

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Rolle von vaskulären Kalium- und TRPC1-Kanälen bei Hypertonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Herrn Gábor Fésüs

geboren in Esztergom, Ungarn

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Patzak  
2. Prof. Dr. Rudolf Schubert  
3. Prof. Dr. Alexander Dietrich

Datum der Promotion: 01.02.2013

<b>Gliederung</b>	<b>Seite</b>
Titelseite	1
Datum der Promotion	2
Gliederung	3
Einleitung	4
Ziele	5
Projekt 1	5
Methoden, Ergebnisse und Diskussion	6
Projekt 2	11
Ergebnisse und Diskussion	11
Projekt 3	12
Ergebnisse und Diskussion	12
Literaturverzeichnis	13
Danksagung	16
Erklärung	16
Anteilerklärung	17

## Einleitung

„Mendelsche“ Formen humaner Hypertonie haben in den letzten Jahren zur Aufklärung von neuartigen Mechanismen geführt, die alle durch veränderte Salz- und Wasserresorption der Niere zustande kommen.<sup>1</sup> Die autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E bildet eine Ausnahme.<sup>2</sup> Unsere Arbeitsgruppe identifizierte den Genlocus auf Chromosom 12p.<sup>3</sup> Die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Antworten waren in den betroffenen Personen mit autosomal-dominanter Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E normal; diese Befunde schließen eine Salz-empfindliche Hypertonie aus.<sup>4</sup> Der Bluthochdruck wurde gleichermaßen erfolgreich mit 5 verschiedenen Medikamentenklassen behandelt.<sup>5</sup> Es fanden sich Hinweise für einen zentralen Mechanismus. So zeigten betroffene Personen eine neurovaskuläre Verbindung mit einem Looping der posteroinferioren zerebellaren Arterie, die den Gehirnstamm am Gebiet der ventrolateralen Medulla beeinflussen könnte.<sup>6</sup> Autonome Tests zeigten, dass Betroffene eine reduzierte sympathische Muskelnerventätigkeit und niedrig-normale Katecholaminwerte haben. Ihre Kapazität, Zunahmen im Blutdruck zu puffern, war jedoch deutlich verschlechtert.<sup>7</sup> Unsere Arbeitsgruppe untersuchte ein japanisches Kind mit Typ-E Brachydaktylie und 12p Deletion sowie weitere betroffene Familien, um das Linkage-Intervall einzuengen. Da der Transkriptionsfaktor L-SOX5 die Genexpression von Kollagen II A1 in Pfoten von Mäusen reguliert, sequenzierte unsere Arbeitsgruppe die kompletten 500.000 Basenpaare des Gens und verwendete Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) für das Gen-Mapping.<sup>8</sup> Es wurde dabei dadurch herausgefunden, dass das Kandidatengen gerade außerhalb des Intervalls liegt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E eine intrachromosomale Neuordnung im 12p Linkage-Intervall existiert. Die Natur der Neuordnung weist darauf hin, dass die Gene, die den ATP-abhängigen Kalium-Kanal Kir6.1 ( $K_{ATP}$ ) kodieren, sowie seine Regulatoren, d.h. Sulfonylurea-Rezeptor SUR2 und Phosphodiesterase PDE3A, die möglichen Hypertoniemandidaten-Gene sind. Interessanterweise kann der Funktionsverlust im Kir6.1-Kanal im Tierversuch zur Vasokonstriktion führen.<sup>9</sup> Funktionsgewinn von PDE3A erhöht dagegen die PDE3A-Expression und erhöht dadurch die Hydrolyse von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Über diesen Mechanismus kann es zur Vasokonstriktion kommen, insbesondere aufgrund einer reduzierten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und Phosphorylierung der Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK).<sup>10</sup> Tierexperimentelle Versuche lassen auch vermuten, dass die verminderte Freisetzung von vasodilatatorischen Adipokinen, wie Adipocyte-derived relaxing factor (ADRF), eine pathophysiologische Rolle bei arterieller Hypertonie spielen könnte.<sup>11</sup> Möglicherweise wirkt Adiponectin

vasodilatatorisch durch Öffnung von Kir6.1-Kanälen. Andere Kandidaten sind Transient receptor potential (TRP)-Kanäle<sup>12</sup>, die ebenfalls potentielle Regulatoren von Kaliumkanälen sind. Hier kommt TRPC1-Kanälen eine besondere Rolle zu, da sie stark in Gefäßmuskelzellen exprimiert werden und als Store-operated channels beschrieben wurden.<sup>13</sup>

