

Die Bedeutung des calciumaktivierten Chloridkanals TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biologe Christoph Heinze
geboren am 25.01.1984 in Weimar

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Christian A. Hübner
2. Prof. Dr. rer. nat. Aria Baniahmad
3. Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.05.2015

Abkürzungsverzeichnis

2.Ab	engl. <i>secondary antibody</i> (Sekundärantikörper)
ADH	antidiuretisches Hormon
ANP	atriales natriuretisches Protein
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
Ano	Anoctamin
bp	engl. <i>base pairs</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CaCC	engl. <i>calcium activated chloride channel</i>
CaCCs	engl. <i>calcium activated chloride currents</i>
CD31	engl. <i>cluster of differentiation 31</i>
cDNA	engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenbis(oxyethylnitrilo)-tetraessigsäure
Ex21	Exon 21
EYFP	engl. <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i>
lox	engl. <i>flanked by loxP</i>
GPCR	engl. <i>G-protein-coupled-receptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-3-Phosphat
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
ko	Knockout
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
MLCK	engl. <i>myosin light chain kinase</i>
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Druck)
mN	Millinewton
mOsmol	Milliosmolarität
NGS	engl. <i>normal goat serum</i>
NKCC1	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter 1
P1	postnataler Tag 1
pA	Pikoampere
PBS	engl. <i>physiological buffer solution</i>
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
pF	Pikofarad
PFA	Paraformaldehyd
PSS	engl. <i>physiological salt solution</i>
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PIP ₂	Phospho-Inositol-2-Phosphat
PL-C	Proteinlipase-C

Abkürzungsverzeichnis

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	engl. <i>relative centrifugal force</i>
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
siRNA	engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMA	engl. <i>smooth muscle actin</i>
SMMHC	engl. <i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
SOC	engl. <i>super optimal broth</i>
TM	Transmembrandomäne
TMEM16	Transmembranprotein16
TN-Puffer	Tris-NaCl Puffer
U46619	Bezeichnung eines synthetisches Prostaglandinanalogen
VGCC	engl. <i>voltage gated calcium channel</i>
w/o	engl. <i>without</i> (ohne)
wt	engl. <i>wildtype</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	2
2.1 Physiologische Grundlagen der Blutdruckregulation	2
2.1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	3
2.1.2 Der Mechanismus der Gefäßkontraktion	4
2.2 Arterielle Hypertonie.....	6
2.2.1 Therapiemöglichkeiten arterieller Hypertonie	8
2.2.2 Calciumaktivierte Chloridkanäle als potentielles Target zur Behandlung arterieller Hypertonie	9
2.3 TMEM16A und seine Familienmitglieder	10
2.4 TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen	12
2.5 TMEM16A bei der Konstriktion arterieller Gefäße	13
3. Zielsetzung	14
4. Material und Methoden.....	15
4.1 PCR-Mutagenese und Generierung eines TMEM16A-cDNA-Plasmides ohne Exon 21	16
4.2 Tiermodelle und Genotypisierung	18
4.3 DNA-Extraktion und Genotypisierung.....	20
4.4 Proteinisolation und Western Blot	20
4.5 Zellkultur und Transfektion	22
4.6 Gewebedarstellung und histologische Färbung	22
4.7 Immunhistochemische Analysen	23
4.7.1 Immunhistochemie an HEK293T Zellen	23

4.7.2	Immunhistochemie an Kryoschnitten	24
4.7.3	Immunhistochemie der Retina, Gehirn- und Muskelschnitte.....	24
4.8	Radiotelemetrische Blutdruckmessungen	25
4.9	Herz-Ultraschalluntersuchungen	26
4.10	Blutanalyse und Analyse der renalen Funktion	26
4.11	Kontraktilitätsmessungen	27
4.11.1	Myographie an isolierten Gefäßen.....	27
4.11.2	Videomikroskopie von kleinen Mesenterialgefäßen.....	28
4.11.3	Kontraktionsmessungen retinaler Arteriolen	29
4.12	Isolation glatter Muskelzellen und retinale „ <i>tissue prints</i> “	29
4.13	Elektrophysiologie von glatten Muskelzellen	31
4.14	Perfusion des isolierten Gefäßsystems der Hintergliedmaße.....	32
4.15	Statistische Auswertung	33
5.	Ergebnisse	34
5.1	Identifizierung einer funktionellen Domäne von TMEM16A.....	34
5.2	Konditionale Inaktivierung von TMEM16A.....	39
5.3	Induzierbare Expression der Cre-Rekombinase in glatten Gefäßmuskelzellen	41
5.4	Konditionale Inaktivierung von TMEM16A durch SMMHC-CreER ^{T2}	42
5.4.1	Veränderte Expression von TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen	42
5.4.2	Analyse struktureller Veränderungen der Gefäße von induzierten- <i>Tmem16a</i> -Knockout-Tieren.....	44
5.4.3	TMEM16A vermittelt CaCCs in Gefäßmuskelzellen	45
5.5	Untersuchung der Herzfunktion und telemetrische Blutdruckmessungen an induzierten- <i>Tmem16a</i> -Knockout-Tieren.....	47
5.6	Analyse von Blutplasmaparametern.....	53
5.7	Bestimmung renaler Parameter	54
5.8	Konstriktionsmessungen an arteriellen Gefäßen.....	54

Inhaltsverzeichnis

5.9	Die Expression von TMEM16A in mikrovaskulären Systemen	56
5.10	TMEM16A vermittelt CaCCs in Perizyten im murinen Hirn	58
5.11	TMEM16A vermittelt CaCCs und Konstriktion in kleinen retinalen Gefäßen	59
5.12	TMEM16A vermittelt CaCCs in Perizyten des Skelettmuskels und beeinflusst den peripheren Widerstand	61
6.	Diskussion	64
6.1	TMEM16A und seine Funktion als calciumaktivierter Chloridkanal	64
6.2	Induzierbare konditionale Inaktivierung von TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen	65
6.3	Konditionale Inaktivierung von TMEM16A in Gefäßmuskelzellen verringert den mittleren arteriellen Blutdruck	68
6.4	TMEM16A ist an der aortalen – jedoch nicht an der mesenterialen – Konstriktion beteiligt.....	71
6.5	TMEM16A in mikrovaskulären Systemen vermittelt Kontraktilität kleinster Arteriolen durch CaCCs und beeinflusst den peripheren Widerstand	72
7.	Schlussfolgerung.....	76
8.	Literaturverzeichnis	78
Anhang	92
	<i>Curriculum vitae</i>	92
	Danksagung.....	93
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	95

1. Zusammenfassung

Der arterielle Blutdruck wird durch das Herzzeitvolumen und den peripheren Widerstand des Gefäßsystems bestimmt. Dieser hängt wesentlich vom Tonus kleiner Arteriolen ab, die ihren Durchmesser durch Kontraktion ihrer glatten Muskelzellen verändern können. Die Kontraktion wird durch eine Membrandepolarisation vermittelt, an dem eine calciumaktivierte Chloridleitfähigkeit beteiligt ist. Die Depolarisation führt über Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration, die wiederum Voraussetzung für die Kontraktion der Gefäße ist. Verschiedene Studien deuteten darauf hin, dass der calciumaktivierte Chloridkanal TMEM16A die Leitfähigkeit in vaskulären glatten Muskelzellen vermittelt. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von TMEM16A für die Blutdruckregulation zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass TMEM16A nicht gleichmäßig entlang des Gefäßbaums exprimiert ist. Vielmehr zeigte sich eine starke Expression in der Aorta, nicht aber in kleineren arteriellen Gefäßen. Besonders stark ist TMEM16A auch in den kleinsten Arteriolen und präkapillären Gefäßen exprimiert. Die Größe der calciumaktivierten Chloridleitfähigkeit korreliert mit dem Expressionsniveau von TMEM16A. Die gezielte Inaktivierung von TMEM16A in Gefäßmuskelzellen führt zum Verlust dieser Chloridleitfähigkeit. Gefäßmuskelspezifische TMEM16A defiziente Tiere zeigen einem Blutdruckabfall, ohne Veränderungen hormoneller, kardialer oder renaler Parameter aufzuweisen. Zudem war die blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin II in induzierten Knockout-Tieren deutlich abgeschwächt. Im Gegensatz zur Aorta und kleinen retinalen Arteriolen konnte in Mesenterialgefäßen keine veränderte Gefäßkontraktilität durch konstriktiv wirkende Agonisten beobachtet werden. TMEM16A ist jedoch notwendig für die Kontraktilität peripherer Blutgefäße, denn diese war in isolierten perfundierten Hinterläufen induzierter Knockout-Tiere durch Applikation von U46619 reduziert. Daher könnte TMEM16A ein vielversprechendes pharmakologisches Target für die Behandlung der arteriellen Hypertonie darstellen.

2. Einleitung

2.1 Physiologische Grundlagen der Blutdruckregulation

Der Blutdruck gibt Auskunft über die Kraft, mit der das zirkulierende Blut gegen die Wände der arteriellen Gefäße drückt (Lawes *et al.* 2004). Das Herz muss das gesamte Blut in seiner viskosen Beschaffenheit durch das sich verjüngende und zunehmend verzweigtere Geflecht der Gefäße pumpen. Dabei nehmen verschiedene Faktoren entscheidend Einfluss auf die Druckbildung. Das Herzzeitvolumen ist ein Maß für die Pumpleistung des Herzen und ergibt sich aus dem Schlagvolumen und der –frequenz (Schrader 2001). Umso höher das Herzzeitvolumen ist, umso mehr Blut wird in die Peripherie der Gefäße gepumpt und führt zu einem Druckanstieg. Ein erhöhtes zirkulierendes Blutvolumen bewirkt ebenfalls einen Anstieg des Blutdrucks. Die Stromstärke des Blutes hängt weiterhin ab von der Druckdifferenz im Gefäßsystem, dem Strömungswiderstand und vom Gefäßquerschnitt (Huppelsberg & Walter, 2013). Ein Anstieg der zytosolischer Calciumkonzentration, vor allem durch einen extrazellulären Einstrom in vaskulären glatten Muskelzellen, führt zur Kontraktion dieser Zellen und erhöht den myogenen Gefäßtonus (Silbernagl & Despopoulos 2012). Ein erhöhter Tonus und der damit verringerte Gefäßdurchmesser erschweren den Transport des Blutes durch die Gefäße und führen zu einem Druckanstieg. Eine ausgeglichene Balance der verschiedenen Faktoren ist notwendig um einen stabilen und angemessenen Blutdruck zu gewährleisten. Darüber hinaus hat der Körper verschiedene Möglichkeiten den Druck zu regulieren (Huppelsberg & Walter, 2013). Mit Hilfe von Baro- und Dehnungsrezeptoren können bspw. Änderungen der Körperlage registriert werden und der Körper kann kurzfristig über den Sympathikus regulatorisch eingreifen. Eine mittelfristige Regulation wird durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) erreicht, indem Rezeptoren in der Niere deren Durchblutung erkennen und bei einem Druckabfall das RAAS aktivieren. Die langfristige Regulation greift in den Wasser- und Elektrolythaushalt ein (Huppelsberg & Walter, 2013). Dabei kommen zusätzlich zum RAAS weitere hormonelle Einflüsse zum Tragen. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) bspw., das aufgrund eines erhöhten Blutvolumens und Druck auf die Herzvorhöfe ausgeschüttet wird, bewirkt eine erhöhte Flüssigkeitsausscheidung durch die

Nieren. Eine gegenläufige Regulation wird mitunter durch das antidiuretische Hormon (ADH) aus der Hypophyse erzielt, welches die Flüssigkeitsrückresorption fördert.

2.1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Dieses System stellt eine hormonelle Kaskade dar, die physiologisch durch einen erniedrigten Druck und eine damit verbundene verringerte Nierendurchblutung in Gang gesetzt wird (Abb.1). Sie bewirkt die Ausschüttung von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere (Huppelsberg & Walter, 2013), was das hepatisch gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I umwandelt. Dieses wiederum wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE, engl. Angiotensin I *converting enzyme*) aus dem Epithel der Lunge und der Niere in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II aktiviert durch Rezeptorbindung Signalmechanismen in verschiedenen Geweben, die unter anderem durch eine

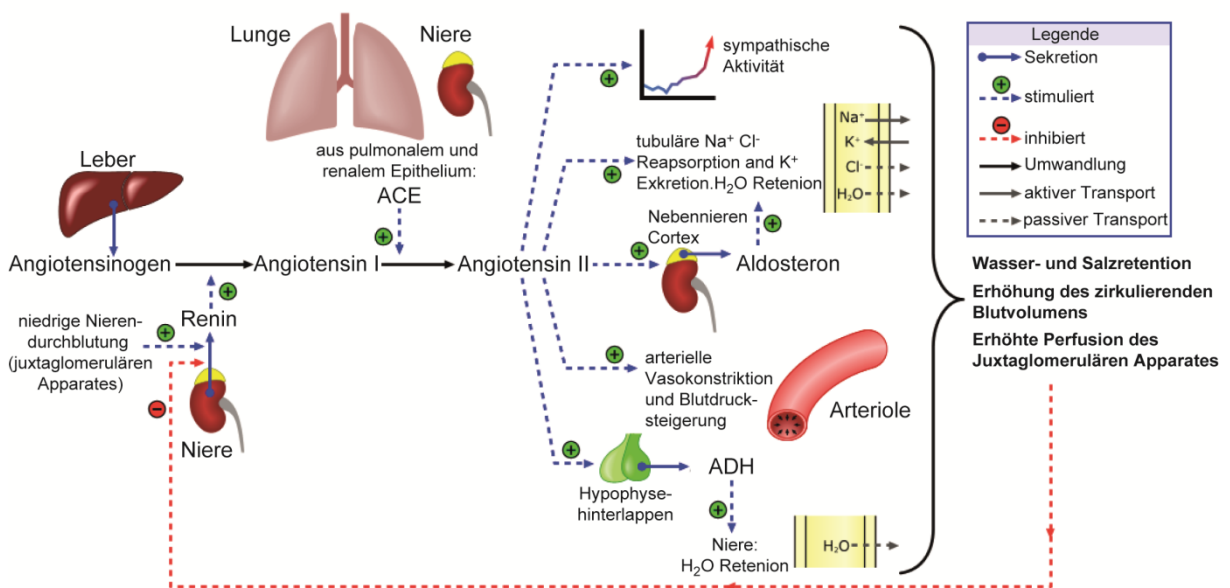


Abb.1: Übersicht über das RAAS. Die hormonelle Kaskade zur Bildung von Angiotensin II bewirkt durch die Aktivierung verschiedener Prozesse die Erhöhung des Blutdrucks. Durch negative Rückkopplung wird die Kaskade reguliert und bleibt im Gleichgewicht. ACE: Angiotensin-konvertierendes Hormon; ADH: Antidiuretisches Hormon (Bildquelle: modifiziert nach http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png)

gesteigerte Wasser- und Salzretention zu einem erhöhten Blutvolumen führen und den Blutdruck steigern. Dadurch wird der juxtaglomeruläre Apparat in der Niere stärker durchblutet und bewirkt somit eine negative Rückkopplung. Mit Hilfe von

Inhibitoren von Renin, ACE und des Angiotensin II-Rezeptors ist es möglich der Kaskade und der Blutdrucksteigerung entgegenzuwirken (Barreras *et al.* 2003).

2.1.2 Der Mechanismus der Gefäßkontraktion

Der Gefäßtonus ist bedingt durch den Kontraktionszustand glatter vaskulärer Gefäßmuskelzellen. Diese Zellen bilden die *Tunica media*, die mittlere Schicht der Blutgefäße. Sie wird von der innen liegenden *Tunica intima* und außen von der *Tunica adventitia* umschlossen. Durch verschiedene Ionen-Transportsysteme, wie den Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1 (NKCC1) und den Anionenaustauscher 2 (AE2, engl. *anion exchanger*) wird Chlorid in glatten Muskelzellen angereichert (Matchkov *et al.* 2012, Orlov *et al.* 2010, Brosius *et al.* 1997, Abb.2). Dadurch ist das Gleichgewichtspotential für Chlorid positiver als das Ruhemembranpotential glatter Muskelzellen (Matchkov 2010). Vasokonstriktive Agonisten, wie das physiologische Angiotensin II bewirken über G-Proteingekoppelter-Rezeptoren (GPCR) eine Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen ($G\alpha_{12,13}$, $G\alpha_q$), die eine intrazelluläre Kaskade in Gang setzen (Busse *et al.* 2007,

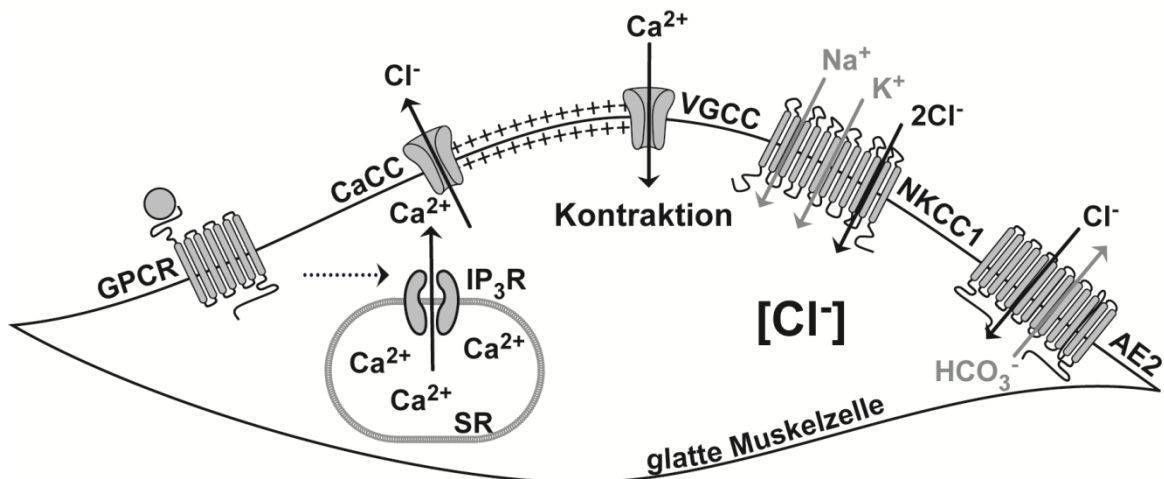


Abb.2: Mechanismus der CaCCs vermittelten Kontraktion. Durch die Ionen-Transportsysteme NKCC1 und AE2 reichert sich Chlorid in glatten Muskelzellen an. Die durch G-Protein-gekoppelten-Rezeptor (GPCR) gesteuerte Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) bewirkt die Aktivierung calciumaktivierter Chloridkanäle (CaCC). Der Chloridausstrom bewirkt eine Depolarisation der Membran und öffnet spannungsgesteuerte Calciumkanäle (VGCC), wodurch der Calciumeinstrom zur Kontraktion der Zelle führt.

