Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Hamburg–Eppendorf

 $\begin{array}{c} {\rm Digene~Hypertonie}\\ {\rm Blutdruckregulation~an~wachen~M"ausen~mit~"Uberaktivierung~des}\\ {\rm Epithelialen~Natriumkanals~(Liddle-Mutante)~und~genetischer~Inaktivierung~der~\beta 1-Untereinheit~des~Ca^{2+}-aktivierten~Kaliumkanals.} \end{array}$ 

Inaugural–Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Birgit Hirsch-Hoffmann geborene Dohse Tierärztin aus Bremen

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3498

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Heike Tönhardt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Heimo Ehmke
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Jörg Aschenbach

#### Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, disease models, blood pressure, hypertension, circadian rhythm, aldosterone, polygenic inheritance, metabolism cages, ion channels, telemetry

Tag der Promotion: 29.02.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-125-3 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011** Dissertation, Freie Universität Berlin **D 188** 

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 4				
1	Ein	leitung	r 5	8
<b>2</b>	Lite	eraturü	ibersicht	11
	2.1	Blutdi	ruckregulation	11
		2.1.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	12
			2.1.1.1 Aldosteron	15
	2.2	Hyper	tonie	19
		2.2.1	Definition und Klassifikation der Hypertonie	19
		2.2.2	Primäre und sekundäre Hypertonie	20
			2.2.2.1 Die primäre Hypertonie	20
			2.2.2.2 Die sekundäre Hypertonie	22
		2.2.3	Salzkonsum und Hypertonie	24
	2.3	Ionenl	kanäle	26
		2.3.1	BK-Kanal (big conductance $Ca^{2+}$ -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal)	26
			2.3.1.1 Klassifizierung	26
			2.3.1.2 Struktur und Aufbau	27
			2.3.1.3 Lokalisation und Funktion	28
			2.3.1.4 Aktivierung und Pharmakologie	29
			2.3.1.5 Die Funktion des BK-Kanals bei der Blutdruckregulation	31
		2.3.2	Epithelialer Natriumkanal	32
			2.3.2.1 Klassifizierung, Lokalisation und Funktion	32
			2.3.2.2 Struktur und Aufbau	33
			2.3.2.3 Regulation	35
	2.4	Liddle	s's Syndrom	36
	2.5	Arbeit	shypothese und Zielsetzung	38
3	Mat	terial ı	und Methoden	39
-	3.1	Mater	ial	39
		3.1.1	Lösungen und Puffer	39
			3.1.1.1 Gelelektrophorese	39
		3.1.2	Chemikalien und Enzyme	39
		3.1.3	Futter	40
	3.2	Versue	chstiere	41
	-	3.2.1	Versuchsserien und Stichprobenumfang	42
	3.3	Metho	$den \ldots \ldots$	44
		3.3.1	Genotypisierung der Mäuse	44

			3.3.1.1 Lysierung der Ohrprobe	44
			3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	44
			3.3.1.3 Gelelektrophorese	46
		3.3.2	Hämodynamische Untersuchungen an wachen Mäusen	46
			3.3.2.1 Chronische Katheter	46
			3.3.2.1.1 Katheterherstellung	46
			3.3.2.2 Operative Implantation der chronischen Katheter	47
			3.3.2.3 Blutdruckmessung	50
			3.3.2.4 Telemetrie	51
			3.3.2.4.1 Transmitter zur telemetrischen Aufzeichnung von	
			hämodynamischen Parametern bei Mäusen	51
			3.3.2.4.2 Operative Implantation der telemetrischen Sender .	52
			3.3.2.4.3 Telemetrische Messung hämodynamischer Parameter	54
			3.3.2.4.4 Telemetrische Messungen unter unterschiedlicher	
			Salzbelastung	54
		3.3.3	Bestimmung von Blutparametern	56
			3.3.3.1 Blutabnahme	56
			3.3.3.1.1 Blutabnahme für die Aldosteronbestimmung	56
			3.3.3.1.2 Blutabnahme für die Elektrolyt-/ Kreatininbestim-	
			$\mathrm{mung}  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  \ldots  $	57
			3.3.3.2 Analyse	57
			$3.3.3.2.1  \text{Aldosteron}  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  $	57
			3.3.3.2.2 Elektrolyte und Kreatinin	59
		3.3.4	Morphometrische Untersuchungen	59
		3.3.5	Einfuhr- und Ausfuhrbilanzierung	59
			3.3.5.1 Metabolische Käfige	59
			3.3.5.2 Analysierte Parameter	60
		3.3.6	Statistische Auswertung	61
1	Fra	obnisse		62
4	4 1	Genota	z	62
	4.2	Ergebr	nisse Chronischer Katheter	64
	1.2	4 2 1	Versuchsserie 1	64
		422	Hämodynamische Daten	64
		423	Morphometrische Daten	66
		1.2.0	4.2.3.1 Herzgewichte	66
			4.2.3.2 Nierengewichte	66
		4.2.4	Plasmaaldosteronkonzentration	67
	4.3	Elektro	olvte und Kreatinin	69

		4.3.1	Versuchsserie 2	69		
	4.4	Ergeb	nisse der telemetrischen Untersuchungen	70		
		4.4.1	Versuchsserie 3	70		
		4.4.2	Basismessung	70		
			4.4.2.1 Mittelwerte	70		
			4.4.2.2 Zirkadianer Rhythmus	72		
		4.4.3	Telemetrische Messungen nach unterschiedlicher Salzbelastung $\ .\ .\ .$	78		
			4.4.3.1 Überblick über den gesamten Versuchszeitraum	78		
			4.4.3.2 Mittelwerte der einzelnen Diäten	80		
			4.4.3.3 Einfluss der Umstellung der Salzbelastung auf die			
			hämodynamischen Parameter	85		
			4.4.3.3.1 Umstellung von der Basis Diät auf die salzarme Diät	85		
			4.4.3.3.2 Umstellung von der salzarmen Diät auf die salzrei-			
			che Diät	86		
			4.4.3.3.3 Umstellung von der salzreichen Diät auf die Basis			
			Diät	88		
	4.5	Versue	che im Stoffwechselkäfig an wachen Mäusen	90		
		4.5.1	Versuchsserie 4	90		
		4.5.2	Stoffwechselbilanz unter der Basis Diät	91		
		4.5.3	Stoffwechselbilanz unter unterschiedlicher Salzbelastung	93		
<b>5</b>	$\mathbf{Disl}$	kussior	1	97		
6	Zus	ammei	nfassung 1	12		
7	Summary 115					
Abbildungsverzeichnis						
$\mathbf{Li}$	Literaturverzeichnis III					
D	anks:	agiina	XX	VI		
Se	$\mathbf{lbsts}$	tändig	keitserklärung XXV	II		

# Abkürzungsverzeichnis

$AT_1 \dots$	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
AT <sub>4</sub>	Angiotensin-Rezeptor Typ 4
IP <sub>3</sub>	Inositroltriphosphat
$U_{Elektrolyt}V$	absolute renale Ausscheidung der Elektrolyte
$\mathrm{K}_{V} \ \ldots \ \ldots$	spannungsabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
$H_2O$	Wasser
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>ir</sub>	einwärts gleichrichtender K <sup>+</sup> -Kanal
+/+ +/+	Wildtyp
+/+ +/d	${ m BK}eta 1$ -Knockout in heterozygoter Ausprägung
+/L +/+	Liddle Mutation in heterozygoter Ausprägung
+/L +/d	Liddle Mutation und BK $\beta1$ - Knockout in heterozygoter Ausprägung
A	Arteria - die (einzelne) Arterie
Aa	Arteriae - mehrere Arterien
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANG II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BK-Kanal	big conductance Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal
BNaC	brain sodium channel-hirnspezifischer Na <sup>+</sup> -Kanal
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen bzw. Peptiden
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP1	channel activating protease 1 - Kanalaktivierende Protease 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cts	counts - Zählschritte
d/d	BK $\beta$ 1-Untereinheit in homozygoter Ausprägung
DAG	Diacylglycerol
DEG	Degenerin

DHL	Deutsche Hochdruckliga
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
e.g	exempli gratia; im englischen Sprachgebrauch für: zum Beispiel
EAG	ether à go-go
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal
ESC	European Society of Cardiology
ESH	European Society of Hypertension
et al	et alii - und weitere
EZV	Extrazellulärvolumen
Fa	Firma
FMRF	ein Peptid, bestehend aus den AS: Phe-Met-Arg-Phe- $NH_2$
GDP	Guanosindiphosphat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HGW	Herzgewicht
HZV	Herzzeitvolumen
I.D	Innendurchmesser
I.E	Internationale Einheiten
i.p	intraperitoneal
IK-Kanal	intermediate conductance Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal
$K_{Ca^{2+}}$	$Ca^{2+}$ - abhängiger - K <sup>+</sup> -Kanal
Кар	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KGW	Körpergewicht
КНК	Koronare Herzkrankheit
КМ	Kotmenge
КО	Knockout
L/L	Liddle Mutation in homozygoter Ausprägung
LBK	doppelheterozygote Mausmutante (Liddle Mutation u. BK $\beta$ 1)
Lig	Ligamentum - das (einzelne) (Sehnen-)Band
Ligg	Ligamenta - mehrere Bänder
LV	Linker Ventrikel
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
MAD	mittlerer arterieller (Blut-)Druck
МК	Metabolischer Käfig

n	Anzahl
N-Terminus	Aminoterminus von Proteinen bzw. Peptiden
N	Nervus - der (einzelne) Nerv
n.s	nicht signifikant
Nn	Nervi - mehrere Nerven
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickoxid
O.D	Außendurchmesser
p.a	pro analysis
PCR	polymerase chain reaction-Polymerase-Kettenreaktion
РНА	Pseudohyperaldosteronismus
РКА	Proteinkinase A (cAMP-abhängig)
РКС	Proteinkinase C ( $Ca^{2+}$ -abhängig)
PKG	Proteinkinase G (cGMP-abhängig)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel - $\mathrm{K}^+\text{-}\mathrm{Kanal}$ des äußeren
	Nierenmarks
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
S	Signatursequenz
s.c	subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	standard error of means - Standardfehler des Mittelwertes
SG	Spezifisches Gewicht
SGK	Serin-Threonin-Kinase
SK-Kanal	small conductance Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal
STOC's	spontaneous transient outward currents - Spontane transiente
	Auswärtsströme
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEA	Tetraethylammonium
ТМ	Transmembransegment
TPR	total peripheral resistance - totaler peripherer Widerstand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TV	Trinkvolumen
UKE	Universitätsklinkum Hamburg-Eppendorf
UV	Urinvolumen

UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Vena - die (einzelne) Vene
vs	versus - verglichen mit oder gegenübergestellt
Vv	Venae - mehrere Venen
WHO	world health organisation -Weltgesundheits organisation
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
ZVD	zentral-venöser Druck

## 1 Einleitung

Fehlregulationen des arteriellen Blutdrucks und die daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall sind noch vor den Krebserkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrienationen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird ihre Bedeutung für die weltweite Morbidität und Mortalität in den nächsten 25 Jahren noch deutlich zunehmen.

Trotz intensiver Forschung sind die funktionellen Mechanismen, die zur Entstehung des arteriellen Bluthochdrucks führen, noch immer unzureichend verstanden. So wird bei über 90 % aller Hypertonie-Patienten die sogenannte primäre oder essentielle Hypertonie unbekannter Ätiologie diagnostiziert.

Bei der essentiellen arteriellen Hypertonie handelt es sich um ein multifaktorielles und heterogenes Krankheitsbild, dem nach derzeitigem Kenntnisstand sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Determinanten zugrunde liegen [Rosskopf et al., 2007]. Im Gegensatz zu den wenigen monogenetisch bedingten Hypertonieformen, wie dem später beschriebenen Liddle's Syndrom, sind bei der essentiellen Hypertonie die Effekte der einzelnen beteiligten Gene gering, und erst eine Interaktion von multiplen Genen mit blutdruckregulierenden Eigenschaften führt zu einer Manifestation der Erkrankung [Timberlake et al., 2001].

Der Einsatz genetischer Methoden hat ganz neue Möglichkeiten für die Analyse von Faktoren, die an der Entwicklung einer Hypertonie beteiligt sind, eröffnet. So ermöglicht es die gezielte Ausschaltung oder Modifikation identifizierter beteiligter Gene, primäre physiologische Mechanismen auch in vivo zu charakterisieren [Budack, 2004]. Die Untersuchungen seltener monokausaler erblicher Formen von arterieller Hypertonie, bei denen Mutationen einzelner Gene mit großen Effekten auf den Blutdruck einhergehen, haben wichtige neue Einblicke in grundlegende Wege der Blutdruckregulation beim Menschen aufgezeigt [Lifton et al., 2001].

Klinische und experimentelle Studien konnten eine dominante Rolle der Niere bei der langfristigen Blutdruck-Regulation aufzeigen [Cowley und Roman, 1996]. Die Na<sup>+</sup>- und Wasserexkretion über die Niere steht in einem engen Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des arteriellen Drucks im Organismus [Guyton, 1991b]. Damit scheint das renale Regulationssystem für den Salz- und Wasserhaushalt in herausragender Weise in die Genese der Bluthochdruckerkrankungen involviert zu sein [Guyton, 1991a].

In den letzten Jahren konnten im Rahmen von experimentellen Untersuchungen an Tiermodellen und klinischen Studien viele Erkenntnisse gewonnen und wichtige renale Targets für die Aufrechterhaltung der Na<sup>+</sup>- und Wasserhomöostase identifiziert werden. Als ein zentraler Faktor konnte der Amilorid-sensitive epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal (ENaC) identifiziert werden. Dieser Kanal wurde unter anderen in Aldosteron-empfindlichen Epithelzellen von Kolon und Niere nachgewiesen, wo er eine Schlüsselposition bei der Kontrolle der Na<sup>+</sup>-Balance, des Blutvolumens und des Blutdrucks inne hat [Rossier et al., 2002]. Eine monogenetische Erkrankung, die zu einer Fehlregulation des ENaC führt und deren Folge eine salzsensitive Hypertonie ist, ist das Liddle's Syndrom [Liddle GW, 1963]. Schon 1994 konnte nachgewiesen werden, dass durch eine gain-of-function Mutation in der  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ - Untereinheit des ENaC das Krankheitsbild des Liddle's Syndroms ausgelöst wird [Shimkets et al., 1994]. Um die Eigenschaften und die Folgen von Mutationen dieses Kanals in vivo zu untersuchen, schuf die Arbeitsgruppe um Bernhard C. Rossier 1999 ein Mausmodell mit einer gain-of-function Mutation durch die Einfügung eines Stoppcodons (R566) auf Position 639 der  $\beta$ -Untereinheit des ENaC (Liddle-Mausmutante). Die Untersuchungen zeigten, dass unter hoher Salzdiät der Phänotyp des Liddle's Syndroms induziert werden kann, wobei die heterozygoten Tiere einen leichteren, geringer ausgeprägten Phänotyp aufweisen. Die Tiere entwickeln unter einer vermehrten Salzzufuhr einen Bluthochdruck, eine Normo- oder Hypokaliämie und eine metabolische Alkalose. Die Plasmaaldosteron- und Plasmareninkonzentrationen sind bei diesen Tieren vermindert [Pradervand et al., 1999]. Aufgrund dieser Symptome wurde der Ausdruck des Pseudohyperaldosteronismus (PHA) geprägt, da die Tiere zwar eine erniedrigte Plasmaaldosteronkonzentration aufweisen, die genannten Veränderungen jedoch in dieser Kombination durch einen Hyperaldosteronismus ausgelöst werden können.

Auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist von zentraler Bedeutung für die mittel- bis langfristige Regulation des arteriellen Blutdrucks und für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Neben der Hypertonie-fördernden Wirkung von Angiotensin ist auch eine gesteigerte Aldosteronsekretion, einhergehend mit erhöhten Aldosteronplasmakonzentrationen, schon lange als Ursache für einen Hypertonus bekannt.

Mäuse mit einer homozygot vorliegenden genetischen Deaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanals (Slobeta-Maus oder BK $\beta$ 1 d/d) weisen einen signifikant erhöhten systemischen Blutdruck auf [Pluger et al., 2000]. Außerdem konnte bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) ein erhöhter arterieller Tonus in isolierten Gefäßen nachgewiesen werden, welcher zudem mit einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle und einer gestörten Kopplung von Ca<sup>2+</sup>-Sparks<sup>1</sup> und STOC's (spontane transiente Auswärtsströme) vergesellschaftet ist [Brenner et al., 2000b] & [Pluger et al., 2000].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zunächst davon ausgegangen, daß die arterielle Hypertonie der homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) eine direkte Folge des erhöhten myogenen Tonus in den arteriellen Widerstandsgefäßen ist [Standen, 2000], [Patterson et al., 2002] & [Kotlikoff und Hall, 2003]. Ein solcher Mechanismus wäre von größtem wissenschaftlichen und medizinischen Interesse, da es sich hierbei erstmalig um den Nachweis einer monogenetischen Hypertonie nicht-renalen Ursprungs handeln würde [Budack, 2004]. Da die BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) aber außerdem signifikant erhöhte Plasmaaldosteronkonzentrationen aufweisen [Budack, 2004], deren Ursache noch nicht hinlänglich geklärt ist, geht man zur Zeit davon aus, daß der Hypertonus zu einem großen Teil durch den erhöhten Plasmaaldosteronspiegel hervorgerufen wird [Grimm et al., 2009].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>spontane, lokal begrenzte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [Nelson et al., 1995]

Um einen tieferen Einblick in die Ätiologie der essentiellen Hypertonie zu gewinnen, ist es, im Hinblick auf die multifaktorielle Genese, von großem Interesse, wie sich die beiden beschriebenen wichtigen Systeme für die Blutdruckregulation bei der Entstehung von Hypertonien beeinflussen. So bietet ein kombiniertes Mausmodell aus den BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen und den Liddle-Mäusen (Liddle x Slobeta Maus) eine Möglichkeit, die Interaktion zwischen zwei wichtigen Faktoren der Blutdruckregulation (Niere und RAAS) zu untersuchen und mögliche Gen-Dosis-Effekte nachzuweisen. Da die einzelnen genetischen Veränderungen bei heterozygotem Auftreten im Tiermodell unter physiologischen Haltungsbedingungen keinen Bluthochdruck verursachen, soll die vorliegende Arbeit klären, ob bei gleichzeitigem Auftreten der Mutationen im heterozygoten Genotyp durch Interaktionen im Phänotyp eine Hypertonie verursacht wird und ob die Blutdruckregulation Unterschiede aufweist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Phänotypisierung der heterozygoten Doppelmutante (+/L +/d) zu erstellen, welche durch Kreuzung der beiden Mauslinien mit den beschriebenen Defekten entstanden ist . Es soll untersucht werden, inwieweit genetische Defekte der oben beschriebenen Mechanismen Einfluss auf die Blutdruckregulation haben. Mit Hilfe von hämodynamischen Messungen soll festgestellt werden, welche Auswirkungen die beschriebenen Defekte in heterozygoter Ausprägung allein und in Kombination miteinander auf den Blutdruck und die Herzfrequenz haben. Außerdem sollen durch Bestimmung der Plasmaspiegel von Aldosteron Anhaltspunkte über die Aktivität des RAAS unter dem Einfluss der beiden genetischen Defekte allein und in Kombination gewonnen werden. Die Analyse der Plasmakonzentration der wichtigsten Elektrolyte soll Hinweise darauf geben, ob bei der heterozygoten Doppelmutante (+/L +/d) pathophysiologische Veränderungen des Salz- und Wasserhaushaltes vorliegen.

Die Rolle einer alimentären Salzbelastung für die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Interaktion von BK-Kanal und ENaC bei der Blutdruckregulation im intakten Organismus ist noch völlig ungeklärt, so daß hämodynamische Messungen, sowie Stoffwechselbilanzierungen unter verschiedenen Salzdiäten eine interessante Möglichkeit darstellen, den Einfluss dieses exogenen Faktors zu untersuchen. Deshalb liegt ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit in der Untersuchung des Einflusses einer unterschiedlichen Salzbelastung auf den Phänotyp der doppelheterozygoten Mausmutante (+/L +/d). Unter verschiedenen Salzdiäten werden Ein- und Ausfuhrbilanzierungen vorgenommen und mit Hilfe eines telemetrischen Messverfahrens soll der Blutdruck über einen längeren Zeitraum, der unterschiedliche Salzdiäten für die Tiere umfasst, untersucht werden. Neben der Messung der hämodynamischen Parameter und der Aktivität unter den jeweiligen Diäten soll ein besonderes Augenmerk auf die Übergangszeiten (Transienten) während der Diätumstellungen gerichtet werden.

## 2 Literaturübersicht

#### 2.1 Blutdruckregulation

Als Blutdruck oder Gefäßdruck bezeichnet man den Druck, der durch den Herzschlag und den damit verbundenen Transport des Blutes in den Gefäßen des Körper- und Lungenkreislaufes entsteht. Er wird in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) oder auch in Kilopascal (kPa) angegeben. 1 mmHg entspricht in etwa 133 Pa. Er ist die treibende Kraft für die Blutzirkulation und abhängig von der aktiven Spannung der Gefäße (Gefäßtonus) und der Elastizität der Gefäßwand, die gemeinsam den totalen peripheren Widerstand (TPR) darstellen, sowie vom Herzminutenvolumen.

Das Herzminutenvolumen, oder auch Herzzeitvolumen (HZV) bezeichnet das Blutvolumen, welches in einer Minute vom linken Ventrikel der Herzens ausgeworfen und als Funktion aus Herzfrequenz und Schlagvolumen berechnet wird. Unter dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAD), der auch in der vorliegenden Arbeit bei den Blutdruckmessungen ermittelt wird, versteht man den durchschnittlichen, unabhängig von den systolischen und diastolischen Schwankungen bestehenden Blutdruck. Er stellt den im arteriellen System auf Herzhöhe gegen den Atmosphärendruck gemessenen Druck dar und wird als Produkt des HZV und des TPR zuzüglich des zentral venösen Drucks (ZVD) definiert. In den herznahen Arterien ist er nahezu identisch mit dem arithmetischen Mittel des systolischen und diastolischen Blutdruckes, in den herzfernen Arterien liegt er etwas niedriger.

Die Regulation des Kreislaufes dient der adäquaten Blutversorgung der peripheren Gewebe und der Aufrechterhaltung des MAD sowie der ständigen Anpassung an den aktuellen Bedarf. Die Regelung des Blutdrucks erfolgt durch Änderung des peripheren Widerstands mittels Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße oder durch Veränderung des HZV [Klinke und Silbernagl, 2003]. Zu diesem Zweck wirken viele Regulationssysteme, die humorale, neuronale und metabolische Komponenten einschließen, in einem komplexen Prozeß zusammen [Guyton, 1991b], [Cowley, 1992] & [Persson, 1996]. Sie lassen sich nach der zeitlichen Abfolge ihres Wirksamwerdens in kurzfristige, mittelfristige und langfristige Mechanismen einteilen.

Kurzfristig wird der arterielle Blutdruck hauptsächlich über neurohumorale Reflexe reguliert, die eine rasche Anpassung an einen veränderten Durchblutungsbedarf ermöglichen, indem sie die Herztätigkeit und den Gefäßtonus beeinflussen. Diese Reflexbögen nehmen ihren Ausgang von verschiedenen Messfühlern, von denen die arteriellen Pressorezeptoren im Aortenbogen und im Bereich des Karotissinus eine besonders wichtige Rolle spielen. Diese Dehnungsrezeptoren detektieren den absoluten Blutdruck sowie Schwankungen des systemischen Blutdrucks, der Herzfrequenz und die Geschwindigkeit der Druckänderung anhand einer veränderten Wandspannung und senden über Afferenzen des N. glossopharyngeus bzw. des N. vagus Signale in Form eines pulssynchronen Druckmusters zu Hirnnervenkernen in der dorsalen Medulla oblongata<sup>2</sup>. Über efferente sympathische Nervenbahnen erfolgt eine Regulation der Herzfrequenz, der Kontraktilität des Herzens und des TPR, wohingegen parasympathische Efferenzen ausschließlich eine negativ chronotrope, also eine frequenzmindernde Wirkung auf das Herz ausüben. Aufgrund dieser Mechanismen werden Schwankungen des MAD innerhalb von Sekunden abgepuffert [Timmers et al., 2003].

In Experimenten an verschiedenen Säugetierspezies konnte gezeigt werden, daß durch Denervierung der Pressorezeptoren einerseits erhebliche Schwankungen des arteriellen Blutdruckes auftraten [Cowley et al., 1973], sowie andererseits eine Hypertonie induziert wurde, die jedoch innerhalb von ein bis zwei Wochen wieder kompensiert wurde [Cowley et al., 1973], [Ito und Scher, 1978] & [Shade et al., 1990]. Diese Normalisierung des Blutdrucks wurde durch andere, verzögert wirkende Kontrollmechanismen ausgelöst.

An der mittelfristigen Regulation des Blutdrucks sind hauptsächlich hormonelle Systeme, wie das Antidiuretische Hormon (ADH) und das atriale natriuretische Peptid (ANP) sowie vor allem das RAAS beteiligt, welches bereits wenige Minuten nach einem Blutdruckabfall eine periphere Vasokonstriktion bewirkt und zu den wichtigsten Regulationsmechanismen des Blutdrucks zählt [Cowley, 1992].

Die mittel- bis langfristige Blutdruckregulation hängt im Weiteren eng mit Veränderungen des extrazellulären Volumens zusammen, wobei zur langfristigen Einstellung des arteriellen Blutdruckes vor allem die Steuerung des Salz- und Wasserhaushaltes an Bedeutung gewinnt. In diesen Zusammenhang gehört die Regulation der Na<sup>+</sup>- und Flüssigkeitsabsorption und –exkretion durch z.B. die Hormone ADH und Aldosteron.

Im Zentrum der langfristigen Regelung des Blutdruckes steht die Niere [Cowley und Roman, 1996], da sie über die Ausscheidung von Flüssigkeit und Elektrolyten auf das extrazelluläre Volumen und damit das zirkulierende Blutvolumen einwirkt. Dies geschieht auf der einen Seite durch die Beeinflussung der Nierenfunktion durch den arteriellen Blutdruck selbst (Druckdiurese) und auf der anderen Seite, indem die Niere unter anderem das Zielorgan für die oben genannten Hormone, sowie für sympathische Signale darstellt.

Auch das RAAS, welches im juxtaglomerulären Apparat der Niere seinen Ursprung hat, übt seine Wirkung auf das renale System aus. Da das RAAS eine entscheidende Rolle bei der Generierung einer eventuell vorliegenden Hypertonie in der hier untersuchten doppelheterozygoten Mausmutante (+/L +/d) spielen soll, wird auf diesen Mechanismus im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>sogenanntes verlängertes Rückenmark, zum Hirnstamm und damit zum zentralen Nervensystem gehörend. Hier werden Erhaltungs- und Schutzreaktionen, wie Kreislauf, Atmung und der Schluckakt beeinflusst.

#### 2.1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das enzymatisch und hormonell seine Wirkung ausübende RAAS ist ein komplexes, kaskadenartiges Regulationssystem des Körpers, welches von herausragender Bedeutung für die Aufrechterhaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, Plasmaosmolarität und Blutdruck ist. Es spielt damit eine zentrale Rolle in der mittel- bis langfristigen Regulation des arteriellen Blutdruckes. Die Zielrezeptoren dieses Systems werden nahezu ubiquitär im Organismus exprimiert; ein Umstand, der die systemische Wirksamkeit des RAAS und dessen Beteiligung an zahlreichen physiologischen Funktionen unterstreicht. Die Aktivierung des RAAS erfolgt über das in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen synthetisierte Renin. Diese granulierten Zellen befinden sich in der Tunica media der periglomerulären Arteriolen [Taugner et al., 1984] & [Barajas, 1979]. Stimuliert wird die Sekretion von Renin aus den Epitheloidzellen unter anderem durch jede Form der renalen Minderdurchblutung und damit einhergehendem sinkenden Perfusionsdruck in der Niere [Finke et al., 1983] und unterliegt dem sogenannten Macula densa-Mechanismus, sowie neuronalen, myogenen und endokrinen Steuerungsmechanismen.

Die Macula densa stellt eine Ansammlung von wenigen hochprismatischen, schmalen Epithelzellen in der Wand des geraden aufsteigenden Teils (Pars recta) des distalen Tubulus dar, die dem afferenten Blutgefäß des Nierenkörperchens anliegen. Dieser Chemorezeptor misst über einen, durch Furosemid<sup>3</sup> hemmbaren, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter, der auch im wasserundurchlässigen dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife vorhanden ist, die tubuläre Ionenkonzentration [Lapointe et al., 1990], insbesondere die Cl<sup>-</sup>Konzentration, sowie die intraluminale Flussrate im distalen Tubulus. Dabei wird die ionale Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit als ein Indikator für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) genutzt. Eine hohe Cl<sup>-</sup>-Konzentration spricht für eine gesteigerte GFR, in dessen Folge es zu einer Vasokonstriktion der Vas afferens kommt. Dadurch wird die GFR gedrosselt (tubuloglomerulärer Feedback). Ist die Ionenkonzentration niedrig, der Harn also hypoosmolar, führt dies zu einer Reninausschüttung und damit zu einer Initiierung des RAAS.

Weiterhin stellt das sympathische Nervensystem einen wichtigen extrarenalen Kontrollfaktor für die Reninsekretion dar. Dazu dienen sympathische Nervenendigungen, die in relativ hoher Dichte an den juxtaglomerulären Zellen im Bereich des glomerulären Gefäßpols vorkommen. Über  $\beta$ 1-adrenerge Rezeptoren stimuliert das Katecholamin Noradrenalin das Enzym Adenylatcyclase. Das dadurch intrazellulär gebildete zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) regt dann die Renin-Sekretion [Hackenthal et al., 1990] an. Weitere Wechselwirkungen zwischen dem Sympathikus und dem RAAS werden über das am Ende der Kaskade stehende Angiotensin II (ANG II), hervorgerufen. ANG II übt unter anderem über die Freisetzung von Noradrenalin einen aktivierenden Effekt auf das sympathische Nervensystem aus.

 $<sup>^3</sup>$ Schleifendiuretikum, führt über die Hemmung des Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Cotransporters zur Ausscheidung großer Mengen Gewebeflüssigkeit

Die Hypothese, daß die Reninsekretion auch einer myogenen Steuerung unterliegt, basiert auf der Theorie, daß Drucksensoren die Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Zellen beeinflussen [Blaine et al., 1984]. Dieser auch als intrarenaler Barorezeptorreflex bezeichnete Mechanismus stellt eine konstante glomeruläre Filtration sicher, auch wenn der Perfusionsdruck in der Niere abfällt. Ein Absinken des Blutdruckes führt zu einer reflektorischen Vasodilatation der proximalen Abschnitte der afferenten Arteriolen (Bayliss-Effekt) und damit zu einer gesteigerten Perfusion des Glomerulums. Im Bereich der Renin-sezernierenden Zellen führt die Vasodilatation zu einer erhöhten Ausschüttung von Renin.

Die Renin-Sekretion unterliegt außerdem der Kontrolle durch humorale Faktoren einschließlich ANG II , Stickoxid (NO), Endothelin<sup>4</sup>, und Steroidhormonen [Taugner et al., 1984] & [Wagner et al., 1998].

Das Renin ist ein zu den Endopeptidasen gehörendes Enzym mit einer Halbwertszeit von etwa einer halben Stunde. Das humane Renin besteht aus 340 Aminosäuren (37-40 kDa). Es wird als Präprorenin synthetisiert und zu dem enzymatisch inaktiven Prorenin umgewandelt. Dieses wird durch Abspaltung von 43 Aminosäuren zum biologisch aktiven Renin, welches dann gemeinsam mit der Vorstufe Prorenin in den Granula der Renin-freisetzenden Zellen bis zur Ausschüttung gespeichert wird. Eine extrarenale Synthese erfolgt unter anderem im Uterus, in der Leber und in den glatten Muskelzellen der Arterien.

Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten  $\alpha$ 2-Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Das hauptsächlich in den Endothelzellen der Lungengefäße, der renalen Arteriolen und glomerulären Kapillaren [Taugner und Ganten, 1982] vorkommende Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) spaltet am C-terminalen Ende des Angiotensin I, die Aminosäuren Histidin und Leucin ab, wodurch das biologisch aktive Octapeptid ANG II entsteht. Das Peptidhormon ANG II selbst übt mehrere Funktionen aus: es ist, neben dem Endothelin eine der stärksten vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen im Organismus. Die Wirkungen von ANG II werden über die G-Protein<sup>5</sup>-gekoppelten AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren und über einen AT<sub>4</sub>- Rezeptor vermittelt. Die Rezeptoren sind an der Plasmamembran von Zellen kardiovaskulärer, endokriner und endothelialer Organe lokalisiert [Kaschina und Unger, 2003]. Durch die Bindung an AT<sub>1</sub> -Rezeptoren an den Gefäßen wirkt ANG II überwiegend auf ein Gq<sup>6</sup> -oder G12 -Protein<sup>7</sup> und übt so seine hauptsächliche blutdrucksteigernde Wirkung aus. Über den second messenger Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) wird dadurch Ca<sup>2+</sup> aus dem sarkoplasmatischen Reticulum der glatten Muskelzellen freigesetzt

 $<sup>^4\</sup>mathrm{Stark}$ vasokonstriktorisch wirkendes Peptidhormon, welches u.a. vom Endothel von Blutgefäßen gebildet wird.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Guaninnucleotid-bindendes Protein. G-Proteine sind einer der wichtigsten Signaltransduktoren zwischen dem Rezeptor der Körperzelle und den untergeordneten Funktionseinheiten.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, welche entscheidend an vielen Signalkaskaden beteiligt ist, indem es die Phospholipase C aktiviert, welche wiederum die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, welche in der Hauptsache im aktivierten Zustand Guanosindiphosphat (GDP) abdissoziieren lassen und Guanosintriphosphat (GTP) binden.

#### Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System



Abbildung 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). AS: Aminosäure; ACE: Angiotensin Converting Enzyme;  $AT_1$ : Angiotensin-Rezeptor Typ 1;  $AT_2$ : Angiotensin-Rezeptor Typ 2; GFR: Glomeruläre Filtrationsrate

und somit eine Vasokonstriktion induziert. Auch in der Niere selbst bewirkt ANG II eine Verengung der Gefäße, wodurch die renale Durchblutung und die GFR negativ beeinflusst werden. Eine chronische Stimulation des  $AT_1$ -Rezeptors kann hingegen zellproliferierende Effekte zur Folge haben und somit zum Beispiel zu einer Hypertrophie des Herzens führen. Der  $AT_2$ -Rezeptor ist für die fetale Entwicklung, die Zelldifferenzierung, die Apoptose und Regeneration von Gewebe sowie die Blutdruckregulation wichtig [Carey et al., 1999].

Über die Effekte des  $AT_4$ - Rezeptors ist bislang wenig bekannt. Er wird in den verschiedensten Geweben exprimiert. Bislang wird ihm eine Beteiligung an der Kognition [Chai et al., 2004] und an der kardiovaskulären Regulation zugesprochen [Kerins et al., 1995].

Weiterhin aktiviert ANG II einen zum Kreislaufzentrum gehörenden Hirnnervenkern in der Medulla oblongata. Dies führt sowohl zu einer zentral vermittelten Vasokonstriktion als auch zu einer Steigerung der direkten Wirkung von ANG II. Außerdem löst ANG II das Durstgefühl durch eine stimulierende Wirkung im Hypothalamus aus und wirkt zudem fördernd auf die Regulation des Salz-Appetits. In der Hypophyse stimuliert ANGII die Freisetzung von ADH und in der Nebennierenrinde (NNR) die Sekretion von Aldosteron aus der Zona glomerulosa.

#### 2.1.1.1 Aldosteron

Aldosteron wurde erstmals im Jahr 1953 isoliert und als "amorphe, das Salz im Körper retinierende Substanz" beschrieben [Simpson und Tait, 1953]. Es gehört zu den C21-Steroiden und wird aufgrund seiner besonderen Wirkung auf den Elektrolythaushalt als Mineralokortikoid bezeichnet, obwohl es in hohen Konzentrationen auch glukokortikoide Effekte ausüben kann. Die Synthese erfolgt in der äußeren Schicht der NNR, der Zona glomerulosa. Wie alle Steroidhormone entstammt Aldosteron dem Cholesterol-Metabolismus.

Über die Substrate Pregnenolon und Progesteron wird 11-Desoxykortikosteron gebildet, aus welchem sowohl das Glukokortikoid Kortikosteron als auch Aldosteron entstehen können. Entscheidend für die Differenzierung in Kortikosteron bzw. Aldosteron sind zwei Enzyme, welche die letzten Syntheseschritte katalysieren und eine spezifische Lokalisation in der Nebenniere aufweisen. Die 11 $\beta$ -Hydroxylase CYP11B1, die in Zellen der Zona fasciculata, der mittleren Schicht der NNR, vorkommt, katalysiert die Synthese von Kortikosteron und einem weiteren Glukokortikoid, dem Kortisol. Die Aldosteronsynthase CYP11B2 wird nur in den Zellen der Zona glomerulosa exprimiert und ist maßgeblich für die letzten Schritte der Aldosteronproduktion [Muller, 1998]. Man kann die Aldosteronsynthese in einen rasch



Abbildung 2: Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde modifiziert nach [White, 1994] & [Sackmann, 2009]

wirksamen und einen längerfristig nachweisbaren Abschnitt gliedern [Sackmann, 2009]. In der akuten Phase tritt innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach Stimulation ein Anstieg der Aldosteronkonzentration auf. Hervorgerufen wird dieser Effekt hauptsächlich durch einen kurzzeitig gesteigerten Transfer von Cholesterin in die Mitochondrien [Cherradi et al., 1998]. Längerfristig führt eine vermehrte Expression des Enzyms CYP11B2 zu einer anhaltend erhöhten Hormonsynthesekapazität [Condon et al., 2002].

Ein multifaktorielles Regulationssystem für die Aldosteronsynthese sorgt dafür, dass die Plasmaaldosteronkonzentration an akute Schwankungen und chronische Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushalts angepasst werden kann [Budack, 2004]. Eine Hyponatriämie und eine Hyperkaliämie stimulieren zum einen direkt die Zellen der Zona glomerulosa [White, 1994]. Zum anderen führen erniedrigte tubuläre Ionenkonzentrationen, insbesondere die Cl<sup>-</sup>-Konzentration, oder auch eine verminderte renale Perfusion im Rahmen eines akuten Blutdruckabfalls zu einer gesteigerten Renin-Freisetzung und setzen damit die Kaskade des RAAS in Gang, an deren Ende die Sekretion von Aldosteron steht. In diesem Fall handelt es sich also um einen indirekten Stimulus.

ANG II, welches hier den entscheidenden Reiz darstellt, sowie das im Hypophysenvorderlappen synthetisierte Peptidhormon ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) und der extrazelluläre K<sup>+</sup>-Spiegel gehören zu den wichtigsten Regulationsmechanismen für die Aldosteronproduktion. Allerdings reagieren die Glomerulosazellen nur kurzzeitig auf eine gesteigerte ACTH-Ausschüttung mit einer vermehrten Aldosteronsekretion. Eine längerfristige Stimulation durch ACTH hat einen inhibierenden Effekt [Sewer und Waterman, 2003].

Zahlreiche weitere Substanzen einschließlich des Peptids Adrenomedullin, sowie extrarenale und extraadrenale Faktoren wie ADH [Nussdorfer et al., 1997] & [Gallo-Payet und Guillon, 1998], und Prolaktin [Glasow et al., 1996] kontrollieren die Aldosteronproduktion. Darüber hinaus konnte man in zahlreichen Experimenten zur Untersuchung der Aldosteronregulation nachweisen, daß die Stoffe Endothelin, NO und ANP und Veränderungen der extrazellulären Osmolalität einen modulierenden Einfluss auf die Aldosteronsekretion haben [Rosolowsky und Campbell, 1990], [Hanke und Campbell, 2000], [Atarashi et al., 1985] & [Makara et al., 2000].

Ein Großteil der second messenger, die an der Regulation der Aldosteron-Freisetzung durch die drei wichtigsten Stimuli (ACTH, ANG II und K<sup>+</sup>) beteiligt sind, sind auch für zahlreiche andere zelluläre Vorgänge von grundlegender Bedeutung [Sackmann, 2009]. So wird die Wirkung von ACTH über den häufig im Organismus vorkommenden sekundären Botenstoff cAMP [Quinn und Williams, 1988] und die Stimulierung durch ANG II unter anderem durch den ebenso verbreiteten Phosphatidylinositolmechanismus<sup>8</sup> vermittelt [Spat, 1988] & [Spat et al., 1991]. Es wurde aber auch nachgewiesen, daß durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration die Aldosteronsekretion stimuliert wird [Spat et al., 1991] & [Rossier et al., 1996]. Hierzu bewirkt K<sup>+</sup> eine Membrandepolarisation, erhöht dadurch die

 $<sup>^{8}\</sup>mathrm{Aktivierung}$ oder Inaktivierung von Kaskaden durch Phosphorylierung <br/>oder Dephosphorylierung von Inositol.

Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und führt dadurch zu einem gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Influx [Sackmann, 2009].

Alle drei beschriebenen Regulationsmechanismen führen also direkt oder indirekt zu einer Erhöhung der intrazellulären zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder beeinflussen die zelluläre Aktivität durch Phosphorylierung anderer Eiweißmoleküle [Sackmann, 2009]. Auch pharmakologisch wirksame Substanzen, die eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration hervorrufen, können dadurch die Expression der Aldosteronsynthase induzieren [Yagci et al., 1996] & [Denner et al., 1996].

Als wichtiges Mineralokortikoid ist Aldosteron von essentieller Bedeutung für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Es dient der präzisen Einstellung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Balance, indem es in Aldosteron-sensitiven Epithelien die Reabsorption von Na<sup>+</sup> und Wasser steigert und zugleich die K<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>-Exkretion erhöht. Das Resultat ist eine Zunahme der Gesamtsalzmenge im Körper, welche im Zusammenspiel mit der Osmoregulation zu einer Erhöhung des extrazellulären Volumens und des Blutdruckes führt [Verrey et al., 1997] & [Pearce et al., 2003].

Die Aldosteron-sensitiven Epithelien befinden sich vor allem in den Nieren (distales Nephron), aber auch im Kolon, in den Speichel- und Schweißdrüsen.

In der Niere führt Aldosteron in den distalen Tubulusabschnitten zu einer funktionellen Aktivierung des ENaC [Chen et al., 1999] & [Rossier et al., 2002], der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [Verrey et al., 2003], des Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters [Abdallah et al., 2001] und des Cl<sup>-</sup>/Anionen-Austauschers [Verlander et al., 2003].

Der Mineralokortikoid-Rezeptor, an den Aldosteron am Zielgewebe bindet, ist ein nukleärer Rezeptor, welcher sich im ungebundenen Zustand im Zytoplasma der Zellen in einem Komplex mit anderen Proteinen befindet. Nach Bindung von Aldosteron findet eine Translokation des Steroid-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern statt, wo dann die Genexpression moduliert wird.

