

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. H. Ehmke

## **Blutdruckrelevante Folgen eines induzierten Knockouts des Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporters 1 (NKCC1) in der glatten Gefäßmuskulatur der Maus**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

**Claudius Steffen**

aus Hamburg

Hamburg 2017

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.07.2017**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm**



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I Fragestellung .....</b>                                                                    | <b>1</b>  |
| <b>II Einleitung .....</b>                                                                      | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Hypertonie in der Bevölkerung .....</b>                                                 | <b>2</b>  |
| <b>2.2. Regulation des Blutdrucks .....</b>                                                     | <b>3</b>  |
| 2.2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....                                            | 4         |
| 2.2.2. Rolle der Niere bei der Regulation des Blutdrucks .....                                  | 7         |
| 2.2.3. Rolle der Gefäße bei der Regulation des Blutdrucks .....                                 | 8         |
| <b>2.3. Der Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter Typ 1 (NKCC1) .....</b>                      | <b>11</b> |
| 2.3.1. Expression von NKCC1 und NKCC2 .....                                                     | 12        |
| 2.3.2. Molekularer Aufbau des NKCC1 .....                                                       | 13        |
| 2.3.3. Regulation der NKCC1-Aktivität .....                                                     | 14        |
| 2.3.4. Eigenschaften des NKCC1 .....                                                            | 15        |
| 2.3.5. Blutdruckspezifische Eigenschaften des NKCC1 .....                                       | 17        |
| <b>III Materialien und Methoden .....</b>                                                       | <b>20</b> |
| <b>3.1. Substanzen und Lösungen .....</b>                                                       | <b>20</b> |
| <b>3.2. Geräte .....</b>                                                                        | <b>21</b> |
| <b>3.3. Instrumente und Materialien .....</b>                                                   | <b>22</b> |
| <b>3.4. Verwendete Mäuse und Prinzip des induzierten Knockouts .....</b>                        | <b>24</b> |
| <b>3.5. Auswahl, Behandlung und Haltung der Versuchstiere .....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>3.6. Versuchsprotokolle und Verwendung von Substanzen .....</b>                              | <b>27</b> |
| 3.6.1. Versuchsprotokoll hämodynamische Messungen .....                                         | 27        |
| 3.6.2. Versuchsprotokoll Hormonbestimmungen .....                                               | 27        |
| 3.6.3. Versuchsprotokoll zur Bestimmung des Wasser- und Elektrolytstatus .....                  | 28        |
| 3.6.4. Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Herz- und Nierenfunktion .....                      | 28        |
| 3.6.5. Verwendung von Substanzen .....                                                          | 28        |
| <b>3.7. Hämodynamische Messung mittels Telemetrie .....</b>                                     | <b>29</b> |
| 3.7.1. Implantation der Telemetriesender .....                                                  | 29        |
| 3.7.2. Telemetrische Messung von Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz .....                    | 31        |
| <b>3.8. Implantation osmotischer Minipumpen und DOCA Pellets .....</b>                          | <b>31</b> |
| <b>3.9. Hormonbestimmung .....</b>                                                              | <b>32</b> |
| 3.9.1. Mauskonditionierung für Hormonbestimmung .....                                           | 32        |
| 3.9.2. Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von Aldosteron- und Reninaktivität im Plasma ..... | 33        |
| 3.9.3. Quantifizierung der Renin-mRNA .....                                                     | 34        |
| 3.9.4. Bestimmung der ANP-Spiegel .....                                                         | 34        |
| <b>3.10. Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels FITC-Sinistrin .....</b>     | <b>34</b> |

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.11. Metabolischer Käfig.....</b>                                                                                           | <b>36</b> |
| 3.11.1. Durchführung des Protokolls .....                                                                                       | 36        |
| 3.11.2. Elektrolytmessung in Plasma, Urin und Kot.....                                                                          | 37        |
| 3.11.3. Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels Kreatinin-Clearance in 24-Stunden-Sammelurin und Plasma ..... | 37        |
| <b>3.12. Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue.....</b>                                                                        | <b>38</b> |
| <b>3.13. Echokardiographie.....</b>                                                                                             | <b>38</b> |
| <b>3.14. Organentnahme .....</b>                                                                                                | <b>38</b> |
| <b>3.15. Retrobulbäre Blutentnahme und Blutgasanalyse (BGA) .....</b>                                                           | <b>39</b> |
| <b>3.16. Histologie.....</b>                                                                                                    | <b>39</b> |
| 3.16.1. Auswertung der Aortenschnitte .....                                                                                     | 40        |
| 3.16.2. Auswertung der Herzschnitte.....                                                                                        | 40        |
| <b>3.17. Programme und Statistik.....</b>                                                                                       | <b>40</b> |
| <b>IV Ergebnisse.....</b>                                                                                                       | <b>41</b> |
| <b>4.1. Einfluss des Knockouts auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz .....</b>                                              | <b>41</b> |
| 4.1.1. Blutdruck.....                                                                                                           | 42        |
| 4.1.2. Aktivität .....                                                                                                          | 47        |
| 4.1.3. Herzfrequenz.....                                                                                                        | 50        |
| <b>4.2. Einfluss des Knockouts auf Histologie der Aorta.....</b>                                                                | <b>52</b> |
| <b>4.3. Einfluss des Knockouts auf Blutdruckregulation .....</b>                                                                | <b>54</b> |
| 4.3.1. Folgen einer Hoch-/ Niedrigsalzdiät.....                                                                                 | 54        |
| 4.3.2. Folgen einer AT1-Rezeptor-Blockade mittels Losartan .....                                                                | 57        |
| 4.3.3. Einfluss des Knockouts auf blutdruckrelevante Hormone.....                                                               | 59        |
| <b>4.4. Einfluss des Knockouts auf Nierenfunktion .....</b>                                                                     | <b>60</b> |
| 4.4.1. Blutgasanalyse .....                                                                                                     | 60        |
| 4.4.2. Nierenfunktion .....                                                                                                     | 61        |
| <b>4.5. Einfluss des Knockouts auf Herzfunktion und Morphologie.....</b>                                                        | <b>63</b> |
| 4.5.1. Echokardiographie .....                                                                                                  | 63        |
| 4.5.2. Atriales natriuretisches Peptid .....                                                                                    | 64        |
| 4.5.3. Ventrikelgewichte .....                                                                                                  | 65        |
| 4.5.4. Morphologie des Herzens (Fibrose).....                                                                                   | 65        |
| <b>4.6. Blutdrucksteigerung durch chronische Angiotensin II-Verabreichung .....</b>                                             | <b>66</b> |
| 4.6.1. Telemetrische Messungen unter Angiotensin II .....                                                                       | 66        |
| 4.6.2. Morphologische Analyse von Gefäßen und Herzen unter Angiotensin II.....                                                  | 70        |
| <b>4.7. Blutdrucksteigerung durch chronische DOCA + Salz-Verabreichung.....</b>                                                 | <b>74</b> |
| 4.7.1. Telemetrische Messungen.....                                                                                             | 74        |
| 4.7.2. Morphologische Analyse von Gefäßen und Herzen .....                                                                      | 78        |
| <b>4.8. Einfluss von Tamoxifen auf Körpergewicht und Tibialänge .....</b>                                                       | <b>82</b> |

|                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>V Diskussion.....</b>                                                                                                                     | <b>84</b>  |
| <b>5.1. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für den Blutdruck.....</b>                                                         | <b>84</b>  |
| 5.1.1. Zusammenfassung und Bewertung der blutdruckrelevanten Folgen des spezifischen<br>NKCC1-Knockouts in der glatten Gefäßmuskulatur ..... | 84         |
| 5.1.2. Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Diskussion.....                                                                             | 92         |
| 5.1.3. Tamoxifen-Effekte: Der spannende Nebenbefund .....                                                                                    | 96         |
| <b>5.2. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur bei art. Hypertonie .....</b>                                                      | <b>97</b>  |
| 5.2.1. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für die Wirkung von Angiotensin II<br>.....                                         | 97         |
| 5.2.2. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für die Wirkung des DOCA + Salz-<br>Modells .....                                   | 100        |
| <b>5.3. Ausblick.....</b>                                                                                                                    | <b>103</b> |
| <b>VI Zusammenfassung .....</b>                                                                                                              | <b>104</b> |
| <b>VII Summary .....</b>                                                                                                                     | <b>105</b> |
| <b>VIII Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                                      | <b>106</b> |
| <b>IX Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                         | <b>110</b> |
| <b>X Danksagung.....</b>                                                                                                                     | <b>121</b> |
| <b>XI Curriculum vitae.....</b>                                                                                                              | <b>122</b> |
| <b>XII Eidesstattliche Versicherung.....</b>                                                                                                 | <b>123</b> |

## I Fragestellung

Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass der ubiquitär exprimierte Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter Typ 1 (NKCC1) einen entscheidenden Einfluss auf den Blutdruck hat. In der glatten Gefäßmuskulatur scheint er maßgeblich den Muskeltonus durch die Aufrechterhaltung einer hohen intrazellulären Chloridkonzentration zu regulieren und könnte somit an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie beteiligt sein.

Bislang wurden lediglich globale Knockoutmäuse untersucht oder pharmakologische Interventionen durchgeführt, um den genauen Einfluss des NKCC1 auf den Blutdruck zu untersuchen. Dabei konnten insbesondere renal bedingte Effekte des NKCC1 und seine Wirkung im Gefäßsystem nicht differenziert betrachtet werden (Orlov et al. 2010). Anhand eines durch Tamoxifen-induzierten, spezifischen Knockouts des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur gilt es nun herauszufinden, welche blutdruckrelevanten Folgen ein dortiges Fehlen des Transporters mit sich führt und ob der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur ein potenzielles Target für pharmakologische Interventionen zur Behandlung der Hypertonie darstellen könnte. Insbesondere sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Kommt es durch den spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur induzierten Knockout des NKCC1 zu einem langfristigen Blutdruckabfall?
2. Ist ein festgestellter Blutdruckabfall primär vaskulär bedingt oder tragen kardiale, hormonelle oder renale Effekte durch einen direkten Knockouteinfluss oder kompensatorisch aufgrund einer Hypotonie zu einer Blutdruckveränderung bei?
3. Spielt der NKCC1 eine Rolle bei der Angiotensin II oder DOCA + Salz-vermittelten Hypertonie?
4. Kann in diesem Modell eine Einflussnahme der Substanz Tamoxifen auf die beobachteten Ergebnisse ausgeschlossen werden?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden zwei Mauslinien jeweils mit und ohne Gabe von Tamoxifen untersucht. In der einen Mauslinie ( $Cre^+$ ) führte die Tamoxifen-Gabe zum Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur, während in der anderen Linie ( $Cre^-$ ) der NKCC1 trotz Tamoxifen-Gabe im Genom erhalten blieb. Zur Analyse des Blutdrucks wurden invasive telemetrische Blutdruckmessungen im Aortenbogen angewandt. Die Überprüfung blutdruckregulierender Effekte wurde durch die Bestimmung des Hormonstatus, der Elektrolyte und Blutgase, Messungen der glomerulären Filtrationsrate und des Plasmavolumens sowie durch Echokardiographien durchgeführt. Außerdem erfolgten Gewichtsbestimmungen und Tibialängenmessungen zur Normierung und histologische Analysen zur Erkennung von Endorganschäden.

## II Einleitung

### 2.1. Hypertonie in der Bevölkerung

Laut der Weltgesundheitsbehörde (WHO) sind kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die führende Todesursache. Es ist davon auszugehen, dass im Jahr 2008 geschätzt 17,3 Millionen Menschen daran verstarben, was einen Anteil von 30 % an allen Verstorbenen in dem Jahr ausmacht (WHO 2011). Für das Jahr 2030 wird gar ein Anstieg auf 23,3 Millionen erwartet (Mathers und Loncar 2006). Neben den ischämischen Herzerkrankungen und den zerebrovaskulären Erkrankungen werden auch periphere arterielle Erkrankungen als eine weitere Untergruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen maßgeblich negativ durch eine Hypertonie beeinflusst. Somit war Bluthochdruck im Jahr 2010 der weltweit folgenreichste Risikofaktor für Krankheitsbelastungen - noch schwerwiegender als Rauchen und Alkohol (Lim et al. 2012). Auch in Deutschland liegt die Prävalenz der Hypertonie unter den 18- bis 79-jährigen bei ungefähr 30 %, im Bereich der 70- bis 79-jährigen sogar bei 75 % (Neuhauser et al. 2013). Als Bluthochdruck werden systolische Blutdruckwerte von über 140 mmHg oder diastolische Blutdruckwerte von über 90 mmHg klassifiziert (Mancia et al. 2013).

Die Zahlen veranschaulichen die Relevanz dieser Thematik und die Notwendigkeit der Einstellung der Blutdruckwerte auf risikoärmere Bereiche. Allein die Senkung des systolischen Blutdrucks um 10 mmHg senkt das Risiko für Schlaganfälle um 50-60 % und für einen Tod durch die koronare Herzkrankheit oder anderer Gefäßerkrankungen um 40-50 % (Rosendorff et al. 2007). Da jedoch nur in seltenen Fällen die Ursachen in einer sogenannten sekundären Hypertonie wie zum Beispiel einer Nierenarterienstenose oder einem Phäochromozytom liegen, handelt es sich bei circa 95 % aller Hochdruckpatienten um eine essentielle Hypertonie (Carretero und Oparil 2000), welche nur symptomatisch behandelbar ist. Das wiederum verdeutlicht das Forschungspotenzial und die Forschungsrelevanz auf diesem Gebiet.

Zwar gibt es bereits eine Reihe von unterschiedlichen gut wirksamen Antihypertensiva, dennoch ist die fortwährende Grundlagenforschung im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems von großer Bedeutung, um weitere Ursachen des Hypertonus und neue Angriffspunkte für eine gezieltere, kausale und möglicherweise nebenwirkungsärmere medikamentöse Therapie zu finden.

## 2.2. Regulation des Blutdrucks

Als Blutdruck versteht man den Druck, welcher in einem bestimmten Bereich eines Gefäßsystems des Körpers herrscht und somit für die Aufrechterhaltung der Blutzirkulation sorgt. Als klinisch besonders relevanter Blutdruck gilt der arterielle Mitteldruck, welcher durch verschiedene invasive und nicht-invasive Methoden bestimmt werden kann (Dieterle 2012). Abgeleitet vom Ohmschen Gesetz bildet sich der mittlere arterielle Druck (MAD) aus dem Herzzeitvolumen (HZV) und dem totalen peripheren Widerstand (TPR) (Prasso et al. 2005).

$$\text{MAD} = (\text{HZV} \times \text{TPR})$$

Während das Herzzeitvolumen von Schlagvolumen und Herzfrequenz abhängig ist, wird der totale periphere Widerstand durch Veränderungen der Gefäßelastizität oder vom Gefäßtonus im arteriellen System maßgeblich beeinflusst.

Zur Gewährleistung einer individuellen und angepassten Blutdruckregulation können die oben genannten Stellglieder zielgerichtet verändert werden und somit auch einzelne Gefäßabschnitte separat reguliert werden. Grundsätzlich kann die Blutdruckregulation über nervale und hormonelle Faktoren, sowie über morphologische Veränderungen des Herzens und des Gefäßsystems erfolgen.

Zeitlich kann man kurzfristige, mittelfristige und langfristige Regulationssysteme differenzieren, deren Übergang allerdings fließend ist. Innerhalb von Sekunden stellt der Barorezeptorreflex die wichtigste Steuereinheit dar. Die am Karotissinus und am Aortenbogen gelegenen Barorezeptoren leiten Informationen über den Dehnungszustand der Gefäße durch Alternation der Impulsfrequenz an die Medulla oblongata weiter. Bei einem Blutdruckabfall beispielsweise, kommt es somit zu einer Barorezeptor getriggerten sympathischen und parasympathischen Beeinflussung des Gefäßtonus und der Herzaktivität, sodass der Blutdruck normalisiert werden kann (Wehrwein und Joyner 2013).

Die mittelfristige Einstellung des Blutdrucks basiert neben den beschriebenen nervalen Mechanismen insbesondere auf einer hormonellen Regulation durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Hormone aus der Familie der natriuretischen Peptide (Ruskoaho et al. 1997), Endotheline (Kohan et al. 2011) und Stickstoffmonoxid (NO) (Forstermann und Sessa 2012). Darüber hinaus tragen die passive Gefäßausdehnung im Falle einer intravasalen Volumenzunahme, sowie Flüssigkeitsverschiebungen in den interstitiellen Raum zur mittelfristigen Blutdruckregulation bei (Cowley 1992).

Die langfristige Blutdruckregulation stellt sich in der Wissenschaft als noch nicht vollständig geklärt heraus. Zwar geht man aufgrund von Experimenten, welche die Denervierung von Pressorezeptoren bewirken, eher davon aus, dass diese im Gegensatz zur kurzfristigen Blutdruckregulation einen geringeren Einfluss auf die langfristige Einstellung haben (Persson et al. 1987), dennoch sind die experimentellen Daten hier umstritten (Cowley 1992, Thrasher 2004, Thrasher 2006). Vielmehr scheint die Niere durch die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts die wesentliche Rolle in der langfristigen Blutdruckregulation zu spielen (Guyton 1991, Ivy und Bailey 2014). Mit Hilfe der auf die Nieren wirkenden Systeme und Hormone, wie das renale Volumenregulationssystem, das Antidiuretischen-Hormon-System (ADH-System), das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die natriuretischen Peptide und die Nierensympathikusaktivität (Kopp 2011, Kurtz 2011) kann beispielsweise ein Überschuss an extrazellulärem Volumen langfristig reguliert werden (Birbaumer und Schmidt 2003).

### **2.2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

In der mittelfristigen und vermutlich auch langfristigen Blutdruckregulation stellt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) die vermeintlich wichtigste Steuereinheit in der Regulation des Blutdrucks dar. Im Falle eines Blutdruckabfalls werden über einen mehrschrittigen Prozess die Hormone Angiotensin II und Aldosteron gebildet, was zu einer Normalisierung des Blutdrucks führen soll. Das in der Leber gebildete Angiotensinogen wird durch das in der Niere gebildete Renin in das Dekapeptid Angiotensin I umgewandelt. Dieses wiederum wird durch das aus Lunge und Niere stammende Angiotensin-converting enzyme (ACE) zum Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) gespalten, welches über verschiedene Mechanismen, unter anderem auch durch die Freisetzung von Aldosteron, für eine Blutdruckelevation sorgt (Moon 2013).

#### **2.2.1.1. Renin**

Das proteolytische Enzym Renin stellt die unterste Stufe des Systems dar und ist verantwortlich für die Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen. Seine Ausschüttung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere wird durch eine Vielzahl von Prozessen getriggert.

Die bedeutendste Rolle scheint die Detektion einer Hypotonie sowie eine erhöhte Natrium-Chlorid-Konzentration im Urin/Primärharn zu spielen. Man geht davon aus, dass Barorezeptoren der afferenten Arteriolen über die Feststellung des Blutdrucks und die Macula densa der Niere über die Kontrolle der Natrium-Chlorid-Konzentration die Reninausschüttung steuern und somit einer Hypertonie entgegenwirken können (Kurtz 2011).

Außerdem sind eine Reihe weiterer äußerer Faktoren bekannt, welche die Reninfreisetzung beeinflussen könnten. Hierzu zählen insbesondere die Sympathikusaktivierung, sowie die bei

Sympathikusaktivierung ausgeschütteten Katecholamine (Kurtz 2012), Dopamin (Hackenthal et al. 1990), Renin-stimulierenden Neuropeptide (Porter et al. 1983), Prostaglandine (Jensen et al. 1996), Angiotensin II (Edwards und Stack 1993), atriales natriuretisches Peptid (ANP) (Kurtz et al. 1986) und NO (Kurtz und Wagner 1998).

Die vesikuläre Freisetzung über die oben genannten Mechanismen wird intrazellulär durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), die Kalziumkonzentration und durch cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) reguliert (Kurtz 2012). (Kurtz 2011). (Kurtz et al. 1986, Kurtz et al. 1998). Des Weiteren wird auch dem Membranpotenzial eine entscheidende Rolle zugerechnet, da Experimente gezeigt haben, dass eine Hyperpolarisation der Zelle zu einer erhöhten Reninausschüttung führt (Castrop et al. 2005).

#### **2.2.1.2. Angiotensin**

Das aufgrund von Renin systemisch gebildete Angiotensin II wird als potentester Teil des RAAS zur Regulation des Blutdrucks und der intravasalen Volumina gezählt. Zu seinen Angriffspunkten zählen Herz, Gefäßsystem, Nervensystem, Verdauungsorgane, Haut, Reproduktionstrakt, Nebennieren, Fettgewebe und insbesondere die Nieren (Paul et al. 2006, Yim und Yoo 2008). Neben seinem oben beschriebenen Syntheseprozess aus Angiotensin I über das ACE werden zusätzlich einige andere Produktionswege angenommen, von denen eine Chymase-vermittelte Bildung aufgrund seiner hohen Substratspezifität als besonders relevant angesehen wird (Urata et al. 1996, Arakawa und Urata 2000). Neben dem am Besten untersuchten Ang II ist außerdem das Angiotensin 1-7 bekannt, das der Wirkung von Ang II entgegen zu wirken scheint (Santos et al. 2000).

Die Wirkungsentfaltung von Ang II beruht auf der Bindung an Guaninnucleotid-bindendes Protein (G-Protein)-gekoppelten Rezeptoren. Hier sind vor allem zwei Rezeptoren, der Angiotensin-Rezeptor-Typ 1 (AT<sub>1</sub>) und der Angiotensin-Rezeptor-Typ 2 (AT<sub>2</sub>), von Relevanz (de Gasparo et al. 2000). Die meisten bekannten Wirkungen entfaltet Ang II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor, der in zwei Subtypen unterteilt wird, den AT<sub>1A</sub>- und AT<sub>1B</sub>-Rezeptor (Iwai und Inagami 1992). Die genaue Funktion des AT<sub>2</sub>-Rezeptors ist unsicherer (Unger 1999).

Abbildung 1 veranschaulicht die besondere Relevanz des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, über den Angiotensin II beispielsweise renale Effekte wie eine Inhibierung der Reninfreisetzung oder eine über die Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde vermittelte Natrium- und Wasserretention hervorruft. Daneben können auch extrarenale Effekte wie insbesondere eine Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße oder Inotropiesteigerung des Herzens vermittelt werden und zu einem Blutdruckanstieg führen (Santos et al. 2005).

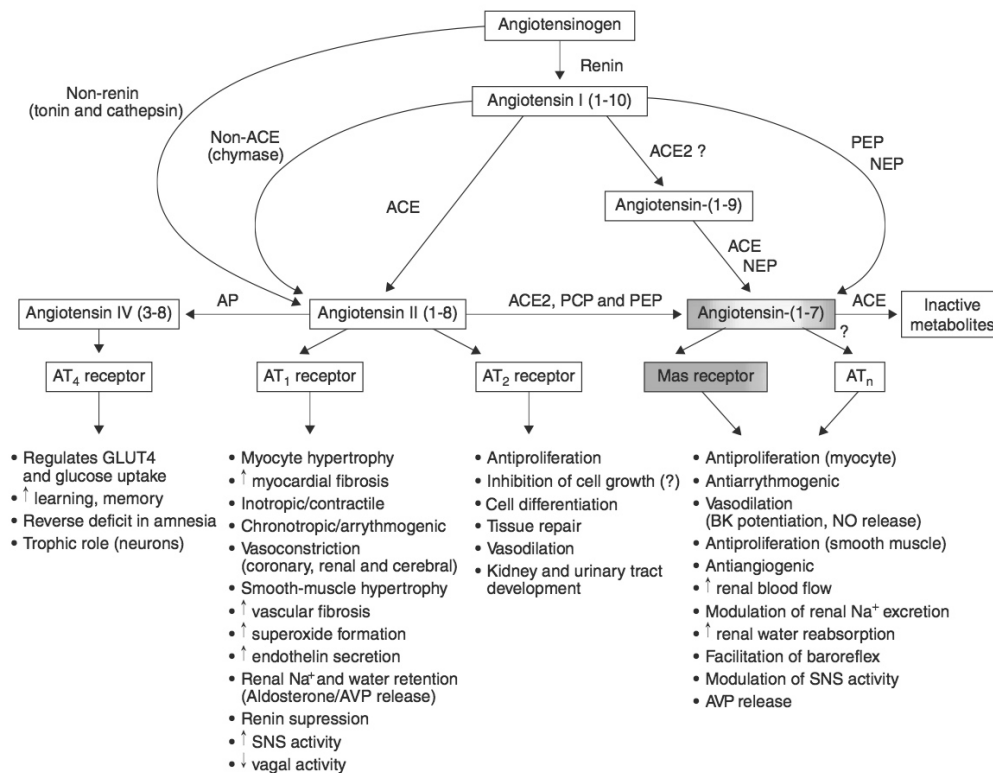


Abb. 1: Wirkungen von Angiotensin im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Modifiziert nach: (Santos et al. 2005)

### 2.2.1.3. Aldosteron

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird durch Ang II-Stimulus von den Nebennieren produziert und sorgt für die Homöostase von Flüssigkeit und Elektrolyten.

In der äußersten Schicht der Nebenniere, der Zona glomerulosa, erfolgt die Biosynthese ausgehend vom Cholesterin durch mehrere enzymatische Stufen. Vermittelt durch das Steroidogenic acute regulatory protein (StAR-Protein) sowie durch das Cytochrom-P450-Enzym CYP11A1 wird Cholesterin in Pregnenolon umgewandelt und schließlich durch die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD3B2) in das gemeinsame Ausgangsprodukt für die Aldosteron- beziehungsweise die Cortisolproduktion, das Progesteron, umgewandelt. Durch vier weitere Cytochrom-P450-Enzymschritte, unter anderem durch CYP11B2, wird das Progesteron schließlich in Aldosteron umgewandelt (Hattangady et al. 2012).

Bei der Sekretion unterscheidet man zwischen einer akuten (Minuten) und einer chronischen (Stunden bis Tage) Sekretion. Während die akute Sekretion („early regulatory step“) durch schnelle Signalkaskaden gesteuert wird und von einer vermehrten Expression und Phosphorylierung des StAR-Proteins abhängig ist, wird die chronische Produktion („late regulatory step“) von der Expression des P450-Enzyms CYP11B2 reguliert, welches die Expression der an der Aldosteronsynthese beteiligten Enzymen kontrolliert (Hattangady et al. 2012).

Die Steuerung der für die Aldosteronsekretion verantwortlichen Einheiten erfolgt hauptsächlich durch Ang II, Plasmakalium und das Adrenokortikotrope Hormon (ACTH) (Hattangady

et al. 2012). Ang II sorgt über die Bindung an den AT1-Rezeptor mittels einer Signalkaskade über die Phospholipase C und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat (PIP<sub>2</sub>) für die Generierung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Über eine IP<sub>3</sub>-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sorgt Ang II somit für eine Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen I und IV (CaMK I/IV) (Hattangady et al. 2012). Diese führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Aktivierung von Promotorregionen des CYP11B2-Gens und zur vermehrten Transkription der Aldosteronsynthase, was schließlich zu einer erhöhten Aldosteronkonzentration führt (Beuschlein 2013). Auch DAG soll über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) für eine Stimulation der Aldosteronproduktion sorgen (Kapas et al. 1995).

### **2.2.2. Rolle der Niere bei der Regulation des Blutdrucks**

Das zuvor beschriebene RAAS als Teil der mittel- und langfristigen Blutdruckregulation hat neben seinem Ursprung in der Niere also auch einen maßgeblichen Einfluss auf die Nierenfunktion.

Die Relevanz der Niere bei der Blutdruckregulation erkannte auch der Physiologe Arthur C. Guyton. Laut seiner Theorie wird der Blutdruck langfristig durch die Volumenregulationsfunktion der Niere gesteuert. Im Normalzustand herrscht ein gesundes Gleichgewicht zwischen Volumen- und Salzaufnahme und deren Ausscheidung. Die Fähigkeit der Niere auf jegliche Blutdruckveränderungen durch eine Regulation des Volumen- und Salzhaushaltes zu reagieren und somit den Blutdruck wieder auf den Ausgangswert zu bringen bezeichnet Guyton als „infinite gain“ (Guyton 1989). Demnach kann eine langfristige Blutdruckerhöhung nur durch eine Störung dieses Gleichgewichtes entstehen (Ivy und Bailey 2014). Es werden zwei Möglichkeiten für eine derartige Störung in Betracht gezogen: eine pathophysiologische Veränderung der Nierenfunktion oder eine erhöhte Volumen- und Salzaufnahme. Beispielsweise würde bei einer geringeren Nierenmasse und demnach einer geringeren Filtrationsfunktion ein höherer Blutdruck von Nöten sein, um die Volumenregulation zu gewährleisten. Insgesamt schließt Guyton eine primäre Erhöhung des totalen peripheren Gefäßtonus für die Entstehung einer chronischen Hypertonie ohne das gleichzeitige Auftreten einer der beiden oben genannten Störungen aus, da bei intakter Nierenfunktion nach dem Prinzip des „infinite gain“ der Blutdruck wieder auf Normallevel gebracht werden müsste (Guyton 1989).

Auch Experimente anderer Gruppen untermauerten die von Guyton beschriebene Relevanz der Niere. Die Gruppe um Hall verdeutlichte insbesondere die entstehende Problematik bei einer fehlenden Detektion der Niere von Volumen-/ Salzüberschüssen im zentralen Kreislauf durch Experimente an Hunden. Dort wurde ein System verwendet, welches es ermöglichte,

jegliche Abweichungen des systemischen Blutdrucks von der Norm direkt und ausschließlich vor der Nierenarterie auszugleichen, sodass trotz einer systemischen Blutdruckerhöhung ein normaler Blutdruck in den Nierenarterien herrschte. Bei systemischer Aldosterongabe kam es somit zu einer sukzessiven volumenbedingten Zunahme des Blutdrucks, da durch die ausschließliche Abpufferung vor der Nierenarterie keine Gegenregulation durch die Nieren erfolgte, sodass die Versuche schließlich aufgrund zu hoher systemischer Blutdruckwerte abgebrochen werden mussten (Hall et al. 1984). Und auch in Transplantationsstudien konnte ein genetischer Einfluss der Nieren auf die Entstehung von Bluthochdruck nachgewiesen werden (Rettig und Grisk 2005). Diese Ergebnisse verdeutlichen also die bis heute unstrittige Relevanz der Niere bei der Einstellung des Blutdrucks.

Die renale Volumenregulation erfolgt durch eine Vielzahl an Prozessen. Neben dem Renin-Angiotensin-System spielt die renale Sympathikusaktivität eine besondere Rolle bei der Drucknatriurese (Kubota et al. 1993). Als wichtiger Teil der renalen Volumenregulation zählt auch die renale Regulation von Natriumkanälen und -transportern, welche durch parakrine oder biophysikalische Prozesse gesteuert wird.

Einer dieser Transporter ist der Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter Typ 2 (NKCC2) im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Dieser wird durch Adenosintriphosphat (ATP) und NO reguliert (Ivy und Bailey 2014) und trägt entscheidend zur Natriumresorption bei.

Eine Inhibition des NKCC2, beispielsweise durch endogenes NO, führt zu einer gestörten Natriumrückresorption, sodass es zu einer Natriurese und dadurch folgenden Blutdruckabnahme kommt. Die entscheidenden Funktionen des Transporters werden auch bei einer loss-of-function Mutation des für den NKCC2 codierenden SLC12A1-Gens, dem sogenannten Bartter-Syndrom Typ I, deutlich. Patienten mit Bartter-Syndrom leiden an einer Reduktion des Plasmavolumens und einer damit einhergehenden Hypotension, Polyurie, Hyponatriämie, Hypochloridämie, Hypokaliämie, Magnesiurie, einer metabolischen Alkalose und einer Hyperkalziurie (Markadieu und Delpire 2014). Eine gleiche Symptomatik wurde in globalen NKCC2-Knockoutmäusen beschrieben (Takahashi et al. 2000). Neben seiner Lokalisation im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) trägt der NKCC2 auch einen entscheidenden Anteil an dem tubuloglomerulären Feedback durch seine Expression in der Macula densa und seiner Rolle der dortigen Natriumchloriddetektion (Peti-Peterdi und Harris 2010).

### **2.2.3. Rolle der Gefäße bei der Regulation des Blutdrucks**

Unabhängig von der von Guyton beschriebenen Relevanz der Niere spielt aber auch das Gefäßsystem über die Regulation des totalen peripheren Widerstands durch die Widerstandsgefäße eine große Rolle in der Blutdruckregulation.

Die arterielle Gefäßwand ist durch ihren dreischichtigen Aufbau gekennzeichnet. Die Tunica intima enthält neben dem Bindegewebe das dem Lumen zugewandte einschichtige Endothel. Die Tunica media enthält mehrere Schichten glatter Gefäßmuskulatur und steuert dadurch den Gefäßdurchmesser. Daran angrenzend liegt die Tunica adventitia, welche Bindegewebe, Gefäße und Nervenfasern enthält (Welsch und Deller 2010).

Die Steuerung des Gefäßdurchmessers durch die glatte Muskulatur ist eng mit Änderungen der intrazellulären freien Kalziumkonzentration gekoppelt (Somlyo und Somlyo 1994). In der glatten Muskulatur bindet Kalzium an Calmodulin und formt so den Kalzium-Calmodulin-Komplex, welcher das Enzym Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Dieses sorgt für die Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin und verursacht dadurch die Muskelkontraktion durch den Querbrückenzyklus (Somlyo und Somlyo 1994).

Eine höhere intrazelluläre Kalziumkonzentration und eine daraus resultierende Gefäßkontraktion kann neben einem Einstrom aus dem Extrazellularraum ebenfalls aus einem intrazellulären Speicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) erreicht werden. Die Steuerung der Freisetzung aus dem SR erfolgt durch zwei Typen von Kalziumkanälen: den Ryanodin-Rezeptoren und den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren. Der Einstrom von extrazellulär erfolgt hauptsächlich durch spannungsabhängige L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, aber auch durch spannungsabhängige T-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Ca<sup>2+</sup>-permeable Kationenkanäle aus der Familie der TRP-Kanäle und Ligandengesteuerte, kalziumpermeable Kationenkanäle (Amberg und Navedo 2013).

Die intrazelluläre Kalziumerhöhung über ligandengesteuerte, kalziumpermeable Kationenkanäle ist ein möglicher Kontraktionsstimulus, welcher zu dem übergeordneten Begriff der pharmakomechanischen Kopplung gezählt wird und ohne eine Membranpotenzialveränderung abläuft (Somlyo et al. 1999). Als einer der wichtigsten Mechanismen der pharmakomechanischen Kopplung zählt die Kalziumfreisetzung vermittelt durch die G-Protein eingeleitete IP<sub>3</sub>-Signaltransduktion und die Regulierung der Kalziumsensitivität durch Myosin-Leichtkette 20 (MLC20)-Phosphorylierung (Somlyo und Somlyo 1994).

Daneben gilt die elektromechanische Kopplung als ein sehr relevanter Kontraktionsstimulus. Hier sort die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle bedingt durch eine Depolarisation des Membranpotenzials für einen Einstrom von Ca<sup>2+</sup> und dadurch für einen Anstieg des Gefäßmuskeltonus.

Neben den spannungsabhängigen und ligandengesteuerten Kalziumkanälen kann aber auch Ca<sup>2+</sup> selbst, zum Beispiel nach Freisetzung aus dem SR als second messenger, für die Aktivierung von kalziumgesteuerten Kalium- oder Chloridkanälen sorgen. So kann die Öffnung von kalziumgesteuerten Ionenkanälen entweder im Falle eines kalziumgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanals zu einer Hyperpolarisation oder im Falle eines kalziumgesteuerten Cl<sup>-</sup>-Kanals zu einer Depolari-

sation führen (Somlyo und Somlyo 1994). Dies verdeutlicht, dass eine Veränderung des Membranpotenzials beispielsweise durch Kalium- oder Chloridkanäle verursacht werden kann und somit in einer Veränderung des Gefäßmuskeltonus resultieren kann.

### 2.2.3.1. Chloridkanäle und Chloridtransporter in Gefäßmuskulatur

Wie zuvor beschrieben scheinen also auch Chloridkanäle und -transporter über eine Veränderung des Membranpotenzials den Gefäßmuskeltonus steuern zu können. Mit Ausnahme der GABA-/Glycin-Rezeptorfamilie wurden alle bekannten Chloridkanalfamilien auch in der glatten Gefäßmuskulatur identifiziert. Im Gegensatz zu anderen Zellen wie zum Beispiel Neuronen oder Skelettmuskulatur wird Chlorid in der glatten Gefäßmuskulatur durch mindestens zwei sekundär-aktive Transportmechanismen intrazellulär akkumuliert. Daher liegt die intrazelluläre Konzentration von Chlorid in der glatten Gefäßmuskulatur über der normalen Konzentration nach dem Donnan-Gleichgewicht, welches dann erreicht wäre, wenn Chlorid sich passiv über die Plasmamembran verteilte. Die zwei entscheidenden Transporter für den sekundär-aktiven Transport von  $\text{Cl}^-$  in den Intrazellularraum sind der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher Typ 2 (AE), sowie der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter Typ 1 (NKCC1), welcher eine Isoform des bereits vorgestellten NKCC2 ist und den in dieser Arbeit zu untersuchenden Transporter darstellt (Matchkov et al. 2013).

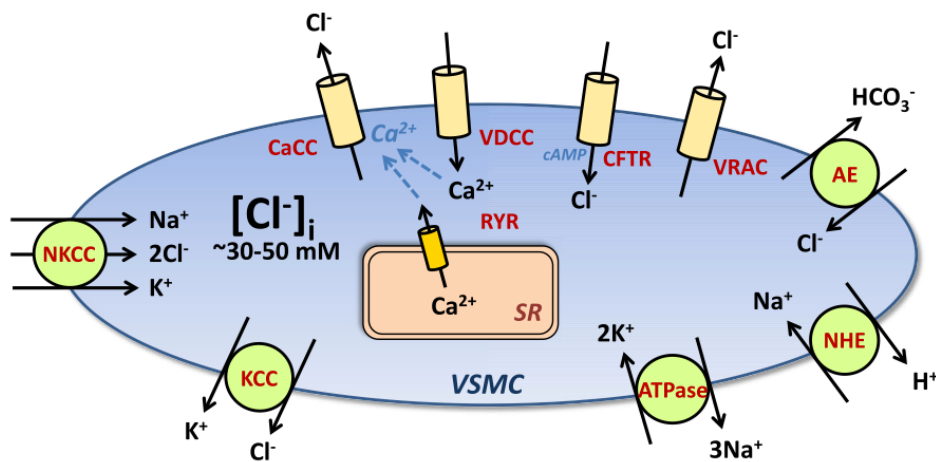


Abb. 2: Chloridhomöostase in der glatten Gefäßmuskelzelle. (Hubner et al. 2015)

Da die intrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration durch die Chloridtransporter über dem Donnan-Gleichgewicht liegt, würde die Öffnung von Chloridkanälen in einem Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  resultieren. Prinzipiell führt dies dazu, dass es im Falle einer Öffnung von Chloridkanälen und einem daraus folgenden Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  zu einer Membrandepolarisation kommt und somit, wie oben beschrieben, zu einem Anstieg des Gefäßmuskeltonus führt.

Die Chloridkanäle werden basierend auf ihren Aktivierungsmechanismen in verschiedene Gruppen unterteilt. So unterscheidet man ionotrope-, spannungsgesteuerte- (VDCC), cAMP-

regulierte, volumensensitive- (VRAC) und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte (CaCC) Chloridkanäle. Molekular betrachtet werden die Chloridkanäle in drei Familien unterteilt: Chloridkanäle (ClC), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) und die ionotrope GABA-/Glycin-Rezeptor-Chloridkanalfamilie (Jentsch et al. 2002).

Als einer der entscheidenden CaCCs in Mausexperimenten wird der TMEM16A-Kanal angesehen. Induzierte Knockoutexperimente des TMEM16A in der glatten Gefäßmuskulatur zeigten einen Blutdruckabfall, welcher auf einen geringeren Chloridausstrom aus der Zelle und somit eine Membranhyperpolarisation zurückzuführen ist (Heinze et al. 2014, Hubner et al. 2015). Während die aktivierten CaCCs also die Gefäßkontraktilität durch den Chloridausstrom und die resultierende Depolarisation zu verstärken scheinen, so ist die Wirkweise der CFTR- und ClC-Kanäle hingegen offenbar vielseitiger. Nach Aktivierung des CFTR-Kanals durch die cAMP-PKA-Phosphorylierungskaskade führte die Anwendung jener CFTR-Aktivatoren zu einer konzentrationsabhängigen Gefäßmuskelrelaxation. Auch die Funktion der ClC-Kanäle, hauptsächlich repräsentiert durch den ClC-3-Kanal, ist aufgrund seiner doppelten Funktionsmöglichkeit entweder als reiner Chloridkanal oder als  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Antiporter komplexer als die Funktion der CaCCs, denn je nach extrazellulärer  $\text{H}^+$ -Konzentration ändert sich die Funktion dieses Kanals (Matchkov et al. 2013).

Die Steuerung des Gefäßmuskeltonus ist daher stark von der Expression und der Aktivität der einzelnen Transporter und Ionenkanäle und der jeweiligen intra- und extrazellulären Ionenkonzentration abhängig. Demnach ist anzunehmen, dass ein fehlerhafter, sekundär aktiver Einwärtstransport, beispielsweise durch ein Fehlen des NKCC1, zu einer verringerten intrazellulären Chloridakkumulation führen könnte und der Transporter somit, möglicherweise auch über die Beeinflussung anderer Chloridkanäle aufgrund der dann geringeren intrazellulären Chloridkonzentration, mutmaßlich einen entscheidenden Einfluss auf das Membranpotential und somit auf den Gefäßmuskeltonus und den Blutdruck haben könnte.

### **2.3. Der Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter Typ 1 (NKCC1)**

Der NKCC1 ist, wie auch der NKCC2, als NKCC-Isoform Teil der Kation-Chlorid-Cotransporter Familie (CCC). Neben den NKCC-Transportern zählen der Na-Cl-Cotransporter (NCC), vier K-Cl-Cotransporter (KCC) und ein CCC-interagierendes Protein (CIP) ebenfalls zu der Familie der CCCs (Isenring und Forbush 2001). Alle Kation-Chlorid-Cotransporter ähneln sich in ihrer Struktur im Hinblick auf eine 12-Transmembrandomäne, sowie große hydrophile, intrazelluläre amino- und carboxyterminale Domänen. Der höchste Grad an Homologie zwischen den verschiedenen Cotransportern wird in den Transmembran-

domänen, sowie in den die Transmembrandomänen-verbindenden intrazellulären Schleifen vermutet (Haas und Forbush 2000).

Die Kation-Chlorid-Cotransporter machen sich die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  zu Nutze. Durch die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  werden durch primär-aktiven Ionentransport elektrochemische Potentiale generiert. Dies ermöglicht den Kation-Chlorid-Cotransportern einen sekundär-aktiven Transport von Chloridionen mittels der Kationentriebkraft über die Membran. Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  sorgt für den ständigen Ausgleich der durch die Chloridtransporter verursachten Ionenverschiebungen, sodass Netto eine Chloridverschiebung nach extra- beziehungsweise intrazellulär erfolgen kann (Gamba 2005).

### **2.3.1. Expression von NKCC1 und NKCC2**

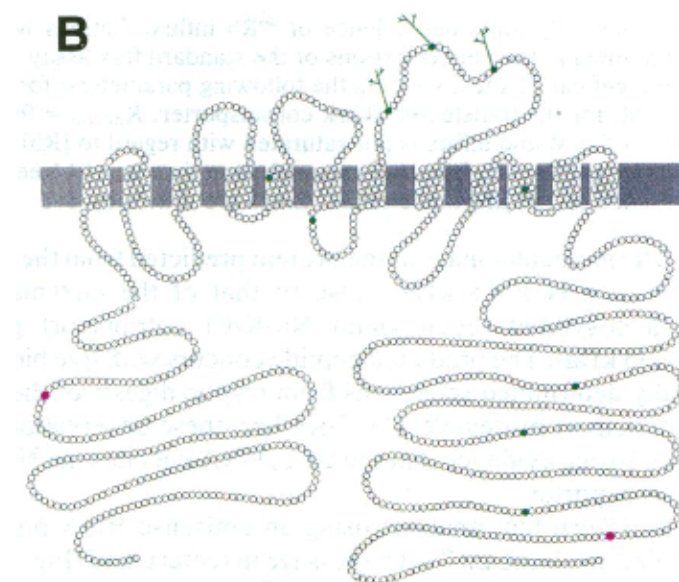
Erstmalig in Erscheinung traten die NKCC-Kotransporter in den frühen 1970er Jahren, wo Wiley und Cooper in Erythrozyten einen Cotransport von Natrium und Kalium beschrieben (Wiley und Cooper 1974). Später fanden Burg und seine Mitarbeiter heraus, dass sich die  $\text{NaCl}$ -Aufnahme im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) durch Furosemid blockieren lässt. Nachdem in den 1970er Jahren der Natrium-gekoppelte Chloridtransport anerkannt wurde, identifizierte die Arbeitsgruppe Geck 1980 einen elektroneutralen Transport von Natrium, Kalium und Chlorid in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (Geck et al. 1980, Haas 1994). Daraufhin folgte der Nachweis an einer Reihe von weiteren Zellen und Geweben. Hierzu zählen die Epithelzellen des TAL, sowie weitere renale Epithelzellen, Drüsen des Magen-Darm-Trakts, der Luftwege oder des Speichels, sowie anderer sekretorischer Epithelien. Außerdem erfolgte eine Identifizierung in Axonen des Tintenfisches, glatter Muskulatur, renalen Mesangiumzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, kultivierten T-Lymphozyten und Erythrozyten (Haas 1994). Der erste Nachweis eines Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransports in der glatten Gefäßmuskulatur erfolgte 1984 durch die Erkenntnis, dass ein Ouabain-unsensitiver Kaliumeinstrom von Schleifendiuretika gehemmt werden kann und von dem Vorhandensein von Natrium und Chlorid im Extrazellularraum abhängig ist (Owen 1984).

Der molekulare Beweis für die Existenz zweier unterschiedlicher  $\text{Na-K-2Cl}$ -Cotransporter wurde im Jahr 1994 gefunden. Somit wurde erstmals zwischen dem NKCC1 (BSC2) und dem NKCC2 (BSC1) unterschieden (Delpire et al. 1994, Gamba et al. 1994). Kurz darauf wurden ebenfalls teilweise die Gene und Exonstrukturen charakterisiert (Markadieu und Delpire 2014). Der NKCC1 wird durch das SLC12A2-Gen kodiert, welches sich auf Chromosom 5q23 befindet. Der NKCC2 wird durch das SLC12A1-Gen auf Chromosom 15q15-q21 kodiert.