## **Ziele und Hypothesen**

Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, ob:

- 1) vaskuläre Kir6.1- Kaliumkanäle eine Rolle bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Typ E-Brachydaktylie beim Menschen spielen (Projekt 1),
- 2) arterielle Gefäße durch Adiponectin aus perivaskulärem Fettgewebe und über Öffnung von Kir6.1 relaxiert werden (Projekt 2) und
- 3) TRPC1-Kanäle im Endothel die Gefäßkontraktilität und den systemischen Blutdruck regulieren (Projekt 3).

## **Projekt 1: Rolle von vaskulären Kir6.1-Kaliumkanälen bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Typ E-Brachydaktylie**

Es wurde eine türkische Familie mit autosomal-dominanter Hypertonie und Typ E-Brachydaktylie untersucht. Die betroffenen Patienten sterben an Schlaganfall vor dem fünfzigsten Lebensjahr. Mit Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Interphase FISH) wurde eine Deletion, Reinsertion und Inversion des kurzen Armes vom Chromosom 12 in den betroffenen Personen gefunden. Dieser Befund spricht dafür, dass Hypertonie durch eine oder mehrere der folgenden drei Gene verursacht sein könnte: ATP-abhängiger Kaliumkanal Kir6.1 bzw. seine Regulatoren, das heißt der Sulfonylurea-Rezeptor 2 (SUR2) und die Phosphodiesterase 3A (PDE3A). Sechs betroffene und vier nichtbetroffene Patienten wurden untersucht. Gesäßbiopsien wurden durchgeführt, kleine Arterienringe wurden in einem Myograph (DMT Wire Myograph System) getestet und mRNA wurde extrahiert. Es wurden Unterarm-Blutfluss Studien durchgeführt, wo die Arteria brachialis mit Diazoxid, Isoproterenol und Milrinon infundiert wurde. Systemische pharmakologische Tests wurden mit intravenösem Diazoxid, Nitroprussid und Isoproterenol getan. Hohe Konzentrationen von PDE3A-mRNA wurden in den Gefäßproben von drei Betroffenen gemessen, allerdings zeigten drei andere Betroffene normale Werte. Die Gefäßringe aus Gesäßbiopsaten reagierten ähnlich auf Forskolin in der An- und Abwesenheit von Glibenclamid bzw. Cromakalim. Allerdings waren die Vasodilatationen nach Gabe von Milrinon verlängert. Die Unterarm-

Infusions-Studien zeigten keine Unterschiede in den Gefäßantworten auf Diazoxid, Isoproterenol oder Milrinon. Systemisch zeigten die Betroffenen eine stärkere Reaktion des Blutdrucks auf Diazoxid und Nitroprussid und eine größere Herzfrequenz als Reaktion auf Isoproterenol. Unsere Ergebnisse werfen Zweifel auf die Rolle von Kir6.1 und SUR2 bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Typ E-Brachydaktylie auf. Die Unterschiede in der Expression von PDE3A und die Reaktionen auf Milrinon sind wahrscheinlich eher Folgen von Bluthochdruck und nicht Ursachen dafür. Obwohl die drei untersuchten Gene aufgrund der hier erhobenen Ergebnisse eher keine Kandidatengene bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Typ-E Brachydaktylie sind, haben die Untersuchungen dieser Gene die Perspektiven des Projektes weiter geschärft.

## **Methoden**

Probanden: 6 betroffene und 4 nichtbetroffene Probanden, die alle der türkischen Familie angehörten, die wir bereits früher beschrieben haben <sup>14</sup>, wurden in unserem Klinischen Forschungszentrum mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission untersucht. Sie erhielten eine Standard-Krankenhausdiät, die 150 mmol Natrium- und 80 mmol Kaliumionen enthielt. Sie nahmen vom Rauchen Abstand und tranken keinen Alkohol.

Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Interphase FISH): Wir präparierten Zelllinien (LCL) und wählten fünf genomische Klone aus Bakterienchromosomen aus (BAC; CITB Bibliothek, Forschungsgenetik) oder verwendeten P1-abgeleitete künstliche Chromosomen (PAC; Genome Systems, Inc), die die Linkage Region abdeckten. Fluoreszenzproben wurden hergestellt, um sie in der in situ Hybridisierung (Interphase FISH) einzusetzen. Es wurden mindestens 20 Chromosomen für jede Person analysiert. <sup>15</sup>

RNS-Extraktion und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR): Gefäß-Biopsien wurden bei den Probanden unter lokaler Anästhesie durchgeführt. <sup>16</sup> Kleine arterielle Gefäße wurden für die physiologischen Studien präpariert. In einigen Proben wurden aus den Arterien mRNA extrahiert. Quantitative RNA-Extraktion und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wurden mit TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt.

Arteria brachialis-Infusionen: Betroffene Familienmitglieder wurden im Vergleich zu Kontrollpatienten untersucht. Die relaxierende Wirkung von Isoproterenol wurde wegen der vermuteten vergrößerten PDE3A-Aktivität analysiert. Die Arterie des nichtdominierenden Armes wurde kanüliert. Intraarterieller Blutdruck und Herzfrequenz (EKG) wurden registriert. Unterarm-Blutfluss wurde durch Plethysmographie (Filtrass 2001, Domed, München, Deutschland) in beiden Armen gemessen.<sup>17</sup> Die Handzirkulation wurde durch eine Handgelenk-Manschette abgeklemmt, die mit 20 mmHg über dem systolischen Blutdruck aufgeblasen war. Nach einer Ruheperiode erfolgten Isoproterenol-Gaben (Isuprel, Abbott, Deutschland); das Pharmakon wurde 4 Minuten lang über den arteriellen Katheter infundiert (0.5, 1.5, 3.0, 6.0, und 12 ng/min/100 ml). Nach einer 45-minütigen Auswaschperiode wurde der Phosphodiesterase-Hemmer Milrinon (Corotrop, Sanofi-Synthelabo, Deutschland) (0.1, 0.3, 1.0, 2.5, und 5 µg/min/100 ml) infundiert. Um die Interaktion zwischen den beiden Wirkstoffen zu bewerten, wurde der Test mit Isoproterenol während der Applikation von Milrinone (5 µg/ min/100 ml Konzentration) wiederholt. Nach dem Auswaschen wurde zusätzliche intraarteriell Diazoxid (Hypertonalum, Essex Pharma, Deutschland) (0.125, 0.25, 0.5, und 1 mg/min/100 ml) appliziert und über einen Zeitraum von 5 Minuten getestet.

Systemische pharmakologische Testung: Es wurden Nitroprusside, Isoproterenol und Diazoxid in betroffenen und nichtbetroffenen Patienten verglichen. Blutdruck wurde durch automatisierte Armmanschette und Finger-Photoplethysmographie (Finapres) registriert; das EKG diente der Analyse des Herzrhythmus. Nach einer Ruheperiode von 45 Minuten wurde Nitroprussid (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, und 1.6 µg/kg/min) über jeweils 5 Minuten infundiert. Nach der folgenden 30-minütigen Periode wurden zusätzlich Isoproterenol und Diazoxid (wie in Bähring et al. beschrieben<sup>18</sup>) appliziert.

Isolierte Gefäße: Kleine Arterien (150 bis 300 µm Durchmesser) wurden von Gesäß-Bioptaten präpariert und in kalter physiologischen Salzlösung (PSS) (5% CO<sub>2</sub> in 95% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die PSS-Lösung enthielt (jeweils in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 1,6 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 EDTA, und 5,5 Glukose. 2 mm-lange Gefäßsegmente wurden mittels zweier rostfreier Drähte in die Messkammer eingespannt. Die Proben wurden dann auf Gefäßkontraktilität in einem Myographen (4 x 5 ml Mikrogefäßbäder) (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark) nach der Methode von Mulvany und Halpern getestet. Die Viabilität und Kontraktilität der Arterien wurde nach einer Vorspannung von 60 Minuten mit einer isomolaren Lösung geprüft, die 60 mmol/l KCl enthielt (KPSS). KPSS war mit PSS