#### 2.2 Hypertonie

Erkrankungen des Herz-Kreislaufssystems bestimmen in den industrialisierten Ländern in hohem Maße das Morbiditäts- und Mortalitätsgeschehen. Bei mehr als 40 % aller Verstorbenen in der Bundesrepublik Deutschland lag in den letzten Jahren eine Herz-Kreislauferkrankung vor [Bundesamt, 2008]. Damit stehen diese noch vor den Krebserkrankungen an der Spitze der Todesursachenstatistik. Die arterielle Hypertonie, als Teil der Herz-Kreislauferkrankungen, ist, zusammen mit der chronischen Herzinsuffizienz, nach wie vor die häufigste Ursache für die kardiovaskuläre Mortalität. Sie stellt ein komplexes und heterogenes Krankheitsbild dar. Die Pathogenese ist ein multifaktorieller Prozess, in den sowohl polygenetische Faktoren als auch multiple Umwelteinflüsse involviert sind [Alexander, 1995]. Sowohl der Erkrankungszeitpunkt, als auch der Schweregrad werden durch die individuellen Voraussetzungen eines Patienten bestimmt.

Als Folgen eines längerfristigen Bluthochdruckes sind vor allem Erkrankungen des zerebralen Gefäßsystems (Schlaganfall), die koronare Herzkrankheit einschließlich des Myokardinfarktes, periphere Durchblutungsstörungen, Herzinsuffizienz und chronische Nierenerkrankungen zu nennen. Anhand der FRAMINGHAM-Studie [Ho et al., 1993] wird die "kardio- und zerebrovaskuläre Risikopotenzierung"aufgrund einer linksventrikulären Hypertrophie, deren Ursache eine chronische arterielle Hypertonie war, deutlich dargestellt: "ein 7- bis 8-fach höheres Risiko einer Herzinsuffizienz, ein 6-fach höheres Risiko bezüglich koronarer Mortalität, ein 2-3-fach höheres Risiko eines Herzinfarkts, ein 4-8-fach höheres Risiko eines Apoplexes sowie ein 2-6-fach höheres Risiko für periphere arterielle Verschlusskrankheiten"[Afkham, 2003].

#### 2.2.1 Definition und Klassifikation der Hypertonie

Ein krankhaft erhöhter Blutdruck, auch als manifeste arterielle Hypertonie (im weiteren: Hypertonie) bezeichnet, liegt vor, wenn der systolische Blutdruck einen Wert von mindestens 140 mmHg annimmt und der diastolische Druck bei 90 mmHg oder höheren Werten liegt. Zum Vergleich: der ideale Blutdruck liegt bei einem systolischen Druck von 120 mmHg und einem diastolischen Druck von 80 mmHg. Der systolische Wert entsteht bei der Anspannungsund Auswurfphase des Herzens, während der diastolische Wert bei der Entspannungs- und Füllungsphase zustande kommt und dem Minimaldruck im Gefäßsystem entspricht.

Von einer Hypertonie spricht man, wenn einer der beiden Werte erhöht ist, oder beide über der Norm liegen. Voraussetzung ist, daß die Werte bei mindestens zwei Gelegenheitsmessungen an verschiedenen Tagen unter Standardbedingungen festgestellt wurden. Unter Standardbedingungen versteht man unter anderem, daß der Patient sich während der Messungen in einem Zustand der psychischen und physischen Ruhe befindet. Diese Definition bezieht sich außerdem auf die manuelle auskultatorische Messung, die von einem Arzt oder geschultem medizinischem Personal unter klinischen Bedingungen durchgeführt wird [Chalmers, 1999] & [Chalmers et al., 1999].

Kategorie	Systolisch (mmHg)		Diastolisch (mmHg)
Optimal	< 120	und	< 80
Normal	120 - 129	und/oder	80 - 84
Hochnormal	130 - 139	und/oder	85 - 89
Grad 1 Hypertonie (leicht)	140 - 159	und/oder	90 - 99
Grad 2 Hypertonie (mittelschwer)	160 - 179	und/oder	100 - 109
Grad 3 Hypertonie (schwer)	$\geq 180$	und/oder	$\geq 110$
Isolierte systolische Hypertonie	$\geq 140$	und	< 90

Es können alle möglichen Kombinationen von systolischem und diastolischem Bluthochdruck auftreten.

Abbildung 3: Definition und Klassifikation von Blutdruckbereichen nach den Leitlinien der European Society of Hypertension (ESH) und der European Society of Cardiology (ESC) 2007 [Mancia et al., 2007].

Dabei bleibt zu bedenken, daß eine solche numerische Einteilung der Hypertonie immer willkürlich bleibt, da das individuelle kardiovaskuläre Risiko eines Patienten nicht berücksichtigt wird [Hochdruckliga, 2009]. Die genannten Schwellenwerte der Hypertonie sollten demnach als flexible Richtwerte betrachtet werden, die individuell adaptiert werden müssen [Mancia et al., 2007]. Die Deutsche Hochdruckliga (DHL) verweist in diesem Zusammenhang auf eine mehr als 30 Jahre alte Definition von Evans und Rose [Hochdruckliga, 2009]: "Die Hypertonie sollte als die Blutdruckhöhe definiert werden, ab welcher Diagnostik und Behandlung für den Patienten von Vorteil sind"[Evans und Rose, 1971].

#### 2.2.2 Primäre und sekundäre Hypertonie

Die dem Bluthochdruck zugrunde liegenden Ursachen sind vielfältig. Es ist dabei grundsätzlich zwischen der primären und der sekundären Hypertonie zu differenzieren. Während bei der primären oder essentiellen Hypertonie keine ursächlichen Pathomechanismen nachgewiesen werden können, tritt die sekundäre oder symptomatische Hypertonie als Folge einer Grunderkrankung anderer Organe auf.

#### 2.2.2.1 Die primäre Hypertonie

Da bei etwa 90 - 95 % der Patienten [Kaplan, 1998] die Ätiologie für ihren erhöhten Blutdruck ungeklärt ist, spricht man in diesen Fällen von einer essentiellen Hypertonie, die somit den weitaus größten Teil der Bluthochdruckformen einnimmt und eine Ausschlußdiagnose darstellt. Die primäre Hypertonie ist multifaktoriell bedingt, und das Verständnis dieses Krankheitsgeschehens durch den individuellen Einfluss von genetischen Komponenten und Umwelteinflüssen erschwert. Es sind diverse Faktoren bekannt, die die Manifestation einer Hypertonie fördern, wobei keiner dieser Punkte eine dominierende Rolle zu spielen scheint.

Die renalen Mechanismen der Na<sup>+</sup>- und Wasserexkretion, das RAAS, sowie das sympathische Nervensystem sind in ihrer Funktion stark vernetzt, daher sind die Ursachen der essentiellen Hypertonie in einem Ungleichgewicht dieser für den Blutdruck bedeutsamen Regulationssysteme zu suchen.

In mehreren Familienstudien konnte man nachweisen, daß die Blutdruckwerte bei Zwillingen sehr stark korrelieren, bei Verwandten ersten Grades nur noch ein moderater, und bei Adoptivkindern und ihren Eltern gar kein Zusammenhang bei den Blutdruckwerten mehr festgestellt werden kann [Feinleib et al., 1977]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß das relative Risiko, eine Hypertonie zu entwickeln, steigt, wenn in der leiblichen Verwandtschaft Fälle von Hypertonie aufgetreten sind, vor allem wenn diese Verwandten zur Zeit der Diagnosestellung relativ jung waren [Luft et al., 1987]. Diese Tatsachen lassen den Schluss zu, daß genetische Faktoren zu einem großen Teil für die Entwicklung einer Hypertonie verantwortlich sind. Dies vermutete man schon in der Mitte des 20. Jahrhunderts, jedoch diskutierte man damals heftig, ob der Erkrankung ein oder einige wenige Gene mit klassischem Mendelschem Erbgang oder eine ganze Reihe an Genen, die jeweils einen kleinen Effekt ausüben, zugrunde lägen [Zanchetti, 1986].

Zwar sind tatsächlich einige Formen familiärer Hypertonie monogenetischen Ursprungs [Shimkets et al., 1994], [Lifton et al., 1992] & [Mune et al., 1995] bekannt, eine dieser seltenen Erkrankungen ist das in Kap. 2.4 beschriebene Liddle's Syndrom, doch man ist sich heutzutage sicher, daß dem Gros der Erkrankungen eine polykausale Ätiologie zugrunde liegt.

Der Bluthochdruck wird hierbei als quantitatives Phänomen angesehen, welches mehrere, unabhängig voneinander vererbte Genveränderungen erfordert und dessen Ausmaß zusätzlich von diversen Umweltfaktoren wie den persönlichen Lebensbedingungen beeinflusst wird. Die verschiedenen Faktoren können in individuell sehr unterschiedlicher Ausprägung zur Hypertonie führen [Lifton, 1995].

Bei solch komplexen Krankheiten, die demnach durch Wechselwirkungen von genetischen und externen Faktoren entstehen, spricht man auch von genetischer Suszeptibilität, das heißt, daß spezielle Varianten von Genen die Prädisposition für eine bestimmte Erkrankung erhöhen. Solche sogenannten Suszeptibilitätsgene würden somit das Risiko für die Entwicklung eines Bluthochdruckes erhöhen, wären aber für sich genommen weder einzeln ausreichend noch zwingend notwendig für die Entstehung dieses Krankheitsbildes [Rutherford, 2003]. Erst die Summierung dieser genetischen Varianten bewirkt also in Verbindung mit Umwelt-Interaktionen, wie z.B. Adipositas oder erhöhtem Salzkonsum den Phänotyp des Hypertonikers [Staessen et al., 2003]. Die Identifizierung von Genen, die an der Entstehung des Bluthochdruckes beteiligt sind, wird also dadurch erschwert, daß nicht nur Gen-Umwelt-Interaktionen, sondern auch Gen-Gen-Interaktionen einen wesentlichen Einfluss auf den variablen Phänotyp haben [Carretero und Oparil, 2000].



# Abbildung 4: Die essentielle Hypertonie als Ergebnis eines Zusammenspiels von genetischen und umweltbedingten Faktoren (mod. nach [Rutherford, 2003]).

Die polygenetische Vererbung spielt also, neben den externen Faktoren, bei der Pathophysiologie des Bluthochdruckes die größte Rolle. Jedes einzelne in die Blutdruckregulation involvierte Gen bewirkt einen kleinen phänotypisch sichtbaren Effekt. Erst die Gesamtheit der genetischen Varianten, die dazu führt, daß der Blutdruck einen willkürlich definierten Schwellenwert überschreitet, bildet die genetische Grundlage des Bluthochdrucks.

Die Erforschung der Pathogenese der Hypertension wird zudem durch den Umstand erschwert, daß sich das Krankheitsbild sehr vielgestaltig darstellen kann. Das liegt daran, daß nicht genau ein Phänotyp durch einen Genotyp hervorgerufen wird, sondern eine phänotypische Ausprägung durch die Vielzahl von variablen genetischen Veränderungen hervorgerufen und darüber hinaus durch exogene Einflüsse weiter modifiziert wird. Gründe hierfür sind z.B. unbekannte genetische Interaktionen, sowie die ineinander greifenden Mechanismen der Blutdruckregulation, die sich immer wieder beeinflussen und aufeinander reagieren, um die Homöostase, oder besser: Homöodynamik kardiovaskulärer Funktionen aufrechtzuerhalten.

#### 2.2.2.2 Die sekundäre Hypertonie

Die sekundäre Hypertonie wird bei 5 – 10 % aller Patienten mit Bluthochdruck diagnostiziert. In diesen Fällen führt eine andere Grunderkrankung zum pathologisch erhöhten Blutdruck. Die kausale Behandlung spielt hier bei der Therapie neben der Blutdrucksenkung eine wichtige Rolle.

Die häufigsten Ursachen für eine sekundäre Hypertonie sind Erkrankungen der Nieren, des endokrinen Systems, des zentralen Nervensystems (ZNS), sowie der Blutgefäße. Dem renalen Hochdruck liegen in den meisten Fällen folgende, sich teilweise überschneidende Pathomechanismen zugrunde : Eine Stenose (Einengung), der Aorta oder der Nierenarterie, aber auch eine Verengung renaler Arteriolen und Kapillaren verursachen eine renale Ischämie, die in der Niere zur Freisetzung von Renin führt. Man spricht in diesem Fall vom Goldblatt-Mechanismus. Uber die in Kap. 2.1.1 beschriebenen Mechanismen wird das RAAS aktiv und führt einerseits über das stark vasokonstriktorisch wirkende ANG II zu einer Erhöhung des TPR und andererseits über das Aldosteron zu einem erhöhten Extrazellulärvolumens (EZV) und damit zu einer Steigerung des HZV. Beide Ereignisse verursachen eine Erhöhung des Blutdruckes [Silbernagl und Lang, 2005]. Auch Renin-produzierende Tumore und Zystennieren sind als Gründe für eine renale Hypertonie bekannt. Weiterhin können nephrologische Erkrankungen (z.B. Glomerulonephritis<sup>9</sup>, interstitielle Nephritis, Niereninsuffizienz), die mit einer Reduktion des funktionsfähigen Parenchyms<sup>10</sup> einhergehen, durch die verminderte Exkretionsleistung zu einer Na<sup>+</sup>-Retention führen, wodurch sekundär ebenfalls das EZV vergrößert wird. Man spricht hierbei von einer primär hypervolämischen Form der renalen Hypertonie [Silbernagl und Lang, 2005].

Darüber hinaus führt jede vorbestehende chronische Form des Bluthochdruckes zur sekundären Schädigung der Nieren, wodurch eine bestehende Hypertension unabhängig von der primären Ursache fixiert werden kann (Nephrosklerose). Auch bei ursächlich anderen Hochdruckformen steht die Niere demnach oftmals im Mittelpunkt des pathologischen Geschehens.

Der endokrin bedingten Hypertonie liegen ganz unterschiedliche Phänomene zugrunde: Das Phäochromozytom, ein Katecholamin-produzierender Tumor des Nebennierenmarks, verursacht unkontrolliert hohe Adrenalin-und Noradrenalinspiegel, wodurch gleichzeitig das HZV und der TPR erhöht werden.

Unter dem Begriff adrenaler Hyperkortizismus versteht man verschiedene Krankheitsbilder, die durch eine Überfunktion der NNR hervorgerufen werden. Das Cushing-Syndrom führt über verschiedene Mechanismen zu einem übermäßig hohen Glukokortikoidspiegel im Plasma. Über eine Erhöhung des HZV durch eine Verstärkung der Katecholaminwirkung, sowie die mineralokortikoiden Effekte hoher Kortisolspiegel (Na<sup>+</sup>-Retention) kommt es zur Hypertonie [Silbernagl und Lang, 2005].

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>Entzündung der Nierenkörperchen.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup>Funktionelles Grundgewebe eines Organs.

Das Conn-Syndrom beschreibt den primären Hyperaldosteronismus, in den meisten Fällen hervorgerufen durch ein Nebennierenadenom, welches Aldosteron im Übermaß produziert. Demgegenüber steht der sekundäre Hyperaldosteronismus, z.B. verursacht durch die in Kap. 2.1.1. beschriebene renale Stimulation des RAAS.

Weiterhin ist das adrenogenitale Syndrom zu nennen, eine meist erblich bedingte Enzymopathie, bei der es durch z.B. einen  $11\beta$ -Monooxygenasemangel zur Blockierung der Kortisolbildung in der NNR kommt. Dadurch wird die ACTH-Ausschüttung enthemmt, was letztendlich zur Salzretention und zur Hypertonie führt. Durch Schädigungen des ZNS (Enzephalitis<sup>11</sup>, Hirnödem, Hirntumor) kann es zu Beeinträchtigungen der Steuerungsprozesse des autonomen Nervensystems kommen, deren Folge eine neurogene Hypertonie (Entzügelungshochdruck) ist. Fehlbildungen des Gefäßsystems können ebenfalls eine Hypertonie hervorrufen. Besonders zu erwähnen ist die Erwachsenenform der Aorten-Isthmusstenose, bei der proximal der Stenose ein erhöhter Blutdruck auftrifft, distal dagegen eine Hypotonie, wodurch es wiederum zu einer Aktivierung des RAAS kommen kann.

#### 2.2.3 Salzkonsum und Hypertonie

Der Einfluss des Kochsalzes auf den Blutdruck wird seit langem untersucht und die Rolle eines erhöhten Salzkonsums in der Pathogenese der Hypertonie ist noch immer strittig [Alderman, 2002], [Elliott und Stamler, 2002], [Freeman und Petitti, 2002], [He und MacGregor, 2002] & [MacGregor und de Wardener, 2002]. Viele Forschergruppen fordern eine Kochsalzrestriktion und sind von der blutdrucksenkenden Wirkung als geeignete Methode zur Prävention der arteriellen Hypertonie und ihrer Folgeerkrankungen überzeugt.

Da nur bei einem gewissen Prozentsatz aller Menschen das Phänomen auftritt, daß sie bei einem Überangebot an Kochsalz mit einem verstärkt ansteigenden bzw. bei salzrestriktiver Diät mit einem signifikant abfallenden Blutdruck reagieren [Linß und Wedler, 1991], nimmt man an, daß ein Teil der Bevölkerung eine möglicherweise genetisch verankerte Salzsensitivität besitzt. Der Anteil salzsensitiver Personen in der Bevölkerung wird auf 9 - 20 % geschätzt [Soldner et al., 1996]. wie bereits erwähnt, bedarf es sogenannter exogener Realisatoren, d.h. Umstände und Risikofaktoren, die bei vorliegender genetischer Disposition die Entwicklung der Hypertonie begünstigen. Einer dieser exogener Faktoren kann eine hohe alimentäre Kochsalzzufuhr sein

Durch eine exzessive Salzaufnahme kommt es im Normalfall über eine inadäquate Na<sup>+</sup>-Exkretion (Diskrepanz zwischen Na<sup>+</sup>- Aufnahme und Na<sup>+</sup>- Exkretion) zu einer Erhöhung des intravasalen Flüssigkeitsvolumens, was zu einer Hemmung des RAAS führt und dadurch die Reabsorption von Salz und Wasser durch die Niere reduziert. Allerdings wird bei vielen hypertensiven Patienten das RAAS eher stimuliert als unterdrückt. Die blutdruckstei-

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup>Entzündung des Großhirns

gernde Wirkung von Kochsalz ist sowohl an das Na<sup>+</sup>- wie auch an das Cl<sup>-</sup>-Ion gebunden. Nicht-Cl<sup>-</sup>-haltige Salze wie Natriumhydrogenkarbonat ( $NaHCO_3$ ) führen zu keiner Blutdrucksteigerung. Ein von der Salzaufnahme unabhängiger Blutdruck wird als salzresistent bezeichnet.

Bis heute ist es nicht gelungen, die Salzsensitivität hinlänglich und zufriedenstellend zu erklären. Um eine Salzsensitivität zu diagnostizieren, muß ein Salzbelastungs- und Salzrestriktionsregime bei den Probanden vorgenommen und eine darauf folgende Blutdruckänderung festgestellt werden. Anhand der Blutdruckreaktion, welche bei salzsensitiven Menschen deutlicher ausfällt, als bei salzresistenten Probanden, wird die Einteilung in die beiden Kategorien vorgenommen. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und für die Patienten äußerst strapaziös. Die Identifizierung von genetischen Grundlagen für die Salzsensitivität könnte die Detektierung von Risikopersonen wesentlich vereinfachen.

Die Arbeitsgruppe um Bernhard C. Rossier konnte, wie schon erwähnt, 1999 an einem Mausmodell mit einer gain-of-function<sup>12</sup> Mutation des ENaC zeigen, daß erst unter hoher Salzdiät der Phänotyp des Liddle's Syndroms induziert werden kann, wobei die heterozygoten Tiere einen weniger deutlichen Phänotyp aufwiesen [Pradervand et al., 1999]. Es handelt sich demnach um eine salzempfindliche Form der Hypertonie. Aus Kreuzungen dieser Mausmutante mit der BK $\beta$ 1 Knockout Maus ist die heterozygote Doppelmutante (+/L +/d) entstanden, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup>Funktionssteigerung.

### 2.3 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Transmembranproteine, die elektrisch geladenen Teilchen, den Ionen, dazu verhelfen, biologische Membranen per Diffusion zu durchqueren. Der Transport der Ionen findet hierbei passiv entlang eines bestehenden elektrochemischen Gradienten statt. Damit unterscheiden sie sich entscheidend von den energieverbrauchenden Ionenpumpen, die Ionen entgegen ihres Konzentrationsgefälles transportieren. Die meisten dieser integralen Membranproteine sind mehr oder weniger selektiv, das heißt, sie besitzen unterschiedliche Leitfähigkeiten für spezifische Ionen. Man kann sie deshalb beispielsweise in Ca<sup>2+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>- sowie Cl<sup>-</sup>-Kanäle einteilen. Differenzierte physikalische Eigenschaften lassen eine weitere Spezifizierung der Kanäle zu. Die Patch-Clamp-Technik, eine Messmethode der Elektrophysiologie, ermöglichte es, die wenige Picoampere (pA) großen Ionenströme über einzelne Kanalproteine zu erfassen und so ihre elektrischen und kinetischen Eigenschaften zu registrieren, sowie Regulatoren des Schaltverhaltens, wie Hormone oder Neurotransmitter und pharmakologische Sensitivitäten zu identifizieren [Ashcroft, 1999] & [Hille, 2001].

Die Steuerung des Öffnungsverhaltens von Ionenkanälen kann durch verschiedene Faktoren, wie z. B. durch Änderung der Spannung an der Zellmembran, Ligandenbindung, mechanische Deformation des Ionenkanals oder Änderung des pH-Wertes, [Klinke und Silbernagl, 2003] erfolgen. In Kooperation mit anderen Transportproteinen sind Ionenkanäle von entscheidender Bedeutung für Transportvorgänge über die Zellmembranen und bieten wichtige Ansatzpunkte für medikamentöse Therapien mittels Kanal-öffnender oder -blockierender Pharmaka.

## 2.3.1 BK-Kanal (big conductance Ca<sup>2+</sup>-aktivierter K<sup>+</sup>-Kanal)

#### 2.3.1.1 Klassifizierung

 $K^+$ -Kanäle stellen die größte Gruppe von Ionenkanälen dar [Hille, 2001] und werden in großer Dichte und Vielfalt im Körper exprimiert. Sie kommen sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen sowie in Tumorzellen vor und haben, wie ihre breite Expression schon vermuten lässt. verschiedenste Funktionen, wie z. B. die Regulation des Membranpotentials, sowie der Zellgröße über Beeinflussung der Zellosmolarität, die Zellproliferation, die Regulierung der Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen, der Salz- und Wasserhomöostase in renalen Zellen und der Apoptose<sup>13</sup>.

Die Molekularbiologie und speziell die genetische Kartierung ermöglichten es, die Kanäle in verschiedene Subtypen einzuteilen. Die verschiedenen Hauptfamilien werden anhand der Kanal-Architektur, der Membrantopologie und homologer Sequenzen der  $\alpha$ - Untereinheiten der K<sup>+</sup>-Kanäle unterschieden [Krause, 2004]. Sie werden aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von hydrophoben Transmembransegmenten (TM) der  $\alpha$ -Untereinheiten in mehrere Strukturklassen eingeteilt. Zu den Kanälen mit der einfachsten  $\alpha$ -Untereinheit, welche nur

 $<sup>^{13}\</sup>mbox{Induzierter}$  Zelluntergang.

aus zwei Transmembrandomänen (2TM-Klasse) besteht, gehört z.B. die Familie der sogenannten einwärts gleichrichtenden K<sup>+</sup>-Kanäle [Ashcroft, 1999]. Zu der Strukturklasse mit vier (zwei x zwei) Transmembrandomänen gehören z.B. die TWIK-Kanäle (Tandem pores in a Weak Inward Rectifying K+ channel) [Lesage et al., 1996].

Weit verbreitet sind die K<sup>+</sup>-Kanäle, deren  $\alpha$  Untereinheiten aus sechs transmembranen Helices<sup>14</sup> (6TM-Klasse) bestehen, wie unter anderem die KCNQ-Kanäle, die Familie der EAG (ether à go-go)-Kanäle<sup>15</sup>, die spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle und die Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanäle.

Zu den Ca<sup>2+</sup>- und zum Teil spannungabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen zählt eine Gruppe strukturell und funktionell unterschiedlicher Kanäle, deren Gemeinsamkeit es ist, der Aktivierung durch intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> zu unterliegen. Bislang wurden dieser Gruppe die SK- <sup>16</sup>, IK-<sup>17</sup>und BK-Kanäle zugeordnet.

Der BK-Kanal (auch KCNM1, Slo (slowpoke) oder MaxiK<sup>+</sup>-Kanal genannt) wurde als Erster dieser drei Ca<sup>2+</sup>- abhängigen Kanälen identifiziert. Er weist nur eine geringe Homologie zu den übrigen Familienmitgliedern auf, besteht insgesamt aus sieben Transmembransegmenten und wird als einziger neben der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auch durch eine Membrandepolarisation aktiviert. BK steht für Big Conductance, da dieser Kanal eine sehr hohe Einzelkanalleitfähigkeit (100 – 250 pS<sup>18</sup>) besitzt.

#### 2.3.1.2 Struktur und Aufbau

BK-Kanäle werden aus heterooligomeren<sup>19</sup> Komplexen von porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten (neue Nomenklatur: KCNM 1) sowie diesen angeschlossenen  $\beta$ -Untereinheiten (neue Nomenklatur: KCNMB 1-4) mit regulatorischer Funktion [Garcia-Calvo et al., 1994] & [Behrens et al., 2000] gebildet. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind membranständige Proteine [Wallner et al., 1999], bestehen aus zwei transmembranen Domänen und weisen eine große extrazelluläre Schleife mit zwei Glycosylierungsstellen<sup>20</sup> und vier Cysteinloci<sup>21</sup>, welche Disulfidbrücken<sup>22</sup> [Brenner et al., 2000a] ausbilden, aus. Der N- und der C-Terminus liegen intrazellulär. Bislang wurden vier verschiedene  $\beta$ -Varianten ( $\beta$ 1 –  $\beta$ 4) mit unterschiedlichen Genen und Spleißmöglichkeiten identifiziert, die je nach Gewebetyp unterschied-

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup>Die Zellmembran durchsetzende Struktur, deren molekulare Anordnung schraubenförmig ist.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup>Benannt nach der Reaktionen der Taufliege *Drosophila melanogaster* auf Etheranästhesie[Kaplan und Trout, 1969] & [Ikeda und Kaplan, 1970]: unterschiedliche Schüttelbewegungen - Shaker (Sh), ether-à-go-go (EAG), slowpoke (slo) und hyperkinetisch (hk).

 $<sup>^{16}</sup>$ small conductance; Ca $^{2+}$ -aktivierter K $^+$ -Kanal mit sehr geringer Einzelkanalleitfähigkeit:  $\leq 20~\mathrm{pS}$ 

 $<sup>^{17}</sup>$ intermediate conductance; Ca $^{2+}$ -aktivierter K $^+$ -Kanal mit mittlerer Einzelkanalleitfähigkeit: 20 - 80 pS $^{18}$ Picosiemens.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup>Moleküle, welche aus mehreren unterschiedlichen Einheiten aufgebaut sind, bezeichnet man als Heterooligomere.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup>Glycosylierung beschreibt einen Prozeß, bei welchem an Proteine oder Lipide Saccharide enzymvermittelt gekoppelt werden. Über diesen Vorgang werden viele intrazelluläre Signalabläufe vermittelt.

 $<sup>^{21}{\</sup>rm Schwefelhaltige}$  Aminosäure,

 $<sup>^{22}</sup>$ an deren Schwefel<br/>enden sich unter Abspaltung von Schwefel-Schwefelverbindungen ausbilden. Z.B.: Entstehung von Cystin.

lich exprimiert werden. So kommen z.B. in der Gefäßmuskulatur [Brenner et al., 2000a], [Brenner et al., 2000b] & [Patterson et al., 2002], in der glatten Muskulatur von Uterus und Ovar [Behrens et al., 2000] und im Gehirn [Weiger et al., 2000] verschiedene Subtypen der  $\beta$ -Untereinheit vor. DIe  $\beta$ 1-Untereinheit, welche bei dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell genetisch inaktiviert ist, wird hauptsächlich in den glatten Muskelzellen exprimiert [Knaus et al., 1994a]. Die  $\beta$ -Untereinheiten üben einen wichtigen modulierenden Effekt aus, indem sie die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des Kanals steigern und das Aktivierungsverhalten beeinflussen. [Tseng-Crank et al., 1996] & [Brenner et al., 2000b]. Zudem werden je nach Subtyp die pharmakologischen Eigenschaften, wie z.B. die Blockung des Kanals durch Iberiotoxin beeinflusst [Ransom et al., 2002] & [Orio et al., 2002] . Die Stöchiometrie der akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten variiert gegenüber den porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten. Im Allgemeinen wird die  $\beta$ 1-Untereinheit in den glatten Muskelzellen im Verhältnis 1:1 zu der  $\alpha$ -Untereinheit exprimiert [Knaus et al., 1994a], während z.B. im Gehirn die  $\alpha$ -Untereinheit öfter vorkommt als die  $\beta$ -Untereinheit. In diesem Fall handelt es sich um die  $\beta$ 4-Untereinheit.

Für einen funktionstüchtigen Kanal ist die Assoziation von vier  $\alpha$ -Untereinheiten zu einem tetrameren Proteinkomplex notwendig. Allen bisher bekannten  $\alpha$ -Untereinheiten von K<sup>+</sup>-Kanälen ist mit kleinen Variationen die sogenannte Signatursequenz (S) in der Porenregion gemeinsam. Diese besteht aus 21 Aminosäuren und weist eine sehr starke Homologie innerhalb der Mitglieder der K<sup>+</sup>-Kanäle auf [Budack, 2004]. Man geht davon aus, daß dieser Bereich innerhalb der Kanalpore einen Selektivitätsfilter für K<sup>+</sup>-Ionen bildet [Hartmann et al., 1991] & [Heginbotham et al., 1994].

Die zentrale Pore wird bei allen Mitgliedern der 6TM-Klasse von den Segmenten S5 und S6 gebildet. Die ersten vier Segmente bilden einen Komplex, der das Öffnen und Schließen der Pore modulieren kann. Die ersten drei dieser Segmente sind fast vollständig über ihre gesamte Länge helikal geformt und befinden sich aufgrund ihrer hydrophoben Aminosäuren nahezu komplett in der Zellmembran. Das S4-Segment hingegen trägt eine charakteristische Aminosäurenabfolge mit Arginin an jeder dritten Position der Transmembranhelix. Dieses Segment hat eine besondere Bedeutung bei der Erfassung des Membranpotentials [Larsson et al., 1996] und wird auch als Spannungssensor bezeichnet. Obwohl in der Regel sowohl der N-Terminus als auch der C- Terminus zytoplasmatisch lokalisiert sind, bildet der BK-Kanal hier eine Ausnahme, da er ein zusätzliches Transmembransegment S0 besitzt, so daß der N-Terminus extrazellulär liegt [Meera et al., 1997].

Die  $\alpha$ -Untereinheit wird von nur einem Gen kodiert, welches durch unterschiedliches Spleißen des RNA-Transkripts verschieden exprimiert wird. Die dadurch entstehenden Spleißvarianten führen, gemeinsam mit den vier Varianten der  $\beta$ -Untereinheiten, zu den gewebespezifischen Unterschieden der BK-Kanaltypen, hinsichtlich der physiologischen Funktionen, wie z.B. Aktivierungskinetik und Leitfähigkeit [Kaczorowski et al., 1996] & [Liu et al., 2002].



Abbildung 5: Molekulare Struktur des BK-Kanals. Topologie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit [modifiziert nach [Orio et al., 2002]].

#### 2.3.1.3 Lokalisation und Funktion

BK-Kanäle wurden erstmals in Nervenzellen von Mollusken nachgewiesen [Thompson, 1977], [Meech, 1978] & [Hermann und Hartung, 1983] und konnten seitdem aus zahlreichen Geweben einschließlich Neuronen des ZNS [Tseng-Crank et al., 1996], glatten Muskelzellen [Knaus et al., 1994a], sowie renalen Tubuluszellen [Knaus et al., 1995] isoliert und identifiziert werden. Ihr nahezu ubiquitäres Vorkommen in Zellen und Geweben mit Ausnahme der Myozyten des Herzens [Toro et al., 1998] spricht für eine Beteiligung an vielfältigen physiologischen Prozessen und Mechanismen.

So steuern sie in Neuronen die Rückführung zum Ruhepotential nach einem Aktionspotential und regulieren die Freisetzung von Neurotransmittern [Tseng-Crank et al., 1996] & [Golding et al., 1999]. Weiterhin kann ihnen unter anderem eine Beteiligung an der Regulation der Sekretion exokriner Drüsen [Trautmann und Marty, 1984], sowie des Elektrolytund Wasserhaushaltes in Kolon [Grunnet et al., 1999] und Niere [Bravo-Zehnder et al., 2000] zugespochen werden. In der glatten Muskulatur beeinflussen die BK-Kanäle den Basaltonus und die Kontraktilität [Nelson und Quayle, 1995], [Hurley et al., 1999] & [Brzezinska et al., 2000] durch folgenden Mechanismus: für die Kontraktion der glatten Muskelzelle ist ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration essentiell. Der Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ist abhängig vom Membranpotential und seinen Veränderungen, da eine Membrandepolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle führt. Der BK-Kanal als ebenfalls spannungsabhängiger Ionenkanal wird auch durch eine Membrandepolarisation aktiviert und ermöglicht durch die Erhöhung der relativen K<sup>+</sup>-Permeabilität nicht nur die Repolarisation, sondern verursacht sogar eine Hyperpolarisation, welche zur Inaktivierung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle führt. Damit leistet der BK-Kanal einen wichtigen Beitrag zur Dämpfung zellulärer Erregung und zur Aufrechterhaltung des basalen myogenen Tonus [Nelson et al., 1995] & [Jackson, 2000].

#### 2.3.1.4 Aktivierung und Pharmakologie

Wie in Kap. 2.3.1.1 erwähnt, zeichnen sich BK-Kanäle im Unterschied zu den SKund IK-Kanälen durch eine hohe Einzelkanalleitfähigkeit aus und werden als einzige neben der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration spannungsabhängig durch Membranpotentialänderungen aktiviert. Durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird die Spannungssensitivität der BK-Kanäle erhöht [Toro et al., 1998]. Es reichen in Abhängigkeit von der Höhe der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration schon geringe Änderungen des Membranpotentials aus, um den Kanal zu öffnen.

BK-Kanäle werden durch die Skorpionsgifte Charybdotoxin, Slotoxin [Garcia-Valdes et al., 2001] und Iberiotoxin, sowie durch Paxillin<sup>23</sup>[Knaus et al., 1994b], Tetraethylammonium- (TEA) und Ba<sup>2+</sup>-Ionen gehemmt. Iberiotoxin und Paxillin wirken spezifisch inhibierend auf BK-generierte K<sup>+</sup>-Ströme, während TEA und Ba<sup>2+</sup>-Ionen hingegen unspezifisch blockierend wirken. Inzwischen sind auch eine Reihe BK-Kanal-aktivierender Substanzen bekannt. Recht selektiv aktivierend wirken z.B. NS1619<sup>24</sup> [Olesen et al., 1994] und Phloretin<sup>25</sup> [Gribkoff et al., 1996]. Mithilfe solch spezifischer pharmakologischer Modulatoren ist es heute leicht möglich, die komplexen Eigenschaften der BK-Kanäle näher zu untersuchen.

Die zahlreichen Funktionen, die die BK-Kanäle in ihrer weiten Verbreitung im Organismus ausüben, werden durch diverse modulierende Stoffe sichergestellt. Die stark repolarisierenden Eigenschaften des BK-Kanals führen dazu, daß seine Aktivität und Aktivierbarkeit durch intrazelluläre Signalwege einer strengen Kontrolle unterliegen und somit die Zellfunktionen rasch an akute Stoffwechselbedürfnisse angepasst werden können [Toro et al., 1998].

So verändern Proteinkinasen mittels Phosphorylierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten die Aktivität der BK-Kanäle in unterschiedlicher Weise [Schubert und Nelson, 2001]. An der Aktivierung der Proteinkinasen sind wiederum zahlreiche weitere Substanzen als second messenger beteiligt. Somit wirken z.B. die Signalkaskaden zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), cAMP und IP3 auf den Kanal ein.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup>Paxillin ist ein neurotoxisches, tremorauslösendes Alkaloid, welches zur Gruppe der Mykotoxine gehört und vom Schimmelpilz Penicillium paxilli gebildet wird.

 $<sup>^{24}</sup>$ Benzimidazol, welches mitochondriale Ca $^{2+}$ -aktivierte K $^+$ -Kanäle aktiviert.

 $<sup>^{25}\</sup>mathrm{Aglykon}$  (Nichtzucker) von dem Glycosid Phlorizin, welches spezifisch die Glukose-Resorption in den Nierentubuli durch Inhibition des Na<sup>+</sup>/Glukose-Kotransporters SGLT1 blockiert.

Ob es zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Kanäle kommt, hängt von der Lokalisation und der jeweiligen Proteinkinase ab. Sowohl die Proteinkinasen PKA und PKG als auch PKC modulieren den Kanal. PKA [Sadoshima et al., 1988] und PKG [Taniguchi et al., 1993] aktivieren, indem sie die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen. Allerdings kann PKA in endokrinen Zellen und in der Hypophyse einen inhibierenden Einfluss ausüben [Tian et al., 2001]. Auch PKC führt vornehmlich zu einer verminderten Aktivität der BK-Kanäle [Minami et al., 1993]. Die jeweiligen Mechanismen der Regulation bedürfen noch einer vollständigen Aufklärung. PKA und PKG phosphorylieren den Kanal an Serinen<sup>26</sup> in der Nähe des 3'-Endes der BK- $\alpha$ -Untereinheit [Tian et al., 1998]. Beide Reaktionen stehen anscheinend unter der Kontrolle der PKC, die durch die Phosphorylierung von benachbarten Serinen die PKA und PKG an ihrer Arbeit hindern kann [Zhou et al., 2001].

Auch ohne die Zwischenschaltung eines second messengers kann die Aktivität der BK-Kanäle beeinflusst werden. So üben andere körpereigene Botenstoffe ihren modulierenden Effekt direkt durch Interaktion mit der  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Untereinheit des Kanals aus. Östrogene und Tamoxifen<sup>27</sup>, z.B., erhöhen, bei Anwesenheit der  $\beta$ -Untereinheit, die Offenwahrscheinlichkeit der BK-Kanäle und bewirken eine Steigerung der Spannungssensitivität der Kanäle, so daß die Aktivierung bei geringeren Membranpotentialen erfolgen kann. Die beiden Substanzen interagieren hierbei von der extrazellulären Seite mit den BK-Kanälen [Valverde et al., 1999], [Dick und Sanders, 2001] & [Dick et al., 2002]. Zusätzlich reduziert Östrogen die Einzelkanalleitfähigkeit, was jedoch diesmal unabhängig von der  $\beta$ -Untereinheit geschieht und somit auf eine direkte Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit schließen lässt [Dick und Sanders, 2001]. Als weitere Modulatoren des BK-Kanals sind Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [Soto et al., 2002], ANG II [Toro et al., 1990] sowie Mg<sup>2+</sup> [Qian und Magleby, 2003] zu nennen.

#### 2.3.1.5 Die Funktion des BK-Kanals bei der Blutdruckregulation

Die glatte Muskulatur der Blutgefäße ist in wesentlichem Maße an der Regulation des peripheren Widerstandes beteiligt, in dem sie den Durchmesser der Gefäße durch Kontraktion oder Relaxation verändert. Der Ruhetonus der Gefäße ist sympathikoadrenerg vermittelt und wird darüber hinaus durch parakrine Faktoren beeinflusst [Julien et al., 1995], indem sie mittels Membranpotentialveränderungen das Kontraktionsverhalten der glatten Muskelzellen steuern. Das Membranpotential wird hauptsächlich durch den K<sup>+</sup>-Gradienten bestimmt. An glatten Muskelzellen lassen sich verschiedene K<sup>+</sup>-Kanaltypen unterscheiden: spannungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>V</sub>), ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>), einwärts gleichrichtende-K<sup>+</sup> Kanäle (inward rectifier, K<sub>ir</sub>) und Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>), zu denen auch der BK-Kanal gehört [Nelson und Quayle, 1995]. Eine Depolarisation des Membranpotentials führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle<sup>28</sup>. Das einströmende Ca<sup>2+</sup>

 $<sup>^{26}</sup>$ Serin ist eine nicht-essentielle, protein<br/>ogene, also am Aufbau von Proteinen beteiligte $\alpha$ -Aminosäure.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup>Ein Östrogenantagonist.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup>Spannungsgesteuerte Calciumkanäle.

löst durch folgenden Mechanismus eine Muskelkontraktion aus: Die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- Konzentration verursacht sogenannte Ca<sup>2+</sup>-Sparks. Das sind intrazelluläre und lokal begrenzte Ca<sup>2+</sup>-Transienten, die durch Öffnung von Ryanodin-sensitiven Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (Ryanodinrezeptoren) des sarkoplasmatischen Retikulums entstehen [Brenner et al., 2000b]. Diese Ca<sup>2+</sup>-Signale führen durch Bindung an die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit zur Öffnung der in der benachbarten Plasmamembran befindlichen Ca<sup>2+</sup>-aktivierten BK-Kanäle und induzieren dadurch sogenannte STOC's ("spontaneous transient outward currents"). Damit sind spontane transiente K<sup>+</sup>-Auswärtsströme gemeint. Die Membrandepolarisation führt ebenfalls zur Öffnung von spannungsabhängigen und auswärts gleichrichtenden K<sup>+</sup>-Kanälen. Der dadurch folgende K<sup>+</sup>-Ausstrom verursacht eine Hyperpolarisation der Zellmembran und nachfolgend ein Schließen der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Da die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>- Konzentration nun wieder sinkt, können die Zellen relaxieren. Die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die Ca<sup>2+</sup>-Spark-generierende Ryanodinrezeptoren und die BK-Kanäle operieren also gemeinsam als funktionelle Einheit, die zur Feineinstellung des myogenen Tonus in Gefäßmuskelzellen führt [Gollasch et al., 1998].

Desweiteren können BK-Kanäle in glatten Muskelzellen über NO direkt aktiviert werden; dies geschieht durch eine Nitrosylierung von Sulfhydrylgruppen der  $\alpha$ -Untereinheit [Bolotina et al., 1994] & [Lang et al., 2000]. Durch den folgenden K<sup>+</sup>-Austrom aus der Zelle kommt es zur Membranhyperpolarisation und zum Absinken des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über die spannungsabhängigen L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Die Konzentration an intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> nimmt wieder ab und es kommt zur Relaxation der Gefäßmuskulatur und zur Vasodilatation.