Wynne *et al.* 2009). Über $G\alpha_q$ führt die Rezeptoraktivierung in glatten Muskelzellen zur Aktivierung der Proteinlipase C (PLC) und dadurch zur Bildung der *second*

Messenger Inositol-3-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). IP₃ bindet an seinen Rezeptor am sarkoplasmatischen Retikulum und bewirkt die Freisetzung von Calcium aus diesem zellinternen Calciumspeicher (Abb.2). Calcium öffnet calciumaktivierte Chloridkanäle (CaCC) und Chlorid strömt entlang seines elektrochemischen Gradienten nach außen. Der Ausstrom dieser Anionen bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran und öffnet spannungsgesteuerte Calciumkanäle (VGCC, engl. *voltage gated calcium channel*). Calcium strömt entlang des Konzentrationsgefälles in die Zellen und erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration. Calcium bewirkt eine Konformationsänderung von Calmodulin und ermöglicht dessen Bindung an die Myosin-Leichte-Kette-Kinase (MLCK, engl. *myosin light chain kinase*, Abb.3a). Dieser aktive Calmodulin-MLCK-Komplex ist nun in der Lage Myosin zu phosphorylieren. Durch diesen Schritt ist die Interaktion mit dem Aktinfilament möglich, welches sich verkürzt und somit zur Kontraktion der Zelle führt (Abb.3b).

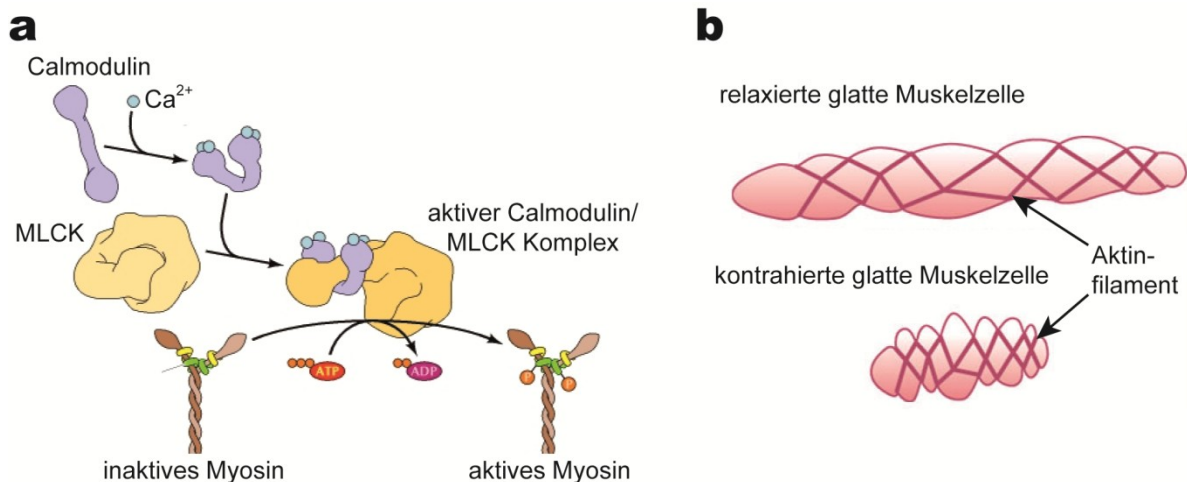


Abb.3: Kontraktionsmechanismus. (a) Durch die calciumvermittelte Konformationsänderung von Calmodulin wird der Calmodulin-Myosin-Leichte-Kette-Kinase-Komplex (MLCK) aktiviert und ermöglicht die Phosphorylierung und Aktivierung von Myosin. Somit wird die Interaktion mit dem (b) Aktinfilament ermöglicht und die glatte Muskelzelle kontrahiert. (Bildquelle: modifiziert nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9961/bin/ch11f28.jpg> und <http://static.ddmcdn.com/gif/muscle-smooth-contracted.jpg>).

Zudem gibt es weitere intrazelluläre Mechanismen, welche die Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen unterstützen. Der ebenfalls durch die PLC gebildete *second Messenger* DAG kann die verschiedenen Isoformen der

Proteinkinase C, PKC α , PKC β und PKC ϵ , die in vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben sind, aktivieren und führt zur direkten Aktivierung der MLCK und der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Wynne *et al.* 2009). Die PKC aktiviert auch den Myosinphosphataseinhibitor CPI-17, einen Mechanismus, der für die Calciumsensitivierung in vorkontrahierten Gefäßen verantwortlich ist (Busse *et al.* 2007). G $\alpha_{12,13}$ reguliert zusätzlich über Rho-GTP und Rho-Kinase die Myosinphosphatase und unterstützt damit die Kontraktion (Busse *et al.* 2007). Darüber hinaus gibt es verschiedene nachgeschaltete Targets der PKC Kaskade, wie bspw. Aktinbindeproteine oder Calciumsensitive Kaliumkanäle (Jaggar *et al.* 2000), die Einfluss auf die Kontraktion nehmen können.

2.2 Arterielle Hypertonie

Verschiedene pathophysiologische Faktoren können zu Störungen des Hormonsystems, des Herz-Kreislauf-Systems und der Niere führen und somit die Blutdruckregulation beeinflussen und sich als Krankheit manifestieren. Zu den Störungen zählen unter anderem eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems und eine Überproduktion verschiedener Blutdruck erhöhender Hormone (Oparil *et al.* 2003). Diese sind vor allem Natrium-retinierende Hormone, Vasokonstriktoren und Renin. Eine erhöhte Reninsekretion führt wiederum über eine vermehrte Produktion von Angiotensin II und Aldosteron zu einem dauerhaft hochregulierten RAAS. Des Weiteren können ein Mangel an Vasodilatoren, eine erhöhte Aktivität vaskulärer Wachstumsfaktoren, genetische Variationen und Mutationen, sowie Veränderungen des zellulären Ionentransports den Blutdruck erhöhen (Oparil *et al.* 2003, Abb.4). Diese genannten Umstände führen zu einem erhöhten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und haben einen Druckanstieg zur Folge.

Die arterielle Hypertonie bezeichnet die dauerhafte Erhöhung des Blutdrucks und wird daher auch umgangssprachlich als Bluthochdruck bezeichnet. Als normale Blutdruckwerte gelten ein systolischer Druck (während der Herzkontraktion) von <130 mmHg und ein diastolischer Druck (während der Herzrelaxation) von <85 mmHg. Von einer arteriellen Hypertonie wird gesprochen, wenn der systolische Druck ≥ 140 mmHg oder der diastolische ≥ 90 mmHg liegt (Mancia *et al.*

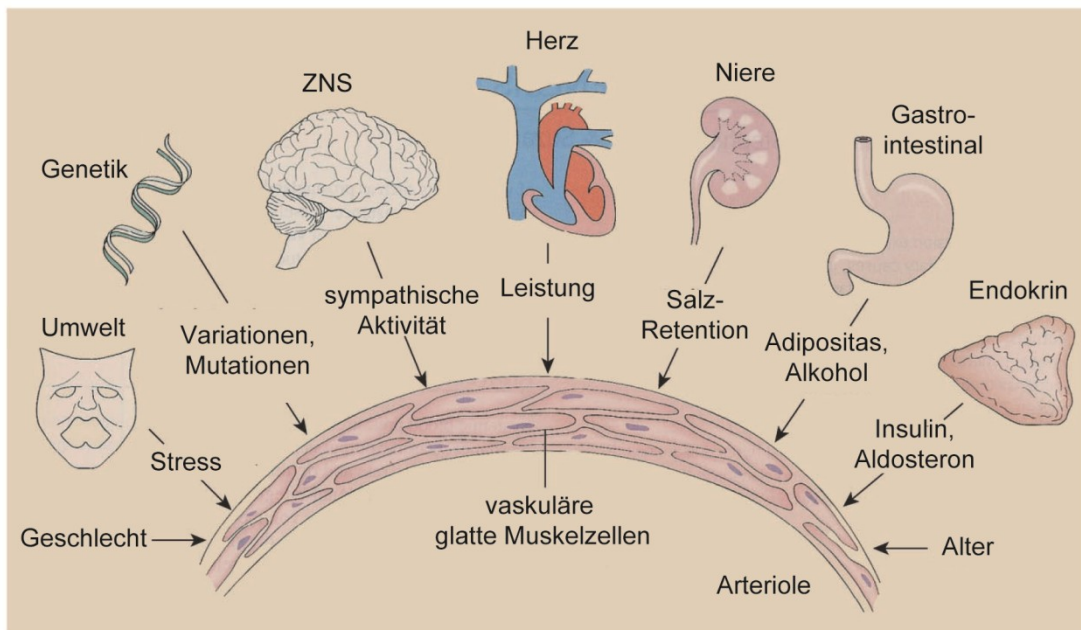


Abb.4: Pathophysiologische Faktoren, die zur Entstehung einer arteriellen Hypertonie beitragen können. (Bildquelle: modifiziert nach Oparil *et al.* 2003)

2013). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organisation*) zählt ein erhöhter Blutdruck als Risikofaktor und Hauptursache für kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit zur Haupttodesursache (Mancia *et al.* 2007). Eine arterielle Hypertonie kann durch Arteriosklerose Organe schädigen, begünstigt die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und kann zu koronarer Herzkrankheit, Schlaganfall, Nierenversagen bis hin zum Tode führen (Johnson *et al.* 2008, Antikainen *et al.* 1998). Weltweit sind etwa eine Milliarde Menschen von arterieller Hypertonie betroffen und es wird postuliert, dass der Anteil in den nächsten Jahren weiter zunehmen wird (Kearney *et al.* 2005). Dabei steigt das Erkrankungsrisiko in der Bevölkerung mit zunehmendem Alter unabhängig vom Geschlecht (Abb.5).

In bis zu 95% der Fälle von arterieller Hypertonie handelt es sich um eine sogenannte primäre Hypertonie, auch essentielle oder idiopathische Hypertonie genannt. Adipositas, Insulinresistenz, hoher Alkoholkonsum, übertriebener Salzkonsum, Stress oder mangelnde Bewegung sind begünstigende Faktoren für einen zu hohen Blutdruck. Über genetische Variationen, die bei Hypertonie eine

Prozentuale Verteilung der Personen mit arterieller Hypertonie

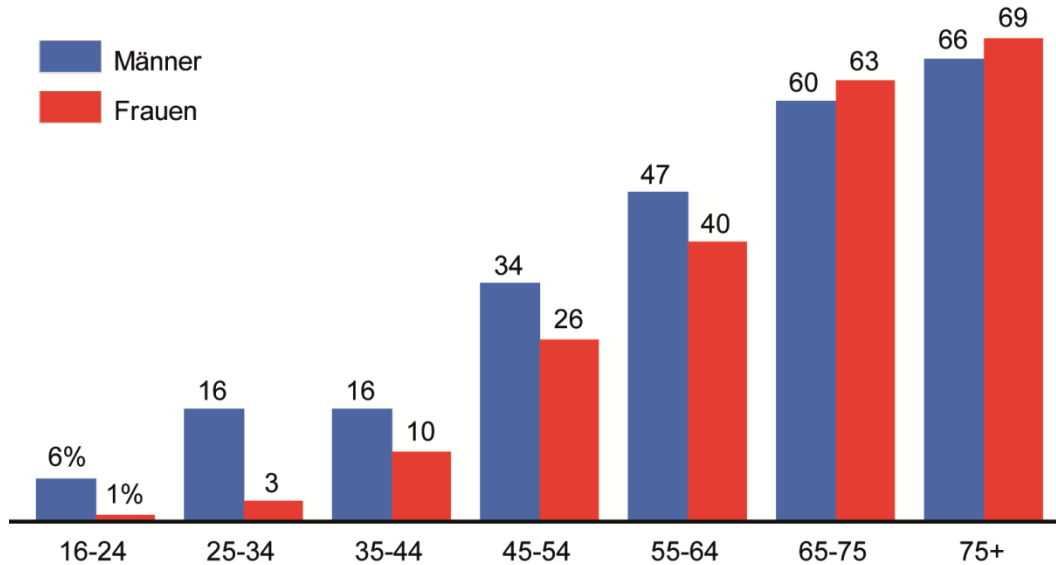


Abb.5: Verteilung des Anteils von Frauen und Männer in der Bevölkerung mit Bluthochdruck im Alter. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil von Frauen und Männern mit arterieller Hypertonie. (Bildquelle modifiziert nach Craig *et al.* 2006).

Rolle spielen könnten, ist hingegen wenig bekannt (Carretero *et al.* 2000). Bei einer sekundären Hypertonie kommt es aufgrund einer anderen Erkrankung zur Ausprägung einer arteriellen Hypertonie (Carretero *et al.* 2000). Beispiele hierfür sind: Renovaskuläre Erkrankungen, Phäochromozytome, Aldosteronismus oder andere monogene Erkrankungen.

2.2.1 Therapiemöglichkeiten arterieller Hypertonie

Um einer arteriellen Hypertonie vorzubeugen, ist auf einen angemessenen und gesunden Lebensstil zu achten (Mancia *et al.* 2013). Im Falle eines Bluthochdruckes sollten Änderungen der Lebensweise immer einer medikamentösen Therapie vorangestellt werden. Klinische Studien belegen, dass ein veränderter Lebensstil einen blutdrucksenkenden Effekt haben kann, der mit einer pharmakologischen Einzeltherapie vergleichbar ist (Elmer *et al.* 2006, Dickinson *et al.* 2006).

Da situationsbedingt eine rasche Therapie notwendig sein kann oder die Umstellung des Lebensstiles nicht ausreicht, um den Blutdruck zu normalisieren, gibt es auch verschiedene pharmakologische Ansatzpunkte, dies zu erreichen. Eine Möglichkeit stellen die sogenannten Betablocker dar. Sie reduzieren die

hormonelle Wirkung in den durch das sympathische Nervensystem gesteuerten Organen und Geweben wie Herz, glatte Muskelzellen, Luftwegen, Arterien und Nieren (Gorre *et al.* 2010). Durch Diuretika kann eine vermehrte Wasser- und Salzausscheidung erreicht und somit das Blutvolumen und der Druck gesenkt werden (Sarafides *et al.* 2010). Calcium-Antagonisten verhindern den Einstrom von Calciumionen in die glatten Muskelzellen der Gefäße und verringern somit deren Konstriktion (Singh 1986). Außerdem gibt es die Möglichkeit, die Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems an den verschiedenen Stellen durch Inhibitoren von Renin, ACE und des Angiotensin II-Rezeptors zu mindern.

Derartige Monotherapien sind nicht immer erfolgreich. Daher besteht des Weiteren die Möglichkeit einer Kombinationstherapie mit verschiedenen antihypertensiven Präparaten und Wirkstoffklassen. Dennoch kommt es in bis zu 30% der Bluthochdruckpatienten zu einer resistenten Hypertonie (Mancia *et al.* 2013). Hierbei besteht trotz verbesserter Lebensweise und medikamentöser Therapie eines Diuretikums und zwei zusätzlicher Wirkstoffe ein systolischer und diastolischer Druck ≥ 140 und ≥ 90 mmHg (Mancia *et al.* 2013) und macht die Entwicklung neuer Therapieansätze erforderlich.

2.2.2 Calciumaktivierte Chloridkanäle als potentielles Target zur Behandlung arterieller Hypertonie

Bedingt durch die stetig steigende Anzahl von Menschen, die an arterieller Hypertonie leiden und die hohe Rate an Therapieresistenzen, ist es notwendig, die hierfür grundlegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen ist bekannt, dass calciumaktivierte Chloridströme (CaCCs) bei verschiedenen physiologischen Mechanismen von großer Bedeutung sind. Sie unterstützen z.B. die epitheliale Sekretion, die Signalweiterleitung von olfaktorischen Rezeptoren, Photorezeptoren, und Neuronen (Galiotta *et al.* 2009, Abb.6). Darüber hinaus vermitteln sie durch Depolarisation die Kontraktion glatter Muskelzellen, die zu einer Konstriktion arterieller Gefäße führt (Large *et al.* 1996). Die CaCCs in glatten Muskelzellen sind wesentlich höher als die korrespondierende Leitfähigkeit in Herz- oder Skelettmuskel (Kitamura & Yamazaki 2001). Somit könnte die Unterdrückung dieser Chloridströme in diesen Zellen ein vielversprechender Ansatz sein, einen

dilatierenden Effekt der Gefäße zu bewirken und dadurch zur Senkung des Blutdrucks beizutragen.

Die molekulare Identität der Kanäle, die CaCCs vermitteln, war lange Zeit nicht aufgeklärt. Im Jahre 2008 gelang mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Identifikation von TMEM16A als calciumaktivierten Chloridkanal (CaCC, Caputo *et al.* 2008, Schroeder *et al.* 2008, Yang *et al.* 2008).

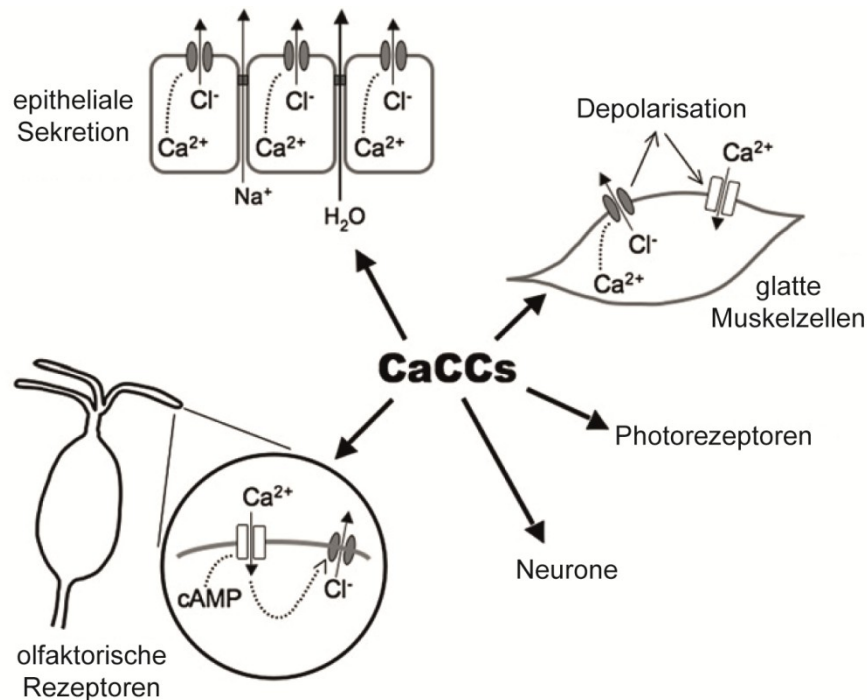


Abb.6: Die Bedeutung von CaCCs bei physiologischen Prozessen. CaCCs sind an verschiedenen physiologischen Mechanismen beteiligt und vermitteln unter anderem die epitheliale Sekretion, die Weiterleitung verschiedener Signale und die Kontraktion glatter Muskelzellen. (Bildquelle: modifiziert nach Galietta *et al.* 2009)

2.3 TMEM16A und seine Familienmitglieder

Als Teil einer zehn Mitglieder umfassenden Genfamilie (TMEM16A-K), welche evolutionär durch verschiedene Genduplikation entstanden ist (Milenkovic *et al.* 2010), konnte bislang nur für TMEM16A und B gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, CaCCs zu erzeugen (Schroeder *et al.* 2008, Stephan *et al.* 2009). Andere Familienmitglieder wie TMEM16F, TMEM16J oder TMEM16K könnten andere Chloridkanäle repräsentieren, die sich hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften und Regulationsmechanismen unterscheiden (Caputo *et al.* 2008).

