

## SUMMARY

The  $K_{Ca3.1}$ , an intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel, is expressed in many tissues and organs and is presumably involved in the control of secretory processes in epithelia, cell volume regulation, the immune response and the control of cell proliferation of many cell types. The  $K_{Ca3.1}$  is also expressed in the cardiovascular system and especially in the endothelium. The endothelial  $K_{Ca3.1}$  is believed to mediate EDHF-type vasodilation by inducing endothelial membrane hyperpolarization. The present work aimed to generate a  $K_{Ca3.1}$ -knockout mouse and to investigate the functional role of endothelial  $K_{Ca3.1}$  in the vasculature and in blood pressure control.

For gene targeting of the  $K_{Ca3.1}$  gene located on chromosome 7 of the mouse genome, exon 4, which codes for the channel pore, was deleted by homologous recombination using a pTV5-targeting vector in E14.1 embryonic stem cells. A positive clone was identified and injected into blastocysts of pseudo-pregnant foster females. Chimeric animals were bred to wild-type C57Bl/6 mice and gave heterozygous animals thus demonstrating successful germ line transmission. Further inbreeding gave homozygous  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice. Genotyping of the  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice revealed successful deletion of exon 4 as demonstrated by PCR and southern blot analysis. Loss of  $K_{Ca3.1}$ -mRNA-expression was proved by RT-PCR. Electrophysiological patch-clamp studies revealed the loss of  $K_{Ca3.1}$  currents and thus channel function in native T-lymphocytes.

$K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice were viable and fertile. Macroscopic and histological examinations revealed splenomegaly in both male and female  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice when compared to wild-type littermates. Moreover, weights of heart and kidney were significantly increased in female  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice, but not in  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  males, thus indicating a gender-specific phenotype.

Cardiovascular phenotyping showed a significant reduction of  $K_{Ca}$  functions in aortic endothelial cells from female  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice. Pressure myography revealed a significantly impaired EDHF-mediated vasodilation in carotid artery of female  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice.  $K_{Ca}$  functions in endothelial cells and EDHF-mediated vasodilation were not significantly impaired in male  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice. Tail-cuff plethysmography and telemetry showed elevated systolic blood pressure in female  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice, but not in male  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mice.

In conclusion, a  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  mouse strain has been successfully generated by the conventional gene targeting strategy. By using this transgenic animal model, the present work shows that  $K_{Ca3.1}$  plays a pivotal role in EDHF-mediated vasodilation and the control of the systemic blood pressure in a gender-specific manner.

# ZUSAMMENFASSUNG

Der  $K_{Ca3.1}$ , ein  $Ca^{2+}$ -aktivierter  $K^+$  Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit ist in vielen Geweben und Organen exprimiert. Es wird angenommen, dass der  $K_{Ca3.1}$  an der Steuerung von Sekretionsprozessen in Epithelien, der zellulären Volumenregulation, der Immunantwort und von Zellproliferationsprozessen beteiligt ist. Der  $K_{Ca3.1}$  ist auch im kardiovaskulären System und insbesondere im Endothel exprimiert. Der endotheliale  $K_{Ca3.1}$  scheint hier durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran die sog. „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF)-medierte Vasodilatation zu vermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine  $K_{Ca3.1}$ -„knockout“-Mauslinie generiert, um die funktionelle Bedeutung des endothelialen  $K_{Ca3.1}$  im Blutgefäßsystem und für die Blutdruckregulation zu untersuchen.

Für das sog. „gene targeting“ des  $K_{Ca3.1}$ -Gens auf Chromosom 7 des Mausgenoms, wurde Exon 4, welches für die Kanalpore kodiert, mittels eines pTV5-Vektors und homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen (E14.1) deletiert. Ein positiver Klon wurde selektiert und in Blastozysten scheinchwangerer Weibchen injiziert. Chimärer Nachwuchs, der mit Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) verpaart wurde, zeugte heterozygote  $K_{Ca3.1}^{+/-}$  Nachkommen. Das veränderte Gen wurde somit über die Keimbahn vererbt. Über Inzucht heterozygoter Tiere, wurden homozygote  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Tiere generiert. Mittels PCR und „southern blot“-Analysen wurde die erfolgreiche Deletion des Exon 4 des  $K_{Ca3.1}$ -Gens in diesen Tieren nachgewiesen. Ein Fehlen der mRNA-Expression und des funktionellen Kanalproteins wurde mittels RT-PCR bzw Patch-clamp Untersuchungen an naiven T-Lymphozyten gezeigt.

Die  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar. Grob makroskopische und histologische Untersuchungen zeigten eine deutliche Vergrößerung der Milz

bei männlichen und weiblichen  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. Darüber hinaus wurde bei weiblichen, jedoch nicht bei männlichen Tieren ein signifikant höheres Herz- und Nierengewicht festgestellt. Dies deutet daraufhin, dass hier ein geschlechtsspezifischer Phänotyp vorliegt. Die kardiovaskuläre Phänotypisierung ergab, dass  $K_{Ca}$ -Funktionen in aortalen Endothelzellen von weiblichen  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen signifikant reduziert waren. Untersuchungen im Druck-Myographen wiesen eine signifikante Verminderung der EDHF-medierte Vasodilatation nach. Endotheliale  $K_{Ca}$ -Funktionen und die EDHF-medierte Vasodilatation war bei männlichen  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen nicht signifikant verändert. Blutdruckmessungen mittels der Schwanzmanschetten-Plethysmographie und Telemetrie zeigten einen signifikant erhöhten systolischen Blutdruck bei weiblichen, aber nicht bei männlichen  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mauslinie erfolgreich generiert werden. Eine kardiovaskuläre Phänotypisierung ergab, dass der endotheliale  $K_{Ca3.1}$  geschlechtsspezifisch eine wichtige Rolle bei der EDHF-medierte Vasodilatation und damit bei der Blutdruckregulation spielt.