identisch, außer dass NaCl mit äquimolarem KCl ausgetauscht wurde. Nach dem Auswaschen von KPSS mit PSS wurden die Gefäßsegmente den folgenden Protokollen unterworfen: Eine kumulative Dosis-Wirkungskurve für Norepinephrin ( $3 \times 10^{-8}$  zu  $3 \times 10^{-6}$  M) wurde für jedes Präparat erzeugt. Nachdem sich die Kontraktionsspannung stabilisiert hatte, wurden die Gefäße mit Forskolin ( $10^{-8}$  -  $3 \times 10^{-5}$ ) behandelt, um die intrazelluläre cAMP durch die Aktivierung von Adenylzyklase in der An- und Abwesenheit des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanalhemmer (SUR2) Glibenclamid ( $3 \times 10^{-6}$  M) bzw. des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanalöffner Cromakalim ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M) zu vergrößern. Im zweiten Satz der Experimente wurden die Gefäßringe mit KPSS vorkontrahiert. Nachdem sich die Spannung stabilisiert hatte, wurden die Gefäße mit dem PDE3-Hemmer Milrinon ( $3 \times 10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M) behandelt. In allen Experimenten wurde gleichzeitig je ein Gefäßsegment separat von jedem Probanden als Kontrollgefäß getestet. Für experimentelle Details siehe Bähring et al.<sup>18</sup>

Die gleiche Messapparatur (Myograph mit 4 x 5 ml Mikrogefäßbädern, Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark; Methode von Mulvany und Halpern) wurde eingesetzt, um myographische Experimente an Gefäßringen von Ratten und Wildtyp- und gentechnisch veränderten Mäusen durchzuführen.

Weitere experimentelle Details für die Projekte 2 und 3 sind in Fésüs et al.<sup>19</sup> und Schmidt et al.<sup>20</sup> beschrieben.

## **Ergebnisse**

Interphase FISH: Wir lokalisierten den Locus für autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie auf einem 3.15 Mb Segment, das zwischen den Markern D12S1650 und SNP rs1899920 liegt. Der letzte Marker liegt neben der 3'-untranslatierten Region von L-SOX5. Wir wählten 5 BAC/PAC innerhalb des Segmentes aus: 184C8, 96K9, 134P11, 284C17 und 345P1. Eine Deletion, Reinsertion und Inversion wurden gefunden. Das PDE3A-Gen liegt proximal vom Klon 184C8, der entfernt, aber zwischen 134P11 und 345P1 wieder eingesetzt wird. Der ATP-abhängige Kaliumkanal (Kir6.1) und sein SUR2 sind in der Nähe vom nichtbeteiligten BAC/PAC. L-SOX5 befindet sich jetzt neben dem Klon 284C17 statt 345P1 in den betroffenen Personen.

mRNS-Expression von Kir6.1, SUR2, PDE3A, und SOX5 in arteriellen Blutgefäßen: TaqMan-Studien zeigten keinen Unterschied in den Kandidat-Genen Kir6.1, SUR2 und

LSOX5 zwischen betroffenen und nichtbetroffenen Familienmitgliedern. Die TaqMan-Experimente zeigten im Durchschnitt eine 147-fach höhere PDE3A-Expression in drei älteren ( $43\pm 4$  Jahre) betroffenen, schwer hypertensiven Patienten, im Vergleich zu drei jüngeren ( $23\pm 2$  Jahre) weniger hypertensiven, betroffenen Personen. Die Expression von PDE3A in diesen drei älteren Patienten war 176-fach höher als in vier nichtbetroffenen ( $39\pm 4$  Jahre) normotensiven Familienmitgliedern.

Isolierte Gefäße: Die kontraktile Antwort auf Gabe von KCl war in den Gefäßen von Betroffenen und Nichtbetroffenen nicht unterschiedlich. Die Kraft, die durch die Zugabe von Norepinephrin erzeugt wurde, war ebenfalls nicht unterschiedlich. In vorkontrahierten Gefäßen waren die Antworten auf Cromakalim, Forskolin oder Forskolin in Ab- und Anwesenheit von Glibenclamid nicht unterschiedlich. Diese Versuche wurden erfolgreich an Gefäßringen von zwei betroffenen Personen durchgeführt. Beide Personen zeigten aber eine erhöhte Vasorelaxation auf Milrinon im Vergleich zu vier nichtbetroffenen Personen. Eine dieser betroffenen Personen hatte eine hohe PDE3A Expression, der andere Patient jedoch nicht.