Während man den NKCC2 lediglich im TAL und in der Macula densa der Niere lokalisieren konnte (Castrop und Schiessl 2014), wurde die Expression des NKCC1 in allen bisher bekannten Zellen nachgewiesen (Orlov et al. 2010). Von dem NKCC2 sind drei verschiedene Isoformen (Isoform A, B und F) bekannt, welche unterschiedliche Lokalisationen entlang des TAL und der Macula densa besitzen. Von allen drei Formen ist der NKCC2A die vorherrschende Form (Carota et al. 2010). Im Gegensatz zu dem NKCC2, welcher sich ausschließlich in der apikalen Membran von Epithelzellen befindet, wird der NKCC1 in der basolateralen Membran exprimiert, in einer ähnlichen Verteilung wie die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . Als einzige Ausnahme wird seine Existenz im Epithel des Plexus choroideus an der apikalen Membran beschrieben (Plotkin et al. 1997, Haas und Forbush 2000).

### 2.3.2. Molekularer Aufbau des NKCC1

Der NKCC1 wird aus 1212 Aminosäuren gebildet, welche zusammen eine Molekülmasse von 131,4 kDa ergeben (Markadieu und Delpire 2014). Wie auch die anderen CCCs verfügt der NKCC1 in seiner hydrophoben Region über 12 Transmembrandomänen und liegt in der Homodimerform vor. Zwischen Segment 7 und 8 enthält der NKCC1 eine große extrazelluläre Schleife. Außerdem kennzeichnen den NKCC1 große amino- (N-) und carboxyterminale (C-terminale) zytoplasmatische Domänen, welche regulatorische Regionen enthalten. Diese werden aus einigen Threonin-Aminosäuren gebildet, welche durch Phosphorylierung die Aktivität des Transporters steuern (Monette und Forbush 2012).



**Abb. 3: Molekularer Aufbau des NKCC1.** (Xu et al. 1994)

Das aminoterminal Ende weist zwischen unterschiedlichen Spezies die geringsten Aminosäureübereinstimmungen aller drei Regionen des NKCC1 auf, während das C-terminale Ende die meisten Gemeinsamkeiten aufweist. Außerdem könnte es einige hydrophobe Regionen

innerhalb des carboxyterminalen Endes geben, welche in die Zellmembran integriert werden (Russell 2000).

Eine Glykolysierung der Schleife zwischen Segment 7 und 8 scheint funktionell für die Membranexpression, die Transportaktivität und die Affinität für Schleifendiuretika relevant zu sein. Funktionell scheinen außerdem die Segmente 2 und 7 eine Rolle bei der Kationenbindung zu besitzen und die Segmente 2, 11, 12 und 3 bei der Bindung an das Schleifendiuretikum Bumetanid (Markadieu und Delpire 2014).

### **2.3.3. Regulation der NKCC1-Aktivität**

Es werden mindestens vier Regulationsmechanismen angenommen, welche die NKCC1-Aktivität kurz- und langfristig steuern. Hierzu zählt man die veränderte Genexpression, eine veränderte Expression auf Zellebene, posttranslationale Aktivierungen und Proteinphosphorylierungen.

Auf der Ebene der Genexpression zeigen sich unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen Veränderungen der NKCC1-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) oder des NKCC1-Proteins. Ratten mit einer induzierten Azidose zeigten eine erhöhte Expression des NKCC1 in äußeren und inneren medullären Sammelrohren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie, vermittelt über den Transkriptionsfaktor HIF-1alpha, zu einer Herabregulation der NKCC1-Transkription führt. Da HIF-1alpha Knockouttiere eine 10-fach erhöhte Expression des NKCC1 in colonalen Mukosazellen hatten, scheint der Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der NKCC1-Expression zu besitzen (Markadieu und Delpire 2014).

Auf Transkriptionsebene spielt die Methylierung der Promotorregion eine Rolle. Spontan hypertensive Ratten (SHR) zeigten eine Hypomethylierung des Promotors bei abgeschwächter Aktivität der DNA-Methyltransferase. In normotensiven Tieren zeigte sich hingegen eine Methylierung der Promotorregion bei hochregulierter DNA-Methyltransferase. Eine geringere Methylierung hat somit eine höhere Expression des NKCC1 zur Folge und kann dadurch den Gefäßmuskeltonus beeinflussen (Cho et al. 2011).

Neben der Expressionsveränderung auf genetischer Ebene wird auch eine Möglichkeit der Regulation durch eine veränderte Expression des Transporters an der Zelloberfläche in Betracht gezogen. So wird über eine cAMP-abhängige Rekrutierung von Membranproteinen spekuliert, welche einen regulatorischen Komplex mit dem NKCC1 bilden könnten (D'Andrea et al. 1996). Auch für die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) zeigten sich Regulationsmöglichkeiten im Sinne einer vermehrten oder verminderten Internalisierung von NKCC1. Jedoch ist noch ungewiss, ob diese verminderte Expression durch Phosphorylierun-

gen des NKCC1 oder anderen Proteinen durch die PKC zustande kommt oder ob der PKC eine andere Rolle bei dem Aus- und Einbau von Proteinen zugeschrieben werden kann (Matthews 2002).

Auf Proteinebene können eine extrazellulär erhöhte Osmolarität und eine verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration jeweils für eine gesteigerte Funktion des NKCC1 verantwortlich sein. Die Kombination beider Einflussfaktoren kann aber auch eine komplexere Wirkung zur Folge haben: Im Falle einer erhöhten extrazellulären Osmolarität kommt es über vermehrten Wasserausstrom zu einer Zellschrumpfung und damit einhergehend einer Zunahme der intrazellulären Chloridkonzentration. Während also die erhöhte Osmolarität für eine Erhöhung der NKCC1-Aktivität sorgt, führt eine höhere intrazelluläre Chloridkonzentration zu dem gegenteiligen Effekt. Das Nettoergebnis beider Faktoren ist strittig (Markadieu und Delpire 2014).

Neben physikalischen Faktoren, Hormonen, Zytokinen und Signalkaskaden, welche die Aktivität des NKCC1 direkt steuern, werden auch indirekte Regulationsmechanismen angenommen, wie zum Beispiel durch Adenylylzyklaseaktivatoren, Phosphodiesteraseinhibitoren und cAMP (Markadieu und Delpire 2014). Auch der CFTR könnte durch seine Wirkung auf die intrazelluläre Chloridkonzentration den NKCC1 indirekt steuern (Shumaker und Soleimani 1999).

Außerdem zeigte sich erstmals in Experimenten an Riesenaxonen aus Tintenfischen und Rektaldrüsen aus Haien, dass die Aktivität des NKCC1 durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse gesteuert wird (Altamirano et al. 1988, Lytle und Forbush 1992). Die Phosphorylierungen werden durch die STE20/SPS1-related proline/alanine-rich Kinase (SPAK-Kinase) oder with-no-K(Lys) Kinase (WNK-Kinase) als Antwort auf geringere intrazelluläre Chloridkonzentrationen gesteuert, wohingegen die Dephosphorylierung über Protein-phosphatase 1 (PP1-Phosphatasen) abläuft (Monette und Forbush 2012). In der am besten charakterisierten Aktivierungskaskade, der WNK4-SPAK-Kaskade, wird SPAK von WNK4 an seiner katalytischen und seiner regulatorischen Domäne phosphoryliert. Dadurch kann SPAK den NKCC1 phosphorylieren und somit aktivieren. Das Calcium-binding-protein 39 (Cab39), auch Protein-25 (MO25) genannt, kann in die SPAK-abhängige Phosphorylierung unabhängig von der WNK-Kinase eingreifen und trägt somit vermutlich ebenfalls eine wichtige regulatorische Eigenschaft (Markadieu und Delpire 2014).

#### **2.3.4. Eigenschaften des NKCC1**

Wie bereits oben beschrieben macht sich der NKCC1 die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  zu Nutze, um Chlorid über einen sekundär-aktiven Transport in das Zellinnere zu befördern. Das  $\text{Na}^+$  wird von der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  primär-aktiv aus der Zelle gebracht, der konsequente  $\text{Na}^+$

Einstrom über den NKCC1 ist entsprechend der Triebkraft für  $\text{Na}^+$ . Der Transport im NKCC1 erfolgt elektroneutral in einem Verhältnis von 1  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{K}^+$  und 2  $\text{Cl}^-$ . Das durch den Transporter mit einströmende Kalium ( $\text{K}^+$ ) verlässt die Zelle in der Regel wieder durch apikale oder basolaterale Kaliumkanäle (Markadieu und Delpire 2014). Chlorid kann aufgrund der elektrochemischen Triebkraft sekundär-aktiv nach intrazellulär transportiert werden.

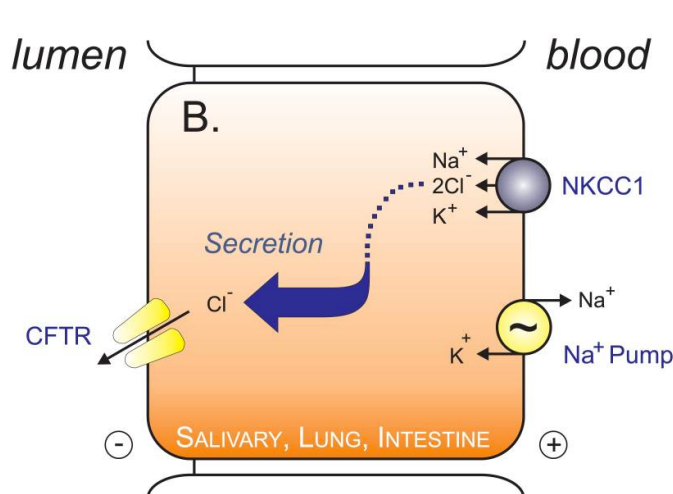


Abb. 4: Eigenschaften des NKCC1. (Modifiziert nach Markadieu und Delpire 2014)

Der NKCC1 wird im Gegensatz zum NKCC2 ubiquitär exprimiert, was weitreichende Folgen für globale NKCC1-Knockouttiere hat. Eine besondere Beeinträchtigung dieser Tiere erfolgt insbesondere durch die resultierende Taubheit und Gleichgewichtsstörungen aufgrund der fehlenden Expression des NKCC1 in der Cochlea und in dem Vestibularorgan. Die hohe Kaliumkonzentration in der Endolymphe kann bei fehlender NKCC1-Aktivität nicht mehr gewährleistet werden und somit kann der depolarisierende Einstrom von  $\text{K}^+$  in die Haarzellen nicht mehr erfolgen (Delpire et al. 1999).

Außerdem reguliert der NKCC1 ganz allgemein zusammen mit den anderen CCCs den Volumenhaushalt der Zellen (Kahle et al. 2015). Des Weiteren kommt dem NKCC1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Chloridkonzentration im Nervensystem zu. Im peripheren Nervensystem ist er unter anderem in primären afferenten Ganglien der Hinterwurzel vertreten. Außerdem spielt er eine Rolle im Geruchssystem (Haering et al. 2015) und in der Freisetzung des Gonadoliberins (GNRH) (DeFazio et al. 2002, Markadieu und Delpire 2014). Auch im ZNS könnte er eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Behandlung einer Epilepsie spielen. Zwar sind die Ergebnisse bezüglich seiner Aktivität in unreifen Neuronen widersprüchlich, dennoch zeigte die Blockade des NKCC1 durch Bumetanid Erfolge bei der Behandlung von Epileptikern. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Erfolge lediglich durch die verursachte Volumenverminderung oder wirklich durch neuronale Effekte zustande kamen (Eftekhar et al. 2013, Markadieu und Delpire 2014).

Darüber hinaus trägt der NKCC1 zur Flüssigkeitssekretion in den Azinuszellen der Speicheldrüse und im Magen-Darm-Trakt bei, sodass NKCC1-Knockouttiere eine geringere Speichel- bzw. Flüssigkeitsproduktion aufweisen. Es konnten ebenfalls Wachstumsretardierungen gezeigt werden (Flagella et al. 1999, Evans et al. 2000, Jakab et al. 2011). Daneben scheint der NKCC1 einen Einfluss auf die Darmmotilität durch seine Aktivität in den Schrittmacherzellen des Magen-Darm-Traktes, den Cajal-Zellen, zu besitzen. Dies könnte in Zusammenhang mit den hohen Letalitätsraten in der Zeit um das Abstillen stehen. Zusätzlich besteht eine Infertilität der männlichen Tiere, vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Axe (Markadieu und Delpire 2014).

Zuletzt besteht eine fragliche Korrelation der NKCC1-Aktivität und der Entstehung von chronischem Nierenversagen (Orlov et al. 2010).

### **2.3.5. Blutdruckspezifische Eigenschaften des NKCC1**

Wie schon zuvor im Zusammenhang mit den Chloridkanälen erwähnt, scheint der NKCC1 aber insbesondere auch bei der Regulation des Blutdrucks eine Rolle zu spielen. Experimente zeigten schon früh, dass die Aktivität des NKCC1 beim Vorliegen einer arteriellen Hypertonie erhöht ist (Owen und Ridge 1989, Davis et al. 1993, Jiang et al. 2004). Mitte der 1980er Jahre konnte gar ein genetisch bedingter Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und der NKCC-Aktivität in Erythrozyten anhand von Experimenten an einer hypertensiven und einer normotensiven Mauslinie gezeigt werden (Bianchi et al. 1985). Erst kürzlich zeigte sich zudem ein epigenetischer Einfluss auf die NKCC1-Aktivität bei Hypertonie (Cho et al. 2011).

Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Vasokonstriktoren wie Angiotensin II die NKCC1-Aktivität steigern und Vasodilatoren wie NO das Gegenteil verursachen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Schleifendiuretika, welche die NKCC-Transporter hemmen, die Kontraktionskraft der Aorta nach Gabe von Phenylephrin verringert (Akar et al. 1999). Später konnte auch ein geringerer Gefäßmuskeltonus in Widerstandsgefäßen nach Bumetanidgabe nachgewiesen werden (Pickkers et al. 2003).

Die Ursache für die Tonusverringering nach Blockade des NKCC1 liegt vermutlich an einer Hyperpolarisation der Zelle. In glatten Gefäßmuskelzellen herrscht eine ähnliche Leitfähigkeit für Chlorid- und Kaliumionen (Chipperfield und Harper 2000, Orlov et al. 2010). Das Gleichgewichtspotenzial für Chlorid ist allerdings positiver als das Ruhemembranpotenzial in der glatten Gefäßmuskulatur. Dies führt dazu, dass eine Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration durch NKCC1-vermittelten Einstrom in einer Depolarisation des Ruhemembranpotenzials resultiert, da das Ruhemembranpotenzial sich in Richtung des Gleichgewichtspotenzials für Chlorid verschiebt. Dementsprechend sinkt die intrazelluläre Chlorid-

konzentration im Falle einer Blockade des NKCC1 und der depolarisierende Einfluss eines Chlorideinstroms ist somit abgeschwächt. Die Blockade des NKCC1 resultiert also in einer Negativierung des Ruhemembranpotenzials – einer Hyperpolarisation und somit einer Gefäßtonusabnahme (Davis et al. 1993, Chipperfield und Harper 2000, Orlov et al. 2010).

Passend dazu konnten auch Meyer und Kollegen 2002 eine geringere maximale Kontraktionsfähigkeit der Portalvenenmuskulatur in NKCC1-Knockouttieren im Vergleich zum Wildtyp nach Phenylephrinapplikation feststellen. Dieser Unterschied bestätigte sich jedoch in der Aortenmuskulatur nicht. Dafür konnte die Arbeitsgruppe mit Hilfe der Tail-Cuff Methode aber auch einen signifikant geringeren Blutdruck (15-20 mmHg) bei globalen NKCC1-Knockoutmäusen verglichen mit Wildtypen nachweisen (Meyer et al. 2002).

Diesen Blutdruckabfall fanden Garg und Kollegen 2007 ebenfalls durch intravasale Blutdruckmessung in der Arteria carotis. Darüber hinaus stellten sie fest, dass die Gabe von Bumetanid den Blutdruck bei NKCC1-Knockoutmäusen nicht verändert, jedoch den Blutdruck der Wildtypen absinken ließ. Dies bewies, dass der Blutdruckabfall durch das Schleifendiuretikum hauptsächlich über den NKCC1 vermittelt wird und offenbar weniger über andere potenzielle Angriffspunkte. Garg et al. zeigten außerdem, dass sich ein durch Bumetanid induzierter Blutdruckabfall im Wildtyp auch nach Abklemmen der Nierenarterien manifestiert, was eine renale Genese des gefundenen Blutdruckabfalls eher unwahrscheinlich erscheinen ließ. Weitere Experimente an Mesenterialarterien dritter Ordnung zeigten, dass unter Bumetanid die kontraktile Effekte des Vasokonstriktors Phenylephrin reduziert sind, was vermuten lässt, dass Bumetanid seine Wirkung eher über die Widerstandsgefäße entfaltet und weniger über andere Gefäßabschnitte (Garg et al. 2007). Alle diese Ergebnisse ließen vermuten, dass eine Abnahme des Gefäßtonus für den gezeigten Blutdruckabfall im Knockout bzw. unter Bumetanid verantwortlich war.

Im Gegensatz zu den oben genannten Forschungsgruppen konnten Kim et al. bei der telemetrischen Messung des Blutdrucks keine Unterschiede zwischen globalen NKCC1-Knockouts und Wildtypen nachweisen. Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe zeigten sogar, dass NKCC1-Knockoutmäuse einen Blutdruckanstieg als Antwort auf eine Hochsalzdiät zeigten, wohingegen die Wildtypen keine Salzsensitivität aufwiesen. Unter Niedrigsalzdiät hatten die NKCC1-Knockoutmäuse außerdem eine geringere Plasmareninaktivität und Aldosteronkonzentration als die Wildtypen. Zwar konnten Kim et al. keinen Blutdruckunterschied unter Normaldiät nachweisen, dennoch lassen ihre Daten einen nicht irrelevanten Einfluss des NKCC1 auch auf die Blutdruckregulation durch das juxtaglomeruläre Feedback beziehungsweise auf die Reninsekretion vermuten, welcher vorher in dieser Form nicht bekannt war (Kim et al. 2008).

Um herauszufinden, in wie weit der NKCC1 am juxtaglomerulären Feedback (JGF) beteiligt ist, wurde unter anderem von Castrop et al. die Plasmaninaktivität an globalen NKCC1-Knockoutmäusen im Vergleich zu Wildtypen bestimmt. Hierbei zeigte sich eine 3-fach höhere Plasmaninaktivität der Knockouttiere im Vergleich zu den Wildtypen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in isolierten granulierten juxtaglomerulären Zellen der Wildtypen nach Applikation von Furosemid eine erhöhte Membrankapazität und vermehrte Reninsekretion vorlag, es hingegen bei NKCC1-Knockoutmäusen zu keiner Veränderung kam (Castrop et al. 2005). Dies verdeutlicht den möglichen direkten Einfluss des NKCC1 auch auf die Regulation der Reninsekretion im juxtaglomerulären Apparat (JGA) (Orlov et al. 2010).

Alle diese Studien haben jedoch gemeinsam, dass sie an globalen NKCC1-Knockouttieren durchgeführt wurden, welcher, wie zuvor beschrieben, ubiquitär im Organismus vorhanden ist und die Tiere daher eine Multimorbidität aufweisen. Die dargestellten, widersprüchlichen Blutdruckeffekte sind also vermutlich darauf zurückzuführen, dass der NKCC1 komplexe und vielseitige Funktionen im Organismus ausführt. Es ist aber unklar, welcher Teil des Organismus die größte Relevanz für die Regulation des Blutdrucks durch den NKCC1 besitzt oder ob der Blutdruck möglicherweise auch situationsabhängig beispielsweise abhängig von der Salzzufuhr von verschiedenen Teilen des Organismus gesteuert wird.

Aus diesem Grund galt es in dieser Arbeit anhand eines durch Tamoxifen-induzierten, spezifischen NKCC1-Knockouts in der glatten Gefäßmuskulatur herauszufinden, in wie weit der NKCC1 im Gefäßsystem zur Regulation des Blutdrucks beiträgt. Genauer stellte sich die Frage, ob der teilweise gezeigte langfristige Blutdruckabfall primär auf eine Veränderung des Gefäßsystems zurückzuführen ist, oder ob möglicherweise auch direkte oder indirekte kardielle, hormonelle oder renale NKCC1-Wirkungen die vorgestellten Effekte des NKCC1 auf den Blutdruck verursacht haben könnten. Da auch beschrieben wurde, dass Angiotensin II die NKCC1-Aktivität steigert, war darüber hinaus fraglich, welche Relevanz der NKCC1 für den blutdrucksteigernden Effekt von Angiotensin II hat. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde auch ein zweites Hypertoniemodell mit DOCA + Salz verwendet, um eine Angiotensin II unabhängige Hypertonie zu erzeugen und zudem weitere Informationen über die Funktionsweise des DOCA-Salz-Modells zu erlangen.

Insgesamt könnten die Erkenntnisse dieser Promotionsarbeit möglicherweise eine Aussage darüber erlauben, ob sich der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur als potenzielles Target für pharmakologische Interventionen zur Therapie der Hypertonie eignet.

### III Materialien und Methoden

#### 3.1. Substanzen und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Lösungen

| Beschreibung                                                                | Firma                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Angiotensin II human                                                        | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                  |
| Augen- und Nasensalbe (Bepanthen®)                                          | Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland                |
| Carprofen (Rimadyl®)-Injektionslösung                                       | Pfizer, New York City, New York, USA                     |
| D(+)-Glucose                                                                | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                       |
| Deoxycorticosterone Acetate (DOCA) Pellet                                   | Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA   |
| Druckluft                                                                   | TMG GmbH, Krefeld, Deutschland                           |
| Enrofloxacin (Baytril®)-Injektionslösung                                    | Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland             |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                                         | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                  |
| Evans Blue                                                                  | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                  |
| FITC-Sinistrin                                                              | Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz-Puntigam, Österreich   |
| Gasflasche CLI OXICARB (O <sub>2</sub> med. 95 %, CO <sub>2</sub> med. 5 %) | SOL SpA, Monza, Italien                                  |
| Gasgemisch (O <sub>2</sub> 20 %, CO <sub>2</sub> 80 %)                      | TMG GmbH, Krefeld, Deutschland                           |
| Glukose 5 %-Lösung                                                          | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| Haarentfernungscreme Sensitive (Veet®)                                      | Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich        |
| Histoacryl® Gewebekleber                                                    | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland            |
| Hochsalzfutter (30.000 mg Natrium/kg Diät) Pellets                          | Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland  |
| Indomethacin                                                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                  |
| Isofluran (Forene®)                                                         | AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland |

|                                                        |                                                                    |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %                     | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland                      |
| Kaliumchlorid                                          | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                 |
| Ketamin-Injektionslösung (Ketamin Gräub®)              | aniMedica GmbH, Senden, Deutschland                                |
| Kontrollsalzfutter (3.000 mg Natrium/kg Diät) Pellets  | Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland            |
| Losartan-Potassium                                     | MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland                          |
| Natriumchlorid Z.A.                                    | J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA |
| Niedrigsalzfutter (200 mg Natrium/kg Diät) Pellets     | Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland            |
| Normalfutter (LAS QCdiet Rod16)                        | LASvendi, Soest, Deutschland                                       |
| Normalfutter, gemahlen (LAS QCdiet Rod16)              | LASvendi, Soest, Deutschland                                       |
| Octenisept® Wunddesinfektion                           | Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland                      |
| Pentobarbital (Narcoren®) Injektionslösung             | Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland                             |
| Povidon-Iod (Betaisodona®)                             | Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland                             |
| Roti ®-Histofix 4 %                                    | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland                     |
| Tamoxifen-Futter (LASCRdiet CreActive TAM 400) Pellets | LASvendi, Soest, Deutschland                                       |

### 3.2. Geräte

**Tabelle 2: Verwendete Geräte**

| Beschreibung                             | Firma                                      |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Anästhesiegas-Entsorgungssystem Fluovac  | FMI GmbH, Seeheim, Deutschland             |
| Blood Gas Analyzer ABL90 FLEX            | Radiometer GmbH, Willich, Deutschland      |
| Druckminderer Hercules CK M 70           | Kayser Werk GmbH, Fulda, Deutschland       |
| Elektrolytanalysator Spotchem EL SE-1520 | Arkray USA, Edina, USA                     |
| Handrefraktometer (Modell 7-0112)        | neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland |

|                                           |                                                            |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Hämatokrit-Zentrifuge (201424)            | Hettich AG, Bäch, Schweiz                                  |
| Inhalationsanästhesie-System              | FMI GmbH, Seeheim, Deutschland                             |
| Mikroskop (Leica DM IRB) für Histologie   | Meyer Instruments, Houston, Texas, USA                     |
| Mikroskopkamera (Leica DFC295)            | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland                   |
| Mikrozentrifuge (5417R)                   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                         |
| Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| PhysioTel® Receiver                       | Data Sciences International, Saint Paul, MN, USA           |
| Schermaschine Thrive® (Model 2000AD)      | Ebimex Schermaschinen, Wilsum, Deutschland                 |
| Schüttlergerät (MS2 Minishaker)           | IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland                      |
| Stereomikroskop Leica MZ7.5 für Operation | Meyer Instruments, Houston, Texas, USA                     |
| Umwälzthermostat F3 mit Wasserbad         | Haake Technik GmbH, Vreden, Deutschland                    |
| Vevo® 2100 System (Ultraschall)           | Visual Sonics Inc., Toronto, Kanada                        |
| Waage (AZ612)                             | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                       |
| Waage (fein) (MC1 LC6200S)                | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                       |
| Waage (XP1202S)                           | Mettler-Toledo International Inc., Columbus, Ohio, USA     |

### 3.3. Instrumente und Materialien

**Tabelle 3: Verwendete Instrumente und Materialien**

| Beschreibung                            | Firma                                         |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Clot catcher                            | Radiometer GmbH, Willich, Deutschland         |
| Einmal-Injektion-Kanüle                 | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Einmalspritze                           | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Elektrolytmessplatte (Spotchem E-Plate) | Arkray USA, Edina, USA                        |
| ES-Kompressen                           | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland     |
| Mikro-Hämatokrit-Kapillaren             | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland    |

|                                                   |                                                              |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Micro-Osmotic Pump Alzet® Model 1002              | Durect Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA              |
| Mikro-Probengefäß Li.-Heparin                     | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland                    |
| Mikro-Probengefäß Tri-Kalium-EDTA                 | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland                    |
| Nahtmaterial (Mersilene 5-0)                      | Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, USA                   |
| SafeClinitubes                                    | Radiometer GmbH, Willich, Deutschland                        |
| Schieblehre                                       | Brüder Mannesmann GmbH, Remscheid, Deutschland               |
| Schmelzpunktbestimmungsröhrchen (9201075)         | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland |
| Skalpellklinge                                    | Bayha GmbH, Markgröningen, Deutschland                       |
| Transmitter (PhysioTel PA-C10)                    | Data Sciences International, Saint Paul, MN, USA             |
| Versiegelungswachsplatte für Hämatokritkapillaren | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland |
| Wärmeunterlage ThermoLux®                         | Witte und Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland                 |
| Zellkulturplatten (Cellstar®)                     | Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Zentrifugenröhrchen (Cellstar®)                   | Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| <b><u>OP-Besteck:</u></b>                         |                                                              |
| Federschere (15000-00)                            | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland             |
| Nadelhalter (12502-12)                            | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland             |
| Pinzetten (00608-11, 11050-10, 11152-10)          | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland             |
| Scheren (14001-12, 14075-11, 14569-12)            | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland             |

### 3.4. Verwendete Mäuse und Prinzip des induzierten Knockouts

Die verwendeten Mäuse wurden freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Christian A. Hübner aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt, welche nach dem 2001 von Metzger und Chambon veröffentlichten Prinzip gezüchtet wurden (Metzger und Chambon 2001). Ihr Prinzip basiert auf einem zuvor beschriebenen System, in dem eine Cre (causes recombination)-Rekombinase ein bestimmtes DNA Segment ausschneiden kann, welches von zwei „loxP sites“ (locus of crossover in phage P1), den Schnittstellen für die Rekombinase, flankiert wird (Sauer und Henderson 1989). Die Besonderheit ihres Prinzips liegt darin, dass ein Knockout spezifisch in einem bestimmten Gen, zu einer bestimmten Zeit und in einem bestimmten Zelltyp erzielt werden kann (Metzger und Chambon 2001). Hierfür wird das Gen der Cre-Rekombinase mit einer modifizierten Ligandenbindungsdomäne (LBD) des humanen Östrogenrezeptors (ER) fusioniert. Die Modifizierung der LBD im Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein führt dazu, dass endogenes Östrogen nicht mehr binden kann (Feil et al. 1996). Dafür kann aber Tamoxifen binden und für die Translokation des Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsproteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern sorgen. Dort wird erst durch Bindung an eine zellspezifische Promotorregion die Transkription der genetischen Information und somit der Cre-Rekombinase ermöglicht.

Für diese Arbeit wurde eine Maus kreiert, welche an einem spezifischen Promotor für die glatte Gefäßmuskulatur (SMMHC) eine Bindungsstelle für das Fusionsprotein hat, sodass die Cre nur in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert wird. Diese Maus wurde mit einer weiteren Maus verpaart, welche die notwendigen LoxP-Schnittstellen an einem Exon enthält, welches essentiell für den NKCC1 kodiert. Durch die Paarung erhielt man eine Maus (Cre<sup>+</sup>), welche nun sowohl über die für die Cre-Rekombinase notwendigen Schnittstellen als auch über eine nach Tamoxifen-Gabe spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur exprimierte Cre-Rekombinase verfügt, sodass der NKCC1 spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur nach Tamoxifen-Gabe (z. B. über das Futter) nicht mehr gebildet werden kann. Das Gen für das Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein wurde über eine Y-chromosomale Vererbung an nachfolgende Generationen weitergegeben, sodass lediglich an männlichen Tieren ein Knockout erzielt werden konnte.

Darüber hinaus wurde eine zweite Mauslinie (Cre<sup>-</sup>) verwendet, welche lediglich über die Schnittstellen an der NKCC1-Sequenz verfügte, jedoch kein Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein besitzt. Dadurch konnte in dieser Linie trotz Tamoxifen-Applikation keine Cre-Rekombinase exprimiert werden und somit der Einfluss der Substanz Tamoxifen auf die Experimente untersucht werden.

Jeweils eine Mausgruppe der jeweiligen Linie erhielt tamoxifenhaltiges Futter (LASCRdiet CreActive TAM400, LASvendi), während die jeweils andere Gruppe jeder Linie Normalfutter (LASQCdiet Rod16, LASvendi) bekam.

Die untersuchten Gruppen bildeten sich daher wie folgt:

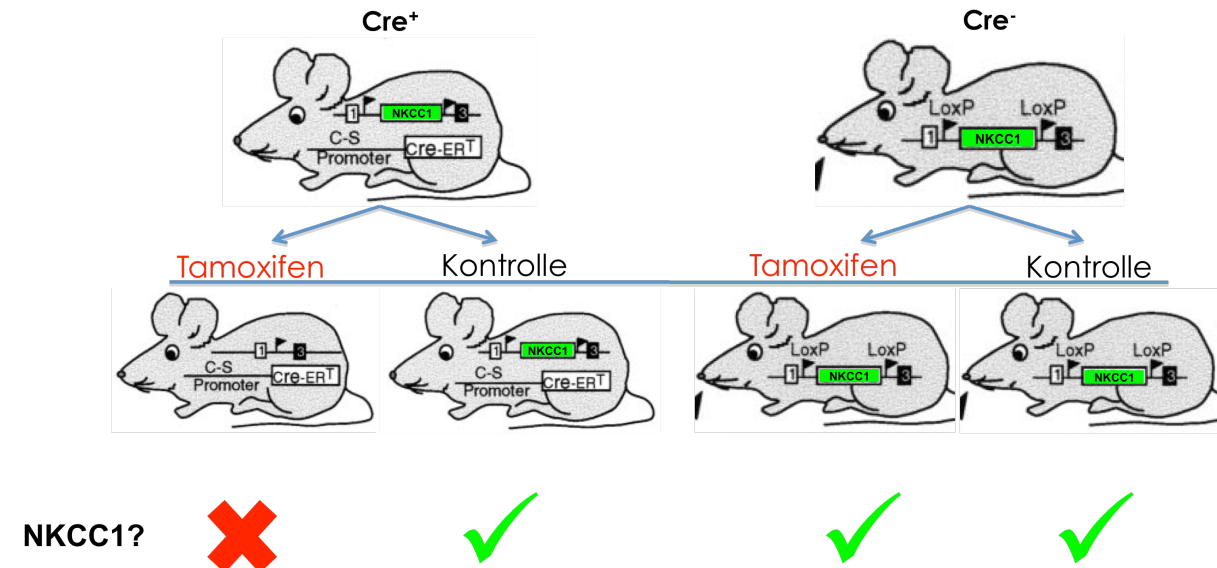


Abb. 5: Darstellung des genetischen Materials der untersuchten Mausgruppen im Hinblick auf den spezifisch induzierten Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur. Modifiziert nach: (Metzger und Chambon 2001)

### Cre<sup>+</sup> Tamoxifen

Die Mäuse dieser Gruppe besitzen sowohl Schnittstellen am NKCC1 als auch ein Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein. Sie exprimieren nach einer 4-wöchigen Verabreichung tamoxifenhaltigen Futters eine Cre-Rekombinase, welche den NKCC1 spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur ausschneidet, was zu einem spezifischen glattmuskulären NKCC1-Knockout führt.

### Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen

Die Mäuse dieser Gruppe besitzen sowohl Schnittstellen am NKCC1 als auch ein Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein. Sie erhalten aber lediglich das Standardfutter und kein Tamoxifen. Somit wird keine Cre-Rekombinase exprimiert und der NKCC1 bleibt erhalten.

### Cre<sup>-</sup> Tamoxifen

Die Mäuse dieser Gruppe besitzen lediglich Schnittstellen am NKCC1, jedoch kein Cre-ER<sup>T</sup> Fusionsprotein für die Cre-Rekombinase. Trotz 4-wöchiger Verabreichung tamoxifenhaltigen Futters kann keine Cre-Rekombinase exprimiert werden und der NKCC1 bleibt erhalten.

---

**Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen**

Die Mäuse dieser Gruppe besitzen Schnittstellen am NKCC1, jedoch kein Cre-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein für die Cre-Rekombinase. Sie erhalten aber lediglich Standardfutter und kein Tamoxifen. Somit wird keine Cre-Rekombinase exprimiert und der NKCC1 bleibt erhalten.

---

**3.5. Auswahl, Behandlung und Haltung der Versuchstiere**

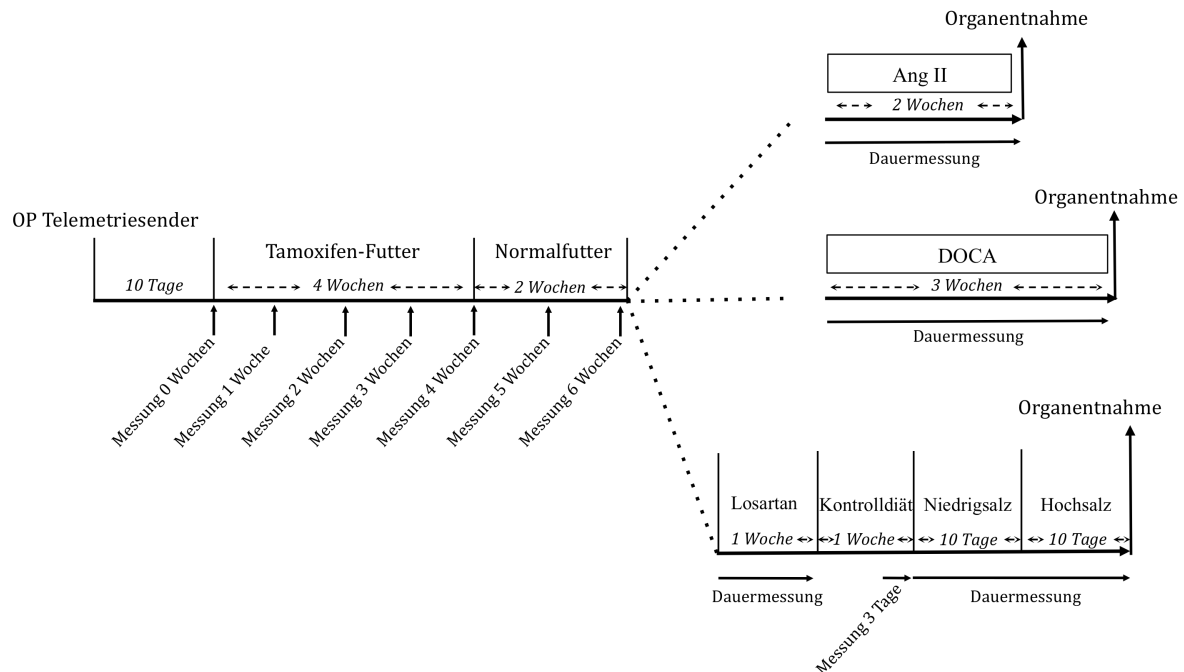
Sämtliche Untersuchungen wurden an insgesamt 316 männlichen Tieren (209 Cre<sup>+</sup>, 107 Cre<sup>-</sup>) ab einem Alter von circa 12 Wochen durchgeführt. Die Einteilung der Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip innerhalb der jeweiligen Mauslinie.

Jedes Tier wurde in einem Einzelkäfig mit Trinkwasser und Futter ad libitum in einem zwölfstündigen Tag-/ Nacht-Rhythmus bei Temperaturen zwischen 20 °C und 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 45 % und 65 % gehalten. Jeder Käfig enthielt Einstreu, ein rot transparentes Plastikhaus und Zellstoff als Nestbaumaterial. Das Gewicht jedes Tieres wurde mindestens wöchentlich protokolliert.

Die Genehmigung der durchgeführten Tierversuche wurde am 12.07.2011 unter der Nummer 29/11 und am 17.01.2014 unter der Nummer 138/13 von der Abteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg erteilt.

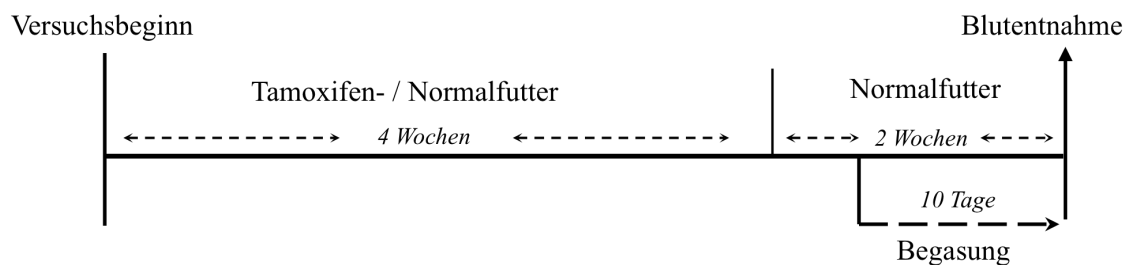
### 3.6. Versuchsprotokolle und Verwendung von Substanzen

#### 3.6.1. Versuchsprotokoll hämodynamische Messungen



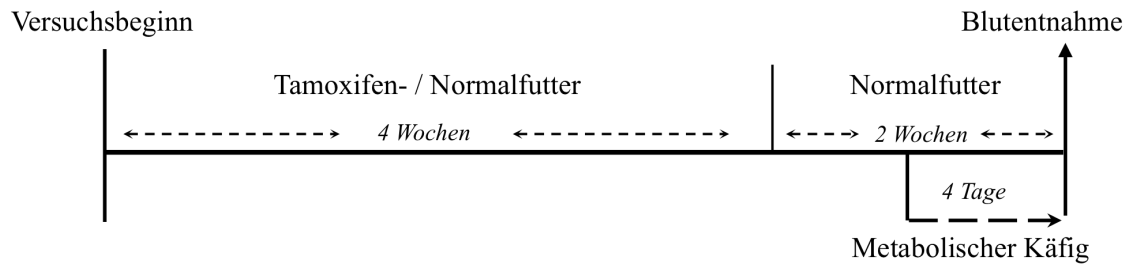
**Abb. 6: Versuchsprotokoll der telemetrischen Messung von Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz:** Versuchsbeginn mit operativer Implantation der Telemetriesender. Am Ende der 10-tägigen post-OP Erholungsphase 3-tägige Basismessung (Zeitpunkt 0 Wochen). Anschließend Start mit 4-wöchiger Gabe Tamoxifen-haltigen Futters für beide Tamoxifengruppen bzw. mit Gabe von Normalfutter für Kontrollgruppen mit wöchentlichen telemetrischen Messungen über 48 Stunden. Danach Umstellung auf Normalfutter für alle Gruppen und weiterhin wöchentlichen telemetrischen Messungen über 48 Stunden. Nach insgesamt 6 Wochen entweder Gabe von Ang II über 2 Wochen bei dauerhafter Messung, oder 3-wöchige dauerhafte Messung unter Gabe von DOCA + Salz (dauerhafte Messung), oder Gabe von Losartan für 1 Woche (dauerhafte Messung), anschließender Umstellung auf Kontrolldiät für 1 Woche (3-tägige Telemetriemessung) und dann jeweils 10 Tage Niedrig- gefolgt von Hochsalzdiät (dauerhafte Messung).

#### 3.6.2. Versuchsprotokoll Hormonbestimmungen



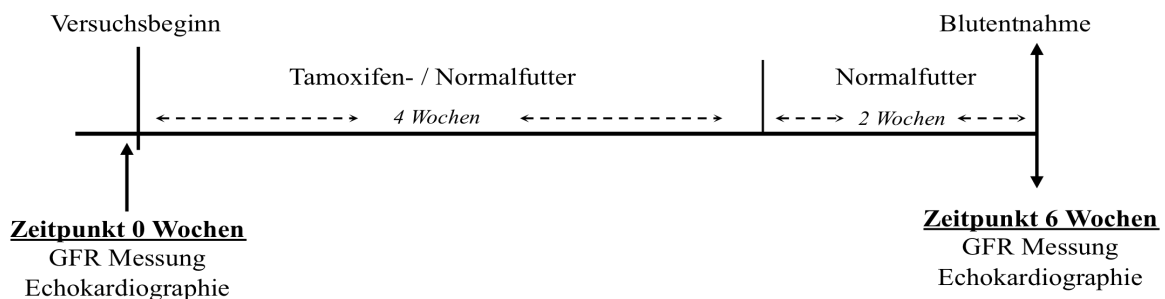
**Abb. 7: Versuchsablauf der Hormonbestimmung:** Versuchsbeginn mit 4-wöchiger Gabe Tamoxifen-haltigen Futters für beide Tamoxifen-Testgruppen bzw. Gabe von Normalfutter für Kontrollgruppen. Danach bis einschließlich 6. Woche nach Versuchsbeginn zwei Wochen lange Gabe von Normalfutter für alle Gruppen sowie Beginn der Druckluftbegasung in den letzten 10 Tagen vor Blutentnahme.

### 3.6.3. Versuchsprotokoll zur Bestimmung des Wasser- und Elektrolytstatus



**Abb. 8: Versuchsprotokoll zur Bestimmung des Wasser- und Elektrolytstatus:** Versuchsbeginn mit 4-wöchiger Gabe Tamoxifen-haltigen Futters für beide Tamoxifen-Testgruppen bzw. Gabe von Normalfutter für Kontrollgruppen. Danach bis einschließlich 6. Woche nach Versuchsbeginn zwei Wochen lange Gabe von Normalfutter für alle Gruppen. Beginn der Messungen im metabolischen Käfig in den letzten 4 Tagen vor Blutentnahme.

### 3.6.4. Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Herz- und Nierenfunktion



**Abb. 9: Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Herz- und Nierenfunktion:** Vor Versuchsbeginn, zum Zeitpunkt 0 Wochen, Messung der glomerulären Filtrationsrate mit FITC-Sinistrin sowie Durchführung der Echokardiographie. Anschließend 4-wöchige Gabe Tamoxifen-haltigen Futters für beide Tamoxifen-Testgruppen bzw. Gabe von Normalfutter für Kontrollgruppen. Danach bis einschließlich 6. Woche nach Versuchsbeginn zwei Wochen lange Gabe von Normalfutter für alle Gruppen. Genau 6 Wochen nach Versuchsbeginn Durchführung der zweiten GFR Messung und Echokardiographie (Zeitpunkt 6 Wochen) mit anschließender Organentnahme.

### 3.6.5. Verwendung von Substanzen

Im Anschluss an die 6-wöchige Induktionsphase des genetischen KO wurde der Einfluss folgender Substanzen in verschiedenen Versuchsreihen, wie in den Versuchsprotokollen angegeben, untersucht:

#### Angiotensin II:

2-wöchige Applikation über osmotische Minipumpen s.c.

Dosierung: 1,5 ng/g KG/min

#### DOCA + Salz:

3-wöchige Applikation durch DOCA-Pellets s.c.

Dosierung: 50 mg/21d release pellet

Zusätzliche Gabe von 1 % NaCl-haltigem Trinkwasser

**Losartan:**

7-tägige Applikation über das Trinkwasser

Dosierung: 30 mg/kg KG/Tag (kalkulierte Trinkmenge: 4 ml/Tag)

**Kontrolldiät:**

Spezialfutter von Altromin, 7-tägige Applikation

Dosierung: 3.000 mg Natrium/kg Diät

**Niedrigsalzdiät:**

Spezialfutter von Altromin, 10-tägige Applikation

Dosierung: 200 mg Natrium/kg Diät

**Hochsalzdiät:**

Spezialfutter von Altromin, 10-tägige Applikation

Dosierung: 30.000 mg Natrium/kg Diät

**3.7. Hämodynamische Messung mittels Telemetrie****3.7.1. Implantation der Telemetriesender**

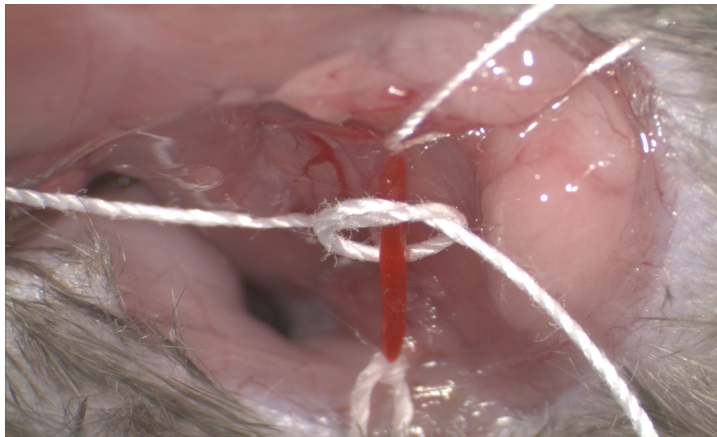
Die telemetrische Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz erfolgte invasiv in der Aorta durch Implantation der Katheter von Blutdrucksendern (DSI PhysioTel® PA-C10) über die Arteria carotis communis. Zusätzlich wurde die Aktivität der Maus durch Detektion der Bewegung des in der Maus implantierten Senders über der Empfangsplatte gemessen. Der eigentliche Sender besitzt ein Gewicht von 1,4 Gramm und wurde subkutan in der rechten Flanke der Maus platziert.

