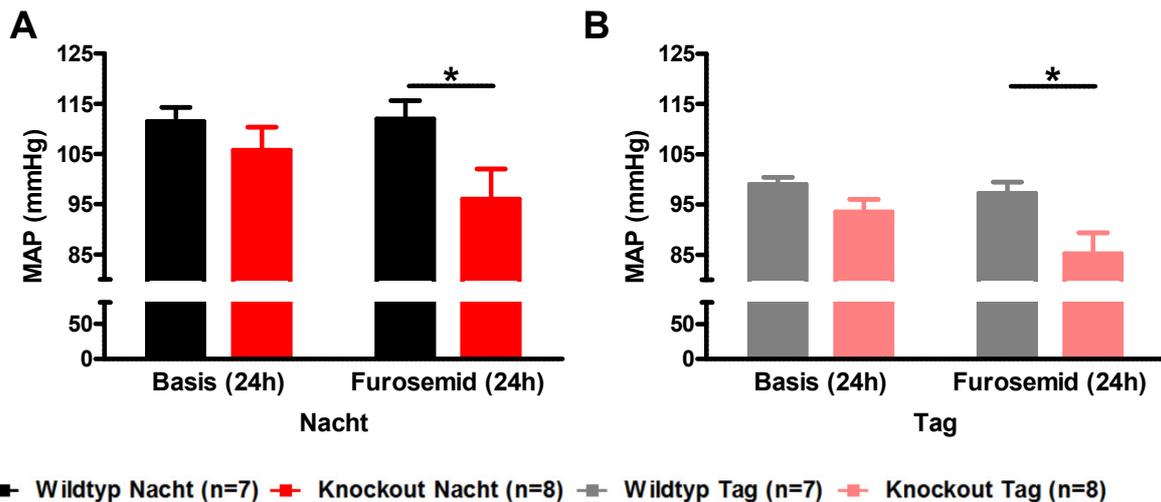


Abbildung 21: Mittlerer arterieller Blutdruck vor bzw. während Furosemidgabe

A Darstellung der Mittelwerte einer zwei Nächte (2x 12 Std., 19-7 Uhr) umfassenden telemetrischen Messung des arteriellen Mitteldrucks vor Beginn der Furosemidapplikation („Basis“) und in den letzten Nächten (6 & 7) der einwöchigen Gabe von Furosemid im Trinkwasser („Furosemid“). **B** Darstellung wie in A während der Tage (7-19 Uhr), Wildtyp: n=7, Knockout: n=8. Zur statistischen Testung wurde eine two-way ANOVA durchgeführt. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

Der zeitliche Verlauf der Blutdruckentwicklung ist in Abbildung 22 A/C aufgeführt. Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Nächte bzw. Tage gegeneinander aufgetragen. Es zeigte sich wie schon in Abbildung 21 beschrieben, dass die beiden Gruppen bereits mit einer leichten Blutdruckdifferenz in den Versuch starteten. Mit Beginn der Furosemidgabe kam es in den ersten beiden Nächten zu einem Blutdruckabfall beider Gruppen: um ca. 13 mmHg bei den Knockouts (n=8) und ca. 10 mmHg bei den Wildtypen (n=7). Bei den während des Tages gemessenen Blutdruckwerten zeigte sich ein ähnlicher, aber weniger ausgeprägter Blutdruckabfall, der außerdem etwas versetzt eintrat. Die Knockouttiere blieben im weiteren Verlauf mit dem mittleren Blutdruck stabil bei 93-95 mmHg nachts und 84-86 mmHg tagsüber. Anders verhielt es sich bei der Wildtypgruppe, bei der wieder eine Erholung des Blutdrucks beobachtet werden konnte. Nach 7 tägiger Furosemidapplikation unmittelbar vor der Organentnahme hatten die Wildtypen nachts mit $112,2 \pm 3,65$ mmHg ihren ursprünglichen Blutdruckwert bereits wieder erreicht, während die Knockouttiere weiterhin einen mittleren arteriellen Druck von $94,32 \pm 5,39$ mmHg aufwiesen. Beim statistischen Vergleich der einzelnen mittleren Nachtwerte gegeneinander mit dem Student's t-Test ergab sich insbesondere in den letzten drei Nächten ein signifikant niedrigerer Blutdruck ($p < 0,05$) bei den Knockout- gegenüber den Wildtypieren.

In Abbildung 22 B/D wurden zusätzlich die mittleren Unterschiede der MAP-Werte der einzelnen Nächte/ Tage normiert auf die jeweils ersten 48 h Basismessung aufgetragen. So konnte eine bessere Vergleichbarkeit des Blutdruckabfalls in der entsprechenden Gruppe erreicht werden.

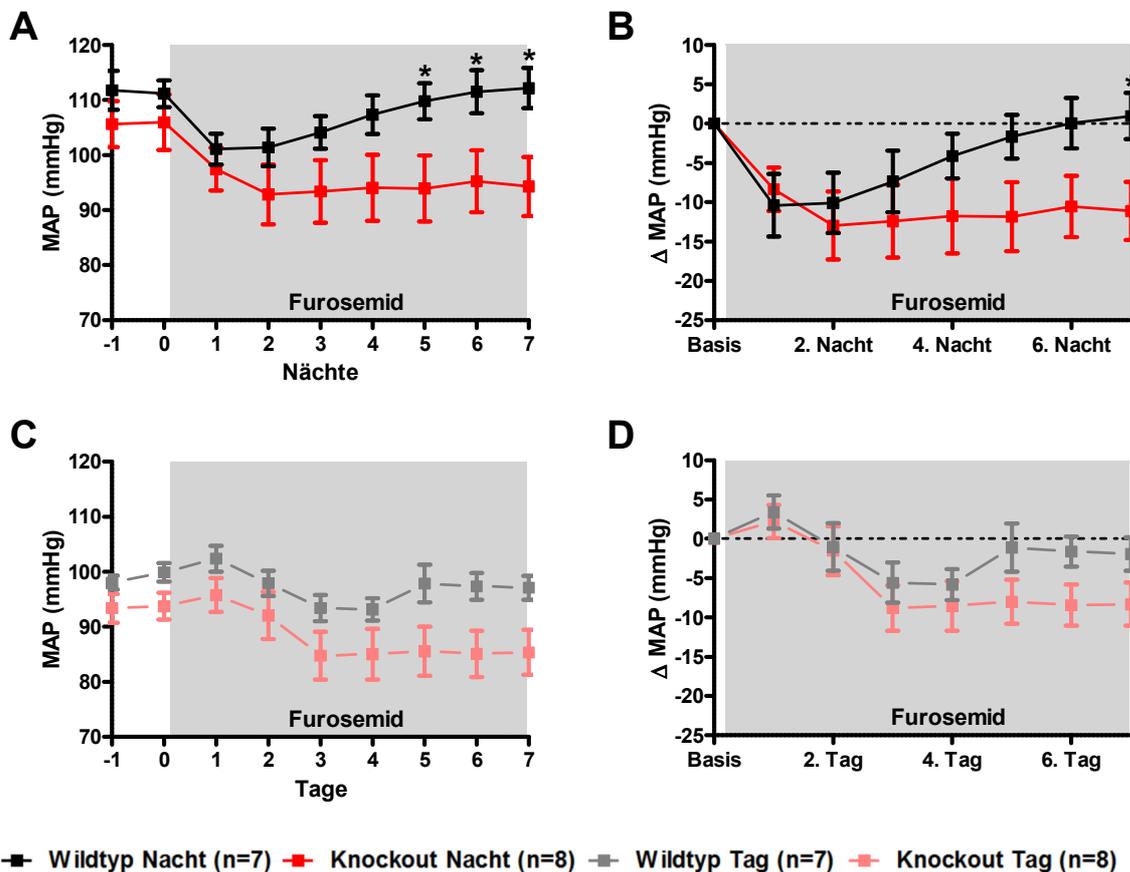


Abbildung 22: Entwicklung des mittleren Blutdrucks unter der Gabe von Furosemid

A/C Vergleich der MAP-Werte zwischen Wildtypen und Knockouts, von zwei Nächten/ Tagen vor bis zur siebten Nacht/ Tag nach Beginn der Gabe von Furosemid. *B/D* Darstellung der Blutdruckdifferenzen im Verlauf der Furosemidapplikation normalisiert auf die „Basis“ 24 h ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit des Blutdruckabfalls. Wildtyp: n=7 Knockout: n=8, die statistische Testung der einzelnen Zeitpunkte wurde mittels Student's t-Test durchgeführt.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

Wie in Abbildung 23 A-B zu sehen ist hatte das Versuchsprotokoll der Furosemidapplikation keine negativen Einflüsse auf den Tag-Nacht-Rhythmus der untersuchten Tiere. Bei Betrachtung der Mittelwerte der einzelnen Stunden für MAP und Aktivität zwei Tage vor Beginn der Furosemidapplikation und während der einwöchigen Phase unter dem Medikament wird klar, dass die Tiere physiologischerweise nachtaktiv waren und tagsüber ihre Ruhephase hatten. Weiterhin bestätigten diese Daten auch die Annahme, dass die Tiere

durch die anfängliche Implantation der Telemetrie-Sender äußerst wenig beeinträchtigt wurden und im Verlauf ein adäquates Verhalten zeigten.

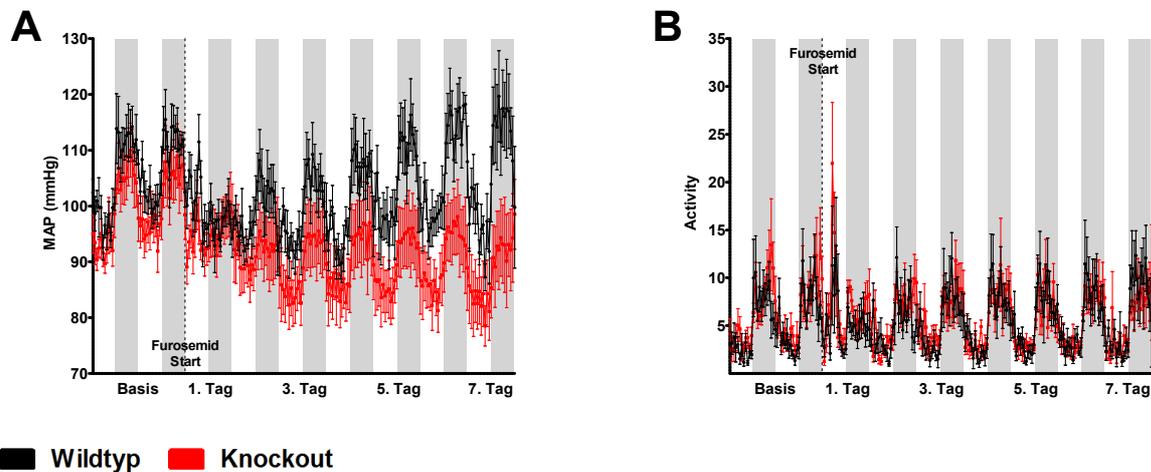


Abbildung 23: Blutdruck und Aktivität unter Furosemid im Wochenverlauf

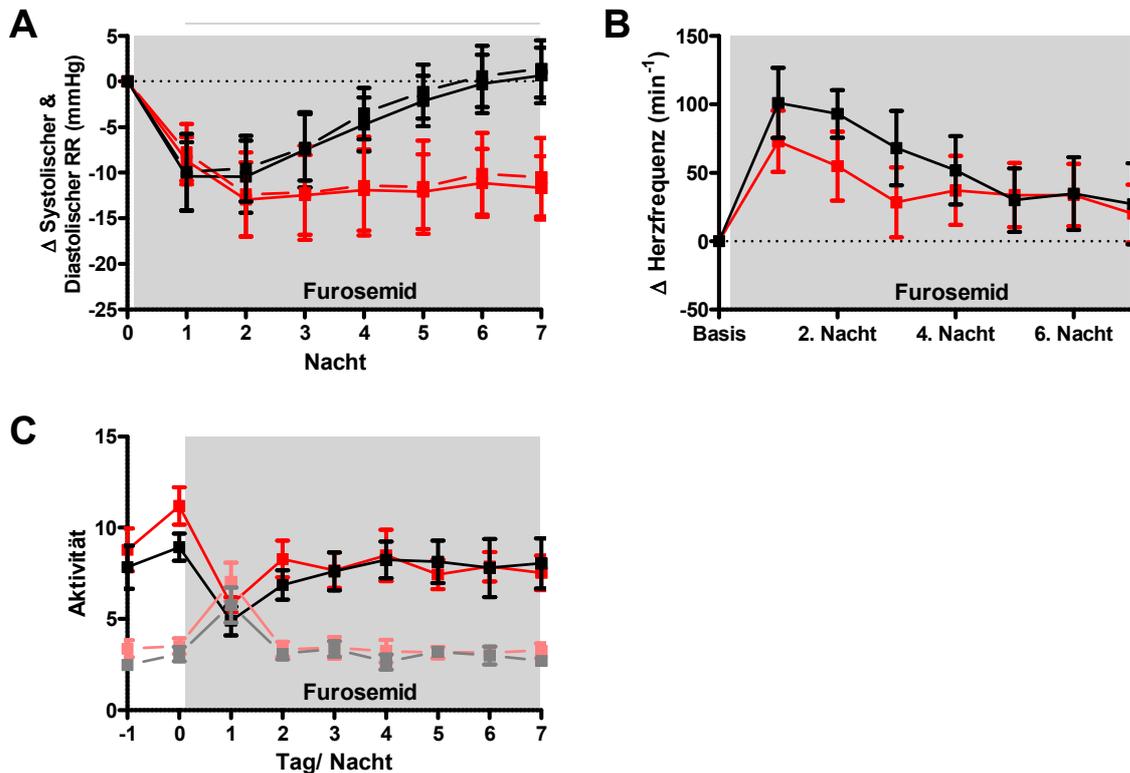
A/B Stündliche Mittelwerte von arteriellem Mitteldruck und Aktivität im Verlauf des Versuchs zur Darstellung des Tag-Nacht-Rhythmus. Wildtyp: n=7, Knockout: n=8.

Zu dem bereits gesehenen Abfall im MAP der Tiere wurden in der Abbildung 24 nochmal getrennt nächtliche systolische und diastolische Werte aufgetragen. Da die Tiere nachtaktiv sind wurde auf die Darstellung der Tageswerte verzichtet. Es zeigte sich, wie in Abbildung 24 A dargestellt, dass systolischer und diastolischer Druck in etwa gleich stark abfielen. Ähnlich wie bereits für die MAP-Werte gezeigt wurde, ist auch hier gut zu erkennen, dass die Wildtypiere zu ihren Ausgangswerten zurückkehrten, während die Knockoutmäuse auch gegen Ende des Versuchs noch deutlich reduzierte Blutdruckwerte aufwiesen.

Damit eine aktivitätsabhängige Verfälschung der ermittelten Blutdruckdaten ausgeschlossen werden konnte, wurden im Messzeitraum ebenfalls die Aktivitätsparameter der untersuchten Tiere im Tages- und Nachtverlauf ausgewertet. Wie in Abbildung 24 C aufgetragen, war die mittlere ermittelte Aktivität in beiden Gruppen, insbesondere nachts, vor Beginn der Furosemidgabe leicht erhöht, pendelte sich aber nach drei auf einen konstanten Wert für Knockout- wie auch für die Wildtypmäuse ein. Es war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Aktivitätsunterschied der Versuchsgruppen erkennbar.

Ein weiterer untersuchter Einflussparameter auf den Blutdruck war die mittlere Herzfrequenz der Tiere. Bei Betrachtung der Ergebnisse fiel in beiden Gruppen auf, dass die Herzfrequenzen im Vergleich zur Basismessung anfänglich deutlich anstiegen (Knockout: $+72,97 \pm 22,47$ mmHg, n=8, Wildtyp: $+101,00 \pm 25,77$ mmHg, n=7), wie es als Kompensation für den Blutdruckabfall als sog. Bedarfstachykardie zu erwarten war (Abb. 24

B). Im weiteren Verlauf nahmen die Herzfrequenzen bei Knockouts und Wildtypen jedoch wieder ab und stagnierten in den letzten drei Nächten etwa dreißig Schläge über dem Ausgangsniveau der jeweiligen Gruppe. Im gesamten betrachteten Zeitraum verhielten sich die Gruppen ähnlich und zeigten trotz der unterschiedlichen Blutdruckwerte keinen nennenswerten Herzfrequenzunterschied zueinander.



■ Wildtyp Nacht (n=7) ■ Knockout Nacht (n=8) ■ Wildtyp Tag (n=7) ■ Knockout Tag (n=8)

Abbildung 24: Entwicklung des mittleren Blutdrucks unter der Gabe von Furosemid

A Systolische und diastolische nächtliche Blutdruckunterschiede zur besseren Vergleichbarkeit normiert auf die 24 stündige Basismessung der beiden Gruppen. **B** Darstellung der Herzfrequenzunterschiede, zur Gegenüberstellung normalisiert auf die Frequenzen der 2x 12Std. Basismessung. **C** Absolute Werte der Aktivität von Wildtyp- und Knockouttieren während der Tag- und Nachtphasen im Verlauf des Versuchs. Wildtyp: n=7, Knockout: n=8, statistische Auswertung per two-way ANOVA.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.2.3 Organgewichte unter Furosemidgabe

Anhand der Bestimmung der Herzgewichte aller Tiere sollte eine mögliche kardiale Strukturänderung aufgrund der Furosemidwirkung im Vergleich zu Tieren unter Normaldiät untersucht bzw. ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 25 A zu sehen, zeigten sich identische Herzgewichte mit einer ähnlichen Streuung zwischen den Gruppen

(Knockout: $113 \pm 3,88$ mg, $n=27$, Wildtyp: $113 \pm 3,31$ mg, $n=22$), die nicht signifikant von den Vergleichstieren ohne Furosemid abweichen.

