

Aus der Fachrichtung 2.4, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

TRPM4- und TRPC1/TRPC4-vermittelte Mechanismen der Blutdruckregulation in Mäusen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: **Ilka Mathar**

geboren am: **20.07.1981 in Erkelenz**

Meinen lieben Eltern

und mir

zur Freude

Zusammenfassung

Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit war es, die Bedeutung von TRPM4- und TRPC1/C4-Kanälen für die Regulation des Blutdrucks und der Herz-/Kreislauf-Regulation, die Glukosehomöostase und die Entstehung von Allergien zu identifizieren.

TRPM4, bildet Calcium-aktivierte Kationenkanäle, die unter physiologischen Bedingungen Natrium in die Zelle leiten und die Zellmembran depolarisieren. Nach Stimulation des Fcε-Rezeptors in Mastzellen und nachfolgender Aktivierung des Phospholipase C Signalweges wird der Calcium-Einstrom durch CRAC (calcium release activated channels) Kanäle entscheidend durch TRPM4 Kanäle vermindert. TRPM4-defiziente Mastzellen setzen deshalb nach Fcε-Rezeptor Stimulation vermehrt Histamin, Leukotriene und TNFα frei. Um zu zeigen, dass diese Befunde, die alle in Knochenmarksmastzellen erhoben wurden, auch in reifen Bindegewebsmastzellen der Haut von Bedeutung sind, habe ich die Entstehung von anaphylaktischen Reaktionen untersucht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inaktivierung von TRPM4 zu einer erhöhten mikrovaskulären Gefäßpermeabilität führt, die auf einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren inklusive Histamin und Serotonin aus Bindegewebsmastzellen beruht. Im Gegensatz zu dieser allergischen Reaktion vom Soforttyp, konnte ich in Anaphylaxieexperimenten, in denen eine Mastzell-vermittelte Entzündungsreaktion (Spät-Phase-Reaktion) mit Aktivierung der Gewebeeinfiltration von Lymphozyten untersucht wurde, keinen Unterschied in TRPM4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren feststellen.

TRPM4 wird neben Mastzellen auch im Herz, Darm, Endothelzellen, Niere, Pankreas und Plazenta exprimiert. In glatten Muskelzellen der Hirnarterie soll TRPM4 als Mechanosensor den myogenen Tonus von Gefäßen regulieren. Durch telemetrische Blutdruckmessungen an TRPM4-defizienten Mäusen habe ich festgestellt, dass diese Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren unter Ruhebedingungen einen signifikant erhöhten Blutdruck aufweisen. Der mittlere arterielle Blutdruck ist bei TRPM4^{-/-} Tieren unter Ruhebedingungen nach Rekonvaleszenz vom operativen Eingriff im Vergleich zu Wildtyp-Tieren um 11 mmHg erhöht. Dieser Unterschied ist während des gesamten Tagesverlaufes vorhanden, wobei der größte Unterschied zwischen den beiden Genotypen in den diastolischen Blutdruckwerten besteht, vor allem bei geringer körperlicher Aktivität. TRPM4^{-/-} Mäuse weisen im Alter von 6 Monaten eine mäßiggradige Myokardhypertrophie ohne Zeichen von Herzinsuffizienz auf, die durch den dauerhaft erhöhten Blutdruck erklärt werden könnte. Untersuchungen zur Blutdruckregulation *in*

vivo durch intraperitoneale Injektion von L-NAME oder verschiedener Dosen Phenylephrin ergaben keinen Unterschied im mittleren arteriellen Blutdruck und der Herzfrequenz. Kontraktilitätsmessungen von Aorten-Segmenten im Organbad zeigen, dass die Phenylephrin-induzierte Kontraktion und die Endothel-abhängige Relaxation unverändert ist. Untersuchungen der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen im Gefäßbett der Hinterpfoten von Mäusen haben gezeigt, dass die Änderungen der Gefäßkontraktilität nach Stimulation mit Phenylephrin, Epinephrin bzw. Isoproterenol sowie die myogene kontraktile Antwort nach stufenweiser Erhöhung des intravasalen Perfusionsdrucks der peripheren Arterien der TRPM4-defizienten Mäuse nicht verändert ist, so dass die Hypertonie in TRPM4^{-/-} Mäusen nicht durch Veränderungen der Gefäßkontraktilität erklärt werden kann. Weiterhin sind die renale Elektrolyt-Ausscheidung sowie die Plasmakonzentration aller relevanten Elektrolyte unverändert. Die Plasma Aldosteronkonzentration und die renale Reninsekretion sind ebenfalls nicht verändert. Nach Injektion von Hexamethonium, einem Antagonisten am nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor an vegetativen Ganglien, kommt es bei TRPM4^{-/-} Mäusen zu einer stärkeren Reduktion des Blutdrucks, so dass der Blutdruckunterschied zwischen den beiden Genotypen aufgehoben ist. Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich nach Applikation des α_1 -Adrenozeptorblockers Prazosin. TRPM4 ist in Chromaffinzellen der Nebenniere exprimiert. Die signifikante Erhöhung der Spiegel von Adrenalin im Plasma sowie von Metanephrin und Vanillinmandelsäure im Urin TRPM4-defizienter Tiere deuten darauf hin, dass die Hypertonie in TRPM4^{-/-} Mäusen auf einer gesteigerten Catecholaminfreisetzung aus Neuronen des sympathischen Nervensystems beruht.

TRPC1 und TRPC4 bilden, wie andere TRPC Proteine, Untereinheiten von Agonist-aktivierten Kationenkanälen. Die Expression der TRPC1-, TRPC4-, TRPC5- und TRPC6-mRNA überlappt z.B. in glatten Muskelzellen von Gefäßen, so dass TRPC-Proteine in diesen Zelltypen möglicherweise als heterooligomere Kanalkomplexe vorliegen. TRPC Kanäle leiten neben Na⁺ auch Ca²⁺ und in glatten Muskelzellen von Gefäßen könnte der Ca²⁺-Einstrom wesentlich zur Kontraktion beitragen. Ich habe deshalb Untersuchungen zur Regulation der Gefäßkontraktilität und der Blutdruckregulation in TRPC1^{-/-} und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen durchgeführt. Telemetrische Messungen ergaben einen erniedrigten mittleren arteriellen Blutdruck in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen sowohl während der Erholung vom operativen Eingriff als auch nach Rekonvaleszenz. TRPC1^{-/-} Mäuse zeigen dagegen keine Blutdruckveränderungen und es war bekannt, dass bei TRPC4^{-/-} Mäusen der mittlere arterielle Blutdruck nur an den ersten vier postoperativen Tagen erniedrigt ist. Offensichtlich kann das Fehlen einer Untereinheit kompensiert werden. Die Hypotonie in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen geht mit einer signifikant

erhöhten Herzfrequenz und einer geringeren körperlichen Aktivität einher. Unabhängig davon ist auch die motorische Aktivität der TRPC1/C4-defizienten Mäuse im „open field“ Test, in dem das Erkundungsverhalten untersucht werden kann, vermindert. Zusätzlich ergaben Kontraktilitätsmessungen von Aortensegmenten eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve für Phenylephrin. Die intraperitoneale und intravenöse Applikation von steigenden Phenylephrin-Dosen zeigte in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren eine verminderte Reflexbradykardie als Folge des durch α_1 -adrenozeptor-Stimulation induzierten Blutdruck-Anstiegs. Insgesamt zeigen meine Untersuchungen, dass Mäuse nur bei gleichzeitiger Inaktivierung beider TRPC-Proteine, TRPC1 und TRPC4, eine Hypotonie entwickeln, die durch eine geringere motorische Aktivität, eine verminderte Baroreflex-Sensitivität oder eine verminderte Gefäßkontraktilität erklärt werden könnte. Unterschiede in der kardialen Kontraktilität können bislang nicht ausgeschlossen werden.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRPM3-Kanäle, durch die divalente Kationen permeieren, schnell und reversibel durch extrazelluläres Pregnenolon-Sulfat, einem neuroaktiven Steroid, aktiviert werden. Pregnenolon-Sulfat aktiviert TRPM3-ähnliche Kanäle in Insulin-produzierenden beta-Zellen des Pankreas, was zu einem rapiden Calcium-Einstrom und verstärkter Insulin-Freisetzung führt. Zur Untersuchung der Bedeutung von TRPM3 Kanälen für die Glukosehomöostase habe ich Glukosetoleranztests an TRPM3-defizienten Mäusen durchgeführt. Weder nach oraler noch nach intraperitonealer Glukose-Applikation konnten Unterschiede im Zeitverlauf des Blutglukosespiegels festgestellt werden. Außerdem wird der Blutglukosespiegel auch nach Applikation maximaler Pregnenolon-Sulfat-Dosierung in Glukosetoleranztests an Wildtypmäusen nicht beeinflusst. Auch in TRPC1-, TRPM4-, TRPM5- und TRPM4/M5-doppeldefizienten Mäusen konnte ich in Glukosetoleranztests keinen Unterschied im Verlauf der Plasma-Glukosekonzentration feststellen, obwohl TRPC1-, TRPM4- und TRPM5-Proteine in beta-Zellen des Pankreas detektiert werden können.

Abstract

The aim of this study was to identify the importance of TRPM4- and TRPC1/C4-channels for the regulation of blood pressure and the cardiovascular system, of glucose homeostasis and for the development of allergic reactions.

One member of the TRPM family, TRPM4, forms calcium-activated cation channels, which conduct sodium and depolarize the cell membrane under physiological conditions. After stimulation of the Fcε-receptor in mast cells and activation of the phospholipase C pathway the calcium entry through CRAC channels is critically limited by TRPM4. TRPM4-deficient mast cells release more histamine, leukotriene and TNFα upon FcεRI-stimulation. To test whether the alterations in FcεRI mediated activation of TRPM4^{-/-} mast cells are equally relevant in connective tissue mast cells in vivo, we did two types of experiments with passive cutaneous anaphylaxis, addressing both immediate- and late-phase anaphylactic responses. In response to antigen stimulation, TRPM4^{-/-} mice showed considerably more fluid extravasation in tissue than wildtype mice. These data indicate that vessel permeability induced by release of inflammatory mediators from mast cells such as histamine is increased in the skin of TRPM4^{-/-} mice. In contrast to the immediate-type allergic reaction, the late-phase reaction to an allergic stimulus was not altered in TRPM4^{-/-} mice.

In addition to mast cells TRPM4 is expressed in heart, intestine, endothelial cells, kidney, pancreas and placenta and also in smooth muscle cells, where TRPM4 was supposed to act as a mechanosensor regulating myogenic tone. Telemetric blood pressure measurements reveal that mean arterial blood pressure averaged from day 9 to 13 after implantation of the transmitter is elevated in TRPM4^{-/-} mice by 11 mmHg under basal conditions compared to wildtype controls. Blood pressure elevation is observed during the complete circadian period and most notable under resting conditions. At an age of more than 6 month TRPM4^{-/-} mice exhibit a moderate hypertrophy of the heart which could be due to hypertension. There are no differences in blood pressure response to application of phenylephrine and L-NAME. Since TRPM4 is expressed in endothelial and smooth muscle cells I performed contractility measurements of aortic rings. There were no differences in phenylephrine induced contraction or endothelial-dependent relaxation. Contractility measurements of peripheral resistance vessels of the hindlimb vesselbed from wildtype and TRPM4^{-/-} mice showed that changes in vascular contractility induced by phenylephrine, epinephrine or isoproterenol as well as the myogenic response induced by intraarterial pressure steps is not different in TRPM4^{-/-} mice, indicating that elevated blood pressure cannot be explained by alterations in vas-

cular contractility. Furthermore, renal electrolyte excretion, plasma sodium, potassium and aldosterone concentrations as well as renal renin secretion rate are unchanged. By contrast inhibition of ganglionic transmission with hexamethonium abolishes the blood pressure difference between both genotypes similarly like application of the α_1 -adrenergic antagonist prazosin, and plasma epinephrine concentration as well as urinary metanephrine and vanillic mandelic acid excretion are elevated in TRPM4^{-/-} mice indicating that hypertension in TRPM4^{-/-} mice depends on an elevated release of catecholamines from sympathetic neurons.

TRPC1 and TRPC4 are, like the other TRPC proteins, subunits of agonist-activated cation channels. The expression of TRPC1, C4, C5 and C6 mRNA overlaps in different cell types, including smooth muscle cells, and therefore these proteins are supposed to build heteromultimeric channel complexes. TRPC channels conduct sodium and calcium ions. In smooth muscle cells the calcium-influx could contribute to vessel contraction. For that reason I performed experiments to analyse the regulation of vessel contractility and blood pressure in TRPC1^{-/-} and TRPC1/C4^{(-/-)2} mice. Telemetric measurements revealed a decreased mean arterial pressure in and TRPC1/C4^{(-/-)2} mice during recovery from surgery as well as under basal conditions. TRPC1^{-/-} mice do not show any changes in basal blood pressure and in TRPC4^{-/-} mice mean arterial pressure is decreased only during the first 4 days after implantation of the transmitters. Obviously the lack of one of these TRPC-proteins can be compensated. Hypotension in TRPC1/C4^{(-/-)2} mice is accompanied by a significantly increased heart rate and a decreased physical activity, which could be independently confirmed in an open field test. Contractility measurements of aortic rings showed a right shift in phenylephrine-induced contraction. Intraperitoneal and intravenous injections of phenylephrine resulted in a decreased reflex bradycardia following blood pressure increase. These results show that the deletion of both TRPC proteins, TRPC1 and TRPC4, causes hypotension in mice which may be explained by a decreased physical activity, baroreflex-sensitivity and vessel contractility. Alterations in cardiac contractility cannot be ruled out until now.

Recently, we could show that TRPM3, a divalent-permeable cation channel, is rapidly and reversibly activated by extracellular pregnenolone sulphate, a neuroactive steroid. Pregnenolone sulphate activates TRPM3-like channels in insulin-producing beta cells, which leads to a rapid calcium influx and enhanced insulin secretion from pancreatic islets. To test the importance of TRPM3 in glucose homeostasis I performed glucose tolerance tests with TRPM3^{-/-} and control mice. After application of either intraperitoneal or oral glucose challenges there were no changes in blood glucose between both

genotypes. In addition, blood glucose levels are also not affected by maximal doses of pregnenolone sulphate in glucose tolerance tests performed in wildtype mice. Also in TRPC1-, TRPM4-, TRPM5- and TRPM4/M5-deficient mice I could not detect any differences in changes of blood glucose after glucose challenge, although these proteins are also found in pancreatic beta-cells.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	8
Inhaltsverzeichnis	11
Abbildungsverzeichnis.....	14
Tabellenverzeichnis	15
Abkürzungsverzeichnis.....	16
1 Allgemeine Einleitung	18
1.1 Blutdruckregulation.....	18
1.1.1 Mechanismen der kurzfristigen Blutdruckregulation.....	18
1.1.2 Mechanismen der mittelfristigen Blutdruckregulation.....	19
1.1.3 Mechanismen der langfristigen Blutdruckregulation.....	19
1.1.4 Störungen der Blutdruckregulation	20
1.2 Methoden der Blutdruckmessung an Mäusen	25
1.2.1 Indirekte Methoden	25
1.2.2 Direkte Methoden.....	25
1.3 Die TRP- Kanalfamilie	28
1.3.1 Grundlagen	28
1.3.2 Physiologische Bedeutung von TRP-Kanälen.....	30
1.3.3 Bekannte Funktionen von TRP-Kanälen bei der Regulation des Gefäßtonus und des systemischen Blutdrucks	32
1.4 Zielsetzung der Arbeit	39
2 Material und Methoden.....	40
2.1 Reagenzien	40
2.2 Puffer und Lösungen	41
2.3 In der Studie verwendete Mauslinien	43
2.3.1 Genotypisierung.....	45
2.4 Inhalationsnarkose	47
2.4.1 Aufbau der Anästhesieeinrichtung.....	47
2.4.2 Durchführung der Narkose	47
2.5 Telemetrische Blutdruckmessung	48
2.5.1 Versuchsaufbau.....	48
2.5.2 Implantation des Blutdrucksensors.....	51
2.5.3 Datenaufzeichnung und Datenanalyse.....	56
2.5.4 Intraperitoneale Applikation von Pharmaka.....	57
2.5.5 Intravenöse Applikation von Pharmaka	57
2.6 Blutentnahme an der Maus und Plasmagewinnung	59

2.7	Bestimmung der Herzhypertrophie, des Hämatokrits und des Plasmavolumens	60
2.8	Kontraktilitätsmessungen an isolierten Aortenringen in einer Organbadapparatur	61
2.8.1	Versuchsaufbau	61
2.8.2	Isolation von Gefäßsegmenten der Aorta thoracalis	61
2.8.3	Versuchsablauf und Auswertung der Kontraktilitätsmessungen	62
2.9	Kontraktilitätsmessungen von Widerstandsgefäßen im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfoten.....	64
2.9.1	Versuchsaufbau	64
2.9.2	Präparation	65
2.9.3	Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes	66
2.10	Isoliert perfundierte Mausniere	70
2.11	Untersuchungen zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	70
2.11.1	Plasma-Renin-Konzentration und renale Renin-mRNA	70
2.11.2	Bestimmung von Aldosteron im Plasma	71
2.12	Bestimmung von Ionenkonzentrationen und Catecholaminabbauprodukten in Plasma bzw. Urin	72
2.13	Bestimmung von Catecholaminen in Mausplasma	73
2.14	Histologie der Nebennieren	73
2.14.1	Intrakardiale Perfusion und Paraffineinbettung	73
2.14.2	Erstellung von Gewebeschnitten und HE-Färbung	74
2.15	Analyse von motorischer Aktivität und Exploration in Offenfeld (open field) Versuch	75
3	Ergebnisse.....	76
3.1	Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse: eine integrative Analyse beteiligter Organe und deren Funktionen.....	76
3.1.1	TRPM4-defiziente Mäuse sind hypertensiv	76
3.1.2	Flüssigkeitshaushalt und RAAS in TRPM4-defizienten Mäusen	81
3.1.3	Regulation der Gefäßkontraktilität in TRPM4-defizienten Mäusen	84
3.1.4	Neurogene Mechanismen sind an der Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse beteiligt.....	95
3.1.5	Histologie der Nebennieren	97
3.2	Hypotonie TRPC1/C4-defizienter Mäuse	99
3.2.1	TRPC1/C4-defiziente Mäusen zeigen eine Hypotonie und verringerte körperliche Aktivität	99
3.2.2	α 1-Adrenozeptor vermittelte Gefäßkontraktilität und Blutdruckregulation	104
3.2.3	Blutdruck- und Herzfrequenzregulation nach Pharmakaapplikation	107
4	Diskussion.....	110
4.1	Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse: eine integrative Analyse beteiligter Organe und deren Funktionen.....	111
4.2	Hypotonie TRPC1/C4-defizienter Mäuse	118
	Anhang A: Anaphylaxie in TRPM4-defizienten Mäusen	124
A.1	Einleitung.....	124
A.1.1	Pathophysiologie der Allergie vom Typ-1	124

A.1.2 Mastzellen und Anaphylaxie	125
A.2 Methoden.....	128
A.2.1 Perkutane Anaphylaxie – Sofortreaktion.....	128
A.2.2 Perkutane Anaphylaxie – Spätphase-Reaktion	129
A.3 Ergebnisse und Diskussion	130
Anhang B: Glucosetoleranztest in TRP-defizienten Mäusen.....	132
B.1 Einleitung.....	132
B.1.1 Physiologie des Glukosestoffwechsels	132
B.1.2 Regulation der Insulinsekretion.....	133
B.1.3 Untersuchung der Glukosehomöostase mittels Glucosetoleranztest	134
B.1.4 Rolle von TRP-Kanälen bei der Glukosehomöostase.....	135
B.2 Methoden.....	137
B.2.1 Intraperitonealer bzw. oraler Glucosetoleranztest	137
B.2.2 Glucosetoleranztest in Kombination mit Glibenclamid oder Pregnenolon-Sulfat	137
B.2.3 Verwendete Mauslinien	138
B.3 Ergebnisse und Diskussion	140
Literaturverzeichnis	150
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
LEBENS LAUF.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der TRP-Proteinstruktur.....	28
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanal Superfamilie.....	29
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der verwendeten Narkoseeinheit.....	47
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Maus-Blutdruck-Transmitters.....	49
Abbildung 5: Photographien zur Darstellung des mikrochirurgischen Eingriffes.....	52
Abbildung 6: Photographien zur Darstellung des mikrochirurgischen Eingriffes.....	53
Abbildung 7: Subkutane Platzierung des Transmitter-Gehäuses.....	54
Abbildung 8: Submandibuläre Blutentnahme.....	59
Abbildung 9: Photographien von der Präparation der Aortenringe und deren Fixierung im Organbad.....	62
Abbildung 10: Protokoll zur Messung der Kontraktilität von Aortenringen im Organbad.....	63
Abbildung 11: Photographien und schematische Darstellung des Perfusionssystems zur Untersuchung der Kontraktilität des Hinterpfoten-Gefäßbettes.....	64
Abbildung 12: Photographien der Präparation zur Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes.....	66
Abbildung 13: Originalmessung des Gefäßwiderstandes und des Perfusionsflusses von einer Wildtyp-Maus nach Applikation steigender Phenylephrin-Dosierungen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve im Gefäßbett der isoliert perfundierten Hinterpfoten.....	68
Abbildung 14: Untersuchung des myogenen Gefäßtonus.....	69
Abbildung 15: Erhöhter Blutdruck in TRPM4-defizienten Mäusen.....	77
Abbildung 16: Zirkadiane Rhythmik von Blutdruck, Herzfrequenz und körperlicher Aktivität.....	78
Abbildung 17: Verlauf der Blutdruckparameter von TRPM4-defizienten Mäusen über 24h.....	79
Abbildung 18: Blutdruckamplitude und Hypertrophie in TRPM4-defizienten Mäusen.....	80
Abbildung 19: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in TRPM4 ^{-/-} Mäusen.....	82
Abbildung 20: Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt.....	82
Abbildung 21: Hämatokrit und Plasmavolumen.....	83
Abbildung 22: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach Phenylephrin-Applikation.....	84
Abbildung 23: Phenylephrin-induzierte Gefäßkontraktilität.....	86
Abbildung 24: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach Norepinephrin-Applikation.....	87
Abbildung 25: Kontraktilität von Widerstandsgefäßen nach Epinephrin-Applikation.....	88
Abbildung 26: Regulation von Herzfrequenz bzw. Gefäßkontraktilität nach Isoproterenol-Applikation.....	89
Abbildung 27: Endothel-abhängige Vasorelaxation in TRPM4-defizienten Mäusen.....	91
Abbildung 28: Analyse des Druck-induzierten Gefäßwiderstandes von TRPM4-defizienten Mäusen.....	93
Abbildung 29: [Pro ¹¹ , DA1a ¹²] Ang I -induzierte Gefäßantwort in TRPM4-defizienten Mäusen.....	94
Abbildung 30: Neurogene Mechanismen sind an der Hypertonie der TRPM4-defizienten Mäuse beteiligt.....	96
Abbildung 31: Histologischer Überblick über eine Nebenniere einer Wildtyp Maus.....	97
Abbildung 32: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte der Nebenniere.....	98
Abbildung 33: Postoperativer Blutdruck- und Herzfrequenzverlauf in TRPC1/C4 ^{(-/-)2} Mäusen.....	100
Abbildung 34: Beziehung zwischen Blutdruck und Herzfrequenz in TRPC1/C4 ^{(-/-)2} Mäusen.....	101

Abbildung 35: Zirkadiane Rhythmik von TRPC1/C4 ^{(-/-)2} Mäusen.	102
Abbildung 36: Körperliche Aktivität von TRPC1/C4 ^{(-/-)2} Mäusen..	103
Abbildung 37: Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz nach intraperitonealer Injektion des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin.....	105
Abbildung 38: Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz nach intravenöser Injektion von Phenylephrin.....	106
Abbildung 39: Phenylephrin-induzierte Gefäßkontraktilität in TRPC1/C4 ^{(-/-)2} Mäusen.	107
Abbildung 40: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz nach intraperitonealer Injektion von Dexmedetomidin, Hexamethonium und L-NAME.....	109
Abbildung 41: Schema zur Analyse der Frühphasereaktion im Rahmen einer perkutanen Anaphylaxie.....	129
Abbildung 42: Schema zur Analyse der Spätphasereaktion im Rahmen einer perkutanen Anaphylaxie.....	129
Abbildung 43: Perkutane Anaphylaxie in Wildtyp- (129SvJ) und TRPM4 ^{-/-} Mäusen.....	131
Abbildung 44: Regulation von Insulinsekretion in beta-Zellen.....	133
Abbildung 45: Glukosetoleranz an TRPM4-defizienten Mäusen.....	140
Abbildung 46: Glukosetoleranz in TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mäusen..	141
Abbildung 47: Effekt von Glibenclamid auf die Glukosetoleranz in verschiedenen Wildtyp- Mausstämmen.....	142
Abbildung 48: Effekt von Glibenclamid auf die Glukosetoleranz in TRPM4-, TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mäusen.	144
Abbildung 49: Glukosetoleranz in TRPM3-defizienten Mäusen.	145
Abbildung 50: Glukosetoleranz in β -Zell-spezifischen TRPM3 ^{+/+} und TRPM3 ^{-/-} Mäusen.	146
Abbildung 51: Effekt von Pregnenolon-Sulfat und Glibenclamid in C57Bl6 Mäusen.	148
Abbildung 52: Glukosetoleranz in TRPC3/C6 ^{(-/-)2} Mäusen..	149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TBE-Puffer (1x).....	41
Tabelle 2: PBS (1x).....	42
Tabelle 3: modifizierte Krebs-Henseleith-Pufferlösung	42
Tabelle 4: Hoch-Kalium Krebs-Heinseleith-Pufferlösung (40mM).....	42
Tabelle 5: Calcium-freie Krebs-Henseleith-Pufferlösung	42
Tabelle 6: Tribromethanol (Avertin) Stocklösung	43
Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Mauslinien	44
Tabelle 8: Primer, Amplifikatlänge und PCR-Bedingungen.....	45
Tabelle 9: Intraperitoneal applizierte Pharmaka.....	57

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes-Enzym
ACh	Acetylcholin
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAN	calcium activated nonselective
CRAC	calcium release activated
DAG	Diacylglycerol
DBP	diastolischer Blutdruck, diastolic blood pressure
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOCA	Deoxycorticosteron-Acetat
DSI	Data Sciences International (Hersteller des Telemetrischen Systems)
eNOS	endotheliale Nitroxidsynthase
et al.	et alii (und weitere)
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KO	knock out (für ein bestimmtes Gen defiziente Tiere)
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
MAP	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PE	Phenylephrin
RAAS	Renin-Angiotnsin-Aldosteron-System
s.c.	subkutan
SBP	systolischer Blutdruck, systolic blood pressure
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TPR	totaler peripherer Widerstand
TRP	Transient Receptor Potential
V.	Vene
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Die chemischen Elemente werden gemäß dem internationalen Periodensystem abgekürzt.

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Blutdruckregulation

Der Blutdruck ist definiert als der in den Gefäßen des Körper- und Lungenkreislaufs bestehende Druck, der die treibende hämodynamische Kraft für die Blutzirkulation bildet. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), welcher auch in der vorliegenden Arbeit bei den Blutdruckmessungen ermittelt wurde, stellt den im arteriellen System auf Herzhöhe gegen den Atmosphärendruck ermittelten Druck dar. An der Regulation des Blutdrucks sind vor allem die Gefäße, das Herz, das autonome Nervensystem, die Niere und die Nebenniere beteiligt. Über das Zusammenspiel dieser Organe werden das Herzzeitvolumen (HZV) und der totale periphere Widerstand (TPR) geregelt. Als Produkt dieser beiden Größen ist der mittlere arterielle Blutdruck definiert: $MAP = HZV \times TPR$.

1.1.1 Mechanismen der kurzfristigen Blutdruckregulation

Kurzfristige Regulationsmechanismen sind dadurch charakterisiert, dass sie auf veränderte Kreislaufanforderungen innerhalb weniger Sekunden reagieren, jedoch bei dauernder Beanspruchung innerhalb von Tagen ihre Wirksamkeit teilweise oder vollständig verlieren (Thews, 1999). Diese Regulation geschieht im bulbären Kreislaufzentrum der Medulla oblongata sowie in übergeordneten hypothalamischen und kortikalen Zentren. Diese Zentren erhalten Informationen zur aktuellen Blutdruckhöhe über die Barorezeptoren im Karotissinus, Aortenbogen und den Herzhöhlen. Die kreislaufregulierenden Neurone beantworten eine arterielle Drucksenkung mit einer Aktivierung des Sympathikus und einer Hemmung des Parasympathikus. Hierdurch wird am Herzen eine positive inotrope und chronotrope Wirkung hervorgerufen und der periphere Widerstand durch Vasokonstriktion erhöht. Außerdem werden aus dem sympathisch innervierten Nebennierenmark vermehrt Katecholamine ausgeschüttet. Norepinephrin (Noradrenalin) wirkt hauptsächlich auf α -adrenerge Rezeptoren und bewirkt so eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Epinephrin (Adrenalin) wirkt in geringen Konzentrationen auf β -adrenerge Rezeptoren und in höheren Konzentrationen bewirkt es über die Bindung an α -adrenerge Rezeptoren eine Kontraktion. Einer arteriellen Druckerhöhung kann durch Hemmung des Sympathikus und Aktivierung des Parasympathikus entgegengewirkt werden.

1.1.2 Mechanismen der mittelfristigen Blutdruckregulation

Mittelfristig greift vor allem das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) in die Blutdruckregulation ein. Ein Blutdruckabfall oder eine renale Minderperfusion führen zu einer Freisetzung des Hormons Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin wandelt das in der Leber synthetisierte Angiotensinogen in Angiotensin I um, das durch das im Blut befindliche Converting-Enzym in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II wirkt direkt blutdrucksteigernd, indem es über eine Bindung an Angiotensin-Rezeptoren der Widerstandsgefäße eine Vasokonstriktion bewirkt. Außerdem fördert es die Freisetzung von antidiuretischem Hormon und steigert das Durstgefühl. Eine Blutdrucksteigerung führt zu einer Zunahme des effektiven Filtrationsdrucks, wodurch das intravasale Blutvolumen und sekundär auch der arterielle Blutdruck abnehmen (Thews, 1999).

1.1.3 Mechanismen der langfristigen Blutdruckregulation

Die langfristige Regulation des arteriellen Blutdrucks erfolgt vor allem durch die Anpassung des Blutvolumens an die jeweilige Kreislaufsituation (Thews, 1999). Ein wichtiges Stellglied dieses Regelsystems ist die Niere. Dort wird über die renale Ausscheidung bzw. Retention von Natrium und Wasser das Extrazellulärvolumen beeinflusst. Eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks führt zu einer verstärkten renalen Flüssigkeitsausscheidung. Hierdurch nehmen das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen und damit auch das Blutvolumen ab. Aufgrund des verminderten venösen Rückstroms kommt es zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens und konsekutiv zu einer Senkung des Blutdrucks. Entsprechend kann ein erniedrigter Blutdruck durch Reduktion der renalen Flüssigkeitsausscheidung normalisiert werden. Die druckabhängige Reninausschüttung, die zur Bildung von Angiotensin II führt, beeinflusst auch die Harnausscheidungsrate der Niere. Angiotensin II stimuliert die Aldosteronsekretion durch die Nebenniere und unter dem Einfluss von Aldosteron wird die Natrium-Rückresorption der Niere gefördert und weniger Wasser ausgeschieden. Außerdem verstärkt Aldosteron die Erregbarkeit der Gefäßmuskulatur gegenüber vasokonstriktorisches Einflüssen und übt damit auch durch Veränderung des peripheren Gefäßwiderstandes eine blutdruckregulierende Wirkung aus.

1.1.4 Störungen der Blutdruckregulation

1.1.4.1 Hypertonie

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse großer epidemiologischer und interventioneller Studien wird in den aktuellen nationalen und internationalen Richtlinien ein Blutdruck oberhalb von 140/90 mmHg als manifeste Hypertonie definiert. Die arterielle Hypertonie zählt zu den Risikofaktoren erster Ordnung bei der Entstehung von Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit (KHK) und ist zentraler Risikofaktor für die zerebrale Ischämie. In den westlichen Industrieländern zählen die KHK und die zerebrale Ischämie zu den häufigsten Todesursachen und es leiden bis zu 25% aller Menschen an einer arteriellen Hypertonie (Schölmerich J., 2006). Die Folgeschäden der unbehandelten Hypertonie umfassen Myokardinfarkt, Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz, Nierenfunktionseinschränkungen, Arteriosklerose, zerebrale Blutungen und Gefäßaneurysmen.

Unter ätiologischen Aspekten unterscheidet man die primäre/essentielle Hypertonie und die sekundären Hypertonien. Bei der essentiellen Hochdruckform, welche in etwa 90% der Fälle vorliegt, ist die Krankheitsentstehung noch unbekannt. Die sekundäre Hypertonie (etwa 5-10%) stellt lediglich ein Symptom einer anderen renalen, endokrinen, neurogenen oder kardiovaskulären Primärerkrankung dar oder ist iatrogen, z.B. Nebenwirkung einer Pharmakotherapie mit Glukokortikoiden. Obwohl bei Patienten mit essentieller Hypertonie mittlerweile einzelne Veränderungen im Genom identifiziert werden konnten, bleibt der Mechanismus zur Bluthochdruckentstehung meistens unklar. Als mögliche Ursachen wurden u.a. Mutationen im Bereich von Genen des NO-Synthase Gens (Miyamoto et al., 1998), des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (Jeunemaitre et al., 1997), des β_2 -Adrenozeptor Gens (Pereira et al., 2003) und des ANP-Guanylatzyklase Systems (Rahmutula et al., 2001) diskutiert. Soziale und psychische Faktoren inklusive Ernährungsgewohnheiten sowie Stress mit erhöhtem Sympathikotonus haben ebenfalls einen großen Anteil an der Entwicklung einer Hypertonie (Esler et al., 2008; Sever and Poulter, 1989; Shannon et al., 2000).

1.1.4.1.1 Bluthochdruckmodelle in Mäusen

Zur Untersuchung der Ätiologie des Bluthochdrucks, der Pathogenese des Endorganschadens oder zur Entwicklung neuer Therapieformen wurden verschiedene Tiermodelle generiert und analysiert. Neben der Ratte als Modellorganismus, werden, vor allem durch die Möglichkeit der Herstellung von Knockout-Mäusen mittels Gentargeting, murine Modelle der Hypertonie verwendet. Die Mausmodelle des Bluthochdrucks

können in pharmakologische, chirurgische und genetische Modelle eingeteilt werden (Lerman et al., 2005).

Die pharmakologischen Modelle werden durch subkutane oder orale Applikation von Deoxycorticosteron-Acetat (DOCA)-Salz, Angiotensin II oder dem Stickstoffmonoxid-Synthase-Hemmer N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) induziert. Bei der DOCA-Salz Methode wird die linke Niere entfernt, ein DOCA-Salz-Pellet subkutan implantiert und eine Hochsalzlösung als Trinkwasser verwendet. Unter diesen Bedingungen kann eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks von 20-35 mmHg erreicht werden. Diese Hochdruckform ist durch Volumenerhöhung, Steigerung der Herzauswurfleistung und Kollagenisierung des linken Ventrikels, endothelialer Dysfunktion, Proteinurie und Glomerulosklerose charakterisiert (Lerman et al., 2005). Bei der Behandlung mit Angiotensin II über osmotische Minipumpen wird ein Anstieg des Blutdrucks von etwa 45 mmHg beschrieben (Landmesser et al., 2002). Die Angiotensin II-induzierte Hypertonie geht mit Herzhypertrophie und Fibrose (Johar et al., 2006) einher und aktiviert Signalwege, die an oxidativem Stress sowohl im Herzen, als auch in Gefäßen und im Gehirn beteiligt sind (Matsuno et al., 2005; Zimmerman et al., 2004). Bei der L-NAME-induzierten Hypertonie kommt es zu einer verminderten Produktion von Stickstoffmonoxid in der Gefäßwand und erhöhtem Gefäßtonus. Verstärkt werden kann dieses Modell durch zusätzliche Behandlung der Mäuse mit einer Hochsalz-Diät (Obst et al., 2004). Diese induzierte Hypertonieform ist mit kardialer Hypertrophie und Fibrose assoziiert (Gross et al., 2004).

Die chirurgischen Modelle beruhen im Wesentlichen auf renalen Modellen des Bluthochdrucks. Im Jahre 1934 entwickelten Goldblatt et al. das erste Modell einer renalbedingten Hypertonie in Hunden durch unilaterale Konstriktion der Nierenarterie mit einem Silber-Clip (Goldblatt et al., 1934). Dieses Modell wurde entsprechend „2K, 1C (2 Kidneys-1 Clip)“ genannt und anschließend erfolgreich bei Kaninchen, Affen, Ratten und später auch Mäusen angewendet (Wiesel et al., 1997). Bei einer weiteren Methode wird eine unilaterale Konstriktion mit einer kontralateralen Nephrektomie kombiniert (1K, 1C). Diese beiden Hypertonieformen unterscheiden sich durch ihre pathophysiologischen Mechanismen. Bei dem 2K, 1C-Modell löst die Reduktion der glomerulären Filtrationsrate, durch die stark eingeschränkte Durchblutung der geclipsten Niere, eine andauernde Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) aus, wodurch eine fortschreitende Hypertonie mit einer Blutdruckerhöhung von etwa 20 mmHg in Mäusen erzielt wird, was mit einer Linksherzhypertrophie, Fibrose und einem Anstieg des kardialen oxidativen Stresses und der Matrix-Metalloproteasen einhergeht (Tyagi et al., 2005). Das 1K, 1C-Modell induziert ebenfalls eine Aktivierung des RAAS,

führt aber durch die zusätzliche Reduktion der funktionsfähigen renalen Masse zu einer akuten Niereninsuffizienz mit Natrium- und Wasser-Retention. Der erhöhte Blutdruck ist dann hauptsächlich Volumen-bedingt.

Die Entschlüsselung des humanen und murinen Genoms erlaubt die gezielte Generierung von Gen-veränderten Tiermodellen zur Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen. Zum Einen können bei Maus- und Rattenstämmen, die durch Spontanmutationen eine Hypertonie entwickeln, durch die Identifikation der entsprechenden Genmutationen die zugrunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden. In einem alternativen Ansatz kann durch Einbringen gezielter Mutationen in einzelne Gene deren Beitrag zur Funktion der Blutdruck regulierenden Organe in Mäusen und Ratten untersucht werden. Anhand der Generierung von Knockout-Mäusen der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) konnte die Bedeutung bei der Regulation des Gefäßtonus, des systemischen Blutdrucks und damit eine Rolle bei der endothelialen Dysfunktion gezeigt werden. Diese eNOS-defizienten Mäuse weisen, wie bei der pharmakologischen Induktion einer Hypertonie mit L-NAME, eine moderate, spontane Hypertonie auf (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996). Ein Fehlen der endothelialen NO-Synthase führt zu einer Aktivierung der Plasma-Renin Aktivität und nachfolgender Steigerung der Superoxid Produktion in der Gefäßwand (Landmesser et al., 2003). Isolierte Arterien von diesen Mäusen zeigen eine beeinträchtigte Relaxation nach Acetylcholin Stimulation und eine verdickte Gefäßwand (Faraci et al., 1998). Bei Mäusen, bei denen die β_1 -Untereinheit des spannungsgesteuerten und Calcium-aktivierten Kaliumkanals großer Leitfähigkeit (BK-Kanälen „big conductance“) ausgeschaltet wurde (Brenner et al., 2000; Jaggar et al., 2000; Pluger et al., 2000), wurde durch einen Hyperaldosteronismus begleitet von erniedrigten Serum-Kalium Konzentrationen und einer Erhöhung des Gefäßtonus von kleinen Arterien eine Blutdruckerhöhung beschrieben (Kotlikoff and Hall, 2003; Patterson et al., 2002; Sausbier et al., 2005). Ein Beispiel für die Entstehung einer Hypertonie, welche neben einer veränderten Gefäßkontraktilität auf zentrale Mechanismen zurückgeführt werden konnte, ist die Inaktivierung des Regulators des G-Protein Signalweges (RGS) 2, welcher die G-Protein Deaktivierung durch Stimulation der GTP Hydrolyse beschleunigt (Gross et al., 2005; Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003). Die α_2 -Adrenozeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Neurotransmitter-Freisetzung im zentralen und peripheren sympathischen Nervensystem. Eine Deletion des α_{2A} -Adrenozeptors in Mäusen führt durch eine Erhöhung der sympathischen Aktivität zu Bluthochdruck und einem hyperadrenergen Status (Altman et al., 1999; Makaritsis et al., 1999). Auch die Deletion des K-Cl Kotransporters KCC3 führt zu einer Hypertonie infolge eines erhöhten sympathischen Tonus mit erhöhten Epine-

phrin- und Norepinephrin-Konzentrationen im Urin (Rust et al., 2006). Eine andere Ursache von erhöhten Catecholamin-Spiegeln kann ein Phäochromozytom im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) darstellen. Bei einem Phäochromozytom handelt es sich um ein Catecholamin-produzierenden Tumor der chromaffinen Zellen vor allem im Nebennierenmark. Man unterscheidet zwei Hauptformen, die MEN Typ1, sowie die MEN Typ2 (Komminoth, 1997). Das Ausschalten beider *Men1* Allele in der Maus führt zu embryonaler Lethalität (Bertolino et al., 2003; Crabtree et al., 2001). Für MEN2 sind verschiedene Mausmodelle beschrieben; einerseits führen Mutationen im verantwortlichen RET Gen zu multifokalem C-Zell Karzinom (Cranston and Ponder, 2003; Michiels et al., 1997), andererseits findet sich keine Tumorbildung in Mäusen nach Expression des humanen mutanten Allels (Skinner et al., 2005). Die Expression einer des humanen Allels entsprechenden murinen Mutation in Mäusen führt zu C-Zell Hyperplasie und Phäochromozytom (Smith-Hicks et al., 2000). Bisher sind für diese Mausmodelle der multiplen endokrinen Neoplasie keine Studien zur Blutdruckregulation veröffentlicht.

1.1.4.2 Hypotonie

Als Hypotonie wird ein dauerhaft unterhalb des Normbereiches liegender Blutdruck bezeichnet. Wie bei der Hypertonie wird die Hypotonie grob in zwei Formen unterschieden: die arterielle Hypotonie und die orthostatische Hypotonie. Die arterielle Form unterteilt sich nochmals in die essentielle/primäre Hypotonie unklarer Genese und die sekundäre Form, die medikamenteninduziert, endokrin, kardiovaskulär oder durch Hypovolämie bedingt sein kann. Zu den Medikamenten mit unerwünschter Blutdrucksenkung gehören neben Antihypertonika auch beispielsweise Diuretika, Antiarrhythmika oder Psychopharmaka. Wichtigste endokrine Ursachen sind Nebennierenrindeninsuffizienz, Hypoaldosteronismus und Hypothyreose. Zu den kardiovaskulären Faktoren zählen Herzinsuffizienz, Aortenstenose oder Herzrhythmusstörungen.

Durch die Generierung von Gen-defizienten Mäusen konnte die Rolle von Angiotensinogen, Renin, dem Angiotensin konvertierenden Enzym (ACE) und der Angiotensin-Rezeptoren im Hinblick auf die Blutdruckregulation beschrieben werden. Angiotensinogen-defiziente Mäuse weisen genauso wie ACE-defiziente Mäuse einen erniedrigten Blutdruck auf (Esther et al., 1996; Krege et al., 1995b; Tanimoto et al., 1994). Die Ursache der Hypotonie in diesen beiden Mausmodellen ist durch das Fehlen von Angiotensin II bedingt. Im Gegensatz dazu sind Mäuse, in denen eines der beiden Renin-Gene ausgeschaltet ist, aufgrund eines kompensatorischen Effektes normotensiv

(Bertaux et al., 1997; Sharp et al., 1996). Angiotensin II vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptorsubtypen, den Angiotensin II Typ1 (AT1)- und Angiotensin II Typ2 (AT2)-Rezeptor (Jones et al., 2008). Mutante Mäuse hetero- oder homozygot für das AT1a-Rezeptor-Gen zeigen sowohl eine Blutdruckerniedrigung als auch gestörte tubuloglomeruläre Feedbackmechanismen (Ito et al., 1995; Schnermann et al., 1997), wohingegen die alleinige Deletion des AT1b-Rezeptors durch eine Kompensation des AT1a-Rezeptors keine Auswirkung auf den Blutdruck hat (Chen et al., 1997). Bei Ausschaltung beider Proteine in der Maus ergibt sich wieder ein erniedrigter Blutdruck (Oliverio et al., 1998; Tsuchida et al., 1998). Im Gegensatz hierzu, führt eine Deletion des AT2-Rezeptors in Mäusen zu einer Blutdruckerhöhung (Gross et al., 2000; Hein et al., 1995). Der basolaterale Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter (NKCC1) spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Elektrolyt- und Volumen-Homöostase. Untersuchungen an NKCC1-defizienten Mäusen im Hinblick auf das kardiovaskuläre System ergaben einen signifikant erniedrigten Blutdruck dieser Mäuse, welcher auf eine Fehlregulation der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus zurückzuführen ist (Meyer et al., 2002). α -Adrenozeptoren übernehmen ebenfalls wichtige Funktionen in vielen physiologischen Prozessen wie beispielsweise bei der glattmuskulären Kontraktion und spielen deshalb eine große Rolle in der Blutdruckregulation. Die α -Adrenozeptoren werden in drei Subtypen unterteilt: α_{1a} , α_{1b} und α_{1d} . Die vaskuläre Lokalisation der α_{1a} -Adrenozeptoren ist auf Widerstandsgefäße beschränkt, daher haben α_{1a} -Adrenozeptor-defiziente Mäuse einen erniedrigten Blutdruck (Rokosh and Simpson, 2002). α_{1b} -Adrenozeptor knockout Mäuse sind normotensiv, weisen aber eine eingeschränkte Blutdruckantwort nach Phenylephrin-Stimulation auf und sind dadurch gegen eine Catecholamin-induzierte Hypertension und kardiale Hypertrophie besser geschützt (Cavalli et al., 1997). Ebenfalls zeigen α_{1d} -Adrenozeptor-defiziente Mäuse eine verminderte Kontraktilität der Aorta und dem mesenterialen Gefäßbett nach α -Adrenozeptor-Stimulation und sind hypotensiv (Tanoue et al., 2003; Tanoue et al., 2002). Neben den α -Adrenozeptoren umfasst die Familie der adrenergen Rezeptoren drei β -Adrenozeptoren. Die meisten β_1 -Adrenozeptor-defizienten Mäuse sterben pränatal, die überlebenden Tiere weisen im adulten Alter keine Beeinträchtigung der basalen Herzfrequenz und des Blutdrucks aufgrund eines kompensatorisch erhöhten Sympathikotonus auf, die positiv chronotrope und inotrope Antwort auf einen β -Agonisten fehlt aber (Rohrer et al., 1996; Rohrer et al., 1998). Auch bei β_2 -Adrenozeptor-defizienten Mäusen findet sich zwar kein Unterschied in der basalen Herzfrequenz und dem Blutdruck, unter Stress neigen diese Tiere durch das Fehlen der β_2 -vermittelten Vasodilatation eher zu einer Hypertension (Chruscinski et al., 1999).

1.2 Methoden der Blutdruckmessung an Mäusen

Die Messung physiologischer Parameter in kleinen Labortieren wie Mäusen spielt in der modernen biomedizinischen Forschung eine wichtige Rolle. Für die Untersuchung des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz wird in der Literatur zwischen indirekten und direkten Bestimmungsmethoden unterschieden (Kramer et al., 2001). Zu den indirekten Verfahren zur Blutdruckmessung zählt hauptsächlich die „tail-cuff Plethysmographie“. Direkte Methoden setzen immer eine Katheterisierung voraus.

1.2.1 Indirekte Methoden

Die plethysmographische Blutdruckmessung an der Schwanzarterie (sog. tail-cuff Plethysmographie) stellt eine nicht-invasive Methode dar, bei welcher der systolische Blutdruck der Maus mittels einer Blutdruckmanschette an der Schwanzarterie gemessen wird, so dass keine arterielle Punktion bzw. Kannulierung notwendig ist (Butz and Davisson, 2001; Krege et al., 1995a; Van Vliet et al., 2000). Durch Auszählen der gemessenen Druckmaxima kann darüber hinaus die Herzfrequenz bestimmt werden. Der Vorteil dieser Methode ist neben einer nicht-invasiven Blutdruckbestimmung die, im Vergleich zu den direkten Methoden, kostengünstige Durchführung (Van Vliet et al., 2000). Allerdings ergeben sich bei der indirekten Methode einige Probleme, welche zu fehlerhaften und unzuverlässigen Ergebnissen führen können. Einerseits muss das Tier zur Vermeidung von Messartefakten durch zu starke Bewegung fixiert werden. Dadurch eignet sich dieses System auch nur wenig für Langzeitmessungen, welche ein Training der Tiere voraussetzen (Brooks et al., 1996). Die erhaltenen Messwerte für den Blutdruck stellen daher auch nur Momentaufnahmen dar (Krage et al., 1995a). Andererseits wird dem Tier meistens Wärme zugeführt, um einen ausreichenden Blutfluss am Schwanz zu gewährleisten. Da sowohl die Fixierung als auch die Wärmezufuhr eine erhebliche Stresssituation für die Tiere darstellen, werden die Blutdruckwerte signifikant in die Höhe getrieben (Van Vliet et al., 2000). Die Genauigkeit der Blutdruckmessung bei diesem Messsystem wird also bei kleinen Labortieren stark durch Umgebungsfaktoren beeinflusst.

1.2.2 Direkte Methoden

Bei den direkten Methoden wird das Blutdrucksignal durch einen intravasalen Katheter über einen daran angeschlossenen elektronischen Druckaufnehmer erfasst. Bei Mäusen werden als Zugänge meist die Carotiden oder die Femoralarterien (Mattson, 1998), aber auch die abdominale Aorta gewählt (Mills et al., 2000). Die Kannulation der A.

carotis communis und damit des Arcus aortae weist jedoch Vorteile gegenüber den anderen Lokalisationen auf, da es seltener zu Thrombusbildung und Verschluss der Katheter kommt und auch keine Komplikationen durch eine Ischämie der hinteren Extremitäten auftreten. Ein großer Vorteil bei den invasiven Messmethoden besteht in der Möglichkeit der kontinuierlichen Beurteilung des systolischen und diastolischen Blutdrucks und sie spiegeln den physiologischen Verlauf wieder.

1.2.2.1 Blutdruckmessung mittels flüssigkeitsgefülltem Kathetersystem

Die direkte intraarterielle Blutdruckmessung ist ein häufig angewendetes Verfahren. Diese erlaubt eine direkte und kontinuierliche Aufzeichnung der Blutdruckwerte, aus denen der systolische, diastolische und mittlere Blutdruck sowie die Herzfrequenz abgeleitet werden können. Mit diesem System sind Langzeitmessungen unter Ruhebedingungen an wachen Mäusen über Tage bis Wochen durchführbar. Durch einen chirurgischen Eingriff wird ein flüssigkeitsgefüllter Katheter in eine der Hauptarterien der Maus eingeführt, dieser nach außen geleitet und mit einem externen Druckaufnehmer verbunden (Mattson, 1998). Die erforderliche Verbindung zwischen dem Tier, dem Drucksensor und -aufnehmer ergibt einige Nachteile (Van Vliet et al., 2000). Zum Einen sind die Tiere in ihrer Beweglichkeit durch den äußeren Katheter deutlich eingeschränkt, wodurch es zusätzlich zu einer Stress-induzierten Verfälschung der Messwerte kommen kann. Zum Anderen besteht die Notwendigkeit, das System ständig mit heparinierter Flüssigkeit zu spülen, um einen thrombotischen Verschluss zu vermeiden; dies beinhaltet außerdem ein erhöhtes Infektionsrisiko (Brooks et al., 1996). Der wesentliche Vorteil dieses Messsystems sind die gegenüber den telemetrischen Messungen geringeren Materialkosten (Van Vliet et al., 2000).

1.2.2.2 Telemetrische Blutdruckmessung

Die Entwicklung von miniturisierten, implantierbaren, radiotelemetrischen Messeinheiten eröffnet die Möglichkeit einer Langzeit-Blutdruckmessung bei Mäusen, welche in ihren Käfigen ohne merkliche Beeinträchtigung leben.

Dieses Messsystem beinhaltet einen Blutdrucksensor, einen Druckaufnehmer und Drucküberträger und die Elektronik in einer Einheit zusammengefasst. Unter Narkose wird der Katheter intravasal platziert und die daran angeschlossene Messeinheit entweder in die Bauchhöhle oder subkutan an der Flanke platziert. Da sich das Empfängersystem unter dem Käfig des Tieres befindet und der Sensor zusammen mit dem Druckaufnehmer als eine Einheit in das Tier implantiert wird, ist keine Verbindung zum Aufnehmer erforderlich. Somit wird die Bewegung des Tieres in keinsten Weise eingeschränkt und es entstehen auch keine Bewegungsartefakte (Brooks et al., 1996). Der

große Vorteil dieser Methode besteht darin, die Blutdruckdaten an frei-beweglichen, wachen Mäusen unter minimaler Stressbelastung zu messen (Kramer and Kinter, 2003). So können exakte und zuverlässige Langzeitmessungen kontinuierlich über Wochen bis Monate durchgeführt werden. Diese Methode ist effizienter, exakter und verlässlicher als die Tail-cuff Plethysmographie oder die Messung mit flüssigkeitsgefüllten Kathetersystemen. Ein Nachteil besteht in einer längeren, zeitaufwändigen Implantation der Messeinheit und größeren Materialkosten. Besonders bei einer Implantation des Katheters in die A. abdominalis besteht die Gefahr einer Ischämie der hinteren Extremitäten. Butz und Davisson erzielten bessere Erfolge bei der Implantation des Katheters über die A. carotis in den Aortenbogen (Butz and Davisson, 2001). Trotz einer Blutflussunterbindung einer der beiden Carotiden besteht bei Mäusen aufgrund eines sehr stark ausgeprägten Circulus Willisii eine ausreichende Blutversorgung aller Hirnareale. Weiterhin ist bei dieser Anwendung das subkutane Platzieren der Messeinheit an der rechten Flanke besser verträglich, als die abdominale Anwendung und intraperitoneale Platzierung.

1.3 Die TRP- Kanalfamilie

1.3.1 Grundlagen

Der erste TRP-Kanal wurde bei Untersuchungen an Photorezeptoren von der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Eine spontan aufgetretene Mutante reagierte auf einen länger anhaltenden Lichtreiz mit einem fortschreitenden Abfall der an den Photorezeptoren abgeleiteten Spannung (Cosens and Manning, 1969). Dieses Phänomen wurde als „vorübergehendes Rezeptorpotential“ und die Tiere als *trp*-Mutanten (englisch: *transient receptor potential*) bezeichnet (Minke et al., 1975). In der Folge konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen atypischen Spannungsverläufe des Membranpotentials auf eine verminderte intrazelluläre Calcium-Konzentration zurückzuführen sind (Hardie, 2001). Durch Klonieren und Sequenzieren des *trp*-Gens konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem TRP-Protein um einen Calcium-Kanal handelt (Montell and Rubin, 1989). Basierend auf diesen Genen wurde die neue Familie der TRP-Kanäle identifiziert. Die TRP-Familie gehört zu der Gruppe der nicht-selektiven Kationenkanäle. Zu dieser Familie zählen ebenfalls die spannungsabhängigen Kalium-, Natrium- und Calcium-Kanäle, die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle, die einwärts-rectifizierenden- und two-pore Kaliumkanäle, die durch zyklische Nukleotide gesteuerten (cyclic nucleotide gated, CNG) und die durch Hyperpolarisation aktivierten, zyklischen Nukleotid-Kanäle (HCN) (Yu and Catterall, 2004).

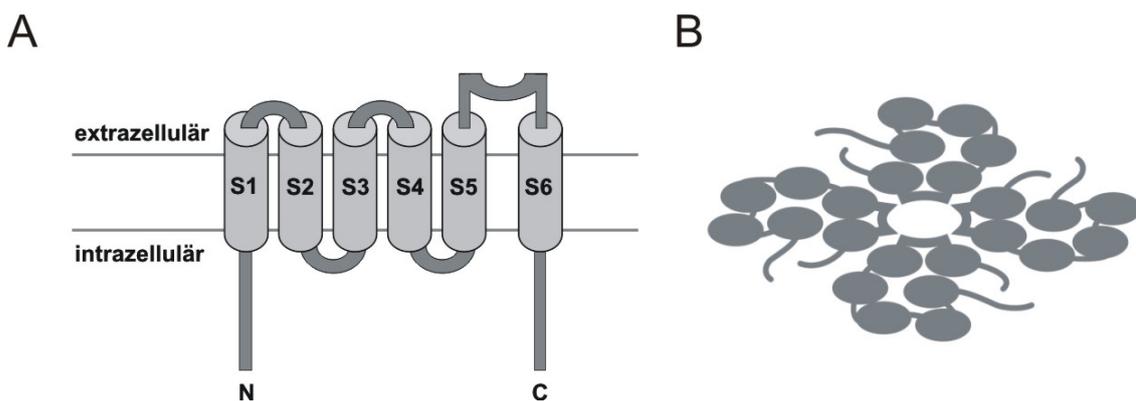


Abbildung 1: Modell der TRP-Proteinstruktur. (A) Ein TRP-Protein besteht aus 6 Transmembransegmenten (S1-S6), welche die Zellmembran durchspannen und einer Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment. (B) Es wird angenommen, dass vier TRP-Proteine zusammen einen homo-oligomeren oder auch hetero-oligomeren Kanal bilden.