Pharmakologische Testung: Die Unterarm-Blutfluss-Experimente zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Antwort auf intra-arterielles Diazoxid war in betroffenen Personen nicht vergrößert. Wir fanden auch keine Unterschiede in den Antworten auf intra-arterielle Gabe von Isoproterenol und Milrinon zwischen nichtbetroffenen und betroffenen Familienmitgliedern. Systemische Medikamenten-Infusionen zeigten größere Antworten in Betroffenen; Patienten zeigten hoch-empfindliche Depressor-Antworten auf systemisches Diazoxid. Eine kumulative Dosis von 137.5 mg Diazoxide senkte den systolischen Blutdruck um  $1.8\pm 4$  mmHg in nichtbetroffenen und um  $18\pm 5$  mmHg in betroffenen Familienmitgliedern ( $P=0.03$ ). Betroffene Familienmitglieder waren auch auf Nitroprusside empfindlicher. Die systemische Isoproterenol-Infusion ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) erhöhte die Herzfrequenz um  $16\pm 2.9$  Schläge/min in nichtbetroffen und um  $24\pm 3.3$  Schläge/min in betroffenen Familienmitgliedern ( $P < 0.05$ ). Die Blutdruck-Antworten waren in beiden Gruppen ähnlich.

## **Diskussion**

Unsere wichtigste Entdeckung besteht darin, dass die autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie in dieser türkischen Familie eine Neuordnung von Genabschnitten auf dem kurzen Arm vom Chromosom 12 zeigt. Diese Neuordnung ist komplex, da eine Deletion,

Reinsertion und Inversion jeweils vorkommen. Die Region neben dem BAC, die an der Neuordnung beteiligt ist, ist relativ arm an Genen. Es gibt Expressed sequence tags (EST) in der Umgebung, aber diese wurden nicht weiter charakterisiert. Unsere drei Kandidaten-Gene, die in unserer Arbeitsgruppe früher sequenziert haben, gaben keine überzeugenden Ergebnisse in den Genexpression-Studien oder in den physiologischen Studien. Unsere Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass mehr als ein Gen für den komplizierten Phänotyp verantwortlich ist. Die Wichtigkeit von unseren Ergebnissen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass dieses „mendelsche“ Hypertonie-Syndrom für das Verstehen primärer Hypertonie wichtig sein kann. Gong et al. fanden eine Verbindung mit Chromosom 12p in chinesischen Familien mit isolierter primärer Hypertonie.<sup>20</sup> Ihr Linkage interval überlappt mit unserem Linkage interval. Wir denken, dass unsere Kandidaten-Gene angemessene Zielstrukturen waren, die es zu testen galt. Kaliumkanäle haben eine Hauptfunktion in der Regulierung des glatten Muskeltonus. SUR2 war ein besonders attraktiver Kandidat, weil dieser Kanalregulator des ATP-abhängigen (Kir6.x) Kaliumkanals umfassend in Gen-defizienten Mäusen untersucht wurde. SUR2 -/- Mäuse zeigen Hypertonie und episodischen Spasmus der Koronararterien.<sup>21</sup> Wir sequenzierten früher dieses Gen und fanden keine Veränderungen. Die Neuordnung von Genabschnitten auf dem kurzen Arm vom Chromosom 12 bei autosomal-dominanter Hypertonie mit Brachydaktylie eröffnete die Möglichkeit der fehlerhaften Kaliumkanal-Regulation. Wir verwendeten die Kaliumkanal-Öffner Diazoxid und Cromakalim, um die Physiologie dieses Systems in den Patienten und ihren Gefäßen zu studieren. Die Gefäße wurden mit einem SUR2 Hemmer, d.h. Glibenclamid, geprüft. Wir fanden keine Unterschiede zwischen betroffenen und nichtbetroffenen Patienten oder ihren Gefäßen. Die Genexpressionsstudien zeigten keine Unterschiede in diesen Kandidaten. Betroffene Familienmitglieder reagierten auf systemisches Diazoxid überempfindlich. Die Reaktion im Unterarm-Blutfluss auf intra-arterielles Diazoxid war in beiden Gruppen ähnlich. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Diazoxid-Überempfindlichkeit eher durch eine verschlechterte Baroreflex-Blutdruck-Pufferung, als durch Gefäßüberempfindlichkeit erklärt werden kann.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 1 findet sich in Bähring et al. „Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12”. *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):471-6.

Eine Kopie dieser Publikation findet sich **im Anhang**.