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Gabe von einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin (in 0,9 % NaCl-Lösung 120 mg Ketamin/16 mg Xylazin pro kg KG). Außerdem erfolgte perioperativ eine Schmerzprophylaxe mit Carprofen und eine Antibiotikaprophylaxe mit Enrofloxacin (beides 5 mg/kg in 0,9 % NaCl-Lösung) jeweils subkutan.

Vor Beginn und auch regelmäßig während der Operation wurde die Narkosetiefe durch Reflexprüfungen fortwährend überwacht und gegebenenfalls nachdosiert. Zur Prophylaxe einer Austrocknung wurden die Augen mit Augen- und Nasensalbe (Bepanthen®) benetzt. Zur Temperaturerhaltung erfolgte die Operation auf einer Wärmeplatte.

Nach lokaler Rasur, Desinfektion der ventralen Halsregion (Betasisodona/H<sub>2</sub>O 1:1) und erfolgreicher Fixierung der Maus in Rückenlage erfolgte die Schnitteinzision von submandibulär bis zum oberen Sternum. Unter einem Stereomikroskop (LEICA MZ 7.5) wurde die linke A. ca-

rotis communis freigelegt und der Blutfluss des Gefäßes nach apikal durch eine Knotenligatur auf Höhe der Bifurkation mit einem Bindfaden gestoppt. Durch einen weiteren Faden circa 0,5 cm kaudal des ersten Knotens wurde das Gefäß gezügelt. Zwischen diesen beiden Knoten wurde ein weiterer Knoten vorgelegt, der dann, nach Punktion der Arterie mit einer Kanüle (Sterican 25 G, B. Braun) und sofortiger Einführung der Katheterspitze (ca. 1,2-1,4 cm) bis zum Aortenbogen, zur Fixierung des Katheters angezogen wurde. Mit den kaudalen und kranialen Zügelungsfäden wurde ebenfalls jeweils ein Knoten um Gefäß und Katheter fixiert, sodass insgesamt 3 Fäden den Katheter sicherten. Jegliches Leck in Form von Blutaustritt wurde ausgeschlossen. Die richtige Position der Katheterspitze wurde noch während des Eingriffs durch eine Druckkurvenkontrolle sichergestellt und daraufhin die Knoten mit Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun) gesichert. Nach Präparation einer subkutanen Tasche im rechten Flankenbereich der Maus konnte der Sender dort platziert werden.



**Abb. 10: Freipräparierte Arteria carotis communis.** Oberer Bildteil basal, unterer Bildteil apikal

Die Wunde wurde mit Einzelknopfnähten (Mersilene 5-0, Ethicon) verschlossen und mit Iod-Lösung desinfiziert. Zur Prophylaxe einer Exsikkose erhielten die Mäuse 0,5 ml einer Glukose (5 %)- und NaCl-Lösung (0,9 %) (Verhältnis 1:1).

Unmittelbar nach dem Eingriff wurden die operierten Tiere in ihre Käfige überführt und diese zur Hälfte auf einer Wärmeplatte (ThermoLux®) platziert, sodass der postoperativen gestörten Wärmeregulation der Mäuse entgegengewirkt werden konnte. Darüber hinaus wurden den Tieren mindestens in den ersten 48 Stunden nach dem Eingriff zusätzlich zu dem üblichen Nahrungsangebot eingeweichte Futterpellets sowie mit Glukose-Lösung (5 %) gefüllte Wasserschälchen angeboten. Zudem wurde bis zum circa siebten Tag nach der Operation täglich der Zustand der Tiere und der Naht überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Bei länger andauernder Nahrungsaufnahmeverweigerung, fehlendem Trinkverhalten oder anderen Gründen für einen sichtbar schlechten Allgemeinzustand der Maus, sowie ggf. einer Schlaganfallssym-

ptomatik wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Überdosis von Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH) getötet.

### **3.7.2. Telemetrische Messung von Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz**

Unter der Voraussetzung, dass die Tiere zehn Tage nach der Operation keine sichtbaren Beeinträchtigungen aufwiesen, wurde die telemetrische Messung, wie in 3.6.1. „Versuchsprotokoll hämodynamische Messungen“ gezeigt, begonnen. In fünfminütigen Abständen, für jeweils 60 Sekunden Dauer, wurden systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruckwerte (MAD), die Herzfrequenz sowie die Aktivität der Mäuse detektiert. Da die maximale Laufzeit der Batterie des Senders bei circa 1,5 Monaten liegt, war es notwendig den Sender nur zu den erforderlichen Messzeitpunkten durch ein Magnetrelais von Extern einzuschalten. Die Basismessung (Messung 0 Wochen) erfolgte über 72 Stunden, wohingegen die restlichen Grundmessungen (Messungen Woche 1-6) jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden erfolgten. Die Messdaten gelangten radiotelemetrisch von den implantierten Sendern an die Empfänger (Receiver), auf denen sich die Käfige befanden. Die gemessenen Daten konnten anschließend durch ein Computerprogramm (Dataquest ART Acquisition, Data Sciences International, Minnesota, USA) aufgenommen werden und schließlich mit weiteren Computerprogrammen (Dataquest A.R.T. Data Analysis, Microsoft Excel, GraphPad Prism) ausgewertet werden.

### **3.8. Implantation osmotischer Minipumpen und DOCA Pellets**

Mit Hilfe osmotischer Minipumpen kann eine konstante Verabreichung von Substanzen wie z. B. Angiotensin II erreicht werden. Die Implantationen erfolgten direkt im Anschluss an die telemetrische Messung 6 Wochen nach Versuchsbeginn.

Gewichtsadaptiert wurde Ang II in 0,9 % NaCl gelöst und dieses dann in die osmotischen Pumpen (Alzet, Modell 1002, 0,25 µl/h Förderrate) gefüllt, sodass eine Förderrate von 1,5 ng/g KG/min Angiotensin II erreicht wurde. Die befüllten Pumpen wurden bis zur Implantation für wenige Stunden in 0,9 % Kochsalzlösung gelagert.

Die Anästhesie der Tiere erfolgte mit circa 3-5 % Isofluran-Narkose. Nach Überprüfen der Narkosetiefe wurde eine Schmerzprophylaxe mit subkutaner Injektion von Carprofen (5 mg/kg) sowie Antibiotikaprophylaxe mit Enrofloxacin subkutan (5 mg/kg) durchgeführt. Nach Rasur im Nacken wurde der Hautbereich mit einer iodhaltigen Lösung desinfiziert und ein circa 0,5 cm langer Querschnitt gesetzt. Anschließend wurde eine circa 1 cm x 1,5 cm große subkutane Tasche im Flankenbereich des Tieres präpariert. Die befüllte osmotische

Minipumpe wurde mit der Öffnung in Richtung kaudal platziert und die Wunde mit 3-4 Stichen genäht (Mersilene 5-0). Die Angiotensin II-Pumpe verblieb für zwei Wochen im Tier. Währenddessen erfolgte eine dauerhafte telemetrische Messung von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität.

Auch zur Implantation der DOCA-Pellets (50 mg/Pellet, 21 days release) war ein circa 0,5 cm langer Schnitt notwendig und eine kleinere subkutane Tasche (1 cm x 1 cm) wurde präpariert, um die Pellets aufzunehmen. Die Pellets verblieben bis zur finalen Organentnahme für 3 Wochen im Tier. Anstelle normalen Trinkwassers erhielten die Tiere eine 1 %-ige Kochsalzlösung zur freien Verfügung. Auch nach Implantation der DOCA-Pellets wurde fortwährend eine telemetrische Messung von Blutdruck, Aktivität und Frequenz durchgeführt.

### **3.9. Hormonbestimmung**

#### **3.9.1. Mauskonditionierung für Hormonbestimmung**

Aufgrund der starken Sensibilität bzgl. Freisetzung von Renin und Aldosteron auf Stressreize ist für die Bestimmung der endogenen Plasmaspiegel der Hormone das vorherige Konditionieren der Tiere an die Narkose erforderlich (Groger et al. 2012). Die Bestimmungen erfolgten gemäß dem Versuchsprotokoll in 3.6.2.

Hierzu wurden die Gitterdeckel durch IVC-Gitterdeckel ausgetauscht, damit durch einen selbstentwickelten sogenannten Begasungsdeckel (umgebauter IVC-Deckel) über einen Zeitraum von neun Tagen täglich einmal Druckluft in den Käfig eingeleitet werden konnte. Die Druckluftapplikation erfolgte nach einem auf 8 Liter/ 30 Sekunden geeichten Luftstrom immer circa 1,5 Stunden vor Beginn der Dunkelphase über eine Dauer von 30 Sekunden pro Käfig.

Am zehnten Begasungstag wurde nach gleichem Prinzip ein Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>, 80 %)/ Sauerstoff (O<sub>2</sub>, 20 %) Gasgemisch (TMG GmbH) in den Käfig eingeleitet, bis die Maus nach ungefähr 30-45 Sekunden tief schlief. Die weitere Narkose erfolgte dann nach zügiger Überführung der schlafenden Maus über eine 3-5 %-ige Isofluran-Luftmischung, sodass die Blutentnahme in tiefer Sedierung retrobulbär erfolgen konnte.



**Abb. 11: Für Begasung modifizierter IVC-Käfigdeckel.**

Für die Bestimmung der Plasmapreninaktivität (PRA) wurden 5 µl Na-EDTA (Sigma) in Glas-kapillaren vorgelegt und das frische Blut in die Kapillare aufgenommen. Anschließend wurde die Kapillare einseitig mit Hämatokrit-Verschlußmasse (Hirschmann) verschlossen und in einer Hämatokrit-Zentrifuge 5 Minuten bei 6.000 U/min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde dann in Eppendorf-Tubes bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung verwahrt. Das weitere Blut wurde zur Aldosteronbestimmung in Lithium-Heparin-beschichteten Mikrogefäßen gesammelt, auf Eis gekühlt und das Plasma nach Zentrifugation (10 min, 2.000 U/min, 4 °C) ebenfalls bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung verwahrt.

### **3.9.2. Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von Aldosteron- und Reninaktivität im Plasma**

Die Bestimmung der Aldosteronplasmaspiegel und der PRA erfolgte durch Telse Kock aus dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des UKE, Hamburg.

Die Plasmaaldosteronbestimmung erfolgte getreu den Angaben der Firma Immunotech mittels Radioimmunoassay (RIA). Hierbei kompetitierte das Aldosteron in den Proben bzw. Kalibratoren mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem Aldosteron Tracer um die Bindung an monoklonale Antikörper an der Röhrchenwand. Für jede Messung waren 50 µl Kalibrator- oder Probenmaterial nötig, zu denen jeweils 500 µl der Tracersubstanz zugegeben wurden. Nach 3 Stunden Inkubation bei 18-25 °C auf dem Schüttler (350 rpm) konnten die Lösungen gemessen werden. Nach der Erstellung einer Standardkurve mittels der Kalibratorproben konnten die Plasmaaldosteronkonzentrationen der Proben in der Einheit pg/ml bestimmt werden.

Die Bestimmung der Plasmapreninaktivität erfolgte gemäß der Anleitung der Firma DiaSorin. Hierbei wurde das gewonnene Mausplasma einem Reninsubstratpuffer zugegeben, welcher im Verhältnis Reninsubstrat zu Pufferlösung 1:2 gemischt wurde. Dabei diente Angiotensinogen, welches aus dem Plasma nephrektomierter Ratten gewonnen wurde, als Reninsubstrat. Probe und Reninsubstratpuffer wurden dann bei 37 °C und 4 °C inkubiert und anschließend in

Reagenzgläser umgeföhrt, welche mit einem biotinylierten IgG-Antikörper gegen Angiotensin I-Konjugat beschichtet waren. Über den Tracer  $^{125}\text{I}$ -markiertes Ileu-5-Angiotensin I konnte die Angiotensin I-Konzentration in den Proben bestimmt werden. Die Angiotensin I-Konzentration in  $\text{ng}/(\text{ml} \times \text{h})$  ist dabei proportional zur Plasmapareninaktivität.

### 3.9.3. Quantifizierung der Renin-mRNA

Die Quantifizierung der Renin-mRNA aus Nierengewebe erfolgte freundlicherweise durch Telse Kock aus dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des UKE (Hamburg) unter Durchführung einer Real-Time-PCR. Folgende Primer wurden verwendet:

1. mRenin/1 CGG GAT CCG TGC AGC CGC CTC TAC CTT GCT TGT
2. mRenin/2 GGA ATT CGC AGC TCG GTG ACC TCT CCA AAG

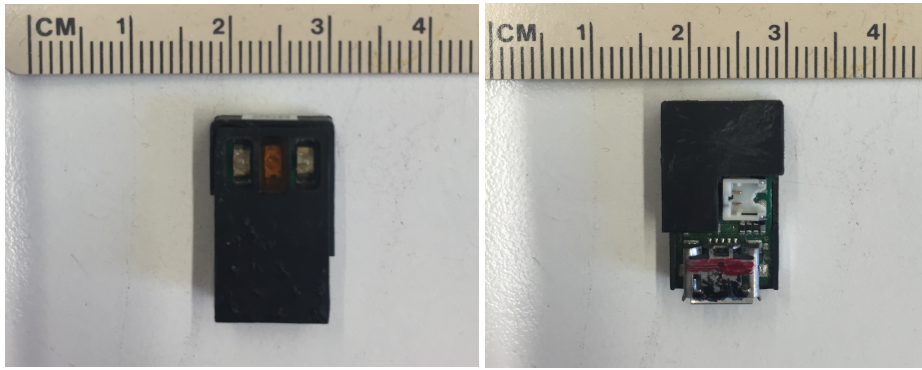
Für die Auswertung wurde die Renin-mRNA Menge ins Verhältnis zur Menge an L32 mRNA gesetzt.

### 3.9.4. Bestimmung der ANP-Spiegel

Die Bestimmung der ANP-Spiegel erfolgte freundlicherweise durch Telse Kock aus dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des UKE (Hamburg) unter Durchführung eines enzymatischen Immunadsorptionsverfahrens (EIA) gemäß den Vorlagen der Firma Phoenix Pharmaceuticals Inc. Das Prinzip beruht auf einer Beschichtung einer Platte mit einem sekundären Antikörper, welcher einen primären Antikörper binden kann. Um letzteren kompetitieren wiederum die zu bestimmenden Peptide sowie biotinylierte Peptide, welche durch Interaktion mit der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP) eine Farbreaktion auslösen. Je nach Farbtintensität kann dann auf den Gehalt der ANP-Konzentration geschlossen werden.

## 3.10. Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels FITC-Sinistrin

Neben der relativ ungenauen Errechnung der GFR mittels der Kreatinin-Clearance-Formel (siehe 3.11.3.) in 24-h-Sammelurin und im Plasma bietet das NIC-Kidney (Non-invasive-Clearance)-Verfahren die Möglichkeit, die GFR an dem gleichen Tier mehrfach durchzuführen. Der mit zwei Leuchtdioden (470 nm) und einer Photodiode (525 nm) ausgestattete Sensor kann durch die transkutane photometrische Messung des vorher retrobulbär intravenös applizierten Farbstoffs fluorescein-isothiocyanate (FITC)-Sinistrin Rückschlüsse über dessen Ausscheidung geben (Schock-Kusch et al. 2011, Schreiber et al. 2012).



**Abb. 12: Sensor für transkutane photometrische Messung**

Zur Herstellung der FITC-Lösung wird FITC-Sinistrin mit 0,9 % NaCl-Lösung im Verhältnis 1 g FITC-Sinistrin : 40 ml Na-Cl gelöst und bis zur Versuchsdurchführung bei -20 °C verwahrt.

Einen Tag vor Versuchsbeginn war die restlose Enthaarung mittels Rasur und Enthaarungscreme auf einer circa 1,5 cm x 2 cm großen Fläche an einer Flanke der Maus unter leichter Isofluran-Narkose erforderlich.

Zur Fixierung des Messapparates wurde die Maus in eine leichte Narkose durch Isofluran-Luftgemisch gebracht. Nach Verbindung der Batterie mit dem Sensor wurde beides auf die am Tag zuvor enthaarte Stelle geklebt und ausreichend befestigt. Zur Messung der Hintergrundfluoreszenz durfte die Maus dann zwei Minuten nicht bewegt werden. Die retrobulbäre Injektion der hergestellten FITC-Sinistrin-Lösung erfolgte gewichtsadaptiert (2,5 mg/ 100 µl für 30 g KG) mit einer Kanüle (30 G ½“ 0,3 x 13 mm) in den retrobulbären Venenplexus. Nach erfolgreicher Applikation wurde das Tier in seinen Käfig zurück überführt. Bei normalen Umgebungsbedingungen, jedoch ohne das sogenannte Cage-Enrichment, wurde für mindestens 60 Minuten die Fluoreszenz an der ungestörten, wachen Maus gemessen. Die Entfernung des Sensors erfolgte ebenfalls unter leichter Isofluran-Narkose. Die Maus wurde je nach Zeitpunkt anschließend in ihre gewohnte Umgebung zurückgesetzt oder eine Organentnahme durchgeführt (siehe auch 3.6.4. „Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Herz- und Nierenfunktion“).

Die computergestützte Auswertung mit dem Programm Sensor\_ctrl\_appV15 diente durch Errechnung der Bestimmung der GFR (in µl/min/100 g KG), indem man eine Konstante für Mäuse (14616,8 µl/100 g KG) durch die Halbwertszeit teilt.

### 3.11. Metabolischer Käfig

#### 3.11.1. Durchführung des Protokolls

Metabolische Käfige ermöglichen eine genaue Protokollierung von Ein- und Ausfuhr der Maus. Hierbei erfolgte die Trennung von Urin und Kot der Mäuse, wodurch beides im 24-Stunden-Rhythmus extrahiert und gemessen werden konnte.

Hierzu wurden die Tiere für 96 Stunden in den Käfig gesetzt und am Ende der letzten 24 Stunden durch eine finale retrobulbäre Blutentnahme zur Gewinnung des Plasmas euthanasiert (siehe auch 3.6.3. „Versuchsprotokoll zur Bestimmung des Wasser- und Elektrolytstatus“).

Zur Gewöhnung an das im metabolischen Käfig verwendete gemahlene Standardfutter wurden die Futterbehälter 24 Stunden vor Beginn der Versuche in die Käfige der Tiere gelegt.

Unmittelbar vor Beginn der ersten 24 Stunden wurde die Luftfeuchtigkeit protokolliert, sowie das Gewicht der Tiere, der gefüllten Wasserflaschen, der leeren Wasserauffangbehälter, der gefüllten Futterbehälter und der leeren Urin- sowie Kotsammelbehälter notiert und die Tiere anschließend in die Käfige gesetzt.

Nach 24 Stunden wurde erneut das Gewicht der Mäuse, der Wasserflaschen, der Wasserauffangbehälter, der Futterbehälter, sowie der Urin- und Kotsammelbehälter erfasst. Zusätzlich wurden die Leergewichte jeweils einer Falconschale und eines Falconschalendeckels bestimmt. Der Kot im Sammelbehälter wurde danach mitsamt durchgefallenen Futterkrümeln vollständig in eine Falconschale überführt und für 24 Stunden bei Raumluft getrocknet. Die Kotkrümel wurden einzeln von Futterkrümeln befreit und das Trockengewicht von Futterkrümeln und Kot wurde bestimmt. Die Kotkrümel wurden schließlich bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Der Urin aus dem Urinsammelbehälter wurde in ein Falcon-Tube überführt und im Kühlschrank zur Sedimentation wenige Stunden verwahrt. Anschließend wurde ein Probenvolumen von 1 ml bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Mit Ende der ersten 24 Stunden begannen die nächsten 24 Stunden des Protokolls, sodass die initialen Gewichte erneut bestimmt werden mussten. Dieses Protokoll wurde für insgesamt vier Tage (4 x 24 Stunden) durchgeführt, am letzten Tag ergänzt durch die finale retrobulbäre Blutentnahme.



Abb. 13: Der Metabolische Käfig

### 3.11.2. Elektrolytmessung in Plasma, Urin und Kot

Nach Kalibrierung des Gerätes mittels Eichlösung erfolgte die Elektrolytmessung von Kot, Urin und Plasma durch Auftragung von 22 µl der jeweiligen Probe auf Messplatten (Spotchem E-Plate, Arkray) im Messgerät (SpotChem EL SE-1520, Arkray). Während die Plasma-proben im unverdünnten Zustand gemessen werden konnten, mussten die Urinproben im Bereich zwischen 1:6 und 1:14 mit bidestilliertem Wasser (bidest. H<sub>2</sub>O) verdünnt werden.

Zur Herstellung einer messbaren Lösung aus Kot wurden die Kotproben in bidest. H<sub>2</sub>O mittels Rührstab homogenisiert (0,08 g Kot /ml bidest. H<sub>2</sub>O), mindestens 10 min eingeweicht und anschließend noch einmal durchmischt. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 2.000 U/min), nach dem der Überstand der Lösung im Urinmodus des Geräts gemessen werden konnte (Mirvish et al. 2008).

### 3.11.3. Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels Kreatinin-Clearance in 24-Stunden-Sammelurin und Plasma

Durch die Bestimmung der Urin- und Plasmakonzentration von Kreatinin und dem Volumen des letzten 24-Stunden-Sammelurins kann mit Hilfe der renalen Clearanceformel die GFR anhand der Kreatinin (Krea)-Clearance abgeschätzt werden:

$$GFR \approx Clearance(Krea) = \text{Harnzeitvolumen} \times \left[ \frac{\text{Urinkonzentration}(Krea)}{\text{Plasmakonzentration}(Krea)} \right]$$

Die Kreatininbestimmung im Plasma und im Urin erfolgte durch die Firma Laboklin GmbH & Co. KG (Labor für Klinische Diagnostik, Streubenstraße 4, 97688 Bad Kissingen).

### 3.12. Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue

Durch die intravenöse Injektion einer Evans Blue Lösung (Sigma) konnte das Plasmavolumen der Mäuse bestimmt werden. Unter einer circa 3-5 %-igen inhalativen Isofluran-Narkose wurden, nach Überprüfung des Fehlens von Reflexen, genau 100 µl der Evans Blue Lösung (50 µg/100 µl) durch eine Kanüle (30 G ½“ 0,3 x 13 mm) retrobulbär intravenös injiziert.

Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes im Blut wurde erst nach einer Wartezeit in Narkose von sieben Minuten mit Hilfe einer Glaskapillare am anderen Auge die finale Blutentnahme in ein heparinisiertes Mikrogefäß durchgeführt. Die Blutproben wurden auf Eis gelagert und schließlich 10 min bei 2.000 U/min zentrifugiert. Im blau eingefärbten Plasma (Überstand) konnte die Extinktion gemessen werden. Dies geschah mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 620 nm nach vorherigem Schütteln von 5 Sekunden. Anhand von selbst ermittelten Eichgeraden konnten schließlich die jeweiligen Plasmavolumina errechnet werden.

### 3.13. Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde einmal direkt vor Beginn der Tamoxifen-Gabe und einmal zum Zeitpunkt 6 Wochen nach Versuchsbeginn durchgeführt (siehe auch 3.6.4. „Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Herz- und Nierenfunktion“). Die Durchführung und Auswertung dieser Versuche übernahm freundlicherweise Thomas Schulze aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE (Hamburg) mit dem Gerät VEVO 2100 System der Firma Visual Sonics.

### 3.14. Organentnahme

Die Organentnahme durch rasche Entnahme des Herzens mittels Brustkorböffnung sowie ggf. die vorab durchgeführte Blutentnahme erfolgte in tiefer Sedierung unter einem circa 3-5 %-igem Isofluran-Luftgemisch (AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG).

Das Herz wurde sofort nach der Präparation zum Auswaschen in eiskalte 0,9 %-ige Kochsalzlösung gelegt und schließlich sämtliches nicht zu den Ventrikeln gehörendes Gewebe abpräpariert. Um das Organ von Flüssigkeit zu befreien wurde es auf Zellstofftüchern abgetupft und auf einer Feinwaage (MC1 LC6200S, Sartorius AG Germany) konnte das Ventrikelgewicht bestimmt werden. Außerdem wurden die thorakalen Aorten unter Vermeidung von Zug vorsichtig herauspräpariert und für folgende histologische Analysen in Formaldehyd-Lösung (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH & Co KG) eingelegt.

Nach Präparation und Entfernung der Nierenkapsel auf Eis wurde außerdem jeweils eine Niere in einem Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schock gefroren und die andere Niere für histologische Analysen in Formaldehyd-Lösung fixiert. Zusätzlich wurde ein Teil des Ohres zur molekulargenetischen Kontrolle des Genotyps entfernt.

Da zur Normierung der erhobenen Parameter die Tibialänge nicht im gleichen Ausmaß vom aktuellen Ernährungszustand der Maus abhängig ist wie das Körpergewicht (KG), wurde die Tibia ebenfalls präpariert und ihre Länge durch eine Schieblehre (Brüder Mannesmann GmbH) gemessen.

### **3.15. Retrobulbäre Blutentnahme und Blutgasanalyse (BGA)**

Zur Vorbereitung der retrobulbären Blutentnahme wurden Schmelzpunktbestimmungsröhrchen (Hirschmann Laborgeräte) auf eine Länge von circa 2-3 cm geschnitten.

Als Anästhetikum wurde individuell angepasst ein circa 3-5 %-iges Isofluran-Luftgemisch verwendet und die Maus auf einer Wärmeplatte gelagert. Zur Blutentnahme wurde dann durch einen Nackengriff eine Blutstauung erreicht und die vorgefertigten Röhrchen in den direkt hinter dem Auge liegenden Venenplexus eingestochen. Je nach Verwendung der Blutproben wurden unterschiedliche Gefäße/ Kapillaren verwendet. Bei dem Ziel einer Blutgasanalyse wurde eine spezielle elektrolytbalancierte BGA-Kapillare mit frischem Blut gefüllt und von dem BGA-Gerät analysiert.

Das nicht für die BGA benötigte Blut wurde für eine spätere Plasmaanalyse in Lithium-Heparin beschichteten Mikrogefäßen (Sarstedt) gesammelt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Später wurden die Blutproben zentrifugiert (4 °C, 2.000 Umdrehungen (U/min)) und das gewonnene Plasma bei -20 °C tief gefroren.

### **3.16. Histologie**

Nach der Organentnahme wurden Herzen und thorakale Aorten in Formaldehyd-Lösung (Roti-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH & Co KG) fixiert und von der Mauspathologie Facility des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Paraffin eingebettet, geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und organspezifisch nach Wunsch gefärbt. Die Aorten wurden mit der EvG-Färbung (Elastika-van-Gieson), die Herzen mit PSR (Pikro-Sirius-Rot) und die Nieren durch die PAS-Reaktion (Periodic acid-Schiff reaction) angefärbt. Die Organschnitte konnten mit einem hochauflösendem Mikroskop (Leica DM IRB, Meyer Instruments) über die Kamera (Leica DFC295) und das Programm „Leica Application Suite“ (LAS) auf dem Computer gespeichert werden. Als Auswerteprogramm für die Schnitte diente das Programm „Image J“.

### **3.16.1. Auswertung der Aortenschnitte**

Zur Analyse der Anpassungsfähigkeit oder Schädigung von Mauseaorten wurde die Tunica Media der jeweiligen Aorta ausgemessen. Einerseits erfolgte die Bestimmung der Schichtdicke der Tunica Media an zehn verschiedenen Stellen mit anschließender Mittelwertbildung und andererseits das Ausmessen der gesamten Fläche der Tunica Media (mittels Subtraktion des Lumendurchmessers vom Außendurchmesser).

### **3.16.2. Auswertung der Herzschnitte**

Zur Detektion möglicher fibrotischer Umbauprozesse in den Herzen wurde für die mikroskopische Analyse ein subjektives Punktesystem angewandt. Insgesamt wurden zehn verschiedene Gesichtsfelder bewertet, von denen vier Gesichtsfelder aus dem linken Herzen stammten, drei aus dem Septumbereich und weitere drei aus dem rechten Herzen. Jedes Gesichtsfeld wurde vom Untersucher mit Punkten von null bis zwei bewertet, wobei null Punkte keiner Fibrose gleichzusetzen waren, ein Punkt einer leichten Fibrose und zwei Punkte bei einer starken Fibrose vergeben wurden. Zur Vermeidung der subjektiven Verfälschung dieser Methode wurde jedes Herz verblindet von jeweils mindestens zwei Personen bewertet. Die Mittelwerte von den beiden Untersuchern für je das gesamte Präparat wurden schließlich dargestellt.

## **3.17. Programme und Statistik**

Zur Darstellung und statistischen Auswertung der Daten wurden, sofern nicht anders genannt, die Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism verwendet.

Je nach Art der Daten wurde eine jeweils passende statistische Analyse durchgeführt. Für den direkten Gruppenvergleich wurden t-Tests oder Varianzanalysen (One-way ANOVA mit Newman-Keuls-Test) verwendet. Für die gleichzeitige Analyse mehrerer Faktoren, wie zum Beispiel bei der Messung des Blutdrucks über die Zeit im Gruppenvergleich wurde eine Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert unter Verwendung des Standardmessfehlers (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

\*P kennzeichnet Signifikanzen von  $P \leq 0.05$ , \*\*P  $\leq 0.01$ , \*\*\*P  $\leq 0.001$ .

## IV Ergebnisse

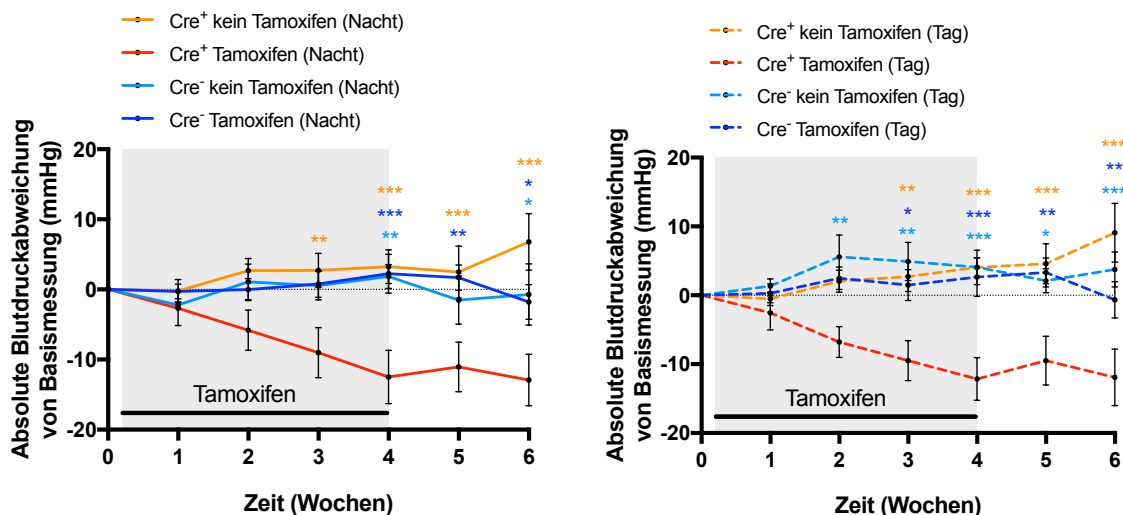
### 4.1. Einfluss des Knockouts auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz

Für die Untersuchung des Einflusses des spezifischen NKCC1-Knockouts in der glatten Gefäßmuskulatur auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz wurden, wie in 3.7. beschrieben, telemetrische Blutdrucksender implantiert.

Die telemetrischen Messungen erfolgten sowohl in der Cre<sup>+</sup>- als auch in der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie. Nach einer initialen Basismessung über 72 Stunden erfolgten im wöchentlichen Abstand jeweils 48-stündige Datenerhebungen. Unmittelbar nach der Basismessung erhielten die Tamoxifen-Gruppen zwecks Induktion des genetischen Knockouts tamoxifenhaltiges Futter über 4 Wochen, die nicht Tamoxifen-Gruppen erhielten Normalfutter. Nach diesen 4 Wochen erhielten dann alle Gruppen für 2 Wochen Normalfutter bis ausschließlich der 6. Woche nach Basismessung, damit eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Substanz Tamoxifen ausgeschlossen werden konnte. Aus den gewonnen Daten wurde für jeden Messzeitpunkt, für Tag (07:00-19:00 Uhr) und Nacht (19:00-07:00 Uhr) getrennt, das arithmetische Mittel gebildet. Die 12-stündige Trennung von Tag- und Nachtwerten erfolgte zum Ausschluss möglicher Auswirkungen unterschiedlicher Aktivitätslevel, herabgesetzter Sympathikusaktivität in der Nacht und aufgrund variierender Hormonlevel der Mäuse über die 24 Stunden.

#### 4.1.1. Blutdruck

Abbildung 14 zeigt jeweils die absoluten Blutdruckabweichungen von der Basismessung der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie jeweils für Tag (rechts) und Nacht (links).



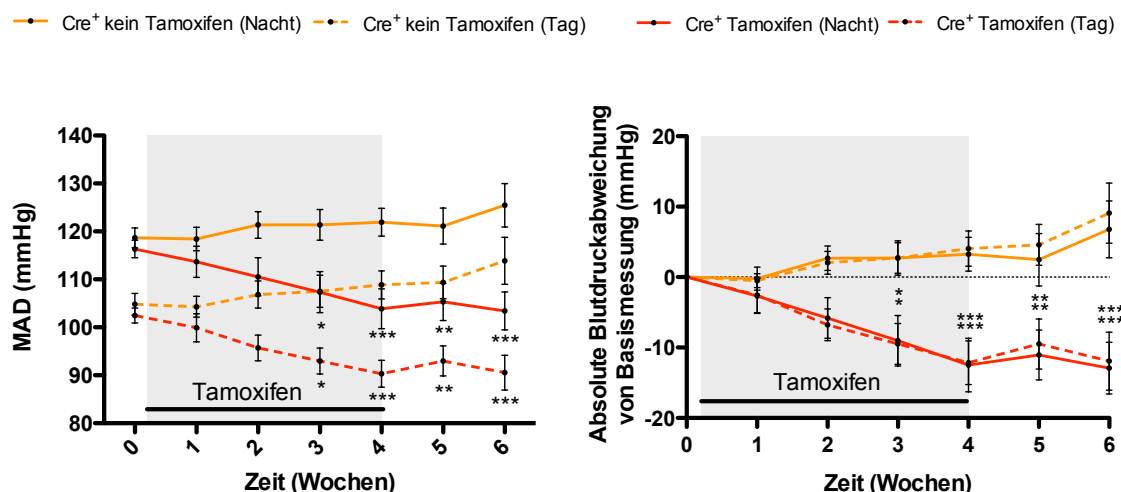
**Abb. 14: Absolute Blutdruckabweichung von der Basismessung der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckabweichung in der Nacht (links) und der absoluten Blutdruckabweichung am Tag (rechts) von den arithmetischen Mitteln der jeweiligen Basismessung der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung an jedem Zeitpunkt erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten für 1 Minute. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase (19:00-07:00 Uhr) zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase (07:00-19:00 Uhr) gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Mittels Bonferroni Post-test wurde die Gruppe Cre<sup>+</sup> Tamoxifen gegen alle anderen Gruppen statistisch getestet. Signifikanzen einer Gruppe zu der Gruppe Cre<sup>+</sup> Tamoxifen wurden mit der jeweiligen Gruppenfarbe gekennzeichnet)

Bei Betrachtung dieser absoluten Blutdruckabweichungen war ein Blutdruckabfall in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe sowohl am Tag als auch in der Nacht festzustellen. Dieser startete mit Beginn der Tamoxifen-Gabe und setzte sich unter Tamoxifen sukzessive bis zum Ende der Tamoxifen-Gabe (4 Wochen) fort. Auch unter Normalfutter ab Woche 4 verblieb der Blutdruck bei dem in Woche 4 erreichten, deutlich herabgesetzten MAD und stieg nicht wieder an. In den anderen untersuchten Gruppen ließ sich hingegen keine Blutdruckveränderung über die Zeit feststellen.

Die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe hatte zum Zeitpunkt 6 Wochen in der Nacht einen Blutdruckunterschied von -12,92 mmHg ( $\pm$  3,66) im Vergleich zur Basismessung und am Tag einen Blutdruckunterschied von -11,92 mmHg ( $\pm$  4,11) im Vergleich zur Basismessung. Alle drei Kontrollgruppen hatten, abgesehen von geringen Schwankungen, keine Blutdruckveränderungen über die Zeit vorzuweisen. Somit unterschied sich die Blutdruckabweichung von der Basismessung der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe zu den anderen Gruppen sowohl am Tag als auch in der

Nacht hochsignifikant. Man kann daraus ableiten, dass durch die Induktion des Knockouts des NKCC1 in der glatten Muskulatur der Blutdruckabfall hervorgerufen wird.

In der folgenden Abbildung 15 wurden die Tag- und Nachtwerte der Blutdruckveränderung und der Blutdruckabweichung nur der beiden  $\text{Cre}^+$ -Gruppen mit und ohne Tamoxifen in einem Graphen dargestellt, um die Unterschiede zwischen Tag- und Nachtwerten herauszuarbeiten.

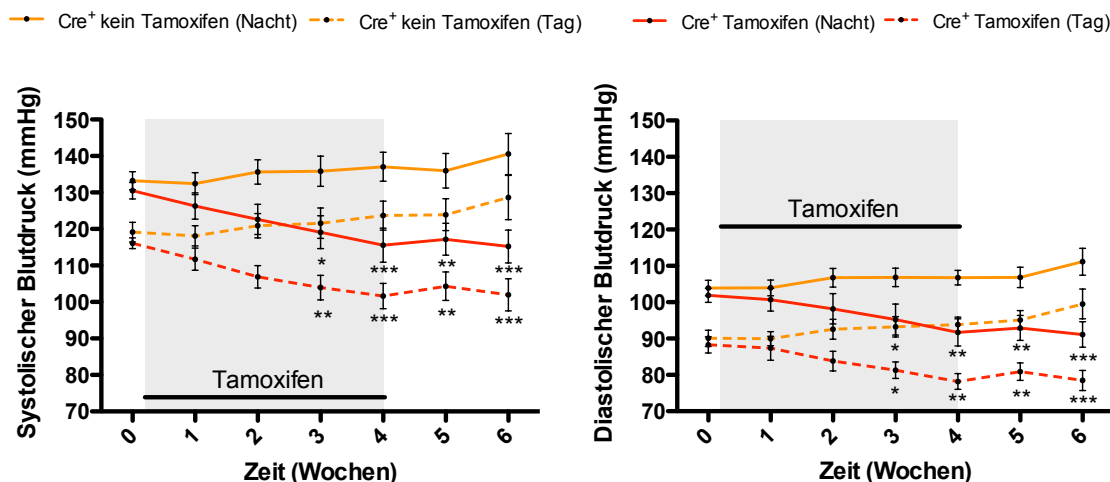


**Abb. 15: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung von der Basismessung der  $\text{Cre}^+$ -Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln der jeweiligen Basismessung (rechts) der  $\text{Cre}^+$ -Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden.  $\text{Cre}^+$  ohne Tamoxifen,  $n=17$ .  $\text{Cre}^+$  Tamoxifen,  $n=18$ . (2-way ANOVA; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Die hier dargestellten mittleren arteriellen Drücke (MAD) der  $\text{Cre}^+$ -Gruppen wiesen im Vergleich der Tag- und Nachtwerte der jeweiligen Gruppen durchgehend Differenzen um circa 13 mmHg auf. Der Mitteldruck lag zum Zeitpunkt 6 Wochen in der  $\text{Cre}^+$ -Tamoxifen-Gruppe in der Nacht bei 103,43 mmHg ( $\pm 3,97$ ) und am Tag bei 90,55 mmHg ( $\pm 3,62$ ). In der  $\text{Cre}^+$ -kein Tamoxifen-Gruppe betrug der Mitteldruck zum gleichen Zeitpunkt in der Nacht 125,46 mmHg ( $\pm 4,51$ ) und am Tag 113,88 mmHg ( $\pm 4,89$ ). Dies ist ein Hinweis auf einen erhaltenen Tag-/ Nacht-Rhythmus in den Tieren.

Der Blutdruckverlauf der jeweiligen Tag- und Nachtwerte verhielt sich in den letzten 2 Wochen nach Tamoxifen konstant, sodass die Blutdruckdifferenz zwischen der Gruppe mit Tamoxifen und der Gruppe ohne Tamoxifen sowohl am Tag als auch in der Nacht (4,5 und 6 Wochen) signifikant war. Der Unterschied zwischen der  $\text{Cre}^+$ -Tamoxifen- und der  $\text{Cre}^+$ -kein Tamoxifen-Gruppe betrug somit circa 22 mmHg in der Nacht und circa 23 mmHg am Tag.

Zur Spezifizierung des Blutdruckabfalls wurden in den folgenden Darstellungen der systolische und der diastolische Blutdruck für die Cre<sup>+</sup>-Gruppen getrennt dargestellt:

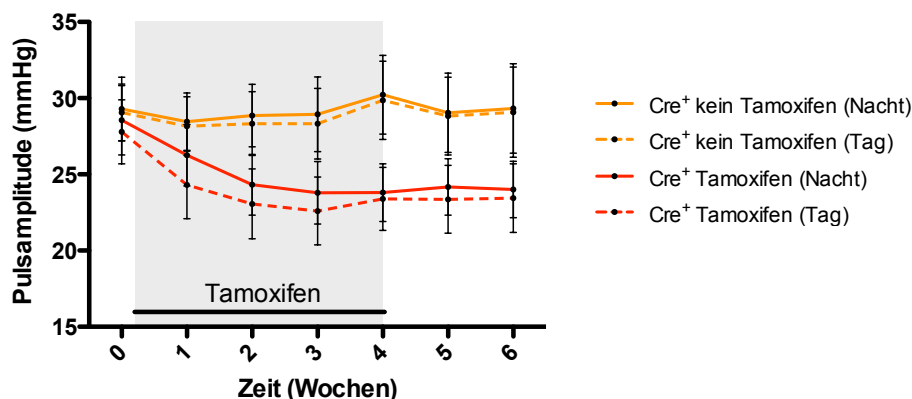


**Abb. 16: Systolische und diastolische Blutdruckveränderungen der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der jeweiligen absoluten systolischen Blutdruckwerte (links) und der jeweiligen absoluten diastolischen Blutdruckwerte (rechts) der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. (2-way ANOVA; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-Test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Auch im Vergleich der systolischen und der diastolischen Blutdruckveränderungen über die Zeit zeigten sich signifikante Unterschiede am Tag und in der Nacht nach 3, 4, 5 und 6 Wochen zwischen der Tamoxifen-Gruppe und der Gruppe ohne Tamoxifen der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie (Abb. 16). Ein Blutdruckabfall war sowohl im systolischen als auch im diastolischen Blutdruck zu erkennen.

Vergleicht man die Differenz aus systolischen Blutdruckwerten und diastolischen Blutdruckwerten erhält man die sogenannte Pulsamplitude, die einen Hinweis auf die Windkesselfunktion der herznahen Gefäße liefern kann.

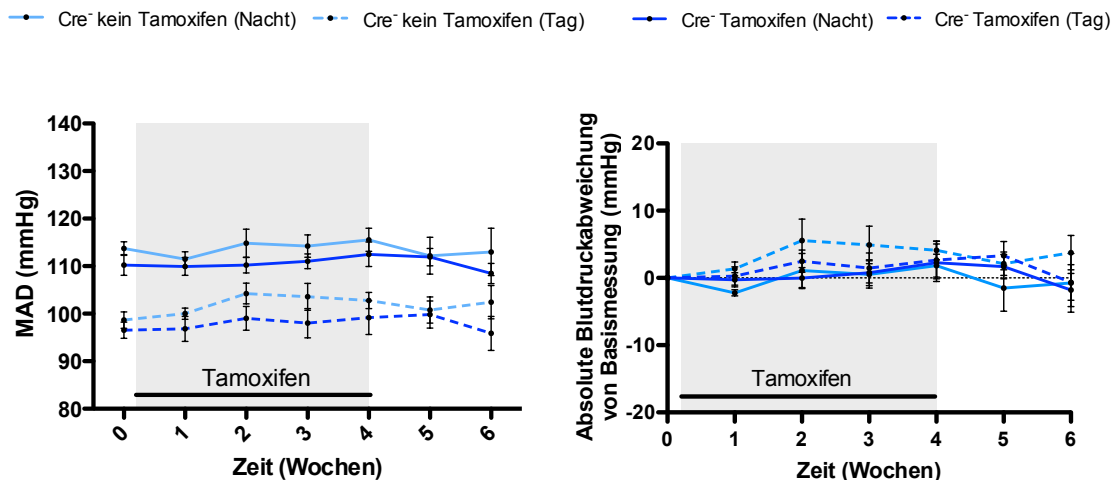
Die Veränderung der Pulsamplitude der Cre<sup>+</sup>-Gruppen ist im Folgenden dargestellt:



**Abb. 17: Pulsamplitude der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der jeweiligen Pulsamplitude der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Nach Tamoxifen-Gabe wies die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe graphisch eine um circa 5 mmHg geringere Pulsamplitude als die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe auf. Diese Differenz blieb auch nach Absetzen des Tamoxifen-Futters erhalten. Der Unterschied war jedoch zu keinem Zeitpunkt unter statistischer Testung mittels einer Two-Way ANOVA signifikant. Bei Durchführung von t-Tests zu jedem Zeitpunkt waren die Werte für die Pulsamplitude allerdings zum Zeitpunkt 4 Wochen signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen.