Die vier regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten der BK-Kanäle zeigen ein gewebespezifisch unterschiedlich starkes Vorkommen. In der glatten Muskulatur, einschließlich der der Blutgefäße, wird vor allem die  $\beta$ 1-Untereinheit exprimiert. Wie bereits erwähnt, erhöht die  $\beta$ 1-Untereinheit die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des Kanals und trägt damit maßgeblich zur Effektivität des Kanals bei der Limitierung der Vasokonstriktion bei. Bestätigt wurde diese Hypothese durch den Phänotyp von Mäusen, bei denen die  $\beta$ 1-Untereinheit genetisch inaktiviert wurde [Brenner et al., 2000b]. Die BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) zeigen einen erhöhten arteriellen Tonus in isolierten Gefäßen, welcher mit einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle und einer gestörten Kopplung von Calcium-Sparks und STOC's einhergeht [Budack, 2004]. Diese molekularen und zellulären Störungen stehen im Zusammenhang mit einem erhöhten systemischen Blutdruck und einer Herzhypertrophie. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die Abnahme der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität bei diesen Mäusen eine kausale Rolle für die arterielle Hypertonie spielt und möglicherweise eine direkte Folge des erhöhten Tonus in den arteriellen Widerstandsgefäßen ist [Brenner et al., 2000b], [Patterson et al., 2002] & [Kotlikoff und Hall, 2003]. Interessanterweise zeigen diese Mäuse, wie schon erwähnt, auch Veränderungen der Aldosteronsekretion aus den Zellen der Zona glomerulosa der NNR. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Hyperaldosteronismus bei  $BK\beta 1$  Knockout Mäusen (d/d) die wesentlichen Ursache der arteriellen Hypertonie darstellt [Lotshaw, 1997], [Budack, 2004] & [Sausbier et al., 2005][Grimm et al., 2009].

#### 2.3.2 Epithelialer Natriumkanal

#### 2.3.2.1 Klassifizierung, Lokalisation und Funktion

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein spannungsunabhängiger Kationenkanal, der sich durch eine hohe Ionenselektivität, eine niedrige Einzelkanalleitfähigkeit, eine langsame Kinetik [Rossier et al., 2002] und eine hohe Sensitivität für das K<sup>+</sup>-sparende Diuretikum Amilorid auszeichnet [Garty und Palmer, 1997], [Fyfe et al., 1998] & [Schild et al., 1997] und maßgeblich am Na<sup>+</sup>-Transport in Geweben beteiligt ist.

Der ENaC gehört zur ENaC/DEG Superfamilie, der auch die brain sodium channels (BNaC), die nur im Nervensystem von Säugern nachgewiesen wurden [Price et al., 1996], der FMRF-amid regulierte Na<sup>+</sup>-Kanal [Green et al., 1994], weitere Amilorid-sensitive Na<sup>+</sup>-Kanäle [Adams et al., 1998] und Proteine der Degenerin-Familie angehören [Kellenberger und Schild, 2002]. Die bislang bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie, es wurden ihr bereits mehr als 60 Vertreter zugeordnet [Bianchi und Driscoll, 2002], weisen untereinander gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So setzen sie sich aus verschiedenen Untereinheiten zu tetrameren Komplexen zusammen. Jede Untereinheit enthält zwei Transmembrandomänen, eine große extrazelluläre Schleife mit einer hochkonservierten Cystin-reichen Region, sowie zwei kurze zytoplasmatische N- und C-Termini. Die Aminosäuresequenzen der zugehörigen Kanäle stimmen zu etwa 15 bis 20 % überein. Die Mitglieder der Superfamilie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Ionenselektivität und ihrer Affinität zu dem K<sup>+</sup>-sparenden Diuretikum Amilorid [Kellenberger und Schild, 2002].

Neben  $Li^+$ -Ionen und Protonen ist der ENaC vor allem für Na<sup>+</sup>-Ionen durchlässig [Garty und Palmer, 1997] & [Alvarez de la Rosa et al., 2000] und spielt somit als Bestandteil der apikalen Zellmembran eine Schlüsselrolle bei dem Na<sup>+</sup>-Transport von Epithelien in Darm, Lunge, exokrinen Drüsen und der Niere. Der ENaC ist verantwortlich für die passive, elektrogene Aufnahme von Na<sup>+</sup> in die Zelle, während die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an der basolateralen Membran Na<sup>+</sup> aktiv aus der Zelle hinauspumpt. Auf diese Weise werden das Membranpotential und der transepitheliale Gradient aufgebaut, die der Sekretion von Kationen (K<sup>+</sup> und H<sup>+</sup>) oder der Resorption von Anionen [Miranda et al., 2009] dienen. Diese Kooperation von ENaC und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Epithelien dient damit der Sicherstellung zahlreicher Zellfunktionen, sowie der intrazellulären Homöostase und der Wahrung eines konstanten EZV[Mano und Driscoll, 1999]. In der Niere befindet sich der ENaC im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron, welches sich aus dem distalen Teil der Pars convoluta des distalen Tubulus, dem Verbindungsstück sowie dem kortikalen und medullären Abschnitt des Sammelrohrs zusammensetzt [Rossier et al., 2002].

#### 2.3.2.2 Struktur und Aufbau

Im Jahr 1993 wurde der ENaC aus dem Kolon der Ratte kloniert und sein molekularer Aufbau beschrieben [Canessa et al., 1993]. Dadurch konnten sowohl neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von Kanalstruktur und -funktion, als auch über die Regulation gewonnen werden. Es handelt sich um einen heterooligomeren Proteinkomplex, welcher sich aus drei verschiedenen homologen Untereinheiten ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) zusammensetzt. Die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peptide bestehen aus 698, 638 bzw. 650 Aminosäuren [Smith und Benos, 1991] mit einem Molekulargewicht von 80 bis 95 kDa [Garty und Palmer, 1997]. Sie weisen eine Sequenz-Homologie von etwa 30 - 35 % auf [Garty und Palmer, 1997] & [Canessa et al., 1994b]. Seine volle Funktionstüchtigkeit erlangt der Kanal nur in Kombination dieser Untereinheiten [Alvarez de la Rosa et al., 2000] & [Canessa et al., 1994b]. Im Gegensatz zu der  $\beta$ und  $\gamma$ -Untereinheit ist es der  $\alpha$ -Untereinheit jedoch möglich, auch wenn sie isoliert exprimiert wird, einen ausreichenden Na<sup>+</sup>-Fluss zu gewährleisten [McDonald et al., 1999]. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten besitzen regulatorische Eigenschaften und bewirken eine Steigerung des Na<sup>+</sup>-Transports, wenn sie mit der  $\alpha$ - Untereinheit assoziiert sind [Alvarez de la Rosa et al., 2000] & [Canessa et al., 1994b]. 1995 wurde erstmals eine  $\delta$ -Untereinheit beschrieben [Waldmann et al., 1995], die in Struktur und Funktion der  $\alpha$ -Untereinheit ähnelt, ebenso wie diese einen homomeren funktionstüchtigen Kanal ausbilden kann und, koexprimiert mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, eine erhöhte Leitfähigkeit für Na<sup>+</sup> zeigt[Ji und Benos, 2004]. Zum stöchiometrischen Aufbau des Kanals, d.h. zur Zusammensetzung der Untereinheiten, existieren unterschiedliche Angaben. Die meisten Autoren gehen zur Zeit von einer heterotetrameren Struktur (vier Untereinheiten:  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) des Kanals aus [Canessa et al., 1994b], [Firsov et al., 1998] & [Kosari et al., 1998], wobei neuere Untersuchungen vermuten lassen, dass sich der ENaC aus einer jeweils gleichen Anzahl von Untereinheiten zusammensetzt [Staruschenko et al., 2005].

Jede Untereinheit besitzt zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) mit kurzen zytoplasmatischen N- und C-Termini und einer großen extrazellulären Schleife, die die beiden hydrophoben transmembranären Segmente verbindet [Garty und Palmer, 1997] & [Schild et al., 1997]. Der zytoplasmatische N-Terminus ist an mehreren Schlüsselfunktionen des Kanals beteiligt. Er spielt sowohl für das Schaltverhalten (Gating) des Kanals [Chang et al., 1996] & [Grunder et al., 1997], als auch für die Assoziation der Untereinheiten und deren Transport zur Zellmembran [Benos und Stanton, 1999] eine wichtige Rolle. An eine Prolin-reiche Region am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit bindet das zytoskelettale Strukturprotein  $\alpha$ -Spektrin, was mit der Lokalisation oder Verankerung des ENaC in der Zellmembran im Zusammenhang stehen könnte [Rotin et al., 1994]. Die extrazelluläre Schleife stellt den größten Teil des Proteins dar und besitzt eine hochaffine Bindungsstelle für Amilorid [Schild et al., 1997]. Innerhalb dieser hydrophilen Domäne sind außerdem mehrere Glykolisierungsstellen lokalisiert [Canessa et al., 1994a]. Kennzeichnend sind zudem zwei konservierte Cystin-reiche Sequenzen, von denen man annimmt, daß


Abbildung 6: Tetramere Struktur des ENaC in Seitenansicht [modifiziert nach [Rossier et al., 2002] & [Bangel, 2006]].

sie am Transport des Kanals zur Zellmembran beteiligt sind [Firsov et al., 1999]. Der intrazelluläre C-Terminus enthält mehrere funktionelle Domänen, die an der Regulation der Anzahl an Kanälen in der Zellmembran beteiligt sind. Eine hochkonservierte Prolin-reiche Sequenz (PPPxY) im C-Terminus, die als PY-Motiv bezeichnet wird, interagiert mit einer Ubiquitin-Ligase namens Nedd4-2 . Diese Interaktion ermöglicht die Ubiquitinierung<sup>29</sup> der Lysin-Reste am N-Terminus, was die Endozytose und Degradation des Kanals zur Folge hat [Staub et al., 1996], [Staub et al., 1997] & [Dinudom et al., 1998]. Durch diese regulatorische Interaktion kann sich die Zahl der aktiven Kanäle in der Zellmembran sehr variabel gestalten. Die Transmembrandomänen bestehen aus zwei hydrophoben Segmenten. Die erste Domäne (M1) grenzt in Form einer  $\alpha$ -Helix direkt an den N-Terminus. Die zweite Transmembrandomäne (M2) beeinflusst die Amilorid-Bindung [Alvarez de la Rosa et al., 2000]. Charakteristische Aminosäurereste im Bereich unmittelbar vor der Transmembrandomäne M2 bilden eine sogenannte Pre-M2-Schlaufe, die in die Membran hineinragt. Sie ist verantwortlich für die hohe Na<sup>+</sup>-Selektivität des ENaC [Kellenberger et al., 1999] und an der Bildung der Kanalpore beteiligt [Benos und Stanton, 1999] & [Mano und Driscoll, 1999].

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup>reversible Bindung des ubiquitär vokommenden Proteins Ubiquitin an andere Proteine, wodurch deren Eigenschaften beeinflusst werden.

#### 2.3.2.3 Regulation

Die Regulation des ENaC findet auf intra- und extrazellulären Signalwegen und über die Modifikation der Kanalaktivität und der Expressionsdichte statt. Hormone wie Aldosteron [Garty, 2000], ADH [Marunaka und Eaton, 1991], Insulin und Glukokortikoide greifen mittels intrazellulärer Signalkaskaden in die Kanaldichte und/oder –aktivität ein [Garty und Palmer, 1997].

Zelluläre Zustände wie z.B. ein erhöhter Na<sup>+</sup>-Spiegel oder ein erniedrigter pH-Wert vermitteln über negative Feedback-Mechanismen einen inhibitorischen Effekt auf den Kanal [Abriel und Horisberger, 1999] & [Harvey et al., 1999]. Daneben werden zahlreiche Kinasen mit der Regulation des ENaC in Verbindung gebracht [Garty und Palmer, 1997]. Ein Beispiel ist die Aldosteron-induzierte Serin-Threonin-Kinase, die über eine Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 eine Aktivitätssteigerung und eine erhöhte Zahl an Kanälen in der Zellmembran bewirkt [Chen et al., 1999] & [Chen et al., 1999].

Auch durch völlig andere Wege kann die Aktivität des ENaC beeinflusst werden: CAP1 (channel activating protease 1) ist eine luminale Serin-Protease, die in Xenopus-Oozyten die Aktivität des ENaC um das Dreifache erhöht [Vallet et al., 1998]. Ebenso kann auch das Enzym Trypsin, auch eine Serin-Protease, den ENaC-generierten Na<sup>+</sup>-Strom in Oozyten signifikant steigern [Chraibi et al., 1998]. Die molekularen Mechanismen bedürfen allerdings noch einer vollständigen Aufklärung.

Der ENaC ist direkt an der Aufrechterhaltung des EZV und des Blutdruckes beteiligt [Volk et al., 2000]. Seine zentrale Bedeutung für die Homöostase zeigt sich besonders durch mutationsbedingte Krankheiten, die die Funktion des ENaC beeinträchtigen. Ein seltenes, wenn auch bekanntes Beispiel ist das Liddle's Syndrom, ein Krankheitsbild, das durch einen der beiden Defekte, den die in dieser Arbeit untersuchte Mausmutante (+/L +/d) trägt, hervorgerufen wird. Aus diesem Grunde werden die pathophysiologischen Hintergründe im folgenden Abschnitt eingehender erläutert.

## 2.4 Liddle's Syndrom

Das Liddle's Syndrom ist ein klassisches Beispiel für eine monogenetisch bedingte Form der arteriellen Hypertonie. Diese sehr selten auftretende Erkrankung wird autosomal dominant vererbt und ist charakterisiert durch eine früh auftretende, hereditäre Form einer salzsensitiven Hypertonie, die mit einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose, einer supprimierten Aldosteronsekretion und erniedrigten Plasmareninspiegeln einhergeht. Da die betroffenen Patienten Symptome eines primären Hyperaldosteronismus aufweisen (Hypokaliämie, metabolische Alkalose, Normo- bis Hypernatriämie), zugleich der Plasmaaldosteronspiegel aber erniedrigt, sowie die Reninkonzentration im Plasma erhöht ist, spricht man bei dieser Erkrankung auch von einem PHA.

Das Liddle's Syndrom wurde erstmals 1963 beschrieben, nach seinem Entdecker benannt [Liddle GW, 1963], und wird durch einen abnorm erhöhten Na<sup>+</sup>-Transport im distalen renalen Tubulus hervorgerufen. Diese Dysfunktion führt zu einer unangebrachten Volumenexpansion und daraus folgend zum Bluthochdruck. Der Hypertonus kann mit Thiaziddiuretika, wie z.B. Amilorid, behandelt werden, während Mineralokortikoid-Rezeptorenblocker wie Spironolacton [Liddle GW, 1963] keinerlei therapeutischen Effekt haben. Der exzessiven Na<sup>+</sup>-Reabsorption liegt eine gesteigerte Aktivität des renalen ENaC zugrunde, die durch verschiedene Mutationen an dem zytoplasmatischen C-Terminus der  $\beta$ - oder der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC hervorgerufen wird [Shimkets et al., 1994] & [Hansson et al., 1995a].

Die beschriebenen genetischen Veränderungen, die das klinische Bild des Liddle's Syndroms hervorrufen, führen zu einer erhöhten Anzahl von Kanälen in der Membran und zu einer gesteigerten Aktivität derselben [Schild et al., 1995]. Es handelt sich damit um gain-offunction Mutationen, deren Ziel die kurze Prolin-reiche Sequenz (PPPxY) am zytoplasmatischen C-Terminus der jeweiligen Untereinheiten des ENaCs ist [Schild et al., 1996]. Diese hoch-konservierte Region wird, wie schon in Kap. 2.3.2.2 beschrieben, als PY-Motiv bezeichnet. Entweder wird das PY-Motiv durch eine Mutation entfernt [Shimkets et al., 1994] & [Hansson et al., 1995a], oder es handelt sich um Missense Mutationen, die dieses Segment modifizieren [Hansson et al., 1995b] & [Tamura et al., 1996]. Diese Region ist essentiell für die Regulation der Kanalaktivität, da sie mit der Internalisierung des Kanals assoziiert ist. Sie interagiert mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Ist das PY-Motiv verändert oder fehlt es ganz, so können die WW-Domänen<sup>30</sup> des Nedd4-2 nicht an den C-Terminus binden. Diese Bindung induziert im Normalfall die Ubiquitinierung N-terminaler Lysinreste [Staub et al., 1996], die das Signal für eine Entfernung des Kanals aus der Zellmembran und eine anschließende lysosomale Degradation bilden.

Die Überaktivität des ENaC beim Liddle's Syndrom beruht also auf einer fehlenden Regulation durch Nedd4-2, wodurch es zu einer vermehrten Anzahl von aktiven Kanälen in der Zellmembran kommt [Abriel et al., 1999]. Um die Eigenschaften und die Folge von Muta-

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup>Proteindomänen, welche durch Bindung an Prolin-reiche Sequenzen Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln.

tionen des Kanals in vivo zu untersuchen, schuf die Arbeitsgruppe um Bernhard C. Rossier 1999 ein Mausmodell mit einer gain-of-function Mutation durch die Einfügung eines Stoppcodons (R566) auf Position 639 der  $\beta$ -Untereinheit des ENaCs [Pradervand et al., 1999]. Unter erhöhter Salzzufuhr entwickeln die Tiere die beschriebenen Symptome des Liddle's Syndroms. Die homozygoten Träger der Mutation weisen dabei ein stärkeres klinisches Bild auf, als die heterozygoten Träger. Das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell (+/L +/d) trägt die beschriebene Mutation in heterozygoter Ausprägung als einen von zwei genetischen Defekten.

## 2.5 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Die doppelheterozygote Liddle x Slobeta-Mausmutante (+/L +/d) ist durch Kreuzung von Mäusen, bei denen durch genetische Manipulation eine Überaktivierung (gain of function) des ENaC induziert wurde (Liddle's Syndrom Knockout Mäuse: (L/L)) und Mäusen mit genetischer Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanals (BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse: (d/d)) generiert worden. Die beiden Mauslinien weisen phänotypisch in homozygoter Ausprägung einen PHA bzw. Hyperaldosteronismus auf, die jeweils durch unterschiedliche Mechanismen induziert werden. Die BK $\beta$ 1-Knockout Mäuse (d/d) weisen generell und die Liddle Mäuse (L/L) unter erhöhter Salzzufuhr einen erhöhten systemischen Blutdruck auf.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Phänotypisierung einer Mausmutante vorzunehmen, welche beide Merkmale in heterozygoter Ausprägung aufweist. Es soll ein eventuell vorliegender Gen-Dosis Effekt und die möglichen pathophysiologischen Konsequenzen einer Kombination der genetischen Defekte hinsichtlich der Blutdruck- und Volumenregulation untersucht werden. Dafür werden männliche doppelheterozygote Mausmutanten (+/L +/d)sowie Geschwistertiere, die jeweils nur für eines der beiden Merkmale heterozygot sind ((+/L +/+) und (+/+ +/d)), mit den dazugehörigen Kontrolltieren (+/+ +/+) verglichen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die heterozygote Liddle Mutation (+/L) in Kombination mit der heterozygoten Ausprägung von BKβ1 Knockout (+/d) auf den Blutdruck, die Blutdruckregulation, das Gewicht von Herz und Nieren, sowie auf die Plasmaaldosteronbzw. die Plasmaelektrolytkonzentration?
- Welchen Einfluss hat eine Veränderung der alimentären Salzzufuhr (Na<sup>+</sup>-Beladung, Na<sup>+</sup>-Entzug) auf den Blutdruck bzw. die Blutdruckregulation und auf die Bilanzierung (Einfuhr/Ausfuhr) der wichtigsten Elektrolyte der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d)?

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

## 3.1.1 Lösungen und Puffer

## 3.1.1.1 Gelelektrophorese

Loading Buffer	
Glycerol	50%
Bromphenolblau, gesättigt	1%
Xylenecaynol $(10\%ig)$	1%
$50 \ge TAE$	2%
$H_2O$ , steril	ad $100 \text{ ml}$
TAE $(50x)$	
Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
EDTA $(0,5 \text{ M}), \text{ pH } 8,0$	$100 \mathrm{ml}$
$H_2O$ , destiliert	ad 1000 ml
TBE $(0,5 x)$	
Tris	242 g
Borsäure	$27,5 {\rm ~g}$
EDTA (0,5 M), pH 8,0	20 ml
$H_2O$ , destilliert	ad 1000 ml $1{:}10$ verdünnt

#### 3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Sigma, Invitrogen, Serva, Calbiochem, Braun und Merck in p.a. oder reinst-Qualität bezogen. Die Nukleinsäuren und Nukleotidtriphosphate wurden bei den Firmen Invitrogen, Pharmacia Biotech und MWG Biotech erworben.

#### 3.1.3 Futter

Die Ernährung der Tiere erfolgte mit Experimentalfuttermittel für Labortiere der Firma Ssniff ad libitum. Wenn es nicht anders angegeben wurde, handelte es sich dabei um standardisiertes, pelletiertes Trockenfutter (Ssniff EF R/M Kontrolle, 10 mm Pellets). Das Futter war wie folgt zusammengesetzt: Trockensubstanz: 95,2 %, Rohprotein (N x 6,25): 20,8 %, Rohfett: 4,2 %, Rohfaser: 5,0 %, Rohasche: 5,6 %, umsetzbare Energie: 15,0 MJ/kg (Angaben in % des Trockengewichts). Der durchschnittliche Na<sup>+</sup>-Gehalt betrug 0,19 %.

Bei den Versuchsserien 3 und 4 wurden zeitweise Diäten mit unterschiedlichem Salzgehalt gefüttert. Es handelte sich hierbei um Na<sup>+</sup>-armes Futter (Ssniff EF R/M Na<sup>+</sup>-arm, 10 mm Pellets </= 0.03 % Na<sup>+</sup>) und Na<sup>+</sup>-reiches Futter (Ssniff EF R/M Na<sup>+</sup>-reich, 10 mm Pellets, 3 % Na<sup>+</sup>).

In der Versuchsserie 4 wurde neben dem oben beschriebenen pelletierten Futtermittelsorten auch mit Mehlfutter mit gleicher Zusammensetzung der Rohnährstoffe gearbeitet (Ssniff EF R/M Mehl), da die metabolischen Käfige für Mehlfutter konzipiert sind.

Mit Ausnahme der Versuchsserien 3 und 4 stand den Tieren Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. In den genannten Versuchsserien erhielten die Mäuse entionisiertes Wasser ad libitum, um eine definierte Na<sup>+</sup>-Versorgung ausschließlich über das Futter zu gewährleisten.

#### 3.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen, 3 bis 7 Monate alten C57/BL6 Inzuchtmäusen mit einer gain-of-function Mutation des ENaC (homozygote Knockout Mäuse (Liddle-Linie): (L/L) ) und einer genetischen Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals (homozygote Knockout Mäuse (BK $\beta$ 1-Linie): (d/d)) durchgeführt. Diese Mauslinie ist durch Kreuzung von Mäusen der Liddle-Linie mit Mäusen der BK $\beta$ 1-Linie generiert worden. Für die Versuche wurden Tiere genutzt, die entweder beide Merkmale in heterozygoter Ausprägung besaßen (+/L +/d), oder für je eines der Merkmale heterozygot waren und für das andere dem Wildtyp entsprachen: (+/L +/+) oder (+/+ +/d). Als Kontrolltiere dienten männliche 3 bis 7 Monate alte ingezüchtete C57/BL6 Mäuse mit intaktem Genom: (+/+ +/+). Für die Versuche wurden ausschließlich Wurfgeschwister verwendet. Die Elterntiere waren ausschließlich doppelheterozygote Mäuse (+/L +/d). Es wurden nur männliche Tiere in die Versuche aufgenommen, um zyklusbedingte Schwankungen des Blutdrucks auszuschließen.

Der Liddle-Knockout wurde 1999 von der Arbeitsgruppe um Prof. B. Rossier (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Lausanne) generiert [Pradervand et al., 1999]. Der Arbeitsgruppe um Prof. H. Ehmke wurden Zuchttiere zur Verfügung gestellt, deren weitere Vermehrung und Aufzucht von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf übernommen wurde.

Der BK $\beta$ 1-Knockout wurde 1999/2000 von der Arbeitsgruppe um Prof. O. Pongs (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg) generiert [Pluger et al., 2000]. Der Arbeitsgruppe um Prof. H. Ehmke wurden auch hier Zuchttiere zur Verfügung gestellt, deren weitere Vermehrung und Aufzucht ebenfalls von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf übernommen wurde.

Auch die Kreuzung der beiden Linien, sowie die weitere Vermehrung und Aufzucht wurde in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Fa. Tecniplast) des Types II long (365 x 207 x 140 mm) auf staubfreiem Weichholzgranulat bei Raumtemperatur  $(22 \pm 2^{\circ}C)$ , einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 5\%$  und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht: 7.00-19.00 Uhr) gehalten. Um den Tieren Beschäftigung zu bieten, wurden die Käfige zusätzlich mit Zellstoffblättern und Häusern aus Kunststoff ("mouse house", Fa. Tecniplast) ausgestattet.

Die Tiere wurden auf das Freisein von Erregern entsprechend der Liste GV-SOLAS 2006 kontrolliert.

Mindestens eine Woche vor Beginn der Versuche wurden die Mäuse aus der zentralen Tierhaltung in ihren Käfigen in das Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie transportiert. Auf diese Weise konnte eine vollständige Erholung von dem Transport und eine ausreichende Adaptation an die neue Umgebung des Labors gewährleistet und somit eine stressbedingte Beeinflussung der Messergebnisse vermieden werden. Insbesondere die durch Tätigkeiten im Mauslabor hervorgerufene neue Geräuschkulisse für die Tiere erforderte eine gewisse Zeit der Gewöhnung. Die Haltung und Fütterung der Tiere im Mauslabor des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor für die zentrale Tierhaltung beschrieben.

Die Tierversuchsgenehmigung wurde von der Behörde für Umwelt und Gesundheit, Hamburg, mit dem Aktenzeichen 72/03erteilt.

## 3.2.1 Versuchsserien und Stichprobenumfang

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf den in der nachfolgenden Tabelle dargestellten Versuchsserien.

	Untersuchungen	Versuchstiere
Versuchsserie 1	Chronische arterielle Katheter	Liddle x Slobeta
	• Hämodynamische Untersuchungen	• +/L +/d
	• Morphometrische Untersuchungen	• +/L +/+
	• Bestimmung der Plasmaaldosteron- konzentration	• +/+ +/d
		• +/+ +/+
Versuchsserie 2	Arterielle Katheter	Liddle x Slobeta
	• Bestimmung von Blutparametern	• $+/L +/d$
	• Morphometrische Untersuchungen	• +/+ +/+
Versuchsserie 3	Telemetrie	Liddle x Slobeta
	• Hämodynamische Untersuchungen	• +/L +/d
		• +/+ +/+
Versuchsserie 4	Metabolische Käfige	Liddle x Slobeta
	• Ein- und Ausfuhrbilanzierung	• +/L +/d
		• +/+ +/+

Die Untersuchungen der Versuchsserie 1 sollten pro Genotyp an mindestens 13 Tieren durchgeführt werden. Ergebnisse in der Literatur haben eine mittlere interindividuelle Variabilität des Blutdrucks mit einen Variationskoeffizient von ~ 5-8 % bei wachen Mäusen gezeigt [Pluger et al., 2000]. Weiterhin musste beachtet werden, daß aus nicht vermeidbaren methodischen Gründen (Operationskomplikationen, Katheterverschluss) etwa 10-20 % der operierten Tiere nicht in den Versuch aufgenommen werden können. Die eingeplante Zahl von Tieren ist ausreichend, um bei dieser Varianz einen Blutdruckunterschied von 10 mm-Hg statistisch auf dem 5 % Signifikanzniveau zu identifizieren. Für die Untersuchungen der Versuchsserie 2 wurden pro Genotyp eine Zahl von 10 Tieren festgelegt. Die telemetrischen Untersuchungen der Versuchsserie 3 wurden pro Genotyp an 7 Tieren durchgeführt und die der Versuchsserie 4 pro Genotyp an 5 Tieren.

## 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Genotypisierung der Mäuse

Zur Bestimmung des Genotyps wurde den Zucht- und den Versuchstieren durch die Tierpfleger der zentralen Versuchstierhaltung im Alter von ca. 6 Wochen eine Ohrbiopsie entnommen. Zur Verifizierung der Genotypisierung wurde den Mäusen, an denen Versuche durchgeführt wurden, zum Abschluss der Experimente nochmals eine Ohrbiopsie entnommen. Die Entnahme der Ohrprobe erfolgte mit einer speziellen Lochzange. Nach Lysierung der Ohrprobe wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) überprüft, ob die Genloci, die für die Liddle-Mutation, bzw. für die  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals codieren bei den Tieren vorhanden waren bzw. fehlten.

#### 3.3.1.1 Lysierung der Ohrprobe

NP- 40 (0,5 %)	$0,5 \ \mu l$
Tween (R) 20 (0,5 %) 6	$0,5 \ \mu l$
$10x \text{ PCR RXN Puffer } (Mg^+)$	$10 \ \mu l$
Proteinase K	$0,03 \mathrm{~mg}$
$H_2O$ , steril	ad 100 $\mu l$

Folgender Ansatz diente dem Verdau einer Ohrprobe:

Die Lysierung erfolgte mit Hilfe eines Thermomixers (Eppendorf Gerätebau) auf Stufe 11 (11x100/min) bei 65°C für 2 h 50 min und wurde abgeschlossen bei 95°C für 10 min. Für den Fall, daß die PCR nicht direkt im Anschluß an den Verdau stattfand, wurde das Lysat bei -20°C gelagert.

#### 3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA durch die PCR wurde folgender Standardansatz ( $100\mu$ l Gesamtvolumen) verwendet:

Liddle	
Ohrprobenlysat:	$3 \ \mu l$
10x PCR RXN-Puffer $(-Mg^{2+})$	100 $\mu l$
$50~{\rm mM}~{\rm MgCl}_2$	$30 \ \mu l$
20  mM dNTP's	$20 \ \mu l$
Primer PLAS	$10 \ \mu l$
Primer PLS	$10 \ \mu l$
Primer Pneo	$2,5\mu l$
Taq-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)	$10 \ \mu l$
$H_2O$ , steril	ad 940 $\mu$ l

## $\mathbf{BK}\beta\mathbf{1}$

<b>— — — —</b>	
Ohrprobenlysat:	$3 \ \mu l$
$10x \text{ PCR RXN-Puffer } (-Mg^{2+})$	$5 \ \mu l$
50 mM $\mathrm{MgCl}_2$	$1,5\mu l$
20  mM dNTP's	0,4 $\mu l$
Primer 1 (100 pmol/ $\mu$ l)	$1 \ \mu l$
Primer 2 (100 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu l$
Primer 3 (100 pmol/ $\mu$ l)	0,125 $\mu l$
Taq-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)	0,5 $\mu l$
H <sub>2</sub> O, steril	ad 50 $\mu$ l

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH bezogen und hatten folgende Sequenzen:

## Liddle:

Primer 1 (Pneo) 5'- CTG TTG GCC GCT GCC CCA-3' Primer 2 (PLS) 5'- CTT CCA AGA GTT CAA CTA CCG-3' Primer 3 (PLAS) 5'- TCT ACC AGC TCA GCC ACA GTG-3'

#### $\mathbf{B}\mathbf{K}\beta\mathbf{1}$ :

Primer 1 (BKMB 11s) 5'-GCT GAA ACT CTG AAG CTA CTC-3' Primer 2 (BKMB 17s) 5'-GCT ATG AGG CAA CTA AAC AGG-3' Primer 3 (BKMB 3a) 5'-CAC AGC TGA TAC ATT GAC CC-3'

Die PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) vorgenommen. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 93°C für 2 Minuten erfolgte die PCR in 35 Amplifikationszyklen mit folgenden Temperaturschritten:

30" 93°C (Denaturierung) 30" 58°C (Primerhybridisierung) 45" 72°C (Extension)

Im Anschluß an die 35 Zyklen wurde der Amplifikationsprozess mit einer 10 Minuten andauernden Extensionsphase bei 72°C beendet. Danach wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Bis zur Analyse durch Gelelektrophorese lagerte man das Produkt bei einer Temperatur von -20°C. Um eventuelle Kontaminationen identifizieren zu können, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mitamplifiziert. Diese enhielt bis auf die cDNA sämtliche für die PCR notwendigen Reagenzien. Weiterhin wurde für jeden Ansatz eine Positivkontrolle durchgeführt, um die Wirksamkeit der eingesetzten Reagenzien und den korrekten Ablauf der PCR zu überprüfen.

#### 3.3.1.3 Gelelektrophorese

Die präparative Trennung und Analyse der DNA-Fragmente erfolgte in 1,2 %igen horizontalen Agaroseflachbett-Gelen in EPS 600 –Kammern (Pharmacia Biotech) in 0,5x TBE mit 6  $\mu$ l/100 ml Ethidiumbromid.. Von dem zu analysierenden Ansatz wurden 10  $\mu$ l mit 1,5  $\mu$ l DNA-Loading-Buffer versetzt und davon im Anschluß 11  $\mu$ l in die Probentaschen des Agarose-Gels pipettiert. Die Trennung wurde innerhalb von 45 min bei einer konstanten Spannung von 110 V abgeschlossen. Die Einpolymerisierung von Ethidiumbromid (Fa. Sigma) in das Agarose-Gel in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml diente der Anfärbung der DNA. Mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (UV- Transilluminator KAISER RS 1, Fa. Biometra) wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA- Amplifikate sichtbar gemacht, mit einer CCD-Kamera (Fa. Computar) fotografiert und so dokumentiert.

Die Fragmente wurden anhand ihrer Länge nach Anzahl von Basenpaaren identifiziert. Als Größenstandard wurde eine "1 kb Plus DNA-Leiter" (Invitrogen) verwendet.

#### 3.3.2 Hämodynamische Untersuchungen an wachen Mäusen

#### 3.3.2.1 Chronische Katheter

Katheterherstellung Die Anfertigung eines Katheterpaares begann mit 3.3.2.1.1der Herstellung der Katheterspitzen, die zuerst aus einem Polyurethanschlauch (0,04" O.D., 0,025" I.D., Braintree Scientific, INC.) modelliert werden mussten. Dazu wurde ein ca. 6 cm langes Schlauchstück mittig mit Hilfe eines Heißluftgebläses angeschmolzen. Der angeschmolzene, noch heiße Bereich musste daraufhin rasch leicht gedehnt und halbrund geformt werden. Nach einer kurzen Phase der Abkühlung wurde der so präparierte Schlauch mit einer Schere in der Mitte durchtrennt, so daß zwei sich verjüngende Spitzen entstanden, die auf die gleiche Länge gekürzt wurden. Das Originalende und die leicht gebogene verjüngte Spitze sollten jeweils ca. 1,5 cm lang sein. Nur Katheterspitzenpaare mit möglichst großer Parallelität wurden weiter verwendet. Diese Spitzen wurden am Originalende mit Hilfe eines ca. 8 mm langen metallenen Verbindungsstifts (gefertigt aus Abschnitten einer 23G Kanüle) mit einem Durchmesser von 0,6 mm mit einem 30 cm langen Polyethylen-Schlauch (1,0 mm O.D., 0,5 mm I.D., Fa. Portex) verbunden, wobei ein ca.1 mm langer Überlappungsbereich (Overlap) zwischen der Spitze und dem Polvethylen- Schlauch entstehen mußte. Dieser diente der Stabilität und der Abdichtung. Über den Overlap wurde mittels eines 2 Komponentenklebers (UHU plus Endfest 300) ein Heat Shrink Tube geklebt, der die zusammengefügten Schlauchenden im Verbindungsbereich zusätzlich abdichten sollte.

Nach einer mindestens 12-stündigen Trocknungsphase wurde die einwandfreie Durchgängigkeit der Katheter überprüft, indem sie mit einer sterilen heparinisierten Kochsalzlösung durchgespült wurden.



Abbildung 7: Selbstgefertigte Katheterspitzen.

**3.3.2.2 Operative Implantation der chronischen Katheter** — Methode nach [Just et al., 2000] & [Mattson, 1998]

Um den Blutdruck und die Herzfrequenz messen zu können, wurde den Versuchstieren ein, wie in Kap. 3.3.2.1.1. beschrieben, selbst hergestellter Katheter in die A. femoralis implantiert. Die zusätzliche Implantation eines Katheters in die V. femoralis erfolgte, um eine zusätzliche Stabilisierung des arteriellen Katheters zu gewährleisten und somit die Gefahr eines Katheterverschlusses durch Abknickung zu reduzieren. Zu diesem Zweck war die in Kap. 3.3.2.1.1. erwähnte Parallelität der beiden Katheterspitzen unbedingt notwendig.

Die Katheter wurden vor der Operation nochmals auf ihre fehlerfreie und leichte Durchgängigkeit getestet und mit einer Heparin-NaCl-Lösung (5.000 I.E. Heparin/100 ml NaCl-Lösung) gefüllt, um die Gefahr einer Thrombenbildung in der Spitze des Katheters zu reduzieren. Dabei wurde darauf geachtet, den Katheter frei von Luftblasen zu halten, damit die Übertragung der Blutdruckamplitude nicht abgeschwächt wurde. Der arterielle Katheter wurde am Ende des Polyethylen-Schlauches farbig markiert, um ihn nach der Implantation von dem venösen Katheter unterscheiden zu können.

Nach Ermittlung des Körpergewichts erfolgte die Narkose der Mäuse mittels einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von 10%-igem Ketamin<sup>®</sup> (120 mg/kg KGW, Fa. Albrecht) und 2%-igem Rompun<sup>®</sup> (Wirkstoff: Xylacin, 16 mg/kg KGW, Fa. Bayer) unter Erhaltung der Spontanatmung. Eine eventuell erforderliche Nachdosierung zur Verlängerung der Narkose erfolgte ausschließlich mit Ketamin<sup>®</sup>, um die atemdepressive Wirkung von Xylacin zu vermeiden. Präoperativ erfolgte eine Schmerzprophylaxe mittels subkutaner (s.c.) Injektion von Rimadyl<sup>®</sup> (Wirkstoff: Carprofen, 5 mg/kg KGW). Zusätzlich wurden die Mäuse antibiotisch mit einer s.c.-Injektion von Baytril<sup>®</sup> (Wirkstoff: Enrofloxacin, 5mg/kg KGW) abgedeckt. Nach Eintritt der Narkose wurden der Nacken und der linke Leistenbereich der Tiere weiträumig rasiert und mit einer jodhaltigen Lösung (Betaisodona<sup>®</sup>) desinfiziert. Während der Operation wurden die Mäuse auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur konstant zu halten. Um die Tiefe der Narkose zu überwachen, wurde auf das Fehlen des Zwischenzehenreflexes geachtet.

Nach einer Inzision der Haut im Nacken kaudal des Os occipitale<sup>31</sup> wurde die Haut subkutan vom Nacken bis zum linken Hinterbein mobilisiert, um durch die so geschaffene Untertunnelung zu einem späteren Zeitpunkt der Operation die Katheter führen zu können. Es folgte die Lagerung und Fixierung der Mäuse in Rückenlage. Nach einer ca. 5 mm lange Inzision der Haut im linken Leistenbereich parallel zur Bauchmuskulatur wurden die weiteren operativen Vorgänge unter stereomikroskopischer Aufsicht (LEICA MZ 75) durchgeführt.

Durch vorsichtiges Präparation und Entfernen von subkutanem Fett- und Bindegewebe mit einem sterilen Wattestäbchen wurde der N. femoralis sowie die A. und V. femoralis proximal vom Lig. inguinale bis distal zur V. saphena medialis dargestellt. Mit Hilfe einer Metallhülse erfolgte eine subkutane Verbindung der Inzisionsstelle in der Leiste mit der im Nacken des Tieres, um die Katheter durch diese Hülse von der Leiste zur Öffnung im Nacken schieben zu können. Dabei war zu beachten, daß der venöse Katheter den arteriellen Katheter nicht kreuzte und, parallel zu diesem verlaufend, medial zu liegen kam. Die Metallhülse wurde nun vorsichtig entfernt. Danach wurde die femorale Trias von Nerv, Vene und Arterie präparativ getrennt, und die beiden Gefäße wurden vollständig vom Lig. inguinale bis zur V. saphena mobilisiert. Besonderes Augenmerk wurde auf die Schonung des Nerves gelegt. Nun wurden die Gefäße proximal der V. saphena einzeln ligiert. Der dafür genutzte Faden diente zudem als Haltezügel.

Bei der Arterie wurde vor ihrer Eröffnung zusätzlich durch eine Ligation direkt distal des Leistenbands der Blutfluss unterbrochen. Dieser Knoten musste wieder zu öffnen sein, um nach der Implantation die Katheterspitze weiter in das Gefäß vorführen zu können.

Nach dieser Vorbereitung wurden die Katheter nacheinander in die Vene und die Arterie implantiert. Dazu erfolgte die Eröffnung der Vene, bzw. der Arterie mit einer Irisschere proximal der distalen Verbindung. Die Katheterspitzen konnten nun vorsichtig in das jeweilige Gefäß hinein- und soweit vorgeschoben werden, daß sie einige Millimeter unter dem Leistenband hindurch zu liegen kamen. Die Fixierung der Katheter sicherten der jeweilige Haltezügel sowie zwei zusätzlich weiter proximal gelegte Haltefäden.

Zur weiteren Stabilisierung wurden beide Katheter nach der Implantation im freien Bereich der Spitzen und an der Austrittsstelle im Nacken mit je einem weiteren Faden miteinander verbunden und der Knoten in der Leiste mit einem Tropfen Histoacrylgewebekleber (Fa. Braun) zusätzlich fixiert. Die Katheter wurden nun am Ende des Polyethylen-Schlauches mit Hilfe von Metallstiften verschlossen, wobei darauf zu achten war, daß kein Blut sondern

 $<sup>^{31}</sup>$ Hinterhauptsbein



Abbildung 8: **OP-Situs: Implantation von chronischen Kathetern in die A. und V.** femoralis.

nur Heparin-NaCl<sup>-</sup>Lösung in den Katheterspitzen verblieb, um das Risiko einer Thrombenbildung so gering wie möglich zu halten.

Nach Ausschluss von Blutungen und nochmaliger Sicherstellung der korrekten Katheterposition wurde die Wunde mit Einzelknopfheften (Mersilene 5-0, Ethicon) verschlossen. Die Maus wurde nun wieder auf dem Bauch gelagert. Die aus der Inzision im Nacken herausgeführten Katheterenden mussten mit einer innen hohlen Metallfeder, die in der Nackenmuskulatur mit zwei weiteren Einzelheften fixiert wurde, vor Benagung und anderer mechanischer Belastung geschützt werden. Der Wundverschluss der Nackenhaut um die Feder erfolgte ebenfalls mit einer Einzelknopfnaht (Mersilene 5-0, Ethicon).

