

### 3. Ergebnisse

In *cell-attached* Patch-Clamp-Experimenten am intakten Endothel von SBH/y und SBN/y wurde ein PAC identifiziert, der durch Anlegen eines positiven Drucks an die Zellmembran aktiviert und durch negativen Druck inaktiviert werden konnte (Abb. 4). Die Öffnung des Kanals auf den mechanischen Stimulus hin erfolgte mit einer Latenz von nur wenigen Millisekunden.

Ohne mechanische Stimulation der Zellmembran zeigte der Kanal bei allen hier untersuchten Tiergruppen eine sehr geringe Kanaloffenwahrscheinlichkeit ( $P_o < 0,1$ ). Diese geringe Basalaktivität konnte durch das Anlegen eines negativen Pipettendrucks an die Zellmembran und die damit erzielte Membrandehnung im Bereich von  $-10$  bis  $-20$  mm Hg vollständig inhibiert werden (Abb. 5).

Nachfolgend werden zunächst die grundlegenden Eigenschaften des druckaktivierten Kationenkanals bei SBN/y beschrieben:

#### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung des PAC am intakten Endothel der SBN/y-Ratte

Am intakten Endothel wurden die Ionenströme durch den Kanal in einem Spannungsbereich von  $90$  mV bis  $-90$  mV gemessen und die Kanalleitfähigkeit bestimmt. Bei negativen Membranpotentialen unter Verwendung der  $140$  mmol/l KCl-Pipettenlösung betrug die Kanalleitfähigkeit  $25 \pm 2$  pS ( $n=14$ ).

In einem einzelnen *Patch* konnte bei mechanischer Stimulation häufig die simultane Aktivierung mehrerer PAC registriert werden. Dies ließ sich in der Stromaufzeichnung dadurch erkennen, daß sich die Stromamplituden der gleichzeitig offenen Kanäle summierten. In  $70$  % der Versuche konnten  $3$  bis  $5$  Kanäle und in  $18$  % der Versuche  $2$  Kanäle durch mechanische Reizung der Zellmembran aktiviert werden. In lediglich  $12$  % der Versuche wurde ein einzelner PAC aktiviert.

Die Kanalaktivität des PAC war stark von der Höhe des am *Patch* angelegten Pipettendrucks abhängig. Sie nahm mit ansteigendem Druck graduiert abgestuft zu (Abb. 6). Je höher der angelegte Druck, desto höher war die Kanalaktivität

(Kanaloffenwahrscheinlichkeit,  $P_o$ ). Die Kanalaktivität ging nach Aufheben des mechanischen Stimulus wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

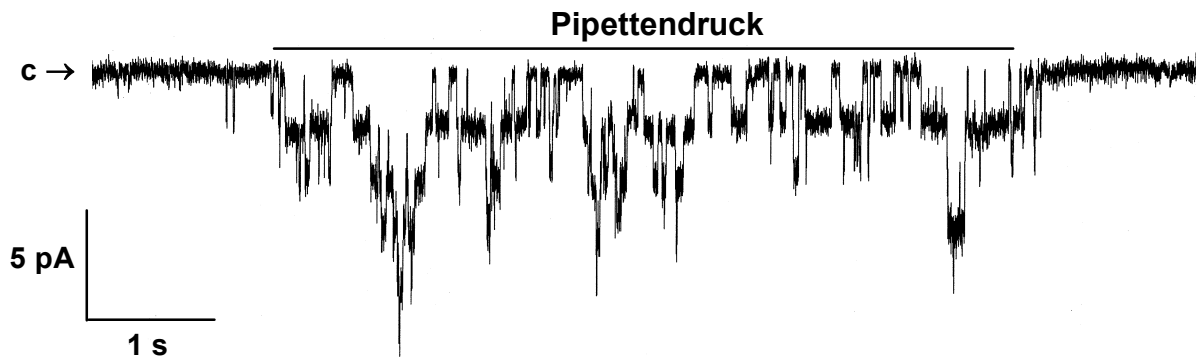


Abb. 4: Originalstromaufzeichnung des PAC in der *cell-attached* Konfiguration am intakten Endothel der Aorta bei  $-90$  mV Klemmpotential. Durch Stimulation mit einem Pipettendruck von 20 mm Hg werden hier mindestens 4 PAC aktiviert. Der Pfeil markiert den Geschlossen-Zustand. Eine Kanalöffnung ist als nach unten gerichteter Strom zu erkennen. KCl-Pipettenlösung.