Die Nieren reagieren auf Funktionsanpassungen oftmals mit einer Veränderung des Nierengewichts, so tritt eine Erhöhung des Nierengewichts bei unilateraler Nephrektomie oder Nierenschädigung z.B. bei Diabetes oder arterieller Hypertonie ein (Seyer-Hansen, 1983; Raji *et al.*, 1989). Bei erhaltener GFR wäre ein niedriges Nierengewicht somit eher als protektiv einzustufen. Im vorliegenden Experiment wurden die Nieren nach 7 tägiger Furosemidapplikation im Rahmen der Organentnahme entfernt und nach Entkapselung als Paar gewogen. Die Auswertung zeigte ein durchschnittliches Nierengewicht von $365,90 \pm 11,55$ mg bei den Knockouts ($n=25$) sowie von $383,30 \pm 10,10$ mg in der Wildtypgruppe ($n=24$) und somit keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 25 B).

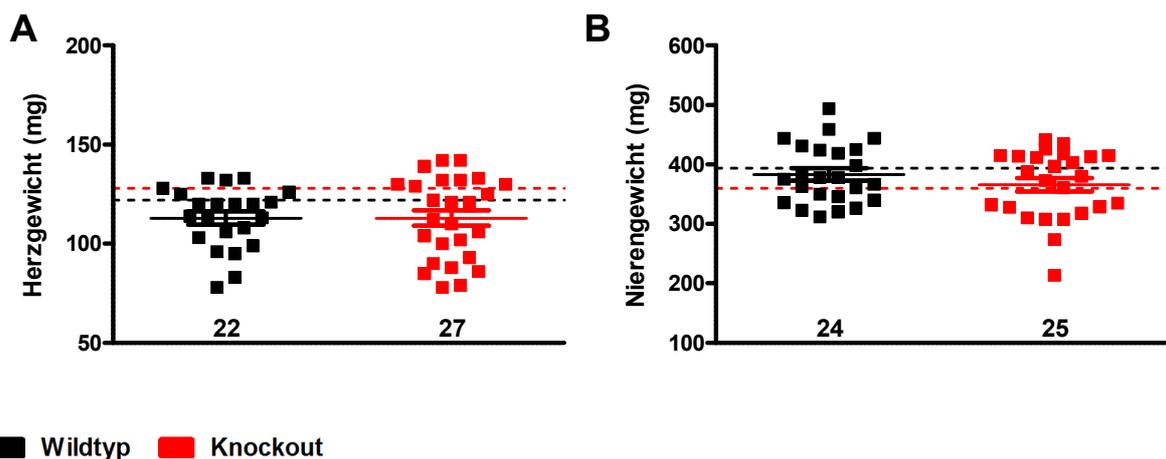


Abbildung 25: Herz- und Nierengewichte unter Furosemidgabe

A Aufgetragene Herzgewichte nach 7 Tagen Furosemidgabe. Wildtyp: $n=22$, Knockout: $n=27$. **B** Gewicht der Nierenpaare nach siebentägiger Furosemidgabe, Darstellung der absoluten Werte. Wildtyp: $n=24$, Knockout: $n=25$. Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's *t*-Test.

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$

4.2.4 Funktionelle Anpassungen des Herzens unter Furosemidgabe

Trotz des gezeigten Blutdruckunterschieds zwischen den Gruppen (Abb. 22 A/ B) war die Herzfrequenz im gesamten Zeitraum nicht signifikant unterschiedlich, dennoch fiel eine initiale Bedarfstachykardie bei Wildtypen und Knockouts unter Furosemidgabe auf (Abb. 24 B). Zusammen mit den ähnlichen Herzgewichten in der Organentnahme

(Abb. 25 A) waren dies erste Hinweise darauf, dass das Herz am ehesten durch funktionelle Veränderungen eine Rolle für die kurzfristige Blutdruckkompensation spielen könnte, aber wahrscheinlich nicht für die festgestellten Blutdruckunterschiede verantwortlich ist. Um dies zu bestätigen wurden diverse Parameter vor und während Furosemidgabe echokardiographisch bestimmt. Es wurde je ein Wert nach KO-Induktion („Basis“) und ein weiterer nach sieben Tagen Furosemidapplikation („Furosemid“) bei den Tieren ermittelt. Die in Abbildung 26 A dargestellte auf das Körpergewicht normierte Masse des linken Ventrikels zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Knockouts und bestätigte damit die Ergebnisse der Analyse des Herzgewichts nach Organentnahme (Abb. 25 A). Auch die funktionellen Parameter Auswurfraction, Herzzeitvolumen und Fractional shortening erbrachten zu keinem Messzeitpunkt signifikante Gruppenunterschiede. Zwischen der ersten und der zweiten Echokardiographie konnten in der jeweiligen Versuchsgruppe leichte Veränderungen festgestellt werden. Die Auswurfraction stieg bei beiden Gruppen leicht an (Wildtyp: $+5,3 \pm 4,8$ %, Knockout: $+3,7 \pm 4,2$ %), ähnlich verhielt sich auch das Herzzeitvolumen (Wildtyp: $+1,74 \pm 1,85$ ml/min, Knockout: $+0,37 \pm 1,26$ ml/min). Es ließ sich allerdings bereits an dem großen Standardfehler erkennen, dass diese Änderungen nicht signifikant waren. Dadurch wurde weiterhin die These unterstützt, dass das Herz allenfalls an der kurzfristigen Blutdruckregulation beteiligt war, aber im längerfristigen Verlauf keine entscheidende Rolle spielte.

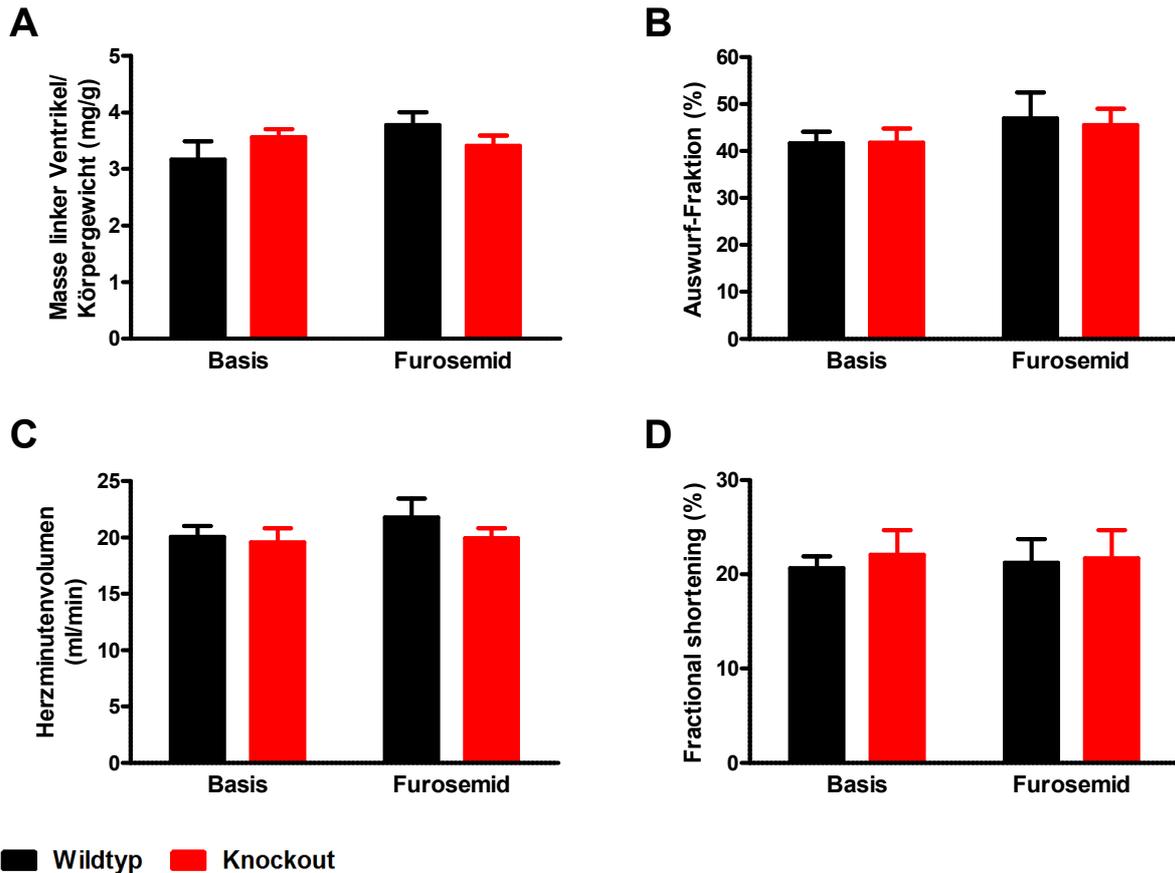


Abbildung 26: Echokardiographische Messungen bei Furosemidapplikation

A Gewicht des linken Ventrikels, **B** Auswurf-Fraktion **C** Herzfrequenz **D** Fractional shortening jeweils vor Beginn der Furosemidgabe und am 7. Tag unter Furosemid echokardiographisch gemessen. Wildtyp: n=9-10, Knockout: n=9, statistische Auswertung per two-way ANOVA.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.2.5 Reaktion der Hormone des RAAS auf die Furosemidgabe

Der durch die Wirkung von Furosemid verursachte Salz-/Wasserverlust ist ein starker Stimulus für die Aktivierung des RAAS. Im Rahmen des augenscheinlich nicht zu kompensierenden Blutdruckunterschieds bei zusätzlichem TMEM16A-KO im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Abb. 24) ergeben sich zwei mögliche Hypothesen. Es könnte einerseits sein, dass die Rückkehr der Wildtypen zu anfänglichen Blutdruckwerten einer massiven RAAS-Aktivierung geschuldet ist, welche durch den KO verhindert wird. Andererseits ist es wahrscheinlicher, dass direkte Effekte des fehlenden TMEM16A einen Blutdruckabfall verursachen der durch das RAAS nicht kompensiert werden kann. Um diese Thesen zu untersuchen wurden deshalb die zwei Hormone Renin und Aldosteron sowie das atriale natriuretische Peptid als zusätzlicher Indikator für den Flüssigkeitsstatus bestimmt. Die Messung erfolgte aus dem bei der Organentnahme gewonnenen Plasma der Tiere.

In Abbildung 27 A wurde die mit einem Radioimmunoassay gemessene Plasma-Renin-Aktivität pro Stunde aufgetragen. Die Knockouttiere (n=11) zeigten eine Reninaktivität von $120,20 \pm 48,31$ ng*ml/hr die beim Student's t-Test signifikant ($p < 0,05$) über dem Wert von $21,47 \pm 5,54$ ng*ml/hr der Wildtypgruppe (n=12) lag. Insbesondere beim Betrachten der absoluten Zahlen fiel auf, dass die Ergebnisse der Wildtypiere sich nahezu identisch mit den (im Hintergrund gezeigten) Werten unter Normaldiät präsentierten.

Die nachfolgend erhobenen Aldosterondaten unterstützten den bereits beschriebenen Effekt der Reninaktivität zwischen den Gruppen. Auch in diesem Fall lagen die Werte der Knockouts (n=11) mit $225,70 \pm 85,96$ pg/ml fast um das zwanzigfache höher als die der Wildtypen ($13,41 \pm 11,78$ pg/ml, n=12). Der Gruppenunterschied fiel im Student's t-Test mit $p < 0,001$ hochsignifikant aus (Abb. 27 B).

Das Ergebnis der ANP-Messung ergab durchschnittliche Werte zwischen 4-6 ng/ml für beide Gruppen. Die augenscheinlich leicht niedrigeren ANP-Spiegel auf Seiten der Knockoutgruppe ($4,55 \pm 0,86$ ng/ml, n=10) im Vergleich zu den Wildtypieren ($6,04 \pm 0,40$ ng/ml, n=9), erwiesen sich als nicht signifikant (Abb. 27 C).

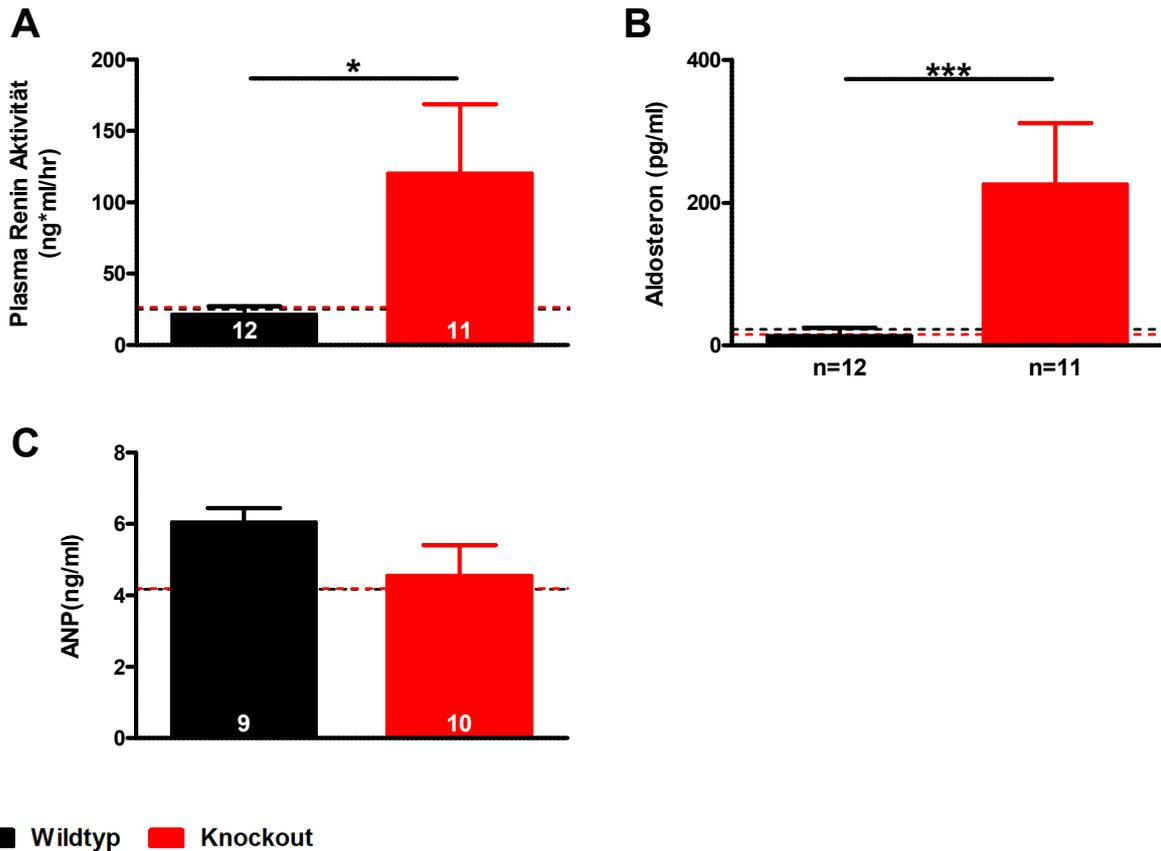


Abbildung 27: Renin, Aldosteron und ANP Messung unter Furosemidgabe

A Ergebnisse der Plasma-Renin-Aktivität nach siebentägiger Gabe von Furosemid. Wildtyp: n=12, Knockout: n=11. **B** Analyse der Aldosteronkonzentrationen im Plasma ein wöchiger Furosemidapplikation. Wildtyp: n= 12, Knockout: n=11. **C** Darstellung der gemessenen ANP Werte ebenfalls nach 7 Tagen Furosemidgabe. Wildtyp: n=9, Knockout: n=10. Die Linien im Hintergrund zeigen die Mittelwerte von Wildtyp- und KO-Mäusen unter Standarddiät. Die statistische Testung erfolgte mittels Student's t-Test.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

4.2.6 Elektrolytbestimmung in Plasma & Urin unter Furosemidgabe

Zur Bestimmung der Plasmaelektrolyte wurde bei zwei Versuchsgruppen unter Furosemid unmittelbar vor der Euthanasie retrobulbär Blut entnommen. Mit dem gewonnenen Material wurde sofort eine Blutgasanalyse durchgeführt. In Tabelle 4 sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Messung sowie die Werte der externen Kreatininmessung aufgetragen

Bei der Auswertung der BGA fielen die im Vergleich niedrigeren Hämoglobinkonzentration sowie der niedrigere Hämatokrit der Knockout-Mäuse auf, die sich signifikant (p<0,05) von denen der Wildtypiere unterschieden. Im Gegenzug dazu lag die Osmolarität der gemessenen Proben bei der Knockoutgruppe höher als in der Wildtypgruppe, diese Differenz

zeigte sich im Student's t-Test hoch signifikant. Bei den Ergebnissen der Elektrolyte zeigten sich im Vergleich sehr ähnliche Werte bei Chlorid und auch Kalium, wobei die Kaliumspiegel im Rahmen der Furosemidgabe überraschenderweise bei allen Tieren verhältnismäßig hoch waren, was am Ehesten durch die zusätzliche Elektrolytsubstitution zu erklären ist. Lediglich die Natrium-Plasmakonzentrationen lagen in der Knockoutgruppe wieder signifikant ($p < 0,01$) über denen der Wildtypgruppe. Auch die durchgeführte Bestimmung des Plasmakreatinins zeigte keine wesentlichen Gruppenunterschiede.