Möglich sind aber auch völlig andere Funktionsweisen. Aufgrund der einheitlich vorhergesagten Topologie mit acht Transmembrandomänen (TM) und zytosolischen N- und C-Terminus innerhalb der Genfamilie werden die TMEM16 auch als Anoctamine (ANO1-10) bezeichnet. Die Familienmitglieder besitzen eine potentielle Dimerisierungsdomäne im N-Terminus, die für die Funktion notwendig sein könnte (Tien *et al.* 2013). Die Region von TM 5 bis einschließlich TM 6 ist zwischen den Familienmitgliedern hoch konserviert. Aufgrund der dort befindlichen amphiphilen Aminosäuren wird postuliert, dass dieser Bereich in die Membran ragt, aber diese nicht durchspannt und somit wichtig für die Porenbildung sein könnte (Yang *et al.* 2008).

Von TMEM16A können verschiedene Isoformen gebildet werden, die durch alternatives Spleißen oder unter Verwendung eines alternativen Promotors entstehen. Diesen werden veränderte Eigenschaften hinsichtlich Calciumsensitivität und Anionenleitfähigkeit zugeschrieben (Ferrera *et al.* 2009). TMEM16A spielt physiologisch eine essentielle und vielseitige Rolle. Konstitutive *Tmem16a*-Knockout-Tiere versterben innerhalb der ersten postnatalen Wochen. Dabei zeigen sie tracheale Fehlbildungen und Entwicklungsdefizite (Rock *et al.* 2008). Weiterhin wird TMEM16A in kleinen Spinalganglien exprimiert (Liu *et al.* 2010). Daher könnte dieser CaCC auch an der Schmerzweiterleitung beteiligt sein. TMEM16A ist ebenfalls in verschiedenen Tumoren hochreguliert (West *et al.* 2004, Carles *et al.* 2006). Dabei ist TMEM16A auch unter dem Namen DOG1 (*Discovered On GIST-1*), ORAOV2 (*Oral cancer Overexpressed*) und TAOS-2 (*Tumor Amplified and Overexpressed*) bekannt und könnte als diagnostischer Biomarker eingesetzt werden. Es wird spekuliert, dass die Hochregulation von TMEM16A in den Tumoren die Proliferation und Migration krankhafter Zellen fördert (Duran & Hartzell 2011).

Die weiteren TMEM16 Familienmitglieder könnten bei anderen biologischen Funktionen und Mechanismen eine Rolle spielen. Beispielsweise wird für TMEM16B vermutet, dass dieser CaCC bei der olfaktorischer Signalweiterleitung eine entscheidende Rolle spielt (Rasche *et al.* 2010). Jedoch sind konstitutive TMEM16B Knockout-Tiere in ihrer Geruchswahrnehmung nicht beeinträchtigt (Billig *et al.* 2011). TMEM16C scheint bei der Regulation der Schmerzweiterleitung der Spinalganglien beteiligt zu sein, indem er mit einem Natrium-aktivierenden Kaliumkanal interagiert und seine Natriumsensitivität und Kanalaktivität moduliert

(Huang *et al.* 2013). TMEM16C Knockout-Ratten zeigten stark reduzierte natriumaktivierte Kaliumströme und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Hitze und mechanosensitiven Einwirkungen. Mutationen in TMEM16E sind mit gnathodiphysealer Dysplasie (Mizuta *et al.* 2007) und verschiedenen Muskel-Dystrophien assoziiert (Bolduc *et al.* 2010). Beim seltenen Scott Syndrom, das durch eine gestörte Blutkoagulation gekennzeichnet ist, konnten Mutationen in TMEM16F detektiert werden, die mit einer Phospholipid-Scramblase Aktivität assoziiert sind (Suzuki *et al.* 2010). Zusätzlich vermag TMEM16F eine Leitfähigkeit von Kation zu vermitteln (Yang *et al.* 2012). TMEM16G wird in der Prostata exprimiert und könnte bei Prostatakrebs als nützlicher Tumormarker verwendet werden (Cereda *et al.* 2010). Bei autosomal rezessiven zerebralen Ataxien mit Gangveränderungen, Augenzittern und Artikulationsstörungen wurden genetische Veränderungen von TMEM16J nachgewiesen (Vermeer *et al.* 2010).

2.4 TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen

TMEM16A wird in glatten Muskelzellen verschiedener muriner Gefäße und der menschlichen Aorta exprimiert und vermittelt CaCCs (Davis *et al.* 2010, Manoury *et al.* 2010). Die Expression von TMEM16B ist im Vergleich dazu verschwindend gering (Manoury *et al.* 2010). Es wurden von TMEM16A verschiedene Spleißvarianten in den glatten Muskelzellen der murinen Portalvene gefunden, die als Homo- oder Heterodimere interagieren könnten (Ohshiro *et al.* 2013). Für die Funktion als CaCC scheint weniger eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen notwendig zu sein, als vielmehr die Interaktion mit Calmodulin (Tian *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang konnte ein regulatorisches Calmodulin-Bindungsmotiv im N-Terminus von TMEM16A identifiziert werden (Vocke *et al.* 2013). In nozizeptorischen Neuronen wurde eine GPCR-induzierte Calciumfreisetzung aus zellinternen Speichern beschrieben, die zur Aktivierung von TMEM16A führt (Jin *et al.* 2013). Dabei wurde gezeigt, dass der C-Terminus und der erste intrazelluläre Abschnitt von TMEM16A in der Lage sind mit dem IP₃-Rezeptor zu interagieren. Diese Interaktion scheint für die GPCR-induzierte Signalweiterleitung über TMEM16A notwendig zu sein, denn eine Unterdrückung dieser interagierenden Mikrodomänen verhinderte diese GPCR-induzierte Aktivierung. Diese Ergebnisse beschreiben eine Funktionsweise von TMEM16A, wie sie analog auch in

vaskulären glatten Muskelzellen wahrscheinlich ist. Somit könnte TMEM16A als CaCC maßgeblich zur Kontraktion vaskulärer Muskelzellen beitragen.

2.5 TMEM16A bei der Konstriktion arterieller Gefäße

Verschiedene Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von TMEM16A in glatten Gefäßmuskelzellen bestätigen die Hypothese, dass dieser CaCC an der Gefäßkonstriktion beteiligt zu sein scheint. Die Herunterregulation von TMEM16A durch siRNA-Transfektion in Ratten zeigte *in vivo* eine verminderte Kontraktion kleiner Mesenterialgefäße (Dam *et al.* 2013). Weiterhin wurde bei einer experimentell induzierten pulmonalen Hypertonie eine gesteigerte Expression von TMEM16A gefunden, die zu verstärkten CaCCs und zu einer stärkeren Kontraktion der Pulmonalarterie führt (Forrest *et al.* 2012). Weitere Untersuchungen glatter Gefäßmuskelzellen zerebraler Arterien von Ratten zeigten die Expression von TMEM16A mit charakteristischen CaCCs, während andere TMEM16-Familienmitglieder nicht detektierbar waren (Thomas-Gatewood *et al.* 2011). Analysen von Ratten mit induzierter Hypertonie offenbarten reduzierte CaCCs in isolierten vaskulären Muskelzellen der Basilararterie, die mit einer reduzierten Expression von TMEM16A korrelierten (Wang *et al.* 2012). Des Weiteren konnten in dieser Studie Strukturveränderungen der Gefäßwände beobachtet werden, die auf eine Rolle von TMEM16A als negativer Regulator der Zellproliferation hindeuten. Somit könnte TMEM16A an der Hypertonie-induzierten zerebrovaskulären Remodellierung beteiligt sein. Es konnte bereits ein potentieller Inhibitor für TMEM16A identifiziert werden, der die CaCCs in vaskulären glatten Muskelzellen unterbindet und zur Relaxation muriner und humaner Gefäße führt (Davis *et al.* 2013).

Somit gibt es verschiedene Hinweise, dass TMEM16A und die dadurch vermittelten CaCCs in vaskulären glatten Muskelzellen Einfluss auf die Konstriktion arterieller Gefäße haben und den Gefäßtonus beeinflussen. Eine Inhibition dieser Ströme könnte den Tonus herabsetzen und zu einer Senkung des Blutdrucks führen. Daher stellt TMEM16A ein potentielles pharmakologisches Target dar, das zur Behandlung arterieller Hypertonie beitragen könnte.

3. Zielsetzung

Der myogene Tonus beschreibt den Kontraktionszustand vaskulärer glatter Muskelzellen. Ein erhöhter myogener Gefäßtonus trägt entscheidend zum Anstieg des Blutdrucks bei und kann zur arteriellen Hypertonie führen. Die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten sind mitunter durch ein hohes Maß an Therapieversagen beschränkt, weshalb weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Gefäßkontraktion notwendig sind um neue mögliche Angriffspunkte zu identifizieren.

Verschiedene Studien liefern Hinweise, dass TMEM16A als calciumaktivierter Chloridkanal eine wichtige Rolle zum Kontraktionsmechanismus beiträgt (Forrest *et al.* 2012, Davis *et al.* 2013, Dam *et al.* 2013). Daher war das zentrale Ziel dieser Arbeit, die Rolle von TMEM16A für die Blutdruckregulation mit Hilfe eines induzierbaren konditionalen Knockouts von *Tmem16a* in vaskulären glatten Muskelzellen aufzuklären. Hierfür sollte zunächst durch Überexpressionsstudien und mit einem konstitutiven Knockout von *Tmem16a* ein funktionell wichtiger Abschnitt von *Tmem16a* molekularbiologisch identifiziert und ausgeschaltet werden. Anschließend war es notwendig das konditionale Mausmodell auf molekularer, elektrophysiologischer und funktioneller Ebene auf Spezifität zu untersuchen. Mit Hilfe von telemetrischen Blutdruckmessungen sollte nachfolgend die Bedeutung von TMEM16A für den arteriellen Blutdruck überprüft werden.

4. Material und Methoden

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des Thüringer Landesamts für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, des Berliner Landesamts für Gesundheit und Soziales und der Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen durchgeführt.

Die nachfolgend mitaufgeführten Methoden der radiotelemetrischen Blutdruckmessungen, Herz-Ultraschalluntersuchungen sowie die Nierenfunktionsuntersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Anika Seniuk und Dr. Helga Vitzthum aus dem Institut von Prof. Dr. Heimo Ehmke für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorfs. In Kollaboration mit Agnieszka Klementowicz und Dr. Maxim Sokolov aus der AG Signal- und Transportprozesse von Dr. Björn Schröder des Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch wurde die Isolation glatter Muskelzellen mit elektrophysiologischen Analysen, die Perfusionsuntersuchungen der Hintergliedmaßen, die Immunhistochemie der Mikrozirkulationssysteme und die Kontraktionsmessungen retinaler Arteriolen durchgeführt. Die weiteren Konstriktionsmessungen durch Myographie und Videomikroskopie erfolgte durch Unterstützung von Johanna Schleifenbaum und István A. Szijártó aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maik Gollasch der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin in Berlin.

4.1 PCR-Mutagenese und Generierung eines TMEM16A-cDNA-Plasmides ohne Exon 21

Die Exzision des zwischen den Familienmitgliedern hoch konserviertem Exon 21 von *Tmem16a* aus einem cDNA-Plasmides (IMAGE Consortium cDNA clone 30547439) wurde durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) realisiert. Neben der Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) kamen folgende Primer zum Einsatz:

Tabelle 1: Verwendete Primer mit Sequenz für die PCR-Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz
T16A_BspEI_fwd	5'-GGT CGG CCC GGT GAC TAC GTG TAC-3'
T16A_BspEI_rev	5'-GGA TGT TAT ACC AGA TGC TCA TTT CCA TGT ACT CGG-3'
T16A_KpnI_fwd	5'-GCA TCT GGT ATA ACA TCC TCA GAG GTG TTG G-3'
T16A_KpnI_rev	5'-CCA TGG TGG CGA CCG GTG GAT CC-3'

Die PCR, bei der zwei DNA Fragmente entstanden, erfolgte im Thermocycler (T3000, Biometra). Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: 98°C 5 min, 35 Zyklen 98°C 30 sec, 66°C 30 sec, 72°C 35 sec und abschließend 2 min 72°C (Abb.7 PCR 1). Das T16A_BspEI-Fragment beinhaltete den letzten Abschnitt von Exon 20 und die ersten 18 Basen von Exon 22. Das T16A_KpnI-Fragment enthielt den Teil ab Exon 22. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit 1x DNA-Ladepuffer (6x DNA-Ladepuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt und mittels 1%igem Agarosegels (LE Agarose, Biozym in 1x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA)) aufgetrennt. Es enthielt Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/µl Ethidiumbromidlösung, Roth) zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht.

Anschließend erfolgte die Extraktion beider die Fragmente mit einem Gel-DNA-Extraktionskit (Zymoclean) entsprechend den Herstellerangaben. Die Fragmente wurden nun in einer PCR und den Primern T16A_BspI_fwd und T16A_KpnI_rev verwendet, um ein Fragment zu erhalten, das einen Abschnitt von TMEM16A ohne Exon 21 darstellte (Abb.7 PCR 2). Das Fragment und das TMEM16A Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI (Fermentas) und Kpn2I (BspEI, Fermentas) in KpnI Puffer (Fermentas) über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Verdaus gelelektrophoretisch. Nach

Gelextraktion dephosphorylierte die alkalischer Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific) bei 37°C für 1 h das einzelsträngige Plasmid. Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (Fermentas) über Nacht bei 4°C (Abb.7 Ligation).

Das Plasmid wurde dann in XL-1 Blue kompetente *E.coli* Bakterien durch 2minütiger Inkubation bei 37°C und 2 min auf Eis transformiert. Nach Zugabe von SOC-Medium (0,5% Hefe-Extrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7.0) folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C unter Bewegung. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der Suspension auf Kanamycin-LB Platten (0,5% Hefe-Extrakt, 1% Trypton, 1% NaCl, 1,5% Agar mit 50mg/ml Kanamycin). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien selektiert und Minikulturen in LB-Medium mit Kanamycin (0,5% Hefe-Extrakt, 1% Trypton, 1% NaCl, mit 50mg/ml Kanamycin) angesetzt.

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Minikulturen geschah mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kitl (Peqlab) entsprechend der Herstellerangaben. Ein Testverdau mit PstI (Fermentas) diente zur Kontrolle des Plasmids. Zusätzlich wurde das Plasmid mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequenzier Kit (Life Technologies), der Primer T16A_BspEI_fwd, T16A_KpnI_rev und des PCR Programms (96°C 60 sec und 28 Zyklen 96°C 10 sec, 55°C 8 sec und 60°C 4 min) amplifiziert. Danach folgte die DNA Präzipitation der PCR-Produkte durch Zugabe von 10% 3 M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2,5fachen Volumen Ethanol. Durch anschließende Zentrifugation bei 16900 rcf pelletierte die DNA und wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Sequenzanalyse der Proben durch einen 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die cDNA aus beiden Plasmiden wurde dann in einen bicistronischen pIRES-EGFP Vektor (Clontech) transferiert.

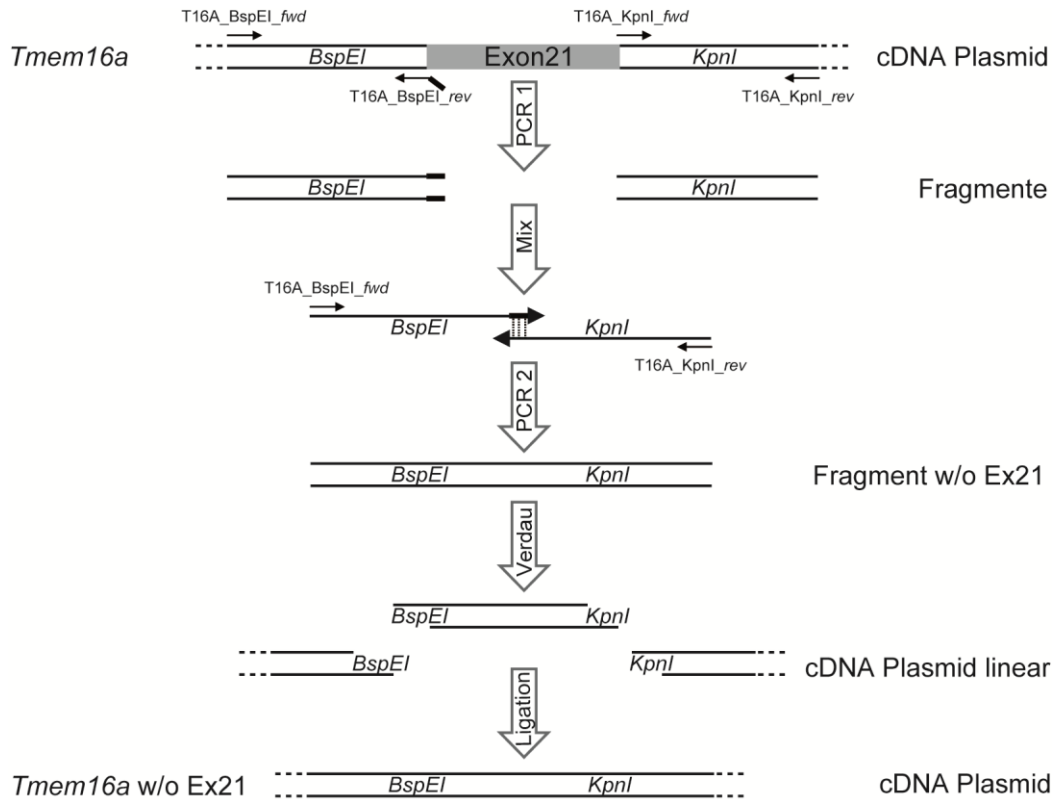


Abb.7: Schematische Erläuterung der PCR-Mutagenese. Dargestellt sind die Primer mit denen aus dem cDNA Plasmid für TMEM16A durch PCR 1 ein DNA-Fragment vor Exon 21 mit Überhang vom Exon 22 und eins ab Exon 22 generiert wurde. Aus dem Mix beider Fragmente und anschließender PCR 2 entstand ein DNA-Fragment ohne Exon 21 (Fragment w/o Ex21). Durch den Restriktionsverdau des Fragments ohne Exon 21 und des Ausgangsplasmids mit BspEI und KpnI wurde durch Ligation beider ein cDNA Plasmid für TMEM16A ohne Exon 21 erzeugt.