Auch in der Cre<sup>-</sup>-Linie zeigten sich eindeutige Unterschiede im Blutdruck zwischen Tag und Nacht, passend zu einem gesunden Tag-/ Nacht-Rhythmus:

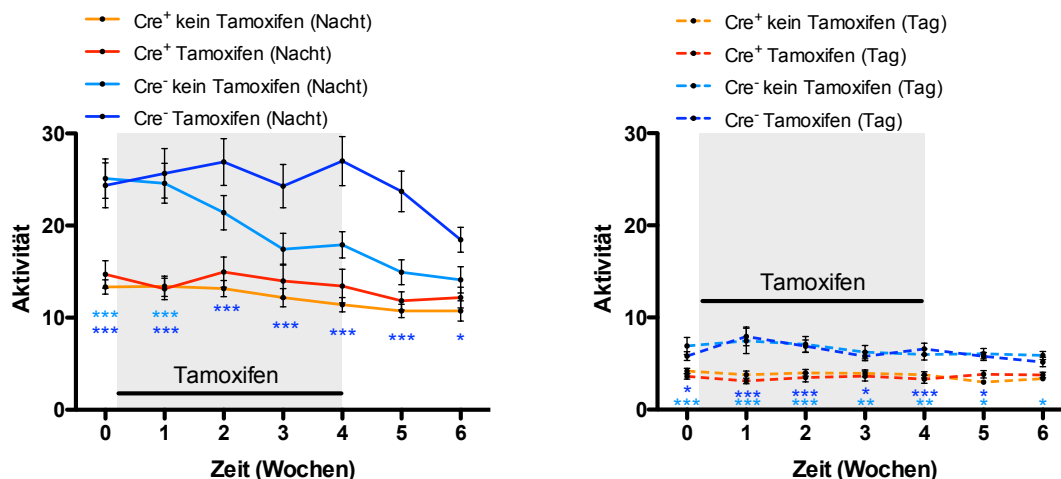


**Abb. 18: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung von der Basismessung der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln der Basismessung (rechts) der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Die Blutdruckdifferenz zwischen den Tag- und Nachtwerten innerhalb der einzelnen Cre<sup>-</sup>-Gruppen lagen wie auch bei den Cre<sup>+</sup>-Gruppen bei circa 13 mmHg. Im Vergleich der Tag- bzw. der Nachtblutdruckwerte zwischen den beiden Cre<sup>-</sup>-Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied über die Zeit. Der MAD lag zum Zeitpunkt 6 Wochen in der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe in der Nacht bei 108,45 mmHg ( $\pm 2,11$ ) und am Tag bei 95,86 mmHg ( $\pm 3,57$ ). In der Cre<sup>-</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe betrug der Mitteldruck zum gleichen Zeitpunkt in der Nacht 112,98 mmHg ( $\pm 4,98$ ) und am Tag 102,43 mmHg ( $\pm 3,48$ ). Die Tamoxifen-Gabe hatte daher keinen Einfluss auf den Verlauf des Blutdrucks in der Cre<sup>-</sup>-Linie.

#### 4.1.2. Aktivität

Durch die Bewegung der Mäuse auf der Messplatte konnten ihnen zu jedem Zeitpunkt Aktivitätswerte zugeordnet werden. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den  $Cre^+$ -Gruppen an Tag oder Nacht im Verlauf:

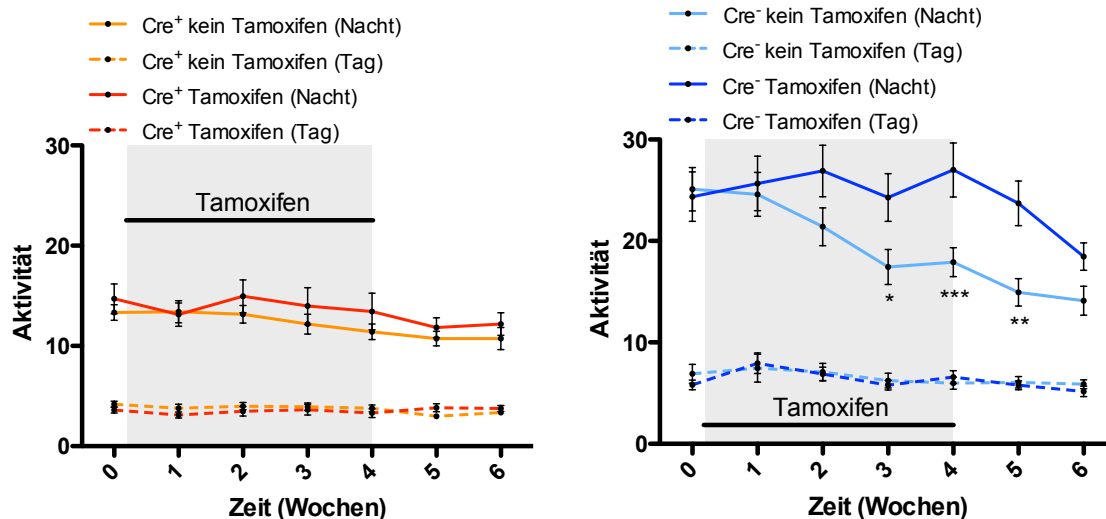


**Abb. 19: Aktivität der  $Cre^+$ - und  $Cre^-$ -Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte in der Nacht (links) und der Aktivitätswerte am Tag (rechts) der  $Cre^+$ - und der  $Cre^-$ -Mauslinie. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelperiode zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellperiode gebildet werden.  $Cre^+$  ohne Tamoxifen, n=17.  $Cre^+$  Tamoxifen, n=18.  $Cre^-$  ohne Tamoxifen, n=11.  $Cre^-$  Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurde die Gruppe  $Cre^+$  Tamoxifen gegen alle anderen Gruppen. Signifikanzen einer Gruppe zu der Gruppe  $Cre^+$  Tamoxifen wurden mit der jeweiligen Gruppenfarbe gekennzeichnet)

Hieraus kann man folgern, dass der beobachtete Blutdruckunterschied nicht durch unterschiedliche Aktivitätsniveaus zwischen den beiden  $Cre^+$ -Gruppen zustande gekommen sein konnte.

Beim Vergleich der  $Cre^+$ -Gruppen mit den  $Cre^-$ -Gruppen zeigten sich bereits zum Zeitpunkt 0 Wochen signifikante Unterschiede. Die  $Cre^-$ -Gruppen starteten in der Nacht mit einer höheren Aktivität (circa 25) als die  $Cre^+$ -Gruppen (circa 14). Auch am Tag lag ihre Aktivität anfangs um 6, während die  $Cre^+$ -Gruppen anfangs eine Aktivität um 4 hatten.

Während der Unterschied zwischen den  $Cre^-$ - und  $Cre^+$ -Gruppen tagsüber fast durchweg signifikant blieb, glich sich die Aktivität der  $Cre^-$ -kein Tamoxifen-Gruppe im Verlauf den  $Cre^+$ -Gruppen an, sodass der Unterschied zwischen diesen Gruppen nicht signifikant blieb. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Tag- und Nachtaktivitäten sind im Folgenden dargestellt:

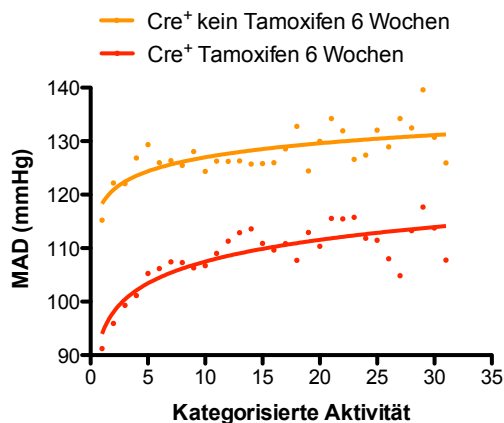


**Abb. 20: Darstellung der Aktivität der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Es zeigte sich ein deutlicher Tag- und Nachtunterschied der Aktivitäten in beiden Linien. Während sich der Aktivitätsverlauf zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen durchweg gleich verhielt und es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab, kam es zwischen den Gruppen der Cre<sup>-</sup>-Linie im Verlauf zu signifikanten Unterschieden. Zwischen Woche 3 und 5 war die Aktivität der Cre<sup>-</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen signifikant niedriger. Dieser Unterschied war jedoch in Woche 6 bereits nicht mehr signifikant.

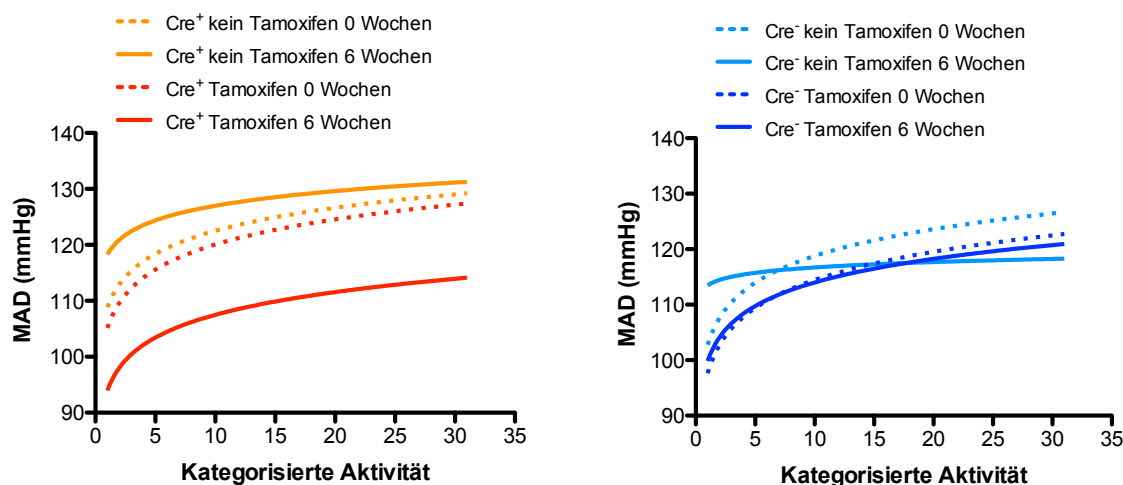
Um einen Einfluss der Aktivität auf die gefundenen Blutdruckunterschiede auszuschließen, wurde die Aktivität kategorisiert. Somit konnten den Aktivitätswerten und damit den einzelnen Kategorien die zugehörigen Blutdruckwerte jedes 5-Minutenwertes zum Zeitpunkt 0 und 6 Wochen zugeteilt werden. Aktivitätswerte von 0-2 wurden der Kategorie 1 zugeordnet und anschließend in 2er Schritten der nächst höheren Kategorie zugeteilt. Aktivitäten über 60 fielen in die höchste Kategorie 31.

Abbildung 21 zeigt die Kurvenanpassung für die aktivitätsnormierten Blutdruckwerte durch einen semi-logarithmischen Fit. Dieser Fit passt am Besten zu den ansteigenden Blutdruckwerten bei höherer Aktivität. Trotz der Streuung der einzelnen Werte ist der Fit eine sinnvolle Methode um die Gruppen miteinander zu vergleichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden die einzelne Punkte nicht mehr dargestellt, sondern lediglich die Kurvenanpassungen (Fits).



**Abb. 21: Kurvenanpassung der aktivitätsnormierten Blutdruckwerte der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe zum Zeitpunkt 6 Wochen.** Die Mausaktivitäten wurden in Kategorien eingeteilt. Aktivitätswerte von 0-2 wurden der Kategorie 1 zugeordnet, Aktivitätswerte von 2-4 der Kategorie 2 etc. Aktivitätswerte von 60 und höher wurden der Kategorie 31 zugeordnet. Aus den zu der jeweiligen Aktivität zugehörigen Blutdruckwerten wurden die arithmetischen Mittel gebildet und hier anhand eines semi-logarithmischen Fits für die beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen zum Zeitpunkt 6 Wochen exemplarisch dargestellt. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Der R<sup>2</sup> Wert betrug für die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe 0,52 und für die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe 0,73.

Der Vergleich der aktivitätsnormierten Blutdruckwerte zwischen Woche 0 und 6 ist hier dargestellt:

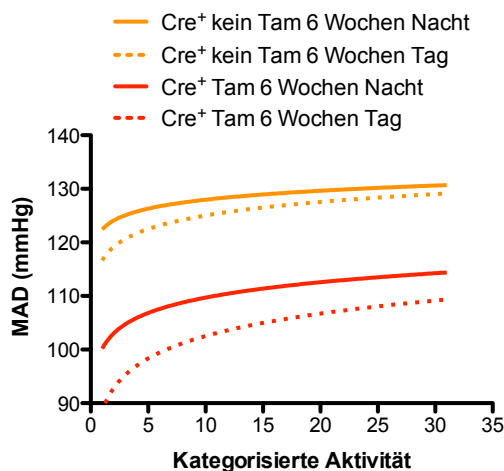


**Abb. 22: Aktivitätsnormierte Blutdruckwerte der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Die Mausaktivitäten wurden in Kategorien eingeteilt. Aktivitätswerte von 0-2 wurden der Kategorie 1 zugeordnet, Aktivitätswerte von 2-4 der Kategorie 2 etc. Aktivitätswerte von 60 und höher wurden der Kategorie 31 zugeordnet. Aus den zu der jeweiligen Aktivität zugehörigen Blutdruckwerten wurden die arithmetischen Mittel gebildet und hier anhand eines semi-logarithmischen Fits dargestellt. Verglichen werden die aktivitätsnormierten Blutdruckwerte zum Zeitpunkt 0 und 6 Wochen der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppe (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppe (rechts). Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. Zum Zeitpunkt 0 Wochen beträgt der R<sup>2</sup>-Wert der Cre<sup>+</sup>-kein Tam-Gruppe 0,90, der Cre<sup>+</sup>-Tam-Gruppe 0,93, der Cre<sup>-</sup>-kein Tam-Gruppe 0,82 und der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe 0,91. Zum Zeitpunkt 6 Wochen beträgt der R<sup>2</sup>-Wert der Cre<sup>+</sup>-kein Tam-Gruppe 0,52, der Cre<sup>+</sup>-Tam-Gruppe 0,73, der Cre<sup>-</sup>-kein Tam-Gruppe 0,06 und der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe 0,86.

Abbildung 22 verdeutlicht, dass der gefundene Blutdruckunterschied in der Cre<sup>+</sup>-Linie zwischen der Tamoxifen-Gruppe und der Gruppe ohne Tamoxifen auch nach aktivitätskategorisierten Blutdruckwerten deutlich nachweisbar ist. Außerdem zeigen die Graphen, dass Aktivi-

tät und Blutdruck positiv miteinander korrelierten. Die Cre<sup>-</sup>-Gruppen zeigten hingegen, wie schon zuvor, keine signifikanten Unterschiede nach Tamoxifen-Gabe. Wie aber auch in den Cre<sup>+</sup>-Gruppen korrelierten Blutdruckwerte und Aktivität positiv miteinander.

Da in den zuvor gezeigten Blutdruckdaten deutliche Unterschiede im Tag-/ Nacht-Rhythmus der Tiere gefunden wurden, zeigt die folgende Abbildung die aktivitätsnormierten Blutdruckwerte zusätzlich in Tag und Nacht aufgespalten:

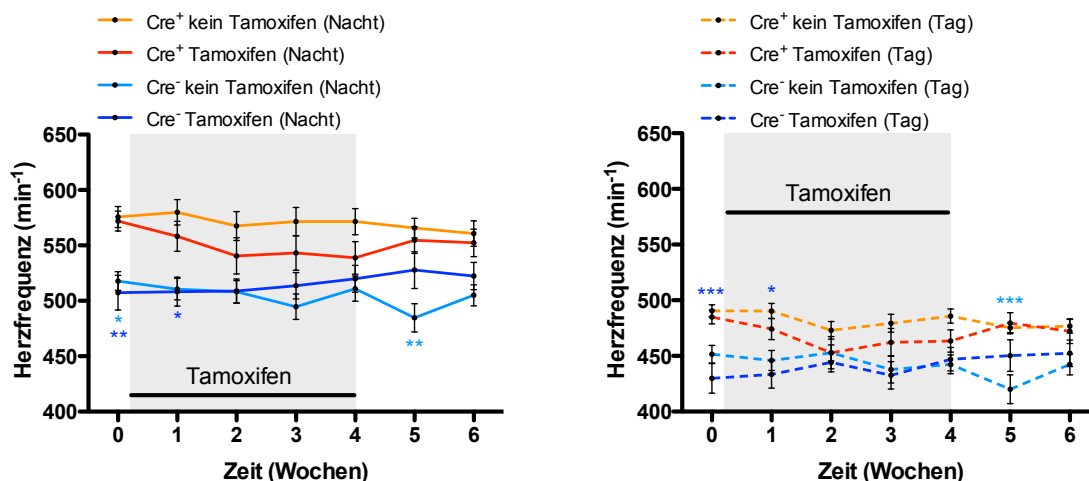


**Abb. 23: Tag und Nacht getrennte, aktivitätsnormierte Blutdruckwerte der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Die Mäusaktivitäten wurden in Kategorien eingeteilt. Aktivitätswerte von 0-2 wurden der Kategorie 1 zugeordnet, Aktivitätswerte von 2-4 der Kategorie 2 etc. Aktivitätswerte von 60 und höher wurden der Kategorie 31 zugeordnet. Aus den zu der jeweiligen Aktivität zugehörigen Blutdruckwerten wurden die arithmetischen Mittel gebildet und hier anhand eines semi-logarithmischen Fits dargestellt. Verglichen werden die aktivitätsnormierten Blutdruckwerte zum Zeitpunkt 0 und 6 Wochen der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppe für Tag und Nacht getrennt. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Der R<sup>2</sup>-Wert der Cre<sup>+</sup>-kein Tam-Gruppe am Tag betrug 0,27 und in der Nacht 0,28. In der Cre<sup>+</sup>-Tam-Gruppe lag der Wert bei 0,59 am Tag und bei 0,54 in der Nacht.

Wie schon bei den Tag und Nacht vereinten, aktivitätsnormierten Blutdruckwerten zeigte sich auch bei der Trennung von Tag und Nacht ein geringerer MAD in den Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppen als in den Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppen zum Zeitpunkt 6 Wochen. Zudem war der MAD in beiden Gruppen in der Nacht höher als am Tag. Dies zeigt, dass nicht nur eine höhere Aktivität zu den höheren Blutdruckwerten in der Nacht beitragen könnte, sondern auch eine erhöhte Sympathikusaktivität in der nächtlichen, aktiven Phase der Tiere.

#### 4.1.3. Herzfrequenz

Abb. 24 und 25 zeigen den Verlauf der Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Gruppen über die 6 Wochen der Messung. Die Analyse der Herzfrequenz wurde hinzugezogen, um auszuschließen, dass die Blutdruckveränderungen durch veränderte Herzfrequenzen und somit über eine Änderung der kardialen Funktion (Schlagvolumen x Herzfrequenz = Cardiac Output) verursacht wurden.

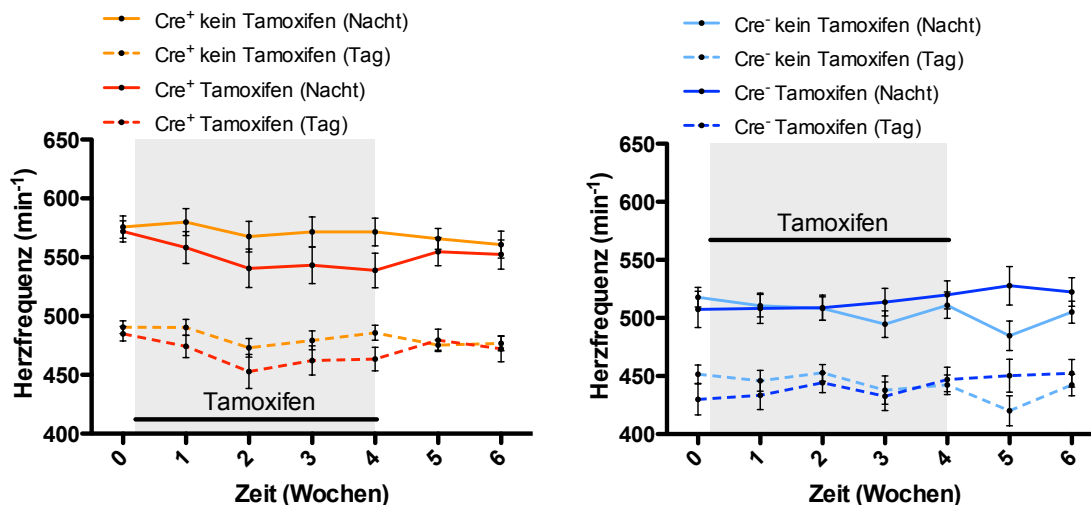


**Abb. 24: Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Herzfrequenzen in der Nacht (links) und der Herzfrequenzen am Tag (rechts) der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinien. Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurde die Gruppe Cre<sup>+</sup> Tamoxifen gegen alle anderen Gruppen. Signifikanzen einer Gruppe zu der Gruppe Cre<sup>+</sup> Tamoxifen wurden mit der jeweiligen Gruppenfarbe gekennzeichnet)

Der hier dargestellte Vergleich der Nacht- bzw. Tagwerte der Herzfrequenzen der jeweiligen Gruppen miteinander zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen der Cre<sup>+</sup>- oder Cre<sup>-</sup>-Linie. Auch über den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe und danach kam es in keiner Gruppe zu einer Veränderung der Herzfrequenz.

Allerdings zeigten sich wie zuvor bei der Aktivität unterschiedliche Ausgangswerte zwischen den Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Gruppen. Die Cre<sup>-</sup>-Gruppen starteten in der Nacht mit einer Frequenz um 510 Schläge/min, während die Cre<sup>+</sup>-Gruppen zum Zeitpunkt 0 eine signifikant höhere Frequenz um 575 Schläge/min hatten. Auch am Tag war der Unterschied zwischen der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe und der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe am Zeitpunkt 0 signifikant. Im Verlauf der Messungen glichen sich die Werte allerdings an, sodass es keine signifikanten Unterschiede mehr gab.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die unterschiedlichen Werte der Herzfrequenz für Tag und Nacht:



**Abb. 25: Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Herzfrequenz für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Die telemetrische Messung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Die Messung jedes Zeitpunktes erfolgte im wöchentlichen Rhythmus über jeweils 48 h bzw. für Zeitpunkt 0 über 72 h. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=17. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=18. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=11. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=14. (2-way ANOVA; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppen mit Tamoxifen- gegen die Gruppen ohne Tamoxifen-Gabe)

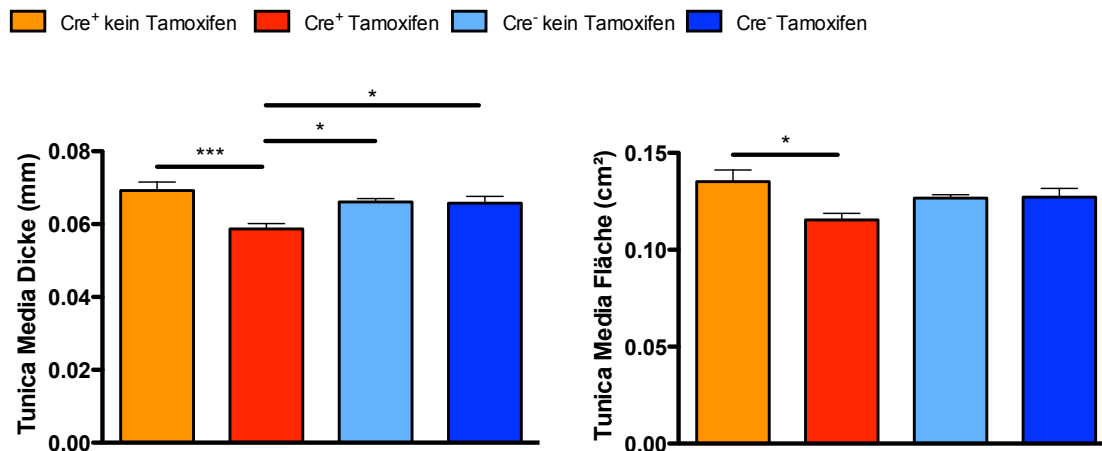
Wie schon zuvor beim Blutdruck und der Aktivität zeigten sich auch bei der Analyse der Herzfrequenz deutliche Unterschiede zwischen Tag und Nacht innerhalb der gleichen Gruppen. In der Nacht wiesen sowohl die Tiere der Cre<sup>+</sup>- als auch die Tiere der Cre<sup>-</sup>-Gruppen deutlich höhere Herzfrequenzen auf, als die zugehörigen Frequenzen am Tag, was einen weiteren Hinweis auf einen gesunden Tag-/ Nacht-Rhythmus liefert.

#### 4.2. Einfluss des Knockouts auf Histologie der Aorta

Als weiteres morphologisches Korrelat eines Blutdruckabfalls wurde die Tunica Media der Aorta analysiert, um Rückschlüsse über morphologische Umbauprozesse im Gefäßsystem der Mauslinien ziehen zu können. Die Aorten wurden zum Zeitpunkt 6 Wochen entnommen. Zu diesem Zeitpunkt erhielten alle Tiere bereits wieder seit 2 Wochen Normalfutter nach zuvor ggf. 4-wöchiger Tamoxifen-Futtergabe.

Die Auswertung der Tunica Media der Aorta erfolgte auf zwei verschiedene Weisen. Einmal wurde die Schichtdicke an 10 verschiedenen Stellen pro Aorta bestimmt und einmal die gesamte Mediafläche durch Ausmessen eines inneren und äußeren Umfangs bestimmt. Passend zu dem zuvor beschriebenen Blutdruckabfall in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe, der nicht ab-

hängig von der Herzfrequenz und der Aktivität ist, zeigten die histologischen Befunde der Aorta passende Ergebnisse. Diese sind in Abbildung 26 dargestellt:



**Abb. 26: Tunica Media der Aorta der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Tunica Media Dicke (links) und der Tunica Media Fläche (rechts) der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinien zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=6. (One-Way ANOVA; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen miteinander.)

Es zeigte sich, dass der zuvor festgestellte signifikante Blutdruckunterschied zwischen den Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen ebenfalls einen Unterschied der Tunica Media Dicke und Fläche nach sich zog. Die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe hatte eine signifikant geringere Media Dicke und Fläche als die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe.

In der Cre<sup>-</sup>-Linie lag bei Dicke und Fläche kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tam- und kein Tam-Gruppen vor. Zwischen den Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen zeigten sich nur beim Messen der Media Dicke signifikante Unterschiede. Hier war die Media Dicke der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe signifikant niedriger als die Media Dicke der beiden Cre<sup>-</sup>-Gruppen. Im Vergleich der Tunica Media Fläche zeigte sich im Vergleich der Linien miteinander kein signifikanter Unterschied.

### 4.3. Einfluss des Knockouts auf Blutdruckregulation

Zur Analyse von Gegenregulationsmechanismen als Antwort auf eine Blutdruckveränderung oder auch von direkten Einflüssen des spezifischen glattmuskulären NKCC1-Knockouts auf die Blutdruckregulation wurden mehrere Versuche durchgeführt. Durch Gabe einer Hoch-/Niedrigsalzdiät sollte die Salzsensitivität getestet werden. Durch Anwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen konnte das tubuloglomeruläre Feedback und somit das RAAS genauer untersucht werden. Während eine Hochsalzdiät in der Regel für eine Herabregulation des RAAS sorgt, führt eine Niedrigsalzdiät normalerweise zu einer Hochregulation. Durch Anwendung beider Diäten hintereinander konnte herausgefunden werden, wie dieser spezifische Knockout auf Salzangel bzw. Salzüberangebot reagiert. Eine pharmakologische AT1-Rezeptor-Blockade mit Losartan diente der weiteren Untersuchung des RAAS unter Bedingungen, in denen das RAAS aufgrund der Blutdrucksenkung eigentlich hochreguliert sein sollte, aber durch Blockade des Angiotensin-Rezeptors nur eingeschränkte Effekte zeigen kann. Diese Ergebnisse wurden durch Bestimmungen der Plasmapreninaktivität, der Renin-mRNA in der Niere und des Plasmaaldosteronspiegels untermauert.

Den für die Losartan- und Salzversuche verwendeten Tieren wurden zuerst Blutdrucksender implantiert und anschließend den Tamoxifen-Gruppen über 4 Wochen Tamoxifen-Futter zugeführt. Anschließend erhielten alle Gruppen über 2 weitere Wochen Normalfutter. Zum Zeitpunkt 6 Wochen wurde Losartan wie beschrieben für 7 Tage in der Dosis 30 mg/kg KG/Tag über das Trinkwasser gegeben und durch telemetrische Messung Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz aufgezeichnet. Nach der Losartan-Gabe erhielten alle Mäuse über 1 Woche eine der Normaldiät ähnliche Kontrolldiät und anschließend über jeweils 10 Tage zuerst eine Niedrigsalzdiät und anschließend eine Hochsalzdiät. Die Organentnahme an diesen Tieren erfolgte am 10. Tag der Hochsalzdiät.

Für die Bestimmungen der Hormone wurden Tiere aller Gruppen zum Zeitpunkt 6 Wochen, also nach 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe und anschließend 2-wöchiger Normalfuttergabe untersucht.

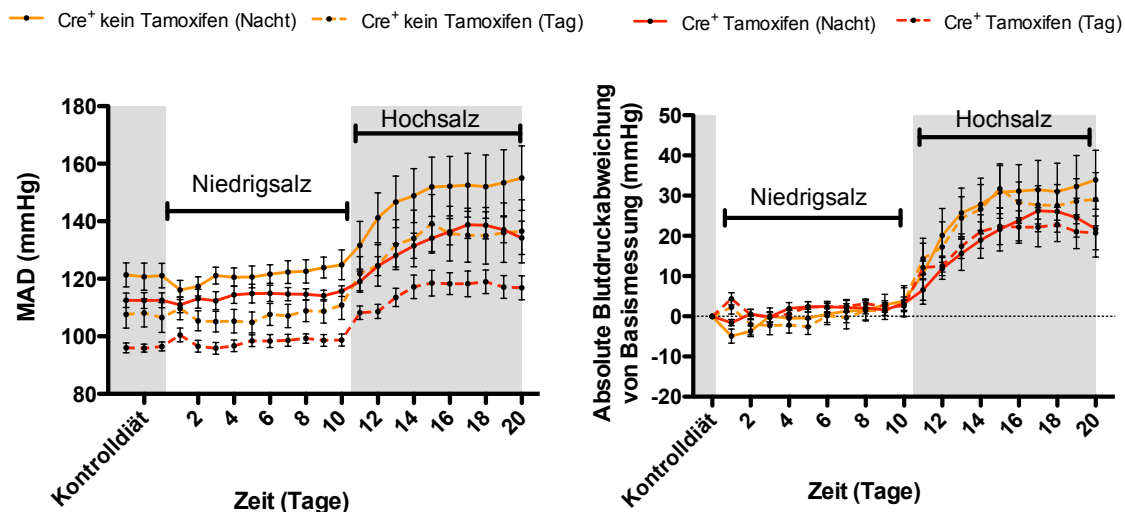
#### 4.3.1. Folgen einer Hoch-/ Niedrigsalzdiät

Die telemetrische Messung von Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz begann in den letzten 3 Tagen der 1-wöchigen Kontrolldiätgabe. Die Daten wurden von nun an durchgängig erhoben. Für die letzten 3 Tage Kontrolldiät und jeden Tag der jeweils 10-tägigen Messung unter

Hoch- bzw. Nidrigsalz wurde analog zu 4.1. das arithmetische Mittel für jeweils 12 Stunden Tag und Nacht gebildet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

#### 4.3.1.1. Blutdruck

Abbildung 27 zeigt die Blutdruckveränderung unter Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät der Cre<sup>+</sup>-Linie.



**Abb. 27: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung von der Kontrolldiät in der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie nach Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln der Kontrolldiät (rechts) der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung beinhaltete eine 3-tägige Kontrolldiät, gefolgt von einer 10-tägigen Nidrigsalzdiät und einer abschließenden Hochsalzdiät. Die Kontrolldiät begann nach dem Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=5. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=8. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

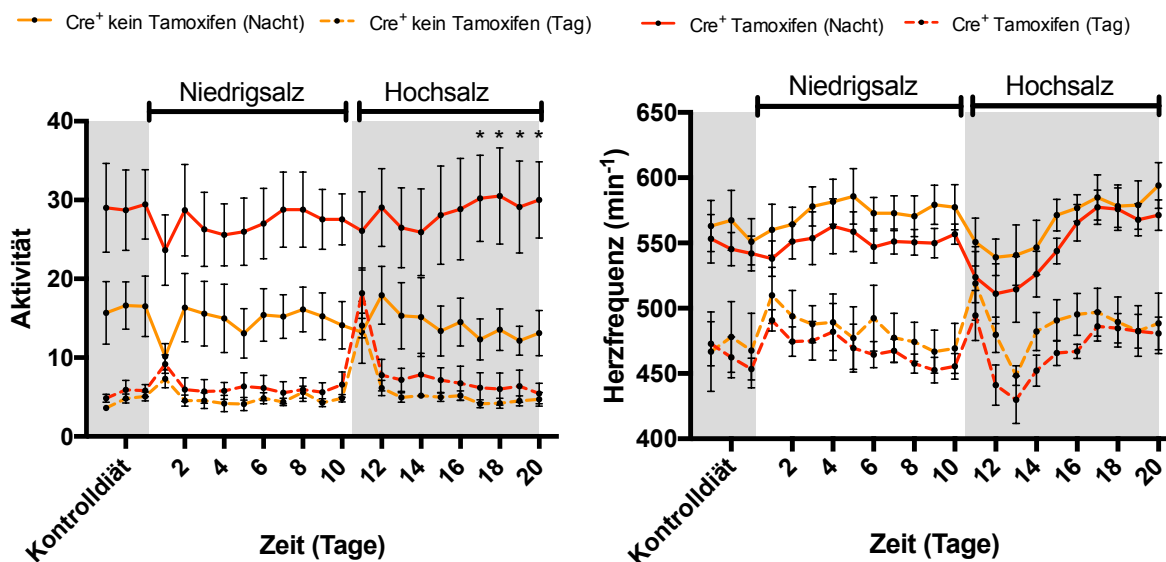
Unter der Kontrolldiät zeigte sich, wie auch schon zuvor beschrieben, ein geringerer Blutdruck in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe als in der Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe. Diese Differenz war jedoch wahrscheinlich wegen der geringeren Anzahl an Tieren nicht signifikant. Es zeigten sich außerdem deutliche Blutdruckunterschiede im Vergleich der Tag- und Nachtwerte innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Nach Gabe von Nidrigsalz kam es in keiner der beiden Gruppen zu einer Veränderung des Blutdrucks. Die anschließende Hochsalzdiät führte hingegen zu einem deutlichen Blutdruckanstieg in beiden Gruppen. In der Cre<sup>+</sup>-Gruppe stieg der Blutdruck um 26,23 mmHg ( $\pm 5,19$ ) auf ein Maximum von 138,76 mmHg ( $\pm 4,71$ ) in der Nacht und um 22,85 mmHg ( $\pm 4,28$ ) auf ein Maximum von 118,97 mmHg ( $\pm 4,08$ ) am Tag. In der Nacht stieg der Blutdruck in der Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe um 33,95 mmHg ( $\pm 7,31$ ) auf ein Maximum von 155,02 mmHg ( $\pm 11,23$ ) und am Tag um 31,70 mmHg ( $\pm 6,19$ ) auf ein Maximum von 139,13 mmHg ( $\pm$

10,19). Der Blutdruckanstieg verlief in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß und ist somit zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich zwischen den beiden  $\text{Cre}^+$ -Gruppen.

#### 4.3.1.2. Aktivität und Herzfrequenz

Abbildung 28 zeigt den Einfluss der Hoch- und Nidrigsalzdiäten auf die Aktivität und die Herzfrequenz in der  $\text{Cre}^+$ -Linie.



**Abb. 28: Aktivität und Herzfrequenz der  $\text{Cre}^+$ -Mauslinie nach Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte und Herzfrequenzen der  $\text{Cre}^+$ -Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung beinhaltete eine 3-tägige Kontrolldiätmessung, gefolgt von einer 10-tägigen Nidrigsalzdiät und einer abschließenden Hochsalzdiät. Die Kontrolldiät begann nach dem Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden.  $\text{Cre}^+$  ohne Tamoxifen,  $n=5$ .  $\text{Cre}^+$  Tamoxifen,  $n=8$ . (2-way ANOVA; \* $P<0.05$ ; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Die  $\text{Cre}^+$ -Tamoxifen-Gruppe startete unter der Kontrolldiät bereits mit einer höheren Aktivität in der Nacht, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur  $\text{Cre}^+$ -kein Tamoxifen-Gruppe war. Gegen Ende der Hochsalzdiät wurde dieser Unterschied zu der  $\text{Cre}^+$ -Gruppe ohne Tamoxifen signifikant. Am Tag waren keine Unterschiede in Aktivität und Herzfrequenz zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Bei der Umstellung auf die Hochsalzdiät kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg der Aktivität am Tag, da die Umstellung zur Tagzeit erfolgte. In der Nacht zeigten beide Gruppen eine deutlich höhere Aktivität als am Tag, was einen gesunden Tag-/ Nacht-Rhythmus verdeutlicht. Unter den verschiedenen Diäten kam es im Verlauf jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität innerhalb der Gruppen.

Die Herzfrequenz zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Vergleich der Tag- und Nachtwerte derselben Gruppen war die Herzfrequenz in der Nacht höher als am Tag, was ebenfalls für einen gesunden Tag-/ Nacht-Rhythmus spricht. Zu Beginn der Hochsalzdiät kam es kurzzeitig zu einem Anstieg und anschließend zu einem überschießenden Ab-

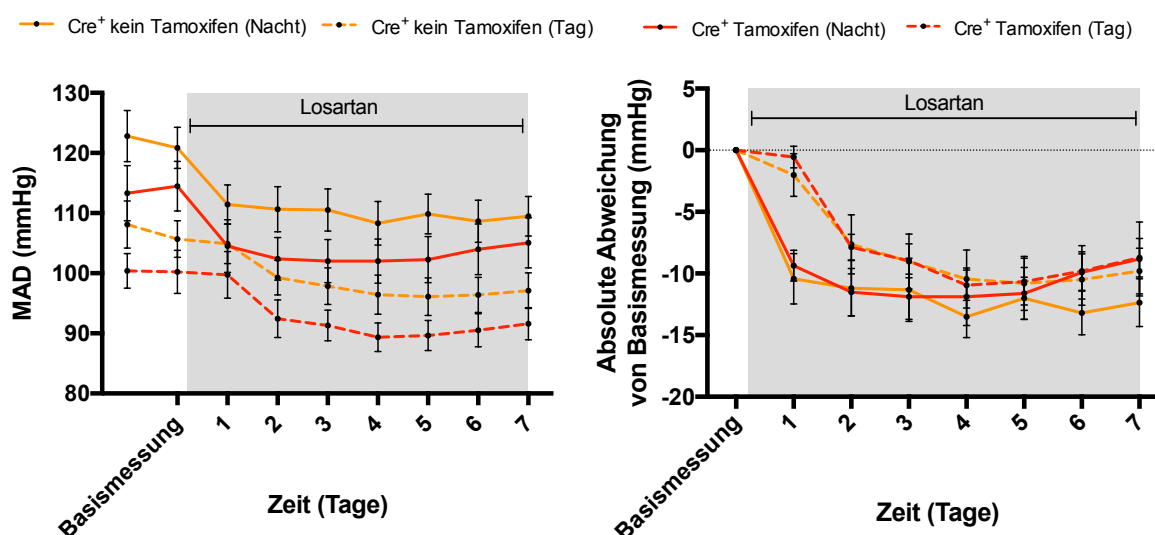
fall der Herzfrequenz am Tag. Die Herzfrequenz glich sich jedoch gegen Ende wieder an die ursprüngliche Herzfrequenz unter der Kontrolldiät an. Ansonsten hatten die Diäten in beiden Gruppen keinen Einfluss auf die Herzfrequenz.

#### 4.3.2. Folgen einer AT1-Rezeptor-Blockade mittels Losartan

Die telemetrische Messung von Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz unter Losartan-Gabe begann nach dem Zeitpunkt 6 Wochen, das heißt 2 Wochen nach erfolgter Induktion mittels Tamoxifen-Futter. Die Daten wurden durchgängig mit Beginn einer 2-tägigen Basismessung gefolgt von 7 Tagen Losartan kontinuierlich über 9 Tage erhoben. Die Basismessung erfolgte als 48-stündige Messung zum 6 Wochen Zeitpunkt. Die Daten zeigen das arithmetische Mittel für jeweils 12 Stunden Tag und Nacht über die Zeit.

##### 4.3.2.1. Blutdruck

Abbildung 29 zeigt die Blutdruckveränderung der Cre<sup>+</sup>-Linie unter Losartan.



**Abb. 29: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung von der Kontrolldiät in der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie nach chronischer Losartan-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln der Kontrolldiät (rechts) der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung beinhaltete eine 2-tägige Basismessung, gefolgt von einer 7-tägigen Gabe von Losartan (grauer Bereich). Die Basismessung begann nach dem Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=7. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

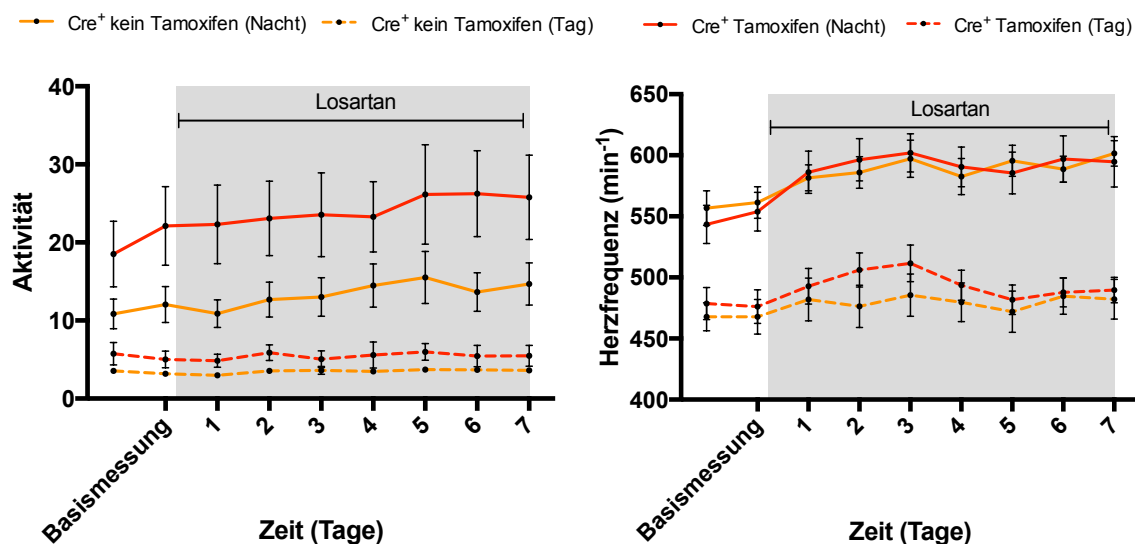
Wie schon zuvor, zeigte sich auch unter Losartan innerhalb aller Gruppen ein Blutdruckunterschied zwischen Tag und Nacht. Während der Basismessung hatte die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe am Tag und in der Nacht erwartungsgemäß einen niedrigeren Blutdruck als die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe, welcher aber wegen einer geringen Tierzahl nicht signifikant war. Nach Gabe von Losartan fiel der Blutdruck in beiden Gruppen ab. Die Dynamik des Blut-

druckabfalls war dabei in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, sodass die anfängliche, zwar nicht signifikante Blutdruckdifferenz zwischen Tamoxifen und nicht Tamoxifen auch nach 7 Tagen Losartan erhalten blieb.

In der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe fiel der Blutdruck während der 7 Tage auf ein Minimum von 102,01 mmHg ( $\pm 3,70$ ) um 11,89 mmHg ( $\pm 2,33$ ) in der Nacht und am Tag um 10,94 mmHg ( $\pm 1,24$ ) auf ein Minimum von 89,36 mmHg ( $\pm 2,40$ ). In der Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe lag das Minimum in der Nacht bei 108,33 mmHg ( $\pm 3,6$ ) (13,51 mmHg ( $\pm 1,69$ ) Abfall) und am Tag bei 96,09 mmHg ( $\pm 3,16$ ) (10,81 mmHg ( $\pm 2,19$ ) Abfall).

#### 4.3.2.2. Aktivität und Herzfrequenz

Abbildung 30 zeigt den Einfluss von Losartan auf die Aktivität und die Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>-Linie.



**Abb. 30: Aktivität und Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie nach chronischer Losartan-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte und Herzfrequenzen der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Die telemetrische Messung beinhaltete eine 2-tägige Basismessung, gefolgt von einer 7-tägigen Gabe von Losartan (grauer Bereich). Die Basismessung begann nach dem Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=7. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Wie schon zuvor unterschieden sich die Tag- und Nachtwerte für Aktivität und Herzfrequenz innerhalb der einzelnen Gruppen. Weder am Tag noch in der Nacht lagen signifikante Unterschiede in der Aktivität oder der Herzfrequenz zwischen beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen vor. Auch über die Dauer der 7-tägigen Losartan-Gabe kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität. Bei Analyse der Herzfrequenz war ein leichter Frequenzanstieg in beiden Gruppen unter Losartan zu beobachten.

#### 4.3.3. Einfluss des Knockouts auf blutdruckrelevante Hormone

Nachdem weder Salzdiäten noch Losartan Unterschiede zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen provozieren konnten, wurden die Plasmareninaktivität und Plasmaaldosteronkonzentration in beiden Gruppen bestimmt, um eine veränderte RAAS-Regulation final ausschließen zu können. Die Plasmareninaktivität wurde anhand des Angiotensinogen-Umsatzes zu Angiotensin I mittels RIA bestimmt. Zusätzlich wurde die Renin-mRNA aus Nierengewebe bestimmt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

|                             | Cre <sup>+</sup> kein Tamoxifen |          | <i>n</i> | Cre <sup>+</sup> Tamoxifen |          | <i>n</i> | <i>P</i> |
|-----------------------------|---------------------------------|----------|----------|----------------------------|----------|----------|----------|
| <b>Plasmareninaktivität</b> |                                 |          |          |                            |          |          |          |
| (ng/ml/h)                   | 31,36                           | ± 8,90   | 7        | 39,38                      | ± 8,71   | 8        | ns       |
| <b>Renin-mRNA</b>           |                                 |          |          |                            |          |          |          |
| (Renin/L32)                 | 2,14                            | ± 0,25   | 6        | 2,06                       | ± 0,22   | 10       | ns       |
| <b>Plasmaaldosteron</b>     |                                 |          |          |                            |          |          |          |
| (pg/ml)                     | 15,30                           | ± 5,35   | 7        | 51,02                      | ± 17,06  | 8        | ns       |
| <b>Aldosteron-Renin-</b>    |                                 |          |          |                            |          |          |          |
| <b>Verhältnis</b>           | 0,0698                          | ± 0,0031 | 7        | 0,2043                     | ± 0,0755 | 8        | ns       |
| (ng/dl in ng/(ml/h))        |                                 |          |          |                            |          |          |          |

**Tabelle 4: Hormoneller Status der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Bestimmt wurden die Plasmareninaktivität, die Renin-mRNA, die Aldosteron-Konzentration und das Aldosteron-Renin-Verhältnis. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. (Zweistichproben-t-Test)

Die hier dargestellten arithmetischen Mittel der gemessenen Parameter zeigen keine Unterschiede zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen in der Plasmareninaktivität. Auch die Renin-mRNA, die Plasmaaldosteronkonzentration, sowie das Aldosteron-Renin-Verhältnis unterscheiden sich nicht signifikant.

Daher bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass es keinen Unterschied im Hinblick auf den Wasser- und Elektrolyt-regulierenden Hormonstatus des RAAS zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen gibt, sowie die Reaktion beider Gruppen auf Hoch-/ bzw. Niedrigsalz und auf Losartan gleich ist. Insgesamt scheint die Cre<sup>+</sup>-Linie salzsensitiv bezüglich des Blutdrucks zu sein.