Tabelle 4: Ergebnisse der Blutgasanalyse nach siebentägiger Furosemidgabe

Parameter	Wildtyp (n=13)		Knockout (n=14)		p-Wert	
	Mittelwert	+/- SEM	Mittelwert	+/- SEM		
ctHb (g/dl)	16,462	0,295	15,443	0,146	0,0108	*
Hctc (%)	50,454	0,913	47,343	0,451	0,0116	*
mOsmc (mmol/kg)	306,338	0,736	310,771	0,633	0,0006	***
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	16,00	1,67	20,20	2,54	0,1841	ns
cK ⁺ (mmol/l)	4,723	0,167	4,450	0,107	0,2073	ns
cNa ⁺ (mmol/l)	146,692	0,444	149,429	0,513	0,0019	**
cCl ⁻ (mmol/l)	108,769	1,630	108,143	1,074	0,7618	ns

Die Urinsammlung im metabolischen Käfig fand am 4. und am 8. Tag der Furosemidgabe statt. Ziel war es, Werte zum einen aus der frühen Phase der Furosemidwirkung und zum anderen unter dem maximalen Einfluss des Diuretikums zu generieren. Im oberen Teil von Tabelle 5 wurden die Ergebnisse des 4. Tages aufgetragen. Zwar zeigte sich bei der Auswertung der Ergebnisse aus dem Urin wie zu erwarten eine deutlich größere Streubreite, dennoch lagen alle gemessenen Werte beim Vergleich zwischen Knockout und Wildtypen relativ eng bei einander. Weder die Kreatininbestimmung, noch eines der gemessenen Elektrolyte Kalium, Natrium oder Chlorid ergaben einen signifikanten Unterschied. Die Daten des 8. Tages präsentierten ein ähnliches Bild, wobei die Streuung der Parameter im Vergleich zur ersten Messung zunahm (Tabelle 5). Interessanterweise waren im Vergleich zu Tag 4 die Kreatininwerte der Knockoutgruppe leicht gesunken, während es bei der Wildtypgruppe zu einem deutlichen Anstieg kam. Miteinander verglichen unterschieden sich die Kreatininkonzentrationen an Tag 8 signifikant voneinander. Die Mittelwerte aller bestimmten Elektrolyte lagen wie z.B. beim Chlorid mit $197,90 \pm 20,97$ mmol/l bei den Knockoutmäusen und $282,20 \pm 54,53$ mmol/l bei den Wildtyptieren zwar deutlich auseinander, waren aber dennoch nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 5: Resultate der Kreatinin- und Elektrolytanalysen im Urin

	Wildtyp (n=12-13)		Knockout (n=14-15)		p-Wert	
4. Tag	Mittelwert	+/- SEM	Mittelwert	+/- SEM		
Kreatinin (mmol/l)	1,53	0,21	1,74	0,38	0,6578	ns
cK ⁺ (mmol/l)	49,07	6,18	41,57	5,05	0,3524	ns
cNa ⁺ (mmol/l)	122,90	24,80	122,00	14,42	0,9739	ns
cCl ⁻ (mmol/l)	171,20	29,47	137,6	9,79	0,2611	ns
8. Tag						
Kreatinin (mmol/l)	2,05	0,32	1,25	0,15	0,0274	*
cK ⁺ (mmol/l)	69,82	14,44	52,63	5,72	0,2543	ns
cNa ⁺ (mmol/l)	165,60	31,61	150,40	17,11	0,6641	ns
cCl ⁻ (mmol/l)	282,20	54,53	197,90	20,97	0,1400	ns

4.2.7 Plasmavolumen unter Furosemidgabe

Mit der Plasmavolumenbestimmung sollten bei den Mäusen unter Furosemideinfluss Flüssigkeitsverschiebungen bzw. Flüssigkeitsverluste detektiert werden. Die Messung fand nach achttägiger Furosemidgabe unmittelbar vor der Organentnahme statt. Das gemessene Plasmavolumen belief sich vor Furosemidgabe auf durchschnittlich $1,49 \pm 0,07$ ml (n=13) bei den Wildtyptieren und $1,55 \pm 0,04$ ml (n=14) bei den Knockouts. Es fanden sich weder bei den absoluten Werten, noch bei einer Normalisierung auf das Gewicht der Mäuse Unterschiede im Gruppenvergleich (Abb. 28 A & B).

Unter Furosemidgabe zeigten die absolut gemessenen Volumina der beiden Gruppen eine leichte Reduktion, wobei das Plasma der Knockout-Mäuse (n=18) durchschnittlich $1,42 \pm 0,05$ ml betrug, wohingegen bei den Wildtyp-Mäusen (n=19) $1,36 \pm 0,05$ ml gemessen wurden. Während die Unterschiede der Gruppen unter Furosemid nicht signifikant waren, ergab sich nach Standardisierung auf das jeweilige Körpergewicht bei den Wildtypmäusen ein im Vergleich zur Standarddiät reduziertes Plasmavolumen ($p < 0,01$). Bei den Knockouttieren deutete sich dieser Unterschied ebenfalls an, fiel aber nicht signifikant aus (Abb. 28 B).

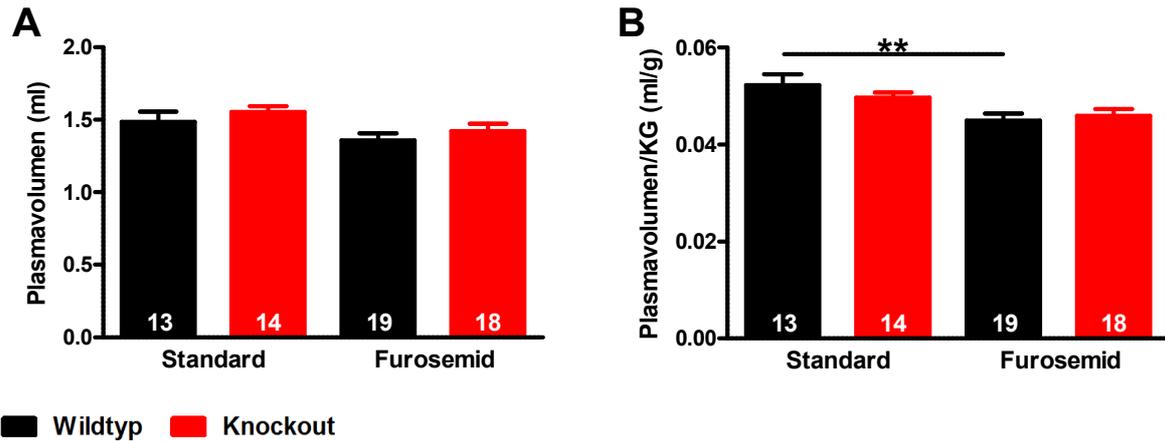


Abbildung 28: Plasmavolumenbestimmung unter Furosemidgabe

A Mit der Evans Blue Methode gemessene Plasmavolumina unter Standarddiät und nach 7 Tagen unter Furosemid. **B** Auf das Körpergewicht der Tiere normalisierte Werte der Plasmavolumina aus A. Wildtyp: $n=19$, Knockout: $n=18$, statistische Testung mit one-way ANOVA.

*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$

4.2.8 Renale Filtration unter Furosemidgabe

Die GFR wurde als Surrogatparameter für die Nierenfunktion vor Beginn („Basis“) und am Ende der Furosemidapplikation („Furosemid“) untersucht. Wie bereits in den anderen Versuchsprotokollen beschrieben, wurden auch in diesem Fall die Ergebnisse als Filtrationsmenge pro Tag aufgetragen und auf hundert Gramm Mausgewicht standardisiert. Wie die folgende Graphik (Abb. 29) illustriert, schienen die Filtrationsraten der Knockouttiere (Basis: $2352 \pm 182,2$ ml/24h/100gKG, Furosemid: $2212 \pm 290,7$ ml/24h/100gKG, $n=13$) zu beiden Messzeitpunkten im Durchschnitt etwas höher als die der Wildtypiere (Basis: $1867 \pm 148,8$ ml/24h/100gKG, Furosemid: $1894 \pm 198,4$ ml/24h/100gKG, $n=10$), dieser Unterschied stellte sich allerdings nicht signifikant dar. Insgesamt zeigte sich eine nahezu unveränderte GFR vor und nach einwöchiger Furosemidgabe in beiden Gruppen.

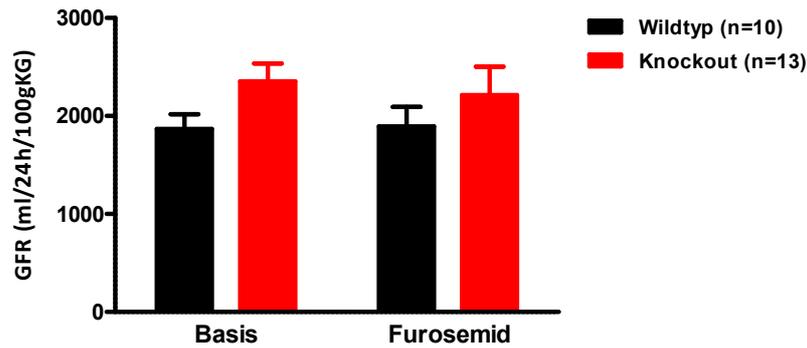


Abbildung 29: Bestimmung der GFR vor und während der Furosemidgabe

Darstellung der Ergebnisse von GFR-Messungen an zwei Zeitpunkten. Einmal vor Beginn der Furosemidapplikation („Basis“) und einmal nach ein wöchiger Furosemidgabe („Furosemid“). Wildtyp: n=10, Knockout: n=13. Die statistische Testung erfolgte mittels two-way ANOVA.

=p<0,05, **=p<0,01, *=p<0,001*

4.2.9 mRNA-Bestimmung in Aorten unter Furosemidgabe

Es sollte untersucht werden wie sich eine durch Furosemid über NKCC1 Blockade und Diurese induzierte Blutdrucksenkung auf die Aktivität des TMEM16A im Gefäß auswirkt. Hierfür wurden thorakale Aorten von Wildtypmäusen unter Standardbedingungen mit denen von Littermates nach siebentägiger Furosemidgabe verglichen. Mittels Real-Time PCR wurde die Menge von TMEM16A mRNA in den Aorten bestimmt. Außerdem wurde auch das Protein L32 als Produkt eines in den Zellen vorkommenden Haushaltsgens (RPL 32) gemessen, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht durch unterschiedliche Mengen an zellulärem Material verfälscht werden.

Die in Abbildung 30 dargestellten Resultate zeigen, dass bei den Tieren, die mit Furosemid behandelt wurden signifikant mehr TMEM16A mRNA in den Zellen der thorakalen Aorta vorhanden war (Kontrolle: $1,23 \pm 0,12$, n=11; Furosemid: $1,66 \pm 0,11$, n=12).

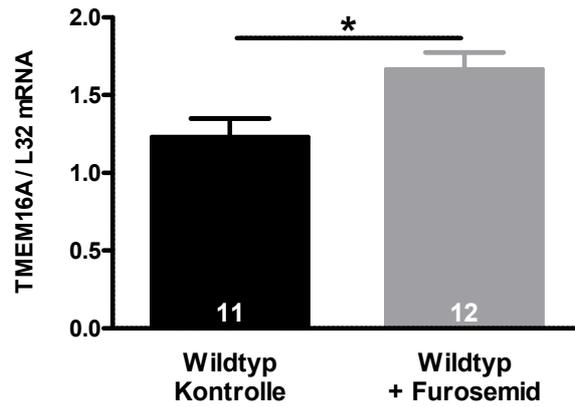


Abbildung 30: Quantifizierung von TMEM16A mRNA in der Aorta

Dargestellt ist die Bestimmung vom Verhältnis TMEM16A mRNA zu L32 mRNA in thorakalen Aorten von Wildtypmäusen ohne („Kontrolle“) und mit siebentägiger Furosemidgabe („Furosemid“), Kontrolle: n=11, Furosemid: n=12. Statistische Testung mittels Student's t-Test.

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

5 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden sämtliche Resultate im Zusammenhang erläutert, mit Bezug auf die aktuelle Literatur diskutiert und entsprechende Schlüsse gezogen. Am Ende folgen ein Fazit der gewonnenen Erkenntnisse sowie ein Ausblick. Außerdem sollen im Rahmen der Methodenkritik die Vorzüge und Grenzen der verwendeten Methoden aufgezeigt werden, um eine bessere Interpretation der erhobenen Daten zu ermöglichen.

5.1 Beteiligung renaler Effekte am Blutdruckabfall des TMEM16A-KO

Eine der maßgeblichen Fragestellungen im Rahmen des Projekts war, ob das Fehlen des Kanals TMEM16A in der Gefäßmuskulatur zu einer veränderten Nierenfunktion bzw. einer Beeinflussung renaler Regulationsmechanismen führt, welche Teile der zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen festgestellten Blutdruckunterschiede erklären würden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TMEM16A auch in der Niere vorkommt und dort wahrscheinlich entsprechenden Krankheitswert zum Beispiel bei der polyzystischen Nierenerkrankung hat (Buchholz *et al.*, 2013; Tanaka and Nangaku, 2014). Erst kürzlich wurde der Kanal an mehreren Orten des Nierenparenchyms wie dem Sammelrohr und dem proximalen Tubulus bei der Maus und beim Menschen in größerer Menge nachgewiesen (Faria *et al.*, 2014; Svenningsen *et al.*, 2014). Die Analyse von isolierten Glomeruli zeigte eine schwache Expression, sodass in erster Linie ein Einfluss auf Reabsorptionsmechanismen im Tubulussystem vermutet wird (Faria *et al.*, 2014). Es wurde außerdem explizit demonstriert, dass der Kanal mit dem glattmuskulären Marker Alpha-Actinin ko-exprimiert wird (Faria *et al.*, 2014). Dies macht deutlich, dass sich in letzter Zeit auch die Hinweise auf eine mögliche Rolle des in glatten Muskelzellen exprimierten TMEM16A in der Niere verdichten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Nierenfunktionsmessung unter Standarddiät konnten den vermuteten Einfluss von glattmuskulärem TMEM16A erstmals bestätigen. Es zeigte sich bei den Knockouttieren unter Normaldiät etwa sechs Wochen nach der Basismessung eine konstant gebliebene GFR, die signifikant höher ausfiel als bei den Wildtyptieren, welche einen GFR-Abfall, am wahrscheinlichsten im Rahmen eines alterstypischen Verlaufs, aufwiesen (Schock-Kusch *et al.*, 2013). Als denkbare Ursache für den fehlenden Abfall der GFR bei den Knockouts käme eine Vasodilatation des Vas afferens in Frage. Diese Annahme passt insbesondere zur festgestellten Kombination aus signifikant niedrigerem Blutdrucks der Tiere und der trotzdem fehlenden RAAS-Aktivierung (Heinze *et al.*, 2014). Letztere wäre in diesem Kontext durch einen fehlenden Stimulus zur

Reninausschüttung aufgrund der erhaltenen Nierenperfusion zu erklären. Beim rein tubulären TMEM16A-Knockout, der keine direkten Effekte auf das Gefäßsystem hat, wurde hingegen eine RAAS Aktivierung beschrieben (Faria *et al.*, 2014).

Des Weiteren wäre auch ein Einfluss des TMEM16A auf die Vasa recta bzw. in den Sammelrohren denkbar, insbesondere weil dort CaCC's bereits nachgewiesen wurden (Qu, Wei and Hartzell, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Svenningsen *et al.*, 2014). Ein vermehrter Blutfluss aufgrund einer Vasodilatation könnte über Auswaschen des Konzentrationsgradienten im Nierenmark zu einer gestörten Reabsorption, somit zu gesteigerter Flüssigkeitsausscheidung führen und darüber einen Teil des Blutdruckabfalls erklären. Eine unter Standarddiät nach Induktion des Knockouts signifikant höhere tägliche Trinkmenge stützt diese Hypothese. Die Tatsache, dass bei der Plasmavolumenbestimmung sowie der Osmolarität kein Gruppenunterschied festgestellt werden konnte stellt sie hingegen in Frage. Es ergab sich keine vermehrte Flüssigkeitsretention im intravasalen Kompartiment aufgrund des Knockouts und bei ähnlichen Körpergewichten zwischen den verglichenen Gruppen findet offensichtlich ebenso keine signifikante Einlagerung im Sinne von Ödemen statt. Auch die ähnlichen Werte für die fraktionelle Exkretion von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ unter Standardbedingungen bei Wildtyp- und Knockouttieren (Heinze *et al.*, 2014) passen zu den Ergebnissen und lassen direkte Auswirkungen des Knockouts auf die Nierenfunktion unwahrscheinlich erscheinen. Vielmehr zeigt sich bei den Knockout-Tieren eine Art „steady state“, wobei die Mehraufnahme an Flüssigkeit augenscheinlich wieder ausgeschieden wird.

Insgesamt ist zu diskutieren, ob der festgestellte Erhalt der GFR bei einem selektiv vaskulären TMEM16A-KO als nephroprotektiv zu werten ist, nachdem tubulärer bzw. glomerulärer TMEM16A Knockout mit einer milden Albuminurie, also Hinweisen auf eine Nierenschädigung assoziiert wurden (Faria *et al.*, 2014). In Bluthochdruckmodellen der Maus wurde eine Vasodilatation des Vas afferens mit einer glomerulären Hyperfiltration und ebenfalls mit Nierenschäden assoziiert (Campese, 1994; Dornas and Silva, 2011). Deshalb bedarf es weiterer Studien, um die Rolle von TMEM16A im Gefäßsystem der Niere genauer aufzuklären. Der vaskuläre TMEM16A Knockout scheint unter Normalbedingungen den altersbedingten Abfall der GFR, möglicherweise durch einen niedrigeren Blutdruck zu verhindern. Es gibt in diesem Mausmodell keinen Anhalt dafür, dass den gemessenen Blutdruckunterschieden renale Mechanismen, bedingt durch den vaskulären TMEM16A-Knockout, zugrunde liegen.

5.2 Abhängigkeit der Auswirkungen des TMEM16A-KO vom Salzkonsum

In der Einleitung wurde ausführlich die Relevanz von unterschiedlicher Kochsalzzufuhr auf den Blutdruck erläutert. Passend dazu demonstrierten Heinze et al. (2014), dass eine Hochsalzdiät in beiden Gruppen den Blutdruck ansteigen lässt, wobei dieser Effekt bei TMEM16A-KO Tieren stärker ausgeprägt war. Ein vermehrter Kochsalzkonsum ist damit augenscheinlich in der Lage, den vorher festgestellten Blutdruckabfall der Knockoutmäuse auszugleichen. Auch der Vergleich der Herzgewichte zeigt sowohl bei Wildtypen, als auch bei Knockouts unter Hochsalzdiät signifikant höhere Werte als unter Niedrigsalzdiät. Diese Hypertrophie gilt als Marker für Endorganschäden durch eine stärkere Herzbelastung im Rahmen des festgestellten höheren Blutdrucks und bestätigt die Wirksamkeit des Diätmodells.