Die Wundnähte im Nacken und in der Leiste wurden abschließend noch einmal mit Betaisodona<sup>(R)</sup> desinfiziert. Nun mussten die aus der Metallfeder herausragenden, mit den Metallstiften verschlossenen Katheterenden mit einem Klebestreifen an der Feder befestigt werden, um eine Rotation und Überkreuzung der Katheter in der Feder zu verhindern. Zur Stabilisierung des Kreislaufs und um einer postoperativen Dehydratation vorzubeugen, wurde den Tieren 1 ml körperwarme isotone NaCl-Lösung subkutan infundiert.

Die Tiere wurden postoperativ bis zum vollständigen Erwachen weiterhin warmgehalten, während der Aufwachphase regelmäßig überwacht und erholten sich sehr schnell von der Narkose. Die Fixierung der Metallfeder erfolgte mittels eines Zweikanal - Swivels (TSE-Systems), so daß sich die Tiere in ihren Einzelkäfigen frei bewegen konnten. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ad libitum. Über den Habitus der Tiere und die Futter- und Wasseraufnahme wurde ein tägliches Protokoll geführt, um den Allgemeinzustand zu beurteilen. Tiere, die mittelgradige bzw.hochgradige pathologische Befunde zeigten, wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und schmerzlos euthanasiert.

#### 3.3.2.3 Blutdruckmessung

Die Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz wurden über den chronischen arteriellen Katheter durchgeführt, der zu diesem Zweck an den erwähnten Zweikanal - Swivel angeschlossen wurde. Die Messung erfolgte stressfrei an den wachen Mäusen, die während des Versuches uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter hatten und sich frei bewegen konnten. Die Aufzeichnungen fanden am 2. bzw. 3. postoperativen Tag kontinuierlich über 1-2 Stunden statt. Die Messungen wurden permanent mittels eines Softwareprogramms (Labtech Notebook<sup>®</sup>) registriert und aufgezeichnet.

Durch das Datenverarbeitungsprogramm  $\operatorname{Igor}^{(\mathbb{R})}$  erfolgte die anschließende Auswertung der gewonnenen Daten. Es wurde sehr darauf geachtet, dass während des gesamten Versuches eine ruhige Atmosphäre im Labor herrschte, um keine Störung der Tiere zu verursachen, die die sensiblen Messparameter beeinflussen könnte. Die Messungen wurden stets in einem dreistündigen Zeitfenster zwischen 16.00 Uhr und 19.00 Uhr durchgeführt, um den zirkadianen Rhythmus der Tiere zu berücksichtigen. Damit wurden die Versuche in der späten Ruhephase der nachtaktiven Tiere durchgeführt.

Ein Blutdrucktransducer (Typ DPT-6100, Föhr Medical Instuments) sorgte für die Umwandlung der Blutdruckamplitude in ein elektrisches Signal. Der Transducer wurde zu diesem Zweck mit entionisiertem Wasser gefüllt und durch einen weiteren Polyethylen-Schlauch mit dem Zweikanal - Swivel verbunden. Die Füllung mit dem entionisierten Wasser mußte luftblasenfrei erfolgen, um die Blutdruckamplitude nicht abzuschwächen. Der arterielle Katheter wurde über ein kurzes Verbindungsstück an die zweite Öffnung des Swivel-Kanals angeschlossen.

Nach Abschluss der Blutdruckmessung am 1. Messtag, dem 2. postoperativen Tag, musste der arterielle Katheter vom Zweikanal - Swivel gelöst und erneut mit einem Metallstift verschlossen werden. Dabei war wieder zu beachten, daß kein Blut in der Katheterspitze verblieb, um das Risiko einer Thrombosierung zu minimieren.

Aus den gewonnenen Daten wurden der Mittelwert des MAD und der durchschnittlichen Herzfrequenz ermittelt.



Abbildung 9: Originalregistrierung einer Blutdruck-/Herzfrequenzmessung über 1,5 Stunden. Die Messung erfolgte an einer wachen ungestressten Wildtypmaus am dritten postoperativen Tag über den arteriellen Katheter. Die obere Kurve stellt die Herzfrequenz (1/min) dar, in der Mitte ist der mittlere arterielle Blutdruck (mmHg) abgebildet und in der unteren Kurve sieht man den Blutdruck (mmHg).

#### 3.3.2.4 Telemetrie

## 3.3.2.4.1 Transmitter zur telemetrischen Aufzeichnung von hämodynamischen Parametern bei Mäusen

Zur radiotelemetrischen Messung des Blutdrucks dienten die Transmitter (PhysioTel<sup>®</sup>) PA Implants) vom Typ TA11PA-C10. Ein Transmitter dieses Typs wiegt 1,4 g und hat ein Volumen von 1,1 cc. Die Länge des Katheters beträgt 5 cm und der Durchmesser des Katheters misst 0,4 mm. Die Batterielaufzeit beträgt 1,5 Monate. Die Aktivierung und Deaktivierung des implantierten Transmitters erfolgt magnetisch über die Außenseite des Käfigs und damit stressfrei für das Tier. Nach der Aktivierung registriert der Transmitter die Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und motorische Aktivität des Tieres und überträgt die Informationen digital über ein radiotelemetrisches Messverfahren auf einen Receiver. Dieser konvertiert die gewonnenen Informationen in eine Computer-lesbare Form. Die Datensammlung wird dann über eine Matrix an den Rechner weitergegeben und dort mit Hilfe des Dataquest A.R.T. Systems erfasst und abgelegt. Da der Nullpunkt jedes Transmitters minimal schwankt, wurde jeder Sender 12 Stunden vor der operativen Implantation aktiviert und in eine sterile, isotone NaCl-Lösung bei Raumtemperatur eingelegt, gemessen und die Nulllinie notiert, um später bei der Auswertung die Blutdruckdaten gegebenenfalls um den veränderten Nullpunkt korrigieren zu können.

**3.3.2.4.2 Operative Implantation der telemetrischen Sender** Die Narkose, die antibiotische Abdeckung, sowie die Schmerzprophylaxe der Tiere erfolgt wie in Kap. 3.3.2.1.2. beschrieben. Nach Einleitung der Narkose wurden die Mäuse ventral vom Processus angularis mandibularis bis zum Sternum weiträumig rasiert. Das rasierte Operationsfeld wurde mit einer jodhaltigen Lösung (Betaisadona<sup>®</sup>) desinfiziert. Zur Kreislaufstabilisierung wurde den Tieren prä- und postoperativ je 1ml körperwarme isotone NaCl<sup>-</sup>Lösung subkutan infundiert. Während der Operation wurden die Mäuse auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur konstant zu halten. Die Fixierung der Tiere erfolgte in Rückenlage mit Hilfe von Klebeband über den Hinterbeinen. Zusätzlich wurde ein Haltefaden um die oberen Incisivi gelegt und etwas gespannt, sowie ein kleines Stück Mullbinde im Nacken der Mäuse platziert, um eine Streckung des Halses und eine Stabilisierung des Kopfes zu erreichen.

Mit einem Skalpell wurde nun die Haut in der ventralen Medianen submandibulär beginnend bis kurz vor dem Sternum inzisiert. Es folgte die Präparation einer Hauttasche von der Inzisionsstelle aus im linken Flankenbereich, in der später der Transmitter platziert werden sollte. Die weiteren Operationsschritte wurden unter stereomikroskopischer Aufsicht (LEICA MZ 75) durchgeführt.

Zunächst mussten die submandibulären Speicheldrüsen vorsichtig mittels steriler Wattestäbchen getrennt werden. Die linke A. carotis communis wurde in einem Bereich von ihrer Gabelung in die Aa. carotis interna und externa ausgehend ca. 1,0 cm nach caudal freipräpariert. Dies geschah unter Schonung der parallel verlaufenden Nervenfasern. Nun wurde ein Faden als Haltezügel direkt caudal der Bifurkation der Aa. carotis interna und externa positioniert und geknotet. Ein weiterer Haltezügel wurde weiter caudal etwa in Höhe des Schlüsselbeins um das Gefäß gelegt, aber nicht geknotet. Die Enden beider Haltefäden wurden mit Klemmen fixiert, die neben dem Tier so positioniert wurden, daß eine leichte Spannung des Gefäßes erzielt werden konnte. Durch diese Spannung, insbesondere des caudalen Haltezügels, konnte auch der arterielle Blutzufluß kurzzeitig und reversibel unterbrochen werden, während das Gefäß für die Implantation des Katheters eröffnet wurde.

Nun wurde der Transmitter auf einer sterilen, angefeuchteten Kompresse rechts neben dem Kopf der Maus gelagert. Der Sender wurde mit steriler, isotoner NaCl-Lösung ständig feucht gehalten. Nach der vorsichtigen Entfernung der Schutzhülle auf der Katheterspitze, wurde die Spitze luftblasenfrei mit biokompatiblen Gel gefüllt. Die moderat gespannte Arterie wurde dann mit Hilfe einer an der Spitze gebogenen Kanüle (Sterican<sup>®</sup> 25G, Fa. Braun) direkt caudal des cranialen Haltefadens eröffnet. Während mit der Kanülenspitze die Öffnung des Gefäßes fixiert wurde, konnte der Katheter mit Hilfe einer speziellen gebogenen Pinzette implantiert werden.



Abbildung 10: OP-Situs: Dargestellt ist die freipräparierte und angezügelte A. carotis (links) und die Implantation der Katheterspitze in das Gefäß (rechts).

Der caudale Haltezügel wurde nun soweit gelockert, daß der Katheter weiter in das Gefäß vorgeschoben werden konnte, bis die Spitze des Katheters etwa 2 mm in den Aortenbogen hineinreichend zu liegen kam. Die Fixierung erfolgte, indem beide Haltefäden um den Katheter, bzw. das Gefäß geknotet wurden. Ein dritter Knoten wurde zwischen beiden Fäden zur weiteren Stabilisierung des Katheters platziert. Je ein Tropfen eines Gewebeklebers (Histoacryl<sup>®</sup>, Fa. Braun) auf jedem Knoten diente der endgültigen Festigung.

Im nächsten Schritt wurde der Telemetriesender in der präparierten Hauttasche im linken Flankenbereich des Tieres positioniert. Besondere wichtig war, daß der Sender soweit dorsal in der Flanke zu liegen kam, daß die Maus später in der Laufbewegung nicht beeinträchtigt wurde. Der Transmitter wurde mit etwas Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>, Fa. Braun) zwischen Sender und subkutanem Gewebe in seiner Lage fixiert.



Abbildung 11: Lokalisation des Telemetriesenders in der Maus.

Das Gefäß konnte nun mit dem Katheter wieder in seine ursprüngliche Position versenkt, die Speicheldrüsen reponiert und die Wunde mit Einzelknopfheften (Mersilene 5-0<sup>®</sup>, Ethicon) verschlossen werden. Die Wunde wurde abschließend noch einmal mit Betaisadona<sup>®</sup> desinfiziert. Die Tiere wurden in ihren Käfig zurückgesetzt und bis zum vollständigen Erwachen auf Zellstoff gelagert, warm gehalten und regelmäßig überwacht.

Für die nächsten 48 Stunden standen den Mäusen externe Wärmequellen zur Verfügung, die sie nach Belieben aufsuchen konnten. Den Tieren stand jederzeit Futter und frisches Wasser zur Verfügung. Zusätzlich zu den gewohnten Pellets konnten die Tiere in den ersten Tagen postoperativ eingeweichte Pellets, die mit Glucose 5 % beträufelt waren, aufnehmen. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde in den nächsten Tagen intensiv überwacht. Bei mittel- und hochgadigen Störungen des Allgemeinbefindens wurden die Tiere schmerzlos euthanasiert.

**3.3.2.4.3 Telemetrische Messung hämodynamischer Parameter** Die Versuche wurden 10 Tage postoperativ gestartet, da die Mäuse nachgewiesenermaßen erst nach dieser Erholungsphase wieder einen regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus zeigen.

Die Messungen blieben unbemerkt von den Tieren, da diese in ihren eigenen Käfigen einschließlich des gewohnten Käfig-Enrichments (Zellstoff und mouse houses) bleiben konnten und, wie immer, uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser hatten. Der Messraum war auf  $22 \pm 2^{\circ}$ C temperiert und die relative Luftfeuchtigkeit betrug  $60 \pm 5\%$ . Das Lichtregime bestand aus einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Lichtphase von 7.00h bis 19.00h. Da der Versuchsraum ausschließlich für die telemetrischen Messungen genutzt wurde, war eine ruhige und stressarme Atmosphäre sichergestellt.

Die hämodynamischen Parameter, sowie die Daten über die motorische Aktivität wurden alle 5 Minuten jeweils für einen Zeitraum von einer Minute über den implantierten Telemetriesender aufgenommen und auf den Computer übertragen. Dieser stand im Nebenraum, so daß die Messungen jederzeit und ohne die Tiere zu stören, überwacht werden konnten. Dies bot zudem eine zusätzliche, objektive Möglichkeit, den Allgemeinzustand der Mäuse zu beurteilen.

Mit Hilfe eines Softwareprogramms (Dataquest A.R.T. Data Acquisition, Data Sciences International, Minnesota, USA) wurden die gesammelten Informationen automatisch gespeichert. Die Auswertung geschah mit Hilfe des Computerprogramms Dataquest A.R.T. Data Analysis (Data Sciences International, Minnesota, USA). Dabei konnten die Zeitintervalle, in denen gemessen wurde, individuell je nach Fragestellung und Versuchsreihe ausgewählt werden.

#### 3.3.2.4.4 Telemetrische Messungen unter unterschiedlicher Salzbelastung

Die Mäuse wurden mit Futter unterschiedlichen NaCl-Gehaltes ernährt, um den Einfluss einer unterschiedlichen Salzzufuhr auf den Blutdruck, bzw. auf die Blutdruckregulation vor dem Hintergrund der Kombination der beiden genetischen Defekte näher zu untersuchen.



Abbildung 12: Darstellung der telemetrischen Aufzeichnung des Blutdrucks.

Die Fütterungsperioden erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 14 Tagen. In den ersten zwei Wochen vor Beginn der Messungen bekamen die Tiere das gewohnte pelletierte Futter mit einem NaCl<sup>-</sup>Gehalt von 0,3% (Firma Ssniff) ad libitum. Die telemetrischen Messungen zur Bestimmung der Ausgangswerte wurden kontinuierlich über 5 Tage durchgeführt. Nun erfolgte die Umstellung auf eine 2-wöchige salzarme Ad-libitum-Diät mit pelletiertem Futter (Firma Ssniff) mit einem NaCl<sup>-</sup>Gehalt von maximal 0,03%. Die hämodynamischen Messungen wurden über den gesamten Fütterungszeitraum fortgeführt. Anschließend wurde die Fütterung auf eine salzreiche Diät mit pelletiertem Futter (Firma Ssniff) mit einem Salzgehalt von 3,0% umgestellt. Auch hier wurde über die gesamten 14 Tage telemetrisch gemessen. Zum Abschluß erfolgte eine nochmalige Umstellung auf das Standardfutter aus der ersten Fütterungsperiode und eine letzte Messperiode von 14 Tagen. Während der gesamten Zeit stand den Tieren entionisiertes Wasser als Trinkwasser ad libitum zur Verfügung.

Diät	Basis 1	Na <sup>+</sup> -arm	Na <sup>+</sup> -reich	Basis 2
Dauer	Tag 1 bis 14	Tag 15 bis $29$	Tag 30 bis $44$	Tag 45 bis $59$
Aufzeichnung	Tag 9 bis 14	Tag 15 bis 29	Tag 30 bis $44$	Tag 45 bis $59$

Versuchsaufbau für die telemetrischen Untersuchungen

#### 3.3.3 Bestimmung von Blutparametern

Den Mäusen, denen chronische Katheter implantiert wurden (siehe Kapitel 3.3.2.2.), wurde nach Abschluß der Blutdruckmessungen Blut abgenommen, um den Aldosteronspiegel im Plasma zu bestimmen. Weiterhin wurden Blutentnahmen bei Mäusen der Versuchsserie 2 durchgeführt, um die Konzentrationen der aussagekräftigsten Elektrolyte und des Stoffwechselproduktes Kreatinin im Plasma zu bestimmen.

#### 3.3.3.1 Blutabnahme

**3.3.3.1.1 Blutabnahme für die Aldosteronbestimmung** Da die Aldosteronkonzentration im Plasma in hohem Maße von den Umgebungsbedingungen, denen die Versuchstiere ausgesetzt sind, abhängig ist, musste die Blutabnahme unbemerkt an wachen und ungestressten Tieren erfolgen, um keine abnahmebedingte Erhöhung des zu untersuchenden Parameters zu induzieren.

Die Blutabnahme erfolgte bei allen Tieren zwischen 17.00 Uhr und 19.00 Uhr, da die Plasmaaldosteronkonzentration zirkadianen Schwankungen unterliegt, die somit minimiert werden konnten.

Um die Abnahme für die Tiere unbemerkt durchführen zu können, wurde aus dem arteriellen Katheter spontan und ohne mechanische Manipulation Vollblut gewonnen. Dazu wurde der Verbindungsschlauch vom Blutdrucktransducer zum Zweikanal - Swivel schon vor Beginn der Messungen so lang abgemessen, daß er 300  $\mu$ l Volumen fasste. Vom Zweikanal-Swivel ausgehend, wurde der Schlauch nach einem Volumen von 250  $\mu$ l markiert. Für die Analyse benötigte man ca. 120  $\mu$ l Plasma. Da der durchschnittliche Hämatokrit ca. 40 % beträgt [Rutschitzka, 2000], wurden 250  $\mu$ l Vollblut abgenommen, um sicher das für die Analyse benötige Plasma gewinnen zu können.

Nach Beendigung der Blutdruckmessung am zweiten Versuchstag wurde der Verbindungsschlauch kurz vor dem Transducer durchschnitten. Dies blieb von den Tieren unbemerkt, da der Schlauch aufgrund seiner Länge aus dem Käfig herausführte und sich die Verbindung zu dem Transducer hinter einem Sichtschutz befand. Durch den arteriellen Blutdrucks floss das Blut ohne weitere Manipulation aus dem arteriellen Katheter in den Verbindungsschlauch. Wenn die Blutsäule die Markierung am Polyethylenschlauch erreicht hatte, befanden sich 250  $\mu$ l Vollblut in dem Schlauch. Nun musste der arterielle Katheter abgeklemmt und damit der Blutfluss unterbrochen werden. Das Blut aus dem Verbindungsschlauch wurde vorsichtig in einen 500  $\mu$ l Tube (Fa. Eppendorf) überführt, in dem 5  $\mu$ l 0,3 M Na<sub>4</sub>-EDTA vorgelegt waren. Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Abnahme bei einer Temperatur von 20°C und bei 6000 x g für 12 min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und die Proben bis zur Analyse bei -20°C gelagert. **3.3.3.1.2** Blutabnahme für die Elektrolyt-/ Kreatininbestimmung Zur Blutabnahme wurden Katheter genutzt, deren Herstellung in Kap. 3.3.2.1.1 beschrieben wurde. Die Narkose der Tiere erfolgte auf die gleiche Weise, wie in Kap. 3.3.2.1.2 erläutert. Nach Einleitung der Narkose wurde der linke Leistenbereich der zu operierenden Mäuse großzügig rasiert. Im Anschluß wurden die Tiere auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte gelagert, um eine Auskühlung zu verhindern. Es folgte eine etwa 5 mm lange Inzision der Haut im Bereich der Leiste. Subkutanes Fett- und Bindegewebe wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und die Trias von N., A. und V. femoralis proximal vom Lig. inguinale bis distal zur V. saphena medialis präparativ dargestellt. Die Arterie wurde mobilisiert und proximal der V. saphena medialis, sowie distal des Leistenbandes abgebunden, um den Blutfluss zu unterbrechen. Nun wurde die Arterie mit Hilfe einer Irisschere eröffnet und der Katheter implantiert. Der proximale Knoten um das Gefäß wurde gelöst, so daß das Blut durch den arteriellen Blutdruck und ohne weitere mechanische Manipulation in den Katheter fließen konnte.

Das Blut wurde in einem mit Li-Heparin präparierten Gefäß (15 I.E. Heparin/ml Blut, Fa. Sarstedt) aufgefangen. Für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Kreatinin waren 250  $\mu$ l Plasma nötig. Direkt nach der Gewinnung wurde das Blut bei einer Temperatur von 20°C und bei 4200 x g für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Dieses aufwendige Procedere der Blutgewinnung wurde durchgeführt, um das Risiko einer abnahmebedingten Hämolyse des Blutes zu minimieren.

#### 3.3.3.2 Analyse

**3.3.3.2.1** Aldosteron Die Analyse der Plasmaproben der Versuchsserie 1 wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Blank in unserer Abteilung durchgeführt Die Bestimmung von Aldosteron erfolgte mit Hilfe von Radioimmunoassays (RIAs) nach dem Coat-a-count-Verfahren. Bei diesem Festphasen-RIA handelt es sich um ein Verfahren zur direkten quantitativen Bestimmung von Aldosteron. Die Innenwandung eines Polypropylenröhrchens ist mit einem Aldosteronantikörper beschichtet, und die Methodik besteht darin, daß radioaktives 125J-markiertes Aldosteron in einer vorgegebenen Zeitspanne mit dem Aldosteron in der zu analysierenden Probe um die Bindung an diesen Antikörper konkurriert. Die zu bestimmenden Mengen von Aldosteron in der Probe werden dann nach Messung des freien oder gebundenen 125J- Aldosteron mit Hilfe von Standardkurven ermittelt.

Da nur geringe Plasmavolumina zur Untersuchung zur Verfügung standen, und zudem Doppelbestimmungen notwendig waren, wurden die Proben mit einem RIA-Kit der Firma Immunotech (Beckman Coulter, USA) analysiert, da für diesen Assay ein Probenvolumen von jeweils nur 50  $\mu$ l ausreichend war. Für die Erstellung der Standardkurve wurden verschiedene Konzentrationen von Aldosteron eingesetzt (10-2000 pg/ml) und die gebundene Aktivität (B) des radioaktiv markierten Aldosterons im Verhältnis zur gebundenen Aktivität einer aldosteronfreien Probe (B0) ermittelt. Die Logit(B/B0)-Werte als Funktion des Logarithmus der Aldosteronkonzentration wurden einer Kurvenanpassung (TableCurve<sup>®</sup>, SPSS Inc., USA) unterworfen und durch eine Geradengleichung (y = a + bx) approximiert. Über die Parameter "a" und "b" der Geradengleichung wurde dann die Konzentration von Aldosteron in der zu bestimmenden Probe errechnet [Budack, 2004].



Abbildung 13: **Standardkurve.** Darstellung einer typischen Kalibrierkurve für einen 125J-RIA von Aldosteron. Der logit (logit(y)=log(y/(1-y))) des Quotienten aus der gebundenen Aktivität des Standards zur gebundenen Aktivität einer aldosteronfreien Probe ist gegen den Logarithmus der Aldosteron- konzentration aufgetragen (als Doppelbestimmung) und kann an eine Geradengleichung (y=a+bx) approximiert werden (r2 = 0,9985); Vertr.intervall: Vertrauensintervall.

**3.3.3.2.2 Elektrolyte und Kreatinin** Die Bestimmung der Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und Kreatininkonzentrationen erfolgte photometrisch. Die Messung der K<sup>+</sup>-Konzentrationen wurde mit Hilfe der Potentiometrie (ionenselektive Elektroden) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Roche/Hitachi Modular Analytics System bei dem veterinärmedizinischen Labor LABOKLIN (Bad Kissingen).

#### 3.3.4 Morphometrische Untersuchungen

Nach Abschluß der Blutdruckmessungen und der Blutabnahme (siehe Kap. 3.3.2.3 u. Kap. 3.3.3.1.1) wurden die Herzen und Nieren der Versuchstiere entnommen. Dazu wurden die Mäuse unmittelbar nach der Blutabnahme über den venösen Katheter euthanasiert (siehe Kap. 3.3.2.2). Die Tiere wurden auf dem Rücken gelagert und das Abdomen eröffnet. Die Nieren wurden nacheinander entnommen und die Nierenkapseln entfernt. Nach adspektorischer Beurteilung wurden die Nieren gewogen (Waage A200S, Fa. Sartorius), in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und einzeln in Alufolie verpackt bei -80°C für weitere molekularbiologische Untersuchungen gelagert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz nach Durchtrennung der großen Gefäße entnommen. Nach der Entfernung der begleitenden Gefäßstrukturen folgte die Spülung des Herzens in Heparin-NaCl-Lösung (5.000 I.E. Heparin/100 ml NaCl-Lösung), um es von Blut und Blutthromben vollständig zu befreien, und die anschließende Trocknung auf einem Stück Zellstoff. Nach Bestimmung des Herzgewichtes (Waage A200S, Fa. Sartorius) erfolgte die präparative Entfernung der Vorhöfe sowie die Trennung des linken und rechten Ventrikels mit anschließender separater Gewichtsbestimmung.

Für weitere Untersuchungen wurden auch die Ventrikel in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.3.5 Einfuhr- und Ausfuhrbilanzierung

#### 3.3.5.1 Metabolische Käfige

Um den Einfluss einer veränderten Salzzufuhr (Na<sup>+</sup>-Beladung, Na<sup>+</sup>-Entzug) auf die Elektrolyt- und Wasserbilanzierung der Mäuse zu untersuchen, wurden die Mäuse der Versuchsserie 4 für jeweils zwei Wochen mit dem Standardfutter, mit einer salzarmen und einer salzreichen Diät (Konzentration siehe Kap. 3.3.2.4.4) ernährt. Den Abschluß bildete eine erneute Fütterung mit dem gewohnten Standardfutter. Das Trinkwasser bestand über den gesamten Versuchszeitraum aus entionisiertem Wasser ad libitum.

Zur Registrierung der metabolischen Parameter wurden die Tiere am Ende jeder Fütterungsperiode unter Fortführung der jeweiligen Diät in speziell konzipierten metabolischen Käfigen (Fa. Tecniplast) gehalten, in denen eine Ein- und Ausfuhrbilanzierung möglich ist. Die Käfige ermöglichten eine getrennte Sammlung von Urin und Faeces. Im oberen Teil des Käfigs konnten sich die Mäuse frei auf einem Gitternetz bewegen, durch das die Exkremente durchfielen. Im unteren Teil des Käfigs sorgte ein konusförmiger Trichter dafür, daß Urin und Kot in separaten Sammelgefäßen aufgefangen wurden. Bei freiem Zugang zu Trinkwasser und Mehlfutter konnte so die täglich produzierte Urin- und Kotmenge getrennt gesammelt werden.

Die Mäuse wurden nach je 12 Tagen Diätfütterung und zusätzlicher Gewöhnung an das Mehlfutter in den letzten vier Tagen vor dem Versuch für 48 Stunden in den metabolischen Käfigen gehalten, wobei sich die Messperiode für die Bilanzierung nur über die letzten 24 Stunden erstreckte. Die ersten 24 Stunden dienten der Eingewöhnung der Tiere an die neuen Haltungsbedingungen. Der Allgemeinzustand der Mäuse wurde mehrfach täglich kontrolliert. Zudem wurden auch in den ersten 24 Stunden der Gewichtsverlust der Tiere, sowie die Futter- und Wasseraufnahme protokolliert, um das Allgemeinbefinden der Mäuse objektiv beurteilen zu können. Vor Beginn und nach Beendigung der Messperiode wurden die aufgenommenen Futter- und Wassermengen, sowie das Gewicht der Tiere protokolliert. Die ausgeschiedenen Kot- und Urinmengen wurden bestimmt und dokumentiert, die gewonnenen Proben aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren.

#### 3.3.5.2 Analysierte Parameter

Folgende Größen wurden bei den Versuchen im Stoffwechselkäfig bestimmt:

Körpergewicht der Tiere	KGW	[g]
Gewichtsverlust während des Versuchs	$\Delta$ KGW	[g]
Trinkvolumen	TV	[ml]
Urinvolumen	UV	[ml]
Kotmenge	KM	[g]
Elektrolytkonzentration im Urin (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> )	$[\mathrm{Na}^+]_{Urin}$	[mmol/l]
Kreatininkonzentration im Urin	Krea	$[\mu mol/l]$
Spezifisches Gewicht im Urin	$\operatorname{SG}$	$N/m^3$

Die Tiergewichte wurden, wie alle übrigen Gewichte, gravimetrisch bestimmt: Einheit: [g] bzw. [mg]. Das spezifische Gewicht des gesammelten Urins wurde refraktometrisch bestimmt (Refraktometer Modell: 7-0113, Fa. NeoLab). Das Urinvolumen in ml wurde nach der Formel Volumen = Masse/Dichte aus dem ermittelten Uringewicht und dem spezifischen Gewicht des Urins errechnet. Die Bestimmung der Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und Kreatininkonzentrationen im Urin der Tiere erfolgte photometrisch. Die Messung der K<sup>+</sup>-Konzentrationen wurde mit Hilfe der Potentiometrie (ionenselektive Elektroden) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Roche/Hitachi Modular Analytics System bei dem veterinärmedizinischem Labor LABOKLIN (Bad Kissingen).

#### 3.3.6 Statistische Auswertung

Zunächst wurden die Versuchsdaten pro Versuchstier ausgewertet und anschließend pro Gruppe als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of means) angegeben. Die Berechnungen wurden mit der Tabellenkalkulation Excel 2000 (Microsoft) durchgeführt. Die Grafiken wurden fast ausschließlich mit dem Statistik- und Grafikprogramm SigmaPlot<sup>®</sup> Version 9.0 erstellt. Die Grafik in Abb. 19 über die Aktivität der Versuchstiere in Kapitel 4.4.2.1. wurde mit GRAPHPAD PRISM<sup>®</sup>) angefertigt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot<sup>®</sup> und GRAPHPAD PRISM<sup>®</sup>. Die Evaluation der Daten erfolgte in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Fragestellung durch unterschiedliche statistische Verfahren.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen der zweiten bis vierten Versuchsserien wurden bei Normalverteilung mittels t-Test nach Student (Students' t-Test) auf ihre Signifikanz getestet. Wenn die zu vergleichenden Daten voneinander abhängig waren, z.B. bei Gegenüberstellung von Daten eines Individuums unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde ein gepaarter t-Test angewandt. Bei unabhängigen Daten wurde mit dem ungepaarten t-Test gearbeitet.

Wenn nicht normalverteilte Ergebnisse vorlagen, wurde bei zwei unabhängigen Datenmengen der Rangtest nach Mann-Whitney (Mann-Whitney-U-Test) als nichtparametrischer Test genutzt. Bei voneinander abhängigen Daten ohne Normalverteilung wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon signed rank test) gearbeitet.

Die Daten der ersten Versuchsserie, bei der vier verschiedene Genotypen miteinander verglichen werden sollten, wurden mittels einseitiger Multivarianzanalyse (one-way ANO-VA, GRAPHPAD PRISM<sup>®</sup>) und anschließendem Newman-Keuls-Test als Post hoc Test miteinander verglichen. Bei nicht normalverteilten Ergebnissen wurde eine rangorientierte Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und sich anschließendem post-hoc-test nach Dunn's method als nichtparametrischer Test angewandt.

Die gewonnenen Daten zum Zirkadianen Rhythmus, sowie zur Verlaufsuntersuchung bei unterschiedlicher Salzbelastung der dritten Versuchsserie wurden mittels zweiseitiger Multivarianzanalyse (two-way ANOVA, GRAPHPAD PRISM®) miteinander verglichen.

Die Nullhypothese, daß zwei zu vergleichende Werte sich nicht unterscheiden, wurde ab einem Signifikanzniveau von p < 0,05 verworfen.

Ein p-Wert von p < 0, 1 wurde als ausreichend angesehen, eine Tendenz zu postulieren.

## 4 Ergebnisse

## 4.1 Genotypisierung

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an männlichen doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) durchgeführt, die durch Kreuzung von einer Mauslinie, bei der durch genetische Manipulation an der  $\beta$ 1-Untereinheit des ENaC eine Überaktivierung (gain of function) des Kanals induziert wurde (+/L), mit einer Mauslinie mit genetischer Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals (+/d) generiert wurden. Als Kontrolltiere dienten männliche Wildtyp Tiere (+/+ +/+), sowie männliche Mäuse, die jeweils nur eine der beiden beschriebenen Mutationen in heterozygoter Ausprägung trugen (+/L +/+und +/+ +/d). Die Kreuzungszucht entstammte einer C57/BL6/6J-Inzuchtlinie. Bei ausnahmslos allen Versuchstieren handelte es sich um Wurfgeschwister, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten.

Um sowohl die Zuchttiere als auch die Tiere, an denen die beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, sicher einem der Genotypen zuordnen zu können, wurde anhand einer Ohrbiopsie mit Hilfe der PCR nachgewiesen, ob die betreffenden Genloci vollständig vorhanden oder durch genetische Manipulation verändert waren. So konnten mit Hilfe der in Kap.3.3.1.2. beschriebenen Primern die Genfragmente mit unterschiedlicher Länge nachgewiesen werden.

Bei dem Genlocus, der für die  $\beta$ 1-Untereinheit des ENaC codiert, konnte für Wildtyp Mäuse dementsprechend ein Genfragment mit 350 Basenpaaren, bei Mäusen, die die Liddle Mutation trugen, ein Genfragment mit 450 Basenpaaren amplifiziert werden. Bei den Mäusen mit Liddle Mutation wurde eine gene replacement Strategie<sup>32</sup> angewandt, so daß es zu einer missense stop codon mutation<sup>33</sup> auf dem Genlocus für die  $\beta$ 1-Untereinheit kam. Dem Stopcodon folgen hierbei etwa 100 Basenpaare, so daß es zu einer Verlängerung des Genlocus auf etwa 450 Basenpaare kommt [Pradervand et al., 1999].

Bei der zweiten Mutation, der genetischen Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>aktivierten Kaliumkanals (BK-Kanal), tritt bei Knockout Mäusen eine Verkürzung des entsprechenden Genfragmentes auf, da das erste codierende BK $\beta$ 1–Exon (exon 2) deletiert wurde.[Brenner et al., 2000b] & [Pluger et al., 2000]. Dieses Exon codiert für die terminale Aminosequenz inklusive der ersten transmembranären Domaine des  $\beta$ 1 Proteins. Durch die Primer 11s und 3a konnte bei den Wildtyp Mäusen ein Genfragment mit 719 Basenpaaren amplifiziert werden, welches dem vollständigen Genabschnitt entspricht. Durch die Primer 17s und 3a wurde der 372 Basenpaare lange Genabschnitt der Knockout Mäuse nachgewiesen.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup>auch gene targeting, eine genetische Methode, bei welcher homologe Rekombination zu Genveränderungen führt. Es können Gene deletiert oder hinzugefügt werden, Punktmutationen eingeführt und Exons entfernt werden.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup>missense mutation: sinnverändernde Mutation

Konnten auf dem Agarose-Gel jeweils beide Banden nachgewiesen werden, handelte es sich um Mäuse mit einem heterozygoten Genotyp.



Abbildung 14: **PCR Analyse von repräsentativen Ohrbiopsien** (bp = Basenpaare). Dargestellt sind mittels PCR amplifizierte Genfragmente aus Ohrbiopsien von +/L +/+ (1-2), +/+ +/+ (3-4), +/L +/d (5-6) und +/+ +/d (7-8) Mäusen. M bezeichnet den 1kb Plus DNA Marker, K- die Negativkontrolle und K<sup>+</sup> die Positivkontrolle. Die Genfragmente für BK $\beta$ 1 +/+ liegen bei 719 bp und die für BKb1 +/d liegen bei 719 und 372 bp. Die Genfragment für Liddle +/+ liegen bei 357 bp und die für Liddle +/L liegen bei etwa 457 bp.

## 4.2 Ergebnisse Chronischer Katheter

## 4.2.1 Versuchsserie 1

Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse wurden ausschließlich von Tieren erhoben, die das Allgemeinbefinden eines gesunden bis geringgradig erkrankten Tieres zeigten, um aussagekräftige Kreislaufparameter zu erhalten. Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens wurde mehrfach täglich der Habitus der Tiere begutachtet. Zur besseren Objektivierbarkeit wurden hierzu mehrere Parameter beurteilt, wie glänzendes Fell, blanke Augen, Körperhaltung, Nestbauverhalten, Futteraufnahme, Aufmerksamkeit und Bewegung.

Zudem wurde täglich die aufgenommene Wassermenge kontrolliert und protokolliert. Nach einer reduzierten Wasseraufnahme am ersten postoperativen Tag, normalisierte sich die Trinkmenge bei allen vier Gruppen am zweiten postoperativen Tag und blieb am dritten postoperativen Tag konstant. Zwischen den Genotypen konnte kein Unterschied in der Wasseraufnahme festgestellt werden.

Mittelwerte und	Standardfehler	der	Wasseraufna	hme post	t OP	in m	1

Genotyp	n	Tag 1 post OP	Tag 2 post OP	Tag 3 post OP
+/+ +/+	17	$1,9$ $\pm$ 0,9 ml	$3,2\pm1,4$ ml	3,0 $\pm$ 1,0 ml
+/L +/+	21	$2,4\pm1,2~\mathrm{ml}$	$2,4\pm1,2$ ml	$3{,}3\pm0{,}8~\mathrm{ml}$
+/+ +/d	18	$2,0$ $\pm$ 1,1 ml	$3,1 \pm 1,1$ ml	$3{,}3\pm1{,}1~\mathrm{ml}$
+/L +/d	12	$1,8\pm0,9~\mathrm{ml}$	$3,5 \pm 1,5$ ml	$3,1 \pm 1,2$ ml

## 4.2.2 Hämodynamische Daten

In der folgenden Tabelle sind die hämodynamischen Daten der ersten Versuchsserie dargestellt. Es wurden am zweiten und dritten postoperativen Tag der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

# Mittelwerte und Standardfehler der hämodynamischen Daten der Versuchsserie 1. (\*p < 0, 05)

		1. Messtag		2. Me	esstag
Genotyp	n	MAD (mm-	Herzfrequenz	MAD (mm-	Herzfrequenz
		Hg)	$(min^{-1})$	Hg)	$(min^{-1})$
+/+ +/+	17	$109,0 \pm 1,8$	$561 \pm 15$	$107,0 \pm 1,9$	$572 \pm 17$
+/L +/+	21	$107,8 \pm 1,5$	$552 \pm 12$	$109,0 \pm 1,7$	$542 \pm 17$
+/+ +/d	18	$104,3 \pm 1,5^{*}$	$570 \pm 16$	$104,2 \pm 2,0^{*}$	$552 \pm 15$
+/L +/d	12	$112,6 \pm 2,7^{*}$	$543 \pm 13$	$111,7 \pm 2,3^*$	$558 \pm 18$

Die Daten der Untersuchungen zeigten eine signifikante Erhöhung des MAD um ca. 8 mmHg bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) im Vergleich zu den einzelheterozygoten

BK $\beta$ 1 Knockout Tieren (+/+ +/d). Dementsprechend ergab auch das arithmetische Mittel aus beiden Messtagen einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Genotypen (112,2 ± 2,2 mmHg vs. 104,2 ± 1,4 mmHg; p < 0,05).

Der Vergleich des MAD der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) mit dem der heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) und mit dem der Wildtypen (+/+ +/+) ergab keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin unterschieden sich weder die heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/+ +/d), noch die heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) signifikant von den Wildtypen (+/+ +/+).

Ebenso wiesen die gemittelten Herzfrequenzen zwischen den vier Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

In Abb. 15 ist die Auswertung der arithmetischen Mittelwertes des MAD über beide Messtage dargestellt.



Abbildung 15: Mittlerer arterieller Blutdruck. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte von zwei Messtagen mit Standardfehlern von Wildtyp Mäusen (+/++/+), heterozygoten Liddle Mäusen (+/L+/+), heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/++/d) und doppelheterozygoten Mäusen (+/L+/d). n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere. (\*p < 0, 05)

#### 4.2.3 Morphometrische Daten

#### 4.2.3.1 Herzgewichte

In der ersten und zweiten Versuchsserie wurde als Parameter für eine Herzhypertrophie das Gewicht des gesamten Herzens, des linken sowie des rechten Ventrikels bestimmt und zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt.

Genotyp	n	HGW (mg)	LV (mg)	RV (mg)	LV/KGW (mg/g)
+/+ +/+	23	$133,9 \pm 3,1$	$97{,}6\pm2{,}2$	$28,2\pm1,2$	$2,8 \pm 0,1^{*}$
+/L +/+	21	$137,0 \pm 3,1$	$97{,}4\pm3{,}0$	$30,0\pm1,\!9$	$3,0\pm0,1$
+/+ +/d	17	$131,4 \pm 4,2$	$96{,}4\pm3{,}5$	$31,1\pm1,6$	$2,9 \pm 0,1$
+/L +/d	19	$133,7 \pm 2,9$	$102{,}7\pm2{,}6$	$25{,}5\pm0{,}8$	$3,2 \pm 0,1^{*}$

Mittelwerte und Standardfehler der Herzgewichte. (\*p < 0, 05)

Mittelwerte und Standardfehler des Alters und der Körpergewichte. (\*p < 0, 05)

Genotyp	n	Alter (Monate)	KGW (g)
+/+ +/+	23	$5{,}6\pm0{,}2$	$33{,}0\pm2{,}3$
+/L +/+	21	$5,3\pm0,5$	$33{,}0\pm0{,}9$
+/+ +/d	17	$5,4 \pm 0,4$	$33,5 \pm 1,2$
+/L +/d	19	$5,0 \pm 0,2$	$32{,}5\pm0{,}8$

Die Daten zeigen einen signifikanten Anstieg des Gewichtes des linken Ventrikels in Bezug auf das Körpergewicht der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+). Dies kann als Indiz für eine Linksherzhypertrophie gewertet werden. Obwohl sich die Körpergewichte der Versuchstiere ähnlich verhalten, konnte der Unterschied bei den absoluten Zahlen nicht signifikant nachvollzogen werden. Die Vergleiche der rechten Ventrikel und der Gesamtherzgewichte ergaben sowohl bei den absoluten, als auch bei den errechneten Zahlen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

#### 4.2.3.2 Nierengewichte

Neben den Herzgewichten wurden von den Tieren der ersten und zweiten Versuchsserie das Gewicht der Nieren bestimmt und zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt. Weder bei den absoluten Werten, noch bei den relativ zum Körpergewicht der Tiere bestimmten Daten ergaben sich signifikante Unterschiede.

Genotyp	n	Gesamtnierengewicht	Gesamtnierengewicht/KGW	
		(mg)	(mg/g)	
+/+ +/+	21	$382,4 \pm 10,0$	$10,7 \pm 0,3$	
+/L +/+	13	$393,9 \pm 20,5$	$12,1 \pm 0,7$	
+/+ +/d	12	$414,1 \pm 19,4$	$12,3 \pm 0,5$	
+/L +/d	12	$364,1 \pm 12,4$	$11,1 \pm 0,4$	

Mittelwerte und Standardfehler der absoluten und relativen Gesamtnierengewichte.

## 4.2.4 Plasmaaldosteronkonzentration

Im Anschluß an die Blutdruckmessung wurde den Tieren der ersten Versuchsserie am dritten postoperativen Tag Blut abgenommen, um die Plasmakonzentration von zirkulierendem Aldosteron zu bestimmen.