4.2 Tiermodelle und Genotypisierung

Ein konditionales Knockout-Mausmodell mit nachstehender *targeting* Strategie (Abb.8) wurde im Labor generiert und war verfügbar. Die Genotypisierung erfolgte mit den Primern T16A_loxP_fwd, T16A_loxP_rev und T16A_KO_fwd (Tabelle 2). Zur Überprüfung der Funktionalität dieses konditionalen *Tmem16a* Knockout-Tiermodells auf seine Funktionalität, wurde eine *Cre-Deleter* Linie (Schwenk *et al.* 1995) eingekreuzt. Dadurch konnte der Phänotyp der resultierenden konstitutiven knockout-Tiere mit den bereits beschriebenen verglichen werden (Rock *et al.*

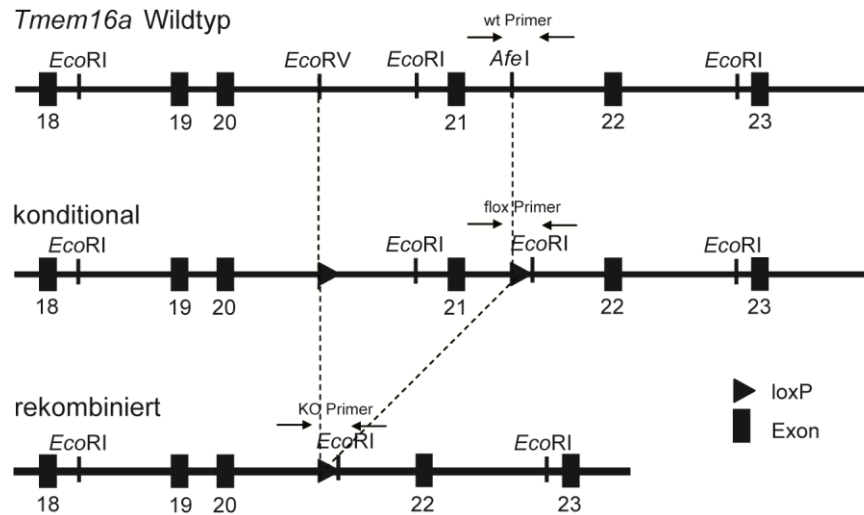


Abb.8: Konditionale *Tmem16a* Strategie. Genomischer Locus für *Tmem16a*; über die Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *AfeI* wurden *loxP-sites* eingefügt, welche die durch Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des dazwischen liegenden Bereiches bewirken.

2008) und ermöglichte die Durchführung entsprechender Kontrollversuche. Für die gezielte und induzierbare Inaktivierung von TMEM16A in vaskulären Muskelzellen wurde die konditionale Linie separat mit SMMHC-CreER^{T2}-Tieren verpaart (Wirth *et al.* 2008). Diese Mauslinie erlaubt eine induzierbare Rekombination durch die Applikation von Tamoxifen. Tamoxifen wurde in der vorliegenden Arbeit vier Wochen lang adulten Tieren über das Futter (LASCRdietTM CreActive TAM400) verabreicht (Kiermayer *et al.* 2006). Die Genotypisierung von SMMHC-CreER^{T2} erfolgte mit den beschriebenen Primern SMWT1, SMWT2 und phCREAS1 (Tabelle 2).

Zur Verifizierung der Funktionalität der SMMHC-CreER^{T2} Linie nach Applikation von Tamoxifen wurde diese mit einer beschriebenen EYFP-Reporter-Linie verpaart (Srinivas *et al.* 2001). Die Überprüfung der genetischen Insertion erfolgte mit den Primern EYFP-*fwd*, (EYFP-*wt-rev* und EYFP-*mutant-rev* (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Primer mit Sequenz für die Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz
T16A_loxP- <i>fwd</i>	5'-CTC GGT GTG GGA CTA TGA ACC-3'
T16A_loxP- <i>rev</i>	5'-CAG ATA CAC CCA GTG TTT CTC C-3'
T16A_KO- <i>fwd</i>	5'-CTC AGG CTC CCA TGA TCC TC-3'
SMWT1	5'-TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC-3'
SMWT2	5'-AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC-3'

phCREAS1	5'-AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT-3'
EYFP- <i>fwd</i>	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'
EYFP- <i>wt-rev</i>	5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3'
EYFP- <i>mutant-rev</i>	5'-AAG ACC GCG AAG AGT TTG TC-3'

4.3 DNA-Extraktion und Genotypisierung

Für die Genotypisierung kam aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA zum Einsatz. Die relevanten DNA-Abschnitte wurden durch PCR amplifiziert und mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die genomische DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien wurde mit der sogenannten HotSHOT-Methode durchgeführt. Dabei wurden Schwanzbiopsien mit alkalischem Lysepuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) 30 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es folgte die Neutralisierung des DNA-Extrakts durch Zugabe der gleichen Menge Neutralisierungspuffer (40 mM Tris-HCl). Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Verwendung bei 4°C.

Die PCR wurde mit dem 100 mM dNTP Set (Invitrogen) und der *Taq* Polymerase (Invitrogen) im Thermocycler (T3000, Biometra) durchgeführt. Die Amplifizierung der DNA Abschnitte erfolgt mit einer sogenannten *Touchdown* PCR, die die Bildung unspezifischer Produkte vermeidet. Das PCR-Programm lautete: 3 Zyklen 94°C 30 sec, 63°C 30 sec, 72°C 1 min, 3 Zyklen 94°C 30 sec, 61°C 30 sec, 72°C 30 sec und 30 Zyklen 94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit 1x DNA-Ladepuffer (6x DNA-Ladepuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt und mittels 1,5 bis 2%igem Agarosegels (LE Agarose, Biozym in 1x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA)), welches mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/µl Ethidiumbromidlösung, Roth) versetzte wurde, aufgetrennt. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte unter UV-Licht.

4.4 Proteinisolation und Western Blot

Die murinen Gewebe wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 2,5 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂O₄, 1 mM PMSF, inklusive

Roche Protease Inhibitor Cocktail) homogenisiert. Anschließend folgte eine 30minütige Ultraschallbehandlung in einem eiskalten Wasserbad (DK 156 BP, Bandelin electronic). Danach wurden die Proben bei 3100 rcf und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Proteingehalt bestimmt (Pierce BCA Protein Assay Kit). 10 µg Protein wurde mittels 8%igem SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Durchführung des Blots erfolgte mit einem Mini-PROTEAN®3 System (Biorad), dabei bestand der Transferpuffer aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% Methanol. Der Transfer wurde anschließend mit Ponceau-Färbung (10 min in 0,5% Ponceau S in 1% Essigsäurelösung) kontrolliert und 1 h bei RT mit Blockierlösung (3% Trockenmilch in TBS-T) inkubiert. Die Inkubation der verschiedenen primären Antikörper (Tabelle 3) geschah unter ständiger Bewegung über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (1-3% Trockenmilch in TBS-T). Nach drei 10minütigen Waschschritten mit TBS-T folgte die Inkubation mit entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 3) in Blockierlösung. Danach wurden die Membranen 4 mal 15 min mit TBS-T und einmal mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit ECL-Lösung (Millipore) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Image Quant LAS 4000 System (GE Healthcare) oder mit Hilfe von Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Western Blot Analysen mit entsprechender Verdünnung

Antikörper Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Verdünnung
Rabbit anti-TMEM16A	Abcam	ab53212	1 : 500
Rabbit anti-TMEM16A		Ep16A2GB Fr2	1 : 500
Rabbit anti-EGFP	Abcam	ab6556	1 : 1000
Mouse anti-Actin	Santa Cruz	sc47778	1 : 2000
Rabbit anti-Tubulin	Abcam	ab15246	1 : 5000
anti-Rabbit HRP gekoppelt	Amersham	NA9340V	1 : 2000
anti-Mouse HRP gekoppelt	Amersham	NA9310V	1 : 2000

4.5 Zellkultur und Transfektion

HEK293T Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) in 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin in DMEM kultiviert. Die Transfektion (2,5 µg DNA pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte, Greiner) mit IRES-EGFP-Plasmiden, die für das native *Tmem16a* oder das *Tmem16a* ohne Exon 21 kodierten, erfolgte mit Lipofectamin (2000 reagent, Invitrogen). Zusätzlich kodierten die Plasmide für EGFP, das durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) parallel translatiert wurde.

Für Western Blot Analysen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Lysepuffer versetzt und geerntet. Für immunhistochemische Färbungen erfolgte die Fixierung mit 4%igem PFA.

4.6 Gewebedarstellung und histologische Färbung

Für die bessere strukturelle Darstellung und Abgrenzung bestimmter Gewebebestandteile wurden die *Cartilago trachealis* der Trachea mit einer Alcianblau-Lösung gefärbt, die im sauren Milieu Proteoglykane färbt.

Nach der Präparation der Tracheen wurden diese über Nacht in 4%igem PFA in PBS bei 4°C fixiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit ddH₂O und eine 15minütige Inkubation mit einer 1%igem Alcianblau 8 GS (C.I. 74240, Roth) in 3% Essigsäurelösung pH 2,5. Danach folgten drei Waschschriffe mit ddH₂O. Durch 30%iger Saccharoselösung wurde das Gewebe entwässert und mit Tissue-Tec® O.C.T. Compound auf Trockeneis gefroren um 10 µm Kryoschnitte anzufertigen. Diese wurden anschließen mit Leitungswasser rehydriert und durch wässrige 0,5%iger Eosin G-Lösung (X883, Roth) gefärbt um zelluläre Strukturen besser sichtbar zu machen.

Für die strukturelle Analyse von arteriellen Gefäßen erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung von 20 µm dicken Kryoschnitten. Hierfür wurden die Schnitte mit destillierten Wasser rehydriert und anschließend 5 min mit Hämalaunlösung nach Mayer (T865, Roth) inkubiert. Danach folgte ein Waschschriff in destilliertem Wasser und ein 15minütiges Bläuen in fließendem Leitungswasser. Nach 2minütigem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Eosin G-Lösung 3 min inkubiert, mit Leitungswasser gespült und in einer aufsteigender

Alkoholreihe (70-96-100%, Xylol) entwässert. Das Eindecken der Schnitte geschah mit Entellan (107961, Merck). Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (VHX-600, Keyence).

4.7 Immunhistochemische Analysen

4.7.1 Immunhistochemie an HEK293T Zellen

Die Zellen wurden für immunhistochemische Untersuchungen auf 14 mm Deckgläschen kultiviert und nach Transfektion mit 4%igem PFA in PBS für 10 min fixiert. Nach drei anschließenden Waschschritten mit PBS folgte ein Blockierungsschritt der Zellen mit 5% NGS, 0,25% TritonX-100 in PBS 1 h bei RT und die Inkubation der jeweiligen primären Antikörper (Tabelle 4) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrritte mit PBS und die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (2 h bei RT, Tabelle 4). Danach folgten ein Waschschrtritt mit PBS und die Inkubation mit Hoechst33258 (1:10000 in PBS, Molecular Probes) für 10 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount-G™ (Southern Biotech) eingedeckt, mit Nagellack versiegelt und am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SP5) ausgewertet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Analysen mit entsprechender Verdünnung

Antikörper Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Verdünnung
Rabbit anti-TMEM16A	Abcam	ab53212	1 : 250
Rabbit anti-TMEM16A		Ep16A2GB Fr2	1 : 250
Rabbit anti-EGFP	Abcam	ab6556	1 : 500
Rat anti-CD31	BioLegend	MEC13.3	1 : 1000
Mouse anti-smooth muscle Actin	Thermo Scientific	MA5-11547	1 : 500
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) –Cy5	Dianova	111-175-144	1 : 1000
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11008	1 : 1000
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 546	Invitrogen	A-11035	1 : 1000
Goat anti-Rat Alexa Fluor 555	Invitrogen	A-21434	1 : 1000
Goat anti-Rat Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11006	1 : 1000
Donkey anti-Mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11001	1 : 500

4.7.2 Immunhistochemie an Kryoschnitten

Die verschiedenen arteriellen Gefäße wurden präpariert und mit 4%igem PFA in PBS bei 4°C über Nacht fixiert. Nach Dehydrierung mit 30%iger Succrose in PBS wurden die Gefäße mit Tissue-Tec® O.C.T. Compound auf Trockeneis gefroren und 20 µm dicke Gefrierschnitte am Kryostat (Leica CM 1850) angefertigt. Anschließend folgte eine Hydrierung mit PBS und die Überführung in eine Shandon-Kassette (Shandon Coverplate und Sequenza® Slide Rack). Danach wurden die Schnitte analog der unter 4.7.1 beschriebenen Methode behandelt.

4.7.3 Immunhistochemie der Retina, Gehirn- und Muskelschnitte

Die Immunhistochemie der Retina erfolgte durch post mortem entfernte Augen, von durch zervikale Dislokation abgetöteten Tieren und Präparation der Netzhäute in Ringer-Lösung (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-Glucose, 5 mM HEPES, pH 7,4). Für die Übersichtsdarstellung der Retinae wurden diese flach auf ein schwarzes Filterpapier (Millipore AABP02500) ausgebreitet, bei der die Photorezeptorseite nach unten zeigte. Anschließend folgte ein Fixierungsschritt des Gewebes mit 4% PFA in 0,1fachem PBS für 20 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in TN-Puffer (150 mM NaCl, Tris-HCl, pH 7,6) wurden die Präparate mit 3%igem *donkey serum*, 1% BSA, 0,25% Triton-X100 und 0,02% NaN₃ in TN-Puffer über Nacht geblockt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tabelle 4) erfolgte in der Blocklösung für 5 Tage bei 4°C, anschließend folgten ein einstündiger Waschschrift mit TN-Puffer bei RT und die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (Tabelle 4). Das Eindecken der Präparate erfolgte mit ProLong® Gold Antifade Reagent (Life Technology). Die Auswertung geschah durch ein Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Observer Z1), das mit einer CoolSNAP HQ² Kamera (Photometrics) ausgestattet war. Mit Hilfe der Metamorph Acquisition Software (Universal Imaging) erfolgte das Zusammenfügen der Aufnahmen.

Die Gehirne wurden vorsichtig entfernt, mit eiskaltem TN-Puffer gespült und 300 µm dicke Vibratonschnitte (Leica VT1200S) angefertigt. Anschließend folgte ein Fixierungsschritt mit 4%igem PFA in 0,1fachen PBS für 20 bis 30 min bei RT, ein Waschschrift mit TN-Puffer und es wurde wie oben bereits beschrieben weiter verfahren.

Für Schnitte des *Musculus extensor digitorum longus* erfolgte die Präparation aus den Hinterläufen der Tiere. Anschließend wurden die Muskeln in 2,5%iger SeaPlaque® GTG® Agarose (Cambrex) eingebettet und wie oben beschrieben, Vibratomschnitte gefertigt und immunhistochemisch aufgearbeitet.

4.8 Radiotelemetrische Blutdruckmessungen

Die telemetrische Blutdruckmessung ist eine direkte und stressfreie Methode, bei der das Tier nach Implantation des Transmitters nicht fixiert oder narkotisiert werden muss. Dabei übermittelt der implantierte Sender die Daten über einen Receiver an einen Computer, während sich das Tier im Käfig frei bewegen kann.

Für die Implantation der Sender wurden Tiere mit einem Minimalgewicht von 23 g durch intraperitoneale Injektion eines auf das Körpergewicht angepasstem Ketamin/Xylazin-Gemisches betäubt. Die Transmitter (Physiotel PA-C10, Data Science International) wurden subkutan platziert, wobei der Katheter des Transmitters in das Lumen des *Arcus aortae* (Aortenbogen) über eine Inzision der *Arteria carotis communis* gelegt wurde (Abb.9). Nach einer postoperativen Regenerationszeit von 10 d wurde mit den telemetrischen Messungen begonnen (Dataquest A.R.T. Software für Acquisition und Analyse).

Die Gabe von Angiotensin II durch subkutan implantierten osmotische Minipumpen (Alzet, Modell 1002) erfolgte mit nachstehender Dosierung: 1,5 ng Angiotensin II pro Gramm Körpergewicht und Stunde. Diese Dosis wurde über einem Zeitraum von 14 d verabreicht.

Für den Einfluss von Niedrigsalz- und Hochsalz-Diäten auf den Blutdruck wurden die Tiere mit modifiziertem Spezialfutter (C1036, Altromin) ernährt. Dazu wurde herkömmliches Futter (Rod16-A, LASQCdiet®Rod16) wie folgt modifiziert: 3 g Na⁺/kg (Kontrolldiät), 0,2 g Na⁺/kg (Niedrigsalzdiät) oder 30 g Na⁺/kg (Hochsalzdiät).

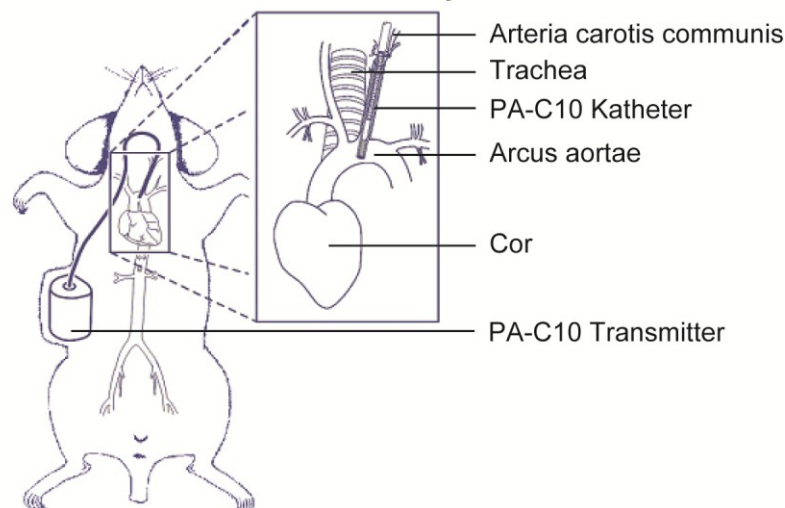


Abb.9: Schematische Darstellung der Implantation der PA-C10 Transmitter. Der Katheter des PA-C10 Transmitters wurde über die Arteria carotis communis in den Aortenbogen (Arcus aortae) gelegt. Der Transmitter selbst wurde subkutan in einer ventralen Tasche platziert. (Bildquelle modifiziert von <http://tulane.edu/som/departments/physiology/telemetry-blood-pressure.cfm>)

4.9 Herz-Ultraschalluntersuchungen

Zur Untersuchung kardialer Veränderungen, die einen Einfluss auf den Blutdruck haben könnten, wurden die Tiere mit Isofluran betäubt. Anschließend erfolgte die transthorakale Echokardiographie (Vevo 2100 System, VisualSonics). Die Untersuchung wurde vor Beginn der Tamoxifenapplikation und nach zweiwöchiger Auswaschphase durchgeführt.

4.10 Blutanalyse und Analyse der renalen Funktion

Um die Konzentration bzw. Aktivitäten verschiedener blutdruckrelevanter Hormone im Blut zu bekommen, erfolgte eine neuntägige Eingewöhnung der Tiere mit Druckluft für eine stressfreie Blutentnahme. Eine Stunde vor Beginn der Nachtphase wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und das Blut retro-orbital in EDTA beschichtete Gefäße (Fisher Scientific) entnommen. Die Trennung des Plasmas erfolgte durch Zentrifugation.

Als Substrat für die Plasma-Renin-Aktivität diente dabei das Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten. Das gewonnene Plasma der Mäuse wurde unmittelbar nach der Blutabnahme verdünnt, mit Substrat versetzt und bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Die Umwandlung von Proangiotensin in Angiotensin I erfolgte durch

einen Radioimmunassay (RIA, Byk & DiaSorin Diagnostics). Die spezifische Umwandlung bei 37°C wurde durch die unspezifische bei 4°C korrigiert. Die Aldosteron-Bestimmung erfolgte ebenfalls mit einem RIA (Siemens). Die Werte für das atriale natriuretische Protein (ANP) wurden mittels Enzym Immunassay (EIA, Phoenix Pharmaceuticals) und für Angiotensin II durch eine *enzyme-linked immunosorbant assay* (ELISA, ENZO Life Science) ermittelt.