Eine denkbare Erklärung für die genannten fehlenden Blutdruckunterschiede wäre, dass die Hochsalzdiät zu einer vermehrten Flüssigkeitsretention führt, welche von dem in dieser Situation supprimierten RAAS unabhängig stattfindet. Insbesondere unter Niedrigsalzdiät hingegen ist der Organismus auf das RAAS zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks angewiesen, so dass es z.B. bei einer Beeinträchtigung der RAAS-Aktivierung durch den Knockout zu einem Blutdruckabfall kommen könnte. Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis von CaCC's in den Renin produzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Diese sollen an der Regulation der Reninausschüttung beteiligt sein (Kurtz and Penner, 1989; Kurtz, 2011). Passend dazu konnte nicht nur unter Hochsalzgabe, sondern auch unter Standardbedingungen durch die Bestimmung der täglichen Wasseraufnahme der Tiere nachgewiesen werden, dass sich durch Induktion des vaskulären TMEM16A Knockouts eine signifikant höhere Trinkmenge einstellte, während dies unter Niedrigsalzdiät nicht der Fall war. Letzteres könnte ein erster Hinweis auf ein relativ verringertes Durstgefühl in der Niedrigsalzgruppe sein und damit die Vermutung stützen, dass die RAAS Aktivierung trotz Induktion durch Salzrestriktion bei TMEM16A-KO nicht adäquat ausfällt.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass es weder unter Salzangel, noch unter Salzüberschuss zu Unterschieden im intravasalen Volumenstatus zwischen Knockout- und Wildtypmäusen kommt. Interessanterweise wurden sowohl bei den Tieren der Hoch- als auch denen der Niedrigsalzdiäten gegenüber den Standardbedingungen signifikant reduzierte Plasmavolumina festgestellt. Bei Normalisierung auf das Gewicht der Tiere konnte dieser Effekt nur noch innerhalb der Wildtypgruppe beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede wäre, dass die Experimente in aufeinanderfolgenden

Kohorten durchgeführt wurden und die Tiere unter Standarddiät dadurch bereits ein höheres Alter erreicht hatten.

Im Rahmen der Hormonanalysen wurde unter Hochsalzdiät in beiden Gruppen die zu erwartende RAAS-Suppression sichtbar, während bei Renin und Aldosteron unter Niedrigsalzdiät die zu erwartende Hochregulation stattfand. Trotz der absolut signifikant höheren Hormonwerte der Knockouttiere unter Niedrigsalzdiät, wäre allerdings in Anbetracht der Blutdruckunterschiede denkbar, dass es relativ gesehen zu einer inadäquat niedrigen Aktivierung des RAAS kommt.

Eine weitere Hypothese ist, dass das Zusammenkommen von zwei kreislaurelevanten Faktoren, in diesem Fall der Knockout und die Niedrigsalzdiät, durch den Organismus schlechter kompensiert werden kann, während die durch die Hochsalzdiät erzeugte Blutdrucksteigerung die TMEM16A-KO Effekte ausgleicht und maskiert. Tatsächlich ergab die Aldosteron Messung unter Hochsalzdiät keine signifikanten Gruppenunterschiede, im Rahmen der Niedrigsalzdiät dagegen war der Aldosteronwert bei den Knockouttieren signifikant höher als in der Wildtypgruppe. Letzteres stützt oben getroffene These, dass die TMEM16A-KO Wirkung vor allem in Situationen zum Tragen kommt in denen die körpereigenen Mechanismen der Blutdruckregulation wie z.B. das RAAS bereits stark beansprucht werden.

Ein Blick auf die Nierenfunktion der Tiere unter einer erniedrigten Salzzufuhr zeigt, dass die unter Standarddiät signifikant höhere GFR bei den Knockouttieren sich an die der Wildtypen angleicht. Die nicht signifikanten GFR Unterschiede unter Niedrigsalzdiät deuten an, dass die Effekte des TMEM16A-KO wie z.B. ein niedrigerer Blutdruck sowie ein höherer Aldosteronspiegel sich bei Salzrestriktion im Vergleich zu Standardbedingungen stärker manifestieren. Unter Hochsalzdiät besteht zwar auch kein signifikanter GFR-Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp, hier ist jedoch augenscheinlich die (vermutlich durch den höheren Blutdruck) gesteigerte GFR der Wildtypmäuse ursächlich für den fehlenden Unterschied in der Nierenfunktion.

Letztendlich ist die aufgehobene Blutdruckdifferenz unter Hochsalzdiät weder durch Veränderung im intravasalen Volumen, noch durch eine Beeinträchtigung der RAAS-Regulation zu erklären und auch die Messungen der Nierenfunktion lassen diesbezüglich keine endgültigen Schlüsse zu. Es lässt sich aber spekulieren, dass in diesem Kontext der Gefäßtonus die entscheidende Rolle spielt, da dieser auf der einen Seite durch den TMEM16A-KO verringert wird, aber auf der anderen Seite die Salzwirkung über

verschiedene Mechanismen z.B. Vasokonstriktion zu einer Steigerung des Blutdrucks führt. Diesbezüglich sind mittlerweile insbesondere durch Kochsalz direkt ausgelöste Signalkaskaden bekannt, welche einen maßgeblichen Einfluss haben könnten (Wirth et al. 2008).

5.3 Additive NKCC-Blockade bei TMEM16A-KO: Wie wird das kompensiert?

Unter den verschiedenen Salzdiäten deutete sich bereits an, dass eine Entlastung der kreislaufregulierenden Systeme z.B. durch Hochsalzdiät die Auswirkungen des Fehlens von TMEM16A deutlich abmildert. Aber schon die leichte Belastung durch eine erniedrigte Salzzufuhr verstärkt den unter Standardbedingungen festgestellten Blutdruckunterschied und das obwohl z.B. das RAAS bei den Knockouttieren signifikant stärker aktiviert wird (Heinze *et al.*, 2014). Es sollte im Zuge dieser Annahmen die These verifiziert werden, dass TMEM16A insbesondere unter Kreislaufbelastung wie z.B. Volumenmangel oder Salzrestriktion bzw. Salzverlust eine wichtige Rolle spielt. Dafür wurden die NKCC Transporter mittels Furosemid blockiert, um einen Salz- bzw. Volumenverlust sowie eine Vasodilatation und damit eine Art doppelten „Kreislaufstress“ auszulösen (Hutcheon and Leonard, 1967). Die genannten Transporter wurden ganz bewusst als „Target“ ausgewählt, da sie wie in der Einleitung erwähnt einige zu TMEM16A sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen. Letztere betreffen vor allem die Rolle für den Chloridhaushalt der glatten Muskelzellen und die Aufrechterhaltung des Vasotonus (Davis, Chipperfield and Harper, 1993; Meyer *et al.*, 2002; Orlov *et al.*, 2012). Es sollte untersucht werden, inwiefern der Organismus in der Lage ist, die Doppelblockade dieser synergistisch wirkenden Effektoren TMEM16A und NKCC zu kompensieren (Hübner, Schroeder and Ehmke, 2015).

Es wurden deshalb Blutdruckmessungen unter einwöchiger Furosemidgabe in TMEM16A Knockout- und Wildtypmäusen wie beschrieben durchgeführt. Anhand der Trinkmengen und der Körpergewichte wurde insbesondere dokumentiert, dass die aufgenommene Furosemiddosis in beiden Gruppen gleich war. Die Ergebnisse der Blutdruckmessung zeigten, dass die Wildtypen nach einem anfänglich starken Blutdruckabfall, während der ersten zwei Tage, diesen innerhalb einer Woche kompensieren konnten und wieder ihre Ausgangsblutdruckwerte erreicht hatten. Die Knockouttiere demonstrierten anfänglich einen noch stärkeren Abfall des Blutdrucks, der dauerhaft mit einer Differenz von bis zu -13 mmHg gegenüber der Basismessung bestehen blieb. Der Blick auf die simultan zur Blutdruckmessung erhobenen Aktivitätslevel der einzelnen Tiere kann diese Blutdruckunterschiede nicht erklären, da ein ähnliches Verhaltensmuster zwischen den

beiden untersuchten Gruppen bestand. Ferner lässt sich hinzufügen, dass über den Versuchszeitraum ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus in den Messungen zu sehen war. Auch eine zu erwartende Kompensation über kardiale Mechanismen ließ sich durch Messung der Herzfrequenz nur in der Akutphase der ersten 48 Stunden zeigen. Es kam zu einem adäquaten Herzfrequenzanstieg bei beiden Gruppen im Sinne einer „Bedarfstachykardie“ bei akutem Blutdruckabfall. Letztere reichte aber zumindest bei den TMEM16A-KO Tieren für eine vollständige Kompensation des Blutdrucks nicht aus. In den Nächten zwei bis sieben sank die Herzfrequenz in beiden Gruppen wieder und pendelte sich leicht über dem Ausgangsniveau ein. Die zusätzlich durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der kardialen Funktion zwischen Wildtyp und Knockout. Weder Kontraktilität, noch Pumpleistung zeigten sich signifikant verändert. Auch die ebenfalls erhobenen Gesamtgewichte und die makroskopische Begutachtung der Herzen lieferten keinen Anhalt für trophische Veränderungen. Während bei der Wildtypgruppe anscheinend im Verlauf andere als kardiale Mechanismen eine Blutdruckkompensation bewirkten, konnten die Knockouttiere diese Mechanismen nicht aktivieren und der Blutdruck blieb erniedrigt.

Die Nierenfunktion war nach der sieben tägigen Furosemidgabe gegenüber der Basismessung in keiner der beiden Gruppen verändert, wobei eine in der Literatur beschriebene und vermutlich prognostisch ungünstige Hyperfiltration durch Vasodilatation des Vas afferens aufgrund der Furosemidwirkung augenscheinlich nicht eintrat (Orlov *et al.*, 2015). Beim Blick auf das RAAS konnten unter Furosemidapplikation sowohl signifikant erhöhte Reninaktivitäten wie auch Aldosteronspiegel bei den Knockouttieren gegenüber der Wildtypgruppe gemessen werden. Die deutlich stärkere Aktivierung des RAAS in der Knockoutgruppe sowie der trotzdem weiterhin beobachtete Blutdruckunterschied stützten zudem weiter die verfolgte Hypothese der gesteigerten Relevanz von TMEM16A unter besonders kreislaufbeanspruchenden Bedingungen.

In Übereinstimmung mit den beobachteten Hormonspiegeln wäre eine Flüssigkeitsretention zu erwarten und tatsächlich ergab die Blutgasanalyse signifikant niedrigere Hämoglobin (Hb)- sowie Hämatokritwerte (Hkt) in der Knockoutgruppe unter Furosemid, was zusammen mit der signifikant höheren Trinkmenge eine Volumenretention andeutete.

Diese Vermutung konnte allerdings im Rahmen der im Folgenden durchgeführten Plasmavolumenbestimmung nicht objektiviert werden. Zwar zeigte die Wildtypgruppe unter Furosemid im Vergleich zu den Tieren unter Standardbedingungen eine signifikante Plasmavolumenreduktion, welche die Wirksamkeit von Furosemid unterstreicht, allerdings gab es keine relevanten Unterschiede zu den TMEM16A-KO Mäusen. Es wäre möglich,

dass es sich bei den Knockouts um sehr geringe Veränderungen im Volumenstatus handelte die in der Plasmavolumenbestimmung nicht erfasst wurden. Entscheidend ist aber, dass die Kombination aus massiver RAAS Aktivierung und deutlicher Mehraufnahme an Flüssigkeit in der Knockoutgruppe lediglich ausreichte um den Volumenstatus unter Furosemidgabe aufrechtzuerhalten, aber der Blutdruckabfall trotzdem über eine vermehrte Salz- und Flüssigkeitsretention nicht kompensiert werden konnte.

Die Konstellation aus TMEM16A-KO und NKCC Blockade scheint zu einem großen Flüssigkeitsverlust zu führen, was auch empirische Beobachtungen der Urinmenge der Tiere im metabolischen Käfig bestätigten. Zur weiteren Evaluation des Wasser-Elektrolythaushalts wurden deshalb die Elektrolytspiegel und die Osmolarität im Plasma bestimmt. Hier konnten passend zur vorherigen Beobachtung signifikante Unterschiede festgestellt werden und zwar waren sowohl das Plasma-Natrium, als auch die Osmolarität bei den Knockouts erhöht. Dies scheint in erster Linie den Daten bezüglich des Flüssigkeitsstatus und den Hb und Hkt Werten zu widersprechen, wäre aber als Effekt der massiv unterschiedlichen RAAS Aktivierung und dem trotzdem annähernd gleichen Plasmavolumen beim Vergleich der Gruppen durchaus plausibel. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Tiere eine Elektrolytlösung (0,8% NaCl, 0,1% KCl) ad libitum erhielten, wobei die signifikant höhere Trinkmenge der Knockouttiere auch eine höhere Salzaufnahme bedingte. Neben der beobachteten RAAS Aktivierung wäre auch diese gesteigerte Elektrolytzufuhr eine Möglichkeit, die unterschiedlichen Werte zu erklären. Es lässt sich somit nicht abschließend klären, ob die Werte den gesteigerten „Salzappetit“ der Tiere widerspiegeln bzw. ob es sich zusätzlich auch um einen Effekt im Rahmen des Protokolls handelt.

Der Verlust der beiden für den glattmuskulären Chloridhaushalt wichtigen Akteure TMEM16A und NKCC1 führt offensichtlich zu einem trotz RAAS Aktivierung und leichter Herzfrequenzsteigerung nicht kompensierbaren Blutdruckabfall. Letzterer kann allerdings weder einer verminderten Herzfunktion, noch einem reduzierten Plasmavolumen oder einer veränderten GFR zugesprochen werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass eine starke Verringerung des peripheren Gefäßwiderstands ursächlich für die gemessene Blutdruckdifferenz ist. Es wäre möglich, dass die Wildtypiere im Gegensatz zu den Knockouts den Blutdruck über eine gesteigerte Vasokonstriktion ausgleichen können.

5.4 Blutdruckabhängigkeit der Aktivität von TMEM16A

Ergänzt man die bereits veröffentlichten Telemetriedaten der Hoch- und Nidrigsalzdiäten mit den neu gewonnenen Messungen unter Furosemid zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen bedeutender werden, je größer die Beanspruchung der Blutdruckregulationsmechanismen ist. Dargestellt ist dies in Abb. 31, welche die Differenz der Blutdruckmittelwerte zeigt. Die gleiche Konstellation findet sich auch im RAAS wieder, mit steigender Beanspruchung der Regulationsmechanismen des Wasser- und Elektrolythaushalts (Hochsalz < Normal < Nidrigsalz < Furosemid) werden die Unterschiede in den Plasmahormonen zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen deutlicher. Sämtliche Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion des TMEM16A unter diesem sog. „Kreislaufstress“ für den Organismus an Relevanz gewinnt. Bei Fehlen des Kanals scheint ein wichtiger Kompensationsmechanismus das RAAS zu sein, welches negative Veränderungen von intravasalem Volumenstatus und Plasmaelektrolyten in der Knockoutgruppe weitestgehend zu kompensieren versucht. Es wird dabei allerdings signifikant stärker beansprucht als bei den Wildtypen und schafft es trotzdem nicht den Blutdruck auf dem Niveau der Kontrollgruppe zu halten.

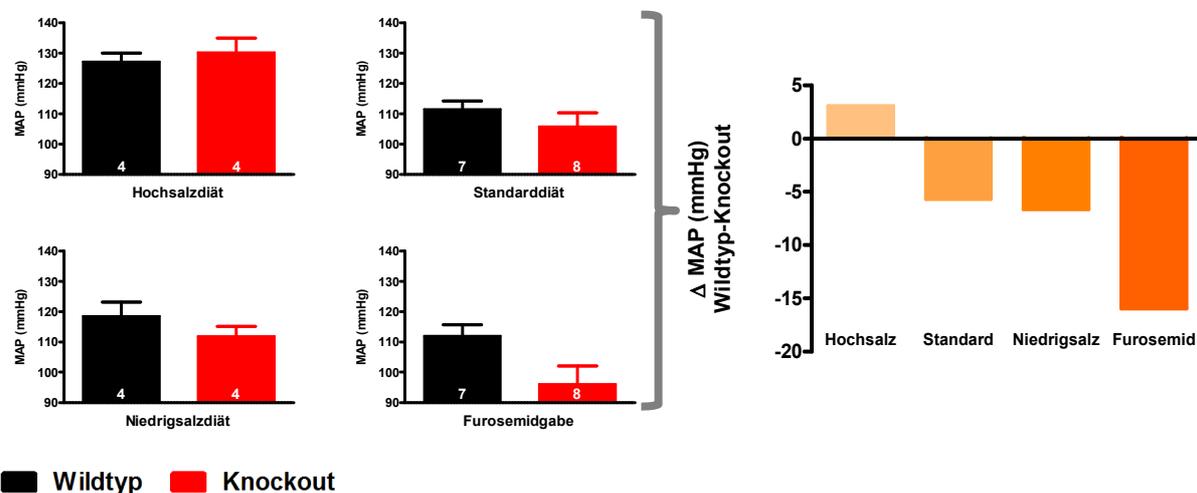


Abbildung 31: Vergleich von Telemetriedaten verschiedener Versuchsprotokolle

Die Telemetriedaten von Hoch- und Nidrigsalzdiät (je $n=4$ pro Gruppe), Standarddiät ($n=7-8$) sowie Furosemidgabe ($n=7-8$) zeigen im Vergleich, dass der Blutdruckunterschied zwischen Wildtyp- und Knockouttieren von Hochsalzdiät < Standarddiät < Nidrigsalzdiät < Furosemid zunimmt (mod. Heinze et al. 2014). Die Daten entsprechen Mittelwerten von nächtlichen Messungen über 48 h unter Standarddiät, nach 10 Tagen Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät oder nach 7 Tagen Furosemidgabe.