Bisher ist noch keine Kristallstruktur von TRP-Kanälen verfügbar. Mittels Hydropathieblot-Analysen ist es möglich, ausgehend von der Aminosäuresequenz des Genproduk-

tes die Sekundärstruktur von TRP-Proteinen vorauszusagen. Nach dem gegenwärtigen Modell weisen alle TRP-Proteine sechs Transmembrandomänen auf. Diese stellen apolare α -Helices mit einer Länge von jeweils 20 bis 25 Aminosäuren dar und durchqueren die Zytoplasmamembran und gleichen damit der Transmembranarchitektur der spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (Sokolova et al., 2001). Hierbei wird angenommen, dass bei sämtlichen TRP-Kanälen die Amino- und Carboxytermini jeweils im Cytosol der Zelle lokalisiert sind (Abbildung 1). Kürzlich veröffentlichte Studien mittels Kryoelektronen- und Rasterkraft-Mikroskopie haben die tetramere Symmetrie mit einer im Zentrum liegenden Pore bestätigt (Barrera et al., 2007; Mio et al., 2007). Die kanalbildende Porenregion wird zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment angenommen. In dieser Region finden sich auch die am höchsten konservierten Bereiche innerhalb der TRP-Familie.

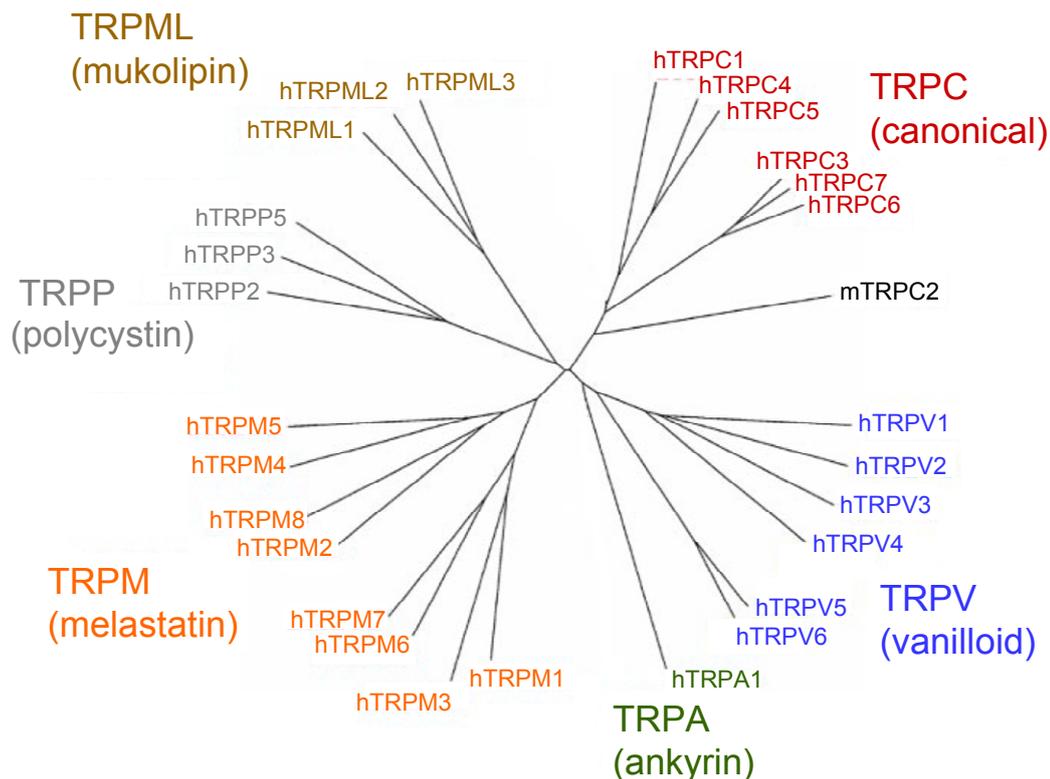


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanal Superfamilie. Modifiziert nach Nilius et al. (Nilius et al., 2007)

Basierend auf der Aminosäuresequenz werden die TRP-verwandten Proteine in sieben Unterfamilien eingeteilt (siehe Abbildung 2): die klassischen TRPCs, welche die größte

Ähnlichkeit zu den *Drosophila* TRPs aufweisen; die Vanilloid-Rezeptor TRPVs, die Melastatin TRPMs, die Mucolipin-ähnlichen TRPMLs, die Polycystin-ähnlichen TRPPs und das Ankyrin-Transmembranprotein 1 TRPA1 (Montell, 2005). Die siebte Unterfamilie, TRPN, beinhaltet Proteine in Tunicaten, Fliegen und Würmern; Mitglieder dieser Unterfamilie konnten bisher nicht in Säugern oder Fischen identifiziert werden. Abweichend zu anderen Klassen von Ionenkanälen werden TRP-Kanäle nicht aufgrund ihrer biologischen Funktion, ihrer biophysikalischen Eigenschaften oder ihrer Liganden eingeteilt. Die bisherige Klassifizierung erfolgt ausschließlich aufgrund der Homologie ihrer Aminosäuresequenz, die zwischen einzelnen Mitgliedern unterschiedlicher Subfamilien weniger als 20% beträgt. Entsprechend heterogen sind die Eigenschaften, Regulationsmechanismen und physiologischen Funktionen von TRP-Proteinen (Minke and Cook, 2002; Montell, 2005; Nilius et al., 2007; Pedersen et al., 2005). Es wird angenommen, dass funktionelle TRP-Kanäle aus heteromultimeren und/oder homomultimeren TRP-Proteinen bestehen (Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Strubing et al., 2003), was eine große Variabilität biophysikalischer und funktioneller Kanaleigenschaften zur Folge hat. Beispielsweise können die Mitglieder einer TRPC-Untergruppe miteinander interagieren. Eine funktionelle Untergruppe bilden TRPC1, TRPC4 und TRPC5, die zweite Untergruppe bilden TRPC3, TRPC6 und TRPC7. TRPC2 Proteine bilden nur Homotetramere. Für eine Multimerisierung innerhalb der verschiedenen Unterfamilien gibt es bisher nur sehr wenige Hinweise.

Die Haupteigenschaften, die die Proteine der TRP-Familie definieren, sind die 6 Transmembran Architektur/Homologie und die Kationenpermeabilität. Wovon TRPM4 und TRPM5, welche impermeabel für Calcium sind, und TRPV5 und TRPV6, welche hoch-permeabel für Calciumionen sind, Ausnahmen darstellen.

1.3.2 Physiologische Bedeutung von TRP-Kanälen

TRP-Kanäle vermitteln den transmembranösen Strom von Kationen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} - und Na^{+} -Konzentration erhöht wird ($[\text{Ca}^{2+}]_i$; $[\text{Na}^{+}]_i$). Zytosolische Calcium-Signale kontrollieren zahlreiche zelluläre Funktionen, von kurzzeitigen Antworten wie Kontraktion und Sekretion hin bis zu Langzeit-Regulationen wie Transkription, Wachstum und Zellteilung (Berridge and Irvine, 1989). Unter Ruhebedingungen ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vergleichsweise niedrig und beträgt nur etwa 100 nM. Extrazellulär beträgt diese etwa 2 mM, sodass die Öffnung eines Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Zellinnere führt. Es sind etliche Effektorproteine

bekannt, die in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_i$ eine Vielzahl von zellulären Abläufen regulieren (Berridge et al., 2003). Zudem wird die Zelle durch den elektrogenen Einstrom von Kationen depolarisiert. Änderungen des Membranpotentials bedingen in elektrisch erregbaren Zellen, wie z.B. Neuronen, die Generierung von Aktionspotentialen. In der quergestreiften Muskulatur führen diese wiederum zur Kontraktion. In nicht-erregbaren Zellen spielt das Membranpotential ebenfalls eine wichtige Rolle, da es z.B. die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran beeinflusst. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass TRPM4-Proteine als Ca^{2+} -aktivierte, nichtselektive Kationenkanäle agieren und somit in Mastzellen die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Influx beeinflussen können. TRPM4-defiziente Mastzellen werden durch das Fehlen des TRPM4-Ionenkanals in einem geringeren Maße depolarisiert als Wildtyp-Kontrollzellen. Nach FcεRezeptor-Stimulation kommt es daher in TRPM4-defizienten Mastzellen zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Influx, der mit einer erhöhten Histamin-Freisetzung einhergeht (Vennekens et al., 2007). In primären glatten Muskelzellen des Ileums konnten kürzlich TRPC4- und TRPC6-vermittelte Kationenströme identifiziert werden. Die resultierenden Ströme beider Kanäle sind notwendig, um die Zellmembran zu depolarisieren und spannungsabhängige Calcium-Kanäle zu aktivieren (Tsvilovskyy et al., 2009).

Eine besondere Eigenschaft der TRP Superfamilie betrifft die Vielfältigkeit der Selektivitäten und Aktivierungsmechanismen dieser Kanäle. Eine Abhängigkeit ihrer Aktivierung von der Phospholipase C trifft für einige Kanäle, vor allem aus der TRPC Familie, zu, andere werden über Mechanismen wie zum Beispiel TRPV4 über Zellvolumenänderung, wie TRPM4 und TRPM5 durch Calcium direkt oder wie TRPV1 und TRPM8 über Temperaturänderungen aktiviert. Darüber hinaus kann ein TRP-Kanal in vielen Fällen durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden (Montell et al., 2002). Die eigentlichen biologischen Funktionen von TRP-Kanälen erweisen sich, soweit bereits bekannt, als ebenso vielfältig wie ihre Aktivierungsmechanismen. TRP-Kanäle sind beteiligt an visuellen, auditiven, Geschmacks- und Schmerz- Signaltransduktionsprozessen, an der Regulation der Blutzirkulation, der Darmtätigkeit, der Mineralaufnahme, der Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes, Atemwegs- und Blasen-Hypersensitivitäten sowie Zellfortbestand und -wachstum (Inoue et al., 2006; Nilius et al., 2007).

1.3.3 Bekannte Funktionen von TRP-Kanälen bei der Regulation des Gefäßtonus und des systemischen Blutdrucks

Die Prozesse und Funktionen, die durch Calciumsignale vermittelt werden, sind von den jeweiligen Zelltypen abhängig, z.B. Auslösung der Gefäßrelaxation, der Aktin-Myosin-Interaktion in Muskelzellen oder Freisetzung von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgt primär über zwei Wege: dem Einstrom von extrazellulärem Calcium über Ionenkanäle in der Plasmamembran oder der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Kompartimenten. Wichtige Calciumspeicher sind das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. Calciumkanäle, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, werden aufgrund ihrer Aktivierung in spannungsabhängige und -unabhängige unterschieden (Inoue et al., 2006). Die spannungsabhängigen Kanäle, die sich hauptsächlich in elektrisch erregbaren Zellen wie Muskelzellen und Neuronen finden lassen, öffnen direkt bei Depolarisation des Membranpotentials und tragen beispielsweise zur Aktionspotentialbildung oder der elektro-mechanischen Kopplung bei (Hofmann et al., 1999). Unter den spannungsunabhängigen Kanälen gibt es solche, die auf Rezeptorstimulation reagieren, solche, die auf Calciumdepletion der intrazellulären Speicher, mechanische Reize, oder andere Stimuli wie Temperatur oder Osmolarität reagieren. Diese Einteilung fundiert jedoch eher auf experimentellen Versuchen als auf der physiologischen Funktion und spiegelt sich auch nicht im molekularen Aufbau der Kanäle vollkommen wider. Da Calcium nicht wie andere „second messenger“ metabolisiert werden kann, müssen Zellen durch verschiedene Regulationsmechanismen die intrazelluläre Calciumkonzentration auf Werte von etwa 40-100 nM halten. Extrazellulär beträgt diese etwa 2 mM, sodass die Öffnung eines Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Zellinnere führt. Aber auch in intrazellulären Kompartimenten wie dem ER oder den Mitochondrien herrscht eine hohe Calciumkonzentration vor, da die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration hauptsächlich durch Wiederaufnahme in die intrazellulären Speicher oder dem Transport von Calcium nach Extrazellulär erfolgt. An der Membran der intrazellulären Kompartimente und der Zellmembran existieren Calcium-ATPasen und Natrium/Calcium-Antiporter, die Calcium energieabhängig aus dem Intrazellulär-raum transportieren und so das Gleichgewicht der intrazellulären Calciumkonzentration aufrechterhalten (Berridge et al., 2003).

Für die Blutdruckregulation ist die Regulation der Calcium-Homöostase vor allem in Endothelzellen, in glatten Muskelzellen, in Kardiomyozyten und in Neuronen von besonderer Bedeutung.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration in Endothelzellen ist entscheidend für die Regulation des Gefäßtonus. Der von Furchgott und Zawadzki beschriebene endothelabhängige relaxierende Faktor (Furchgott and Zawadzki, 1980), der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert, wurde als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Ignarro et al., 1987). NO wird in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH unter Bildung von L-Citrullin enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin hergestellt (Palmer et al., 1988). Diese Reaktion wird von einer Gruppe von Enzymen katalysiert, die als NO-Synthasen bezeichnet werden. Die endotheliale Nitroxidsynthase (eNOS) kann über rezeptorabhängige Agonisten wie Acetylcholin und Bradykinin oder durch mechanische Stimulation aktiviert werden. Die Rezeptorstimulation führt durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und Bindung an Calmodulin zur transienten Enzymaktivierung, während die Schubspannung durch Aktivierung der Proteinkinase B und Phosphorylierung der eNOS zu langanhaltender NO-Produktion führt. Langfristig schützt NO die Gefäßwand vor arteriosklerotischen Veränderungen und wirkt der endothelialen Dysfunktion entgegen, wobei kurzfristige Funktionen u.a. die lokale Regulation des Gefäßtonus, die Organdurchblutung und die Endothelpermeabilität umfassen (Nilius and Droogmans, 2001; Yao and Garland, 2005). NO diffundiert aus den Endothelzellen in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert die Guanylatzyklase. Dies führt durch Erhöhung der intrazellulären cGMP- (zyklisches Guanosinmonophosphat) Konzentration zu einer Relaxation und damit zur Vasodilatation der Gefäße (Yao and Garland, 2005).

Die Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird durch den Anstieg und Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert (Somlyo and Somlyo, 1994). Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht über die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) eine Kontraktion der glatten Muskelzellen. Die MLCK phosphoryliert die Leichtketten des Myosins und aktiviert die kontraktile Myosin-Adenosin-Triphosphatase (ATPase) (Berridge, 2008). Im glatten Muskel wird die Sensitivität des kontraktile Apparates gegenüber Calcium durch intrazelluläre Botenstoffe, welche die Aktivität der MLCP beeinflussen, reguliert. Kontraktile Agonisten agieren über Signalmoleküle wie Proteinkinase C, Arachidonsäure und Rho-Kinase und steigern somit die Empfindlichkeit der glatten Muskelzellen gegenüber kontraktile Stimuli durch Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (Kimura et al., 1996; Kitazawa et al., 1991).

Der Mechanismus der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten beruht auf einer Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Durch Depolarisation der Zellmembran strömt während des Aktionspotentials Calcium über spannungsabhängige Calcium-Kanäle ins Zellinnere; in geringem Maße

geschieht dies auch über den Natrium/Calcium-Austauscher. Dieser transmembranöse Calcium-Einstrom aktiviert die Ryanodin-Rezeptoren und triggert somit die Freisetzung von Calcium aus dem SR ins Zellinnere. Zytosolisches Calcium wiederum stimuliert weitere sarkolemmale Calcium-Kanäle, die einen weiteren Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ hervorrufen. Durch Bindung von Calcium an Troponin C erfolgt die Querbrückenaktivierung und damit die Kontraktion. Die Calcium-Entfernung aus dem Zytosol erfolgt hauptsächlich über die SERCA ins SR und über den NCX.

Adrenalin und Noradrenalin werden durch Exozytose aus dem Nebennierenmark und noradrenergen postganglionären Neuronen freigesetzt und aktivieren in ihrer Funktion als Neurotransmitter und Hormone Adrenozeptoren. Auf diese Weise regulieren sie z.B. den Blutdruck über den Tonus der glatten Muskelzellen oder die Herztätigkeit. Die Exozytose unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Eine zentrale Rolle nimmt dabei eine Maschinerie von Fusionsproteinen, den SNARE-Proteinen (soluble NSF attachment protein receptor) ein (Sutton et al., 1998). Es wird angenommen, dass diese Proteine die Fusion beider Membranen und die Ausbildung der Fusionspore katalysieren (Jahn and Sudhof, 1999; Sudhof and Rothman, 2009). Zentraler Trigger der Freisetzung ist die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die v.a. durch Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle induziert wird. Zusätzlich könnten zahlreiche andere Ionenkanäle, wie TRP-Kanäle, an der Modulation der Freisetzung beteiligt sein.

Die Peptidase Renin ist das Schlüsselenzym des RAAS, welches ebenfalls u.a. eine bedeutende Rolle für die Regulation des arteriellen Blutdrucks spielt. Erstaunlicherweise und anders als in anderen sekretorischen Zellen hemmt eine Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration in juxtaglomerulären Zellen der Niere die Freisetzung von Renin („Calcium-Paradoxon“). Der inhibierende Effekt von Calcium auf die Reninsekretion scheint gesichert, aber der Wirkmechanismus ist noch weitgehend unbekannt (Castrop et al.).

1.3.3.1 Funktionen von TRPC-Kanälen im Gefäßsystem und im Herzen

Es wird angenommen, dass Kanäle der TRP-Superfamilie eine wichtige Rolle bei den durch Calcium-Einstrom beeinflussten Signalkaskaden in Endothelzellen und glatten Muskelzellen spielen und damit eine Aufgabe bei der Regulation des systemischen und pulmonalen Blutkreislaufs einnehmen. Unter Verwendung verschiedenster Techniken wie RT-PCR, Westernblot und Immunhistochemie konnten viele der TRP-Kanäle sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen unterschiedlicher Spezies detektiert werden (Watanabe et al., 2008).

Bisher konnte eine Beteiligung der TRPC1, -3, -4, -5 und -6 Kanäle an kontraktilen und proliferativen Prozessen in der Gefäßmuskulatur, welche bedeutend für kardiovaskuläre Erkrankungen sein könnten, beschrieben werden (Beech, 2005). TRPC1-Proteine werden u.a. im Herz, in glatter Muskulatur und Endothel exprimiert (Beech et al., 2003) und es konnte eine Expression in verschiedenen Gefäßen von Mensch, Maus, Ratte und Kuh nachgewiesen werden (Ahmmed and Malik, 2005). Heterologe Expression von TRPC1 in menschlichen Endothelzellen der Umbilikalvene verstärkt die Thrombin-induzierte Endothelzellpermeabilität (Ahmmed et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in glatten Muskelzellen von menschlichen Pulmonalarterien und Bronchialästen exprimiert wird und bei deren Proliferation von Bedeutung sein könnte (Golovina et al., 2001; Sweeney et al., 2002). Eine Hochregulation von TRPC1 in glatten Muskelzellen mit experimentell induzierter Gefäßverletzung könnte auf eine Relevanz von TRPC1 bei arterieller Gefäßverschlusskrankheit hindeuten, da durch Antikörperbehandlung gegen TRPC1 und damit dessen Blockade die Proliferation von glatten Muskelzellen *in vitro* gehemmt werden kann (Kumar et al., 2006). Weiterhin konnte eine Beteiligung von TRPC1 bei der pulmonären Hypertonie (Zhang et al., 2007) und der damit zusammenhängenden chronischen Hypoxie (Lin et al., 2004) gezeigt werden. Interessanterweise zeigten TRPC1-defiziente Mäuse, entgegen aller postulierten Funktionen, keine Veränderungen in der Gefäßkontraktilität (Dietrich et al., 2007).

Obwohl TRPC3 in glatten Muskelzellen exprimiert ist, konnte bisher keine physiologische Rolle direkt mit dessen Expression korreliert werden. Eine spontane und Agonist-induzierte Aktivierung von TRPC3 wurde in Myozyten aus Cerebralarterien von Ratten (Reading et al., 2005), aus Ohrarterien von Kaninchen (Albert et al., 2006) und aus Koronararterien von Kaninchen (Peppiatt-Wildman et al., 2007) beschrieben. Reading et al. konnten zeigen, dass nach Antisense-Behandlung gegen TRPC3 von Cerebralarterien die durch UTP, nicht aber die durch intraluminalen Druck, hervorgerufene Depolarisation und Konstriktion inhibiert ist. Xi und Koautoren konnten eine IP₃-induzierte Aktivierung von TRPC3 in Cerebralarterien von Ratten zeigen (Xi et al., 2008). Eine erhöhte Expression von TRPC3 wurde bei Patienten mit Hypertonie und hypertensiven Ratten im Gefäßendothel und Monozyten gefunden (Liu et al., 2009; Thilo et al., 2009). Auch bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie konnte eine verstärkte Expression von TRPC3 in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen detektiert werden (Yu et al., 2004). Hinweise für eine Rolle von TRPC3 bei der Regulation des basalen und Agonist-induzierten Kationenstroms, des Membranpotentials und damit der Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen geht aus einer Studie hervor, in welcher die Eliminierung der TRPC6 Expression in Mäusen zu einer erhöhten TRPC3

Expression in glatten Muskelzellen aus Aorta und Cerebralarterie führt (Dietrich et al., 2005).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass TRPC4 in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert ist, ist dessen biologische Funktion in diesen Zellen noch unklar (Inoue et al., 2004). Dagegen kann TRPC4 auch im vaskulären Endothel detektiert werden und in Endothelzellen von TRPC4^{-/-} Mäusen ist der durch Acetylcholin, ATP oder Thrombin induzierte zytosolische Anstieg der Calciumkonzentration drastisch vermindert. Als Folge davon ist sowohl die Relaxation von Aortenringen als auch die Regulation der Gefäßpermeabilität in isolierten Endothelzell-Layern und auch in intakten Lungengefäßen stark eingeschränkt (Freichel et al., 2001; Tiruppathi et al., 2002). Weiterhin konnte an TRPC4-defizienten Mäusen eine Fehlfunktion der Aktivierung des CFTRs (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in vaskulären Endothelzellen gezeigt werden (Wei et al., 2001).

Neben TRPC4 konnte für TRPC5 und TRPC6 durch Untersuchung TRPC6-defizienter Mäuse gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TRPC5 den durch Lysophosphatidylcholin induzierten Calcium-Einstrom und damit die Migration der Endothelzellen beeinflusst (Chaudhuri et al., 2008). Eine wichtige Funktion von TRPC6 beinhaltet die Endothelzellpermeabilität (Singh et al., 2007) und die Migration von Endothelzellen (Chaudhuri et al., 2008). Darüberhinaus führt eine Unterdrückung der TRPC6-Expression in Cerebralarterien von Ratten zu einer verminderten myogenen Vasokonstriktion (Welsh et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte sich in TRPC6-defizienten Mäusen keine verminderte myogene Antwort, sondern eine erhöhte Kontraktion von Aortenringen und eine Hypertonie (Dietrich et al., 2005). Zusätzlich wurde in TRPC6^{-/-} Mäusen beschrieben, dass TRPC6 eine entscheidende Rolle bei der durch Hypoxie ausgelösten pulmonären Vasokonstriktion einnimmt (Weissmann et al., 2006).

Hormone wie Noradrenalin, Adrenalin und Angiotensin II führen zu einer Aktivierung G-Protein-abhängiger Signalwege, die am Einstrom von Calcium, an Calcium-abhängigen Prozessen und der Entwicklung einer Herzhypertrophie beteiligt sind und zu kardialem Remodeling und Herzinsuffizienz führen können (Heineke and Molkentin, 2006). Neben dem Zusammenspiel von spannungsabhängigen L-Typ Calcium-Kanälen, Na⁺/Ca²⁺-Austauschern, Ryanodin-Rezeptoren und der SERCA-ATPase können anhaltende Calcium-Antworten durch die o.g. neuroendokrinen Faktoren nach Stimulierung von Gq/11-gekoppelten Rezeptoren und Aktivierung der Phospholipase C ausgelöst werden. TRP Proteine könnten Bestandteile dieser Kanalkomplexe sein. Da, wie gezeigt werden konnte, in glatten Muskelzellen eine enge funktionelle Kopplung von TRPC-Kanälen und spannungs-abhängigen Calcium-Kanälen besteht (Tsvilovskyy et

al., 2009), könnte eine entsprechende Kopplung auch in Kardiomyozyten eine Rolle spielen. Vorliegende Arbeiten zur Rolle von TRPC-Proteinen bei kardialer Hypertrophie beruhen auf Knock-Down Experimenten an neonatalen Kardiomyozyten oder auf Überexpression von TRPC-Transgenen unter Kardiomyozyten-spezifischen Promotoren in Mausmodellen, in denen TRPC-Proteine die Kontraktilität von Kardiomyozyten regulieren können. So zeigen Mäuse, bei denen ein TRPC3-Transgen in Kardiomyozyten überexprimiert ist, eine Herzhypertrophie und – in Abhängigkeit von der Expressionsstärke des Transgens – eine verminderte Lebenserwartung (Nakayama et al., 2006). Eine ähnliche Rolle bei der Entstehung einer Angiotensin II-induzierten Herzhypertrophie wurde auch für TRPC6-Kanäle postuliert (Kuwahara et al., 2006; Onohara et al., 2006). Dass TRPC-Proteine tatsächlich eine Rolle bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie spielen, ergibt sich aus einem Tiermodell, bei dem TRPC1 inaktiviert wurde. TRPC1-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Druck-induzierte Hypertrophie und einen verminderten durch Membranschwellung bzw. Angiotensin II induzierten Kationeneinstrom in Kardiomyozyten der hypertrophierten Herzen (Seth et al., 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beschriebenen TRPC-Kanäle unter anderem eine wichtige Rolle bei der Kontraktion und Proliferation von glatten Gefäßmuskulzellen, bei der Permeabilität und NO-Freisetzung von Endothelzellen und womöglich bei der Entstehung der Herzhypertrophie spielen. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen TRPC-Kanälen und einer Beeinflussung der Herzkontraktilität ist bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund könnten diese Kanäle in der Zukunft möglicherweise neue Zielstrukturen im kardiovaskulären System für Arzneimittel darstellen.

1.3.3.2 Funktionen von TRPM-Kanälen im Gefäßsystem und im Herzen

TRPM4 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der durch hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen aktiviert wird (auch CAN-Kanal, für Ca^{2+} -activated non-selective). CAN-Kanäle mit TRPM4-ähnlichen Eigenschaften wurden erstmals in kultivierten Herzmuskulzellen beschrieben (Colquhoun et al., 1981) und wurden seitdem in vielen Geweben, wie z.B. Neuronen, exokrinen Geweben, Niere und Endothel gefunden (Partridge and Swandulla, 1987; Siemen, 1993; Teulon et al., 1987). Das TRPM4 Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 19 und bei der Maus auf Chromosom 7. Es besteht aus 25 Exons und beinhaltet eine Größe von 54kb beim Menschen und 31kb im Mausgenom. In menschlichem Gewebe konnten TRPM4-Transkripte u.a. in Herz, Niere und der Lunge detektiert werden (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003; Xu et al.,

2001). Northern-Blot Analysen von unterschiedlichen Mausgeweben zeigen TRPM4 u.a. in Herz, Endothel der Aorta und Niere (Nilius et al., 2003). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass TRPM4 auch in der glatten Muskulatur exprimiert wird (Earley et al., 2004). Die Einzelkanalleitfähigkeit liegt bei etwa 23 pS, wobei unterschiedliche Sensitivitäten des Kanals für intrazelluläre Calcium-Konzentrationen beschrieben werden. Durch Herunterregulation der TRPM4-Expression mittels Antisense-Oligonukleotiden zeigten Earley et al., dass TRPM4 womöglich an der Druck-induzierten Depolarisation und der myogenen Vasokonstriktion von Cerebralarterien beteiligt sein könnte. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass TRPM4 in Zellen des Sinusknoten exprimiert wird und damit dort eine Funktion bei der Schrittmacheraktivität einnehmen könnte (Demion et al., 2007). TRPM4-Transkripte wurden im Ventrikel, Sinusknoten und in Purkinjefasern nachgewiesen. In Kardiomyozyten könnten TRPM4 Kanäle bei pathologischer Erhöhung der myokardialen Calcium-Konzentration aktiviert werden und verzögerte Nachdepolarisationen gefolgt von Tachyarrhythmien auslösen. TRPM4-ähnliche Ströme sind in ventrikulären Kardiomyozyten von spontan hypertensiven Ratten (SHR) hochreguliert (Guinamard et al., 2006). Dabei ist unklar, ob eine Aktivierung von TRPM4-Kanälen Ursache oder Folge der Hypertrophie ist. Kürzlich wurde darüber hinaus eine „gain of function“ Mutation in Exon1 des TRPM4-Gens von Patienten mit progressiv familiärem Leitungsblock Typ 1 (PFHB1) identifiziert (Kruse et al., 2009). Nach Rückenmarksverletzung wird die Expression von TRPM4 in Endothelzellen des das Trauma umgebenden Kapillaren hochreguliert und es kommt zu Einblutungen und neurologischen Ausfällen; in Abwesenheit von TRPM4 sind die Einblutungen und neurologischen Ausfällen drastisch vermindert (Gerzanich et al., 2009). Neben den beschriebenen Funktionen von TRPM4 im Gefäßsystem oder im Herzen gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Studien über TRP-Kanäle der Melastatin-Familie im Herz-/Kreislauf-System. Für TRPM2 konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal den durch H₂O₂ induzierten Anstieg der Endothelzellpermeabilität über einen Calcium-Einstrom vermittelt (Hecquet et al., 2008). Zusätzlich wurde kürzlich eine funktionelle Relevanz von TRPM3 bei kontraktilen und proliferativen Eigenschaften von glatten Muskelzellen beschrieben (Naylor et al.) und bis auf eine Beteiligung von TRPM7 bei der Magnesium-Homöostase in glatten Muskelzellen (He et al., 2005) gibt es bisher keine weiteren Studien über Funktionen von TRPM Kanälen im Herz/Kreislauf-System.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Bedeutung von TRPM4 und TRPC1/C4-Kanälen für die Blutdruckregulation mittels radiotelemetrischer Messungen an TRPM4- bzw. TRPC1/TRPC4-defizienten Mäusen zu charakterisieren. Da postuliert wird, dass diese TRP-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen, der NO-Freisetzung aus Endothelzellen, der neuronalen und Mastzell-vermittelten Regulation des Gefäßtonus sowie bei der Regulation der renalen Reninfreisetzung spielen könnten, sollte die Bedeutung von TRPM4 bzw. TRPC1/C4 in diesen Blutdruck-regulierenden Organsystemen untersucht werden. Dazu sollten Kontraktilitätsmessungen an isolierten Aortensegmenten durchgeführt werden und Messungen des peripheren Gefäßwiderstandes im isolierten Gefäßbett der Hinterpfoten zur Beurteilung der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen etabliert werden. Darüberhinaus sollte durch Applikation vasoaktiver Pharmaka der Beitrag dieser TRP-Kanäle zur Blutdruckregulation durch das autonome Nervensystem, die Endothel-abhängige bzw. glattmuskuläre Gefäßkontraktilität und die Herzfunktion analysiert werden. Weiterhin sollte der Einfluss der Gendelektionen auf den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt unter Einbeziehung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems untersucht werden.

Neben der Analyse des Blutdrucks sollte eine Methode zur Analyse der Degranulation von Bindegewebsmastzellen in der Haut von TRPM4-defizienten Mäusen etabliert und angewendet werden und die Auswirkung der Inaktivierung mehrerer in Betazellen des Pankreas exprimierter TRP-Kanäle auf die Glukosehomöostase mittels Glukosetoleranztest untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Aceton	Fischer Scientific, Schwerte
Acetylcholin, acetylcholine chloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (A6625)
Agarose, peqGOLD Universal	PeqLab, Erlangen (35-1020)
Albumin, Dinitrophenyl (DNP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (A6661)
[Pro ¹¹ , DAla ¹²] Angiotensin I	Bachem, Weil am Rhein (4039942)
Avertin (2-2-2 Tribromoethanol)	Fluka/Sigma-Aldrich, Deisenhofen (90710)
Braunol®	Braun, Melsungen
Calciumchlorid, CaCl ₂ *2H ₂ O	Roth, Karlsruhe (5239.1)
Dexmedetomidin	Orion Pharma, Finnland
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Applichem, Darmstadt (A1104)
EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethyl- ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (E4378)
Eosin	Merck, Darmstadt
Epinephrin, epinephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (E4642)
Ethidiumbromid, Ethidiumbromidlösung 1%	Roth, Karlsruhe (2218.2)
Eukitt, Eindeckmedium	Fluka/Sigma-Aldrich, Deisenhofen (03989)
Evans Blue	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (E2129)
1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB)	Fluka/Sigma-Aldrich, Deisenhofen (42080)
Formamid	Roth, Karlsruhe (6749.2)
Gewebekleber, Vetbond	3M, World Precision Instruments, USA
Glukose	Roth, Karlsruhe (X997.2)
Glutaraldehyd, 25 wt.% in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (G4004)
Hämalaun, Lösung nach Mayer	Roth, Karlsruhe (T865.2)
Heparin	Braun, Melsungen
Hexamethonium, Hexamethonium bro- mide	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (H0879)
IgE anti-DNP-HSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (clone SPE-7)
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Isoproterenol, DL-Isoproterenol hydro- chloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (I5627)

L-NAME, hydrochloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (N5751)
Kaliumchlorid, f. anal. Zwecke	Grüssing GmbH (6331)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (P018.1)
Magnesiumsulfat, MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker, 1Kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe (15615-024)
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
NaCl 0.9%, isotone Lösung	Braun, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat	Grüssing GmbH (12143)
Natrium-Pyruvat	Roth, Karlsruhe (8798.2)
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (A7257)
dNTP-Set, peqGOLD	PeqLab, Erlangen (20-2010)
Paraffin, Paraplast [®] regular	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (76257)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P6148)
PGF ₂ α,	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P0424)
Phenylephrin, L-phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P6126)
Prazosin, prazosin hydrochloride	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P7791)
Pregnenolon-Sulfat, pregnenolone sulfate sodium salt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P162)
Proteinase K	Applichem, Darmstadt (A3830)
Sonnenblumenöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (S5007)
Terg-A-Zyme	Alconox Inc.
Tween 80	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P8074)
Xylol	VWR, Darmstadt

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: TBE-Puffer (1x)

Komponente	Konzentration
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
	pH-Wert 8.3

Tabelle 2: PBS (1x)

Komponente	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ PO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
	pH-Wert 7.4

Tabelle 3: modifizierte Krebs-Henseleith-Pufferlösung

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	118 mM
Kaliumchlorid	4.7 mM
Caliumchlorid-Dihydrat	2.52 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1.64 mM
Natriumhydrogencarbonat	24.88 mM
Kaliumhydrogenphosphat	1.18 mM
Glucose	5 mM
Natrium-Pyruvat	1 mM
	pH-Wert 7.4

Tabelle 4: Hoch-Kalium Krebs-Heinseleith-Pufferlösung (40mM)

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	85 mM
Kaliumchlorid	40 mM
Caliumchlorid-Dihydrat	2.52 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1.64 mM
Natriumhydrogencarbonat	24.88 mM
Kaliumhydrogenphosphat	1.18 mM
Glucose	5 mM
Natrium-Pyruvat	1 mM
	pH-Wert 7.4

Tabelle 5: Calcium-freie Krebs-Henseleith-Pufferlösung

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	118 mM
Kaliumchlorid	4.7 mM

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1.64 mM
Natriumhydrogencarbonat	24.88 mM
Kaliumhydrogenphosphat	1.18 mM
Glucose	5 mM
Natrium-Pyruvat	1 mM
EGTA	1mM
	pH-Wert 7.4

Tabelle 6: Tribromethanol (Avertin) Stocklösung

Komponente	Konzentration
2,2,2-Tribromethanol	1g
Tertiärer-Amylalkohol (2-Methyl-2-butanol)	0.63 ml
	Unter Rühren bei 65°C lösen

Gebrauchslösung:

600µl der Avertin-Stocklösung bei 65°C in 50ml 0.9% NaCl-Lösung unter Rühren lösen. Die Gebrauchslösung lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahren.

2.3 In der Studie verwendete Mauslinien

Die Versuche wurden - falls nicht anders angegeben - an männlichen, zwei bis fünf Monate alten, Wildtyp- und TRP-defizienten Mäusen (TRP^{-/-}) durchgeführt.

Die Mauslinien mit definierten Mutationen im TRPC4- (Freichel et al., 2001) und TRPM4- (Vennekens et al., 2007) Gen wurden in unserem Labor hergestellt; die TRPC1- (Dietrich et al., 2007) defiziente Linie wurde im Labor von Prof. Dr. L. Birnbaumer (NIEHS) hergestellt und stehen im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung.

Die Versuchstiere sind adulte Mäuse aus Inzucht- oder Auszuchtlinien, bei denen ein einzelnes oder gleichzeitig zwei Gene von Kationenkanälen TRPC1, TRPC4 oder TRPM4 inaktiviert sind (Tabelle 7). Um mögliche genetische Einflüsse zu minimieren, wurden die Gen-defizienten Tiere durch Verpaarung mit Mäusen eines entsprechenden Inzuchtstammes auf einen definierten genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. Bei den Tieren mit Deletionen in mehreren Genen, bei denen diese Rückkreuzungen einen Zeitraum von mehreren Jahren erfordert, wurden Nachkommen der ersten Generation (F1) aus Verpaarungen von Tieren der Inzuchtlinien 129SvJ und C57Bl6/N als Kontrolltiere verwendet. Die 129SvJ-Mäuse (Stock Nummer 129/SvJlBm) wurden von der Fir-

ma BRL Biological Research (Füllinsdorf, Schweiz) bezogen und in der institutseigenen SPF-Tierhaltung weitergezüchtet. Die C57Bl6/N-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mauslinien und der entsprechenden Kontrolltiere:

Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Mauslinien

Gendeletion(en)	Genetischer Hintergrund	Kontrolltiere
TRPM4 ^{-/-}	129SvJ (N ≤ 6)	129SvJ
TRPM4 ^{-/-}	C57Bl6/N (N ≤ 6)	C57Bl6/N
TRPC1 ^{-/-} /TRPC4 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	129_BI6_F1*
TRPC1 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	129_BI6_F1*

* Nachkommen aus der ersten Generation (F1) von Verpaarungen der 129SvJ- mit C57Bl6-Inzuchtmäusen

** gemischter genetischer Hintergrund 129SvJ x C57Bl6

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 5\%$ und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in durchsichtigen Makrolonkäfigen (Fa. Techniplast) des Types II auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Zur Beschäftigung der Tiere wurden die Käfige zusätzlich mit einigen Blättern Zellstoff ausgestattet. Die Ernährung der Tiere erfolgte mit standardisiertem, pelletiertem Trockenfutter (Ssniff, V1534R/M-H) und Leitungswasser ad libidum. Das Futter war wie folgt zusammengesetzt: Rohprotein 19%, Rohfett 4%, Rohfaser 6%, Asche 7%, umsetzbare Energie 11.9MJ/kg (Angaben in % des Trockengewichtes).

Eine Woche vor Beginn der Versuche wurden die Mäuse aus der zentralen Tierhaltung in ihren Einzelkäfigen in das Versuchslabor transportiert, um durch eine vollständige Erholung von dem Transport und Eingewöhnung an die Laborumgebung eine stressbedingte Beeinflussung der Messergebnisse auszuschließen. Die Haltung und Fütterung der Tiere im Mauslabor erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben. Die Genotypen der Tiere waren dem Untersucher während der Durchführung der jeweiligen Experimente und der Datenanalyse nicht bekannt. Die Auflösung der Genotypen erfolgte erst im Anschluss an die Auswertung der gesamten Versuchsreihe.

Die Tierversuchsgenehmigungen wurden von der zuständigen Behörde des Saarpfalz-Kreises erteilt.

2.3.1 Genotypisierung

Die Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion an genomischer DNA. Eine Ohr- bzw. Schwanzbiopsie wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 200µl einer Proteinase K-Lösung der Konzentration 0.2 mg/ml versetzt und über Nacht in einem Thermoschüttler bei 55°C und 600 rpm inkubiert. Im Anschluß wurde die Proteinase für 20 min bei 95°C denaturiert und der Ansatz gegebenenfalls bei 4°C gelagert.

Tabelle 8: Primer, Amplifikatlänge und PCR-Bedingungen

Allel	Primer & Amplifikat	PCR-Bedingungen
<i>TRPM3</i>	A: 5'-GGCAGAGTGAGGGGAGAAAC-3'	1.5min bei 94°C
	B: 5'-AGGATAGAGCTTAAGTTCTCCC-3'	10 Zyklen:
	C: 5'-CGCAGCAACATTGTCATTTCC-3'	30s bei 94°C
		30s bei 65°C
	161bp Amplifikat für das WT Allel (B&C) und 235bp Amplifikat für das KO Allel (A&B)	(-0.5°C pro Zyklus) 30s bei 72°C
	26 Zyklen:	
		30s bei 94°C
		30s bei 60°C
		30s bei 72°C
		5min bei 72°C
<i>TRPM4</i>	A: 5'-TCCACCTTTCTTAGTTCACC-3'	2min bei 94°C
	B: 5'-GTTTGATGTCTCCTTCAGTCG -3'	35 Zyklen:
	C: 5'-CCAAAGCCTAGACTTAATTTCC-3'	30s bei 94°C
	D: 5'-GAGTTCCTGTCCTCCTAAAG-3'	30s bei 58°C
	523bp Amplifikat für das WT Allel (A&B) und 550bp Amplifikat für das KO Allel (C&D)	30s bei 72°C
		5min bei 72°C
<i>TRPM5</i>	A: 5'-TTCACCTGCCAGCCCTCATCTAC-3'	3min bei 95°C
	B: 5'-GGTGCCTCTGTTAGCTTCTCC-3'	32 Zyklen:
	C: 5'-GCCTGCTCTTACTGAAGGCTCT-3'	30s bei 95°C
		60s bei 65°C
		60s bei 72°C
		7min bei 72°C
<i>TRPC1</i>	A: 5'-GAGACTGTTGTCACAAGATGC-3'	Siehe Bedingungen <i>TRPM3</i>
	B: 5'-ACTTTGAGGGCAAAGGTTGCC-3'	
	C: 5'-AGAGGCCACTTGTGTAGCGC-3'	
	549bp Amplifikat für das WT Allel (A&B) und 617bp Amplifikat für das KO Allel (A&C)	

<i>TRPC3</i>	A: 5'-GAATCCACCTGCTTACAACCATGTG-3'	1.5min bei 94°C	
	B: 5'-GGTGGAGGTAACACACAGCTAAGCC-3'	10 Zyklen:	
		30s bei 94°C	
	800bp Amplifikat für das WT Allel und 300bp Amplifikat für das KO Allel	30s bei 67°C	
		(-0.5°C pro Zyklus)	
		30s bei 72°C	
		26 Zyklen:	
		30s bei 94°C	
		30s bei 62°C	
		30s bei 72°C	
		5min bei 72°C	
<i>TRPC4</i>	A: 5'-ACAGTGCTCTGAACCCACGG-3'	Siehe	Bedingungen
	B: 5'-CTCGCACCGGATGCCTTTGC-3'	<i>TRPM3</i>	
	C: 5'-GCCTGCTCTTTACTGAAGGCTCT-3'		
	290bp Amplifikat für das WT Allel (A&B) und 364bp Amplifikat für das KO Allel (A&C)		
<i>TRPC6</i>	A: 5'-CAGATCATCTCTGAAGGTCTTTATGC-3'	Siehe	Bedingungen
	B: 5'-TGTGAATGCTTCATTCTGTTTTGCGCC-3'	<i>TRPM3</i>	
	C: 5'-ACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC-3'		
	D: 5'-GGGTTTAATGTCTGTATCACTAAAGCCTCC3'		
	234bp Amplifikat für das WT Allel (A&B) und 339bp Amplifikat für das KO Allel (C&D)		

Die Auftrennung von DNA-Amplifikaten erfolgte durch Elektrophorese in 2%igen Agarosegelen. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer suspendiert, in der Mikrowelle erhitzt bis sie gelöst war und unter leichtem Rühren etwas abgekühlt. 300 ml der noch warmen Lösung wurden in Gelschlitten mit entsprechenden Kämmen ausgegossen und 15 µl Ethidiumbromid-Lösung (2%ige Lösung) eingerührt. Als Größenstandard wurde der selbst hergestellte pUC18/Hinfl (resultierende Bandengrößen: 1412, 517, 396, 220, 75, 65 bp) verwendet. Die zu trennenden DNA-Proben wurden vor der Beladung des Gels mit 5µl 1/10 DNA Ladepuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180V. Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Amplifikate wurden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera fotografiert.

2.4 Inhalationsnarkose

2.4.1 Aufbau der Anästhesieeinrichtung

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem Plexiglasbehälter, der mit einer weichen Unterlage gepolstert war.

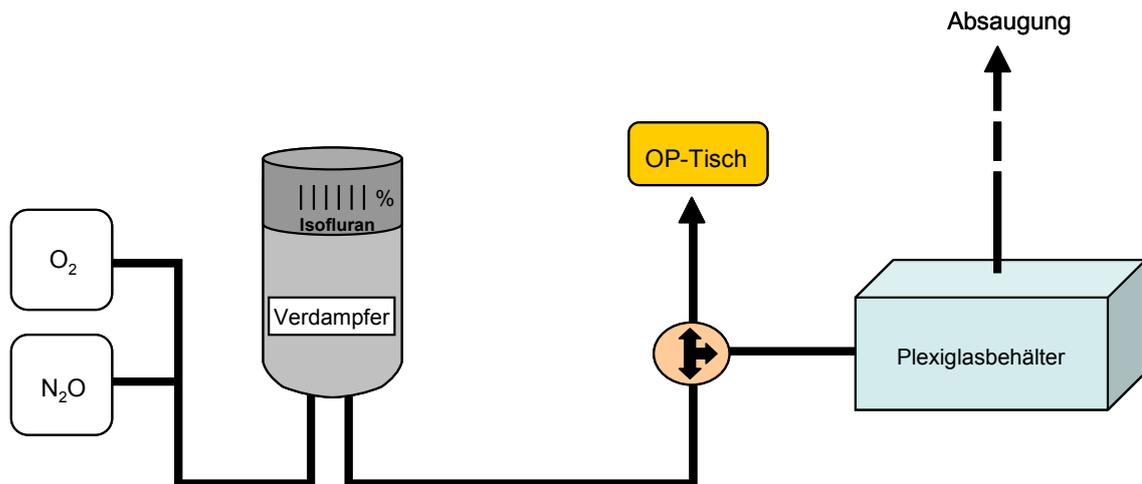


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der verwendeten Narkoseeinheit

Als Narkosegas wurde ein Gasgemisch aus Sauerstoff (Fa. Messer Griesheim, Nr. 0034), Lachgas (Stickoxydul pro narcosi, Fa. Messer Griesheim, Nr. 1200) und Isofluran verwendet. Der Sauerstoff (hausinterner O₂-Wandanschluss) und das Lachgas (externe Gasflasche) wurden über ein Schlauchsystem durch einen mit Isofluran gefüllten Verdampfer (Forane, Firma Abbott) in den Plexiglasbehälter oder zum OP-Tisch geleitet. Durch Verwendung eines Dreiweghahns kann der Fluss des Narkosegases zwischen Plexiglasbehälter und OP-Tisch umgeschaltet werden. Als Beatmungsmaske wurde eine abgeschnittene 10 ml Injektionspritze verwendet. Die Absaugung des Narkosegases erfolgte über das hausinterne Belüftungssystem (schematische Darstellung in Abbildung 3).

2.4.2 Durchführung der Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden die Mäuse in ein luftdichtes Plexiglasgefäß transferiert. Über einen daran angeschlossenes Schlauchsystem wurde das Gasgemisch beste-

hend aus Sauerstoff (1 l/min), Lachgas (0.05 l/min) und Isofluran (1.75%) eingeleitet. Die Mäuse wurden einzeln in die mit dem Narkosegas gesättigte Kammer gesetzt. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht ist, kann die Maus auf den OP-Tisch transferiert und fixiert werden. Über eine Maske wurde nun ein Narkose-Gasgemisch bestehend aus Sauerstoff (0.25 l/min), Lachgas (0.05 l/min) und Isofluran (1.2 - 1.5 %) eingeleitet.

Alle invasiven Eingriffe wurden unter einem Stereomikroskop (Zeiss) durchgeführt.

2.5 Telemetrische Blutdruckmessung

2.5.1 Versuchsaufbau

Die Möglichkeit hämodynamische Langzeitmessungen am wachen Tier durchzuführen, besteht in der Verwendung radiotelemetrischer Blutdrucktransmitter der Firma Data Sciences International. Hierbei ist der Drucktransducer in ein Implantat integriert, welches zusätzlich zum Drucksensor eine Batterie und einen Sender enthält. Durch die vollständige Implantation dieser Drucksensor- und Sendeeinheit ist es möglich, die intraarteriellen Druckwerte telemetrisch und dadurch ohne Beeinträchtigung der Tiere über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten zu registrieren. Das Signal wird über einen speziellen Empfänger (Receiver) empfangen und per Computer aufgezeichnet.

2.5.1.1 Aufbau der Transmitter

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Miniatur-Drucktransmitter des Typs TA11PA-C10 verwendet. Der Aufbau eines solchen Blutdruck-Transmitters für Mäuse ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Der Transmitter beinhaltet einen Drucksensor einer Größe von 1.5 x 1.5 mm. Dieser Sensor ist an Pyrex, einem Borosilicatglas, befestigt, um ihn von thermischem und mechanischem Stress zu isolieren. Auf diese Weise ist eine höhere Stabilität der Blutdruckmessungen gewährleistet. Die Elektronik zur Verstärkung des Sensorsignals, zur Abstimmung der Radiofrequenz und zur Weiterleitung der Informationen, ist auf einem mehrschichtigen Keramik-Hybrid lokalisiert und wird durch eine Batterie angetrieben.

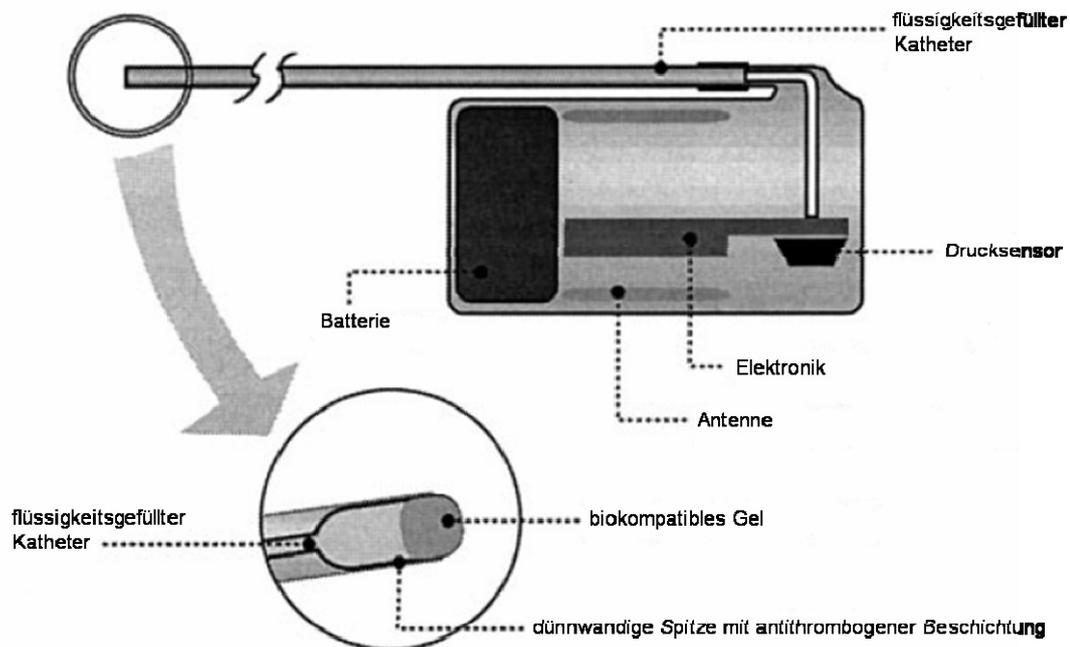


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Maus-Blutdruck-Transmitters. Ein 5 cm langer, flüssigkeitsgefüllter Katheter mit einer dünnwandigen Spitze (Vergrößerung) leitet den intraarteriellen Druck zu einem Sensor, welcher in dem intraperitoneal-gelegenen Implantat lokalisiert ist. Diese Einheit beinhaltet ebenfalls die Elektronik für die Signalverarbeitung und die Frequenz-Weiterleitung (modifiziert nach Mills et al., 2000).

Der arterielle Druck wird über einen 0.4 mm Durchmesser und 5 cm langen, flüssigkeitsgefüllten Katheter zu dem Sensor fortgeleitet. Der Katheter besteht aus zwei verschiedenen Abschnitten. Die distalen 4 mm bestehen aus dünnwandigem und flexiblem Urethan mit einer antithrombogenen Oberflächenbeschichtung. Die Funktion dieser dünnwandigen Spitze ist es, die hochfrequenten Komponenten des Drucksignals in das Lumen des Katheters weiterzuleiten. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass die Spitze des Katheters innerhalb des Blutgefäßes lokalisiert ist. Der übrige Teil des Katheters ist aus Urethan konstruiert, bestehend aus einer 0.1 mm dicken Wand und einem 0.2 mm starken Lumen, um eine Kombination aus geringer Dehnbarkeit und Knickbeständigkeit zu gewährleisten. Das Lumen ist mit einer gering-viskosen Flüssigkeit gefüllt, wobei die distalen 2 mm der dünnwandigen Spitze mit einem biokompatiblen Gel gefüllt sind, welches das Eindringen von Blut in das Katheterlumen und eine Thrombosebildung verhindert. Weiterhin weist der Katheter 1.5 cm von der Spitze entfernt eine Orientierungsmarke auf, die das korrekte Einführen in die Arterie erleichtert. Es war bekannt, dass diese Marke am Katheter bei einer 30 g schweren Maus etwa 4 mm weit in die linke A. carotis eingeschoben werden muss, damit die Katheterspitze im

Aortenbogen platziert ist. Die Elektronik, der Sensor und die Batterie sind in einem Gehäuse verpackt, welches mit Silicon-Elastomer beschichtet ist um die Biokompatibilität zu erhöhen. Das Gehäuse ist 13 mm lang und 9 mm breit. Das Gesamtgewicht des Implantates beträgt 1.4 g und das Volumen 1.1 ml. Die Einheit besitzt eine ständige Laufzeit von etwa 6 Wochen; es besteht jedoch die Möglichkeit mittels eines Magneten den Transmitter an- und wieder abzuschalten um gegebenenfalls auch über einen längeren Zeitraum nach Implantation messen zu können. Während der Batterielaufzeit wurden die Sender nach enzymatischer Reinigung wiederholt verwendet. Zusätzlich zur Druckmessung kann mit dem hier verwendeten Transmitter-Modell auch die körperliche Aktivität der Maus registriert werden. Die Detektion der Aktivität beruht auf einem Mechanosensor im Inneren des Transmitters, welcher ein Signal an den Receiver sendet, wenn dieser durch Bewegung des Tieres einen mechanischen Stoß erfährt.

2.5.1.2 Anordnung der Geräte

Die registrierten Druck- und Aktivitäts-Daten werden nach Konvertierung in ein analoges Radiowellensignal zu einem Receiver (RPC-1, Data Sciences Int.) weitergeleitet, der sich unterhalb des Käfigs befindet. Der Receiver leitet die Signale an einen Computer weiter. Dort werden die Daten gespeichert und können mit Hilfe der Dataquest A.R.T. Aquisition-Software analysiert werden. Zusätzlich wird über eine weitere an die Matrix angeschlossene Einheit (Ambient Pressure Reference, APR-1) der Umgebungsdruck registriert, so dass für jeden Messwert ein Referenzdruck vorhanden ist, mit welchem die aufgezeichneten Gefäßdrücke abgeglichen wurden.

2.5.1.3 Kalibrierung der Messgeräte

Die Geräte werden bereits vom Hersteller kalibriert. Es wird dennoch empfohlen vor Beginn der Experimente die Eichung zu überprüfen und neu durchzuführen. Zunächst wurde über einen Zeitraum von mehreren Tagen täglich der Umgebungsdruck aufgezeichnet und mit den Messwerten des deutschen Wetterdienstes verglichen. Da hierbei keine großen Diskrepanzen auftraten, wurde die Druckreferenz gemäß Hersteller als korrekt kalibriert erachtet.

Einen Tag vor der Implantation wurde der jeweilige Transmitter zur Stabilisierung der Elektronik mit einem Magneten eingeschaltet. Die von dem Transmitter ausgesendeten elektromagnetischen Wellen wurden zur Überprüfung mit einem Radio, welches die betreffende Frequenz empfängt, hörbar gemacht. Unmittelbar vor der Implantation

wurde dann die Abweichung des Messsignals von Null aufgezeichnet und registriert. Bei einer Abweichung von mehr als 1.5 mmHg wurde der Transmitter nicht verwendet. Nach Explantation des Transmitters wurde diese Abweichung, um eine eventuelle Abweichung der Messwerte feststellen zu können, erneut kontrolliert.

2.5.2 Implantation des Blutdrucksensors

2.5.2.1 OP-Vorbereitung und Narkose

Nach der Narkoseeinleitung wurde die Maus gewogen und auf eine vorgewärmte Heizplatte (37°C) überführt. Wenn der Schutzreflex der Maus, getestet durch Berühren der Hinterpfote mit einer Pinzette, erloschen war, wurde eine aus einer 2 ml Spritze hergestellte, schräg angeschnittene Inhalationsmaske unterhalb der Unterlippe festgenäht. Das über diese Maske applizierte Narkose-Gasgemisch wurde von dem Versuchstier eingeatmet (Abbildung 5A). Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde eine Salbe (Bepanthen, Roche) appliziert.