Die Bestimmung der Blutgas-, Elektrolyt- und Hämatokritwerte aus den Blutproben geschah mit Hilfe eines Blutgasanalysegeräts (ABL90, Radiometer) und Elektrolyt Analyser (SPOTCHEM EL SE/1520, Arkray) direkt aus den Blutproben der Isofluran-anästhesierten Tieren.

Für die Untersuchung der renalen Funktion wurden die Tiere jeweils einzeln für vier Tage in metabolischen Käfigen (Typ 304, Tecniplast) gehalten und der Urin der letzten 24 h am letzten Tag für die Messungen verwendet.

4.11 Kontraktilitätsmessungen

4.11.1 Myographie an isolierten Gefäßen

Die Kontraktilität der *Aorta thoracica* und der *Arteria mesenterica superior* erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Myographen für kleine Gefäße (DMT 610M, Aarhus). Hierfür wurden dem Tier die genannten Gefäße post mortem entfernt und umgehend in 4°C kalte oxiginierte (95% O₂, 5% CO₂) physiologische Salzlösung (PSS: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM Mg₂SO₄, 11,1 mM D-Glucose, and 1,6 mM CaCl₂) transferiert. Anschließend folgte die Entfernung des perivaskulären Fetts und des Bindegewebes. Die Gefäße wurden in 2 mm breite Ringe geschnitten, auf zwei Stahldrähte (0,0394 mm Durchmesser) aufgezogen und in physiologischer Salzlösung inkubiert, die kontinuierlich mit einem Gasgemisch von 95% O₂ und 5% CO₂ begast und dadurch bei pH 7,4 und durch ein Wasserbad bei 37°C gehalten wurde. Die Aortenringe wurden mit einer Kraft von 2,94 mN (0,3 g) und die Mesenterialringe mit einem Spannungsäquivalent in den Myographen eingespannt, welches bei einem 0,9fachen Gefäßdurchmessers bei 100 mmHg generiert wurde, (Abb.10). Nach einer Äquilibrationszeit von 60 min wurden die Gefäßringe vor jedem Experiment mit initial 60 mM KCl-Lösung vorbehandelt und die Kontraktionskraft

bestimmt. Anschließend folgte die Behandlung mit Phenylephrin, U46619 und Angiotensin II in verschiedenen Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Chart5 (AD Instruments Ltd. Spechbach).

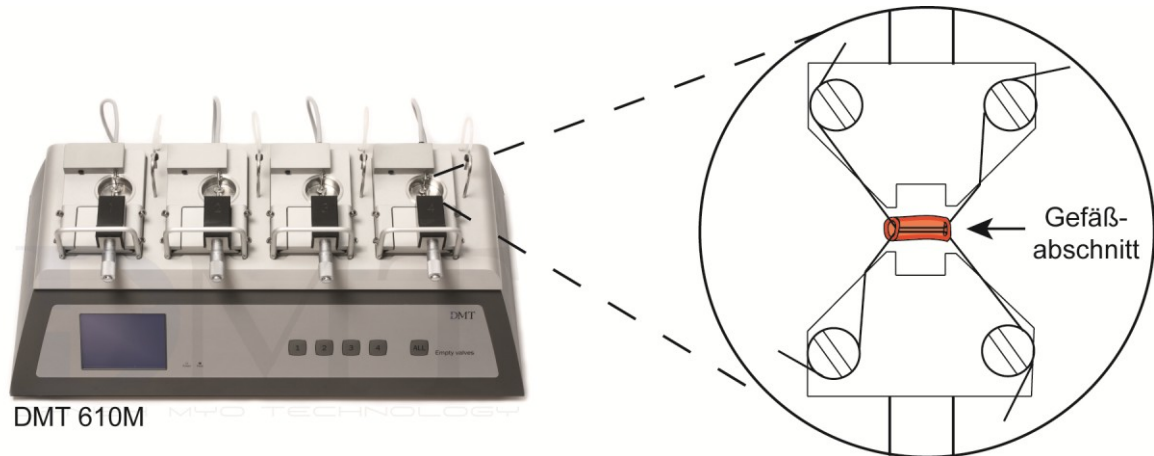


Abb.10: Kontraktilitätsmessung mit einem Myographen. Schematische Darstellung von der Kontraktionsmessung mit Hilfe eines DMT 610 Myographen von arteriellen Gefäßen. (Bildquelle modifiziert aus der Anleitung des DMT 610M)

4.11.2 Videomikroskopie von kleinen Mesenterialgefäßen

Die gesamten Mesenterialarterien wurde entfernt, von umliegendem Gewebe befreit und in 4°C kaltes oxigeniertes (95% O₂, 5% CO₂) PSS transferiert. Die einzelnen Mesenterialgefäße wurden anschließend auf Glaskanülen gesetzt, welche einen hydrostatischen Druck auf das Gefäß erlauben (Abb.11). Die Gefäße wurden fortwährend mit oxigenerter (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Henseleit-Lösung (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,6 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 0,03 mM EDTA, und 11,1 mM D-Glucose, pH 7,4) mit einer Temperatur von 37°C gespült. Mit dem Pressure Servo Control System (Living System Instrumentation) erfolgte die Anpassung an 20, 40, 60, 80 oder 100 mmHg. Der innere Gefäßdurchmesser wurde mit einem Videomikroskop (Nikon Diaphot, Düsseldorf, Deutschland) gemessen und die Daten mittels Analyse Programm (HaSoTec) erfasst. Die Gefäße wurden vor jedem Experiment 45-60 min äquilibriert und anschließend initial bei 80 mmHg mit 60 mM KCl behandelt. Danach folgten die Konstriktionsaufnahmen unter Zugabe von Phenylephrin, U46619 und Angiotensin II.

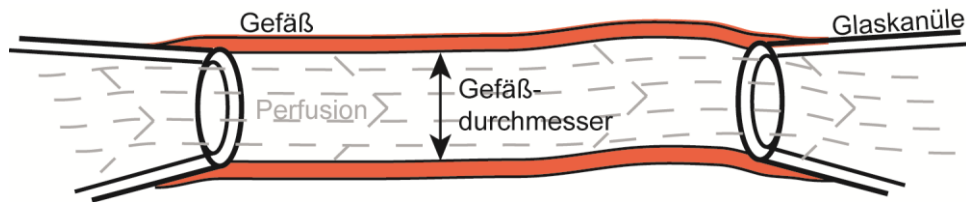


Abb.11: Prinzip der Videomikroskopie. Schematisch dargestellt ist die Anbringung der Gefäße auf Glaskanülen, die eine Perfusion des Gefäßes und die Bestimmung des inneren Gefäßdurchmessers durch ein Videomikroskop erlauben.

4.11.3 Kontraktionsmessungen retinaler Arteriolen

Die post mortem entfernten Augen von durch zervikale Dislokation getötet Tieren wurden in Ca^{2+} -freie Lösung (135 mM NaCl, 5 mM NaOH, 3 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1 μM Nifedipine, mit Succrose auf 300 mOsm eingestellt, pH 7,4) transferiert. Danach folgte die Entfernung der Cornea der Linse. Die Retina wurde vom Pigmentepithel gelöst und in 3 bis 4 gleiche Teile geschnitten und in eine Lösung (135 mM NaCl, 5 mM NaOH, 3 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1,8 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 10 mM D-Glucose, mit Succrose auf 300 mOsm eingestellt, pH 7,4) überführt. Anschließend folgte eine Äquilibration der Retinastücke bei RT und konstanter Zufuhr von CO_2 für mindestens 2 h. Danach wurden sie in eine Petrischale mit Deckgläschen überführt um die Konstriktion am Zeiss Observer Z1 mit einem 63fach Glycerol Immersions Objektiv aufzunehmen. Mit Hilfe der MetaMorph Software erfolgte das Zusammensetzen der Aufnahmen. Für jedes Retinateilstück wurden repräsentative Areale, die sekundäre und tertiäre Arteriolen umfassten, ausgewählt und alle 30 sec der Fokus nachjustiert. Alle 20 min erfolgte die Zugabe von U46619 in die Petrischale um die finalen Konzentrationen von 1, 3 und 10 nM zu erhalten. Für die Analyse der maximalen Gefäßkontraktion wurde die Durchmesser vor der Gabe der jeweiligen U46619 Konzentration und 20 min danach bestimmt.

4.12 Isolation glatter Muskelzellen und retinale „tissue prints“

Der *Aorta descendens*, die *Arteria carotis* und die *Arteria mesenterica superior* mit ihren Ästen wurden entfernt und in eiskalte Präparationslösung (70 mM NaCl, 1 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose, 100 mM Saccharose, 0,5 mg/l BSA, 8%

Glutamax, 10 mM HEPES, pH 7,4) überführt. In der Präparationslösung konnte das umliegende Gewebe entfernt, die Gefäße longitudinal geöffnet und das Präparat durch mehrmaliges Spülen von Blut befreit werden. Anschließend wurden die Präparate in Reaktionsgefäße mit 250 µl Verdauungslösung (0,25 mM Elastase (Sigma) und 0,7 mM Kollagenase Typ II (Sigma) in Präparationslösung) überführt und schüttelnd bei 350 rpm und 37°C 20 min inkubiert. Nach Wiederholung dieses Verdauungsschrittes in frischer Verdauungslösung folgte die Überführung der Gewebestücke in Präparationslösung und durch Trituieren die Vereinzelung mit Hilfe einer Pasteurpipette. Die dispensierten Zellen wurden bis zur Verwendung maximal 3 h auf Eis gelagert.

Für die Präparation von Mikrogefäßen aus der Retina wurde diese in Präparationslösung (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 10 mM Na-HEPES, 15 mM Mannitol, 5 mM Glucose, pH 7,4, eingestellt auf 310 mOsm mit Succrose) transferiert. Anschließend inkubierten sie in Verdauungslösung (2,5 ml Earl's balanced salt solution versetzt mit 0,5 mM EDTA, 250 U/ml DNaseI (Worthington), 3-4 U/ml Papain (Worthington), 2 mM Cystein) für 30 min bei 30°C. Der pH 7,4 wurde zuvor durch Zufuhr von 5% CO₂ eingestellt. Danach folgten die Überführung der retinalen Gewebe in Präparationslösung und die Separation in einzelne Quadranten, die jeweils eine der vier primären Arteriolen beinhalteten, die vom Sehnerveneintritt ausgehen. Auf den retinalen Quadranten, die mit der Photorezeptorseite nach unten ausgerichtet waren, wurde ein Deckgläschen positioniert und wieder abgenommen, wodurch Gefäße an dem Deckgläschen haften blieben. Dieser Druckschritt (engl.: *tissue print*) wurde bei allen Quadranten durchgeführt (nach Puro *et al.* 2012).

Die Präparation von Mikrogefäßen aus dem Gehirn erfolgte in der Präparationslösung (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 10 mM Na-HEPES, 15 mM Mannitol, 5 mM Glucose, pH 7,4, eingestellt auf 310 mOsm mit Succrose). Anschließend folgte die Separierung der Proben in 1% Kollagenase NB4 (Serva) und 1% Kollagenase Typ II (Worthington) in Präparationslösung 1 h bei 37°C. Das Trituieren zerkleinerte das Gewebe mechanisch weiter, die anschließend bis zur Messung in Präparationslösung bei Raumtemperatur lagerten.

Mikrogefäße vom Skelettmuskel wurden aus dem *Musculus triceps brachii* präpariert und die Rückstände und Bindegewebe in physiologischer Salzlösung

(PSS: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,6 mM CaCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, pH 7,4) entfernt und das Muskelgewebe vorsichtig zerkleinert. Anschließend folgte der Verdau der Gewebe in 2,4% Kollagenase Typ II, 16 mM Glutamax und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin in 10 ml physiologischer Salzlösung unter Bewegung bei 37°C. Danach folgte die Zugabe von 20 ml physiologischer Salzlösung, in der sie bis zur Messung gelagert wurden.

4.13 Elektrophysiologie von glatten Muskelzellen

Calciumaktivierte Chloridströme vaskulärer Muskelzellen, Perizyten und HEK293T Zellen wurden mittels Ganzzelleableitung (engl.: *whole-cell voltage patch clamp*) unter Verwendung eines EPC-10 Verstärker und PatchMaster Software (HEKA) registriert. Die extrazelluläre Lösung bestand aus 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1,4 mM CaCl₂, 20 mM TEA, 10 mM D-Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4. Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (1,5 mm äußerer und 1,2 mm innerer Durchmesser) gezogen, deren typische Impedanz bei 3 bis 4 MΩ lag. Die Lösung in den Pipetten beinhaltete 140 mM CsCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,4 mM CaCl₂, 10 mM HEDTA, 20 mM TEA, 10 mM HEPES und der pH von 7,2, der wurde mit CsOH eingestellt. Die Konzentration freier Calciumionen lag in dieser Lösung bei 600 nM, bestimmt durch ein NanoDrop 3300 Fluoreszenz Spektrometer (Thermo Fisher) und dem ratiomerischen Indikator Indo1 (Invitrogen). In einigen Experimenten wurde eine nahezu Calciumfreie Intrazellulärlösung ohne CaCl₂ durch Zugabe von 10 mM EGTA verwendet. Die jeweilige Osmolarität (intra- und extrazellulär) lag bei etwa 310 mOsm. Die Aufnahme der Ströme wurde bei RT durchgeführt. Das Membranpotential wurde bei -60 mV gehalten und die Bestimmung der Aktivierung der Ströme erfolgte durch Spannungssprünge von -80 zu +100 mV mit 20 mV Inkrement und einer Dauer von 1 s. Die Amplituden wurden am Ende des depolarisierenden Spannungspulses gemessen, da diese sogenannten *tail*-Ströme besser zur Quantifizierung geeignet sind. In manchen Zellen führte eine verlängerte Depolarisation allerdings zu einer Aktivierung auswärts rektifizierender Leitfähigkeiten, die jedoch keine Auswirkungen auf die *tail*-Ströme hatte. Die Amplitude der *tail*-Stromdichte, welche die Ströme nach Beendigung der Spannungspulse darstellen, wurde nach dem Spannungssprung

von -80 mV auf +80 mV oder +100 mV bestimmt und die *tail*-Stromdichte durch eine monoexponentielle Funktion mit der FitMaster Software (HEKA) angepasst.

Die extrazelluläre Lösung bei *patch clamp* Messungen an Perizyten unterschied sich im Vergleich zu der anderen. Sie bestand aus 135 mM NaCl, 5 mM NaOH, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 300 mOsm, bei pH 7,4, während die Pipettenlösung nicht verändert wurde.

Die Messungen von Perizyten aus Hirn und Skelettmuskel wurden an Zellen aus Gewebesuspensionen durchgeführt. Dafür erfolgte die Zugabe von 2,5 ml PSS (siehe Abschnitt 3.13) zu 0,5 ml der Gewebesuspension in einer Petrischale. Der Austausch der Lösung wurde mit Hilfe eines druckunterstützten Perfusionssystems (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments) durchgeführt.

Für perforierte Patch-Clamp Messungen, wodurch das Membranruhepotential bestimmt werden kann, wurde zu der Pipettenlösung (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM HEDTA, 10 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH eingestellt) Gramacidin (G5002, Sigma) zugegeben. Die finale Gramacidinkonzentration betrug 5 µg/ml.

4.14 Perfusion des isolierten Gefäßsystems der Hintergliedmaße

Angelehnt an die Beschreibung von Mossman *et al.* 2003 wurden die präparierten Hintergliedmaßen gründlich mit physiologischer Salzlösung (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4) perfundiert und bei 37°C in einem feuchten Milieu gehalten. Anschließend wurde die Femoralarterie kanüliert und mittels peristaltischer Pumpe ein konstanter Fluss von begaster (95% O₂, 5% CO₂) physiologischer Salzlösung angelegt. Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich mittels Druckwandler (Living Systems Instrumentation) bestimmt und in einem Polygraphen dargestellt. Nach einer Äquilibrationszeit von 10 min erfolgte die Einstellung der Flussrate auf einen Perfusionsdruck von 80 mmHg um einen natürlichen myogenen Tonus nachzuempfinden. Nach der Stabilisierung des Druckes wurden Bolusinjektionen von U46619 (20 oder 60 pmol in 200 µl Totalvolumen in physiologischer Salzlösung) appliziert und der Perfusionsdruck gemessen.

4.15 Statistische Auswertung

Die statistischen Tests erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student's t-Tests bzw. der Zwei-Wege-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Analyse. Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standart error of the mean*) wurden angegeben. Die Anzahl der verwendeten Tiere, Tierpräparate oder Zellen wurde mit „n“ angegeben.

5. Ergebnisse

5.1 Identifizierung einer funktionellen Domäne von TMEM16A

Für die Untersuchungen des calciumaktivierten Chloridkanal TMEM16A wurde eine konditionale Knockout-Mauslinie etabliert, die im Folgenden phänotypisch analysiert und beschrieben werden soll.

Zunächst wurde ein für die Proteinfunktion essentieller Abschnitt von TMEM16A gesucht. Basierend auf einem Alignment der Proteinsequenzen der gesamten TMEM16-Familie mittels ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) konnte im Exon 21 von *Tmem16a* eine hohe Homologie nachgewiesen werden (Abb.12). Dieser zwischen den Familienmitgliedern hoch konservierte Bereich lässt auf eine wichtige funktionelle Rolle schließen. Das Exon 21 von *Tmem16a* besteht aus 153 Basenpaaren und kodiert für 51 Aminosäuren. Das Fehlen dieses Exons hat daher keine Verschiebung des Leserasters mit einem vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge.

		Exon 21	
NP_848757	TMEM16A	YMEMIIQFGFVTLFVASFPLAPL FALLNNIIEIRLDAKKFVTELRRPV AI RAKDIGI WYN 819	
NP_705817	TMEM16B	YMEMIIQFGFVTLFVASFPLAPV FALLNNVIEVRLDAKKFVTELRRP DAVTKDIGI WFD 803	
NP_996914	TMEM16G	YLEMVLIQFGFVTIFVAACPLAPL FALLNNWVEIRLDARKFVCEYRRP V AERAQDIGI WFH 704	
NP_001121575	TMEM16C	YLEMVLIQFGFTTIFVAAPLAPL LALLNNIIEIRLDAYKFVTQWRR LP ARATDIGI WLG 814	
NP_848888	TMEM16D	YLEMILQFGFTTIFVAAPLAPL LALLNNIIEIRLDAYKFVTQWRR PL ASRAKDIGI WYG 601	
NP_808362	TMEM16E	YLETVIQFGFATLFVASFPLAPL FALMNNIMGIRVDAWKLTQYRR P VAAKAHSIGV WQD 723	
NP_001240742	TMEM16F	YLEMIIQFGFVTLFVASFPLAPL LALVNNILEIRVDAWKLTQFR RM VPEKAQDIGA WQP 748	
NP_848468	TMEM16J	FMEMMIQYGFTTIFVAAPLAPL LALFNLVEIRLDAIKM VRL QRRVPRKAKDIG TWLQ 591	
NP_001158151	TMEM16H	YQEMFVQFGYVVL FSSAFPLAALCALVNNLIEIRSDAFKLC T GLQRPFGRVESIG QWQK 802	
NP_598740	TMEM16K	YLELFLQFGYVSL FSCVYPLAAAFV L NNFTEVNSDAL K MCRVFKRFFA EPSASIG VWQL 557	

Abb.12: Auszug des Alignments der Proteinsequenzen aller TMEM16-Familienmitglieder.