Die vorliegende Arbeit liefert zudem Anhaltspunkte dafür, dass die Funktion von TMEM16A von der Höhe des Blutdrucks abhängig sein könnte. Die Kombination der Blockade des NKCC1 durch Furosemid sowie des vaskulären Knockouts von TMEM16A zielt auf zwei synergistisch wirkende Regulationsmechanismen des Chloridhaushalts in der glatten Gefäßmuskulatur ab (Hübner, Schroeder and Ehmke, 2015). Die Inaktivierung von jeweils einem der beiden Targets zeigt ähnliche Effekte, so konnte für die Gabe von Furosemid eine Hyperpolarisation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Ratte gezeigt werden, ähnlich wie dies bei Chloridkanalblockern der Fall war (Davis, Chipperfield and Harper, 1993; Davis *et al.*, 2013). Diese Übereinstimmungen werden bekräftigt durch aktuelle Resultate einer Studie, in der die verstärkte Wirkung von Beta-Sympatomimetika auf die Relaxation der Atemwegsmuskulatur durch die zusätzliche Behandlung mit einer Kombination von Bumetanid und einem Chloridkanalblocker demonstriert werden konnte (Danielsson *et al.*, 2014).

Ein ähnliches Ergebnis liefern die erhobenen Telemetriedaten aus der Furosemidgruppe, welche zeigen, dass die gleichzeitige Inaktivierung von NKCC und TMEM16A einen stärkeren und nachhaltigeren Blutdruckabfall erzeugt, als die Blockade eines der beiden Targets wie beim alleinigen TMEM16A-Knockout unter Standarddiät oder der Furosemidgabe in der Wildtypgruppe. Hierbei scheinen unterschiedliche Grade der Aktivität jeweils eines der beiden Ziele eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde z.B. unabhängig voneinander eine direkte Korrelation der NKCC-Aktivität mit der Höhe der Blutdruckwerte sowie eine Überexpression von TMEM16A bei hypertensiven Ratten nachgewiesen (Wang *et al.* 2015; Kotelevtsev *et al.* 1987; Jiang *et al.* 2004).

Beide Effektoren tragen physiologischerweise zu einer Depolarisation der glatten Muskelzelle bei. Während der NKCC entscheidend an der Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles beteiligt ist, bewirkt die Öffnung des TMEM16A durch Chloridausstrom eine Depolarisation (Kunzelmann *et al.*, 2011; Hübner, Schroeder and Ehmke, 2015). Dies führt zur Kontraktion der glatten Muskelzelle und unterstützt damit die Aufrechterhaltung des Gefäßmuskeltonus. Im Zusammenhang mit den vorliegenden Daten lässt sich die Hypothese aufstellen, dass diese positive Korrelation zwischen Blutdruck und Kanal-Aktivität, wie bereits für NKCC gezeigt, auch für TMEM16A bestehen könnte und somit dessen vermehrte Aktivität die Grundlage für die erfolgreiche Rückkehr zu den Ausgangsblutdruckwerten in der Wildtypgruppe darstellt, die den Knockouttieren logischerweise verwehrt bleibt (Abb. 32).

Als erster Anhalt um diese Annahme zu untermauern dienen die gefäßspezifischen mRNA Daten von TMEM16A in Aorten (Abb. 30). Es zeigte sich, dass beim Vergleich von Wildtyptieren gegenüber Wildtyptieren mit Furosemidgabe die Menge an TMEM16A-mRNA in der Furosemidgruppe signifikant höher ist. Dieses Ergebnis legt nahe, dass TMEM16A und NKCC sich ergänzen und ggf. die fehlenden Effekte des jeweils anderen zu kompensieren versuchen. Dies impliziert eine mögliche blutdruckabhängige Expression des TMEM16A.

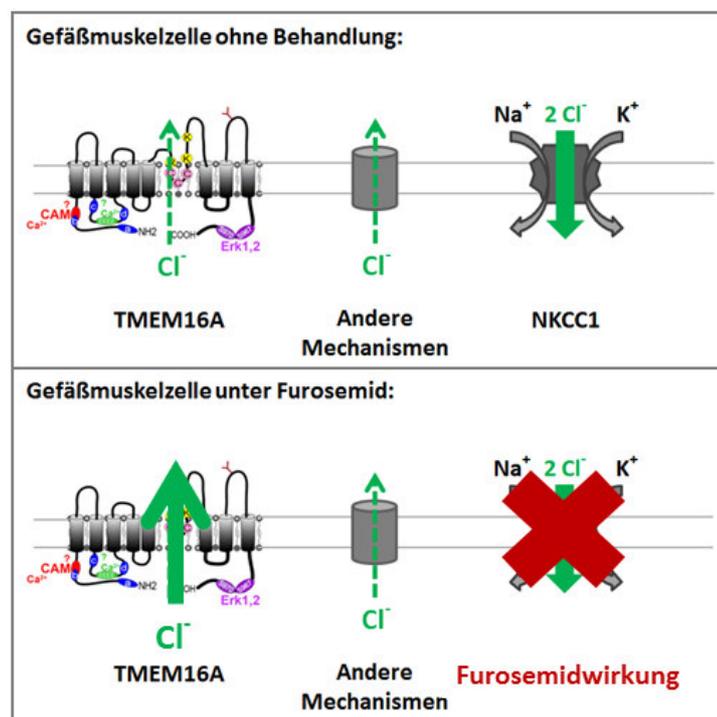


Abbildung 32: Hypothese: Blutdruckkompensation durch Überexpression von TMEM16A

5.5 Fazit der Studien

Bereits 1996 vermuteten Large und Wang, ohne die genauen Mechanismen zu kennen, dass CaCC's durch ihren Einfluss auf das Chlorid Gleichgewicht Einfluss auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen haben. Weitere Arbeiten untermauern die Annahme, dass Chlorid einen entscheidenden Anteil an der Kontraktilität der Gefäße hat und in diesem Rahmen einen wichtigen Effektor der Wirkung des Sympathikus z.B. über α_1 -Rezeptoren und darauffolgende CaCC Aktivierung darstellt (Remillard *et al.*, 2000; Boedtkjer *et al.*, 2008).

Heute wissen wir, dass TMEM16A ubiquitär in der glatten Gefäßmuskulatur vorhanden ist. In großen Gefäßen wie der A. carotis, der Aorta sowie der Pfortader, aber ebenso in zerebralen Arteriolen und kleinen Gefäßen der Retina konnte der Kanal bereits nachgewiesen werden (Davis *et al.*, 2010; Thomas-Gatewood *et al.*, 2011; Heinze *et al.*, 2014). Unklar ist jedoch weiterhin welche Gefäße entscheidend für die blutdruckmodulierende Wirkung von TMEM16A sind. Zwar konnte im Gehirn eine Beteiligung von TMEM16A an der myogenen Antwort in besonders pericytenreichen Abschnitten von Arteriolen nachgewiesen werden, allerdings handelt es sich hier lediglich um einen lokalen Mechanismus zur Durchblutungssteuerung (Bandopadhyay, 2001; Bulley *et al.*, 2012).

Unter Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit wird weiterhin die These unterstützt, dass ein Großteil der TMEM16A Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem durch dessen Wirkung auf den peripheren Gefäßwiderstand vermittelt werden. Über einen vasodilatativen Mechanismus im Vas afferens könnte ähnlich wie bei Furosemid auch die festgestellte höhere GFR bei TMEM16A-KO Tieren unter Standarddiät zustande kommen (Orlov *et al.*, 2015). Zudem scheint ein funktionierender glattmuskulärer TMEM16A, wie durch die verschiedenen eingesetzten Protokolle gezeigt wurde, vor allem bei Ausreizung anderer blutdruckregulierender Mechanismen eine essentielle Rolle für die Blutdruckregulation zu spielen. Weiterhin besteht augenscheinlich ein sensibles Gleichgewicht im Chloridhaushalt der glatten Gefäßmuskulatur, welches entscheidend von funktionierendem TMEM16A und NKCC1 abhängt und den Ausfall beider Komponenten nur unzureichend ausgleichen kann. Womöglich weil eine Blockade einer der beiden Komponenten unter anderen Bedingungen durch Aktivitätssteigerung der jeweils anderen kompensiert werden würde.

Die konstante Blutdrucksenkung durch eine kombinierte Blockade von TMEM16A und NKCC1 könnte auch ein interessantes neues Ziel für die Behandlung der arteriellen Hypertonie sein. Möglicherweise wäre man durch eine Kombination der beiden Wirkmechanismen in der Lage die Dosierungen der einzelnen Medikamente senken und so die Nebenwirkungen wie Ototoxizität und Elektrolytverlust durch Furosemid zu reduzieren.

5.6 Methodenkritik

Bei der Auswahl der Methoden und der Konzeption der Versuchsprotokolle wurden etablierte Techniken und neue Verfahren eingesetzt, um valide und aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Trotz der sorgfältigen Auswahl und Durchführung der einzelnen Techniken hat

jedes Verfahren seine Grenzen, welche eine entscheidende Rolle bei der Interpretation der einzelnen Ergebnisse spielen und deshalb im Folgenden erläutert werden sollen.

Der selektiv glattemuskuläre und induzierbare TMEM16A Knockout

Bei den eingesetzten Mäusen vom Genotyp TMEM16A SMMHC-CreER^{T2} handelte es sich um „Littermates“ bereits in vorhergehenden Experimenten verwendeter Tiere. Es gab somit bereits aussagekräftige Daten zur Effektivität und Ausprägung des Knockouts, welche in einer Publikation (Heinze *et al.*, 2014) ausführlich beschrieben wurden.

Der Vorteil dieses induzierbaren Knockouts war die direkte Vergleichbarkeit mit nicht induzierten Geschwistermäusen, die genetisch identisch waren. Dadurch konnte eine höhere Validität der gewonnenen Ergebnisse erzeugt werden. Demgegenüber steht letztlich vor allem der Nachteil, dass durch die längere Gesamtdauer eines Versuchs im Rahmen der vierwöchigen Induktion mit darauffolgenden zwei Wochen Pause zum „auswaschen“ des Tamoxifens, die Experimente kosten- und ressourcenintensiver waren.

Diäten und Protokolle

Die Rahmenbedingungen für die Versuche wie z.B. Dauer der Tamoxifengabe zur Induktion des Knockouts, sowie auch Menge und Dauer der Salzdiäten leiteten sich aus aussagekräftigen Vorversuchen ab. Aus der Übernahme dieser Vorgehensweisen ergaben sich mehrere Vorteile. Auf der einen Seite handelte es sich dabei um bestehende Protokolle, die sich als zielführend erwiesen haben, zum anderen lag ein Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Ergänzung bereits bestehender Erkenntnisse. Eine Verwendung desselben Mausmodells und etablierter Versuchsprotokolle gewährleistete somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse und erleichterte die Interpretation der Daten in ihrer Gesamtheit.

Ein Vorgehen, das vorher in dieser Form noch nicht durchgeführt worden war, ist die siebentägige Gabe von Furosemid, welche in den Experimenten eine zentrale Rolle spielt. Dieses Protokoll wurde auf der Basis einer ausführlichen Literaturrecherche und Vorversuchen entwickelt, wobei der Fokus auf einer optimalen Dosierung und Dauer der Applikation lag. Dadurch sollten aussagekräftige Ergebnisse entstehen, ohne die Tiere einer zu großen Belastung auszusetzen. Veröffentlichungen, die als Referenzen bezüglich einer adäquaten Dosierung und einer Methode zum Ausgleich des Salzverlusts unter chronischer Furosemidgabe dienten, waren u.a. Nüsing *et al.* 2005; Castrop *et al.* 2004. Die zusätzliche ad libitum Gabe der Elektrolytlösung (0,8% NaCl, 0,1% KCl) war wichtig für das Wohlergehen der Mäuse, ist jedoch insbesondere bei der Interpretation der Daten aus der Blutgasanalyse sowie den Hormonbestimmungen zu beachten.

Messung von Kreislauf- und Herzfunktionsparametern

Die eingesetzte Echokardiographie zur Ermittlung der Herzfunktion stellt in seinem Kosten/Nutzenverhältnis ein im Prinzip alternativloses Verfahren dar. Es handelt sich um eine günstige und verfügbare Möglichkeit, um eine Vielzahl an kardialen Parametern zu messen. Kompromisse müssen bezüglich einer subjektiven Bewertung des Untersuchers in Kauf genommen werden, letztere wurden jedoch mittels fest montiertem Schallkopf und standardisierten Schallfenstern möglichst gering gehalten. Auch die Belastung der Tiere beschränkte sich auf eine Kurznarkose und das lokale Entfernen des Fells.

Bei der Messung hämodynamischer Parameter mittels Telemetrie handelt es sich um eine aufwendige und kostenintensive Methode, welche derzeit einen absoluten „Goldstandard“ darstellt. Nach Implantation der Sender ergibt sich zwar durch die OP initial eine etwas höhere Belastung für die untersuchten Tiere im Gegensatz zur nicht-invasiven Blutdruckmessung, welche aber durch Qualität wie auch Quantität der erhobenen Daten gegenüber den alternativ eingesetzten Verfahren gerechtfertigt ist.

Die häufigste Alternative ist die Tail-Cuff Messung, bei welcher die Maus für eine Einzelmessung fixiert und der Blutdruck dann mittels Manschette um den Schwanz plethysmographisch gemessen wird. Dies hat zur Folge, dass immer nur einzelne Zeitpunkte evaluiert werden können. Die Messung eines Tag-Nacht-Rhythmus ist unmöglich. Außerdem werden die Tiere bei jeder Messung zusätzlichem Stress ausgesetzt und die Werte somit womöglich verfälscht.

In eben diesen Punkten zeigt sich die Überlegenheit der Telemetrie: Messwerte werden kontinuierlich über einen längeren Zeitraum an unbeeinträchtigt lebenden Tieren erhoben und durch das Mitteln der Werte in gewissen Perioden (z.B. 24 Std.) erhält man präzise Aussagen, die eine deutlich geringere Streuung zeigen. Außerdem erfolgt die Messung von den Mäusen unbemerkt und eine Verfälschung der Werte durch akuten Stress bei der Datenerhebung ist ausgeschlossen. Ein weiterer Vorteil ist, dass als zusätzlicher Wert gleichzeitig die Aktivität der Mäuse aufgezeichnet wird und in Korrelation zum jeweilig gemessenen Blutdruck gesetzt werden kann (Kramer et al. 2000; Van Vliet et al. 2006; Mills et al. 2000).

Bestimmung der Hormone des RAAS

Auch die Bestimmung der kreislaurelevanten Hormone mittels einer Blutentnahme in CO₂-Narkose nach mehrtägiger Gewöhnung der Mäuse durch „Training“ gehört mittlerweile zu einem etablierten Verfahren an unserem Institut. Die Kombination des Trainings zur

Gewöhnung der Tiere an das Procedere verhindert einen stressbedingten Anstieg der Hormone bei der entscheidenden Messung. Außerdem vereinfacht die Entnahme des Blutes zum Zeitpunkt des physiologischen Hormonpeaks (Zeman *et al.*, 2008; Gröger *et al.*, 2012; Nikolaeva *et al.*, 2012) die anschließende Bestimmung der Werte im Labor.

Die Grenzen dieser Methode liegen vor allem in der CO₂-Narkosevariante. Diese steht unter anderem im Verdacht Schmerzen, i.S. einer Atemwegsreizung und damit Stress zu verursachen, was natürlich kontraproduktiv wäre. Um Letzteres möglichst zu umgehen wurde ein 20% O₂/ 80% Co₂-Gemisch verwendet und dies langsam in die Käfige eingeleitet (Conlee *et al.*, 2005). Auch der Säuren-Basen-Haushalt wird durch das CO₂ beeinträchtigt, das Verfahren eignet sich beispielsweise nicht für eine gleichzeitige Blutgasanalyse. Ein Einfluss auf die Hormonspiegel wird jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der unterschiedlichen Reaktion der Tiere auf das Training: während manche Mäuse sich äußerlich mit der Zunahme der Trainingsdurchläufe zu beruhigen schienen, gab es auch Tiere bei denen der Trainingseffekt offensichtlich nicht so deutlich eintrat, was bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen ist.

Plasmavolumenbestimmung

Die in unserem Institut neu etablierte Methode der Plasmavolumenmessung beruht auf dem bereits lange bekannten Prinzip der Evans Blue Dilution und stellt eine elegante Möglichkeit zur Abschätzung des Plasmavolumens dar (Dawson, Evans and Whipple, 1920; Crooke and Morris, 1942). In der Literatur werden als Einschränkungen der Methodik diskutiert: die Beeinflussung der Evans Blue Konzentration durch Hämolyse, Anlagerung an Proteine wie z.B. Albumin sowie die Elimination des Farbstoffes. Daher wurden in einigen früheren Publikationen mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion entnommen (Gibson and Evans, 1937; Morris, 1944).

Aufgrund der geringen Blutvolumina von Mäusen und der Belastung der Tiere wurde im vorliegenden Protokoll auf diese Vorgehensweise verzichtet. Es erfolgte lediglich eine Blutentnahme nach sieben Minuten d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem sich der Farbstoff bereits gleichmäßig verteilt hat, die Elimination jedoch gering ist (Zweens and Frankena, 1981; Zhang *et al.*, 2005). Um sicherzugehen, dass dieses Vorgehen valide ist, wurde eine Evaluation der Methode durchgeführt. Dafür wurden Messungen an Tieren ohne Wiedererwachen vorgenommen, denen unmittelbar vorher bereits in tiefer Narkose eine definierte Menge Blut ($261,4 \pm 24,83 \mu\text{l}$, n=8) abgenommen worden war. Die Ergebnisse zeigen, dass die Entnahme von 15-20% des Plasmavolumens signifikant zu detektieren ist (Abb. 33).