#### 4.4. Einfluss des Knockouts auf Nierenfunktion

Zur Analyse einer veränderten Nierenfunktion sowie von morphologischen Veränderungen der Niere aufgrund des spezifischen glattmuskulären NKCC1-Knockouts wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Wie zuvor erhielten die hierfür verwendeten Tiere in den entsprechenden Gruppen Tamoxifen-Futter über 4 Wochen und anschließend über 2 Wochen Normalfutter für alle Gruppen. Nach diesen insgesamt 6 Wochen erfolgten Untersuchungen von Blut, Urin und der renalen Clearance sowie der fraktionellen Ausscheidung (FE) im metabolischen Käfig. Die Untersuchung der GFR mittels FITC-Sinistrin erfolgte jeweils im selben Tier zum Zeitpunkt 0 und 6 Wochen.

##### 4.4.1. Blutgasanalyse

Die Durchführung der im Folgenden dargestellten Blutgasanalyse lieferte unter anderem Informationen über die Regulation des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts durch die Niere. Es wurden jeweils die beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen miteinander verglichen.

|                                             | Cre <sup>+</sup> kein Tam |        | Cre <sup>+</sup> Tam |        | P  |
|---------------------------------------------|---------------------------|--------|----------------------|--------|----|
| <b>pH</b>                                   | 7,33                      | ± 0,01 | 7,34                 | ±0,01  | ns |
| <b>pCO<sub>2</sub></b> (mmHg)               | 43,23                     | ± 1,23 | 42,65                | ± 0,93 | ns |
| <b>pO<sub>2</sub></b> (mmHg)                | 53,38                     | ± 2,30 | 54,84                | ± 2,58 | ns |
| <b>BE</b> (mmol/l)                          | -3,20                     | ± 0,80 | -2,81                | ± 0,80 | ns |
| <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (mmol/l) | 22,44                     | ± 0,57 | 22,68                | ± 0,60 | ns |
| <b>Laktat</b> (mg/dl)                       | 2,29                      | ± 0,32 | 2,73                 | ± 0,30 | ns |
| <b>Na<sup>+</sup></b> (mmol/l)              | 150,70                    | ± 0,47 | 149,00               | ± 0,36 | ns |
| <b>K<sup>+</sup></b> (mmol/l)               | 4,63                      | ± 0,09 | 4,67                 | ± 0,06 | ns |
| <b>Cl<sup>-</sup></b> (mmol/l)              | 119,30                    | ± 0,47 | 117,60               | ± 0,51 | ns |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b> (mmol/l)             | 1,27                      | ± 0,01 | 1,25                 | ± 0,01 | ns |
| <b>Hkt</b> (%)                              | 45,90                     | ± 1,15 | 45,35                | ± 0,93 | ns |
| <b>Glukose</b> (mg/dl)                      | 159,20                    | ± 8,83 | 166,70               | ± 8,70 | ns |

**Tabelle 5: Blutgasanalyse der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Bestimmt wurden pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Laktat, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Hkt und Glukose. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=11. (; \*P<0.05, \*\*P<0.01; Statistisch getestet mittels Zweistichproben t-Test wurde die Tamoxifen-Gruppe gegen die Gruppe ohne Tamoxifen)

Tabelle 5 verdeutlicht, dass sich die Blutgasanalysen im Vergleich der  $\text{Cre}^+$ -Gruppen unter Tamoxifen-Gabe und ohne Tamoxifen-Gabe nicht signifikant unterschieden. Es zeigte sich kein Unterschied im Hinblick auf den pH-Wert und andere Parameter des Säure-Basen-Haushalts. Auch die Glukosekonzentration, die Elektrolyte und der Hämatokritwert unterschieden sich innerhalb der  $\text{Cre}^+$ -Gruppen nicht signifikant.

#### 4.4.2. Nierenfunktion

Zur Überprüfung einer Auswirkung des NKCC1-Knockouts in Bezug auf die Filtrationsleistung der Niere wurde die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Ein im Vergleich zum Vas efferens dilatierteres Vas afferens würde über eine Erhöhung des Filtrationsdrucks ( $P(\text{eff})$ ) zu einer höheren glomerulären Filtrationsrate führen und umgekehrt. Die Bestimmung der GFR erfolgte einerseits durch transkutane photometrische Messung nach Injektion von FITC-Sinistrin und andererseits durch Kreatinin-Clearance-Bestimmung aus Plasma und 24-h-Sammelurin, gewonnen mit Hilfe des metabolischen Käfigs. Letzterer ermöglichte außerdem die Bestimmung der fraktionellen Ausscheidungen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ . Darüber hinaus wurde auch das Plasmavolumen bestimmt, um einerseits die Nierenfunktion bezüglich Wasserhaushalt/ Volumenretention zu überprüfen und konsekutiv den Einfluss eines veränderten Plasmavolumens auf den Blutdruck ausschließen zu können bzw. ein erhöhtes Plasmavolumen als Kompensationsmechanismus einer möglichen Vasodilatation zu detektieren.

|                                                      | Cre <sup>+</sup> kein Tamoxifen | <i>n</i> | Cre <sup>+</sup> Tamoxifen | <i>n</i> | <i>P</i> |
|------------------------------------------------------|---------------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|
| <b>GFR vor Tamoxifen-Gabe</b><br>(ml/24 h/100 g KG)  | 1027,68 ± 61,52                 | 14       | 1335,82 ± 98,54            | 14       | *        |
| <b>GFR nach Tamoxifen-Gabe</b><br>(ml/24 h/100 g KG) | 975,44 ± 56,74                  | 14       | 1277,01 ± 80,30            | 14       | **       |
| <b>GFR-Veränderung</b><br>(ml/24 h/100 g KG)         | -52,24 ± 56,31                  | 14       | -58,81 ± 112,80            | 14       | ns       |
| <b>Kreatininclearance</b><br>(ml/24 h)               | 805,5 ± 123,1                   | 8        | 749,0 ± 159,9              | 10       | ns       |
| <b>FE (Na<sup>+</sup>)</b><br>(%)                    | 0,2625 ± 0,0444                 | 8        | 0,4180 ± 0,0851            | 10       | ns       |
| <b>FE (K<sup>+</sup>)</b><br>(%)                     | 6,564 ± 1,131                   | 8        | 10,800 ± 1,752             | 10       | ns       |
| <b>FE (Cl<sup>-</sup>)</b><br>(%)                    | 0,6375 ± 0,0931                 | 8        | 0,8860 ± 0,1688            | 10       | ns       |
| <b>Plasmavolumen</b><br>(ml)                         | 1,89 ± 0,13                     | 15       | 1,78 ± 0,11                | 13       | ns       |

**Tabelle 6: Relevante Parameter für die Nierenfunktion der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Bestimmt wurden die GFR durch Messung von FITC-Sinistrin, die Kreatinin-Clearance, die FE von Na, K und Cl und das Plasmavolumen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern. Die GFR-Messung vor Tamoxifen-Gabe erfolgte zum Zeitpunkt 0 Wochen, die sonstigen Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Zwischen Woche 4 und 6 erhielten die Tiere Normalfutter. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, Statistisch getestet mittels Zweistichproben t-Test wurden die jeweiligen Tamoxifen-Gruppen gegen die Gruppen ohne Tamoxifen)

Die GFR-Messung mittels FITC-Sinistrin erfolgte sowohl vor der Gabe von Tamoxifen (0 Wochen) als auch zum Zeitpunkt 6 Wochen, nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe und anschließend 2-wöchiger Normalfuttergabe. Es zeigte sich schon initial vor Tamoxifen-Gabe eine signifikant höhere GFR in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe im Vergleich zur Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen, was wohl auf die zufällige Auswahl der Tiere zurückzuführen ist. Dieser Unterschied war auch nach Tamoxifen-Gabe zum Zeitpunkt 6 Wochen noch signifikant. Der Vergleich der GFR zum Zeitpunkt 0 Wochen mit der GFR nach 6 Wochen innerhalb der jeweiligen Gruppe zeigte einen signifikanten Abfall der GFR in beiden Gruppen über die Zeit. Deshalb wurde die GFR-Veränderung zwischen beiden Gruppen analysiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Auch die Bestimmung der GFR durch die Kreatinin-Clearance im 24-h-Sammelurin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen.

Im Vergleich der fraktionellen Ausscheidungen (FE) für die Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid und im Plasmavolumen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.

Daher ist festzuhalten, dass die Gruppen sich bezüglich der Nierenfunktion wohl nicht unterscheiden. Gleiches gilt für den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Status.

#### **4.5. Einfluss des Knockouts auf Herzfunktion und Morphologie**

Nach Analyse des Einflusses des spezifischen NKCC1-Knockouts auf die Niere als Stellgröße der Blutdruckregulation sollte nun auch der Einfluss auf das Herz und damit mögliche primäre kardiale Effekte und Gegenregulationsmechanismen aufgedeckt werden. Hierfür wurde den jeweiligen Gruppen wie bereits beschrieben in den ersten 4 Wochen Tamoxifen über das Futter und in den daraufhin folgenden 2 Wochen Normalfutter gegeben. Es wurde jeweils vor Tamoxifen-Gabe und zum Zeitpunkt 6 Wochen eine Echokardiographie durchgeführt. Außerdem wurden zum Zeitpunkt 6 Wochen die ANP-Konzentration im Plasma, die Ventrikelgewichte und die Herzmorphologie histologisch bestimmt.

##### **4.5.1. Echokardiographie**

Die Normierung der Narkosetiefe erfolgte durch die Atemfrequenz. Daher sind auch die Herzfrequenzen in der Echokardiographie in beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen vergleichbar. Untersucht wurden Fractional Shortening (prozentuale Verkleinerung des linken Ventrikels in der Systole im Vergleich zur Diastole), Herzminutenvolumen, Ejektionsfraktion (Auswurffraktion des linken Ventrikels) und die Herzfrequenz jeweils vor (0 Wochen) und nach (6 Wochen) Tamoxifen-Gabe. Abbildung 31 zeigt, dass sich keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf oder zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen in einer der untersuchten Größen fanden.

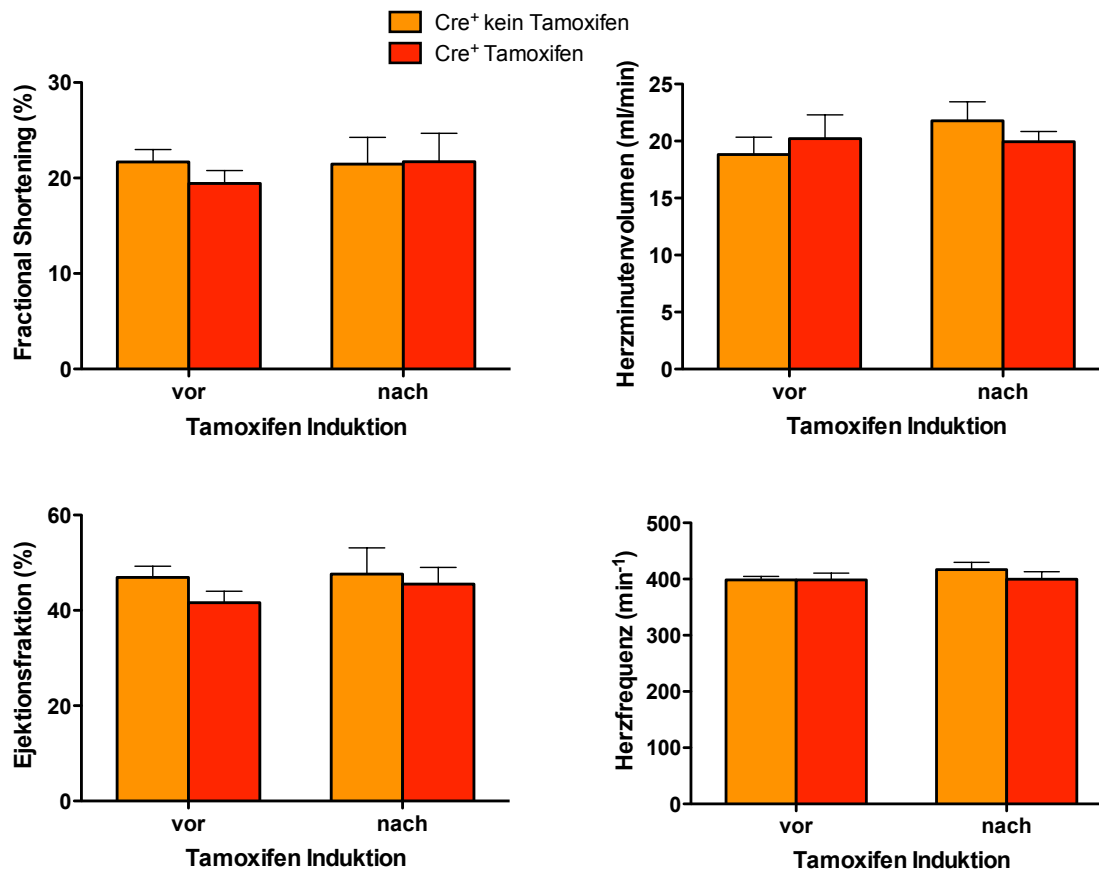


Abb. 31: Echokardiographie der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe. Dargestellt sind von oben links nach unten rechts: Fractional shortening, Herzminutenvolumen, Ejektionsfraktion und Herzfrequenz. Die Balken stellen die arithmetischen Mittel mit den Standardfehlern der beiden Cre<sup>+</sup>-Mauslinien dar. Die Messung vor Tamoxifen-Induktion erfolgte zum Zeitpunkt 0 Wochen und die Messung nach Tamoxifen-Induktion zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni post-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

#### 4.5.2. Atriales natriuretisches Peptid

Zur Untersuchung einer weiteren kardial hormonellen Gegenregulation als Antwort auf den geringeren Blutdruck bzw. als Hinweis auf den Volumenhaushalt in der Knockout-Gruppe wurde die Konzentration von ANP zum Zeitpunkt 6 Wochen bestimmt:

|             | Cre <sup>+</sup> kein Tamoxifen | <i>n</i> | Cre <sup>+</sup> Tamoxifen | <i>n</i> | <i>P</i> |
|-------------|---------------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|
| ANP (ng/ml) | 5,994 ± 1,606                   | 7        | 3,028 ± 0,489              | 8        | ns       |

Tabelle 7: ANP-Veränderung Cre<sup>+</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. (Statistisch getestet mittels Zweistichproben t-Test wurde die Tamoxifen-Gruppe gegen die Gruppe ohne Tamoxifen)

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den ANP-Konzentrationen zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen.

#### 4.5.3. Ventrikelgewichte

Die Herzen wurden nach Extraktion durch Spülung mit kalter NaCl-Lösung von Blut befreit und die Herzohren und Vorhöfe abpräpariert. Die Organe wurden vor dem Wiegen noch auf Zellstoff von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

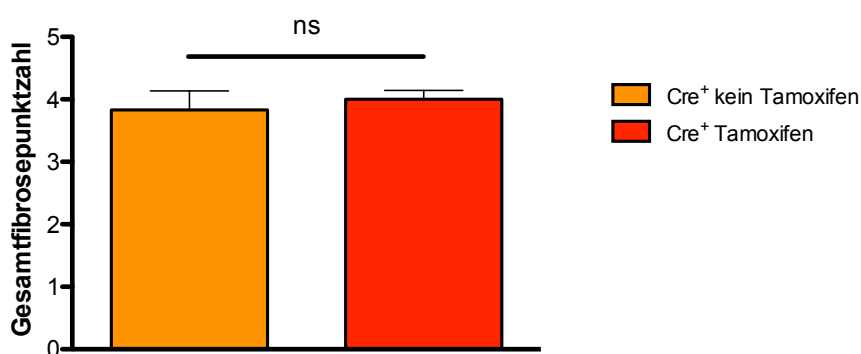
|                         | Cre <sup>+</sup> kein Tamoxifen | <i>n</i> | Cre <sup>+</sup> Tamoxifen | <i>n</i> | <i>P</i> |
|-------------------------|---------------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|
| <b>Ventrikelgewicht</b> |                                 |          |                            |          |          |
| (mg)                    | 108,2 ± 2,2                     | 9        | 103,6 ± 5,7                | 11       | ns       |

**Tabelle 8: Ventrikelgewichte Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit den Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinien zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=11. (Statistisch getestet mittels Zweistichproben t-Test wurde die Tamoxifen-Gruppe gegen die Gruppe ohne Tamoxifen)

Die Cre<sup>+</sup>-Gruppen zeigten im Vergleich keinen signifikanten Unterschied des Ventrikelgewichts.

#### 4.5.4. Morphologie des Herzens (Fibrose)

Durch subjektive Punktevergabe für das Ausmaß der Herzfibrose wurden pro Organ 10 Blickfelder der histologischen Schnitte bewertet. Jedem Blickfeld konnte eine Fibrose von 0-2 zugeteilt werden, wobei 0 keine Fibrose bedeutet, 1 eine leichte und 2 eine starke Fibrose. Maximal konnte jedes Organ somit eine Punktzahl von 20 erhalten. Die Blickfelder wurden pro Organ zweimal von jeweils 2 verschiedenen Personen verblindet bewertet.



**Abb. 32: Bestimmung der Herzfibrose.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Bewertung der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Bewertung erfolgte anhand einer Skala von 0-2 für 10 Gesichtsfelder pro Maus. Die Tamoxifen-Gabe erfolgte nach dem Zeitpunkt 0 Wochen bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=3. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=3. (Statistisch getestet mittels Zweistichproben t-Test wurden die Tamoxifen-Gruppe gegen die Gruppe ohne Tamoxifen)

Wie in Abbildung 32 zu sehen, zeigten beide Gruppen nahezu keine Herzfibrose. Die Tamoxifen-Gruppe hatte einen gemittelten Score von 4,0, während für die Gruppe ohne Tamoxifen ein gemittelter Score von 3,8 ermittelt wurde. Beide Cre<sup>+</sup>-Gruppen unterscheiden sich somit nicht signifikant im Hinblick auf die Herzfibrose.

Daher ist festzuhalten, dass es im Bezug auf die Herzfunktion und Morphologie des Herzens zu keinen Unterschieden zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen kam und somit keine primären kardialen Unterschiede oder kardialen Gegenregulationsmechanismen als Antwort auf den Blutdruckabfall gefunden wurden.

#### **4.6. Blutdrucksteigerung durch chronische Angiotensin II-Verabreichung**

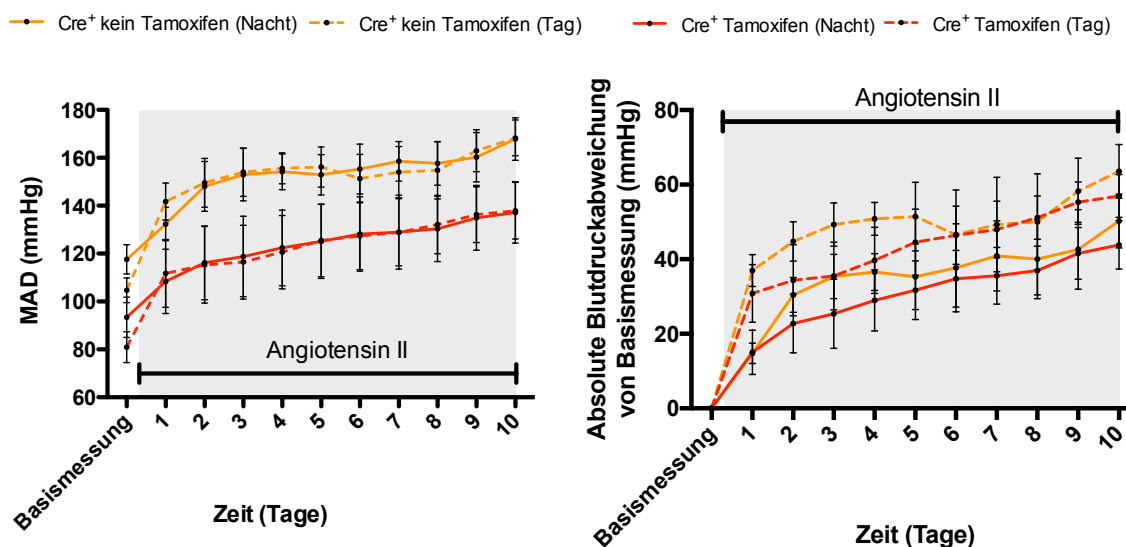
Aufgrund der Hypothese, dass Angiotensin II seine vasokonstriktorische Wirkung direkt über den NKCC1 entfalten könnte, wurden unter 14-tägiger Angiotensin II-Gabe telemetrische Messungen von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität durchgeführt. Außerdem erfolgten morphologische Analysen von Aorta und Herz, sowie Bestimmungen des Ventrikelgewichts, um die Auswirkung der Hypertonie durch chronische Angiotensin II-Gabe (1,5 ng/g KG/min Ang II für 14 Tage) quantifizieren zu können.

##### **4.6.1. Telemetrische Messungen unter Angiotensin II**

Durch die telemetrischen Messungen konnte neben dem Blutdruck auch die Aktivität und die Herzfrequenz gemessen werden. Die Angiotensin II-Gabe erfolgte durch osmotische Minipumpen, welche den Tieren nach 4-wöchiger Tamoxifen-Futtermittelgabe und 2-wöchiger Normalfuttermittelgabe am Zeitpunkt 6 Wochen subkutan implantiert wurden. Eine telemetrische Messung über 48 h zum Zeitpunkt 6 Wochen diente als Ausgangswert vor der Angiotensin II-Gabe. Unmittelbar anschließend wurde Angiotensin II über 14 Tage kontinuierlich von den Minipumpen freigesetzt. Die telemetrischen Messungen erfolgten über 10 Tage durchgängig über den gesamten Zeitraum alle 5 Minuten für 60 Sekunden. Um Interaktionseffekte mit Tamoxifen bzw. direkte Tamoxifen-Effekte auszuschließen, wurde neben der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie ebenfalls die Cre<sup>-</sup>-Mauslinie für die Versuche hinzugezogen.

#### 4.6.1.1. Blutdruck

Die Blutdruckveränderung der Cre<sup>+</sup>-Gruppen sind im Folgenden dargestellt:

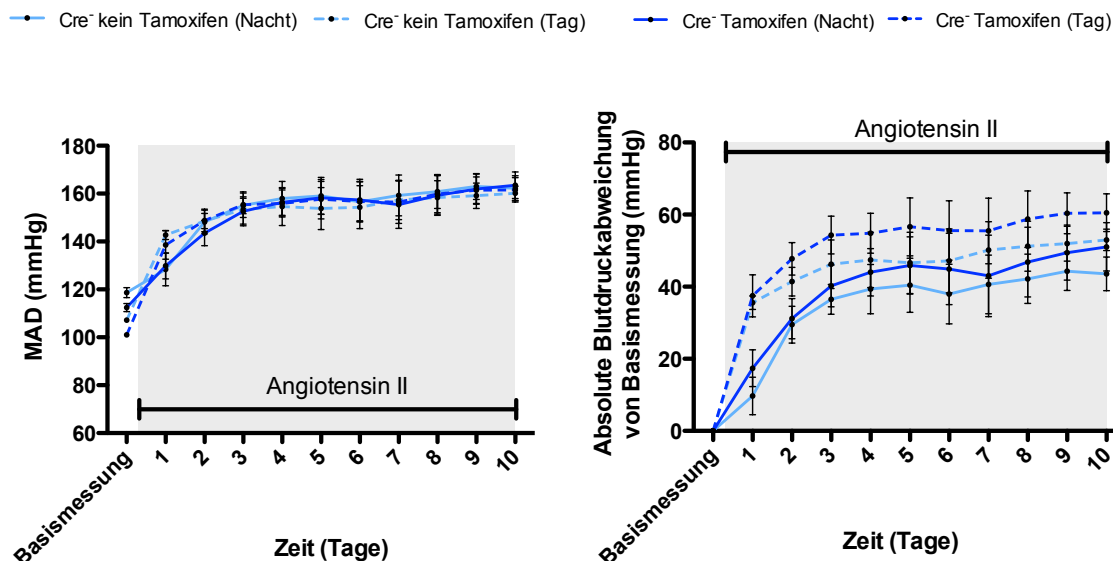


**Abb. 33: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung vom Basiswert der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie unter chronischer Angiotensin II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln des Zeitpunktes 0 Tage (rechts) der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter Angiotensin II-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=6. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

An Zeitpunkt 0 hatte die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe erwartungsgemäß einen geringeren MAD als die Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen. Dieser Unterschied war jedoch aufgrund der geringen Tierzahl nicht signifikant. Außerdem war der MAD zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen in der Nacht höher als am Tag, was für einen gesunden Tag-/ Nacht-Rhythmus spricht.

Nach Gabe von Angiotensin II verschwand der Unterschied zwischen den Tag- und Nachtwerten in beiden Gruppen, was als Störung des Tag-/ Nacht-Rhythmus zu interpretieren ist. Über die dargestellten 10 Tage der Ang II-Gabe stieg der MAD in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe um 42,81 mmHg ( $\pm 6,48$ ) auf ein Maximum von 137,21 mmHg ( $\pm 12,84$ ) in der Nacht und um 56,97 mmHg ( $\pm 5,70$ ) auf ein Maximum von 137,92 mmHg ( $\pm 11,81$ ) am Tag. In der Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen stieg der Blutdruck um 50,22 mmHg ( $\pm 7,21$ ) auf ein Maximum von 167,83 mmHg ( $\pm 8,83$ ) in der Nacht und um 63,55 mmHg ( $\pm 7,21$ ) auf ein Maximum von 168,28 mmHg ( $\pm 7,47$ ) am Tag. Die Dynamik des Blutdruckanstiegs erfolgte in beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen sehr ähnlich. Der Unterschied im Blutdruck zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen, der allerdings nicht signifikant war, blieb somit über die gesamte Zeit erhalten.

Der Einfluss von Angiotensin II auf die Cre<sup>-</sup>-Gruppen ist hier dargestellt:

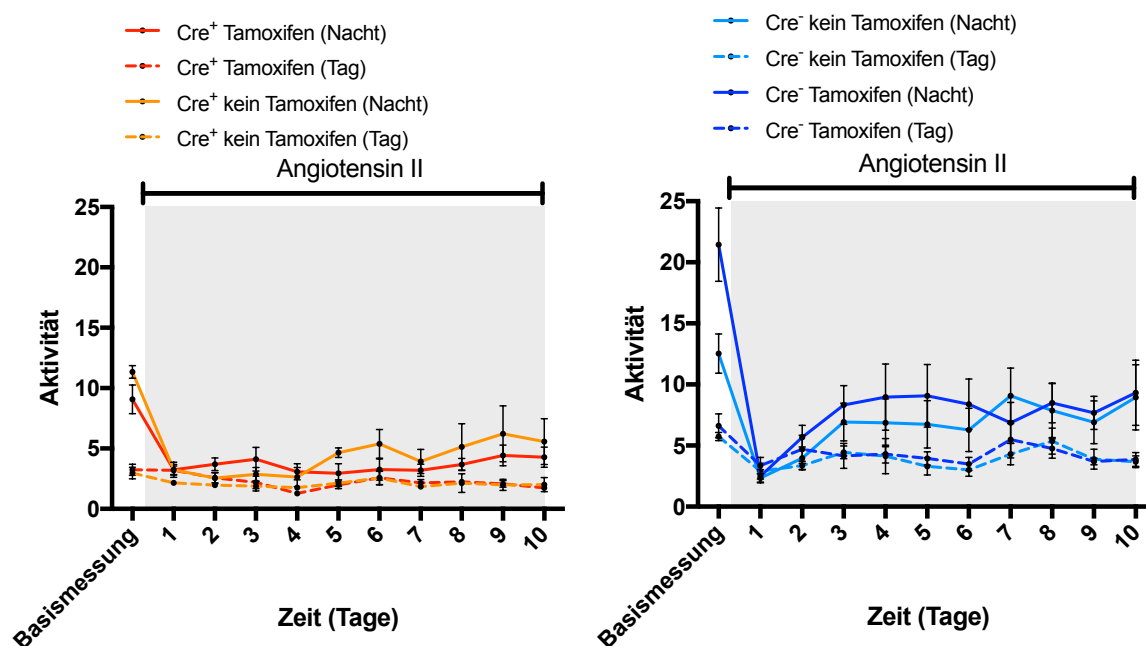


**Abb. 34: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung zum Basiswert der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie unter chronischer Angiotensin II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln des Zeitpunktes 0 Tage (rechts) der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter Angiotensin II-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=5. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Über die dargestellten 10 Tage der Ang II-Gabe stieg der MAD in der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe um 51,06 mmHg ( $\pm 6,70$ ) auf ein Maximum von 163,48 mmHg ( $\pm 5,55$ ) in der Nacht und um 60,51 mmHg ( $\pm 5,23$ ) auf ein Maximum von 161,58 mmHg ( $\pm 5,14$ ) am Tag. In der Cre<sup>-</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen stieg der Blutdruck um 44,30 mmHg ( $\pm 5,32$ ) auf ein Maximum von 162,97 mmHg ( $\pm 5,408$ ) in der Nacht und um 53,00 mmHg ( $\pm 3,00$ ) auf ein Maximum von 160,17 mmHg ( $\pm 2,97$ ) am Tag. Die Dynamik des Blutdruckanstiegs erfolgte in beiden Cre<sup>-</sup>-Gruppen ähnlich und es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im MAD zwischen den beiden Gruppen.

#### 4.6.1.2. Aktivität

Die Aktivitätsveränderung unter Ang II ist im Folgenden dargestellt:

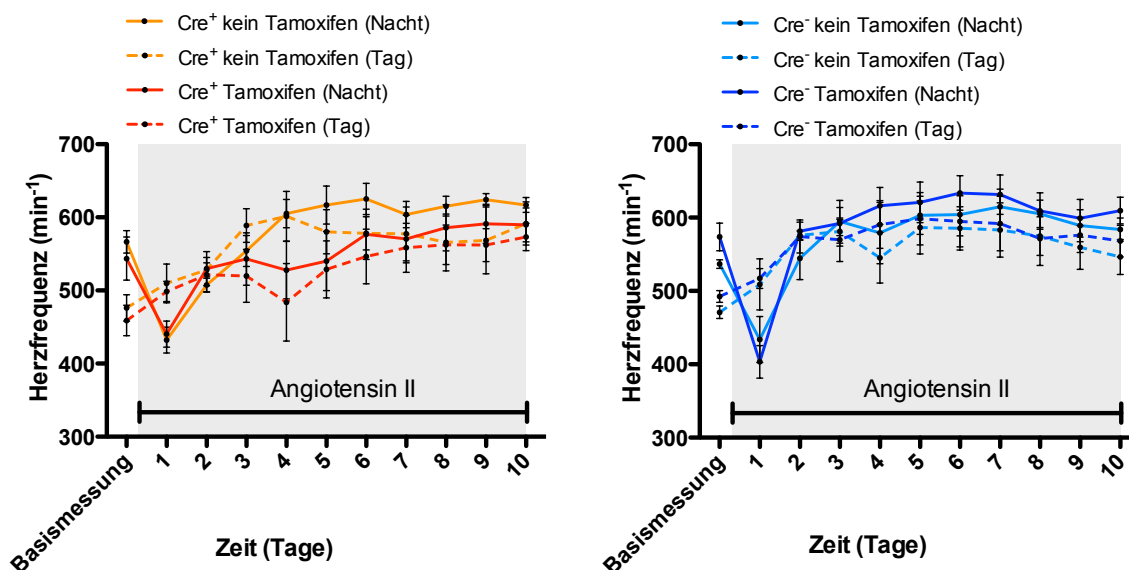


**Abb. 35: Aktivität der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie unter chronischer Angiotensin II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter Angiotensin II-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=5. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=5. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=5. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Nach Angiotensin II-Gabe kam es sowohl in den Cre<sup>+</sup>- als auch in den Cre<sup>-</sup>-Gruppen zu einem Abfall der Aktivität, der über die Dauer der Ang II-Gabe anhielt. Es bestand jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen der jeweiligen Linien. Der Unterschied zwischen Tag- und Nachtaktivitäten war an den meisten Tagen nicht mehr signifikant.

#### 4.6.1.3. Herzfrequenz

Die Herzfrequenzveränderung nach Ang II-Gabe ist im Folgenden dargestellt:

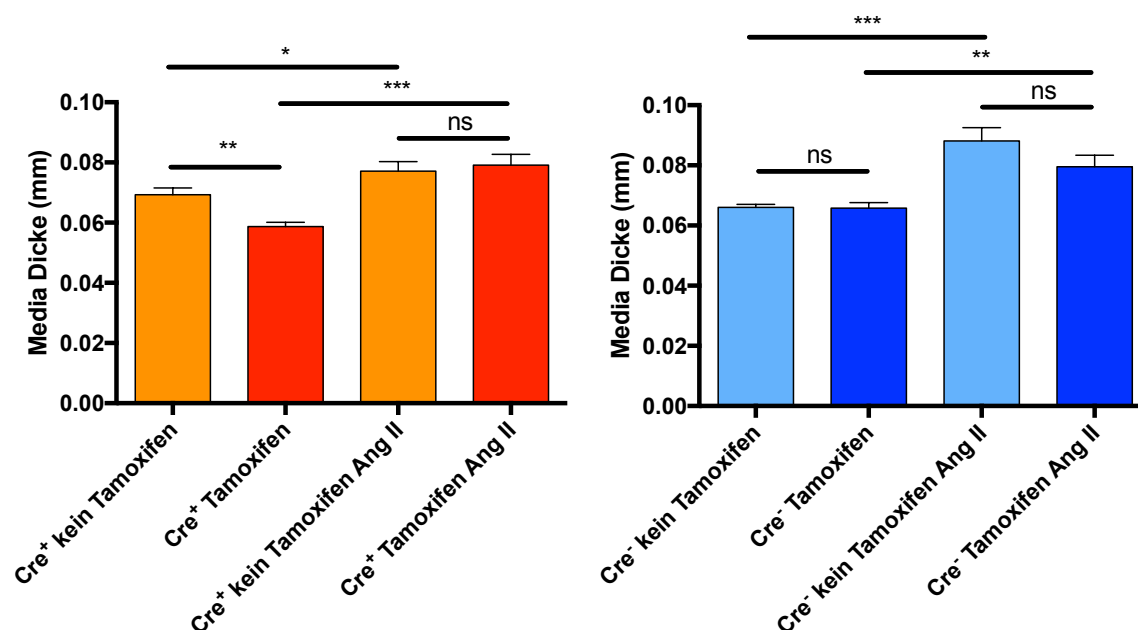


**Abb. 36: Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie unter chronischer Angiotensin II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Herzfrequenzen für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltetete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter Angiotensin II-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=5. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag- und die Nachtwerte der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

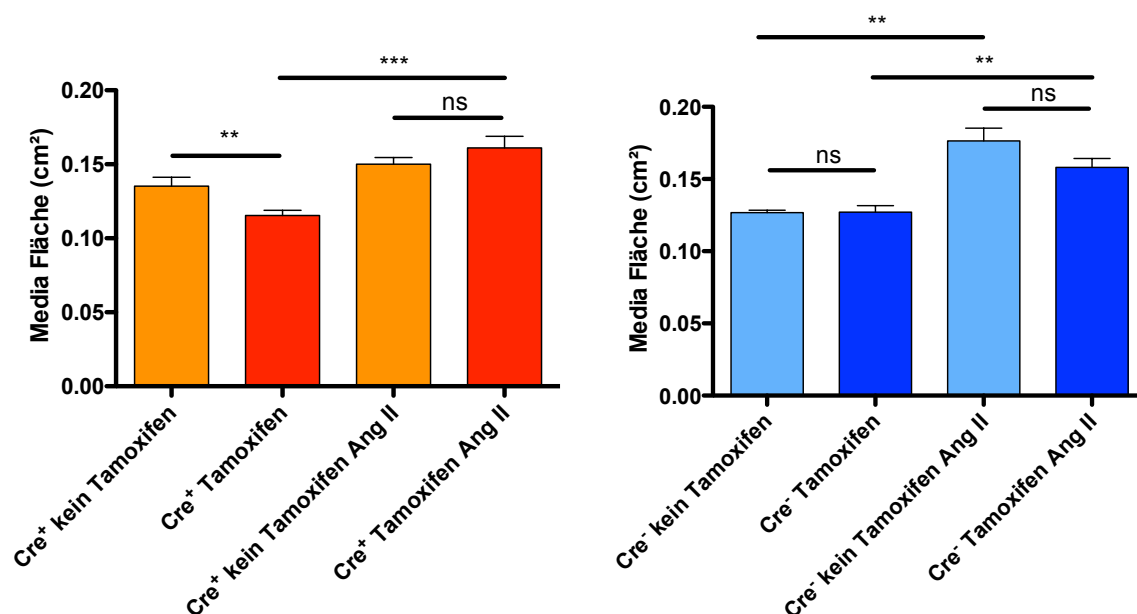
Direkt nach Beginn der Angiotensin II-Gabe kam es in der Nacht zu einem Abfall der Herzfrequenz, welcher jedoch im Verlauf verschwand und die Herzfrequenz sich der ursprünglichen Frequenz anglich. Unter Ang II verschwand der Unterschied zwischen Tag- und Nachtwerten innerhalb der Gruppen ebenfalls. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der jeweiligen Linien.

#### 4.6.2. Morphologische Analyse von Gefäßen und Herzen unter Angiotensin II

Es wurde ebenfalls der Einfluss der chronischen Ang II-Gabe auf die Morphologie der Aorten und der Herzen untersucht. Verglichen wurden unbehandelte Tiere, deren Organentnahme nach 4-wöchiger Tamoxifen- und anschließender Normalfuttergabe zum Zeitpunkt 6 Wochen erfolgte, mit Tieren, welche zum Zeitpunkt der Organentnahme der unbehandelten Tiere zusätzlich noch über 14 Tage Angiotensin II bekamen. Die Analyse der Tunica Media ist im Folgenden dargestellt:



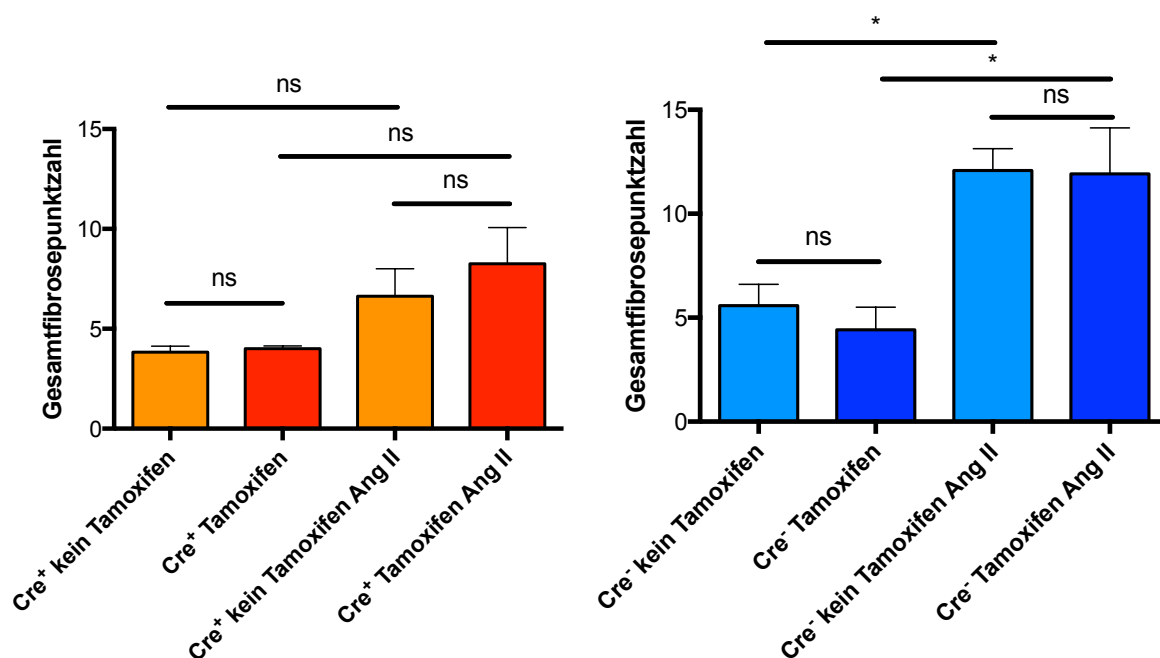
**Abb. 37: Dicke der Tunica Media der Aorta der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach Ang II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Tunica Media Dicke der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen für die Ang II-Gruppen erfolgten am Ende der Angiotensin II-Gabe nach 14 Tagen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der Angiotensin II-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=5. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen Ang II, n=4. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=5. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen Ang II, n=5. (One-Way ANOVA; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)



**Abb. 38: Fläche der Tunica Media der Aorta der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach Ang II-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Tunica Media Fläche der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen für die Ang II-Gruppen erfolgten am Ende der Angiotensin II-Gabe nach 14 Tagen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der Angiotensin II-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=5. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen Ang II, n=4. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=5. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen Ang II, n=5. (One-Way ANOVA; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Der zuvor schon gezeigte Unterschied in der Media Dicke und Fläche zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen ohne Ang II zeigte sich unter Ang II-Behandlung nicht mehr. Auch in der Cre<sup>-</sup>-Linie zeigte sich weder in den unbehandelten Tieren noch unter Ang II ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Im Vergleich der Gruppen ohne Ang II mit den jeweiligen Gruppen unter Ang II war jedoch sowohl innerhalb der Cre<sup>+</sup>- als auch der Cre<sup>-</sup>-Gruppen ein Unterschied in der Media Dicke und Fläche vorzufinden. Die Ang II-behandelten Gruppen zeigten alle eine signifikant größere Media Dicke als die zugehörigen Gruppen ohne Ang II Behandlung. Lediglich die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe zeigte bei dem Vergleich der Media Fläche keine signifikanten Unterschiede. Da die Gruppen sich jedoch beim Vergleich der Media Dicke unterschieden, ist die nicht vorhandene Signifikanz in der Fläche auf eine zu starke Streuung zurückzuführen.

Auch in der Herzfibrose zeigten sich Unterschiede zwischen den Ang II-Tieren und den unbehandelten Tieren:



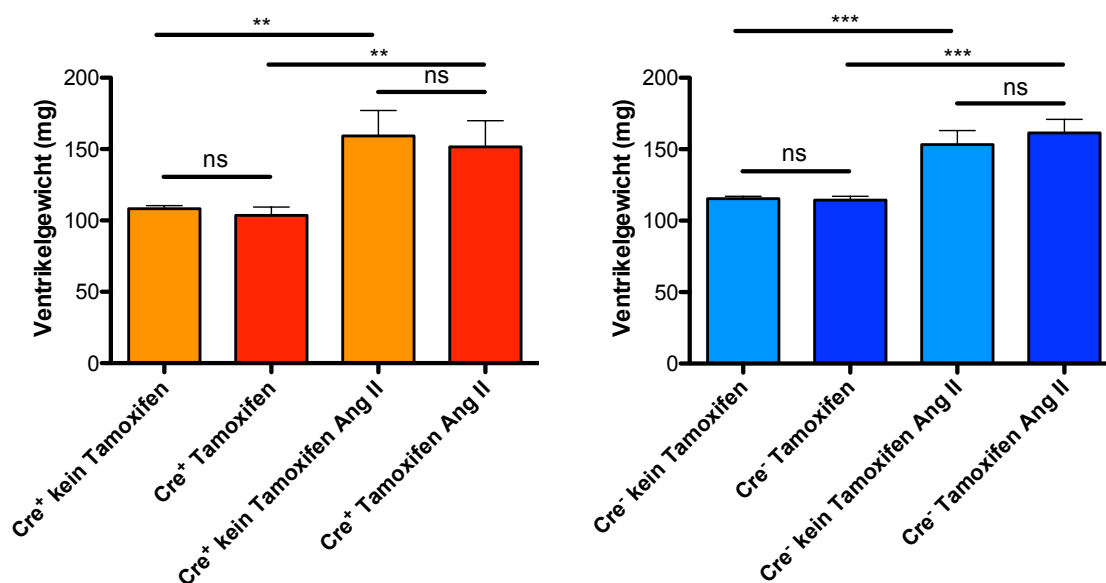
**Abb. 39: Herzfibrose der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach 14 Tagen Ang II.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Bewertung der Cre<sup>+</sup>-Linie (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen für die Ang II-Gruppen erfolgten am Ende der Angiotensin II Gabe nach 14 Tagen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der Angiotensin II-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Die Bewertung erfolgte anhand einer Skala von 0-2 für 10 Gesichtsfelder pro Maus. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=3. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=3. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=2. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen Ang II, n=4. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=3. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=3. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=3. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen Ang II, n=3. (One-Way ANOVA; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Die Cre<sup>-</sup>-Ang II-Gruppen hatten eine signifikant höhere Gesamtfibrosepunktzahl als die Vergleichsgruppen ohne Ang II. Dieser Unterschied war auch bei den Cre<sup>+</sup>-Tieren optisch zu erkennen, jedoch bestanden hier keine Signifikanzen, was wohl mit einer zu geringen Tierzahl

zu begründen ist. Im jeweiligen Vergleich der unbehandelten Gruppen untereinander und der Gruppen unter Ang II untereinander wurde in beiden Linien kein signifikanter Unterschied gefunden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle untersuchten Gruppen auf die Angiotensin II-Gabe im Hinblick auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz gleich reagierten. Die Blutdruckdifferenz der Cre<sup>+</sup>-Gruppen blieb auch unter Angiotensin II gleichermaßen erhalten. In der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe ohne Angiotensin II zeigte sich, wie schon zuvor beschrieben, eine signifikant geringere Media Dicke und Media Fläche. Unter Angiotensin II ist dieser Unterschied nicht mehr vorhanden, jedoch führte Angiotensin II zu einer größeren Dicke und Fläche der Tunica Media der Aorta, sowie zu einer vermehrten Herzfibrose in allen Gruppen.

Die zusätzlich analysierten Ventrikelgewichte sind im Folgenden dargestellt:



**Abb. 40: Ventrikelgewichte der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach 14 Tagen Ang II.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie. Die Bestimmungen der Ang II-Gruppen erfolgten am Ende der Angiotensin II-Gabe nach 14 Tagen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der Angiotensin II-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=11. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen Ang II, n=4. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=20. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=20. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen Ang II, n=7. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen Ang II, n=7. (One-Way ANOVA; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Im Vergleich der einzelnen unbehandelten Gruppen der jeweiligen Linien untereinander kam es zu keinem signifikanten Unterschied der Ventrikelgewichte. Auch im Vergleich der jeweiligen Gruppen unter Ang II konnten keine Unterschiede gefunden werden.