Genotyp	n	Plasmaaldosteronkonzentration (pg/ml)
+/+ +/+	17	$37,0 \pm 10,0$
+/L +/+	15	$11,3 \pm 4,2$
+/+ +/d	14	$84.0 \pm 20.2$
+/L +/d	13	$9,7 \pm 3,2$

Mittelwerte und Standardfehler der Plasmaaldosteronkonzentrationen.

Die Konzentrationen an zirkulierendem Aldosteron im Blut sind sowohl bei den doppelheterozygoten Tieren (+/L +/d) als auch bei den einzelheterozygoten Liddle Mäusen (+/L +/+) gegenüber den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) und gegenüber den einzelheterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/+ +/d) signifikant erniedrigt. Demgegenüber ist die Plasmakonzentration von Aldosteron der einzelheterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/+ +/d) gegenüber den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) tendenziell erhöht (p < 0, 1), allerdings ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen.

Da die Daten der Plasmaaldosteronkonzentration nicht normalverteilt sind, wurde zum Vergleich der Gruppen eine rangorientierte Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und sich anschließendem post-hoc-test nach Dunn's method angewendet. Die Ergebnisse der Analyse der Plasmaaldosteronkonzentration sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Ergebnisse der Va	arianzanalyse der l	Plasmaaldosteronkonze	ntration nach
Kruskal-Wallis	und post-hoc-test	nach Dunn's method.	$(*\mathbf{p} < 0, 05)$

Genotyp vs. Genotyp	+/L +/+	+/+ +/d	+/L +/d
+/+ +/+	p < 0,05(*)	p > 0,05(n.s.)	p < 0,05(*)
+/L +/+		p < 0,001 (***)	p > 0,05(n.s.)
+/+ +/d			p < 0,001 (***)
+/L +/d			



Abbildung 16: Aldosteronkonzentrationen im Plasma. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Aldosteronkonzentrationen von Wildtyp Mäusen (+/+ +/+), einzelheterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/+ +/d), einzelheterozygoten Liddle Mäusen (+/L +/+) und doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d). n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere.

# 4.3 Elektrolyte und Kreatinin

#### 4.3.1 Versuchsserie 2

In der folgenden Tabelle sind die Plasmakonzentrationen der untersuchten Parameter der zweiten Versuchsserie dargestellt.

Mittelwerte und Standardfehler der Elektrolyt-/ Kreatininkonzentration im Plasma. (\*p < 0, 05)

Genotyp	n	Natrium	Kalium	Chlorid	Kreatinin
		(mmol/l)	(mmol/l)	(mmol/l)	(mg/dl)
+/+ +/+	10	$144 \pm 0.6$	$5,2 \pm 0,1$	$112 \pm 0.4$	$0,11 \pm 0,01$
+/L +/d	10	$143 \pm 0.7$	$5,4 \pm 0,2$	$111 \pm 1,0$	$0,14 \pm 0,01^{*}$

Die Plasmakonzentrationen der abgebildeten Elektrolyte zeigten im ungepaarten Student's t-test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Konzentration von Kreatinin war im Plasma der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d)signifikant höher als im Plasma der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+).
## 4.4 Ergebnisse der telemetrischen Untersuchungen

### 4.4.1 Versuchsserie 3

Sowohl die Wildtyp Mäuse (+/+ +/+), als auch die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) der telemetrischen Versuchsreihe wurden post operationem und begleitend zu den Messungen unterschiedlichen alimentären Salzbelastungen ausgesetzt, um deren Auswirkungen auf die hämodynamischen Parameter zu untersuchen. In der folgenden Tabelle ist das angewandte Diätschema dargestellt:

versuensaarbaa far die telemetrisenen entersaenangen						
Diät	Basis 1	${ m Na}^+$ -arm	${ m Na}^+$ -reich	Basis 2		
Fütterungszeitraum	Tag 1 bis $14$	Tag 15 bis $29$	Tag 30 bis $44$	Tag 45 bis $59$		
Aufzeichnungszeitraum	Tag 9 bis 14	Tag 15 bis 29	Tag 30 bis 44	Tag 45 bis 59		

Versuchsaufbau für die telemetrischen Untersuchungen

Der Aufzeichnungszeitraum während der ersten Basisdiät musste auf fünf Tage begrenzt werden, da die Batterielaufzeit der telemetrischen Sender auf etwa 1,5 Monate beschränkt ist. Die Messperiode begann 10 Tage post operationem, um einen regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus zu gewährleisten, der von Operations- und Narkosebedingten Artefakten unbeeinflusst ist.

### 4.4.2 Basismessung

Die ersten fühf Tage der Aufzeichnungsperiode unter Normalsalzdiät dienten der Phänotypisierung der doppelheterozygoten Mausmutante (+/L +/d).

**4.4.2.1 Mittelwerte** Die Auswertung der Mittelwerte der hämodynamischen Basisdaten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) und den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+). Sowohl der MAD (Wildtyp (WT) (n = 7): 104,8  $\pm$  2,2 mmHg, doppelheterozygote Mutante (LBK) (n = 7): 106,5  $\pm$  2,8 mmHg, Abb. 17), als auch der systolische (WT (n = 7): 118,2  $\pm$  2,0 mmHg, LBK (n = 7): 118,2  $\pm$  3,5 mmHg, Abb. 17) und diastolische Druck (WT (n = 7): 92,2  $\pm$  2,3 mmHg, LBK (n = 7): 94,2  $\pm$  2,5 mmHg, Abb. 17) ergaben bei beiden Genotypen vergleichbare Werte.



Abbildung 17: Hämodynamische Basisdaten über fünf Tage registriert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern der Daten von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d).

Auch der Vergleich der gemittelten Herzfrequenzen während der Basismessung lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Genotypen (WT (n = 7):  $487 \pm 12.8$  Schläge/min vs. LBK (n = 7):  $520 \pm 9.7$  Schläge/min, Abb. 18).



Abbildung 18: Basisdaten der Herzfrequenz über fünf Tage registriert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern der Daten von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d).

Auch die gemittelten Aktivitätswerte der Basismessung unterschieden sich nicht signifikant (WT (n = 7): 4,7 ± 0,4 counts/min vs. LBK (n = 7): 7,4 ± 2,0 counts/min,(Abb. 19 oben)), allerdings weisen die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) eine größere Streuung auf als die Wildtyp Mäuse (+/+ +/+), da sich zwei der sieben doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) vermehrt bewegt haben. (Abb. 19 unten)



Abbildung 19: Basisdaten der Aktivität über fünf Tage registriert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern der Daten von sieben Wildtypen (+/++/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) (oben) und die individuellen Mittelwerte der Tiere (unten).

**4.4.2.2 Zirkadianer Rhythmus** Um den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere zu untersuchen, wurden die hämodynamischen Daten, die Herzfrequenz sowie die motorische Aktivität über 24 Stunden täglich in fünf-minütigen Abständen für je eine Minute aufgezeichnet. Über je eine Stunde wurde ein Mittelwert gebildet. Die Messung begann um 7.00 Uhr. In den folgenden Abbildungen ist ein gemittelter Tagesverlauf des MAD, der Herzfrequenz und der motorischen Aktivität während der Basismessung exemplarisch dargestellt.



Abbildung 20: Exemplarischer Tagesverlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes: Dargestellt sind die stündlichen arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von fünf Tagen Basismessung von 7 Wildtypen (+/+ +/+) und 7 doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d).



Abbildung 21: Exemplarischer Tagesverlauf der Herzfrequenz: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von fünf Tagen Basismessung von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d).



Abbildung 22: Exemplarischer Tagesverlauf der Aktivität: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von fünf Tagen Basismessung von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d).

Der Verlauf der zirkadianen Rhythmik weist bei beiden untersuchten Genotypen einen deutlichen Anstieg sowohl der Blutdruckdaten, als auch der Herzfrequenz und der Aktivität auf, der zeitlich mit dem Beginn der Nachtphase zusammenfällt. Zur weiteren Aufschlüsselung wurde nun je ein Mittelwert über 12 Stunden für die nächtliche Aktivitätsphase (19:00 Uhr bis 6:00 Uhr) und für die tägliche Ruhephase (7:00 Uhr bis 18:00 Uhr) ermittelt.

Mittelwerte und Standardfehler der hämodynamischen Daten, sowie d	ler
Aktivität über die Tag- und Nachtphasen der Basismessung	

Genotyp	n	MAD	MAD	HF Tag	HF	Aktivität	Aktivität
		Tag	Nacht	$(1/{ m min})$	Nacht	Tag	Nacht
		(mmHg)	(mmHg)		$(1/{ m min})$	(cts/min)	(cts/min)
+/+ +/+	7	$99,3\pm2,3$	$110,\!4\pm2,\!2$	$454 \pm 11{,}9$	$520 \pm 14,3$	$2{,}0\pm0{,}1$	7,5 $\pm$ 2,1
+/L +/d	7	$99,8\pm1,9$	$115{,}7\pm3{,}7$	$474 \pm 4{,}2$	$567 \pm 18{,}9$	$1{,}8\pm0{,}3$	$13{,}1\pm3{,}9$

Der Vergleich der Tageswerte mit denen der Nachtphase bestätigte den Eindruck, den man von den dargestellten Verlaufskurven gewinnt, und zeigte eine signifikante Erhöhung aller Parameter während der Nachtphase (gepaarter Students' t-Test: MAD WT Tag vs. WT Nacht:

p < 0,0001, MAD LBK Tag vs. LBK Nacht: p < 0,001, HF WT Tag vs. WT Nacht: p < 0,0001, HF LBK Tag vs. LBK Nacht: p < 0,01, Aktivität WT Tag vs. WT Nacht: p < 0,001, Wilcoxon signed rank test: Aktivität LBK Tag vs. LBK Nacht: p < 0,05). Das bedeutet, daß die Tiere beider Gruppen einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus zeigten und sich von der operativen Implantation des Telemetriesenders vollständig erholt hatten. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigte das Ergebnis der zuvor durchgeführten statistischenTests: Die Uhrzeit übt eindeutig einen signifikanten Effekt auf die gemessenen Parameter aus. (Two way ANOVA: LBK vs. WT: p < 0,001).



Abbildung 23: Mittelwerte des mittleren arteriellen Blutdruckes getrennt in Tagund Nachtphase: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d). (\*\*\*P < 0,001).



Abbildung 24: Mittelwerte der Herzfrequenz getrennt in Tag- und Nachtphase: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von sieben Wildtypen (+/++/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d). (\*\*P < 0,005 und \*\*\*P < 0,001).



Abbildung 25: Mittelwerte der Aktivität getrennt in Tag- und Nachtphase: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von sieben Wildtypen (+/+ +/+) und sieben doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d). (\*P < 0,05 und \*\*\*P < 0,001).

Der Vergleich der arithmetischen Mittelwerte von Tag und Nacht zwischen den beiden Genotypen ergab weder bei den hämodynamischen Daten, noch bei den Aktivitätsdaten einen signifikanten Unterschied. Lediglich die Herzfrequenz der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) während der nächtlichen Aktivitätsphase liegt tendenziell über der der Wildtypen (+/+ +/+) (ungepaarter t-Test: Herzfrequenz nachts: LBK vs. WT: p < 0,07). (Vgl. Tabelle 4.4.2.2).

Zur weiteren Analyse wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, wobei die Mittelwerte der nächtlichen Aktivitätsphase (19:00 Uhr bis 6:00 Uhr) von jeder Stunde der beiden Gruppen miteinander verglichen wurden.

Demnach sind sowohl die Blutdruckdaten, als auch die Herzfrequenz und die Aktivität bei den doppelheterozygoten Tieren (+/L +/d) gegenüber den Wildtyp Tieren (+/+ +/+)signifikant erhöht. (*Two way ANOVA: MAD: LBK vs. WT: p < 0,001; Systole: LBK vs. WT: p < 0,05; Diastole: LBK vs. WT: p < 0,001; Herzfrequenz: LBK vs. WT: p < 0,001; Aktivität: LBK vs. WT: p < 0,001*).

#### 4.4.3 Telemetrische Messungen nach unterschiedlicher Salzbelastung

An die fünftägige Basismessung unter Normalsalzdiät schloß sich unmittelbar das in Kap. 4.4.1 beschriebene Diätschema an, um den Einfluss unterschiedlicher Salzbelastung auf den Blutdruck der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) zu untersuchen.

**4.4.3.1 Überblick über den gesamten Versuchszeitraum** In der folgenden Abbildung ist der Verlauf des MAD, der Herzfrequenz und der Aktivität beider Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum von 47 Tagen dargestellt.



Abbildung 26: Mittlerer arterieller Blutdruck: Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler von jeweils 24 Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von 47 Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die jeweilig gefütterte Diät ist in den Balken angegeben (*Two way ANOVA: MAD Tagesmittelwerte: Na<sup>+</sup>-arm: LBK vs. WT: p < 0,05*).

In der dargestellten Verlaufskurve lässt sich ein eindeutiger Anstieg des MAD nach dem 20. Messtag feststellen, der sowohl bei den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d), als auch bei den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) auftritt. Dieser Anstieg fällt mit der Umstellung von der Na<sup>+</sup>-armen auf die Na<sup>+</sup>-reiche Diät zusammen. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Hochsalzdiät (Na<sup>+</sup>-reich) fällt der MAD bei beiden Versuchsgruppen wieder ab, jedoch ohne das Niveau der Normalsalzdiät (Basis Diät 1) wieder zu erlangen. Erst am 35. Tag der Messung, als die zweite Umstellung auf die Normalsalzdiät (Basis Diät 2) erfolgte, sank der MAD bei beiden Genotypen wieder deutlich ab, um sich in den darauffolgenden Tagen etwa auf dem Niveau der Niedrigsalzdiät (Na<sup>+</sup>-arm) einzupendeln. Streckenweise liegen die

Tagesmittelwerte des MAD der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) tendenziell über dem der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+) (*Two way ANOVA: MAD: Basis Diät 1: LBK vs. WT: p < 0,1*). Ein direkter Vergleich der Mittelwerte eines jeden Tages zwischen den beiden Gruppen ergab mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, daß der Unterschied des MAD zwischen den Versuchsgruppen unter der Niedrigsalzdiät ein signifikantes Niveau erreicht (*Two way ANOVA: MAD: Na<sup>+</sup>-arm: LBK vs. WT: p < 0,05*).



Abbildung 27: Herzfrequenz: Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler von jeweils 24 Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von 47 Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die jeweilig gefütterte Diät ist in den Balken angegeben (*Two way ANOVA: HF Tagesmittelwerte: alle Diäten: LBK vs. WT: p < 0,001*).

Auch bei Betrachtung des Verlaufes der Herzfrequenzen fällt ein Anstieg der Werte bei beiden Genotypen mit der Umstellung auf die Hochsalzdiät zusammen, gefolgt von einem allmählichen Absinken und Einpendeln der Werte auf dem ursprünglichen Niveau. Die Mittelwerte der Messdaten der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) liegen immer über denen der Wildtypen (+/+ +/+). Ein direkter Vergleich der Mittelwerte eines jeden Tages zwischen den beiden Gruppen ergab hier mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, daß der Unterschied der Herzfrequenz zwischen den Versuchsgruppen unter allen Diäten ein signifikantes Niveau erreicht. (*Two way ANOVA: HF: alle Diäten: LBK vs. WT: p < 0,001*)



Abbildung 28: Aktivität: Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler von jeweils 24 Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von 47 Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die jeweilig gefütterte Diät ist in den Balken angegeben (\*\*PS <0.05; \*\*\*PS <0.001).

Die Darstellung der Aktivität zeigt einen relativ gleichmäßigen Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum, der keine Abhängigkeit von den verschiedenen Diäten zeigt. Auch hier ergab ein direkter Vergleich der Mittelwerte eines jeden Tages zwischen den beiden Gruppen mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, daß der Unterschied der Aktivität zwischen den Versuchsgruppen unter allen Diäten ein signifikantes Niveau erreicht. (*Two way ANOVA: Aktivität: LBK vs. WT: Basis 1: p < 0,005; Na<sup>+</sup>-arm: p <0,001; Na<sup>+</sup>-reich: p < 0,001; Basis* 2: p < 0,001).

### 4.4.3.2 Mittelwerte der einzelnen Diäten

Die Auswertung der Mittelwerte der hämodynamischen Daten über den gesamten jeweiligen Diätzeitraum ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Lediglich unter der Basis Diät 2 war die Aktivität der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) signifikant erhöht (*Mann Whitney Test: Aktivität: LBK vs. WT: p < 0,05*)

Bei dem Vergleich der Mittelwerte der Diäten untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Vergleich der Tages- und Nachtmittelwerte der hämodynamischen Parameter zwischen den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) und den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+)ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Differenzen.

Mittelwerte und Standardfehler der telemetrisch aufgezeichneten Parameter  $(^*\mathbf{p}<\mathbf{0},\mathbf{05})$ 

Genotyp	n	Parameter	Basis	$Na^+$ -	Na <sup>+</sup> -	Basis
			Diät 1	arme	reiche	Diät 2
				Diät	Diät	
+/+ +/+	7	MAD (mmHg)	$104,8 \pm 2,2$	$107{,}8\pm2{,}0$	$112,\!8\pm2,\!2$	$108{,}4\pm2{,}5$
+/L +/d	7	MAD (mmHg)	$106,5 \pm 2,8$	$109,8\pm2,6$	$113,1\pm4,4$	$112{,}9\pm5{,}8$
+/+ +/+	7	Systole (mm-	$118,2 \pm 2,0$	$121,2 \pm 2,2$	$125,9 \pm 1,7$	$120,7\pm1,7$
		lig)				
+/L +/d	7	Systole (mm-	$118,2 \pm 3,5$	$120,6 \pm 2,9$	$123,3 \pm 4,7$	$122,5 \pm 5,6$
		Hg)				
+/+ +/+	7	Diastole (mm-	$92,2 \pm 2,3$	$95,1 \pm 2,2$	$100,3 \pm 3,1$	$96,4 \pm 3,8$
		Hg)				
+/L +/d	7	Diastole (mm-	$94,2 \pm 2,5$	$98,1 \pm 2,4$	$102,1 \pm 4,0$	$102,7\pm6,0$
		Hg)				
+/++/+	7	Herzfrequenz	$487 \pm 12,8$	$502 \pm 11,5$	$512 \pm 14,9$	$484 \pm 17,0$
		$(1/\min)$				
+/L +/d	7	Herzfrequenz	$520 \pm 9,7$	$530 \pm 8,5$	$536 \pm 11.8$	$521 \pm 8,6$
		$(1/\min)$				
+/++/+	7	Aktivität	$4,7 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,6$	$5,9\pm0,5$	$4,7 \pm 0,5$ *
		(counts/min)				
+/L +/d	7	Aktivität	$7,4 \pm 2,0$	$8,9 \pm 2,4$	$8,7 \pm 1,8$	$7,5 \pm 1,2$ *
		(counts/min)				

Mittelwerte und Standardfehler telemetrisch aufgezeichneter Parameter im Unterschied von Tag und Nacht

Genotyp	n	Parameter	Basis	Na <sup>+</sup> -	Na <sup>+</sup> -	Basis
			Diät 1	arme	reiche	Diät 2
				Diät	Diät	
+/+ +/+	7	MAD-Tag	$99,3 \pm 2,3$	$101,1\pm1,5$	$104,2 \pm 5,5$	$103{,}2\pm2{,}5$
		MAD-Nacht	$110,4 \pm 2,2$	$115,0 \pm 2,6$	$121,4 \pm 7,1$	$113,7\pm2,8$
		(mmHg)				
+/L +/d	7	MAD-Tag	$99,8 \pm 4,9$	$100,7 \pm 2,3$	$103,4 \pm 3,3$	$105{,}8\pm4{,}5$
		MAD-Nacht	$115,7 \pm 3,7$	$118,8 \pm 3,3$	$122,7 \pm 5,7$	$120,0 \pm 7,2$
		(mmHg)				
+/+ +/+	7	HF-Tag	$454 \pm 11,9$	$465 \pm 10,9$	$466 \pm 13,2$	$446 \pm 17,3$
		HF-Nacht	$520 \pm 14,3$	$538 \pm 12,5$	$558 \pm 16,9$	$523 \pm 17,0$
		$(1/\min)$				
+/L +/d	7	HF-Tag	$474 \pm 4,2$	$490 \pm 9,5$	$484 \pm 12,3$	$479 \pm 11,7$
		HF-Nacht	$567 \pm 18{,}9$	$571 \pm 12,6$	$587 \pm 15,8$	$564 \pm 12,0$
		(mmHg)				
+/+ +/+	7	Aktivität-Tag	$2,0 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,1\pm0,1$
		Aktivität-	$7,5 \pm 2,1$	$9,5 \pm 2,8$	$9,6\pm0,9$	$7,4 \pm 0,8$
		Nacht				
		(cts/min)				
+/L +/d	7	Aktivität-Tag	$1,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,3$
		Aktivität-	$13,1 \pm 3,9$	$15,3 \pm 4,5$	$14,8 \pm 3,3$	$12,5 \pm 2,2$
		Nacht				
		(cts/min)				

Zur weiteren Aufschlüsselung sind in den folgenden Abbildungen die Verlaufskurven des MAD beider Versuchsgruppen für die einzelnen Diäten dargestellt. Es werden jeweils die letzten fünf Tage einer Diät abgebildet. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurden Mittelwerte über je drei Stunden gebildet. Die Auswertung begann um 7:00 Uhr morgens.



Abbildung 29: MAD Basis Diät 1: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von fünf Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die Auswertung begann um 7:00 Uhr morgens. Tag und Nacht sind durch Balken gekennzeichnet.



Abbildung 30: **MAD Na<sup>+</sup>-arme Diät:** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von fünf Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die Auswertung begann um 7:00 Uhr morgens. Tag und Nacht sind durch Balken gekennzeichnet.



Abbildung 31: **MAD** Na<sup>+</sup>-reiche Diät: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von fünf Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die Auswertung begann um 7:00 Uhr morgens. Tag und Nacht sind durch Balken gekennzeichnet.



Abbildung 32: MAD Basis Diät 2: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Stunden über einen Aufzeichnungszeitraum von fünf Tagen von beiden untersuchten Genotypen. Die Auswertung begann um 7:00 Uhr morgens. Tag und Nacht sind durch Balken gekennzeichnet.

## 4.4.3.3 Einfluss der Umstellung der Salzbelastung auf die hämodynamischen Parameter

Um den Einfluss der Diätumstellung auf den Blutdruck zu überprüfen, wurden die Transienten der hämodynamischen Parameter näher betrachtet. Der Vergleich der Mittelwerte der Blutdruckdaten und der Herzfrequenz von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Ernährungsumstellung erfolgte sowohl zwischen den Genotypen als auch zwischen den Diäten. Für den Vergleich des Blutdruckes innerhalb eines Genotypes aber zwischen zwei Diäten wurde der gepaarte Student's t-test angewandt, da es sich um eine Gegenüberstellung zweier Werte von jeweils einem Individuum handelte. Wurden die Daten der heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) mit denen der Wildtypen (+/+ +/+) verglichen, wurde der ungepaarte Student's t-test angewandt.

4.4.3.3.1 Umstellung von der Basis Diät auf die salzarme Diät Die Umstellung von der Basis Diät auf die salzarme Ernährung hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck oder auf die Herzfrequenz der Doppelmutanten und der Kontrolltiere. Im folgenden werden jeweils der Mittelwert mit Standardfehler des MAD, sowie der Herzfrequenz im Vergleich zwischen zwei aufeinander folgenden Diäten dargestellt. Rechts daneben ist die Differenz der Transienten abgebildet.



Abbildung 33: **MAD**: Umstellung von Basis Diät 1 auf Na<sup>+</sup>-arme Diät: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung des MAD nach der Umstellung.



Abbildung 34: Herzfrequenz: Umstellung von Basis Diät 1 auf Na<sup>+</sup>-arme Diät: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung der Herzfrequenz nach der Umstellung.

4.4.3.3.2 Umstellung von der salzarmen Diät auf die salzreiche Diät Der Übergang von der salzarmen auf die salzreiche Ernährung bewirkte sowohl bei den Wildtypen (+/+ +/+), als auch bei den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) einen signifikanten Anstieg des Blutdruckes. Das arithmetische Mittel des MAD stieg bei den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) von 110,6 mmHg (Mittelwert der letzten drei Tage der Na<sup>+</sup>- armen Diät) auf 115,9 mmHg (Mittelwert der ersten drei Tage der Na<sup>+</sup>reichen Diät) an. Bei den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) konnte ein Anstieg von 108,0 mmHg auf 114,0 mmHg beobachtet werden. Die signifikante Erhöhung zeigt sich bei beiden Genotypen auch bei dem Vergleich von Systole und Diastole (nicht abgebildet). Die Höhe des Blutdruckanstieges unterschied sich im Vergleich beider Versuchsgruppen nicht signifikant. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung in Kapitel 4.4.1.2, daß die Hochsalzdiät zu Beginn einen deutlichen Effekt auf beide Genotypen ausübte, der im weiteren Verlauf der Diät nicht mehr feststellbar war.



Abbildung 35: **MAD: Umstellung von Na<sup>+</sup>-arme Diät auf Na<sup>+</sup>-reiche Diät:** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung des MAD nach der Umstellung.

Auf die Höhe der Herzfrequenz hatte die Umstellung von salzarmer auf salzreiche Ernährung bei beiden Versuchsgruppen keinen Einfluss. Der Mittelwert der letzten drei Tage der Na<sup>+</sup>-armen Diät betrug bei den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) 540  $\pm$  11 Schläge/min, und der der ersten drei Tage der Na<sup>+</sup>-reichen Diät lag bei 551  $\pm$  12 Schlägen/min. Bei den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) veränderte sich das arithmetische Mittel von 520  $\pm$  4 Schlägen/min (Na<sup>+</sup>-arme Diät) zu 529  $\pm$  11 Schläge/min (Na<sup>+</sup>-reiche Diät).



Abbildung 36: **Herzfrequenz: Umstellung von Na<sup>+</sup>-arme Diät auf Na<sup>+</sup>-reiche Diät:** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung der Herzfrequenz nach der Umstellung.

4.4.3.3.3 Umstellung von der salzreichen Diät auf die Basis Diät Die Rückkehr nach zweiwöchiger Hochsalzbelastung zur Standardfütterung führte zu einer signifikanten Erniedrigung der Blutdruckparameter sowohl bei den doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) als auch bei den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+). Bei beiden Versuchsgruppen fiel die Erniedrigung gleichermaßen hoch aus. Der MAD der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) sank von 112,3 ± 4,7 mmHg (Mittelwert der letzten drei Tage der Hochsalzdiät) auf 108,8 ± 4,5 mmHg (Mittelwert der ersten drei Tage der Basis Diät). Zum Vergleich sank der MAD der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+) von 110,8 ± 2,1 mmHg bei der Hochsalz Diät auf 105,6 ± 1,8 mmHg zu Beginn der Basis Diät.



Abbildung 37: **MAD: Umstellung von Na<sup>+</sup>-reiche Diät auf Basis Diät:** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung des MAD nach der Umstellung.

Die Herzfrequenz blieb auch bei der Umstellung von der Hochsalzdiät auf die Basis Diät bei beiden Genotypen fast unbeeinflusst. Der Mittelwert der ersten drei Tage nach der Umstellung lag bei den Wildtypen (+/+ +/+) mit 489  $\pm$  22 Schlägen/min etwas unter dem Wert der letzten drei Tage der Hochsalzdiät (504  $\pm$  18 Schläge/min). Der Mittelwert der Herzfrequenz der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) änderte sich nur marginal: 521  $\pm$  13 Schläge/min (Na<sup>+</sup>-reiche Diät) und 522  $\pm$  11 Schläge/min (Basis Diät).



Abbildung 38: **Herzfrequenz: Umstellung von Na<sup>+</sup>-reiche Diät auf Basis Diät:** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler von jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Futterumstellung von beiden untersuchten Genotypen. Die rechte Abbildung zeigt die Änderung der Herzfrequenz nach der Umstellung.

# 4.5 Versuche im Stoffwechselkäfig an wachen Mäusen

In der vierten Versuchsserie wurden mit Hilfe von metabolischen Käfigen Untersuchungen zur Einfuhr- und Ausfuhrbilanzierung vorgenommen, um die Phänotypisierung der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) zu komplettieren und im Anschluss daran den Einfluss unterschiedlicher alimentärer Salzbelastungen auf den Stoffwechsel und insbesondere auf das renale System zu untersuchen.

## 4.5.1 Versuchsserie 4

Die Mäuse dieser Versuchsreihe wurden dem gleichen Diätschema unterzogen, wie die Tiere der telemetrischen Versuchsserie:

Versuchsaufbau für die Untersuchungen zur Einfuhr- und Ausfuhrbilanzierung (MK: Metabolischer Käfig).

Diät	Basis 1	$Na^+$ -arm	$Na^+$ -reich	Basis 2
Fütterungszeitraum	Tag 1 bis $14$	Tag 15 bis $29$	Tag 30 bis $44$	Tag 45 bis $59$
Aufenthalt im MK	Tag 12 bis $14$	Tag 27 bis 29	Tag 42 bis 44	Tag 57 bis 59
Sammelperiode	Tag 13 bis 14	Tag 28 bis 29	Tag 43 bis 44	Tag 58 bis 59

Zusätzlich zu dem gewohnten Pelletfutter stand den Tieren vier Tage bevor der Aufenthalt im Stoffwechselkäfig begann, das Mehlfutter zur Verfügung, um eine Gewöhnung daran zu erreichen. Der Aufenthalt der Tiere im metabolischen Käfig wurde auf 48 Stunden ausgedehnt, obwohl die Sammelperiode nur 24 Stunden betrug, da die Mäuse im Käfig erfahrungsgemäß weniger Nahrung zu sich nehmen. Somit konnte die Vergleichbarkeit zwischen den Mengen an aufgenommener Nahrung und an den Ausscheidungen gewahrt bleiben. Außerdem ist der Gewichtsverlust am zweiten Tag signifikant niedriger als am ersten Tag im metabolischen Käfig, so daß man davon ausgehen kann, daß sich die Tiere am zweiten Tag steady state Bedingungen annähern (siehe Abb. 39). Ein längerer Aufenthalt in den Käfigen zur besseren Gewöhnung und noch stärkerer Annäherung an einen ausgeglichenen Stoffwechselhaushalt wurde abgelehnt, um die Belastung der Tiere möglichst gering zu halten und einen weiteren nicht vermeidbaren Gewichtsverlust zu verhindern.



Abbildung 39: Gewichtsverlust im metabolischen Käfig: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Daten von fünf Wildtyp Mäusen (+/+ +/+)und fünf doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) an jeweils beiden Tagen des Aufenthalts im Stoffwechselkäfig. (\*P<0,05 und \*\*P < 0,005).

### 4.5.2 Stoffwechselbilanz unter der Basis Diät

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in der folgenden Tabelle. Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurden das spezifische Gewicht des Urins, die Konzentration der wichtigsten Elektrolyte und die Konzentration von Kreatinin im Urin bestimmt. Zur genauen Ein- und Ausfuhrbilanzierung wurde zunächst die absolute renale Ausscheidung der Elektrolyte (U<sub>Elektrolyt</sub>V) nach der Formel: [Elektrolyt ]<sub>Urin</sub> \* V<sub>Urin</sub> (Harnzeitvolumen 1/24h) bestimmt. Weiterhin wurde die Bilanz der untersuchten Elektrolyte und des Wassers berechnet. Sie gibt den Anteil der ausgeschiedenen Menge an der zugeführten Menge in Prozent an.

Genotyp (n)	+/++/+ (5)	+/L+/d (5)
KGW initial (g)	$27,\!64 \pm 0,\!80$	$25,\!62\pm 0,\!86$
Gewichtsverlust/24h (g)	$0,69 \pm 0,16$	$0,41 \pm 0,15$
Trinkvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,13 \pm 0,01$	$0,\!17\pm0,\!02$
Urinvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$
$H_2$ O-Bilanz (% der Aufnahme)	$33,2 \pm 6,3$	$32,3 \pm 5,6$
Spezifisches Gewicht $_{Urin}$ (N/m <sup>3</sup> )	$1,075 \pm 0,02$	$1,079 \pm 0,01$
$[Na^+]_{Urin} (mmol/l)$	$152,4 \pm 20,9$	$157,8 \pm 24,4$
$[\mathbf{K}^+]_{Urin} \pmod{l}$	$321,5 \pm 30,4$	$313,5 \pm 30,1$
$[Cl^-]_{Urin} \pmod{l}$	$289,0 \pm 44,4$	$284,8 \pm 45,4$
$[{f Kreatinin}]_{Urin} \ (\mu {f mol}/{f l})$	$3718,8 \pm 308,0$	$3308,2 \pm 456$
$Na^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$62,6 \pm 13,2$	$63,3\pm7,6$
Absolute renale Na <sup>+</sup> -Exkretion	$0,\!17 \pm 0,\!04$	$0,\!19\pm0,\!03$
(mmol/24h)		
${ m K}^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$44,0 \pm 6,0$	$43,2 \pm 7,4$
Absolute renale K <sup>+</sup> -Exkretion	$0,34 \pm 0,08$	$0,\!39\pm0,\!06$
(mmol/24h)		
$Cl^-$ -Bilanz (% der Beladung)	$97,5 \pm 15.1$	$99,7 \pm 10,8$
	$0,29 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,05$
(mmol/24h)		

Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Parameter im Urin unter der Basis Diät.

Die initial bestimmten Körpergewichte wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf, ebenso wie die verzeichneten Gewichtsverluste während des Aufenthaltes in dem Stoffwechselkäfig. Auch die Trink- und Urinvolumina beider Gruppen entsprachen sich in etwa. Die durchschnittliche Flüssigkeitsbilanz der Tiere (Differenz aus Trinkund Urinvolumen)war bei beiden Gruppen positiv. Im tabellarischen Überblick ist zu erkennen, daß die doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) auch bei den übrigen Parametern,wie den Werten für das spezifische Gewichts des Urins, den Konzentrationen der Elektrolyte und des Kreatinins im Urin, sowie den Exkretionswerten keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+) aufwiesen. Auch die Bilanzen der Elektrolyte entsprachen sich bei beiden Genotypen in etwa. Für Cl<sup>-</sup> wiesen die Tiere eine nahezu ausgeglichene Bilanz auf, während vom aufgenommenen Na<sup>+</sup>, bzw. K<sup>+</sup> nur etwa 60%, bzw. 40% über die Nieren ausgeschieden wurden.

#### 4.5.3 Stoffwechselbilanz unter unterschiedlicher Salzbelastung

Unmittelbar an die Untersuchung unter der Basis Diät schloss sich das unter 4.5.1 beschriebene Diätschema an. Die Ergebnisse sind in den folgenden drei Tabellen zusammengefasst. Unter der salzarmen Diät zeigten sich einige signifikante Unterschiede bei der Bilanzierung des Salz- und Wasserhaushaltes:

Die doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) haben prozentual signifikant weniger von dem aufgenommenen Wasser ausgeschieden als die Wildtyp Mäuse (+/+ +/+). Diese Beobachtung korreliert mit der Na<sup>+</sup>-Bilanz, die bei den doppelheterozygoten Tieren (+/L +/d) ebenfalls signifikant niedriger ausfällt als bei den Wildtypen (+/+ +/+).

Bei der absoluten renalen Na<sup>+</sup>-Exkretion zeigte sich zwar eine tendenziell geringere Ausscheidung der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+), die jedoch kein signifikantes Niveau erreichte (p = 0.05).

Die K<sup>+</sup>-Bilanz zeigte, daß die Wildtyp Mäuse (+/+ +/+) prozentual signifikant mehr von dem aufgenommen K<sup>+</sup> über die Nieren ausgeschieden haben, als die doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d). Hier bestätigten allerdings auch keine tendenziell vorhandenen Unterschiede bei der absoluten renalen K<sup>+</sup>-Exkretion diese Beobachtung ( p = 0,3).

Bei Betrachtung der Na<sup>+</sup>-Bilanz fällt auf, daß die Tiere mehr Na<sup>+</sup> über die Nieren ausgeschieden haben, als sie während des Versuchszeitraumes zu sich genommen haben. Dies ist wahrscheinlich in einer geringeren Futteraufnahme als üblich während des Aufenthaltes in den Metabolischen Käfigen begründet. Ein Vergleich zu der Futteraufnahme während der vorangegangenen Basis Diät bestätigt diese Annahme (Basis Diät Futteraufnahme: WT: 3,1g  $\pm$  0,2g, LBK: 3,5g  $\pm$  0,2g vs. Na<sup>+</sup>-arme Diät Futteraufnahme: WT: 1,6g  $\pm$  0,1g, LBK: 1,9g  $\pm$  0,1g). Die übrigen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede bei dem direkten Vergleich beider Genotypen.

Genotyp (n)	+/++/+ (5)	+/L+/d (5)
KGW initial (g)	$27{,}80\pm0{,}63$	$26,\!48 \pm 0,\!83$
Gewichtsverlust/24h (g)	$1{,}01\pm0{,}14$	$0,\!55 \pm 0,\!19$
Trinkvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0{,}10\pm0{,}01$	$0{,}11\pm0{,}01$
Urinvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,04 \pm 0,003$	$0,03 \pm 0,002^*$
$H_2O$ -Bilanz (% der Aufnahme)	$38,9 \pm 4,8$	$24,2 \pm 3,0^{*}$
Spezifisches Gewicht $_{Urin}$ (N/m <sup>3</sup> )	$1,\!055 \pm 0,\!01$	$1,062 \pm 0,01$
$[Na^+]_{Urin} (mmol/l)$	$58,6\pm9,8$	$58,8\pm6,0$
$[\mathbf{K}^+]_{Urin} \ (\mathbf{mmol/l})$	$217,1 \pm 18,7$	$259,8 \pm 15,1$
$[\mathrm{Cl}^-]_{Urin} \ (\mathrm{mmol/l})$	$90,2 \pm 12,4$	$119,0 \pm 12,4$
$[{f Kreatinin}]_{Urin} \ (\mu {f mol}/l)$	$4201,7 \pm 477,5$	$4720,2\pm381,7$
$Na^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$270,1 \pm 18,3$	165,7 $\pm$ 26,6 *
$ {\bf Absolute \ renale \ Na^+ - Exkretion} $	$0,06 \pm 0,003$	$0{,}04\pm0{,}01$
$(\rm mmol/24h)$		
${ m K}^+ ext{-Bilanz}$ (% der Beladung)	$54,8 \pm 4,4$	$38,5 \pm 4,9 *$
	$0{,}22\pm0{,}02$	$0{,}18\pm0{,}03$
$(\rm mmol/24h)$		
$\mathrm{Cl}^-\text{-}\mathrm{Bilanz}$ (% der Beladung)	$106,8 \pm 5,4$	$85,1 \pm 13,8$
$ {\bf Absolute \ \ renale \ \ } Cl^-{\bf Exkretion} $	$0{,}09\pm0{,}01$	$0,\!08 \pm 0,\!02$
$(\rm mmol/24h)$		

Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Parameter im Urin unter Na<sup>+</sup>-armer Diät (\*p<0,05).

Unter der folgenden salzreichen Diät zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den in Tabelle 16 aufgeführten Parametern. Die Tendenz eines erhöhten spezifischen Gewichtes des Urins der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) erreichte kein signifikantes Niveau (p = 0, 08).

Genotyp (n)	+/+ +/+ (5)	+/L+/d (5)
Körpergewicht (g)	$26,53 \pm 0,45$	$26,05 \pm 0,77$
Gewichtsverlust/24h (g)	$1,13 \pm 0,18$	$1,55 \pm 0,14$
Trinkvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,\!26\pm0,\!02$	$0,\!27\pm0,\!04$
Urinvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0{,}13\pm0{,}03$	$0{,}14\pm0{,}01$
${ m H_2O} ext{-Bilanz} \ (\% \ { m der} \ { m Aufnahme})$	$54,0 \pm 2,28$	$45,1\pm9,5$
Spezifisches Gewicht $_{Urin}$ (N/m <sup>3</sup> )	$1,028 \pm 0,004$	$1,049 \pm 0,01$
$[\mathbf{Na}^+]_{Urin} \ \mathbf{(mmol/l)}$	$478,2 \pm 72,6$	$528,8 \pm 87,3$
$[\mathbf{K}^+]_{Urin} \ \mathbf{(mmol/l)}$	$101.0 \pm 8,3$	$125,4 \pm 23,6$
$[\mathrm{Cl}^-]_{Urin} \ (\mathrm{mmol/l})$	$501,4 \pm 75,3$	$580,\!6\pm108,\!9$
$[{f Kreatinin}]_{Urin} \; (\mu {f mol}/{f l})$	$1348,7 \pm 97,5$	$2189,6 \pm 756,0$
Na <sup>+</sup> -Bilanz (% der Beladung)	$71,4 \pm 10,4$	$66,7 \pm 13,8$
Absolute renale Na <sup>+</sup> -Exkretion	$1,79 \pm 0,41$	$1,\!65 \pm 0,\!53$
$(\rm mmol/24h)$		
${ m K}^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$79,0\pm6,2$	$77,8\pm8,3$
	$0,\!37\pm0,\!05$	$0,\!35\pm0,\!08$
(mmol/24h)		
$Cl^-$ -Bilanz (% der Beladung)	$75,7\pm10,8$	$72,4 \pm 15,0$
	$1,87 \pm 0,4$	$1,77 \pm 0,6$
(mmol/24h)		

Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Parameter im Urin unter Na<sup>+</sup>-reicher Diät.

Die zum Abschluß erneut erfolgte Bilanzierung unter der Basis Diät wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Salzbelastung zu einer dauerhaften Beeinflussung des Wasser- und Elektrolythaushaltes führte, oder ob die gemessenen Werte denen der ersten Bilanzierung glichen. Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration im Urin der doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d) im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+). Auch die K<sup>+</sup>-Konzentration im Urin der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) war tendenziell niedriger als bei den Wildtypen (+/+ +/+) (p = 0,07). Diese Beobachtung schien zu dem scheinbar erhöhten Harnzeitvolumen der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) zu passen, welches erniedrigte Substanzkonzentrationen im Urin erklären könnte. Allerdings ergab die Statistik keinen signifikanten Unterschied. Die übrigen Werte, insbesondere die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Bilanz, sowie die absolute renale Ausscheidung der Elektrolyte unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander.