## **Projekt 2: Adiponectin aus perivaskulärem Fettgewebe relaxiert arterielle Gefäße durch Öffnung von Kir6.1 und anderen Kaliumkanälen**

Kir6.1-Kanäle in Gefäßmuskelzellen sind Zielstrukturen für eine Reihe von verschiedenen endogenen Vasodilatoren. Perivaskuläres Fettgewebe produziert einen relaxierenden Faktor (Adipocyte-derived relaxing factor, ADRF), der ATP-abhängige (Kir6.x) Kaliumkanäle und/oder spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_v$ ) in Arterien der Ratte öffnet.<sup>22, 23</sup> Viszerale Fettakkumulation verursacht eine Funktionsstörung der Fettzellen, einschließlich die Hyposekretion von Adiponectin. Wir überprüften die Hypothese, ob ADRF mit Adiponectin identisch ist und ob Adiponectin eine Rolle bei der parakrinen Kontrolle des Gefäßtonus durch das perivaskuläre Fettgewebe spielen kann. Daher wurden Sprague-Dawley (SD) Ratten, Wildtyp- und Adiponectin-Gen-defiziente Mäuse (Apn1<sup>-/-</sup>) sowie New Zealand Obese (NZO) Mäuse untersucht.

### **Ergebnisse**

Rekombinantes Adiponectin hemmte bei einer Konzentration von 2-5  $\mu\text{g/ml}$  die Serotonin-induzierten Vasokontraktionen der Aorta der Ratte. Diese Effekte wurden durch die  $K_v$ -Kanalhemmung mit 4-Aminopyridine (4-AP, 2mM) abgeschafft. ATP-abhängige (Kir6.x) Kaliumkanäle spielten keine Rolle. Ähnliche Effekte wurden in der Mesenterialarterie der NZO Maus beobachtet. Um die Gefäßfunktion in Apn1<sup>-/-</sup> Mäuse zu studieren, wurde das mesenteriale Gefäßbett isoliert, kanüliert und bei einer konstanten Perfusionsströmung von 4-5-ml/min in An- und Abwesenheit von Serotonin perfundiert. 4-AP (2 mM) induzierte eine Erhöhung des Perfusionsdrucks im isoliert perfundierten mesenterialen Gefäßbett von Apn1<sup>-/-</sup> Mäusen, die sich nicht von Wildtyp-Tieren unterschied. Die Entfernung des perivaskulären Fettgewebes verstärkte die Vasokonstriktionen, aber schaffte die 4-AP-Effekte ab. Die antikontraktilen Effekte des perivaskulären Fetts waren in Mesenterialarterien und in Aortenpräparaten von Apn1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen gleich. Trotz hoher Adiponectin-Spiegel waren die antikontraktilen Effekte des perivaskulären Fettgewebes in Mesenterialarterien von NZO Mäusen mit Zunahme des Alters abgeschwächt.

### **Diskussion**

Die Messungen zeigen, dass Adiponectin ein neuer humoraler Vasodilatator ist, der Aorta- und Mesenterialarterien-Ringe relaxiert. Die Relaxation kommt durch Öffnung von  $K_v$ -Kanälen zustande. Kir6.x-Kanälen sind nicht beteiligt. Die Ergebnisse zeigen, dass ADRF-Effekte nicht nur ein Rattenphänomen sind, sondern ADRF auch in perivaskulärem

Fettgewebe der Maus produziert wird. Sie zeigen, dass ADRF eine Fehlfunktion in NZO Mäusen zeigt und ADRF nicht identisch mit Adiponectin ist.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 2 findet sich in Fesüs et al. „Adiponectin is a novel humoral vasodilator“. *Cardiovasc Res.* 2007 Sep 1;75(4):719-27.

Eine Kopie dieser Publikation findet sich **im Anhang**.

### **Projekt 3: TRPC1-Kanäle im Endothel regulieren die Gefäßkontraktilität und den systemischen Blutdruck**

TRPC1-Kanäle werden in Blutgefäßen exprimiert und sind vermeintliche Kandidaten für die Regulation des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Stoffwechsel und von Kaliumkanälen. Wenig ist über ihre Rolle bei Endothel-abhängigen Vasodilatationen bekannt, insbesondere bei EDHF (Endothelium-derived hyperpolarizing factor)-ausgelösten Vasodilatationen, bei denen  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Kanäle ( $K_{Ca}$ ) eine Schlüsselrolle spielen. Um molekulare Information über die Rolle von TRPC1 bei der Funktion von  $K_{Ca}$ -Kanälen und dem EDHF-Signalkomplex zu gewinnen, wurden Endothel-abhängige und -unabhängige Vasodilatationen,  $K_{Ca}$ -Kanal-Ströme und glattmuskuläre Kontraktilität in TRPC1-Gen-defizienten Mäusen (TRPC1-/-) untersucht. Gefäßkontraktionen wurden in Druck- und Drahtmyographen getestet und zusätzlich mittels der Intravitalmikroskop studiert. Elektrophysiologische Messungen und konfokales  $Ca^{2+}$ -Imaging wurden angewendet, um  $K_{Ca}$ -Kanal-Funktionen zu prüfen.