Allerdings kam es im Vergleich der unbehandelten Gruppen mit den zugehörigen Ang II-Gruppen zu signifikanten Unterschieden. Alle Ang II-Gruppen hatten ein signifikant höheres Ventrikelgewicht als die zugehörigen unbehandelten Gruppen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle untersuchten Gruppen auf die Angiotensin II-Gabe im Hinblick auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz gleich reagierten. Die Blutdruckdifferenz der Cre<sup>+</sup>-Gruppen blieb auch unter Angiotensin II gleichermaßen erhalten.

Angiotensin II führte zu einer größeren Dicke und Fläche der Tunica Media der Aorta, einer gesteigerten Herzfibrose, sowie höheren Ventrikelgewichten in allen Gruppen.

#### **4.7. Blutdrucksteigerung durch chronische DOCA + Salz-Verabreichung**

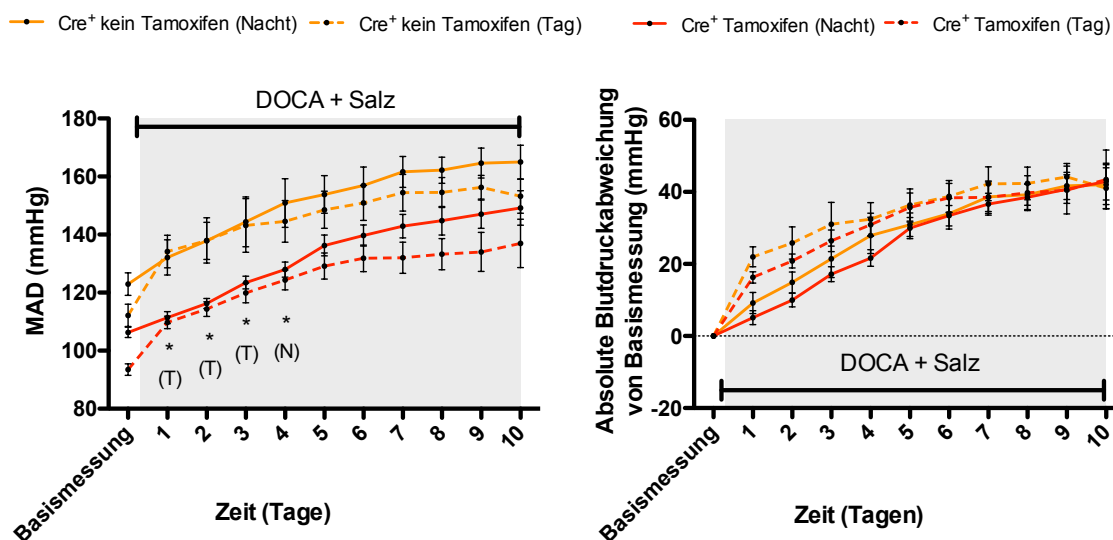
Durch die Untersuchung einer chronischen DOCA + Salz-Verabreichung (Deoxycorticosteron Acetat ist eine Aldosteron-Vorstufe) sollte die Auswirkung einer volumenbedingten Hypertonie auf den spezifischen Knockout des NKCC1 untersucht werden. Die Ergebnisse sollten verglichen werden mit denen der durch Angiotensin II verursachten Hypertonie. Über 3 Wochen gab ein subkutan implantiertes 50mg release-pellet DOCA kontinuierlich ab und den Tieren wurde zusätzlich 1% NaCl-Lösung statt Trinkwasser angeboten. Wie schon für Ang II wurden telemetrische Messungen durchgeführt. Anschließend erfolgten morphologische Analysen von Aorten und Herzen, sowie Bestimmungen der Ventrikelgewichte.

##### **4.7.1. Telemetrische Messungen**

Durch die telemetrischen Messungen konnte neben dem Blutdruck auch die Aktivität und die Herzfrequenz gemessen werden. Die DOCA-Pellets wurden nach dem Zeitpunkt 6 Wochen subkutan implantiert. Zuvor erhielten die jeweiligen Mausgruppen ggf. über 4 Wochen Tamoxifen und anschließend 2 Wochen Normalfutter. Eine telemetrische Messung über 48 Stunden zum Zeitpunkt 6 Wochen diente als Ausgangswert vor den DOCA + Salz-Messungen, welche analog zum Angiotensin II über 10 Tage durchgängig erfolgte.

#### 4.7.1.1. Blutdruck

Die Blutdruckveränderungen der Cre<sup>+</sup>-Gruppen sind im Folgenden dargestellt:

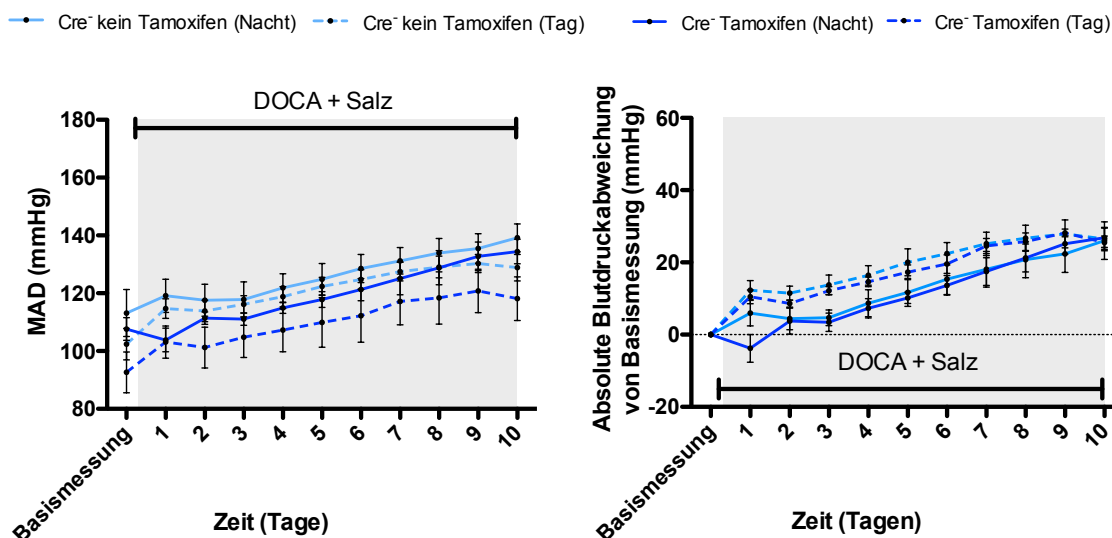


**Abb. 41: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung zum Basiswert der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie unter chronischer DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln des Zeitpunktes 0 Tage (rechts) der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige, dauerhafte Messung unter DOCA + Salz-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelfphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=7. (2-way ANOVA; \*P<0.05; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag (T)- und die Nachtwerte (N) der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

An Zeitpunkt 0 zeigte sich wie zuvor zwar ein Unterschied zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen an Tag und Nacht, dieser war jedoch aufgrund der geringen Tierzahl nicht signifikant. Dieser Unterschied wurde aber am Tag an den Tagen 1-3 unter DOCA + Salz signifikant und in der Nacht an Tag 4. Auch zu späteren Zeitpunkten waren die Blutdruckwerte der beiden Gruppen unterschiedlich, jedoch nicht im signifikanten Bereich. Die Dynamik des Blutdruckanstiegs nach DOCA + Salz-Gabe war jedoch zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Tag- und Nachtwerten glich sich unter DOCA + Salz an. Es kam zu einem Blutdruckanstieg in beiden Gruppen. In der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe stieg der Blutdruck um 42,89 mmHg ( $\pm 5,11$ ) auf ein Maximum von 149,18 mmHg ( $\pm 5,94$ ) in der Nacht und um 43,46 mmHg ( $\pm 8,18$ ) auf ein Maximum von 136,95 mmHg ( $\pm 8,34$ ) am Tag. In der Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen stieg der Blutdruck um 42,05 mmHg ( $\pm 5,54$ ) auf ein Maximum von 165,01 mmHg ( $\pm 5,81$ ) in der Nacht und um 44,15 mmHg ( $\pm 3,75$ ) auf ein Maximum von 156,31 mmHg ( $\pm 5,85$ ) am Tag.

Die Blutdruckveränderung der Cre<sup>-</sup>-Tiere ist im Folgenden veranschaulicht:



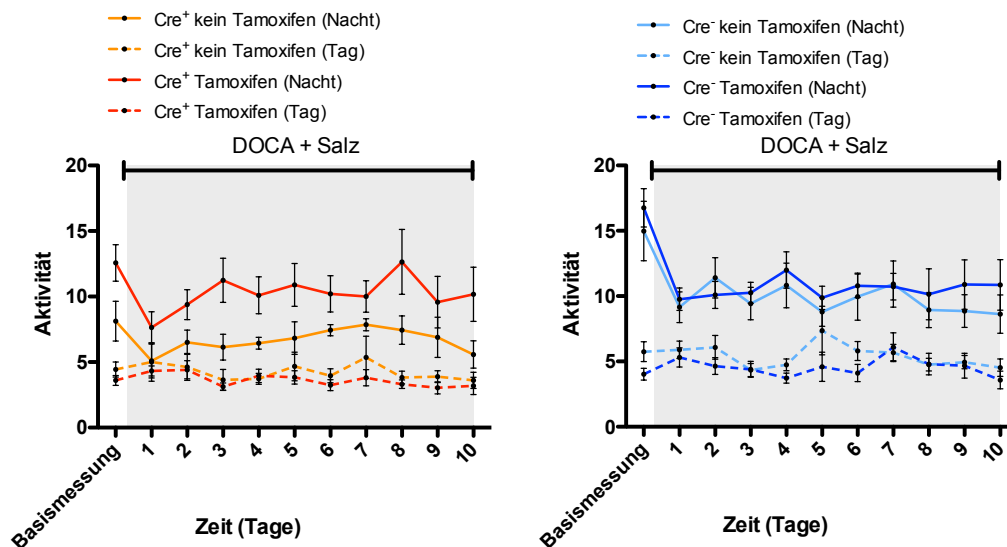
**Abb. 42: Blutdruckveränderung und absolute Blutdruckabweichung zum Startpunkt der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie unter chronischer DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der absoluten Blutdruckwerte (links) und der absoluten Blutdruckabweichung von den arithmetischen Mitteln des Zeitpunktes 0 Tage (rechts) der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen für Tag und Nacht. Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter DOCA + Salz-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=7. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag (T)- und die Nachtwerte (N) der Gruppe mit Tamoxifen- gegen die Gruppe ohne Tamoxifen-Gabe)

Auch in den Cre<sup>-</sup>-Gruppen kam es zu einem Blutdruckanstieg unter DOCA + Salz. In der Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe stieg der Blutdruck um 26,84 mmHg ( $\pm$  2,68) auf ein Maximum von 134,46 mmHg ( $\pm$  4,24) in der Nacht und um 28,18 mmHg ( $\pm$  1,08) auf ein Maximum von 120,82 mmHg ( $\pm$  7,50) am Tag. In der Cre<sup>-</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen stieg der Blutdruck um 26,02 mmHg ( $\pm$  5,20) auf ein Maximum von 139,17 mmHg ( $\pm$  4,80) in der Nacht und um 27,89 mmHg ( $\pm$  3,88) auf ein Maximum von 130,27 mmHg ( $\pm$  3,13) am Tag. Demnach gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Cre<sup>-</sup>-Gruppen am Tag oder in der Nacht. In der Dynamik des Blutdruckanstiegs zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede, sodass der Blutdruckanstieg in beiden Gruppen gleichsinnig erfolgte. Auch der Unterschied zwischen den Tag- und Nachtwerten innerhalb der beiden Gruppen war nicht signifikant.

#### 4.7.1.2. Aktivität

Sowohl für die Gruppen der Cre<sup>+</sup>-Linie als auch für die Gruppen der Cre<sup>-</sup>-Linie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen der jeweiligen Linie. Die Aktivität war in allen Gruppen in der Nacht signifikant höher als am Tag. Die Aktivität veränderte sich in keiner der Gruppen signifikant über die Zeit.

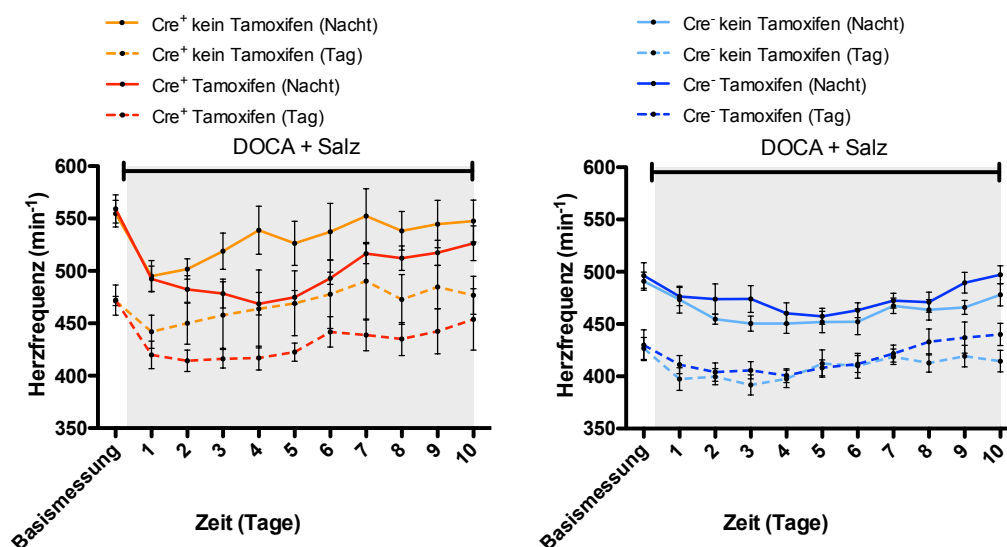
Die Aktivitätsveränderung unter DOCA + Salz-Gabe ist in Abbildung 43 dargestellt.



**Abb. 43: Aktivität der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie nach chronischer DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Aktivitätswerte für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltetete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter DOCA + Salz-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=7. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=7. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag (T)- und die Nachtwerte (N) der Gruppen mit Tamoxifen- gegen die Gruppen ohne Tamoxifen-Gabe)

#### 4.7.1.3. Herzfrequenz

Die Herzfrequenzänderung unter DOCA + Salz ist im Folgenden dargestellt:

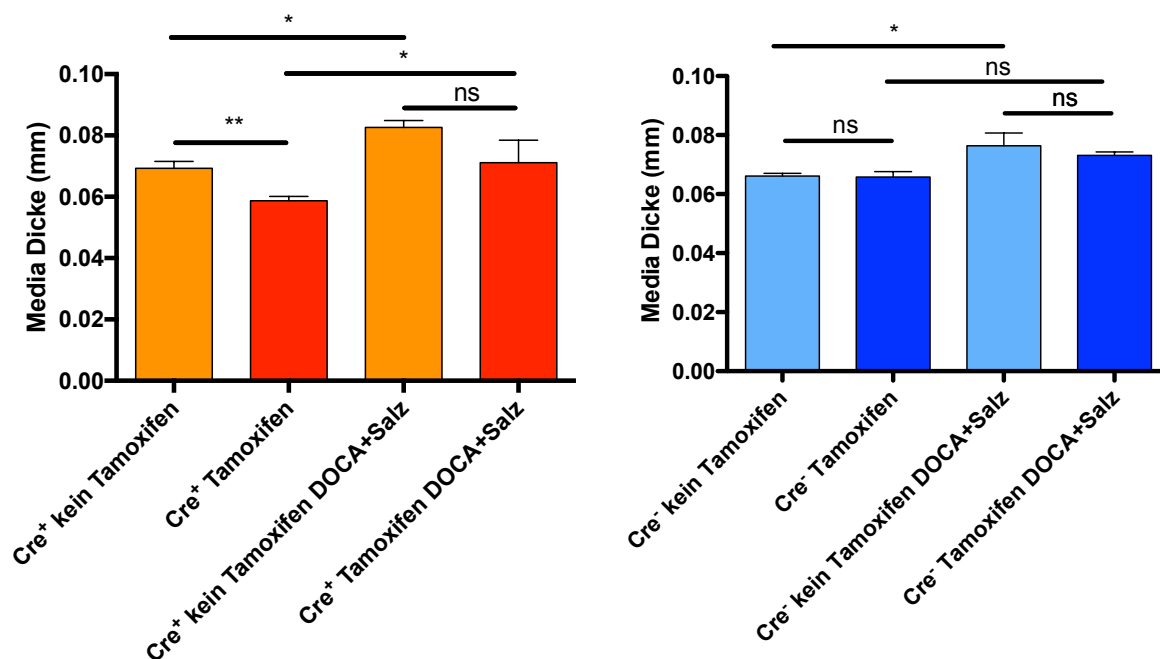


**Abb. 44: Herzfrequenz der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie unter chronischer DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Herzfrequenzen für Tag und Nacht der Cre<sup>+</sup>-Mausgruppen (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mausgruppen (rechts). Als Zeitpunkt 0 Tage diente das arithmetische Mittel einer 48-stündigen Messung nach zuvor 4-wöchiger Tamoxifen-Gabe für die jeweiligen Gruppen und anschließenden 2 Wochen Normalfuttergabe. Die telemetrische Messung beinhaltetete nach der 48-stündigen Basismessung eine 10-tägige dauerhafte Messung unter DOCA + Salz-Einfluss. Die Messung erfolgte durchgängig alle fünf Minuten. Die Nachtwerte setzen sich dabei aus der jeweiligen 12-stündigen Dunkelphase zusammen, während die Tagwerte durch die jeweilige 12-stündige Hellphase gebildet werden. Cre<sup>+</sup> ohne Tamoxifen, n=4. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=7. Cre<sup>-</sup> ohne Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=7. (2-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden jeweils die Tag (T)- und die Nachtwerte (N) der Gruppen mit Tamoxifen- gegen die Gruppen ohne Tamoxifen-Gabe)

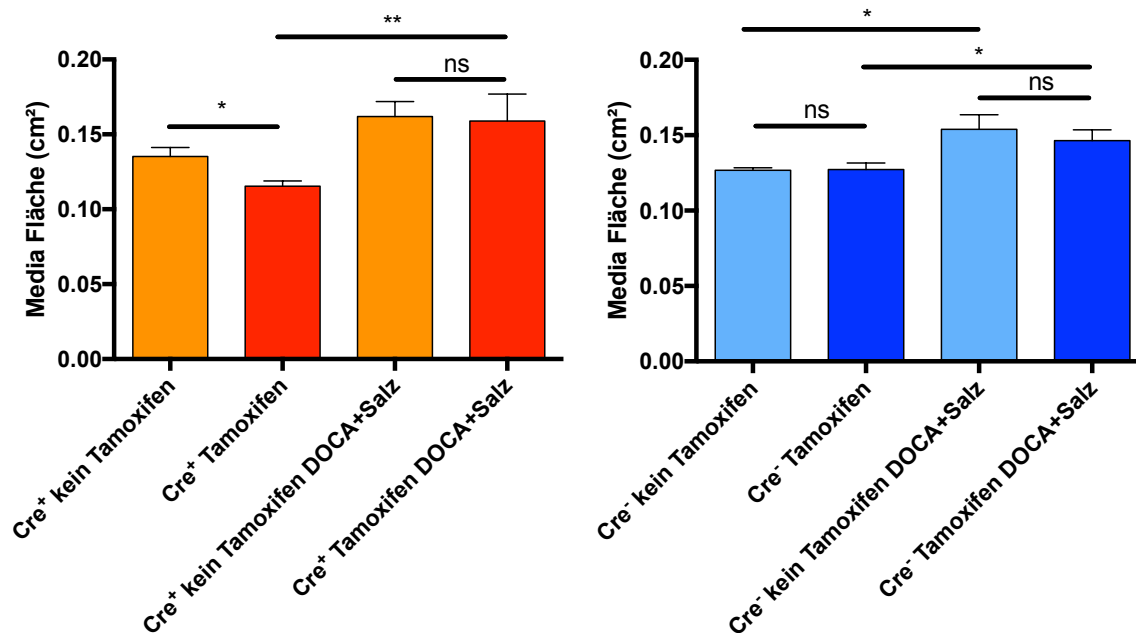
Auch in der Herzfrequenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der jeweiligen  $Cre^{+/-}$  und  $Cre^{-/-}$ -Linien basal oder nach Gabe von DOCA + Salz. In der Nacht zeigten alle Gruppen höhere Herzfrequenzen als am Tag. Unmittelbar nach DOCA + Salz-Gabe kam es in allen Gruppen zu einem Abfall der Herzfrequenz um 50 /min. Die Herzfrequenz näherte sich jedoch im Verlauf der Zeit wieder an den ursprünglichen Wert an.

#### 4.7.2. Morphologische Analyse von Gefäßen und Herzen

Es wurde ebenfalls der Einfluss der DOCA + Salz-Gabe auf die Morphologie der Aorten und der Herzen untersucht. Verglichen wurden unbehandelte Tiere, deren Organentnahme nach 4 Wochen Tamoxifen-Futter und anschließend 2 Wochen Normalfutter zum Zeitpunkt 6 Wochen erfolgte, mit Tieren, welche nach den 6 Wochen wie beschrieben noch über 3 Wochen DOCA + Salz bekamen. Die Analyse der Tunica Media ist im Folgenden dargestellt:



**Abb. 45: Dicke der Tunica Media der Aorta der  $Cre^{+/-}$  und  $Cre^{-/-}$ -Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Tunica Media Dicke der  $Cre^{+}$ -Mauslinie (links) und der  $Cre^{-}$ -Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen der DOCA + Salz-Gruppen erfolgten am Ende der DOCA + Salz-Gabe nach 3 Wochen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der DOCA + Salz-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt.  $Cre^{+}$  kein Tamoxifen, n=9.  $Cre^{+}$  Tamoxifen, n=9.  $Cre^{+}$  kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=2.  $Cre^{+}$  Tamoxifen DOCA + Salz, n=2.  $Cre^{-}$  kein Tamoxifen, n=6.  $Cre^{-}$  Tamoxifen, n=6.  $Cre^{-}$  kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=3.  $Cre^{-}$  Tamoxifen DOCA + Salz, n=3. (One-Way ANOVA; \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

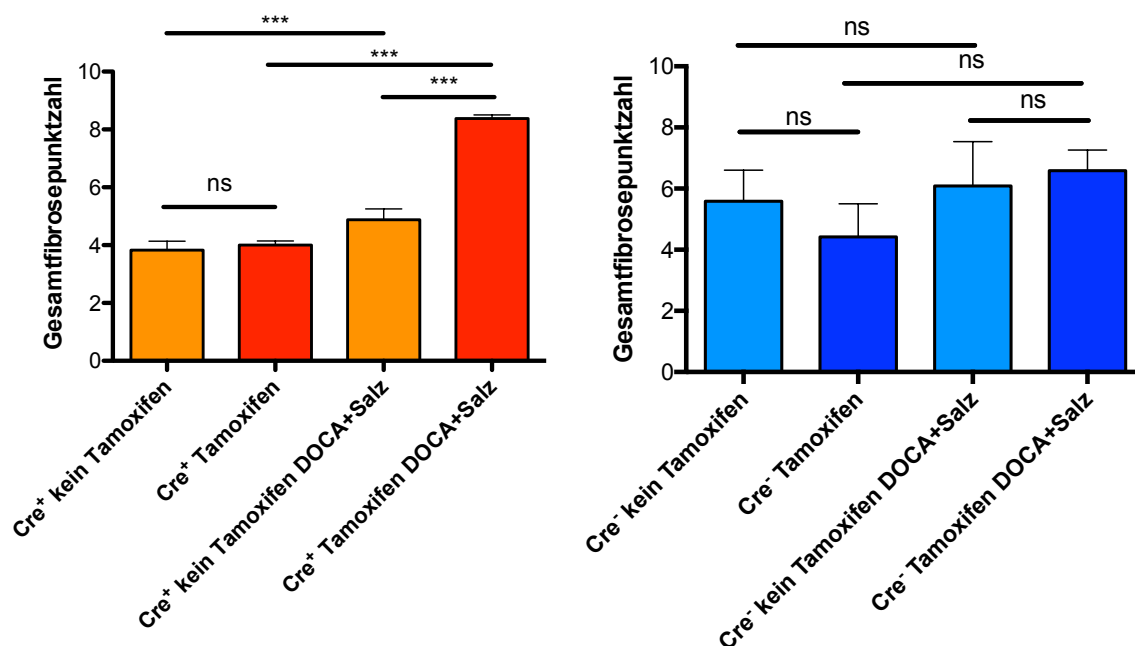


**Abb. 46:** Fläche der Tunica Media der Aorta der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach DOCA + Salz-Gabe. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Tunica Media Dicke der Cre<sup>+</sup>-Mauslinie (links) und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen der DOCA + Salz-Gruppen erfolgten am Ende der DOCA + Salz-Gabe nach 3 Wochen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der DOCA + Salz-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=2. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen DOCA + Salz, n=2. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=6. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=3. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen DOCA + Salz, n=3. (One-Way ANOVA; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Wie schon früher gezeigt, wies die unbehandelte Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe eine signifikant geringe Media Dicke und Fläche auf als die unbehandelte Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war nach DOCA + Salz-Gabe nicht mehr signifikant. Es fand sich aber eine signifikante Zunahme der Media Dicke und Fläche zwischen den jeweiligen Cre<sup>+</sup>-Gruppen ohne DOCA + Salz und den zugehörigen Gruppen unter DOCA + Salz-Behandlung. Lediglich die Media Fläche der Cre<sup>+</sup>-Gruppe ohne Tamoxifen war nicht signifikant unterschiedlich zwischen DOCA + Salz-Behandlung und ohne. Bei Analyse der Media Dicke war dieser Unterschied aber signifikant, sodass die fehlende Signifikanz im Unterschied in der Fläche auf eine zu geringe Tierzahl zurückgeführt werden kann.

In der Cre<sup>-</sup>-Linie zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen im unbehandelten Zustand oder denen unter DOCA + Salz-Behandlung. Die DOCA + Salz behandelte Cre<sup>-</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe hatte eine signifikant größere Media Dicke und Fläche als die Vergleichsgruppe ohne DOCA + Salz-Behandlung. Die Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Media Dicke im Vergleich zur Cre<sup>-</sup>-Tamoxifen-Gruppe unter DOCA + Salz-Behandlung. Bei Analyse der Media Fläche war letzterer Vergleich aber signifikant unterschiedlich.

Auch in der Analyse der Herzfibrose zeigten sich signifikante Unterschiede:

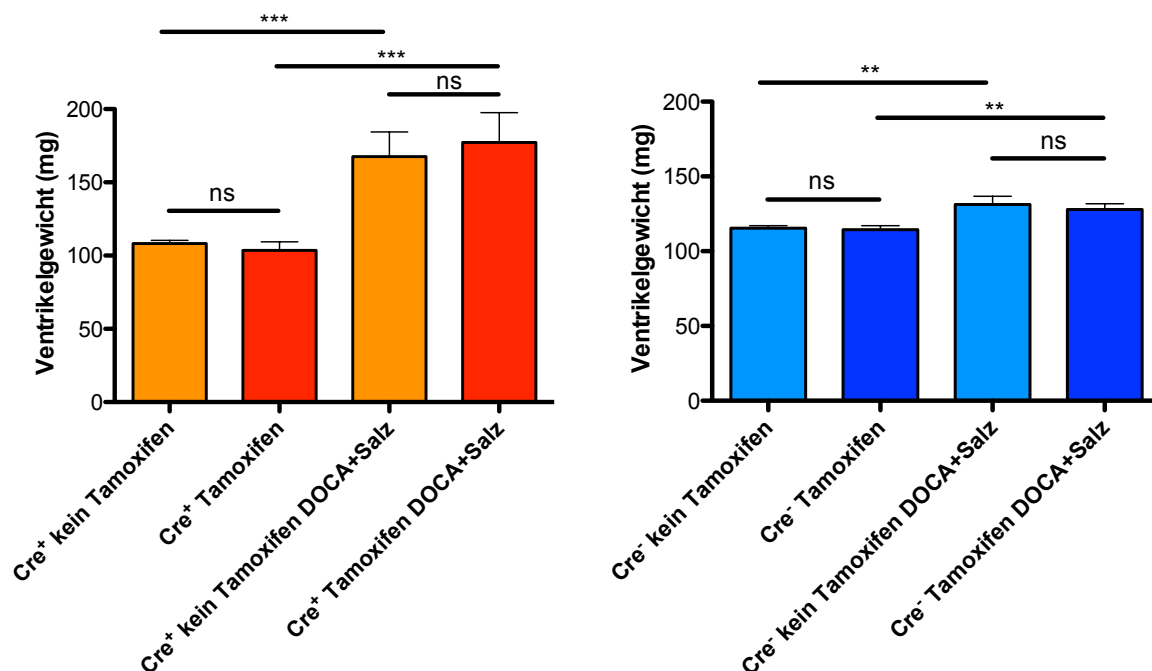


**Abb. 47: Herzfibrose der  $Cre^{+}$ - und der  $Cre^{-}$ -Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Bewertung der  $Cre^{+}$ -Linie (links) und der  $Cre^{-}$ -Mauslinie (rechts). Die Bestimmungen der DOCA + Salz-Gruppen erfolgten am Ende der DOCA + Salz-Gabe nach 3 Wochen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der DOCA + Salz-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Die Bewertung erfolgte anhand einer Skala von 0-2 für 10 Gesichtsfelder pro Maus.  $Cre^{+}$  kein Tamoxifen, n=3.  $Cre^{+}$  Tamoxifen, n=3.  $Cre^{+}$  kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=2.  $Cre^{+}$  Tamoxifen DOCA + Salz, n=2.  $Cre^{-}$  kein Tamoxifen, n=3.  $Cre^{-}$  Tamoxifen, n=3.  $Cre^{-}$  kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=3.  $Cre^{-}$  Tamoxifen DOCA + Salz, n=3. (One-Way ANOVA; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Die Abbildung veranschaulicht, dass es in den unbehandelten  $Cre^{+}$ -Tieren zu keinem Unterschied der Herzfibrose zwischen den Gruppen kam. Die unbehandelten Gruppen der  $Cre^{+}$ -Linie zeigten jedoch signifikant niedrigere Herzfibrosewerte als die zugehörigen Gruppen unter DOCA + Salz-Gabe. Zudem hatte die  $Cre^{+}$ -Gruppe ohne Tamoxifen unter DOCA + Salz-Behandlung eine geringere Gesamtfibrosepunktzahl als die  $Cre^{+}$ -Gruppe mit Tamoxifen unter DOCA + Salz-Behandlung.

Zwischen den Gruppen der  $Cre^{-}$ -Linie zeigten sich durchweg keine signifikanten Unterschiede, weder mit/ ohne Tamoxifen noch mit/ ohne DOCA + Salz.

Bei der Analyse der Ventrikelgewichte zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen den unbehandelten Tieren und den Tieren mit DOCA + Salz-Behandlung:



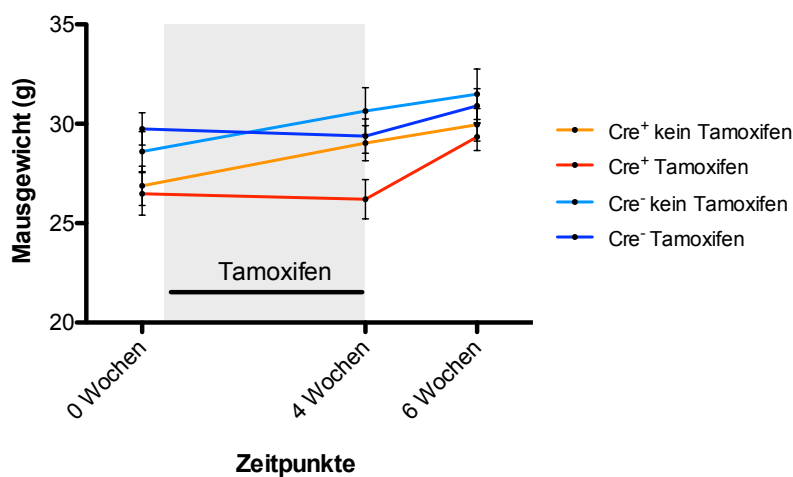
**Abb. 48: Ventrikelgewichte der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe nach DOCA + Salz-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie. Die Bestimmungen der DOCA + Salz-Gruppen erfolgten am Ende der DOCA + Salz-Gabe nach 3 Wochen, die der anderen Gruppen bereits vor dem Beginn der DOCA + Salz-Gabe. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=9. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=11. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=5. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen DOCA + Salz, n=6. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=20. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=20. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen DOCA + Salz, n=6. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen DOCA + Salz, n=9. (One-Way ANOVA; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Im Vergleich der unbehandelten Gruppen untereinander und der mit DOCA + Salz behandelten Gruppen untereinander zeigten sich weder zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen noch zwischen den Cre<sup>-</sup>-Gruppen signifikante Unterschiede. Allerdings hatten alle behandelten DOCA + Salz-Gruppen sowohl der Cre<sup>+</sup>-Linie als auch der Cre<sup>-</sup>-Linie signifikant höhere Ventrikelgewichte als die zugehörigen Gruppen ohne DOCA + Salz-Einfluss.

Alle Gruppen unter DOCA + Salz-Behandlung zeigten gleiche Reaktionen im Hinblick auf Blutdruck, Aktivität und Herzfrequenz. Die DOCA + Salz-Behandlung führte zu einer größeren Dicke und Fläche der Tunica Media der Aorta in allen Gruppen, einer gesteigerten Herzfibrose in den Cre<sup>+</sup>-Gruppen, sowie höheren Ventrikelgewichten in allen Gruppen.

#### 4.8. Einfluss von Tamoxifen auf Körpergewicht und Tibiallänge

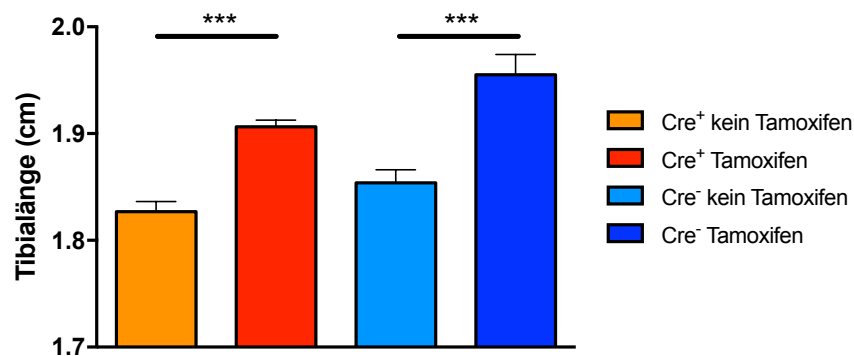
Im Folgenden sollte insbesondere durch gezielte Betrachtung der Cre<sup>-</sup>-Linie der Einfluss von Tamoxifen auf das Körpergewicht und die Tibiallänge bestimmt werden. Das Mausegewicht wurde zum Zeitpunkt 0 Wochen (vor der Tamoxifen-Gabe) bestimmt, am Zeitpunkt 4 Wochen (direkt nach Ende der Tamoxifen-Gabe) und zum Zeitpunkt 6 Wochen, nachdem alle Gruppen wieder 2 Wochen Normalfutter bekamen. Die Tibiallänge wurde zum Zeitpunkt 6 Wochen bestimmt. Die Gewichtsverlaufanalyse ergab folgenden Befund:



**Abb. 49: Gewichtsverlauf der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie zu verschiedenen Zeitpunkten. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Tamoxifen-Gabe für die jeweilige Gruppe beginnend nach dem Zeitpunkt 0 Wochen und bis einschließlich zum Zeitpunkt 4 Wochen andauernd. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=15. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=13. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=10. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=10. (Two-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Bonferroni Post-test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Es zeigte sich ein geringer Anstieg des Körpergewichts über die Zeit, welcher in allen Gruppen zu erkennen war. Graphisch ist ein initial verringerter Anstieg des Körpergewichts in den Tamoxifen-Gruppen im Vergleich zu den Gruppen ohne Tamoxifen zu erkennen, sodass zum Zeitpunkt 4 Wochen die Gruppen ohne Tamoxifen ein leicht höheres Körpergewicht zu haben schienen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant und egalisierte sich bis zum Zeitpunkt 6 Wochen. Die Tamoxifen-Tiere holten den Rückstand im Körpergewicht demnach innerhalb von 2 Wochen wieder vollständig auf.

Bei der Bestimmung der Tibiallänge zeigten sich jedoch interessante signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:



**Abb. 50: Tibiallänge der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie mit und ohne Tamoxifen-Gabe.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehlern der Cre<sup>+</sup>- und der Cre<sup>-</sup>-Mauslinie zum Zeitpunkt 6 Wochen. Zuvor wurden die jeweiligen Mausgruppen über 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und anschließend über 2 Wochen mit Normalfutter behandelt. Cre<sup>+</sup> kein Tamoxifen, n=19. Cre<sup>+</sup> Tamoxifen, n=20. Cre<sup>-</sup> kein Tamoxifen, n=10. Cre<sup>-</sup> Tamoxifen, n=10. (One-way ANOVA; Statistisch getestet mittels Newman-Keuls-Test wurden alle Gruppen gegeneinander)

Beide Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup> Tamoxifen-Gruppen zeigten eine hochsignifikant größere Tibiallänge als die jeweiligen zugehörigen Gruppen ohne Tamoxifen.

## V Diskussion

### 5.1. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für den Blutdruck

Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit war es zu zeigen, ob ein spezifischer Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur zu einem Blutdruckabfall führt, um somit die Relevanz des NKCC1 für die Blutdruckregulation zu klären. Außerdem sollte untersucht werden, ob es auf kardialer, humoraler oder renaler Ebene ggf. zu Gegenregulationsmechanismen als Antwort auf eine Blutdruckveränderung kommt. Die Erkenntnisse sollten mit Hilfe einer durch Tamoxifen-induzierten, spezifischen glattmuskulären Knockoutmauslinie untersucht werden. In einer Linie ( $Cre^+$ ) wurden die Folgen des Knockouts untersucht, während im Vergleich mit der anderen Linie ( $Cre^-$ ) der Einfluss von Tamoxifen auf die Versuchsergebnisse untersucht werden konnte.

#### 5.1.1. Zusammenfassung und Bewertung der blutdruckrelevanten Folgen des spezifischen NKCC1-Knockouts in der glatten Gefäßmuskulatur

Die telemetrische Blutdruckmessung zeigte einen sukzessiven Blutdruckabfall unter der Tamoxifen-Gabe ausschließlich in der NKCC1-SMMHC-Knockoutgruppe ( $Cre^+$  Tamoxifen). Dieser Blutdruckabfall sistierte nach Absetzen des Tamoxifens und festigte sich stabil auf einem Blutdruckniveau, welches um knapp 13 mmHg in der Nacht und 12 mmHg am Tag niedriger war, als vor dem durch Tamoxifen-induzierten Knockout des NKCC1. Dies ist ein Hinweis, dass der Knockout hämodynamisch relevant ist und langfristig nicht voll kompensiert wird. Da die Kontrollgruppe ( $Cre^+$  kein Tamoxifen) sowie die Gruppen der  $Cre^-$ -Linie keine Blutdruckveränderungen aufwiesen, ist festzuhalten, dass der spezifische Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur zu einem erheblichen Blutdruckabfall führt, welcher sich unter Tamoxifen-Gabe über die Zeit zunehmend manifestiert und auch nach Tamoxifen-Gabe erhalten bleibt.

Die Tatsache, dass lediglich in der  $Cre^+$ -Tamoxifen-Gruppe ein Blutdruckabfall gefunden wurde und der Blutdruckverlauf in beiden  $Cre^-$ -Gruppen unabhängig von der Tamoxifen-Gabe gleich ist, belegt, dass der gefundene Blutdruckabfall wohl am ehesten durch den NKCC1-SMMHC-Knockout verursacht wurde und nicht auf die Substanz Tamoxifen zurückzuführen ist.

Aufgrund der zeitlichen Latenz des Knockoutprozesses und des Alterungsprozesses der Tiere und der damit verbundenen möglichen Blutdruckzunahme (Wen et al. 2015) könnte sogar angenommen werden, dass der oben genannte Blutdruckabfall von 13 bzw. 12 mmHg im Falle eines akut durchgeführten totalen NKCC1-SMMHC-Knockouts möglicherweise noch hö-

her hätte ausfallen können. Denn ein steigendes Alter könnte als Gegenspieler des induzierten Blutdruckabfalls fungieren und ein langsamer Prozess ermöglicht möglicherweise zudem leichter die Aktivierung von Kompensationsmechanismen. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Vergleich der beiden  $Cre^+$ -Gruppen miteinander. In diesem Vergleich zeigte sich nach erfolgter Induktion des Knockouts sogar eine Blutdruckdifferenz von 22 mmHg in der Nacht und 23 mmHg am Tag. Alterungsprozesse können in diesem Fall als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da alle Gruppen gleichermaßen von dem Faktor Alter beeinflusst wurden.

Die Hypothese zum Mechanismus des Blutdruckabfalls besagt, dass dieser primär durch eine Vasodilatation aufgrund des NKCC1-Knockouts verursacht wird. Der Gefäßtonus wird maßgeblich durch die Zellladung bestimmt, das sogenannte Ruhemembranpotenzial (Jackson 2000). Hauptverantwortlich für die Einstellung des Ruhemembranpotenzials sind die drei Ionen Kalium, Natrium und Chlorid. Während Kalium ein Gleichgewichtspotenzial von ungefähr -93,1 mV in der glatten Muskulatur hat, so liegt dieses bei Natrium bei circa +69,7 mV und bei Chlorid bei circa -24,6 mV. Abhängig von der Leitfähigkeit der einzelnen Ionen und deren jeweiligem Gleichgewichtspotenzial kann mittels der sogenannten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung das Ruhemembranpotenzial errechnet werden. Dieses liegt in der glatten Gefäßmuskulatur bei circa -66,2 mV (Chipperfield und Harper 2000). Demnach hat eine Erhöhung der Leitfähigkeit für Natrium und Chlorid einen depolarisierenden Einfluss auf das Ruhemembranpotenzial, da ihr Gleichgewichtspotenzial positiver als das Ruhemembranpotenzial ist.

Interessanterweise sollen die Permeabilitäten für Kalium und Chlorid in der glatten Gefäßmuskulatur sogar ähnlich sein, im Gegensatz zu anderen Geweben wie der Skelettmuskulatur (Orlov et al. 2010). Somit scheint Chlorid in der Gefäßmuskulatur eine entscheidende Rolle für das Membranpotenzial zu spielen. Dies konnte bereits in Experimenten gezeigt werden. So kommt es zum Beispiel im Falle einer Blockade des NKCC1 zu einer Negativierung des Gleichgewichtspotenzials für Chlorid, da weniger Chlorid in den Intrazellularraum gelangt. Eine Negativierung des Gleichgewichtspotenzials für Chlorid führt aufgrund der zuvor genannten Relevanz von Chlorid für das Ruhemembranpotenzial zu einem stärker negativen Ruhemembranpotenzial. Davis et al. fanden beispielsweise einen Abfall um 2,4 mV in normotensiven Tieren und um 3,9 mV in hypertensiven Tieren (Davis et al. 1993). Passend zu dieser Hyperpolarisation konnte nach Blockade des NKCC1 ebenfalls eine teilweise Inaktivierung von spannungsabhängigen L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen festgestellt werden (Anfinogenova et

al. 2004). Alle diese Veränderungen könnten eine Vasodilatation verursachen und somit den in dieser Arbeit gezeigten Blutdruckabfall erklären.

In der genaueren Analyse des Blutdrucks wurde zwischen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten weiter differenziert. Sowohl die systolischen als auch die diastolischen Blutdruckwerte zeigten, wie auch der MAD, eine Abnahme ausschließlich in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe, sodass die Abnahme des MAD in dieser Gruppe daher sowohl durch eine systolische als auch durch eine diastolische Blutdruckabnahme verursacht wurde. Dies untermauert die Hypothese eines geringeren Gefäßmuskeltonus in den Widerstandsgefäßen in den Knockout-tieren. Der Tonus in den Widerstandsgefäßen bildet zusammen mit dem Herzzeitvolumen und dem zentralvenösen Druck den MAD. Ein geringerer Gefäßtonus und somit ein geringerer totaler peripherer Widerstand würde wie beschreiben sowohl systolische als auch diastolische Blutdrücke beeinflussen. Dies steht beispielsweise im Kontrast zu einem erhöhten Schlagvolumen, welches hauptsächlich den systolischen Druck erhöht und unter Umständen gar zu einem Absinken der Diastole führt (Rowell et al. 1968, Joyner und Casey 2015).

In der Analyse der Differenz der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte, der sogenannten Pulsamplitude, zeigte sich graphisch tatsächlich eine geringere Pulsamplitude in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe als in der Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe. Dieser Unterschied war zum Zeitpunkt 4 Wochen gemessen mit einem Students-t-Test signifikant. Zum Einen passt eine geringere Pulsamplitude zur Hypothese der Abnahme des totalen peripheren Widerstands, zum Anderen lässt eine geringere Pulsamplitude auf eine bessere Gefäßelastizität der herznahen Gefäße und damit auf eine bessere Funktion des sogenannten Windkesselsystems schließen. Die Dicke der Tunica Media der Aorta korreliert aufgrund ihrer Funktion in der Regulation der Windkesselseigenschaft über eine Kontraktion und konsekutive Zunahme der Steifigkeit positiv mit der Pulsamplitude. Eine hohe Pulsamplitude geht dabei in der Regel mit einer höheren Gefäßdicke und einer geringen Elastizität einher (Berry und Greenwald 1976). In der Tat war die Dicke und Fläche der Tunica Media der Aorta signifikant niedriger in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe als in den Kontrollgruppen. Die allgemein geringe Wandspannung führte zu einer erhöhten Elastizität, wodurch es zu einer Abnahme der Pulsamplitude kam (Belz 1995).

Darüber hinaus galt es herauszufinden, ob die Aktivität einen Einfluss auf die Blutdruckanalysen haben könnte und ob gegebenenfalls unterschiedliche Aktivitäten im Vergleich zwischen den Gruppen somit die Blutdruckwerte verfälscht haben könnten. Es zeigte sich in allen Gruppen in den Dunkelphasen (Nacht) eine deutlich höhere Aktivität als an den Hellphasen

(Tag). Auch die Herzfrequenz und der MAD zeigten eine positive Korrelation zu der Aktivität und somit höhere Werte in der Nacht als am Tag.

Ein möglicher Einfluss von Gruppenunterschieden in den Aktivitätsniveaus auf die zuvor gezeigten Blutdruckdifferenzen der  $\text{Cre}^+$ -Gruppen wurde anhand von aktivitätsnormierten Blutdruckanalysen ausgeschlossen. Der jeweilige Blutdruckunterschied blieb an verschiedenen Aktivitätslevels zwischen den  $\text{Cre}^+$ -Gruppen erhalten. Zusätzlich konnte durch die Aufspaltung der aktivitätsnormierten Blutdruckdaten in Tag und Nacht gezeigt werden, dass nicht nur eine höhere Aktivität zu den höheren Blutdruckwerten in der Nacht beigetragen haben könnte, sondern auch eine erhöhte Sympathikusaktivität in der nächtlichen, aktiven Phase der Tiere, da die nächtlichen aktivitätsnormierten Blutdruckwerte bei gleichen Aktivitätslevel höher waren als die aktivitätsnormierten Blutdruckwerte am Tag.