2.5.2.2 OP-Durchführung

Grundsätzlich wurde auf keimarme Arbeitsbedingungen geachtet. Es wurden sowohl sterile Lösungen als auch autoklaviertes Besteck verwendet. Die Operation erfolgte mit sterilen Handschuhen, Atemschutzmaske und Kittel.

Die gesamten nun folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter stereomikroskopischer Betrachtung. Zu Beginn wurde die Maus im Halsbereich mit einem elektrischen Haarschneider rasiert und dieser Bereich zur gesamten Haarentfernung mit einer Enthaaungscreme behandelt. Der Hals wurde im Bereich des Zungenbeins nach caudal bis zum Manubrium sterni in der Median-Linie eröffnet (Abbildung 5B). Mit einer stumpfen Schere wurde eine subkutane Tasche für das Transmittergehäuse an der rechten Flanke präpariert und diese mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Speicheldrüsen wurden mittels Wattestäbchen in ihre beiden Hälften geteilt und dadurch die Luftröhre freigelegt. Die beiden Drüsenhälften und die anliegenden Fettkörper wurden auf jeder Seite mittels Haltenähten fixiert (Abbildung 5C). Während der gesamten Operation wurde die Wunde mit steriler Kochsalzlösung feucht gehalten. Die A. carotis communis sinistra wurde vorsichtig mit feinen Pinzetten (FST Dumont forceps, Nr. 11251-35) von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und zusätzlich von dem parallel verlaufendem N. vagus getrennt (Abbildung 5D).

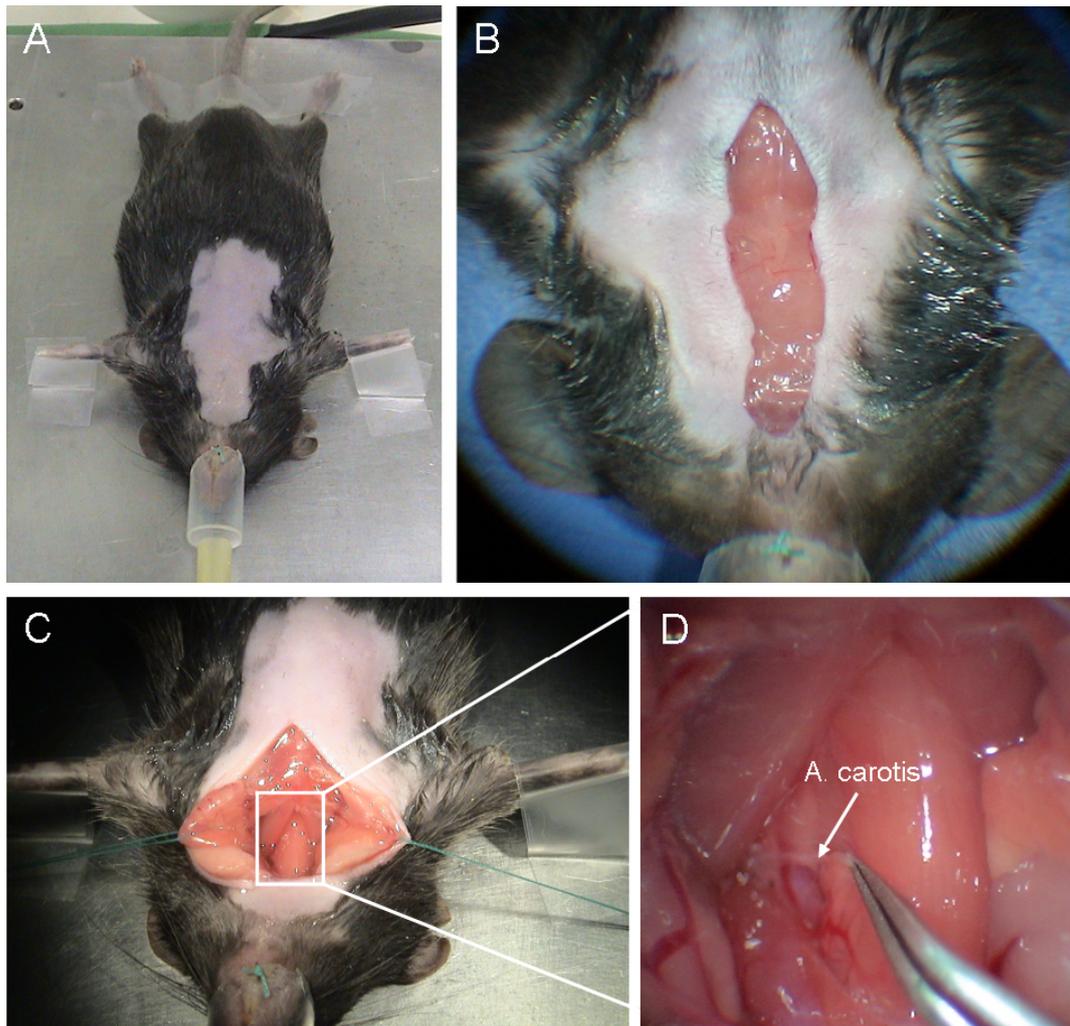


Abbildung 5: Fotografien zur Darstellung des mikrochirurgischen Eingriffes. (A) OP-Lagerung und Inhalationsnarkose, OP-Bereich enthaart. (B) Medianer Hautschnitt von Larynx bis Oberrand Sternum. (C) Lateralisierung der drüsigen Anteile und Fixierung mittels Haltenähten. (D) Nahaufnahme des OP-Bereiches mit Sicht auf die linke A. carotis.

Anschließend wurde die A. carotis communis sinistra mit einem Faden angeschlungen (Seide 7-0, Braintree Scientific, Inc.) und kranial möglichst nahe der Bifurkation ligiert. Dadurch konnte die A. carotis unter wenig Spannung fixiert werden (Abbildung 6A&B). Mittels eines Doppel-Gleitknotens wurden zwei weitere kaudale Ligaturen zur späteren Fixierung des Katheters vorgelegt. Zum Stoppen des Blutflusses wurde eine feine Gefäßklemme (Aesculap, Anpressdruck 0,25 N, Nr. FD562R) kaudal auf die Carotis gesetzt.

Vor der Implantation des Transmitters wurde dieser mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt und das Vorhandensein des biokompatiblen Gels in der Katheterspitze kontrolliert.

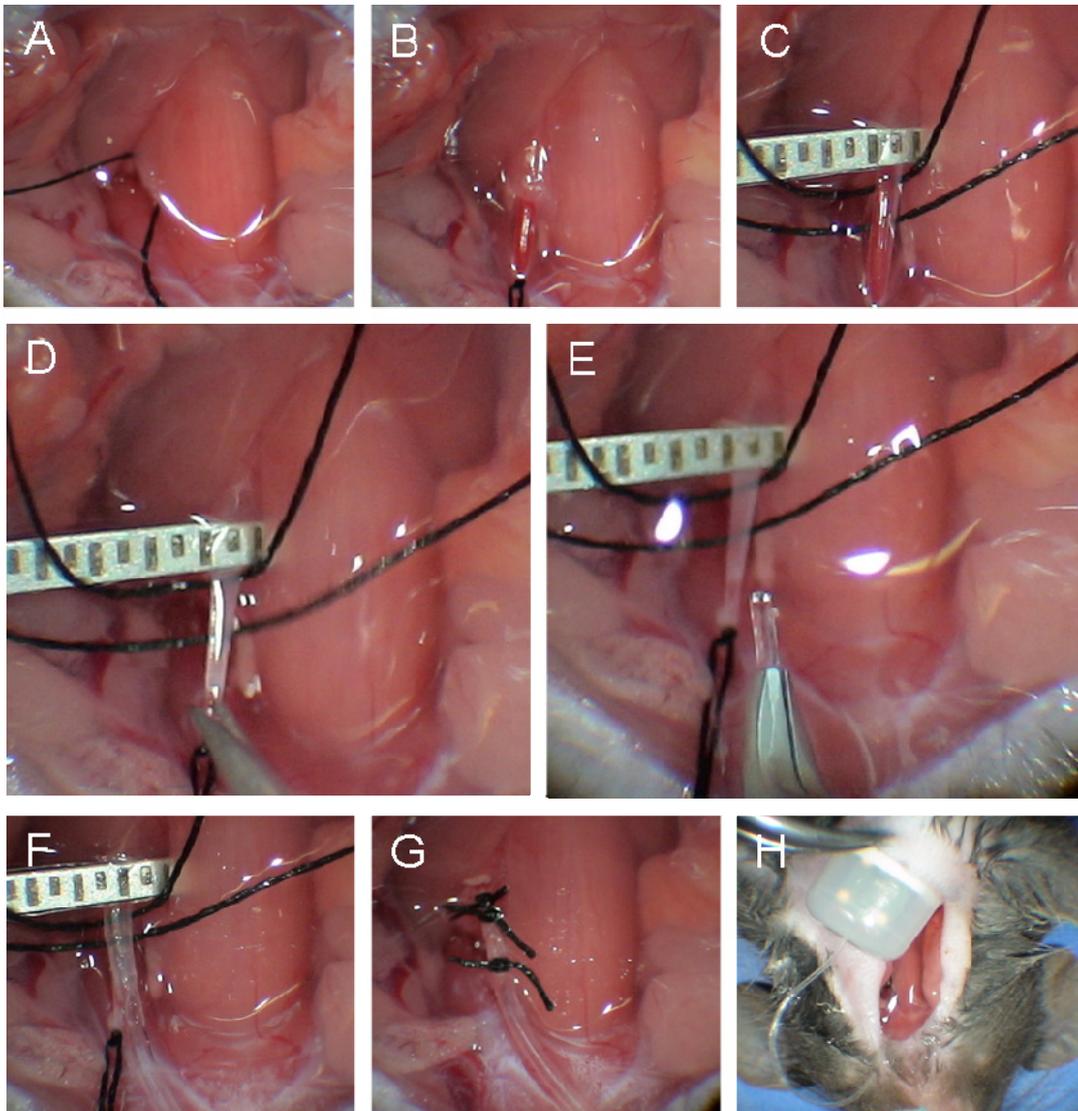


Abbildung 6: Fotografien zur Darstellung des mikrochirurgischen Eingriffes. (A) Anschlagung der linken A. carotis mit Fäden (B) Leichtes Mobilisieren der Carotis durch kraniale Ligatur (C) Kaudales Abklemmen des Gefäßes und Vorbereitung von 2 Fäden für die spätere Katheterfixierung (D) T-förmiger Anschnitt des Gefäßes mittels einer Mikroschere (E) Vergleich der Durchmesser von Gefäß und Katheter (F) Einführen des Katheters in die A. carotis. (G) Schließen der Katheterligaturen. (H) Subkutanes Platzieren des Transmitters in eine stumpf präparierte ventrolaterale Hauttasche.

Mit Hilfe einer Mikroschere (FST Mini-Vannas straight, Nr. 15000-00) wurde die unter Spannung stehende A. carotis T-förmig angeschnitten (Abbildung 6D). Das Kathete-

rende wurde darauf mit einer speziellen Gefäß-Pinzette (FST Vessel cannulation forceps, Nr. 00608-11) in die Arterie bis hin zur angelegten Gefäßklemme eingeführt (Abbildung 6E&F). Nach Öffnen der Gefäßklemme konnte der Katheter bis zur Orientierungsmarke (siehe Transmitter-Aufbau) in das Gefäß vorgeschoben werden. Nach Kontrolle der Blutdruckamplitude wurde der Katheter jetzt mit den vorgelegten Ligaturen und Gewebekleber (Vetbond 3M Tissue Adhesive, WPI) in der Arterie fixiert. Das Transmittergehäuse wurde – wie in Abbildung 7 dargestellt - in der dafür vorbereiteten subkutanen Tasche platziert, so dass der Katheter nun in einem Bogen von der linken Halsschlagader über die Trachea, entlang der rechten Flanke der Maus bis zum Transmittergehäuse lag.

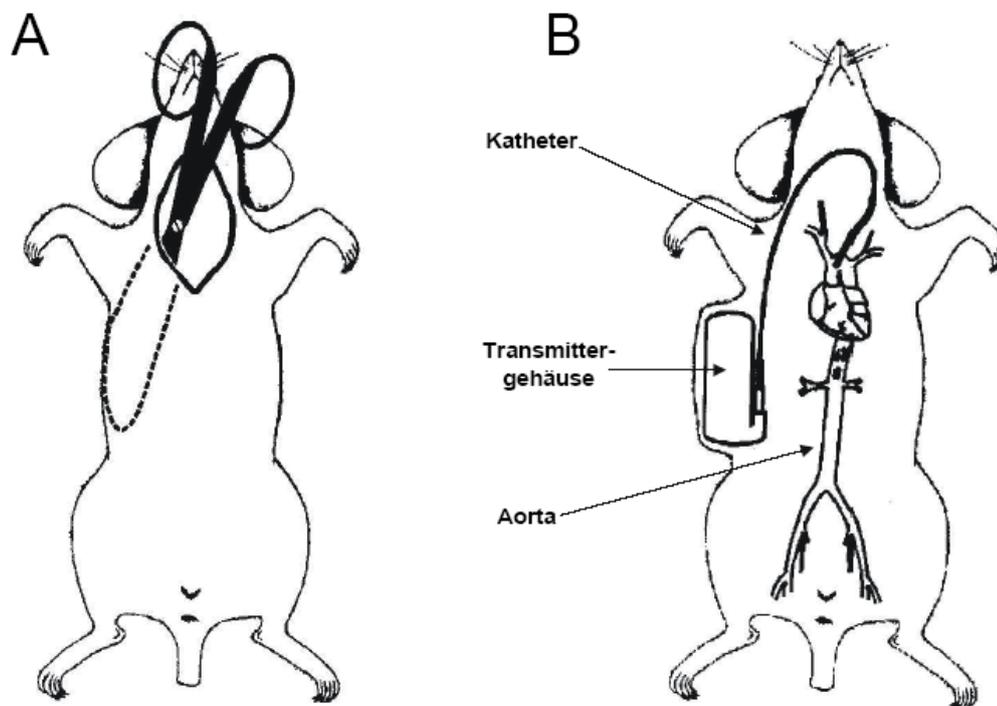


Abbildung 7: Subkutane Platzierung des Transmitter-Gehäuses. (A) Erstellung einer subkutanen Tasche (B) Schematische Darstellung der Lage des Transmitters.

Der Transmitter wurde zusätzlich in dieser Tasche mit Gewebekleber befestigt. Nach der Entfernung der Haltnähte an den Drüsen und deren Repositionierung wurde der gesamte OP-Situs nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Hautnaht erfolgte durch dichte Einzelknopfnähte (Mersilene 4-0). Die Wunde wurde mit Braunol® (Fa. Braun) desinfiziert und mit Gewebekleber abermals versiegelt. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes wurde der Maus physiologische Kochsalzlösung (0.15 ml/10g

Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Zur postoperativen Analgesie wurde der Maus zusätzlich etwa 20 Minuten vor Beendigung der Narkose Carprofen (Rimadyl® Injektionslösung, 5 mg/kg Körpergewicht in 100 µl NaCl 0.9 %) subkutan in den Abdominalbereich injiziert.

Das Narkosegas wurde abgedreht, die Atemmaske entfernt und die Maus in ihren Käfig zurückgelegt. Bis zum vollständigen Aufwachen war die Maus noch unter Beobachtung und wurde dann auf den entsprechenden Receiver transferiert.

2.5.2.3 Erholungsphase

Während der postoperativen Erholungsphase und auch an sämtlichen anderen Tagen wurden die Tiere hinsichtlich Beweglichkeit, Vigilanz, Pflegezustand des Fells sowie ihres Allgemeinzustandes untersucht. Die Operationswunde wurde täglich mit Braunovidon Salbe (B. Braun, Melsungen AG) versorgt und die Wundheilung beobachtet. Die Mäuse wurden täglich gewogen. Jeweils anschließend erfolgte eine Kontrolle der Lage der Implantate sowie der Amplitude des Blutdrucksignals. Einmal in der Woche wurden Käfige, Trinkwasser, Einstreu und Nistmaterial ausgewechselt. Während der gesamten Rekonvaleszenzphase lief die Messung in einem zeitlich definierten Messplan, wobei von jeder Maus alle drei Minuten der Blutdruck und die Aktivität über einen Zeitraum von zehn Sekunden aufgezeichnet wurden.

2.5.2.4 Wiederverwendung der Transmitter

Je nach Batteriezustand können die Transmitter mehrere Male wieder verwendet werden. Nach der Explantation wurden sie zunächst manuell von groben Gewebe- und Gewebekleber-Resten befreit und anschließend für 24 Stunden in eine enzymatische Reinigungsflüssigkeit (Terg-A-Zyme, Alconox Inc.) eingelegt. Nach der Reinigung von Nahtresten und kleineren Verschmutzungen wurden die Transmitter über Nacht in 2% Glutaraldehydlösung (Sigma) desinfiziert. Ebenfalls war es wichtig, das biokompatible Gel in der Katheterspitze zu erneuern, um eine weitere Signalweiterleitung zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde mit einer speziellen, vom Hersteller bezogenen Kanüle, unter dem Stereomikroskop neues Gel in die Spitze des Katheters injiziert. Transmitter, deren Batterielebensdauer abgelaufen war, konnten durch den Hersteller ausgetauscht werden.

2.5.3 Datenaufzeichnung und Datenanalyse

Die Dataquest A.R.T. Software beinhaltet zwei unterschiedliche Programme. Mit Hilfe des Datenakquisitionsmodules werden die eingehenden Rohdaten aufgenommen und gespeichert. Das Analysemodul dient der Auswertung aufgezeichneter Daten unabhängig von der Aktivität des Akquisitionsmodules. Das Analyseprogramm berechnet aus den Rohwerten die Herzfrequenz, den systolischen (SBP) und diastolischen (DBP) Blutdruck, die Blutdruckamplitude (Differenz zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck) sowie den mittleren arteriellen Druck nach folgendem Algorithmus $MAP = DBP + 1/3 (SBP - DBP)$. Die Aufzeichnung der Drucksignale erfolgte mit einer Abtastrate von 500 Hz. Dabei wurden zusätzlich zur wellenförmigen Druckkurve die Signalstärke als Maß für den Ladezustand der Batterie sowie die Aktivität der Tiere registriert.

Die Software beinhaltet acht Eingangskanäle für die Datenaufzeichnung. Dies bedeutet, dass acht Tiere gleichzeitig kontinuierlich gemessen werden können. Alternativ kann ein zeitlich definierter Messplan zugeordnet werden. Nach dem operativen Eingriff bis zu Beginn der intraperitonealen Pharmaka-Applikationen wurden die Daten alle 3 Minuten für 10 Sekunden aufgezeichnet. Zur Analyse des Zeitverlaufes der Kreislaufparameter wurden jeweils Stunden-Mittelwerte gebildet, und daraus wiederum ein Tagesmittelwert berechnet. Die gemessenen Parameter unter Basalbedingungen stellen wiederum einen Mittelwert der Tagesmittelwerte an den jeweilig angegebenen Tagen dar. Während der Pharmaka-Applikation wurde, entsprechend der Wirkdauer des jeweiligen Pharmakons, kontinuierlich gemessen. Die gemessenen Werte wurden nach Genotyp-Gruppen geordnet und Minutenmittelwerte gebildet, um anschließend für jede Gruppe den Gruppenmittelwert für systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck, sowie für die Herzfrequenz und die Aktivität bilden zu können. Zur Analyse der zirkadianen Rhythmik der Kreislaufparameter wurden Mittelwerte für jede Stunde gebildet. Um den durchschnittlichen Tagesverlauf darzustellen, wurden die korrespondierenden Mittelwerte für MAP, HF und Aktivität an den jeweiligen Tageszeitpunkten gemittelt und auf einer Zeitachse aufgetragen. Um die Kreislaufparameter unter körperlicher Aktivität und bei Inaktivität bzw. bei nur geringer körperlicher Aktivität zu vergleichen, wurde ein Schwellenwert von „9 counts pro Minute“ festgelegt.

Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, wobei ein p-Wert kleiner als 0.05 als signifikant erachtet wurde. Als Fehlermarker wurde stets der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) verwendet.

2.5.4 Intraperitoneale Applikation von Pharmaka

Zur Untersuchung der Bedeutung der TRP-Proteine für die Regulation des systemischen Blutdrucks und der Herzfrequenz wurden den Mäusen diverse Pharmaka intraperitoneal verabreicht (siehe Tabelle 9). Das Injektionsvolumen betrug immer 150 µl.

Vor der jeweiligen Injektion wurde zunächst über einen Zeitraum von 20 Minuten der Basalwert kontinuierlich aufgezeichnet. Anschließend wurde das betreffende Pharmakon intraperitoneal injiziert und die Maus sofort wieder in ihren Käfig zurücktransferiert. Die Dauer der kontinuierlichen Messung betrug je nach verwendeter Substanz zwischen 60 und 600 Minuten. Die Auswertung erfolgte durch Erstellung von Minuten-Mittelwerten der unterschiedlichen Parameter. Im Ergebnisteil werden jeweils die Absolutwerte oder die Änderungen der entsprechenden Parameter nach der Verabreichung der Medikamente und vorheriger 10-minütiger Baseline dargestellt. Zur Darstellung der Änderungen der Parameter wurde von jedem Messwert nach der Injektion der über den Zeitraum von 10 Minuten vor der Injektion berechnete Mittelwert subtrahiert.

Tabelle 9: Intraperitoneal applizierte Pharmaka

Wirkstoff (Substanz)	Dosis [mg/kg KG]	Referenz	Wirkdauer (~min)
Dexmedetomidin	0.01	(Davies et al., 2003)	100
Hexamethonium	20	(Zarrindast et al., 2001)	80
Isoproterenol	0.02	(VanderBrink et al., 1999)	60
L-NAME	25	(Brandes et al., 2000)	600
Norepinephrin	0.1, 0.3, 1.0	(Murata et al., 1995)	100
Phenylephrin	0.1, 0.3, 1.0	(Jumrussirikul et al., 1998)	100
Prazosin	1.0	(Shusterman et al., 2002)	120

2.5.5 Intravenöse Applikation von Pharmaka

Zur intravenösen Injektion wurde den Tieren ein venöser Katheter in die Vena femoralis implantiert. Der Katheter (Micro-Renathane: OD: 0.025; ID: 0.3 mm, 20 cm Länge) wurde vor der Operation auf Durchgängigkeit geprüft und anschließend luftblasenfrei mit einer Natriumchlorid-Lösung gefüllt. Bei diesem Eingriff erfolgte die Narkose der Tiere mittels Isofluran. Als Schmerzprophylaxe wurde den Mäusen Carprofen (5 mg/kg

KG) subkutan injiziert. Während der Operation lagen die Tiere auf einer 37°C warmen Heizplatte, um die Körpertemperatur konstant zu halten. Vor der Operation wurden der Nacken und das linke Hinterbein der Tiere rasiert, das übrige Fell mit Enthaarungscreme entfernt und anschließend mit Ethanol desinfiziert. Es erfolgte ein Hautschnitt entlang des Oberschenkels von etwa 1 cm oberhalb des Kniegelenkes bis in die Leiste. Durch Entfernen von Fett- und subcutanem Bindegewebe wurde der N. femoralis sowie A. und V. femoralis dargestellt. Nach subkutaner Präparation eines Tunnels entlang der Flanke nach cranial, wurde die Haut mit einem Dorn plus einem Katheter-Shuttle zwischen den Schulterblättern durchstoßen, mit dessen Hilfe nun der Katheter vom Hinterbein bis in den Nackenbereich geschoben werden konnte. Zur Erlangung freier Sicht auf das Femoral-Gefäß-Nerven-Paket wurden jeweils eine Haltenaht rechts und links des Hautschnittes und eine durch die Muskulatur der Bauchwand gelegt. Unter Schonung des Nerven wurden Arterie und Vene durch vorsichtige Präparation mittels zweier Pinzetten freigelegt und stumpf voneinander getrennt, wobei besonders auf die leichte Verletzbarkeit der Vene und kleinerer Gefäßabgänge geachtet werden musste. Die Vene wurde distal ligiert, proximal unterschlungen und dort eine Gefäßklemme gesetzt. Anschließend wurde sie mittels einer Mikroschere im spitzen Winkel angeschnitten und der vorbereitete Katheter bis hin zur Klemme in das Gefäß eingeführt. Die Gefäßklemme wurde geöffnet und der Katheter orthograd in das Gefäß hineingeschoben, die korrekte Lage durch Injizieren von etwas NaCl überprüft und durch eine zweite Ligatur der Katheter innerhalb der Vene fixiert. Bevor die Operationswunde mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen wurde, musste der Katheter nach Injektion einer Heparin-Lösung (50 I.E./ml) mit Hilfe von einer abgestumpften und nicht mehr durchlässigen Kanüle verschlossen werden. Anschließend erfolgte die Einführung des Katheterendes in einen Tygon-Schlauch (ID: 1.3, OD: 3.03 mm), welcher vor Benennung und anderen mechanischen Belastungen schützen sollte. An der Austrittsstelle des Katheters am Rücken war der Tygon-Schlauch mit einer Art Knopf versehen und wurde damit in der Nackenmuskulatur festgenäht. Die Wunde wurde mit Braunol desinfiziert. Die Tiere wurden nach dem Erwachen aus der Narkose in einen eingegengten Käfig transferiert, ein Haltefaden an der den Katheter verschließenden Kanüle befestigt und dieser mit Hilfe eines Stativs oberhalb aus dem Käfig geleitet. Der Faden wurde drehbar an dem Stativ befestigt.

Nach einer mindestens 2-stündigen Erholungsphase der Mäuse wurde mittels des Blutdrucktransmitters die Baseline als Rohsignal mit einer Abtastrate von 500 Hz kontinuierlich aufgezeichnet. Zur intravenösen Injektion wurden 1 ml Spritzen mit einer abgestumpften Kanüle verwendet. Zum Injektionsvolumen wurde zusätzlich das To-

traumvolumen des Katheters addiert und zum Luftblasen-freien Wechseln der Spritzen der Katheter mit einer beschuhten Arterienklemme verschlossen.

2.6 Blutentnahme an der Maus und Plasmagewinnung

Die submandibuläre Blutentnahme stellt eine verlässliche und schnelle Methode dar, mit der ohne Narkotisierung der Maus problemlos ein Blutvolumen von bis zu 0.2 ml entnommen werden kann (Golde et al., 2005). Das submandibuläre Gefäßbündel befindet sich an der caudalen Seite des Unterkiefers, ventrocaudal zum sogenannten lateralen Canthus rostralis des Auges. An diesem Punkt laufen die Venen der Augenhöhle, die submandibuläre Vene und weitere die Gesichtsregion versorgenden Venen zur Jugular-Vene zusammen.

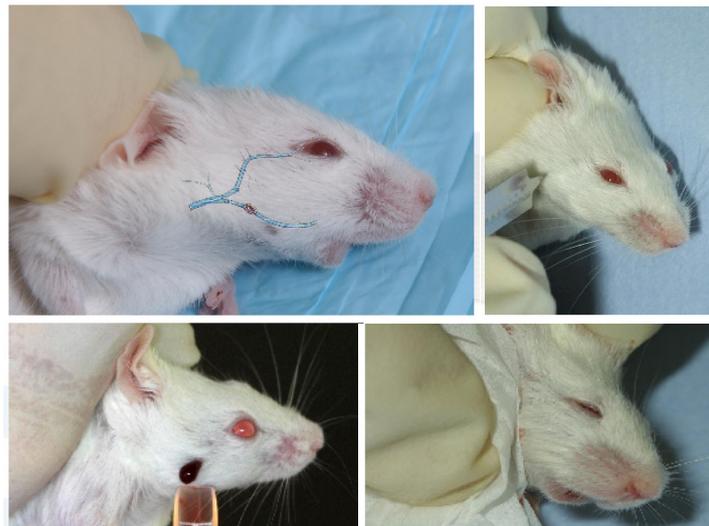


Abbildung 8: Submandibuläre Blutentnahme (modifiziert nach Medipoint International Inc.)

Zur submandibulären Blutentnahme wird die Maus manuell fixiert und anschließend das vaskuläre Gefäßbündel in der Mitte zwischen der Ohrbasis und ventral des Unterkiefers mit einer Lanzette oder Kanüle (20G x 1½“, 0.9 mm x 40 mm) punktiert (Abbildung 8). Das Blut wird in die dafür vorgesehenen Probengefäße aufgefangen. Der Blutfluss kann durch leichte Kompression mit einem saugfähigen Tuch jederzeit gestoppt werden.

Zur Plasmagewinnung wird das Blut in spezielle Probengefäße aufgefangen (Heparin- oder EDTA-Probengefäße, Sarstedt) und für 10 min bei 1300 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma kann nun in ein weiteres Gefäß überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden.

2.7 Bestimmung der Herzhypertrophie, des Hämatokrits und des Plasmavolumens

Durch die Berechnung des kardialen Hypertrophieindex erhält man einen Parameter für das Ausmaß einer Hypertrophie. Zur Bestimmung der Herzhypertrophie wurden die Herzen der Mäuse entnommen und die großen Gefäßstümpfe abgesetzt. Anschließend wurde das Gewicht der Herzen ermittelt und in Verhältnis zum Körpergewicht der jeweiligen Maus gesetzt.

Unter dem Hämatokrit versteht man den relativen Volumenanteil der roten Blutkörperchen aus Gesamtblut. Zur Bestimmung des Hämatokrit wurden Heparin-beschichtete Mikrokapillaren (Brand GmbH, Wertheim) mit durch submandibuläre Punktion entnommenem Blut befüllt, mit Knet verschlossen und für 10 min in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich Laborapparate, Schweiz) zentrifugiert. Der Anteil der Erythrozyten-Fraktion an der aufgetrennten Blutsäule wurde mit einem Lineal abgemessen und der Hämatokrit als prozentualer Volumenanteil der zellulären Blutbestandteile ermittelt.

Das Plasmavolumen stellt die zirkulierende Gesamtplasmamenge des Organismus dar und kann durch Injektion von bekannten Mengen eines Farbstoffs bestimmt werden. Zur Ermittlung des Plasmavolumens wurde die Evan's Blue Verdünnungsmethode verwendet (Skryabin et al., 2004). Die Mäuse wurden mittels Isofluran-Narkose anästhesiert und 30 µl einer Evan's Blue Stocklösung (0.5% w/v in steriler 0.9%iger Natriumchlorid-Lösung, sterilfiltriert) wurde intravenös in eine der Schwanzvenen injiziert. Fünf Minuten später wurde etwa 100 µl Blut durch submandibuläre Venenpunktion zur Bestimmung der zirkulierenden Evan's Blue Level gewonnen und die Mäuse anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Plasma-Proben (10 µl) wurden in 190 µl NaCl (0.9%ige sterile Natriumchloridlösung) verdünnt und die Konzentration des Farbstoffs bei 605 nm in einem Spektrophotometer (Infinite 200, Tecan Group Ltd.) gemessen. Die Verdünnung des Farbstoffs wurde durch Extrapolation von einer Evan's Blue Standardkurve, welche in Mausplasma vorbereitet wurde, errechnet.

2.8 Kontraktilitätsmessungen an isolierten Aortenringen in einer Organbadapparatur

Die Messung der Kontraktion an isolierten Gefäßsegmenten erlaubt eine Beurteilung der Kontraktilität der Blutgefäße unabhängig von nervalen bzw. neuronalen und humoralen Einflüssen. Die isolierte Organ-Apparatur ist eine vollautomatisierte Anlage zur Messung isometrischer und isotonischer Kontraktionen im Gewebeverband (glatte Muskulatur, Skelettmuskulatur, Myokard). Mit dieser Methode wurden Kontraktilitätsmessungen an TRPM4-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Aortensegmenten durchgeführt.

2.8.1 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden in einer isolierten Organ-Apparatur (IOA-5301, FMI GmbH Seeheim/Ober Beerbach) durchgeführt, die mit vier Organbädern ausgerüstet war. Die Apparatur besteht aus vier temperierbaren Organbädern (5 ml Volumen), welche mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast werden können. Die Gefäßringe wurden mit Hilfe von triangel-förmigen Adaptoren an den Organbadarmen fixiert und mit isometrischen Kraftaufnehmern verbunden. Der isometrische Kraftaufnehmer (TIM-1020, FMI-GmbH) ist über einen Brückenmessverstärker (MIO-0501, FMI-GmbH) durch einen dazwischengeschaltetes Interface (Power-Lab, ADInstruments) mit einem Computer verbunden.

Vor jedem Versuch wurde die Messapparatur durch Anbringen von unterschiedlichen Gewichten am Kraftaufnehmer geeicht. Das mit modifizierter Krebs-Henseleith-Pufferlösung gefüllte Organbad wurde mit einem Wasserbad (Thermo Haake) auf 37°C temperiert. Mit einem Handschaltpult (IOA-5330, FMI-GmbH) ließ sich die Badlösung automatisch austauschen. Der Badlösungswechsel konnte im Durchflussverfahren oder durch Leersaugen und erneutes Auffüllen erfolgen. Die Bäder konnten separat oder gemeinsam über einstellbare Timer gespült oder abgesaugt werden.

2.8.2 Isolation von Gefäßsegmenten der Aorta thoracalis

Zunächst wurde den Mäusen zur Vermeidung der Blutgerinnung Heparin (83 I.E./g Körpergewicht) und anschließend Avertin (25 µl/g Körpergewicht) als Narkosemittel intraperitoneal appliziert. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Maus auf dem Rücken liegend an allen vier Gliedmaßen befestigt. Die nun folgenden Präparationsschritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops.

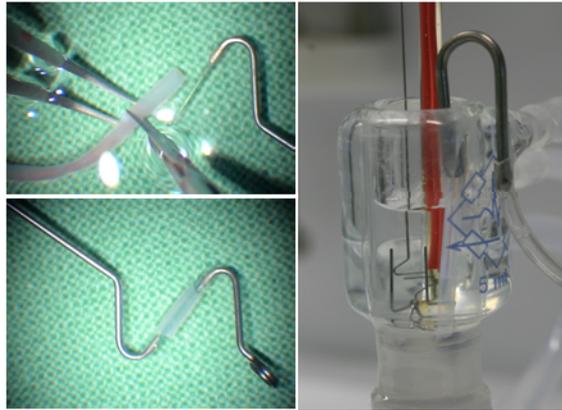


Abbildung 9: Fotografien von der Präparation der Aortenringe und deren Fixierung im Organbad.

Nach Eröffnen des Bauchraumes und des Thorax durch einen Medianschnitt wurden die inneren Organe seitlich fixiert und die Aorta thoracalis vorsichtig vom Aortenbogen entlang der Wirbelsäule bis zum Abgang der Nierenarterien freipräpariert, unter Vermeidung von jeglichem Zug und Druck entnommen und zur Erhaltung des physiologischen Milieus in eine vorbereitetes Gefäß mit Krebs-Henseleith Pufferlösung gegeben. Das Gefäßlumen wurde mit der physiologischen Lösung gespült und die Aorta wurde in drei der triangelförmigen Adaptoren des Organbades entsprechend große Teile (ca. 4 mm) zugeschnitten. Die Aorten-Ringe wurden an jeweils zwei Adaptoren angebracht und im Organbad befestigt (Abbildung 9).

2.8.3 Versuchsablauf und Auswertung der Kontraktilitätsmessungen

Nach dem Einbringen der Aorten-Ringe in die Organbäder wurden die Gefäßsegmente in einer Zeitspanne von einer Stunde schrittweise auf eine Ruhespannung von 1 g (entspricht 10 mN) vorgespannt, welche während des Experimentes aufrecht erhalten wurde. Jeder Aortenring wurde vor den Kontraktions- bzw. Relaxationsmessungen dreimal mit 40 mM KCl Krebs-Henseleith-Lösung vorkontrahiert. Bei dieser Badlösung wurde ein Teil der Natriumionen durch Kaliumionen ersetzt, wodurch die Zellen in der Gefäßwand depolarisiert werden. Diese Vorkontraktion diente der Agonist-unabhängigen Vorstimulation des kontraktlien Apparates und dem Nachweis der Kontraktionsfähigkeit der Segmente. Nur in den Fällen, in denen eine angemessene Kontraktion ausgelöst werden konnte, wurde das Experiment für das entsprechende Segment fortgeführt. Darauf erfolgte die Untersuchung der Kontraktions- bzw. der Relaxations-Antworten auf die Zugabe verschiedener Agonisten. Das Messprotokoll zur Un-

tersuchung der Kontraktilität von TRPM4-defizienten Aortenringen im Vergleich zu Wildtyp Aortenringen gestaltete sich wie in Abbildung 10 dargestellt. Die Untersuchung der glattmuskulären Kontraktionskraft der Aortenringe erfolgte zuerst durch kumulative Zugabe von Phenylephrin zur Badlösung. Vor Applikation einer höheren Konzentration wurde das Erreichen eines Plateaus abgewartet. Anschließend wurde durch mehrmaliges Waschen mit physiologischer Lösung die anfängliche Ruhespannung erreicht. Nach einer Vorkontraktion der Gefäßringe mit Prostaglandin-F2 α (3 μ M) und Erreichen eines Plateaus wurde die durch Acetylcholin induzierte Maximal-Relaxation gemessen und ausgehend von der Vorkontraktion die ausgelöste Relaxation in Prozent berechnet. Die Segemente, die eine Relaxation von weniger als 50% zeigten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da hierbei davon ausgegangen werden konnte, dass während der Präparation die Endothelzellschicht beschädigt worden war.

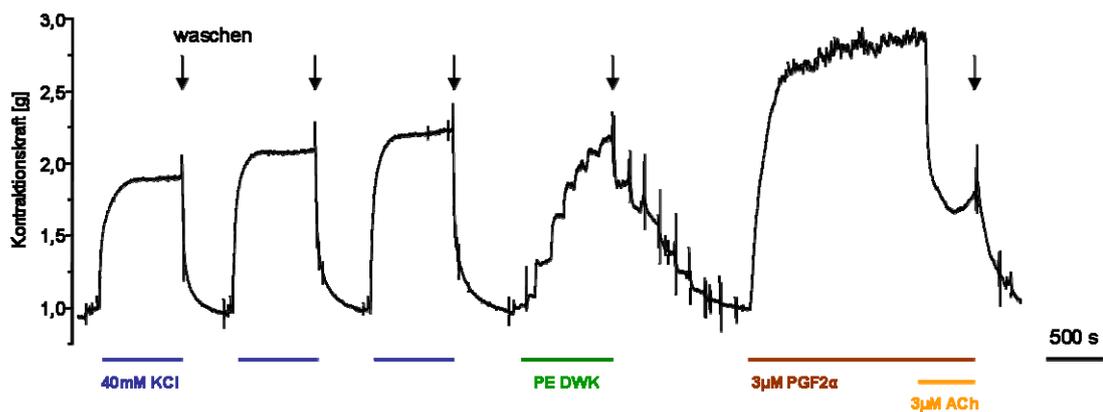


Abbildung 10: Protokoll zur Messung der Kontraktilität von Aortenringen im Organbad. Darstellung anhand einer Originalmessung; KCl: Kaliumchlorid, PE: Phenylephrin, DWK: Dosis-Wirkungs-Kurve, ACh: Acetylcholin.

Mit Hilfe der Computersoftware Chart 6 (ADInstruments) wurden die Messungen aufgezeichnet, anschließend wurden die Einzelwerte in Excel statistisch ausgewertet und mit dem Programm Origin 7.5 (OriginLab) graphisch dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden durch Anwendung einer logistischen Funktion gefittet:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$

In dieser Funktion beschreibt y die Kontraktionskraft bei einer gegebenen Agonisten-Konzentration. Der Parameter A_1 repräsentiert die Ausgangskraft in Abwesenheit des Agonisten, A_2 entspricht der maximal entwickelten Kraft bei der höchsten Agonisten-

Konzentration, x_0 repräsentiert die Konzentration, an der 50% der maximalen Kontraktionskraft erreicht sind und p entspricht einem Parameter, der die Steilheit der Funktion am Wendepunkt beschreibt.

2.9 Kontraktilitätsmessungen von Widerstandsgefäßen im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfoten

2.9.1 Versuchsaufbau

Das Perfusionssystem PS-1 (Hugo Sachs, Typ 834/7) kann sowohl zur Perfusion von Organen als auch dem Gefäßbett der Hinterpfoten von kleineren Tieren eingesetzt werden. Die Perfusion kann sowohl unter konstantem Perfusionsdruck als auch unter konstanter Flussrate erfolgen. Der Vorteil der druckkontrollierten im Vergleich zur volumenkontrollierten Perfusion besteht darin, dass es nicht zu durch Druckspitzen-induzierter Extravasation von Flüssigkeit ins Interstitium und damit zu Ödembildung kommt.

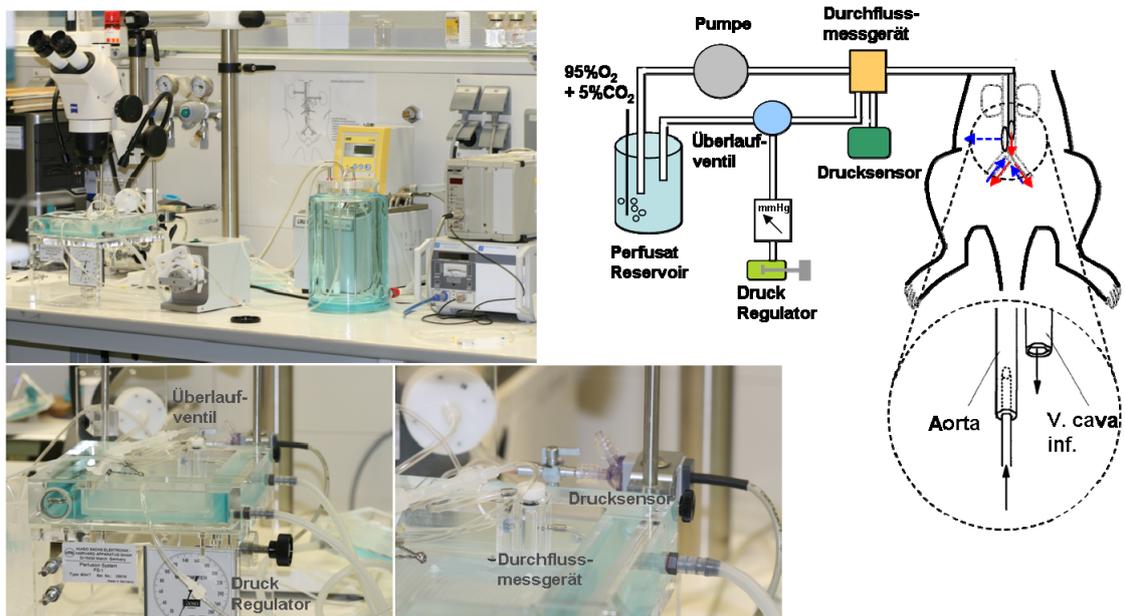


Abbildung 11: Fotografien und schematische Darstellung des Perfusionssystems zur Untersuchung der Kontraktilität des Hinterpfoten-Gefäßbettes.

Das System setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Ein doppelwandiges Glasgefäß mit einem Volumen von 2 Litern dient als Vorratsgefäß für das Perfusat. Mit einem Umwälzthermostat wird die Perfusionslösung in dem Vor-

ratsbehälter auf 37°C vorgeheizt und über eine Glasfritte mit Carbogen begast. Das Perfusat wird von dort mittels einer Rollerpumpe mit regulierbarer Förderleistung über ein Schlauchsystem vorbei an einem Drucksensor inklusive Blasenfalle und einem Flussmessgerät durch die Kanüle in die Aorta gefördert. Mit Hilfe des Ultraschall-Flussaufnehmers (Typ 1.5RB für T106, Hugo Sachs) wird der Perfusionsfluss oberhalb der Aortenkanüle gemessen. Hier befindet sich auch der Anschluss des Druckaufnehmers (Isotec, Hugo Sachs) für die Messung des tatsächlichen Perfusionsdrucks. Durch eine zwischengeschaltete Membran ist das System so konstruiert, dass dieses Überlaufventil die Rückflusspassage zum Vorratsgefäß freigibt, sobald der Perfusionsdruck den am Druckgeber eingestellten und am Manometer angezeigten Druck erreicht bzw. übersteigt. Damit sich der eingestellte Druck ausbilden kann, ist es erforderlich, dass die Pumpe prinzipiell mehr Perfusat pumpt, als durch das Organ fließt (Abbildung 11). Während des Versuches befindet sich das Präparat in einer feuchten, doppelwandigen Plastikkammer, welche ebenfalls über das Umwälzthermostat auf 37°C beheizt wird. Unmittelbar vor der Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes muss sichergestellt sein, dass das Perfusionssystem komplett bis zum distalen Ende der Arterienkanüle blasenfrei mit frischer Nährlösung gefüllt ist. Nach Passage des Gefäßbettes der Hinterpfoten fließt das Perfusat über die Vena cava ab. Im zuleitenden Schlauchsystem ist kurz vor Eintritt der Kanüle in die Aorta ein austauschbares Schlauchstück zwischengeschaltet, um dort Bolus-injektionen unterschiedlicher Substanzen einspritzen zu können. Das gesamte Schlauchsystem, mit Ausnahme des oben genannten Schlauchstückes, wird mehrfach verwendet und deshalb nach Abschluss eines Experimentes mit Aqua bidest perfundiert und anschließend mit Pressluft getrocknet.

Alle Daten wurden über ein elektronisches Differenzierungssystem, den Rückkopplungsverstärker und über ein Interface in einem Computer aufgezeichnet und anschließend mittels Excel und Origin ausgewertet.

2.9.2 Präparation

Zunächst erfolgte eine Vollheparinisierung mit 83 I.E./g Körpergewicht Heparin i.p., um die Bildung von Mikrothromben im Gefäßsystem zu verhindern. Außerdem wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Avertin narkotisiert (0.5 mg/g Körpergewicht). Sobald der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurde mit der Präparation begonnen. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend in die Kammer des Perfusionssystems positioniert. Durch eine mediane Laparotomie vom Becken bis zum Brustbein wurde das Abdomen eröffnet. Nach Darstellung des Retroperitonealraumes durch Re-

traktion der intraperitonealen Baueingeweide, wurde die Aorta abdominalis dargestellt. Sie wurde aus dem paraaortalen Bindegewebe freipräpariert, mobilisiert und für eine Ligatur zwischen Nierenarterie und Bifurkation vorbereitet. Um eine hohe Volumenbelastung durch das Perfusat im venösen Schenkel zu vermeiden, wurde vor Eröffnung der Aorta die Vena cava inferior longitudinal eingeschnitten, danach die Aorta mit einer kleiner Inzision eröffnet, die Kanüle unter laufender Perfusion eingeschoben und innerhalb des Gefäßes mit der vorbereiteten Ligatur fixiert (Abbildung 12). Anschließend wurde mit einem Druck von etwa 70 mmHg die Aorta orthograd perfundiert.

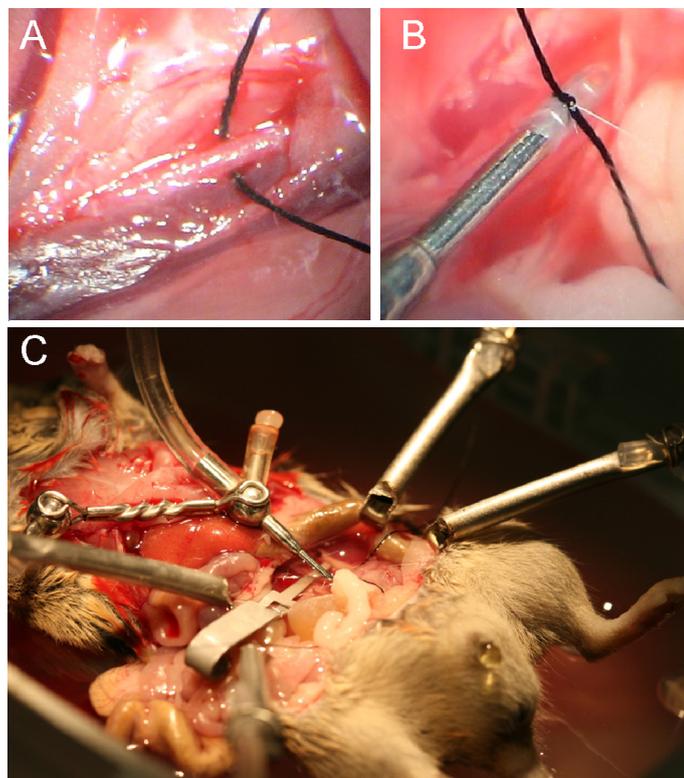


Abbildung 12: Fotografien der Präparation zur Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes. (A) Darstellung der Aorta abdominalis mit vorbereiteter Ligatur. (B) Fixierung der Perfusionskanüle im Gefäß. (C) Übersichtsaufnahme des Präparates in der feuchten Kammer.

2.9.3 Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes

Als Basislösung für die Perfusion des Hinterpfoten-Gefäßbettes wurde eine modifizierte, mechanisch gefilterte Krebs-Henseleith-Lösung (KHR) verwendet. Durch Begasen mit Carbogen und die dadurch stattfindende Reaktion von CO_2 und H_2O zu H^+HCO_3^- stellte sich ein physiologischer pH Wert von 7.4 ein. Für die Untersuchung des myoge-

nen Gefäßtonus wurde zusätzlich eine Calcium-freie Perfusionslösung angesetzt, welche der Basislösung entsprach und anstatt Calciumchlorid 1 mM EGTA enthielt. Diese Lösung wurde ebenfalls filtriert, in einem Wasserbad auf 37°C temperiert und mit Carbogen begast.

Vor Beginn der Experimente wurde nach Kanülierung der Aorta das Gefäßbett zunächst ca. 10 Minuten perfundiert und anschließend der Perfusionsdruck schrittweise auf 100 mmHg erhöht. Bei diesem Perfusionsdruck entwickelt sich ein spontaner myogener Gefäßtonus, weshalb eine Vorkontraktion zur Untersuchung vasorelaxierender Substanzen nicht notwendig war. Nach dem Erreichen eines stabilen Gefäßtonus wurden Phenylephrin, Epinephrin, Isoproterenol bzw. Acetylcholin in aufsteigenden Konzentrationen als Bolus von jeweils 200 µl appliziert. Diese Substanzen wurden direkt oberhalb der Aortenkanüle in den zuführenden Schlauch injiziert. Die Agonist-induzierten Änderungen des Perfusionsflusses bzw. des daraus errechneten Widerstands wurden grundsätzlich unter einem konstanten Perfusionsdruck von 100 mmHg durchgeführt. Bei stark relaxierenden Substanzen wie z.B. Acetylcholin musste darauf geachtet werden, dass die Pumprate erhöht wurde, um nach der Relaxation den Perfusionsdruck aufrechterhalten zu können. Das Ang I Analogon [Pro11, DAla12] Ang I wurde konstant über eine Minute als 1 µM Lösung perfundiert. Der Gefäßwiderstand wurde berechnet als Quotient von Perfusionsdruck und Perfusionsfluss.

Anhand einer Originalaufzeichnung ist in Abbildung 13 die Vorgehensweise zur Analyse der PE-induzierten Kontraktion der Widerstandsgefäße dargestellt. Mit der Software BDAS® von Hugo Sachs wurde alle 2 Sekunden der Perfusionsdruck und Perfusionsfluss aufgezeichnet. Während und auch nach dem Versuch konnten Markierungen in die Aufzeichnungen gesetzt werden, um den Injektionszeitpunkt, den basalen Ausgangswert vor Injektion eines bestimmten Agonisten, Injektionsartefakte sowie die Maximalreaktion zu kennzeichnen. Trotz des Überlaufventils steigt bei jeder Bolusinjektion der Druck während der Injektion für etwa 4 Sekunden kurzfristig an (Abbildung 13). Dieser artifizielle Druckanstieg wurde nicht mit in die Analyse einbezogen, wobei eine Überlagerung des Artefakts mit Agonist-induzierten Druckänderungen bei sehr geringen Agonist-Konzentrationen nicht immer vollständig ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 13).

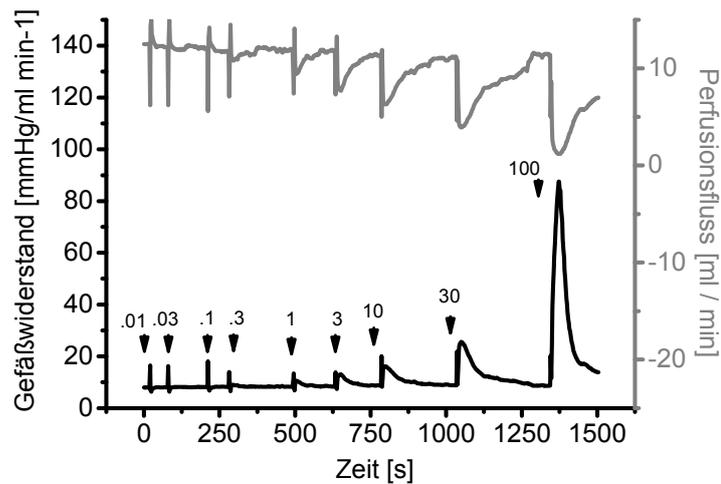


Abbildung 13: Originalmessung des Gefäßwiderstandes und des Perfusionsflusses von einer Wildtyp-Maus nach Applikation steigender Phenylephrin-Dosierungen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve im Gefäßbett der isoliert perfundierten Hinterpfoten.

Bei jedem durchgeführten Experiment wurden die Maximalreaktion einer jeweiligen Dosis und der dazugehörige Basalwert vor Injektion durch Bildung des Mittelwertes über 8 Sekunden ermittelt. Aus allen Einzelwerten der Versuche wurden die Mittelwerte für jeden Punkt der Dosis-Wirkungskurve berechnet.

Die myogene Antwort (Bayliss-Effekt) beruht auf einer dehnungs-induzierten Kontraktion der Gefäßmuskulatur, die damit einen Mechanismus zur Autoregulation der Organdurchblutung darstellt. Zur Untersuchung der myogenen Gefäßantwort im Modell der isoliert perfundierten Hinterpfoten wurde nach der oben beschriebenen, 10-minütigen Äquilibrationsphase unter Perfusion mit der Basislösung der Perfusionsdruck von 100 mmHg wieder schrittweise auf 50 mmHg reduziert. Es erfolgte nun eine stufenweise Erhöhung des Perfusionsdrucks um jeweils 10 mmHg in 2 Minuten-Abständen bis ein finaler Druck von 120 mmHg erreicht war. Anschließend wurde von der Basislösung zu der Calcium-freien Perfusionslösung gewechselt und das beschriebene Protokoll wiederholt, um die passive Gefäßantwort zu ermitteln (Abbildung 14). Bei C57Bl6/N Wildtyp-Mäusen mit einem geringeren Körpergewicht wurde das beschriebene Protokoll wie folgt modifiziert, um eine Ödembildung zu verhindern: stufenweise Erhöhung des Perfusionsdrucks von 40-90 mmHg in 1 Minuten-Abständen.

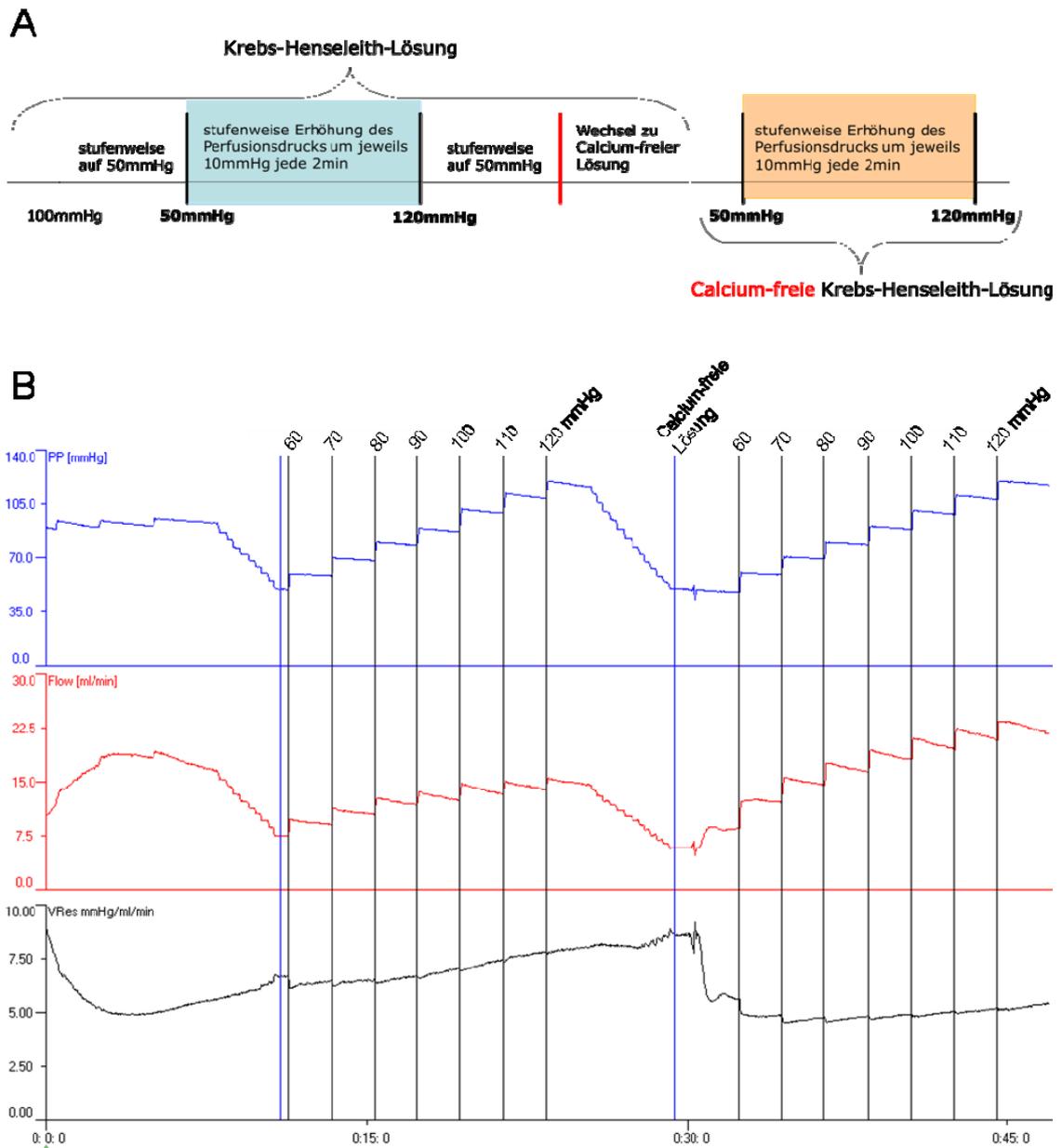


Abbildung 14: Untersuchung des myogenen Gefäßtonus. (A) Schematisch dargestelltes Protokoll des Experimentes zur Analyse der myogenen Gefäßantwort. (B) Screenshot einer Original-Aufzeichnung; PP: Perfusionsdruck, Flow: Perfusionsfluss, VRes: Gefäßwiderstand.