#### **Ergebnisse**

Die Abwesenheit von TRPC1-Kanäle in der Arteria carotis erzeugte eine Verstärkung von TRAM-34- und UCL1684-empfindlichen EDHF-Vasodilatationen. NO-vermittelte Vasodilatationen blieben unverändert. TRPC1-Defizienz bewirkte erhöhte EDHF-Typ-Vasodilatationen in Widerstandgefäßen *in vivo*. Endotheliale ( $IK_{Ca}/SK_{Ca}$ )  $K_{Ca}$ -Ströme und  $Ca^{2+}$ -Spark-assoziierte  $K_{Ca}$ -vermittelte spontane transiente Außwärtsströme (STOCs) waren in glattmuskulären TRPC1 -/- Zellen unverändert. Receptor-abhängiger  $Ca^{2+}$ -Influx und  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum waren in TRPC1 -/- Gefäßmuskelzellen unverändert. Blutdruckmessungen mit der Schwanz-Manschette zeigten geringere systolische Blutdruckwerte in TRPC1-/- Tieren.

## Diskussion

Die Ergebnisse demonstrieren, dass TRPC1 als ein negativer Regler der endothelialen  $K_{Ca}$ -Kanal-abhängigen EDHF-Typ-Vasodilatation ist. Über diesen Mechanismus spielt TRPC1 eine wichtige Rolle bei der systemischen Blutdruckregulation. Unserer Hypothese nach ist TRPC1 ein funktioneller Bestandteil des EDHF- $K_{Ca}$ -Signalkomplexes. Die Messungen zeigen, dass die pharmakologische Hemmung von TRPC1 EDHF-Vasodilatationen erhöht und eine neue Strategie zur systemischen Blutdrucksenkung darstellt. Dieser neue Ansatz wird ohne Beteiligung von Kir6.1-Kanälen bewerkstelligt.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse von Projekt 3 findet sich in Schmidt et al. Amplification of EDHF-type vasodilatations in TRPC1-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec;161(8):1722-33.

Eine Kopie dieser Publikation findet sich **im Anhang**.

## Referenzen

1. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001; 104: 545–556.
2. Bilginturan N, Zileli S, Karacadag S, Pirnar T. Hereditary brachydactyly associated with hypertension. *J Med Genet*. 1973; 10: 253–259.
3. Schuster H, Wienker TF, Toka HR, Bähring S, Jeschke E, Toka O, Busjahn A, Hempel A, Tahlhammer C, Oelkers W, Kunze J, Bilginturan N, Haller H, Luft FC. Autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a Turkish kindred resembles essential hypertension. *Hypertension*. 1996; 28: 1085–1092.
4. Schuster H, Wienker TF, Toka HR, Bähring S, Jeschke E, Toka O, Busjahn A, Hempel A, Tahlhammer C, Oelkers W, Kunze J, Bilginturan N, Haller H, Luft FC. Autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a Turkish kindred resembles essential hypertension. *Hypertension*. 1996; 28: 1085–1092.

5. Schuster H, Toka O, Toka H, Busjahn A, Öztekin Ö, Wienker TF, Bilginturan N, Bähring S, Skrabal F, Haller H, Luft FC. A cross-over medication trial for autosomal-dominant hypertension with brachydactyly. *Kidney Int.* 1998; 53: 167–172.
6. Naraghi R, Schuster H, Toka HR, Bähring S, Toka O, Oztekin O, Bilginturan N, Knoblauch H, Wienker TF, Busjahn A, Haller H, Fahlbusch R, Luft FC. Neurovascular compression at the ventrolateral medulla in autosomal dominant hypertension and brachydactyly. *Stroke.* 1997; 28: 1749–1754.
7. Jordan J, Toka H, Heusser K, Stabroth C, Tank J, Diedrich A, Toka O, Shannon JR, Stoffels M, Krämer J, Oelkers W, Schuster H, Naraghi R, Schobel HP, Haller H, Luft FC. Severely impaired baroreflex buffering in patients with monogenic hypertension and neurovascular contact. *Circulation.* 2000; 102: 2611–2618.
8. Ikeda T, Zhang J, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, Nakamura K, Ikegawa S. Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene.* 2002; 298: 59–68.
9. Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels. *J Clin Invest.* 2002; 110:203–208.
10. Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2002;277:38072–38078.
11. Gollasch M, Dubrovskaja G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Dec;25(12):647-53.
12. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. Dietrich A, Mederos Y, Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(16):6980-9.

13. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T. *Pflugers Arch*. 2007 Dec;455(3):465-77.
14. Schuster H, Wienker TF, Bähring S, Bilginturan N, Toka HR, Neitzel H, Jeschke E, Toka O, Gilbert H, Lowe A, Ott J, Haller H, Luft FC. Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet*. 1996;4:98–100.
15. Rauch A. Epithelial Cells from Buccal Smears and Urine and Human Sperm Cells. In: Rautenstraub B, Liehr T, eds. *FISH Technology, Lab Manual*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany; 2002.
16. Goode GK, Heagerty AM. In vitro responses of human peripheral small arteries in hypercholesterolemia and effects of therapy. *Circulation*. 1995; 91: 2898–2903.
17. Haefeli WE, Linder L, Luscher TF. Quinaprilat induces arterial vasodilation mediated by nitric oxide in humans. *Hypertension*. 1997; 30: 912-917.
18. Sylvia Bähring, Anita Rauch, Okan Toka, Christoph Schroeder, Christiane Hesse, Heike Siedler, Gabor Fesus, Walter E. Haefeli, Andreas Busjahn, Atakan Aydin, Yvette Neuenfeld, Astrid Mühl, Hakan R. Toka, Maik Gollasch, Jens Jordan and Friedrich C. Luft. Autosomal-Dominant Hypertension With Type E Brachydactyly Is Caused by Rearrangement on the Short Arm of Chromosome 12. *Hypertension* 2004;43;471-476.
19. Fesus G, Dubrovskaja G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007 Sep 1;75(4):719-27.
20. Gong M, Zhang H, Schulz H, Lee YA, Sun K, Bähring S, Luft FC, Nürnberg P, Reis A, Rohde K, Ganten D, Hui R, Hubner N. Genome-wide linkage reveals a locus for human essential (primary) hypertension on chromosome 12p. *Hum Mol Genet*. 2003;12: 1273–1277.
21. Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels. *J Clin Invest*. 2002; 110:203–208.

22. Löhn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. FASEB J. 2002 Jul;16(9):1057-63.

23. Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periaortoadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. Hypertension. 2004 Sep;44(3):271-6.

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch möchte ich meinen besonderen Dank für die freundliche Überlassung des Themas meiner Promotionsarbeit, die hervorragende Betreuung, sowie die außergewöhnliche Unterstützung und Förderung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft danke ich für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich zu arbeiten und für seine Ratschläge.

Ich möchte dem Team der Arbeitsgruppe Gollasch für Hilfe, Ratschläge und eine nette Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Frau Dr. Galina Dubrovskaja und Herrn Dr. Kirill Essin.

Meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre Liebe.

### **Erklärung**

„Ich, Gábor Fésüs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Zur Rolle von vaskulären Kalium- und TRPC1-Kanälen bei Hypertonie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

9.9.2011

**Gábor Fésüs** hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Bähring et al. „Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12”. *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):471-6.

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Gefäßbiopsien, Kontraktionsmessungen, Datenanalyse, Manuskript verfassen

Publikation 2: Fesüs et al. „Adiponectin is a novel humoral vasodilator“. *Cardiovasc Res*. 2007 Sep 1;75(4):719-27.

60 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Kontraktionsmessungen, Praeparationen, Datenanalyse, Perfusionsmessungen, Methodenaufbau, Manuskript verfassen

Publikation 3: Schmidt et al. Amplification of EDHF-type vasodilatations in TRPC1-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec;161(8):1722-33.

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Kontraktionsmessungen, Datenanalyse, Manuskript verfassen, Konzeption

Gabor Fesüs

Prof. Dr. Maik Gollasch

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