Geordnet nach der absteigenden Sequenzhomologie sind die verschiedenen Familienmitglieder mit *accession number* (NP_), Name und Position der jeweiligen letzten Aminosäure gelistet. Markiert wurde der Bereich, der dem Exon 21 von *Tmem16a* entspricht. Grau hervorgehoben sind gleiche Aminosäuren.

Ausgehend von bioinformatischen Sequenzanalysen kodiert das Exon 21 von *Tmem16a* für die sechste von insgesamt acht Transmembrandomänen des Membranproteins und nahezu den kompletten anschließenden intrazellulären *loop* von TMEM16A (Hartzell *et al.* 2009, Abb.13). Dabei ragt zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne ein kurzer Proteinabschnitt in die Membran, der diese jedoch nicht durchspannt. Es wird spekuliert, dass dieser Abschnitt eine

wichtige Rolle bei der Porenbildung spielt und die Durchlässigkeit für Anionen ermöglicht (Yang *et al.* 2008, Scudieri *et al.* 2013, Adomaviciene *et al.* 2013).

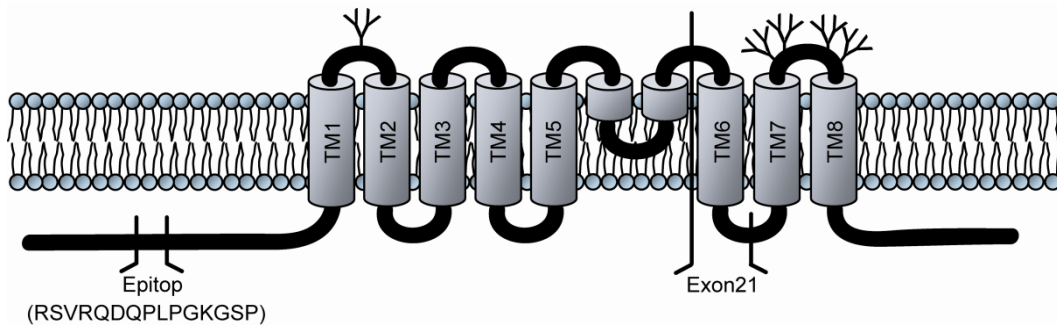


Abb.13: Putative Topologie von TMEM16A basierend auf bioinformatischen Analysen. Dargestellt sind die in der Plasmamembran verankerten Transmembrandomänen (TM1-8), Exon 21, das Epitop des Antikörpers und die extrazellulären möglichen Glykosylierungsstellen.

Ausgehend vom identifizierten, zwischen den Familienmitgliedern hoch konservierten Abschnitt, wurde mittels PCR-Mutagenese aus dem cDNA Plasmid für TMEM16A ein cDNA Plasmid für TMEM16A ohne Exon 21 generiert. Die Generierung bzw. die Exzision des Exons 21 wurde mittels Testverdau und Sequenzierung der Primer T16A_BspEI_fwd und T16A_KpnI_rev überprüft (Abb.14).

Die pIRES-EGFP Plasmide – kodierend für das native TMEM16A und TMEM16A ohne Exon 21 – wurden anschließend in Überexpressionsstudien analysiert. Diese Plasmide ermöglichen eine parallele Expression von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und dem nativen TMEM16A (pIRES-EGFP-TMEM16A) bzw. dem TMEM16A ohne Exon 21 (pIRES-EGFP-TMEM16A w/o Ex21) durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES). Für die Etablierung eines Western Blots wurde TMEM16A in HEK293T überexprimiert und anschließend auf Proteinebene nachgewiesen. Für das native TMEM16A konnten zwei Signale bei etwa 120 kDa detektiert werden. Dieses reduzierte sich durch den Verlust des Exons 21 auf ein Signal mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb.15).

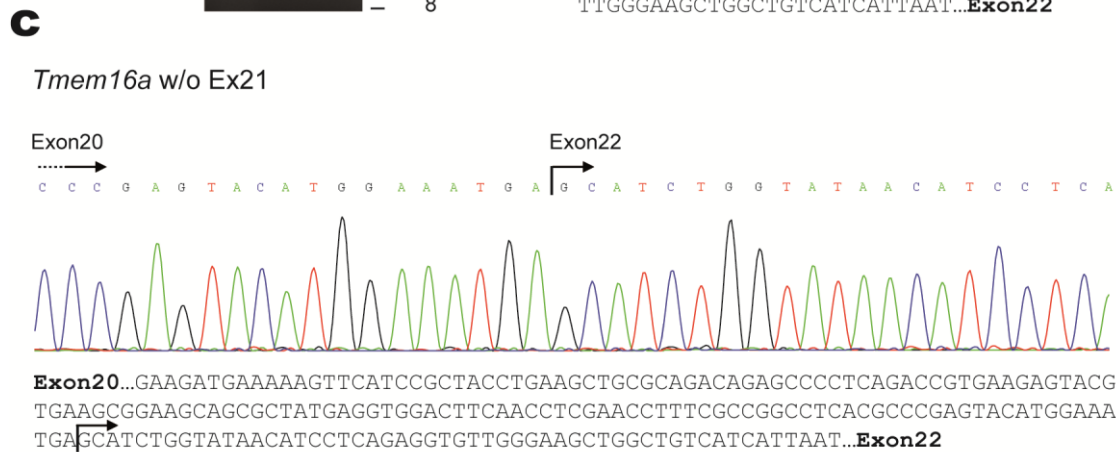
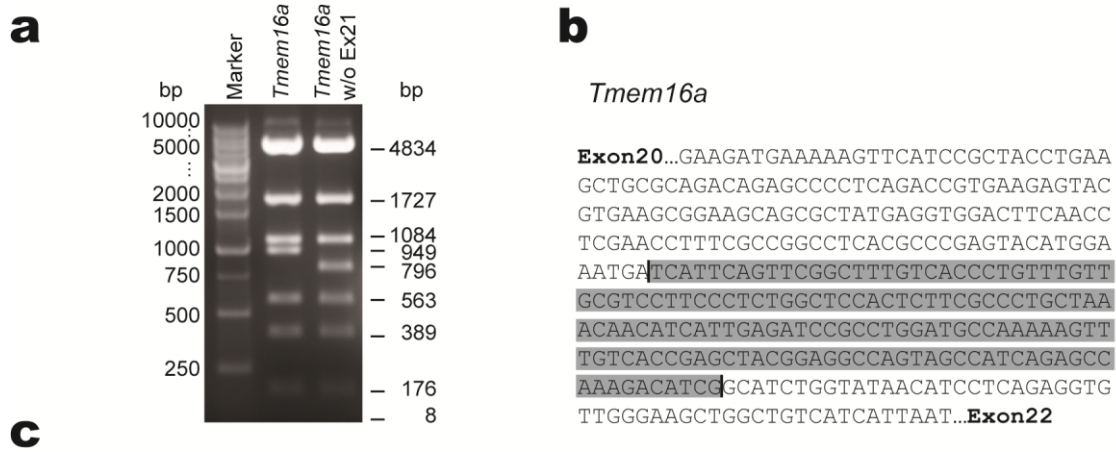


Abb.14: Die Generierung des cDNA Plasmides TMEM16A ohne Exon 21. (a) Testverdau der Plasmide pIRES-EGFP-TMEM16A und pIRES-EGFP-TMEM16A w/o Ex21 mit PstI und vorhergesagten Fragmentgrößen. (b) Sequenzabschnitt der cDNA von *Tmem16a*, bei dem Exon 21 hervorgehoben ist. (c) Ausschnitt der Sequenzanalyse pIRES-EGFP-TMEM16A w/o Ex21 mit T16A_BspEI_fwd. Markiert wurde der direkte Übergang von Exon 20 zu Exon 22 von TMEM16A.

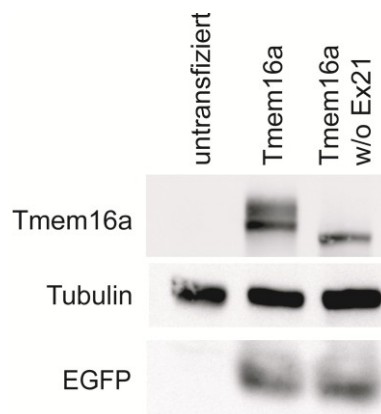


Abb.15: TMEM16A und TMEM16A w/o Ex21 Überexpression in HEK293T Zellen. HEK293T Zellen wurden mit pIRES-EGFP-TMEM16A und -TMEM16A w/o Ex21 transfiziert und die daraus gewonnen Proteinextrakte mittels Western Blot untersucht. Für pIRES-EGFP-TMEM16A ergab sich ein Signal um 120 kDa, während TMEM16A w/o Ex21 - bedingt durch das Fehlen von Exon 21 - auf ein Signal mit geringeren Molekulargewicht aufwies. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin (55 kDa) und zur Transfektionkontrolle EGFP (27 kDa) verwendet.

Um die zelluläre Lokalisation von TMEM16A zu untersuchen, wurden transfizierte HEK293T Zellen immunhistochemisch markiert und analysiert. Dabei konnte für das native TMEM16A ein membranständiges Signal beobachtet werden. Das Fehlen des Exons 21 hingegen führte zum Verlust einer eindeutigen Membranlokalisation und die Färbungen zeigten Signale, welche vermehrt im Zytoplasma lokalisierten (Abb.16). Die Signale für TMEM16A konnten nur in Zellen detektiert werden, die auch EGFP exprimierten. Zusätzlich wurde eine Färbung mit Hoechst33258 durchgeführt, durch die Zellkerne angefärbt werden. Somit konnten transfizierte von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden.

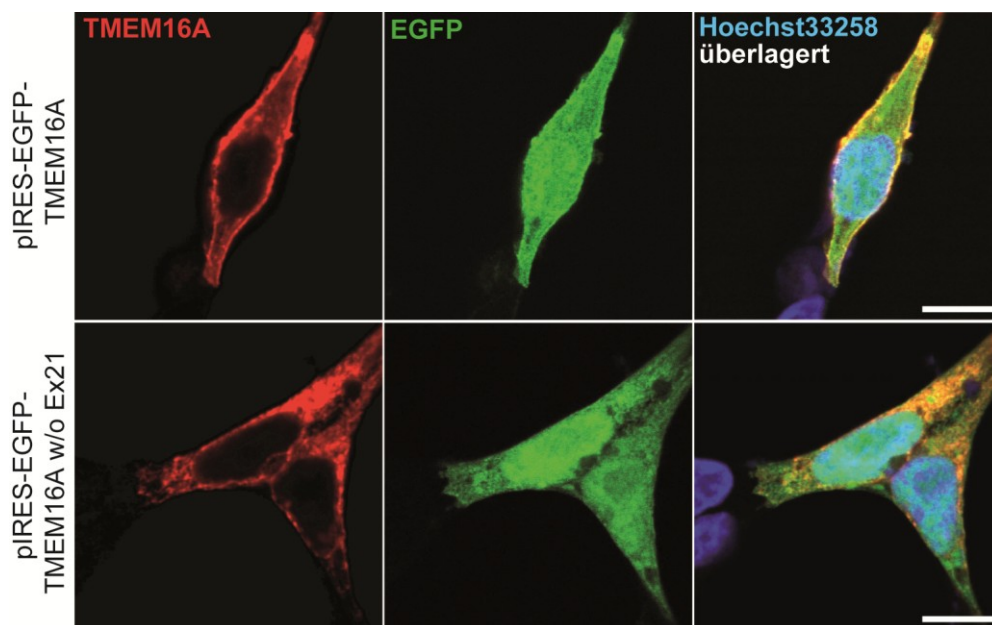


Abb.16: IHC an mit pIRES-EGFP-TMEM16A, -TMEM16A w/o Ex21 transfizierten HEK293T Zellen. TMEM16A wurde mittels Alexa546 gekoppelten Sekundärantikörper (links) markiert. EGFP diente der Transfektionskontrolle (mitte) und mittels Hoechst33258 (rechts, durch Überlagerung der beiden anderen Kanäle) wurden die Zellkerne sichtbar gemacht. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Nach den beschriebenen Lokalisationsstudien des nativen und trunkierten TMEM16A in überexprimierten HEK293T Zellen wurden diese funktionell auf ihre CaCCs untersucht. Anhand elektrophysiologischer Messungen und Analysen konnten für das native TMEM16A CaCCs gemessen werden, welche in der trunkierten Variante nahezu nicht detektierbar waren. (Abb.17a). Durch das Anlegen verschiedener Spannungen wurde an den HEK293T Zellen, die das native TMEM16A überexprimierten, vielfach höhere Ströme im Vergleich zum *Tmem16a* w/o Ex21 gemessen (Abb.17b). Durch die graphische Darstellung der

tail-Stromdichte bei +100 mV konnte ein signifikanter Unterschied durch das fehlende Exon 21 weiter verdeutlicht und quantifiziert werden, wobei Stromdichten von $705,6 \pm 12,2$ pA/pF des nativen TMEM16A, dem trunkierten TMEM16A mit $91,4 \pm 4,2$ pA/pF gegenüberstand (Abb.17c).

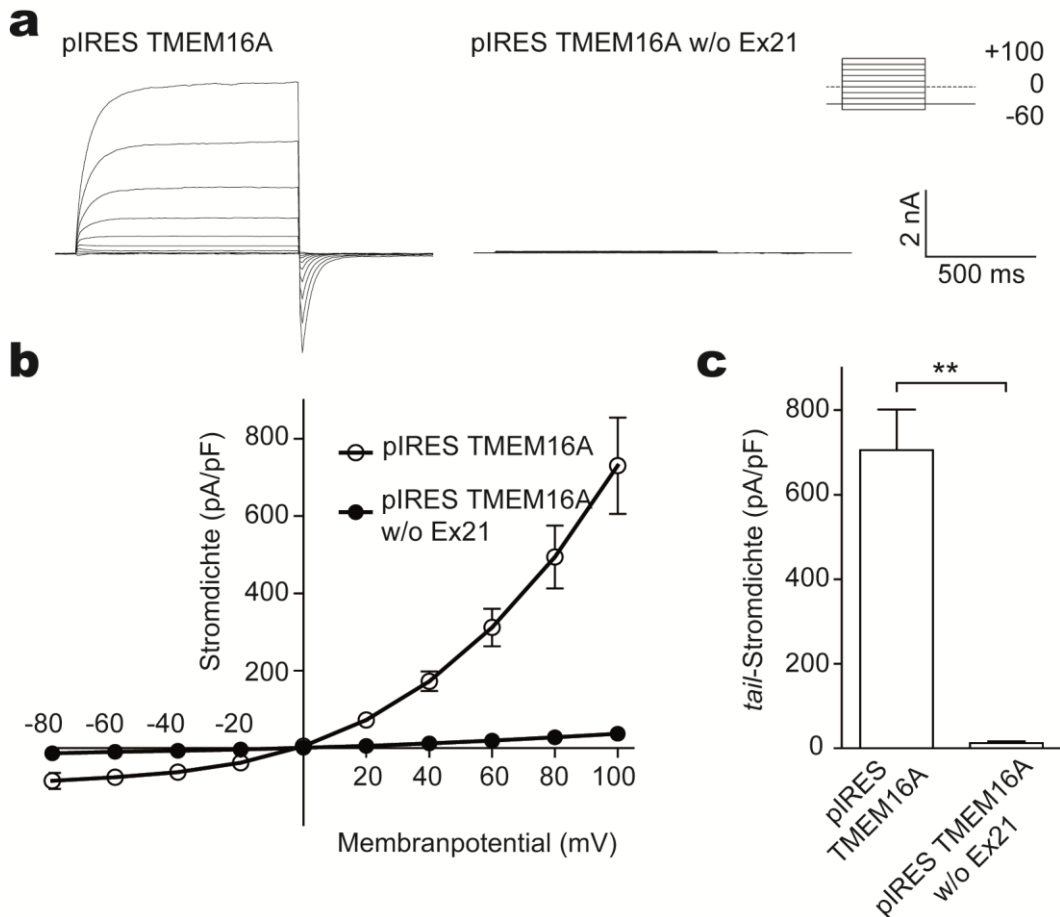


Abb.17: Calciumaktivierte Chloridleitfähigkeit (CaCCs) von TMEM16A überexprimierten HEK293T Zellen. (a) Dargestellt sind repräsentative Ströme für pIRES-EGFP-TMEM16A und pIRES-EGFP-TMEM16A w/o Ex21, (b) die Strom-Spannungs-Kurve bei verschiedenen Spannungspulsen und (c) die Gegenüberstellung der *tail*-Stromdichten bei +100 mV (jeweils n=12). Student's t-Test; ** p<0,01

Durch die vergleichenden Analysen des nativen und trunkierten TMEM16A konnte gezeigt werden, dass das trunkierte TMEM16A nicht in der Lage ist, in HEK293T Zellen CaCCs zu erzeugen. Es konnte Exon 21 von *Tmem16a* als ein für die Proteinfunktion essentieller Abschnitt identifiziert werden, da das Fehlen des Exon 21 zu einer trunkierten Form führt, die nicht zwangsläufig abgebaut wird, eine veränderte Lokalisation zeigt und keine CaCCs vermittelt.

5.2 Konditionale Inaktivierung von TMEM16A

Zur Untersuchung der Bedeutung von TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen wurde ein konditionales Mausmodell für TMEM16A, welches die zellspezifische Deletion von Exon 21 ermöglicht, im Labor generiert. Um die Funktionalität dieses Modells zu überprüfen, wurde aus diesem konditionalen Modell durch Einkreuzen einer *Cre-Deleter* Linie (Schwenk *et al.* 1995, Kühn *et al.* 1995) eine konstitutive Knockout (ko) Mauslinie für *Tmem16a* generiert. Bei der Genotypisierung amplifizierten die Primer T16A_loxP-*fwd* und T16A_loxP-*rev* für das *Tmem16a* Wildtyp-Allel ein 182 bp langes DNA-Fragment und bei Vorhandensein der loxP-*site* ein 222 bp langes Produkt. Durch die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination und das dadurch entstandene ko-Allel konnte mit den Primern T16A_ko-*fwd* und T16A_loxP-*rev* nachgewiesen werden, diese amplifizierten ein 336 bp großes Fragment (Abb.18).