Bei jeder Druckstufe wurde die myogene Gefäßantwort des Hinterpfoten-Gefäßbettes aus der Differenz des Widerstandes von Calcium-haltiger zu Calcium-freier Lösung geteilt durch den Widerstand in Calcium-haltiger Lösung prozentual berechnet:

$$[\text{Gefäßtonus (myogener Anteil in \%)}] = \frac{\text{Gefäßwiderstand}_{\text{KHR}} - \text{Gefäßwiderstand}_{\text{Calcium-frei}}}{\text{Gefäßwiderstand}_{\text{KHR}}} \times 100$$

2.10 Isoliert perfundierte Mausniere

In einem ähnlichen Perfusionssystem, der isoliert-perfundierten Mausniere, wurden Experimente in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Frank Schweda, Universität Regensburg durchgeführt.

Nieren von Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen wurden perfundiert, wie in Schweda et al. beschrieben (Schweda et al., 2003). Die Aorta abdominalis wurde kanüliert, die rechte Niere entnommen, in eine temperierte feuchte Kammer platziert und mit einem konstanten Druck perfundiert. Die renale Vene wurde ebenfalls kanüliert und das venöse Effluat wurde zur Bestimmung der Renin-Aktivität und des venösen Blutflusses gesammelt. Als Basislösung für die Perfusion wurde eine modifizierte Krebs-Henseleith-Lösung, supplementiert mit Rinderserumalbumin und gewaschenen menschlichen Erythrozyten, verwendet.

2.11 Untersuchungen zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

2.11.1 Plasma-Renin-Konzentration und renale Renin-mRNA

Die Bestimmung der Renin-Aktivität und der renalen Renin-mRNA wurde im Labor von Prof. Frank Schweda (Universität Regensburg) durchgeführt.

Um die Plasmaneninkonzentration zu bestimmen, wurde in einer enzymatisch katalysierten Reaktion die Renin-abhängige Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen mit einem Radioimmunoassay der Firma Byk & DiaSorin Diagnostics ermittelt (Schweda et al., 2003). Durch submandibuläre Punktion des Venenplexus wurden Blutproben von Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen gewonnen, diese zentrifugiert und das Plasma in den Test eingesetzt. Der Test beruht auf der Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen unter optimalen Bedingungen. Dafür wurde ausreichend Angiotensinogen-Lösung, die aus dem Plasma von nephrektomierten Ratten gewonnen wurde, zugesetzt und durch eine selektive Enzymblockade mittels einer Phenylmethylsulfonyl-Lösung der Abbau von Angiotensin I verhindert. Die Bildung von Angiotensin I ist durch Renin enzymkatalysiert. Dabei ist die pro definierte Zeiteinheit gebildete Menge an Angiotensin I bei konstanten Reaktionsbedingungen proportional der Plasmaneninkonzentration. Das Prinzip des RIA basiert auf der Kompetition zwischen einer definierten Menge radioaktiv markiertem Angiotensin I und dem Angiotensin I aus den Probenan-

sätzen um eine begrenzte Zahl an Antikörperbindungsstellen. Nach einer Inkubation ist die Menge des gebundenen, markierten Angiotensin I reziprok proportional zu der Menge des freien Angiotensin I in dem Probenansatz.

Die Renin und β -Actin mRNA-Spiegel wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt (Wagner et al., 2007).

2.11.2 Bestimmung von Aldosteron im Plasma

Die Plasma-Aldosteron-Konzentration wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs der Firma DRG Instruments (Marburg, EIA-4410) bestimmt.

Das Prinzip dieses enzymatischen Immunoassays beruht auf der Konkurrenz zwischen einem unmarkierten Antigen (zu untersuchende Proben und Standards) und einem enzym-gekoppelten Antigen um eine limitierte Anzahl an Antikörper-Bindestellen auf der Mikrotiterplatte. Je höher die Antigen-Konzentration in der zu untersuchenden Probe ist, desto weniger markierte Antigen-Moleküle werden an die Antikörper gebunden.

Das Heparin-Plasma wurde durch submandibuläre Punktion des Venenplexus unter Vermeidung jeglicher Art von Stress für die Tiere und anschließender Zentrifugation gewonnen. Es wurden für alle Plasma-Proben Doppelbestimmungen durchgeführt und am Ende der Mittelwert berechnet. Zuerst wurden 50 μ l der Proben bzw. Standards mit 100 μ l des Konjugats für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. An die Oberfläche der Mikrotiterplatten ist ein Rabbit Anti-Aldosteron Antikörper gebunden. Hinzugegebenes Aldosteron aus Plasma konkurriert mit dem biotinylierten Aldosteron-Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) Konjugat um die Antikörperbindungsstellen. Die folgenden Waschschriffe mit 3 x jeweils 300 μ l Waschlösung entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschen wird das Enzym-Substrat (100 μ l) zugegeben, 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und diese enzymatische Reaktion wird durch die Zugabe 100 μ l einer Stopp-Lösung beendet. Das Enzymsubstrat besteht aus einem „Farbstoff“ (farblores Tetramethylbenzidin, TMB) und einem Peroxid (Wasserstoffperoxid). Durch die Peroxidase des Enzymkonjugats wird Wasserstoffperoxid in OH-Radikale gespalten, welche einer Aminogruppe des TMB ein Elektron entreißen. Das TMB-Radikalkation ist blau gefärbt. Nach einer definierten Zeit wird das Enzym mit verdünnter Schwefelsäure denaturiert, so dass es nicht mehr katalytisch aktiv ist. Durch die Protonierung des TMB-Radikalkations schlägt die Farbe von blau nach gelb um. Anschließend wird die Absorption bei 450 nm bestimmt; die Farb-Intensität ist invers proportional zu der Aldosteron-Konzentration in der Probe. Eine Standardreihe von Aldosteronlösungen bekannter Konzentration wird parallel angefertigt und eine

Kalibrierungskurve erstellt. Durch Interpolation der Messwerte mit dieser Kalibrierungskurve kann schließlich die Aldosteron-Konzentration der Blutplasmaprobe errechnet werden.

2.12 Bestimmung von Ionenkonzentrationen und Catecholaminabbauprodukten in Plasma bzw. Urin

Die Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentrationen in Urin und Plasma erfolgte mittels eines Flammenphotometers (Eppendorf) im Labor von Prof. F. Schweda. Metalle werden bei Erhitzung zur Emission von Licht angeregt, wobei für die einzelnen Elemente bestimmte Wellenlängen charakteristisch sind. Im Flammenphotometer wird die Elektrolytlösung im Luftstrom zerstäubt und in einer Gasflamme (Propan oder Acetylen) zur Emission angeregt. Die charakteristische Emissionslinie wird durch Spektralfilter selektiert und die Intensität photometrisch gemessen. Die Plasmaproben wurden durch Punktierung des submandibulären Venenplexus gewonnen (siehe Kapitel 2.6).

Angesäuertes 24h Sammel-Urin wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion durch Verwendung von handelsüblichen Kits für Vanillinmandelsäure (ClinRep Diagnostic Kit VMA in urine, Recipe Chemicals and Instruments, München) und für Metanephrin und Normetanephrin (BioRad Laboratories GmbH, München) analysiert.

Zur Bestimmung der Ionenkonzentrationen bzw. der Catecholaminabbauprodukte (Metanephrin, Normetanephrin und Vanillin-Mandelsäure) im Urin wurden die Mäuse in metabolische Käfige (Hatteras Instruments, USA) untergebracht, wo sie freien Zugang zu Futter und Trinkwasser hatten. Die Stoffwechselkäfige bestehen aus einem runden Plastikbehälter mit Gitterboden, in dem sich das Versuchstier befindet. Unterhalb des Gitterbodens ist ein zweites Plastikbehälter lokalisiert, worin ein speziell aus Metall gefertigter Trichter eingehangen wird. Dieser Trichter ist so konzipiert, dass der durch das Gitter laufende Urin und herabfallende Kot in ein Urin-/Kot-Trennstück geleitet wird. Der Urin sammelt sich an der Außenseite des Trennstücks und tropft in ein Sammelgefäß ab, wohingegen der Kot durch das Trennstück am Sammelgefäß vorbeigeleitet wird. Nach 3 aufeinander folgenden Tagen Eingewöhnungsphase, erfolgte für 24h die Urinsammlung. Die Stoffwechselkäfige wurden täglich gereinigt. Hierzu wurde das Versuchstier entnommen und Körpergewicht, Wasser- und Futterverbrauch notiert. Die Urinsammelgefäße wurden gewechselt und gewogen, um die Urinmenge zu ermitteln. Nach der Reinigung der Käfige wurden diese neu mit Futter, Wasser und Urinsammel-

röhrchen bestückt und das Versuchstier wieder eingesetzt. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.13 Bestimmung von Catecholaminen in Mausplasma

Epinephrin- und Norepinephrin-Konzentrationen im Plasma wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion im Institut für Pharmakologie über Herrn Prof. F. Schweda in Regensburg bestimmt. Die Blutproben wurden durch submandibuläre Punktion (siehe Kapitel 2.6) des Venenplexus 10 Sekunden nach Fixierung der jeweiligen Maus gewonnen (Ritthaler et al., 1997). Um die Auswirkungen des Handling-Stresses der Mäuse auf die Messergebnisse möglichst gering zu halten, wurden nur Proben analysiert, die sofort nach einmaliger Fixierung und Punktierung gesammelt werden konnten.

2.14 Histologie der Nebennieren

2.14.1 Intrakardiale Perfusion und Paraffineinbettung

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte zunächst eine Vollheparinisierung mit 83 I.E. Heparin je Maus, um die Bildung von Mikrothromben im Gefäßsystem zu inhibieren. Außerdem wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Avertin anästhesiert. Für die kardiale Perfusion mit PBS und 4% PFA/PBS wurde die Maus mit gespreizten Extremitäten auf einer Styroporplatte unter einem Stereomikroskop fixiert. Es erfolgte die Eröffnung des Peritoneums und des Thorax. Das ausgeschnittene Segment Thoraxwand wird aufgeklappt und in kranialer Richtung fixiert. Mit einer Mikroschere wird der linke Ventrikel punktiert und über eine Metallkanüle (Fine Science Tools, Heidelberg), welche an das PBS- bzw. PFA/PBS-Reservoir über Schläuche angeschlossen ist, in die linke Herzkammer eingeführt, so weit wie möglich in den Aortenbogen vorgeschoben und mit einer Klammer fixiert. Unmittelbar anschließend wird der rechte Vorhof perforiert und das Gefäßsystem mit PBS gespült. Nach vollständiger Perfusion, erkennbar am PBS-Ausfluss aus dem rechten Vorhof, wird das Ventil vor der Kanüle umgeschaltet und das Gefäßsystem mit 4% PFA/PBS perfundiert. Anschließend werden die Nebennieren entnommen und nochmals über Nacht in 4% PFA/PBS fixiert.

Die fixierten Präparate wurden in Histologie-Kassetten umgelagert. Die Entwässerung und Paraffineinbettung erfolgte in einem Einbettautomaten (Tissue Tek VIP Vacuum Infiltration Processor 2000, Model 4622, Miles Scientific, USA). Dabei wurden die Nebennieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 40°C dehydriert (jeweils 1h in 70%, 80%, 90%, 96% und 2 x 1h in 100% Ethanol) und nach zwei Bädern in Xylol in Einbettungsmaterial „Paraplast“ (A6330, Sigma Aldrich, Taufkirchen) eingebettet. Die Präparate wurden jeweils aus den Einbettkassetten genommen und in kleine Edelstahlwannen („Cryomolds“, Bio Optica, Mailand, Italien) platziert. Anschließend wurde vorgewärmtes (ca. 60°C) Einbettungsmaterial auf die Präparate gegeben, der Deckel der Einbettkassette auf die Edelstahlwanne gegeben und alles auf einem Kühlelement (vorgekühlt, -20°C) abgekühlt.

2.14.2 Erstellung von Gewebeschnitten und HE-Färbung

Zur Erstellung der Gewebeschnitte wurde der Gewebe-Paraffinblock in ein Mikrotom (Reichert-Jung, 2040) eingespannt, parallel zum Messer ausgerichtet und 5 µm starke Schnitte angefertigt. Diese wurden zuerst in einem Wasserbad bei Raumtemperatur geglättet und anschließend auf einen Objektträger transferiert, nochmals auf einer Heizplatte bei 50°C gestreckt und getrocknet. Zum Ablaufen des Paraffins wurden die Präparate für 30 min bei 90°C im Brutschrank inkubiert.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebeschnitten stellt eine Standardmethode in der Histologie dar: Bei dieser Färbetechnik werden basophile Zellkerne mit Hämatoxylin blau und eosinophile Strukturen wie das Zytoplasma, Kollagen oder Muskeln mit Eosin rosa bis rot gefärbt. Die in Paraffin fixierten Gewebeschnitte wurden in einer Xylol/Ethanolreihe deparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte 2 x 3min in Xylol und je 2 x 2min in 100%, 96% und 70% Ethanol und Leitungswasser inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in Mayers Färbelösung überführt. Die Färbung wurde durch Waschen (1 min) unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Präparate 20 Sekunden in HCl-Ethanol differenziert. Nach 10 min Wässern unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte 5-10 min in Eosin gefärbt. Danach wurden die Präparate kurz in Aqua bidest getaucht. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe: kurz 2 x in 70% Ethanol und jeweils 2 x 2min in 96% und 100% Ethanol. Nach 2 x 2min Waschen in Xylol wurden die Schnitte in Depex eingedeckt. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Nebennierenschnitte mit 5-, 10- und 32-facher Vergrößerung fotografiert (Zeiss, AxioVision).

2.15 Analyse von motorischer Aktivität und Exploration in Offenfeld (open field) Versuch

Der Open Field Test ist ein weit verbreiteter Test bei Nagern zur quantitativen Darstellung der motorischen Aktivität und des Erkundungsverhaltens (Crawley, 2008). Der Test wurde jeweils an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dabei ist es besonders wichtig die Personen, Umgebungsgeräusche, Uhrzeit sowie alle weiteren möglichen Einflussfaktoren konstant zu halten. Die Open-field Apparatur ist eine definiert große ($37.5 \times 76.5 \text{ cm}^2$), durch Wände begrenzte Fläche, deren Boden in 20 Quadrate gleicher Größe eingeteilt ist. Die Versuchstiere werden einzeln ohne Habituation in die Mitte des Feldes gesetzt und über einen Zeitraum von 5 Minuten bestimmte Verhaltensweisen der Mäuse beobachtet und protokolliert. Wichtige Parameter der Bewertung sind die motorische Aktivität ermittelt durch die Anzahl der überquerten Linien, wobei die diagonale Überquerung von Quadraten als zwei überquerte Linien gewertet wurde, und das individuelle Verhalten. Das Erkundungsverhalten jeder Maus wurde anhand der Aufrichtungen an der Seitenwand sowie mitten im Raum gemessen. Auch die Häufigkeit des Putzens und die Abgabe von Kot und Urin wurde protokolliert. Da der Versuch an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wird, ist zu beachten, dass sich die Versuchstiere an die Umgebungssituation gewöhnen (Habituation) und dadurch das Erkundungsverhalten und die motorische Aktivität mit jedem Tag geringer werden sollten. Diese Wiederholungen ermöglichen Rückschlüsse auf das Erinnerungsvermögen.

3 Ergebnisse

3.1 Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse: eine integrative Analyse beteiligter Organe und deren Funktionen

Zur eindeutigen Identifizierung von TRPM4 Proteinen in Zellen oder Geweben des kardiovaskulären Systems wurden von Dr. M. Meissner in unserem Institut Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Proteinfractionen von Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen und einem affinitäts-gereinigten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen, welcher gegen das aminoternale Ende von Maus-TRPM4 gerichtet ist, durchgeführt (Vennekens et al., 2007). Ähnlich, wie bereits in Mastzellen beschrieben, konnten TRPM4-Proteine einer Größe von 138 kD in Endothelzellen der Aorta, im Vorhof und Ventrikel, in der Niere und in der Nebenniere von Wildtyp- aber nicht von TRPM4^{-/-} Mäusen detektiert werden. Da TRPM4-Proteine Calcium-aktivierte Kationenkanäle darstellen, welche das Membranpotential und den Calcium-Einstrom in Mastzellen regulieren, lag die Vermutung nahe, dass TRPM4 aufgrund der Expression in den oben genannten Geweben eine Rolle bei der Blutdruckregulation spielen könnte.

3.1.1 TRPM4-defiziente Mäuse sind hypertensiv

Zur Charakterisierung der kardiovaskulären Funktionen in TRPM4-defizienten Mäusen wurden zuerst die basalen hämodynamischen Parameter mittels Radiotelemetrie bestimmt. Diese Methode erlaubt das gleichzeitige Aufzeichnen von Blutdruck, Herzfrequenz und physischer Aktivität an frei beweglichen Tieren. Nach der Implantation des Blutdruck-Transmitters zeigten die Mäuse typischerweise erhöhte Blutdrucklevel, welche sich im Laufe einer Woche auf ein Basalniveau einstellten (Abbildung 15A). Während dieser Anfangsperiode, welche in den TRPM4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen unverändert war, erholten sich die Tiere von der Anästhesie und dem operativen Eingriff. Im Anschluss an die Erholungsphase konnte der mittlere arterielle Druck unter Ruhebedingungen gemessen werden. Dieser war im Mittel von Tag 9-13 nach Operation in den TRPM4^{-/-} Mäusen um ~11 mmHg erhöht (WT 101.9±0.5 und TRPM4^{-/-} 112.8±0.7 mmHg, p<0.001) (Abbildung 15A, D).

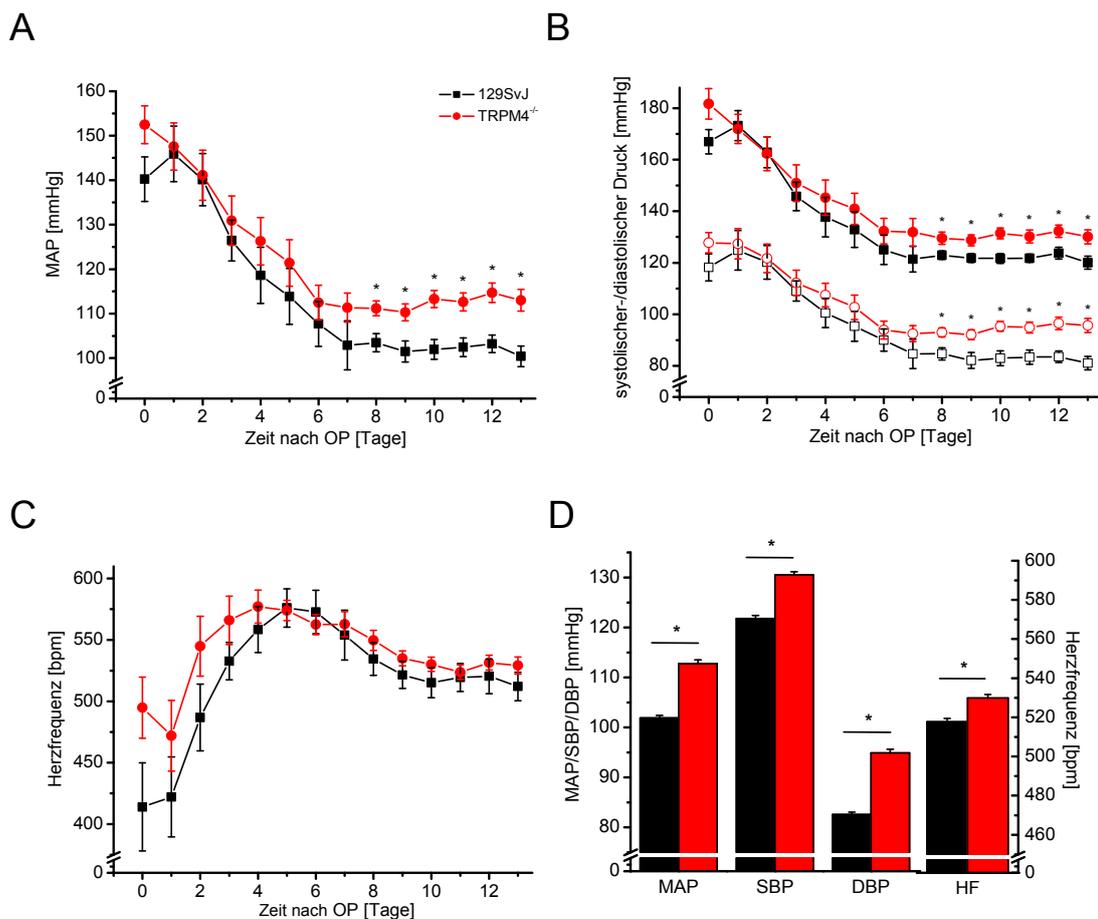


Abbildung 15: Erhöhter Blutdruck in TRPM4-defizienten Mäusen. (A-C) Zeitverlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP, * $p < 0.01$, A), des systolischen- (SBP, * $p < 0.05$) und diastolischen (DBP, * $p < 0.01$) Blutdrucks (B) und der Herzfrequenz (HF) (C) in Wildtyp (schwarz, $n = 7-13$) und TRPM4^{-/-} Mäusen (rot, $n = 8-15$) nach Implantation des Blutdrucktransmitters. Dargestellt sind 24h Tagesmittelwerte. (D) Mittelwerte von MAP, SBP, DBP und Herzfrequenz von Tag 9-13 nach Operation.

Unter diesen Basalbedingungen waren sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck signifikant erhöht (SBP: WT 121.8 ± 0.6 und TRPM4^{-/-} 130.5 ± 0.6 mmHg, $p < 0.001$; DBP: WT 82.6 ± 0.5 und TRPM4^{-/-} 94.9 ± 0.7 mmHg, $p < 0.001$), wobei der größte Unterschied im diastolischen Blutdruck zu sehen war (Abbildung 15B, D). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Zeitverlauf der Herzfrequenz verglichen an den jeweiligen Einzeltagen, aber im Mittel der Tage 9-13 nach Implantation war die Herzfrequenz leicht erhöht (Abbildung 15C, D) (HR: WT 517.7 ± 1.8 und TRPM4^{-/-} 529.9 ± 1.8 bpm $p < 0.05$).

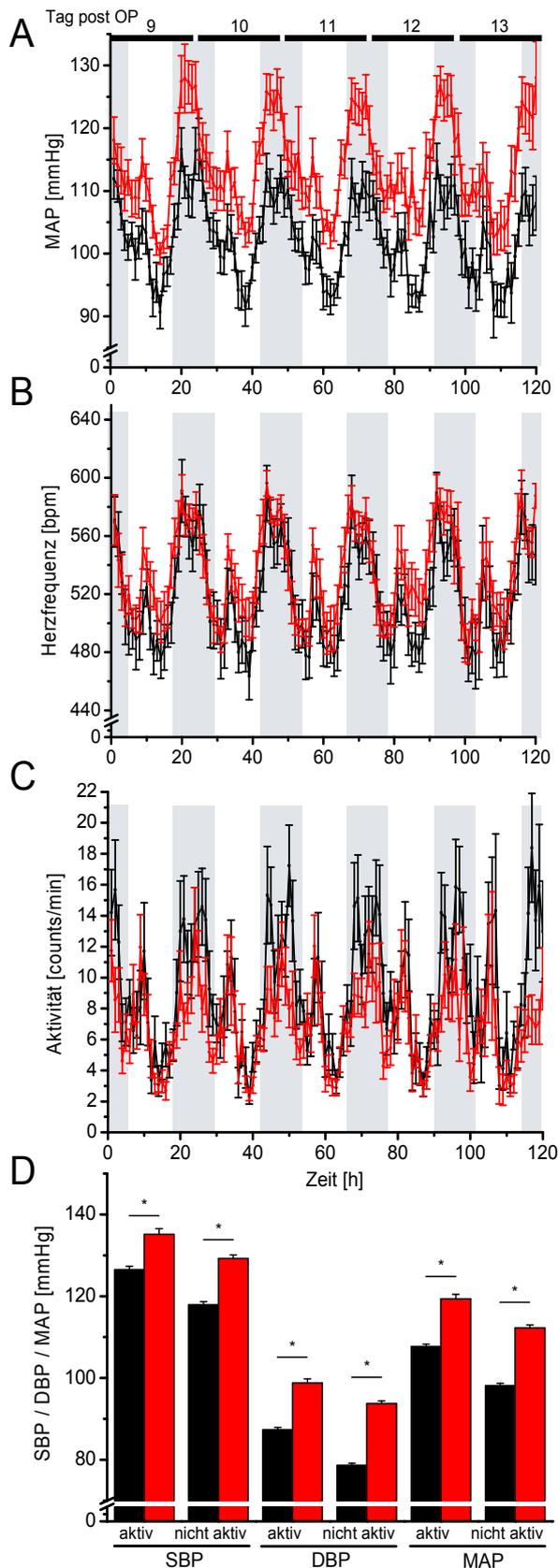


Abbildung 16: Zirkadiane Rhythmik von Blutdruck, Herzfrequenz und körperlicher Aktivität. Zirkadiane Rhythmik des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP, A), der Herzfrequenz (B) und der körperlichen Aktivität (C) von Wildtyp (schwarz, n=7-13) und *Trpm4*^{-/-} Mäusen (rot, n=8-15) gemittelt von Tag 9-13 nach Implantation des Blutdruck-Transmitters. Die Zeitspanne von 18:00h bis 06:00h ist in grau markiert. (D) Aktivitäts-abhängige Analyse von MAP, systolischem (SBP) und diastolischem (DBP) Blutdruck von Tag 9-13 nach Operation; *p<0.01. Blutdruckwerte bei einem körperlichen Aktivitäts-count größer als 9 (aktiv) oder kleiner als 9 (nicht-aktiv) wurden analysiert.

In Abbildung 16 wurden zur Analyse der zirkadianen Rhythmik die entsprechenden Stundenmittelwerte von den Tagen 9, 10, 11, 12 und 13 nach Implantation gemittelt und im Tagesverlauf aufgetragen. Hier ist erkennbar, dass an diesen Tagen nach Rekonvaleszenz vom operativen Eingriff die *TRPM4*^{-/-} Mäuse während der kompletten Tag-Nacht-Periode einen erhöhten MAP mit Akrophasen zwischen 18:00 Uhr und 01:00 Uhr aufwiesen. Die zirkadiane Rhythmik der Herzfrequenz und der körperlichen Aktivität zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, aber auch einen deutlichen Tag/Nacht-Rhythmus. Die körperliche Aktivität ist ein bedeutender Faktor, welcher den Blutdruck beeinflusst. Aus diesem Grund wurden der MAP, der

systolische Blutdruck und der diastolische Blutdruck während aktiver im Vergleich zu nicht-aktiven Phasen der Mäuse analysiert. Das verwendete Telemetrie-System ermit-

telt einen Aktivitäts-Index, mit dem die körperliche Aktivität der Tiere abgeschätzt werden kann. Aktivitätswerte kleiner als 9 counts pro Minute wurden als „nicht-aktiv“ und alle counts größer neun als „körperlich aktiv“ definiert. Wie in Abbildung 16D gezeigt, waren alle Blutdruck-Parameter in den TRPM4^{-/-} Mäusen signifikant erhöht, wobei sich unter nicht-aktiven Bedingungen die Hypertonie am deutlichsten zeigte (MAP_{aktiv}: WT: 107.7±0.6 mmHg, TRPM4^{-/-} 119.3±1.1 mmHg, p<0.001; MAP_{nicht aktiv}: 98.2±0.5 mmHg in WT und 112.3±0.7 mmHg in TRPM4^{-/-} Mäusen, p<0.001). Dabei ergab sich der größte Unterschied beim diastolischen Blutdruck während nicht-aktiver Phasen (DBP_{nicht aktive}: 78.7±0.6 mmHg in WT und 93.7±0.6 mmHg in TRPM4^{-/-} Mäusen, p<0.001). Offensichtlich führt die Inaktivierung des TRPM4 Kanals zu einer Verschiebung des arteriellen Blutdrucks hin zu erhöhten Blutdruckwerten.

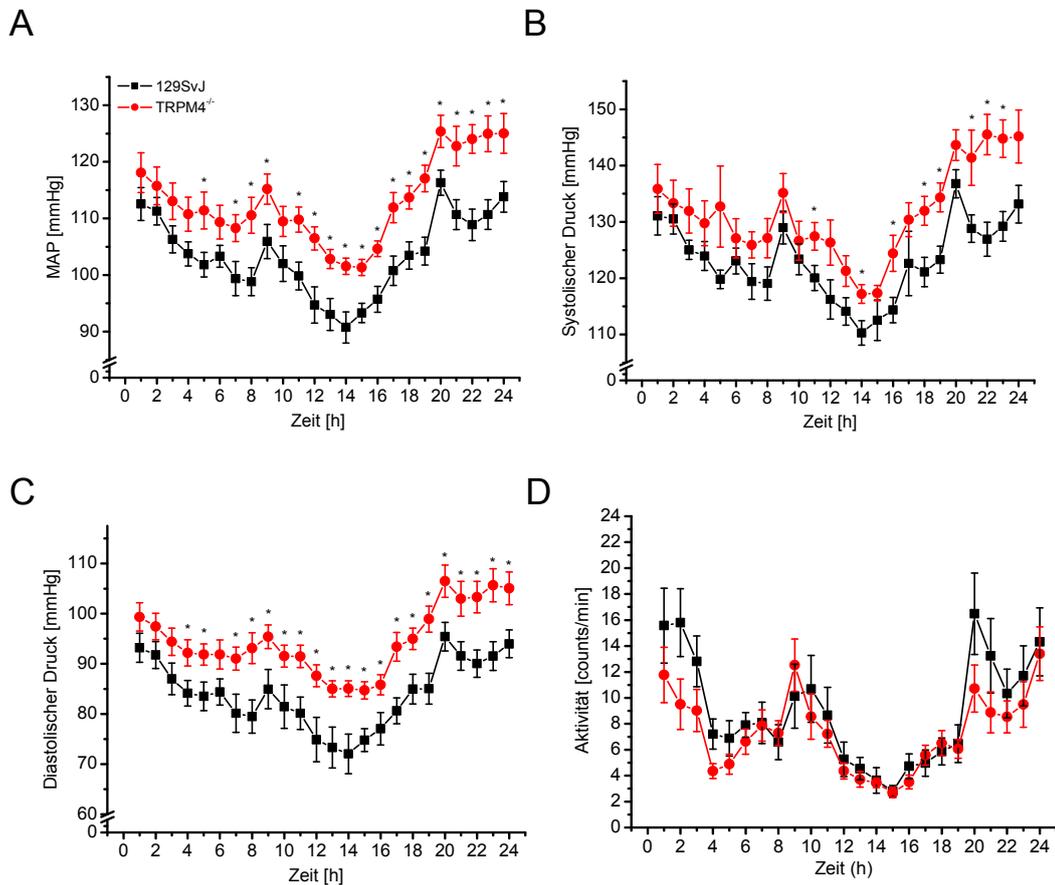


Abbildung 17: Verlauf der Blutdruckparameter von TRPM4-defizienten Mäusen über 24h. Zeitverlauf des mittleren (A), systolischen (B) und diastolischen Blutdrucks (C) und der physischen Aktivität (D) über 24h in Wildtyp (schwarz, n=7-13) und TRPM4^{-/-} Mäusen (rot, n=8-15). Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von 5 Tagen (9-13 post OP) jeweils zwischen 1 und 0 Uhr nachts.

Werte für Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivität zeigen eine zirkadiane Rhythmik, welche durch eine niedrige Periode während des Schlafens - d.h. tagsüber - einen langsamen Anstieg nach dem Erwachen und einer hohen Plateauphase während des Wachseins - d.h. nachts - gekennzeichnet ist. In Abbildung 17 ist das Profil des Verlaufes des mittleren arteriellen Blutdrucks, des systolischen- und diastolischen Blutdrucks und der physischen Aktivität für 24 Stunden gemittelt unter Basalbedingungen von Tag 9 bis Tag 13 nach Operation graphisch dargestellt. Nahezu über den gesamten Tagesverlauf hinweg bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich des MAP (Abbildung 17A) und des diastolischen Blutdrucks (Abbildung 17C) in den TRPM4-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Der systolische Blutdruck war hauptsächlich während Phasen höherer körperlicher Aktivität signifikant unterschiedlich, wohingegen kein Unterschied im Hinblick auf die Aktivität der Tiere festgestellt werden konnte.

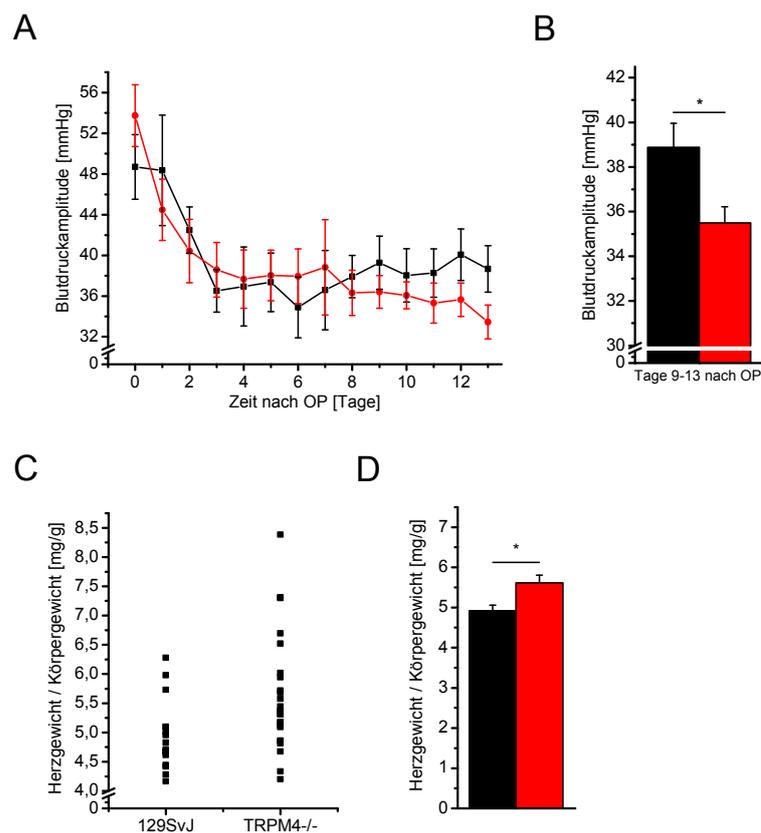


Abbildung 18: Blutdruckamplitude und Hypertrophie in TRPM4-defizienten Mäusen. (A) Zeitverlauf der Blutdruckamplitude von Wildtyp (schwarz, n=7-13) und TRPM4-defizienten Mäusen (rot, n=8-15) nach Implantation. (B) Analyse der Blutdruckamplitude von Tag 9-13 nach Operation. (C-D) Darstellung der Einzelwerte und Gruppenstatistik des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht in Wildtyp (n=17) und TRPM4^{-/-} Mäusen (n=25).

In der Blutdruckamplitude zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen verglichen an den jeweiligen Einzeltagen (Abbildung 18A), aber im Durchschnitt der Tage 9-13 nach Implantation des Blutdrucktransmitters war die Blutdruckamplitude leicht erniedrigt (Abbildung 18B). In einem Alter von 6 bis 8 Monaten zeigte sich bei den TRPM4-defizienten Mäusen eine signifikante Herzhypertrophie, die Folge der Hypertonie oder Folge der Inaktivierung von TRPM4 in kardialen Zellen sein kann. Die Abbildung 18C&D veranschaulicht das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht der einzelnen gemessenen Mäuse und die Gruppenanalyse (WT 4.9 ± 0.1 mg/g und TRPM4^{-/-} 5.6 ± 0.2 mg/g, $p < 0.05$). Veränderungen der Herzfunktion können eine Verschiebung des basalen Blutdrucks hervorrufen, aber Druck-Volumen Messungen im linken Ventrikel mittels eines miniaturisierten P-V-Katheters (Millar Instruments Inc., USA) ergaben keine Unterschiede bezüglich des Herzschlagvolumens und des Herzzeitvolumens in anästhesierten TRPM4^{-/-} Mäusen und Wildtyp-Kontrollen (Kooperation mit P. Herijgers und G. van der Mieren, Herzchirurgie, Universität Leuven).

3.1.2 Flüssigkeitshaushalt und RAAS in TRPM4-defizienten Mäusen

Der arterielle Blutdruck hängt neben der Herzfunktion ebenso von Veränderungen des Blutvolumens und dessen Regulation und vom totalen peripheren Widerstand, beides wiederum abhängig vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ab.

Die Fähigkeit der Renin-Sekretion der TRPM4-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen wurde in dem Modell der isoliert-perfundierten Niere untersucht (Kooperation mit Prof. Dr. F. Schweda, Physiologie, Regensburg). Eine Stimulation der Renin-Sekretion mit Isoproterenol und eine darauf folgende Inhibition mit Angiotensin II war in Abwesenheit von TRPM4 unverändert (Abbildung 19A). Dies schließt einen wesentlichen Defekt der Renin-bildenden juxtaglomerulären Zellen aus. Ebenfalls war die renale Expression der Renin mRNA in den TRPM4^{-/-} Mäusen vergleichbar zu der der Wildtypen und die Plasma-Renin-Aktivität war nicht erhöht, sondern eher erniedrigt, was als ein sekundärer Effekt der Hypertonie erklärt werden könnte (Abbildung 19B). In Abbildung 19C ist die Plasma Aldosteron Konzentration von TRPM4^{-/-} und Wildtyp Mäusen graphisch dargestellt. Es konnten keine Veränderungen der Plasma Aldosteron Konzentration in den TRPM4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen festgestellt werden.

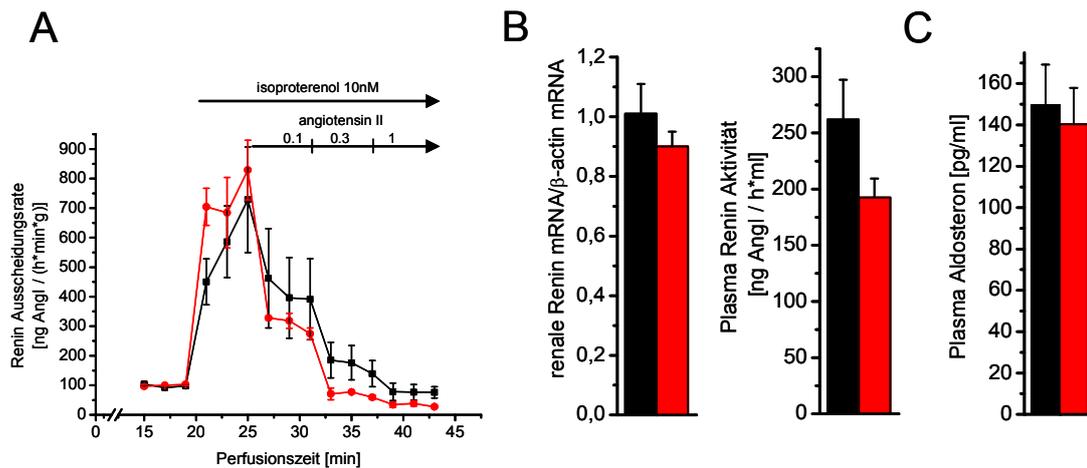


Abbildung 19: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in TRPM4^{-/-} Mäusen. (A) Renin-Aktivität im Perfusat der isolierten Niere von Wildtyp (schwarz) und TRPM4^{-/-} Mäusen (rot, n=3/Genotyp) vor und nach Applikation von Isoproterenol (10 nM) und Angiotensin II (0.1-1 nM). (B) Renale Renin mRNA Expression normalisiert auf β-Aktin mRNA in Wildtyp (n=5) und TRPM4^{-/-} Mäusen (n=6) und Plasma Renin Aktivität (rechts) in TRPM4^{-/-} (n=25) und Wildtyp (n=23) Mäusen. (C) Plasma Aldosteron Konzentration von Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen (n=18/Genotyp).

Für die Bestimmung der Elektrolyte Natrium und Kalium im Plasma und im Urin, wurden einerseits Blutproben der TRPM4^{-/-} und Wildtyp Mäuse durch submandibuläre Punktion gewonnen und andererseits Urinproben in Stoffwechselfärgen gesammelt und diese mittels flammenphotometrischer Messung quantifiziert.

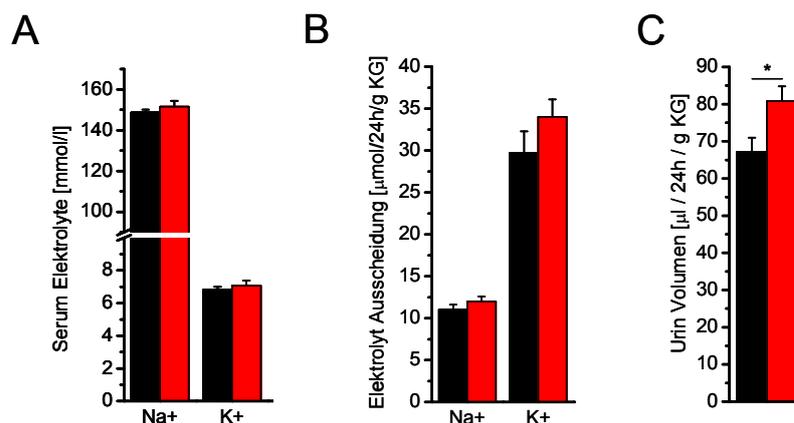


Abbildung 20: Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt. (A) Serum-Elektrolyt Konzentrationen (n=19/Genotyp), (B) Elektrolyt-Ausscheidung (WT: n=21, TRPM4^{-/-} n=22) im 24h Urin und 24h Urinvolumen (C, WT: n=21, TRPM4^{-/-} n=22).

Die Ionenkonzentrationen im Serum und im Urin waren unverändert (Abbildung 20A&B). Das ausgeschiedene Urinvolumen war in den TRPM4^{-/-} Mäusen um etwa 20% erhöht (Abbildung 20C).

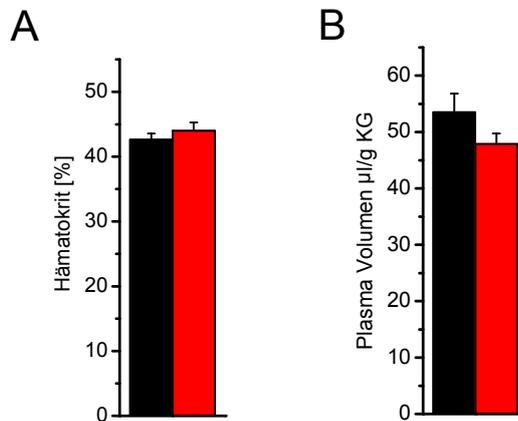


Abbildung 21: Hämatokrit und Plasmavolumen. (A) Statistische Analyse des Hämatokrits (A, n=8/Genotyp) und des Plasmavolumens (B, n=5/Genotyp) von Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen.

Eine Hypertonie kann auch als Folge eines gesteigerten Blutvolumens auftreten. Zur Bestimmung des Blutvolumens wurden sowohl das Verhältnis der Erythrozyten zum Gesamtvolumen (Hämatokrit) als auch das Plasmavolumen bestimmt. Der Hämatokrit der TRPM4^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu den Wildtypen nicht verändert (Abbildung 21A). Die genaue Bestimmung des Plasmavolumens erfolgte mittels einer Verdünnungsmethode durch Nachweis eines im Plasma löslichen Farbstoffs. Über eine Injektion in die Schwanzvene wurde den Mäusen eine definierte Menge einer Farbstofflösung verabreicht. Nach fünf Minuten und damit gleichmäßiger Verteilung der injizierten Lösung im Kreislauf wurde eine Blutprobe entnommen, abzentrifugiert und mittels Photometrie die optische Dichte der Farbstoffverdünnung gemessen. Aus diesen Werten konnte durch gleichzeitige Erstellung einer Standardreihe definierter Farbstoffkonzentrationen das Plasmavolumen errechnet werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Plasmavolumens der TRPM4^{-/-} Mäuse. Da sich sowohl Hämatokrit als auch das absolute Plasmavolumen und somit das Gesamtblutvolumen beider Genotypen nicht unterscheiden, ist die Hypertonie nicht auf eine Erhöhung des Blutvolumens zurückzuführen.

3.1.3 Regulation der Gefäßkontraktilität in TRPM4-defizienten Mäusen

Der arterielle Blutdruck wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Vasokonstriktoren und Vasodilatoren und durch autoregulatorische myogene Mechanismen beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Reaktivität der Gefäßmuskulatur *in vivo* und *in vitro* untersucht.

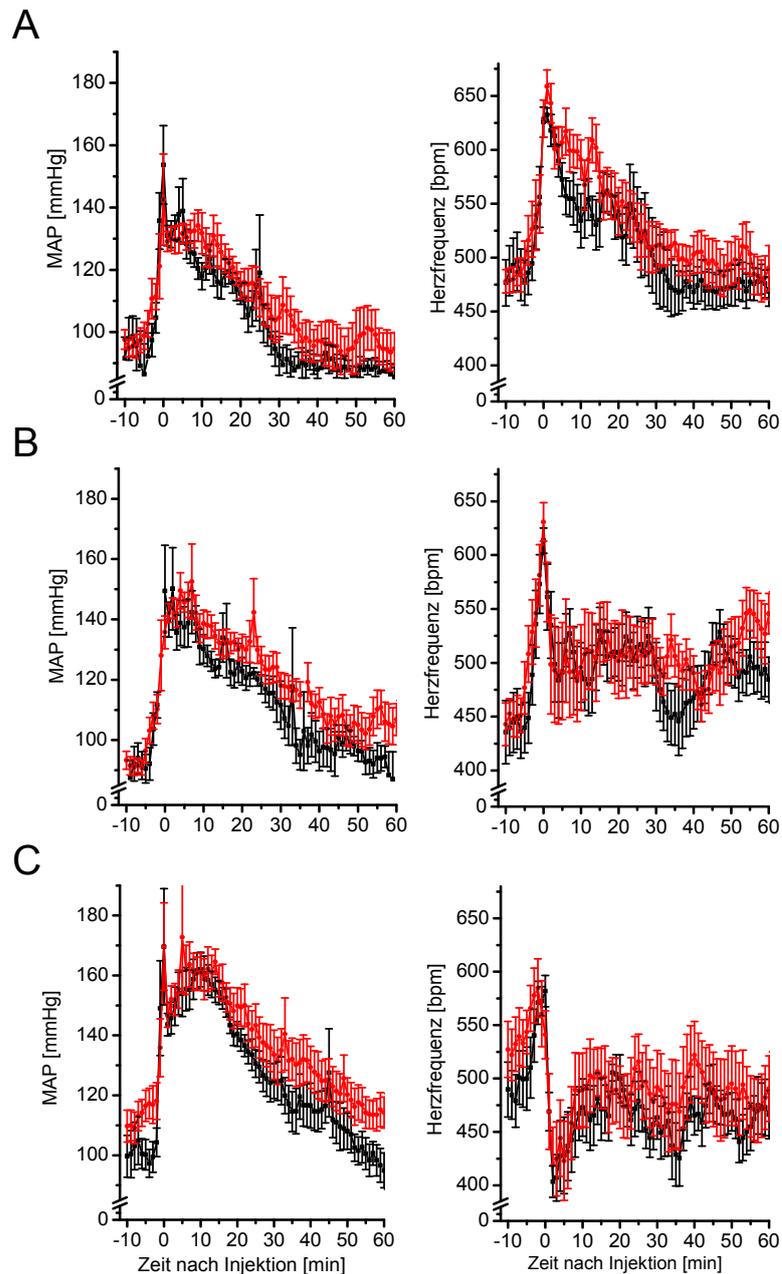


Abbildung 22: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach Phenylephrin-Applikation. Mittlerer arterieller Blutdruck (links) und Herzfrequenz (rechts) nach intraperitonealer Injektion steigender Phenylephrin-Dosierungen (A: 0.1 mg/kg KG, B: 0.3 mg/kg KG, C: 1.0 mg/kg KG, WT n=7, TRPM4^{-/-} n=9, WT: schwarz; TRPM4^{-/-}: rot).

Getestet wurde der Effekt der TRPM4-Deletion auf die Gefäßkontraktilität *in vivo* mittels des Radiotelemetrie-Systems, an isolierten Gefäßsegmenten der Aorta thoracalis im Organbad und an Widerstandsgefäßen am Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfoten der Maus. Direkte Stimulation der α_1 -adrenergen Rezeptoren nach intraperitonealer Injektion verschiedener Phenylephrin-Konzentrationen resultierte in vergleichbaren Anstiegen des mittleren arteriellen Blutdrucks und Änderungen der Herzfrequenz in beiden Genotypen (Abbildung 22A-C). Die Blutdruck-steigernde Wirkung von Phenylephrin war dosisabhängig. Bei einer Dosis von 0.1 mg/kg Körpergewicht stiegen sowohl MAP als auch Herzfrequenz stark an und erreichten etwa nach 35 Minuten wieder den Ruhewert (Abbildung 22A). Nach Gabe einer Phenylephrin-Dosis von 0.3 mg/kg KG erhöhte sich der Blutdruck noch stärker, wobei die Herzfrequenz schon nicht mehr so stark anstieg (Abbildung 22B). Die höchste verabreichte Phenylephrin-Dosis (1.0 mg/kg KG) verursachte auch die stärkste Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks (WT $+49.3 \pm 1.7$ mmHg und TRPM4^{-/-} $+44.0 \pm 2.1$ mmHg). Im Vergleich zu den niedrigeren Dosierungen fiel hierbei die Herzfrequenz durch die Aktivierung der Barorezeptoren reflektorisch ab (WT -76.9 ± 8.1 bpm und TRPM4^{-/-} -96.6 ± 10.1 bpm; Abbildung 22C). Aus Kontrollexperimenten war bereits bekannt, dass der initiale Blutdruckanstieg nach intraperitonealer Injektion innerhalb der ersten Minuten auch bei einer Injektion von Kochsalzlösung beobachtet wird und damit durch die Injektion und nicht durch das injizierte Arzneimittel hervorgerufen wird. Die Kontraktilität von isolierten Aortenringen als Antwort auf Zugabe von Phenylephrin wurde unter isometrischen Bedingungen im Organbad analysiert. Zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve wurden Messreihen mit steigenden Phenylephrin-Konzentrationen (0.01-30 μ M) durchgeführt; eine Originalmessung eines präparierten Aortenrings nach Zugabe steigender Phenylephrin-Konzentrationen ist jeweils für Wildtyp und Knockout in Abbildung 23A&B gezeigt. Hinsichtlich der beiden untersuchten Gruppen konnten bei den durch Phenylephrin hervorgerufenen Kontraktionen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 23C; EC₅₀: WT 1.0 ± 0.2 μ M; TRPM4^{-/-} 0.9 ± 0.1 μ M). Zur Untersuchung der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen wurde das Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote gewählt. Unter Avertin-Anästhesie wurde die Aorta abdominalis der Maus kanüliert, die Vena cava longitudinal eröffnet und das Gefäßbett bei einem konstanten Druck von ~ 100 mmHg mit physiologischer Lösung perfundiert. Steigende Phenylephrin-Konzentrationen wurden als Bolus von 200 μ l appliziert und der Gefäßwiderstand durch Messung des Perfusionsflusses errechnet. In Abbildung 23 E und F ist jeweils eine Originalmessung einer Wildtyp- und TRPM4-defizienten Mauspräparation graphisch dargestellt.

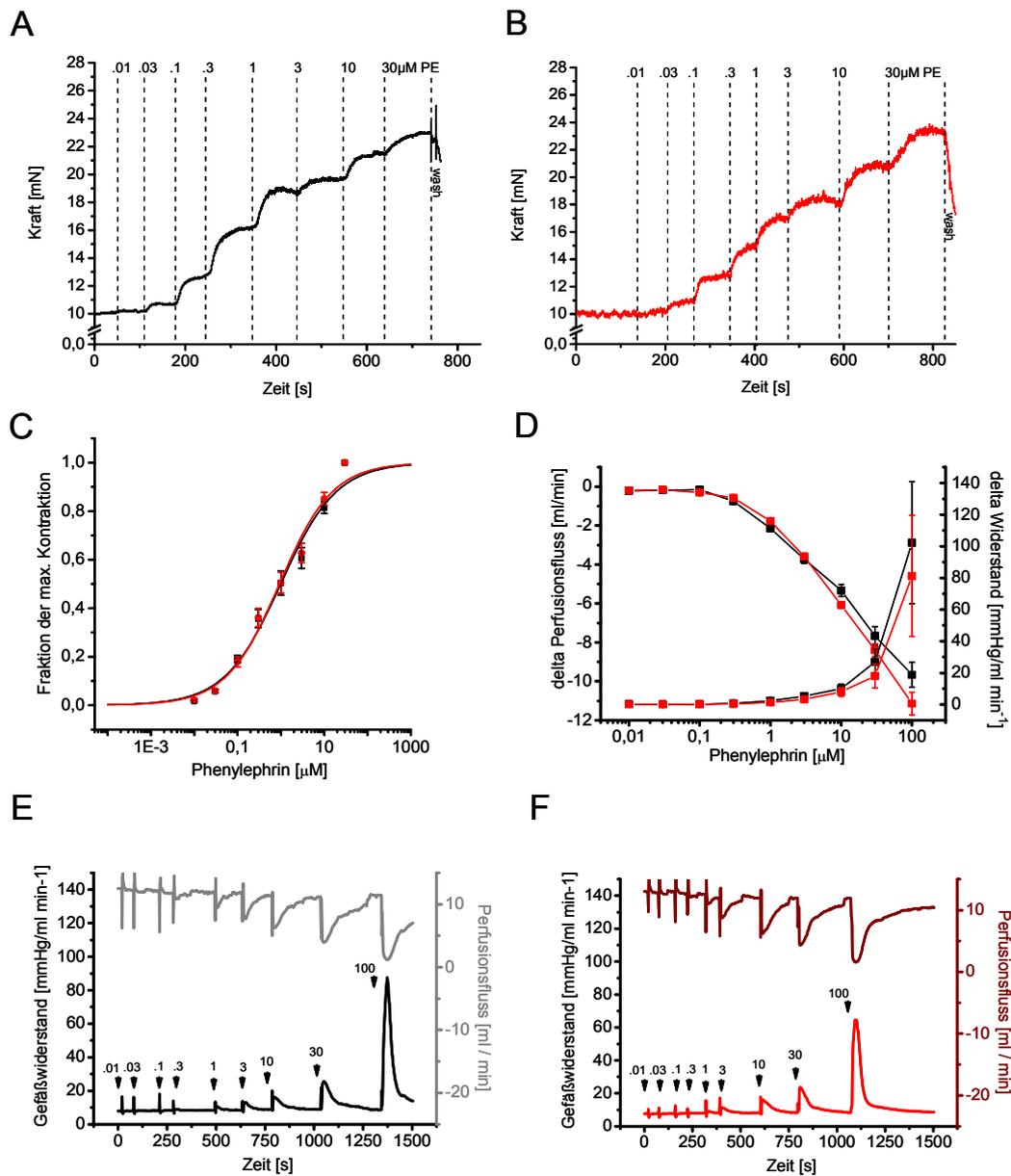


Abbildung 23: Phenylephrin-induzierte Gefäßkontraktibilität. (A-B) Originalmessung der Phenylephrin-induzierten Kontraktion eines Wildtyp- (A) und TRPM4^{-/-} (B)-Aortenrings. (C) Konzentrations-Wirkungskurve Phenylephrin-induzierter Kontraktion von isolierten Aortenringen (WT n=7, TRPM4^{-/-} n=8). (D) Dosis-Wirkungskurve der Änderungen des Flusses und des Widerstandes nach Applikation von Phenylephrin im Gefäßbett der Hinterpfoten (n=9/Genotyp). (E-F) Originalmessung des Gefäßwiderstandes und des Perfusionsflusses der isoliert-perfundierten Hinterpfoten von Wildtyp (E) und TRPM4^{-/-} (F) Mäusen; Bolusinjektionen von Phenylephrin sind mit Pfeilen gekennzeichnet (in µM).

Die Zugabe steigender Phenylephrin-Konzentrationen resultierte in einer vergleichbaren Reduktion des Perfusionsflusses und einem Anstieg des Gefäßwiderstandes in TRPM4^{-/-} und Wildtyp Mäusen (Abbildung 23D). Ebenfalls waren die Absolutwerte des

basalen Perfusionsflusses nicht verändert (WT: 11.0 ± 1.1 ml/min, TRPM4^{-/-} 13.3 ± 0.9 ml/min, $p=0.13$) und nach Applikation der höchsten Phenylephrin-Dosis (100 μ M Bolus) war der Perfusionsfluss nahezu komplett reduziert (WT: 1.5 ± 0.4 ml/min, TRPM4^{-/-} 2.1 ± 0.4 ml/min, $p=0.3$). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der intraperitonealen Gabe von Norepinephrin und Epinephrin im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote beobachtet werden (Abbildung 24, Abbildung 25).

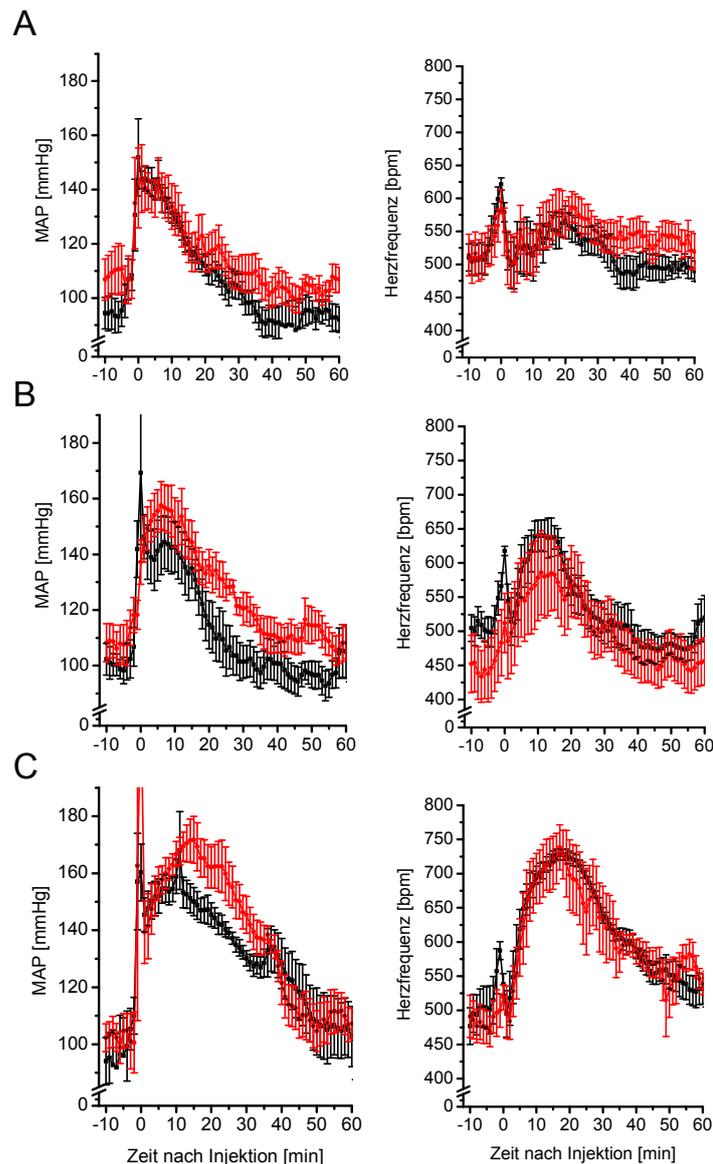


Abbildung 24: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach Norepinephrin-Applikation. Mittlerer arterieller Blutdruck (links) und Herzfrequenz (rechts) nach intraperitonealer Injektion verschiedener Dosen Norepinephrin. (A) 0.1 mg/kg KG Norepinephrin (WT: $n=7$, TRPM4^{-/-} $n=9$). (B) 0.3 mg/kg KG Norepinephrin (WT: $n=7$, TRPM4^{-/-} $n=8$). (C) 1.0 mg/kg KG Norepinephrin (WT: $n=6$, TRPM4^{-/-} $n=7$).

Im Vergleich zu der höchsten Phenylephrin-Dosis konnte im Falle der intraperitonealen Applikation von Norepinephrin keine Herzfrequenzsenkung, sondern bei allen Dosierungen eine sich steigernde Herzfrequenz festgestellt werden. Auch bei intraperitonealer Injektion steigender Norepinephrin-Konzentrationen ließ sich eine Dosis-Abhängigkeit des Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegs feststellen. Nach Applikation von 0.1 mg/kg KG Norepinephrin stieg der mittlere arterielle Blutdruck nach wenigen Minuten um etwa 45 mmHg an, wobei die Auswirkungen auf die Herzfrequenz noch nicht ausgeprägt war (Abbildung 24A). Stärkere Auswirkungen auf sowohl den MAP als auch die Herzfrequenz konnten bei einer höheren Dosis (0.3 mg/kg KG) beobachtet werden (Abbildung 24B). Die Auswirkungen der höchsten verabreichten Dosis Norepinephrin (1.0 mg/kg KG) zeigten sich in einer Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks um durchschnittlich 65 mmHg und einer Herzfrequenzsteigerung von etwa 250 bpm (Abbildung 24C). Weder nach intraperitonealer Applikation von Phenylephrin noch von Norepinephrin konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz beider untersuchten Gruppen festgestellt werden.

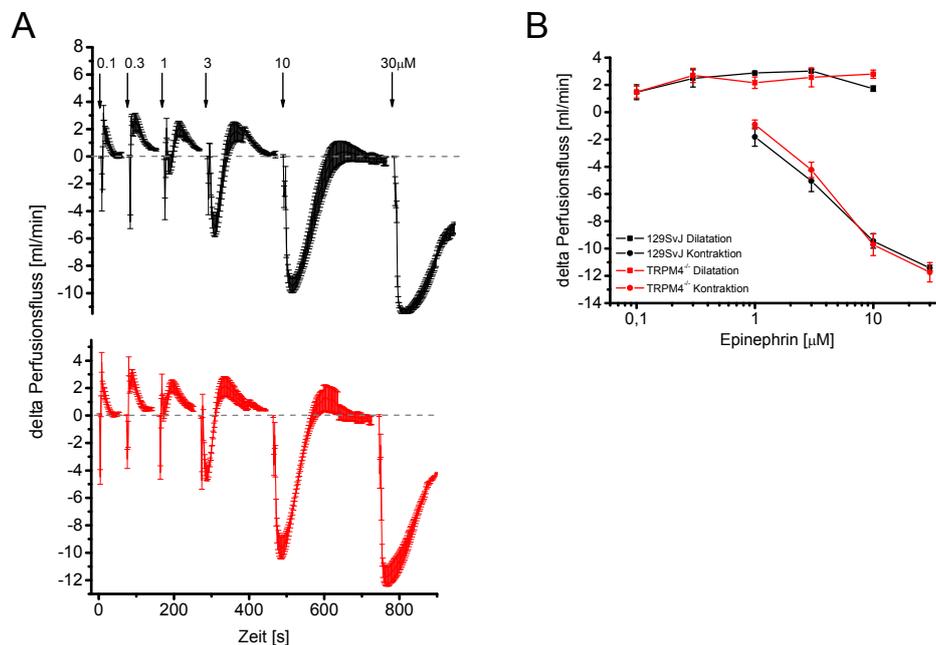


Abbildung 25: Kontraktibilität von Widerstandsgefäßen nach Epinephrin-Applikation. (A) Originalmessung des Perfusionsflusses der isoliert-perfundierten Hinterpfote; Bolusinjektionen von Epinephrin sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Mittlere Änderungen des Perfusionsflusses nach Applikation von Epinephrin im Gefäßbett der Hinterpfoten (n=6/Genotyp).

Die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen wurde im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfoten untersucht. Die Applikation von Epinephrin, einem Agonisten an α - und β -Adrenozeptoren, ergab vergleichbare Änderungen im Perfusionsfluss. Bei niedrigen Dosierungen konnte ein ähnlicher Anstieg des Perfusionsflusses in beiden Gruppen durch β -adrenerge Stimulation beobachtet werden. Mit steigenden Epinephrin-Dosierungen wurde die Vasokonstriktion, vermittelt durch Aktivierung der α -adrenergen Rezeptoren, immer deutlicher (Abbildung 25).

Eine Stimulation von β -Adrenozeptoren mit dem synthetischen nicht-selektiven β -Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) *in vivo* (Abbildung 26A) zeigte keine Unterschiede in der positiv chronotropen Wirkung.

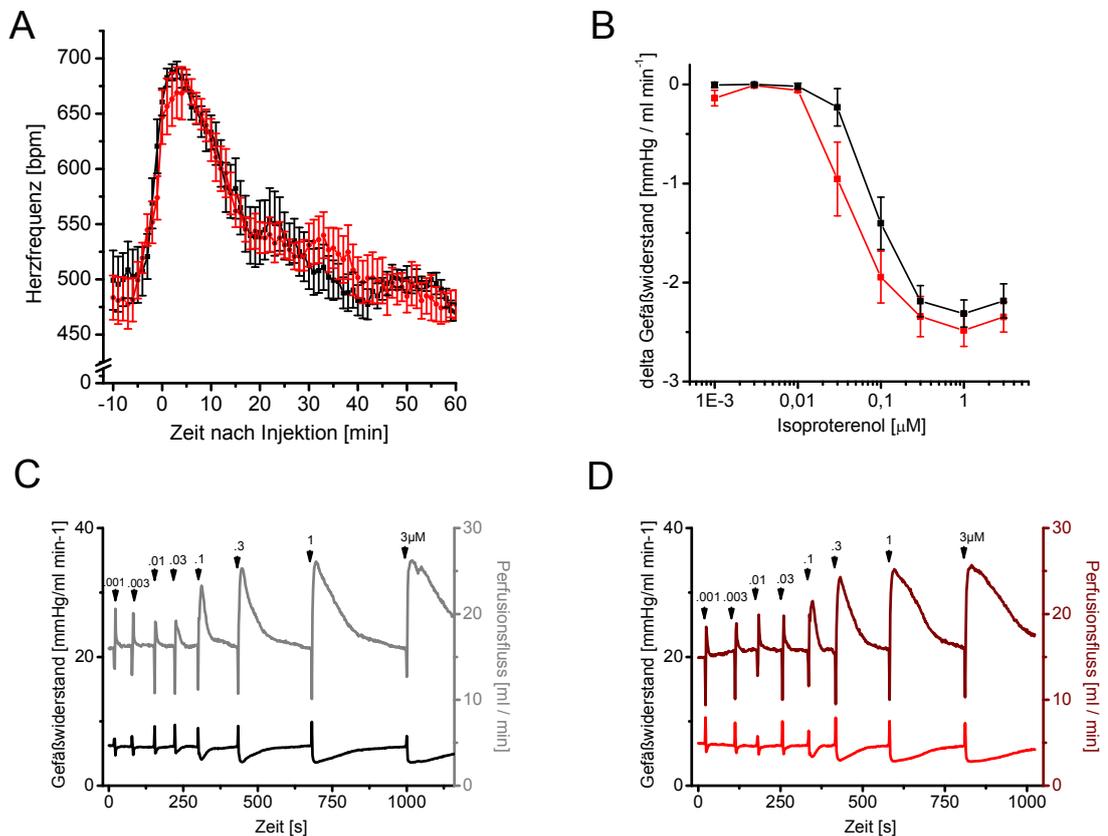


Abbildung 26: Regulation von Herzfrequenz bzw. Gefäßkontraktilität nach Isoproterenol-Applikation. (A) Herzfrequenz nach Injektion von Isoproterenol (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG i.p., WT: n=7, TRPM4^{-/-}: n=8). (B) Dosis-Wirkungs-Kurve der Änderungen des Gefäßwiderstands nach Applikation steigender Mengen von Isoproterenol im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote (WT: n=6, KO: n=7). (C-D) Originalaufzeichnungen der Reaktion des Gefäßwiderstandes und Perfusionsflusses auf Isoproterenol in Wildtyp (C) und TRPM4^{-/-} (D).

Kurz nach Injektion stieg die Herzfrequenz beider Genotypen von einem Ruhewert von etwa 500 bpm ausgehend auf durchschnittlich 670 bpm an. Ebenfalls konnten keine Unterschiede in der Relaxation der glatten Muskelzellen im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote beobachtet werden (Abbildung 26B-D). Im Gegensatz zu der Reaktion auf Epinephrin, bei der sich in niedriger Dosis die Relaxation über β_2 -Adrenozeptoren und in höheren Dosen die α_1 -adrenerge vermittelte Vasokonstriktion zeigte, wiesen die Hinterpfotenpräparate bei Isoproterenolgabe nur die Komponente der Relaxation auf, da dessen Reaktion ausschließlich über β -Adrenozeptoren vermittelt wird. Dadurch kommt es *in vivo* (Abbildung 26A) neben der direkten Wirkung über β_1 -Adrenozeptoren zusätzlich über das Hervorrufen einer reflektorischen Tachykardie zu einer maximal positiven Chronotropie.

Das Endothel arterieller Gefäße vermittelt vaskuläre Kontraktilität durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen und beeinflusst damit den Blutdruck. In vielen Modellen für eine Hypertonie ist diese assoziiert mit einer veränderten endothel-abhängigen Vasorelaxation. Die Beteiligung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung an der Aufrechterhaltung des Ruheblutdrucks bei den TRPM4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen wurde durch intraperitoneale Injektion des Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitors N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 25 mg/kg i.p.) getestet (Abbildung 27A). In diesem Experiment war innerhalb einiger Minuten nach der Injektion ein schneller Anstieg des Blutdrucks zu beobachten. Etwa 35 Minuten nach der Injektion erreichte der mittlere arterielle Blutdruck sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den TRPM4-defizienten Mäusen ein Plateau und begann etwa nach 100 Minuten wieder langsam zu fallen, wobei er allerdings erst nach 600 Minuten wieder den Ausgangswert erreichte. Unmittelbar nach der Injektion war parallel zu dem Blutdruckanstieg in beiden Gruppen eine reflektorische Bradykardie zu beobachten. Etwa 30 Minuten nach der Applikation hatte sich in beiden Gruppen gleichermaßen eine Bradykardie mit Werten um 325 bpm ausgebildet. Der durch L-NAME induzierte Blutdruckanstieg (WT: $+33.0 \pm 0.5$ mmHg; TRPM4^{-/-}: $+38.4 \pm 0.4$ mmHg) und die reflektorische Bradykardie war vergleichbar in den Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen (WT: -128.2 ± 2.7 bpm, TRPM4^{-/-}: -159.4 ± 2.3 bpm).

Zusätzlich wurde die Endothel-abhängige Gefäßrelaxation nach Applikation von Acetylcholin sowohl an isolierten Aortenringen (Abbildung 27B), als auch an Widerstandgefäßen untersucht (Abbildung 27C-D). Die Aortenringe wurden mit 3 μ M Prostaglandin-F2 α vorkontrahiert, wobei keine Unterschiede zwischen Wildtypen und TRPM4-defizienten Tieren festgestellt wurde. Bei Erreichen des Kontraktionsmaximums wurde die Endothel-abhängige Relaxation mittels 3 μ M Acetylcholin erzeugt.

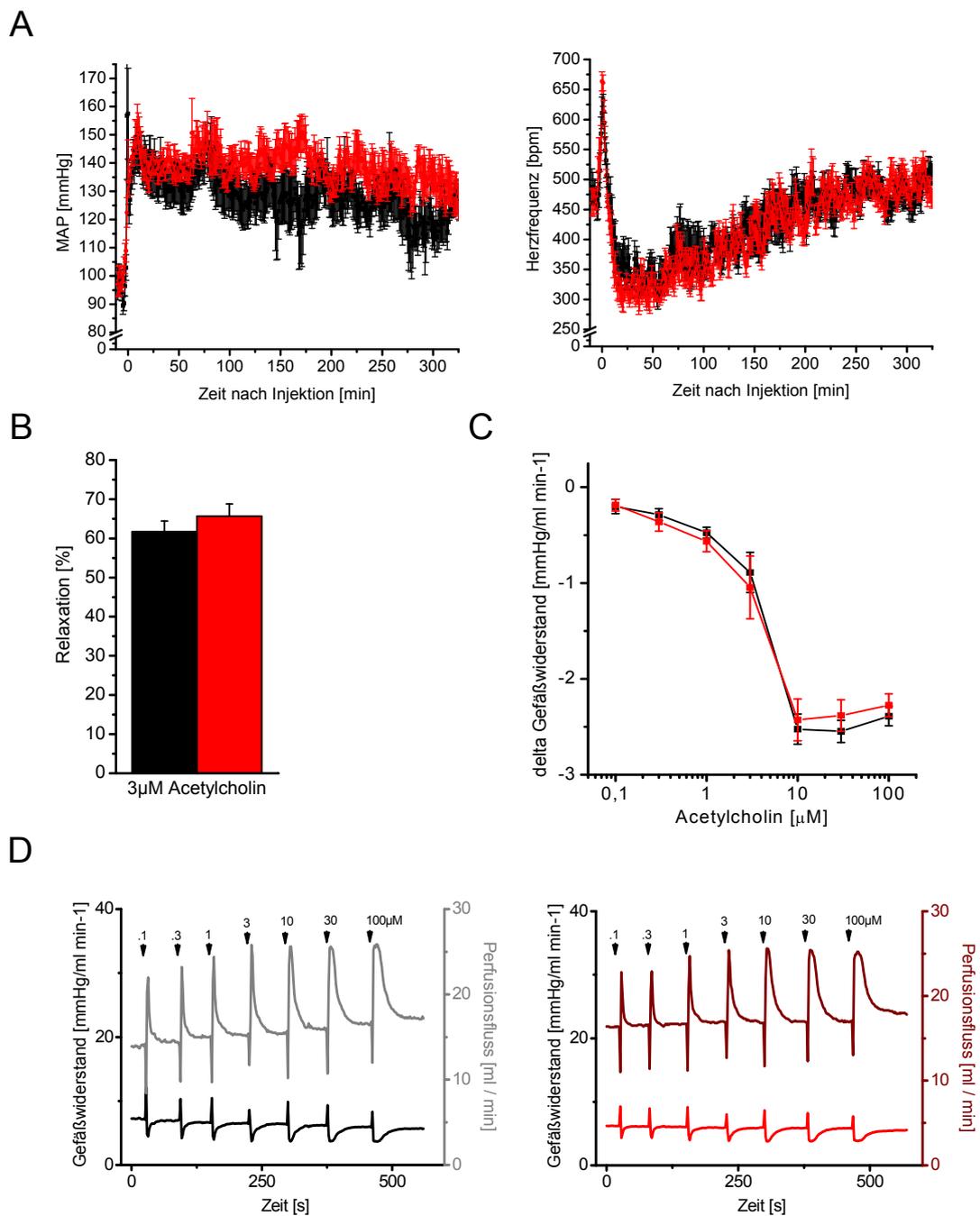


Abbildung 27: Endothel-abhängige Vasorelaxation in TRPM4-defizienten Mäusen. (A) Mittlerer arterieller Blutdruck (links) und Herzfrequenz (rechts) nach intraperitonealer Injektion von L-NAME (25 mg/kg KG) von Wildtyp (schwarz, n=7) und $TRPM4^{-/-}$ Mäusen (rot, n=9). (B) Prozentuale Gefäßrelaxation der Aortenringe von Wildtyp (n=20) und $TRPM4^{-/-}$ Mäusen (n=21) nach Applikation von $3\mu\text{M}$ Acetylcholin ausgehend von einer Vorkontraktion hervorgerufen durch $3\mu\text{M}$ $\text{PGF}_2\alpha$. (C) Änderungen des Gefäßwiderstandes nach Applikation steigender Acetylcholin-Konzentrationen im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote (n=7/Genotyp). (D) Originalmessungen von Gefäßwiderstand und Perfusionsfluss nach Gabe steigender Acetylcholin-Dosierungen im Hinterpfotengefäßbett von Wildtyp (links) und $TRPM4^{-/-}$ (rechts).

Die Vasorelaxation betrug im Wildtyp $61.7 \pm 2.7\%$ und im Knockout $65.7 \pm 3.1\%$ und damit konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt werden. Die Dosis-Wirkungskurve der Verminderung des Gefäßwiderstandes nach Zugabe steigender Acetylcholin-Dosierungen (Abbildung 27C) im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfoten verdeutlicht, dass die stärkste Relaxation nach Applikation von Acetylcholin im Bereich zwischen 1.0 und $10 \mu\text{M}$ hervorgerufen werden konnte. Die drei höchsten Dosierungen riefen alle eine etwa gleich starke Relaxation der Widerstandsgefäße im Modell der isoliert-perfundierten Hinterpfote hervor.

Zur Untersuchung einer Beteiligung von TRPM4 an der Regulation der myogenen Gefäßantwort in Widerstandsgefäßen wurden in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck Änderungen des Gefäßwiderstandes der Hinterpfoten von TRPM4^{-/-} und Wildtyp Mäusen analysiert. Da postuliert wurde, dass TRPM4 eine Rolle bei der myogenen Gefäßantwort in Cerebralarterien spielen soll, wurden diese Experimente mit TRPM4-defizienten Mäusen auf zwei verschiedenen Wildtyp-Hintergründen durchgeführt. Zum einen wurden die Messungen an den bisher verwendeten TRPM4^{-/-} Mäusen und 129SvJ Wildtyp-Kontrollen, zum anderen an TRPM4^{-/-} Mäusen auf einem C57Bl6 Hintergrund und C57Bl6 Wildtyp-Kontrollen durchgeführt (Abbildung 28). Bei allen Experimenten wurde der Druck, mit dem die abdominale Aorta perfundiert wurde, zuerst schrittweise auf ein Niveau von 100 mmHg (129SvJ Mäuse) bzw. 90 mmHg (C57Bl6 Mäuse) erhöht. Unter diesen Bedingungen entwickelte sich ein spontaner myogener Gefäßtonus, welches am Beispiel der Acetylcholin-induzierten Relaxation ohne vorherige Vorkontraktion gezeigt werden konnte. Zur Untersuchung der myogenen Antwort wurde der Perfusionsdruck schrittweise in jeweils 10 mmHg Schritten erhöht; Startpunkt waren 50 mmHg (129SvJ) bzw. 40 mmHg (C57Bl6) und Endpunkt 120 mmHg bzw. 90 mmHg . Anschließend wurde das gleiche Protokoll unter Calcium-freien Bedingungen wiederholt und die durch Dehnung der Gefäßwand hervorgerufene Vasokonstriktion bei einem definierten Perfusionsdruck ermittelt. Die Erhöhung des intravaskulären Drucks induzierte eine vergleichbare myogene Antwort in allen untersuchten Gruppen (Abbildung 28C&D). Dies zeigte, dass der erhöhte Blutdruck in den TRPM4-defizienten Mäusen nicht durch eine veränderte myogene Gefäßantwort der peripheren Widerstandsgefäße erklärt werden konnte.

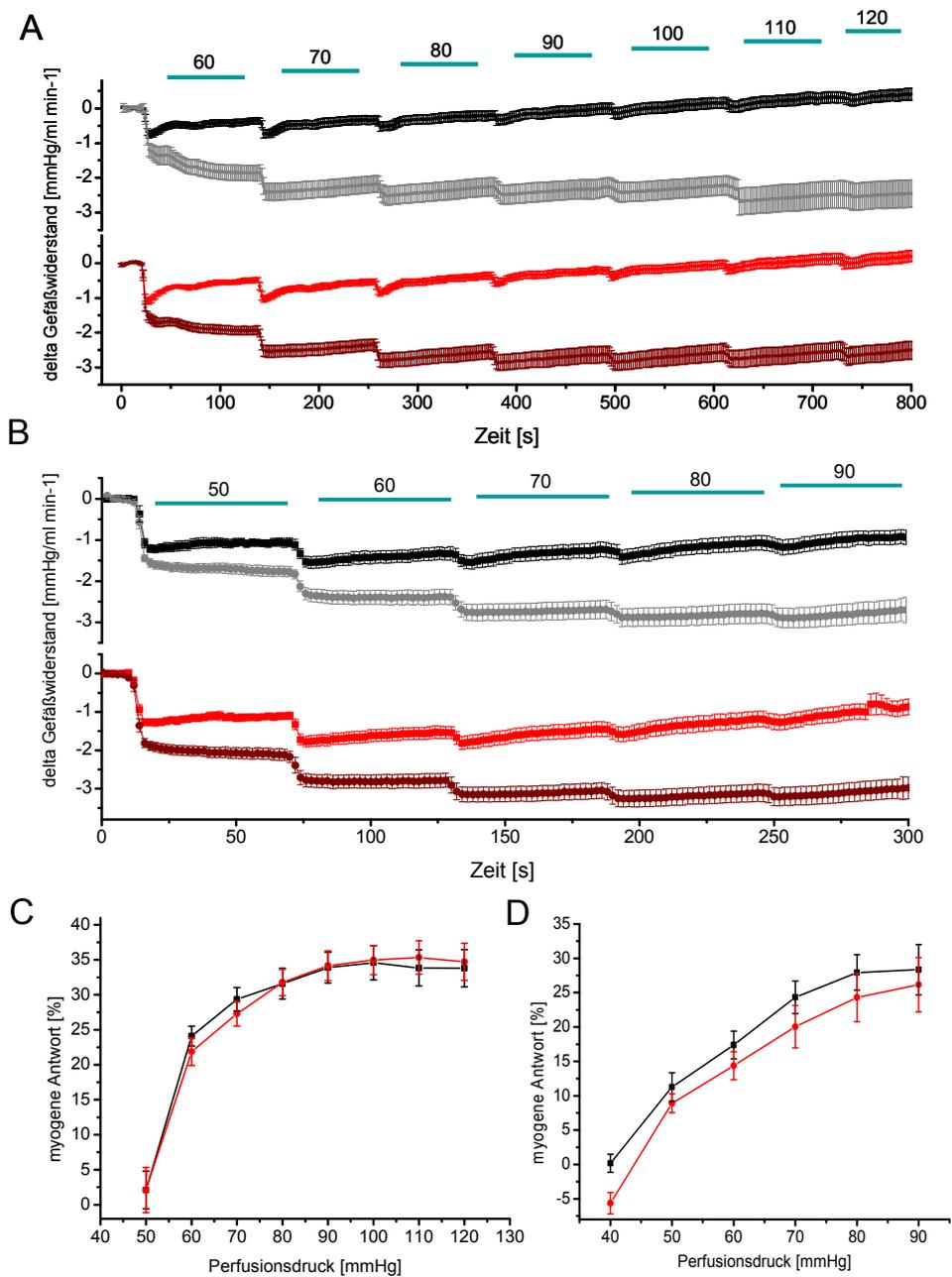


Abbildung 28: Analyse des Druck-induzierten Gefäßwiderstandes von TRPM4-defizienten Mäusen. (A&B) Änderungen des Gefäßwiderstandes unter Perfusion mit physiologischer Lösung (schwarz, rot) oder Calcium-freier Lösung (grau, dunkel-rot) als Perfusat in Wildtyp (129SvJ, A oben, n=11; C57Bl6 B oben, n=9) und TRPM4^{-/-} (129SvJ-Hintergrund, A unten, n=10; C57Bl6-Hintergrund, B unten, n=9) Mäusen. (C&D) Analyse der myogenen Antwort in Abhängigkeit des Perfusionsdrucks berechnet aus (A bzw. B).

Angiotensin II, gebildet durch das Angiotensin I-konvertierende Enzym (ACE), ist einer der wichtigsten Vasokonstriktoren, welche den Blutdruck regulieren. Allerdings wird der Blutdruck auch durch ACE-unabhängige Bildung von Ang II durch Chymasen reguliert.

Chymasen sind Serin-Proteasen, welche hauptsächlich von im Gefäßinterstitium sitzenden Mastzellen sekretiert werden (Li et al., 2004; Okunishi et al., 1984). Da die Antigen-induzierte Mastzell-Degranulation in den TRPM4^{-/-} Mäusen erhöht ist (Vennekens et al., 2007), wollte ich untersuchen, ob eine erhöhte Mastzell-abhängige Chymase-Aktivität an der Entstehung der Hypertonie beteiligt sein kann. Ich habe die Kontraktion von Widerstandsgefäßen nach Applikation eines Ang I Analogons ([Pro¹¹, DAAla¹²] Ang I) analysiert. Dieses synthetische Substrat wird ausschließlich von Chymasen und nicht von ACE zu Ang II umgesetzt. Die Perfusion des Gefäßbettes der Hinterpfoten mit einer ([Pro¹¹, DAAla¹²] Ang I enthaltenden Lösung (1 µM) resultierte innerhalb von 60 Sekunden in einer Reduktion des Perfusionsflusses um 46 Prozent in Wildtyp Mäusen und in einer vergleichbaren Verminderung des Perfusionsflusses bzw. einem gleichzeitigen Anstieg des Gefäßwiderstandes im Gefäßbett der Hinterpfoten von TRPM4^{-/-} Mäusen (Abbildung 29).

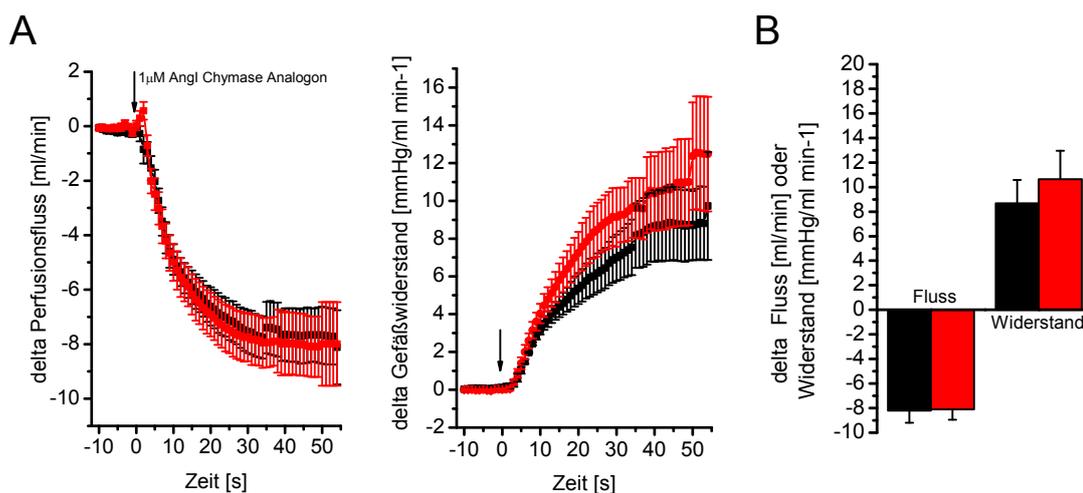


Abbildung 29: [Pro¹¹, DAAla¹²] Ang I -induzierte Gefäßantwort in TRPM4-defizienten Mäusen. (A) Gemittelte Änderungen des Perfusionsflusses und des Gefäßwiderstandes der ersten 60 Sekunden nach Wechsel zu einer Perfusionslösung, die 1 µM des Chymase-Substrates [Pro¹¹, DAAla¹²] Ang I (n=5/Genotyp) enthält. (B) Peak-Perfusionsfluss und -Gefäßwiderstand berechnet aus den Experimenten zeigt in A.

Da das wirksame vasokonstriktorische Peptid in der Gefäßwand erst durch die Chymasen gebildet werden muss, wurde hier kein Bolus appliziert, sondern mit [Pro¹¹, DAAla¹²] Ang I (1µM) konstant perfundiert.

3.1.4 Neurogene Mechanismen sind an der Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse beteiligt

Zentrale Einflüsse auf die Blutdruckregulation können durch Änderungen des Tonus des parasympathischen und sympathischen Nervensystems vermittelt werden, wobei eine hohe sympathische Aktivität oft bei Patienten mit essentieller Hypertonie beobachtet wird (Esler et al., 2001; Guyenet, 2006).

Aufgrund der Expression von TRPM4 in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems, wie im Thalamus, Hypothalamus, Medulla oblongata, Pons und Rückenmark (Lein et al., 2007) wurde der Einfluss neurogener Mechanismen zur Ausbildung der Hypertonie in den TRPM4^{-/-} Mäusen getestet. Zur Untersuchung der Blutdruck- und Herzfrequenzregulation ohne die Beteiligung des vegetativen Nervensystems wurde den Mäusen Hexamethonium appliziert. Der Ganglienblocker Hexamethonium ist ein Antagonist an neuronalen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren und blockiert somit sowohl den Einfluss des Sympathikus als auch des Parasympathikus auf den Blutdruck. Abbildung 30A zeigt den Blutdruckverlauf vor und nach Inhibition der ganglionären Übertragung mit Hexamethonium (20 mg/kg KG i.p.). Durch die Blockade des sympathischen und parasympathischen Einflusses zeigten die TRPM4^{-/-} Mäuse eine größere Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks, so dass der Unterschied im basalen MAP zwischen den beiden Genotypen aufgehoben war (WT: Δ MAP 23.5±5.9 mmHg; TRPM4^{-/-} Δ MAP 31.2±8.6 mmHg, Abbildung 30A&C). Die blutdrucksteigernde Wirkung nach Sympathikus-Aktivierung erfolgt zu einem großen Teil über Stimulation von α_1 -Adrenorezeptoren. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde den Tieren Prazosin (1 mg/kg KG), ein α_1 -Adrenorezeptor-Antagonist, appliziert. Nach intraperitonealer Injektion ergab sich ein vergleichbares Ergebnis wie bei Hexamethonium (WT: Δ MAP 14.7±3.0; TRPM4^{-/-} Δ MAP 18.9±6.4 mmHg, Abbildung 30B&C). Diese Ergebnisse deuteten auf einen erhöhten sympathischen Tonus der TRPM4-defizienten Mäuse hin. Da eine erhöhte sympathische Aktivität oft in erhöhten systemischen Catecholamin-Leveln resultiert, wurden die Konzentrationen von Epinephrin und Norepinephrin im Plasma und deren Metabolite im Urin der Mäuse analysiert (Abbildung 30D&E). Es stellte sich heraus, dass die Plasma-Epinephrin Konzentrationen sowie die Konzentration von Metanephrin und Vanillinmandelsäure im Urin der TRPM4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erhöht und die von Norepinephrin und Metanephrin tendenziell ebenfalls erhöht waren.

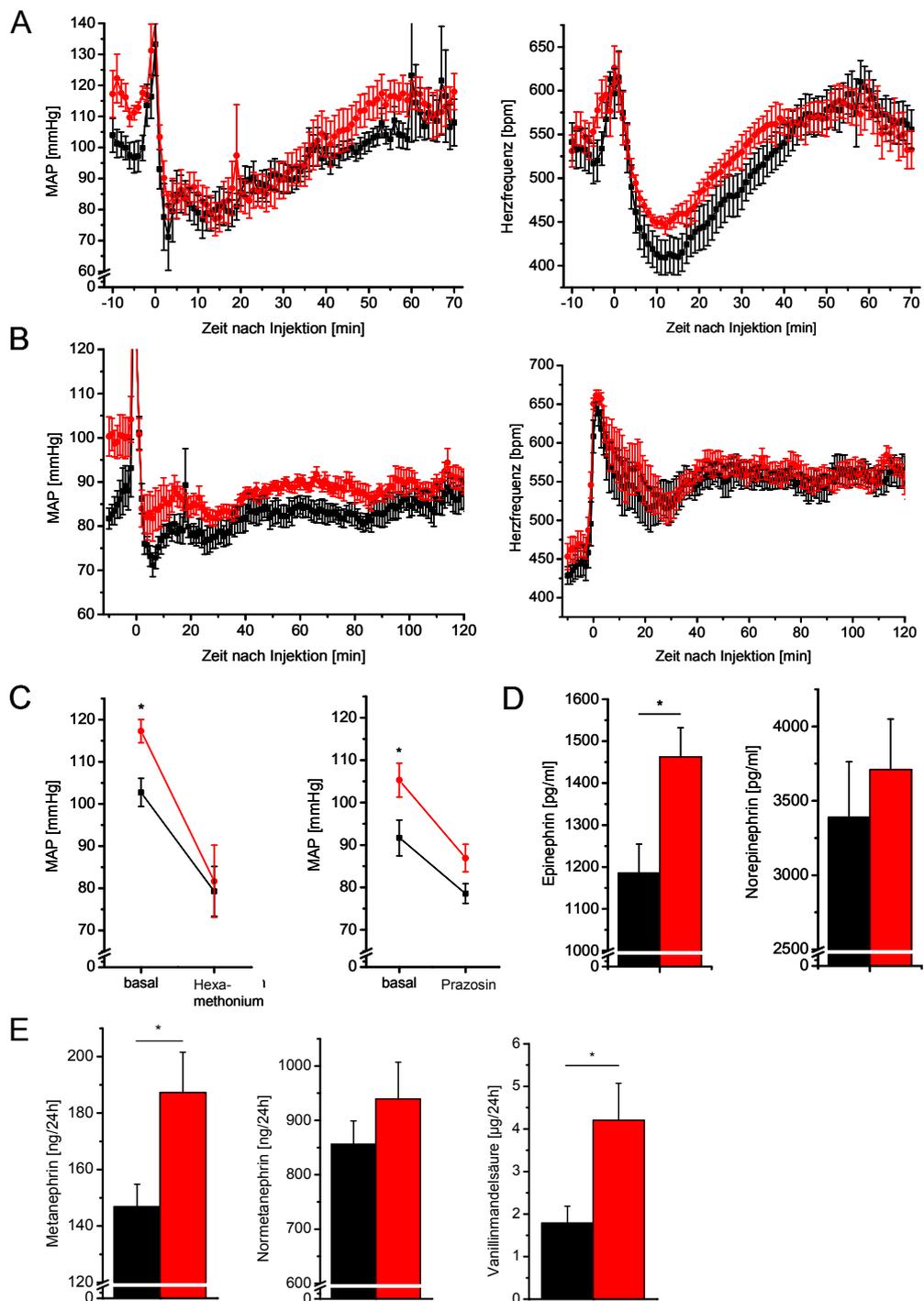


Abbildung 30: Neurogene Mechanismen sind an der Hypertonie der TRPM4-defizienten Mäuse beteiligt. (A) Zeitverlauf des MAP (links) und der Herzfrequenz (rechts) vor und nach Injektion von Hexamethonium (20 mg/kg KG, i.p.) und (B) von Prazosin (1 mg/kg i.p.) in TRPM4^{-/-} (rot, n=7) und Wildtyp (schwarz, n=9) Mäusen. (C) Durchschnittlicher MAP vor und nach Injektion von Hexamethonium (links) und Prazosin (rechts) analysiert aus A und B. (D) Plasma Epinephrin und Norepinephrin Konzentrationen (n=14/Genotyp, *p<0.01). (E) Catecholamin-Metabolit-Konzentrationen im Urin von Wildtyp (n=15, für VMA n=6) und TRPM4^{-/-} Mäusen (n=14, für VMA n=8; *p<0.05).

3.1.5 Histologie der Nebennieren

Die Nebennieren sind von einer Bindegewebskapsel (Capsula fibrosa) umgeben und bestehen weiterhin aus dem Nebennierenmark (Medulla glandulae suprarenalis) und der Nebennierenrinde (Cortex glandulae suprarenalis). Eine Übersicht ist anhand eines H.E.-gefärbten Paraffinschnittes einer Nebenniere von einer Wildtyp Maus in Abbildung 31 gezeigt. Die Nebennierenrinde zeigt ein Dreischichtenaufbau. Der periphere subkapsuläre Rindenbereich besteht aus Ballen und Gruppen von Zellen, die vorwiegend Aldosteron bilden und wird Zona glomerulosa genannt. In der mittleren Zona fasciculata sind die Zellen in radiären Strängen angeordnet, welche vorwiegend Glukokortikoide bilden. In der marknahen Zona reticularis bilden die Zellen einen netzartigen Verband; hier werden ebenfalls Glukokortikoide und Androgene gebildet.

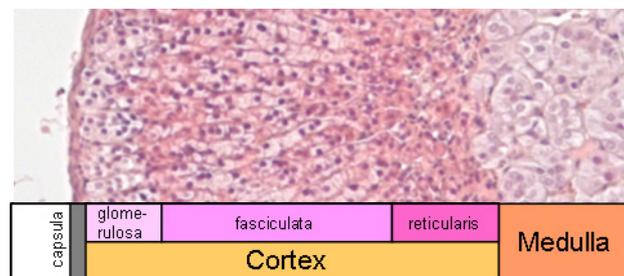


Abbildung 31: Histologischer Überblick über eine Nebenniere einer Wildtyp Maus.

Das Nebennierenmark liegt im Inneren der Nebenniere und weist aufgrund der Embryogenese in morphologischer, wie in physiologischer Hinsicht, eine weitgehende Übereinstimmung mit den sympathischen Paraganglien auf. Ein Charakteristikum der Markzellen ist, dass sie sich mit Chromsalzen braun anfärben lassen; daher werden sie als chromaffine Zellen bezeichnet. Sie produzieren aus L-Tyrosin sowohl Adrenalin (zu ~80%) als auch Noradrenalin (zu ~20%).

Histologische Untersuchungen von Nebennieren zeigten keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen. In den Übersichtsaufnahmen konnte in beiden Genotypen die dreischichtige Rinde und das Mark eindeutig voneinander abgetrennt werden (Abbildung 32). Auch das Verhältnis von Mark zu Rinde und der Rindenschichten untereinander war vergleichbar und ohne pathologische Auffälligkeiten. Weiterhin wurde kein infiltrierendes Wachstum oder vermehrte Vaskularisierung gefunden. Bei näherer Betrachtung stellten sich die Zellkerne gleichförmig groß und mit normalem Kern-/Plasma-Verhältnis dar. Aus den genannten Gründen wurde ein Phä-

ochromozytom als Ursache der Hypertonie in den TRPM4-defizienten Mäusen ausgeschlossen.

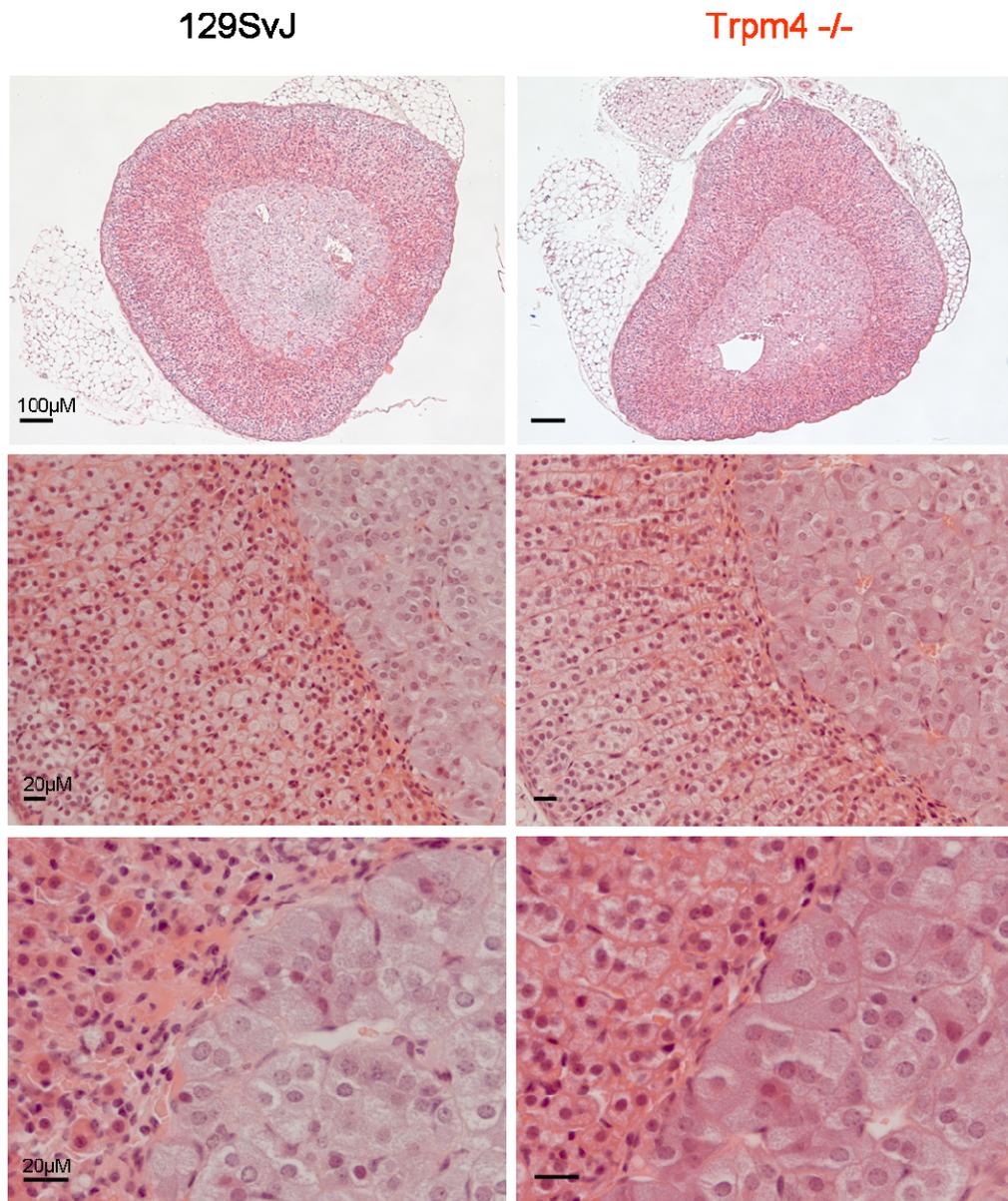


Abbildung 32: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte der Nebenniere.

3.2 Hypotonie TRPC1/C4-defizienter Mäuse

TRPC1 und TRPC4 bilden, wie andere TRPC-Proteine, Untereinheiten von Agonist aktivierten Kationenkanälen (Birbaumer, 2009; Freichel and Flockerzi, 2007; Freichel et al., 2004b; Freichel et al., 2005), wobei TRPC1 und TRPC4 möglicherweise miteinander (Sours-Brothers et al., 2009) und auch mit TRPC5 und TRPC6 heteromultimerisieren können (Goel et al., 2002; Strubing et al., 2003). Die Expression der TRPC1-, TRPC4-, TRPC5- und TRPC6-mRNA überlappt zum Beispiel in glatten Muskelzellen von Gefäßen (Inoue et al., 2004), so dass TRPC-Proteine in diesen Zelltypen möglicherweise als heterooligomere Kanalkomplexe vorliegen. TRPC Kanäle leiten neben Natrium auch Calcium, wobei der Calcium-Einstrom in glatten Muskelzellen von Gefäßen zur Kontraktion beitragen könnte. In unserem Institut konnten in primären glatten Muskelzellen des Ileums TRPC4- und TRPC6-Ströme identifiziert und gemessen werden und damit gezeigt werden, dass beide Proteine unabhängige TRPC4- und TRPC6-Kanäle bilden, die gleichzeitig durch Carbachol aktiviert werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass Acetylcholin in diesen Zellen über G_q -gekoppelte M_2 - und G_i -gekoppelte M_3 -Rezeptoren TRPC6- und TRPC4-Kanäle öffnet; die resultierenden depolarisierenden Ströme aktivieren in der Folge spannungsabhängige Calcium-Kanäle und sind somit für die neurogene, Acetylcholin-vermittelte Muskelkontraktion verantwortlich (Ambudkar, 2009; Tsvilovsky et al., 2009). Eine ähnliche Rolle, die Umwandlung G_q -vermittelter chemischer Signale in elektrische, könnten TRPC-Kanäle auch in der glatten Gefäßmuskulatur oder im Herzen spielen. Gleichzeitig könnten sie auch aufgrund ihrer Calcium-Leitfähigkeit zu Veränderungen Calcium-abhängiger Prozesse in der Zelle führen. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Blutdruckregulation und der Gefäßkontraktilität an TRPC1/C4-Doppelknockout Mäusen durchgeführt.

3.2.1 TRPC1/C4-defiziente Mäusen zeigen eine Hypotonie und verringerte körperliche Aktivität

Zur Charakterisierung der kardiovaskulären Funktionen in TRPC1/C4-defizienten Mäusen wurden die basalen hämodynamischen Parameter mittels Radiotelemetrie bestimmt. Das arterielle Drucksignal wurde über 24 Stunden pro Tag in einem Intervall von 3 Minuten für je 10 Sekunden und einer Abtastrate von 500 Hz aufgezeichnet. Während der ersten Tage nach Implantation des Blutdrucktransmitters war der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in beiden Untersuchungsgruppen deutlich erhöht. Im weiteren

Verlauf fiel der Blutdruck kontinuierlich ab und pendelte sich nach etwa einer Woche auf ein konstantes Niveau ein. Messungen von vier unabhängigen Versuchstiergruppen ergaben einen erniedrigten MAP in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen, sowohl während der Erholung vom operativen Eingriff als auch nach Rekonvaleszenz (Abbildung 33A). TRPC1^{-/-} Mäuse (Dietrich et al., 2007) zeigen dagegen keine Blutdruckänderungen (Abbildung 33A, Inset) und bei TRPC4^{-/-} Mäusen ist der MAP nur an den ersten vier postoperativen Tagen erniedrigt, danach aber im Vergleich zu Wildtypen unverändert (Dissertation M. Hoffmann, AG Freichel).

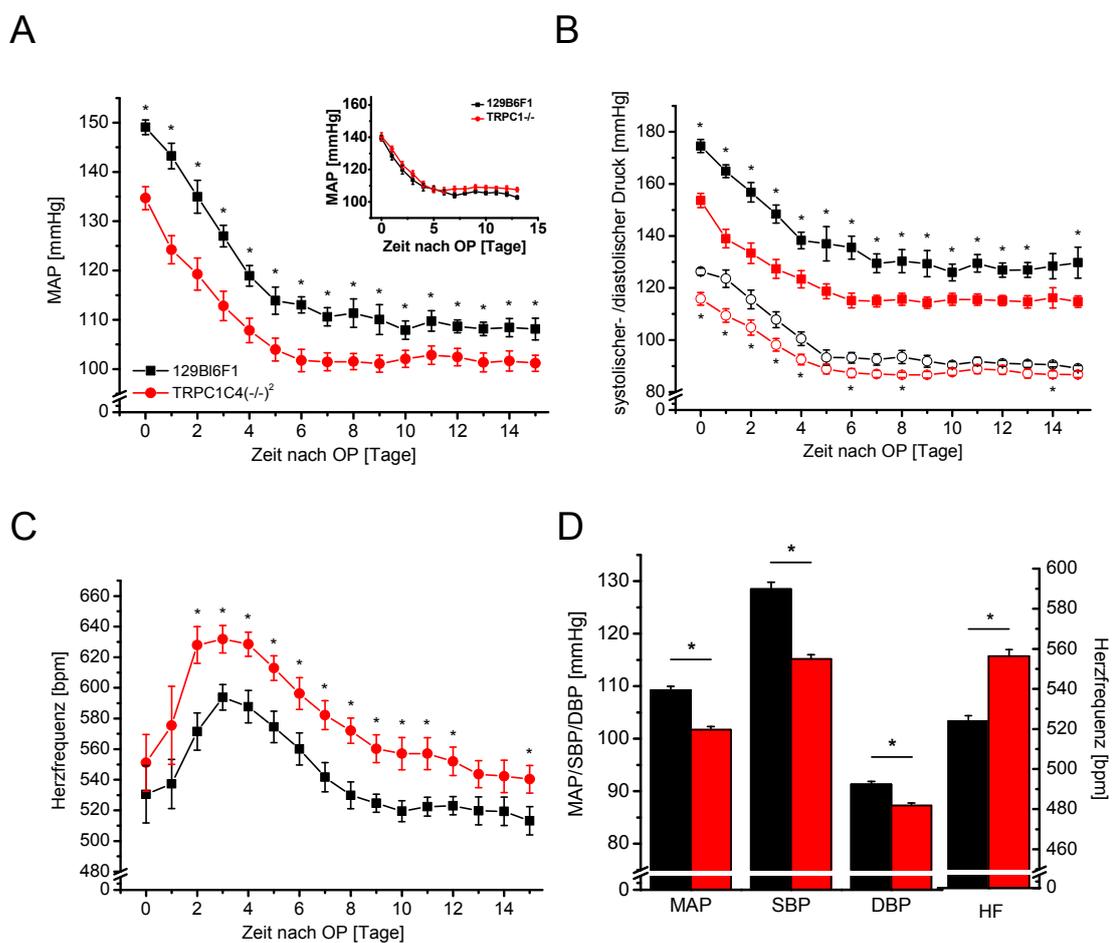


Abbildung 33: Postoperativer Blutdruck- und Herzfrequenzverlauf in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen. (A-C) Zeitverlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP, $p < 0.05$, A), des systolischen (SBP, $p < 0.05$) und diastolischen (DBP, $p < 0.05$) Blutdrucks (B) und der Herzfrequenz (C) in Wildtyp (schwarz, $n = 15$) und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen (rot, $n = 11$) nach Implantation des Blutdrucktransmitters. (D) MAP, SBP, DBP und Herzfrequenz gemittelt von Tag 7-15 nach Operation.

An Tag sieben nach dem operativen Eingriff betragen die durchschnittlichen Werte des MAP der Wildtypiere 110.6 ± 1.8 mmHg und für die TRPC1/C4^(-/-)2 Mäuse 101.5 ± 1.8 mmHg. Dieser Unterschied im mittleren arteriellen Blutdruck unter Basalbedingungen nach Rekonvaleszenz vom operativen Eingriff blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 15 Tagen bestehen. Ebenfalls war sowohl während der Erholungsphase als auch unter diesen Basalbedingungen der systolische Blutdruck signifikant erniedrigt (Abbildung 33B). Signifikante Unterschiede im diastolischen Blutdruck waren vor allem während der Erholungsphase deutlich. Die Hypotonie in TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen ging mit einer signifikant erhöhten Herzfrequenz einher (Abbildung 33C). An den ersten Tagen nach Implantation zeigte sich eine hohe Variabilität der Herzfrequenz der beiden betrachteten Genotypen. Bis zum vierten Tag nach der Operation stieg die Herzfrequenz stetig an und fiel in den darauf folgenden Tagen allmählich ab. Ähnlich wie der Blutdruck erreichte auch die Herzfrequenz etwa ab Tag sieben ein konstantes Niveau. Als Maß für die basale Herzfrequenz unter Ruhebedingungen wurden in Analogie zum Blutdruck alle gemessenen Daten über den Zeitraum von Tag 7-15 gemittelt (Abbildung 33D). Der mittlere arterielle Blutdruck in diesem Zeitraum betrug bei den Wildtypen 109.3 ± 0.7 mmHg und bei den TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen 101.7 ± 0.6 mmHg. Systolischer und diastolischer Blutdruck betragen bei den Wildtyp-Mäusen 128.5 ± 1.3 mmHg bzw. 91.3 ± 0.6 mmHg und bei den TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen 115.2 ± 0.8 mmHg bzw. 87.3 ± 0.5 mmHg (Abbildung 33D), wobei der größte Unterschied im systolischen Blutdruck erkennbar war.

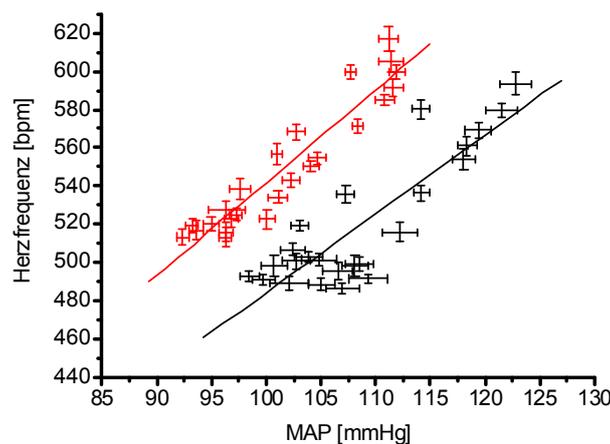


Abbildung 34: Beziehung zwischen Blutdruck und Herzfrequenz in TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen. Graphische Darstellung der Herzfrequenz in Relation zum mittleren arteriellen Blutdruck in Wildtyp und TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen.

In Abbildung 34 ist die Herzfrequenz in Abhängigkeit des MAP von beiden Genotypen aufgetragen. Es wird deutlich, dass in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen diese Relation im Vergleich zu den Wildtypen parallel in Richtung einer höheren Herzfrequenz und eines niedrigeren MAPs verschoben ist. Dies zeigt, dass bei einem definierten MAP die Herzfrequenz in den TRPC1/C4-defizienten Mäusen deutlich höher oder andersherum bei einer definierten Herzfrequenz der MAP deutlich erniedrigt ist.

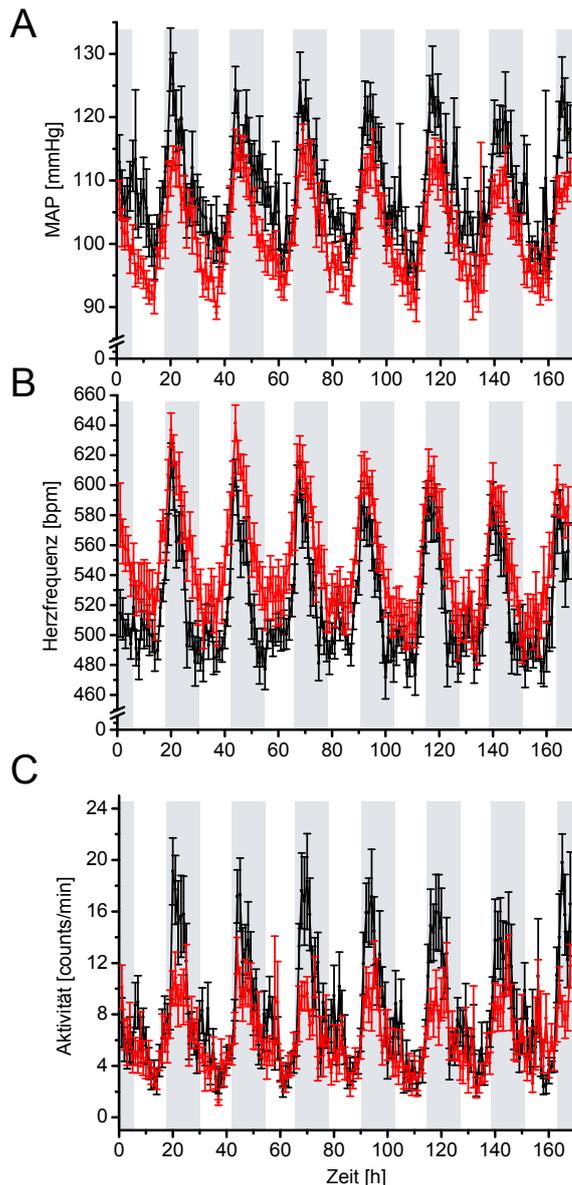


Abbildung 35: Zirkadiane Rhythmik von TRPC1/C4^(-/-) Mäusen. Zirkadiane Rhythmik der kardiovaskulären Parameter und der körperlichen Aktivität von Wildtyp (schwarz, n=15) und TRPC1/C4^(-/-) (rot, n=11) während der Tage 9-15 nach der Operation. (A) Mittlerer arterieller Blutdruck, (B) Herzfrequenz, (C) Aktivität.