Bei der allgemeinen Betrachtung der Aktivitäts- und Herzfrequenzwerte zwischen den Gruppen der jeweiligen Linien zeigten sich keine Unterschiede in der  $\text{Cre}^+$ -Linie. In der  $\text{Cre}^-$ -Tamoxifen-Gruppe kam es in der Nacht jedoch teilweise zu signifikant höheren Aktivitätswerten als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist vermutlich auf eine zufällige Varianz innerhalb der Gruppe zurückzuführen, da der Unterschied sich nicht über die gesamte Zeit fand. Insgesamt haben die  $\text{Cre}^-$ -Tiere jedoch eine höhere Aktivität und eine geringere Herzfrequenz als die  $\text{Cre}^+$ -Tiere. Eine Vergleichbarkeit der beiden  $\text{Cre}^+$ - und  $\text{Cre}^-$ -Linien ist wegen des genetischen Hintergrundes generell schwierig, da beide Linien zwar auf gleichem Hintergrund sind, aber über viele Generationen inzüchtig verpaart wurden und genetische Drifts nicht ausgeschlossen werden können.

Zusammenfassend ist also bisher festzuhalten, dass es bei den NKCC1-Knockouttieren zu einem Blutdruckabfall gekommen ist, welcher wohl auf den Knockout selbst und nicht auf die Substanz Tamoxifen zurückzuführen ist und auch nicht durch Unterschiede in der Aktivität verursacht wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck abfallen, was für einen geringeren totalen peripheren Widerstand und somit eine Vasodilatation der Widerstandsgefäße spricht. Außerdem zeigten die Knockouttiere eine geringere Media Dicke in der Aorta, was als Folge des geringeren Blutdrucks zu werten ist. Die bisher diskutierten Daten bestätigen somit die initiale Hypothese, dass der NKCC1 im Gefäßsystem einen entscheidenden Einfluss auf den Blutdruck hat. Allerdings liefern sie noch keine Hinweise auf durch den Knockout bedingte, andere mögliche blutdruckrelevante Steuerungsprozesse wie Hormone, die Niere oder das Herz.

Wichtige Regelkreise für die Einstellung des Blutdrucks sind das RAAS und die Nierenfunktion. Zur Untersuchung der Salzsensitivität der Tiere und der Funktion des RAAS wurden die

Effekte einer Hoch- bzw. Nidrigsalzdiät auf den Blutdruck untersucht. Eine Hochsalzdiät führt in der Regel zu einer Herabregulation des RAAS, während eine Nidrigsalzdiät für eine Hochregulation des RAAS sorgt, beides jeweils um den Blutdruck auf Normallevel zu halten. Unter Nidrigsalzdiät kam es zu keiner Veränderung des Blutdrucks in den beiden untersuchten  $Cre^+$ -Gruppen. Unter Hochsalz hingegen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des MAD in beiden Gruppen. Dies verdeutlicht, dass die  $Cre^+$ -Linie sensitiv auf Salz reagiert und lässt Rückschlüsse auf den Hintergrund der Tiere zu. Denn es konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise reine C57BL/6-Mäuse nicht mit einem Blutdruckanstieg auf hohe Natrium Zufuhr reagieren (Vitzthum et al. 2014). Daher ist zu erkennen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Tiere keinen reinen C57BL/6-Maushintergrund aufweisen.

Die Ursache für einen Blutdruckanstieg unter hoher Salzzufuhr ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es wird aber angenommen, dass es sich um eine Schwäche in den Möglichkeiten einer Natriumausscheidung in der Niere handelt (Ando und Fujita 2012). Beide Gruppen reagierten mit der gleichen Dynamik auf die Hochsalzdiät, sodass der NKCC1-SMMHC-Knockout keinen zusätzlichen Einfluss auf die Salzausscheidung zu haben scheint. Dies zeigten auch die Ergebnisse der fraktionellen Ausscheidungen von Natrium, Kalium und Chlorid, die keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen.

Darüber hinaus ließ die Salzdiät erste Rückschlüsse auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zu. Da die  $Cre^+$ -Gruppen eine vergleichbare Dynamik im Blutdruckanstieg nach Hochsalzdiät zeigten und dementsprechend gleiche körperliche Reaktionen auf die veränderten Salzbedingung vermuten lassen, scheint das RAAS in den Knockouttieren nicht verändert zu sein.

Diese Vermutung wurde ebenfalls bei der Blutdruckmessung unter Anwendung von dem Angiotensin I-Rezeptorantagonisten Losartan bestätigt. Losartan verhindert normalerweise die Funktion des Ang II über den AT1-Rezeptor, sodass das RAAS in seiner blutdrucksteigernden Funktion stark beeinträchtigt ist. Auch unter Losartan zeigte sich in beiden  $Cre^+$ -Gruppen erneut die gleiche Dynamik des Blutdruckabfalls. Diese ganzen Sachverhalte weisen die Hypothese eines veränderten RAAS zurück, da unter Losartan die  $Cre^+$ -Tamoxifen-Gruppe im Fall einer knockoutbedingten Fehlregulation im Sinne einer gestörten Aktivierbarkeit des RAAS einen geringeren Blutdruckabfall als die Kontrollgruppe hätte zeigen müssen und im Falle eines hochregulierten RAAS einen stärkeren Blutdruckabfall als die Kontrollgruppe. Als Bestätigung hierfür zeigten sich auch bei direkten Messungen der Plasmareninaktivität, der Renin-mRNA aus der Niere, der Plasmaaldosteronkonzentration und dem Aldosteron-Renin-Verhältnis im Plasma keine Unterschiede zwischen den beiden  $Cre^+$ -Gruppen.

Obwohl in den unbehandelten Tieren zuvor ein Blutdruckunterschied zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen nachgewiesen werden konnte, zeigten die für die Salzdiät- und Losartan-Versuche verwendeten Gruppen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im MAD. Trotz fehlender Signifikanzen war der Blutdruck in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe dieser Versuche graphisch erwartungsgemäß stets niedriger als in der Kontrollgruppe. Die nicht erreichte Signifikanz im Blutdruckunterschied der beiden Gruppen in diesen Versuchen ist daher am ehesten durch eine zu geringe Tierzahl zu erklären. Auch in der Aktivität zeigten beide Gruppen der Losartan- und Salzversuche Unterschiede, die zu manchen Zeitpunkten sogar signifikant waren. Da auch die Aktivität in den unbehandelten Gruppen bei wesentlich höherer Tierzahl keine Unterschiede zeigte, ist der teilweise sogar signifikante Unterschied in der Aktivität der beiden Gruppen der Losartan- und Salzversuche ebenfalls durch zu geringe Tierzahl zu erklären. Für das primäre Ziel der Losartan- und Salzversuche, nämlich der Beurteilung der Kinetik des Blutdrucks unter den verschiedenen Einflüssen, reichte die im Vergleich zu den anderen Versuchen geringere Tierzahl wahrscheinlich aus.

Als Antwort auf den geringen Blutdruck wäre auch ein kompensatorischer, beispielsweise durch ADH-verursachter (Baylis 1987) Anstieg des Plasmavolumens und daraus folgend durch Wasserdilution ebenso ein geringerer Hämatokritwert denkbar gewesen. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied im Plasmavolumen zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen. Und wie alle anderen Parameter in der Blutgasanalyse zeigte auch der Hämatokritwert keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Cre<sup>+</sup>-Gruppen, sodass ein kompensatorischer Volumenanstieg ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte.

Da zwar das Tubulussystem der Niere nicht durch den Knockout beeinflusst war, wohl aber das Gefäßsystem der Niere könnte es hierdurch zu primären renalen Veränderungen gekommen sein, welche unabhängig von einer Kompensation als Antwort auf den geringen Blutdruck stattgefunden haben könnten. So ist beispielsweise bekannt, dass es bei chronischer Erhöhung des Widerstandes in Gefäßen in der Kortikalis oder Medulla der Niere zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium und somit zu einem Anstieg des Blutdrucks kommt (Mattson et al. 1994). Denkbar wäre also auch gewesen, dass ein Blutdruckabfall durch eine veränderte Blutzirkulation in diesem Areal bei einer Verringerung des Widerstandes entstanden sein könnte. Gegen diese Hypothese spricht in diesem Fall allerdings, dass es wie zuvor beschrieben, zu keiner veränderten fraktionellen Ausscheidung oder einem verändertem Plasmavolumen in den Knockouttieren kam.

Daneben müssten auch das Vas afferens und Vas efferens der Glomeruli der Niere vom Knockout beeinflusst worden sein. Diese Tatsache könnte sogar klinisch besonders relevant

sein, da der NKCC1 auch in der Entstehung von chronischem Nierenversagen eine Rolle spielen könnte (Orlov et al. 2012). Denn Afroamerikaner scheinen in Erythrozyten eine geringere NKCC1-Aktivität als die französisch-kanadische Vergleichsgruppe zu haben (Orlov et al. 2010). Und zusätzlich haben Afroamerikaner eine höhere Prävalenz für das Entstehen von chronischem Nierenversagen im Endstadium (Boone 2000). Somit stellt sich die Frage ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der generellen NKCC1-Aktivität und Nierenversagen geben könnte.

In früheren Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Blockade der NKCC-Transporter zu einer Vasodilatation im Vas afferens der Niere führt. Außerdem war diese Dilatation aufgrund der dortigen fehlenden Expression des NKCC2 auf den NKCC1 zurückzuführen (Wang et al. 2007). Dementsprechend könnte dem NKCC1 eine Schutzfunktion vor hypertonen Blutdruckwerten zukommen, da seine Aktivität für eine Vasokonstriktion im Vas afferens sorgt (Orlov et al. 2012). Die Annahme der Schutzfunktion basiert allerdings auf der Hypothese, dass der NKCC1 vermehrt im Vas afferens exprimiert ist und weniger im Vas efferens, sodass eine fehlerhafte Funktion des Transporters zu einer verhältnismäßig stärkeren Dilatation im Vas afferens führen würde und somit zu einer erhöhten Druckbelastung für die Niere, welche sich in einer erhöhten GFR manifestieren würde. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde diese Druckbelastung somit durch die Messung der GFR jeweils vor und nach Tamoxifen-Gabe überprüft.

Bei der Analyse der GFR mittels FITC-Sinistrin hatte die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe sowohl vor als auch nach Tamoxifen-Gabe signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe, was auf die Einteilung der Tiergruppen zurückzuführen ist, welche zufällig erfolgte. Auch in der Analyse zwischen der GFR vor und nach Tamoxifen-Gabe innerhalb der jeweiligen Gruppe zeigte sich ein GFR-Abfall für beide Gruppen, welcher am ehesten durch das Altern der Tiere erklärbar ist, sodass schließlich die GFR-Veränderung zwischen den Gruppen verglichen wurde. Diese zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und auch die zweite Methode zur GFR-Bestimmung durch die Kreatinin-Clearance zeigte keine unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Gruppen. Somit scheint der glattmuskuläre NKCC1-Knockout die GFR nicht zu beeinflussen, was mit zwei vollkommen unterschiedlichen Methoden gezeigt werden konnte.

Es gab also in diesem Projekt keine Hinweise auf Unterschiede in der Nierenfunktion. Daher ist zu vermuten, dass noch andere Mechanismen untersucht werden sollten, um den Zusammenhang zwischen der NKCC1-Aktivität und der erhöhten Inzidenz von chronischem Nierenversagen herzustellen. Ein weiterführendes Experiment wäre zum Beispiel die beiden

Cre<sup>+</sup>-Gruppen einer unilateralen Nephrektomie sowie einem langfristigen Hypertoniemodell mit simultaner Gabe von Angiotensin II und DOCA + Salz zu unterziehen (Kirchhoff et al. 2008), um eine stärkere Belastung für die Niere zu kreieren. Durch anschließende histologische Untersuchungen, Albuminbestimmungen im Urin und Überprüfung der Nierenfunktion könnten Nierenschädigungen identifiziert werden. Ebenso sollten die Gefäße in der Niere bezüglich des Widerstands direkt untersucht werden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass es durch den glattmuskulären Knockout zu keinen Veränderungen der Nierenparameter kam - weder primär durch den Knockout, noch sekundär durch eine Kompensation des Blutdruckabfalls.

Kardial wäre zu erwarten, dass es bei kurzfristigen Veränderungen des Blutdrucks oder der Pulsamplitude im Regelfall zu einer Reaktion der Pressorezeptoren und einer damit verbundenen Herzfrequenzmodulation kommen könnte (La Rovere und Pinna 2014). Bei der aufgezeigten Abnahme des systolischen und diastolischen Blutdrucks und der Pulsamplitude in der Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe wäre demnach ein Anstieg der Herzfrequenz zu erwarten gewesen. Es zeigte sich jedoch keine Veränderung der Herzfrequenz in den untersuchten Gruppen. Daher ist anzunehmen, dass es zu einer Anpassungsreaktion der Pressorezeptoren an den geringeren MAD aufgrund des langsam induzierten Blutdruckabfalls gekommen sein könnte, so dass es trotz geringerer Pulsamplitude und geringeren Blutdrucks zu keiner Aktivierung der Pressorezeptoren und somit keinem Anstieg der Herzfrequenz kam.

Auch in der Echokardiographie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen im Kontraktionsverhalten (Fractional Shortening), in der Ejektionsfraktion und im Herzminutenvolumen. Demnach kam es auch nicht zu einer Inotropiesteigerung des Herzens als Reaktion auf den niedrigeren Blutdruck im Sinne einer versuchten Kompensation. Passend dazu zeigte sich auch kein Unterschied im Ventrikelgewicht oder in der Histologie des Herzens zwischen den Gruppen.

Als ein weiterer hormoneller Einfluss auf den Blutdruck dient das in den Herzmuskelzellen gebildete ANP. Bei erhöhter Vorhofdehnung wird seine Ausschüttung gefördert mit dem Ziel einer Blutdrucksenkung, hauptsächlich durch eine gesteigerte Natriumausscheidung durch die Nieren (Lang et al. 1987). In den Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Gruppen kam es jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden in der Plasma-ANP-Konzentration, was unterstützt durch die ebenfalls fehlenden Unterschiede im Plasmavolumen und Hämatokritwert auf keine Veränderungen im Volumenhaushalt der Cre<sup>+</sup>-Linie hinweist.

Insgesamt bleibt daher festzuhalten, dass der spezifische Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur zu einem deutlichen Abfall des Blutdrucks führte, welcher weder kardial, noch hormonell, noch renal bedingt ist bzw. durch einen dieser Parameter kompensiert wurde.

### 5.1.2. Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Diskussion

Nachdem sich die NKCC1-Blutdruckdaten bislang lediglich auf globale NKCC1-Knockouts bezogen, war der in dieser Arbeit verwendete spezifische NKCC1-Knockout in der glatten Gefäßmuskulatur der erstmalig beschriebene spezifische NKCC1-Knockout. Eine besondere Relevanz hat dieser spezifische Knockout auch deshalb, da die Blutdruckdaten der globalen NKCC1-Knockouts in der Literatur keine eindeutigen Befunde zulassen. Messungen mit der Tail-Cuff-Methode (Meyer et al. 2002, Wall et al. 2006) oder invasiv mit dem Femoralarterienkatheter (Flagella et al. 1999) zeigten zwar einen eindeutigen Blutdruckabfall in den Knockouts, allerdings konnten andere Arbeitsgruppen mit der aussagekräftigeren Methode der telemetrischen Blutdruckmessung an wachen, ungestressten Mäusen keinen Blutdruckunterschied finden (Kim et al. 2008). Die Limitationen dieser Arbeiten bestanden in der Ungewissheit der Einflussnahme von extravaskulären blutdruckrelevanten Steuerungsmechanismen im globalen NKCC1-Knockout. Daher bestand nie eine vollkommene Sicherheit, dass der NKCC1 im Gefäßsystem den entscheidenden Beitrag für den häufig gezeigten Blutdruckabfall leistet.

Zwar konnten Garg et al. einerseits bereits zeigen, dass ein Blutdruckabfall durch die NKCC1-Blockade mit Bumetanid auch nach Abklemmen der Nierenarterien vorhanden ist und somit nicht primär renal bedingt ist. Und andererseits konnten sie *in vitro* auch zeigen, dass eine durch Phenylephrin hervorgerufene Gefäßkontraktion in Mesenterialgefäßen dritter Ordnung durch das Schleifendiuretikum Bumetanid, einem NKCC1/2-Blocker, abgeschwächt wird, was verdeutlicht, dass der NKCC1 den Tonus in Widerstandsgefäßen beeinflusst (Garg et al. 2007).

Durch den in dieser Arbeit erstmals beschriebenen spezifischen NKCC1-Knockout in der glatten Gefäßmuskulatur konnte nun aber zum ersten Mal spezifisch klargestellt werden, dass der NKCC1 in der Gefäßmuskulatur an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Es zeigte sich, dass ein selektiver glattemuskulärer NKCC1-Knockout einen reduzierten mittleren arteriellen Blutdruck aufweist, was sich wohl durch einen geringeren totalen peripheren Widerstand erklären lässt, da extravaskuläre Mechanismen nicht vom Knockout betroffen und auch nicht kompensatorisch verändert waren.

Dass die Blutdruckveränderungen in der Literatur teilweise nicht eindeutig waren, mag einerseits an den unterschiedlichen Messmethoden und genetischen Hintergründen liegen. Andererseits wird es wohl auch damit zusammen hängen, dass der globale NKCC1-Knockout neben den Effekten auf den Gefäßwiderstand auch die Nierenfunktion maßgeblich beeinflusst, wodurch es zu unterschiedlich starken Veränderungen des Blutdrucks kommen konnte (Hubner et al. 2015). So konnte auch gezeigt werden, dass globale NKCC1-Knockouttiere eine 3-fach erhöhte Plasmaninkonzentration im Vergleich zu den Wildtypen hatten. Darüber hinaus führte eine Blockade des NKCC1 mit Furosemid zu einer erhöhten Reninfreisetzung in Primärkulturen von juxtaglomerulären Zellen, wohingegen in NKCC1-Knockouttieren Furosemid keinen Einfluss mehr hatte. Dies zeigt, dass der NKCC1 zumindest teilweise einen direkten Effekt auf die juxtaglomerulären Zellen und somit auf die basale Reninfreisetzung hat, welche unabhängig von der in der Macula Densa vermittelten Reninfreisetzung zu sein scheint, welche unter Einfluss des NKCC2 abläuft. Demnach würde eine Herabregulation des NKCC1 in den juxtaglomerulären Zellen zu einer gesteigerten Reninfreisetzung führen, da der NKCC1 im Regelfall für eine Suppression der Reninfreisetzung sorgt, welche vermutlich über eine Verringerung des Ruhemembranpotenzials abläuft (Castrop et al. 2005).

Dass der in dieser Arbeit untersuchte spezifische Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur keine veränderte Reninfreisetzung zeigte, ist somit indirekt ein Indiz für die Validität der vorherigen Entdeckungen der Gruppe Castrop, dass der NKCC1 einen direkten Einfluss auf die Reninfreisetzung durch die juxtaglomerulären Zellen und somit auf die Blutdruckregulation hat, da letztere Zellen von dem hier durchgeführten Knockout wahrscheinlich nicht direkt beeinflusst waren. Denn wäre die von der Gruppe beschriebene 3-fache Erhöhung der Plasmaninkonzentration eine Folge des geringeren Blutdrucks gewesen, hätte sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit ein Unterschied im Renin zeigen müssen. Da sich kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp fand, ist anzunehmen, dass es zu keiner kompensatorischen Erhöhung der Plasmaninkonzentration kam und zuvor gezeigte Unterschiede im Renin auf direkte Effekte des Transporters auf die Reninfreisetzung zurückzuführen sind. Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht die genaue Lokalisation der Reninfreisetzung überprüft, sodass weitere Untersuchungen für den Beweis des direkten Effekts der Reninfreisetzung durch die juxtaglomerulären Zellen notwendig wären.

Neben der Reninfreisetzung gibt es noch weitere renale Parameter, welche möglicherweise als Antwort auf die Hypotonie im globalen Knockout verändert sein könnten und dadurch die widersprüchlichen Blutdruckdaten in der Literatur erklären könnten. So wurde beschrieben, dass sich in globalen NKCC1-Knockoutmäusen geringere Plasma-ANP-Konzentrationen als

in Wildtypen fanden (Wall et al. 2006). Außerdem wurden höhere Plasmaaldosteronkonzentrationen in den globalen Knockouttieren und ein Anstieg des Blutdrucks unter Hochsalzdiät gefunden, welcher im Wildtyp nicht vorzufinden war (Kim et al. 2008). Alle diese Veränderungen wurden meist als Kompensationsmechanismen, als Antwort auf die durch den globalen Knockout hervorgerufene Hypotonie interpretiert.

In dieser Arbeit zeigten sich am selektiven glattmuskulären NKCC1-Knockout keinerlei kardiale, hormonelle oder renale Veränderungen. Es kam trotz des gezeigten deutlichen Blutdruckabfalls zu keinerlei Kompensationsmechanismen. Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Gruppen ist am ehesten durch die hier durchgeführten Untersuchungen an spezifischen Knockouttieren zu erklären, bei welchen der NKCC1 lediglich in der glatten Gefäßmuskulatur ausgeschaltet wurde, während in allen vorherigen Analysen ein globaler Knockout untersucht wurde. Wie eingangs beschrieben ist der NKCC1 aber ubiquitär im Organismus vertreten, weswegen im globalen Knockout eine Vielzahl an Faktoren zu den bislang uneinheitlichen Ergebnissen geführt haben könnte.

Trotz der klaren Befunde ist es überraschend, dass es zu keinen kompensatorischen, prohypertensiven Effekten zum Ausgleich des Blutdruckabfalls in dem spezifischen Knockout kam. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen somit der für lange Zeit unbestrittenen Hypothese der Blutdruckregulation Guytons (Pao 2014). Laut seiner Annahme steuert die Niere langfristig den Blutdruck in der Funktion eines Blutdruckkontrollsystems durch Anpassung des Salz- und Wasserhaushaltes bei Blutdruckänderungen (Guyton et al. 1972, Guyton 1991). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten jedoch keinerlei messbare Veränderungen, welche auf eine Anpassung des Salz- und Wasserhaushaltes schließen lassen. Auch nach Gabe von Hochsalz zeigte sich keine unterschiedliche Dynamik im Blutdruckanstieg zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen. Dies verdeutlicht, dass selbst im Falle eines Überangebotes von Salz und somit einer optimalen Grundlage für einen Blutdruckausgleich keine kompensatorische Anpassung des Blutdrucks der Knockoutgruppe an die Kontrollgruppe erfolgte.

Versuche, die ebenfalls in Diskrepanz zu Guytons Theorie stehen, wurden unter anderem von Crowley et al. durchgeführt (Crowley et al. 2005). Diese Arbeitsgruppe verglich anhand von Nierentransplantationsstudien den Einfluss des AT<sub>1a</sub>-Rezeptor auf den Blutdruck. In einer Gruppe fehlte der Rezeptor lediglich in der Niere und war sonst überall im Organismus existent, während er in der anderen Gruppe in allen anderen Teilen des Körpers fehlte und nur in der Niere existierte. Interessanterweise zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnlicher Blutdruckabfall, sodass geschlussfolgert wurde, dass extrarenale Veränderungen eigenständig und ohne eine renale Abhängigkeit zu einer Blutdruckveränderung beitragen können, was in Dis-

krepanz zu Guytons Theorie steht. Auch wenn die Blutgefäße als Hauptursache für den in der Studie beschriebenen Blutdruckunterschied in Verdacht gerieten, gab es damals keine Beweise für die alleinige Verantwortlichkeit der Gefäße (Mendelsohn 2005).

Der sichere Nachweis einer nierenunabhängigen, direkten Beteiligung des Gefäßsystems an der Regulation des systemischen Blutdrucks erfolgte erstmalig durch Knockoutversuche des Mineralokortikoidrezeptors in der glatten Gefäßmuskulatur. In den ebenfalls durch das Cre/loxP-System hergestellten Knockouttieren wurde *in vivo* durch telemetrische Blutdruckmessung ein geringerer Blutdruck bei unveränderter Natriumhomöostase im Vergleich zu den Wildtypen nachgewiesen. Außerdem konnte in den Knockouttieren unter anderem ein verringerter Gefäßmuskeltonus der Mesenterialarterien zweiter Ordnung im Vergleich zum Wildtyp durch Kraftmessung am Myographen nachgewiesen werden (McCurley et al. 2012).

Auch Knockoutexperimente von Dicer-abhängigen miRNAs spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur führten zu einem nierenunabhängigen Blutdruckabfall. Dies lässt ebenfalls einen primären Einfluss der Gefäße auf die Blutdrucksteuerung erkennen (Albinsson et al. 2011).

Zusätzlich zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei Untersuchungen an einem spezifischen Knockout in der glatten Gefäßmuskulatur des Kalzium-aktivierten Chloridkanals TMEM16A (Heinze et al. 2014). Hier wurde nach dem ebenfalls durch Tamoxifen-induzierten Knockout des TMEM16A im Cre/loxP-System ein geringerer systemischer Blutdruck in der Knockoutgruppe im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Außerdem wurde eine geringere konstriktorische Antwort in der Aorta und in kleinen Arteriolen der Retina im Knockout im Vergleich zum Wildtyp beschrieben, was auf einen geringeren Gefäßmuskeltonus hinweist. Somit zeigten diese Knockoutversuche nicht nur einen, wie auch beim spezifischen glattmuskulären NKCC1-Knockout gezeigten Blutdruckabfall, sondern lassen darüber hinaus auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem NKCC1 und dem TMEM16A schließen. Beide können nämlich durch ihre Aktivität durch Veränderungen in der Chloridleitfähigkeit beziehungsweise dem intrazellulären Chloridgehalt zu einer Veränderung des Ruhemembranpotenzials beitragen. Eine beeinträchtigte NKCC1-Funktion könnte über eine geringere intrazelluläre Chloridkonzentration zu einem unzureichenden Chloridausstrom über den TMEM16A führen, sodass dieser seine depolarisierende Wirkung nicht mehr ausüben kann. Vor diesem Hintergrund basiert der gezeigte Blutdruckabfall in der NKCC1-Knockoutgruppe also möglicherweise nicht allein auf dem NKCC1, sondern auf dem Zusammenspiel aller Chlorid- und Membranpotenzial beeinflussenden Transportern und Kanälen.

Insgesamt baut diese Arbeit auf die vorherigen Erkenntnisse der Verantwortlichkeit der Gefäße für die primäre Blutdruckeinstellung auf und beweist, dass Störungen im Gefäßsystem

zweifelsfrei eine primäre Ursache für eine Blutdruckveränderung darstellen können. Es gilt aber zu bedenken, dass der Knockout zwar spezifisch in der glatten Gefäßmuskulatur erfolgte, im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Gefäßtonusmessungen durchgeführt wurden. Auch wenn anzunehmen ist, dass primär ein verringerter Gefäßtonus der Widerstandsgefäße für den Blutdruckabfall in den Knockouttieren ursächlich war (Orlov et al. 2010), ist festzustellen, dass nicht überprüft wurde, ob die Widerstandsgefäße der Knockouttiere *in vitro* einen geringeren Gefäßtonus zeigen bzw. eine geringere Antwort auf Vasokonstriktoren aufzuweisen haben als der Wildtyp. Auch die Bestimmung der Tunica media Dicke erfolgte lediglich in der Aorta und nicht in Widerstandsgefäßen. Somit fehlt für die sichere Annahme eines geringen Gefäßmuskeltonus in Widerstandsgefäßen als Ursache die finale Gewissheit. Gefäßtonusmessungen wären daher zum direkten Beweis unbedingt zu empfehlen. Dass aber, wie erwähnt, keine anderen Ursachen außer einem veränderten Gefäßtonus für den Blutdruckabfall wahrscheinlich sind, lässt annehmen, dass möglicherweise der sehr langsam über Wochen einsetzende Blutdruckabfall verantwortlich dafür sein könnte, dass sich Barorezeptoren und blutdrucksteuernde Hormone langfristig auf einen neuen Blutdrucklevel einstellen und deshalb keine kompensatorische Gegenregulation erfolgt ist.

### 5.1.3. Tamoxifen-Effekte: Der spannende Nebebefund

Zum Ausschluss von Tamoxifen-Effekten auf die gezeigten Ergebnisse wurde die Cre<sup>-</sup>-Linie hinzugezogen. Wie oben erwähnt kam es in dieser Linie teilweise zu unspezifischen und daher vermutlich varianzbedingten Unterschieden zwischen der Cre<sup>-</sup>-Gruppe mit und ohne Tamoxifen. Einzig die erhöhte Tibialänge in den Tamoxifen-Gruppen der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Linie im Vergleich zu den Gruppen ohne Tamoxifen war zwischen beiden Mauslinien gleichwertig ausgeprägt und nicht durch Varianzen oder Messungenauigkeiten zu erklären. Daher konnte z. B. das Ventrikelgewicht oder die GFR nicht auf die Tibialänge normiert werden. Da aber die Normierung auf das Körpergewicht ebenfalls etabliert ist, wurde dieses stattdessen zur Überprüfung einzelner Parameter hinzugezogen.

Alle weiteren Parameter und Ergebnisse, insbesondere der Blutdruck wurden, wie zuvor beschrieben, nicht von der Substanz Tamoxifen beeinflusst. Somit stellte der Unterschied in der Tibialänge lediglich einen Nebebefund dar, welcher wohl für die beobachteten Effekte keine weiteren Konsequenzen hat. Ein Tamoxifen-Einfluss auf das Knochenwachstum ist bereits bekannt und wird in der Literatur diskutiert (Moon et al. 1991, Perry et al. 2005, Karimian et al. 2008).

## 5.2. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur bei art. Hypertonie

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Folgen von dem spezifischen NKCC1-Knockout auf zwei verschiedene Hypertonieformen untersucht werden. Einerseits galt es durch die vor allem vasokonstriktorisch bedingte Hypertonie durch Gabe von Angiotensin II herauszufinden, ob Angiotensin II seine Wirkung auf die Gefäße im Zusammenspiel mit dem NKCC1 in der glatten Muskulatur entfaltet.

Andererseits sollte sichergestellt werden, dass ein ggf. unter Angiotensin II-Gabe aufgezeigter möglicher Blutdruckunterschied zwischen den Gruppen spezifisch auf Angiotensin II-vermittelte Effekte am NKCC1 im glatten Gefäßmuskel zurückgeführt werden kann und nicht durch eine allgemein veränderte NKCC1-Funktion im Gefäßsystem bei Hypertonie. Somit diene das DOCA + Salz-Modell unter anderem als zweite Hypertonieform, die aber im Gegensatz zur Ang II-Gabe mit einem supprimierten Angiotensin II einhergeht. Zudem sollte aber auch die Pathogenese des Blutdruckanstiegs über DOCA + Salz in diesem Modell genauer aufgeklärt werden, da die Rolle von  $\text{Cl}^-$  in dem DOCA + Salz-Modell kontrovers diskutiert wird.

### 5.2.1. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für die Wirkung von Angiotensin II

Zu einem wichtigen Steuerungsmechanismus der NKCC1-Aktivität werden (De)Phosphorylierungsprozesse gezählt. So fand man heraus, dass eine Aktivierung der NKCC1-Aktivität durch eine Phosphorylierung maßgeblich durch die sogenannte WNK-SPAK-Kaskade abläuft (Ohta et al. 2009, Markadieu und Delpire 2014). Passend dazu konnte in WNK-Knockouttieren eine geringere druckinduzierte myogene Antwort der Mesenterialarterien (Susa et al. 2012) und in globalen SPAK-Knockouttieren ein geringerer Blutdruck (Yang et al. 2010) nachgewiesen werden, welcher auf den NKCC1 zurückgeführt wurde. Denn es zeigte sich eine vermehrte Expression von NKCC2 und eine normale Reaktion auf Furosemid in den Knockouttieren, sodass der Blutdruckabfall eher nicht durch NKCC2, sondern auf eine Vasodilatation vermittelt über den NKCC1 zurückzuführen ist.

Zeniya et al. konnten zudem zeigen, dass Angiotensin II für eine vermehrte Phosphorylierung von SPAK und NKCC1 sorgt. Dieser Effekt war unter dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Valsartan nicht vorhanden, sodass angenommen wird, dass Angiotensin II seine Wirkung auf die Kaskade über den AT1-Rezeptor entfaltet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsprozesse durch Angiotensin II in WNK3-Knockouttieren nicht vorhanden sind und der Angiotensin II vermittelte Blutdruckanstieg in den Knockouttieren abgeschwächt

ist. Dies verdeutlichte die Signifikanz auch von WNK3 für die Wirkung von Angiotensin II (Zeniya et al. 2013). Die Versuche zeigten somit, dass Angiotensin II definitiv einen Einfluss auf die Aktivität des NKCC1 hat. Allerdings ließ sich keine Aussage darüber treffen, welchen Beitrag der NKCC1 im Gefäßmuskel für die Gesamtwirkung von Angiotensin II bei der Blutdruckeinstellung trägt und in wie weit der NKCC2 von der Angiotensin II-Wirkung beeinflusst wird, da auch der NKCC2 über SPAK/WNK reguliert wird (Richardson und Alessi 2008).

Diese Fragen konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche am Modell des spezifischen NKCC1-Knockouts in der glatten Gefäßmuskulatur genauer beleuchtet werden. Denn dieses Knockoutmodell ermöglicht einerseits eine selektive Betrachtung der Rolle der Niere, da der NKCC1 im Tubulussystem nicht ausgeknockt ist und andererseits eine Differenzierung zwischen NKCC1 und NKCC2, da lediglich der NKCC1 ausgeschaltet wurde.

Zum Zeitpunkt der Basismessung vor Angiotensin II-Gabe zeigte sich zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen wie erwartet ein Blutdruckunterschied. Die Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe hatte einen geringeren Blutdruck als die Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe. Dieser Unterschied lag nicht im signifikanten Bereich. Da aber zuvor bereits gezeigt werden konnte, dass die unbehandelte Cre<sup>+</sup>-Tamoxifen-Gruppe einen signifikant niedrigeren Blutdruck als die unbehandelte Cre<sup>+</sup>-kein Tamoxifen-Gruppe hat, ist die fehlende Signifikanz zum Zeitpunkt der Basismessung bei den Angiotensin II-Versuchen durch die zu geringe Tierzahl in diesen Versuchen zu erklären. Unter der 14-tägigen Gabe von Angiotensin II zeigte sich sowohl in den Cre<sup>+</sup>- als auch in den Cre<sup>-</sup>-Gruppen ein Blutdruckanstieg. Der Blutdruckanstieg unter Angiotensin II erfolgte in allen untersuchten Gruppen in gleichem Ausmaß, sodass der anfänglich beobachtete Unterschied im Blutdruck zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen auch nach Gabe von Angiotensin II im gleichen Ausmaß erhalten blieb. Demnach war der absolute Blutdruckanstieg (MAP hinterher-MAP vorher) in beiden Gruppen gleich, sodass Angiotensin II seine Wirkung wohl nicht im Wesentlichen im Zusammenspiel mit dem NKCC1 entfaltet, sondern andere Mechanismen für die Ang II-Wirkung entscheidender sind.

Da sich zwischen den Cre<sup>-</sup>-Gruppen weder vor, noch nach Angiotensin II-Gabe ein Unterschied im Blutdruck zeigte, ist festzustellen, dass Tamoxifen auch keinen Einfluss auf den Blutdruckanstieg unter Angiotensin II und somit auf diese Ergebnisse hat.

Bei Betrachtung der Aktivität erkennt man einen Abfall in den Aktivitätswerten, der in allen Gruppen gleich ausfiel und dem Effekt von Angiotensin II auf das Verhalten der Tiere zugeordnet werden kann. Auch das Fehlen eines Tag-/ Nacht-Rhythmus, erkennbar an der Angleichung der Tag- und Nachtwerte insbesondere im Blutdruck, sind auf die Beeinträchtigung

der Tiere unter Angiotensin II-Infusion zurückzuführen. In der Herzfrequenz zeigte sich in allen Gruppen ein reflektorischer Abfall kurz nach Beginn der Angiotensin II-Gabe. Die Herzfrequenz erreichte in allen untersuchten Gruppen nach wenigen Tagen wieder die Ausgangsfrequenz, sodass auch hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet wurden.

Darüber hinaus bestätigten die Analysen der Dicke und Fläche der Tunica Media in der Aorta und Endorganschäden am Herzen, gemessen an der Herzfibrose sowie den Ventrikelgewichten, dass die Gabe von Angiotensin II erfolgreich zu einem Blutdruckanstieg geführt hat und auch im Organsystem Schaden verursacht hat. So zeigte sich ein Anstieg der Media Dicke der Aorta in allen Angiotensin II-Gruppen der  $Cre^+$ - und  $Cre^-$ -Linien und auch eine Zunahme der Herzfibrose in allen Gruppen der  $Cre^-$ -Linie unter Angiotensin II als Korrelate für Endorganschäden. Lediglich für die  $Cre^+$ -Gruppen unter Ang II manifestierte sich keine signifikante Herzfibrose im Vergleich zu den Gruppen ohne Ang II. Dass dieser Effekt dort nicht signifikant ist, hängt vermutlich erneut mit der zu geringen Tierzahl zusammen. Dafür zeigte sich die vermehrte kardiale Beanspruchung in den Ventrikelgewichten, bei denen alle Angiotensin II-behandelten Gruppen signifikant höhere Werte als die zugehörigen Vergleichsgruppen ohne Angiotensin II-Gabe aufwiesen. Die erhöhten Ventrikelgewichte sind somit möglicherweise ein Zeichen einer reaktiven Hypertrophie verursacht durch die Hypertonie unter Ang II (Levy et al. 1988).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse für alle Gruppen einen Blutdruckanstieg unter Angiotensin II mit Endorganeffekten. Auch wenn in der Literatur gezeigt werden konnte, dass Angiotensin II einen positiven Effekt auf die NKCC1-Aktivität hat, zeigte die Tatsache, dass der Blutdruckanstieg in den  $Cre^+$ -Gruppen zu einem gleichen Ausmaß erfolgte jedoch, dass Angiotensin II seine hämodynamische Wirkung in diesem Modell wohl nicht wesentlich über den NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur entfaltet. Die NKCC1-Aktivität in der glatten Muskulatur spielt in der Entstehung einer Angiotensin II-abhängigen Hypertonie daher wohl nicht die vorherrschende Rolle. Stattdessen könnte also eher die Aktivität der NCCs und des NKCC2, aber auch der NKCC1-Aktivität in anderen Körperzellen durch Angiotensin II beeinflusst werden und somit eine wichtigere Funktion in Hinblick auf die Angiotensin II-vermittelte Hypertonie als der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur einnehmen (Rafiqi et al. 2010).

### **5.2.2. Relevanz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur für die Wirkung des DOCA + Salz-Modells**

Die Erkenntnis der Entstehung einer Hypertonie durch die Verabreichung von Desoxycorticosteron Acetat (DOCA) und Natriumchlorid besteht bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts (Selye et al. 1943). In dieser Arbeit hatte die Verwendung von DOCA + Salz primär den Zweck, die Ergebnisse der Angiotensin II-Versuche spezifisch auf eine Angiotensin II-Wirkung zurückführen zu können und somit eine allein durch die Hypertonie veränderte NKCC1-Funktion in diesen Versuchen ausschließen zu können. Dieses zweite Hypertonie-modell mit DOCA + Salz ging somit im Gegensatz zu den Angiotensin II-Versuchen mit einem supprimierten Angiotensin II einher.

Außerdem galt es zu untersuchen, ob das DOCA + Salz-Modell seine Wirkung über eine durch den NKCC1 vermittelte intrazelluläre Chloriderhöhung entfaltet. So kamen bereits 1983 Kurtz et al. zu der Erkenntnis, dass die Induktion der Hypertonie im DOCA + Salz-Modell nicht nur von Natrium, sondern auch maßgeblich von Chlorid abhängig ist, da die Natriumchloridverbindung in einem stärkeren Blutdruckanstieg resultierte als Natriumbikarbonat- oder Natriumascorbatverbindungen. Da erst wenig zuvor die Existenz des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur als aktive Chloridpumpe beschrieben worden war, wurde über einen möglichen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Kurtz und dem NKCC1 spekuliert (Kurtz und Morris 1983).

Auch die Versuche von Davis et al. aus dem Jahr 1993 ließen einen Einfluss des NKCC1 im DOCA + Salz-Modell vermuten. Sie hatten herausgefunden, dass Tiere, welche DOCA + Salz bekamen, in der glatten Gefäßmuskulatur höhere intrazelluläre Chloridkonzentrationen aufwiesen als die Kontrollgruppe. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch den NKCC1-Inhibitor Bumetanid in normotensiven Tieren zu einem Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration in der glatten Gefäßmuskulatur kam, welcher unter einer DOCA + Salz-Hypertonie sogar verstärkt war. Dies deutete darauf hin, dass der NKCC1 eine entscheidende Rolle bei der Wirkungsentfaltung des DOCA + Salz-Modells beim Blutdruckanstieg zu besitzen scheint (Davis et al. 1993).

Die vermutete Relevanz des NKCC1 für die DOCA + Salz-induzierte Hypertonie konnte in dieser Arbeit allerdings nicht direkt gezeigt werden. Insgesamt erzeugte die volumenbedingte Hypertonie im DOCA + Salz-Modell nämlich ähnliche Werte wie unter der chronischen Angiotensin II-Gabe. Wie auch unter Angiotensin II kam es zu einem vergleichbaren Blutdruckanstieg in allen Gruppen nach der Gabe von DOCA + Salz. Es zeigte sich insgesamt ein etwas geringerer Blutdruckanstieg unter DOCA + Salz als unter Angiotensin II. Da die Blutdruck-

veränderung im gleichen Ausmaß in allen Gruppen erfolgte, kann eine Beteiligung des glatt-muskulären NKCC1 für die Entstehung einer Hypertonie im DOCA + Salz-Modell hier nicht direkt gezeigt werden. Zusätzlich stützen diese Ergebnisse die Angiotensin II-Versuche, da auch in diesem zweiten Hypertoniemodell ein vergleichbarer Blutdruckanstieg in allen Gruppen zu verzeichnen war.

Der nicht signifikante Blutdruckunterschied zwischen den Cre<sup>+</sup>-Gruppen unter Angiotensin II, welcher mit einer zu geringen Tierzahl begründet wurde, war teilweise unter DOCA + Salz bei ähnlichen Tierzahlen sogar signifikant. Zusätzlich war der Tag-/ Nacht-Rhythmus im Vergleich zu den Angiotensin II-Versuchen bei DOCA + Salz-Behandlung besser erhalten, was verdeutlicht, dass Störungen in der zirkadianen Rhythmik Angiotensin II spezifisch sind. Während die Aktivität sich nicht signifikant über die Zeit veränderte, kam es wie schon unter Angiotensin II zu einem reflektorischen Abfall der Herzfrequenz initial nach Beginn der DOCA + Salz-Gabe. Diese glich sich aber wie schon unter Angiotensin II schnell wieder dem Ausgangsniveau an. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant im Hinblick auf Aktivität oder Herzfrequenz.

Bei der Analyse von Endorganschäden wie z. B. der Media Dicke der Aorta, der Herzfibrose und dem Ventrikelgewicht zeigten sich ebenfalls ähnliche Ergebnisse wie unter Angiotensin II. Dementsprechend zeigten die DOCA + Salz-Gruppen im Vergleich zu den Gruppen ohne DOCA + Salz in der Regel höhere Werte in der Tunica Media Dicke und Fläche, mehr Herzfibrose sowie ein höheres Ventrikelgewicht. Dass die Unterschiede hier teilweise nicht signifikant waren, ist wie schon zuvor durch die geringe Tierzahl zu erklären.

Insgesamt kam es nicht zu signifikanten Unterschieden in der Höhe des Blutdruckanstiegs oder Endorganeffekten zwischen den Gruppen innerhalb der Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Linie, sodass der spezifische NKCC1-Knockout in der glatten Gefäßmuskulatur mit dem durchgeführten Modell eher keinen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer DOCA + Salz-Hypertonie besitzt.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Relevanz des NKCC1 für die hämodynamische DOCA + Salz-Wirkung als eher gering eingestuft werden kann. Sowohl die Angiotensin II-Gabe als auch die DOCA + Salz-Gabe führte zu einem gleichen Blutdruckanstieg in allen Gruppen, sodass sich für den NKCC1 in keinem der beiden Hypertoniemodelle eine große mechanistische Relevanz zeigt. In beiden Modellen zeigten sich in allen Gruppen vergleichbare signifikante Endorganschäden, was verdeutlicht, dass das Fehlen des NKCC1 in beiden Modellen nicht vollends vor der Entstehung einer Hypertonie schützen kann. Da das DOCA + Salz-Modell aufgrund der vorherigen Erkenntnisse seine Wirkung wahrscheinlich

über eine veränderte intrazelluläre Chloridkonzentration entfaltet, sind wie auch schon bei der Wirkung von Angiotensin II wohl auch andere Kanäle bzw. Transporter, unabhängig vom NKCC1, für die DOCA + Salz-Wirkung entscheidender.

Für beide Hypertoniemodelle gilt, dass sie einen sehr massiven, kurzfristigen Hochdruck erzeugen. Demnach scheint der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur bei einer akut erzeugten massiven Hypertonie keine entscheidende mechanistische Relevanz zu besitzen. Das hier gezeigt bedeutet aber nicht, dass der NKCC1 bei der Hypertonieentwicklung gar keine Rolle spielt. Denn mildere Modelle, welche noch langfristiger mit einer geringeren Dosis wirken, würden möglicherweise einen Unterschied zwischen der Knockoutgruppe und der Kontrollgruppe zeigen, da bei einem milderen Blutdruckanstieg die Möglichkeiten für zellinterne Signalkaskaden als Anpassung an die Hypertonieentwicklung unter Umständen eher gegeben wären.

Zudem bleibt zu bemerken, dass der durch den glattmuskulären Knockout des NKCC1 im Vergleich zur Kontrollgruppe gefundene tiefere Blutdruck in beiden Hypertoniemodellen erhalten bleibt, sodass beide Gruppen zwar einen Blutdruckanstieg aufweisen, aber die NKCC1-Knockoutgruppe auch unter der Hypertonie stets einen geringen Blutdruck aufweist. Demnach könnte der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur trotz der vermutlich geringeren Relevanz bei der Hypertonieentstehung eine protektive Rolle im Falle einer pharmakologischen Blockade einnehmen.