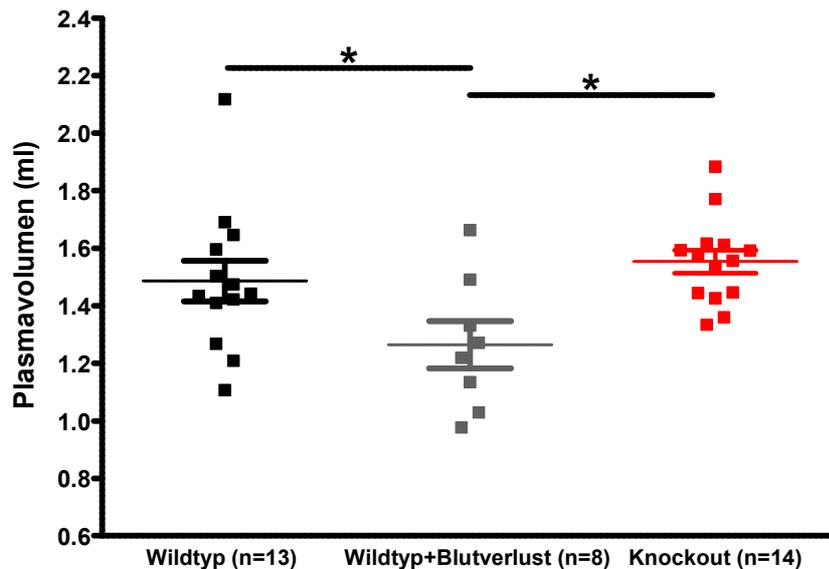


Abbildung 33: Evaluation der Evans Blue Plasmavolumenmessung

Plasmavolumenmessung durchgeführt bei Wildtyp-Mäusen (n=13), Wildtyp-Mäusen denen vorher eine definierte Menge Blut ($261,4 \pm 24,83 \mu\text{l}$) entnommen wurde (n=8) sowie bei TMEM16A-Knockout Tieren. Dieses Experiment sollte dazu dienen die Sensitivität der Methode zu evaluieren. Statistische Testung mittels one-way ANOVA. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$

Des Weiteren wurden, um qualitativ hochwertige Ergebnisse zu gewährleisten, hämolysierte Plasmaproben von der Auswertung ausgeschlossen. Eine zusätzliche Fehlerquelle stellt die Injektion der definierten Menge des Farbstoffes dar. Es gilt zu beachten, dass bei jeder Ungenauigkeit (z.B. paravasale Injektion) eine andere als die definierte Menge Farbstoff nach intravasal gelangt, am wahrscheinlichsten ist in diesem Kontext eine Minderapplikation. Bei der späteren Berechnung wird das Plasmavolumen daher vermutlich eher überschätzt (Zweens and Frankena, 1981). Es handelt sich dabei um leichte Ungenauigkeiten, die in erster Linie die Absolutwerte beeinflussen, jedoch keinen Einfluss auf den Vergleich zwischen den Gruppen haben, da alle Tiere mit demselben Verfahren gemessen wurden. Diese Vermutungen spiegeln sich auch in den gewonnenen Ergebnissen wieder. Es zeigte sich aber insgesamt, dass die von uns gemessenen Plasmavolumina mit den in der Literatur zu findenden Angaben vergleichbar waren, was die Effektivität und Validität der Methode unterstreicht (GV-SOLAS, 2009).

Nicht invasive Berechnung der GFR

Ähnlich wie bei der Bestimmung des Plasmavolumens kam auch bei der Messung der GFR ein Farbstoff, in diesem Fall das FITC-Sinistrin zum Einsatz. Die Berechnung der GFR erfolgt mittels einer, durch den Erfinder der Methode, empirisch im Versuch ermittelten Formel und der photometrisch bestimmten Halbwertszeit von FITC-Sinistrin. Dies hat den Vorteil, dass

die absolut applizierte Farbstoff-Menge keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Außerdem erhält man bei der Anwendung der Formel direkt eine auf 100g KG standardisierte GFR (Schreiber *et al.*, 2012). Die Methode ist relativ neu, wurde aber bereits in einer größeren Zahl von Studien evaluiert (Schock-Kusch *et al.*, 2011, 2013). Auch institutsinterne, noch nicht publizierte Versuche zeigen vielversprechende und nachvollziehbare Ergebnisse, z.B. bei unilateral nephrektomierten Tieren.

Der Vorteil gegenüber anderen Verfahren zur Evaluation der Nierenfunktion ist, dass es eine geringere Belastung für die Tiere darstellt, da kein Blut entnommen werden muss. Dadurch bedingt lassen sich auch mehrere Messungen am selben Tier durchführen, die lediglich durch die Anzahl der zugelassenen retrobulbären Injektionen limitiert werden.

Die Vorteile des Verfahrens liegen klar auf der Hand, es gibt allerdings auch Einschränkungen. Da die vorgegebene Formel empirisch ermittelt wurde, wird von bestimmten Standardbedingungen ausgegangen z.B. von einem definierten Verteilungsvolumen für das One Compartment Modell mit dem die GFR letztendlich berechnet wird. Das bedeutet bei starken Unterschieden im Plasmavolumen der untersuchten Gruppen kommt es letztendlich zu Fehleinschätzungen der GFR (Schock-Kusch *et al.*, 2009; Schreiber *et al.*, 2012). Dieser Fehler wurde in der vorliegenden Arbeit durch Bestimmung des Plasmavolumens ausgeschlossen.

Außerdem wurden bereits bei der Auswertung der Rohdaten lediglich qualitativ gute Kurven in die Studien eingeschlossen. Um an dieser Stelle eine standardisierte Auswahl zu gewährleisten, wurde entschieden, dass eine Kurve bei Auswertung durch das Computerprogramm mindestens eine Korrelation von $r^2 > 0,7$ haben muss sowie ein Konfidenzintervall von maximal +/- 30 Sekunden bezüglich der der Halbwertszeit haben darf.

Ein alternativ zur GFR-Bestimmung in Frage kommendes Verfahren wäre die Berechnung der Kreatinin Clearance aus einer 24h Urinsammlung mit dem metabolischen Käfig, welcher im folgenden Absatz beschrieben wird. Hierzu wäre allerdings zusätzlich noch eine finale Blutentnahme zur Bestimmung des Plasmakreatininpiegels erforderlich. Daraus ergibt sich über die im nächsten Absatz beschriebenen Einschränkungen (z.B. eine höhere Belastung für die Tiere) hinaus auch der Nachteil, dass lediglich eine einzige Messung pro Maus vorgenommen werden kann. Es wird somit unmöglich, den GFR-Verlauf einer einzelnen Kohorte darzustellen, außerdem wären deutlich höhere Tierzahlen für weniger valide Ergebnisse notwendig.

Quantifizierung des Wasser-Elektrolyt-Haushalts

Der speziell für Mäuse entwickelte Stoffwechsellkäfig der Firma „Tecniplast“ bietet ein optimales Instrument zur Sammlung und Quantifizierung von Urin und Kot. Außerdem können Ein- und Ausfuhr genauestens dokumentiert werden. Problematisch ist allerdings, dass die Tiere dafür im Stoffwechsellkäfig einer unbekannteren Umgebung ausgesetzt werden. Es gibt keine Möglichkeit für Einstreu/ Nistmaterial und der Boden auf dem sich die Tiere bewegen besteht aus Gitterstäben.

Es muss beachtet werden, dass die Mäuse dadurch einer Stress und Belastungssituation ausgesetzt sind, welche sich auf Ess- bzw. Trinkverhalten auswirkt und somit Veränderungen bei den zu evaluierenden Stoffwechselprodukten Urin und Kot hervorruft (Kurien, Everds and Scofield, 2004). Um die Qualität der Daten zu optimieren waren deshalb die Zeiten im Stoffwechsellkäfig streng auf 3-4 Stunden limitiert. Es wurde dadurch zugunsten valider Ergebnisse in Kauf genommen, dass z.B. die Exkretionsfraktion der einzelnen Stoffe nicht berechnet werden kann. Trotzdem muss diese Ausnahmesituation für die Tiere bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle verwendeten Methoden gut validiert sind und im Rahmen ihrer Grenzen eingesetzt wurden. Trotzdem ist es unbedingt erforderlich, die erwähnten Einschränkungen einzelner Verfahren zu kennen, um die Ergebnisse adäquat zu interpretieren. So wurden z.B. an einigen Stellen Abweichungen bezüglich der ermittelten Absolutwerte in Kauf genommen (z.B. Plasmavolumen), was vor allem beim Vergleich mit Studien zu beachten ist, bei denen andere Protokolle verwendet werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit spielen diese Schwankungen jedoch eine untergeordnete Rolle und werden beim Vergleich zweier gleich behandelter Gruppen vernachlässigbar.

5.7 Quo vadis – offene Fragen, weiterführende Experimente

Trotz vieler neuer Erkenntnisse bleiben zum Schluss noch offene Fragen, für deren Bearbeitung im Folgenden einige mögliche Ansätze aufgezeigt werden. In dieser Arbeit konnten weitere Einflüsse des vaskulären TMEM16A auf Wasser- und Elektrolythaushalt und die Nierenfunktion gezeigt werden. Vor allem in Zusammenschau mit den Erkenntnissen von Faria et. al (2014) bezüglich des tubulären und des glomerulären Knockouts deutet alles auf eine relevantere Rolle von TMEM16A in der Niere hin als bislang gezeigt werden konnte. Es wäre deshalb interessant, ein Mausmodell mit einem lediglich auf die Niere begrenzten vaskulären Knockout zu untersuchen, insbesondere da eine starke TMEM16A Expression in

der glatten Muskulatur der Niere bereits nachgewiesen wurde (Faria *et al.*, 2014). In Betracht kämen selektive Untersuchungen von Vas afferens und Vas efferens, aber auch Erhebungen der GFR und die Analyse von Elektrolyt- und Volumenverlusten, über die es in einem solchen Setting zurzeit noch zu wenig Erkenntnisse gibt.

Auch die bereits erwähnte Hypothese, dass die TMEM16A Expression durch die Höhe des Blutdrucks mitgesteuert wird, sollte weiter untersucht werden. Hierfür würden sich z.B. Gewebeproben von Gefäßen anbieten, um die Expression von TMEM16A bei Tieren unter Standarddiät gegen Furosemidgabe zu vergleichen. Die durchgeführte mRNA Quantifizierung in Aorten lieferte erste Anhalte, bislang ist allerdings unklar welcher Gefäßtyp die blutdrucksenkenden Effekte des TMEM16A-KO vermittelt, die Analyse von Widerstandsgefäßen unter verschiedenen Blutdruckbedingungen könnte hier weitere Anhaltspunkte liefern (Wang *et al.*, 2012; Huo *et al.*, 2015).

Außerdem könnte ähnlich wie für die Wildtypmäuse unter Furosemid in den vorliegenden Versuchen, bei TMEM16A-KO Mäusen unter Standarddiät die mRNA des NKCC in den Gefäßen im Vergleich zu Wildtypen unter Standarddiät quantifiziert werden. Damit wäre man in der Lage festzustellen, ob das Fehlen einer der beiden Effektoren NKCC oder TMEM16A regelhaft durch erhöhte Aktivität des jeweils anderen kompensiert wird. Zur Vervollständigung der Daten müssten außerdem auch die entsprechenden Proteinlevel erhoben und direkte Aktivitätsmessungen durchgeführt werden.

Wichtig wäre des Weiteren die blutdrucksenkenden Effekte der Kombination aus NKCC und TMEM16A Blockade und weitere Auswirkungen auf Chlorid regulierende Mechanismen im Gefäßmuskel genauer zu untersuchen. Dafür würde sich z.B. die Kreuzung des NKCC Knockout Modells mit der induzierbaren TMEM16A Knockout Maus zu einem Doppel-Knockout anbieten. In einem ersten Schritt könnte alternativ der spezifische Blocker T16A inh-A01 bei NKCC Knockout Mäusen eingesetzt werden (Davis *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

Alle diese Ansätze könnten wichtige Erkenntnisse bringen, um die Rolle des TMEM16A für die Blutdruckregulation weiter zu charakterisieren.

6 Zusammenfassung

Insbesondere die essentielle Hypertonie, an der 85% der Bluthochdruckpatienten leiden ist aufgrund der multifaktoriellen Genese in ihren Mechanismen noch nicht vollkommen verstanden. Der periphere Gefäßwiderstand scheint in diesem Kontext eine entscheidende Rolle sowohl für die physiologische Blutdruckregulation, als auch für die Entstehung der arteriellen Hypertonie zu spielen. Ein wesentlicher Einfluss auf die Modulierung und Aufrechterhaltung des peripheren Gefäßwiderstandes wird den Calcium aktivierten Chloridkanälen (CaCC) zugeschrieben. So wurde bereits 1996 von Large und Wang vermutet, dass CaCC's maßgeblich an der Vasokonstriktion beteiligt sind.

Die durchgeführten Experimente sollen die in vivo Auswirkungen des glattmuskulären Knockouts von TMEM16A, dem anscheinend wichtigsten CaCC, auf den Blutdruck untersuchen. Hierfür wurden Versuche unter verschiedenen kreislaufwirksamen Bedingungen durchgeführt, die durch eine Hoch- und Niedrigsalzdiät sowie eine einwöchige Furosemidgabe erzeugt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Bluthochdruck fördernden Bedingungen wie der Hochsalzdiät („Western Diet“) kaum Gruppenunterschiede bei Nierenfunktion, RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) Aktivierung und Plasmavolumen zwischen Wildtyp- und Knockouttieren bestehen. Die bereits von Heinze *et al.* (2014) publizierte Resultate der Blutdruckmessung unter dieser Diät werden dadurch bestätigt. Je mehr die Blutdruckregulationsmechanismen jedoch mit „Kreislaufstress“ im Sinne von Salzrestriktion bei der Niedrigsalzdiät bzw. noch stärker durch Salz-/ Wasserverlust und Vasodilatation bei der Furosemidgabe konfrontiert werden, desto offensichtlicher zeigen sich die Effekte des TMEM16A Knockouts.

Bei Standarddiät konnte ein fehlender altersbedingter Rückgang der GFR (glomeruläre Filtrationsrate) bei den TMEM16A-KO Tieren festgestellt werden, welcher mutmaßlich auf einer Vasodilatation des Vas afferens basiert. Bei den Basismessungen des RAAS gab es keine Gruppenunterschiede. Bereits unter einer verringerten Salzzufuhr zeigten die Knockouttiere eine deutlich stärkere RAAS-Aktivierung als die Kontrollmäuse. Im Rahmen des Furosemidprotokolls zeigte sich in den ersten zwei Tagen ein Blutdruckabfall von über 10 mmHg bei beiden Gruppen. Letzterer konnte bei den Wildtypen im Verlauf kompensiert werden, sodass nach 7 Tagen wieder der ursprüngliche Blutdruck erreicht wurde. Die Knockout-Mäuse demonstrierten hingegen einen im Mittel um bis zu 13 mmHg reduzierten Blutdruck, der trotz deutlich stärkerer RAAS Aktivierung als in der Kontrollgruppe bis zum Versuchsende bestand.

Der durch Furosemid blockierte Transporter NKCC wirkt in der glatten Muskelzelle synergistisch mit TMEM16A auf den Chloridhaushalt und fördert eine Depolarisation und damit eine Vasokonstriktion. Es ist zu berücksichtigen, dass für die Aktivität des NKCC bereits eine direkte Abhängigkeit von der Höhe des Blutdrucks gezeigt wurde und ebenso bei spontan hypertensiven Ratten eine Überexpression von TMEM16A gefunden werden konnte (Jiang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). Dies lässt die These zu, dass eine Hochregulation von TMEM16A für die in der Wildtypgruppe erfolgte Blutdruckkompensation verantwortlich sein könnte. Eine Quantifizierung der TMEM16A mRNA in Aorten von Wildtyptieren unter Furosemid zeigte signifikant erhöhte Werte gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Furosemid, was die genannte These stützt.

Mit den vorliegenden Daten lassen sich jetzt Aussagen über die betrachteten Fragestellungen treffen.

1) Ein relevanter Einfluss einer Störung der Nierenfunktion auf den beobachteten Blutdruckabfall bei TMEM16A-KO erscheint unwahrscheinlich. Dennoch spielt TMEM16A durch den bei KO festgestellten fehlenden altersbedingten GFR-Abfall und mit Blick auf die Publikationen von Faria *et al.* (2014) und Svenningsen *et al.* (2014) augenscheinlich eine Rolle in der Niere, die weiter evaluiert werden muss.

2) Für die stärkeren TMEM16A-KO Effekte unter Nidrigsalzdiät verglichen mit der Hochsalzgabe scheint eine vermehrte Belastung der Kreislaufregulationsmechanismen ursächlich zu sein. Unter diesen Bedingungen ist der Organismus zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks deshalb stärker auf einen funktionierenden TMEM16A angewiesen.

3) Die gleichzeitige Blockade der synergistisch wirkenden Effektoren TMEM16A und NKCC wurde nur teilweise durch eine massive RAAS Aktivierung und eine anfängliche Bedarfstachykardie kompensiert. Es kam dennoch zu einem noch stärkeren Blutdruckabfall als unter Standardbedingungen, der bis zum Versuchsende bestehen blieb und im Verlauf nicht ausgeglichen werden konnte. Insgesamt scheinen sich der Transporter NKCC und der Kanal TMEM16A in ihrer Wirkung zu ergänzen bzw. Funktionsverluste des jeweils anderen zum Teil zu kompensieren. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass TMEM16A ebenso wie bereits für NKCC gezeigt eine gewisse Blutdruckabhängigkeit in seiner Aktivität zeigt. Diesbezüglich besteht allerdings weiterer Forschungsbedarf.

7 Summary

Especially, the essential hypertension which affects 85% of the hypertensive patients is not fully understood in their mechanisms due to the multifactorial genesis. In this context, the peripheral vascular resistance appears to play a crucial role, on the one hand for physiological blood pressure regulation and on the other hand for the development of arterial hypertension. A significant influence on the modulation and maintenance of the peripheral vascular resistance is attributed to the Calcium-activated Chloride Channels (CaCC). Already in 1996, Large und Wang hypothesized that CaCCs are involved in vasoconstriction.

The experiments are designed to investigate the in vivo blood pressure effects of smooth muscle TMEM16A knockout, which is the currently most important CaCC. For this purpose, observations were performed under various conditions with vascular effects, which were induced by a high and a low salt diet, as well as by a one-week furosemide application.

The results show that under conditions favorable to hypertension such as the high-salt diet ("Western Diet"), there are hardly any group differences in renal function, RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone system) activation and plasmavolume between wildtype and knockout animals. The already by Heinze *et al.* (2014) published results of the blood pressure measurement under „Western Diet“ are thereby confirmed. Confronting the blood pressure regulation mechanisms with increasing „circulatory stress“, in the sense of salt restriction (low salt diet) or even stronger in salt / water loss and vasodilatation by the furosemide application, the more obvious are the effects of the TMEM16A knockout.