In Abbildung 35 wurde die zirkadiane Rhythmik für den mittleren arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz und die körperliche Aktivität der TRPC1/C4^(-/-) und der Wildtyp Mäuse ausgewertet. Gezeigt ist jeweils ein Profil des mittleren arteriellen Blutdrucks (A), der Herzfrequenz (B) und der körperlichen Aktivität (C) unter Ruhebedingungen während der Tage 9-15 nach Implantation. Für alle drei Parameter ist nach Rekonvaleszenz vom operativen Eingriff der Tag-Nacht-Rhythmus wieder deutlich erkennbar. Der zirkadiane Verlauf beider Kreislaufparameter ist bei Wildtyp- und TRPC1/C4^(-/-) Mäusen vergleichbar,

wobei erkennbar war, dass die TRPC1/C4^(-/-) Mäuse einen im gesamten Tagesverlauf deutlich erniedrigten Blutdruck und eine erhöhte Herzfrequenz aufweisen. Hinsichtlich des tageszeitlichen Verlaufs der körperlichen Aktivität konnte ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, erreicht – wie erwartet – die körperliche Aktivität in beiden Untersuchungsgruppen in

den Nachmittagsstunden einen Tiefpunkt. Im Gegensatz dazu, ist die Aktivität der TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen während der Nachtphasen deutlich vermindert (siehe Abbildung 36A).

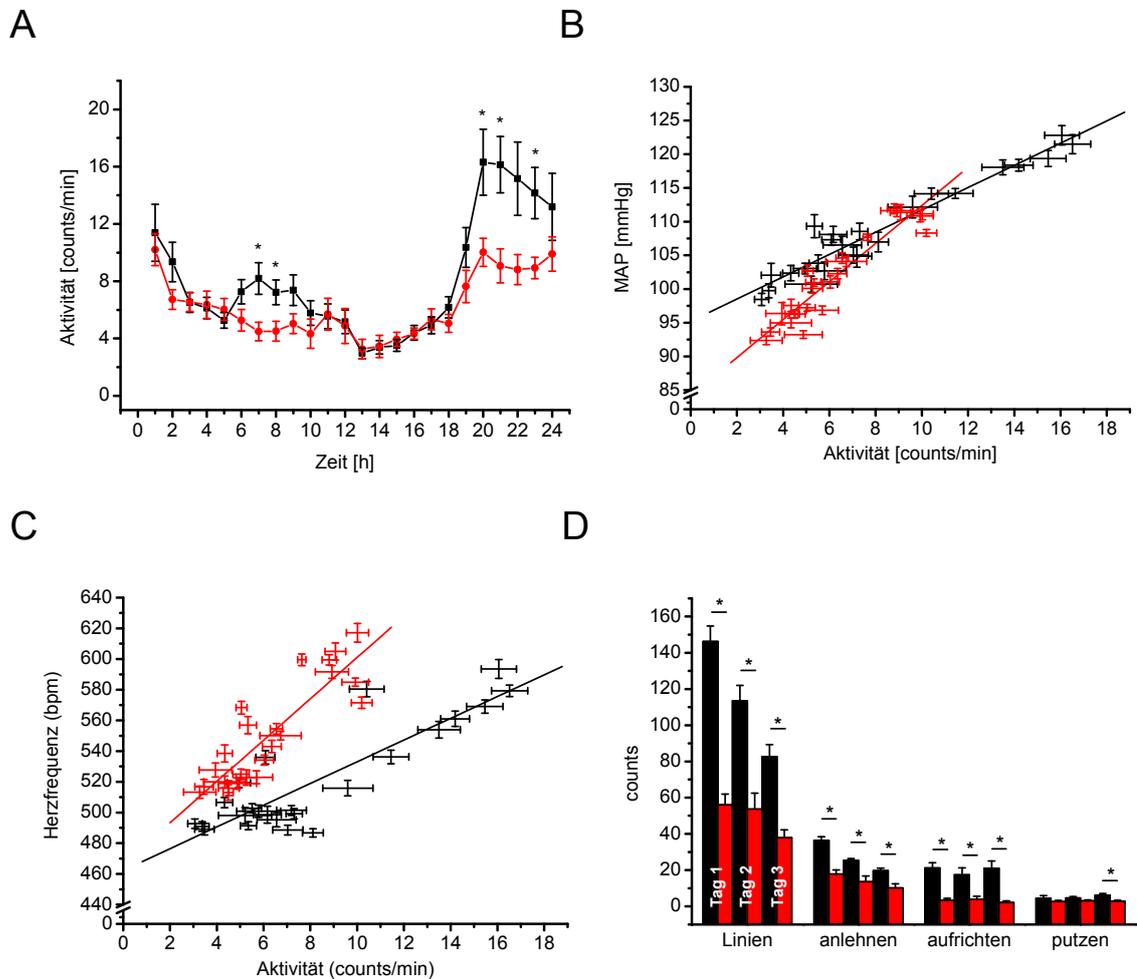


Abbildung 36: Körperliche Aktivität von TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen. (A) Stundenmittelwerte der körperlichen Aktivität über den Zeitraum von Tag 9-15 post OP jeweils über 24h von Wildtyp (schwarz, n=15) und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen (rot, n=11). (B&C) Mittlerer arterieller Blutdruck (B) und Herzfrequenz (C) in Abhängigkeit der Aktivität gemittelt an den Tagen 9-15 post OP von Wildtyp (schwarz, n=15) und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen (rot, n=11). (D) Open field Verhaltenstest von Wildtyp (schwarz) und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen (rot, n=12/Genotyp).

Zusätzlich wurde in den Morgenstunden zwischen 6 und 8 Uhr eine signifikant geringere Aktivität der TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen gemessen (Abbildung 36A). Eine aktivitätsabhängige Analyse sowohl des mittleren arteriellen Blutdrucks als auch der Herzfrequenz ergab bei beiden Parametern eine stärkere Steigung der Geraden in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen (Abbildung

36B&C), d.h. bei gleicher Zunahme der körperlichen Aktivität zeigten die Knockouts einen deutlich stärkeren Anstieg des MAPs und der Herzfrequenz als die Wildtypen.

Die verminderte körperliche Aktivität der TRPC1/C4^(-/-) Mäuse wurde mittels einer unabhängigen Methode – einem „Open field-Test“ – überprüft. Dieser Test ermöglicht eine Beurteilung des Erkundungsverhaltens und vor allem der körperlichen Aktivität der Tiere. An drei aufeinander folgenden Tagen wurden die Mäuse einzeln in einen mit Gitternetzlinien versehenen Kasten gesetzt und ohne Habituation ihr Verhalten analysiert. Abbildung 36D verdeutlicht, dass TRPC1/C4^(-/-) Mäuse an allen drei Tagen eine signifikant verminderte Aktivität, gezeigt durch die zurückgelegte Wegstrecke anhand der überquerten Linien, aufwiesen. Darüberhinaus zeigten TRPC1/C4^(-/-) Mäuse aufgrund der untersuchten Verhaltensvariablen ein eingeschränktes Erkundungsverhalten.

3.2.2 α 1-Adrenozeptor vermittelte Gefäßkontraktilität und Blutdruckregulation

Zur Untersuchung der Blutdruck- und Herzfrequenzregulation in TRPC1/C4^(-/-) Mäusen unter maximaler sympathomimetischer Stimulation wurden Experimente *in vivo* und *in vitro* mittels Applikation unterschiedlicher Phenylephrin-Konzentrationen durchgeführt. Nach Injektion einer hohen Phenylephrin-Dosis steigt der Blutdruck stark an, wodurch über den Barorezeptor-Reflex die Herzfrequenz absinkt. Phenylephrin wurde den beiden Gruppen an verschiedenen Tagen in aufsteigenden Konzentrationen intraperitoneal appliziert. Es ließ sich eine deutliche Dosis-Abhängigkeit feststellen. Bei einer Dosis von 0.1 mg/kg KG (Abbildung 37A) stieg der mittlere arterielle Blutdruck in beiden Genotypen einige Minuten nach der Injektion um etwa 35 mmHg an. Circa 10 Minuten nach Injektion begann dieser langsam zu sinken und hatte nach 40 Minuten wieder seinen Ausgangswert erreicht. Die Herzfrequenz stieg in den Wildtypen kurzfristig an und erreichte ziemlich schnell wieder ihr Ausgangsniveau. Nach Gabe einer Phenylephrin-Dosis von 0.3 mg/kg KG erhöhte sich der mittlere arterielle Blutdruck beider Genotypen etwa um 45 mmHg, verblieb für kurze Zeit auf diesem Plateau und erreichte erst nach mehr als 60 Minuten wieder den Ausgangswert. In den Wildtypen zeigte sich parallel zu dem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks eine reflektorische Erniedrigung der Herzfrequenz, welche nach etwa 20 Minuten wieder den Basalwert erreichte.

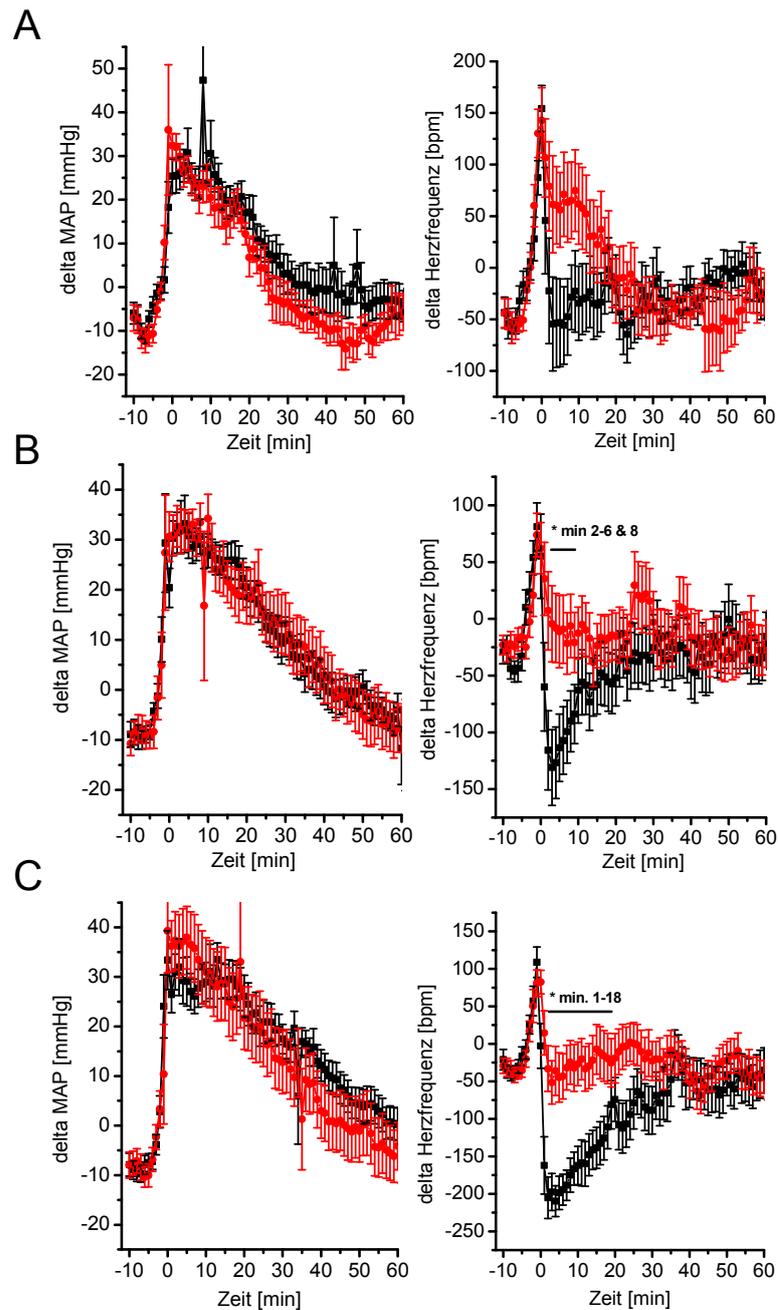


Abbildung 37: Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz nach intraperitonealer Injektion des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin. Mittlerer arterieller Blutdruck (links) und Herzfrequenz (rechts) nach intraperitonealer Injektion von Phenylephrin in einer Dosis von (A) 0.1 mg/kg KG (WT n=13, KO n=9) (B) 0.3 mg/kg KG (WT n=18, KO n=12) (C) 1.0 mg/kg KG (WT n=18, KO n=14), Wildtyp schwarz, TRPC1/C4^{(-/-)2} rot.

Diese reflektorische Bradykardie war in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen nicht zu beobachten; nach einer kurzzeitigen Erhöhung der Herzfrequenz aufgrund der Injektion erreichte diese schon nach 5 Minuten wieder ihren Ausgangswert (Abbildung 37B). Die feh-

lende reflektorische Bradykardie der TRPC1/C4^(-/-) Mäuse war nach einer Injektion von 1.0 mg/kg KG Phenylephrin noch deutlicher zu sehen. Während Wildtypiere mit einem Abfall der Herzfrequenz um mehr als 200 bpm reagieren blieb diese Reaktion in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen vollkommen aus. Der Blutdruckanstieg war in den TRPC1/C4^(-/-) Mäuse allerdings mit dem der Wildtypen vergleichbar (Abbildung 37C).

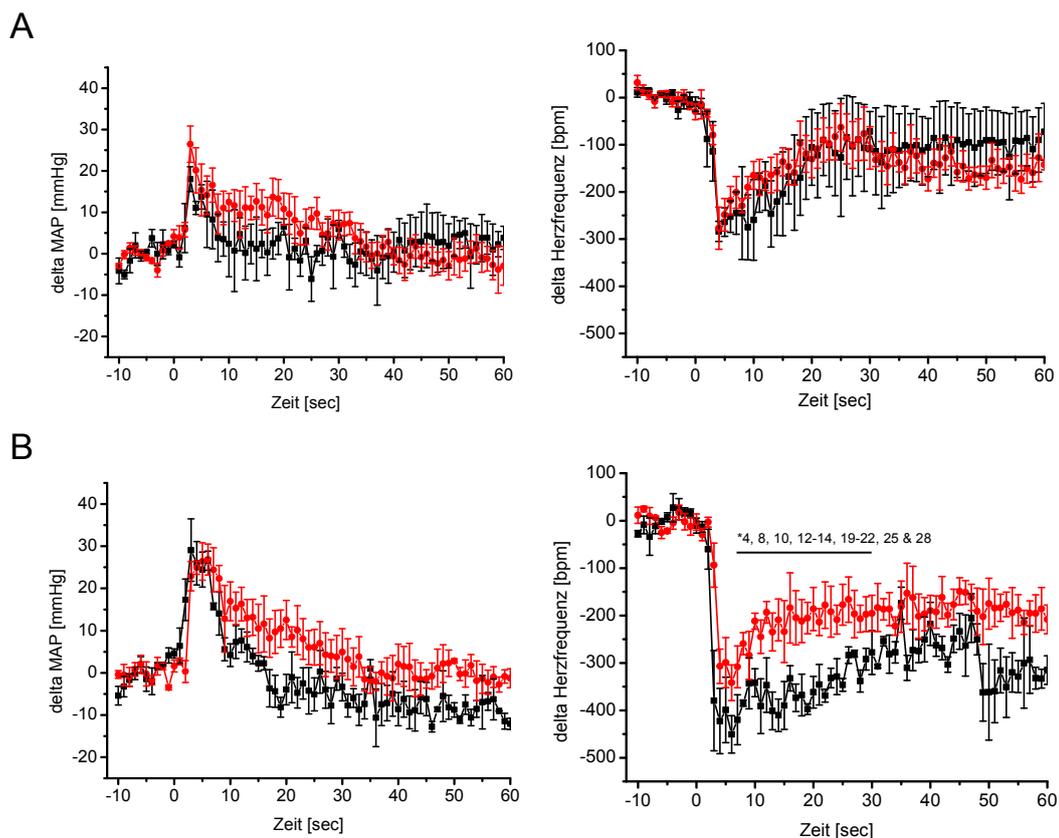


Abbildung 38: Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz nach intravenöser Injektion von Phenylephrin. Mittlerer arterieller Blutdruck (links) und Herzfrequenz (rechts) nach intravenöser Injektion unterschiedlicher Phenylephrin-Dosen. (A) 25 µg/kg KG (B) 70 µg/kg KG (WT n=3, KO n=4).

Da bei einem entsprechenden Blutdruckanstieg eine reflektorische Bradykardie schon innerhalb weniger Sekunden auftritt, wurde Phenylephrin auch intravenös appliziert. Nach Applikation von 25 µg/kg KG Phenylephrin stieg der mittlere arterielle Blutdruck um etwa 25 mmHg in beiden Genotypen und auch die Herzfrequenz erniedrigte sich reflektorisch in beiden Gruppen um etwa 250 bpm (Abbildung 38A). Die Injektion von

70 µg/kg KG Phenylephrin führte zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks von etwa 30 mmHg in den Wildtyp und in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen, wobei die reflektorische Bradykardie in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen geringer ausgeprägt war. Diese Experimente zeigen in ähnlicher Weise wie nach intra-peritonealer Injektion eine verminderte reflektorische Bradykardie, wobei aber die Anzahl der untersuchten Tiere noch gering ist.

Zur Analyse der durch PE induzierten Gefäßkontraktilität wurden Kontraktionsmessungen an isolierten Aortenringen durchgeführt. In Abbildung 39A ist die auf den jeweiligen Maximalwert normalisierte Kontraktion von Wildtyp- und TRPC1/C4^(-/-) Aortenringen in Abhängigkeit der Phenylephrin-Konzentration graphisch dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungskurve der Kontraktilität ist in TRPC1/C4^(-/-) Aortenringen im Vergleich zum Wildtyp hin zu höheren Konzentrationen verschoben.

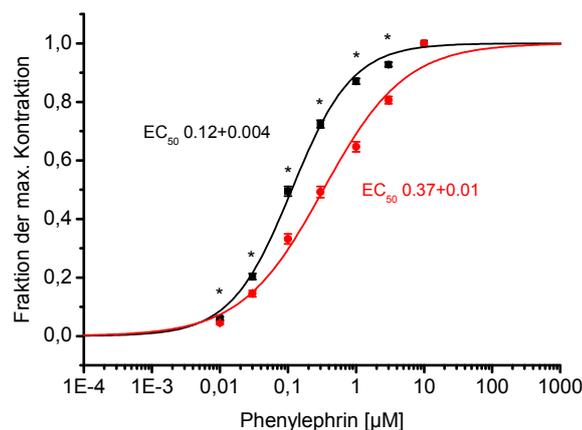


Abbildung 39: Phenylephrin-induzierte Gefäßkontraktilität in TRPC1/C4^(-/-) Mäusen. Kontraktilität von isolierten Aortenringen im Organbad (WT: schwarz, n=38, KO: rot, n=43 Aortenringe).

3.2.3 Blutdruck- und Herzfrequenzregulation nach Pharmakaapplikation

Um Hinweise auf eine Bedeutung einzelner Blutdruck-regulierender Organsysteme zu erhalten, wurden Blutdruck- bzw. Herzfrequenz-modulierende Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen appliziert.

Dexmedetomidin ist ein α_2 -Adrenozeptoragonist, welcher durch die Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung in Sympathikusneuronen zu einem Abfall von Blutdruck und

Herzfrequenz führt. Sowohl bei den Wildtyp Mäusen als auch bei den TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen kam es unmittelbar nach einem initialen Anstieg nach der Injektion nur zu einem sehr schwach ausgeprägten Blutdruckabfall (Abbildung 40A). Durch die Stimulation der α_2 -Adrenozeptoren kam es aber hauptsächlich zu einer Erniedrigung der Herzfrequenz, welche nach etwa 20 Minuten ihr Minimum erreichte und sich innerhalb von 100 Minuten wieder normalisierte. Die Kontrolltiere erreichten ausgehend von 550 bpm Minimalwerte um 371 bpm, wohingegen die TRPC1/C4^(-/-)2 Mäuse ausgehend von 554 bpm Minimalwerte von 454 bpm erreichten. Der Abfall der Herzfrequenz zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 40A).

Weiterhin wurde zur Untersuchung der Blutdruck- und Herzfrequenzregulation ohne die Beteiligung des vegetativen Nervensystems Hexamethonium verabreicht. Hexamethonium besitzt einen selektiv depolarisierenden Effekt an allen nikotinergen Rezeptoren, welche postsynaptisch an der Skelettmuskulatur, den vegetativen Ganglien und im ZNS vorkommen. Sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Knockout-Mäusen kam es unmittelbar nach der intraperitonealen Injektion zu einem vergleichbaren Blutdruckabfall (Abbildung 40B). Ausgehend von durchschnittlich 112 mmHg bei den Wildtypen und 99 mmHg bei den TRPC1/C4-defizienten Mäusen wurden nach wenigen Minuten Blutdruckwerte von 92 mmHg bzw. 87 mmHg erreicht. Innerhalb von 50 Minuten stieg der Blutdruck wieder auf das Ausgangsniveau an. Durch die Stimulation der nikotinergen Rezeptoren sank auch die Herzfrequenz in beiden Gruppen, erreichte nach etwa 10 Minuten ihr Minimum und normalisierte sich innerhalb von mehr als 60 Minuten. Betrachtet man die Änderungen des mittleren arteriellen Drucks und der Herzfrequenz bezogen auf die Ausgangswerte vor der Injektion, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen.

Zur Untersuchung des Beitrags der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung zum Ruheblutdruck bei TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen im Vergleich zu Wildtypen, wurde L-NAME, ein unspezifischer NO-Synthase Inhibitor, appliziert. In diesem Experiment war innerhalb einiger Minuten nach der Injektion ein schneller Anstieg des Blutdrucks in beiden Genotypen zu beobachten (Abbildung 40C). Etwa 20 Minuten nach der Injektion stabilisierte sich der mittlere arterielle Blutdruck sowohl bei den Wildtyp als auch bei den TRPC1/C4^(-/-)2 Mäusen bei einem Plateau von etwa 142 mmHg bzw. 132 mmHg. 100 Minuten nach der Injektion begann der Blutdruck wieder sehr langsam zu fallen, erreichte allerdings erst nach etwa 600 Minuten wieder den Ausgangswert. Der durch NO vermittelte Blutdruckanstieg zeigte keine signifikanten Unterschiede in den beiden untersuchten Genotypen. Unmittelbar nach der Injektion war parallel zum Blutdruckanstieg in beiden Gruppen ausgehend von etwa 527 bpm bei den Wildtypen und 587 bpm

bei den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen ein Abfall der Herzfrequenz auf Werte von 307 bpm bzw. 314 bpm zu beobachten. Etwa 50 Minuten nach der Injektion begann die Herzfrequenz wieder langsam anzusteigen.

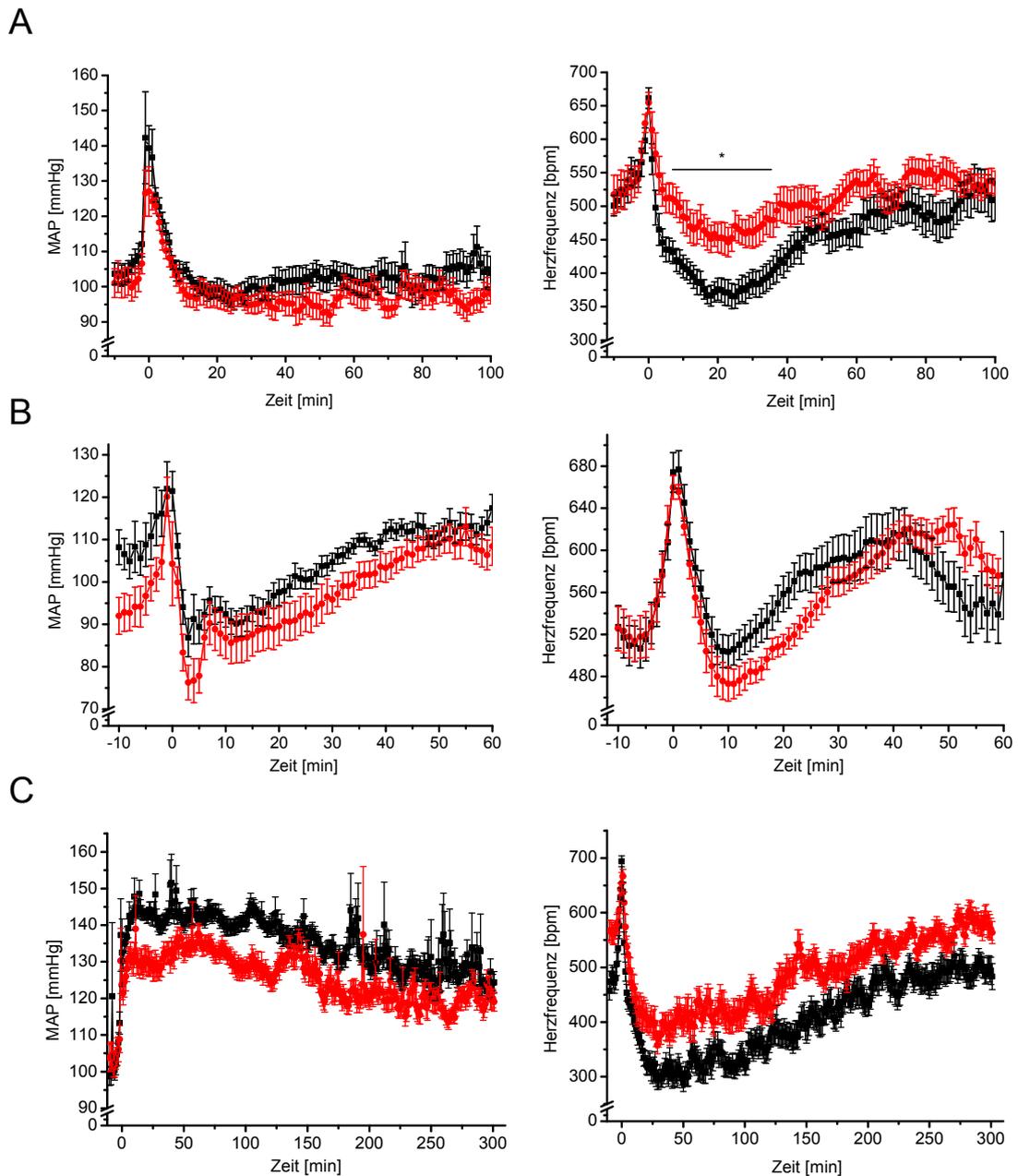


Abbildung 40: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz nach intraperitonealer Injektion von Dexmedetomidin, Hexamethonium und L-NAME. (A) 10 µg/kg KG Dexmedetomidin (WT n=20, KO n=15), (B) 20 mg/kg KG Hexamethonium (WT n=18, KO n=15), (C) 25 mg/kg KG L-NAME (WT n=18, KO n=15), Wildtyp schwarz, TRPC1/C4^(-/-) rot.

4 Diskussion

TRP-Kanäle bilden Kationenkanäle in Säugerzellen, die durch verschiedenste Agonisten, aber auch durch Temperatur, mechanische Reize und weitere Stimuli aktiviert werden. Sie vermitteln den transmembranösen Einstrom von Kationen wie Natrium und Calcium entlang ihres elektrochemischen Gradienten ins Zellinnere (Clapham, 2003). Eine große Zahl der TRPs wird in Säugern in Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert (Watanabe et al., 2008). Allerdings sind bisher keine oder wenig spezifische Pharmaka verfügbar, mit denen sich diese Kanäle/Ströme spezifisch blockieren lassen. Deshalb war es bisher nicht möglich, die Bedeutung einzelner TRP-Kanäle für bestimmte Organ- oder Systemfunktionen pharmakologisch zu charakterisieren. Um dennoch TRP-Proteine bzw. den TRP-vermittelten Natrium- bzw. Calcium-Einstrom nativen TRP-Kanälen und deren physiologischen Funktionen exakt zuzuordnen, haben wir definierte Mutationen in das jeweilige TRP-Gen in Keimzellen von Mäusen eingefügt und auf diese Weise dieses Gen in allen Zellen einer Maus gezielt inaktiviert. Die beobachteten Funktionsverluste in diesen sogenannten „Knock-out Mäusen“ im Vergleich zur erhaltenen Funktion in den Wildtyp-Tieren, bei denen das entsprechende Gen nicht mutiert ist, erlauben Rückschlüsse auf die Funktion des jeweiligen TRP-Kanals über die zellulären Funktionen hinaus auch für komplexe Systemfunktionen am gesamten Organismus, wie z.B. für die Regulation des Blutdrucks sowie die Erregungsausbreitung am Herzen und des Blutzuckerspiegels. Aufgrund der hochgradigen Homologie des murinen und humanen Genoms können weitreichende Schlussfolgerungen und Vorhersagen zur Symptomatik, Pathogenese sowie dem Nutzen medikamentöser Interventionen bei entsprechenden Krankheiten des Menschen getroffen werden.

In dieser Arbeit wurden durch intraarterielle Messungen mittels Radiotelemetrie die Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz in zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht. Die Radiotelemetrie wird als die „state of the art“ Methode für das Monitoring physiologischer Funktionen bei wachen, frei beweglichen Labortieren angesehen (Kramer and Kinter, 2003). Bei diesem Verfahren erfolgt ein mikrochirurgischer Eingriff an den Tieren, bei welchem ein telemetrischer Druck-Sender in die A. carotis sinistra implantiert wird. Die Mäuse sind durch die vollständige Implantation des kombinierten Drucksensors und Senders frei beweglich und nach Rekonvaleszenz vom chirurgischen Eingriff in keinsten Weise in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Neben der kontinuierlichen Aufzeichnung des systemischen Blutdrucks und der daraus abgeleiteten Herzfrequenz an wachen Tieren, können die kardiovaskulären Parameter im zirka-

dianen Verlauf für jedes Tier über einen Zeitraum von Wochen bis hin zu wenigen Monaten sowohl unter Ruhebedingungen als auch bei körperlicher Belastung untersucht werden. Nachteile der Radiotelemetrie sind neben den anfänglich hohen Ausrüstungskosten das aufwendige Training, das für die mikrochirurgische Implantation der Transmitter unerlässlich ist. Vergleichende Studien zeigen deutlich, dass die Radiotelemetrie besonders bei Blutdruckmessungen an Mäusen anderen Methoden überlegen ist (Kramer and Kinter, 2003; Lorenz, 2002; Whitesall et al., 2004). Eine in der Literatur häufig verwendete Methode zur Bestimmung des systolischen Blutdrucks ist die Tail-cuff Plethysmographie. Obwohl diese Methode eine einfache Messung des arteriellen Blutdrucks ermöglicht, besitzt sie eine große Zahl an Nachteilen. Der größte Nachteil besteht in dem enormen Stress, dem die Tiere ausgesetzt werden, auch wenn sie zuvor an die Versuchsbedingungen akklimatisiert wurden. Dies spiegelt sich in der hohen Herzfrequenz im Vergleich zu unter Ruhebedingungen gemessenen Werten wieder (Lorenz, 2002). Anders als die Ratte, welche normalerweise nach einiger Trainingszeit an diese Methode gewöhnt werden kann, bleibt der Stresslevel bei Mäusen auch nach langem Training erhöht. Weiterhin können die Messungen erheblich durch Bewegungen der Tiere gestört werden. Lorenz et al. erläutern weiter, dass mittels Tail-cuff gemessene Blutdruckwerte, falls sie nicht durch Bewegungsartefakte gestört sind, relativ gut mit Werten nach intraarterieller Messung vergleichbar sind; aber die Autoren empfehlen demnach Blutdruck-Unterschiede, die mittels Tail-cuff erhoben wurden mit direkten intraarteriellen Messungen abzusichern.

Aufgrund der Expression von sowohl TRPM4 als auch TRPC1 und TRPC4 im kardiovaskulären System, wurden zu Beginn der vorliegenden Studien mittels Radiotelemetrie zunächst über einen Zeitraum von mehreren Wochen die Regulation des systemischen Blutdrucks und der Herzfrequenz untersucht. Anschließend wurde in weiterführenden Experimenten untersucht, welche Mechanismen den erhobenen Blutdruckveränderungen zugrunde liegen. Die Ergebnisse werden im Weiteren getrennt nach Genotyp diskutiert.

4.1 Hypertonie TRPM4-defizienter Mäuse: eine integrative Analyse beteiligter Organe und deren Funktionen

TRPM4 Proteine bilden Calcium-aktivierte nicht-selektive Kationenkanäle in Mastzellen, welche die Triebkraft für den Calcium-Einstrom und damit die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die allergische Reaktion limitieren (Vennekens et al., 2007).

TRPM4-Proteine einer Größe von 138kDa konnten in Endothelzellen, im Vorhof, im Ventrikel, in der Niere und der Nebenniere von Wildtyp Mäusen identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des TRPM4-Gens die Langzeitregulation des systemischen Blutdrucks signifikant beeinflusst. TRPM4^{-/-} Mäuse weisen eine Hypertonie auf. Durch eine integrative Analyse der an der Blutdruckregulation beteiligten Organe und deren Funktionen konnten gezeigt werden, dass neurogene Mechanismen an der Ausbildung der Hypertonie der TRPM4-defizienten Mäuse beteiligt sind. Pathologische Veränderungen und damit eine Beteiligung an der Entstehung des erhöhten Blutdrucks des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, der Herzfunktion, der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen, des Elektrolyt- oder Wasser-Haushaltes und der physischen Aktivität konnten durch unterschiedliche experimentelle Ansätze ausgeschlossen werden.

Die Mäuse tolerierten die Radiotelemetrie-Implantate sehr gut und zeigten normale, arttypische Verhaltensmerkmale wie Nestbau, Nachtaktivität und Neugierde. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde bereits beschrieben, dass der Blutdruck der Mäuse zunächst für einige Tage nach der Operation während der Rekonvaleszenz deutlich erhöht ist und dass sich der Tag/Nacht-Rhythmus erst nach 5-7 Tagen post operationem wieder einstellt (Butz and Davisson, 2001; Kramer et al., 2000; Mattson, 1998; Van Vliet et al., 2000). Dies bedeutet, dass den Tieren eine Erholungsphase von mehreren Tagen gewährt werden muss, um zuverlässige Messungen des Ruheblutdrucks zu erhalten bzw. Experimente zur Blutdruckregulation ohne Beeinflussung durch den chirurgischen Eingriff durchgeführt werden können. Die beschriebene Blutdrucknormalisierung innerhalb einer Woche nach Implantation konnte ich in meinen Messungen bestätigen. Die Implantation des Katheters in die linke A. carotis verursachte bei den Tieren keine neurologischen Ausfallerscheinungen wie Lähmungen, so dass anzunehmen ist, dass die Versorgung des Gewebes über Gefäßkollateralen ausreichend ist. Es konnte gezeigt werden, dass TRPM4^{-/-} Mäuse durchschnittlich eine signifikante Erhöhung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks von 9 mmHg, 12 mmHg und 11 mmHg aufweisen. Diese Blutdruckerhöhung besteht über den gesamten Tagesverlauf. Mit Hilfe des Radiotelemetrie-Systems ist es zusätzlich möglich, indirekte Einflüsse auf die hämodynamischen Parameter zu analysieren, welche durch ein verändertes Verhalten der Tiere auftreten können, da eine vermehrte körperliche Aktivität und eine dadurch hervorgerufene gesteigerte Herzfrequenz direkt mit einer Blutdruckerhöhung korreliert (Van Vliet et al., 2003). Die Auswertung des zirkadianen Rhythmus der körperlichen Aktivität ergab keine Veränderungen der TRPM4-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Aus diesem Grund kann eine Aktivi-

täts-bedingte Hypertonie ausgeschlossen werden, vor allem auch dadurch, dass die Analyse der Blutdruckwerte bei geringer körperlicher Aktivität eine noch deutlichere Erhöhung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks mit Werten von 11 mmHg, 15 mmHg und 14 mmHg ergab.

Zur weiteren Analyse der betreffenden Mechanismen, durch welche die Deletion des TRPM4-Kanals zu einer Beeinträchtigung der Langzeit-Blutdruck-Regulation führt, wurden alle wichtigen an der Regulation des Blutdrucks beteiligten Organe und deren Funktionen untersucht. Die Blutdruckerhöhung in den TRPM4^{-/-} Mäusen war in mehr als 6 Monate alten Tieren - wahrscheinlich sekundär - mit einer moderaten Herzhypertrophie ohne Anzeichen einer kardialen Fehlfunktion verbunden. Es wurde bereits beschrieben, dass TRPM4 in verschiedenen Zelltypen des Herzens exprimiert wird. Mittels RT-PCR konnte von J. Londono in unserem Labor TRPM4 aus mittels Laser-Micro-Dissection isolierten Kardiomyozyten amplifiziert werden. Demion et al. (Demion et al., 2007) zeigten TRPM4 Expression in Zellen des Sinusknoten und Guinamard et al. (Guinamard et al., 2006) beschrieben eine Hochregulation der TRPM4-Expression in Kardiomyozyten von hypertrophierten Herzen in Ratten. Kürzlich wurde eine Mutation in Exon 1 des TRPM4-Gens von Patienten mit progressiv familiärem Leitungsblock Typ1 identifiziert, die zu einer Substitution des Glutamats in Position 7 durch Lysin (TRPM4^{E7K}) führt. Dieser Aminosäureaustausch stellt offensichtlich eine „gain of function“ Mutation dar; nach Expression in HEK-Zellen scheint der turnover der TRPM4^{E7K}-Mutanten im Vergleich zum turnover des Wildtyp-Proteins verlangsamt zu sein, woraus ein größerer TRPM4-vermittelter Kationenstrom ins Zytosol resultiert. Erklärt wird dies durch eine veränderte SUMOylierung von TRPM4 Proteinen und einer verminderten Endozytose (Kruse et al., 2009). Intraventrikuläre Messungen von Druck-Volumen-Kurven (in Zusammenarbeit mit G. van der Mieren, Cardiologie Universität Leuven) ergaben keine Veränderungen der Herzauswurfleistung der TRPM4-defizienten Mäuse unter Basalbedingungen. Dies spricht dagegen, dass die Hypertonie auf einer gesteigerten Herzkontraktilität mit erhöhtem Herzzeitvolumen beruht.

Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist von zentraler Bedeutung für die mittel- bis langfristige Blutdruckregulation und die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Organismus (Cowley, 1992; Crowley et al., 2005; Persson, 1996). Deshalb habe ich untersucht, ob bei den TRPM4-defizienten Mäusen die Funktionsfähigkeit des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beeinträchtigt ist. Die Sekretion von Renin aus juxtaglomerulären Zellen der Niere wird durch vaskuläre Rezeptoren in der Wand der afferenten Arteriolen, die auch als renale Barorezeptoren bezeichnet werden, und durch Änderungen der Natriumkonzentration im Bereich der distalen

Tubuli im Macula-densa-Bereich gesteuert. In Macula-densa Zellen wurden TRPM4-ähnliche Kanäle bereits beschrieben (Lapointe et al., 2003). Messungen der Regulation der Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren, die renale Renin Expression und die Plasma Renin-Konzentration (in Zusammenarbeit mit F. Schweda, Physiologie Universität Regensburg) waren in den TRPM4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen unverändert. Ebenfalls ergab die Analyse der Aldosteron-Konzentration im Plasma keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Die Blutentnahme für die Analyse der Plasma-Renin und Aldosteronkonzentration erfolgte unter möglichst stressfreien Bedingungen über eine submandibuläre Punktion, da seit langem bekannt ist, dass eine Aktivierung des Sympathikus innerhalb kurzer Zeit zu einer Stimulierung der Renin- und Aldosteronsekretion führt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein wesentlicher Defekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als primäre Ursache der Hypertonie ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden die Elektrolytkonzentrationen im Urin und im Plasma von TRPM4-defizienten Mäusen und Wildtypen untersucht. Zum Beispiel würde im Rahmen eines Hyperaldosteronismus eine Verschiebung der Elektrolytkonzentration im Plasma erfolgen, welche sich in der Regel durch den Nachweis einer Hybernatriämie und einer Hypokaliämie bestätigen ließe. Die in dieser Arbeit bestimmten Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid im Urin wiesen bei den TRPM4^{-/-} Mäusen keine signifikanten Abweichungen auf. Auch der Hämatokrit und das Plasma Volumen sind in den TRPM4-defizienten Tieren unverändert. Lediglich das ausgeschiedene Urinvolumen über einen Gesamtzeitraum von 24h ist um etwa 20% erhöht. Wäre als Ursache der Hypertension das Plasmavolumen erhöht und damit als Gegenregulation das Urinvolumen gesteigert, sollte gleichzeitig die Sekretion von Renin herabgesetzt sein. Aufgrund der vorliegenden Daten, lässt sich die Polyurie der TRPM4-defizienten Mäuse als Folge einer Druckdiurese erklären. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse gegen eine chronische Volumen Retention als Hauptursache der Blutdruckerhöhung in den TRPM4^{-/-} Mäusen.

Der mittlere arterielle Blutdruck ist das Produkt aus Herzauswurfleistung und totalem peripheren Widerstand. Die gleichzeitige Erhöhung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks, eine leicht erniedrigte Blutdruckamplitude und keine Veränderungen der Herzauswurfleistung, sprechen für eine Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes (Klabunde, 2005). Eine Vasokonstriktion von arteriellen Widerstandsgefäßen ist eine Hauptkomponente der Kontrolle des totalen peripheren Gefäßwiderstandes, und damit auch des Blutdrucks (Davis and Hill, 1999). Es wurde bereits in der Literatur postuliert, dass TRPM4 und TRPC6 unabhängig voneinander an der Regulation des myogenen Gefäßtonus in Cerebralarterien beteiligt sein sollen (Earley

et al., 2004; Welsh et al., 2002). In einem anschließend erschienenen Review wurde wiederum eine Rolle von TRP-Kanälen bei der Generierung des myogenen Tonus angezweifelt (Sharif-Naeini et al., 2008). Weiterhin konnte kürzlich erstmals demonstriert werden, dass die Polyzystine TRPP1 und TRPP2, ebenfalls Mitglieder der TRP-Superfamilie, eine Rolle bei der Druckwahrnehmung in Blutgefäßen einnehmen (Sharif-Naeini et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die myogene Antwort von peripheren Widerstandsgefäßen im Experiment der isoliert perfundierten Hinterpfoten untersucht. Als myogene Antwort eines Widerstandsgefäßes bezeichnet man die Fähigkeit der glatten Muskulatur auf Erhöhung des transmuralen Drucks mit einer Kontraktion zu antworten (Bayliss, 1902). Sie ist der Grundmechanismus für die Autoregulation der Organdurchblutung. Dehnung der Gefäßwand führt zu einer Tonussteigerung, Verminderung der Gefäßwanddehnung resultiert in einer Tonusreduktion. Dadurch ist es möglich bei plötzlicher Änderung des Perfusionsdruckes in physiologischen Bereichen die Durchblutung konstant zu halten. Diese Autoregulation von Widerstandsgefäßen beruht nur auf der Aktivität von glatten Gefäßmuskelzellen und ist unabhängig von neuronalen, metabolischen und hormonellen Einflüssen. Die myogene Antwort im Hinterpfotengefäßbett der TRPM4^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert. Um einen Einfluss des genetischen Hintergrundes zusätzlich ausschließen zu können wurden diese Messungen nochmals mit Tieren eines C57Bl6 Wildtyp-Hintergrundes und entsprechenden Kontrollen durchgeführt und auch dabei konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hypertonie der TRPM4-defizienten Mäuse nicht durch eine veränderte myogene Antwort der peripheren Arterien und Arteriolen erklärt werden kann. Obwohl diese Ergebnisse zunächst widersprüchlich zu den Ergebnissen von Earley et al. an Cerebralarterien erscheinen (Earley et al., 2004), könnte eine mögliche Erklärung darin liegen, dass unterschiedliche Gefäßtypen untersucht wurden. Die Aufgabe der Regulation des Blutflusses durch die myogene Antwort ist möglicherweise in den Nieren und im Gehirn von größerer Bedeutung als in anderen Organsystemen. Im Vergleich zu den Arteriolen des Hinterpfotengefäßbettes weisen Cerebralarterien möglicherweise unterschiedliche Mechanismen auf, um größeren Blutdruckschwankungen entgegenzuwirken, welche ansonsten zu Hypoxie oder einer zu starken Durchblutung des Gehirns führen würden. Aus diesem Grund könnten die regulierenden Mechanosensoren, die für die myogene Antwort verantwortlich sind, in diesen Blutgefäßtypen voneinander abweichen. Darüber hinaus führte der TRPM4-Anitise-Ansatz von Earley et al. zu einer unvollständigen Reduktion der TRPM4 mRNA, wobei die Reduktion der TRPM4-Proteinmenge auch nicht quantifiziert wurde. Aus diesem Grund könnten die Differenzen der Ergebnisse in der Anwendung der unterschiedlichen Methoden, nämlich einer-

seits Gentergating und andererseits Antisense RNA Behandlung, begründet sein. Eine vergleichbare Diskrepanz der myogenen Antwort konnte auch zwischen einem Antisense-vermittelten (Welsh et al., 2002) und einem Gentergating-basierten Ansatz (Dietrich et al., 2004) zur Inaktivierung von TRPC6 gefunden werden. Hier wurde von beiden Arbeitsgruppen die myogene Antwort in Cerebralarterien untersucht. Dietrich et al. zeigen, dass eine Erhöhung des intravaskulären Drucks eine ähnliche Vasokonstriktion in Gefäßen von TRPC6-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen hervorruft, wobei der Perfusionsdruck, an dem die myogene Dilatation in eine Konstriktion übergeht, in den Knockout-Tieren in Richtung niedrigere Werte verschoben ist. In mit TRPC6-antisense behandelten Cerebralarterien beschreiben Welsh et al. eine Inhibierung der durch Erhöhung des intravaskulären Druck hervorgerufenen Vasokonstriktion von 70-80%.

Der arterielle Blutdruck wird nicht nur durch autoregulatorische Mechanismen, sondern auch durch ein Zusammenspiel zahlreicher Vasokonstriktoren und Vasodilatoren bestimmt. Die α_1 -Adrenozeptor vermittelte Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen durch Phenylephrin sowohl in Blutdruckexperimenten *in vivo* als auch an isolierten Aortenringen und peripheren Widerstandsgefäßen *in vitro* war zwischen den untersuchten Genotypen vergleichbar. Auch eine durch α - und β -adrenerge unspezifische Rezeptoraktivierung induzierte Vasokonstriktion mittels Norepinephrin *in vivo* ergab keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Gefäßkontraktilität der TRPM4-defizienten Mäuse. Weiterhin zeigte die durch niedrige Epinephrin-Konzentrationen hervorgerufene Vasodilatation über β_2 -adrenerge Rezeptoren und die durch höhere Konzentrationen vermittelte Vasokonstriktion über α_1 -Adrenozeptoren im Gefäßbett der isoliert perfundierten Hinterpfoten den gleichen Effekt in TRPM4^{-/-} Mäusen und Wildtypen. Die β -Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation war sowohl in den Blutdruckexperimenten als auch im Experiment der isoliert perfundierten Hinterpfoten vergleichbar. Bei der über Stickstoffmonoxid vermittelten Relaxation durch intraperitoneale Applikation des NO-Synthase Inhibitors L-NAME und der durch Acetylcholin induzierten NO-Produktion in peripheren Widerstandsgefäßen ergab sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Wildtyp- bzw. Knockout-Mäusen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Beitrag der basalen NO-Freisetzung zur Aufrechterhaltung des Ruheblutdrucks in den TRPM4-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nicht verändert ist. Da eine Inaktivierung von TRPM4 zu vermehrter Mastzell-Degranulation führt (Vennekens et al., 2007), wollte ich eine erhöhte Chymase-Aktivität in Mastzellen von TRPM4-defizienten Gefäßen ausschließen. Die durch ACE-unabhängige Bildung von Angio-

tensin II durch Mastzell-abhängige Chymasen hervorgerufene Kontraktion der Widerstandsgefäße der Hinterpfoten war in den TRPM4^{-/-} Mäusen nicht verändert.

Eine akute Erhöhung des Blutdrucks sollte zu einer Baroreflex-vermittelten Inhibition der sympathischen Aktivität führen. Dabei sollte dann die sympathische Inhibition zu einer Verminderung der Herzfrequenz und der Catecholamin-Freisetzung aus den Nervenendigungen und den Chromaffinzellen führen. In TRPM4^{-/-} Mäusen konnten eine leichte (aber signifikante) Erhöhung der durchschnittlichen Herzfrequenz unter Basalbedingungen, signifikant erhöhte Epinephrin Level im Plasma und signifikant erhöhte Level von Metanephrin bzw. Vanillinmandelsäure im Urin gefunden werden. Die durchschnittlichen Norepinephrin Level im Plasma und von Normetanephrin im Urin waren ebenfalls im Vergleich zu Wildtypen erhöht, der Unterschied war aber bei der Anzahl der untersuchten Tiere nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung, warum der Unterschied in den Epinephrin Level im Plasma deutlicher ist, könnte durch die unterschiedlichen Synthesorte, denen die zirkulierenden Catecholamine Epinephrin und Norepinephrin entstammen, erklärt werden. Epinephrin wird aus den Chromaffinzellen des Nebennierenmarks nach Aktivierung der präganglionären sympathischen Nerven freigesetzt. Norepinephrin wird ebenfalls aus dem Nebennierenmark ins Blut abgegeben, repräsentiert aber nur etwa 20% der gesamten aus dem Nebennierenmark entstammenden Catecholamine. Die hauptsächliche Quelle des im Gefäßsystem zirkulierenden Norepinephrins stammt aus sympathischen Nervenendigungen. Zusätzlich zu den erhöhten Epinephrin Konzentrationen im Plasma weist auch eine Gabe von Hexamethonium, durch welches die ganglionäre Übertragung sowohl des sympathischen als auch des parasympathischen Nervensystems blockiert wird, auf eine Fehlregulation des Sympathikus hin. In den TRPM4^{-/-} Mäusen fiel der mittlere arterielle Blutdruck nach intraperitonealer Injektion von Hexamethonium auf ein vergleichbares Niveau wie in Wildtyp Mäusen ab, sodass der bestehende Blutdruckunterschied aufgehoben werden konnte. Durch intraperitoneale Applikation von Prazosin, welches hauptsächlich die durch α_1 -adrenerge Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion blockiert, konnte – wie auch nach Hexamethonium-Injektion – der Blutdruck der TRPM4^{-/-} Mäuse stärker reduziert werden als in den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die TRPM4-defizienten Mäuse einen erhöhten Sympathikotonus aufweisen. Die deutliche Erhöhung der Epinephrin Level im Plasma und der im Urin ausgeschiedenen Menge von Metanephrin und Vanillinmandelsäure sowie die Aufhebung der Hypertonie durch den Ganglienblocker Hexamethonium könnte auf eine wichtige Rolle von TRPM4 bei der Regulation der Catecholaminfreisetzung aus Chromaffinzellen des Nebennierenmarks hinweisen. Alternativ könnte die Regulation der Aktivität der präganglionären

sympathischen Nerven, welche die Nebenniere innervieren, verändert sein. Auch können Veränderungen der Wiederaufnahme der Catecholamine oder anderer Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden, dass eine Inaktivierung des TRPM4 Gens zu einer Hypertonie in Mäusen führt. Dabei konnte durch die systematische Analyse der Blutdruck-beeinflussenden Organe eine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion, des RAAS und der Herzfunktion ausgeschlossen werden. Die systematische Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen deutet darauf hin, dass der erhöhte Blutdruck auf einem verstärkten Sympathikotonus mit einer Beteiligung der Nebenniere beruht.

Obwohl die Mechanismen, wie nun die Inaktivierung zu Bluthochdruck führt, bisher noch nicht auf der molekularen Ebene verstanden sind, suggerieren diese Ergebnisse, dass eine Stimulation der TRPM4 Aktivität nicht nur hilfreich wäre um allergischen Reaktionen vorzubeugen (siehe Anhang A: Anaphylaxie in TRPM4-defizienten Mäusen), sondern auch um eine Erniedrigung des Blutdrucks ohne Beeinflussung der Herzfunktion bei hypertensiven Patienten zu erreichen.

4.2 Hypotonie TRPC1/C4-defizienter Mäuse

TRPC4 und TRPC1 bilden, wie andere TRPC Proteine, Untereinheiten von Agonist-aktivierten Kationenkanälen (Freichel and Flockerzi, 2007; Freichel et al., 2004b; Freichel et al., 2005), wobei TRPC1 und TRPC4 zusammen mit TRPC5 und möglicherweise auch mit TRPC6 heteromultimerisieren können (Goel et al., 2002; Strubing et al., 2003). Die Expression der TRPC1-, TRPC4-, TRPC5- und TRPC6-mRNA überlappt u.A. in glatten Muskelzellen von Gefäßen (Inoue et al., 2004), so dass TRPC-Proteine in diesen Zelltypen möglicherweise als heterooligomere Kanalkomplexe vorliegen. Da TRPC Kanäle neben Na^+ auch Ca^{2+} leiten, könnte der Ca^{2+} -Einstrom in glatten Muskelzellen von Gefäßen wesentlich zur Kontraktion beitragen. Ich habe deshalb Untersuchungen zur Regulation der Gefäßkontraktilität und der Blutdruckregulation in TRPC1^{-/-} und TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen durchgeführt.

Mit Hilfe radiotelemetrischer Blutdruckmessungen konnte gezeigt werden, dass TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse eine signifikante Erniedrigung des über 24h gemittelten systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks von 14 mmHg, 4 mmHg und 7 mmHg sowohl während der Erholung vom operativen Eingriff als auch nach Rekonvaleszenz aufweisen. Diese Hypotonie besteht über den gesamten Tagesverlauf und

geht mit einer signifikant erhöhten Herzfrequenz einher. TRPC1^{-/-} Mäuse dagegen zeigen keine Blutdruckveränderungen und bei TRPC4^{-/-} Mäusen ist der MAP nur an den ersten vier postoperativen Tagen erniedrigt. In den Endothelzellen von TRPC4^{-/-} Mäusen ist der durch körpereigene Agonisten wie Acetylcholin, ATP oder Thrombin induzierte zytosolische Anstieg der Calciumkonzentration drastisch vermindert. Als Folge davon ist sowohl die Relaxation von Aortenringen als auch die Regulation der Gefäßpermeabilität in isolierten Endothelzell-Layern und auch in intakten Lungengefäßen stark eingeschränkt (Freichel et al., 2001; Tirupathi et al., 2002). Der mittlere arterielle Blutdruck ist 24 Stunden nach Implantation eines intraarteriellen Katheters im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren um ca. 11 mmHg erniedrigt. Nach ausreichender Rekonvaleszenz der Tiere vom operativen Eingriff kann allerdings kein Unterschied mehr hinsichtlich des Ruheblutdrucks gemessen werden (Hoffmann, 2004). In TRPC1^{-/-} Mäusen ist die Druck-induzierte Kontraktion von Cerebralarterien unverändert. Weiterhin wurde beschrieben, dass TRPC1 alleine - entgegen einiger Hypothesen - keine obligatorische Komponente des speicher-abhängigen und durch Stretch aktivierten Kanalkomplexes in glatten Muskelzellen darstellt (Dietrich et al., 2007).

Mittels der verwendeten Blutdruck-Transmitter ist eine Quantifizierung der körperlichen Aktivität der Tiere möglich. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse neben der erhöhten Herzfrequenz und der Hypotonie eine geringere körperliche Aktivität aufweisen. Die Auswertung des zirkadianen Rhythmus der körperlichen Aktivität zeigt vor allem in den Nachtstunden eine deutlich geringere Aktivität der TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Durch einen „Open Field Test“ konnte die verminderte körperliche Aktivität der TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen bestätigt werden. Werden nun der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz in Abhängigkeit von der körperlichen Aktivität betrachtet, wird deutlich, dass bei normaler körperlicher Aktivität der MAP erniedrigt und die Herzfrequenz erhöht ist. Die Herzfrequenz steigt mit zunehmender körperlicher Aktivität stärker an als in den Wildtyp Tieren. Die Frage, ob der erniedrigte Blutdruck und die gesteigerte Herzfrequenz eine Folge der verminderten Aktivität der Mäuse sind oder ob die verminderte Aktivität durch die Hypotonie und Tachykardie bedingt ist, bleibt hier ungeklärt.

In vivo Experimente zur Blutdruckregulation ergaben einen Hinweis auf eine gestörte Regulation der Herzfrequenz nach Stimulation α_1 -Adrenozeptor vermittelter Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen durch Phenylephrin. Nach intraperitonealer Injektion von Phenylephrin, durch welches der Blutdruck um mehr als 40 mmHg anstieg, war in den Wildtypen eine deutliche Barorezeptor-vermittelte Reflexbradykardie erkennbar.