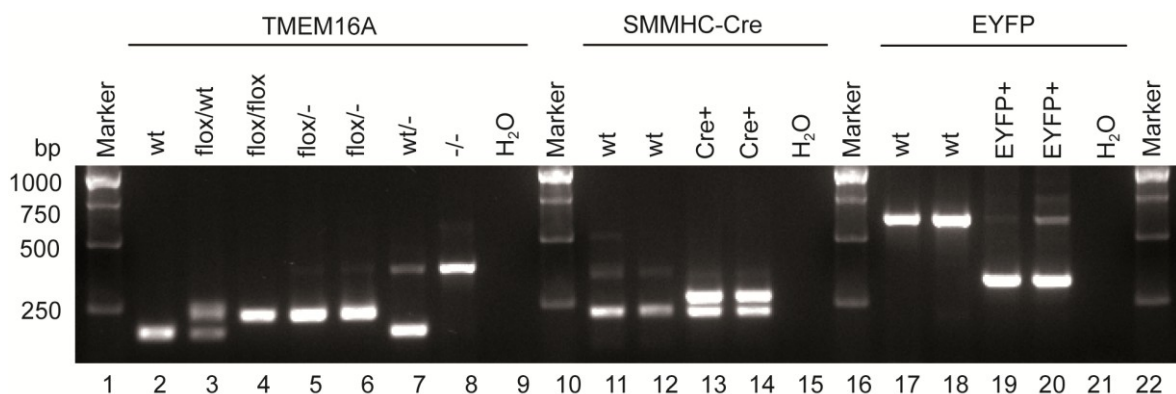


Abb.18: Genotypisierung. Gelelektrophorese von *Tmem16a* mit den Primern T16A_loxp-*fwd*, T16A_loxP-*rev* und T16A_ko-*rev*, SMMHC-CreER^{T2} mit den Primern SMWT1, SMWT2 und phCREAS1 und EYFP mit den Primern EYFP-*fwd*, EYFP-wt-*rev* und EYFP-*mutant-rev*. Die verschiedenen PCR-Produkte wurden mittels 2%igem Agarosegels aufgetrennt. Die Spuren 1, 10, 16 und 22 zeigen zur Größenermittlung eine DNA-Leiter (1 kb *ladder* GeneCraft). bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; flox: mit loxP flankiert; -/-: beide Allele rekombiniert; Cre+: SMMHC-CreER^{T2} positiv; EYFP+: positiv für die EYFP-Reportergen-kassette. Fragmentgrößen: T16A: wt (182 bp), flox (222 bp), ko (336 bp); SMMHC-Cre: wt (225 bp), positiv (225 bp + 287bp); EYFP: wt (600 bp), positiv (320 bp + 600 bp)

Wie beschrieben (Rock *et al.* 2008) verstarben die konstitutiven *Tmem16a*-ko-Tiere innerhalb der ersten postnatalen Wochen und zeigten Fehlbildungen der trachealen Knorpelspangen (Abb.19a). Diese Fehlbildungen konnten durch die Färbung mit Alcianblau sichtbar gemacht werden (Abb.19b). Diese färbt im sauren

Milieu Mucopolysaccharide wie Hyaluronsäure, die auch Bestandteil der Knorpelspangen ist.

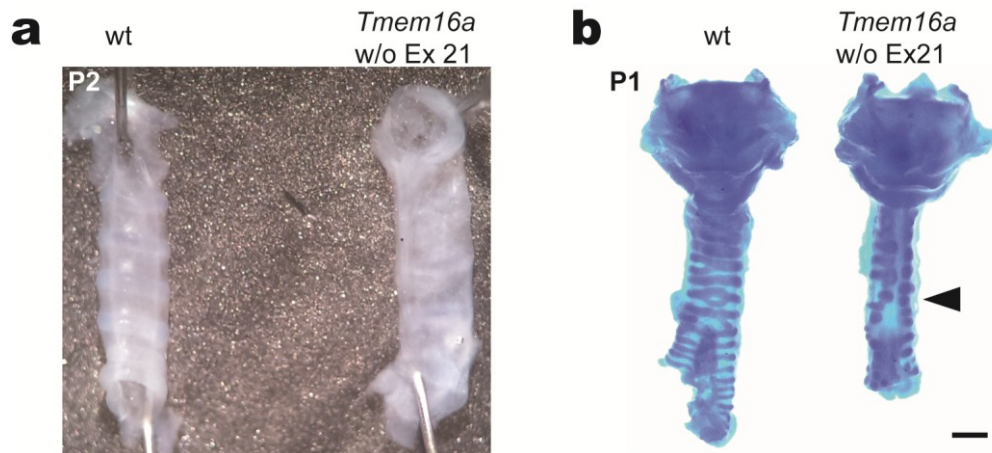


Abb.19: Fehlbildung der trachealen Knorpelspangen im konstitutivem *Tmem16a* knockout. (a) Darstellung frisch präparierter Tracheen von ko- und wildtyp (wt)-Tieren am zweiten postnatalen Tag (P2). (b) Alcianblaufärbung der Tracheen von P1 Tieren, die mittels 4%igem PFA fixiert wurden. Die Pfeilspitze zeigt die Fehlbildungen der trachealen Knorpelspangen. Der Maßstab beträgt 500 µm.

Um die Expression von TMEM16A in verschiedenen murinen Geweben zu untersuchen, wurden Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte die Veränderung des Signales für TMEM16A durch das Fehlen von Exon 21 analog der *in vitro* Analysen festgestellt werden (Abb.20). Weiterhin wurden

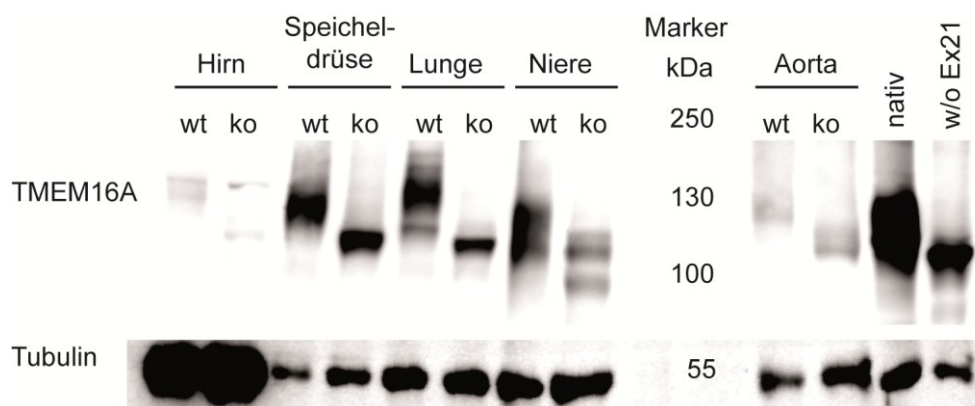


Abb.20: Western Blot von TMEM16A Wildtyp- (wt) und konstitutiven Knockout (ko) Tieren. 10 µg Proteinmenge von verschiedenen Gewebelysaten aus P1 Tieren und 2,5 µg Proteinlysate aus den Überexpressionsversuchen wurden mittels Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde α-Tubulin (55 kDa) verwendet.

verschiedene gewebespezifische Expressionsmuster deutlich, die auf unterschiedliche Isoformen, posttranslationale Modifikationen und Expressionsniveaus schließen lassen, die für TMEM16A auch bereits beschrieben wurden (Ferrera *et al.* 2009, Fallah *et al.* 2011, Schreiber *et al.* 2010). Denn die Signale zeigten verschiedene Molekulargewichte und unterschiedliche Signalintensitäten.

5.3 Induzierbare Expression der Cre-Rekombinase in glatten Gefäßmuskelzellen

Nachdem die Funktionalität des konditionalen *Tmem16a* Knockout-Tiermodells mit der *Cre-Deleter* Linie gezeigt werden konnte, wurde für die gefäßspezifische Inaktivierung durch Einkreuzen der SMMHC-CreER^{T2} Linie (Wirth *et al.* 2008) untersucht. Diese Mauslinie erlaubt eine induzierbare Rekombination in glatten Muskelzellen, da die Cre-Rekombinase der Kontrolle des *smooth muscle myosin heavy chain* (SMMHC) Promotors unterliegt und zusätzlich mit einem modifizierten Östrogenrezeptor fusioniert ist. Somit ermöglicht die Cre-Rekombinase nur in Anwesenheit von Tamoxifen die effektive Rekombination der Zielsequenz (Feil *et al.* 1997). Die Induktion der Rekombination erfolgte durch die vierwöchige Applikation von Tamoxifen, welches ausgewachsenen Tieren durch das Futter (LASCRdietTM CreActive TAM400) verabreicht wurde (Kiermayer *et al.* 2006). Um die Effektivität der induzierbaren SMMHC-CreER^{T2} nach Applikation des Tamoxifen zu überprüfen, wurde diese Linie mit einer EYFP-Reporterlinie verpaart (Srinivas *et al.* 2001). Tiere, die für *Tmem16a* homozygot gefloxt und positiv für das EYFP-Reportergen waren (Abb.18), wurden mit TAM400-Futter behandelt. Unbehandelte Geschwistertiere dienten dabei als Kontrolle. Nach einer Auswaschphase von mindestens zwei Wochen, wurden von verschiedenen Gefäßen Kryoschnitte angefertigt und immunhistochemisch analysiert. Das EYFP-Signal wurde dabei ebenfalls immunhistochemisch verstärkt (Abb.21). In allen unterschiedlichen Gefäßtypen konnte die Expression von EYFP nachgewiesen werden, was auf die wirksame Rekombination durch die SMMHC-CreER^{T2}-Rekombinase nach Gabe des TAM400-Futters zurückzuführen war.

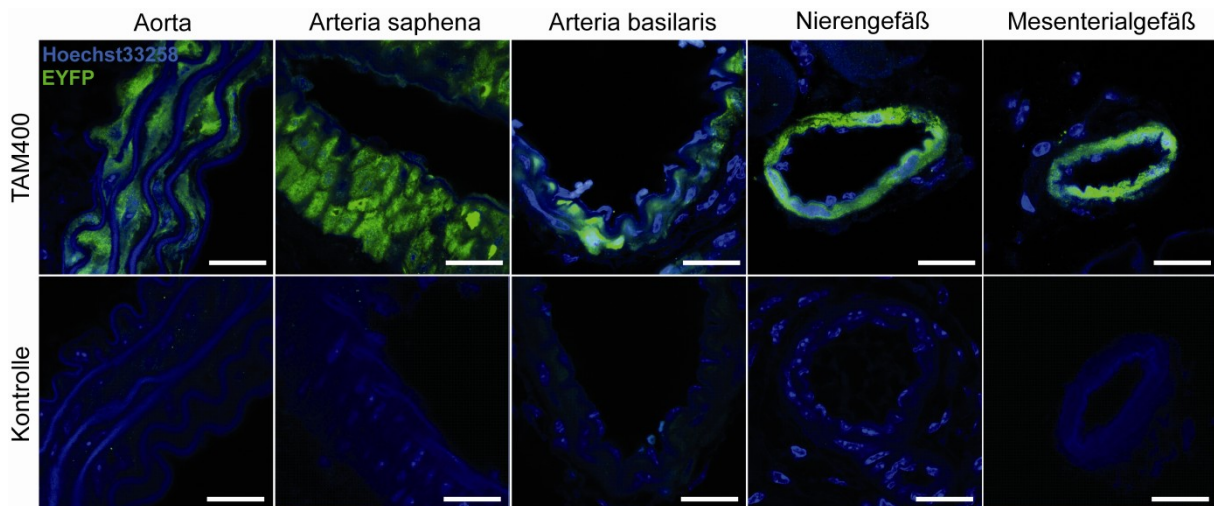


Abb.21: Immunhistochemie an verschiedenen Gefäßen von induzierten SMMHC-CreER^{T2}-EYFP-Reportertieren. SMMHC-CreER^{T2}-EYFP-Tiere wurden mit Tamoxifen über TAM400-Futter behandelt und immunhistochemisch analysiert. Das Signal für EYFP wurde mittels Antikörper gegen EGFP und mit einem Sekundärantikörper (Alexa488) verstärkt. Als Kontrolltiere wurden Geschwistertiere des gleichen Genotyps verwendet. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst33258 sichtbar gemacht. Der Maßstab beträgt 20 µm.

5.4 Konditionale Inaktivierung von TMEM16A durch SMMHC-CreER^{T2}

Nachdem die tamoxifenabhängige Induktion der SMMHC-CreER^{T2}-Linie durch das TAM400-Futter bestätigt wurde, konnte diese mit der konditionalen TMEM16A Linie verpaart und die TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}-Tiere analysiert werden.

5.4.1 Veränderte Expression von TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen

Für die Expressionsanalyse von TMEM16A in verschiedenen Gefäßmuskelzellen wurden Proteinlysate unterschiedlicher Gefäße aus TAM400 behandelten (induzierte-*Tmem16a*-ko) und unbehandelten (nicht-induzierte Kontrolltiere) TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}-Tieren mittels Western Blot untersucht. Dabei konnte analog zu den Vorversuchen ein starkes, nicht klar abgegrenztes Signal bei etwa 120 kDa in den untersuchten Gefäßen der nicht-induzierten Kontrolltiere beobachtet werden, das sich auf zwei Signale mit niedrigeren Molekulargewicht in den induzierte-*Tmem16a*-ko reduzierte (Abb.22).

Ergebnisse

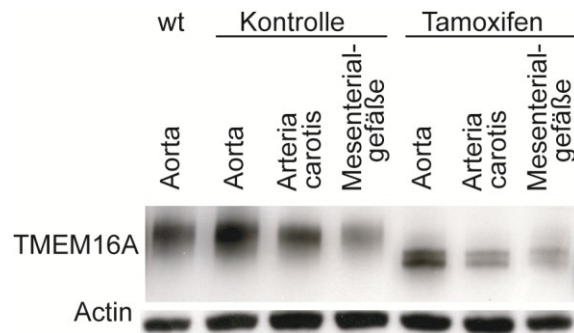


Abb.22: TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2} Western Blot. Je 10 µg Proteinmenge der Proteinlysaten aus verschiedenen Gefäßen von induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen) und nicht-induzierten Kontrolltieren, sowie Wildtyp (wt) Aorta wurden aufgetragen. Als Ladekontrolle diente β-Actin (43 kDa).

Anschließend wurden verschieden große Gefäße aus induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren gegenübergestellt. Dafür wurden bei der Präparation die Mesenterialgefäße in große (1. und 2.Ordnung) und kleine (3. und höhere Ordnung) Gefäße unterschieden (Abb.23). Dabei konnte abhängig von der Gefäßgröße eine abnehmende Signalintensität nachgewiesen werden, was auf stärkere Expression von TMEM16A in größeren Gefäßen gegenüber kleineren schließen lässt.

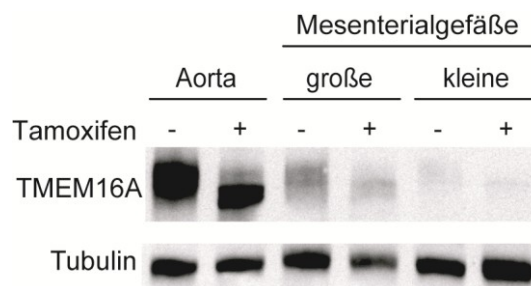


Abb.23: Vergleich der Expression von TMEM16A in Gefäßen unterschiedlicher Größe. Western Blot mit jeweils 10 µg Proteinmenge von Aorta, große (1. und 2. Ordnung) und (3. und höherer Ordnung) Mesenterialgefäße aus induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen+) und nicht-induzierten Kontrolltieren (Tamoxifen-) geordnet nach absteigender Gefäßgröße. Als Ladekontrolle wurde die Expression von α-Tubulin (55 kDa) detektiert.

Um die Expression und Lokalisation von TMEM16A in Gefäßmuskelzellen weiter zu untersuchen, wurden Kryoschnitte verschiedener Gefäße aus induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren angefertigt und analysiert. Dabei konnte ein Signal für TMEM16A detektiert werden, das zwischen den beiden Gruppen nicht wesentlich variierte, jedoch in der Zweitantikörperkontrolle nicht

vorhanden war (Abb.24). Zur besseren Orientierung und Charakterisierung der Gefäße wurde der Endothelzellmarker *cluster of differentiation 31* (CD31) in allen immunhistologischen Markierungen parallel verwendet. Bei der Analyse der Markierungen konnte ebenfalls eine Abnahme der Signalstärke für TMEM16A in Abhängigkeit der Gefäßgröße beobachtet werden, was mit den Ergebnissen im Western Blot korreliert.

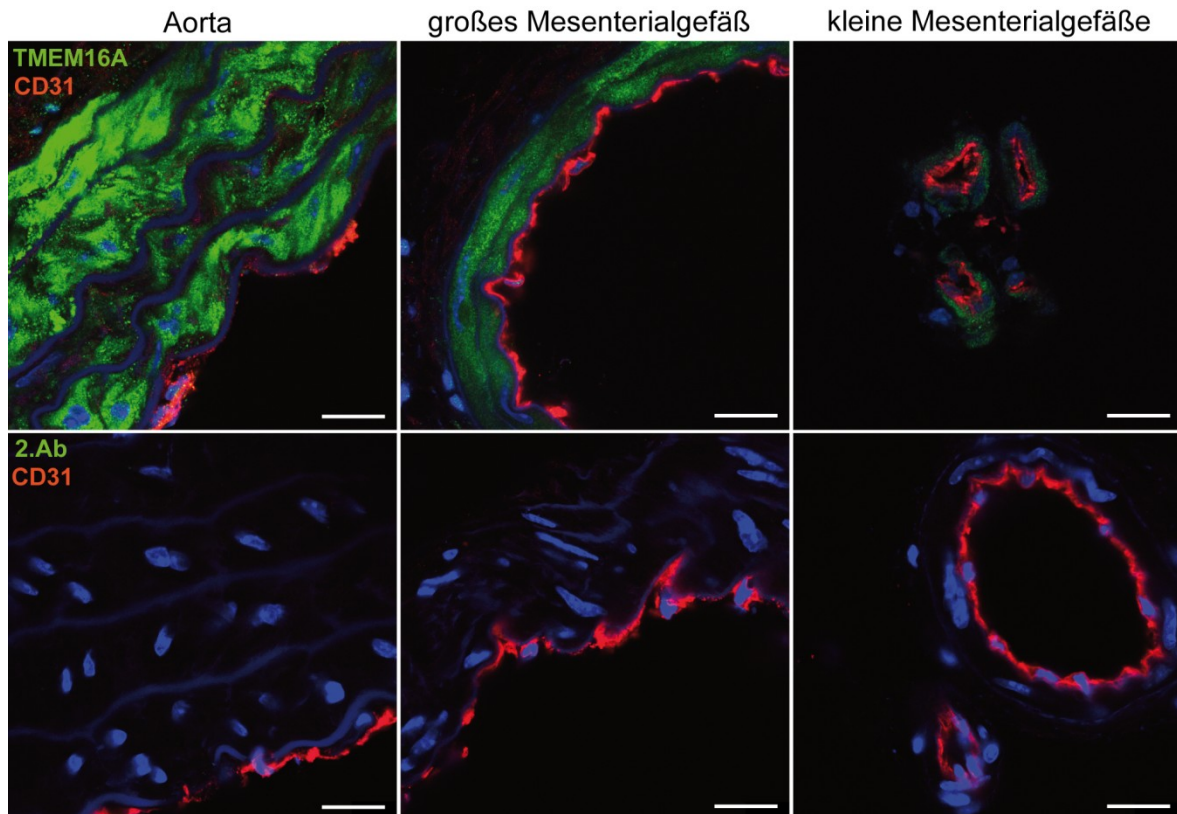


Abb.24: Immunhistochemie an verschiedenen Gefäßen. Markiert wurde TMEM16A mit Cy5 gekoppelten sekundären Antikörper und CD31 mit Alexa555. Als Kontrolle für TMEM16A wurde nur der sekundäre Antikörper verwendet (2.Ab). Die Zellkerne wurden mit Hoechst33258 sichtbar gemacht. Der Maßstab beträgt 20 µm.