In the case of standard diet, a missing age-related decrease in GFR (glomerular filtration rate) was observed in the TMEM16A-KO animals, which is presumably based on vasodilatation of the vas afferens. The baseline measurements of the RAAS, showed no group differences. However, already under a reduced salt intake, the knockout animals demonstrated a significantly stronger RAAS activation than the control mice. Within the framework of the furosemide protocol, a blood pressure drop of more than 10 mmHg was observed in both groups in the first two days. This effect was compensated in the course of the experiment by the wild types, so that after 7 days the original blood pressure was reached again. The knockout mice, on the other hand, demonstrated an average blood pressure drop of up to 13 mmHg, which despite the distinctly stronger activation of RAAS than in the control group, persisted until the end of the experiment.

The Furosemide blocked transporter NKCC acts synergistically with the TMEM16A in the smooth muscle cell and promotes depolarization and thus vasoconstriction. It should be considered that for the activity of the NKCC, a direct dependence on the level of the blood pressure was already shown and also an over-expression of TMEM16A could be found in

spontaneously hypertensive rats (Jiang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). This suggests that an upregulation of TMEM16A might be responsible for the blood pressure compensation in the wild type group. A quantification of the TMEM16A mRNA in aortas of wildtypes under furosemide showed significantly increased values against a control group without furosemide, which supports the above-mentioned hypothesis.

With the obtained results, we can now make statements regarding the considered questions.

1) A relevant effect of a renal function disorder on the observed blood pressure drop at TMEM16A-KO appears unlikely. Nevertheless, regarding the lack of age-related GFR degradation observed at the knockout mice and taking the publications by Faria *et al.* (2014) and Svenningsen *et al.* (2014) into account, TMEM16A evidently plays a role in the kidney, which has to be further evaluated.

2) Responsible for the stronger TMEM16A-KO effects under low salt diet compared to high-salt diet, seems to be an increased stress of the circulatory regulation mechanisms. Under these conditions the organism has more need of a functioning TMEM16A to maintain the blood pressure.

3) The simultaneous blockade of the synergistic effectors TMEM16A and NKCC was only partially compensated by a massive RAAS activation and an initial demand tachycardia. Nevertheless, there was an even greater blood pressure drop than under standard conditions, which persisted until the end of the experiment and could not be compensated in the course of time. Altogether, the transporter NKCC and the channel TMEM16A seem to complement each other in their effects and to partially compensate function losses of the other. In addition, TMEM16A is also likely to show some blood pressure dependence in its activity as already shown for NKCC. However, further research on this topic is needed.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ADH	<i>Antidiuretisches Hormon</i>
AE	<i>Anion Exchanger</i>
ANP	<i>Atriales natriuretisches Peptid</i>
CaCC	<i>Calcium activated chloride channel</i>
DSI	<i>Data Science International</i>
FITC	<i>Fluorescent Isothiocyanat</i>
GFR	<i>Glomeruläre Filtrationsrate</i>
Hb	<i>Hämoglobin</i>
Hkt	<i>Hämatokrit</i>
HMV	<i>Herzminutenvolumen</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
KO	<i>Knockout</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NIC	<i>Non invasive clearance</i>
NKCC	<i>Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMMHC	<i>Smooth muscle heavy chain</i>
SR	<i>Sarcoplasmatic Reticulum</i>
VDCC	<i>Voltage dependent calcium channel</i>
VRAC	<i>Volume regulated anion channel</i>
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

9 Literaturverzeichnis

- Aburto, N. J., Ziolkovska, A., Hooper, L., Elliott, P., Cappuccio, F. P. and Meerpohl, J. J. (2013) 'Effect of lower sodium intake on health: systematic review and meta-analyses.', *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 346(April):f1326.
- Akar, F., Skinner, E., Klein, J. D., Jena, M., Paul, R. J. and O'Neill, W. C. (1999) 'Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in rat aorta.', *The American Journal of Physiology*, 276(6 Pt 1):C1383-90.
- Bandopadhyay, R. (2001) 'Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers', *Journal of Neurocytology*, 44:35–44.
- Barish, M. E. (1983) 'A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus oocyte*.' , *The Journal of Physiology*, 342:309–325.
- Bianchi, G., Ferrari, P., Trizio, D., Ferrandi, M., Torielli, L., Barber, B. R. and Polli, E. (1985) 'Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in the rat. A genetically determined link.', *Hypertension*, 7(3 Pt 1):319–325.
- Boedtkjer, D. M. B., Kim, S., Jensen, A. B., Matchkov, V. M. and Andersson, K. E. (2015) 'New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels - T16Ainh -A01, CaCCinh -A01 and MONNA - what do they inhibit?', *British Journal of Pharmacology*, 172(16):4158–72.
- Boedtkjer, D. M. B., Matchkov, V. V., Boedtkjer, E., Nilsson, H. and Aalkjaer, C. (2008) 'Vasomotion has chloride-dependency in rat mesenteric small arteries', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(2):389–404.
- Boese, S. H., Glanville, M., Gray, M. A. and Simmons, N. L. (2000) 'The swelling-activated anion conductance in the mouse renal inner medullary collecting duct cell line mIMCD-K2.', *The Journal of Membrane Biology*, 177(1):51–64.
- Brandes, R., Busse, R. (2011) Kapitel 28: Kreislauf. In *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Schmidt, R.F. (Hrg.), Lang, F. (Hrg.), Heckmann, M. (Hrg.), 31. Auflage, Springer Verlag, 573-626.
- Buchholz, B., Faria, D., Schley, G., Schreiber, R., Eckardt, K.-U. and Kunzelmann, K. (2013) 'Anoctamin 1 induces calcium-activated chloride secretion and proliferation of renal cyst-forming epithelial cells.', *Kidney International*, 85(5):1–10.
- Bulley, S. and Jaggar, J. H. (2013) 'Cl⁻ channels in smooth muscle cells.', *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 466:861–872.

- Bulley, S., Neeb, Z. P., Burris, S. K., Bannister, J. P., Thomas-Gatewood, C. M., Jangsangthong, W. and Jaggar, J. H. (2012) 'TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries.', *Circulation Research*, 111(8):1027–36.
- Butz, G. M. and Davisson, R. L. (2001) 'Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool.', *Physiological Genomics*, 5(2): 89–97.
- Campese, V. M. (1994) 'Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications [clinical conference]', *Hypertension*, 23(4):531–550.
- Cantarovich, F., Benedetti, L., Fernández, J. C., Chena, C., Castro, L., Galli, C. J., Pérez Loredo, J., Locatelli, A. and Tizado, J. (1974) 'High doses of furosemide and sodium in hypertension. A single therapeutic measure in severe cases.', *Nephron*, 12(2):133–139.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O. and Gaietta, L. J. V (2008) 'TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity.', *Science (New York, N.Y.)*, 322(5901):590–594.
- Castrop, H., Schweda, F., Mizel, D., Huang, Y., Briggs, J., Kurtz, A. and Schnermann, J. (2004) 'Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion.', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286(5):F848-57.
- Chalmers, J., MacMahon, S., Mancina, G., Whitworth, J., Beilin, L., Hansson, L., Neal, B., Rodgers, A., Ni Mhurchu, C. and Clark, T. (1999) '1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization.', *Clinical and Experimental Hypertension*, 21(5–6):1009–1060.
- Chen, Y., An, H., Li, T., Liu, Y., Gao, C., Guo, P., Zhang, H. and Zhan, Y. (2011) 'Direct or indirect regulation of calcium-activated chloride channel by calcium', *Journal of Membrane Biology*, 240(3):121–129.
- Conlee, K. M., Stephens, M. L., Rowan, A. N. and King, L. A. (2005) 'Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats.', *Laboratory Animals*, 39(2):137–161.
- Cridde, D. N., De Moura, R. S., Greenwood, I. A. and Large, W. A. (1996) 'Effect of niflumic acid on noradrenaline-induced contractions of the rat aorta.', *British Journal of Pharmacology*, 118(4):1065–1071.

- Crooke, A. C. and Morris, C. J. (1942) 'The determination of plasma volume by the Evans blue method.', *The Journal of Physiology*, 101(2):217–223.
- Dai, Y. and Zhang, J. H. (2001) 'Role of Cl⁻ current in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery.', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(5):H2159–H2167.
- Dai, Y. and Zhang, J. H. (2002) 'Manipulation of chloride flux affects histamine-induced contraction in rabbit basilar artery.', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 282(4):H1427–H1436.
- Dam, V. S., Boedtkjer, D. M. B., Nyvad, J., Aalkjaer, C. and Matchkov, V. (2014) 'TMEM16A knockdown abrogates two different Ca²⁺-activated Cl⁻ currents and contractility of smooth muscle in rat mesenteric small arteries', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 466(7):1391–1409.
- Danielsson, J., Yim, P., Rinderspacher, A., Fu, X. W., Zhang, Y., Landry, D. W. and Emala, C. W. (2014) 'Chloride channel blockade relaxes airway smooth muscle and potentiates relaxation by α -agonists', *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(3):L273–L282.
- Davis, A. J., Forrest, A. S., Jepps, T. A., Valencik, M. L., Wiwchar, M., Singer, C. A., Sones, W. R., Greenwood, I. A. and Leblanc, N. (2010) 'Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle.', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 299(5):C948–C959.
- Davis, A. J., Shi, J., Pritchard, H. A. T., Chadha, P. S., Leblanc, N., Vasilikostas, G., Yao, Z., Verkman, A. S., Albert, A. P. and Greenwood, I. A. (2013) 'Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A inh-A01', *British Journal of Pharmacology*, 168(3):773–784.
- Davis, J. P. L., Chien, P. F. W., Chipperfield, A. R., Gordon, A. and Harper, A. A. (2000) 'The three mechanisms of intracellular chloride accumulation in vascular smooth muscle of human umbilical and placental arteries', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 441(1):150–154.
- Davis, J. P. L., Chipperfield, A. R. and Harper, A. A. (1993) 'Accumulation of Intracellular Chloride by (Na-K-Cl) Co-transport in Rat Arterial Smooth Muscle is Enhanced in Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)/salt Hypertension', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 25(3):233–237.
- Dawson, A. B., Evans, H. M. and Whipple, G. (1920) 'Blood Volume Studies', *American Journal of Physiology*.

- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C. and Thorne, T. (1999) 'Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter.', *Nature Genetics*, 22(2):192–5.
- Dormans, T. P., Pickkers, P., Russel, F. G. and Smits, P. (1996) 'Vascular effects of loop diuretics.', *Cardiovascular Research*, 32(6):988–97.
- Dornas, W. C. and Silva, M. E. (2011) 'Animal models for the study of arterial hypertension.', *Journal of Biosciences*, 36(4):731–7.
- Duran, C. and Hartzell, H. (2011) 'Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels?', *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(6):685–692.
- Ehmke H. (2014) Das Kreislaufsystem. In 'Physiologie'. Kurtz, A. (Hrg.), Pape, H.-C. (Hrg.), Klinke, R. (Hrg.) and Silbernagl, S. (Hrg.), 7. Auflage, Thieme Verlag, 214-265.
- Faria, D., Rock, J. R., Romao, A. M., Schweda, F., Bandulik, S., Witzgall, R., Schlatter, E., Heitzmann, D., Pavenstädt, H., Herrmann, E., Kunzelmann, K. and Schreiber, R. (2014) 'The calcium-activated chloride channel Anoctamin 1 contributes to the regulation of renal function.', *Kidney International*, 85(6):1369–1381.
- Ferrera, L., Caputo, A., Ubbby, I., Bussani, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., Pagani, F. and Galletta, L. J. V (2009) 'Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing', *Journal of Biological Chemistry*, 284(48):33360–33368.
- Flagella, M., Clarke, L. L., Miller, M. L., Erway, L. C., Giannella, R. A., Andringa, A., Gawenis, L. R., Kramer, J., Duffy, J. J., Doetschman, T., Lorenz, J. N., Yamoah, E. N., Cardell, E. Lou and Shull, G. E. (1999) 'Mice Lacking the Basolateral Na-K-2Cl Cotransporter Have Impaired Epithelial Chloride Secretion and Are Profoundly Deaf', *Journal of Biological Chemistry*, 274(38):26946–26955.
- Forrest, A. S., Joyce, T. C., Huebner, M. L., Ayon, R. J., Wiwchar, M., Joyce, J., Freitas, N., Davis, A. J., Ye, L., Duan, D. D., Singer, C. a, Valencik, M. L., Greenwood, I. A. and Leblanc, N. (2012) 'Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension.', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(12):C1229-43.
- Garg, P., Martin, C. F., Elms, S. C., Gordon, F. J., Wall, S. M., Garland, C. J., Sutliff, R. L. and O'Neill, W. C. (2007) 'Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systemic blood pressure and smooth muscle tone.', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(5):H2100–H2105.

- Gibson, J. G. and Evans, W. A. (1937) 'Clinical studies of the blood volume. I. Clinical application of a method employing the azo dye "evans blue" and the spectrophotometer.', *The Journal of Clinical Investigation*, 16(3):301–316.
- Graudal, N. A., Galløe, A. M. and Garred, P. (1998) 'Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterols, and triglyceride: a meta-analysis.', *Journal of the American Medical Association*, 279(17):1383–91.
- Greenwood, I. A., Ledoux, J. and Leblanc, N. (2001) 'Differential regulation of Ca(2+)-activated Cl(-) currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase.', *The Journal of Physiology*, 534(Pt. 2):395–408.
- Gröger, N., Vitzthum, H., Fröhlich, H., Krüger, M., Ehmke, H., Braun, T. and Boettger, T. (2012) 'Targeted mutation of SLC4A5 induces arterial hypertension and renal metabolic acidosis.', *Human Molecular Genetics*, 21(5):1025–36.
- Grundy, S. M., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S. and Fuster, V. (1999) 'AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology.', *Journal of the American College of Cardiology*, 34(4):1348–1359.
- GV-SOLAS (2009) *Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren , insbesondere kleinen Versuchstieren.*
- Haas, M. and Forbush, B. (2000) 'The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia.', *Annual Review of physiology*, 62:515–534.
- He, F. J., Li, J. and Macgregor, G. A. (2013) 'Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials.', *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 346(5):f1325.
- Heinze, C., Seniuk, A., Sokolov, M. V, Huebner, A. K., Klementowicz, A. E., Szijártó, I. A., Schleifenbaum, J., Vitzthum, H., Gollasch, M., Ehmke, H., Schroeder, B. C. and Hübner, C. A. (2014) 'Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure.', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2): 675-686.
- Huang, F., Rock, J. R., Harfe, B. D., Cheng, T., Huang, X., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2009) 'Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50):21413–8.

- Hübner, C. A., Schroeder, B. C. and Ehmke, H. (2015) 'Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle.', *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 467(3):605–14.
- Huo, Y., Li, J., Qin, X., Huang, Y., Wang, X. X., Gottesman, R. F., Tang, G., Wang, B., Chen, D., He, M., Fu, J., Cai, Y., Shi, X., Zhang, Y., Cui, Y., Sun, N., Li, X., Cheng, X., Wang, J., Yang, X., Yang, T., Xiao, C., Zhao, G., Dong, Q., Zhu, D., Wang, X. X., Ge, J., Zhao, L., Hu, D., Liu, L. and Hou, F. F. (2015) 'Efficacy of Folic Acid Therapy in Primary Prevention of Stroke Among Adults With Hypertension in China', *Journal of the American Medical Association*, 313(13):1325.
- Hutcheon, D. E. and Leonard, G. (1967) 'Diuretic and antihypertensive actions of furosemide.', *The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs*, 7(1):26–33.
- Jiang, G., Akar, F., Cobbs, S. L., Lomashvilli, K., Lakkis, R., Gordon, F. J., Sutliff, R. L. and O'Neill, W. C. (2004) 'Blood pressure regulates the activity and function of the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle.', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(4):H1552–H1557.
- Kitamura, K. and Yamazaki, J. (2001) 'Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature.', *Japanese Journal of Pharmacology*, 85(4):351–7.
- Kotchen, T. A. (2010), Chapter 37 Hypertensive Vascular Disease. In *Harrison's Cardiovascular Medicine*, Loscalzo J. (Hrg.), *Mcgraw-Hill Publ.Comp.*, 422-444.
- Kotelevtsev, I. V, Orlov, S. N., Pokudin, N. I., Agnaev, V. M. and Postnov, I. V (1987) 'Genetic analysis of inheritance of Na⁺, K⁺-cotransport rate, calcium level in erythrocytes and blood pressure in F2 hybrids of spontaneously hypertensive and normotensive rats', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 103(4):456–458.
- Kramer, K., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., Mills, P. A., Huettegan, D., Zwiers, L. and Brockway, B. (2000) 'Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study.', *Laboratory Animals*, 34(3):272–280.
- Kunzelmann, K., Tian, Y., Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Thevenod, F., Roussa, E., Rock, J. and Schreiber, R. (2011) 'Anoctamins.', *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 462(2):195–208.
- Kurien, B. T., Everds, N. E. and Scofield, R. H. (2004) 'Experimental animal urine collection: a review.', *Laboratory Animals*, 38(4):333–361.
- Kurtz, A. (2011) 'Renin release: sites, mechanisms, and control.', *Annual Review of Physiology*, 73:377–99.

Kurtz, A. and Penner, R. (1989) 'Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(9):3423–3427.

Lamb, F. S., Kooy, N. W. and Lewis, S. J. (2000) 'Role of Cl(-) channels in alpha-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat.', *European Journal of Pharmacology*, 401(3):403–412.

Lang, F. (2011) Kapitel 29: Niere. In *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Schmidt, R.F. (Hrg.), Lang, F. (Hrg.), Heckmann, M. (Hrg.), 31. Auflage, Springer Verlag, 630-663.

Large, W. A. and Wang, Q. (1996) 'Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl- conductance in smooth muscle.', *The American Journal of Physiology*, 271(2 Pt 1):C435–C454.

Lawes, C. M., Hoorn, S. Vander and Rodgers, A. (2008) 'Global burden of blood-pressure-related disease, 2001', *The Lancet*, 371(9623):1513–1518.

Lee, H.-A., Baek, I., Seok, Y. M., Yang, E., Cho, H.-M., Lee, D.-Y., Hong, S. H. and Kim, I. K. (2010) 'Promoter hypomethylation upregulates Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats.', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 396(2):252–257.