Genotyp (n)	+/+ +/+ (5)	+/L+/d (5)
KGW (g)	$28{,}65\pm0{,}48$	$26,79 \pm 1,18$
Gewichtsverlust/24h (g)	$0{,}83\pm0{,}13$	$1,\!10\pm0,\!06$
Trinkvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,14 \pm 0,02$	$0{,}19\pm0{,}03$
Urinvolumen(24h)/KGW (ml/g)	$0,04 \pm 0,01$	$0{,}08\pm0{,}03$
$H_2O$ -Bilanz (% der Aufnahme)	$27,4 \pm 1,3$	$24,2 \pm 4,2$
Spezifisches Gewicht $_{Urin}$ (N/m <sup>3</sup> )	$1,088 \pm 0,01$	$1,064 \pm 0,02$
$[Na^+]_{Urin} (mmol/l)$	$162,8 \pm 10,8$	109,0 $\pm$ 17,7 *
$[\mathbf{K}^+]_{Urin} \ (\mathbf{mmol/l})$	$293,5\pm9,5$	$222,2 \pm 33,2$
$[Cl^-]_{Urin} \text{ (mmol/l)}$	$238,4 \pm 17,2$	153,6 $\pm$ 24,9 *
$[$ Kreatinin $]_{Urin}$ ( $\mu$ mol/l)	$5050,5\pm321,5$	$3782,0\pm1000,4$
$Na^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$83,0\pm8,0$	$93,3 \pm 20,0$
$ {\bf Absolute \ renale \ Na^+ - Exkretion} $	$0,16 \pm 0,02$	$0{,}15\pm0{,}03$
(mmol/24h)		
$\rm K^+$ -Bilanz (% der Beladung)	$50,8 \pm 6,4$	$64,6 \pm 15,1$
	$0,\!29\pm0,\!04$	$0,\!32\pm0,\!07$
$(\rm mmol/24h)$		
$Cl^-$ -Bilanz (% der Beladung)	$107,1 \pm 11,7$	$112,6 \pm 21,3$
$ {\bf Absolute \ \ renale \ \ } Cl^- {\bf Exkretion} $	$0,\!24 \pm 0,\!03$	$0{,}21\pm0{,}04$
$(\rm mmol/24h)$		

Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Parameter im Urin unter Basis Diät 2 (\*p $<0,\!05)$ 

# 5 Diskussion

Die arterielle Hypertonie ist nach wie vor die häufigste Ursache für kardiovaskulär bedingte Erkrankungen in den industrialisierten Nationen. Nur in etwa 5-10 % der Fälle ist es derzeit möglich, die Ursache für den Bluthochdruck festzustellen. In den weitaus meisten Fällen lautet die Ausschlußdiagnose primäre oder essentielle Hypertonie, deren Ursachen aufgrund des multifaktoriell bedingten und heterogenen Krankheitsbildes verborgen bleiben. Genetische Komponenten und externe Faktoren wirken auf vielschichtige Weise zusammen und führen in ihrer Gesamtheit zu dem pathogenen Phänotyp des Hypertonikers.

Die essentielle Hypertonie wird polygenetisch verursacht und gehört somit zu den quantitativen Erkrankungen, das bedeutet, daß mehrere genetische Veränderungen für den Bluthochdruck verantwortlich sind. Die einzelnen Effekte der beteiligten Gene sind jedoch mehr oder weniger gering, vielmehr ist eine Interaktion von multiplen Genen für die Krankheitsbildung notwendig. Zudem können die einzelnen genetischen Veränderungen eine additive Wirkung ausüben, sich also auch gegenseitig verstärken und somit einen variablen Phänotyp hervorrufen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell ist eine durch Kreuzung von Mäusen, bei denen durch genetische Manipulation eine Überaktivierung (gain of function) des ENaC induziert wurde (L/L), und Mäusen mit genetischer Inaktivierung des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanals (BK $\beta$ 1 d/d) entstandene doppelheterozygote Mutante. Es beruht damit auf zwei genetischen Defekten, die jeder für sich in homozygoter Ausprägung ein Modell für eine arterielle Hypertonie darstellen und phänotypisch einen Hyperaldosteronismus bzw. Pseudohyperaldosteronismus aufweisen, der jeweils durch unterschiedliche Mechanismen induziert wird. Sowohl das RAAS, als auch die renale Salz- und Wasserhomöostase werden durch die genetischen Veränderungen beeinflusst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Phänotypisierung der heterozygoten Doppelmutante (+/L +/d) hinsichtlich der Blutdruck- und Volumenregulation vorzunehmen und die möglichen pathophysiologischen Konsequenzen einer Kombination beider Defekte zu untersuchen. Da die einzelnen genetischen Veränderungen bei heterozygotem Auftreten im Tiermodell unter physiologischen Haltungsbedingungen keinen Bluthochdruck verursachen, sollte geklärt werden, ob bei gleichzeitigem Auftreten der Mutationen im heterozygoten Genotyp durch Interaktionen im Phänotyp eine Hypertonie verursacht wird (Gen–Dosis Effekt) und die Blutdruckregulation Unterschiede aufweist. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses einer unterschiedlichen Salzbelastung auf den Phänotyp der doppelheterozygoten Mausmutante (+/L +/d).

Um den Einfluss der Kombination der genetischen Defekte auf die mittelfristige Regulation des Blutdruckes zu untersuchen, wurden in der ersten Versuchsserie der MAD und die Herzfrequenz bestimmt. Als Kontrolltiere dienten hier sowohl Wurfgeschwister mit intaktem Genom (Wildtyp +/+ +/+) als auch Geschwistertiere die jeweils nur einen der Defekte in heterozygoter Ausprägung trugen (Liddle's Syndrom +/L +/+ und BK $\beta$ 1 Knockout +/+ +/d).

Die hämodynamischen Messungen erfolgten an wachen Mäusen über einen chronisch implantierten Katheter in der A. femoralis. Neben der Radiotelemetrie ist diese Methode der Blutdruckmessung, nach derzeitigem Kenntnisstand, das präziseste Verfahren zur Ermittlung des Blutdrucks und der Herzfrequenz bei Mäusen [Van Vliet et al., 2000] & [Butz und Davisson, 2001]. Da die Messung über den chronischen Katheter, im Gegensatz zu der Schwanzplethysmographie, bei der die Tiere fixiert und einer erhöhten Umgebungstemperatur ausgesetzt sind, ohne Störung der Tiere erfolgt, ist davon auszugehen, daß keine stressbedingten Artefakte und Veränderungen der Messparameter infolge eines erhöhten Sympathikotonus auftreten. Die in der vorliegenden Arbeit mit dieser Methode bestimmten Herzfrequenzen von ca. 560 Schlägen pro Minute stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein [Tian et al., 1997] & [Li et al., 1999]. Im Gegensatz zum Umgang mit Ratten ist es sehr schwer, Mäuse an die erforderlichen Manipulationen bei Verwendung der Tail cuff Methode zu gewöhnen, und als Folge davon liegen die gemessenen Blutdruckwerte häufig über dem in der Literatur angegeben MAD der Mäuse von ca. 108 mmHg [Pluger et al., 2000]; [Mattson, 2001]; [Cholewa und Mattson, 2005]; [Bek et al., 2006]; [Just et al., 2000]; [Schweda et al., 2005]; [Oppermann et al., 2006] & [Rust et al., 2006]. Vergleiche von Blutdruckwerten in der Literatur, die mittels Tail cuff Methode oder durch Kathetermessungen an wachen Tieren durchgeführt wurden, bestätigen noch einmal, daß die hier durchgeführte Messmethode, der Schwanzplethysmographie bezüglich der Präzision der Ergebnisse überlegen ist [Mattson, 1998] & [Quaschning et al., 2001]. Zudem ist es ein weiterer wichtiger Vorteil der chronisch implantierten Katheter, daß es möglich ist, Blutproben von wachen und ungestressten Mäusen zu gewinnen.

Die Bestimmung der täglichen Wasseraufnahme zeigte, daß sich die Mäuse bis zum Messbeginn von der Narkose und der Operation weitestgehend erholt hatten. Am zweiten und dritten postoperativen Tag nahmen die Tiere im Durchschnitt ca. 3,7 ml Wasser zu sich, was einer normalen physiologischen Flüssigkeitsaufnahme entspricht [Meyer, 1993]. Da die Mäuse außerdem den Habitus eines gesunden bzw. geringgradig erkrankten Tieres zeigten, konnte davon ausgegangen werden, daß die erhobenen Blutdruckdaten durch den erfolgten Eingriff nur unwesentlich beeinträchtigt wurden. Voraussetzung für eine schnelle Regeneration der Tiere nach der Operation war allerdings eine zügige und routinierte Implantation der Katheter.

Die Auswertung der beiden Messtage der ersten Versuchsserie zeigte einen signifikant erhöhten Blutdruck bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) im Verhältnis zu den heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Tieren (+/+ +/d), wobei die Herzfrequenzen keine Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen aufwiesen. Der signifikante Blutdruckunterschied zwischen den beiden Genotypen ließ sich an beiden Messtagen gleichermaßen nachweisen. Die erhobenen Blutdruckwerte der heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/+ +/d) stimmen mit früher publizierten Daten von BK $\beta$ 1 Knockout Wildtypen (+/+ +/+) überein [Pluger et al., 2000] & [Budack, 2004], was dafür spricht, daß ein heterozygoter genetischer Defekt der  $\beta$ 1-Untereinheit des BK-Kanals nicht ausreicht, um eine Blutdruckerhöhung zu verursachen. Daß sich die Blutdruckwerte der heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) unter einer normalen Salzdiät, wie sie hier vorlag, nicht vom Wildtyp unterscheiden, wurde schon von Pradervand et al. [Pradervand et al., 1999] beschrieben und konnte hier bestätigt werden. Die an beiden Messtagen erkennbare tendenzielle Blutdruckerhöhung der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) gegenüber den heterozygoten Liddle Mäusen (+/L +/+) und den Wildtypen (+/+ +/+) erreichte kein signifikantes Niveau. Die erhöhten Blutdruckwerte der Doppelmutante (+/L +/d) gegenüber der heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Maus (+/+ +/d) sprechen für einen geringen, aber messbaren Effekt der Kombination beider genetischen Defekte.

Wie in der Literaturübersicht beschrieben, wurde in den letzten Jahren die Hypothese entwickelt, daß die arterielle Hypertonie bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) eine direkte Konsequenz eines erhöhten Tonus in arteriellen Widerstandsgefäßen ist [Brenner et al., 2000b]; [Standen, 2000]; [Patterson et al., 2002] & [Kotlikoff und Hall, 2003]. Als erste beschrieben Brayden und Nelson im Jahr 1992, daß die Aktivierung der BK-Kanäle durch den lokalen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßmuskeltonus spielt, indem sie einen negativen Feedback Mechanismus zur Limitierung einer Vasokonstriktion vermittelt [Brayden und Nelson, 1992]. Die regulatorische  $\beta$ 1-Untereinheit erhöht die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle maßgeblich und trägt somit fundamental zu einer Funktionssteigerung der BK-Kanäle bei.

Durch Untersuchungen an isolierten Gefäßen von homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) konnte gezeigt werden, daß der erhöhte arterielle Tonus mit einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle und einer gestörten Kopplung von Calcium-Sparks und STOC's vergesellschaftet ist. Diese molekularen und zellulären Störungen gehen mit einem erhöhten systemischen Blutdruck und einer Herzhypertrophie einher. Mittlerweile konnte man jedoch zudem bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) erhöhte Plasmaaldosteronspiegel nachweisen [Budack, 2004] & [Grimm et al., 2009], so daß die Hypothese eines rein myogenen Hypertonus in Frage gestellt ist, und der Hyperaldosteronismus als alternative oder zusätzliche Erklärung für die Hypertonie der BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) dient [Grimm et al., 2009].

Im Gegensatz zu den BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) zeigen die Liddle Mäuse (L/L) gegenüber dem jeweiligen Wildtyp (+/+) signifikant erniedrigte Plasmaaldosteronspiegel, wobei sich die heterozygoten Liddle Mäuse (+/L) intermediär verhalten [Pradervand et al., 1999]. Wie ebenfalls im Literaturteil beschrieben, führt die gain-offunction-Mutation des ENaC bei den Liddle Mäusen (L/L) zu einer vermehrten Reabsorption von Na<sup>+</sup> im renalen Tubulus, weshalb die Tiere bei einer vermehrten Salzzufuhr eine Normo- oder Hypokaliämie, eine metabolische Alkalose und einen Bluthochdruck entwickeln. Unter normalen Ernährungsbedingungen zeigen die Liddle Mäuse (L/L) ausschließlich einen erniedrigten Aldosteronspiegel, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine durch die Salzretention hervorgerufene Hypervolämie. Aufgrund dieser Symptome wurde der Ausdruck des Pseudohyperaldosteronismus geprägt, da die Tiere zwar erniedrigte Plasmaaldosteronspiegel aufweisen, die genannten anderen Veränderungen jedoch in dieser Kombination durch einen Hyperaldosteronismus hervorgerufen werden können.

Aufgrund des gegensätzlichen Verhaltens bezüglich des Plasmaaldosteronspiegels, welches die beiden untersuchten genetischen Defekte isoliert und vor allem in homozygoter Ausprägung zeigen, wurde bei den Mäusen der ersten Versuchsserie im Anschluss an die hämodynamischen Untersuchungen die Aldosteronkonzentration im Plasma bestimmt. Die Blutabnahme für die Analyse erfolgte unter stressfreien Bedingungen über den arteriell implantierten Katheter, da seit langem bekannt ist, daß eine Aktivierung des Sympathikus innerhalb kürzester Zeit über direkte und indirekte Signalwege zu einer Stimulierung der Aldosteronsekretion führt [Dunn, 1970] & [Taugner et al., 1984]. Dies wird durch Publikationen bestätigt, in denen je nach Methode der Blutgewinnung sehr unterschiedliche Werte für die Aldosteronkonzentration im Plasma mitgeteilt werden [Cholewa und Mattson, 2005]; [Heikkila et al., 2002] & [Masuzaki et al., 2003]. Dementsprechend gibt es noch keinen einheitlichen Referenzwert für die Plasmaaldosteronkonzentration bei Mäusen. Um das Risiko zu minimieren, durch die Blutabnahme eine Erhöhung der Aldosteronkonzentration zu verursachen, wurde auf absolute Ruhe im Labor geachtet und die Abnahmebedingungen so optimiert, daß die Blutentnahme von den Tieren unbemerkt durchgeführt werden konnte.

Die in dieser Arbeit erhobenen Aldosterondaten liegen infolgedessen in der Regel auch deutlich unter den in der Literatur publizierten Konzentrationen, was als Indikator für die Qualität der Abnahmebedingungen angesehen werden kann.

Die Blutabnahme erfolgte in einem relativ engen Zeitfenster zwischen 17.00 und 19.00 Uhr, um den zirkadianen Rhythmus der Aldosteronfreisetzung zu berücksichtigen. So befindet sich bei dem durchgeführten Lichtregime während dieser Zeit die Sekretion der NNR-Hormone auf einem Maximum [Droste et al., 2003], wodurch mögliche Unterschiede bei der Aldosteronsekretion sehr präzise erfasst werden können. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Probenvolumens von weniger als 150  $\mu$ l wurde die Aldosteronkonzentration in den einzelnen Proben mit dem Radioimmunoassay der Firma Immunotech analysiert. Der Aldosteron-RIA von Immunotech wird von vielen Arbeitsgruppen zur Bestimmung der Aldosteronkonzentration bei verschiedenen Spezies verwendet [Hilbers et al., 1999] & [Arrighi et al., 2001] und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit (6 pg/ml) aus.

Die heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) wiesen gegenüber dem Wildtyp (+/+ +/+)signifikant erniedrigte Plasmaaldosteronkonzentrationen auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den früher publizierten Ergebnissen überein [Pradervand et al., 1999] und bestätigt somit den bekannten Phänotyp des Liddle's Syndroms. Die heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/+ +/d) unterschieden sich hinsichtlich der Plasmaaldosteronkonzentrationen nicht signifikant von den Wildtyp Mäusen (+/+ +/+). Dennoch kann man eine deutliche Tendenz zu einem erhöhten Plasmaaldosteronspiegel erkennen. Dieser Befund steht also im Einklang mit den Veröffentlichungen, die eine gesteigerte Aldosteronsekretion bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d) beschreiben [Budack, 2004] & [Grimm et al., 2009], mit dem Unterschied, daß die heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/+ +/d) einen leichteren Phänotyp aufweisen. Ein Vergleich der beiden einzelheterozygoten Genotypen (+/L +/+ und +/+ +/d) ergibt einen hochsignifikanten Unterschied in der Plasmaaldosteronkonzentration. Die Kombination der beiden genetischen Defekte in der heterozygoten Doppelmutante (+/L +/d) führte zu Plasmaaldosteronwerten, die sich kaum von den Werten der heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) unterschieden. Dementsprechend waren sie gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) signifikant und gegenüber den heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/+ +/d) hochsignifikant erniedrigt.

Im Zusammenhang mit den erhobenen Blutdruckdaten ergibt sich beim Vergleich der vier Genotypen folgendes Bild: Obwohl der Plasmaaldosteronspiegel der heterozygoten  $BK\beta 1$ Knockout Mäuse (+/+ +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) tendenziell und gegenüber den anderen beiden Genotypen hochsignifikant erhöht ist, liegt der MAD der  $BK\beta 1$ Knockout Mäuse (+/+ +/d) nicht über dem der Wildtypen (+/+ +/+) und ist gegenüber dem der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Defekt der BK $\beta$ 1-Untereinheit allein in heterozygoter Ausprägung nicht ausreicht, um pathologisch erhöhte Blutdruckwerte zu verursachen, obwohl in Bezug auf das RAAS ein gewisser Effekt des veränderten Genotyps auf den Phänotyp anzunehmen ist. Die heterozygoten Liddle Mäuse /+/L +/+) und die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d)weisen sowohl gegenüber den Wildtypen (+/++/+) als auch gegenüber den heterozygoten  $BK\beta1$  Knockout Mäusen (+/+ +/d) signifikant, bzw. hochsignifikant erniedrigte Plasmaaldosteronkonzentrationen auf, wobei sich der MAD der heterozygoten Liddle Mäuse (+/L +/+) nicht von dem der anderen Genotypen unterscheidet und der Blutdruck der doppelheterozygoten Mutante (+/L +/d) tendenziell die höchsten Werte von allen erreicht, und gegenüber den BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/+ +/d) signifikant erhöht ist. Hinsichtlich der Regulation der Aldosteronproduktion scheint sich demnach bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) der Phänotyp des Liddle's Syndroms durchzusetzen.

Da die gedrosselte Aldosteronproduktion bei dem Krankheitsbild des Liddle's Syndroms durch die gesteigerte Salzretention und die damit einhergehende Hypervolämie hervorgerufen, und durch diese Gegenregulation der Blutdruck im Normbereich gehalten wird, lässt sich vermuten, daß bei der doppelheterozygoten Mutante (+/L +/d) die gleichen physiologischen Prozesse zu dem erniedrigten Plasmaaldosteronspiegel führen. Da der Blutdruck der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) im Gegensatz zu den heterozygoten Liddle Mäusen (+/L +/d)signifikant erhöht ist, kann man spekulieren, daß es durch die Kombination der beiden Defekte zu einer leichten Blutdruckerhöhung kommt, bzw. daß die Kombination dazu führt, daß es trotz einer starken Drosselung der Aldosteronproduktion zu einer beginnenden Entgleisung des Blutdruckes kommt.

Die Ursache der gestörten Regulation der Aldosteronproduktion bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (d/d), die in dieser Arbeit bei den heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäusen (+/+ +/d) tendenziell nachvollzogen werden konnte, ist noch nicht hinlänglich geklärt. In früheren Studien wurde nachgewiesen, daß durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Zellen der NNR eine Aldosteronsekretion stimuliert wird [Spat et al., 1991] & [Rossier et al., 1996]. Dieser Anstieg erfolgt durch eine spannungsabhängige Aktivierung von T-Typ und L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, durch die Ca<sup>2+</sup> bei Membrandepolarisation von extrazellulär in die Zelle gelangt [Spat et al., 1991]. Sowohl durch eine Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration als auch durch ANG II kann eine Depolarisation der Membran hervorgerufen und somit eine Stimulation der Aldosteronfreisetzung ausgelöst werden [Lotshaw, 1997].

Über ANG II wird zusätzlich die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern gefördert, was einen weiteren Signalweg für den Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration darstellt [Barrett et al., 1989]. Funktionelle Veränderungen von zellulären Mechanismen, die maßgeblich an der Regulation des Membranpotentials beteiligt sind und in deren Folge es zu einer stärker ausgeprägten Membrandepolarisation kommt, könnten also eine erhöhte Aldosteronfreisetzung induzieren und infolgedessen einen primären, Reninunabhängigen Hyperaldosteronismus verursachen. Der Nachweis von BK-Kanälen in der Zona glomerulosa der NNR [Sausbier et al., 2005] führte zu der Uberlegung, daß diese ebenfalls an der Regulation der Aldosteronsekretion beteiligt sein können. So übernehmen die BK-Kanäle eine wichtige Funktion bei der Beendigung der zellulären Mechanismen, die durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ausgelöst werden, indem sie der initialen Membrandepolarisation entgegenwirken und schließlich eine Membranhyperpolarisation durch einen K<sup>+</sup>-Ausstrom aus den Zellen induzieren. Wie bereits im Literaturteil beschrieben, wird durch die  $\beta$ 1- Untereinheit die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle entscheidend gesteigert und somit auch die Wirkung des negativen Feedbacks der BK-Kanäle verstärkt [Vogalis et al., 1996]; [Orio et al., 2002] & [Qian und Magleby, 2003].

Überlegungen, daß durch die genetische Inaktivierung der  $\beta$ 1- Untereinheit eine verringerte Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der BK-Kanäle bei den BK $\beta$ 1 Knockout Tieren (d/d) auch in den Zellen der Zona glomerulosa zu einer verstärkten Depolarisation der Zellen führen, und dadurch eine erhöhte Aldosteronsekretion der BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) resultieren könnte, wurden inzwischen durch den Nachweis widerlegt, daß die  $\beta$ 1-Untereinheit in der Zona glomerulosa nicht exprimiert wird [Sachse, 2010].

Sausbier et al., die auch bei BK-Kanal-defizienten Mäusen (BK $\alpha$  -/-) erhöhte Aldosteronspiegel im Blut nachweisen konnten, beschrieben 2005 den Verlust des kontrollierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms in Glomerulosa-Zellen bei BK $\alpha$  Knockout Mäusen als möglichen Mechanismus für den Hyperaldosteronismus. Weiterhin ist bekannt, daß der BK-Kanal in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks die Freisetzung von Katecholaminen beeinflusst, die wiederum mittels adrenerger Rezeptoren die Aldosteronfreisetzung modulieren. Mittlerweile konnte die  $\beta$ 1-Untereinheit des BK-Kanals auch im Nebennierenmark nachgewiesen werden [Grimm et al., 2009], so daß es denkbar ist, daß die  $\beta$ 1-Untereinheit, ähnlich wie in anderen Geweben, dazu führt, daß es über eine Hyperpolarisation des Membranpotentials zu einer Abschwächung der Ca<sup>2+</sup>-mediierten Katecholaminfreisetzung kommt [Sorimachi et al., 1990] & [Gonzalez-Garcia et al., 1993]. Weiterführende Untersuchungen von Rieg et al. deuten jedoch eher auf einen sekundären Hyperaldosteronismus hin: BK $\alpha$  Knockout Mäuse zeigen eine fehlerhafte BK-mediierte K<sup>+</sup>-Sekretion, somit müssen die Mäuse den renal outer medullary K<sup>+</sup>- channel (ROMK), ein Mitglied der einwärts-gleichrichtenden K<sup>+</sup>-Kanäle, Aldosteron-abhängig hochregulieren, um das K<sup>+</sup> ausscheiden zu können [Rieg et al., 2007]. Damit könnte der erhöhte Aldosteronspiegel im Plasma ein kompensatorischer Nebeneffekt sein, um die K<sup>+</sup>-Homöostase aufrechtzuerhalten. Ein solcher Mechanismus wurde jüngst auch als eine Ursache für den Hyperaldosteronismus und erhöhten Blutdruck bei homozygoten BK $\beta$ 1Knockout Mäusen postuliert [Grimm et al., 2009]. Ob dies auch auf die in dieser Arbeit untersuchten heterozygoten  $BK\beta1$  Knockout Mäuse zutrifft, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Unabhängig von der Ursache des erhöhten Plasmaaldosteronspiegels, geht man inzwischen davon aus, daß die Hypertonie der homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) überwiegend durch den Hyperaldosteronismus bedingt ist [Budack, 2004] & [Grimm et al., 2009] und nur in einem geringeren Maße durch den erhöhten myogenen Tonus verursacht wird. Wie bereits im Literaturteil beschrieben ist Aldosteron essentiell an der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt. Als Folge erhöhter Aldosteronkonzentrationen kommt es durch eine gesteigerte Aktivität von Ionenkanälen vor allem in epithelialen Geweben zu einer Störung dieses Gleichgewichtes.

Auf zellulärer Ebene wird die pathologische Wirkung von erhöhten Aldosteronkonzentrationen auf die Elektrolyt- und Volumenhomöostase in erster Linie durch eine Funktionssteigerung des ENaC sowie der basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im distalen Tubulussystem der Niere verursacht [Kellenberger und Schild, 2002] & [Rossier et al., 2002]. Hierdurch erfolgt eine verstärkte Reabsorption von Na<sup>+</sup> und sekundär, durch Zunahme des transepithelialen Potentials, eine Steigerung der transepithelialen Diffusion von Cl<sup>-</sup> [Verrey et al., 2003] & [Rotin, 2000]. Aufgrund dieser primären Steigerung der Reabsorption von NaCl werden über sekundäre Prozesse vermehrt K<sup>+</sup>-Ionen über den ROMK in das Tubuluslumen sezerniert und mit dem Urin ausgeschieden [Frindt et al., 2002]. Zusätzlich wurden Hinweise gefunden, daß die Expression des ROMK in der Niere direkt durch Aldosteron erhöht wird [Palmer, 1999]. So erfolgt im Rahmen eines Hyperaldosteronismus eine Verschiebung der Elektrolytkonzentrationen im Plasma, die sich in der Regel mit Hilfe labordiagnostischer Untersuchungen durch den Nachweis einer Hypernatriämie und einer Hypokaliämie bestätigen lässt. Im umgekehrten Fall kann primär eine Veränderung der Elektrolythomöostase die Aldosteronsekretion beeinflussen. Neben ACTH und ANG II gehört, wie erwähnt, K<sup>+</sup> zu den wichtigsten beeinflussenden Faktoren für die Konzentration von Aldosteron im Plasma. Im Rahmen des Liddle's Syndroms kommt es zu einer verstärkten Reabsorption von Na<sup>+</sup> durch den ENaC, wodurch über eine Erhöhung des extrazellulären Volumens eine Hypertonie entsteht. Das führt zu einer gedrosselten Aktivität des RAAS mit verminderten Renin- und Aldosteronspiegeln im Blut.

Da die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) einen ähnlich verminderten Plasmaaldosteronspiegel aufweisen wie die Liddle Mäuse (L/L), ist es denkbar, daß eine vermehrte Reabsorption von Na<sup>+</sup> durch den verstärkt arbeitenden ENaC so gravierende Auswirkungen auf den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers hat, daß der Hyperaldosteronismus der  $BK\beta 1$  Knockout Mäuse (d/d) überlagert wird. Somit gelingt es den Mäusen mit gedrosselter Aldosteronproduktion die Salz- und Wasserhomöostase zu wahren. Beim Liddle's Syndrom wird durch die gesteigerte Na<sup>+</sup>-Resorption im Sammelrohr der Niere vermehrt K<sup>+</sup> über apikal lokalisierte Kanäle, wie dem BK-Kanal und dem ROMK, sowie über den parazellulären Weg ausgeschieden. Wenn man der weiter oben aufgeführten Theorie der Arbeitsgruppe um Grimm [Grimm et al., 2009] folgt, wonach der Hyperaldosteronismus der BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) eine fehlerhafte K<sup>+</sup>-Sekretion kompensieren soll, kann spekuliert werden, daß die vermehrte K<sup>+</sup>-Ausscheidung durch den Liddle Phänotyp eine vermehrte Aldosteronsekretion überflüssig macht. Die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) zeigen hinsichtlich der wichtigsten Elektrolytkonzentrationen im Plasma (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>) keine Abweichungen von den Werten der Wildtypen (+/+ +/+). Auch dieser Befund spricht dafür, daß der erniedrigte Aldosteronspiegel nötig zu sein scheint, um die Homöostase zu wahren. Die erhobenen Werte der Wildtypen (+/+ +/+) stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein [Boehm et al., 2007]. Es ist also wahrscheinlich, daß der signifikant erniedrigte Aldosteronspiegel es den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) ermöglicht, das Elektrolytgleichgewicht aufrechtzuerhalten.

In Bezug auf den heterozygoten Liddle Phänotyp stimmen diese Ergebnisse mit denen von Pradervand et al. überein [Pradervand et al., 1999]. Unter einer normalen Salzdiät zeigt die heterozygote Liddle Maus (+/L) außer eines erniedrigten Aldosteronspiegels keine Veränderungen, die auf einen Aldosteronismus hinweisen. Zu den Plasmaelektrolytkonzentrationen der heterozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (+/d) gibt es bislang keine Untersuchungen. Für die homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout Mäuse (d/d) sind in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden. Während eine Hypernatriämie bei den homozygoten BK $\beta$ 1 Knockout-Mäusen (d/d) mehrfach beschrieben wurde [Budack, 2004] & [Grimm et al., 2009], sind bezüglich der Plasma-K<sup>+</sup>-Konzentration sowohl erhöhte als auch erniedrigte Werte festgestellt worden [Budack, 2004] & [Grimm et al., 2009].

Ein über lange Zeit erhöhter Blutdruck wirkt schädigend auf das Herz- und Gefäßsystem. Unter einer hypertensiven Herzerkrankung versteht man alle durch die Hypertonie bedingten kardialen Veränderungen. Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine umfassende phänotypische Charakterisierung der doppelheterozygoten Mausmutante (+/L +/d) hinsichtlich der Blutdruck- und Volumenregulation vorzunehmen und die möglichen pathophysiologischen Konsequenzen zu untersuchen, wurden an isolierten Herzen der Versuchsserien 1 und 2 morphometrische Untersuchungen vorgenommen, um eventuell mit einer Hypertonie assoziierte kardiale Endorganschäden zu erkennen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das relative Gewicht des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) signifikant erhöht war. Dieser Index stellt ein in der Literatur weit verbreitetes Maß für eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) dar. Die arterielle Hypertonie begünstigt unter anderem die Ausbildung einer reaktiven LVH. Unter einer LVH versteht man den Zustand abnormen, pathologischen Wachstums des linken Ventrikels, der sowohl zu einer Zunahme des kardialen Gewichts und der Wandstärke desselben als auch zu funktionellen Störungen betreffend Kontraktilität, Elektrophysiologie und Koronardurchblutung führt [Sheridan, 2000]. Die LVH ist die häufigste Manifestationsform einer hypertensiven Herzerkrankung. Sie entwickelt sich unter dem Einfluss einer Vielzahl von biomechanischen, hämodynamischen und hormonellen Stimuli. Die Hypertrophie der Herzmuskulatur ist Ausdruck der Adaptation des Körpers an einen chronisch erhöhten arteriellen Blutdruck, mit dem Ziel, die erhöhte Wandspannung zu kompensieren [Brilla et al., 1996]. Morphologisch lässt sich die LVH in eine konzentrische, in der Regel durch Druckbelastung hervorgerufene Form, die zu einer Zunahme des interstitiellen Bindegewebes führt, und eine exzentrische Form unterteilen, die sich häufiger als Folge einer Volumenbelastung manifestiert; in der Praxis handelt es sich oft um Mischformen, die auch in der Gruppe der essentiellen Hypertoniker am häufigsten vorkommen. Die LVH gilt als wesentlicher, auch unabhängig von einer Hypertonie bestehender Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität [Innes et al., 1998], bedingt durch charakteristische Komplikationen wie Angina pectoris, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt oder Herzrhythmusstörungen. Zudem ist sie häufig mit der koronaren Herzkrankheit (KHK) assoziiert. Das morphologische Korrelat der LVH als kardialen Kompensationsversuch auf die chronische Druckerhöhung bezeichnet man als Remodeling, eine pathologische Umgestaltung von Myozyten und interstitiellen Kompartimenten des Herzens, bei der die Homogenität des kardialen Gewebes aufgehoben wird [Weber, 2001]. Studien haben gezeigt, daß das RAAS für das Remodeling mitverantwortlich zu sein scheint [Brilla et al., 1991] & [Schmieder et al., 1996].

Um Hinweise auf morphologische renale Veränderungen zu erhalten, wurde bei den Tieren der ersten und zweiten Versuchsserie das Gewicht der Nieren bestimmt. Weiterhin wurde bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) und bei den Wildtypen (+/+ +/+) die Kreatininkonzentration im Plasma bestimmt. Kreatinin ist die Ausscheidungsform des Kreatins,
eines Zwischenproduktes des intermediären Stoffwechsels. Die täglich mit dem Harn ausgeschiedene Menge an Kreatinin ist eine individuelle Konstante und der Muskelmasse direkt proportional. Es wird in der Niere vollständig glomerulär filtriert, tubulär nur bei hohen Plasmawerten sezerniert und nicht reabsorbiert [Willibald Pschyrembel, 1998]. Der Kreatininspiegel im Plasma kann über den Referenzbereich hinaus ansteigen, wenn die glomeruläre Filtration zu über 50 % eingeschränkt ist. Andererseits können auch bei unveränderter GFR erhöhte Kreatininkonzentrationen im Plasma auftreten, wenn die endogene Produktion von Kreatinin deutlich gesteigert ist. Dies ist beispielsweise denkbar, wenn die Muskelarbeit stark erhöht ist. Kreatininbestimmungen werden zur Diagnose und Verlaufskontrolle von akuten und chronischen Nierenerkrankungen durchgeführt. Weder das absolute, noch das relative Gesamtnierengewicht der untersuchten Gruppen wies signifikante Unterschiede auf. Der Kreatininspiegel der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) lag dagegen signifikant über dem der Wildtypen (+/+ +/+). Die Werte beider Versuchsgruppen liegen noch unter den in der Literatur angegebenen Referenzwerten [Boehm et al., 2007], so daß man davon ausgehen kann, daß auch bei den doppelheterozygoten Tieren (+/L +/d) keine Niereninsuffizienz vorliegt. Dennoch könnten die gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) signifikant erhöhten Werte ein Hinweis auf eine beginnende hypertone Nephropathie, also eine durch den erhöhten Blutdruck hervorgerufene Nierenfunktionseinschränkung sein. Die Bestimmung der Kreatinin Clearance könnte Aufschluß über eine eventuell eingeschränkte GFR geben. Da der Kreatininwert proportional zur Muskelmasse ist, kann außerdem spekuliert werden, ob bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) ein höherer Anteil an Muskelgewebe vorliegt, als bei den Wildtypen (+/+ +/+). Angesichts der nahezu identischen Körpergewichte beider Gruppen ist dies als Ursache für den erhöhten Kreatininspiegel jedoch eher unwahrscheinlich. Denkbar ist auch eine gesteigerte endogene Produktion von Kreatinin durch z.B. verstärkte Muskelarbeit der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d). Zur Überprüfung dieser Hypothese ist es möglich, die Bewegungsaktivität der Mäuse zu überprüfen und zu vergleichen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses einer unterschiedlichen Salzbelastung auf den Phänotyp der heterozygoten Maus-Doppelmutante (+/L +/d). Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Kombination der beiden Defekte in heterozygoter Ausprägung bei den Mäusen zu Veränderungen des zirkadianen Rhythmus führt. Unter dem zirkadianen Rhythmus versteht man den tageszeitlichen Rhythmus biologischer Funktionen des Körpers.

Diese Untersuchungen erfolgten mittels der telemetrischen Messmethode. Im Jahr 2000 wurde diese Methode entwickelt, anhand derer Blutdruck und Herzfrequenz an sich frei bewegenden, wachen Mäusen ermittelt werden können [Kramer et al., 2000]. Insbesondere im Hinblick auf die automatisch und kontinuierlich gemessenen Parameter hatte man so einen einfachen und schonenden Weg gefunden, pathologische und pharmakologische Beeinflussungen schneller erkennen und bestimmen zu können. Kramer und Kinter untersuchten 2003 erneut das Telemetriesystem mit den gleichen positiven Ergebnissen. Sie charakterisierten dieses System als die effizienteste, zuverlässigste und am wenigsten arbeitsintensive Methode der Blutdruckmessung im Vergleich zu vorher beschriebenen Verfahren. Die Radiotelemetrie wird von ihnen als "state of the art" für das Monitoring physiologischer Funktionen bei wachen und frei beweglichen Labortieren beschrieben [Kramer und Kinter, 2003].

Da nachgewiesen werden konnte, daß sich der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere erst fünf bis sieben Tage post operationem wieder einstellt [Van Vliet et al., 2000]; [Butz und Davisson, 2001]; [Kramer et al., 2000] & [Whitesall et al., 2004], hatten die Tiere der dritten Versuchsserie zwischen dem operativen Eingriff und dem Messbeginn eine Regenerationsphase von 10 Tagen. Aufgrund der Tatsache, daß die Implantation des Katheters in die linke A. carotis bei den Tieren keine neurogenen Ausfallserscheinungen hervorrief, ist anzunehmen, daß die Versorgung der linke Kopfhälfte durch die A. vertebralis übernommen und so die fehlende Versorgung durch die A. carotis kompensiert werden kann.

Der Habitus der Tiere wurde täglich beurteilt. Die aktuellen Blutdruck- und Herzfrequenzdaten jedes einzelnen Tieres konnten auf dem Messcomputer verfolgt und daraus zusätzlich ein objektiver Eindruck über das Allgemeinbefinden der Tiere abgeleitet werden. Ein Vergleich der beiden in der vorliegenden Arbeit genutzten Blutdruckmessmethoden ergab bei Untersuchungen von Herrn Dr. Faulhaber (nicht veröffentlichte Daten), daß der MAD in der telemetrischen Versuchsgruppe um ca. 4-5 mmHg niedriger lag als bei der Kathetermethode. Eine andere Arbeitsgruppe ermittelte eine teilweise mehr als 10 mmHg große Differenz zwischen den beiden Methoden, wobei auch hier die Versuchsgruppe aus dem telemetrischen Messverfahren die niedrigeren Werte aufwies [Balakrishnan et al., 1998] & [Van Vliet et al., 2003]. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied ist, daß die mit der Methode der chronisch implantierten Katheter einhergehenden Manipulationen, wie z.B. die notwendigen Spülungen der Katheter mit heparinisierter NaCl Lösung höhere Blutdruckwerten bei dieser Messmethode verursachen.

Schon aufgrund der unterschiedlichen postoperativen Messzeitpunkte ist es schwierig, die beiden angewandten Methoden zur Blutdruckmessung zu vergleichen. Es ist davon auszugehen, daß die Mäuse der telemetrischen Versuchsreihe durch eine wesentlich längere Erholungsphase nach der Operation und durch die Haltung in ihren gewohnten Käfigen ohne Einschränkungen der Bewegungsfreiheit weniger gestresst sind als die Tiere mit chronisch implantierten Kathetern. Ein Umstand, der ebenfalls eine Erklärung für den Blutdruckunterschied zwischen den beiden Messmethoden bieten könnte. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Tatsache, daß die Herzfrequenzen bei beiden Versuchsgruppen während der telemetrischen Messungen niedriger waren als bei der Kathetermethode. Letztlich ist es für eine endgültige Aufklärung notwendig, Vergleichsstudien mit beiden Messmethoden durchzuführen.

Die Blutdruckwerte der Wildtypen (+/+ +/+) der Versuchsserie 3 ähneln solchen, die von anderen Arbeitsgruppen mit der telemetrischen Messmethode gewonnen wurden [Butz und Davisson, 2001]; [Kramer et al., 2000]; [Van Vliet et al., 2003] & [Obst et al., 2006]. Beim Vergleich ist der zum Teil unterschiedliche genetische Hintergrund der Wildtyp Mäuse zu beachten. Unter der Basismessung zeigten die über fünf Tage gemittelten hämodynamischen Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vesuchsgruppen. Da zwei der sieben Mäuse aus der Gruppe der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) eine gesteigerte Aktivität zeigten, erscheint die Aktivität dieser Gruppe insgesamt erhöht, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Die graphische Darstellung der Parameter im 24-stündigen Tagesverlauf zeigt bei beiden Genotypen einen deutlichen Anstieg der Werte mit Beginn der nächtlichen Aktivitätsphase. Das zeigt, daß die Tiere sich von dem operativen Eingriff erholt haben und wieder einen regelmäßigen Tag-/Nachtrhythmus mit speziesbedingten niedrigeren hämodynamischen Daten am Tag und höheren in der Nacht aufweisen, der sich an den Hell- und Dunkelphasen des durchgeführten Lichtregimes orientiert. Da sich die Kurve der heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) zeitlich nicht von der der Wildtypen (+/+ +/+) unterscheidet, kann man davon ausgehen, daß der zirkadiane Rhythmus der Tiere nicht durch die Mutationen beeinträchtigt wird.

Weiterhin fällt bei Betrachtung der graphischen Darstellung des Tagesverlaufes der aufgezeichneten Daten auf, daß die doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) in der nächtlichen Aktivitätsphase bei allen aufgezeichneten Parametern höhere Werte als die Wildtypen (+/++/+) aufweisen. Eine durchgeführte zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigt diesen Eindruck. Sowohl die hämodynamischen Parameter (MAD, Systole, Diastole und Herzfrequenz) als auch die Aktivität sind bei den heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) nachts teilweise hochsignifikant gegenüber denen der Wildtypen (+/+ +/+) erhöht. Da sich, wie erwähnt, bei der Aufschlüsselung der individuellen Aktivitätswerte zeigte, daß sich zwei der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) besonders stark bewegt haben müssen, ist die Differenz in der Nachtphase bei diesem Parameter zwischen beiden Versuchsgruppen besonders groß. Der große Standardfehler ist ebenfalls mit der starken Streuung der individuellen Werte zu erklären. Als einziger Parameter ist die Herzfrequenz der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) auch tagsüber signifikant höher als die der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+).

Das Herz ist in der Lage seine Funktion der aktuellen körperlichen Belastung in kürzester Zeit anzupassen. Dies geschieht durch extrakardiale (nervale und humorale) Signale und wird von intrakardialen Mechanismen umgesetzt. Die efferenten Fasern des Sympathikus und des Parasympathikus bewirken eine Veränderung der Herzfrequenz. Parasympathische Fasern des N. vagus haben einen hemmenden Einfluss auf das Herz, der Sympathikus wirkt dagegen stimulierend. Unter Zuständen erhöhter Anspannung verändert sich die Herzfrequenz. Diese können physischer oder psychischer Art sein [Boutellier, 2005]. Beide Formen der Belastung führen zu einer Stimulation des Herzens durch sympathische Nervenfasern und damit zu einer positiven chronotropen Wirkung, also einer Erhöhung der Herzfrequenz [Wyatt und Mitchell, 1974] & [Vincent und Leahy, 1997]. Die erhöhte Herzfrequenz in der nächtlichen Aktivitätsphase könnte demnach mit der vermehrten Aktivität der heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) zu erklären sein. Andererseits sind sowohl der Standardfehler als auch die Differenz bei der Herzfrequenz nachts nicht so groß wie bei der Aktivität. Dies spricht im Zusammenhang mit der erhöhten Herzfrequenz am Tage gegen eine direkte Korrelation der Aktivität mit der Herzfrequenz. Da neben der physischen Form auch andere Arten der Belastung zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen, kann man spekulieren, daß die doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) während des Versuches gestresster reagieren als die Wildtypen (+/+ +/+). Eine weitere Möglichkeit ist, daß der durch den Katheter in der A. carotis unterbrochene Blutfluss und die dadurch zwangsläufig veränderte Durchblutung des Kopfes bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) doch nicht vollständig kompensiert werden kann. Obwohl der Habitus der Tiere ungestört war und sich keine neuronalen Ausfallserscheinungen zeigten, könnten dadurch die, im Vergleich zum klinischen Allgemeinzustand, subtilen Veränderungen in den hämodynamischen Parametern erklärt werden.

Die Erhöhung des Blutdruckes bei den doppelheterozygoten Tieren (+/L +/d) tritt ausschließlich in der nächtlichen Aktivitätsphase auf. Physiologischerweise weist der Blutdruck typische Verlaufsänderungen während der 24-stündigen Dauer eines Tages auf (sog. zirkadiane Blutdruck-Rhythmik): Während der Wachphase liegen die Werte höher, um im Verlaufe der Schlafphase auf die niedrigsten Werte abzusinken. Zirkadiane Rhythmen werden hauptsächlich im Hypothalamus vom Nucleus suprachiasmaticus gesteuert [Silbernagl und Lang, 2005]. Dieser steht mit anderen Effektorsystemen im zentralen Nervensystem (ZNS) in Verbindung und reguliert bzw. kontrolliert z.B. die Körpertemperatur, Hormonfreisetzungen und viele andere Körperfunktionen Während der Wachphase sind die für die Aktivität nötigen Funktionen höher eingestellt: Der Sympathikus steigert den Blutdruck, beschleunigt und verstärkt Herzaktion und Atmung. Da der BK Kanal auch in Neuronen des ZNS nachgewiesen werden konnte [Tseng-Crank et al., 1994], in die Neurotransmitterfreisetzung in Neuronen involviert ist [Tseng-Crank et al., 1996], und die  $\beta$ 1-Untereinheit des BK Kanals zwar hauptsächlich in glatten Muskelzellen vorkommt [Vogalis et al., 1996] & [Knaus et al., 1994a], jedoch auch im Gehirn [Tseng-Crank et al., 1996] detektiert werden konnte, ist es denkbar daß die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) aufgrund der fehlenden regulatorischen  $\beta$ 1-Untereinheit des BK Kanals eine Fehlregulation der vegetativen Funktionen während der Wachphase zeigen. Da die heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) eine erhöhte Aktivität während der Wachphase zeigten, ist es ebenso vorstellbar, daß das sympathische Nervensystem verstärkt arbeitet und somit einen erhöhten Blutdruck hervorruft. Weil auch die  $\beta$ 1-Untereinheit im Nebennierenmark nachgewiesen werden konnte [Grimm et al., 2009], ist es denkbar, daß es durch die fehlende Hyperpolarisation des Membranpotentials nicht mehr zu einer Abschwächung der Ca<sup>2+</sup>-mediierten Katecholaminfreisetzung kommt [Sorimachi et al., 1990] & [Gonzalez-Garcia et al., 1993]. Bestimmungen des Katecholaminspiegels könnten darüber Auskunft geben. Weiterhin sind endokrinologische Entgleisungen, wie z. B. ein erhöhter Kortisolspiegel während der Wachphase denkbar. Zur Klärung dieser Frage wären Bestimmungen der Plasmakonzentration des Kortisols und auch des ACTH, als ein regulierendes Hormon für die Synthese und Freisetzung des Kortisols sinnvoll.

Die Umstellung auf die salzarme Diät hatte nur geringe Auswirkungen auf die hämodynamischen Parameter. Im Vergleich der Parameter der salzarmen Diät zu der Basis Diät 1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ein Vergleich der Mittelwerte der Parameter zwischen beiden Genotypen untereinander über den gesamten Versuchszeitraum lieferte ebenfalls keine signifikanten Differenzen. Der signifikante Unterschied des Blutdruckes zwischen den beiden Gruppen blieb während der nächtlichen Aktivitätsphase erhalten. Die Umstellung von der salzarmen auf die salzreiche Ernährung zeigte dagegen deutliche Effekte. Sowohl der MAD, als auch die systolischen und diastolischen Werte stiegen bei beiden Versuchsgruppen signifikant an. Die Hälfte der hypertensiven Patienten, aber auch ein Viertel der normotensiven Bevölkerung weist eine Salzsensitivität auf [Weinberger et al., 1994]. Bei salzsensitiven Menschen korreliert der Blutdruck mit der alimentären Salzmenge, während bei salzresistenten Menschen die Höhe des Blutdrucks unabhängig von der Salzaufnahme ist [Weinberger et al., 2001].

Salzsensitive Probanden reagieren auf eine vermehrte Kochsalzzufuhr mit einer Na<sup>+</sup>-Retention und damit verbunden mit einer Zunahme des EZV. Salzresistente Probanden lassen dagegen dieses Phänomen nicht erkennen [Skrabal et al., 1984]. Interessanterweise zeigt auch die Kontrollgruppe (+/+ +/+) in diesen Versuchen den signifikanten Blutdruckanstieg. Man kann also vermuten, daß beide Versuchsgruppen zunächst sensitiv auf die erhöhte Salzzufuhr reagieren. Um diese Hypothese zu verifizieren, wäre es sinnvoll, die Elektrolytkonzentration im Plasma, sowie eine Plasmavolumenbestimmung unter verschiedenen Salzdiäten durchzuführen. Die Umstellung auf die Basis Diät 2 ergab erwartungsgemäß bei beiden Versuchsgruppen eine signifikante Senkung des Blutdruckes.

Die signifikante Erhöhung des Blutdruckes bei den heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) während der Nacht gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) war nur während der salzreichen Diät nicht vorhanden, weil der Blutdruck der Wildtypen (+/+ +/+) etwas stärker angestiegen ist, als der der heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d).

Da der Aldosteronspiegel der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) schon unter alimentären Normalsalzbedingungen gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) signifikant erniedrigt ist, ist davon auszugehen, daß er unter Hochsalzbedingungen weniger stark weiter gesenkt werden kann, da eine maximale Suppression des Aldosteronspiegels schneller erreicht ist. Nach dieser Überlegung wäre aber ein besonders starker Blutdruckeffekt bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) zu erwarten gewesen. Plasmaaldosteronbestimmungen unter verschieden konzentrierten Salzdiät-Fütterungen können hierüber Aufschluß geben.

Die Ein- und Ausfuhrbilanzierung der wichtigsten Elektrolyte im Stoffwechselkäfig ergab unter der Basis Diät keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Auch dies spricht für die These, daß der erniedrigte Aldosteronspiegel der heterozygoten Doppelmutanten (+/L +/d) dazu führt, daß die Wasser- und Elektrolythomöostase gewahrt bleibt. Dies unterstützt außerdem die Annahme, daß der nächtliche Blutdruckanstieg nicht mit einer Fehlregulation des RAAS oder des renalen Systems zusammenhängt. Die unter der salzarmen Diät aufgetretenen Unterschiede in der Bilanzierung sind kritisch zu betrachten, da bei den absoluten Zahlen keinerlei gleichartige Tendenz zu erkennen ist. Es ist möglich, daß es sich um ein rechnerisches Phänomen handelt, da die Mengen und Fallzahlen sehr klein sind. Da sich unter der salzarmen Diät auch bei den hämodynamischen Messungen keine Veränderungen zur Basis Diät ergeben haben, ist anzunehmen, daß sich die Bilanzierung beider Gruppen nicht gravierend unterscheidet. Auch unter der salzreichen Ernährung ergeben sich keine Unterschiede. Zu beachten ist, daß die Messungen zu einem Zeitpunkt vorgenommen wurden, als die Tiere schon 14 Tage die jeweilige Diät bekommen hatten. Es ist möglich, daß das renale System der Tiere zum Zeitpunkt der Bilanzierung das Gleichgewicht zwischen Zufuhr und Ausscheidung wieder hergestellt hat. Ein erhöhter Salzkonsum über längere Zeit führt zunächst unweigerlich zu einer Retention von Na<sup>+</sup> und Wasser im Körper, bis die Homöostase wieder erreicht ist. Das liegt daran, daß die Antwort der Nieren auf eine veränderte Salzzufuhr mit einer gewissen Verzögerung erfolgt. Die Retention von Wasser und Na<sup>+</sup> führt zu einer vorübergehenden Erhöhung des EZV und erfolgt auf Kosten einer individuell variablen Blutdruckerhöhung. Da der Blutdruckanstieg beider Versuchsgruppen zu Beginn der Hochsalzdiät besonders stark war, erfolgte eventuell zu diesem Zeitpunkt eine Na<sup>+</sup>- und Volumenretention, die sich im Verlaufe der Diät wieder gegeben hat.

Die Daten, die aus der Bilanzierung im metabolischen Käfig gewonnen wurden, sind insgesamt kritisch zu bewerten, da anzunehmen ist, daß sich die Tiere zum Zeitpunkt der Messung nicht vollständig in einem "steady state" befunden haben. Die Na<sup>+</sup>-Bilanz unter der salzarmen Diät, die weit mehr als 100 % beträgt, deutet beispielsweise darauf hin, daß die Tiere während des Versuches weniger Nahrung zu sich genommen haben, als unter normalen Haltungsbedingungen. Unterstützt wird diese These durch die Gewichtsabnahme der Versuchstiere. Es ist denkbar, daß somit unbeabsichtigt zusätzliche experimentelle Faktoren eingeführt wurden, die zu einer Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben. Denkbar ist z.B. daß die ungewohnte Umgebung im metabolischen Käfig als externer Stressor eine Sympathikusaktivierung bei den Versuchstieren hervorgerufen hat. Bei Aktivierung des Sympathikus dominieren katabole Stoffwechselprozesse, die zu negativen metabolischen Bilanzen führen können. Zudem sollte der Versuchsaufbau kritisch hinterfragt werden. So könnte die 24stündige Sammelperiode des Urins zu geringen Volumenverlusten durch Verdunstung geführt haben. Ebenso ist es möglich, daß die pulverige Konsistenz des Mehlfutters, welches dadurch auch an den Pfoten der Mäuse hängen bleiben könnte, geringe Verluste beim Ermitteln des Futterverzehrs hervorgerufen hat.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse der Phänotypisierung und der Untersuchungen unter unterschiedlicher alimentärer Salzbelastung konnte im Rahmen dieser Arbeit kein deutlich ausgeprägter Gen-Dosis-Effekt durch die Kombination der beiden Defekte in heterozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Pathologisch erhöhte Blutdruckwerte, wie sie bei den homozygoten Phänotypen der beiden einzelnen Defekte vorkommen, konnten in den durchgeführten Versuchen nicht nachvollzogen werden. Unter einer salzarmen Diät konnte allerdings eine signifikante Erhöhung des Blutdruckes der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) nachgewiesen werden. Desweiteren konnten während der nächtlichen Aktivitätsphase teilweise erhöhte Blutdruckwerte gemessen werden. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, daß die Kombination der genetischen Defekte auch in heterozygoter Form einen milden Effekt hervorruft.

In Bezug auf das RAAS scheint sich der Liddle Phänotyp durchzusetzen. Die Ursache für den vermehrten Blutdruckanstieg der doppelheterozygoten Mutante (+/L +/d) während der Wachphase konnte nicht geklärt werden. Für die vollständige Aufklärung der Pathogenese sind weiterführende molekularbiologische, pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen erforderlich.

## 6 Zusammenfassung

Digene Hypertonie - Blutdruckregulation an wachen Mäusen mit Überaktivierung des Epithelialen Natriumkanals (Liddle-Mutante) und genetischer Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanals.

Der chronisch erhöhte Blutdruck gehört zu den häufigsten pathologischen Befunden in der westlichen Welt und stellt aufgrund seiner Bedeutung für kardiovaskulär bedingte Erkrankungen ein gravierendes Problem dar. Bei der essentiellen arteriellen Hypertonie handelt es sich um ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild, dem nach derzeitigem Kenntnisstand sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Determinanten zugrunde liegen. Im Gegensatz zu den wenigen monogenetisch bedingten Hypertonieformen sind die Effekte der einzelnen beteiligten Gene gering, und erst eine Interaktion von multiplen Genen mit blutdruckregulierenden Eigenschaften führt zu einer Manifestation der Erkrankung.

Durch die Anwendung genetischer Methoden haben sich für die Analyse von Faktoren, die an der Entstehung einer Hypertonie beteiligt sind, zahlreiche neue Perspektiven eröffnet. Um einen tieferen Einblick in die Ätiologie der essentiellen Hypertonie zu gewinnen, ist es von großem Interesse, wie sich wichtige Systeme für die Blutdruckregulation bei der Entstehung von Hypertonien beeinflussen. Monogenetisch verursachte Krankheiten stellen eine einzigartige Möglichkeit dar, um den Zusammenhang zwischen Umwelteinflüssen, wie z.B. Kochsalzabusus, und genetischen Faktoren untersuchen zu können. Eine dieser monogenetischen Erkrankungen ist das Liddle's Syndrom, das zu einer Fehlregulation des ENaC führt und deren Folge eine salzsensitive Hypertonie ist.

Mäuse mit einer homozygot vorliegenden genetischen Deaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des  $Ca^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanals (BK $\beta$ 1 d/d) weisen einen signifikant erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck auf. Außerdem zeigen die BK $\beta$ 1-KO Mäuse einen erhöhten arteriellen Tonus in isolierten Gefäßen. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die arterielle Hypertonie bei BK $\beta$ 1- KO Mäusen eine direkte Konsequenz des erhöhten myogenen Tonus in arteriellen Widerstandsgefäßen ist. Da die BK $\beta$ 1-KO Mäuse aber außerdem signifikant erhöhte Plasmaaldosteronkonzentrationen aufweisen, deren Ursache noch nicht hinlänglich geklärt ist, geht man zur Zeit davon aus, dass der Hypertonus zu einem großen Teil durch den erhöhten Plasmaaldosteronspiegel hervorgerufen wird. Das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell ist eine durch Kreuzung von Mäusen mit genetischer Inaktivierung der  $\beta$ 1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaliumkanals (BK $\beta$ 1 d/d) und Mäusen, bei denen durch genetische Manipulation eine Uberaktivierung (gain of function) des ENaC induziert wurde (L/L), entstandene Doppelmutante. Es beruht damit auf zwei genetischen Defekten, die jeder für sich in homozygoter Ausprägung ein Modell für eine arterielle Hypertonie darstellen und phänotypisch einen Hyperaldosteronismus bzw. Pseudohyperaldosteronismus aufweisen, der durch unterschiedliche Mechanismen induziert wird. Sowohl das RAAS, als auch die renale Salz- und Wasserhomöostase werden durch die genetischen Veränderungen beeinflusst. Die einzelnen genetischen Veränderungen verursachen bei heterozygotem Auftreten im Tiermodell unter physiologischen Haltungsbedingungen keinen Bluthochdruck.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit zu klären, ob bei gleichzeitigem Auftreten der Mutationen im heterozygoten Genotyp durch Interaktionen im Phänotyp eine Hypertonie verursacht wird und die Blutdruckregulation Unterschiede aufweist. Durch die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Aldosteron und der wichtigsten Elektrolyte sollten Anhaltspunkte über die Aktivität des RAAS und über pathophysiologische Veränderungen der Salz- und Wasserhomöostase gewonnen werden. Schließlich wurde der Einfluss einer unterschiedlichen Salzbelastung auf den Phänotyp der doppelheterozygoten Mausmutante untersucht. Hierzu wurden in vier Versuchsserien an adulten männlichen doppelheterozygoten Mausmutanten (+/L +/d), dem entsprechenden Wildtyp (+/+ +/+), sowie teilweise an einzelheterozygoten Mäusen (+/L +/+ und +/+ +/d) die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

- Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz an wachen und ungestressten Mäusen über einen chronischen arteriellen Katheter am 2. und 3. postoperativen Tag.
- 2. Entnahme von Blutproben über den arteriellen Katheter mit anschließender Bestimmung der Plasmakonzentration von Aldosteron, Elektrolyten und Kreatinin.
- 3. Entnahme der Herzen mit Bestimmung des Herzgewichts sowie des Gewichts des linken und rechten Ventrikels. Anschließende Berechnung des Verhältnisses von Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht als Index einer myokardialen Hypertrophie.
- 4. Entnahme der Nieren mit Bestimmung des Gesamtnierengewichts. Anschließende Berechnung der Verhältnisses vom Gesamtnierengewicht zum Körpergewicht.
- 5. Messung der hämodynamischen Parameter (MAD, Systole, Diastole), der Herzfrequenz und der Aktivität mittels radiotelemetrischen Messverfahrens;
- a Auswertung der Mittelwerte
- b Auswertung des Zirkadianen Rhythmus
- c Auswertung der unterschiedlichen Salzbelastung
- 6. Stoffwechselbilanzierung im metabolischen Käfig unter unterschiedlicher Salzbelastung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1. Die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) wiesen gegenüber den heterozygoten BK $\beta$ 1-KO-Mäusen (+/+ +/d) einen signifikant erhöhten MAD auf.
- 2. Die Befunde der morphometrischen Untersuchungen ergaben ein erhöhtes relatives linksventrikuläres Herzgewicht der doppelheterozygoten Tiere (+/L +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+).
- 3. Die Plasmaaldosteronkonzentration der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) und der heterozygoten Liddle-Mäuse (+/L +/+) war gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) und den heterozygoten BKβ1-KO-Mäusen (+/+ +/d) signifikant erniedrigt. Ebenso war der Plasmaaldosteronspiegel der heterozygoten BKβ1-KO-Mäuse (+/+ +/d) gegenüber den Wildtypen (+/+ +/+) tendenziell erhöht.
- 4. Die Plasmakonzentrationen von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> der doppelheteroygoten Mäuse (+/L +/d) unterschieden sich nicht von denen der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+). Der Plasmaspiegel des Kreatinin lag dagegen bei den doppelheterozygoten Mäusen (+/L +/d) signifikant über dem der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+).
- Die doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) zeigten während der radiotelemetrischen Blutdruckmessung einen ihrer Spezies entsprechenden zirkadianen Rhythmus.
- 6. Sowohl die hämodynamischen Parameter als auch die Aktivität der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) sind während der nächtlichen Aktivitätsphase signifikant höher als die der Wildtyp Mäuse (+/+ +/+).
- 7. Unter der salzarmen Diät während der radiotelemetrischen Blutdruckmessung ergab ein direkter Vergleich der Tagesmittelwerte, dass der MAD der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) signifikant über dem der Wildtypen (+/+ +/+) lag.
- 8. Sowohl die Werte der Herzfrequenz als auch die der Aktivität der doppelheterozygoten Mäuse (+/L +/d) während der radiotelemetrischen Blutdruckmessung lagen bei einem direkten Vergleich der Tagesmittelwerte unter allen Diäten signifikant über den Werten der Wildtypen (+/+ +/+).
- 9. Die Umstellung der Salzbelastung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die hämodynamischen Parameter beider Versuchsgruppen.
- 10. Die Versuche im metabolischen Käfig konnten keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich der Ein- und Ausfuhrbilanzierung liefern.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit kein deutlich ausgeprägter Gen-Dosis-Effekt nachgewiesen werden. Dennoch scheint die Kombination der beiden genetischen Defekte in heterozygoter Ausprägung einen milden Effekt auf die Blutdruckregulation auszuüben.

## 7 Summary

Digenic hypertonia - regulation of blood pressure in awake mice with overactivity of the epithelial sodium channel (Liddle mutant) and with genetic inactivation of the  $\beta$ 1-subunit of the C $a^{2+}$  activated potassium channel.

Chronic high blood pressure is one of the most common diagnostic findings in the western world and poses a serious health problem due to its association with cardiovascular diseases. Essential arterial hypertonia is a multifactorially caused disease that to present knowledge is both linked to environmental factors and genetic determinants. Compared to the few monogenetically caused hypertonia forms, the effects of individual genes on the manifestation of hypertonia are minor. Only an interaction of multiple genes responsible for blood pressure adjustments leads to a manifestation of the disease.

With the use of genetic methods numerous new perspectives have evolved for the analysis of factors associated with hypertonia. For a better understanding of essential hypertonia etiology, it is of large interest to comprehend the interaction of essential systems for blood pressure regularization. Monogenetically caused diseases provide an outstanding possibility to examine the interdependence of environmental influences, e.g. the extensive use of sodium, and genetic factors. One of these monogenetic illnesses is the Liddle syndrome that leads to an abnormal regularization of the ENaC and thus sodium sensitive hypertonia.

Mice with a homozygous genetic deactivation of the  $\beta 1$  subunit of the Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (BK $\beta 1$  d/d) have a significantly increased mean arterial blood pressure. In addition, the BK $\beta 1$ -KO mice display an increased arterial tonus in isolated vessels. Based on these observations the conclusion was drawn that arterial hypertension in BK $\beta 1$ -KO mice directly results from the increased myogenic tonus in the arterial resistance vessels. However, the BK $\beta 1$ -KO mice also have a significantly increased plasma aldosterone concentration that researchers were not fully able to explain yet. It is currently assumed that the hypertension in BK $\beta 1$ -KO mice is to a large extent caused by the increased aldosterone concentration.

The examined mouse model in this study is a double mutant caused by a crossing of mice with a genetic inactivation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channel (BK $\beta$ 1 d/d) and with genetically manipulated mice with an over-activation ("gain of function") of the ENaC (L/L). Therefore, this mice model is based on two genetic defects which each in itself – if expressed homozygous – resembles a model for arterial hypertension. This model phenotypically induces a hyperaldosteronism or pseudohyperaldosteronism, respectively, caused by different mechanisms. Both the RAAS as the renal salt and water homeostasis are affected by genetic changes. Yet, individual heterozygous genetic changes do not cause high blood pressure (animal model under physiological conditions).

The aim of this study was to investigate whether the simultaneous occurrence of mutations in a heterozygous genotype results in hypertension due to subsequent phenotype interactions. Furthermore, it should be investigated, whether this simultaneous occurrence leads to differences in blood pressure regulation. By determining plasma concentrations of aldosterone and other important electrolytes should be gained information on the activity of RAAS-related and pathophysiological changes in salt and water homeostasis. Finally, it should be investigated the influence of different salt exposures on the phenotype of the double heterozygous mutant mouse. For this purpose, in four experiments series the following tests were performed on an adult male double heterozygous mutant mice (+/L +/d), the corresponding wild-type (+/+ +/+), and a single heterozygous mice (+/L +/+ +/+)

- 1. Measurement of the mean arterial blood pressure and heart rate in awake and unstressed mice using a chronic arterial catheter on the second and third postoperative day.
- 2. Blood sampling via the arterial catheter followed by measurement of plasma concentration of aldosterone, electrolytes and creatinine.
- 3. Heart removal with determination of heart weight and the weight of the left and right ventricle. Ratio calculation of total heart weight or left ventricel weight, respectively, to body weight as an index of myocardial hypertrophy.
- 4. Removal of the kidneys with the determination of total kidney weight. Subsequent ratio calculation of total kidney weight to body weight.
- 5. Measurement of hemodynamic parameters (mean arterial blood pressure, systole, diastole), heart rate and activity by radiotelemetric measurement method:
- a Evaluation of the mean values.
- b Evaluation of the circadian rhythm.
- c Evaluation of the different salt concentrations.
- 6. Metabolism analysis in the metabolic cage under different salt exposures.

The results can be summarized as the following:

- 1. The double heterozygous mice (+/L +/d) showed a significant increase in mean arterial blood pressure compared to the BK $\beta$ 1-heterozygous knockout mice (+/+ +/d).
- 2. The findings of the morphometric studies showed an increased relative weight of the left ventricular heart in double heterozygous animals (+/L +/d) compared to the wild type (+/+ +/+).

- 3. The plasma aldosterone concentration of double heterozygous mice (+ / L + / d) and the heterozygous Liddle mice (+/L +/+) were significantly lower compared to the wild type (+/+ +/+) and the heterozygous BK $\beta$ 1-KO mice (+/+ +/d). Likewise, the plasma concentrations of aldosterone of the heterozygous BK $\beta$ 1-KO mice (+/+ +/d)tended to be higher compared to the wild type (+/+ +/+).
- 4. The plasma concentrations of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> of double heterozygous mice (+/L +/d) did not differ from those of wild-type mice (+/+ +/+). The plasma creatinine levels of the double heterozygous mice (+/L +/d) were significantly higher than those of wild-type mice (+/+ +/+).
- 5. The double heterozygous mice (+/L +/d) showed a (for their species) typical circadian rhythm in the radiotelemetric blood pressure measurement.
- 6. Both the hemodynamic parameters and the activity of double heterozygous mice (+/L+/d) were significantly higher during the nocturnal activity phase than of the wild-type mice (+/+ +/+).
- 7. Given a low-salt diet in direct comparison of the daily average values, the mean arterial blood pressure was significantly higher for double heterozygous mice (+/L +/d) than for the wild type (+/++/+) in the radiotelemetric blood pressure measurements.
- 8. In direct comparison of the daily average values of all diets in the radiotelemetric blood pressure measurement, both the values of heart rate and the activity were significantly higher for the double heterozygous mice (+/L+/d) than for the wild type (+/++/+).
- 9. Conversion of the salt load had no significant influence on hemodynamic parameters of the two experimental groups.
- 10. The experiments in the metabolic cage could not provide clear results in terms of influx and elimination balance analysis.

In conclusion, in this thesis no explicit gene-dose effect could be detected. Nevertheless, the combination of the two genetic defects in heterozygous expression seems to have a mild effect on blood pressure regulation.

## Abbildungsverzeichnis

1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)[Eigene Abbildung]	14
2	Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde [modifiziert nach: [White, 1994]	
	& [Sackmann, 2009]]	16
3	Definition und Klassifikation von Blutdruckbereichen nach den Leitlinien der	
	European Society of Hypertension (ESH) und der European Society of Car-	
	diology (ESC) 2007	20
4	Die essentielle Hypertonie als Ergebnis eines Zusammenspiels von genetischen	
	und umweltbedingten Faktoren [modifiziert nach Rutherford 2003]	22
5	Molekulare Struktur des BK-Kanals. Topologie der $\alpha\text{-}$ und $\beta\text{-}Untereinheit.}$	
	$[modifiziert nach [Orio et al., 2002]] \dots $	29
6	Tetramere Struktur des ENaC in Seitenansicht [modifiziert nach	
	$[Rossier et al., 2002]] \dots $	34
7	Selbstgefertigte Katheterspitzen [Kilp, 2008]	47
8	OP-Situs: Implantation von chronischen Kathetern in die A. und V. femoralis	
	[Eigene Photographie]	49
9	Originalregistrierung einer Blutdruck-/Herzfrequenzmessung über 1,5 Stun-	
	den. [eigene Originalmessung, Ausgabe aus dem Labtech Notebook $^{\textcircled{R}}$ -	
	Programm]	51
10	Dargestellt ist die freipräparierte und angezügelte A. carotis (links) und die	
	Implantation der Katheterspitze in das Gefäß (rechts) [Eigene Photographie	
	(links) und Bild von Data Sciences International, Minnesota, USA (rechts)].	53
11	Lokalisation des Telemetriesenders in der Maus [Data Sciences International,	
	$Minnesota, USA]. \ldots \ldots$	53
12	Darstellung der telemetrischen Aufzeichnung des Blutdrucks [Data Sciences	
	International, Minnesota, USA]	55
13	Standardkurve. Darstellung einer typischen Kalibrierkurve für einen 125J-	
	RIA von Aldosteron. [Budack, 2004]	58
14	PCR Analyse von repräsentativen Ohrbi opsien. [Eigene Photographie]. $\ .$	63
15	Mittlerer arterieller Blutdruck. [Eigene Abbildung]	65
16	Aldosteronkonzentrationen im Plasma [Eigene Abbildung]	68
17	Hämodynamische Basisdaten über fünf Tage registriert. [Eigene Abbildung].	71
18	Basisdaten der Herzfrequenz über fünf Tage registriert. [Eigene Abbildung]	71
19	Basisdaten der Aktivität über fünf Tage registriert. [Eigene Abbildung]	72
20	Exemplarischer Tagesverlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes. [Eigene	
	Abbildung]	73
21	Exemplarischer Tagesverlauf der Herzfrequenz. [Eigene Abbildung]	73
22	Exemplarischer Tagesverlauf der Aktivität. [Eigene Abbildung]	74

23	Mittelwerte des mittleren arteriellen Blutdruckes getrennt in Tag- und Nacht-	
	phase. [Eigene Abbildung]	75
24	Mittelwerte der Herzfrequenz getrennt in Tag- und Nachtphase. [Eigene Ab-	
	bildung]	76
25	Mittelwerte der Aktivität getrennt in Tag- und Nachtphase. [Eigene Abbildung].	76
26	Mittlerer arterieller Blutdruck. [Eigene Abbildung]	78
27	Herzfrequenz. [Eigene Abbildung]	79
28	Aktivität. [Eigene Abbildung]	80
29	MAD Basis Diät 1. [Eigene Abbildung]	83
30	MAD Na <sup>+</sup> -arme Diät. [Eigene Abbildung]	83
31	MAD Na <sup>+</sup> -reiche Diät. [Eigene Abbildung]	84
32	MAD Basis Diät 2. [Eigene Abbildung]	84
33	MAD. [Eigene Abbildung]	85
34	Herzfrequenz: Umstellung von Basis Diät 1 auf Na <sup>+</sup> -arme Diät. [Eigene Ab-	
	bildung]	86
35	MAD: Umstellung von Na <sup>+</sup> -arme Diät auf Na <sup>+</sup> -reiche Diät [Eigene Abbildung].	87
36	Herzfrequenz: Umstellung von Na <sup>+</sup> -arme Diät auf Na <sup>+</sup> -reiche Diät [Eigene	
	Abbildung]	88
37	MAD: Umstellung von Na <sup>+</sup> -reiche Diät auf Basis Diät [Eigene Abbildung].	89
38	Herzfrequenz: Umstellung von Na <sup>+</sup> -reiche Diät auf Basis Diät [Eigene Abbil-	
	dung]	89
39	Gewichtsverlust im metabolischen Käfig [Eigene Abbildung].	91

## Literatur

- [Abdallah et al., 2001] Abdallah, J. G., Schrier, R. W., Edelstein, C., Jennings, S. D., Wyse, B. und Ellison, D. H.; Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(-)cotransporter abundance: role of aldosterone; J Am Soc Nephrol; 12(7):(2001), 1335– 41; eng.
- [Abriel und Horisberger, 1999] Abriel, H. und Horisberger, J. D.; Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels expressed in Xenopus laevis oocytes; J Physiol; 516 (Pt 1):(1999), 31–43; eng.
- [Abriel et al., 1999] Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D. und Staub, O.; Defective regulation of the epithelial Na+ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome; J Clin Invest; 103(5):(1999), 667–73; eng.
- [Adams et al., 1998] Adams, C. M., Anderson, M. G., Motto, D. G., Price, M. P., Johnson, W. A. und Welsh, M. J.; Ripped pocket and pickpocket, novel Drosophila DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons; *J Cell Biol*; 140(1):(1998), 143–52; eng.
- [Afkham, 2003] Afkham, F.; Einfluss des ACE-NEP-Inhibitors AVE 7688 und des ACE-Hemmers Ramipril auf die Mortalität von spontan hypertensiven Ratten unter besonderer Berücksichtigung der Gefäß-, Nieren- und Herzfunktion; Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover; Hannover (2003); einfluss des ACE-NEP-Inhibitors AVE 7688 und des ACE-Hemmers Ramipril auf die Mortalität von spontan hypertensiven Ratten unter besonderer Berücksichtigung der Gefäß-, Nieren- und Herzfunktion.
- [Alderman, 2002] Alderman, M. H.; Salt, blood pressure and health: a cautionary tale; *Int J Epidemiol*; 31(2):(2002), 311–5; eng.
- [Alexander, 1995] Alexander, R. W.; Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective; *Hypertension*; 25(2):(1995), 155–61; eng.
- [Alvarez de la Rosa et al., 2000] Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K. und Zhang, P.; Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels; Annu Rev Physiol; 62:(2000), 573–94; eng.
- [Arrighi et al., 2001] Arrighi, I., Bloch-Faure, M., Grahammer, F., Bleich, M., Warth, R., Mengual, R., Drici, M. D., Barhanin, J. und Meneton, P.; Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98(15):(2001), 8792–7; eng.

- [Ashcroft, 1999] Ashcroft, F.; Ion channels and disease (Academic Press, San Diego, San Francisco) (1999).
- [Atarashi et al., 1985] Atarashi, K., Mulrow, P. J. und Franco-Saenz, R.; Effect of atrial peptides on aldosterone production; J Clin Invest; 76(5):(1985), 1807–11; eng.
- [Balakrishnan et al., 1998] Balakrishnan, S., Tatchum-Talom, R. und McNeill, J. R.; Radiotelemetric versus externalized catheter monitoring of blood pressure: effect of vasopressin in spontaneous hypertension; J Pharmacol Toxicol Methods; 40(2):(1998), 87–93; eng.
- [Bangel, 2006] Bangel, N.; Molekulare Charakterisierung des epithelialen Na+-Kanals (ENaC) aus Nasengewebe von Patienten mit und ohne Mukoviszidose; Dissertation; Westfälische Wilhelms-Universität Münster (2006).
- [Barajas, 1979] Barajas, L.; Anatomy of the juxtaglomerular apparatus; Am J Physiol; 237(5):(1979), F333–43; eng.
- [Barrett et al., 1989] Barrett, P. Q., Bollag, W. B., Isales, C. M., McCarthy, R. T. und Rasmussen, H.; Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion; *Endocr Rev*; 10(4):(1989), 496–518; eng.
- [Behrens et al., 2000] Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschutz, R. und Pongs, O.; hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family; FEBS Lett; 474(1):(2000), 99–106; eng.
- [Bek et al., 2006] Bek, M. J., Wang, X., Asico, L. D., Jones, J. E., Zheng, S., Li, X., Eisner, G. M., Grandy, D. K., Carey, R. M., Soares-da Silva, P. und Jose, P. A.; Angiotensin-II type 1 receptor-mediated hypertension in D4 dopamine receptor-deficient mice; *Hypertension*; 47(2):(2006), 288–95; eng.
- [Benos und Stanton, 1999] Benos, D. J. und Stanton, B. A.; Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels; J Physiol; 520 Pt 3:(1999), 631–44; eng.
- [Bianchi und Driscoll, 2002] Bianchi, L. und Driscoll, M.; Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember; *Neuron*; 34(3):(2002), 337–40; eng.
- [Blaine et al., 1984] Blaine, E. H., Schorn, T. W. und Boger, J.; Statine-containing renin inhibitor. Dissociation of blood pressure lowering and renin inhibition in sodium-deficient dogs; *Hypertension*; 6(2 Pt 2):(1984), I111–8; eng.

- [Boehm et al., 2007] Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N., Freyenhagen, R., Hartmann, M. und Zacharowski, K.; Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice; *Biol Chem*; 388(5):(2007), 547–54; eng.
- [Bolotina et al., 1994] Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. und Cohen, R. A.; Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle; *Nature*; 368(6474):(1994), 850–3; eng.
- [Boutellier, 2005] Boutellier, U. H.-V., U.; Arbeits- und Sportphysiologie (Springer Verlag) (2005); 3-540-21882-3.
- [Bravo-Zehnder et al., 2000] Bravo-Zehnder, M., Orio, P., Norambuena, A., Wallner, M., Meera, P., Toro, L., Latorre, R. und Gonzalez, A.; Apical sorting of a voltage- and Ca2+-activated K+ channel alpha -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(24):(2000), 13114–9; eng.
- [Brayden und Nelson, 1992] Brayden, J. E. und Nelson, M. T.; Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels; *Science*; 256(5056):(1992), 532–5; eng.
- [Brenner et al., 2000a] Brenner, R., Jegla, T. J., Wickenden, A., Liu, Y. und Aldrich, R. W.; Cloning and functional characterization of novel large conductance calciumactivated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4; *J Biol Chem*; 275(9):(2000a), 6453–61; eng.
- [Brenner et al., 2000b] Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T. und Aldrich, R. W.; Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel; *Nature*; 407(6806):(2000b), 870–6; eng.
- [Brilla et al., 1991] Brilla, C. G., Janicki, J. S. und Weber, K. T.; Cardioreparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy; *Circulation*; 83(5):(1991), 1771–9; eng.
- [Brilla et al., 1996] Brilla, C. G., Matsubara, L. und Weber, K. T.; Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis; *Hypertension*; 28(2):(1996), 269–75; eng.
- [Brzezinska et al., 2000] Brzezinska, A. K., Gebremedhin, D., Chilian, W. M., Kalyanaraman, B. und Elliott, S. J.; Peroxynitrite reversibly inhibits Ca(2+)-activated K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle cells; Am J Physiol Heart Circ Physiol; 278(6):(2000), H1883–90; eng.

- [Budack, 2004] Budack, M. K.; Untersuchungen zur Blutdruckregulation bei Mäusen mit genetischer Inaktivierung der β1-Untereinheit des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanals; Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; Hannover, Hamburg (2004); untersuchungen zur Blutdruckregulation bei Mäusen mit genetischer Inaktivierung der β1-Untereinheit des Ca2+-aktivierten Kaliumkanals.
- [Bundesamt, 2008] Bundesamt, S.; Todesursachen in Deutschland, Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2007; Technischer Bericht; Bundesamt, Statistisches; Wiesbaden (2008); todesursachen in Deutschland, Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2007.
- [Butz und Davisson, 2001] Butz, G. M. und Davisson, R. L.; Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool; *Physiol Genomics*; 5(2):(2001), 89–97; eng.
- [Canessa et al., 1993] Canessa, C. M., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C.; Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration; *Nature*; 361(6411):(1993), 467–70; eng.
- [Canessa et al., 1994a] Canessa, C. M., Merillat, A. M. und Rossier, B. C.; Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells; Am J Physiol; 267(6 Pt 1):(1994a), C1682–90; eng.
- [Canessa et al., 1994b] Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C.; Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits; *Nature*; 367(6462):(1994b), 463–7; eng.
- [Carey et al., 1999] Carey, R. M., Wang, Z. Q. und Siragy, H. M.; Novel actions of angiotensin II via its renal type-2 (AT(2)) receptor; *Curr Hypertens Rep*; 1(2):(1999), 151–7; eng.
- [Carretero und Oparil, 2000] Carretero, O. A. und Oparil, S.; Essential hypertension. Part I: definition and etiology; *Circulation*; 101(3):(2000), 329–35.
- [Chai et al., 2004] Chai, S. Y., Fernando, R., Peck, G., Ye, S. Y., Mendelsohn, F. A., Jenkins, T. A. und Albiston, A. L.; The angiotensin IV/AT4 receptor; *Cell Mol Life Sci*; 61(21):(2004), 2728–37; eng.
- [Chalmers, 1999] Chalmers, J.; The 1999 WHO-ISH Guidelines for the Management of Hypertension; Med J Aust; 171(9):(1999), 458–9; eng.
- [Chalmers et al., 1999] Chalmers, J., MacMahon, S., Mancia, G., Whitworth, J., Beilin, L., Hansson, L., Neal, B., Rodgers, A., Ni Mhurchu, C. und Clark, T.; 1999 World Health

Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization; *Clin Exp Hypertens*; 21(5-6):(1999), 1009–60; doi:10.3109/10641969909061028.

- [Chang et al., 1996] Chang, S. S., Grunder, S., Hanukoglu, A., Rosler, A., Mathew, P. M., Hanukoglu, I., Schild, L., Lu, Y., Shimkets, R. A., Nelson-Williams, C., Rossier, B. C. und Lifton, R. P.; Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1; *Nat Genet*; 12(3):(1996), 248–53; eng.
- [Chen et al., 1999] Chen, S. Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O. C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F. und Pearce, D.; Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(5):(1999), 2514–9; eng.
- [Cherradi et al., 1998] Cherradi, N., Brandenburger, Y. und Capponi, A. M.; Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein; *Eur J Endocrinol*; 139(3):(1998), 249–56; eng.
- [Cholewa und Mattson, 2005] Cholewa, B. C. und Mattson, D. L.; Influence of elevated renin substrate on angiotensin II and arterial blood pressure in conscious mice; *Exp Physiol*; 90(4):(2005), 607–12; eng.
- [Chraibi et al., 1998] Chraibi, A., Vallet, V., Firsov, D., Hess, S. K. und Horisberger, J. D.; Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in Xenopus oocytes; J Gen Physiol; 111(1):(1998), 127–38; eng.
- [Condon et al., 2002] Condon, J. C., Pezzi, V., Drummond, B. M., Yin, S. und Rainey, W. E.; Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase; *Endocrinology*; 143(9):(2002), 3651–7; eng.
- [Cowley, 1992] Cowley, J., A. W.; Long-term control of arterial blood pressure; *Physiol Rev*; 72(1):(1992), 231–300; eng.
- [Cowley et al., 1973] Cowley, J., A. W., Liard, J. F. und Guyton, A. C.; Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs; *Circ Res*; 32(5):(1973), 564–76; eng.
- [Cowley und Roman, 1996] Cowley, J., A. W. und Roman, R. J.; The role of the kidney in hypertension; JAMA; 275(20):(1996), 1581–9; eng.
- [Denner et al., 1996] Denner, K., Rainey, W. E., Pezzi, V., Bird, I. M., Bernhardt, R. und Mathis, J. M.; Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells; *Mol Cell Endocrinol*; 121(1):(1996), 87–91; eng.

- [Dick et al., 2002] Dick, G. M., Hunter, A. C. und Sanders, K. M.; Ethylbromide tamoxifen, a membrane-impermeant antiestrogen, activates smooth muscle calcium-activated large-conductance potassium channels from the extracellular side; *Mol Pharmacol*; 61(5):(2002), 1105–13; eng.
- [Dick und Sanders, 2001] Dick, G. M. und Sanders, K. M.; (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice; J Biol Chem; 276(48):(2001), 44835–40; eng.
- [Dinudom et al., 1998] Dinudom, A., Harvey, K. F., Komwatana, P., Young, J. A., Kumar, S. und Cook, D. I.; Nedd4 mediates control of an epithelial Na+ channel in salivary duct cells by cytosolic Na+; Proc Natl Acad Sci U S A; 95(12):(1998), 7169–73; eng.
- [Droste et al., 2003] Droste, S. K., Gesing, A., Ulbricht, S., Muller, M. B., Linthorst, A. C. und Reul, J. M.; Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamicpituitary-adrenocortical axis; *Endocrinology*; 144(7):(2003), 3012–23; eng.
- [Dunn, 1970] Dunn, T. B.; Normal and pathologic anatomy of the adrenal gland of the mouse, including neoplasms; J Natl Cancer Inst; 44(6):(1970), 1323–89; eng.
- [Elliott und Stamler, 2002] Elliott, P. und Stamler, J.; Evidence on salt and blood pressure is consistent and persuasive; Int J Epidemiol; 31(2):(2002), 316–9; discussion 331–2; eng.
- [Evans und Rose, 1971] Evans, J. G. und Rose, G.; Hypertension; Br Med Bull; 27(1):(1971), 37–42; eng.
- [Feinleib et al., 1977] Feinleib, M., Garrison, R. J., Fabsitz, R., Christian, J. C., Hrubec, Z., Borhani, N. O., Kannel, W. B., Rosenman, R., Schwartz, J. T. und Wagner, J. O.; The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results; Am J Epidemiol; 106(4):(1977), 284–5; eng.
- [Finke et al., 1983] Finke, R., Gross, R., Hackenthal, E., Huber, J. und Kirchheim, H. R.; Threshold pressure for the pressure-dependent renin release in the autoregulating kidney of conscious dogs; *Pflugers Arch*; 399(2):(1983), 102–10; eng.
- [Firsov et al., 1998] Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C. und Schild, L.; The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC); *EMBO J*; 17(2):(1998), 344–52; eng.
- [Firsov et al., 1999] Firsov, D., Robert-Nicoud, M., Gruender, S., Schild, L. und Rossier,
  B. C.; Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelium sodium channel (ENaC). Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface; *J Biol Chem*; 274(5):(1999), 2743–9; eng.

- [Freeman und Petitti, 2002] Freeman, D. A. und Petitti, D. B.; Salt, blood pressure and public policy; *Int J Epidemiol*; 31(2):(2002), 319–20; discussion 331–2; eng.
- [Frindt et al., 2002] Frindt, G., McNair, T., Dahlmann, A., Jacobs-Palmer, E. und Palmer, L. G.; Epithelial Na channels and short-term renal response to salt deprivation; Am J Physiol Renal Physiol; 283(4):(2002), F717–26; eng.
- [Fyfe et al., 1998] Fyfe, G. K., Quinn, A. und Canessa, C. M.; Structure and function of the Mec-ENaC family of ion channels; *Semin Nephrol*; 18(2):(1998), 138–51; eng.
- [Gallo-Payet und Guillon, 1998] Gallo-Payet, N. und Guillon, G.; Regulation of adrenocortical function by vasopressin; *Horm Metab Res*; 30(6-7):(1998), 360–7; eng.
- [Garcia-Calvo et al., 1994] Garcia-Calvo, M., Knaus, H. G., McManus, O. B., Giangiacomo, K. M., Kaczorowski, G. J. und Garcia, M. L.; Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle; *J Biol Chem*; 269(1):(1994), 676–82; eng.
- [Garcia-Valdes et al., 2001] Garcia-Valdes, J., Zamudio, F. Z., Toro, L., Possani, L. D. und Possan, L. D.; Slotoxin, alphaKTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between alpha and alpha+beta (beta1 or beta4) complexes; *FEBS Lett*; 505(3):(2001), 369–73.
- [Garty, 2000] Garty, H.; Regulation of the epithelial Na+ channel by aldosterone: open questions and emerging answers; *Kidney Int*; 57(4):(2000), 1270–6; eng.
- [Garty und Palmer, 1997] Garty, H. und Palmer, L. G.; Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation; *Physiol Rev*; 77(2):(1997), 359–96; eng.
- [Glasow et al., 1996] Glasow, A., Breidert, M., Haidan, A., Anderegg, U., Kelly, P. A. und Bornstein, S. R.; Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland; J Clin Endocrinol Metab; 81(8):(1996), 3103–11; eng.
- [Golding et al., 1999] Golding, N. L., Jung, H. Y., Mickus, T. und Spruston, N.; Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons; J Neurosci; 19(20):(1999), 8789–98; eng.
- [Gollasch et al., 1998] Gollasch, M., Wellman, G. C., Knot, H. J., Jaggar, J. H., Damon, D. H., Bonev, A. D. und Nelson, M. T.; Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca2+ signals in cerebral arteries: Ca2+ sparks as elementary physiological events; Circ Res; 83(11):(1998), 1104–14; eng.

- [Gonzalez-Garcia et al., 1993] Gonzalez-Garcia, C., Cena, V., Keiser, H. R. und Rojas, E.; Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells; *Biochim Biophys Acta*; 1177(1):(1993), 99–105; eng.
- [Green et al., 1994] Green, K. A., Falconer, S. W. und Cottrell, G. A.; The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH2 (FMRFamide) directly gates two ion channels in an identified Helix neurone; *Pflugers Arch*; 428(3-4):(1994), 232–40; eng.
- [Gribkoff et al., 1996] Gribkoff, V. K., Lum-Ragan, J. T., Boissard, C. G., Post-Munson, D. J., Meanwell, N. A., Starrett, J. E., Jr, Kozlowski, E. S., Romine, J. L., Trojnacki, J. T., Mckay, M. C., Zhong, J. und Dworetzky, S. I.; Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels; *Mol Pharmacol*; 50(1):(1996), 206–17.
- [Grimm et al., 2009] Grimm, P. R., Irsik, D. L., Settles, D. C., Holtzclaw, J. D. und Sansom, S. C.; Hypertension of Kcnmb1-/- is linked to deficient K secretion and aldosteronism; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106(28):(2009), 11800–5; eng.
- [Grunder et al., 1997] Grunder, S., Firsov, D., Chang, S. S., Jaeger, N. F., Gautschi, I., Schild, L., Lifton, R. P. und Rossier, B. C.; A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel; *EMBO J*; 16(5):(1997), 899–907; eng.
- [Grunnet et al., 1999] Grunnet, M., Knaus, H. G., Solander, C. und Klaerke, D. A.; Quantification and distribution of Ca(2+)-activated maxi K(+) channels in rabbit distal colon; Am J Physiol; 277(1 Pt 1):(1999), G22–30; eng.
- [Guyton, 1991a] Guyton, A. C.; Abnormal renal function and autoregulation in essential hypertension; *Hypertension*; 18(5 Suppl):(1991a), III49–53; eng.
- [Guyton, 1991b] Guyton, A. C.; Blood pressure control–special role of the kidneys and body fluids; *Science*; 252(5014):(1991b), 1813–6; eng.
- [Hackenthal et al., 1990] Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. und Taugner, R.; Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion; *Physiol Rev*; 70(4):(1990), 1067– 116; eng.
- [Hanke und Campbell, 2000] Hanke, C. J. und Campbell, W. B.; Endothelial cell nitric oxide inhibits aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells: modulation by oxygen; Am J Physiol Endocrinol Metab; 279(4):(2000), E846–54; eng.
- [Hansson et al., 1995a] Hansson, J. H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B. und Lifton, R. P.; Hypertension caused

by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome; *Nat Genet*; 11(1):(1995a), 76–82; eng.

- [Hansson et al., 1995b] Hansson, J. H., Schild, L., Lu, Y., Wilson, T. A., Gautschi, I., Shimkets, R., Nelson-Williams, C., Rossier, B. C. und Lifton, R. P.; A de novo missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92(25):(1995b), 11495–9; eng.
- [Hartmann et al., 1991] Hartmann, H. A., Kirsch, G. E., Drewe, J. A., Taglialatela, M., Joho, R. H. und Brown, A. M.; Exchange of conduction pathways between two related K+ channels; *Science*; 251(4996):(1991), 942–4; eng.
- [Harvey et al., 1999] Harvey, K. F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C. N., Day, M. L., Parasivam, G., Cook, D. I. und Kumar, S.; All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na+; J Biol Chem; 274(18):(1999), 12525–30; eng.
- [He und MacGregor, 2002] He, F. J. und MacGregor, G. A.; Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health; *J Hum Hypertens*; 16(11):(2002), 761–70; eng.
- [Heginbotham et al., 1994] Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. und MacKinnon, R.; Mutations in the K+ channel signature sequence; *Biophys J*; 66(4):(1994), 1061–7; eng.
- [Heikkila et al., 2002] Heikkila, M., Peltoketo, H., Leppaluoto, J., Ilves, M., Vuolteenaho, O. und Vainio, S.; Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production; *Endocrinology*; 143(11):(2002), 4358–65; eng.
- [Hermann und Hartung, 1983] Hermann, A. und Hartung, K.; Ca2+ activated K+ conductance in molluscan neurones; *Cell Calcium*; 4(5-6):(1983), 387–405; eng.
- [Hilbers et al., 1999] Hilbers, U., Peters, J., Bornstein, S. R., Correa, F. M., Johren, O., Saavedra, J. M. und Ehrhart-Bornstein, M.; Local renin-angiotensin system is involved in K+-induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells; *Hypertension*; 33(4):(1999), 1025–30; eng.
- [Hille, 2001] Hille, B.; Ion channels of excitable membranes; Band 3. Aufl. (Sinauer Associates, Sunderland) (2001).
- [Ho et al., 1993] Ho, K. K., Anderson, K. M., Kannel, W. B., Grossman, W. und Levy, D.; Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects; *Circulation*; 88(1):(1993), 107–15; eng.

- [Hochdruckliga, 2009] Hochdruckliga, D.; Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie; Nieren- und Hochdruckkrankheiten; 38(4):(2009), 137–188; leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie.
- [Hurley et al., 1999] Hurley, B. R., Preiksaitis, H. G. und Sims, S. M.; Characterization and regulation of Ca2+-dependent K+ channels in human esophageal smooth muscle; Am J Physiol; 276(4 Pt 1):(1999), G843–52; eng.
- [Ikeda und Kaplan, 1970] Ikeda, K. und Kaplan, W. D.; Patterned neural activity of a mutant Drosophila melanogaster; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 66(3):(1970), 765–72.
- [Innes et al., 1998] Innes, B. A., McLaughlin, M. G., Kapuscinski, M. K., Jacob, H. J. und Harrap, S. B.; Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension; *Hypertension*; 31(3):(1998), 741–6; eng.
- [Ito und Scher, 1978] Ito, C. S. und Scher, A. M.; Regulation of arterial blood pressure by aortic baroreceptors in the unanesthetized dog; *Circ Res*; 42(2):(1978), 230–6; eng.
- [Jackson, 2000] Jackson, W. F.; Ion channels and vascular tone; *Hypertension*; 35(1 Pt 2):(2000), 173–8; eng.
- [Ji und Benos, 2004] Ji, H. L. und Benos, D. J.; Degenerin sites mediate proton activation of deltabetagamma-epithelial sodium channel; J Biol Chem; 279(26):(2004), 26939–47; eng.
- [Julien et al., 1995] Julien, C., Zhang, Z. Q. und Barres, C.; How sympathetic tone maintains or alters arterial pressure; *Fundam Clin Pharmacol*; 9(4):(1995), 343–9; eng.
- [Just et al., 2000] Just, A., Faulhaber, J. und Ehmke, H.; Autonomic cardiovascular control in conscious mice; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 279(6):(2000), R2214–21; eng.
- [Kaczorowski et al., 1996] Kaczorowski, G. J., Knaus, H. G., Leonard, R. J., McManus, O. B. und Garcia, M. L.; High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function; *J Bioenerg Biomembr*; 28(3):(1996), 255–67; eng.
- [Kaplan, 1998] Kaplan, N. M.; Treatment of hypertension: insights from the JNC-VI report; Am Fam Physician; 58(6):(1998), 1323–30; eng.
- [Kaplan und Trout, 1969] Kaplan, W. D. und Trout, W. E., 3rd; The behavior of four neurological mutants of Drosophila; *Genetics*; 61(2):(1969), 399–409.
- [Kaschina und Unger, 2003] Kaschina, E. und Unger, T.; Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function; *Blood Press*; 12(2):(2003), 70–88; eng.

- [Kellenberger et al., 1999] Kellenberger, S., Gautschi, I. und Schild, L.; A single point mutation in the pore region of the epithelial Na+ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(7):(1999), 4170–5; eng.
- [Kellenberger und Schild, 2002] Kellenberger, S. und Schild, L.; Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure; *Physiol Rev*; 82(3):(2002), 735–67; eng.
- [Kerins et al., 1995] Kerins, D. M., Hao, Q. und Vaughan, D. E.; Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV; J Clin Invest; 96(5):(1995), 2515–20; eng.
- [Kilp, 2008] Kilp, H.; Pathogenese der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 Defizien; Dissertation; Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (2008).
- [Klinke und Silbernagl, 2003] Klinke, R. und Silbernagl, S.; Lehrbuch der Physiologie; Band4. Auflage (Thieme Verlag, Stuttgart, New York) (2003); 3-13-796004-5.
- [Knaus et al., 1995] Knaus, H. G., Eberhart, A., Koch, R. O., Munujos, P., Schmalhofer, W. A., Warmke, J. W., Kaczorowski, G. J. und Garcia, M. L.; Characterization of tissue-expressed alpha subunits of the high conductance Ca(2+)-activated K+ channel; *J Biol Chem*; 270(38):(1995), 22434–9; eng.
- [Knaus et al., 1994a] Knaus, H. G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., Smith, M. und Swanson, R.; Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K+ channel from smooth muscle; J Biol Chem; 269(25):(1994a), 17274–8; eng.
- [Knaus et al., 1994b] Knaus, H. G., McManus, O. B., Lee, S. H., Schmalhofer, W. A., Garcia-Calvo, M., Helms, L. M., Sanchez, M., Giangiacomo, K., Reuben, J. P., Smith, r., A. B. und et al.; Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels; *Biochemistry*; 33(19):(1994b), 5819–28; eng.
- [Kosari et al., 1998] Kosari, F., Sheng, S., Li, J., Mak, D. O., Foskett, J. K. und Kleyman, T. R.; Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel; J Biol Chem; 273(22):(1998), 13469–74; eng.
- [Kotlikoff und Hall, 2003] Kotlikoff, M. und Hall, I.; Hypertension: beta testing; J Clin Invest; 112(5):(2003), 654–6; eng.
- [Kramer und Kinter, 2003] Kramer, K. und Kinter, L. B.; Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals; *Physiol Genomics*; 13(3):(2003), 197–205; eng.

- [Kramer et al., 2000] Kramer, K., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., Mills, P. A., Huetteman, D., Zwiers, L. und Brockway, B.; Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study; *Lab Anim*; 34(3):(2000), 272–80; eng.
- [Krause, 2004] Krause, P.; Der Einfluß von BK-Kanal-Modulatoren auf die Migration von Gliomzellen; Dissertation; Friedrich-Schiller-Universität Jena (2004).
- [Lang et al., 2000] Lang, R. J., Harvey, J. R., McPhee, G. J. und Klemm, M. F.; Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca2+-activated K+ (BKCa) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci; J Physiol; 525 Pt 2:(2000), 363-76; eng.
- [Lapointe et al., 1990] Lapointe, J. Y., Bell, P. D. und Cardinal, J.; Direct evidence for apical Na+:2Cl::K+ cotransport in macula densa cells; Am J Physiol; 258(5 Pt 2):(1990), F1466-9; eng.
- [Larsson et al., 1996] Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S. und Isacoff, E. Y.; Transmembrane movement of the shaker K+ channel S4; *Neuron*; 16(2):(1996), 387–97; eng.
- [Lesage et al., 1996] Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J.; TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K+ channel with a novel structure; *EMBO J*; 15(5):(1996), 1004–11.
- [Li et al., 1999] Li, P., Sur, S. H., Mistlberger, R. E. und Morris, M.; Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice; Am J Physiol; 276(2 Pt 2):(1999), R500–4; eng.
- [Liddle GW, 1963] Liddle GW, C. W. J., Bledsoe T; A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion; *Trans Assoc Am Physicians*; 76:(1963), 199–213; a familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion.
- [Lifton, 1995] Lifton, R. P.; Genetic determinants of human hypertension; Proc Natl Acad Sci U S A; 92(19):(1995), 8545–51.
- [Lifton et al., 1992] Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Ulick, S. und Lalouel, J. M.; The molecular basis of glucocorticoid-remediable aldosteronism, a Mendelian cause of human hypertension; *Trans Assoc Am Physicians*; 105:(1992), 64–71; eng.
- [Lifton et al., 2001] Lifton, R. P., Gharavi, A. G. und Geller, D. S.; Molecular mechanisms of human hypertension; *Cell*; 104(4):(2001), 545–56.
- [Linß und Wedler, 1991] Linß, G. und Wedler, B.; Arterielle Hypertonie (Akademie Verlag, Berlin) (1991); arterielle Hypertonie.

- [Liu et al., 2002] Liu, X., Chang, Y., Reinhart, P. H. und Sontheimer, H.; Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells; *J Neurosci*; 22(5):(2002), 1840–9; eng.
- [Lotshaw, 1997] Lotshaw, D. P.; Effects of K+ channel blockers on K+ channels, membrane potential, and aldosterone secretion in rat adrenal zona glomerulosa cells; *Endocrinology*; 138(10):(1997), 4167–75; eng.
- [Luft et al., 1987] Luft, F. C., Miller, J. Z., Weinberger, M. H., Grim, C. E., Daugherty, S. A. und Christian, J. C.; Influence of genetic variance on sodium sensitivity of blood pressure; *Klin Wochenschr*; 65(3):(1987), 101–9; eng.
- [MacGregor und de Wardener, 2002] MacGregor, G. und de Wardener, H. E.; Salt, blood pressure and health; *Int J Epidemiol*; 31(2):(2002), 320–7; discussion 331–2; eng.
- [Makara et al., 2000] Makara, J. K., Petheo, G. L., Toth, A. und Spat, A.; Effect of osmolarity on aldosterone production by rat adrenal glomerulosa cells; *Endocrinology*; 141(5):(2000), 1705–10; eng.
- [Mancia et al., 2007] Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A. M., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R. E., Boudier, H. A., Zanchetti, A., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellemans, I., Kristensen, S. D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J. L., Erdine, S., Kiowski, W., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Lindholm, L. H., Viigimaa, M., Adamopoulos, S., Bertomeu, V., Clement, D., Farsang, C., Gaita, D., Lip, G., Mallion, J. M., Manolis, A. J., Nilsson, P. M., O'Brien, E., Ponikowski, P., Redon, J., Ruschitzka, F., Tamargo, J., van Zwieten, P., Waeber, B. und Williams, B.; 2007 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); J Hypertens; 25(6):(2007), 1105–87; eng.
- [Mano und Driscoll, 1999] Mano, I. und Driscoll, M.; DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt; *Bioessays*; 21(7):(1999), 568–78; eng.
- [Marunaka und Eaton, 1991] Marunaka, Y. und Eaton, D. C.; Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels; Am J Physiol; 260(5 Pt 1):(1991), C1071-84; eng.
- [Masuzaki et al., 2003] Masuzaki, H., Yamamoto, H., Kenyon, C. J., Elmquist, J. K., Morton, N. M., Paterson, J. M., Shinyama, H., Sharp, M. G., Fleming, S., Mullins, J. J.,

Seckl, J. R. und Flier, J. S.; Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice; *J Clin Invest*; 112(1):(2003), 83–90; eng.

- [Mattson, 1998] Mattson, D. L.; Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice; Am J Physiol; 274(2 Pt 2):(1998), R564–70; eng.
- [Mattson, 2001] Mattson, D. L.; Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice; Am J Hypertens; 14(5 Pt 1):(2001), 405–8; eng.
- [McDonald et al., 1999] McDonald, F. J., Yang, B., Hrstka, R. F., Drummond, H. A., Tarr, D. E., McCray, J., P. B., Stokes, J. B., Welsh, M. J. und Williamson, R. A.; Disruption of the beta subunit of the epithelial Na+ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype; *Proc Natl Acad Sci U S* A; 96(4):(1999), 1727–31; eng.
- [Meech, 1978] Meech, R. W.; Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues; Annu Rev Biophys Bioeng; 7:(1978), 1–18; eng.
- [Meera et al., 1997] Meera, P., Wallner, M., Song, M. und Toro, L.; Large conductance voltage- and calcium-dependent K+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(25):(1997), 14066–71; eng.
- [Meyer, 1993] Meyer, K. B. u. J. L., H.; Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung; Band 8 (Verlag M. & H. Schaper, Alfeld-Hannover) (1993); supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung.
- [Minami et al., 1993] Minami, K., Fukuzawa, K., Nakaya, Y., Zeng, X. R. und Inoue, I.; Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K+ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells; *Life Sci*; 53(14):(1993), 1129–35; eng.
- [Miranda et al., 2009] Miranda, N., Simeoni, M. A., Ciriana, E., Panico, C., Cappello, E. und Capasso, G. B.; [Anatomy, physiology and clinical relevance of the connecting tubule]; *G Ital Nefrol*; 26(1):(2009), 55–63; ita.
- [Muller, 1998] Muller, J.; Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road?; *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*; 25:(1998), S79–85; eng.
- [Mune et al., 1995] Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkila, H., Agarwal, A. K. und White, P. C.; Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase; *Nat Genet*; 10(4):(1995), 394–9; eng.

- [Nelson et al., 1995] Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. und Lederer, W. J.; Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks; *Science*; 270(5236):(1995), 633–7; eng.
- [Nelson und Quayle, 1995] Nelson, M. T. und Quayle, J. M.; Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle; Am J Physiol; 268(4 Pt 1):(1995), C799–822; eng.
- [Nussdorfer et al., 1997] Nussdorfer, G. G., Rossi, G. P. und Mazzocchi, G.; Role of adrenomedullin and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis; *Peptides*; 18(7):(1997), 1079–89; eng.
- [Obst et al., 2006] Obst, M., Tank, J., Plehm, R., Blumer, K. J., Diedrich, A., Jordan, J., Luft, F. C. und Gross, V.; NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol; 290(4):(2006), R1012–9; eng.
- [Olesen et al., 1994] Olesen, S. P., Munch, E., Moldt, P. und Drejer, J.; Selective activation of Ca(2+)-dependent K+ channels by novel benzimidazolone; *Eur J Pharmacol*; 251(1):(1994), 53–9; eng.
- [Oppermann et al., 2006] Oppermann, M., Mizel, D., Huang, G., Li, C., Deng, C., Theilig, F., Bachmann, S., Briggs, J., Schnermann, J. und Castrop, H.; Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl co-transporter; J Am Soc Nephrol; 17(8):(2006), 2143–52; eng.
- [Orio et al., 2002] Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G. und Latorre, R.; New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits; News Physiol Sci; 17:(2002), 156–61; eng.
- [Palmer, 1999] Palmer, L. G.; Potassium secretion and the regulation of distal nephron K channels; Am J Physiol; 277(6 Pt 2):(1999), F821–5; eng.
- [Patterson et al., 2002] Patterson, A. J., Henrie-Olson, J. und Brenner, R.; Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel; *Trends Cardiovasc Med*; 12(2):(2002), 78–82; eng.
- [Pearce et al., 2003] Pearce, D., Bhargava, A. und Cole, T. J.; Aldosterone: its receptor, target genes, and actions; *Vitam Horm*; 66:(2003), 29–76; eng.
- [Persson, 1996] Persson, P. B.; Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction; *Physiol Rev*; 76(1):(1996), 193–244; eng.
- [Pluger et al., 2000] Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenau, M., Lohn, M., Waldschutz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F. C., Ehmke, H. und Pongs, O.; Mice with disrupted

BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure; *Circ Res*; 87(11):(2000), E53–60; eng.

- [Pradervand et al., 1999] Pradervand, S., Wang, Q., Burnier, M., Beermann, F., Horisberger, J. D., Hummler, E. und Rossier, B. C.; A mouse model for Liddle's syndrome; J Am Soc Nephrol; 10(12):(1999), 2527–33; eng.
- [Price et al., 1996] Price, M. P., Snyder, P. M. und Welsh, M. J.; Cloning and expression of a novel human brain Na+ channel; J Biol Chem; 271(14):(1996), 7879–82; eng.
- [Qian und Magleby, 2003] Qian, X. und Magleby, K. L.; Beta1 subunits facilitate gating of BK channels by acting through the Ca2+, but not the Mg2+, activating mechanisms; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(17):(2003), 10061–6; eng.
- [Quaschning et al., 2001] Quaschning, T., Ruschitzka, F., Shaw, S. und Luscher, T. F.; Aldosterone receptor antagonism normalizes vascular function in liquorice-induced hypertension; *Hypertension*; 37(2 Part 2):(2001), 801–5; eng.
- [Quinn und Williams, 1988] Quinn, S. J. und Williams, G. H.; Regulation of aldosterone secretion; Annu Rev Physiol; 50:(1988), 409–26; eng.
- [Ransom et al., 2002] Ransom, C. B., Liu, X. und Sontheimer, H.; BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity; *Glia*; 38(4):(2002), 281–91; doi: 10.1002/glia.10064.
- [Rieg et al., 2007] Rieg, T., Vallon, V., Sausbier, M., Sausbier, U., Kaissling, B., Ruth, P. und Osswald, H.; The role of the BK channel in potassium homeostasis and flow-induced renal potassium excretion; *Kidney Int*; 72(5):(2007), 566–73; eng.
- [Rosolowsky und Campbell, 1990] Rosolowsky, L. J. und Campbell, W. B.; Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells; *Endocrinology*; 126(4):(1990), 1860–6; eng.
- [Rossier et al., 2002] Rossier, B. C., Pradervand, S., Schild, L. und Hummler, E.; Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors; Annu Rev Physiol; 64:(2002), 877–97; eng.
- [Rossier et al., 1996] Rossier, M. F., Burnay, M. M., Brandenburger, Y., Cherradi, N., Vallotton, M. B. und Capponi, A. M.; Sources and sites of action of calcium in the regulation of aldosterone biosynthesis; *Endocr Res*; 22(4):(1996), 579–88; eng.
- [Rosskopf et al., 2007] Rosskopf, D., Schurks, M., Rimmbach, C. und Schafers, R.; Genetics of arterial hypertension and hypotension; *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 374(5-6):(2007), 429–69; eng.

- [Rotin, 2000] Rotin, D.; Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins; *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 9(5):(2000), 529–34; eng.
- [Rotin et al., 1994] Rotin, D., Bar-Sagi, D., O'Brodovich, H., Merilainen, J., Lehto, V. P., Canessa, C. M., Rossier, B. C. und Downey, G. P.; An SH3 binding region in the epithelial Na+ channel (alpha rENaC) mediates its localization at the apical membrane; *EMBO J*; 13(19):(1994), 4440–50; eng.
- [Rust et al., 2006] Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., Beck, F. X., Boettger, T., Schubert, R., Ehmke, H., Jentsch, T. J. und Hubner, C. A.; Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3; *Circ Res*; 98(4):(2006), 549–56; eng.
- [Rutherford, 2003] Rutherford, P. A.; Genetic influences in human hypertension; J Hypertens; 21(1):(2003), 19–22; eng.
- [Rutschitzka, 2000] Rutschitzka, R. W. T. S. T. Q. C. D. W. K. W. R. L. M. K. G. N. T. R. S. S. R. L. B. R. H. L. C. B. T. L. u. M. G., F.T.; Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoetin; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 97:(2000), 11609–11613; nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoetin.
- [Sachse, 2010] Sachse, G.; Untersuchungen zur Regulation des Blutdrucks durch Ca<sup>2+</sup>abhängige Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit in der Maus (Mus musculus, LINNAEUS 1758); Dissertation; Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg (2010).
- [Sackmann, 2009] Sackmann, S.; Molekulare Mechanismen der autonomen Aldosteronsekretion; Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau (2009).
- [Sadoshima et al., 1988] Sadoshima, J., Akaike, N., Kanaide, H. und Nakamura, M.; Cyclic AMP modulates Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas; Am J Physiol; 255(4 Pt 2):(1988), H754–9; eng.
- [Sausbier et al., 2005] Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X. B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C. A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H. G., Kenyon, C., Shipston, M. J., Storm, J. F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M. und Ruth, P.; Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice; *Circulation*; 112(1):(2005), 60–8; eng.
- [Schild et al., 1995] Schild, L., Canessa, C. M., Shimkets, R. A., Gautschi, I., Lifton, R. P. und Rossier, B. C.; A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease

increases channel activity in the Xenopus laevis oocyte expression system; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92(12):(1995), 5699–703; eng.

- [Schild et al., 1996] Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P. und Rossier, B. C.; Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome; *EMBO J*; 15(10):(1996), 2381–7; eng.
- [Schild et al., 1997] Schild, L., Schneeberger, E., Gautschi, I. und Firsov, D.; Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation; J Gen Physiol; 109(1):(1997), 15–26; eng.
- [Schmieder et al., 1996] Schmieder, R. E., Martus, P. und Klingbeil, A.; Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized doubleblind studies; JAMA; 275(19):(1996), 1507–13; eng.
- [Schubert und Nelson, 2001] Schubert, R. und Nelson, M. T.; Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle; *Trends Pharmacol Sci*; 22(10):(2001), 505–12.
- [Schweda et al., 2005] Schweda, F., Segerer, F., Castrop, H., Schnermann, J. und Kurtz, A.; Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors; *Hypertension*; 46(4):(2005), 780–6; eng.
- [Sewer und Waterman, 2003] Sewer, M. B. und Waterman, M. R.; ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex; *Microsc Res Tech*; 61(3):(2003), 300–7; eng.
- [Shade et al., 1990] Shade, R. E., Bishop, V. S., Haywood, J. R. und Hamm, C. K.; Cardiovascular and neuroendocrine responses to baroreceptor denervation in baboons; Am J Physiol; 258(4 Pt 2):(1990), R930–8; eng.
- [Sheridan, 2000] Sheridan, D. J.; Regression of left ventricular hypertrophy: do antihypertensive classes differ?; *J Hypertens Suppl*; 18(3):(2000), S21–7; eng.
- [Shimkets et al., 1994] Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., Gill, J. R., Jr, Ulick, S., Milora, R. V. und Findling, J. W.; Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel; *Cell*; 79(3):(1994), 407–14.
- [Silbernagl und Lang, 2005] Silbernagl, S. und Lang, F.; Taschenatlas der Pathophysiologie; Band 2 (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart) (2005); deutsch.
- [Simpson und Tait, 1953] Simpson, S. A. und Tait, J. F.; The nature of the circulating hormones of the adrenal cortex in man; Arch Middx Hosp; 3(4):(1953), 209–18; eng.

- [Skrabal et al., 1984] Skrabal, F., Herholz, H., Neumayr, M., Hamberger, L., Ledochowski, M., Sporer, H., Hortnagl, H., Schwarz, S. und Schonitzer, D.; Salt sensitivity in humans is linked to enhanced sympathetic responsiveness and to enhanced proximal tubular reabsorption; *Hypertension*; 6(2 Pt 1):(1984), 152–8; eng.
- [Smith und Benos, 1991] Smith, P. R. und Benos, D. J.; Epithelial Na+ channels; Annu Rev Physiol; 53:(1991), 509–30; eng.
- [Soldner et al., 1996] Soldner, A., Spahn-Langguth, H. und Mutschler, E.; The reninangiotensin-aldosterone system: focus on its distinct role in arterial hypertension and its various inhibitors as a therapeutic strategy to effectively lower blood pressure; *Pharmazie*; 51(11):(1996), 783–99; eng.
- [Sorimachi et al., 1990] Sorimachi, M., Yamagami, K. und Nishimura, S.; Tetraethylammonium stimulates adrenomedullary secretion by causing fluctuations in a cytosolic free Ca concentration; *Brain Res*; 507(2):(1990), 347–50; eng.
- [Soto et al., 2002] Soto, M. A., Gonzalez, C., Lissi, E., Vergara, C. und Latorre, R.; Ca(2+)activated K+ channel inhibition by reactive oxygen species; Am J Physiol Cell Physiol; 282(3):(2002), C461–71; eng.
- [Spat, 1988] Spat, A.; Stimulus-secretion coupling in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells; J Steroid Biochem; 29(4):(1988), 443–53; eng.
- [Spat et al., 1991] Spat, A., Enyedi, P., Hajnoczky, G. und Hunyady, L.; Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells; *Exp Physiol*; 76(6):(1991), 859–85; eng.
- [Staessen et al., 2003] Staessen, J. A., Wang, J., Bianchi, G. und Birkenhäger, W. H.; Essential hypertension; *Lancet*; 361(9369):(2003), 1629–41; doi:10.1016/S0140-6736(03)13302-8.
- [Standen, 2000] Standen, N.; Tuning channels for blood pressure; *Nature*; 407(6806):(2000), 845, 847–8; eng.
- [Staruschenko et al., 2005] Staruschenko, A., Adams, E., Booth, R. E. und Stockand, J. D.; Epithelial Na+ channel subunit stoichiometry; *Biophys J*; 88(6):(2005), 3966–75; doi: 10.1529/biophysj.104.056804.
- [Staub et al., 1996] Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J. und Rotin, D.; WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na+ channel deleted in Liddle's syndrome; *EMBO J*; 15(10):(1996), 2371–80; eng.

- [Staub et al., 1997] Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. und Rotin, D.; Regulation of stability and function of the epithelial Na+ channel (ENaC) by ubiquitination; *EMBO J*; 16(21):(1997), 6325–36; eng.
- [Tamura et al., 1996] Tamura, H., Schild, L., Enomoto, N., Matsui, N., Marumo, F. und Rossier, B. C.; Liddle disease caused by a missense mutation of beta subunit of the epithelial sodium channel gene; *J Clin Invest*; 97(7):(1996), 1780–4; eng.
- [Taniguchi et al., 1993] Taniguchi, J., Furukawa, K. I. und Shigekawa, M.; Maxi K+ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells; *Pflugers Arch*; 423(3-4):(1993), 167–72; eng.
- [Taugner et al., 1984] Taugner, R., Buhrle, C. P., Hackenthal, E., Mannek, E. und Nobiling, R.; Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms; *Contrib Nephrol*; 43:(1984), 76–101; eng.
- [Taugner und Ganten, 1982] Taugner, R. und Ganten, D.; The localization of converting enzyme in kidney vessels of the rat; *Histochemistry*; 75(2):(1982), 191–201; eng.
- [Thompson, 1977] Thompson, S. H.; Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones; J Physiol; 265(2):(1977), 465–88.
- [Tian et al., 1997] Tian, B., Meng, Q. C., Chen, Y. F., Krege, J. H., Smithies, O. und Oparil, S.; Blood pressures and cardiovascular homeostasis in mice having reduced or absent angiotensin-converting enzyme gene function; *Hypertension*; 30(1 Pt 1):(1997), 128–33.
- [Tian et al., 2001] Tian, L., Duncan, R. R., Hammond, M. S., Coghill, L. S., Wen, H., Rusinova, R., Clark, A. G., Levitan, I. B. und Shipston, M. J.; Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation; *J Biol Chem*; 276(11):(2001), 7717–20; doi:10.1074/jbc.C000741200.
- [Tian et al., 1998] Tian, L., Knaus, H. G. und Shipston, M. J.; Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase; J Biol Chem; 273(22):(1998), 13531–6.
- [Timberlake et al., 2001] Timberlake, D. S., O'Connor, D. T. und Parmer, R. J.; Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies; *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 10(1):(2001), 71–9.
- [Timmers et al., 2003] Timmers, H. J. L. M., Wieling, W., Karemaker, J. M. und Lenders, J. W. M.; Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans; *J Physiol*; 553(Pt 1):(2003), 3–11; doi:10.1113/jphysiol.2003.052415.

- [Toro et al., 1990] Toro, L., Amador, M. und Stefani, E.; ANG II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers; Am J Physiol; 258(3 Pt 2):(1990), H912–5.
- [Toro et al., 1998] Toro, L., Wallner, M., Meera, P. und Tanaka, Y.; Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily; News Physiol Sci; 13:(1998), 112–117.
- [Trautmann und Marty, 1984] Trautmann, A. und Marty, A.; Activation of Ca-dependent K channels by carbamoylcholine in rat lacrimal glands; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81(2):(1984), 611–5.
- [Tseng-Crank et al., 1994] Tseng-Crank, J., Foster, C. D., Krause, J. D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T. J. und Reinhart, P. H.; Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K+ channel isoforms from human brain; *Neuron*; 13(6):(1994), 1315–30.
- [Tseng-Crank et al., 1996] Tseng-Crank, J., Godinot, N., Johansen, T. E., Ahring, P. K., Strøbaek, D., Mertz, R., Foster, C. D., Olesen, S. P. und Reinhart, P. H.; Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K+ channel beta-subunit from human brain; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(17):(1996), 9200–5.
- [Vallet et al., 1998] Vallet, V., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C.; Epithelial sodium channel regulatory proteins identified by functional expression cloning; *Kidney Int Suppl*; 67:(1998), S109–14.
- [Valverde et al., 1999] Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C. und Latorre, R.; Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit; *Science*; 285(5435):(1999), 1929–31.
- [Van Vliet et al., 2000] Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S. und Montani, J. P.; Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure; J Pharmacol Toxicol Methods; 44(2):(2000), 361–73.
- [Van Vliet et al., 2003] Van Vliet, B. N., Chafe, L. L. und Montani, J.-P.; Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice; J Physiol; 549(Pt 1):(2003), 313–25; doi:10.1113/jphysiol.2003.041897.
- [Verlander et al., 2003] Verlander, J. W., Hassell, K. A., Royaux, I. E., Glapion, D. M., Wang, M.-E., Everett, L. A., Green, E. D. und Wall, S. M.; Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension; *Hypertension*; 42(3):(2003), 356–62; doi: 10.1161/01.HYP.0000088321.67254.B7.
- [Verrey et al., 1997] Verrey, F., Spindler, B. und Mastroberardino, L.; Regulation of Na+ reabsorption in aldosterone target epithelia; *Kidney Blood Press Res*; 20(3):(1997), 148–50.
- [Verrey et al., 2003] Verrey, F., Summa, V., Heitzmann, D., Mordasini, D., Vandewalle, A., Féraille, E. und Zecevic, M.; Short-term aldosterone action on Na,K-ATPase surface expression: role of aldosterone-induced SGK1?; Ann N Y Acad Sci; 986:(2003), 554–61.
- [Vincent und Leahy, 1997] Vincent, I. C. und Leahy, R. A.; Real-time non-invasive measurement of heart rate in working dogs: a technique with potential applications in the objective assessment of welfare problems; Vet J; 153(2):(1997), 179–83.
- [Vogalis et al., 1996] Vogalis, F., Vincent, T., Qureshi, I., Schmalz, F., Ward, M. W., Sanders, K. M. und Horowitz, B.; Cloning and expression of the large-conductance Ca(2+)activated K+ channel from colonic smooth muscle; Am J Physiol; 271(4 Pt 1):(1996), G629–39.
- [Volk et al., 2000] Volk, K. A., Husted, R. F., Snyder, P. M. und Stokes, J. B.; Kinase regulation of hENaC mediated through a region in the COOH-terminal portion of the alpha-subunit; Am J Physiol Cell Physiol; 278(5):(2000), C1047–54.
- [Wagner et al., 1998] Wagner, C., Jensen, B. L., Krämer, B. K. und Kurtz, A.; Control of the renal renin system by local factors; *Kidney Int Suppl*; 67:(1998), S78–83.
- [Waldmann et al., 1995] Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. und Lazdunski, M.; Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na+ channel; J Biol Chem; 270(46):(1995), 27411–4.
- [Wallner et al., 1999] Wallner, M., Meera, P. und Toro, L.; Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca2+-activated K+ channels: a transmembrane beta-subunit homolog; Proc Natl Acad Sci U S A; 96(7):(1999), 4137–42.
- [Weber, 2001] Weber, K. T.; Cardioreparation in hypertensive heart disease; *Hypertension*; 38(3 Pt 2):(2001), 588–91.
- [Weiger et al., 2000] Weiger, T. M., Holmqvist, M. H., Levitan, I. B., Clark, F. T., Sprague, S., Huang, W. J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M. E., Glucksmann, M. A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P. S. und Curtis, R.; A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels; J Neurosci; 20(10):(2000), 3563–70.
- [Weinberger et al., 2001] Weinberger, M. H., Fineberg, N. S., Fineberg, S. E. und Weinberger, M.; Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans; *Hypertension*; 37(2 Part 2):(2001), 429–32.

- [Weinberger et al., 1994] Weinberger, M. H., Wagner, U. L. und Fineberg, N. S.; Salt sensitivity and the blood pressure response to verapamil; Am J Hypertens; 7(6):(1994), 515–9.
- [White, 1994] White, P. C.; Disorders of aldosterone biosynthesis and action; N Engl J Med; 331(4):(1994), 250–8; doi:10.1056/NEJM199407283310408.
- [Whitesall et al., 2004] Whitesall, S. E., Hoff, J. B., Vollmer, A. P. und D'Alecy, L. G.; Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods; Am J Physiol Heart Circ Physiol; 286(6):(2004), H2408–15; doi:10.1152/ajpheart.01089.2003.
- [Willibald Pschyrembel, 1998] Willibald Pschyrembel, O. D., Helmut Hildebrandt; Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (Walter de Gruyter, Berlin, New York); 258 Auflage (1998).
- [Wyatt und Mitchell, 1974] Wyatt, H. L. und Mitchell, J. H.; Influences of physical training on the heart of dogs; *Circ Res*; 35(6):(1974), 883–9.
- [Yagci et al., 1996] Yagci, A., Oertle, M., Seiler, H., Schmid, D., Campofranco, C. und Müller, J.; Potassium induces multiple steroidogenic enzymes in cultured rat zona glomerulosa cells; *Endocrinology*; 137(6):(1996), 2406–14.
- [Zanchetti, 1986] Zanchetti, A.; Platt versus Pickering: an episode in recent medical history. By J. D. Swales, editor. An essay review; *Med Hist*; 30(1):(1986), 94–6.
- [Zhou et al., 2001] Zhou, X. B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G. X., Ruth, P. und Korth, M.; A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase; J Biol Chem; 276(46):(2001), 43239–45; doi:10.1074/jbc.M104202200.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Ehmke danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit am Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie, UKE Hamburg zu promovieren, sowie für seine stets freundliche und professionelle Betreuung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. med. vet. H. Tönhardt für die Übernahme dieser Arbeit zur Vorlage beim Fachbereich der Freien Universität Berlin und für ihre herzliche und geduldige Hilfe und Beratung bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Frau Dr. med. vet. Mareike Budack möchte ich ganz herzlich für die umfassende praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit und für ihren jederzeit hilfsbereiten, verständnisvollen und freundschaftlichen Beistand danken.

Herrn Dr. rer. nat. M. Blank und Frau M. Hölzel danke ich herzlich für die Unterstützung bei anfallenden Analysen im Labor.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Eppendorf möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken. Besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Peter Bassalay für seine stete Hilfsbereitschaft in allen labortechnischen Belangen. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Alexander Schwoerer für die Hilfe bei allen Fragen die Auswertung der Daten betreffend. Frau Jördis Lanfermann danke ich für die immer freundschaftliche Zusammenarbeit im Mauslabor.

Weiterhin danke ich auch allen Korrekturlesern, vor allem Frau Dr. med. Anja Takla.

Meinem leider verstorbenen Schwiegervater, Dr. med. H.-U. Hirsch-Hoffmann, danke ich für die liebevolle Betreuung meines Sohnes, damit mir Zeit zum Schreiben der Dissertation blieb.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, Dr. med. Wolfram und Bärbel Dohse, für ihren liebevollen Rückhalt und ihre unermüdliche Unterstützung in allen beruflichen und privaten Belangen. Ohne sie wäre mir weder mein Studium, noch meine Promotion möglich gewesen.

## ${\bf Selbstst} \ddot{a}n digkeitserk l\ddot{a}rung$

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Bremen, den 09.03.2011

Birgit Hirsch-Hoffmann