### 5.3. Ausblick

Die Erkenntnis, dass ein spezifischer Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur den Blutdruck erheblich senkt, verdeutlicht die Relevanz dieses Transporters für die Einstellung des Blutdrucks, gerade weil auch unter der Hypertonie der NKCC1-Knockout einen geringeren Blutdruck zeigt. Daher kann man den NKCC1 als potenzielles pharmakologisches Target für die Senkung des Blutdrucks z. B. in der Behandlung der Hypertonie ansehen. Aufgrund der ubiquitären Expression im Organismus würde seine globale Blockade jedoch vielfältige Nebenwirkungen hervorrufen und es ist fraglich, ob die Vorteile hier tatsächlich überwiegen. So wurde bereits gezeigt, dass eine Störung/ ein Fehlen des NKCC1 neben den blutdruckrelevanten Mechanismen beispielsweise zu Taubheit und Gleichgewichtsstörungen führen kann, es zu Beeinträchtigungen im peripheren Nervensystem kommen kann, die Speichel und Flüssigkeitsproduktion herabgesetzt sein kann und seine Blockade auch zu Infertilität führt. Ohnehin stehen mit den Schleifendiuretika (z. B. Furosemid, Bumetanid) bereits wenig selektive Inhibitoren des NKCC1 und NKCC2 für den gesamten Organismus zur Verfügung. Auch wenn zum Beispiel eine NKCC2-vermittelte diuretische Nebenwirkung teilweise gewollt ist, scheiden diese Medikamente aber bei vielen Patienten zur Hypertoniebehandlung gerade aufgrund der starken Nebenwirkungen aus. Die spezifische Blockade des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur im Sinne einer nebenwirkungsarmen Therapie scheint somit eine sinnvolle Option eines neuen pharmakologischen Targets zu sein, welche allerdings schwer zu entwickeln sein dürfte.

## VI Zusammenfassung

Einleitung: Der Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter Typ 1 (NKCC1) trägt durch seine Funktion in der glatten Gefäßmuskulatur und in anderen Organen entscheidend zur Steuerung des Blutdrucks bei. Durch einen Tamoxifen-induzierten spezifischen Knockout des NKCC1 in der glatten Muskulatur sollte die genaue Relevanz des Transporters in der Gefäßmuskulatur für die Blutdruckeinstellung untersucht werden und kompensatorische Mechanismen gegebenenfalls aufgedeckt werden. Außerdem galt es herauszufinden, ob Angiotensin II seine hypertensive Wirkung entscheidend über den NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur entfaltet. Diese Ergebnisse sollten durch den Vergleich mit einer volumenbedingten Hypertonie durch das sogenannte DOCA-Salz-Modell überprüft werden und zudem die Funktion des NKCC1 in der Gefäßmuskulatur für diese beiden Bluthochdruckmodelle herausgearbeitet werden.

Methodik: Durch zwei Mauslinien jeweils mit und ohne Gabe von Tamoxifen konnten die Funktionen des NKCC1 und der Einfluss der Substanz Tamoxifen überprüft werden. Durch hämodynamische Messungen mittels Telemetrie konnte der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt werden. Gegebenenfalls stattfindende Kompensationsmechanismen sollten durch Analysen der Herz- und Nierenfunktion, Plasmahormonbestimmungen, Elektrolytuntersuchungen und histologische Analysen aufgedeckt werden. Um die Ergebnisse zu normieren wurden auch Gewichtsbestimmungen und Tibialängenmessungen durchgeführt.

Ergebnisse: In der NKCC1-Knockoutgruppe zeigte sich ein signifikanter Abfall des Blutdrucks, welcher in den drei Kontrollgruppen nicht beobachtet wurde. Dabei kam es weder zu kardialen, hormonellen oder renalen Veränderungen. Weder nach Gabe von Angiotensin II, noch von DOCA + Salz kam es zu Unterschieden im Blutdruckanstieg zwischen den Gruppen, bei erhaltener Blutdruckdifferenz zwischen NKCC1-Knockout- und Vergleichsgruppe.

Schlussfolgerung: Der spezifische Knockout des NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur sorgt für einen primären Blutdruckabfall allein durch seine Funktion im Gefäßsystem. Somit ist die Niere nicht zwangsläufig an der Blutdruckregulation beteiligt und zeigt, wie auch kardiale und hormonelle Systeme, keine Kompensationsversuche als Reaktion auf den Blutdruckabfall. Außerdem scheint der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur weder unter Angiotensin II noch im DOCA-Salz-Modell bei intensiven Dosierungen entscheidend an der Blutdrucksteigerung beteiligt zu sein. Zukünftig könnte der NKCC1 in der glatten Gefäßmuskulatur ein mögliches pharmakologisches Target zur Behandlung der Hypertonie darstellen.

## VII Summary

Introduction: The Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter Type 1 (NKCC1) plays an important role in the regulation of blood pressure through its function in vascular smooth muscle cells and other organs. Using a tamoxifen induced knockout of the NKCC1 in vascular smooth muscle cells the exact relevance of this transporter in vascular smooth muscle cells for the regulation of blood pressure and possible compensatory mechanisms should be developed. Furthermore the study intended to find out if angiotensin II develops its hypertensive effects in particular through mechanisms involving the NKCC1 in vascular smooth muscle cells. With the use of the DOCA salt model the angiotensin II results should be controlled by creating hypertension by means of an increased blood volume. Hence, the NKCC1 function in vascular smooth muscle cells for both these hypertension models should be revealed.

Methods: Using two mouse strains both applied with and without tamoxifen the functions of the NKCC1 in vascular smooth muscle cells and the substance tamoxifen could be developed. Haemodynamic measurements with use of telemetry allowed to determine blood pressure and heart frequency. Possible compensatory mechanisms should be revealed by the analysis of heart and kidney function, measurements of plasma hormones, electrolytes and histology. In order to standardise the results measurements of mouse weight and tibia lengths were held.

Results: The NKCC1 knockout group showed a significant fall in blood pressure, which was not noticed in any of the three control groups. Furthermore, there were no cardiac, hormonal or renal changes. Neither the application of angiotensin II, nor the application of DOCA + salt resulted in differences in the rise of blood pressure between the groups. However, the initial difference in blood pressure between the NKCC1 knockout group and the comparison group persisted also during an increasing blood pressure.

Conclusion: The specific NKCC1 knockout in vascular smooth muscle cells results in a fall of blood pressure solely caused by its function in vascular smooth muscle cells. There were no renal, cardiac or hormonal compensatory reactions on the fall in blood pressure. Hence it can be stated that the kidney is not necessarily involved in blood pressure regulation. In addition the NKCC1 in vascular smooth muscle cells does not seem to play a leading role when both the angiotensin II and the DOCA salt hypertension models are applied intensively. In future the NKCC1 in vascular smooth muscle cells might be a possible pharmacological target for the treatment of hypertension.

## VIII Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------|
| °C               | Grad Celsius                                         |
| <sup>125</sup> I | Iod-125                                              |
| A.               | Arteria                                              |
| Abb.             | Abbildung                                            |
| ACE              | Angiotensin-konvertierendes Enzym                    |
| ACh              | Acetylcholin                                         |
| ACTH             | Adrenocorticotropes Hormon                           |
| ADH              | Antidiuretisches Hormon/ Adiuretin/ Vasopressin      |
| Ang II           | Angiotensin II                                       |
| ANOVA            | Analysis of variance                                 |
| ANP              | Atriales natriuretisches Peptid                      |
| Art.             | Arteriell                                            |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                  |
| AT <sub>1</sub>  | Angiotensin-Rezeptor Typ 1                           |
| AT <sub>2</sub>  | Angiotensin-Rezeptor Typ 2                           |
| BE               | Basenexzess                                          |
| BGA              | Blutgasanalyse                                       |
| bidest.          | Bidestilliert                                        |
| BK-Kanäle        | Ca <sup>2+</sup> -aktivierten-K <sup>+</sup> -Kanäle |
| BSC1             | Bumetanid-sensitiver-Kotransporter 1 (NKCC2)         |
| BSC2             | Bumetanid-sensitiver-Kotransporter 2 (NKCC1)         |
| bzgl.            | bezüglich                                            |
| bzw.             | beziehungsweise                                      |
| C-terminal       | Carboxyterminal                                      |
| Ca               | Kalzium                                              |
| Cab39            | Calcium-binding-protein 39                           |
| CaCC             | Ca <sup>2+</sup> -aktivierter Chloridkanal           |
| CaMK             | Kalzium-/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase         |
| cAMP             | cyclisches Adenosinmonophosphat                      |
| CCC              | Kation-Chlorid-Cotransporter                         |
| CFTR             | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  |
| cGMP             | cyclisches Guanosinmonophosphat                      |
| CIP              | CCC-interagierendes Protein                          |

|                         |                                                    |
|-------------------------|----------------------------------------------------|
| Cl                      | Chlorid                                            |
| ClC                     | Chloride channel                                   |
| CO <sub>2</sub>         | Kohlenstoffdioxid                                  |
| Cre                     | causes recombination                               |
| CYP                     | Cytochrom P450                                     |
| d                       | days (Tage)                                        |
| DNA                     | Desoxyribonukleinsäure                             |
| DOCA                    | Deoxycorticosteron Acetat                          |
| EDTA                    | Ethylendiamintetraessigsäure                       |
| EIA                     | Enzymatische Immunadsorption                       |
| ENaC                    | Epithelialer Natriumkanal                          |
| ER                      | Östrogenrezeptor                                   |
| EvG                     | Elastika-van-Gieson                                |
| FE                      | Fraktionelle Ausscheidung                          |
| FITC                    | Fluorescein-isothiocyanate                         |
| G-Protein               | Guaninnucleotid-bindendes Protein                  |
| g                       | Gramm                                              |
| GABA                    | $\gamma$ -Aminobuttersäure                         |
| GFR                     | Glomeruläre Filtrationsrate                        |
| ggf.                    | gegebenenfalls                                     |
| GNRH                    | Gonadotropin releasing Hormon                      |
| H                       | Wasserstoff                                        |
| H <sub>2</sub> O        | Wasser                                             |
| HCO <sup>3-</sup>       | Bikarbonat                                         |
| HIF                     | Hypoxie-induzierter Faktor                         |
| Hkt                     | Hämatokrit                                         |
| HSD3B2                  | 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase            |
| HZV                     | Herzzeitvolumen                                    |
| IP <sub>3</sub>         | Inositol-1,4,5-trisphosphat                        |
| IZIP                    | Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie |
| JGF                     | Juxtaglomeruläre Feedback                          |
| JGA                     | Juxtaglomerulärer Apparat                          |
| K                       | Kalium                                             |
| K <sub>ir</sub> -Kanäle | einwärts-gleichrichtende K <sup>+</sup> -Kanäle    |
| K <sub>v</sub> -Kanäle  | spannungsgesteuerte K <sup>+</sup> -Kanäle         |

|                  |                                                  |
|------------------|--------------------------------------------------|
| K2p-Kanäle       | two pore domain K <sup>+</sup> -Kanäle           |
| KCC              | K-Cl-Cotransporter                               |
| KCl              | Kaliumchlorid                                    |
| kDA              | Kilodalton                                       |
| KG               | Körpergewicht                                    |
| kg               | Kilogramm                                        |
| Krea             | Kreatinin                                        |
| L-Typ            | longlasting Typ                                  |
| LBD              | Ligandenbindungsdomäne                           |
| loxP             | locus of crossover in phage P1                   |
| M                | Molarität                                        |
| MAD              | Mittlerer arterieller Druck                      |
| Mg               | Milligramm                                       |
| min              | Minute                                           |
| ml               | Milliliter                                       |
| MLC              | Myosin-light-chain                               |
| MLCK             | Myosin-leichte-Ketten-Kinase                     |
| mmHg             | Millimeter Quecksilbersäule                      |
| mRNA             | messenger Ribonukleinsäure, messenger RNA        |
| N-Glycolysierung | Amino-Glycolysierung                             |
| N-terminal       | Aminoterminal                                    |
| Na               | Natrium                                          |
| NaCl             | Natriumchlorid                                   |
| NCX              | Na <sup>+</sup> -/ Ca <sup>2+</sup> -Austauscher |
| ng               | Nanogramm                                        |
| NCC              | Na-Cl-Cotransporter                              |
| NH <sup>4+</sup> | Ammonium                                         |
| NKCC             | Na-K-2Cl-Cotransporter                           |
| NKCC1            | Na-K-2Cl-Cotransporter 1                         |
| NKCC2            | Na-K-2Cl-Cotransporter 2                         |
| nm               | Newtonmeter                                      |
| NO               | Stickstoffmonoxid                                |
| NTG              | Nitroglycerin                                    |
| O <sub>2</sub>   | Sauerstoff                                       |
| PAS              | Periodic acid-Schiff reaction                    |

|                   |                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------|
| pCO <sub>2</sub>  | Kohlenstoffdioxidpartialdruck                        |
| PCR               | Polymerase chain reaction                            |
| PGF <sub>2α</sub> | Prostaglandin F <sub>2α</sub>                        |
| PKA               | Proteinkinase A                                      |
| PKC               | Proteinkinase C                                      |
| PMCA              | Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> -ATPase               |
| pO <sub>2</sub>   | Sauerstoffpartialdruck                               |
| post-op           | postoperativ                                         |
| PP1               | Protein phosphatase 1                                |
| PSR               | Pikro-Sirius-Rot                                     |
| RAAS              | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System                  |
| Rb                | Rubidium                                             |
| RIA               | Radioimmunoassay                                     |
| ROMK              | Renal outer medullary potassium channel              |
| SEM               | Standard error of the mean (Standardfehler)          |
| SERCA             | Sarkoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase |
| SHR               | Spontan hypertensive Ratte                           |
| SMMHC             | Smooth muscle myosin heavy chain                     |
| SPAK              | STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase       |
| SR                | Sarkoplasmatisches Retikulum                         |
| StAR              | Steroidogenic acute regulatory protein               |
| T-Typ             | Transient Typ                                        |
| TAL               | Thick ascending limb (Henle Schleife)                |
| Tam               | Tamoxifen                                            |
| TPR               | Totaler peripherer Widerstand                        |
| TRP-Kanäle        | Transient receptor potential channels                |
| U                 | Umdrehungen                                          |
| UKE               | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf               |
| VSMC              | Vascular smooth muscle cell                          |
| WNK               | with-no-K(Lys) kinase                                |
| z. B.             | zum Beispiel                                         |
| ZNS               | Zentrales Nervensystem                               |
| ZVD               | Zentralvenöser Druck                                 |

## IX Literaturverzeichnis

- Akar, F., E. Skinner, J. D. Klein, M. Jena, R. J. Paul und W. C. O'Neill (1999). "Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in rat aorta." Am J Physiol **276**(6 Pt 1): C1383-1390.
- Albinsson, S., A. Skoura, J. Yu, A. DiLorenzo, C. Fernandez-Hernando, S. Offermanns, J. M. Miano und W. C. Sessa (2011). "Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function." PLoS One **6**(4): e18869.
- Altamirano, A. A., G. E. Breitwieser und J. M. Russell (1988). "Vanadate and fluoride effects on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in squid giant axon." Am J Physiol **254**(4 Pt 1): C582-586.
- Amberg, G. C. und M. F. Navedo (2013). "Calcium dynamics in vascular smooth muscle." Microcirculation **20**(4): 281-289.
- Ando, K. und T. Fujita (2012). "Pathophysiology of salt sensitivity hypertension." Ann Med **44 Suppl 1**: S119-126.
- Anfinogenova, Y. J., M. B. Baskakov, I. V. Kovalev, A. A. Kilin, N. O. Dulin und S. N. Orlov (2004). "Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport, intracellular Cl<sup>-</sup> and L-type Ca<sup>2+</sup> channels." Pflugers Arch **449**(1): 42-55.
- Arakawa, K. und H. Urata (2000). "Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis." Hypertension **36**(4): 638-641.
- Baylis, P. H. (1987). "Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans." Am J Physiol **253**(5 Pt 2): R671-678.
- Belz, G. G. (1995). "Elastic properties and Windkessel function of the human aorta." Cardiovasc Drugs Ther **9**(1): 73-83.
- Berry, C. L. und S. E. Greenwald (1976). "Effects of hypertension on the static mechanical properties and chemical composition of the rat aorta." Cardiovasc Res **10**(4): 437-451.
- Beuschlein, F. (2013). "Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease." Eur J Endocrinol **168**(6): R85-93.
- Bianchi, G., P. Ferrari, D. Trizio, M. Ferrandi, L. Torielli, B. R. Barber und E. Polli (1985). "Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in the rat. A genetically determined link." Hypertension **7**(3 Pt 1): 319-325.
- Birbaumer, N. und R. F. Schmidt (2003). "Biologische Psychologie." Springer-Verlag Berlin Heidelberg **5. Auflage**: 189-190.
- Boone, C. A. (2000). "End-stage renal disease in African-Americans." Nephrol Nurs J **27**(6): 597-600.
- Carota, I., F. Theilig, M. Oppermann, P. Kongsuphol, A. Rosenauer, R. Schreiber, B. L. Jensen, S. Walter, K. Kunzelmann und H. Castrop (2010). "Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms." Acta Physiol (Oxf) **199**(3): 327-338.

- Carretero, O. A. und S. Oparil (2000). "Essential hypertension. Part I: definition and etiology." Circulation **101**(3): 329-335.
- Castrop, H., J. N. Lorenz, P. B. Hansen, U. Friis, D. Mizel, M. Oppermann, B. L. Jensen, J. Briggs, O. Skott und J. Schnermann (2005). "Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl- cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion." Am J Physiol Renal Physiol **289**(6): F1185-1192.
- Castrop, H. und I. M. Schiessl (2014). "Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2)." Am J Physiol Renal Physiol **307**(9): F991-f1002.
- Chipperfield, A. R. und A. A. Harper (2000). "Chloride in smooth muscle." Prog Biophys Mol Biol **74**(3-5): 175-221.
- Cho, H. M., H. A. Lee, H. Y. Kim, H. S. Han und I. K. Kim (2011). "Expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> -2Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension." Am J Hypertens **24**(12): 1286-1293.
- Cowley, A. W., Jr. (1992). "Long-term control of arterial blood pressure." Physiol Rev **72**(1): 231-300.
- Crowley, S. D., S. B. Gurley, M. I. Oliverio, A. K. Pazmino, R. Griffiths, P. J. Flannery, R. F. Spurney, H. S. Kim, O. Smithies, T. H. Le und T. M. Coffman (2005). "Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system." J Clin Invest **115**(4): 1092-1099.
- D'Andrea, L., C. Lytle, J. B. Matthews, P. Hofman, B. Forbush, 3rd und J. L. Madara (1996). "Na:K:2Cl cotransporter (NKCC) of intestinal epithelial cells. Surface expression in response to cAMP." J Biol Chem **271**(46): 28969-28976.
- Davis, J. P., A. R. Chipperfield und A. A. Harper (1993). "Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) co-transport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension." J Mol Cell Cardiol **25**(3): 233-237.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright und T. Unger (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." Pharmacol Rev **52**(3): 415-472.
- DeFazio, R. A., S. Heger, S. R. Ojeda und S. M. Moenter (2002). "Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons." Mol Endocrinol **16**(12): 2872-2891.
- Delpire, E., J. Lu, R. England, C. Dull und T. Thorne (1999). "Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter." Nat Genet **22**(2): 192-195.
- Delpire, E., M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert und S. R. Gullans (1994). "Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells." J Biol Chem **269**(41): 25677-25683.

- Dieterle, T. (2012). "Blood pressure measurement--an overview." Swiss Med Wkly **142**: w13517.
- Edwards, R. M. und E. J. Stack (1993). "Angiotensin II inhibits glomerular adenylate cyclase via the angiotensin II receptor subtype 1 (AT1)." J Pharmacol Exp Ther **266**(2): 506-510.
- Eftekhari, S., J. Mehvari Habibabadi, M. Najafi Ziarani, S. S. Hashemi Fesharaki, M. Gharakhani, H. Mostafavi, M. T. Joghataei, N. Beladimoghadam, E. Rahimian und M. R. Hadjighassem (2013). "Bumetanide reduces seizure frequency in patients with temporal lobe epilepsy." Epilepsia **54**(1): e9-12.
- Evans, R. L., K. Park, R. J. Turner, G. E. Watson, H. V. Nguyen, M. R. Dennett, A. R. Hand, M. Flagella, G. E. Shull und J. E. Melvin (2000). "Severe impairment of salivation in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1)-deficient mice." J Biol Chem **275**(35): 26720-26726.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger und P. Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10887-10890.
- Flagella, M., L. L. Clarke, M. L. Miller, L. C. Erway, R. A. Giannella, A. Andringa, L. R. Gawenis, J. Kramer, J. J. Duffy, T. Doetschman, J. N. Lorenz, E. N. Yamoah, E. L. Cardell und G. E. Shull (1999). "Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf." J Biol Chem **274**(38): 26946-26955.
- Forstermann, U. und W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Gamba, G. (2005). "Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters." Physiol Rev **85**(2): 423-493.
- Gamba, G., A. Miyanoshita, M. Lombardi, J. Lytton, W. S. Lee, M. A. Hediger und S. C. Hebert (1994). "Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney." J Biol Chem **269**(26): 17713-17722.
- Garg, P., C. F. Martin, S. C. Elms, F. J. Gordon, S. M. Wall, C. J. Garland, R. L. Sutliff und W. C. O'Neill (2007). "Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systemic blood pressure and smooth muscle tone." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2100-2105.
- Geck, P., C. Pietrzyk, B. C. Burckhardt, B. Pfeiffer und E. Heinz (1980). "Electrically silent cotransport on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in Ehrlich cells." Biochim Biophys Acta **600**(2): 432-447.
- Groger, N., H. Vitzthum, H. Frohlich, M. Kruger, H. Ehmke, T. Braun und T. Boettger (2012). "Targeted mutation of SLC4A5 induces arterial hypertension and renal metabolic acidosis." Hum Mol Genet **21**(5): 1025-1036.
- Guyton, A. C. (1989). "Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension." Am J Hypertens **2**(7): 575-585.
- Guyton, A. C. (1991). "Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids." Science **252**(5014): 1813-1816.

- Guyton, A. C., T. G. Coleman, A. V. Cowley, Jr., K. W. Scheel, R. D. Manning, Jr. und R. A. Norman, Jr. (1972). "Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension." Am J Med **52**(5): 584-594.
- Haas, M. (1994). "The Na-K-Cl cotransporters." Am J Physiol **267**(4 Pt 1): C869-885.
- Haas, M. und B. Forbush, 3rd (2000). "The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia." Annu Rev Physiol **62**: 515-534.
- Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten und R. Taugner (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-1116.
- Haering, C., N. Kanageswaran, P. Bouvain, P. Scholz, J. Altmüller, C. Becker, G. Gisselmann, J. Waring-Bischof und H. Hatt (2015). "Ion Transporter NKCC1 - Modulator of Neurogenesis in Murine Olfactory Neurons." J Biol Chem.
- Hall, J. E., J. P. Granger, M. J. Smith, Jr. und A. J. Premen (1984). "Role of renal hemodynamics and arterial pressure in aldosterone "escape"." Hypertension **6**(2 Pt 2): I183-192.
- Hattangady, N. G., L. O. Olala, W. B. Bollag und W. E. Rainey (2012). "Acute and chronic regulation of aldosterone production." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 151-162.
- Heinze, C., A. Seniuk, M. V. Sokolov, A. K. Huebner, A. E. Klementowicz, I. A. Szijarto, J. Schleifenbaum, H. Vitzthum, M. Gollasch, H. Ehmke, B. C. Schroeder und C. A. Hubner (2014). "Disruption of vascular Ca<sup>2+</sup>-activated chloride currents lowers blood pressure." J Clin Invest **124**(2): 675-686.
- Hubner, C. A., B. C. Schroeder und H. Ehmke (2015). "Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle." Pflugers Arch **467**(3): 605-614.
- Isenring, P. und B. Forbush (2001). "Ion transport and ligand binding by the Na-K-Cl cotransporter, structure-function studies." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **130**(3): 487-497.
- Ivy, J. R. und M. A. Bailey (2014). "Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure." J Physiol **592**(Pt 18): 3955-3967.
- Iwai, N. und T. Inagami (1992). "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor." FEBS Lett **298**(2-3): 257-260.
- Jackson, W. F. (2000). "Ion channels and vascular tone." Hypertension **35**(1 Pt 2): 173-178.
- Jakab, R. L., A. M. Collaco und N. A. Ameen (2011). "Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(1): G82-98.
- Jensen, B. L., C. Schmid und A. Kurtz (1996). "Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): F659-669.
- Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich und A. A. Zdebik (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." Physiol Rev **82**(2): 503-568.

- Jiang, G., F. Akar, S. L. Cobbs, K. Lomashvilli, R. Lakkis, F. J. Gordon, R. L. Sutliff und W. C. O'Neill (2004). "Blood pressure regulates the activity and function of the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(4): H1552-1557.
- Joyner, M. J. und D. P. Casey (2015). "Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs." Physiol Rev **95**(2): 549-601.
- Kahle, K. T., A. R. Khanna, S. L. Alper, N. C. Adragna, P. K. Lauf, D. Sun und E. Delpire (2015). "K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease." Trends Mol Med **21**(8): 513-523.
- Kapas, S., A. Purbrick und J. P. Hinson (1995). "Role of tyrosine kinase and protein kinase C in the steroidogenic actions of angiotensin II, alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin in the rat adrenal cortex." Biochem J **305** ( Pt 2): 433-438.
- Karimian, E., A. S. Chagin, J. Gjerde, T. Heino, E. A. Lien, C. Ohlsson und L. Savendahl (2008). "Tamoxifen impairs both longitudinal and cortical bone growth in young male rats." J Bone Miner Res **23**(8): 1267-1277.
- Kim, S. M., C. Eisner, R. Faulhaber-Walter, D. Mizel, S. M. Wall, J. P. Briggs und J. Schnermann (2008). "Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol **295**(4): F1230-1238.
- Kirchhoff, F., C. Krebs, U. N. Abdulhag, C. Meyer-Schwesinger, R. Maas, U. Helmchen, K. F. Hilgers, G. Wolf, R. A. Stahl und U. Wenzel (2008). "Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II." Kidney Int **73**(5): 643-650.
- Kohan, D. E., N. F. Rossi, E. W. Inscho und D. M. Pollock (2011). "Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin." Physiol Rev **91**(1): 1-77.
- Kopp, U. C. (2011). Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. Neural Control of Renal Function. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences
- Copyright (c) 2011 by Morgan & Claypool Life Sciences.
- Kubota, J., H. Nishimura, M. Ueyama und K. Kawamura (1993). "Effects of renal denervation on pressure-natriuresis in spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **57**(11): 1097-1105.
- Kurtz, A. (2011). "Renin release: sites, mechanisms, and control." Annu Rev Physiol **73**: 377-399.
- Kurtz, A. (2012). "Control of renin synthesis and secretion." Am J Hypertens **25**(8): 839-847.
- Kurtz, A., R. Della Bruna, J. Pfeilschifter, R. Taugner und C. Bauer (1986). "Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4769-4773.

- Kurtz, A., K. H. Gotz, M. Hamann und C. Wagner (1998). "Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4743-4747.
- Kurtz, A. und C. Wagner (1998). "Role of nitric oxide in the control of renin secretion." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): F849-862.
- Kurtz, T. W. und R. C. Morris, Jr. (1983). "Dietary chloride as a determinant of "sodium-dependent" hypertension." Science **222**(4628): 1139-1141.
- La Rovere, M. T. und G. D. Pinna (2014). "Beneficial effects of physical activity on baroreflex control in the elderly." Ann Noninvasive Electrocardiol **19**(4): 303-310.
- Lang, R. E., T. Unger und D. Ganten (1987). "Atrial natriuretic peptide: a new factor in blood pressure control." J Hypertens **5**(3): 255-271.
- Levy, D., K. M. Anderson, D. D. Savage, W. B. Kannel, J. C. Christiansen und W. P. Castelli (1988). "Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study." Ann Intern Med **108**(1): 7-13.
- Lim, S. S., T. Vos, A. D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, M. Amann, H. R. Anderson, K. G. Andrews, M. Aryee, C. Atkinson, L. J. Bacchus, A. N. Bahalim, K. Balakrishnan, J. Balmes, S. Barker-Collo, A. Baxter, M. L. Bell, J. D. Blore, F. Blyth, C. Bonner, G. Borges, R. Bourne, M. Boussinesq, M. Brauer, P. Brooks, N. G. Bruce, B. Brunekreef, C. Bryan-Hancock, C. Bucello, R. Buchbinder, F. Bull, R. T. Burnett, T. E. Byers, B. Calabria, J. Carapetis, E. Carnahan, Z. Chafe, F. Charlson, H. Chen, J. S. Chen, A. T. Cheng, J. C. Child, A. Cohen, K. E. Colson, B. C. Cowie, S. Darby, S. Darling, A. Davis, L. Degenhardt, F. Dentener, D. C. Des Jarlais, K. Devries, M. Dherani, E. L. Ding, E. R. Dorsey, T. Driscoll, K. Edmond, S. E. Ali, R. E. Engell, P. J. Erwin, S. Fahimi, G. Falder, F. Farzadfar, A. Ferrari, M. M. Finucane, S. Flaxman, F. G. Fowkes, G. Freedman, M. K. Freeman, E. Gakidou, S. Ghosh, E. Giovannucci, G. Gmel, K. Graham, R. Grainger, B. Grant, D. Gunnell, H. R. Gutierrez, W. Hall, H. W. Hoek, A. Hogan, H. D. Hosgood, 3rd, D. Hoy, H. Hu, B. J. Hubbell, S. J. Hutchings, S. E. Ibeanusi, G. L. Jacklyn, R. Jasrasaria, J. B. Jonas, H. Kan, J. A. Kanis, N. Kassebaum, N. Kawakami, Y. H. Khang, S. Khatibzadeh, J. P. Khoo, C. Kok, F. Laden, R. Lalloo, Q. Lan, T. Lathlean, J. L. Leasher, J. Leigh, Y. Li, J. K. Lin, S. E. Lipshultz, S. London, R. Lozano, Y. Lu, J. Mak, R. Malekzadeh, L. Mallinger, W. Marcenes, L. March, R. Marks, R. Martin, P. McGale, J. McGrath, S. Mehta, G. A. Mensah, T. R. Merriman, R. Micha, C. Michaud, V. Mishra, K. Mohd Hanafiah, A. A. Mokdad, L. Morawska, D. Mozaffarian, T. Murphy, M. Naghavi, B. Neal, P. K. Nelson, J. M. Nolla, R. Norman, C. Olives, S. B. Omer, J. Orchard, R. Osborne, B. Ostro, A. Page, K. D. Pandey, C. D. Parry, E. Passmore, J. Patra, N. Pearce, P. M. Pelizzari, M. Petzold, M. R. Phillips, D. Pope, C. A. Pope, 3rd, J. Powles, M. Rao, H. Razavi, E. A. Rehfuess, J. T. Rehm, B. Ritz, F. P. Rivara, T. Roberts, C. Robinson, J. A. Rodriguez-Portales, I. Romieu, R. Room, L. C. Rosenfeld, A. Roy, L. Rushton, J. A. Salomon, U. Sampson, L. Sanchez-Riera, E. Sanman, A. Sapkota, S. Seedat, P. Shi, K. Shield, R. Shivakoti, G. M. Singh, D. A. Sleet, E. Smith, K. R. Smith, N. J. Stapelberg, K. Steenland, H. Stockl, L. J. Stovner, K. Straif, L. Straney, G. D. Thurston, J. H. Tran, R. Van Dingenen, A. van Donkelaar, J. L. Veerman, L. Vijayakumar, R. Weintraub, M. M. Weissman, R. A. White, H. Whiteford, S. T. Wiersma, J. D. Wilkinson, H. C. Williams, W. Williams, N. Wilson, A. D. Woolf, P. Yip, J. M. Zielinski, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. Ezzati, M. A. AlMazroa und Z. A. Memish (2012). "A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21

- regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2224-2260.
- Lytle, C. und B. Forbush, 3rd (1992). "The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation." *J Biol Chem* **267**(35): 25438-25443.
- Mancia, G., R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. Bohm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, J. Redon, A. Dominiczak, K. Narkiewicz, P. M. Nilsson, M. Burnier, M. Viigimaa, E. Ambrosioni, M. Caulfield, A. Coca, M. H. Olsen, R. E. Schmieder, C. Tsioufis, P. van de Borne, J. L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, P. A. Sirnes, J. L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, D. L. Clement, A. Coca, T. C. Gillebert, M. Tendera, E. A. Rosei, E. Ambrosioni, S. D. Anker, J. Bauersachs, J. B. Hitij, M. Caulfield, M. De Buyzere, S. De Geest, G. A. Derumeaux, S. Erdine, C. Farsang, C. Funck-Brentano, V. Gerc, G. Germano, S. Gielen, H. Haller, A. W. Hoes, J. Jordan, T. Kahan, M. Komajda, D. Lovic, H. Mahrholdt, M. H. Olsen, J. Ostergren, G. Parati, J. Perk, J. Polonia, B. A. Popescu, Z. Reiner, L. Ryden, Y. Sirenko, A. Stanton, H. Struijker-Boudier, C. Tsioufis, P. van de Borne, C. Vlachopoulos, M. Volpe und D. A. Wood (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)." *Eur Heart J* **34**(28): 2159-2219.
- Markadieu, N. und E. Delpire (2014). "Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters." *Pflugers Arch* **466**(1): 91-105.
- Matchkov, V. V., V. Secher Dam, D. M. Bodtkjer und C. Aalkjaer (2013). "Transport and function of chloride in vascular smooth muscles." *J Vasc Res* **50**(1): 69-87.
- Mathers, C. D. und D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS Med* **3**(11): e442.
- Matthews, J. B. (2002). "Molecular regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1) and epithelial chloride secretion." *World J Surg* **26**(7): 826-830.
- Mattson, D. L., S. Lu, K. Nakanishi, P. E. Papanek und A. W. Cowley, Jr. (1994). "Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure." *Am J Physiol* **266**(5 Pt 2): H1918-1926.
- McCurley, A., P. W. Pires, S. B. Bender, M. Aronovitz, M. J. Zhao, D. Metzger, P. Chambon, M. A. Hill, A. M. Dorrance, M. E. Mendelsohn und I. Z. Jaffe (2012). "Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors." *Nat Med* **18**(9): 1429-1433.
- Mendelsohn, M. E. (2005). "In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter." *J Clin Invest* **115**(4): 840-844.
- Metzger, D. und P. Chambon (2001). "Site- and time-specific gene targeting in the mouse." *Methods* **24**(1): 71-80.

- Meyer, J. W., M. Flagella, R. L. Sutliff, J. N. Lorenz, M. L. Nieman, C. S. Weber, R. J. Paul und G. E. Shull (2002). "Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H1846-1855.
- Mirvish, S. S., M. E. Davis, M. P. Lisowyj und N. W. Gaikwad (2008). "Effect of feeding nitrite, ascorbate, hemin, and omeprazole on excretion of fecal total apparent N-nitroso compounds in mice." Chem Res Toxicol **21**(12): 2344-2351.
- Monette, M. Y. und B. Forbush (2012). "Regulatory activation is accompanied by movement in the C terminus of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1)." J Biol Chem **287**(3): 2210-2220.
- Moon, J. Y. (2013). "Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension." Electrolyte Blood Press **11**(2): 41-45.
- Moon, L. Y., G. K. Wakley und R. T. Turner (1991). "Dose-dependent effects of tamoxifen on long bones in growing rats: influence of ovarian status." Endocrinology **129**(3): 1568-1574.
- Neuhauser, H., M. Thamm und U. Ellert (2013). "[Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **56**(5-6): 795-801.
- Ohta, A., T. Rai, N. Yui, M. Chiga, S. S. Yang, S. H. Lin, E. Sohara, S. Sasaki und S. Uchida (2009). "Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure." Hum Mol Genet **18**(20): 3978-3986.
- Orlov, S. N., F. Gossard, Z. Pausova, O. A. Akimova, J. Tremblay, C. E. Grim, J. M. Kotchen, T. A. Kotchen, D. Gaudet, A. W. Cowley und P. Hamet (2010). "Decreased NKCC1 activity in erythrocytes from African Americans with hypertension and dyslipidemia." Am J Hypertens **23**(3): 321-326.
- Orlov, S. N., S. V. Koltsova, J. Tremblay, M. B. Baskakov und P. Hamet (2012). "NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone." Ann Med **44 Suppl 1**: S111-118.
- Orlov, S. N., J. Tremblay und P. Hamet (2010). "NKCC1 and hypertension: a novel therapeutic target involved in the regulation of vascular tone and renal function." Curr Opin Nephrol Hypertens **19**(2): 163-168.
- Owen, N. E. (1984). "Regulation of Na/K/Cl cotransport in vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **125**(2): 500-508.
- Owen, N. E. und K. M. Ridge (1989). "Mechanism of angiotensin II stimulation of Na-K-Cl cotransport of vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **257**(4 Pt 1): C629-636.
- Pao, A. C. (2014). "Update on the Guytonian view of hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **23**(4): 391-398.
- Paul, M., A. Poyan Mehr und R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." Physiol Rev **86**(3): 747-803.

- Perry, M. J., S. Gujra, T. Whitworth und J. H. Tobias (2005). "Tamoxifen stimulates cancellous bone formation in long bones of female mice." Endocrinology **146**(3): 1060-1065.
- Persson, P., H. Ehmke, H. Kirchheim und H. Seller (1987). "The influence of cardiopulmonary receptors on long-term blood pressure control and plasma renin activity in conscious dogs." Acta Physiol Scand **130**(4): 553-561.
- Peti-Peterdi, J. und R. C. Harris (2010). "Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release." J Am Soc Nephrol **21**(7): 1093-1096.
- Pickkers, P., F. G. Russel, T. Thien, A. D. Hughes und P. Smits (2003). "Only weak vasorelaxant properties of loop diuretics in isolated resistance arteries from man, rat and guinea pig." Eur J Pharmacol **466**(3): 281-287.
- Plotkin, M. D., M. R. Kaplan, L. N. Peterson, S. R. Gullans, S. C. Hebert und E. Delpire (1997). "Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter BSC2 in the nervous system." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): C173-183.
- Porter, J. P., S. I. Said und W. F. Ganong (1983). "Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells." Neuroendocrinology **36**(5): 404-408.
- Prasso, J. E., G. Berberian, S. E. Cabreriza, T. A. Quinn, L. J. Curtis, D. G. Rabkin, A. D. Weinberg und H. M. Spotnitz (2005). "Validation of mean arterial pressure as an indicator of acute changes in cardiac output." Asaio j **51**(1): 22-25.
- Rafiqi, F. H., A. M. Zuber, M. Glover, C. Richardson, S. Fleming, S. Jovanovic, A. Jovanovic, K. M. O'Shaughnessy und D. R. Alessi (2010). "Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure." EMBO Mol Med **2**(2): 63-75.
- Rettig, R. und O. Grisk (2005). "The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies." Hypertension **46**(3): 463-468.
- Richardson, C. und D. R. Alessi (2008). "The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway." J Cell Sci **121**(Pt 20): 3293-3304.
- Rosendorff, C., H. R. Black, C. P. Cannon, B. J. Gersh, J. Gore, J. L. Izzo, Jr., N. M. Kaplan, C. M. O'Connor, P. T. O'Gara und S. Oparil (2007). "Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research and the Councils on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention." Circulation **115**(21): 2761-2788.
- Rowell, L. B., G. L. Brengelmann, J. R. Blackmon, R. A. Bruce und J. A. Murray (1968). "Disparities between aortic and peripheral pulse pressures induced by upright exercise and vasomotor changes in man." Circulation **37**(6): 954-964.
- Ruskoaho, H., H. Leskinen, J. Magga, P. Taskinen, P. Mantymaa, O. Vuolteenaho und J. Leppaluoto (1997). "Mechanisms of mechanical load-induced atrial natriuretic peptide secretion: role of endothelin, nitric oxide, and angiotensin II." J Mol Med (Berl) **75**(11-12): 876-885.

- Russell, J. M. (2000). "Sodium-potassium-chloride cotransport." Physiol Rev **80**(1): 211-276.
- Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos und S. P. Andrade (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." Regul Pept **91**(1-3): 45-62.
- Santos, R. A., A. J. Ferreira, S. V. Pinheiro, W. O. Sampaio, R. Touyz und M. J. Campagnole-Santos (2005). "Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs." Expert Opin Investig Drugs **14**(8): 1019-1031.
- Sauer, B. und N. Henderson (1989). "Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome." Nucleic Acids Res **17**(1): 147-161.
- Schock-Kusch, D., Q. Xie, Y. Shulhevich, J. Hesser, D. Stsepankou, M. Sadick, S. Koenig, F. Hoecklin, J. Pill und N. Gretz (2011). "Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves." Kidney Int **79**(11): 1254-1258.
- Schreiber, A., Y. Shulhevich, S. Geraci, J. Hesser, D. Stsepankou, S. Neudecker, S. Koenig, R. Heinrich, F. Hoecklin, J. Pill, J. Friedemann, F. Schweda, N. Gretz und D. Schock-Kusch (2012). "Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice." Am J Physiol Renal Physiol **303**(5): F783-788.
- Selye, H., C. E. Hall und E. M. Rowley (1943). "Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride." Can Med Assoc J **49**(2): 88-92.
- Shumaker, H. und M. Soleimani (1999). "CFTR upregulates the expression of the basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in cultured pancreatic duct cells." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): C1100-1110.
- Somlyo, A. P. und A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-236.
- Somlyo, A. P., X. Wu, L. A. Walker und A. V. Somlyo (1999). "Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **134**: 201-234.
- Susa, K., S. Kita, T. Iwamoto, S. S. Yang, S. H. Lin, A. Ohta, E. Sohara, T. Rai, S. Sasaki, D. R. Alessi und S. Uchida (2012). "Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels." Clin Exp Nephrol **16**(4): 530-538.
- Takahashi, N., D. R. Chernavsky, R. A. Gomez, P. Igarashi, H. J. Gitelman und O. Smithies (2000). "Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5434-5439.
- Thrasher, T. N. (2004). "Baroreceptors and the long-term control of blood pressure." Exp Physiol **89**(4): 331-335.
- Thrasher, T. N. (2006). "Arterial baroreceptor input contributes to long-term control of blood pressure." Curr Hypertens Rep **8**(3): 249-254.

- Unger, T. (1999). "The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme." J Hypertens **17**(12 Pt 2): 1775-1786.
- Urata, H., H. Nishimura und D. Ganten (1996). "Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans." Am J Hypertens **9**(3): 277-284.
- Vitzthum, H., A. Seniuk, L. H. Schulte, M. L. Muller, H. Hetz und H. Ehmke (2014). "Functional coupling of renal K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> handling causes high blood pressure in Na<sup>+</sup> replete mice." J Physiol **592**(Pt 5): 1139-1157.
- Wall, S. M., M. A. Knepper, K. A. Hassell, M. P. Fischer, A. Shodeinde, W. Shin, T. D. Pham, J. W. Meyer, J. N. Lorenz, W. H. Beierwaltes, J. R. Dietz, G. E. Shull und Y. H. Kim (2006). "Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys." Am J Physiol Renal Physiol **290**(2): F409-416.
- Wang, X., J. Breaks, K. Loutzenhiser und R. Loutzenhiser (2007). "Effects of inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter on myogenic and angiotensin II responses of the rat afferent arteriole." Am J Physiol Renal Physiol **292**(3): F999-f1006.
- Wehrwein, E. A. und M. J. Joyner (2013). "Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system." Handb Clin Neurol **117**: 89-102.
- Welsch, U. und T. Deller (2010). Lehrbuch Histologie. München, Elsevier GmbH.
- Wen, W., R. Luo, X. Tang, L. Tang, H. X. Huang, X. Wen, S. Hu und B. Peng (2015). "Age-related progression of arterial stiffness and its elevated positive association with blood pressure in healthy people." Atherosclerosis **238**(1): 147-152.
- WHO (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010, World Health Organization.
- Wiley, J. S. und R. A. Cooper (1974). "A furosemide-sensitive cotransport of sodium plus potassium in the human red cell." J Clin Invest **53**(3): 745-755.
- Xu, J. C., C. Lytle, T. T. Zhu, J. A. Payne, E. Benz, Jr. und B. Forbush, 3rd (1994). "Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2201-2205.
- Yang, S. S., Y. F. Lo, C. C. Wu, S. W. Lin, C. J. Yeh, P. Chu, H. K. Sytwu, S. Uchida, S. Sasaki und S. H. Lin (2010). "SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction." J Am Soc Nephrol **21**(11): 1868-1877.
- Yim, H. E. und K. H. Yoo (2008). "Renin-Angiotensin system - considerations for hypertension and kidney." Electrolyte Blood Press **6**(1): 42-50.
- Zeniya, M., E. Sohara, S. Kita, T. Iwamoto, K. Susa, T. Mori, K. Oi, M. Chiga, D. Takahashi, S. S. Yang, S. H. Lin, T. Rai, S. Sasaki und S. Uchida (2013). "Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II." Hypertension **62**(5): 872-878.

## **X Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, für die Überlassung des Themas, seinen vielen klugen Ratschlägen, insbesondere nach Vorträgen, sowie die konstruktive Ausarbeitung weiterführender Experimente.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Dr. med. Anika Seniuk, für die harmonische und unkomplizierte Zusammenarbeit und den ständigen Gedankenaustausch auf freundschaftlicher Ebene.

Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Helga Vitzthum für die Einführung in neue Methoden, viele Denkanstöße sowie der stetigen Pflege einer sehr guten Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen.

Meinen Mitdoktoranden Andra Stubbe, Maik von der Forst, Christian Marx, Torben Neuss, Dr. med. Charlotte Wallach und Dr. med. vet. Marisa Jelinek danke ich ebenfalls für den harmonischen Laboralltag und die gegenseitige Unterstützung.

Dipl.-Ing. Peter Bassalay danke ich für die technische Hilfe und die Einführung in Gerätschaften.

Telse Kock, Margrit Hölzel, Annett Hasse und Anke Grosse danke ich ebenfalls für die Unterstützung.

Für die Durchführung der Echokardiographie danke ich außerdem Thomas Schulze ganz herzlich.

Des Weiteren bin ich sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte über das Graduiertenkolleg „Individualized Cardiovascular Research“ ein Promotionsstipendium des „Deutschen Zentrums für Herz-Kreislaufforschung“ zu erhalten und danke daher Frau Prof. Dr. rer. nat. Tanja Zeller, Frau Prof. Dr. Lucie Carrier und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel für die Schaffung dieser Möglichkeit.

Dr. med. Christian Moll danke ich in diesem Rahmen für die Mitbeurteilung der Arbeit als externer Supervisor im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank aber meiner Familie und den mir nahe stehenden Personen für das Interesse und Verständnis beziehungsweise den kompetenten Beiträgen oder Ratschlägen, sofern es denn möglich war.

## **XI Curriculum vitae**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **XII 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: .....