Li, Q. and Cai, H. (2015) 'ANO1 taking center stage: blood pressure regulation in SHR.'s.', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 82(24):216–217.

Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., Galderisi, M., Grobbee, D. E., Jaarsma, T., Kirchhof, P., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Manolis, A. J., Nilsson, P. M., Ruilope, L. M., Schmieder, R. E., Sirnes, P. A., Sleight, P., Viigimaa, M., Waeber, B., Zannad, F., Burnier, M., Ambrosioni, E., Caulfield, M., Coca, A., Olsen, M. H., Tsioufis, C., Van De Borne, P., Zamorano, J. L., Achenbach, S., Baumgartner, H., Bax, J. J., Bueno, H., Dean, V., Deaton, C., Erol, C., Ferrari, R., Hasdai, D., Hoes, A. W., Knuuti, J., Kolh, P., Lancellotti, P., Linhart, A., Nihoyannopoulos, P., Piepoli, M. F., Ponikowski, P., Tamargo, J. L., Tendera, M., Torbicki, A., Wijns, W., Windecker, S., Clement, D. L., Gillebert, T. C., Rosei, E. A., Anker, S. D., Bauersachs, J., Hitij, J. B., Caulfield, M., De Buyzere, M., De Geest, S., Derumeaux, G. A., Erdine, S., Farsang, C., Funck-Brentano, C., Gerc, V., Germano, G., Gielen, S., Haller, H., Jordan, J., Kahan, T., Komajda, M., Lovic, D., Mahrholdt, H., Ostergren, J., Parati, G., Perk, J., Polonia, J., Popescu, B. A., Reiner, Ž., Rydén, L., Sirenko, Y., Stanton, A., Struijker-Boudier, H., Vlachopoulos, C., Volpe, M. and Wood, D. A. (2013) '2013 ESH/ESC guidelines

for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)', *European Heart Journal*, 34(28):2159–2219.

Markadieu, N. and Delpire, E. (2014) 'Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 466(1):91–105.

Mathers, C. D., Boerma, T. and Ma Fat, D. (2009) 'Global and regional causes of death', *British Medical Bulletin*, 92(1):7–32.

Mente, A., O'Donnell, M. J., Rangarajan, S., McQueen, M. J., Poirier, P., Wielgosz, A., Morrison, H., Li, W., Wang, X., Di, C., Mony, P., Devanath, A., Rosengren, A., Oguz, A., Zatonska, K., Yusufali, A. H., Lopez-Jaramillo, P., Avezum, A., Ismail, N., Lanas, F., Puoane, T., Diaz, R., Kelishadi, R., Iqbal, R., Yusuf, R., Chifamba, J., Khatib, R., Teo, K. and Yusuf, S. (2014) 'Association of Urinary Sodium and Potassium Excretion with Blood Pressure', *New England Journal of Medicine*, 371(7):601–611.

Mente, A., O'Donnell, M., Rangarajan, S., Dagenais, G., Lear, S., McQueen, M., Diaz, R., Avezum, A., Lopez-Jaramillo, P., Lanas, F., Li, W., Lu, Y., Yi, S., Rensheng, L., Iqbal, R., Mony, P., Yusuf, R., Yusoff, K., Szuba, A., Oguz, A., Rosengren, A., Bahonar, A., Yusufali, A., Schutte, A. E., Chifamba, J., Mann, J. F. E., Anand, S. S., Teo, K., Yusuf, S. and PURE, E. and O. I. (2016) 'Associations of urinary sodium excretion with cardiovascular events in individuals with and without hypertension: a pooled analysis of data from four studies.', *Lancet*, 388(10043):465–75.

Meyer, J. W., Flagella, M., Sutliff, R. L., Lorenz, J. N., Nieman, M. L., Weber, C. S., Paul, R. J. and Shull, G. E. (2002) 'Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter.', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(5):H1846–H1855.

Mills, P. A., Huettner, D. A., Brockway, B. P., Zwiers, L. M., Gelsema, a J., Schwartz, R. S. and Kramer, K. (2000) 'A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry.', *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(5):1537–1544.

Morris, C. (1944) 'The determination of plasma volume by the Evans blue method: the analysis of haemolysed plasma', *The Journal of Physiology*, 102:441–445.

Mozaffarian, D., Fahimi, S., Singh, G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Engell, R. E., Lim, S., Danaei, G., Ezzati, M., Powles, J. and Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (2014) 'Global sodium consumption and death from cardiovascular causes.', *The New England Journal of Medicine*, 371(7):624–34.

- Nikolaeva, S., Pradervand, S., Centeno, G., Zavadova, V., Tokonami, N., Maillard, M., Bonny, O. and Firsov, D. (2012) 'The Circadian Clock Modulates Renal Sodium Handling', *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6):1019–1026.
- Nüsing, R. M., Treude, A., Weissenberger, C., Jensen, B., Bek, M., Wagner, C., Narumiya, S. and Seyberth, H. W. (2005) 'Dominant role of prostaglandin E2 EP4 receptor in furosemide-induced salt-losing tubulopathy: a model for hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome.', *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(8):2354–62.
- O'Donnell, M. E. and Owen, N. E. (1994) 'Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle.', *Physiological Reviews*, 74(3):683–721.
- Oh, S.-J., Hwang, S. J., Jung, J., Yu, K., Kim, J., Choi, J. Y., Hartzell, H. C., Roh, E. J. and Lee, C. J. (2013) 'MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1.', *Molecular Pharmacology*, 84(5):726–35.
- Oliver, W. J., Cohen, E. L. and Neel, J. V (1975) 'Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a "no-salt" culture.', *Circulation*, 52(1):146–51.
- Oppermann, M. and Hansen, P. (2007) 'Vasodilatation of afferent arterioles and paradoxical increase of renal vascular resistance by furosemide in mice', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 20892:279–287.
- Orlov, S. N., Koltsova, S. V., Tremblay, J., Baskakov, M. B. and Hamet, P. (2012) 'NKCC1 and hypertension: Role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone', *Annals of Medicine*, 44(S1):S111–S118.
- Orlov, S. N., Koltsova, S. V., Kapilevich, L. V, Gusakova, S. V and Dulin, N. O. (2015) 'NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension.', *Genes & Diseases*, 2(2):186–196.
- Orlov, S. N., Tremblay, J. and Hamet, P. (2010) 'NKCC1 and hypertension: a novel therapeutic target involved in the regulation of vascular tone and renal function.', *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 19(2):163–8.
- Owen, N. E. and Ridge, K. M. (1989) 'Mechanism of angiotensin II stimulation of Na-K-Cl cotransport of vascular smooth muscle cells', *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 257:C629-C636.

Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water and Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (2005) *Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate*. Washington, D.C.: National Academies Press.

Picollo, A., Malvezzi, M. and Accardi, A. (2014) 'TMEM16 Proteins: Unknown Structure and Confusing Functions.', *Journal of Molecular Biology*, 427(1):94–105.

Qu, Z., Wei, R. W. and Hartzell, H. C. (2003) 'Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells.', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 285(2):F326-35.

Raij, L., Dalmaso, A. P., Staley, N. A. and Fish, A. J. (1989) 'Renal Injury in Doca-Salt Hypertensive C5-Sufficient and C5-Deficient Mice', *Kidney International*, 36(4):582–592.

Remillard, C. V, Lupien, M. a, Crépeau, V. and Leblanc, N. (2000) 'Role of Ca²⁺- and swelling-activated Cl⁻ channels in α 1-adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles', *Cardiovascular Research*, 46(3):557–568.

Rock, J. R., Futtner, C. R. and Harfe, B. D. (2008) 'The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea.', *Developmental Biology*, 321(1):141–9.

Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didié, M., Beck, F. X., Boettger, T., Schubert, R., Ehmke, H., Jentsch, T. J. and Hübner, C. a. (2006) 'Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3', *Circulation Research*, 98(4):549–556.

Schneider, K. W. and Otto, H. (1962) 'Zur gleichzeitigen Bestimmung der Plasmamenge mit Evans blue und des Nierenplasmastromes mit PAH', *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, 135(6):562–568.

Schnermann, J. and Briggs, J. P. (2008) 'Tubuloglomerular Feedback - Mechanistic Insights from Gene- Manipulated Mice', *Kidney International*, 74(4):418–426.

Schock-Kusch, D., Geraci, S., Ermeling, E., Shulhevich, Y., Sticht, C., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Pill, J., Schmitt, R. and Melk, A. (2013) 'Reliability of Transcutaneous Measurement of Renal Function in Various Strains of Conscious Mice', *PLOS ONE*, 8(8):e71519.

Schock-Kusch, D., Sadick, M., Henninger, N., Kraenzlin, B., Claus, G., Kloetzer, H. M., Weiß, C., Pill, J. and Gretz, N. (2009) 'Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(10):2997–3001.

- Schock-Kusch, D., Xie, Q., Shulhevich, Y., Hesser, J., Stsepankou, D., Sadick, M., Koenig, S., Hoecklin, F., Pill, J. and Gretz, N. (2011) 'Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves.', *Kidney International*, 79(11):1254–1258.
- Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N. and Schock-Kusch, D. (2012) 'Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice', *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 303(5):F783–F788.
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2008) 'Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit.', *Cell*, 134(6):1019–29.
- Scudieri, P., Sondo, E., Ferrera, L. and Galletta, L. J. V (2012) 'The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels.', *Experimental Physiology*, 97(2):177–83.
- Seo, Y., Lee, H. K., Park, J., Jeon, D., Jo, S., Jo, M. and Namkung, W. (2016) 'Ani9, A Novel Potent Small-Molecule ANO1 Inhibitor with Negligible Effect on ANO2', *PLOS ONE*, 11(5):e0155771.
- Seyer-Hansen, K. (1983) 'Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus.', *Kidney International*, 23(4):643–646.
- Sheridan, J. T., Worthington, E. N., Yu, K., Gabriel, S. E., Hartzell, H. C. and Tarran, R. (2011) 'Characterization of the oligomeric structure of the Ca(2+)-activated Cl- channel Ano1/TMEM16A.', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2):1381–1388.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A. and Lifton, R. P. (1996) 'Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2.', *Nature genetics*, 13(2):83–188.
- Stephan, A. B., Shum, E. Y., Hirsh, S., Cygnar, K. D., Reisert, J. and Zhao, H. (2009) 'ANO2 is the cilial calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28):11776–11781.
- Svenningsen, P., Nielsen, M. R., Marcussen, N., Walter, S. and Jensen, B. L. (2014) 'TMEM16A is a Ca(2+) -activated Cl(-) channel expressed in the renal collecting duct.', *Acta Physiologica*, 212(2):1–9.
- Tanaka, T. and Nangaku, M. (2014) 'ANO1: an additional key player in cyst growth.', *Kidney International*, 85(5):1007–9.

- Thomas-Gatewood, C., Neeb, Z. P., Bulley, S., Adebisi, A., Bannister, J. P., Leo, M. D. and Jaggar, J. H. (2011) 'TMEM16A channels generate Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in cerebral artery smooth muscle cells', *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 301(5):H1819–H1827.
- Van Vliet, B. N., McGuire, J., Chafe, L., Leonard, A., Joshi, A. and Montani, J. P. (2006) 'Phenotyping the level of blood pressure by telemetry in mice', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(11):1007–1015.
- Wang, B., Li, C., Huai, R. and Qu, Z. (2015) 'Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, contributes to spontaneous hypertension', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 82:22–32.
- Wang, M., Yang, H., Zheng, L. Y., Zhang, Z., Tang, Y. B., Wang, G. L., Du, Y. H., Lv, X. F., Liu, J., Zhou, J. G. and Guan, Y. Y. (2012) 'Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation', *Circulation*, 125(5):697–707.
- Wang, X., Breaks, J., Loutzenhiser, K. and Loutzenhiser, R. (2007) 'Effects of inhibition of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter on myogenic and angiotensin II responses of the rat afferent arteriole.', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 292(3):F999–F1006.
- Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J. S. and Offermanns, S. (2008) 'G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension.', *Nature Medicine*, 14(1):64–68.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R. S., Banegas, J. R., Giampaoli, S., Hense, H.-W., Joffres, M., Kastarinen, M., Poulter, N., Primatesta, P., Rodríguez-Artalejo, F., Stegmayr, B., Thamm, M., Tuomilehto, J., Vanuzzo, D. and Vescio, F. (2003) 'Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States.', *Journal of the American Medical Association*, 289(18):2363–2369.
- Xiao, Q., Yu, K., Perez-Cornejo, P., Cui, Y., Arreola, J. and Hartzell, H. C. (2011) 'Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21):8891–8896.
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S. R., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2012) 'TMEM16F Forms a Ca²⁺-Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation', *Cell*, 151(1):111–122.
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W.-S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.-M., Raouf, R., Shin, Y. K. and Oh, U. (2008) 'TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance', *Nature*, 455(7217):1210–1215.

Zeman, M., Petrák, J., Stebelová, K., Nagy, G., Krizanova, O., Herichová, I. and Kvetňanský, R. (2008) 'Endocrine rhythms and expression of selected genes in the brain, stellate ganglia, and adrenals of hypertensive TGR rats', in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148:308–316.

Zhang, H., Zhang, A., Kohan, D. E., Nelson, R. D., Gonzalez, F. J. and Yang, T. (2005) 'Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9406–9411.

Zhang, Q., Cao, C., Zhang, Z., Wier, W. G., Edwards, A. and Pallone, T. L. (2008) 'Membrane current oscillations in descending vasa recta pericytes.', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 294(3):F656–F666.

Zweens, J. and Frankena, H. (1981) 'An improved method for the determination of the plasma volume with Evans Blue.', *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 19(9):919–924.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachenstatistik	2
Abbildung 2: Chlorid in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur.....	8
Abbildung 3: Aktivierung und Struktur von TMEM16A in der Gefäßmuskulatur.....	10
Abbildung 4: Blutdruckentwicklung unter Niedrig- und Hochsalzdiät bei TMEM16A-KO	17
Abbildung 5: Zeitstrahl Standarddiät	21
Abbildung 6: Zeitstrahl Salzdiät.....	22
Abbildung 7: Zeitstrahl Furosemidgabe	24
Abbildung 8: Telemetriesender der Firma DSI & Op-Situs Senderimplantation.....	27
Abbildung 9: Vorbereitung GFR-Messung & Maus während der GFR-Messung.....	29
Abbildung 10: Beispielkurve einer GFR-Messung am PC.....	30
Abbildung 11: Eichkurven Plasmavolumenbestimmung	32
Abbildung 12: Echokardiographische Messungen.....	35
Abbildung 13: Gewichtsentwicklung bei Standard und Salzdiäten	42
Abbildung 14: Trinkmenge unter Standard- und Salzdiät.....	43
Abbildung 15: Bestimmung der GFR unter Standarddiät	45
Abbildung 16: GFR-Vergleich vor und während Salzdiät.....	46
Abbildung 17: Herz- und Nierengewichte unter Salzdiät	47
Abbildung 18: Auswertung der Hormone des RAAS & ANP	49
Abbildung 19: Plasmavolumen bei Standard-, Niedrig- und Hochsalzdiät	51
Abbildung 20: Gewichtsverlauf und Trinkmengenbestimmung unter Furosemidgabe.....	54
Abbildung 21: Mittlerer arterieller Blutdruck vor bzw. während Furosemidgabe.....	56
Abbildung 22: Entwicklung des mittleren Blutdrucks unter der Gabe von Furosemid	57
Abbildung 23: Blutdruck und Aktivität unter Furosemid im Wochenverlauf	58
Abbildung 24: Entwicklung des mittleren Blutdrucks unter der Gabe von Furosemid	59
Abbildung 25: Herz- und Nierengewichte unter Furosemidgabe	60
Abbildung 26: Echokardiographische Messungen bei Furosemidapplikation.....	62
Abbildung 27: Renin, Aldosteron und ANP Messung unter Furosemidgabe	64
Abbildung 28: Plasmavolumenbestimmung unter Furosemidgabe.....	67
Abbildung 29: Bestimmung der GFR vor und während der Furosemidgabe.....	68
Abbildung 30: Quantifizierung von TMEM16A mRNA in der Aorta	69
Abbildung 31: Vergleich von Telemetriedaten verschiedener Versuchsprotokolle.....	77
Abbildung 32: Hypothese: Blutdruckkompensation durch Überexpression von TMEM16A	79
Abbildung 33: Evaluation der Evans Blue Plasmavolumenmessung.....	84

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien der arteriellen Hypertonie nach WHO-Klassifikation	3
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Medikamente und Chemikalien.....	37
Tabelle 3: Auflistung der zur Versuchsdurchführung verwendeten Utensilien und Geräte	38
Tabelle 4: Ergebnisse der Blutgasanalyse nach siebentägiger Furosemidgabe	65
Tabelle 5: Resultate der Kreatinin- und Elektrolytanalysen im Urin	66

12 Danksagung

Ich möchte allen Personen danken, die die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Anika Seniuk, die mich die ganze Zeit hinweg intensiv betreut hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, auch wenn mal etwas nicht so gelaufen ist, wie ich es mir gewünscht hätte. Ich bedanke mich auch recht herzlich bei Herrn Prof. Ehmke für die Überlassung des Themas, die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Materialien und vieles mehr sowie den intellektuellen Austausch.

Mein weiterer Dank geht an alle Kollegen des Instituts und meine Mitdoktoranden, mit denen ich viele schöne Momente hatte und die mir auch einige Tipps für meinen weiteren Werdegang mitgegeben haben. Außerdem an Peter Bassalay für die Durchführung der Echokardiographie. In diesem Zusammenhang möchte ich zwei Personen nochmal besonders hervorheben, zum einen Fr. Dr. Helga Vitzthum mit der wir so manche „Denksackgasse“ lösen konnten und zum anderen unsere MTA Telse Kock die uns bei den Hormonbestimmungen sehr unterstützt hat. Ich möchte mich auch für all die Unterstützung von außerhalb des Instituts bedanken, um alle aufzuzählen wären es einfach zu viele.

Zum Schluss geht mein größter Dank an meine Frau und meine Familie, die vieles möglich machten und mich durchgehend unterstützt haben dieses Projekt zu meistern.

13 Lebenslauf

14 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: