

Aus dem Department für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Leiter: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg

**Untersuchungen zur endothelabhängigen und
endothelunabhängigen Vasomotorik der Mäuseaorta**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Corinna Moll
aus
Reutlingen

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2.Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit !

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Regulation des Vasotonus	4
1.1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen der Blutdruckregulation .	4
1.1.1.1 Aufbau der Arterienwand.....	4
1.1.1.2 Kontraktionsmechanismen der glatten Muskulatur.....	5
1.1.1.3 Regulation des Gefäßtonus.....	6
1.2 Das Gefäßendothel und seine Rolle bei der Regulation des Vasotonus	6
1.2.1 NO-Synthese	7
1.2.2 Das NO/cGMP-System	8
1.3 Das Endothelinsystem	10
1.3.1 Endothelinsynthese.....	10
1.3.2 Pharmakodynamik des Endothelins.....	11
1.3.3 Endothelinrezeptorantagonisten	12
1.4 Die Rolle der Serum- und Glukokortikoid regulierten Kinase 1 (SGK1) bei der Blutdruckregulation.....	13
1.5 Kaliumkanäle und ihre Funktion bei der Regulation des Vasotonus... 15	15
1.5.1 Calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}).....	15
1.5.1.1 Einfluss der α -Untereinheit der BK-Kanäle auf die Blutdruckregulation	17
1.5.1.2 Einfluss der β_1 -Untereinheit der BK-Kanäle auf die Blutdruckregulation	18
1.6 Fragestellung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20

2.1 Versuchstiere	20
2.2 Materialien	20
2.2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	20
2.2.2 Chemikalien	21
2.2.3 Zusammensetzung der Lösungen.....	22
2.2.4 Zusammensetzung der Lösungen für die Kontraktions- /Relaxationsversuche.....	23
2.2.5 Herstellung der Stammlösungen.....	24
2.3 Versuchsaufbau	25
2.3.1 Aufbau des Organbads	25
2.3.2 Kalibrierung des Messgerätes	26
2.4 Versuchsdurchführung	27
2.4.1 Gefäßpräparation.....	27
2.4.2 Äquilibration	28
2.4.3 Funktionstest	28
2.4.4 Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven	29
2.4.5 Pipettierschema für die Dosis-Wirkungs-Kurven.....	31
2.4.6 Statistische Auswertung.....	32
3 ERGEBNISSE	33
3.1 Untersuchungen zur Vasomotorik bei CD1-Mäusen	33
3.1.1 Kontraktionsversuche mit Norepinephrin	33
3.1.2 NO-Synthese-Hemmung durch L-Nitro-Arginin.....	34
3.1.3 Endothelunabhängige Gefäßrelaxation durch Natrium-Nitroprussid	35
3.1.4 Endothelabhängige Gefäßrelaxation durch Acetylcholin.....	36
3.2 Untersuchungen zur ET-1 vermittelten Vasokonstriktion	38
3.2.1 ET-1 vermittelte Vasokonstriktion bei CD1-Mäusen.....	38
3.2.2 Rolle der SGK1 bei der Regulation des Vasotonus	39
3.3 Einfluss der BK-Kanäle auf den arteriellen Vasotonus	41

3.3.1 Endothelunabhängige Gefäßrelaxation durch Natrium-Nitroprussid bei BK ^{+/+} - und BK ^{-/-} -Mäusen im Vergleich.....	41
3.3.2 Endothelabhängige Gefäßrelaxation bei BK ^{+/+} - und BK ^{-/-} -Mäusen durch Acetylcholin.....	43
4 DISKUSSION	45
4.1 Versuche zur endothelabhängigen und endothelunabhängigen Gefäßrelaxation	46
4.2 Regulation des Gefäßtonus durch ET-1	47
4.3 Die Funktion der BK-Kanäle bei der Regulation des arteriellen Vasotonus	49
5 ZUSAMMENFASSUNG	52
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	53
7 LITERATURVERZEICHNIS	56
8 ANHANG.....	70
8.1 Danksagungen.....	70
8.2 Lebenslauf	71

1 Einleitung

1.1 Regulation des Vasotonus

Die arterielle Hypertonie ist eine Erkrankung, die in Industrieländern bei Erwachsenen mit einer Prävalenz von bis zu 25 % auftritt (20;91;159). Die Erforschung der Ursachen dieser Erkrankung und die daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten sind daher von großer Bedeutung.

Die Regulation des Blutdrucks ist notwendig, um die Gewebe- bzw. Organperfusion dem jeweiligen notwendigen Bedarf anzupassen. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) ist definiert als das Produkt aus dem Herzzeitvolumen (HZV) und dem totalen peripheren Widerstande (TPR) zuzüglich des zentral-venösen Drucks (ZVD).

$$\mathbf{MAD = (HZV \times TPR) + ZVD}$$

Hierbei ist der totale periphere Widerstand abhängig vom Tonus und der Elastizität der Gefäßwände, das Herzzeitvolumen ist definiert als das Produkt aus Herzfrequenz und Schlagvolumen. Der arterielle Blutdruck wird reguliert durch das Zusammenspiel von vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Faktoren, auf welche später näher eingegangen wird, und über das Herzzeitvolumen.

1.1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen der Blutdruckregulation

1.1.1.1 Aufbau der Arterienwand

Die Gefäßwand der Arterien besteht aus drei Schichten, der Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa (Adventitia). Die Intima besteht aus einer Schicht Endothelzellen und ist dem Lumen des Gefäßes zugewandt. Beim Menschen hat diese Zellschicht eine Fläche von 4000-7000 m². Die Endothelzellschicht, auch Endothel genannt, spielt bei der

Blutdruckregulation eine wichtige Rolle, was durch Versuche von Furchgott und Zawadzki gezeigt werden konnte (47). Die Media stellt die Muskulatur der Gefäße dar und besteht aus glatten Muskelzellen. Sie hat der Dehnung des Gefäßes durch den Blutdruck entgegenzuwirken und reguliert über den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen den Gefäßdurchmesser. Die Adventitia besteht aus Bindegewebe, dient dem Einbau der Gefäße in die Umgebung und der Aufnahme äußerer Krafteinwirkung.

1.1.1.2 Kontraktionsmechanismen der glatten Muskulatur

Die Aktivität der kontraktilen Filamente der Muskulatur, Aktin und Myosin, hängt von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ab (157). In der glatten Muskelzelle ist, abhängig vom Gefäßdurchmesser, eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Einstrom über Ca^{2+} -Kanäle oder Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum maßgeblich an der Kontraktion beteiligt. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (basal: 0,1 $\mu\text{mol/l}$ auf 1 $\mu\text{mol/l}$ bei der Kontraktion) bindet Ca^{2+} an Calmodulin, was die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLK) aktiviert, die leichten Myosinketten phosphoryliert und über die Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten die Kontraktion auslöst.

Das Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im Innern der Zelle wird durch eine Ca^{2+} -ATPase (SERCA, sarcoendoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase) verursacht, welche sowohl für eine Wiederaufnahme von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher als auch für dessen Transport nach extrazellulär verantwortlich ist (155). Es existieren 5 verschiedene SERCA-Isoformen die von 3 Genen codiert werden. SERCA1a und SERCA1b kommen vor allem in der quergestreiften Skelettmuskulatur vor. SERCA2a ist neben der Skelettmuskulatur auch in Zellen des Myokards zu finden. SERCA2b kommt in glatten Muskelzellen vor, SERCA3 vor allem in Endothelzellen und Epithelzellen, wodurch die beiden letztgenannten Isoformen bei der Regulation des arteriellen Blutdrucks von Bedeutung sind (4;176). Die sinkende Konzentration an Ca^{2+} inaktiviert die MLK, wodurch es zur Dephosphorylierung der Myosin-Leichtketten durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase kommt (MLCP). Dieses Absinken der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die daraus resultierende Inaktivierung der MLK führen zur Relaxation der glatten Muskulatur (157).

1.1.1.3 Regulation des Gefäßtonus

Der lokale Gefäßtonus ist das Resultat des Zusammenspiels von vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Faktoren (29;59;60;127). Der Ruhetonus der Gefäße ist sympathikoadrenerg vermittelt und steht zusätzlich unter dem Einfluss parakriner Faktoren (76). Zu den lokalen Regulationsmechanismen zählt unter anderem der sogenannte Bayliss-Effekt, eine direkt myogene Kontraktion auf eine transmurale Drucksteigerung (43). Außerdem setzt das Endothel zahlreiche Faktoren, auch Autacoide genannt, frei, die auf den Gefäßtonus Einfluss nehmen (76;151;152). Auch Gase wie CO_2 und O_2 können den Gefäßtonus beeinflussen (151).

1.2 Das Gefäßendothel und seine Rolle bei der Regulation des Vasotonus

Das Endothel besteht, wie eingangs schon erwähnt, aus nur einer Schicht von Endothelzellen und stellt die Grenze zwischen Blut und Gefäßwand dar. Das Endothel hat wichtige kardiovaskuläre Funktionen, wie die Regulation der Thrombozytenaggregation und des Gefäßtonus. Zu den vom Endothel gebildeten Vasokonstriktoren gehören unter anderem Endothelin und Thromboxan A_2 (79;80). Wichtige Vasodilatoren des Endothels sind das zur Gruppe der Prostaglandine gehörende Prostacyclin PGI_2 , EDRF (endothelium derived relaxing factor), entspricht Stickstoffmonoxid (NO), aber auch Endothelin und Bradykinin (80;105;124). Die Produktion von NO und PGI_2 wird durch niedrige Endothelinkonzentrationen stimuliert (34;80). Auch die Freisetzung des endothelial derived hyperpolarizing factor (EDHF), ein Botenstoff, der noch nicht genau identifiziert ist, spielt bei der endothelvermittelten Vasodilatation eine Rolle. Die Freisetzung von EDHF wird unter anderem durch Bradykinin stimuliert (38). Der EDHF erhöht die K^+ -Leitfähigkeit glatter Muskelzellen, wodurch es zur Hyperpolarisation dieser Zellen kommt. Diese Hyperpolarisation hemmt wiederum die Aktivität

spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und somit die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur (14;36;39;112).

1.2.1 NO-Synthese

1980 wurden zum ersten Mal von Furchgott und Zawadzki endothelabhängige Faktoren beschrieben, welche eine wichtige Rolle in der Regulation des lokalen Gefäßtonus spielen. Sie konnten zeigen, dass das vasodilatatorische Acetylcholin seine Eigenschaft verliert, wenn das Endothel nicht mehr intakt ist. Daraus schlossen sie, dass Acetylcholin nicht direkt die Relaxation auslöst, aber das Endothel zur Bildung von Faktoren anregt, welche die Relaxation bewirken. Als wichtigster Botenstoff in der Vermittlung der Vasorelaxation stellte sich später das vom Endothel gebildete NO heraus (46;72;107;121).

Die NO-Synthese erfolgt durch die NO-Synthase, die aus der Aminosäure L-Arginin, unter Beteiligung von O_2 und NADPH (Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat), N^{ω} -Hydroxy-L-Arginin bildet, das wiederum durch Abspaltung von L-Citrullin zu NO umgewandelt wird (siehe Abbildung 1) (122).

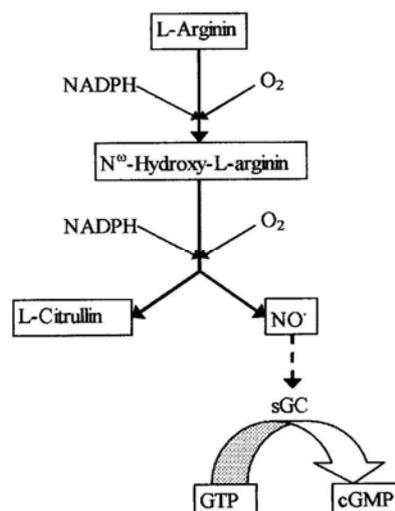


Abbildung 1: NO-Synthese und cGMP Bildung

Es existieren drei verschiedene NO-Synthase Isoformen: die neuronale (nNOS), die endotheliale (eNOS) und die induzierbare Isoform (iNOS). Die eNOS wird auch als konstitutive Isoform bezeichnet (2;104). Die Aktivität der nNOS und der eNOS ist Ca^{2+} - bzw. calmodulinabhängig (24;42), dagegen wird die Aktivität der iNOS durch Faktoren wie Zytokine, mechanische Gefäßdeformation oder Ischämie reguliert (15;103).

Unter normalen Bedingungen spielt die eNOS die wichtigste Rolle bei der Regulation des lokalen Gefäßtonus. Sie sorgt durch eine basale NO-Produktion für eine adäquate Gewebepfusion (72). Eine eNOS-Hemmung mit L-Nitro-Arginin, was auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde, bewirkt nach initialer Kontraktion mit Norepinephrin eine zusätzliche Gefäßkontraktion. Dies ist Hinweis auf eine kontinuierliche NO-Produktion des Endothels, unabhängig von der Anwesenheit des potenten Vasokonstriktors Norepinephrin. Im Tiermodell ist es ein gängiges Manöver, durch chronische Gabe von L-Nitro-Arginin die NO-Synthese zu hemmen und dadurch eine arterielle Hypertonie auszulösen. Der systemische Blutdruck steigt an und die renale Perfusion sinkt aufgrund der verminderten Fähigkeit von renalen Blutgefäßen zur Vasodilatation (130). Die NO-Synthese der eNOS kann durch physikalische Reize wie Schubspannung oder durch vasoaktive Substanzen wie Acetylcholin, Endothelin, Bradykinin und Prostaglandine beeinflusst werden (23).

1.2.2 Das NO/cGMP-System

Die wohl wichtigste Aufgabe von NO in der glatten Muskulatur der Gefäßwand ist die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) (70). Dieses Enzym besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit mit Häm als prosthetischer Gruppe (52). NO ist in der Lage, die sGC zu aktivieren, die dann wiederum, unter Beteiligung von Mg^{2+} , Guanosin-5-Triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) umsetzt, und als sogenannter second-messenger intrazelluläre Signalwege beeinflusst (106;110;111). In der Zelle der glatten Muskulatur bindet cGMP an die cGMP-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinase (cGK1)(150). Die cGK1 ist in der Lage, Proteine, die die Aktivität

der kontraktiven Filamente beeinflussen, zu phosphorylieren, und so die Interaktion von Aktin und Myosin zu hemmen (129). Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen an cGK1 defizienten Mäusen. Diese Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen erhöhten Blutdruck und eine verschlechterte Relaxation der Gefäßmuskulatur auf NO. Diese Versuche deuten deshalb darauf hin, dass cGK1 eine entscheidende Rolle bei der NO mediierten Gefäßrelaxation spielt (92;129). Die cGK1 verursacht außerdem ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase bzw. des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers des sarkoplasmatischen Retikulums und der Zellmembran (3;48;97;157). Diese Mechanismen, plus ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bewirken die Relaxation der Gefäßmuskulatur (92;129).

1.3 Das Endothelinsystem

Neben den bereits erwähnten Vasokonstriktoren spielt Endothelin eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus (55;61;80). 1988 gelang es Yanagisawa et al. zum ersten Mal, diesen starken Vasokonstriktor aus den Endothelzellen der Schweineaorta zu isolieren (179). Inzwischen ist bekannt, dass Endotheline Peptidhormone sind, die aus 21 Aminosäuren bestehen. Bis heute sind drei Isoformen kloniert, die kurz als ET-1, ET-2 und ET-3 bezeichnet werden (10;28;78).

1.3.1 Endothelinsynthese

Endothelin wird hauptsächlich intrazellulär synthetisiert (28;78). Als Endothelinvorläufer wird prä-pro-Endothelin gebildet, das durch Proteolyse in pro-Endothelin umgewandelt wird (62;66). Pro-Endothelin, auch Big-Endothelin (Big-ET) genannt, besteht aus 38 Aminosäuren und wird durch das Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) in intrazellulären Vesikeln, und membrangebunden extrazellulär, zum physiologisch aktiven Endothelin umgewandelt (7;99;179;180). Bildungsort des ET-1 ist vor allem das Endothel. In geringen Mengen findet man es auch in glatten Gefäßmuskelzellen, Nervenzellen, Leberzellen und Makrophagen (89;117;161;179). ET-2 und ET-3 lassen sich nicht in Endothelzellen nachweisen, jedoch in anderen Geweben wie Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere und Gehirn (6;12). Im menschlichen Gefäßsystem ist ET-1, das in Aufbau und Struktur starke Ähnlichkeit mit dem Schlangengift (Sarafotoxin) der *Atractaspis*-Gattung (Erdviper) hat, die vorherrschende Form (84;145). ET-2 und ET-3 spielen bei der Regulation des Gefäßtonus keine wesentliche Rolle (89;90).

1.3.2 Pharmakodynamik des Endothelins

Bis jetzt sind zwei Endothelinrezeptoren bekannt, über die Endothelin auf die glatte Gefäßmuskulatur Einfluss nimmt, der ET_A- und der ET_B-Rezeptor (10) (siehe Abbildung 2). Es existieren noch weitere ET-Rezeptoren, jedoch wurden deren Funktionen noch nicht weiter beschrieben (40;84;98;113). Beide Rezeptortypen sind über G-Proteine an Phospholipase C gekoppelt, deren Stimulation zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), 1,2-Diacylglycerol (DAG) und zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. Der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration resultiert aus einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle über Ca²⁺-Kanäle und aus einer IP₃ vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (68;90;156). ET_A-Rezeptoren befinden sich vor allem auf der glatten Gefäßmuskulatur, den Kardiomyozyten, nicht aber auf dem Gefäßendothel. Der ET_A-Rezeptor bindet hauptsächlich ET-1, seine Affinität für ET-2 und ET-3 ist wesentlich geringer. Im Gefäßsystem vermittelt er eine Vasokonstriktion (5;139;160). ET_B-Rezeptoren befinden sich sowohl auf der glatten Gefäßmuskulatur als auch auf dem Gefäßendothel und binden alle drei ET-Isomere mit nahezu gleicher Affinität (139). ET_B-Rezeptoren, die auf der glatten Muskulatur lokalisiert sind, lösen durch ihre Aktivierung eine Vasokonstriktion aus (160). Die Stimulation der ET_B-Rezeptoren auf Endothelzellen und in der Niere führt dagegen über NO und PGI₂ zu gesteigerter Natriuresis und somit zur Abnahme des arteriellen Blutdrucks (35;44;53;68;69).

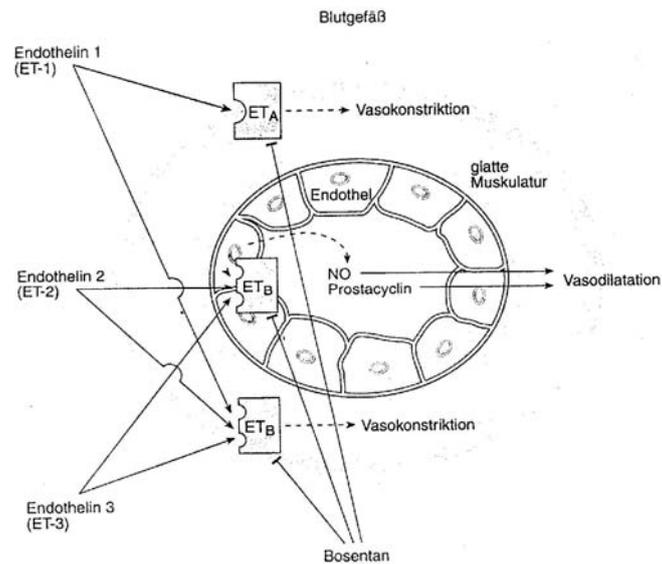


Abbildung 2: Endothelin und seine Rezeptoren

1.3.3 Endothelinrezeptorantagonisten

Es existieren drei verschiedene Typen von Endothelinrezeptorantagonisten, die sich hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber den Endothelinrezeptoren unterscheiden. Sie werden entsprechend ihrer Rezeptoraffinität in ET_A -, ET_B - und ET_{AB} -Rezeptorantagonisten klassifiziert. Eine selektive Blockade von ET_B -Rezeptoren hemmt die NO vermittelte Vasodilatation und führt so zu einer Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes, wohingegen ET_{AB} -Rezeptorantagonisten die kardiovaskuläre und renale Funktion zu verbessern scheinen (50;109;169;172;173). In Tierversuchen konnte durch Verwendung von LU302872, einem ET_{AB} -Rezeptorantagonisten, die Progression einer Niereninsuffizienz verzögert werden (174). ET-Rezeptorantagonisten sollen daher vor allem in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und bei Erkrankungen der Niere eingesetzt werden. Bosentan, ein ET_{AB} -Rezeptorantagonist, ist für die Behandlung der pulmonalen Hypertone

zugelassen. In unseren Versuchen wurde der ET_{AB}-Rezeptorantagonist LU 302872 verwendet.

Die Rolle von Endothelin und ET-Rezeptoren für die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Durch pharmakologische Blockade oder genetische Deletion von ET-Rezeptoren, bzw. der Endothelinsynthese selbst, konnte der Einfluss auf den arteriellen Blutdruck untersucht werden. Bei der Verwendung von ET_A-Rezeptorantagonisten wurde im Tierversuch ein Abfall des Blutdrucks beobachtet, wohingegen die Blockade oder Deletion von ET_B-Rezeptoren zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt (65;119;164). Bei Mäusen die defizient für ET-1 sind (ECE-1-knockout-Mäuse), steigt der arterielle Blutdruck an, was vermutlich auf das Fehlen des vasodilatatorischen Effekts von ET-1 auf den ET_B-Rezeptor und der verminderte Na⁺ bzw. Wasserausscheidung über die Niere zurückzuführen ist (1;69). Eine unspezifische Blockade beider ET-Rezeptoren führt hingegen zu einer Reduktion des arteriellen Blutdrucks (100).

1.4 Die Rolle der Serum- und Glukokortikoid regulierten Kinase 1 (SGK1) bei der Blutdruckregulation

Die SGK1 ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, deren Aktivität auf Transkriptionsebene sowie durch eine anschließende Phosphorylierung reguliert wird (87;123;170). Die Transkription des für die SGK1 codierenden Gens kann unter anderem durch Glukokortikoide, Wachstumsfaktoren, Ca²⁺-Konzentration, Follikel-stimulierendes-Hormon (FSH) und Hyperosmolarität gesteigert werden (9;57;81;87;102). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass ET-1 und Aldosteron ebenfalls Aktivatoren der SGK1 Expression sind (175;182). Die SGK1 ist bei verschiedenen Vorgängen in der Zelle, wie der Regulation des Zellzyklus, Apoptosehemmung, und der Regulation des Zellvolumens von Bedeutung (19;86;87;101). Busjahn et al. konnten zudem zeigen, dass eine erhöhte SGK1-Aktivität mit einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks einhergeht. Diese Beobachtung führte zur Schlussfolgerung, dass SGK1 an der Blutdruckregulation beteiligt ist und zur Entwicklung einer

arteriellen Hypertonie beitragen kann (21). Pathophysiologisch scheinen hierbei Aldosteron und ET-1 vermittelte Signalwege, die zum Anstieg der SGK1-Konzentration führen, eine entscheidende Rolle zu spielen. Der Einsatz von ET-Rezeptorantagonisten verhindert einen Anstieg dieser mRNA-Transkription und könnte somit zur Senkung des arteriellen Blutdrucks beitragen (175).

1.5 Kaliumkanäle und ihre Funktion bei der Regulation des Vasotonus

An glatten Muskelzellen lassen sich verschiedene Kaliumkanaltypen unterscheiden: spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_V), ATP-sensitive K^+ -Kanäle (K_{ATP}), sogenannte einwärts-gleichrichtende- K^+ -Kanäle (inward rectifier, K_{ir}) und calciumabhängige K^+ -Kanäle (K_{Ca}) (116).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V) werden durch Depolarisation der Zellmembran geöffnet, und das Ruhepotential verschiebt sich so in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials, wodurch die Membran hyperpolarisiert. Hierdurch sinkt gleichzeitig der Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ), wodurch eine Vasodilatation der Gefäße ausgelöst wird (141).

Die K_{ATP} -Kanäle sind unter physiologischen Bedingungen in der Regel in Gefäßen inaktiv. Sie werden durch ATP gehemmt und durch ADP, bzw. durch das Absinken des ATP/ADP-Quotienten aktiviert, und sind daher bei der metabolischen Blutdruckregulation von Bedeutung (41). Sie sind außerdem der Angriffspunkt verschiedener Vasodilatoren (Kaliumkanalöffner wie Diazoxid, Minoxidil und Pinacidil), die K_{ATP} -Kanäle aktivieren und so zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur beitragen (33;116;135;137).

Den K_{ir} wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials der Zellen und des Ruhetonus der Gefäße zugesprochen (75;136). Sie werden durch eine Hyperpolarisation aktiviert, wobei der resultierende Kaliumstrom, im Gegensatz zu den anderen oben genannten Kaliumkanälen, bei diesen Kanälen nach innen gerichtet ist (137).

1.5.1 Calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca})

Die K_{Ca} lassen sich in Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit (small conductance, SK, 5-20 pS), mittlerer Leitfähigkeit (intermediate conductance, IK, 20-80 pS) und großer Leitfähigkeit (big conductance, BK-Kanäle, 100-400 pS) einteilen (115).

Mit Ausnahme der Kardiomyozyten konnten BK-Kanäle in allen Zellen und Geweben des Körpers nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass BK-Kanäle bei vielen physiologischen Mechanismen von Bedeutung sind. Hierunter fallen die Regulation der Sekretion von exokrinen Drüsen, die Regulation der Magenmotilität und auch die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes in der Niere und im Kolon (16;25;58;64;132;148;166). Weiterhin haben sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der myogenen Kontraktilität (114;116). Die BK-Kanäle sind aus vier spannungssensitiven α -Untereinheiten und vier calciumsensitiven, regulatorischen β -Untereinheiten aufgebaut (116). Es existieren 4 Varianten der β -Untereinheiten, wobei der jeweilige Typ der Untereinheit die Sensitivität des Kanals gegenüber Ca^{2+} und dessen Öffnungskinetik bestimmt (8;128;138). In glatten Muskelzellen wird hauptsächlich die β_1 -Untereinheit exprimiert (82). Die Funktion der BK-Kanäle ist vom Membranpotential der Zelle und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Ihre Offenwahrscheinlichkeit erhöht sich durch die Depolarisation der Zelle und durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ca^{2+} -sparks). Ca^{2+} moduliert durch Bindung an die β -Untereinheit des BK-Kanals die Kanalaktivität. Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt so über den daraus resultierenden Kaliumauswärtsstrom zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran (133). Eine weitere Möglichkeit der direkten Aktivierung der BK-Kanäle in glatten Muskelzellen erfolgt über NO; hierbei erfolgt eine Nitrosylierung von Sulfhydrylgruppen der α -Untereinheit (13;88). Auch hier kommt es durch die Aktivierung der Kanäle zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, mit einem Absinken des Ca^{2+} -Einstroms über spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, und somit zur Relaxation der Gefäßmuskulatur (26;45;141).

IK-Kanäle sind vor allem im Endothel der Gefäße zu finden und spielen hier eine wichtige Rolle bei der endothelvermittelten Vasodilatation (30;37;39). Eine Aktivierung dieser Kanäle führt über eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen zur Relaxation der Gefäßmuskulatur. Bei diesem Signalweg ist auch der bereits erwähnte EDHF von Bedeutung (22).

SK-Kanäle konnten im Endothel der Gefäße und in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Sie sind ebenfalls bei der endothelabhängigen Vasodilatation von Bedeutung (30;31;39;51). Zu diesen Kanälen mit kleiner Leitfähigkeit zählt auch der Renal Outer Medullary K⁺-Channel (ROMK), der vor allem in der Niere exprimiert wird (54;154).

1.5.1.1 Einfluss der α -Untereinheit der BK-Kanäle auf die Blutdruckregulation

Die α - und β_1 -Untereinheiten der BK-Kanäle werden je nach Gewebetyp von den Zellen unterschiedlich stark exprimiert. So sind BK-Kanäle mit β_1 -Untereinheit vor allem in Zellen der glatten Muskulatur der Gefäße, des Uterus, der Harnblase sowie im Gehirn zu finden (8;18;125;171). Bei Zellen der quergestreiften Skelettmuskulatur und bei Neuronen fehlt die β_1 -Untereinheit (74;74;167). Die α -Untereinheiten sind bei allen Gewebetypen zu finden, nur nicht auf den Myozyten des Herzens, da hier keine BK-Kanäle exprimiert werden (165). Die Bedeutung der α -Untereinheit und ihrer ubiquitären Expression konnte eindrucksvoll durch BK-knockout-Mäuse (BK^{-/-}-Mäuse) gezeigt werden. BK^{-/-}-Mäuse zeigen einen komplexen Phänotyp mit cerebellärer Ataxie, Hypertonie, progressivem Hörverlust und reduzierter Kaliumsekretion im Kolon (116;126;144;146-148). Die Hypertonie ist sowohl auf vaskuläre als auch auf endokrine Regulationsstörungen zurückzuführen. Die Vasorelaxation der Gefäße über die cGMP/Proteinkinase G (PKG)-Signalkaskade, die einen wichtigen Beitrag zur Blutdruckregulation liefert, ist gestört. Normalerweise aktiviert cGMP die cGMP-abhängige PKG, die wiederum BK-Kanäle phosphoryliert und dadurch aktiviert, was zur Dilatation glatter Muskelzellen beiträgt (26;45;71;94;129). Außerdem führt der Mangel an BK-Kanälen zum Verlust der transienten auswärtsgerichteten Kaliumströme über diese Kanäle, welche im Normalfall durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration über sogenannte Ca²⁺-sparks ausgelöst werden (27). Dieser fehlende Kaliumausstrom verhindert die Hyperpolarisation und erhöht die

Aktivität der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, was den Gefäßtonus erhöht (108).

$\text{BK}^{-/-}$ -Mäuse haben erhöhte Aldosteronwerte im Vergleich zu $\text{BK}^{+/+}$ -Mäusen. Der derzeitige Wissensstand deutet drauf hin, dass es sich hierbei um einen primären bzw. sekundären Hyperaldosteronismus handelt. Als Ursache wird der Verlust des hemmenden Einflusses der BK-Kanäle in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde auf die Aldosteronsekretion angenommen. Der Beitrag der Kanäle zur Aldosteronsekretion ist jedoch umstritten (49;95). Auch Ca^{2+} -Kanäle sind zahlreich in den Zellen der Zona glomerulosa exprimiert und an der Aldosteronsekretion beteiligt (63;96;142;158). So könnte auch der Verlust des kontrollierten Ca^{2+} -Einstroms bei $\text{BK}^{-/-}$ -Mäusen für die gestörte Aldosteronsekretion und den Hyperaldosteronismus verantwortlich sein.

1.5.1.2 Einfluss der β_1 -Untereinheit der BK-Kanäle auf die Blutdruckregulation

Die β_1 -Untereinheit der BK-Kanäle vermittelt die Ca^{2+} -Sensitivität und vermittelt die Aktivierung der Kanäle bei physiologischen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen. Aus dieser gesteigerten Kanalaktivität resultiert, wie oben beschrieben, durch die Hyperpolarisation der Membran eine eingeschränkte Vasokonstriktion (17;18;73). Bestätigt wurde dieses Konzept durch $\text{BK}\beta_1^{-/-}$ Mäuse. Diese zeigen, ähnlich den $\text{BK}^{-/-}$ Mäusen, einen erhöhten Blutdruck (18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität bei diesen Mäusen eine kausale Rolle für die arterielle Hypertonie spielt und möglicherweise eine direkte Folge des erhöhten Tonus in den arteriellen Widerstandsgefäßen ist (18;83;125). Interessanterweise zeigen auch diese Mäuse Veränderungen der Aldosteronsekretion aus den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Hyperaldosteronismus bei $\text{BK}\beta_1^{-/-}$ Mäusen einen wesentlichen Beitrag zur arteriellen Hypertonie hat (95;146).

1.6 Fragestellung

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die endothelabhängige Gefäßrelaxation an der Mäuseaorta zu untersuchen und zu etablieren.

Hierzu sollte primär an CD1-Mäusen sowohl die Vasokonstriktion als auch die endothelabhängige- bzw. endothelunabhängige Vasorelaxation untersucht werden.

Sekundär sollte dann diese etablierte Methode an folgenden konkreten Fragestellungen angewendet werden:

1. Ist die ET-1-abhängige Vasokonstriktion von Aortenringen über SGK1 vermittelt? Hierfür wurden Versuche mit SGK^{+/+}- und SGK^{-/-}-Mäusen durchgeführt und die Vasokonstriktion auf kumulative Dosen von ET-1 zwischen den Genotypen verglichen.

2. In der zweiten Versuchsreihe wurde die endothelabhängige und endothelunabhängige Vasorelaxation bei BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche CD1-Mäuse mit einem Gewicht von 25 bis 30 g verwendet (Charles River GmbH, Deutschland). Die Tiere wurden in Gruppen aus maximal 4 Tieren in Makrolon-Edelstahlgitter-Käfigen (Firma Ehret, Emmendingen) gehalten. Als Nahrung stand ihnen pelletiertes Trockenfutter (Firma Altromin, Lage) und Leitungswasser zur Verfügung. Im Tierstall wurde durch eine 12-stündige Beleuchtung ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus erzeugt, die Temperatur betrug $\sim 22^{\circ}\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit lag bei $\sim 60 \text{ g/m}^3$.

Weiterhin wurden $\text{SGK}^{+/+}$ - und $\text{SGK}^{1-/-}$ Mäuse verwendet. Diese stammten aus der Zucht von Prof. Lang, Physiologisches Institut des Universitätsklinikums Tübingen (177). Für die Versuche mit den $\text{BK}^{+/+}$ - und $\text{BK}^{1-/-}$ Mäusen stellte uns Prof. Ruth, Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen, die Mäuse zu Verfügung (147).

2.2 Materialien

2.2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Produkt / Gerät	Typ	Hersteller
Faden	Dermafil Green/Polyester	SMI AG
Feinwaage	Precisa 100 A-300 M	PAG Oerlikon AG
Haken	Federharter Edelstahldraht (CRNI 8/10); Durchmesser 0,2 mm	Hugo Sachs KG
Klemme	BH 110	Aesculap
Magnetrührer	IKAMAC RCT	IKA Labortechnik
Mikroskop	M3C	Wild

pH-Elektrode	SenTixMic	WTW
pH-Meter	pH 330i	WTW
Pinzette	BD 151	Aesculap
Pinzette (spitz, gebogen)	BD 333	Aesculap
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Schere	BC 61	Aesculap
Waage	440-47	Kern und Sohn GmbH

2.2.2 Chemikalien

Die hier aufgeführten Substanzen wurden zur Herstellung der Lösungen verwendet:

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Acetylcholinchlorid	ACh	Sigma-Aldrich
Norepinephrin (Noradrenalin)	NA	Sigma-Aldrich
Calciumchloriddihydrat	CaCl ₂ *2H ₂ O	Merck
Endothelin 1	ET 1	Calbiochem
Endothelinrezeptorantagonist LU 302872	ET _{AB}	Knoll AG
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz (Titriplex)	EDTA	Merck
α-D(+)-Glucose-Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ *H ₂ O	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
L-Nitro-Arginin	LNA	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Carl Roth GmbH
Natrium-Nitroprussid Dihydrat	SNP	Sigma-Aldrich

2.2.3 Zusammensetzung der Lösungen

Krebs-Henseleit-Lösung (pro Versuch wurden 10 Liter Lösung hergestellt;
Endkonzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung in mmol/l):

1,25 mmol/l	CaCl ₂ (1,85 g)
0,03 mmol/l	EDTA (37,2 mg)
2,75 mmol/l	Glukose (5,5 g)
4,7 mmol/l	KCl (3,5 g)
1,2 mmol/l	KH ₂ PO ₄ (1,6 g)
1,2 mmol/l	MgSO ₄ (2,95 g)
118 mmol/l	NaCl (69 g)
24 mmol/l	NaHCO ₃ (20,9 g)

Die Modifikation der von uns verwendeten Krebs-Henseleit-Lösung besteht in einer Reduktion der Ca²⁺-Konzentration von 2,5 mmol/l auf 1,25 mmol/l. Dies hat folgenden Hintergrund: in vivo sind ca. 50% des Ca²⁺ Plasmaprotein gebunden, und stehen demzufolge nicht für den Ca²⁺ Einstrom zur Verfügung. Eine Ca²⁺ Konzentration von 2,5 mmol/l würde deshalb zu einer systematischen Überschätzung der entwickelten Kraft führen.

Um die Herstellung der Krebs-Henseleit-Lösung am Versuchstag zu vereinfachen, wurden mit Aqua bidest. 5 Liter einer Stammlösung hergestellt, welche wie folgt zusammengesetzt war (Endkonzentrationen in der Stammlösung in mmol/l):

25 mmol/l	CaCl ₂ (18,5 g)
94 mmol/l	KCl (35 g)
24 mmol/l	KH ₂ PO ₄ (16 g)
24 mmol/l	MgSO ₄ (29,5 g)

Am Versuchstag wurden 500 ml der Stammlösung 1:20 verdünnt, zu 10 Liter Lösung wurde dann noch

0,03 mmol/l	EDTA (37,2 mg)
2,75 mmol/l	Glukose (5,5 g)
118 mmol/l	NaCl (69 g)
24 mmol/l	NaHCO ₃ (20,9 g)

zugegeben.

2.2.4 Zusammensetzung der Lösungen für die Kontraktions-/Relaxationsversuche

Aus den verschiedenen Substanzen für die Organbadversuche wurden Stammlösungen hergestellt. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden dann weitere Verdünnungsreihen (1:10) mit Aqua bidest. bis zu einer Konzentration von 10^{-5} mol/l für Norepinephrin und Acetylcholin bzw. 10^{-6} mol/l für Na⁺-Nitroprussid gemacht. Die verwendeten Pipettierschemata und Endkonzentrationen im Organbad sind unter Punkt 2.4.5 zu finden.

2.2.5 Herstellung der Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt.

Acetylcholin (Molekulargewicht: 181,67 g):

Für 10^{-2} mol/l Stammlösung: 0,0181 g in 10 ml Aqua bidest.

Norepinephrin (Molekulargewicht: 205,64 g):

Für 10^{-2} mol/l Stammlösung: 0,042 g in 5 ml Aqua bidest.

Für 5×10^{-3} mol/l Stammlösung: 0,021 g in 5 ml Aqua bidest.

Als Oxidationsschutz für Norepinephrin wurden sofort nach der Herstellung der Stammlösung 30 μ l einer 2×10^{-2} mol/l EDTA-Lösung hinzugegeben.

EDTA (Molekulargewicht: 372,24 g):

Für 2×10^{-2} mol/l Stammlösung: 37,2 g in 5 ml Aqua bidest.

Endothelin-1 (Molekulargewicht: 2492,0 g):

Für 10^{-4} mol/l Stammlösung: 0,1 mg ET-1, nach Zugabe von 1,3 μ l Ethansäure, in 400 μ l Aqua bidest. lösen.

Endothelinrezeptorantagonist LU 302872 (Molekulargewicht: 528,61 g):

Für 10^{-2} mol/l Stammlösung (5,8861 mg/ml) wurde der Endothelinantagonist zuerst in 100 μ l 0,2 mol/l NaOH gelöst und dann mit 900 μ l Aqua bidest.aufgefüllt.

L-Nitro-Arginin (Molekulargewicht: 269,7 g):

Für 10^{-2} mol/l Stammlösung: 0,0135 g in 5 ml Aqua bidest.

Na^+ -Nitroprussid (Molekulargewicht: 298 g):

Für 10^{-2} mol/l Stammlösung: 0,0298 g in 10 ml Aqua bidest.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Aufbau des Organbads

Die Versuche an den Aortenringen wurden im sogenannten Organbad nach Schuler (Hugo Sachs Elektronik KG, March/Freiburg) durchgeführt, welches nach Klaus Stieler modifiziert war (siehe Abbildung 3).

Das Organbad besteht aus einem Plexiglas-Gestell mit 4 temperierten 20 ml-Organbehältern, umgeben von einem Wassermantel. Für jedes der 4 Organgefäße existiert ein extra Wärmeaustauscher. Oberhalb der Gefäße befindet sich jeweils eine Messvorrichtung, die auf und ab bewegt werden kann. Die Messvorrichtung trägt die Aufhängung für die Gefäßringe und den isometrischen Kraftaufnehmer. An der Messvorrichtung ist ein ca. 18 cm langes Rohr befestigt, das in heruntergelassenem Zustand in die Organbadkammer ragt. Am unteren Ende des Rohrs ist die Fritte befestigt. Die Fritte ist der Auslass für Carbogengas (Linde AG) in die Organbadkammer. Die Flussgeschwindigkeit des Carbogens durch die Fritte kann für jedes Organbad separat geregelt werden.

Die Modifikation nach Klaus Stieler bei diesem Organbad besteht in einer Teflontrennwand welche an das Rohr angebracht ist. Diese Teflontrennwand bietet 2 Vorteile: zum einen kommt es zu einer Abnahme von störenden Einflüssen auf die Fäden bzw. Ringe durch aus der Fritte austretende Carbogengasblasen und zweitens kommt es durch die Form der Teflontrennwand und den Weg der aufsteigenden Carbogengasblasen zu einem gerichteten Flüssigstrom in der Organbadkammer (siehe Abbildung 3).

Ein Zirkulationsthermostat sorgt über einen parallelen Kreislauf für eine stabile Temperatur ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) in den Organbadkammern. Die Organbadkammern können über eine elektrische Pumpe mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt werden. Der pH-Wert wurde regelmäßig kontrolliert und betrug bei Begasung mit Carbogen 7,4.

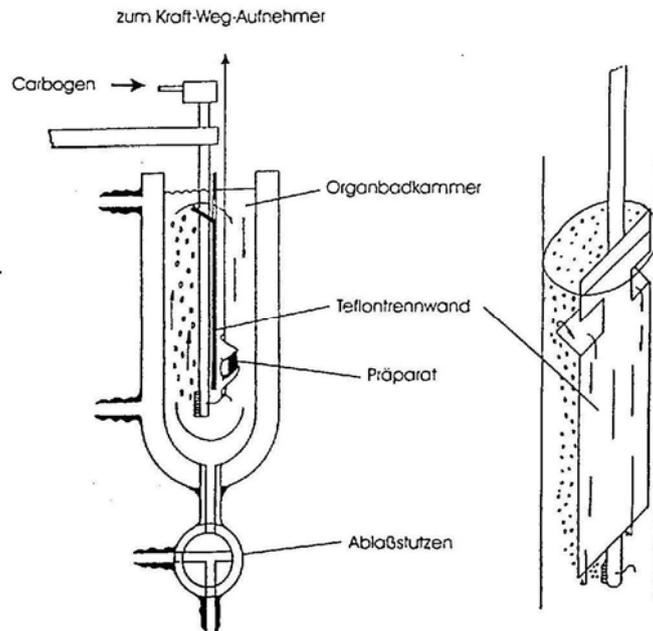


Abbildung 3: Schuler Organbad, modifiziert nach Klaus Stieler.

2.3.2 Kalibrierung des Messgerätes

Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit einem Gewicht von 1,0 g, das an die Kraftaufnehmer angehängt wurde. Über den 2-Kanal-Brückenverstärker (Hugo-Sachs-Elektronik) wird der Kraftausschlag, den die Software auf dem Computer anzeigt, auf 1,0 cN eingestellt. Aufgezeichnet wird die Kraftentwicklung der Ringe mit dem Computerprogramm BDAS (Basic Data Acquisition Software, Hugo Sachs Elektronik).

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Gefäßpräparation

Die Mäuse wurden, nach initialer CO₂ Narkose, durch Dekapitation getötet. Anschließend wurde die Maus auf ein 30 x 20 cm großes Korkbrett auf dem Rücken liegend mit 4 durch die Extremitäten gesteckten Nadeln fixiert. Das Abdomen und der Thorax wurden durch einen Medianschnitt eröffnet. Um Zugang zu der im hinteren Mediastinum verlaufenden Aorta thoracalis zu bekommen, wurden das Zwerchfell und die Lunge schonend entfernt. Das anschließende Freipräparieren der Aorta erfolgte unter Zuhilfenahme eines binokularen Mikroskops mit 16-facher Vergrößerung. Distal des Zwerchfells wurde die Aorta mit einer Klemme abgeklemmt und mit Hilfe einer Schere vorsichtig, und ohne Ausübung von Zug, nach kranial freipräpariert. Zum Schutz der Aorta wurde das umliegende Binde- und Fettgewebe großzügig mitentfernt. Das Gefäß wurde anschließend in eine Petrischale mit auf 37°C vorgewärmter, und Carbogen begaster, Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Unter 16-facher Vergrößerung wurde sehr schonend das umliegende Binde- und Fettgewebe entfernt. Anschließend wurde die Aorta, je nach Länge, in 3 oder 4 gleich große Gefäßringe geschnitten. Mit großer Vorsicht, und ohne das Endothel des Gefäßringes zu verletzen, wurden 2 triangelförmige Haken (hergestellt in der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie der Universität Tübingen, siehe Abbildung 4) gegenläufig durch den Ring gelegt. Die Haken sind so konstruiert, dass sie sich am offenen Ende verschließen lassen. Dies sichert den Ring gegen ein versehentliches Herausrutschen. An einen der Haken ist ein Faden angebracht, über den dieser mit dem Kraftaufnehmer verbunden ist. Anschließend werden die Ringe in das Organbad eingehängt, und mit 2,5 cN vorgespannt, was sich bei anderen Untersuchern (162) und eigenen Voruntersuchungen als optimal erwiesen hat. Bei Nichtgebrauch zwischen den Versuchstagen wurden die Haken in Aqua bidest gelagert um Längenveränderungen des Fadens im Versuch, und somit falsche Ergebnisse, zu vermeiden.

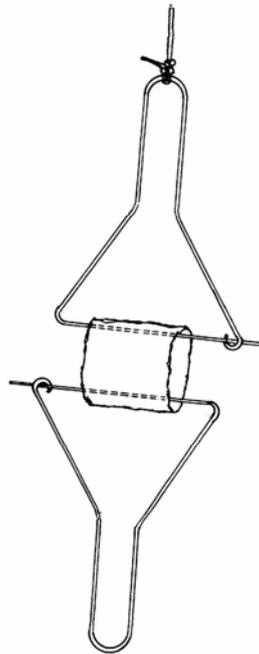


Abbildung 4: Haken mit Aortenring

2.4.2 Äquilibration

Während der anschließenden einstündigen Äquilibrationsphase wird die Lösung in den Gefäßen alle 20 min ausgetauscht und nach jeder Spülung die Vorspannung der Ringe wieder auf 2,5 cN justiert. Nach einer Stunde bleibt die Spannung der Ringe konstant, und die Versuche konnten gestartet werden.

2.4.3 Funktionstest

Um die Funktionsfähigkeit des Endothels zu überprüfen wurden die Ringe durch hinzupipettieren von Norepinephrin (10^{-3} mol/l) in die Organbäder kontrahiert. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktion, ersichtlich am Plateau der Kraftentwicklung, wurde die Endothelfunktion durch Zugabe von Acetylcholin (10^{-3} mol/l) geprüft, wobei als Kriterium der Endothel-Intaktheit die Ringe eine

Relaxation zeigen mussten. Ringe, welche dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

2.4.4 Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven

Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit den Vasokonstriktoren Norepinephrin oder Endothelin durchgeführt. Die Relaxation wurde entweder *endothelabhängig* mit Acetylcholin oder *endothelunabhängig* mit Na⁺-Nitroprussid untersucht.

Hierfür wurden die jeweiligen Lösungen kumulativ hinzugegeben. Es wurde versucht, die nächsthöhere Konzentration nach Erreichen des Plateaus hinzu zu pipettieren (siehe Abbildung 5).

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurden die Organbäder mehrmals gespült, um sowohl Vasokonstriktoren als auch Relaxantien auszuwaschen.

Aufgrund der hohen Affinität von Endothelin zu seinen Rezeptoren ist es nicht möglich, mit den Ringen weitere Versuche durchzuführen. In diesen Fällen war es pro Ring nur einmal möglich, eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erstellen.

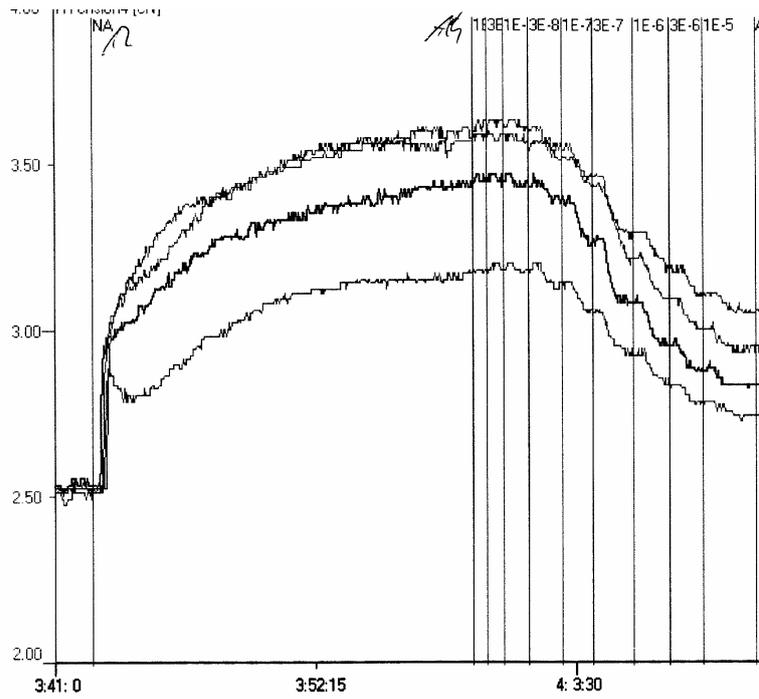


Abbildung 5: Originalaufzeichnung einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit Acetylcholin nach Kontraktion der Ringe mit Norepinephrin.

2.4.5 Pipettierschema für die Dosis-Wirkungs-Kurven

Schema für Norepinephrin und Na⁺-Nitroprussid:

<u>Konzentration im Organbad</u>	<u>Menge und Konz. der pipettierten Lösg.</u>
100 pmol/l	2 µl 10 ⁻⁶ mol/l Stammlösung
300 pmol/l	4 µl 10 ⁻⁶ mol/l Stammlösung
1 nmol/l	14 µl 10 ⁻⁶ mol/l Stammlösung
3 nmol/l	4 µl 10 ⁻⁵ mol/l Stammlösung
10 nmol/l	14 µl 10 ⁻⁵ mol/l Stammlösung
30 nmol/l	4 µl 10 ⁻⁴ mol/l Stammlösung
100 nmol/l	14 µl 10 ⁻⁴ mol/l Stammlösung
300 nmol/l	4 µl 10 ⁻³ mol/l Stammlösung
1 µmol/l	14 µl 10 ⁻³ mol/l Stammlösung
3 µmol/l	4 µl 10 ⁻² mol/l Stammlösung
10 µmol/l	14 µl 10 ⁻² mol/l Stammlösung

Schema für Acetylcholin:

<u>Konzentration im Organbad</u>	<u>Menge und Konz. der pipettierten Lösg.</u>
1 nmol/l	2 µl 10 ⁻⁵ mol/l Stammlösung
3 nmol/l	4 µl 10 ⁻⁵ mol/l Stammlösung
10 nmol/l	14 µl 10 ⁻⁵ mol/l Stammlösung
30 nmol/l	4 µl 10 ⁻⁴ mol/l Stammlösung
100 nmol/l	14 µl 10 ⁻⁴ mol/l Stammlösung
300 nmol/l	4 µl 10 ⁻³ mol/l Stammlösung
1 µmol/l	14 µl 10 ⁻³ mol/l Stammlösung
3 µmol/l	4 µl 10 ⁻² mol/l Stammlösung
10 µmol/l	14 µl 10 ⁻² mol/l Stammlösung

Schema für Endothelin 1:

<u>Konzentration im Organbad</u>	<u>Menge und Konz. Der pipettierten Lösg.</u>
100 pmol/l	2 μl 10^{-6} mol/l Stammlösung
300 pmol/l	4 μl 10^{-6} mol/l Stammlösung
1 nmol/l	14 μl 10^{-6} mol/l Stammlösung
3 nmol/l	4 μl 10^{-5} mol/l Stammlösung
10 nmol/l	14 μl 10^{-5} mol/l Stammlösung
30 nmol/l	4 μl 10^{-4} mol/l Stammlösung
100 nmol/l	14 μl 10^{-4} mol/l Stammlösung

2.4.6 Statistische Auswertung

Mit dem Software-Programm HSE-BDAS W für Microsoft Windows (Basic data acquisition software, Version 1.3, September 2002, Hugo Sachs Elektronik) erfolgte die Aufzeichnung der Original-Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die Erfassung sämtlicher Daten zu diesen Kurven. Mit dem Software-Programm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation) wurden Mittelwerte und Standardfehler aus den mit HSE-BDAS W gesammelten Daten berechnet. Die Grafiken in dieser Arbeit wurden mit dem Software-Programm Origin erstellt (Version 7 G, OriginLab Corporation). Die Textbearbeitung erfolgte mit Microsoft Word 2000 (Microsoft Corporation).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Vasomotorik bei CD1-Mäusen

3.1.1 Kontraktionsversuche mit Norepinephrin

Nach Erreichen einer stabilen Spannung von 2,5 cN wurden kumulative Konzentrationen von Norepinephrin in das Organbad pipettiert. Die Minimalkonzentration im Organbad war 100 pmol/l, die Maximalkonzentration 10 µmol/l, wobei die maximale Kontraktion der Gefäßringe in der Regel bei 1 µmol/l erreicht war. Die beobachtete maximale Kraftentwicklung der Gefäßringe war $3,37 \pm 0,09$ cN, was einer Kraftentwicklung von 0,73 cN ausgehend von den 2.5 cN Ausgangskraft entspricht (siehe Abbildung 6).

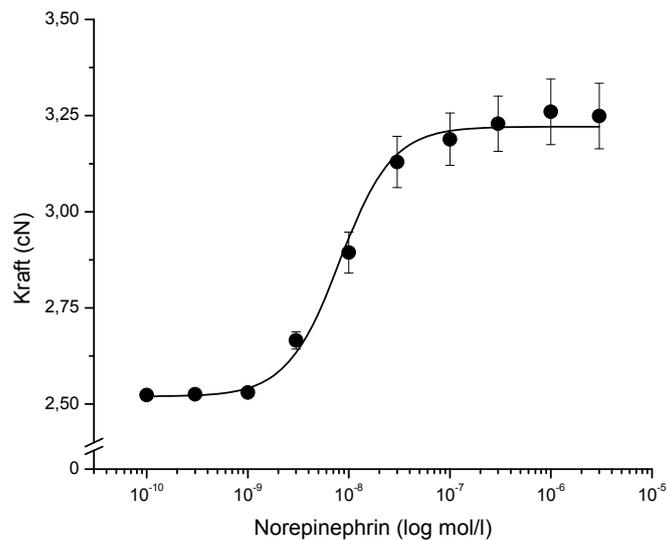


Abbildung 6: Durch Norepinephrin ausgelöste Kontraktion der Aortenringe von CD1-Mäusen. Die Grafik repräsentiert Mittelwerte \pm Standardfehler (n=31 Ringe von n=10 Mäusen).

3.1.2 NO-Synthese-Hemmung durch L-Nitro-Arginin

In dieser Versuchsreihe wurde nach Erreichen der maximalen Kontraktion der Aortenringe auf Norepinephrin L-Nitro-Arginin in das Organbad zugegeben.

L-Nitro-Arginin, ein Hemmstoff der NO-Synthase, blockiert die NO-Produktion des Endothels. Bei intaktem Endothel wird auch in Gegenwart von Norepinephrin kontinuierlich NO gebildet. Es sollte demnach eine zusätzliche Kontraktion der Aortenringe zu beobachten sein. Nach Erreichen der maximalen Kraftentwicklung der Aortenringe auf $4 \mu\text{l}$ der $5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ Norepinephrin-Lösung ($1 \mu\text{mol/l}$ im Organbad) wurde, durch Zugabe von $200 \mu\text{l}$ einer 10^{-2} mol/l L-Nitro-Arginin-Lösung (entspricht einer Konzentration von $150 \mu\text{mol/l}$ im Organbad), eine Zunahme der Kraft von $3,64 \pm 0,07 \text{ cN}$ auf $3,91 \pm 0,10 \text{ cN}$ beobachtet (siehe Abbildung 7).

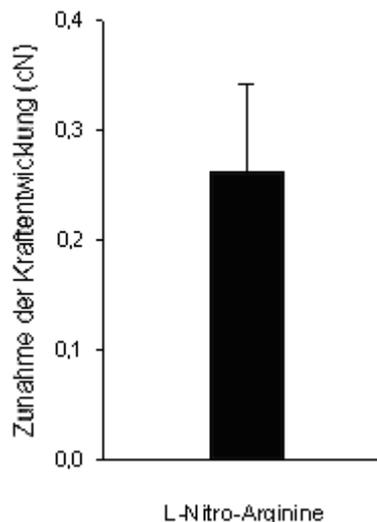


Abbildung 7: Zunahme der Kraftentwicklung bei Aortenringen von CD1-Mäusen durch eNOS-Hemmung mit L-Nitro-Arginin nach Kontraktion der Aortenringe durch Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert Mittelwerte \pm Standardfehler (n=18 Ringe von n=5 Mäusen).

3.1.3 Endothelunabhängige Gefäßrelaxation durch Natrium-Nitroprussid

Bei den Aortenringen wurde mit 4 μl der 5×10^{-3} molaren Norepinephrin-Lösung (entspricht $1 \mu\text{mol/l}$ im Organbad) eine Kontraktion ausgelöst. Nach Erreichen der maximal möglichen Kraftentwicklung wurde dann der NO-Donator Natrium-Nitroprussid in kumulativen Konzentrationen in das Organbad pipettiert und so eine endothelunabhängige Relaxation ausgelöst (siehe Abbildungen 8 und 9). Die Konzentrationen von Natrium-Nitroprussid betragen hierfür im Organbad zwischen 100 pmol/l und maximal 1 $\mu\text{mol/l}$. Die Aortenringe relaxierten von $3,91 \pm 0,10$ cN auf $2,42 \pm 0,03$ cN.

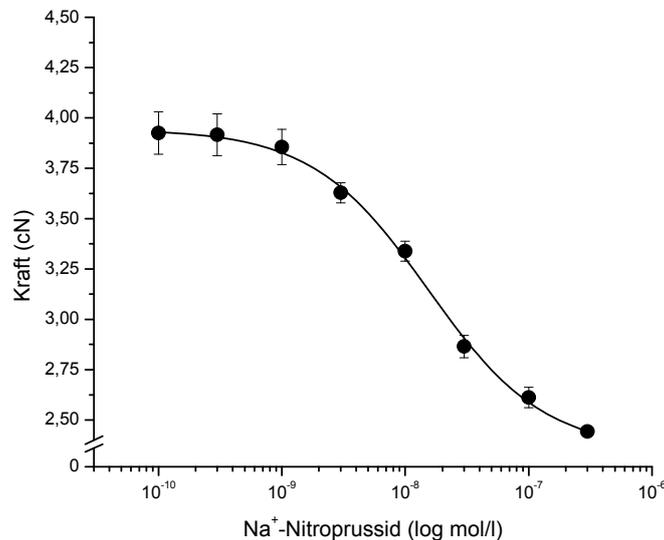


Abbildung 8: Durch Natrium-Nitroprussid ausgelöste Relaxation bei Aortenringen von CD1-Mäusen, nach Kontraktion mit Norepinephrin und Hemmung der NO Bildung mit L-Nitro-Arginin. Die Grafik repräsentiert Mittelwerte \pm Standardfehler (n=18 Ringe von n=5 Mäusen).

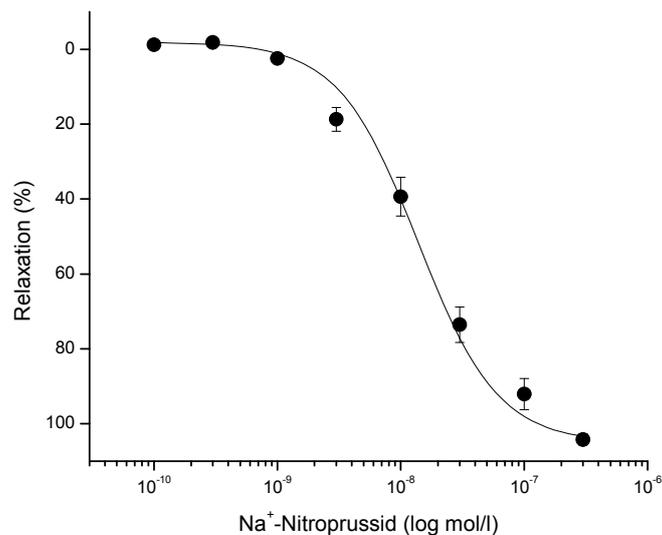


Abbildung 9: Durch Natrium-Nitroprussid ausgelöste Relaxation von Aortenringen bei CD1 Mäusen nach Kontraktion mit Norepinephrin und Hemmung der NO Bildung mit L-Nitro-Arginin. Die Grafik repräsentiert Mittelwerte \pm Standardfehler (n=18 Ringe von n=5 Mäusen).

3.1.4 Endothelabhängige Gefäßrelaxation durch Acetylcholin

Bei den Aortenringen wurde mit 4 μ l der 5×10^{-3} molaren Norepinephrin-Lösung (entspricht $1 \mu\text{mol/l}$ im Organbad) eine Kontraktion ausgelöst. Nach Erreichen der maximal möglichen Kraftentwicklung wurde dann Acetylcholin in kumulativen Konzentrationen in das Organbad pipettiert und so eine endothelabhängige Gefäßrelaxation ausgelöst. Die Konzentration von Acetylcholin betrug dabei im Bad zwischen 1 nmol/l und maximal 10 $\mu\text{mol/l}$. Der Mittelwert der maximalen Kraftentwicklung durch Norepinephrin lag in dieser Versuchsreihe bei $3,34 \pm 0,08$ cN. Durch die Zugabe von Acetylcholin konnte eine Abnahme der Kraftentwicklung von 3,34 cN auf $2,81 \pm 0,04$ cN erreicht werden, was einer prozentualen Kraftabnahme bzw. Relaxation von $57,24 \pm 5,92$ % entspricht (siehe Abbildungen 10 und 11).

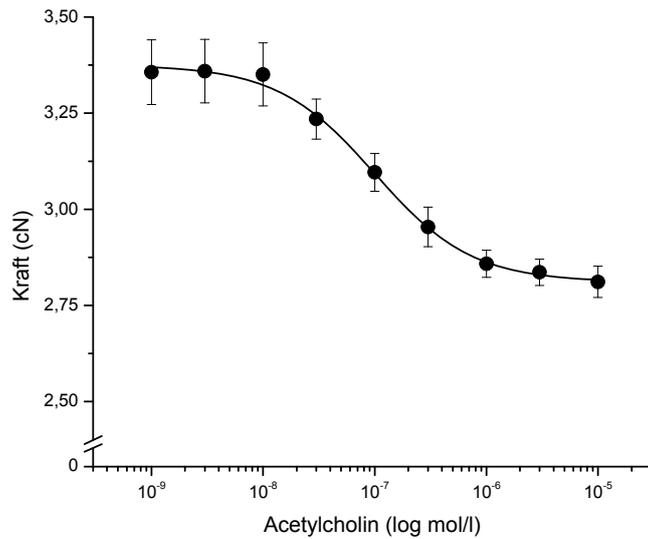


Abbildung 10: Durch ACh ausgelöste, endothelabhängige Relaxation bei Aortenringen von CD1 Mäusen nach Kontraktion mit Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert Mittelwerte \pm Standardfehler (n=16 Ringe von n=7 Mäusen).

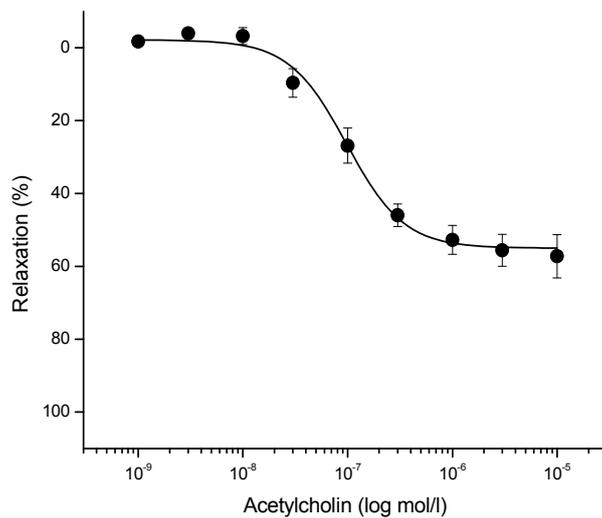


Abbildung 11: Endothelabhängige Relaxation der Aortenringe von CD1-Mäusen auf ACh nach Kontraktion mit Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=16 Ringe von n=7 Mäusen).

3.2 Untersuchungen zur ET-1 vermittelten Vasokonstriktion

3.2.1 ET-1 vermittelte Vasokonstriktion bei CD1-Mäusen

Zu Beginn der Versuche wurden die Gefäßringe der Mäuse im Organbad auf 2,5 cN vorgespannt, und dann kumulative Konzentrationen an ET-1 in das Organbad pipettiert. Im Organbad konnten so ET-1-Konzentrationen zwischen 100 pmol/l und 100 µmol/l erzielt werden.

Durch das Hinzupipettieren von ET-1 kam es ab einer Konzentration von 3 nmol/l im Organbad zu einer deutlichen Vasokonstriktion. Die maximale Kraftentwicklung wurde in den Versuchen bei einer Konzentration von 100 nmol/l erreicht und betrug $2,92 \pm 0,15$ cN (siehe Abbildung 12).

In weiteren Versuchen wurde der Effekt von LU 302872, einem unspezifischen ET_{AB}-Rezeptorantagonisten, auf die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion untersucht. Hierzu wurden die Gefäßringe vor dem Hinzupipettieren von ET-1 eine halbe Stunde mit dem LU 302872 inkubiert, und anschließend ET-1 in kumulativen Konzentrationen in das Organbad gegeben. Die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion wie sie bei den vorherigen Versuchen gezeigt wurde, blieb vollkommen aus (siehe Abbildung 12).

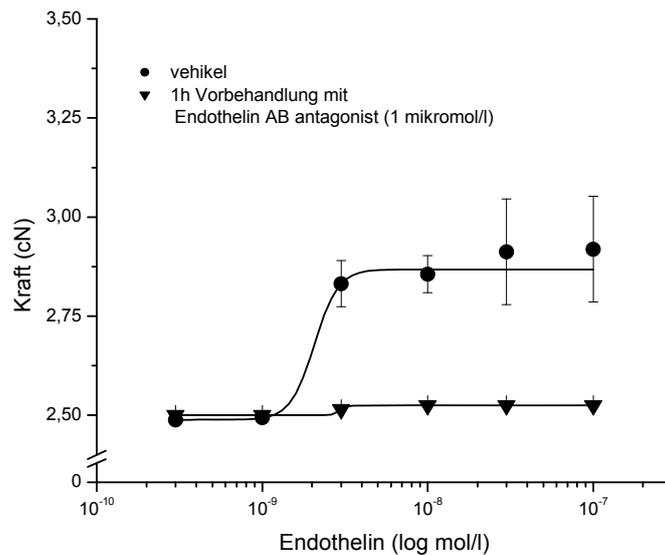


Abbildung 12: Durch ET-1 verursachte Zunahme der Kraftentwicklung bei Aortenringen von CD1-Mäusen. Im Vergleich dazu Ringe, die 1 Stunde mit dem ET_{AB}-Antagonist (LU 302872) inkubiert wurden. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte ± Standardfehler (je n=13 Ringe von n=5 Mäusen)

3.2.2 Rolle der SGK1 bei der Regulation des Vasotonus

Bei diesen Versuchen wurden Gefäßringe von SGK1^{+/+}-Mäusen mit Gefäßringen von SGK1^{-/-}-Mäusen bezüglich der durch ET-1 verursachten Zunahme der Kraftentwicklung verglichen. Die Gefäßringe wurden vor Beginn des Versuchs gleichermaßen behandelt und auf 2,5 cN vorgespannt. Dann wurden wieder aufsteigende Konzentrationen an ET-1 in die Organbäder pipettiert, wobei im Organbad Konzentrationen zwischen 100 pmol/l und 100 nmol/l erzielt wurden. Bei beiden Gefäßtypen konnte, wie auch bei den Vorversuchen, ab einer ET-1-Konzentration von 3 nmol/l eine Zunahme der Kraftentwicklung beobachtet werden, die bei den SGK1^{+/+}-Mäusen zunächst stärker ausfällt als bei den SGK1^{-/-}-Mäusen. Die maximale Kontraktion der

Gefäßringe bei einer ET-1-Konzentration von 100 nmol/l betrug jedoch, ausgehend von den zuvor eingestellten 2,5 cN, für die SGK1^{+/+}-Gefäßringe 2,82±0,05 cN und für die SGK1^{-/-}-Gefäßringe 2,78±0,03 cN (siehe Abbildung 13).

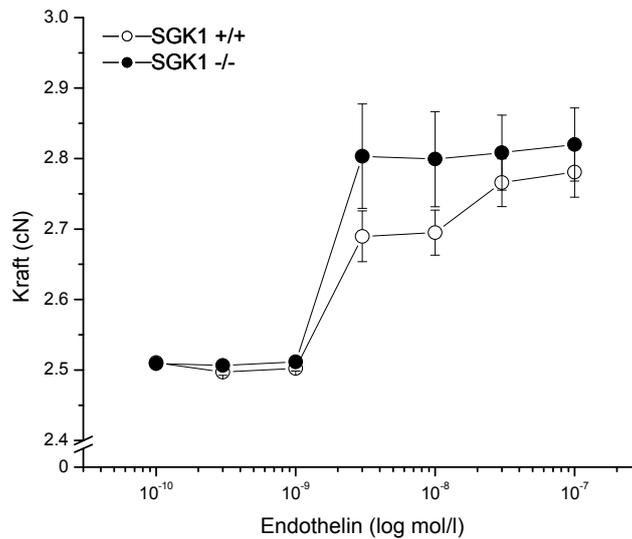


Abbildung 13: Vergleich der durch ET-1 ausgelösten Zunahme der Kraftentwicklung bei SGK1^{+/+} und SGK1^{-/-}-Mäusen. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte ± Standardfehler (n=11 Ringe von n=4 SGK1^{-/-}-Mäusen, n=12 Ringe von n=4 SGK^{+/+}-Mäusen).

3.3 Einfluss der BK-Kanäle auf den arteriellen Vasotonus

Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle sind, wie bereits beschrieben, bei der Regulation des Gefäßtonus von Bedeutung. Ihre Aktivierung resultiert in einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks.

In dieser Versuchsreihe wurden genetisch veränderte Mäuse verwendet, welche defizient für den Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal, auch BK-Kanal genannt, waren. Diese $\text{BK}^{-/-}$ -Mäuse wurden mit Wildtyp, oder $\text{BK}^{+/+}$ -Mäusen, die nicht defizient für diesen Kanal waren, bezüglich ihres arteriellen Vasotonus bzw bezüglich ihrer Gefäßreaktionen auf Natrium-Nitroprussid und Acetylcholin untersucht und miteinander verglichen.

3.3.1 Endothelunabhängige Gefäßrelaxation durch Natrium-Nitroprussid bei $\text{BK}^{+/+}$ - und $\text{BK}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich

Die Gefäßringe wurden vor Beginn des Versuchs mit 2,5 cN vorgespannt. Dann erfolgte eine Vorkontraktion mit 4 μl einer 5×10^{-3} molaren Norepinephrin-Lösung (entspricht $1 \mu\text{mol/l}$ im Organbad), wobei die maximale Kraftentwicklung der $\text{BK}^{+/+}$ -Mäuse $3,18 \pm 0,10$ cN, und die der $\text{BK}^{-/-}$ -Mäuse $3,06 \pm 0,09$ cN betrug. Mit kumulativen Konzentrationen an Natrium-Nitroprussid konnte, sowohl bei den $\text{BK}^{+/+}$ -Mäusen als auch bei den $\text{BK}^{-/-}$ -Mäusen, bei einer Konzentration von 30 nmol/l im Organbad eine Gefäßrelaxation von 100 %, auf den Ausgangswert von 2,5 cN erreicht werden (siehe Abbildungen 14 und 15).

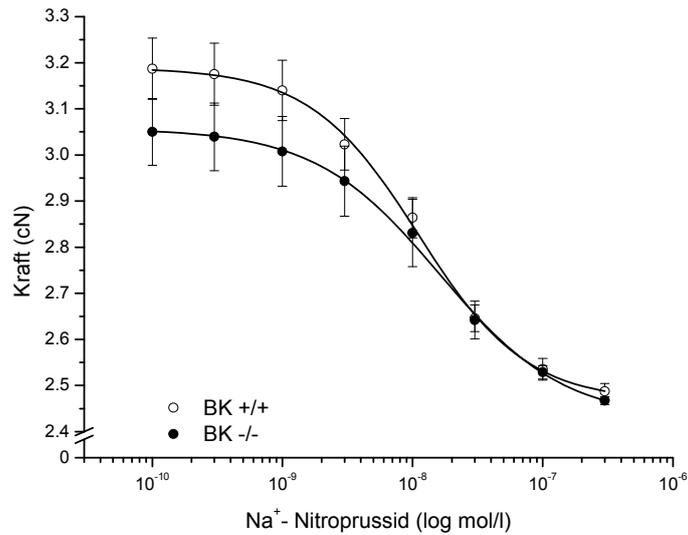


Abbildung 14: Durch Natrium-Nitroprussid ausgelöste Relaxation nach Kontraktion mit Norepinephrin bei Aortenringen von BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte ± Standardfehler (n=23 Ringe von n=8 BK^{+/+}-Mäusen, n=21 Ringe von n=7 BK^{-/-}-Mäusen).

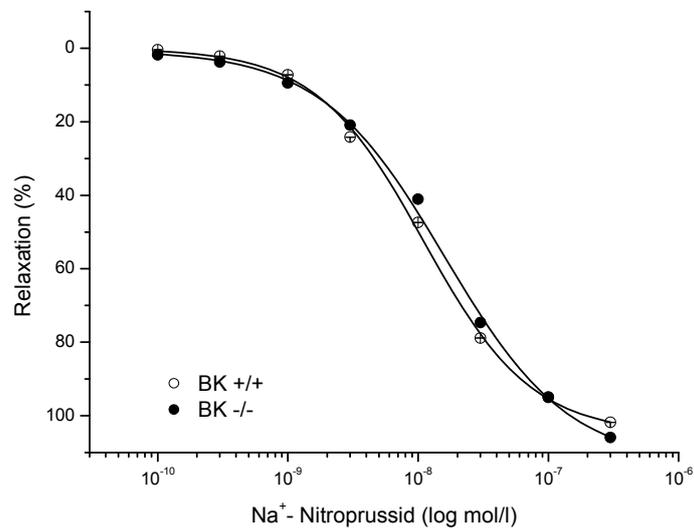


Abbildung 15: Durch Natrium-Nitroprussid ausgelöste Relaxation bei Aortenringen von BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen nach Kontraktion mit Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte ± Standardfehler (n=23 Ringe von n=8 BK^{+/+}-Mäusen, n=21 Ringe von n=7 BK^{-/-}-Mäusen).

3.3.2 Endothelabhängige Gefäßrelaxation bei BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen durch Acetylcholin

Nachdem die Gefäßringe wieder mit 2,5 cN vorgespannt wurden, und die Vorkontraktion mit 4 µl einer 5x10⁻³ molaren Norepinephrin-Lösung (entspricht 1µmol/l im Organbad) erfolgt war, wurden kumulative Konzentrationen von Acetylcholin in die Organbäder pipettiert um eine endothelabhängige Gefäßrelaxation auszulösen. Die maximale Vorkontraktion der Aortenringe lag für die BK^{+/+}-Mäuse bei 3,03±0,90 cN, für die BK^{-/-}-Mäuse bei 2,91±0,08 cN.

Bei den BK^{+/+}-Mäusen wurde bei einer Acetylcholin-Konzentration von 1µmol/l im Organbad die maximal mögliche Relaxation der Gefäßringe erreicht. Die Kraftentwicklung reduzierte sich hier auf 2,77±0,07 cN, was einer prozentualen Relaxation von 51,78 ±6,30 % entspricht.

Bei den BK^{-/-}-Mäusen wurde die maximal mögliche Reduktion der Kraftentwicklung bei einer Acetylcholin-Konzentration im Organbad von 300nmol/l erreicht. Die Kraft reduzierte sich von 2,91±0,08 cN auf 2,79 ±0,07 cN, was einer prozentualen Gefäßrelaxation von 39,97±7,13 % entspricht (siehe Abbildungen 16 und 17).

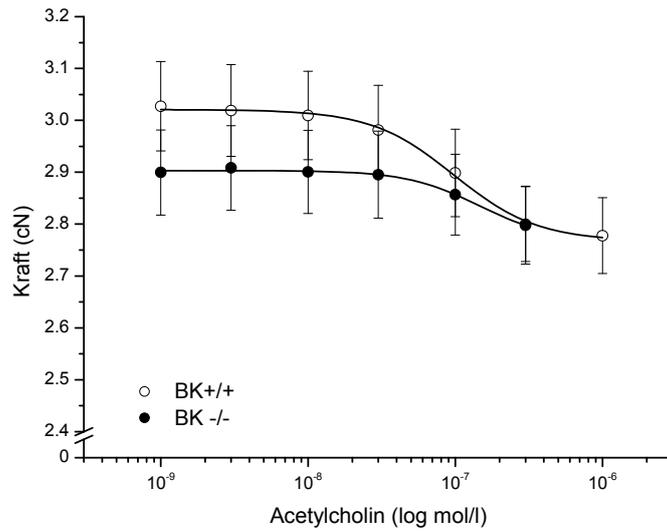


Abbildung 16: Durch ACh ausgelöste Reduktion der Kraftentwicklung bei BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen, nach Kontraktion mit Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=26 Ringe von n=9 BK^{+/+}-Mäusen, n=20 Ringe von n=7 BK^{-/-}-Mäusen).

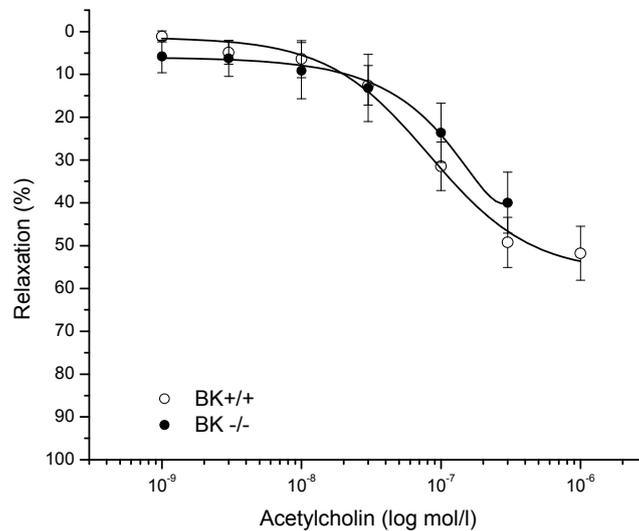


Abbildung 17: Durch ACh ausgelöste Relaxation bei Aortenringen von BK^{+/+}- und BK^{-/-}-Mäusen nach Kontraktion mit Norepinephrin. Die Grafik repräsentiert die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=26 Ringe von n=9 BK^{+/+}-Mäusen, n=20 Ringe von n=7 BK^{-/-}-Mäusen).

4 Diskussion

Mit dem in dieser Studie verwendeten Schuler-Organbad können in vitro verschiedene Einflüsse auf die Vasomotorik untersucht werden. Es ist so möglich nach Ursachen der arteriellen Hypertonie zu forschen um neue Therapieansätze zu finden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, wie Aortenringe von Mäusen auf den Vasokonstriktor Norepinephrin und die Vasorelaxantien Acetylcholin und Natrium-Nitroprussid reagieren. Hierfür mussten Teile des Organbads den anatomischen Bedingungen der Maus angepasst werden. Das Hauptproblem hierbei waren die Haken, wobei sich als optimal (stabil genug um keine Deformierung durch Vorspannung oder Kraftänderung zuzulassen, aber dennoch dünn genug um Endothelläsionen so gering als möglich zu halten) federhart gewickelter Edelstahldraht mit einem Durchmesser von 0,2 mm erwiesen hat. Im nächsten Schritt musste dann eine optimale Vorspannung für die Aortenringe der Mäuse ausgetestet werden. In vivo sind Blutgefäße durch das strömende Blut ständig einer gewissen Wanddehnung ausgesetzt, was im Versuch durch die Vorspannung der Ringe imitiert werden soll. In dieser Arbeit wurde die Vorspannung der Aortenringe zu Beginn eines jeden Versuches auf eine Kraft von 2,5 cN eingestellt, was 2,5 g entspricht. Die von uns gewählten Versuchsbedingungen sind mit bereits in der Literatur publizierten Werten vergleichbar (93;134;153). Quaschnig et al. und Schuh et al. verwendeten 2 g als Vorspannung bei ihren Versuchen, unter der Annahme, daß diese Spannung ungefähr dem mittleren arteriellen Blutdruck der Maus entspricht (134;153). Ebenso versuchten Liu et al. sich mit einer Vorspannung von 2,5-3 g einem Blutdruck von 100 mmHg anzunähern (93). In anderen Arbeiten wurden die Kontraktions- und Relaxationsversuche aber auch mit wesentlich kleineren Vorspannungen durchgeführt (129;143;163). Um einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde zu Beginn eines jeden Versuches, nach Vorkontraktion mit Norepinephrin, ein Relaxationsversuch mit ACh durchgeführt um die Funktionsfähigkeit des Endothels zu überprüfen.

Ringe, die nicht relaxierten, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen, was die Streuung der Messergebnisse reduzierte.

4.1 Versuche zur endothelabhängigen und endothelunabhängigen Gefäßrelaxation

In den durchgeführten Versuchen wurde zunächst, nach Vorkontraktion der Ringe mit Norepinephrin, das Relaxationsvermögen der Gefäßringe auf ACh getestet. Hierbei handelt es sich um einen vom Endothel abhängigen Prozess, mit welchem die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit überprüft werden kann. ACh bindet an den M₃-Rezeptor, der auf Endothelzellen exprimiert wird, und löst so über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration eine Aktivierung der eNOS aus, was die NO-Synthese aktiviert. In diesen Versuchen zeigt sich eine Relaxation der Gefäßringe auf ACh mit durchschnittlich 57±6 %. In anderen Arbeiten wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen ähnliche Ergebnisse erzielt. So wurde in der Arbeit von Liu et al. eine Relaxation auf ACh von 61,3±5,6 % erzielt, in der Arbeit von Vandeputte et al. 63±9 % und in der Arbeit von Pfeifer et al. 60±5 % (93;129;168). In anderen Arbeiten zeigten die Gefäßringe eine stärkere Relaxation auf ACh. So relaxierten die Aortenringe bei Quaschnig et al. und Schuh et al. mit 87±4 % und 79±8 % deutlich besser als in den hier durchgeführten Versuchen (134;153). Mögliche Ursachen für diese Abweichungen in den Ergebnissen kann ein unterschiedlich stark funktionstüchtiges Endothel sein, welches durch die Präparation der Gefäßringe beschädigt wurde. Hierfür kann z.B. zu starker Zug auf das Gefäß während dem Herauspräparieren aus der Maus, oder bei der Entfernung des Fett- und Bindegewebes verantwortlich sein. Weiterhin kann das Einführen der Haken bzw. der Durchmesser des Drahts die vulnerable Endothelzellschicht beschädigen. Der dadurch verursachte Verlust an Endothel führt zur Verringerung der NO-Produktion und somit zu einer Abschwächung der Relaxation auf ACh.

In einer anderen Versuchsreihe wurde die Gefäßrelaxation durch Natrium-Nitroprussid ausgelöst. Natrium-Nitroprussid ist ein NO-Donator, daher ist die Relaxation hier unabhängig von der Funktionstüchtigkeit des Endothels und gibt allein die Fähigkeit der glatten Muskulatur zur Relaxation wieder bzw. zeigt, inwieweit der durch NO ausgelöste Signalweg, der zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur beiträgt, intakt ist. Bei diesen Versuchen relaxierten die Aortenringe ~100%, was einer Relaxation auf die Ausgangsspannung entspricht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Arbeiten gefunden (93;134;153). Der Befund, dass Aortenringe auf Natrium-Nitroprussid zu 100 %, auf ACh jedoch nur auf ~60 % relaxieren untermauert zusätzlich die oben genannte Hypothese: es muss zu einer traumatischen Schädigung des Endothels gekommen sein welche eine 100 %ige Relaxation auf ACh, wie sie z.B. bei Ratten beobachtet wird (77;181), verhindert. Weiterhin deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die gewählte Vorspannung für die Mäuseaorta ideal scheint.

4.2 Regulation des Gefäßtonus durch ET-1

Endothelin spielt als potenter Vasokonstriktor eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und wird mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in Verbindung gebracht (32;134;178). Bei i.v. Applikation von ET-1 kommt es durch Aktivierung von ET_B-Rezeptoren zu einem initialen Blutdruckabfall (44;160), welcher in einen langdauernden, über ET_A-Rezeptoren vermittelten, Anstieg des Blutdrucks übergeht (67;120). In unseren Versuchen konnte eindrucksvoll an der Maus die Wirkung von ET-1 auf den Gefäßtonus von Aortenringen gezeigt werden. Dies entspricht u.a. den Ergebnissen in anderen Studien, wobei gefäßbettabhängige Unterschiede beobachtet wurden (183). In einer Studie von Zhou et al. wurden Untersuchungen mit ET-1 an unterschiedlichen Gefäßen der Maus gemacht. Gefäßringe der Aorta abdominalis kontrahierten wesentlich stärker als solche der Aorta thoracalis bzw. der Arteria carotis (183). Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion von Aortenringen vor allem über den ET_A-Rezeptor vermittelt wird; der Antagonist des ET_A-Rezeptors BQ-

123 konnte eine ET-1 induzierte Vasokonstriktion gänzlich verhindern (183). Die Rolle des ET_B-Rezeptors für die endothelabhängige Vasorelaxation ist derzeit noch unklar, seine Lokalisation auf dem Endothel lässt aber eine Funktion für die Vasorelaxation vermuten. Untersuchungen mit einem ET_B-Rezeptoragonisten konnten bei Phenylephrine kontrahierten Aortenringen jedoch keine Relaxation auslösen (183). In anderen Studien, in welchen Versuche an der A. renalis und an der A. mesenterialis durchgeführt wurden, konnte wiederum ein Einfluss von beiden Rezeptortypen, also auch des ET_B-Rezeptors, auf die Vasokonstriktion festgestellt werden (11). In heterozygoten ET_B-Rezeptor knockout Mäusen wurde ein erhöhter Blutdruck beobachtet, der möglicherweise auf eine gestörte ET-1 Clearance zurückzuführen ist (10). In unseren Versuchen an Gefäßringen der Aorta abdominalis und der Aorta thoracalis blieb, wie nach diesen Studien zu erwarten war, durch eine Blockade beider ET-Rezeptortypen mit dem unselektiven ET_{A/B}-Rezeptorantagonisten LU 302872 eine ET-1 induzierte Vasokonstriktion komplett aus, was, wie bereits vorher erwähnt, in diesen Gefäßen vor allem auf die Blockade der ET_A-Rezeptoren zurückzuführen ist.

Bei der SGK-1 handelt es sich um die Serum- und Glukokortikoid induzierte Kinase 1, wobei die Genexpression unter anderem auch durch ET-1 reguliert werden kann (175). Neuere Studien zeigen, dass ET-1 die Expression der SGK1 m-RNA in isolierten Aortenringen und kultivierten glatten Muskelzellen erhöhen kann, wobei dieser Effekt nach 90 min sein Maximum erreicht und durch den in dieser Arbeit verwendeten ET_{AB}-Antagonisten (LU302872) komplett hemmbar war (175). Veränderungen im SGK1 Gen werden weiterhin als Teil der multifaktoriellen Ursache für die Entstehung einer arterieller Hypertonie in Verbindung gebracht (21;175).

In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Wirkung von ET-1 auf die Vasokonstriktion von isolierten Aortenringen bei SGK1^{+/+}- und SGK1^{-/-} Mäusen untersucht. Beide Genotypen zeigen auf kumulative Dosen von ET-1 eine fast identische maximale Krafterwicklung. Auch ein Vergleich der ET-1 induzierten Vasokonstriktion zwischen dem genetischen Hintergrund der SGK1 Mäuse

(129/SvJ) und dem der CD1 Mäuse lässt keinen Unterschied erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Fehlen der SGK1 in der Mäuseaorta für die ET-1 induzierte Vasokonstriktion, und die Aktivierung des zugehörigen G-Protein-gekoppelten Signalwegs der zur Vasokonstriktion führt, unter unseren Versuchsbedingungen keine Rolle spielt. Der Anstieg der SGK1-Transkription wird nach einer Zeitdauer von 60 min beobachtet (175). Da sich die Versuche im Organbad aber in einem Zeitraum von 20-30 min abspielen (Zeit für die Erstellung einer kompletten Dosis-Wirkungskurve), kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Zeitraum zu kurz war um eventuell bestehende Unterschiede zu beobachten. Ferner befindet sich im Organbad eine zwar den Elektrolyten angepasste, jedoch nicht dem Blut identische Flüssigkeit, was sich in einem Fehlen jeglicher Hormone widerspiegelt. Sollten physiologische Konzentrationen an ET-1 einen induzierenden Einfluss auf die SGK1-Expression in der Aorta *in vivo* haben, könnte durch die gewählte Versuchsbedingung „Organbad“ ein die Vasomotorik beeinflussender Effekt unentdeckt geblieben sein. Ob hier andere Methoden wie die Videomikroskopie bessere Ergebnisse liefern, bleibt zu untersuchen. Der in Zusammenhang mit Hyperinsulinämie einhergehende Bluthochdruck, der bei Hochsalzdiät in Kombination mit Fruktose im Trinkwasser bei SGK1^{-/-} im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen beobachtet wurde, scheint somit eher auf einem renalen Defekt mit NaCl Retention als auf einem vaskulären Phänomen zu beruhen.

4.3 Die Funktion der BK-Kanäle bei der Regulation des arteriellen Vasotonus

In unseren Versuchen wurde *in vitro* an Aortenringen von BK^{-/-}-Mäusen untersucht, ob BK-Kanäle an der Regulation des Vasotonus beteiligt sind. Für BK^{-/-}-Mäuse wurde bereits gezeigt, dass die Tiere eine Erhöhung des arteriellen Tonus aufgrund endokriner und vaskulärer Regulationsstörungen haben, auf welche in der Einleitung näher eingegangen wurde.

Der BK-Kanal der glatten Muskulatur der Gefäße besteht aus 4 α -Untereinheiten, welche den eigentlichen Kanal bilden, und 4 β_1 -Untereinheiten.

Die Bedeutung der β_1 -Untereinheit für Vasomotorik und der daraus resultierenden Konsequenzen auf den Blutdruck wurde in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (18;56;118;131). Zusammengefasst zeigen $BK\beta_1$ knockout Mäuse einen erhöhten Vasotonus und eine Hyperreaktivität der Gefäße auf KCl und Norepinephrin (118;131). Bei Versuchen zur endothelunabhängigen Gefäßrelaxation mit der Verwendung von Na-Nitroprussid zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und $BK\beta_1$ knockout Mäusen (118;131). Untersuchungen zur Acetylcholin-induzierten endothelabhängigen Vasorelaxation führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So fanden Plüger et al. keinen signifikanten Unterschied der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation zwischen den Genotypen, wohingegen die Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation bei Oelze et al. in $BK\beta_1$ knockout Mäusen geringer ausfiel als bei Wildtyp Mäusen (118;131).

Sausbier et al. konnten an der auch in dieser Arbeit verwendeten $BK^{-/-}$ -Maus zeigen, dass die über die cGMP/Proteinkinase G vermittelte Vasorelaxation abgeschwächt war, und die Mäuse einen erhöhten vaskulären Tonus haben (146). Dies unterstützt die Annahme einer signifikanten Bedeutung dieses Signalwegs für die über diesen Signalweg ausgelöste Vasorelaxation. Kompliziert wird der *in vivo* Phänotyp der $BK^{-/-}$ -Maus jedoch dadurch, dass bei dieser Maus ein primärer Hyperaldosteronismus vorliegt, der ebenfalls zu einem erhöhten Blutdruck beitragen kann: durch Fehlen der BK-Kanal-vermittelten Hyperpolarisation erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, was zu einer gesteigerten Aldosteronfreisetzung führt (146). Dadurch bedingt kommt es zu einer erhöhten Na^+ -Reabsorption in der Niere mit gesteigerter Wasserretention, was zu einem erhöhten zirkulierenden Blutvolumen und Blutdruck führt und kausal als Ursache der Hypertonie in Frage kommen kann. Weiterführende Untersuchungen von Rieg et al. deuten jedoch eher auf einen sekundären Hyperaldosteronismus hin: $BK^{-/-}$ -Mäuse haben ein Problem mit ihrer Kaliumhomöostase, somit müssen die Mäuse, um in Kaliumbilanz zu bleiben, den renal outer medullary Kaliumkanal (ROMK)

aldosteronabhängig hochreguliere, um das K^+ ausscheiden zu können (140;175)

Entsprechend den Ergebnissen der oben genannten Studien hätten wir in unseren Versuchen bei Fehlen der BK α -Untereinheit eine abgeschwächte endothelabhängige Relaxation auf die Zugabe von Acetylcholin erwartet. Interessanterweise zeigte die durch Norepinephrin ausgelöste Vasokonstriktion als auch die durch Acetylcholin und Na-Nitroprussid ausgelöste Vasodilatation keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Die myogene Antwort in BK^{-/-}-Mäusen wurde jedoch noch nie mit Acetylcholin untersucht. In der Arbeit von Sausbier et al. zeigte die Applikation von zellpermeablem cGMP eine verminderte Vasorelaxation der Tibialarterie (146). In diesen Versuchen wurden jedoch die Gefäße nicht kontrahiert, sondern deren Tonus durch Druckänderungen variiert bevor die Applikation von cGMP erfolgte. In Norepinephrin-kontrahierten Aortenringen, welche anschließend mit Acetylcholin relaxiert werden, scheint die Situation jedoch anders auszusehen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Acetylcholin-vermittelte NO-Freisetzung in Aortenringen intakt ist und wahrscheinlich nicht die Bedingungen der Widerstandsgefäße widerspiegelt. Hingegen geht aus den Untersuchungen in Aortenringen von BK^{-/-}-Mäusen klar hervor, dass für die endothelunabhängige Relaxation, ausgelöst durch Na-Nitroprussid, der BK-Kanal keine Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde *in vitro* im Schuler Organbad die Vasomotorik in isolierten Aortenringen in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Um die Versuche an der Maus durchführen zu können mussten die Versuchsbedingungen an die anatomischen Verhältnisse der Maus angepasst werden. Als optimales Material der Haken hatte sich federhart gewickelter Edelstahl Draht mit einem Durchmesser von 0,2 mm erwiesen. Bei Verwendung der für Ratten etablierten und verwendeten Vorspannung konnte keine suffiziente Relaxation der Aortenringe erreicht werden. Durch weitere Testung wurde eine ideale Vorspannung von 2,5 cN ermittelt.

Bei den durchgeführten Experimenten zeigten CD1-Mäuse eine Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Relaxation um ~60% der Norepinephrin-induzierten Kontraktion. Die Untersuchung der endothelunabhängigen Relaxation durch Zugabe von Na-Nitroprussid zeigte eine 100%ige Relaxation der Norepinephrin-induzierten Kontraktion. Dies deutet darauf hin, dass die glatte Muskulatur auf sowohl endogenes also auch exogenes NO reagiert, aber Teile des Endothels durch die Haken beschädigt sind.

ET-1 zeigte in Wildtyp-Mäusen eine dosisabhängige Vasokonstriktion. Bei SGK1 knockout Mäusen konnte kein Unterschied der ET-1 induzierten Kontraktion verglichen zu Wildtyp-Tieren gezeigt werden. Somit scheint das Fehlen der SGK1, zumindest unter unseren Versuchsbedingungen, bei der Vasokonstriktion durch ET-1 und bei der Aktivierung des zugehörigen G-Protein gekoppelten Signalwegs nicht von Bedeutung zu sein.

BK^{-/-}-Mäuse und Wildtyp-Mäuse zeigten weder bei der Vasokonstriktion mit Norepinephrin noch bei der Vasodilatation auf Acetylcholin und Na-Nitroprussid einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Dies deutet darauf hin, daß die Acetylcholin vermittelte NO-Freisetzung intakt ist, und daß der BK-Kanal bei der endothelunabhängigen Relaxation durch Na-Nitroprussid keine Rolle spielt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholinchlorid
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca}	calciumabhängiger, "big conductance" Kaliumkanal
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂ *2H ₂ O	Calciumchloriddihydrat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene related peptide
C ₆ H ₁₂ O ₆ *H ₂ O	Glucosemonohydrat
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
cN	Zentinewton
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
CO ₂	Kohlendioxid
ECE	endothelin-converting-enzyme
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz
ENaC	renaler epithelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET	Endothelin
FSH	Follikel-stimulierendes-Hormon
g	Gramm
GTP	Guanosin-5-Triphosphat
H ₂ O	Wasser
HZV	Herzzeitvolumen

IK_{Ca}	calciumabhängiger, "intermediate conductance" Kaliumkanal
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP_3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
K_V	spannungsabhängiger Kaliumkanal
K_{ATP}	Adenosintriphosphat-sensitiver Kaliumkanal
K_{IR}	einwärts gleichrichtender (inward rectifier) Kaliumkanal
K_{Ca}	calciumabhängiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LNA	L-Nitro-Arginin
MAD	mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnesiumsulfatheptahydrat
min	Minute
μl	Mikroliter
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
MLK	Myosin-Leichtketten-Kinase
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NA	Norepinephrin (Arterenol)
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
nmol	Nanomol
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase

NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PGI	Prostaglandine
pmol	Picomol
pS	Einzelkanalleitfähigkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	renal outer medullary potassium channel
SERCA	sarcoendoplasmatic-retikulum-calcium-ATPase
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SGK1	Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
SK _{Ca}	calciumabhängiger, "small conductance" Kaliumkanal
SNP	Natrium-Nitroprussid-Dihydrat
SW	Standardabweichung
TGF-β	Transforming-growth-factor-β
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TPR	totaler periphere Widerstand
ZVD	zentralvenöser Druck

7 Literaturverzeichnis

1. Ahn, D., Ge, Y., Stricklett, P. K., Gill, P., Taylor, D., Hughes, A. K., Yanagisawa, M., Miller, L., Nelson, R. D., and Kohan, D. E. Collecting Duct-Specific Knockout of Endothelin-1 Causes Hypertension and Sodium Retention. *J.Clin.Invest* 2004;114(4):504-11.
2. Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochem.J.* 1-8-2001;357(Pt 3):593-615.
3. Andriantsitohaina, R., Lagaud, G. J., Andre, A., Muller, B., and Stoclet, J. C. Effects of CGMP on Calcium Handling in ATP-Stimulated Rat Resistance Arteries. *Am.J.Physiol* 1995;268(3 Pt 2):H1223-H1231.
4. Anger, M., Samuel, J. L., Marotte, F., Wuytack, F., Rappaport, L., and Lompre, A. M. In Situ mRNA Distribution of Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca(2+)-ATPase Isoforms During Ontogeny in the Rat. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1994;26(4):539-50.
5. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor. *Nature* 20-12-1990;348(6303):730-2.
6. Bakris, G. L., Fairbanks, R., and Traish, A. M. Arginine Vasopressin Stimulates Human Mesangial Cell Production of Endothelin. *J.Clin.Invest* 1991;87(4):1158-64.
7. Barnes, K., Brown, C., and Turner, A. J. Endothelin-Converting Enzyme: Ultrastructural Localization and Its Recycling From the Cell Surface. *Hypertension* 1998;31(1):3-9.
8. Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschutz, R., and Pongs, O. HKCNMB3 and HKCNMB4, Cloning and Characterization of Two Members of the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Beta Subunit Family. *FEBS Lett.* 26-5-2000;474(1):99-106.
9. Bell, L. M., Leong, M. L., Kim, B., Wang, E., Park, J., Hemmings, B. A., and Firestone, G. L. Hyperosmotic Stress Stimulates Promoter Activity and Regulates Cellular Utilization of the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Protein Kinase (Sgk) by a P38 MAPK-Dependent Pathway. *J.Biol.Chem.* 18-8-2000;275(33):25262-72.
10. Benigni, A. and Remuzzi, G. Endothelin Antagonists. *Lancet* 9-1-1999;353(9147):133-8.
11. Berthiaume, N., Yanagisawa, M., Labonte, J., and D'Orleans-Juste, P. Heterozygous Knock-Out of ET(B) Receptors Induces BQ-123-Sensitive Hypertension in the Mouse. *Hypertension* 2000;36(6):1002-7.
12. Bloch, K. D., Eddy, R. L., Shows, T. B., and Quertermous, T. cDNA Cloning and Chromosomal Assignment of the Gene Encoding Endothelin 3. *J.Biol.Chem.* 25-10-1989;264(30):18156-61.
13. Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., and Cohen, R. A. Nitric Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Nature* 28-4-1994;368(6474):850-3.
14. Bolz, S. S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., de Wit, C., Fleming, I., Busse, R., and Pohl, U. Antisense Oligonucleotides Against Cytochrome P450

- 2C8 Attenuate EDHF-Mediated Ca(2+) Changes and Dilation in Isolated Resistance Arteries. *FASEB J.* 2000;14(2):255-60.
15. Boulanger, C. M. [Endothelial NO Synthase]. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* 1995;189(6):1069-79.
 16. Bravo-Zehnder, M., Orio, P., Norambuena, A., Wallner, M., Meera, P., Toro, L., Latorre, R., and Gonzalez, A. Apical Sorting of a Voltage- and Ca2+-Activated K+ Channel Alpha -Subunit in Madin-Darby Canine Kidney Cells Is Independent of N-Glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 21-11-2000;97(24):13114-9.
 17. Brayden, J. E. and Nelson, M. T. Regulation of Arterial Tone by Activation of Calcium-Dependent Potassium Channels. *Science* 24-4-1992;256(5056):532-5.
 18. 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. Vasoregulation by the Beta1 Subunit of the Calcium-Activated Potassium Channel. *Nature* 19-10-2000;407(6806):870-6.
 19. Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., and Greenberg, M. E. Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.* 2001;21(3):952-65.
 20. Burt, V. L., Whelton, P., Roccella, E. J., Brown, C., Cutler, J. A., Higgins, M., Horan, M. J., and Labarthe, D. Prevalence of Hypertension in the US Adult Population. Results From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995;25(3):305-13.
 21. Busjahn, A., Aydin, A., Uhlmann, R., Krasko, C., Bähring, S., Szelestei, T., Feng, Y., Dahm, S., Sharma, A. M., Luft, F. C., and Lang, F. Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase (SGK1) Gene and Blood Pressure. *Hypertension* 2002;40(3):256-60.
 22. Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., and Weston, A. H. EDHF: Bringing the Concepts Together. *Trends Pharmacol.Sci.* 2002;23(8):374-80.
 23. Busse, R., Hecker, M., and Fleming, I. Control of Nitric Oxide and Prostacyclin Synthesis in Endothelial Cells. *Arzneimittelforschung.* 1994;44(3A):392-6.
 24. Busse, R. and Mulsch, A. Calcium-Dependent Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cytosol Is Mediated by Calmodulin. *FEBS Lett.* 4-6-1990;265(1-2):133-6.
 25. Carl, A., McHale, N. G., Publicover, N. G., and Sanders, K. M. Participation of Ca2(+)-Activated K+ Channels in Electrical Activity of Canine Gastric Smooth Muscle. *J.Physiol* 1990;429:205-21.
 26. Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P., Giulumian, A. D., and White, R. E. Nitrovasodilators Relax Mesenteric Microvessels by CGMP-Induced Stimulation of Ca-Activated K Channels. *Am.J.Physiol* 1997;273(1 Pt 2):H76-H84.
 27. Chen, C. C., Lamping, K. G., Nuno, D. W., Barresi, R., Prouty, S. J., Lavoie, J. L., Cribbs, L. L., England, S. K., Sigmund, C. D., Weiss, R. M., Williamson, R. A., Hill, J. A., and Campbell, K. P. Abnormal Coronary

- Function in Mice Deficient in Alpha1H T-Type Ca²⁺ Channels. *Science* 2003;302(5649):1416-8.
28. Clozel, M. and Fischli, W. Human Cultured Endothelial Cells Do Secrete Endothelin-1. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S229-S231.
 29. Cowley, A. W., Jr. Long-Term Control of Arterial Blood Pressure. *Physiol Rev.* 1992;72(1):231-300.
 30. Crane, G. J., Gallagher, N., Dora, K. A., and Garland, C. J. Small- and Intermediate-Conductance Calcium-Activated K⁺ Channels Provide Different Facets of Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Rat Mesenteric Artery. *J.Physiol* 15-11-2003;553(Pt 1):183-9.
 31. Crane, G. J. and Garland, C. J. Thromboxane Receptor Stimulation Associated With Loss of SKCa Activity and Reduced EDHF Responses in the Rat Isolated Mesenteric Artery. *Br.J.Pharmacol.* 2004;142(1):43-50.
 32. da Silva, A. A., Kuo, J. J., Tallam, L. S., and Hall, J. E. Role of Endothelin-1 in Blood Pressure Regulation in a Rat Model of Visceral Obesity and Hypertension. *Hypertension* 2004;43(2):383-7.
 33. Dart, C. and Standen, N. B. Adenosine-Activated Potassium Current in Smooth Muscle Cells Isolated From the Pig Coronary Artery. *J.Physiol* 1993;471:767-86.
 34. De Nucci, G., Gryglewski, R. J., Warner, T. D., and Vane, J. R. Receptor-Mediated Release of Endothelium-Derived Relaxing Factor and Prostacyclin From Bovine Aortic Endothelial Cells Is Coupled. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85(7):2334-8.
 35. Dohi, Y. and Luscher, T. F. Endothelin in Hypertensive Resistance Arteries. Intraluminal and Extraluminal Dysfunction. *Hypertension* 1991;18(4):543-9.
 36. Dora, K. A. and Garland, C. J. Properties of Smooth Muscle Hyperpolarization and Relaxation to K⁺ in the Rat Isolated Mesenteric Artery. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;280(6):H2424-H2429.
 37. Doughty, J. M., Plane, F., and Langton, P. D. Charybdotoxin and Apamin Block EDHF in Rat Mesenteric Artery If Selectively Applied to the Endothelium. *Am.J.Physiol* 1999;276(3 Pt 2):H1107-H1112.
 38. Drexler, H. and Hornig, B. Endothelial Dysfunction in Human Disease. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1999;31(1):51-60.
 39. Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., and Weston, A. H. K⁺ Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Rat Arteries. *Nature* 19-11-1998;396(6708):269-72.
 40. Emori, T., Hirata, Y., and Marumo, F. Specific Receptors for Endothelin-3 in Cultured Bovine Endothelial Cells and Its Cellular Mechanism of Action. *FEBS Lett.* 24-4-1990;263(2):261-4.
 41. Escande, D. and Caverio, I. K⁺ Channel Openers and 'Natural' Cardioprotection. *Trends Pharmacol.Sci.* 1992;13(7):269-72.
 42. Fleming, I. and Busse, R. Signal Transduction of ENOS Activation. *Cardiovasc.Res.* 15-8-1999;43(3):532-41.
 43. Folkow, B. Myogenic Mechanisms in the Control of Systemic Resistance. Introduction and Historical Background. *J.Hypertens.Suppl* 1989;7(4):S1-S4.

44. Fozard, J. R. and Part, M. L. The Role of Nitric Oxide in the Regional Vasodilator Effects of Endothelin-1 in the Rat. *Br.J.Pharmacol.* 1992;105(3):744-50.
45. Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B., and Keef, K. D. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Activates Cloned BKCa Channels Expressed in Mammalian Cells by Direct Phosphorylation at Serine 1072. *J.Biol.Chem.* 16-4-1999;274(16):10927-35.
46. Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M. Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.
47. Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 27-11-1980;288(5789):373-6.
48. Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y., and Shigekawa, M. Cyclic GMP Stimulates Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Vascular Smooth Muscle Cells in Primary Culture. *J.Biol.Chem.* 5-7-1991;266(19):12337-41.
49. Ganz, M. B., Nee, J. J., Isales, C. M., and Barrett, P. Q. Atrial Natriuretic Peptide Enhances Activity of Potassium Conductance in Adrenal Glomerulosa Cells. *Am.J.Physiol* 1994;266(5 Pt 1):C1357-C1365.
50. Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E., and Bennett, T. Effects of the Non-Peptide, Non-Selective Endothelin Antagonist, Bosentan, on Regional Haemodynamic Responses to NG-Monomethyl-L-Arginine in Conscious Rats. *Br.J.Pharmacol.* 1996;118(2):352-4.
51. Gauthier, K. M., Spitzbarth, N., Edwards, E. M., and Campbell, W. B. Apamin-Sensitive K⁺ Currents Mediate Arachidonic Acid-Induced Relaxations of Rabbit Aorta. *Hypertension* 2004;43(2):413-9.
52. Gerzer, R., Bohme, E., Hofmann, F., and Schultz, G. Soluble Guanylate Cyclase Purified From Bovine Lung Contains Heme and Copper. *FEBS Lett.* 14-9-1981;132(1):71-4.
53. Ghoneim, M. A., Yamamoto, T., Hirose, S., Nagasawa, T., and Hagiwara, H. Endothelium Localization of ETB Receptor Revealed by Immunohistochemistry. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S111-S112.
54. Giebisch, G. Renal Potassium Transport: Mechanisms and Regulation. *Am.J.Physiol* 1998;274(5 Pt 2):F817-F833.
55. Goldberg, N., Lundin, A. P., Delano, B., Friedman, E. A., and Stein, R. A. Changes in Left Ventricular Size, Wall Thickness, and Function in Anemic Patients Treated With Recombinant Human Erythropoietin. *Am.Heart J.* 1992;124(2):424-7.
56. Gollasch, M., Tank, J., Luft, F. C., Jordan, J., Maass, P., Krasko, C., Sharma, A. M., Busjahn, A., and Bähring, S. The BK Channel Beta1 Subunit Gene Is Associated With Human Baroreflex and Blood Pressure Regulation. *J.Hypertens.* 2002;20(5):927-33.
57. Gonzalez-Robayna, I. J., Falender, A. E., Ochsner, S., Firestone, G. L., and Richards, J. S. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Stimulates Phosphorylation and Activation of Protein Kinase B (PKB/Akt) and Serum and Glucocorticoid-Induced Kinase (Sgk): Evidence for A Kinase-

- Independent Signaling by FSH in Granulosa Cells. *Mol.Endocrinol.* 2000;14(8):1283-300.
58. Grunnet, M., Knaus, H. G., Solander, C., and Klaerke, D. A. Quantification and Distribution of Ca²⁺-Activated Maxi K⁺ Channels in Rabbit Distal Colon. *Am.J.Physiol* 1999;277(1 Pt 1):G22-G30.
 59. Guyton, A. C. Abnormal Renal Function and Autoregulation in Essential Hypertension. *Hypertension* 1991;18(5 Suppl):III49-III53.
 60. Guyton, A. C. Blood Pressure Control--Special Role of the Kidneys and Body Fluids. *Science* 28-6-1991;252(5014):1813-6.
 61. Harnett, J. D., Kent, G. M., Barre, P. E., Taylor, R., and Parfrey, P. S. Risk Factors for the Development of Left Ventricular Hypertrophy in a Prospectively Followed Cohort of Dialysis Patients. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1994;4(7):1486-90.
 62. Harnett, J. D., Kent, G. M., Foley, R. N., and Parfrey, P. S. Cardiac Function and Hematocrit Level. *Am.J.Kidney Dis.* 1995;25(4 Suppl 1):S3-S7.
 63. Hausdorff, W. P. and Catt, K. J. Activation of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels and Biphasic Cytosolic Calcium Responses by Angiotensin II in Rat Adrenal Glomerulosa Cells. *Endocrinology* 1988;123(6):2818-26.
 64. Hay-Schmidt, A., Grunnet, M., Abrahamse, S. L., Knaus, H. G., and Klaerke, D. A. Localization of Ca²⁺ -Activated Big-Conductance K⁺ Channels in Rabbit Distal Colon. *Pflugers Arch.* 2003;446(1):61-8.
 65. Haynes, W. G., Ferro, C. J., O'Kane, K. P., Somerville, D., Lomax, C. C., and Webb, D. J. Systemic Endothelin Receptor Blockade Decreases Peripheral Vascular Resistance and Blood Pressure in Humans. *Circulation* 15-5-1996;93(10):1860-70.
 66. Helin, K., Stoll, M., Meffert, S., Stroth, U., and Unger, T. The Role of Angiotensin Receptors in Cardiovascular Diseases. *Ann.Med.* 1997;29(1):23-9.
 67. Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., and Marumo, F. Endothelin Receptor Subtype B Mediates Synthesis of Nitric Oxide by Cultured Bovine Endothelial Cells. *J.Clin.Invest* 1993;91(4):1367-73.
 68. Hocher, B., Thone-Reineke, C., Bauer, C., Raschack, M., and Neumayer, H. H. The Paracrine Endothelin System: Pathophysiology and Implications in Clinical Medicine. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1997;35(3):175-89.
 69. Hoffman, A., Abassi, Z. A., Brodsky, S., Ramadan, R., and Winaver, J. Mechanisms of Big Endothelin-1-Induced Diuresis and Natriuresis : Role of ET(B) Receptors. *Hypertension* 2000;35(3):732-9.
 70. Hofmann, F., Ammendola, A., and Schlossmann, J. Rising Behind NO: CGMP-Dependent Protein Kinases. *J.Cell Sci.* 2000;113 (Pt 10):1671-6.
 71. Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., and Fishman, M. C. Hypertension in Mice Lacking the Gene for Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Nature* 21-9-1995;377(6546):239-42.

72. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released From Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84(24):9265-9.
73. Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., and Nelson, M. T. Calcium Sparks in Smooth Muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2000;278(2):C235-C256.
74. Jan, L. Y. and Jan, Y. N. Voltage-Gated and Inwardly Rectifying Potassium Channels. *J.Physiol* 1-12-1997;505 (Pt 2):267-82.
75. Johnson, T. D., Marrelli, S. P., Steenberg, M. L., Childres, W. F., and Bryan, R. M., Jr. Inward Rectifier Potassium Channels in the Rat Middle Cerebral Artery. *Am.J.Physiol* 1998;274(2 Pt 2):R541-R547.
76. Julien, C., Zhang, Z. Q., and Barres, C. How Sympathetic Tone Maintains or Alters Arterial Pressure. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1995;9(4):343-9.
77. Kalea, A. Z., Schuschke, D. A., Harris, P. D., and Klimis-Zacas, D. J. Cyclo-Oxygenase Inhibition Restores the Attenuated Vasodilation in Manganese-Deficient Rat Aorta. *J.Nutr.* 2006;136(9):2302-7.
78. Kanse, S. M., Takahashi, K., Warren, J. B., Perera, T., Porta, M., Ghatei, M., and Bloom, S. R. Production of Endothelin by Vascular Smooth Muscle Cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S113-S116.
79. Katusic, Z. S., Shepherd, J. T., and Vanhoutte, P. M. Endothelium-Dependent Contractions to Calcium Ionophore A23187, Arachidonic Acid, and Acetylcholine in Canine Basilar Arteries. *Stroke* 1988;19(4):476-9.
80. Kiowski, W., Luscher, T. F., Linder, L., and Buhler, F. R. Endothelin-1-Induced Vasoconstriction in Humans. Reversal by Calcium Channel Blockade but Not by Nitrovasodilators or Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Circulation* 1991;83(2):469-75.
81. Klingel, K., Warntges, S., Bock, J., Wagner, C. A., Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R., and Lang, F. Expression of Cell Volume-Regulated Kinase H-Sgk in Pancreatic Tissue. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2000;279(5):G998-G1002.
82. Knaus, H. G., Eberhart, A., Glossmann, H., Munujos, P., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. Pharmacology and Structure of High Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Cell Signal.* 1994;6(8):861-70.
83. Kotlikoff, M. and Hall, I. Hypertension: Beta Testing. *J.Clin.Invest* 2003;112(5):654-6.
84. Kumar, C., Mwangi, V., Nuthulaganti, P., Wu, H. L., Pullen, M., Brun, K., Aiyar, H., Morris, R. A., Naughton, R., and Nambi, P. Cloning and Characterization of a Novel Endothelin Receptor From *Xenopus* Heart. *J.Biol.Chem.* 6-5-1994;269(18):13414-20.
85. Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W. H., Kamada, N., and . Elevated Blood Pressure and Craniofacial Abnormalities in Mice Deficient in Endothelin-1. *Nature* 21-4-1994;368(6473):703-10.
86. Lang, F., Busch, G. L., and Volkl, H. The Diversity of Volume Regulatory Mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 1998;8(1-2):1-45.

87. Lang, F., Klingel, K., Wagner, C. A., Stegen, C., Warntges, S., Friedrich, B., Lanzendorfer, M., Melzig, J., Moschen, I., Steuer, S., Waldegger, S., Sauter, M., Paulmichl, M., Gerke, V., Risler, T., Gamba, G., Capasso, G., Kandolf, R., Hebert, S. C., Massry, S. G., and Broer, S. Deranged Transcriptional Regulation of Cell-Volume-Sensitive Kinase HSGK in Diabetic Nephropathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 5-7-2000;97(14):8157-62.
88. Lang, R. J., Harvey, J. R., McPhee, G. J., and Klemm, M. F. Nitric Oxide and Thiol Reagent Modulation of Ca²⁺-Activated K⁺ (BKCa) Channels in Myocytes of the Guinea-Pig *Taenia Caeci*. *J.Physiol* 1-6-2000;525 Pt 2:363-76.
89. Levin, E. R. Endothelins. *N.Engl.J.Med.* 10-8-1995;333(6):356-63.
90. Levin, E. R. Endothelins As Cardiovascular Peptides. *Am.J.Nephrol.* 1996;16(3):246-51.
91. Lifton, R. P., Gharavi, A. G., and Geller, D. S. Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell* 23-2-2001;104(4):545-56.
92. Lincoln, T. M., Dey, N., and Sellak, H. Invited Review: CGMP-Dependent Protein Kinase Signaling Mechanisms in Smooth Muscle: From the Regulation of Tone to Gene Expression. *J.Appl.Physiol* 2001;91(3):1421-30.
93. Liu, L. H., Paul, R. J., Sutliff, R. L., Miller, M. L., Lorenz, J. N., Pun, R. Y., Duffy, J. J., Doetschman, T., Kimura, Y., MacLennan, D. H., Hoying, J. B., and Shull, G. E. Defective Endothelium-Dependent Relaxation of Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Ca²⁺ Signaling in Mice Lacking Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Isoform 3. *J.Biol.Chem.* 28-11-1997;272(48):30538-45.
94. Lopez, M. J., Wong, S. K., Kishimoto, I., Dubois, S., Mach, V., Friesen, J., Garbers, D. L., and Beuve, A. Salt-Resistant Hypertension in Mice Lacking the Guanylyl Cyclase-A Receptor for Atrial Natriuretic Peptide. *Nature* 2-11-1995;378(6552):65-8.
95. Lotshaw, D. P. Effects of K⁺ Channel Blockers on K⁺ Channels, Membrane Potential, and Aldosterone Secretion in Rat Adrenal Zona Glomerulosa Cells. *Endocrinology* 1997;138(10):4167-75.
96. Lotshaw, D. P. Role of Membrane Depolarization and T-Type Ca²⁺ Channels in Angiotensin II and K⁺ Stimulated Aldosterone Secretion. *Mol.Cell Endocrinol.* 25-4-2001;175(1-2):157-71.
97. Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., and Waldman, S. A. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.* 2000;52(3):375-414.
98. Luscher, T. F. Endothelin, Endothelin Receptors, and Endothelin Antagonists. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 1994;3(1):92-8.
99. Matsumura, Y., Ikegawa, R., Tsukahara, Y., Takaoka, M., and Morimoto, S. Conversion of Big Endothelin-1 to Endothelin-1 by Two-Types of Metalloproteinases of Cultured Porcine Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 15-8-1991;178(3):899-905.
100. Matsuura, T., Miura, K., Ebara, T., Yukimura, T., Yamanaka, S., Kim, S., and Iwao, H. Renal Vascular Effects of the Selective Endothelin

- Receptor Antagonists in Anaesthetized Rats. *Br.J.Pharmacol.* 1997;122(1):81-6.
101. Mikosz, C. A., Brickley, D. R., Sharkey, M. S., Moran, T. W., and Conzen, S. D. Glucocorticoid Receptor-Mediated Protection From Apoptosis Is Associated With Induction of the Serine/Threonine Survival Kinase Gene, Sgk-1. *J.Biol.Chem.* 18-5-2001;276(20):16649-54.
 102. Mizuno, H. and Nishida, E. The ERK MAP Kinase Pathway Mediates Induction of SGK (Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase) by Growth Factors. *Genes Cells* 2001;6(3):261-8.
 103. Moncada, S. The 1991 Ulf Von Euler Lecture. The L-Arginine: Nitric Oxide Pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992;145(3):201-27.
 104. Moncada, S. Nitric Oxide. *J.Hypertens.Suppl* 1994;12(10):S35-S39.
 105. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J. R. An Enzyme Isolated From Arteries Transforms Prostaglandin Endoperoxides to an Unstable Substance That Inhibits Platelet Aggregation. *Nature* 21-10-1976;263(5579):663-5.
 106. Moncada, S. and Higgs, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N.Engl.J.Med.* 30-12-1993;329(27):2002-12.
 107. Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 1991;43(2):109-42.
 108. Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F., and Klugbauer, N. Dominant Role of Smooth Muscle L-Type Calcium Channel Cav1.2 for Blood Pressure Regulation. *EMBO J.* 17-11-2003;22(22):6027-34.
 109. Mulder, P., Richard, V., Derumeaux, G., Hogie, M., Henry, J. P., Lallemand, F., Compagnon, P., Mace, B., Comoy, E., Letac, B., and Thuillez, C. Role of Endogenous Endothelin in Chronic Heart Failure: Effect of Long-Term Treatment With an Endothelin Antagonist on Survival, Hemodynamics, and Cardiac Remodeling. *Circulation* 16-9-1997;96(6):1976-82.
 110. Murad, F. Cyclic GMP: Synthesis, Metabolism, and Function. Introduction and Some Historical Comments. *Adv.Pharmacol.* 1994;26:1-5.
 111. Murad, F. Regulation of Cytosolic Guanylyl Cyclase by Nitric Oxide: the NO-Cyclic GMP Signal Transduction System. *Adv.Pharmacol.* 1994;26:19-33.
 112. Nagao, T. and Vanhoutte, P. M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Endothelium-Dependent Relaxations. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;8(1):1-6.
 113. Nambi, P., Pullen, M., and Kumar, C. Identification of a Novel Endothelin Receptor in *Xenopus Laevis* Liver. *Neuropeptides* 1994;26(3):181-5.
 114. Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., and Lederer, W. J. Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Calcium Sparks. *Science* 27-10-1995;270(5236):633-7.
 115. Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F., and Standen, N. B. Calcium Channels, Potassium Channels, and Voltage Dependence of Arterial Smooth Muscle Tone. *Am.J.Physiol* 1990;259(1 Pt 1):C3-18.