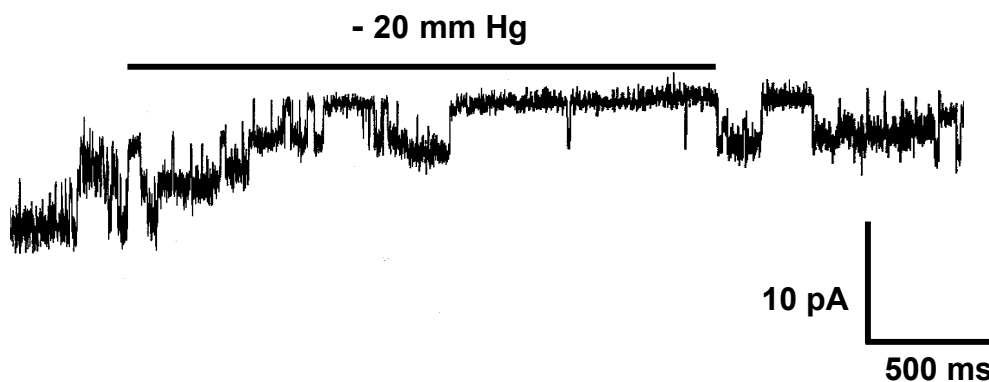


Abb. 5: Inaktivierung des PAC in der *cell-attached* Konfiguration durch Anlegen eines negativen Pipettendrucks in einem *Patch* mit hoher basaler PAC-Aktivität. Nach Aufhebung des negativen Drucks ist wieder eine Kanalaktivität zu beobachten. KCl-Pipettenlösung.

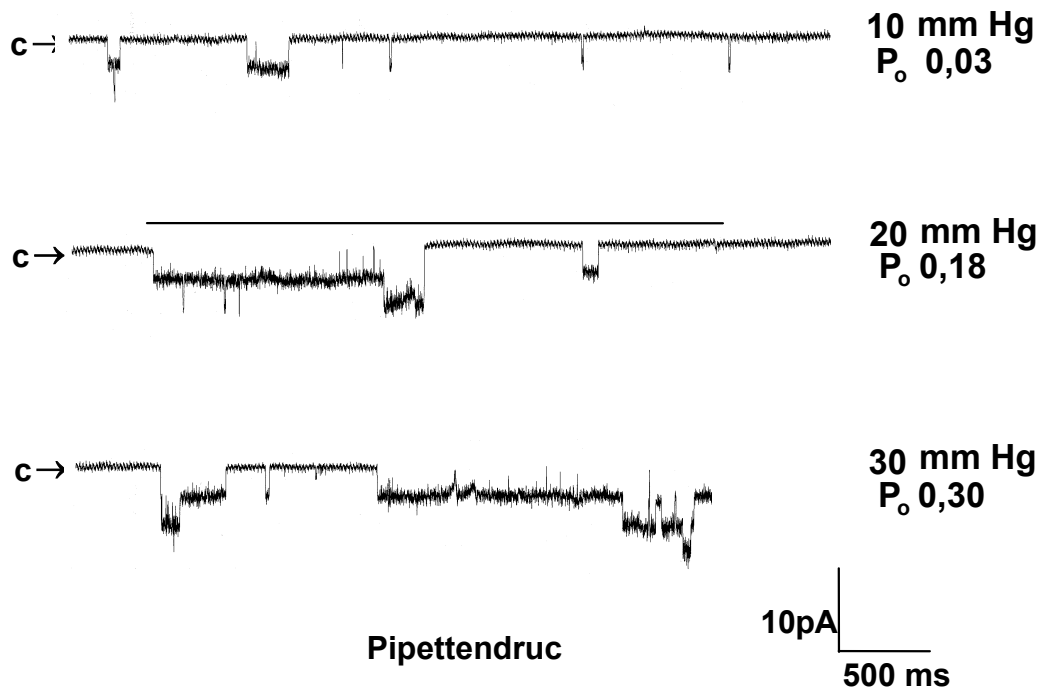


Abb. 6: Mechanosensitivität des PAC. Graduierter Anstieg der Kanaloffenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) bei zunehmendem Pipettendruck. Hier wurden max. 3 Kanäle aktiviert. „C“ markiert den Geschlossen-Zustand. *cell-attached* Konfiguration. KCl-Pipettenlösung.

### 3.2 und Koaktivierung des

### Kalziumpermeabilität des PAC NSC

In einer Serie von *cell-attached* Patch-Clamp-Experimenten wurde eine KCl-Pipettenlösung verwendet, die zusätzlich auch 1 mmol/l Kalzium enthielt. In diesen Versuchen konnte eine Koaktivierung von Kalzium-aktivierten Kationenkanälen ( $n=12$ ) registriert werden (Abb. 7). Hier folgte auf die Aktivierung des PAC durch positiven Pipettendruck die Öffnung eines Kalzium-aktivierten nicht-selektiven Kationenkanals (*non-selective cation channel*, NSC), welcher selbst nicht mechanosensitiv ist (Hoyer, 1996; Köhler, 1998). Das Aufheben der mechanischen Stimulation resultierte in einer Inaktivierung des PAC und nachfolgend des NSC. Eine solche Koaktivierung konnte ohne Kalzium in der Pipettenlösung nicht beobachtet werden ( $n=25$ ).

Um die Kalziumleitfähigkeit des PAC zu ermitteln und darzustellen, wurden *cell-attached* Experimente mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Pipettenlösung durchgeführt (original

Stromaufzeichnung: Abb. 8). Der Kanal war ebenfalls permeabel für divalente Kationen - für Kalzium betrug die Leitfähigkeit  $5 \text{ pS} \pm 1 \text{ SD}$  ( $n=4$ ) (Abb. 9).

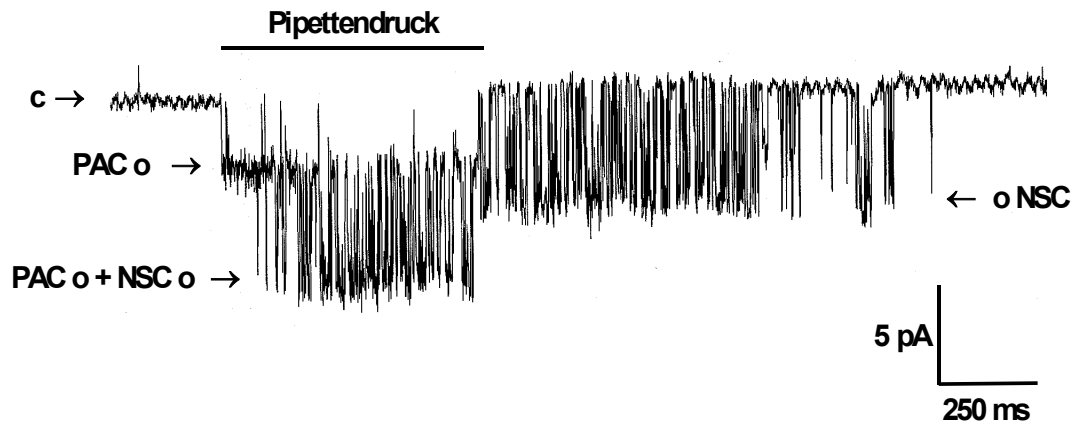


Abb. 7: Koaktivierung eines Kalzium-abhängigen Kationenkanals in *cell-attached* Experimenten mit PAC-Aktivität. Die KCl-Pipettenlösung enthielt zusätzlich 1 mmol/l Kalzium. „C“ markiert den Geschlossen-Zustand und „O“ den Offen-Zustand des jeweiligen Kanals.

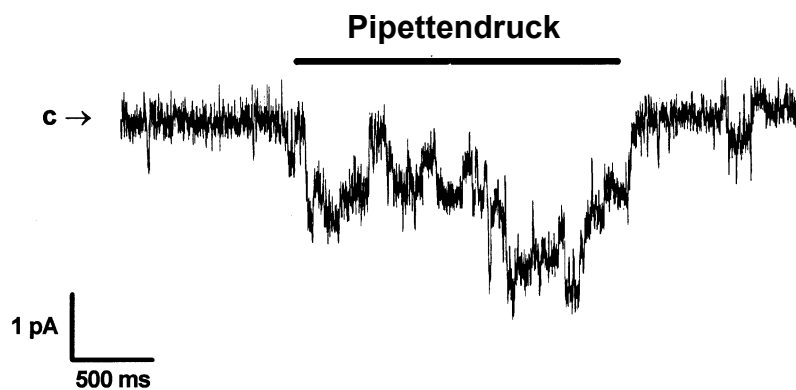


Abb. 8: Kalziumeinstrom durch den PAC in *cell-attached* Experimenten bei einem Membranpotential von  $-80 \text{ mV}$  und einer  $90 \text{ mM CaCl}_2$ -Pipettenlösung. „C“ markiert den Geschlossen-Zustand.

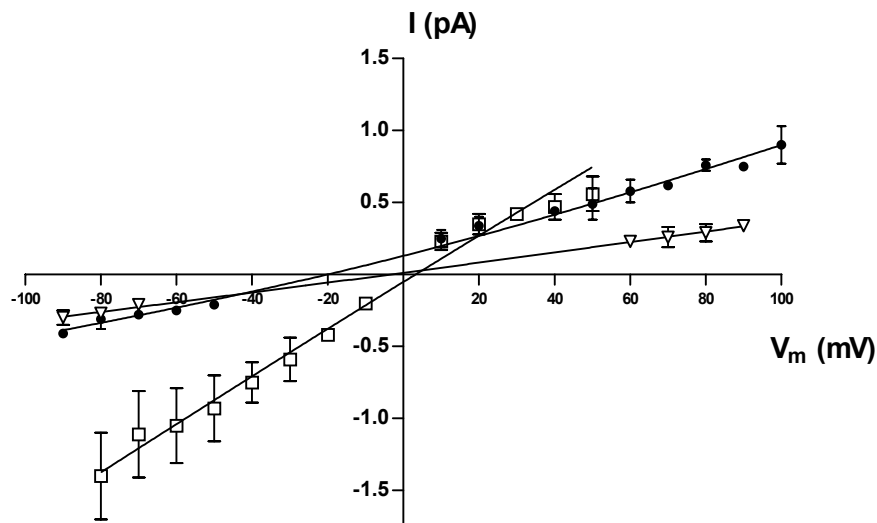


Abb. 9: Strom-Spannungs-Beziehung des PAC in *inside-out* Experimenten: offene Dreiecke: 90 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  (Pipette und Bad); gefüllte Kreise: 90 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  (Pipette), 140 mmol/l NaCl (Bad); offene Quadrate: 140 mmol/l KCl (Pipette), 140 mmol/l NaCl (Bad).

### 3.3 Der PAC bei experimenteller salz-sensitiver Hypertonie

#### 3.3.1 Stammdaten der normotensiven und hypertensiven Sabra-Ratten

Nach acht-wöchiger Salzdiät mit 1%-igem NaCl *ad libitum* und Implantation des DOCA-Pellets zeigten diese behandelten SBH/y einen signifikant erhöhten Blutdruck, verglichen mit den auf die gleiche Art behandelten SBN/y ( $p < 0,01$ ). Vor Beginn der Behandlung waren SBH/y und SBN/y normotensiv und die Blutdruckwerte waren nicht unterschiedlich zwischen den beiden Stämmen. Unbehandelte SBH/y und SBN/y entwickelten keinen Hypertonus (Abb.10).

Die Körpergewichte unbehauelter SBH/y waren signifikant höher als die unbehauelter SBN/y ( $p < 0,01$ ). Zwischen behandelten SBH/y und SBN/y zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die behandelten SBH/y wiesen ein geringeres Körpergewicht verglichen mit den unbehauelten SBH/y auf, wie es in der Regel bei hypertensiven Ratten beobachtet wird.

Das Herzgewicht behandelter SBH/y war signifikant erhöht verglichen mit behandelten SBN/y ( $p < 0,01$ ). Ebenso war das Herzgewicht unbehandelter SBH/y signifikant höher als das unbehandelter SBN/y ( $p < 0,01$ ).

Die Stammdaten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

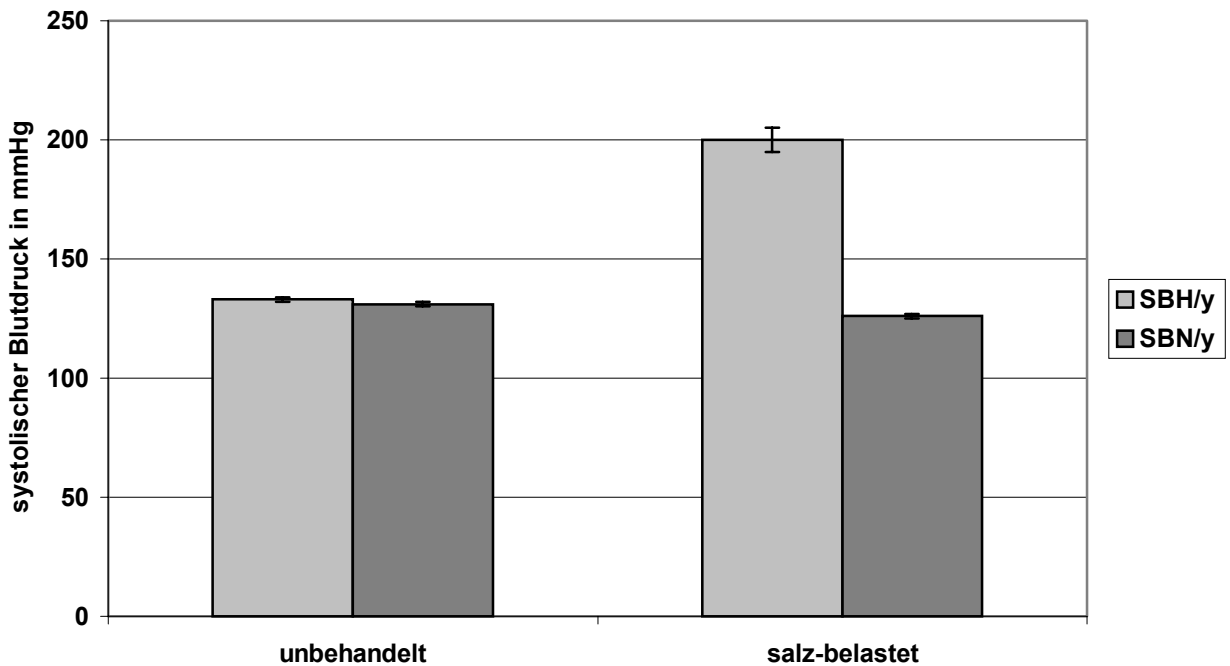


Abb. 10: Blutdruckwerte unbehandelter und behandelter SBH und SBN. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Tier	Körpergewicht (g)	Herzgewicht (g)	Blutdruck (mmHg)
Behandelte SBH/y (n=7)	337 $\pm$ 11	1,1 $\pm$ 0,04	200 $\pm$ 5
Behandelte SBN/y (n=7)	320 $\pm$ 8	0,8 $\pm$ 0,03	126 $\pm$ 1
Unbehandelte SBH/y (n=7)	359 $\pm$ 3	1,0 $\pm$ 0,02	133 $\pm$ 1
Unbehandelte SBN/y (n=7)	325 $\pm$ 5	0,8 $\pm$ 0,02	131 $\pm$ 1

Tabelle 1: Stammdaten behandelter und unbehandelter SBH/y und SBN/y. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Um das Herzgewicht verschieden großer und schwerer Tiere miteinander in Relation zu setzen, wurde das Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht ermittelt. Diese Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio war bei den behandelten SBH/y nach achtwöchiger Salzdiät im Vergleich zu den behandelten SBN/y signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Die unbehandelten SBH/y wiesen im Vergleich zu den unbehandelten SBN/y keine signifikant erhöhte Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio auf ( $p = 0,08$ ).

### 3.3.2 Vergleich der Drucksensitivität und Leitfähigkeit des PAC bei den untersuchten Tiergruppen

Die bisher dargelegten Einzelkanalcharakteristika des PAC (Mechanosensitivität, Leitfähigkeit für monovalente Kationen) waren bei allen untersuchten Gruppen von Sabra-Ratten nicht signifikant unterschiedlich und sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefaßt:

	Leitfähigkeit	Mechanosensitivität		
		10 mmHg	20 mmHg	30 mmHg
Unbehandelte SBN/y	$25,0 \pm 2,0$ pS	$0,23 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,06$ (n=6)
Unbehandelte SBH/y	$25,6 \pm 0,8$ pS	$0,19 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,08$	$0,45 \pm 0,06$ (n=3)
Behandelte SBN/y	$24,7 \pm 0,9$ pS	$0,19 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,06$ (n=9)
Behandelte SBH/y	$23,4 \pm 4,1$ pS	$0,14 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,08$	$0,4 \pm 0,07$ (n=4)

Tabelle 2: Einzelkanalcharakteristika des PAC bei den untersuchten Tiergruppen. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Als Maß für die Mechanosensitivität des PAC wurde die Kanaloffenwahrscheinlichkeit bei einem Pipettendruck von 10, 20 und 30 mm Hg bestimmt (Abb. 11).

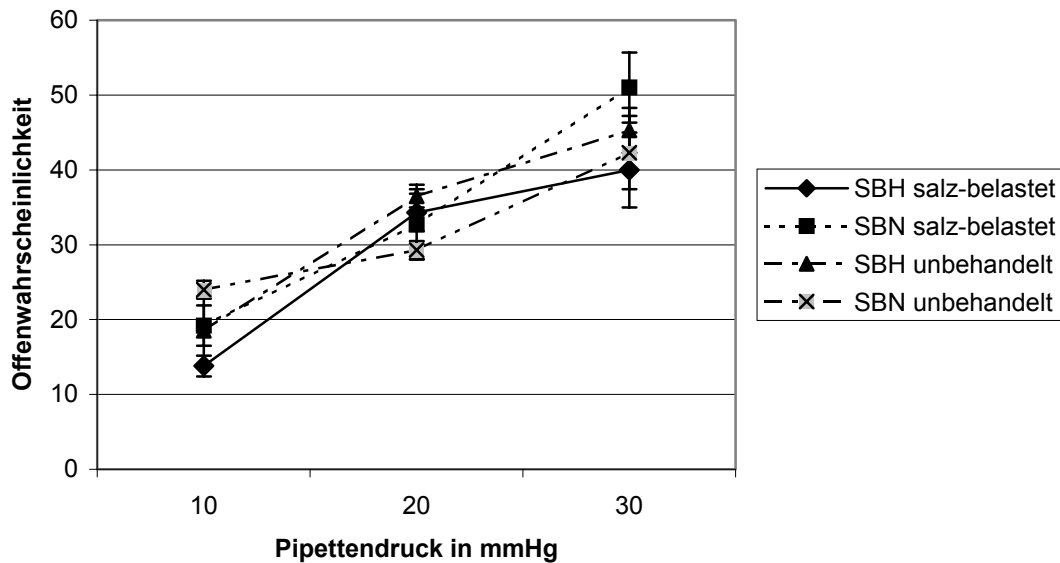


Abb. 11: Drucksensitivität des PAC. Angaben entsprechen den Mittelwerten der Offenwahrscheinlichkeit bei den jeweiligen Pipettendrücken  $\pm$  SEM.

### 3.3.3 Kanalzahlen pro untersuchtem Membranareal

Die Anzahl der maximal aktivierbaren PAC in untersuchten Membranarealen (*Patch*), in denen eine Aktivität von PAC nachgewiesen werden konnte, ist im Folgenden dargestellt (Tabelle 3, Abb. 12 und 13). Es zeigten sich in allen untersuchten Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede, so dass die insgesamt erhöhte Kanaldichte nicht auf einer sogenannten lokalen *Cluster*-Bildung beruht.

	Aorta (Abb. 9)	Mesenterialarterie (Abb. 10)
salz-belastete SBH/y	2,1 $\pm$ 0,5 vs. SBN 2,8 $\pm$ 0,2 (n=7)	1,3 $\pm$ 0,6 vs. SBN/y 2,0 $\pm$ 0,4 (n=7)
Unbehandelte SBH/y	2,7 $\pm$ 0,5 vs. SBN 2,5 $\pm$ 0,3 (n=7)	1,6 $\pm$ 0,4 vs. SBN/y 1,8 $\pm$ 0,4 (n=7)

Tabelle 3: Anzahl der PAC pro *Patch* mit PAC-Aktivität. Mittelwerte  $\pm$  SEM.



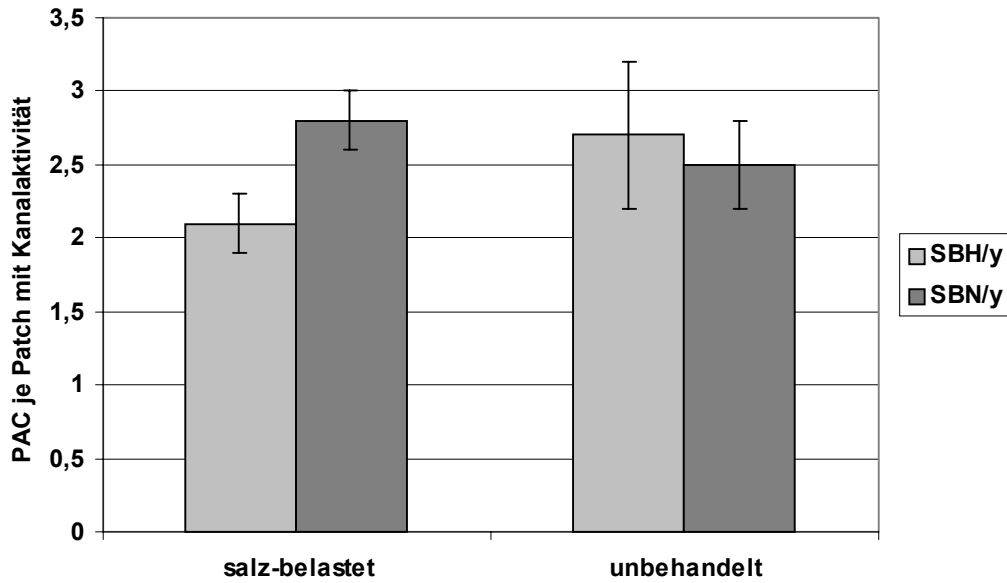


Abb. 12: Anzahl der im Endothel der Aorta aktivierbaren PAC in *Patches* mit PAC-Aktivität. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

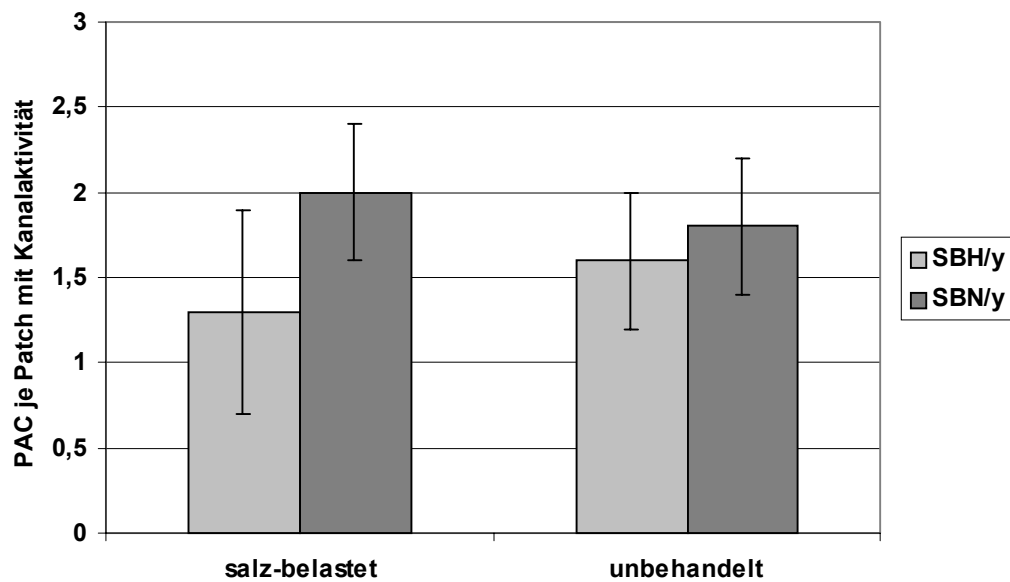


Abb. 13: Anzahl der im Endothel der Mesenterialarterie aktivierbaren PAC in *Patches* mit PAC-Aktivität. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.4 Vergleich von behandelten und unbehandelten SBH/y und SBN/y

#### 3.4.1 Vergleich der Kanaldichte des PAC am intakten Endothel der Mesenterialarterie behandelter und unbehandelter SBH/y und SBN/y

Die Patch-Clamp-Experimente wurden zunächst an der Mesenterialarterie durchgeführt. Dazu wurden 15 hochohmige Seals (3-10 G $\Omega$ ) pro Tier angefertigt. Jede der vier Tiergruppen bestand aus sieben Tieren. Bei salz-belasteten SBH/y zeigte sich eine signifikant verringerte apparente PAC-Dichte verglichen mit salz-belasteten SBN/y (5,7%  $\pm$  2, n=7 vs. 24,3%  $\pm$  8, n=7; p<0,05, MW-U-Test), während bei unbehandelten SBH/y und SBN/y keine signifikanten Unterschiede der Kanaldichte (20,0%  $\pm$  5, n=7 vs. 25,7%  $\pm$  6, n=7; p=0,61) zu verzeichnen waren (Abb. 14).

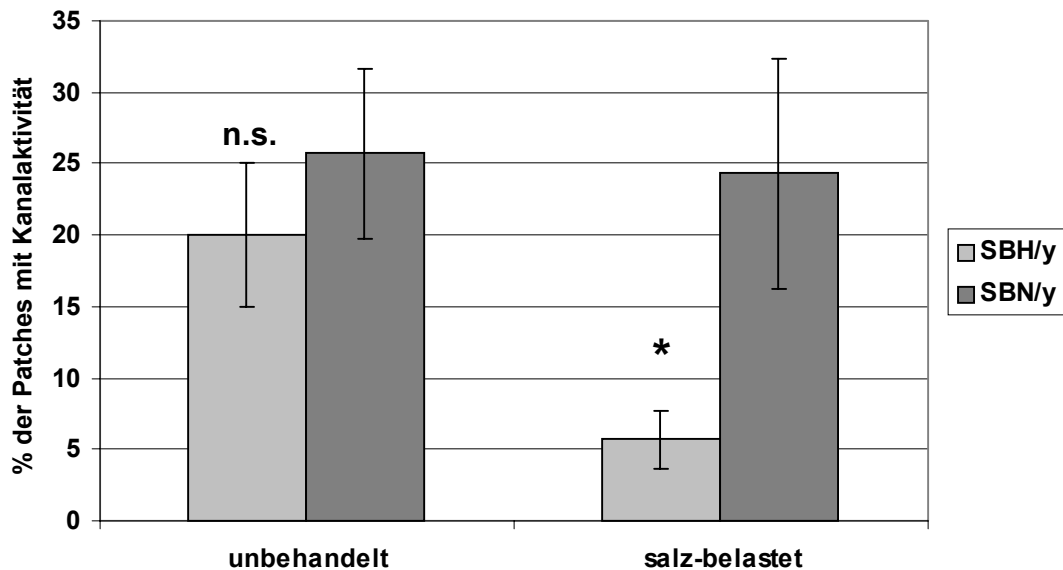


Abb. 14: Vergleich der Kanaldichte des PAC am Endothel der Mesenterialarterie von Sabra-Ratten. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* p<0,05, n.s. nicht signifikant

### 3.4.2 Kanaldichte des PAC am intakten Endothel der Aorta behandelter SBH/y und SBN/y

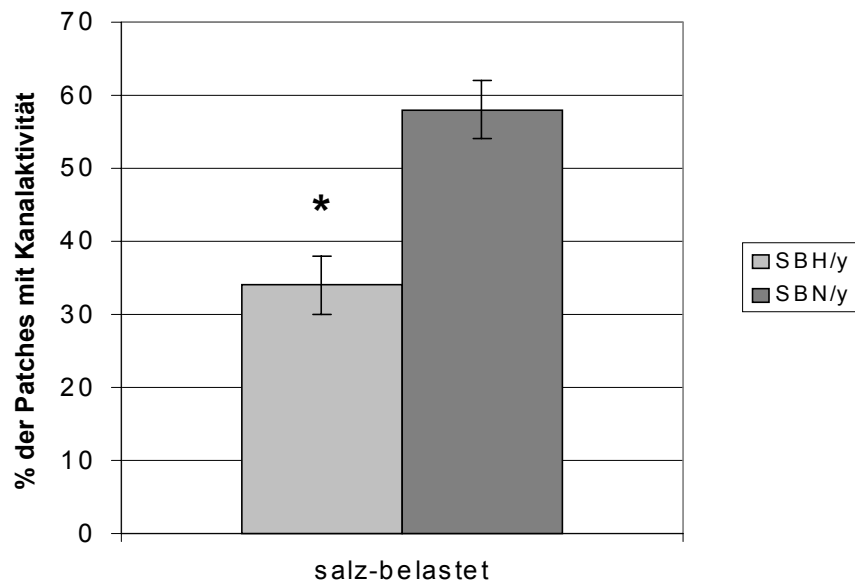


Abb. 15: Vergleich der Kanaldichte des PAC am Endothel der Aorta salz-belasteter Sabra-Ratten. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,01$

Analog zu den Versuchen am Endothel der Mesenterialarterie wurden die Patch-Clamp-Experimente an der Aorta von salz-belasteten Tieren durchgeführt. Dazu wurden 10 hochohmige Seals (3-10 G $\Omega$ ) pro Tier angefertigt. Jede Tiergruppe bestand aus sieben Tieren. Insgesamt war am Endothel der Aorta die apparente Kanaldichte des PAC höher als am Endothel der Mesenterialarterie. Es wurde bei den salz-belasteten SBH/y eine signifikant verringerte Kanaldichte verglichen mit den SBN/y registriert: SBH/y 34%  $\pm$  4 (n=7) vs. SBN/y 58%  $\pm$  4 (n=7),  $p=0,003$  (Abb. 15).