Barorezeptoren sind Mechanorezeptoren in der Gefäßwand des Carotis-Sinus und Aortenbogens, die bei einem Blutdruckanstieg durch Dehnung aktiviert werden. Dies führt zu einer Inhibierung des sympathischen Nervensystems und einer Aktivierung des Parasympathikus mit nachfolgender Bradykardie. Im Unterschied zu Wildtyp Tieren blieb die Reflexbradykardie nach Applikation steigender PE-Konzentrationen in den TRPC1/C4-defizienten Tieren nahezu aus. Eine intravenöse Applikation bietet den Vorteil, dass sich die Substanz sofort im Blutkreislauf befindet und ein im Vergleich zur intraperitonealen Injektion deutlich schnellerer Wirkeintritt innerhalb von Sekunden zu beobachten ist. Erste Ergebnisse nach intravenöser Gabe von PE ergaben ebenfalls eine eingeschränkte Reflexbradykardie als Folge eines schnellen und starken Blutdruckanstiegs, was auf eine gestörte Autoregulation der Barorezeptoren in TRPC1/C4^(-/-) Mäusen hindeutet. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche veränderte Herzfrequenzregulation zeigte eine Stimulation der α_2 -Adrenorezeptoren mit Dexmedetomidin. Für diesen α_2 -Adrenorezeptoragonisten wurde beschrieben, dass niedrigere Konzentrationen vor allem den α_{2a} -Adrenorezeptor Subtyp aktivieren (Kamibayashi et al., 1995). Diese Aktivierung führt am Herzen zu einer Bradykardie und in der Peripherie zu einer Vasodilatation mit Blutdruckabfall. Nach intraperitonealer Applikation von Dexmedetomidin in einer Dosis von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG konnte allerdings sowohl in den Wildtypen als auch in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen kaum eine Änderung des Blutdrucks beobachtet werden. Die Applikation führte in beiden Genotypen aber zu einer Bradykardie, wobei diese in den TRPC1/C4^(-/-) Mäusen signifikant schwächer ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu zeigte eine intraperitoneale Applikation des nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten Hexamethonium oder des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME keine Veränderungen der Blutdruck und Herzfrequenzantwort in beiden Genotypen.

Der arterielle Blutdruck wird unter anderem durch ein Zusammenspiel verschiedener Vasokonstriktoren und Vasodilatoren bestimmt. Zur Analyse glattmuskulärer Kontraktion wurden Kontraktilitätsmessungen an isolierten Aortenringen von TRPC1/C4^(-/-) Mäusen und Wildtypen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve für Phenylephrin, was auf eine geringere Ansprechbarkeit der glatten Muskelzellen der Aorta von TRPC1/C4^(-/-) Mäusen hinweist und durch einen veränderten Calcium-Einstrom über TRPC1/C4 Kationenkanäle in glatten Muskelzellen nach α_1 -Adrenozeptor-Stimulation erklärt werden könnte. In Aortenringen von TRPC4^(-/-) Mäusen ist die Phenylephrin- und Noradrenalin-induzierte Kontraktion unverändert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TRPC1/C4^(-/-) Mäuse eine Hypotonie aufweisen, die mit einer verminderten körperlichen Aktivität assoziiert

ist. Darüberhinaus zeigen Kontraktilitätsmessungen an isolierten Aortenringen eine verminderte α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Gefäßkontraktion. Außerdem zeigen die TRPC1/C4-defizienten Mäuse eine Störung des Barorezeptorreflexes nach Blutdrucksteigerung. Aufgrund des unveränderten Blutdrucks in TRPC1- bzw. TRPC4-Einzelknockouts sprechen meine Ergebnisse dafür, dass in den Einzel-Knockouts das Fehlen einer Untereinheit kompensiert werden kann und eine Hypotonie bzw. verminderte Gefäßkontraktilität erst beim Fehlen beider TRPC-Proteine, TRPC1 und TRPC4, auftritt.

Weitere Experimente in Kooperation mit Prof. Dr. Frank Schweda (Universität Regensburg) zeigen eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen. Sowohl die Plasma-Renin-Aktivität als auch die renale Renin mRNA sind im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöht (Schweda, Mathar, Freichel; noch zu publizieren). Weiterhin sind das ausgeschiedene Urinvolumen und die Natriumkonzentration im Urin vermindert, was wahrscheinlich durch den niedrigen Blutdruck in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen bedingt ist. An isoliert perfundierten Nieren zeigte sich eine normale Stimulier- und Hemmbarkeit der Reninsekretion in beiden Genotypen, was gegen einen primären Defekt der Reninsekretion in den juxtaglomerulären Zellen der Niere in TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen spricht. Von Juan E. Camacho Londoño aus unserer Arbeitsgruppe konnte, übereinstimmend mit der erhöhten Renin-Aktivität, keine Erhöhung von Angiotensinogen im Plasma der TRPC1/C4-defizienten Mäuse, dem Substrat von Renin, gemessen werden. Insgesamt kann aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht beantwortet werden, ob die erhöhte Herzfrequenz eine Folge der Hypotonie ist oder ob sie unabhängig davon durch Inaktivierung von TRPC1 und TRPC4 zustande kommt. Als Folge und zur Kompensation der Hypotonie kann sowohl das Renin-Angiotensin-Aldosteron System aktiviert und dadurch das Urinvolumen und die Natriumkonzentration im Urin vermindert, als auch die Herzfrequenz in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen erhöht sein. Durch Applikation eines β -Blockers sollte in diesem Falle der Blutdruck in den TRPC1/C4^{(-/-)2} Mäusen noch stärker abfallen. Weiterhin sind die Stimulierbarkeit der α_2 -Adrenozeptoren möglicherweise durch Desensitisierung im Vergleich zu den Wildtypen erniedrigt, was zu einer erhöhten Herzfrequenz beitragen könnte. Besonders ein weiteres wichtiges Experiment zur Aufklärung des Phänotyps der TRPC1/C4-defizienten Mäuse wäre die Charakterisierung der kardialen Kontraktilität. Bei einer eingeschränkten kardialen Kontraktilität wäre die Herzauswurfleistung vermindert, was unabhängig von Unterschieden in der Gefäßkontraktilität und der körperlichen Aktivität den erniedrigten Blutdruck mit erhöhter Herzfrequenz erklären könnte. Eine primäre kardiale Ursache für die erhöhte Herzfrequenz könnte man beispiels-

weise durch Untersuchungen an spontan kontrahierenden Präparaten des rechten Vorhof ausschließen.

Im Weiteren wurden im Rahmen der Dissertation folgende Methoden und Ergebnisse etabliert, die unter anderem Eingang in Publikationen gefunden haben.

Anhang A: Anaphylaxie in TRPM4-defizienten Mäusen

A.1 Einleitung

Unter einer Allergie wird eine Immunreaktion gegenüber ansonsten „harmlosen“ Antigenen, wie beispielsweise Pollen, Milbenkot, Tierhaaren oder bestimmten Nahrungsmitteln, verstanden.

Nach Coombs und Gell werden allergische Reaktionen in 4 Typen klassifiziert (Gell PGH, 1963): Typ 1: Immunglobulin-E (IgE) -vermittelte Sofortreaktion, Typ 2: Immunglobulin-G- und Immunglobulin-M-vermittelte zytotoxische Reaktion, Typ 3: IgG-Immunkomplex-vermittelte Reaktion und Typ 4: zellvermittelte Spätreaktion. Da die durchgeführten Experimente auf die Untersuchung der Typ-1 Reaktion ausgerichtet sind, soll im Folgenden auf diese näher eingegangen werden.

A.1.1 Pathophysiologie der Allergie vom Typ-1

Etwa 90% aller Allergien sind Allergien vom Typ-1 und daher IgE-vermittelt. Beim ersten Kontakt eines Organismus mit einem potentiellen Allergen kommt es zur Sensibilisierung gegen dieses Agens. Antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Langerhanszellen in der Haut und Schleimhaut, dendritische Zellen oder gewebständige Makrophagen und zirkulierende Monozyten, phagozytieren die eingedrungenen Antigene, prozessieren sie durch proteolytische Spaltung und präsentieren deren Peptide in major histocompatibility complex II (MHC-II)-Molekülen naiven CD4⁺ T-Helferzellen (Th) des Typs 0 (Vorläuferzellen). Diese wiederum differenzieren sich unter Einfluss von Interleukin-4 (IL-4) zu allergenspezifischen T-Helferzellen des Typs 2, die daraufhin IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Th2-Zellen sind für Antikörper-vermittelte humorale Immunantworten verantwortlich. Zu deren wichtigsten Effektorfunktionen gehören die Regulation der IgE-Produktion und die Unterhaltung von IgE-abhängigen Immunreaktionen, die durch Eosinophile und Mastzellen als weitere Effektorzellen vermittelt werden. Th2-Zellen initiieren den Klassenwechsel der B-Zellen, woraufhin diese allergenspezifisches IgE bilden. Das IgE bindet an spezifische Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten. Bei einem Folgekontakt mit dem Allergen binden die Allergene an das membranständige IgE der Mastzellen und Basophilen, die daraufhin durch Degranulation ihre intrazellulären Botenstoffe wie Histamin, Serotonin, Leukotriene und Prostaglandine freisetzen. Dies führt innerhalb von Minuten zu einer allergischen Frühreakti-

on, die durch erhöhte Gefäßpermeabilität, vermehrte Schleimproduktion, Konstriktion der glatten Muskulatur und Chemotaxis von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Nach 3-8 Stunden schließt sich die allergische Spätphase an: Durch die Produktion von IL-4, 5, 10 und 13 von Th2-Zellen werden Eosinophile, Basophile, Makrophagen und weitere T-Lymphozyten aktiviert und strömen in die Kontaktregionen des Gewebes ein (Averbeck et al., 2007).

A.1.2 Mastzellen und Anaphylaxie

Mastzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Unreife Vorläufer der Mastzellen zirkulieren zunächst im Blut, wandern schließlich in die Zielgewebe, wie die Haut, den Respirationstrakt und die Darmmukosa, ein und differenzieren dort zu reifen Mastzellen (Galli et al., 2005). In intrazellulären Granula speichern Mastzellen eine Vielzahl von Botenstoffen, die nach entsprechender Stimulation freigesetzt werden und u. a. Inflammation, Vasodilatation, pathologisch gesteigerte Endothelpermeabilität sowie Bronchokonstriktion hervorrufen. Dadurch sind Mastzellen bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, insbesondere bei der Immunabwehr, bei Allergien und bei Anaphylaxie. Die Mastzellvermittelte Anaphylaxie beruht auf einer Freisetzung einer großen Zahl von Mediatoren, wie Histamin, Proteasen, Cytokinen und Proteoglykanen. Ebenso führt die Mastzellaktivierung zur schnellen Synthese und Freisetzung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen, welche über eine Metabolisierung von Arachidonsäure gebildet werden (Prussin and Metcalfe, 2006).

Für die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung ist ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol der Mastzellen erforderlich. Dieser Einstrom von Calcium ist abhängig vom Membranpotential, welches die Triebkraft für diesen darstellt (Mohr and Fewtrell, 1987a; Mohr and Fewtrell, 1987b). Nach Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration werden Calcium-aktivierte nicht selektive Kationenkanäle (CAN: calcium-activated nonselective cation) aktiviert, die ursprünglich in kultivierten Herzzellen der Ratte und in Pankreasazinuszellen beschrieben wurden (Colquhoun et al., 1981; Maruyama and Peterson, 1982). TRPM4 und der nächste Verwandte TRPM5 wurden als zwei Kandidaten für die Klasse der CAN-Kanalfamilie beschrieben (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003; Prawitt et al., 2003). Beide Proteine gehören zu der Melastatin-Unterfamilie der TRP-Membranproteine. Es bestand schon längere Zeit die Hypothese, dass CAN-Kanäle das Membranpotential von Zellen und damit das Ausmaß des Calcium-Einstroms kontrollieren könnten. Es ist vorstellbar, dass in elektrisch erregba-

ren Zellen, in denen der Calcium-Einstrom hauptsächlich durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vermittelt wird, eine Depolarisation den Calcium-Einstrom vergrößert. In nicht-erregbaren Zellen, wie Mastzellen, in welchen der Calcium-Einstrom hauptsächlich über speicher- und rezeptor-abhängige Kanäle vermittelt wird, würde eine Depolarisation des Membranpotentials den Calcium-Einstrom vermindern. Diese Hypothese wird durch Studien an Zelllinien, in denen TRPM4 überexprimiert oder herunterreguliert wurde, unterstützt (Cheng et al., 2007; Launay et al., 2004). Sowohl in der Maus als auch im Menschen gibt es zwei Hauptpopulationen von Mastzellen, Schleimhautmastzellen (murin: MMC, mucosal type mast cells) und Bindegewebsmastzellen (murin: CTMC, connective tissue type mast cells). MMC sind vor allem in Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes sowie in den Bronchien, lokalisiert. Bindegewebsmastzellen kommen in der Haut und in der Bauchhöhle vor. Da im murinen System weder MMC noch CTMC für *in vitro*-Untersuchungen in ausreichend hoher Zahl aus den entsprechenden Geweben isoliert werden können, werden vor allem sogenannte BMMC (bone marrow-derived mast cells) als anerkanntes *in vitro* Äquivalent für Mastzellen verwendet. Diese Zellen werden aus Knochenmarkszellen durch eine mehrwöchige Kultur in Gegenwart von Interleukin-3 generiert (Razin et al., 1982). Wir hatten TRPM4-defiziente Mäuse hergestellt und konnten zeigen, dass TRPM4 Calcium-aktivierte Kationenkanäle bildet, die in Knochenmarksmastzellen zur Depolarisation der Zellmembran führen und dadurch indirekt die treibende Kraft für den Calcium-Einstrom limitieren. Entsprechend ist in Abwesenheit von TRPM4 der Calcium-Einstrom in Mastzellen und damit die Degranulation drastisch gesteigert. Es konnte gezeigt werden, dass TRPM4 den Fc ϵ -Rezeptor-vermittelten Calcium-Einstrom und damit die Mastzellaktivierung durch seinen Effekt auf das Membranpotential reguliert. TRPM4^{-/-} Knochenmarksmastzellen zeigten im Durchschnitt ein mehr depolarisiertes Membranpotential und einen verstärkten Calcium-Einstrom. Diese Hyperpolarisation des Membranpotentials konnte dem Kaliumstrom, welcher durch den SK4-Kanal vermittelt wird, zugeordnet werden. Nach der Aktivierung der speicher-abhängigen Calcium-Kanäle und einer Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration wird der TRPM4-Kanal aktiviert, depolarisiert das Membranpotential und vermindert somit die Triebkraft für den Calcium-Einstrom durch CRAC-Kanäle. Auf diese Weise fungiert der TRPM4-Kanal als eine molekulare „Bremse“ auf den Calcium-Einstrom nach Fc ϵ -Rezeptor-vermittelter Aktivierung. An Knochenmarksmastzellen konnte gezeigt werden, dass die Fc ϵ RI-vermittelte Aktivierung dieser Mastzellen zu einer schnellen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin, und zu einer Neusynthese von Metaboliten der Arachidonsäure und verschiedenen Zytokinen und Chemokinen führt (Metcalf et al., 1997). TRPM4^{-/-} Knochenmarksmastzellen setzten vermehrt Histamin, Leukotrien und TNF

frei, wohingegen die Sekretion von IL-6 nicht verändert war (Vennekens et al., 2007). Um zu untersuchen, ob in Abwesenheit von TRPM4 auch die Aktivierung von reifen Bindegewebsmastzellen z.B. in der Haut gesteigert ist, wurden Anaphylaxie-Experimente an Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen etabliert und durchgeführt.

A.2 Methoden

Zur Untersuchung, ob der in kultivierten und unreifen Knochenmarksmastzellen gefundene Mechanismus der gesteigerten Mastzell-Aktivierung auch in Bindegewebsmastzellen zutrifft, wurden die folgenden *in vivo* Experimente an Wildtyp und TRPM4^{-/-} Mäusen etabliert und durchgeführt.

A.2.1 Perkutane Anaphylaxie – Sofortreaktion

Das Protokoll für die Sofortreaktion der kutanen Anaphylaxie wurde durchgeführt wie in Ali et al. beschrieben (Ali et al., 2004).

Ein Tag vor Versuchsbeginn wurde das Rückenfell der Tiere in Isofluran-Narkose durch Rasieren und anschließendes Auftragen von Enthaarungscreme entfernt und mit Dexpanthenol-Salbe behandelt. Am Versuchstag wurde den Mäusen in Isofluran-Narkose an zwei benachbarten Hautstellen am Rücken 30µl einer Lösung von IgE-Immunglobulinen (30 oder 60ng in 30µl 0.9% (w/v) NaCl) oder NaCl intradermal injiziert. Die verwendeten Immunglobuline erkennen Dinitrophenyl (DNP) und 2,4-Dinitrofluorobenzen (DNFB) als Antigen (IgE anti DNP; Sigma D-8406). Das Antigen ist an humanes Serumalbumin (HSA) als Trägersubstanz gekoppelt. 48h nach der Injektion von IgE anti-DNP-HSA bzw. 0.9% NaCl wurde den Mäusen ebenfalls unter Isofluran-Anästhesie 100µg DNP-HSA in 200µl einer 0.1% (w/v) Evan's Blue Lösung in 0.9% NaCl intravenös in den retrobulbären Plexus injiziert. Den Kontrollmäusen wurde 0.9% NaCl statt DNP-HSA appliziert. Nach der Sensibilisierungsphase erfolgt nun *in vivo* die Mastzellaktivierung durch Kreuzvernetzung der an die Fcε-Rezeptoren gebundenen Antikörper, was innerhalb kürzester Zeit zu einer Degranulation der Zellen und damit zur Freisetzung der gespeicherten Mediatoren führt. Durch die Freisetzung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren wird unter anderem die Endothelzellpermeabilität gesteigert. Eine Stunde nach der intravenösen Injektion des Allergens wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und es wurden an den Injektionsstellen Hautbiopsien definierter Größe mit Hilfe von Biopsie-Stanzen (Ø 8mm, pfm Produkte für die Medizin AG, Köln) entnommen. Zur Extraktion des Evan's Blue Farbstoffes wurden die Biopsien 48h bei 55°C in 500µl Formamid inkubiert. Die Extravasation des Farbstoffs durch die Zunahme der mikrovaskulären Endothelpermeabilität als Maß für die Anaphylaxie wurde mittels Absorptionsmessung bei 620nm quantifiziert. Die gemessene Absorption der Kontroll-Injektionsstelle jeder Maus bei 620nm wurde von den IgE-injizierten Proben abgezogen.

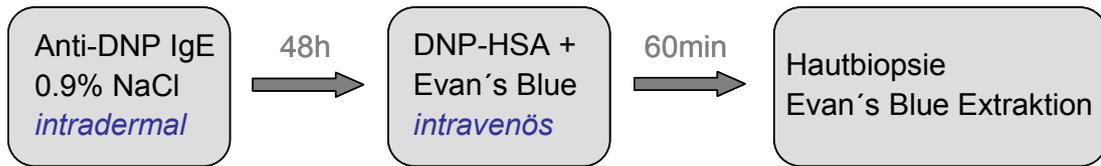


Abbildung 41: Schema zur Analyse der Frühphasereaktion im Rahmen einer perkutanen Anaphylaxie

A.2.2 Perkutane Anaphylaxie – Spätphase-Reaktion

Das Experiment zur Spätphase-Reaktion im Rahmen einer perkutanen Anaphylaxie wurde in Anlehnung an Klemm et al. durchgeführt (Klemm et al., 2006).

Die Mäuse wurden durch eine intravenöse Injektion in den retrobulbären Plexus von 2µg IgE anti-DNP-HSA in 200µl 0.9% NaCl passiv sensibilisiert. Die verwendeten Immunglobuline erkennen Dinitrophenyl (DNP) und 2,4-Dinitrofluorobenzen (DNFB) als Antigen. 24h nach der Sensibilisierung wurde 10µl einer 0.3% (w/v) DNFB Aceton-Sonnenblumenöl (4:1) Lösung mit einer Pipette auf beide Seiten des rechten Ohres epidermal appliziert. Das unbehandelte linke Ohr der Maus diente als Kontrolle. Die Hautreaktion wurde durch die Messung der Ohrdicke mit einem Mikrometer an den Zeitpunkten 1h bis 48h nach Antigen-Applikation bestimmt. Die Zunahme der Ohrdicke wurde berechnet als Prozent des Ausgangswertes vor der Antigen-Zugabe.



Abbildung 42: Schema zur Analyse der Spätphasereaktion im Rahmen einer perkutanen Anaphylaxie

A.3 Ergebnisse und Diskussion

Zur Induktion der anaphylaktischen Sofortreaktion wurde 2 Tage nach einer intradermalen Sensibilisierung der Mäuse mit einem IgE Antikörper gegen DNP-HSA oder einer Injektion von NaCl als Kontrolle die passive kutane Anaphylaxie durch eine intravenöse Injektion von DNP-HSA, gelöst in NaCl-Evan's Blue, induziert. Während der ersten Stunde nach der Induktion wird die Entzündungsreaktion hauptsächlich durch Freisetzung von Histamin und Serotonin vermittelt. Dadurch wird die Gefäßpermeabilität erhöht und der Evan's Blue Farbstoff tritt in das umgebende Gewebe aus (Inagaki et al., 1986). Unter Kontroll-Bedingungen zeigte sich kein Unterschied in der Extravasation des Farbstoffes nach dem Antigen-Stimulus in Hautbiopsien beider Genotypen. In TRPM4-defizienten Mäusen ist nach der DNP-HSA Injektion die Extravasation von Evan's Blue in das Hautgewebe im Vergleich zu den Wildtypen (Abbildung 43A&B) deutlich erhöht. Diese Ergebnisse weisen auf eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und eine verstärkte kutane Anaphylaxie in TRPM4^{-/-} Mäusen hin. Da ein Unterschied in der Mastzell-dichte das Ausmaß der anaphylaktischen Reaktion beeinflussen kann, wurde zuvor mittels histomorphometrischer Analyse gezeigt, dass die Mastzell-dichte vor der DNP-HSA Stimulation in Hautbiopsien der beiden Genotypen nach Sensibilisierung nicht unterschiedlich war (Vennekens et al., 2007).

Zur Untersuchung der Spätphase-Reaktion wurden die Mäuse mit einer intravenösen Injektion von IgE anti-DNP-HSA sensibilisiert und die perkutane Anaphylaxie mittels Messung der Ohrdicke bis 48h nach epikutaner Applikation von 2,4-Dinitrofluorobenzol bestimmt. Studien in Mastzell-defizienten „W/W^v“ Mäusen haben gezeigt, dass Mastzellen sowohl für die Gewebsschwellung als auch für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind (Wershil et al., 1991). Zu keinem Zeitpunkt konnten Unterschiede in der Spätphase-Reaktion zwischen Wildtyp und TRPM4-defizienten Mäusen gemessen werden (Abbildung 43C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der in BMMCs erarbeitete Mechanismus, der zu einer gesteigerten Mastzellaktivierung nach Inaktivierung von TRPM4 führt, nicht nur in kultivierten Knochenmarksmastzellen, sondern auch in Bindegewebsmastzellen der Haut von Bedeutung ist (Vennekens et al., 2007). Diese Untersuchungen lassen schließen, dass TRPM4 als Calcium-aktivierter Kationenkanal fungiert, welcher die Mastzell-Aktivierung inhibiert. Wird TRPM4 aktiviert, so wird der Calcium-Einstrom vermindert und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren gebremst.

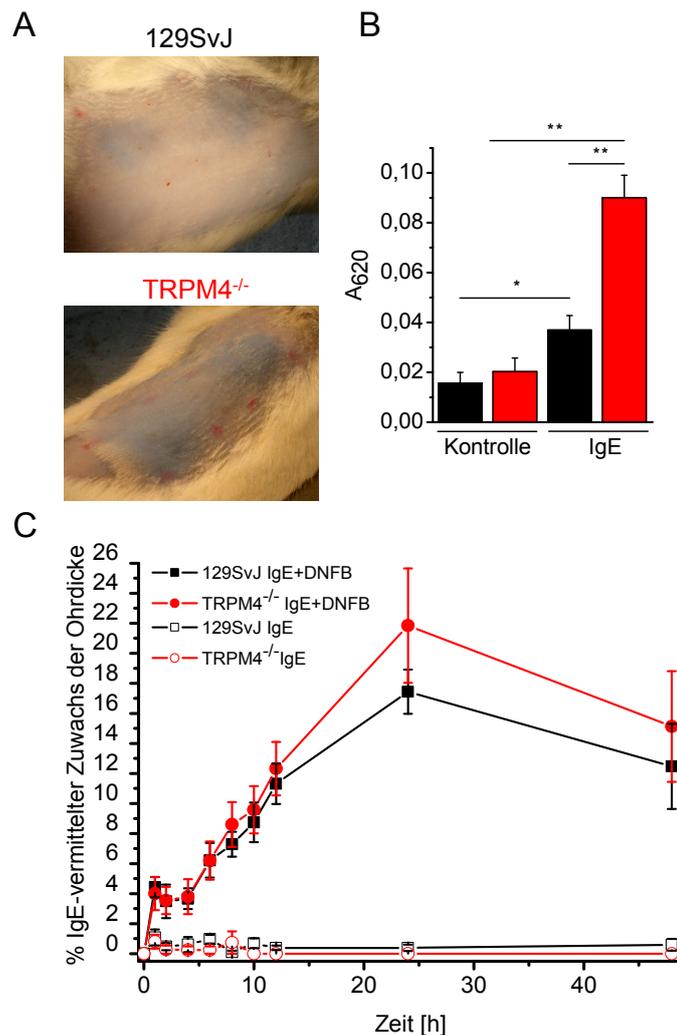


Abbildung 43: Perkutane Anaphylaxie in Wildtyp- (129SvJ) und TRPM4^{-/-} Mäusen. (A) Die Gefäßpermeabilität wurde durch intradermale Injektion von IgE anti DNP-HSA gefolgt von einer intravenösen Injektion von DNP-HSA zusammen mit Evan's Blue ausgelöst. Die Bilder zeigen die Rückenhaut nach Rasur von einer Wildtyp (129SvJ) und einer TRPM4^{-/-} Maus. (B) Extravasation von Evan's Blue in die Haut als ein Maß für die Akutreaktion der perkutanen Anaphylaxie; quantifiziert wurde die Absorption des Extraktes einer an der Injektionsstelle entnommenen Gewebeprobe (IgE: WT n=18, KO n=22; Kontrolle: WT n=19, KO n=28; *p<0.05, **p<0.01). (C) Spätphase-Reaktion. DNFB wurde auf die rechten Ohren von 129SvJ (n=8) und TRPM4^{-/-} (n=9) Mäusen appliziert, welche zuvor mit IgE anti DNP-HSA passiv sensibilisiert wurden; das unbehandelte linke Ohr diente als Kontrolle (WT n=8, KO n=3). Daten repräsentieren den Anstieg der Ohrdicke in Prozent.

Somit konnte ein Mechanismus beschrieben werden, welcher an Hypersensitivitätsreaktionen beteiligt ist und möglicherweise könnten TRPM4-aktivierende Substanzen die Aktivierung von Mastzellen limitieren und als Pharmaka zur Behandlung von allergischen Reaktionen eingesetzt werden.

Anhang B: Glucosetoleranztest in TRP-defizienten Mäusen

B.1 Einleitung

B.1.1 Physiologie des Glukosestoffwechsels

Glukose spielt eine zentrale Rolle in der Energieversorgung des Organismus. Die Regulation der Blutglukosehomöostase erfolgt sowohl über die Leber als auch über die in den Langerhans Inseln der vom Pankreas gebildeten Hormone Insulin, Glukagon und Somatostatin. Die Langerhansinseln des Pankreas enthalten mehrere endokrine Zelltypen: Insulin-produzierenden β -Zellen, Glukagon-produzierende α -Zellen, Somatostatin-produzierende D-Zellen und Polypeptid sezernierende PP-Zellen, die auch als F-Zellen bezeichnet werden. Insulin erhöht in Leber- und Muskelzellen die Glukoseaufnahme und die Bildung von Glykogen, welches der kurz- bis mittelfristigen Speicherung und Bereitstellung des Energieträgers Glukose dient. Als weiterer Energiespeicher wird bei anaboler Stoffwechsellage in der Leber aus Glukose zusätzlich Fett metabolisiert. Diese in der Leber gebildeten Lipide erreichen über den Blutweg das Fettgewebe, wo sie als Triglyzeride gespeichert werden. Weiterhin fördert Insulin den Eiweißaufbau. Glukagon stimuliert die Glykogenolyse, was einen Blutzuckeranstieg zur Folge hat. Auf das Fettgewebe wirkt es lipolytisch und stellt somit Fettsäuren für die Energielieferung zur Verfügung. Somatostatin vermindert die Freisetzung von Insulin und Glukagon. Weiterhin hemmt es die Motorik des Magen-Darm-Kanals und die Sekretion der Verdauungssäfte. Damit werden zu große Blutzuckerschwankungen verhindert.

Nach einer Glukoseaufnahme wird das Gleichgewicht des Blutglukosespiegels durch das Zusammenspiel dreier Faktoren wieder hergestellt: (i) Als Antwort auf die Glukoseerhöhung im Blut wird die Insulinsekretion stimuliert. (ii) Die Kombination aus Hyperglykämie und Hyperinsulinämie fördert die Glukoseaufnahme durch die Leber, den Darm und die Muskulatur. (iii) Gleichzeitig wird die hepatische Glukoseproduktion gehemmt.

B.1.2 Regulation der Insulinsekretion

In Abbildung 44 ist die Regulation der Glukose-induzierten Insulin-Sekretion schematisch dargestellt.

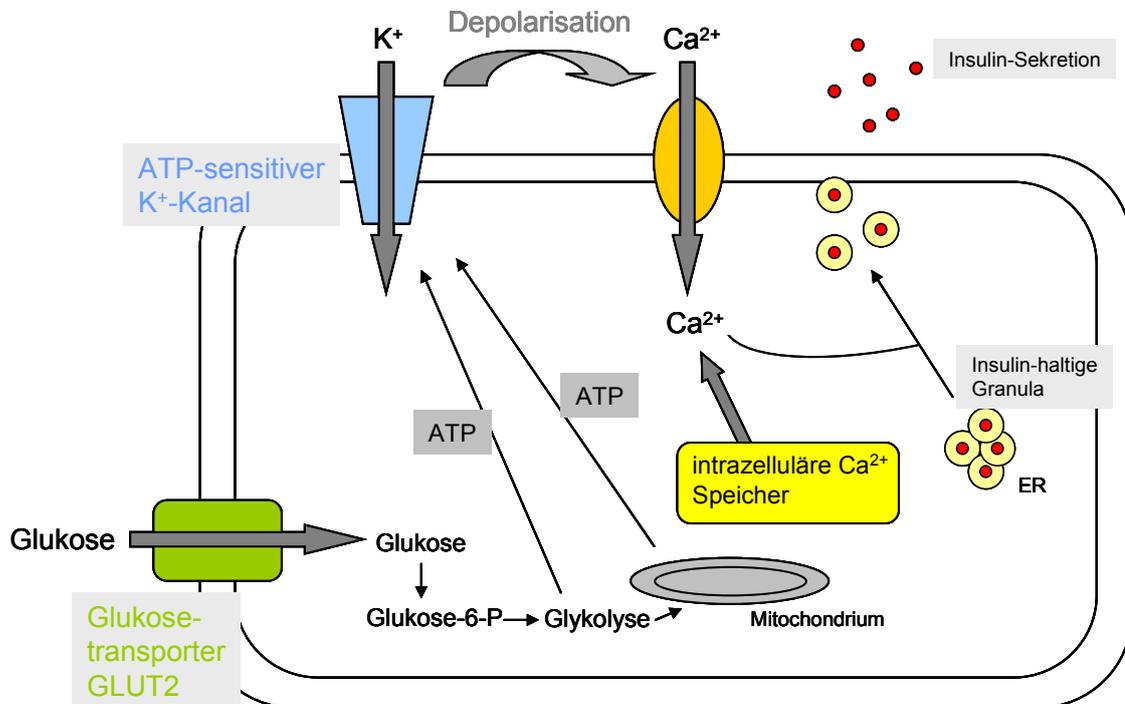


Abbildung 44: Regulation von Insulinsekretion in beta-Zellen

Der Glukosetransport in die β -Zelle erfolgt energieunabhängig entsprechend dem Konzentrationsgefälle über den Glukosetransporter GLUT2. Dort wird die Glukose durch Katalyse des Transfers von Phosphat aus ATP auf Glukose über die Glucokinase phosphoryliert, dem Energiestoffwechsel zugeführt und steigert somit den intrazellulären ATP-Gehalt. ATP führt zum Verschluss des ATP-sensitiven K⁺-Kanals. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran, zur Aktivierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und zum Einstrom von extrazellulärem Calcium. Dieses bewirkt zusammen mit dem aus den intrazellulären Speichern mobilisierten Calcium eine Fusion der Insulin-enthaltenen Speichergranula und deren Exozytose (Hürter, 2007).

B.1.3 Untersuchung der Glukosehomöostase mittels Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest stellt ein einfaches und aussagekräftiges Diagnostikum dar, die Veränderung der Glukosehomöostase bei Patienten mit Diabetes mellitus nachzuweisen. Die Möglichkeit die Glukosetoleranz bei Mäusen zu messen ist für das Verständnis der Pathogenese und für das Testen potentieller Therapeutika von besonderer Bedeutung.

Das limitierte Blutvolumen der Maus stellt spezielle Anforderungen an die Sensitivität der Technik, durch welche ein Metabolit oder eine Substanz im Blut bestimmt werden soll. Im Falle einer Glukosebestimmung wird dieses noch erschwert, da normalerweise mehrere Messungen in relativ kurzen Zeitintervallen benötigt werden. Die zurzeit beste Methode die Blutglukosekonzentration zu messen ist die Verwendung von Blutzuckermessgeräten. Diese Messgeräte sind sehr einfach zu handhaben und ermöglichen relativ genaue Messungen innerhalb von Sekunden von einem sehr kleinen Blutvolumen im μl -Bereich (Heikkinen et al., 2007).

Der orale Glukosetoleranztest (oGTT) misst die Fähigkeit des Körpers, die Blutzuckerhomöostase trotz schneller Zufuhr einer definierten Menge an Glukose im physiologischen Rahmen aufrecht zu erhalten. Es ist bekannt, dass oral verabreichte Glukose zu einer stärkeren Insulinausschüttung führt, als eine intravenöse Glukoseinfusion, die den gleichen glykämischen Effekt zeigt (Drucker and Nauck, 2006; Perley and Kipnis, 1967). Ein großer Anteil der Insulinsekretion nach oraler Glukosegabe ist nicht auf die unmittelbare Einwirkung von Glukose auf die β -Zellen, sondern auf die insulinotrope Wirkung weiterer Hormone zurückzuführen, die aus intestinalen Mukosazellen freigesetzt werden. Grundlage dieses als Inkretin-Effekt bezeichneten Mechanismus ist die Bildung der gastrointestinalen Hormone GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) und GLP-1 (Glucagon-like Peptid 1). Die Isolierung und Charakterisierung des GIP war ein entscheidender Schritt bei der Suche nach intestinalen Inkretinen. GIP wird aus enteroendokrinen Zellen des Duodenums und proximalen Jejunums freigesetzt und führt nach der Nahrungsaufnahme zur Glukose-abhängigen Steigerung der Insulinsekretion (Creutzfeldt and Ebert, 1985). Die Sekretion von GLP-1 durch die L-Zellen des distalen gastrointestinalen Traktes wird durch Kohlenhydrate und Fettbestandteile der Nahrung stimuliert. Neben seiner glukoseabhängigen insulinotropen Wirkung nach Nahrungsaufnahme, inhibiert das GLP-1 auch die Glucagonsekretion aus dem Pankreas (Drucker et al., 1987).

Der intraperitoneale Glukosetoleranztest (ipGTT) misst die Beseitigung eines intraperitoneal injizierten Glukose-Bolus in periphere Organe. Im Vergleich zu einem oralen

Glucosetoleranztest berücksichtigt dieser Test nicht die Inkretin-vermittelte Insulinfreisetzung.

B.1.4 Rolle von TRP-Kanälen bei der Glukosehomöostase

Neben ATP-sensitiven Kaliumkanälen, die durch Regulation des Membranpotentials die Insulinfreisetzung entscheidend beeinflussen (Ashcroft, 2006), konnten in den letzten Jahren auch mehrere TRP-Proteine in β -Zellen nachgewiesen werden. Neben TRPM4 und TRPM3 konnten auch TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPV1, TRPV5, TRPM2 und TRPM5 detektiert werden (Nilius et al., 2007; Nilius and Voets, 2008). Es wird deshalb spekuliert, dass der Kationeneinstrom über TRP-Kanäle mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembran ebenfalls an der Insulinsekretion beteiligt ist.

B.1.4.1 Glibenclamid und TRPM4

Glibenclamid ist ein orales Antidiabetikum, welches - wie andere Sulfonylharnstoffe - den ATP-sensitiven Kaliumkanal in β -Zellen des Pankreas inhibiert und somit eine erhöhte Insulinfreisetzung bewirkt. Da TRPM4-ähnliche Ströme in Kardiomyozyten durch ATP reversibel gehemmt werden können, postulierten Guinamard et al. (Guinamard et al., 2004) eine Sulfonylharnstoff-Sensitivität dieses Kanals. In Experimenten an TRPM4 exprimierenden HEK293 Zellen konnten sie zeigen, dass der TRPM4-vermittelte Strom durch Glibenclamid gehemmt wird (Demion et al., 2007). Desweiteren haben Cheng et al. vermutet, dass TRPM4 eine Rolle bei der Kontrolle des Membranpotentials und der elektrischen Aktivität von Insulinoma-Zellen (INS-1) spielen könnte (Cheng et al., 2007). TRPM4-vermittelte Änderungen des Membranpotentials während eines Glukosestimulus sollen an der Ausbildung von Calcium-Oszillationen und der Insulinsekretion von β -Zellen maßgeblich beteiligt sein.

B.1.4.2 Pregnenolon-Sulfat und TRPM3

Für TRPM3 konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Spleißvarianten nachgewiesen werden (Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Eine Folge des alternativen Spleißens betrifft die Porenregion und somit die Poreneigenschaften der kodierten Kanäle. Die Kanäle mit einer langen Porenregion leiten hauptsächlich monovalente Kationen, wohingegen Kanäle mit einer kürzeren Porenregion vorwiegend für bivalente Kationen

permeabel sind. Die Expression von TRPM3 ist auf eine begrenzte Anzahl an Geweben limitiert. Beim Menschen konnte eine hohe Expression in der Niere nachgewiesen werden, wobei dies für Mäuse nicht bestätigt werden konnte (Oberwinkler, 2007). Weiterhin konnte eine hohe Expression von TRPM3 im Gehirn (Fonfria et al., 2006) gezeigt werden. Funktionell konnten endogen exprimierte Kanäle aber bisher in keinem dieser Gewebe nachgewiesen werden.

Mit dem Ziel einen spezifischen Agonisten von TRPM3 zu identifizieren, konnte von Wagner et al. gezeigt werden, dass TRPM3, schnell und reversibel durch extrazelluläres Pregnenolon-Sulfat, einem neuroaktiven Steroid, aktiviert wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Pregnenolon-Sulfat TRPM3-ähnliche Ströme in Insulinproduzierenden β -Zellen aktiviert. Die Applikation von Pregnenolon-Sulfat führte zu einem rapiden Calcium-Einstrom und einer verstärkten Insulin-Freisetzung aus Inseln des Pankreas (Wagner et al., 2008).

B.2 Methoden

Beim Glukosetoleranztest wird die Fähigkeit eines Organismus untersucht, nach Glukoseapplikation die Glukose aus dem Blut innerhalb eines definierten Zeitraumes in die Zielzellen zu transportieren. Bei diesem Test werden mehrere Messungen der Blutglukose vor und zu definierten Zeitpunkten nach Glukoseapplikation durchgeführt.

B.2.1 Intraperitonealer bzw. oraler Glucosetoleranztest

Es wurden – falls nicht anders angegeben – etwa 3 Monate alte männliche Mäuse verwendet. Nach 12-14 stündigem Fasten (über Nacht) erfolgte im Anschluss an eine Nüchtern-Blutzuckerbestimmung eine intraperitoneale Injektion bzw. orale Verabreichung von 2 g Glukose/kg Körpergewicht. Um den zeitlichen Verlauf der Blutglukoseentwicklung zu beurteilen, wurde nach 15, 30, 60 und 120 Minuten die Glukosekonzentration mit einem Blutzuckermeßgerät (FreeStyle, Disetronic) bestimmt. Bei dem verwendeten Messgerät reichten wenige μl Blut aus, welches meist nach einmaliger Inzision wiederholt am Schwanzende gewonnen werden konnte. Da wir in Vorversuchen bei wiederholten Messungen an einer Versuchsgruppe von Wildtypmäusen Schwankungen der Blutglukose-Spiegel zwischen einzelnen Versuchstagen beobachtet hatten, wurden in der Folge an allen Versuchstagen TRP-defiziente Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere parallel untersucht.

Der verwendete Glukoseteststreifen ist ein Biosensor, dessen Reaktionsprinzip auf der Glukosedehydrogenase-Methode beruht. Die β -D-Glukose wird durch dieses Enzym spezifisch unter Reduktion des Coenzym Pyrrrolchinolinchinon (PQQ) zu Glukonolacton und PQQH_2 umgesetzt. PQQH_2 reduziert dann den Mediator Hexacyanoferrat-III zu Hexacyanoferrat-II. Durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei Palladiumelektroden wird der Mediator wieder rückoxidiert, wobei die freiwerdenden Elektronen amperometrisch detektiert werden. Sie sind der eingesetzten Glukosemenge proportional.

B.2.2 Glukosetoleranztest in Kombination mit Glibenclamid oder Pregnenolon-Sulfat

Der Verlauf des Glukosetoleranztests erfolgte wie unter B 2.1 beschrieben. Die Mäuse wurden 12-14 Stunden über Nacht gefastet und vor Versuchsbeginn wurde der Nüchternblutzucker bestimmt.

Das orale Antidiabetikum Glibenclamid wurde den Mäusen 30 min vor der Applikation des Glukosebolus (2g/kg KG) in einer Konzentration von 2.5 mg/kg Körpergewicht, gelöst in Leitungswasser, mittels einer Schlundsonde (Fine Science Tools) p.o. appliziert. Den Kontrollmäusen wurde das gleiche Volumen an Leitungswasser appliziert. Durch vorherige Testuntersuchungen wurde für Glibenclamid eine Applikationszeit von 30 min vor der Gabe des Glukostimulus gewählt, da Glibenclamid in ungestauten Tieren etwa nach 50-60 min seine Maximalwirkung gezeigt hatte und somit seine Maximalwirkung etwa mit der maximalen Blutglukosekonzentration nach Glukosegabe parallel verlaufen sollte.

Bislang gibt es sehr wenige Arbeiten, in denen die Wirkungen von systemisch appliziertem Pregnenolon-Sulfat untersucht wurde. Pregnenolon-Sulfat wurde in einer Konzentration von 1.196 mM in 0.2% Tween 80 in NaCl 24 sowie 1 h vor Versuchsbeginn jeweils für eine Stunde im Ultraschallbad gelöst. Den Mäusen wurde unter Isofluran-Narkose Pregnenolon-Sulfat in einer Konzentration von 4mg/kg Körpergewicht 4min vor Applikation des Glukosebolus (2g/kg KG) intravenös in den retrobulbären Plexus injiziert, da keine ausreichenden Informationen zur Bioverfügbarkeit von PregS nach i.p. Injektion oder oraler Applikation vorlagen. Den Kontrolltieren wurde 0.2% Tween 80 in NaCl injiziert.

B.2.3 Verwendete Mauslinien

Die Mauslinien mit definierten Mutationen im TRPM4- (Vennekens et al., 2007) Gen wurden in unserem Labor hergestellt; die TRPC3- (Hartmann et al., 2008) und TRPC6- (Dietrich et al., 2005) defizienten Linien wurden im Labor von Prof. Dr. L. Birnbaumer (NIEHS) und die TRPM5-defiziente Linie (Zhang et al., 2003) wurde im Labor von Prof. C. Zuker (USCD, USA) hergestellt und stehen im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung.

Die Versuchstiere sind adulte Mäuse aus Inzucht- oder Auszuchtlinien, bei denen ein einzelnes oder gleichzeitig zwei Gene von Kationenkanälen TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM4 oder TRPM5 inaktiviert sind. Um mögliche genetische Einflüsse zu minimieren, wurden die Gen-defizienten Tiere durch Verpaarung mit Mäusen eines entsprechenden Inzuchtstammes auf einen definierten genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. Bei den Tieren mit Deletionen in mehreren Genen, bei denen diese Rückkreuzungen einen Zeitraum von mehreren Jahren erfordert, wurden Nachkommen der ersten Generation (F1) aus Verpaarungen von Tieren der Inzuchtlinien 129SvJ und C57Bl6 als Kontrolltiere verwendet. Die 129SvJ-Mäuse (Stock Nummer 129/SvJlbn) wurden von der Firma

BRL Biological Research (Füllinsdorf, Schweiz) bezogen und in der institutseigenen SPF-Tierhaltung weitergezüchtet. Die C57Bl6/N-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über für Glukosetoleranztests verwendete Mauslinien und der entsprechenden Kontrolltiere:

Gendeletion(en)	Genetischer Hintergrund	Kontrolltiere
TRPM4 ^{-/-}	129SvJ	129SvJ
TRPM4 ^{-/-}	C57Bl6/N	C57Bl6/N
TRPM5 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	129_BI6_F1*
TRPM4 ^{-/-} /TRPM5 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	129_BI6_F1*
TRPM3 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	TRPM3 ^{+/+} , Geschwistertiere aus TRPM3 ^{+/-} x TRPM3 ^{+/-} Verpaarungen
TRPM3 ^{-flox} , RipCre ⁺	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	TRPM3 ^{-flox} , RipCre ⁻
TRPC3 ^{-/-} /TRPC6 ^{-/-}	gemischt 129SvJ/C57Bl6**	129_BI6_F1*

* Nachkommen aus der ersten Generation (F1) von Verpaarungen der 129SvJ- mit C57Bl6-Inzuchtmäusen

** gemischter genetischer Hintergrund 129SvJ x C57Bl6

B.3 Ergebnisse und Diskussion

Um zu überprüfen, ob die TRPM4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen in der Lage sind, den Anstieg der Blutglukosespiegel innerhalb kurzer Zeit wieder zu senken, wurden Glukosetoleranztests durchgeführt.

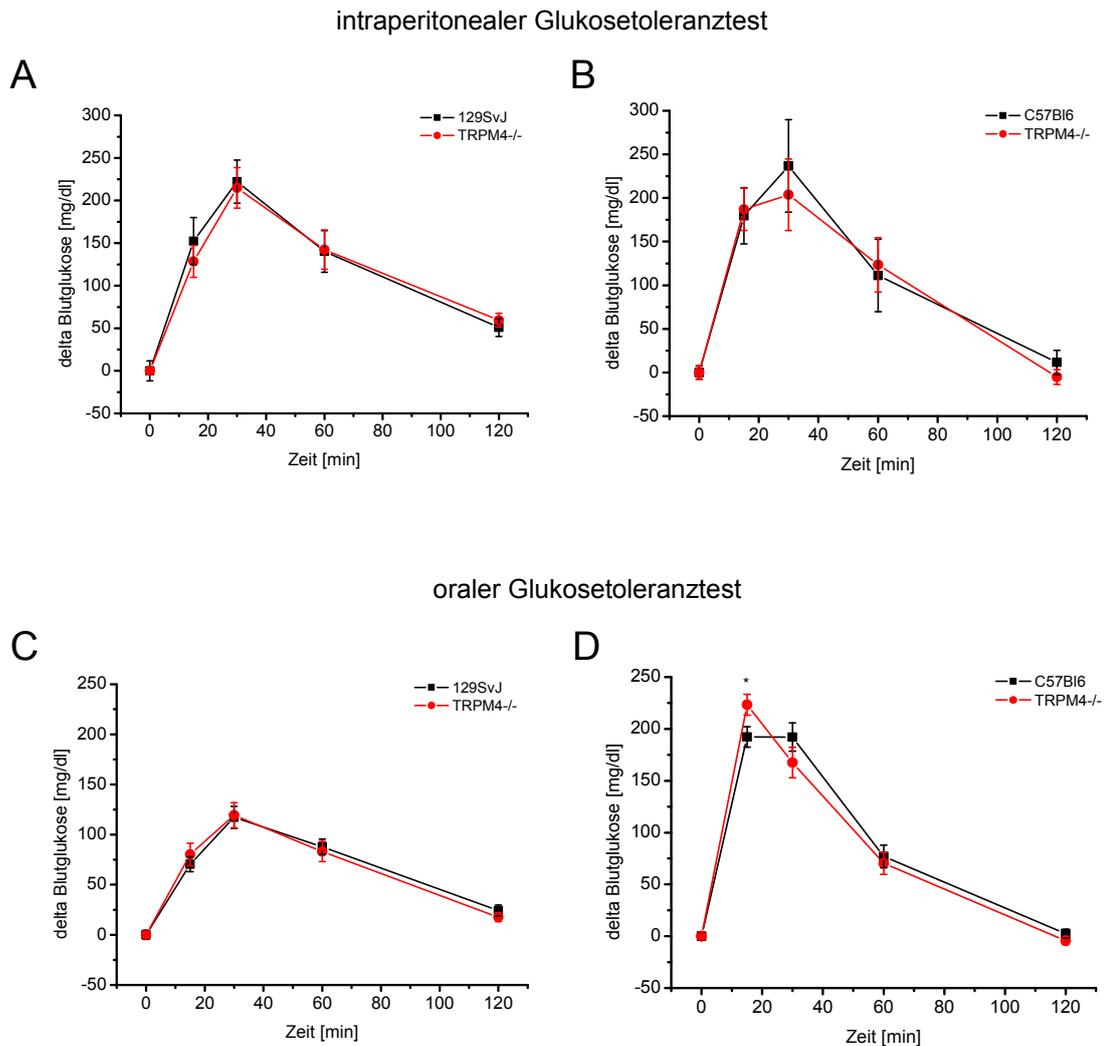


Abbildung 45: Glukosetoleranz an TRPM4-defizienten Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukosespiegel vor und nach intraperitonealer (A & B) bzw. oraler Applikation (C & D) eines Glukosebolus (2g/kg KG) in TRPM4^{-/-} und den entsprechenden Wildtyp Kontrollen. Die Experimente wurden sowohl an Tieren mit einem 129SvJ-Wildtyphintergrund (A & C, ipGTT: n=10/Genotyp, oGTT: WT n=16, KO n=18) als auch mit einem C57Bl6-Wildtyphintergrund (B & D, ipGTT: n=5/Genotyp, oGTT: WT n=15, KO n=17) durchgeführt.

Es wurden TRPM4-defiziente Mäuse mit entsprechenden Kontrolltieren untersucht, die mindestens sechs Mal einerseits auf den 129SvJ-Wildtyphintergrund und andererseits

auf den C57Bl6-Wildtyp hintergrund zurückgekreuzt worden waren. Den Mäusen wurde jeweils 2g/kg KG Glukose appliziert und der Blutglukosewert zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten bestimmt. Die ermittelten Basalwerte der Blutglukosekonzentration vor Applikation des Glukosebolus unterschieden sich in keiner der beiden untersuchten Gruppen. Die Änderungen der Blutglukosewerte im Vergleich zum Basalwert vor der Glukoseapplikation sind in Abbildung 45 dargestellt. 30 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von Glukose zeigten alle untersuchten Mäuse einen Blutglukosewert von mehr als 200mg/dl. Im weiteren Verlauf sank dieser wieder stetig ab und hatte nach 120 Minuten wieder nahezu seinen Ausgangswert erreicht. Im Gegensatz zu dem intraperitonealen Glukosetoleranztest, konnten nach oraler Glukoseapplikation Unterschiede bezüglich der Glukosespiegel zwischen den beiden untersuchten Wildtyp-Gruppen festgestellt werden, während sich TRPM4-defiziente Tiere nicht von den jeweiligen Kontrolltieren unterschieden. Generell hatten die 129SvJ Wildtypen und die dazu parallel gemessenen TRPM4-defizienten Mäuse im Verlauf des oralen Tests allgemein niedrigere Werte als Tiere beider Genotypen mit C57Bl6 Hintergrund. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass TRPM4-Proteine die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung nicht entscheidend beeinflussen, was anschließend auch an isolierten Langerhans-Inseln gezeigt werden konnte (Vennekens et al., 2007).

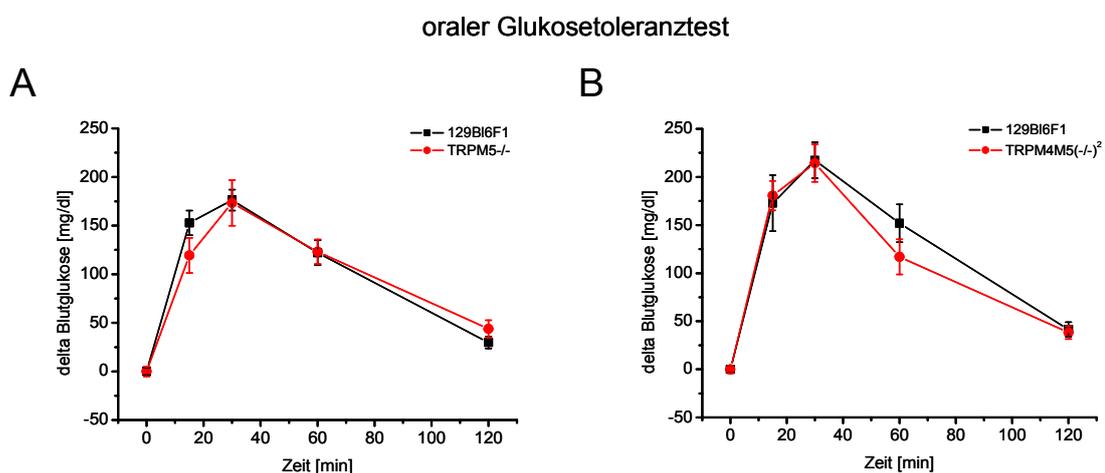


Abbildung 46: Glukosetoleranz in TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukoselevel vor und nach oraler Applikation eines Glukosebolus (2g/kg KG) in TRPM5^{-/-} (A, WT n=15, KO n=16) und TRPM4/M5^{(-/-)2} (B, WT n=8, KO n=10) und den entsprechenden Wildtyp Kontrollen.

Aufgrund der engen Verwandtschaft und den fast gleichen physiologischen Eigenschaften zwischen TRPM4 und TRPM5 wurde sowohl mit TRPM5- und auch mit TRPM4/M5-defizienten Mäusen, eines gemischten Wildtypintergrundes aus 129SvJ und C57Bl6, ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt wurde ein Unterschied zwischen den Wildtypen und den TRPM5- bzw. TRPM4/M5-defizienten Mäusen festgestellt (Abbildung 46).

Durch die bisher beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer oder oraler Applikation eines Glukosestimulus weder TRPM4 noch TRPM5 die Glukosetoleranz beeinflussen.

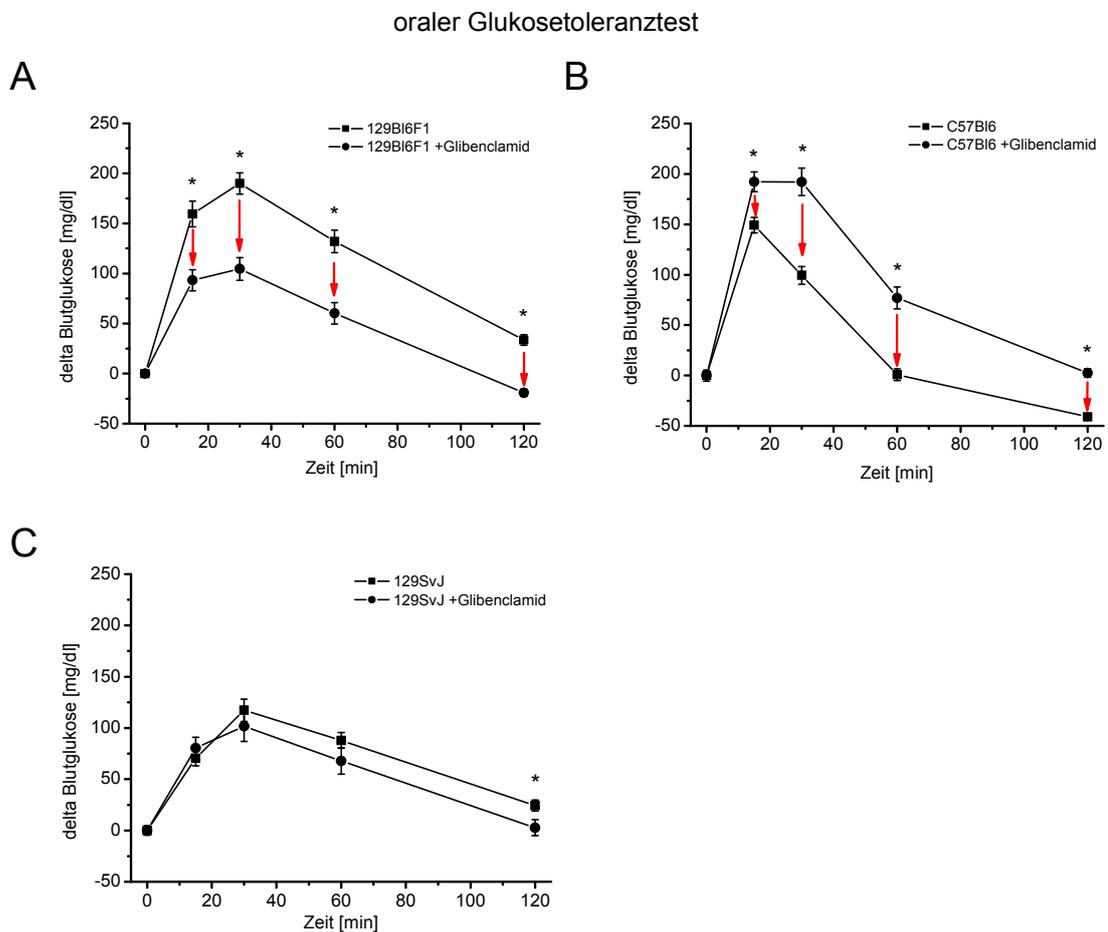


Abbildung 47: Effekt von Glibenclamid auf die Glukosetoleranz in verschiedenen Wildtyp-Mausstämmen. Zeitverlauf der Blutglukosekonzentrationen vor und nach oraler Applikation von Glibenclamid und Glukose in 129Bl6F1 (oGTT: n=24, oGTT+Glibenclamid n=25), C57Bl6 (oGTT: n=15, oGTT+Glibenclamid n=28) und 129SvJ (oGTT: n=16, oGTT+Glibenclamid n=22) Wildtyp-Mäusen.

Aufgrund der postulierten Glibenclamid-Sensitivität von TRPM4-Kanälen, war es weiterhin von großem Interesse, die Wirkung des oralen Antidiabetikums Glibenclamid sowohl an TRPM4-, TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mauslinien zu testen.

Zuerst wurde durch orale Applikation vor Durchführung eines Glukosetoleranztestes der Effekt von Glibenclamid auf drei verschiedene Wildtypmausstämme analysiert.

In Abbildung 47 sind die Änderungen der Blutglukosewerte mit und ohne vorherige Gabe von Glibenclamid der drei unterschiedlichen Wildtyp-Gruppen dargestellt. Bei den 129Bl6F1 Wildtypen (Abbildung 47A) und bei den C57Bl6 Wildtypen (Abbildung 47B) zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Blutglukosewerte im Verlauf des Glukosetoleranztests bei Vorbehandlung mit Glibenclamid. Im Gegensatz dazu konnte keine Auswirkung des Antidiabetikums bei dem Glukosetoleranztest in 129SvJ Mäusen festgestellt werden. Hier verliefen die Blutglukosewerte mit und ohne Gabe von Glibenclamid vollkommen gleich (Abbildung 47C). Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Glibenclamid nicht in allen Wildtypstämmen die gleiche Wirksamkeit aufweist und damit für weitere Untersuchungen mit Glibenclamid ein geeigneter Wildtypstamm und entsprechende TRP-defiziente Tiere gewählt werden mussten.

In Abbildung 48A ist nochmals verdeutlicht, dass bei 129SvJ-Mäusen und den auf diesen Hintergrund zurückgekreuzten TRPM4-defizienten Mäusen keine Reduktion der Blutglukosekonzentration durch Glibenclamid hervorzurufen war. Aus diesem Grund wurde der Glukosetoleranztest mit vorheriger Glibenclamid-Applikation an TRPM4^{-/-} Mäusen auf einem C57Bl6-Hintergrund und C57Bl6 Wildtypen wiederholt. Anhand des in Abbildung 48B dargestellten Glukoseverlaufs von TRPM4-defizienten und Wildtyp Mäusen mit und ohne vorherige Applikation von Glibenclamid wurde deutlich, dass das Antidiabetikum den gleichen reduzierenden Effekt auf den Blutglukoseverlauf in beiden untersuchten Genotypen aufwies. Auch nach Untersuchungen an TRPM5-defizienten Mäusen konnte kein Unterschied der durch Glibenclamid reduzierten Blutglukosewerte festgestellt werden (Abbildung 48C). Die gleichen Messungen wurden an TRPM4/M5-doppelt-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen durchgeführt (Abbildung 48D). In den Wildtypen (F1) war eine deutliche Senkung der Blutglukosewerte im Glukosetoleranztest in Kombination mit Glibenclamid zu sehen, wohingegen die Blutglukosewerte der TRPM4/M5^{(-/-)2} Mäuse durch vorherige Gabe des Antidiabetikums im Vergleich zu den Blutglukosewerten nach einer Glukosestimulation nicht signifikant erniedrigt waren.

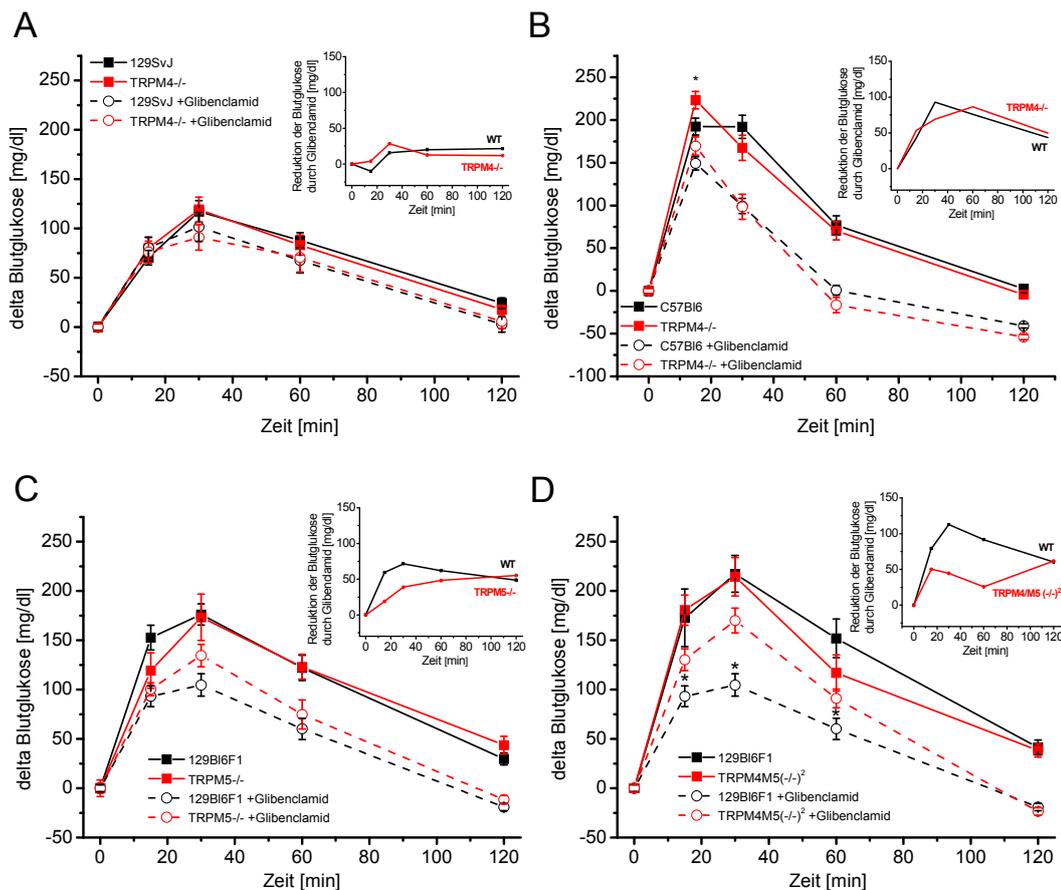


Abbildung 48: Effekt von Glibenclamid auf die Glukosetoleranz in TRPM4-, TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukosekonzentrationen von *Trpm4*^{-/-} (A, oGTT/oGTT + Glibenclamid: WT n=16/22, KO n=18/23; B, oGTT/oGTT + Glibenclamid: WT n=15/28, KO n=17/27), *Trpm5*^{-/-} (C, oGTT/oGTT + Glibenclamid: WT n=16/25, KO n=15/10) und *TRPM4/M5*^{(-/-)2} Mäusen (D, oGTT/oGTT + Glibenclamid: WT n=8/25, KO n=10/26, *p<0.05 für WT+Glibenclamid vs M4M5+Glibenclamid) und Wildtypen mit und ohne vorherige Applikation des Antidiabetikums Glibenclamid. Das Inset verdeutlicht die Reduktion der Blutglukose durch Glibenclamid, berechnet aus der Differenz der Änderungen der Blutglukosekonzentrationen mit und ohne Glibenclamid-Vorbehandlung.

Obwohl für beide Kanäle eine Expression in β -Zellen des Pankreas beschrieben wurde, konnte durch diese Versuche an TRPM4-, TRPM5- und TRPM4/M5-defizienten Mäusen kein Unterschied in den Blutglukosewerten während eines Glukosetoleranztests gefunden werden. Weiterhin sprechen meine Ergebnisse dagegen, dass die Blutzucker-senkende Wirkung von Glibenclamid allein über TRPM4-Kanäle vermittelt wird. Auch Experimente an TRPM5-defizienten Mäusen lieferten keine Hinweise auf eine Wirkung des Antidiabetikums durch Inhibition von TRPM5-Kanälen. Lediglich an TRPM4/M5-doppelt-defizienten Mäusen konnte keine Senkung der Blutglukosewerte durch Glibenclamid induziert werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe,

dass das Fehlen von TRPM4 durch TRPM5 kompensiert werden kann und umgekehrt, dass nur bei gleichzeitiger Inaktivierung beider Proteine der Effekt von Glibenclamid auf die Glukosetoleranz aufgehoben ist und demnach heteromultimere Kanalkomplexe unter Beteiligung von TRPM4 und TRPM5 Proteinen Angriffspunkt von Glibenclamid sein könnte. Neben der bekannten Wirkung von Sulfonylharnstoffen, wie Glibenclamid, durch SUR1-vermittelte Inhibition von K_{ATP} -Kanälen, konnte kürzlich gezeigt werden, dass Sulfonylharnstoffe auch über einen intrazellulären Weg (Geng et al., 2007), sowie über Epac2-Proteine, die Austauschfaktoren für Ras-ähnliche Guanosin-Triphosphatasen darstellen, wirken (Zhang et al., 2009).

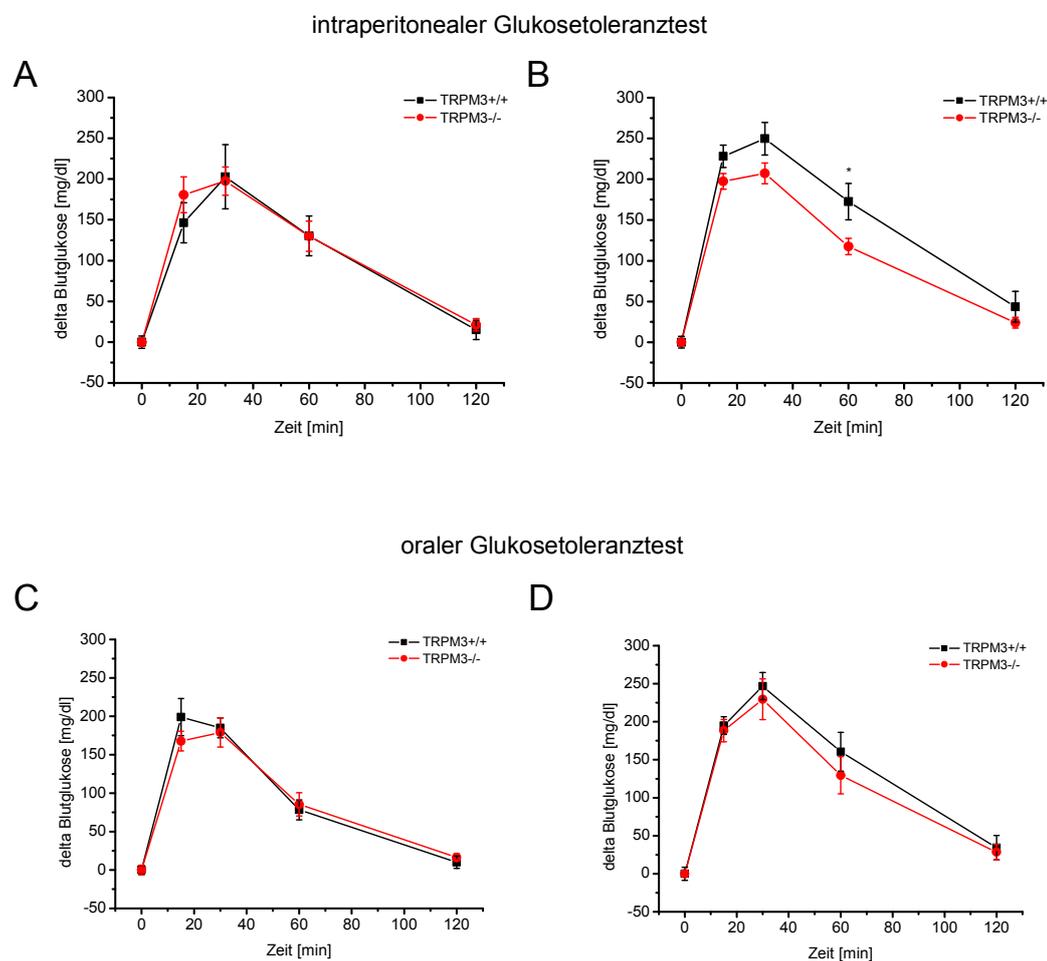


Abbildung 49: Glukosetoleranz in TRPM3-defizienten Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukospielgel vor und nach intraperitonealer (A & B) bzw. oraler Applikation (C & D) eines Glukosebolus (2g/kg KG) in TRPM3^{+/+} und TRPM3^{-/-} Mäusen. Die Experimente wurden an 3 Monate alten (A: WT n=9, KO n=10 & C: WT n=9, KO n=10) und 6 Monate alten (B & D: n=10/Genotyp) Mäusen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass pankreatische Inselzellen TRPM3-Kanäle exprimieren, welche durch Pregnenolon-Sulfat und auch Nifedipin aktiviert werden können (Wagner et al., 2008). Parallel wurden in unserem Institut TRPM3-defiziente Mäuse hergestellt (Mannebach, 2008). Deshalb wurden Glukosetoleranztests an TRPM3-defizienten Mäusen mit und ohne vorheriger Applikation von Pregnenolon-Sulfat charakterisiert. Die Experimente wurden an 3 bzw. 6 Monate alten, männlichen TRPM3-defizienten Mäusen durchgeführt, wobei in diesem Fall TRPM3^{+/+} Geschwistertiere aus +/- Verpaarungen als Kontrolltiere verwendet wurden. Es wurden sowohl intraperitoneale als auch orale Glukosetoleranztests durchgeführt. Die ermittelten Basalwerte vor Glukoseapplikation waren zwischen den untersuchten Gruppen nicht unterschiedlich.

Weder nach intraperitonealer noch nach oraler Glukoseapplikation wurden Veränderungen in den Blutglukosewerten von 3 Monate alten TRPM3^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen TRPM3^{+/+} Mäusen festgestellt. Um eine altersbedingte Veränderung der Glukosetoleranz der TRPM3^{-/-} Mäuse zu charakterisieren wurden die gleichen Experimente auch an 6 Monate alten Tieren durchgeführt (Abbildung 49B&D). Auch hier war der Blutglukoseverlauf zwischen beiden Genotypen, sowohl nach intraperitonealer als auch nach oraler Applikation, vergleichbar. Lediglich zum Untersuchungszeitpunkt 60 Minuten nach intraperitonealer Glukoseapplikation konnte ein Unterschied detektiert werden.

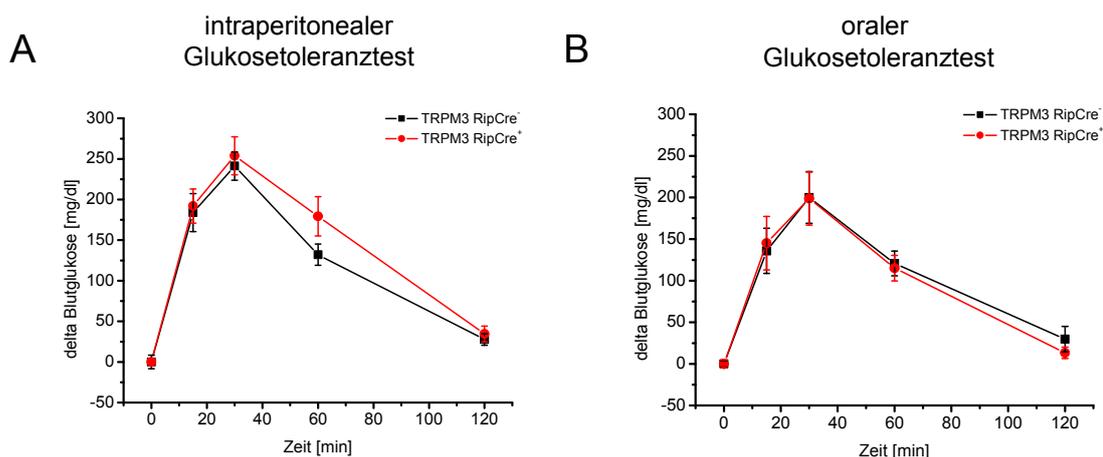


Abbildung 50: Glukosetoleranz in β -Zell-spezifischen TRPM3^{+/+} und TRPM3^{-/-} Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukosespiegel vor und nach intraperitonealer (A) bzw. oraler Applikation (B) eines Glukosebolus (2g/kg KG) in β -Zell-spezifischen TRPM3^{+/+}, RipCre⁻ und TRPM3^{-/-}, RipCre⁺ Mäusen (n=7/Genotyp).

Um die Auswirkungen einer β -Zell-spezifischen Inaktivierung von TRPM3 auf die Glucosetoleranz zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem TRPM3^{flox} Allel, bei denen Exon 24 des TRPM3-Gens von loxP Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase flankiert ist (TRPM3^{+flox}), mit Mäusen (RipCre^{+tg}) verpaart, bei denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten-Insulin 2 Promotors steht. Die entstandenen TRPM3^{+/-}RipCre^{tg} Mäuse wurden dann mit TRPM3^{flox/flox} Mäusen verpaart. Dadurch entstanden TRPM3^{-flox}RipCre^{tg} (TRPM3^{-flox}, RipCre⁺) und Kontrolltiere (TRPM3^{-flox}, RipCre⁻) (Mannebach, 2008). Die Untersuchungen an diesen Tieren ergaben ebenfalls keine Unterschiede der Blutglukosewerte, weder nach oraler, noch nach intraperitonealer Glukoseapplikation.

Es wurde gezeigt, dass die Applikation des TRPM3-Agonisten Pregnenolon-Sulfat die Insulinfreisetzung aus isolierten β -Zellen des Pankreas verstärkt. Aufgrund dieser Aktivierbarkeit von TRPM3 durch Pregnenolon-Sulfat, wollte ich untersuchen, ob Pregnenolon-Sulfat die Blutzuckerspiegel nach Glukoseapplikation senken kann und ob diese Wirkung in TRPM3-defizienten Mäusen gegebenenfalls vermindert ist. Deshalb wurde zuerst ein Glucosetoleranztest an Wildtyp Mäusen nach vorheriger Gabe von Pregnenolon-Sulfat durchgeführt. Die PregS-Applikation erfolgte 4 Minuten vor dem intraperitonealen Glukosestimulus unter leichter Isofluran-Narkose intravenös in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Anschließend wurden – wie bisher – die Änderungen der Blutglukosewerte von Pregnenolon-Sulfat-behandelten und unbehandelten Wildtypen bis 2 Stunden nach der Glukoseapplikation verfolgt. In Abbildung 51A ist der Zeitverlauf der Änderungen der Blutglukosewerte graphisch dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt waren Unterschiede in den Blutglukosewerten zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren feststellbar. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 51B nochmals der Effekt von Glibenclamid auf die Blutglukosespiegel dargestellt. Da im Gegensatz zu Glibenclamid bisher noch keine Daten über die Insulin-sezernierenden bzw. Blutzucker-senkende Wirkung nach systemischer PregS-Applikation bekannt war, wurde versucht, den Versuchstieren die maximal mögliche Dosis von PregS zu verabreichen. Zur Untersuchung der Duftstofferkennung in männlichen Mäusen haben Kavaliers et al. einen Maximal-Bolus von 10 mg/kg KG i.p. appliziert (Kavaliers and Kinsella, 1995). Um ausschließen zu können, dass die Aufnahme in den Blutkreislauf durch eine fehlende Resorption aus dem Intraperitonealraum verhindert wird, wurde den Tieren PregS intravenös injiziert. Aufgrund der limitierenden Löslichkeit von Pregnenolonsulfat und dem laut GVSolas limitierten intravenös injizierbaren Maximalvolumen, konnte die Dosis nicht weiter erhöht werden.

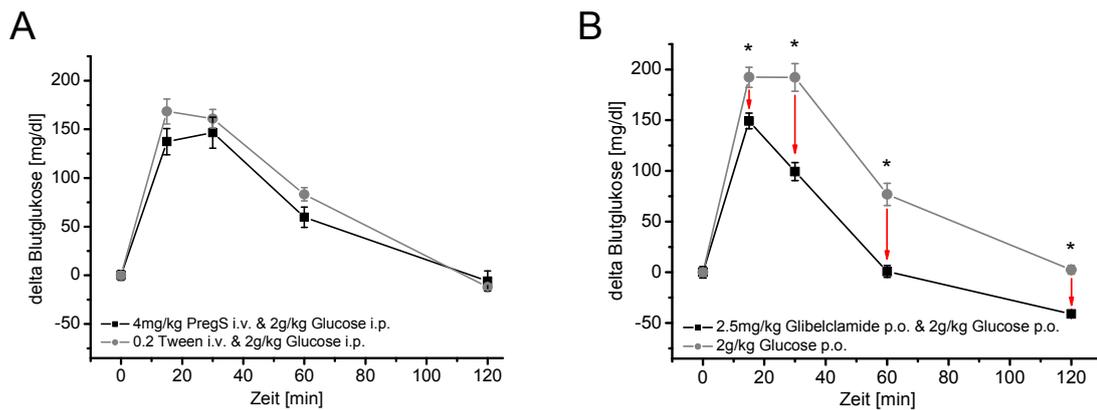


Abbildung 51: Effekt von Pregnenolon-Sulfat und Glibenclamid in C57Bl6 Mäusen. (A) Zeitverlauf der Blutglukosespiegel vor und nach Applikation eines Glukosebolus (2g/kg KG) mit (schwarz, n=9) und ohne (grau, n=10) Vorbehandlung mit Pregnenolon-Sulfat (4mg/kg KG). Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit Glibenclamid (2.5mg/kg KG, oGTT: n=15, Glibenclamid+oGTT: n=28) (B) zeigt eine Pregnenolon-Sulfat-Behandlung keinen Effekt auf den Verlauf der Blutglukoselevel während des Glukosetoleranztests.

Neben der Expression verschiedener Mitglieder der TRPM-Familie konnten auch Transkripte von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 Proteinen in β -Zellen des Pankreas nachgewiesen werden (Freichel et al., 2004a; Roe et al., 1998; Sakura and Ashcroft, 1997). In β -Zellen des Pankreas wurden nach Stimulation mit Acetylcholin, welches über den G-Protein-gekoppelten M3-Rezeptor die Insulinfreisetzung verstärkt, Speicher-abhängige Kationenströme mit Ähnlichkeiten zu TRPC-vermittelten Ionenströmen beschrieben (Mears and Zimlik, 2004). Ich habe deshalb auch an TRPC3/C6-defizienten Mäusen Glukosetoleranztests durchgeführt. Da im Unterschied zu allen bisherigen Glukosetoleranztests unterschiedliche Nüchtern-Blutzuckerspiegel festgestellt wurden, sind in Abbildung 52 sowohl die Absolutwerte, als auch die Änderungen der Blutglukosewerte im Vergleich zum Ausgangswert gezeigt. Anhand der Absolutwerte wird deutlich, dass die TRPC3/C6^{(-/-)2} Mäuse erniedrigte Blutglukosewerte zu den Zeitpunkten vor und 15 Minuten nach der Applikation des Glukosestimulus aufwiesen. In Abbildung 52B ist die Änderung der Blutglukosewerte dargestellt. Der verminderte Abfall der Blutzuckerspiegel in TRPC3/C6^{(-/-)2} Mäusen zu den Zeitpunkten 60 und 120 Minuten nach Glukoseapplikation könnten auf einer verminderten Glukose-induzierten Insulinsekretion oder auf einer veränderten Insulin-induzierten Glukoseverwertung beruhen.

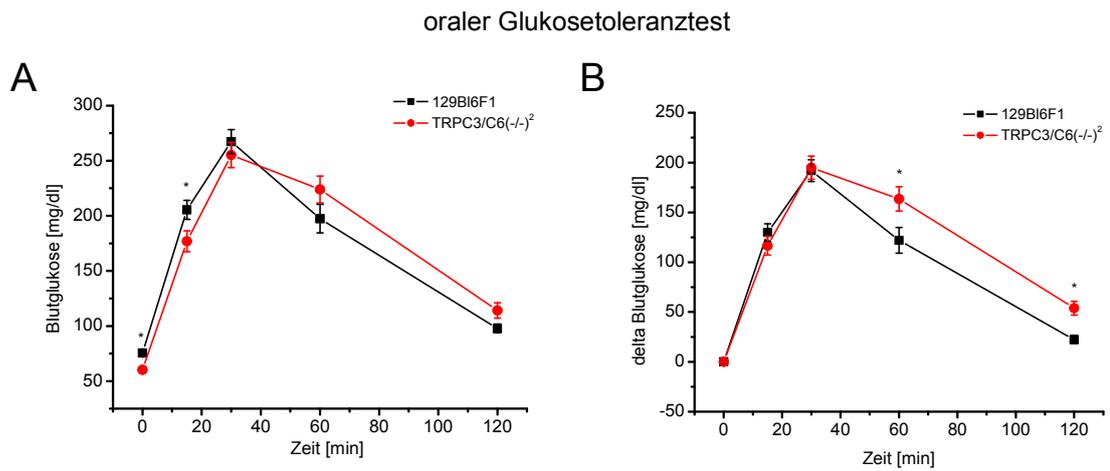


Abbildung 52: Glukosetoleranz in TRPC3/C6^{(-/-)2} Mäusen. Zeitverlauf der Blutglukoselevel vor und nach oraler Applikation (C & D) eines Glukosebolus (2g/kg KG) in TRPC3/C6^{(-/-)2} und Wildtyp Mäusen (n=13/Genotyp). Dargestellt sind sowohl die Absolut- als auch die Delta-Werte.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, G. U., and Malik, A. B. (2005). Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflügers Arch* 451, 131-142.
- Ahmed, G. U., Mehta, D., Vogel, S., Holinstat, M., Paria, B. C., Tirupathi, C., and Malik, A. B. (2004). Protein kinase C α phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca²⁺ entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 279, 20941-20949.
- Albert, A. P., Pucovsky, V., Prestwich, S. A., and Large, W. A. (2006). TRPC3 properties of a native constitutively active Ca²⁺-permeable cation channel in rabbit ear artery myocytes. *J Physiol* 571, 361-369.
- Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., Pearce, W., Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., Kuehn, N., Gray, A., Giddings, J., Peskett, E., *et al.* (2004). Essential role for the p110 δ phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* 431, 1007-1011.
- Altman, J. D., Trendelenburg, A. U., MacMillan, L., Bernstein, D., Limbird, L., Starke, K., Kobilka, B. K., and Hein, L. (1999). Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in α 2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56, 154-161.
- Ambudkar, I. S. (2009). Unraveling smooth muscle contraction: the TRP link. *Gastroenterology* 137, 1211-1214.
- Ashcroft, F. M. (2006). From molecule to malady. *Nature* 440, 440-447.
- Averbeck, M., Gebhardt, C., Emmrich, F., Treudler, R., and Simon, J. C. (2007). Immunologic principles of allergic disease. *J Dtsch Dermatol Ges* 5, 1015-1028.
- Barrera, N. P., Shaifita, Y., McFadzean, I., Ward, J. P., Henderson, R. M., and Edwardson, J. M. (2007). AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1086-1090.
- Bayliss, W. M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28, 220-231.
- Beech, D. J. (2005). Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 597-603.
- Beech, D. J., Xu, S. Z., McHugh, D., and Flemming, R. (2003). TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* 33, 433-440.
- Berridge, M. J. (2008). Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 586, 5047-5061.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *NatRevMolCell Biol* 4, 517-529.
- Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- Bertaux, F., Colledge, W. H., Smith, S. E., Evans, M., Samani, N. J., and Miller, C. C. (1997). Normotensive blood pressure in mice with a disrupted renin Ren-1d gene. *Transgenic Res* 6, 191-196.
- Bertolino, P., Radovanovic, I., Casse, H., Aguzzi, A., Wang, Z. Q., and Zhang, C. X. (2003). Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs. *Mech Dev* 120, 549-560.

- Birnbaumer, L. (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 395-426.
- Brandes, R. P., Schmitz-Winnenthal, F. H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P. L., Vanhoutte, P. M., Fleming, I., and Busse, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9747-9752.
- Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., and Aldrich, R. W. (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876.
- Brooks, D., Horner, R. L., Kozar, L. F., Waddell, T. K., Render, C. L., and Phillipson, E. A. (1996). Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure. *J Appl Physiol* 81, 1012-1018.
- Butz, G. M., and Davisson, R. L. (2001). Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiol Genomics* 5, 89-97.
- Castrop, H., Hocherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., and Wagner, C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 90, 607-673.
- Cavalli, A., Lattion, A. L., Hummler, E., Nenniger, M., Pedrazzini, T., Aubert, J. F., Michel, M. C., Yang, M., Lembo, G., Vecchione, C., *et al.* (1997). Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11589-11594.
- Chaudhuri, P., Colles, S. M., Bhat, M., Van Wagoner, D. R., Birnbaumer, L., and Graham, L. M. (2008). Elucidation of a TRPC6-TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement. *Mol Biol Cell* 19, 3203-3211.
- Chen, X., Li, W., Yoshida, H., Tsuchida, S., Nishimura, H., Takemoto, F., Okubo, S., Fogo, A., Matsusaka, T., and Ichikawa, I. (1997). Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272, F299-304.
- Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S. A., Stokes, A. J., Kinet, J. P., Fleig, A., and Penner, R. (2007). TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 41, 51-61.
- Chruscinski, A. J., Rohrer, D. K., Schauble, E., Desai, K. H., Bernstein, D., and Kobilka, B. K. (1999). Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 274, 16694-16700.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- Colquhoun, D., Neher, E., Reuter, H., and Stevens, C. F. (1981). Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 294, 752-754.
- Cosens, D. J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287.
- Cowley, A. W., Jr. (1992). Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 72, 231-300.
- Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M., Garrett-Beal, L., Emmert-Buck, M. R., Edgemon, K. A., Lorang, D., Libutti, S. K., Chandrasekharappa, S. C., Marx, S. J., *et al.* (2001). A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1118-1123.

- Cranston, A. N., and Ponder, B. A. (2003). Modulation of medullary thyroid carcinoma penetrance suggests the presence of modifier genes in a RET transgenic mouse model. *Cancer Res* 63, 4777-4780.
- Crawley, J. N. (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 57, 809-818.
- Creutzfeldt, W., and Ebert, R. (1985). New developments in the incretin concept. *Diabetologia* 28, 565-573.
- Crowley, S. D., Gurley, S. B., Oliverio, M. I., Pazmino, A. K., Griffiths, R., Flannery, P. J., Spurney, R. F., Kim, H. S., Smithies, O., Le, T. H., and Coffman, T. M. (2005). Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 115, 1092-1099.
- Davies, M. F., Haimor, F., Lighthall, G., and Clark, J. D. (2003). Dexmedetomidine fails to cause hyperalgesia after cessation of chronic administration. *Anesth Analg* 96, 195-200, table of contents.
- Davis, M. J., and Hill, M. A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79, 387-423.
- Demion, M., Bois, P., Launay, P., and Guinamard, R. (2007). TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc Res* 73, 531-538.
- Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaja, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455, 465-477.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Lauterbach, B., Essin, K., Obst, M., Gross, V., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2004). TRPC6 deficient mice develop an elevated blood pressure and an early onset of the myogenic tone in cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs ArchPharmacolSuppl* 369, R61.
- Dietrich, A., Mederos, Y. S. M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., *et al.* (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25, 6980-6989.
- Drucker, D. J., and Nauck, M. A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368, 1696-1705.
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., and Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3434-3438.
- Earley, S., Waldron, B. J., and Brayden, J. E. (2004). Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res* 95, 922-929.
- Esler, M., Eikelis, N., Schlaich, M., Lambert, G., Alvarenga, M., Dawood, T., Kaye, D., Barton, D., Pier, C., Guo, L., *et al.* (2008). Chronic mental stress is a cause of essential hypertension: presence of biological markers of stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 498-502.
- Esler, M., Rumantir, M., Kaye, D., Jennings, G., Hastings, J., Socratous, F., and Lambert, G. (2001). Sympathetic nerve biology in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 986-989.

- Esther, C. R., Jr., Howard, T. E., Marino, E. M., Goddard, J. M., Capecchi, M. R., and Bernstein, K. E. (1996). Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74, 953-965.
- Faraci, F. M., Sigmund, C. D., Shesely, E. G., Maeda, N., and Heistad, D. D. (1998). Responses of carotid artery in mice deficient in expression of the gene for endothelial NO synthase. *Am J Physiol* 274, H564-570.
- Fonfria, E., Murdock, P. R., Cusdin, F. S., Benham, C. D., Kelsell, R. E., and McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26, 159-178.
- Freichel, M., and Flockerzi, V. (2007). Biological functions of TRPs unravelled by spontaneous mutations and transgenic animals. *Biochem Soc Trans* 35, 120-123.
- Freichel, M., Philipp, S., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (2004a). TRPC4 and TRPC4-deficient mice. *NovartisFoundSymp* 258:189-99; *discussion*; 199-203, 263-6., 189-199.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., *et al.* (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *NatCell Biol* 3, 121-127.
- Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Hoffmann, M., Muller, C., Stolz, S., Scheunemann, J., Weissgerber, P., and Flockerzi, V. (2004b). Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1352-1358.
- Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Stolz, S., Philipp, S. E., Weissgerber, P., and Flockerzi, V. (2005). Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* 567, 59-66.
- Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Galli, S. J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 135-142.
- Gell PGH, C. R. (1963). *Clinical Aspects of Immunology*: Blackwell).
- Geng, X., Li, L., Bottino, R., Balamurugan, A. N., Bertera, S., Densmore, E., Su, A., Chang, Y., Trucco, M., and Drain, P. (2007). Antidiabetic sulfonylurea stimulates insulin secretion independently of plasma membrane KATP channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E293-301.
- Gerzanich, V., Woo, S. K., Vennekens, R., Tsybalyuk, O., Ivanova, S., Ivanov, A., Geng, Z., Chen, Z., Nilius, B., Flockerzi, V., *et al.* (2009). De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nat Med* 15, 185-191.
- Goel, M., Sinkins, W. G., and Schilling, W. P. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 277, 48303-48310.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F., and Summerville, W. W. (1934). Studies on Experimental Hypertension : I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med* 59, 347-379.
- Golde, W. T., Gollobin, P., and Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34, 39-43.
- Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., Rubin, L. J., and Yuan, J. X. (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative

Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H746-755.

Gross, V., Milla, A. F., Plehm, R., Inagami, T., and Luft, F. C. (2000). Long-term blood pressure telemetry in AT₂ receptor-disrupted mice. *J Hypertens* 18, 955-961.

Gross, V., Obst, M., Kiss, E., Janke, J., Mazak, I., Shagdarsuren, E., Muller, D. N., Langenickel, T. H., Grone, H. J., and Luft, F. C. (2004). Cardiac hypertrophy and fibrosis in chronic L-NAME-treated AT₂ receptor-deficient mice. *J Hypertens* 22, 997-1005.

Gross, V., Tank, J., Obst, M., Plehm, R., Blumer, K. J., Diedrich, A., Jordan, J., and Luft, F. C. (2005). Autonomic nervous system and blood pressure regulation in RGS2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1134-1142.

Guinamard, R., Chatelier, A., Demion, M., Potreau, D., Patri, S., Rahmati, M., and Bois, P. (2004). Functional characterization of a Ca²⁺-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J Physiol* 558, 75-83.

Guinamard, R., Demion, M., Magaud, C., Potreau, D., and Bois, P. (2006). Functional expression of the TRPM4 cationic current in ventricular cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 48, 587-594.

Guyenet, P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7, 335-346.

Hardie, R. C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 204, 3403-3409.

Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., *et al.* (2008). TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59, 392-398.

He, Y., Yao, G., Savoia, C., and Touyz, R. M. (2005). Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ Res* 96, 207-215.

Hecquet, C. M., Ahmmed, G. U., Vogel, S. M., and Malik, A. B. (2008). Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 102, 347-355.

Heikkinen, S., Argmann, C. A., Champy, M. F., and Auwerx, J. (2007). Evaluation of glucose homeostasis. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 29*, Unit 29B 23.

Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., and Kobilka, B. K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744-747.

Heineke, J., and Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600.

Heximer, S. P., Knutsen, R. H., Sun, X., Kaltenbronn, K. M., Rhee, M. H., Peng, N., Oliveira-dos-Santos, A., Penninger, J. M., Muslin, A. J., Steinberg, T. H., *et al.* (2003). Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest* 111, 1259.

Hoffmann, M. (2004) Charakterisierung der Blutdruck- und Herzfrequenzregulation in CaV β 3^{-/-} und TRPC4^{-/-} Mäusen durch direkte intraarterielle und telemetrische Blutdruckmessung., Universität des Saarlandes.

Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *RevPhysiol BiochemPharmacol* 139:33-87., 33-87.

- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7461-7466.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., and Fishman, M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-242.
- Hürter, P., Kordonouri, O., Danne, T., Lange, K. (2007). *Kompendium pädiatrische Diabetologie*: Springer Berlin Heidelberg).
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9269.
- Inagaki, N., Goto, S., Nagai, H., and Koda, A. (1986). Homologous passive cutaneous anaphylaxis in various strains of mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **81**, 58-62.
- Inoue, R., Jensen, L. J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A., and Ito, Y. (2006). Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res* **99**, 119-131.
- Inoue, R., Morita, H., and Ito, Y. (2004). Newly emerging Ca²⁺ entry channel molecules that regulate the vascular tone. *Expert Opin Ther Targets* **8**, 321-334.
- Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3521-3525.
- Jaggari, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., and Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C235-256.
- Jahn, R., and Sudhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.
- Jeunemaitre, X., Ledru, F., Battaglia, S., Guillemin, M. T., Courbon, D., Dumont, C., Darmon, O., Guize, L., Guernonprez, J. L., Diebold, B., and Ducimetiere, P. (1997). Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* **99**, 66-73.
- Johar, S., Cave, A. C., Narayanapanicker, A., Grieve, D. J., and Shah, A. M. (2006). Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J* **20**, 1546-1548.
- Jones, E. S., Vinh, A., McCarthy, C. A., Gaspari, T. A., and Widdop, R. E. (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **120**, 292-316.
- Jumrussirikul, P., Dinerman, J., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Ekelund, U., Georgakopoulos, D., Schramm, L. P., Calkins, H., Snyder, S. H., Hare, J. M., and Berger, R. D. (1998). Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *J Clin Invest* **102**, 1279-1285.
- Kamibayashi, T., Mammoto, T., Hayashi, Y., Yamatodani, A., Takada, K., Sasaki, S., and Yoshiya, I. (1995). Further characterization of the receptor mechanism involved in the antidysrhythmic effect of dexmedetomidine on halothane/epinephrine dysrhythmias in dogs. *Anesthesiology* **83**, 1082-1089.
- Kavaliers, M., and Kinsella, D. M. (1995). Male preference for the odors of estrous female mice is reduced by the neurosteroid pregnenolone sulfate. *Brain Res* **682**, 222-226.

- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., *et al.* (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.
- Kitazawa, T., Gaylenn, B. D., Denney, G. H., and Somlyo, A. P. (1991). G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **266**, 1708-1715.
- Klabunde, R. E. (2005). *Cardiovascular Physiology Concepts*: Lippincott Williams & Wilkins).
- Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T. W., Jakob, T., and Ruland, J. (2006). The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* **203**, 337-347.
- Komminoth, P. (1997). [Multiple endocrine neoplasia type 1 and 2. 1997 diagnostic guidelines and molecular pathology]. *Pathologe* **18**, 286-300.
- Kotlikoff, M., and Hall, I. (2003). Hypertension: beta testing. *J Clin Invest* **112**, 654-656.
- Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B. P., Voss, H. P., Remie, R., and Van Zutphen, B. L. (2001). The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemp Top Lab Anim Sci* **40**, 8-16.
- Kramer, K., and Kinter, L. B. (2003). Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics* **13**, 197-205.
- Kramer, K., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., Mills, P. A., Huetteman, D., Zwiers, L., and Brockway, B. (2000). Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study. *Lab Anim* **34**, 272-280.
- Krege, J. H., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., and Smithies, O. (1995a). A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* **25**, 1111-1115.
- Krege, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., Jennette, J. C., O'Brien, D. A., and Smithies, O. (1995b). Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* **375**, 146-148.
- Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G., Ohmert, I., Schulze-Bahr, E., Brink, P., and Pongs, O. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest* **119**, 2737-2744.
- Kumar, B., Dreja, K., Shah, S. S., Cheong, A., Xu, S. Z., Sukumar, P., Naylor, J., Forte, A., Cipollaro, M., McHugh, D., *et al.* (2006). Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res* **98**, 557-563.
- Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., and Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* **116**, 3114-3126.
- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., Holland, S. M., and Harrison, D. G. (2002). Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* **40**, 511-515.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukui, T., Holland, S. M., Mitch, W. E., and Harrison, D. G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* **111**, 1201-1209.

- Lapointe, J. Y., Bell, P. D., Sabirov, R. Z., and Okada, Y. (2003). Calcium-activated nonselective cationic channel in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F275-280.
- Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A., and Kinet, J. P. (2004). TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* 306, 1374-1377.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., and Kinet, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397-407.
- Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K. R., Rich, A., Huang, M., Lin, J. H., Feder, J. N., Janovitz, E. B., *et al.* (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278, 20890-20897.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., *et al.* (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- Lerman, L. O., Chade, A. R., Sica, V., and Napoli, C. (2005). Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 146, 160-173.
- Li, M., Liu, K., Michalicek, J., Angus, J. A., Hunt, J. E., Dell'Italia, L. J., Feneley, M. P., Graham, R. M., and Husain, A. (2004). Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest* 114, 112-120.
- Lin, M. J., Leung, G. P., Zhang, W. M., Yang, X. R., Yip, K. P., Tse, C. M., and Sham, J. S. (2004). Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95, 496-505.
- Liu, D., Yang, D., He, H., Chen, X., Cao, T., Feng, X., Ma, L., Luo, Z., Wang, L., Yan, Z., *et al.* (2009). Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats. *Hypertension* 53, 70-76.
- Lorenz, J. N. (2002). A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1565-1582.
- Makaritsis, K. P., Johns, C., Gavras, I., Altman, J. D., Handy, D. E., Bresnahan, M. R., and Gavras, H. (1999). Sympathoinhibitory function of the alpha(2A)-adrenergic receptor subtype. *Hypertension* 34, 403-407.
- Mannebach, S. (2008) Untersuchung von TRPM3-Kationenkanälen mit Hilfe von Knock-down- und Knock-out-Methoden., Universität des Saarlandes.
- Maruyama, Y., and Peterson, O. H. (1982). Single-channel currents in isolated patches of plasma membrane from basal surface of pancreatic acini. *Nature* 299, 159-161.
- Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., Yamanishi, K., Miyazaki, M., Matsubara, H., and Yabe-Nishimura, C. (2005). Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112, 2677-2685.
- Mattson, D. L. (1998). Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice. *Am J Physiol* 274, R564-570.
- Mears, D., and Zimlik, C. L. (2004). Muscarinic agonists activate Ca²⁺ store-operated and -independent ionic currents in insulin-secreting HIT-T15 cells and mouse pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* 197, 59-70.
- Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. (1997). Mast cells. *Physiol Rev* 77, 1033-1079.

- Meyer, J. W., Flagella, M., Sutliff, R. L., Lorenz, J. N., Nieman, M. L., Weber, C. S., Paul, R. J., and Shull, G. E. (2002). Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1846-1855.
- Michiels, F. M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G. M., Feunteun, J., and Billaud, M. (1997). Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3330-3335.
- Mills, P. A., Huetteman, D. A., Brockway, B. P., Zwiers, L. M., Gelsema, A. J., Schwartz, R. S., and Kramer, K. (2000). A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *J Appl Physiol* **88**, 1537-1544.
- Minke, B., and Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* **82**, 429-472.
- Minke, B., Wu, C., and Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* **258**, 84-87.
- Mio, K., Ogura, T., Kiyonaka, S., Hiroaki, Y., Tanimura, Y., Fujiyoshi, Y., Mori, Y., and Sato, C. (2007). The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas. *J Mol Biol* **367**, 373-383.
- Miyamoto, Y., Saito, Y., Kajiyama, N., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Nakayama, M., Kamitani, S., Harada, M., Ishikawa, M., Kuwahara, K., *et al.* (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* **32**, 3-8.
- Mohr, F. C., and Fewtrell, C. (1987a). Depolarization of rat basophilic leukemia cells inhibits calcium uptake and exocytosis. *J Cell Biol* **104**, 783-792.
- Mohr, F. C., and Fewtrell, C. (1987b). IgE receptor-mediated depolarization of rat basophilic leukemia cells measured with the fluorescent probe bis-oxonol. *J Immunol* **138**, 1564-1570.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-598.
- Montell, C., and Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-1323.
- Murata, S., Rosenblum, W. I., Shimizu, T., and Nelson, G. H. (1995). Delayed platelet adhesion/aggregation at sites of endothelial injury in mouse cerebral arterioles after transient elevations of blood pressure and shear. *Stroke* **26**, 650-653; discussion 654.
- Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I., and Molkentin, J. D. (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *Faseb J* **20**, 1660-1670.
- Naylor, J., Li, J., Milligan, C. J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., Beri, D., *et al.* Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ Res* **106**, 1507-1515.
- Nilius, B., and Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* **81**, 1415-1459.

- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87, 165-217.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., and Flockerzi, V. (2003). Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278, 30813-30820.
- Nilius, B., and Voets, T. (2008). A TRP channel-steroid marriage. *Nat Cell Biol* 10, 1383-1384.
- Oberwinkler, J. (2007). TRPM3, a biophysical enigma? *Biochem Soc Trans* 35, 89-90.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., and Philipp, S. E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280, 22540-22548.
- Obst, M., Gross, V., and Luft, F. C. (2004). Systemic hemodynamics in non-anesthetized L-NAME- and DOCA-salt-treated mice. *J Hypertens* 22, 1889-1894.
- Okunishi, H., Miyazaki, M., and Toda, N. (1984). Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 2, 277-284.
- Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15496-15501.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Embo J* 25, 5305-5316.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.
- Partridge, L. D., and Swandulla, D. (1987). Single Ca-activated cation channels in bursting neurons of *Helix*. *Pflugers Arch* 410, 627-631.
- Patterson, A. J., Henrie-Olson, J., and Brenner, R. (2002). Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med* 12, 78-82.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38, 233-252.
- Peppiatt-Wildman, C. M., Albert, A. P., Saleh, S. N., and Large, W. A. (2007). Endothelin-1 activates a Ca²⁺-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol* 580, 755-764.
- Pereira, A. C., Floriano, M. S., Mota, G. F., Cunha, R. S., Herkenhoff, F. L., Mill, J. G., and Krieger, J. E. (2003). Beta2 adrenoceptor functional gene variants, obesity, and blood pressure level interactions in the general population. *Hypertension* 42, 685-692.
- Perley, M. J., and Kipnis, D. M. (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46, 1954-1962.
- Persson, P. B. (1996). Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction. *Physiol Rev* 76, 193-244.
- Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenau, M., Lohn, M., Waldschutz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F. C., Ehmke, H., and Pongs, O. (2000). Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* 87, E53-60.

- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., and Penner, R. (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15166-15171.
- Prussin, C., and Metcalfe, D. D. (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* *117*, S450-456.
- Rahmutula, D., Nakayama, T., Soma, M., Takahashi, Y., Kunimoto, M., Uwabo, J., Sato, M., Izumi, Y., Kanmatsuse, K., and Ozawa, Y. (2001). Association study between the variants of the human ANP gene and essential hypertension. *Hypertens Res* *24*, 291-294.
- Razin, E., Stevens, R. L., Akiyama, F., Schmid, K., and Austen, K. F. (1982). Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate. *J Biol Chem* *257*, 7229-7236.
- Reading, S. A., Earley, S., Waldron, B. J., Welsh, D. G., and Brayden, J. E. (2005). TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *288*, H2055-2061.
- Ritthaler, T., Schrickler, K., Kees, F., Kramer, B., and Kurtz, A. (1997). Acute hypoxia stimulates renin secretion and renin gene expression in vivo but not in vitro. *Am J Physiol* *272*, R1105-1111.
- Roe, M. W., Worley, J. F., 3rd, Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A. A., Dralyuk, F., Blair, N. T., Mertz, R. J., Philipson, L. H., and Dukes, I. D. (1998). Characterization of a Ca²⁺ release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and [Ca²⁺]_i oscillations in transgenically derived beta-cells. *J Biol Chem* *273*, 10402-10410.
- Rohrer, D. K., Desai, K. H., Jasper, J. R., Stevens, M. E., Regula, D. P., Jr., Barsh, G. S., Bernstein, D., and Kobilka, B. K. (1996). Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7375-7380.
- Rohrer, D. K., Schauble, E. H., Desai, K. H., Kobilka, B. K., and Bernstein, D. (1998). Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol* *274*, H1184-1193.
- Rokosh, D. G., and Simpson, P. C. (2002). Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9474-9479.
- Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., Beck, F. X., Boettger, T., Schubert, R., Ehmke, H., *et al.* (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res* *98*, 549-556.
- Sakura, H., and Ashcroft, F. M. (1997). Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* *40*, 528-532.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X. B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C. A., *et al.* (2005). Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* *112*, 60-68.
- Schnermann, J. B., Traynor, T., Yang, T., Huang, Y. G., Oliverio, M. I., Coffman, T., and Briggs, J. P. (1997). Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* *273*, F315-320.
- Schölmerich J., S. B., H. Drexler, M. Hallek, W. Hiddemann, W.H. Hörl, H. Klein, M. Landthaler, K. Lenz, K. Mann, J. Mössner, U. Müller-Ladner, J. Reichen, W. Schmie-

- gel, J.O. Schröder, W. Seeger, W. Stremmel, N. Suttorp, L.S. Weilemann und J.C. Wöhrle (2006). *Medizinische Therapie: Springer Berlin Heidelberg*.
- Schweda, F., Wagner, C., Kramer, B. K., Schnermann, J., and Kurtz, A. (2003). Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F770-777.
- Seth, M., Zhang, Z. S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., Tsiokas, L., Winn, M., Abramowitz, J., Rockman, H. A., *et al.* (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ Res* 105, 1023-1030.
- Sever, P. S., and Poulter, N. R. (1989). A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl* 7, S9-12.
- Shannon, J. R., Jordan, J., Diedrich, A., Pohar, B., Black, B. K., Robertson, D., and Biaggioni, I. (2000). Sympathetically mediated hypertension in autonomic failure. *Circulation* 101, 2710-2715.
- Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., Nilius, B., and Honore, E. (2008). TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response. *Pflugers Arch* 456, 529-540.
- Sharif-Naeini, R., Folgering, J. H., Bichet, D., Duprat, F., Lauritzen, I., Arhatte, M., Jordan, M., Dedman, A., Chatelain, F. C., Schulte, U., *et al.* (2009). Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell* 139, 587-596.
- Sharp, M. G., Fettes, D., Brooker, G., Clark, A. F., Peters, J., Fleming, S., and Mullins, J. J. (1996). Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension* 28, 1126-1131.
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., and Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13176-13181.
- Shusterman, V., Usiene, I., Harrigal, C., Lee, J. S., Kubota, T., Feldman, A. M., and London, B. (2002). Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H2076-2083.
- Siemen, D. (1993). Nonselective cation channels. *Exs* 66, 3-25.
- Singh, I., Knezevic, N., Ahmmed, G. U., Kini, V., Malik, A. B., and Mehta, D. (2007). Gα_q-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem* 282, 7833-7843.
- Skinner, M. A., Kalyanaraman, S., Safford, S. D., Heuckeroth, R. O., Tourtellotte, W., Goyeau, D., Goodfellow, P., Milbrandt, J. D., and Freemerman, A. (2005). A human yeast artificial chromosome containing the multiple endocrine neoplasia type 2B Ret mutation does not induce medullary thyroid carcinoma but does support the growth of kidneys and partially rescues enteric nervous system development in Ret-deficient mice. *Am J Pathol* 166, 265-274.
- Skryabin, B. V., Holtwick, R., Fabritz, L., Kruse, M. N., Veltrup, I., Stypmann, J., Kirchhof, P., Sabrane, K., Bubikat, A., Voss, M., and Kuhn, M. (2004). Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination. *Genesis* 39, 288-298.
- Smith-Hicks, C. L., Sizer, K. C., Powers, J. F., Tischler, A. S., and Costantini, F. (2000). C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Embo J* 19, 612-622.

- Sokolova, O., Kolmakova-Partensky, L., and Grigorieff, N. (2001). Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 9, 215-220.
- Somlyo, A. P., and Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle [published erratum appears in *Nature* 1994 Dec 22-29;372(6508):812]. *Nature* 372, 231-236.
- Sours-Brothers, S., Ding, M., Graham, S., and Ma, R. (2009). Interaction between TRPC1/TRPC4 assembly and STIM1 contributes to store-operated Ca²⁺ entry in mesangial cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 234, 673-682.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278, 39014-39019.
- Sudhof, T. C., and Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474-477.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Sweeney, M., Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, S., McDaniel, S. S., and Yuan, J. X. (2002). Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L144-155.
- Tang, K. M., Wang, G. R., Lu, P., Karas, R. H., Aronovitz, M., Heximer, S. P., Kaltenbronn, K. M., Blumer, K. J., Siderovski, D. P., Zhu, Y., and Mendelsohn, M. E. (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 9, 1506-1512.
- Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., Fukamizu, A., and Murakami, K. (1994). Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 269, 31334-31337.
- Tanoue, A., Koshimizu, T. A., Shibata, K., Nasa, Y., Takeo, S., and Tsujimoto, G. (2003). Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab* 14, 107-113.
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S., and Tsujimoto, G. (2002). The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* 109, 765-775.
- Teulon, J., Paulais, M., and Bouthier, M. (1987). A Ca²⁺-activated cation-selective channel in the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse. *Biochim Biophys Acta* 905, 125-132.
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (1999). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart*.
- Thilo, F., Loddenkemper, C., Berg, E., Zidek, W., and Tepel, M. (2009). Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension. *Mod Pathol* 22, 426-430.
- Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S. M., Paria, B. C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A. B. (2002). Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *CircRes* 91, 70-76.
- Tsuchida, S., Matsusaka, T., Chen, X., Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., Fogo, A., Utsunomiya, H., Inagami, T., and Ichikawa, I. (1998). Murine double nullizygotes of the

- angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygoten. *J Clin Invest* 101, 755-760.
- Tsvilovskyy, V. V., Zholos, A. V., Aberle, T., Philipp, S. E., Dietrich, A., Zhu, M. X., Birnbaumer, L., Freichel, M., and Flockerzi, V. (2009). Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 137, 1415-1424.
- Tyagi, N., Moshal, K. S., Lominadze, D., Ovechkin, A. V., and Tyagi, S. C. (2005). Homocysteine-dependent cardiac remodeling and endothelial-myocyte coupling in a 2 kidney, 1 clip Goldblatt hypertension mouse model. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 583-594.
- Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S., and Montani, J. P. (2000). Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44, 361-373.
- Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., and Montani, J. P. (2003). Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice. *J Physiol* 549, 313-325.
- VanderBrink, B. A., Link, M. S., Aronovitz, M. J., Saba, S., Sloan, S. B., Homoud, M. K., Estes, I. N., and Wang, P. J. (1999). Assessment of atrioventricular nodal physiology in the mouse. *J Interv Card Electrophysiol* 3, 207-212.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S. E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V., and Freichel, M. (2007). Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol* 8, 312-320.
- Wagner, C., de Wit, C., Kurtz, L., Grunberger, C., Kurtz, A., and Schweda, F. (2007). Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100, 556-563.
- Wagner, T. F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S. E., and Oberwinkler, J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* 10, 1421-1430.
- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., and Ito, H. (2008). TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118, 337-351.
- Wei, L., Freichel, M., Jaspers, M., Cuppens, H., Cassiman, J. J., Droogmans, G., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2001). Functional interaction between TRP4 and CFTR in mouse aorta endothelial cells. *BMC Physiol* 1, 3.
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H. A., *et al.* (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19093-19098.
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., and Brayden, J. E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90, 248-250.
- Wershil, B. K., Wang, Z. S., Gordon, J. R., and Galli, S. J. (1991). Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 87, 446-453.

- Whitesall, S. E., Hoff, J. B., Vollmer, A. P., and D'Alecy, L. G. (2004). Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *286*, H2408-2415.
- Wiesel, P., Mazzolai, L., Nussberger, J., and Pedrazzini, T. (1997). Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* *29*, 1025-1030.
- Xi, Q., Adebisi, A., Zhao, G., Chapman, K. E., Waters, C. M., Hassid, A., and Jaggar, J. H. (2008). IP3 constricts cerebral arteries via IP3 receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Circ Res* *102*, 1118-1126.
- Xu, X. Z., Moebius, F., Gill, D. L., and Montell, C. (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10692-10697.
- Yao, X., and Garland, C. J. (2005). Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* *97*, 853-863.
- Yu, F. H., and Catterall, W. A. (2004). The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* *2004*, re15.
- Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., and Yuan, J. X. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13861-13866.
- Zarrindast, M. R., Barghi-Lashkari, S., and Shafizadeh, M. (2001). The possible cross-tolerance between morphine- and nicotine-induced hypothermia in mice. *Pharmacol Biochem Behav* *68*, 283-289.
- Zhang, C. L., Katoh, M., Shibasaki, T., Minami, K., Sunaga, Y., Takahashi, H., Yokoi, N., Iwasaki, M., Miki, T., and Seino, S. (2009). The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* *325*, 607-610.
- Zhang, S., Patel, H. H., Murray, F., Remillard, C. V., Schach, C., Thistlethwaite, P. A., Insel, P. A., and Yuan, J. X. (2007). Pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and IPAH patients show divergent cAMP-mediated effects on TRPC expression and capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *292*, L1202-1210.
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* *112*, 293-301.
- Zimmerman, M. C., Lazartigues, E., Sharma, R. V., and Davisson, R. L. (2004). Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* *95*, 210-216.