116. Nelson, M. T. and Quayle, J. M. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *Am.J.Physiol* 1995;268(4 Pt 1):C799-C822.
117. Nunez, D. J., Brown, M. J., Davenport, A. P., Neylon, C. B., Schofield, J. P., and Wyse, R. K. Endothelin-1 mRNA Is Widely Expressed in Porcine and Human Tissues. *J.Clin.Invest* 1990;85(5):1537-41.
118. Oelze, M., Warnholtz, A., Faulhaber, J., Wenzel, P., Kleschyov, A. L., Coldewey, M., Hink, U., Pongs, O., Fleming, I., Wassmann, S., Meinertz, T., Ehmke, H., Daiber, A., and Munzel, T. NADPH Oxidase Accounts for Enhanced Superoxide Production and Impaired Endothelium-Dependent Smooth Muscle Relaxation in BKbeta1-/- Mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006;26(8):1753-9.
119. Ohuchi, T., Kuwaki, T., Ling, G. Y., Dewit, D., Ju, K. H., Onodera, M., Cao, W. H., Yanagisawa, M., and Kumada, M. Elevation of Blood Pressure by Genetic and Pharmacological Disruption of the ETB Receptor in Mice. *Am.J.Physiol* 1999;276(4 Pt 2):R1071-R1077.
120. Ozaki, S., Ohwaki, K., Ihara, M., Fukuroda, T., Ishikawa, K., and Yano, M. ETB-Mediated Regulation of Extracellular Levels of Endothelin-1 in Cultured Human Endothelial Cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 17-4-1995;209(2):483-9.
121. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 11-6-1987;327(6122):524-6.
122. Palmer, R. M. and Moncada, S. A Novel Citrulline-Forming Enzyme Implicated in the Formation of Nitric Oxide by Vascular Endothelial Cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 16-1-1989;158(1):348-52.
123. Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., and Hemmings, B. A. Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase (SGK) Is a Target of the PI 3-Kinase-Stimulated Signaling Pathway. *EMBO J.* 1-6-1999;18(11):3024-33.
124. Parsons, A. A., Schilling, L., and Wahl, M. Analysis of Acetylcholine-Induced Relaxation of Rabbit Isolated Middle Cerebral Artery: Effects of Inhibitors of Nitric Oxide Synthesis, Na,K-ATPase, and ATP-Sensitive K Channels. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 1991;11(4):700-4.
125. Patterson, A. J., Henrie-Olson, J., and Brenner, R. Vasoregulation at the Molecular Level: a Role for the Beta1 Subunit of the Calcium-Activated Potassium (BK) Channel. *Trends Cardiovasc.Med.* 2002;12(2):78-82.
126. Payet, M. D., Bilodeau, L., Drolet, P., Ibarrondo, J., Guillon, G., and Gallo-Payet, N. Modulation of a Ca(2+)-Activated K⁺ Channel by Angiotensin II in Rat Adrenal Glomerulosa Cells: Involvement of a G Protein. *Mol.Endocrinol.* 1995;9(8):935-47.
127. Persson, L. G., Lindstrom, K., Lingfors, H., and Bengtsson, C. Results From an Intervention Programme Dealing With Cardiovascular Risk Factors. Experiences From a Study of Men Aged 33-42 in Habo, Sweden. *Scand.J.Prim.Health Care* 1996;14(3):184-92.
128. Petkov, G. V., Bonev, A. D., Heppner, T. J., Brenner, R., Aldrich, R. W., and Nelson, M. T. Beta1-Subunit of the Ca²⁺-Activated K⁺ Channel

- Regulates Contractile Activity of Mouse Urinary Bladder Smooth Muscle. *J.Physiol* 1-12-2001;537(Pt 2):443-52.
129. Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F. Defective Smooth Muscle Regulation in CGMP Kinase I-Deficient Mice. *EMBO J.* 1-6-1998;17(11):3045-51.
 130. Pflueger, A. C., Osswald, H., and Knox, F. G. Adenosine-Induced Renal Vasoconstriction in Diabetes Mellitus Rats: Role of Nitric Oxide. *Am.J.Physiol* 1999;276(3 Pt 2):F340-F346.
 131. Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenau, M., Lohn, M., Waldschutz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F. C., Ehmke, H., and Pongs, O. Mice With Disrupted BK Channel Beta1 Subunit Gene Feature Abnormal Ca(2+) Spark/STOC Coupling and Elevated Blood Pressure. *Circ.Res.* 24-11-2000;87(11):E53-E60.
 132. Pluznick, J. L., Wei, P., Carmines, P. K., and Sansom, S. C. Renal Fluid and Electrolyte Handling in BKCa-Beta1-/- Mice. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2003;284(6):F1274-F1279.
 133. Porter, V. A., Bonev, A. D., Knot, H. J., Heppner, T. J., Stevenson, A. S., Kleppisch, T., Lederer, W. J., and Nelson, M. T. Frequency Modulation of Ca2+ Sparks Is Involved in Regulation of Arterial Diameter by Cyclic Nucleotides. *Am.J.Physiol* 1998;274(5 Pt 1):C1346-C1355.
 134. Quaschnig, T., Voss, F., Relle, K., Kalk, P., Vignon-Zellweger, N., Pfab, T., Bauer, C., Theilig, F., Bachmann, S., Kraemer-Guth, A., Wanner, C., Theuring, F., Galle, J., and Hocher, B. Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promotes Endothelin-Induced Hypertension: Lessons From Endothelin-1 Transgenic/Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2007;18(3):730-40.
 135. Quayle, J. M., Bonev, A. D., Brayden, J. E., and Nelson, M. T. Calcitonin Gene-Related Peptide Activated ATP-Sensitive K+ Currents in Rabbit Arterial Smooth Muscle Via Protein Kinase A. *J.Physiol* 15-2-1994;475(1):9-13.
 136. Quayle, J. M., McCarron, J. G., Brayden, J. E., and Nelson, M. T. Inward Rectifier K+ Currents in Smooth Muscle Cells From Rat Resistance-Sized Cerebral Arteries. *Am.J.Physiol* 1993;265(5 Pt 1):C1363-C1370.
 137. Quayle, J. M., Nelson, M. T., and Standen, N. B. ATP-Sensitive and Inwardly Rectifying Potassium Channels in Smooth Muscle. *Physiol Rev.* 1997;77(4):1165-232.
 138. Ransom, C. B., Liu, X., and Sontheimer, H. BK Channels in Human Glioma Cells Have Enhanced Calcium Sensitivity. *Glia* 2002;38(4):281-91.
 139. Remuzzi, G. and Benigni, A. Endothelins in the Control of Cardiovascular and Renal Function. *Lancet* 4-9-1993;342(8871):589-93.
 140. Rieg, T., Vallon, V., Sausbier, M., Sausbier, U., Kaissling, B., Ruth, P., and Osswald, H. The Role of the BK Channel in Potassium Homeostasis and Flow-Induced Renal Potassium Excretion. *Kidney Int.* 2007;72(5):566-73.

141. Robertson, B. E. and Nelson, M. T. Aminopyridine Inhibition and Voltage Dependence of K⁺ Currents in Smooth Muscle Cells From Cerebral Arteries. *Am.J.Physiol* 1994;267(6 Pt 1):C1589-C1597.
142. Rossier, M. F., Python, C. P., Capponi, A. M., Schlegel, W., Kwan, C. Y., and Vallotton, M. B. Blocking T-Type Calcium Channels With Tetrandrine Inhibits Steroidogenesis in Bovine Adrenal Glomerulosa Cells. *Endocrinology* 1993;132(3):1035-43.
143. Russell, A. and Watts, S. Vascular Reactivity of Isolated Thoracic Aorta of the C57BL/6J Mouse. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2000;294(2):598-604.
144. Ruttiger, L., Sausbier, M., Zimmermann, U., Winter, H., Braig, C., Engel, J., Knirsch, M., Arntz, C., Langer, P., Hirt, B., Muller, M., Kopschall, I., Pfister, M., Munkner, S., Rohbock, K., Pfaff, I., Rusch, A., Ruth, P., and Knipper, M. Deletion of the Ca²⁺-Activated Potassium (BK) Alpha-Subunit but Not the BKbeta1-Subunit Leads to Progressive Hearing Loss. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 31-8-2004;101(35):12922-7.
145. Saito, A., Shiba, R., Yanagisawa, M., Masaki, T., Kimura, S., Yamada, K., Mima, T., Shigeno, T., and Goto, K. Characterization of the Effect of Endothelins in Canine Cerebral Arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S219-S221.
146. Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X. B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C. A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H. G., Kenyon, C., Shipston, M. J., Storm, J. F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M., and Ruth, P. Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel-Deficient Mice. *Circulation* 5-7-2005;112(1):60-8.
147. Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., Kamm, S., Adelsberger, H., Sausbier, U., Sailer, C. A., Feil, R., Hofmann, F., Korth, M., Shipston, M. J., Knaus, H. G., Wolfer, D. P., Pedroarena, C. M., Storm, J. F., and Ruth, P. Cerebellar Ataxia and Purkinje Cell Dysfunction Caused by Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 22-6-2004;101(25):9474-8.
148. Sausbier, M., Matos, J. E., Sausbier, U., Beranek, G., Arntz, C., Neuhuber, W., Ruth, P., and Leipziger, J. Distal Colonic K(+) Secretion Occurs Via BK Channels. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006;17(5):1275-82.
149. Sausbier, M., Matos, J. E., Sausbier, U., Beranek, G., Arntz, C., Neuhuber, W., Ruth, P., and Leipziger, J. Distal Colonic K⁺ Secretion Occurs Via BK Channels. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006;17(5):1275-82.
150. Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., and Hofmann, F. Mechanisms of NO/CGMP-Dependent Vasorelaxation. *Circ.Res.* 27-10-2000;87(9):825-30.
151. Schmetterer, L., Findl, O., Strenn, K., Graselli, U., Kastner, J., Eichler, H. G., and Wolzt, M. Role of NO in the O₂ and CO₂ Responsiveness of Cerebral and Ocular Circulation in Humans. *Am.J.Physiol* 1997;273(6 Pt 2):R2005-R2012.
152. Schrader, J., Kroll, K., Henrich, M., and Piper, H. M. Coronary and Myocardial Adenosine Receptors. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46(8-9):S421-S426.

153. Schuh, K., Quaschnig, T., Knauer, S., Hu, K., Kocak, S., Roethlein, N., and Neyses, L. Regulation of Vascular Tone in Animals Overexpressing the Sarcolemmal Calcium Pump. *J.Biol.Chem.* 17-10-2003;278(42):41246-52.
154. Shuck, M. E., Bock, J. H., Benjamin, C. W., Tsai, T. D., Lee, K. S., Slightom, J. L., and Bienkowski, M. J. Cloning and Characterization of Multiple Forms of the Human Kidney ROM-K Potassium Channel. *J.Biol.Chem.* 30-9-1994;269(39):24261-70.
155. Shull, G. E. Gene Knockout Studies of Ca²⁺-Transporting ATPases. *Eur.J.Biochem.* 2000;267(17):5284-90.
156. Simonson, M. S. and Dunn, M. J. Cellular Signaling by Peptides of the Endothelin Gene Family. *FASEB J.* 1990;4(12):2989-3000.
157. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. Signal Transduction and Regulation in Smooth Muscle. *Nature* 17-11-1994;372(6503):231-6.
158. Spat, A. and Hunyady, L. Control of Aldosterone Secretion: a Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. *Physiol Rev.* 2004;84(2):489-539.
159. Stowasser, M. and Gordon, R. D. Primary Aldosteronism. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 2003;17(4):591-605.
160. Taddei, S. and Vanhoutte, P. M. Role of Endothelium in Endothelin-Evoked Contractions in the Rat Aorta. *Hypertension* 1993;21(1):9-15.
161. Takeda, Y., Itoh, Y., Yoneda, T., Miyamori, I., and Takeda, R. Cyclosporine A Induces Endothelin-1 Release From Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Eur.J.Pharmacol.* 23-3-1993;233(2-3):299-301.
162. Talukder, M. A., Morrison, R. R., and Mustafa, S. J. Comparison of the Vascular Effects of Adenosine in Isolated Mouse Heart and Aorta. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;282(1):H49-H57.
163. Tawfik, H. E., Schnermann, J., Oldenburg, P. J., and Mustafa, S. J. Role of A1 Adenosine Receptors in Regulation of Vascular Tone. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005;288(3):H1411-H1416.
164. Taylor, T. A., Garipey, C. E., Pollock, D. M., and Pollock, J. S. Gender Differences in ET and NOS Systems in ETB Receptor-Deficient Rats: Effect of a High Salt Diet. *Hypertension* 2003;41(3 Pt 2):657-62.
165. Toro, L., Wallner, M., Meera, P., and Tanaka, Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci.* 1998;13:112-7.
166. Trautmann, A. and Marty, A. Activation of Ca-Dependent K Channels by Carbamoylcholine in Rat Lacrimal Glands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1984;81(2):611-5.
167. Tseng-Crank, J., Foster, C. D., Krause, J. D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T. J., and Reinhart, P. H. Cloning, Expression, and Distribution of Functionally Distinct Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Isoforms From Human Brain. *Neuron* 1994;13(6):1315-30.
168. Vandeputte, C. and Docherty, J. R. Modulation of Contraction by Alpha(2A/D)-Adrenoceptors in Mouse Aorta: Evidence Employing Knockout Technology. *Br.J.Pharmacol.* 2002;135(5):1209-12.

169. Wang, Q. D., Li, X. S., Lundberg, J. M., and Pernow, J. Protective Effects of Non-Peptide Endothelin Receptor Antagonist Bosentan on Myocardial Ischaemic and Reperfusion Injury in the Pig. *Cardiovasc.Res.* 1995;29(6):805-12.
170. Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., and Firestone, G. L. Characterization of Sgk, a Novel Member of the Serine/Threonine Protein Kinase Gene Family Which Is Transcriptionally Induced by Glucocorticoids and Serum. *Mol.Cell Biol.* 1993;13(4):2031-40.
171. Weiger, T. M., Holmqvist, M. H., Levitan, I. B., Clark, F. T., Sprague, S., Huang, W. J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M. E., Glucksmann, M. A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P. S., and Curtis, R. A Novel Nervous System Beta Subunit That Downregulates Human Large Conductance Calcium-Dependent Potassium Channels. *J.Neurosci.* 15-5-2000;20(10):3563-70.
172. Wenzel, R. R., Fleisch, M., Shaw, S., Noll, G., Kaufmann, U., Schmitt, R., Jones, C. R., Clozel, M., Meier, B., and Luscher, T. F. Hemodynamic and Coronary Effects of the Endothelin Antagonist Bosentan in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 24-11-1998;98(21):2235-40.
173. Wolf, S. C., Brehm, B. R., Gaschler, F., Brehm, S., Klaussner, M., Smykowski, J., Amann, K., Osswald, H., Erley, C. M., and Risler, T. Protective Effects of Endothelin Antagonists in Chronic Renal Failure. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1999;14 Suppl 4:29-30.
174. Wolf, S. C., Gaschler, F., Brehm, S., Klaussner, M., Amann, K., Risler, T., and Brehm, B. R. Endothelin-Receptor Antagonists in Uremic Cardiomyopathy. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000;36(5 Suppl 1):S348-S350.
175. Wolf, S. C., Schultze, M., Risler, T., Rieg, T., Lang, F., Schulze-Osthoff, K., and Brehm, B. R. Stimulation of Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase-1 Gene Expression by Endothelin-1. *Biochem.Pharmacol.* 14-4-2006;71(8):1175-83.
176. Wu, K. D., Lee, W. S., Wey, J., Bungard, D., and Lytton, J. Localization and Quantification of Endoplasmic Reticulum Ca(2+)-ATPase Isoform Transcripts. *Am.J.Physiol* 1995;269(3 Pt 1):C775-C784.
177. Wulff, P., Vallon, V., Huang, D. Y., Volkl, H., Yu, F., Richter, K., Jansen, M., Schlunz, M., Klingel, K., Loffing, J., Kauselmann, G., Bosl, M. R., Lang, F., and Kuhl, D. Impaired Renal Na(+) Retention in the Sgk1-Knockout Mouse. *J.Clin.Invest* 2002;110(9):1263-8.
178. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. A Novel Peptide Vasoconstrictor, Endothelin, Is Produced by Vascular Endothelium and Modulates Smooth Muscle Ca²⁺ Channels. *J.Hypertens.Suppl* 1988;6(4):S188-S191.
179. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 31-3-1988;332(6163):411-5.
180. Yano, M., Okada, K., Takada, J., Hioki, Y., Matsuyama, K., Fukuroda, T., Noguchi, K., Nishikibe, M., and Ikemoto, F. Endothelin-Converting

- Enzyme and Its in Vitro and in Vivo Inhibition. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S26-S28.
181. Zhang, C., Patel, R., Eiserich, J. P., Zhou, F., Kelpke, S., Ma, W., Parks, D. A., Darley-Usmar, V., and White, C. R. Endothelial Dysfunction Is Induced by Proinflammatory Oxidant Hypochlorous Acid. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;281(4):H1469-H1475.
 182. Zhang, W., Xia, X., Reisenauer, M. R., Rieg, T., Lang, F., Kuhl, D., Vallon, V., and Kone, B. C. Aldosterone-Induced Sgk1 Relieves Dot1a-Af9-Mediated Transcriptional Repression of Epithelial Na⁺ Channel Alpha. *J.Clin.Invest* 2007;117(3):773-83.
 183. Zhou, Y., Dirksen, W. P., Zweier, J. L., and Periasamy, M. Endothelin-1-Induced Responses in Isolated Mouse Vessels: the Expression and Function of Receptor Types. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004;287(2):H573-H578.

8 Anhang

8.1 Danksagungen

Diese Arbeit wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Oßwald durchgeführt.

Prof Dr. H. Oßwald möchte ich hierbei ganz herzlich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und für seine Unterstützung bei ihrer Fertigstellung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr.T. Rieg, der mir über die ganze Zeit hinweg mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich für seine große Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützt haben, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Moll, Corinna
Geburtsdatum: 11.06.1980
Geburtsort: Reutlingen
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1986-07/1990 Römerschanz-Schule Reutlingen
Grundschule

09/1990-06/1999 Albert-Einstein-Gymnasium Reutlingen
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

09/1999-09/2001 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Fakultät für Biologie
25.07.2001 Vordiplom

03/2002-05/2008 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Fakultät für Humanmedizin

10. 09.2003 Ärztliche Vorprüfung
29.04.2008 Ärztliche Prüfung
08.05.2008 Approbation als Ärztin