5.4.2 Analyse struktureller Veränderungen der Gefäße von induzierten-*Tmem16a*-Knockout-Tieren

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass TMEM16A in hypertensiven Ratten einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation glatter Muskelzellen in der zerebralen Basilararterie hat (Wang *et al.* 2012). Um mögliche histologische Veränderungen der Gefäße – bedingt durch die tamoxifeninduzierte Rekombination von *Tmem16a* – zu untersuchen, wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)

Präparate verschiedener Gefäße angefertigt (Abb.25a). Anschließend wurde die Dicke der Gefäßwände und das Gefäßlumen gemessen und das Verhältnis beider Faktoren zueinander bestimmt. Es konnte kein Unterschied zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren und den Kontrollen festgestellt werden (Abb.25b, Kontrolle gegen induzierte-*Tem16a*-ko: Aorta: $0,079 \pm 0,001$ und $0,073 \pm 0,004$, große Mesenterialgefäße: $0,122 \pm 0,005$ und $0,126 \pm 0,006$, kleine Mesenterialgefäße $0,153 \pm 0,007$ und $0,163 \pm 0,008$).

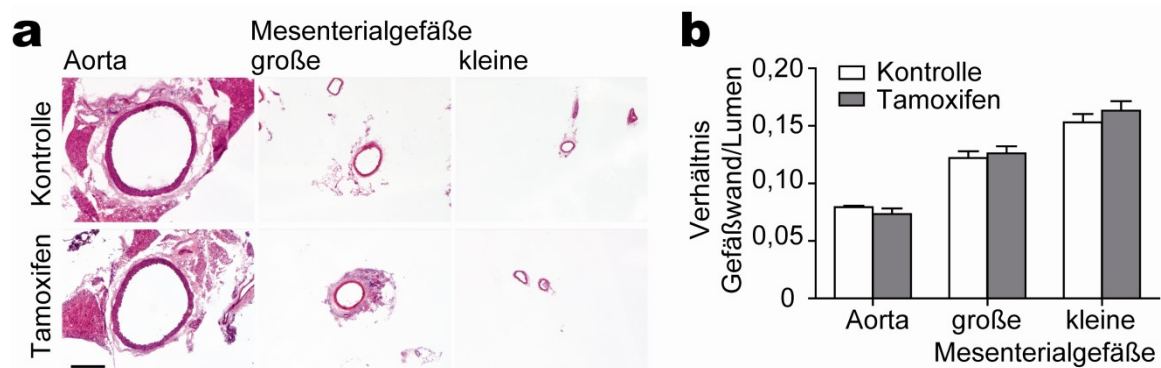


Abb.25: Strukturanalyse arterieller Gefäße. Zur Untersuchung möglicher struktureller Veränderungen in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren wurden HE-Färbungen verschiedener Gefäße gefertigt (a, Maßstab: 500 μ m). Aus Gefäßdicke und Gefäßlumen bestimmte sich das Verhältnis, das sich zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren nicht unterschied (b, jeweils Gefäßschnitte aus n=3 Tieren).

5.4.3 TMEM16A vermittelt CaCCs in Gefäßmuskelzellen

Nachdem sowohl der Nachweis des veränderten TMEM16A in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren im Western Blot als auch das abnehmende Expressionsniveau von TMEM16A in kleineren Gefäßen durch immunhistochemische Untersuchungen gelang, wurde nun elektrophysiologische Untersuchungen vorgenommen. Hierfür wurden glatten Muskelzellen aus der Aorta isoliert und CaCCs gemessen (Abb.26). In den Zellen von Wildtyp- und nicht-induzierten Kontrolltieren konnten CaCCs registriert werden, die in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren stark vermindert bzw. nicht mehr vorhanden waren (Abb.26a,b). Durch die Zugabe von Niflumic Acid zur Elektrodenlösung wurden die CaCCs geblockt. Niflumic Acid ist ein unspezifischer Blocker für CaCCs und wurde bereits im Zusammenhang mit TMEM16A verwendet (Schroeder *et al.* 2008). Außerdem zeigte sich die Calciumabhängigkeit der

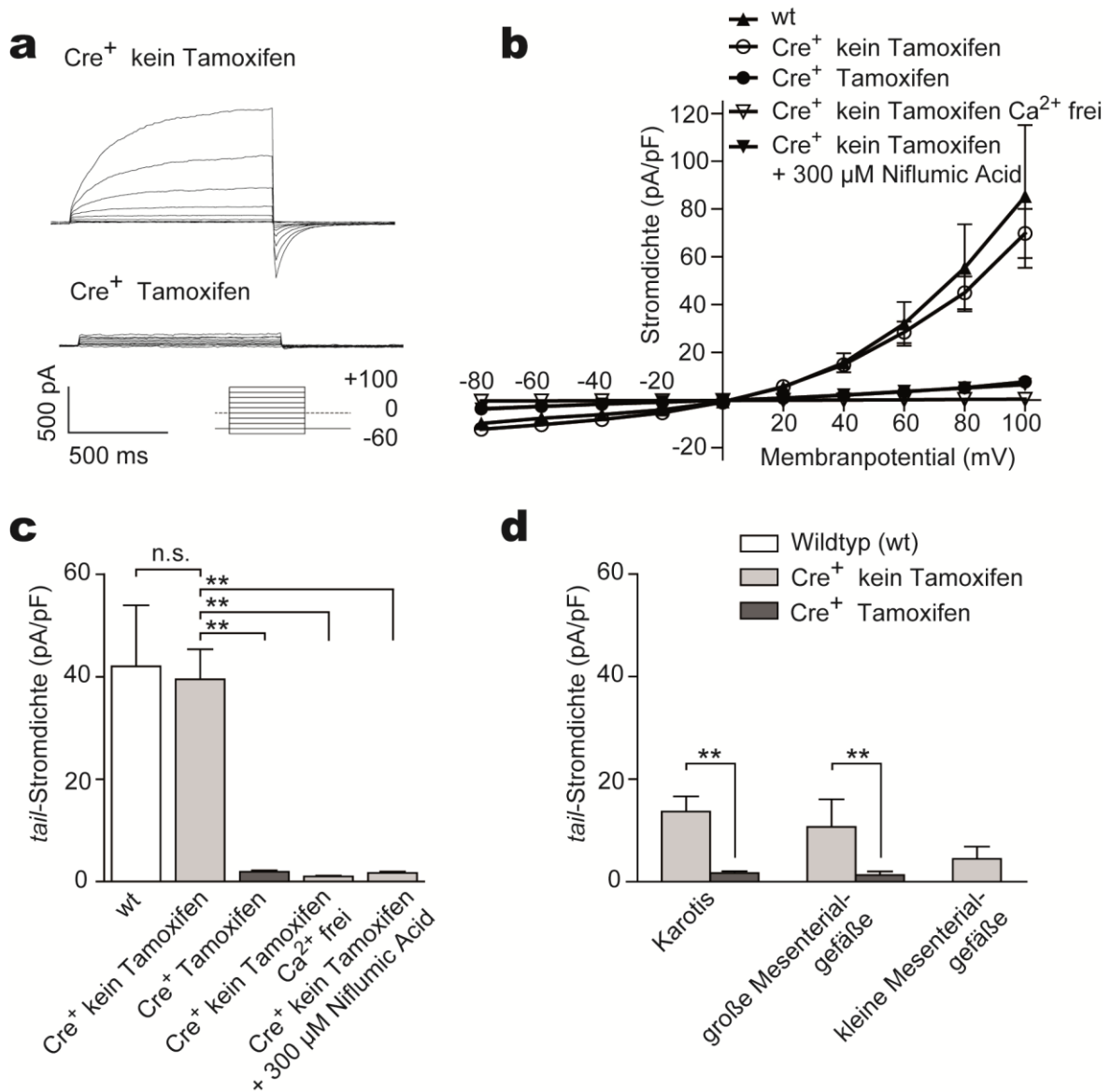


Abb.26: CaCCs an Gefäßmuskelzellen aus induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren. (a) Dargestellt sind repräsentative Ströme für nicht-induzierte Kontroll- (Cre⁺ kein Tamoxifen) und induzierte-*Tmem16a*-ko-Tiere (Cre⁺ Tamoxifen). (b) Strom-Spannungskurve bei verschiedenen angelegten Membranpotentialen. Dabei wurden die CaCCs aus Wildtyp (n=5), nicht-induzierten Kontroll- (n=14) und induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (n=15) verglichen. Durch Entfernung von Calcium aus der Elektrodenlösung der Kontrollen (Cre⁺ kein Tamoxifen, n=3) oder durch Zugabe eines CaCCs-Blockers (Cre⁺ kein Tamoxifen + 300 μM Niflumic Acid, n=3) konnten die CaCCs unterbunden werden. (c,d) Gegenüberstellung der *tail*-Stromdichte bei +80 mV. Student's t-Test; n.s. p>0,05; ** p<0,01

Kanäle, wenn Calcium aus der Elektrodenlösung entfernt wurde. Ohne Calcium waren keine CaCCs messbar, was auf seine essentielle Bedeutung schließen lässt. Durch Gegenüberstellung der *tail*-Stromdichten bei +80 mV konnte der Unterschied verdeutlicht werden (Abb.26c; Wildtyp: 42,02 ± 10,67 pA/pF, nicht-

induzierte Kontrolltiere: $39,48 \pm 5,66$ pA/pF, induzierte-*Tmem16a*-ko: $1,92 \pm 0,28$ pA/pF, nicht-induzierte Kontrolltiere ohne Calcium: $1 \pm 0,12$ pA/pF, nicht-induzierte Kontrolltiere mit Niflumic Acid: $1,71 \pm 0,24$ pA/pF).

Die Untersuchung der CaCCs von Zellen weiterer arterieller Gefäße offenbarte eine abnehmende Leitfähigkeit bei abnehmender Gefäßgröße, was mit den Expressionsuntersuchungen korrelierte (Abb.26d; *tail*-Stromdichten bei +80 mV von Karotis: $13,69 \pm 2,95$ pA/pF in nicht-induzierten Kontrolltieren und $1,68 \pm 0,38$ pA/pF in induzierten-*Tmem16a*-ko, große Mesenterialgefäße: $10,69 \pm 2,95,39$ pA/pF in nicht-induzierten Kontrolltieren und $1,27 \pm 0,74$ pA/pF in induzierten-*Tmem16a*-ko, Karotis: $4,45 \pm 2,4$ pA/pF in nicht-induzierten Kontrolltieren).

5.5 Untersuchung der Herzfunktion und telemetrische

Blutdruckmessungen an induzierten-*Tmem16a*-Knockout-Tieren

Nach der Analyse molekularer und elektrophysiologischer Eigenschaften von TMEM16A im TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2} Tiermodell wurde eine weiterführende Phänotypisierung vorgenommen. Dazu kam eine telemetrische Methode der Blutdruckmessung zum Einsatz. Den Tieren wurde ein Telemetriesender in die Aorta implantiert, der es nach entsprechender Regenerationszeit erlaubte, den arteriellen Blutdruck direkt und ohne äußere Stresseinwirkungen zu messen und zu analysieren (Abb.27). Nach Erstellung der Basismessung über drei Tage folgte die Umstellung des Futters und somit die tamoxifeninduzierte Rekombination. Die Messungen wurden einmal pro Woche an 72 h einmal stündlich für fünf Minuten aufgezeichnet und die Werte der aktiven Nachtphase pro Tier zu einem zusammengefasst. Der Druck in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (Cre⁺ Tamoxifen) sank nach vier Wochen Tamoxifen Behandlung von initial $112,4 \pm 4,6$ mmHg auf $97,6 \pm 3,4$ mmHg und erreichte im Vergleich zu den nicht-induzierten Tieren (Cre⁺ kein Tamoxifen), deren Druck stabil blieb ($110,3 \pm 2,0$ mmHg / $113,27 \pm 3,0$ mmHg), und einer Kontrollgruppe ohne SMMHC-CreER^{T2}, welcher Tamoxifen verabreicht wurde (Cre⁻ Tamoxifen, von

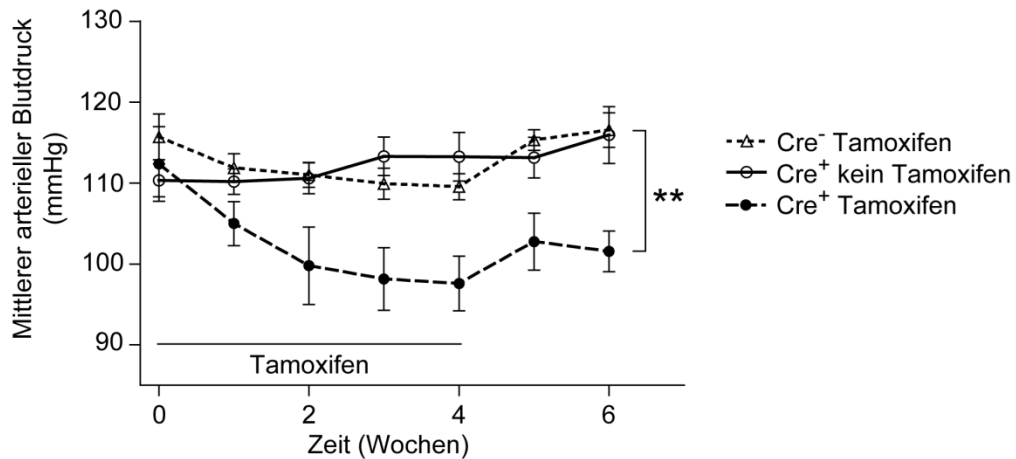


Abb.27: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks. Mittlerer arterieller Blutdruck von induzierten-*Tmem16a*-ko (Cre^+ Tamoxifen, $n=14$) und nicht-induzierten Kontrollen (Cre^+ kein Tamoxifen, $n=15$), sowie einer Tamoxifen behandelten Kontrollgruppe ohne SMMHC- $CreER^{T2}$ (Cre^- Tamoxifen, $n=6$) über den Zeitraum von sechs Wochen (vierwöchige Tamoxifeninduktion und anschließender zweiwöchige Auswaschphase). 2-wege ANOVA; ** $p < 0,01$

114,8 ± 2,5 mmHg auf 107,7 ± 2,3 mmHg), signifikant erniedrigte Werte. Nach Umstellung auf das herkömmliche Futter (Rod16-A, LASQCdiet®Rod16) der Tamoxifen-induzierten Tiere stieg der mittlere arterielle Druck auf 101,6 ± 2,5 mmHg nach sechs Wochen leicht an, blieb aber signifikant unter dem Niveau der Kontrollgruppen (Cre^+ kein Tamoxifen 115,9 ± 3,5 mmHg und Cre^- Tamoxifen 114,9 ± 2,4 mmHg).

Möglicherweise könnte die verringerte Herzfrequenz, die während der Tamoxifenapplikation beobachtet wurde, auf den leichten Anstieg des Druckes nach Absetzen des Tamoxifens zurückzuführen sein. Wie aus Abb.28 ersichtlich wird, verringerte sich die ebenfalls telemetrisch erfasste Herzfrequenz sowohl in der induzierten-*Tmem16a*-ko Gruppe als auch in der Kontrollgruppe ohne SMMHC- $CreER^{T2}$ nach vierwöchiger Tamoxifenapplikation auf ein signifikant erniedrigtes Niveau und stieg nach zweiwöchiger Auswaschphase auf die Ausgangswerte.

Ergebnisse

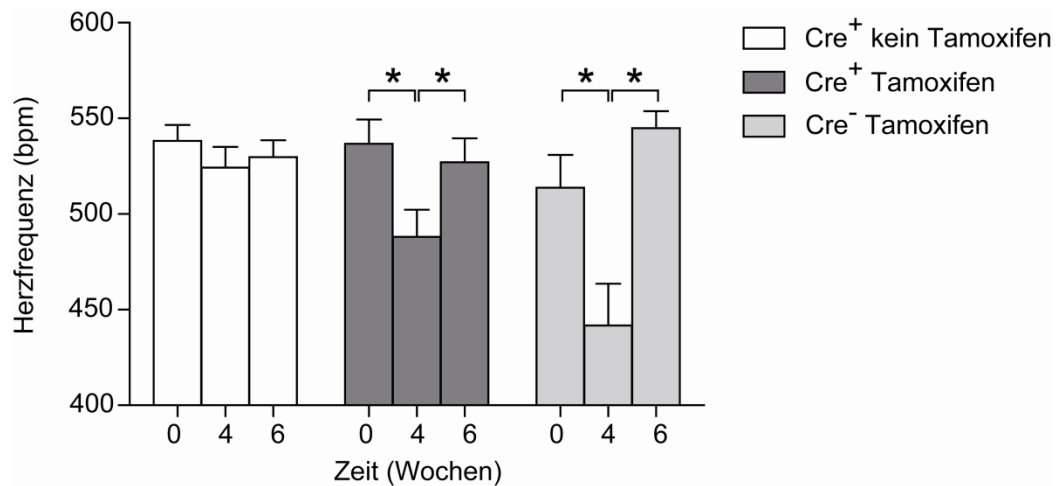


Abb.28: Einfluss der Tamoxifenapplikation auf die Herzfrequenz in *Tmem16a*-Tieren.

Telemetrisch gemessene Herzfrequenz (bpm, engl. *beats per minute*) in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (Cre⁺ Tamoxifen, n=14, 0 Wochen: 537 ± 13 bpm, 4 Wochen: 488 ± 14 bpm, 6 Wochen: 527 ± 13 bpm) und in der Tamoxifen behandelten Kontrollgruppe ohne SMMHC-CreER^{T2} (Cre⁻ Tamoxifen, n=6, 0 Wochen: 514 ± 17 bpm, 4 Wochen: 442 ± 22 bpm, 6 Wochen: 544 ± 9 bpm) verringerte sich nach vierwöchiger Tamoxifenapplikation und stieg nach zweiwöchiger Auswaschphase auf vergleichbare Ausgangswerte. In den Kontrolltieren (Cre⁻ Tamoxifen, n=15, 0 Wochen: 538 ± 8 bpm, 4 Wochen: 524 ± 11 bpm, 6 Wochen: 529 ± 9 bpm) hingegen blieb die Herzfrequenz über den Zeitraum von sechs Wochen gleich. Student's t-Test; * p<0,05.

Durch die separate Betrachtung des systolischen und diastolischen Druckes (Abb.29a, b) wird deutlich, dass der systolische stärker abfällt als der diastolische Druck. Das bedeutet, dass dem erniedrigten systolischen Blutdruck ein größerer Einfluss auf den erniedrigten gemittelten arteriellen Druck zuzuschreiben ist. Während der Systole wird etwa die Hälfte des ausgeworfenen Blutvolumens direkt in die Peripherie weitergeleitet, während die andere Hälfte durch die elastische Extension der Aorta und der größeren proximalen Gefäße kurz gespeichert und zeitverzögert weitergegeben wird (Belz *et al.* 1995). Diese Eigenschaft wird als Windkesselfunktion bezeichnet. Bildet man die Differenz aus systolischem und diastolischem Druck, resultiert die Pulsamplitude, die in den induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt ist (Abb.29c). Eine erhöhte Pulsamplitude gilt als Indiz für eine erhöhte kardiovaskuläre, insbesondere koronare Mortalität (Benetos *et al.* 1997).

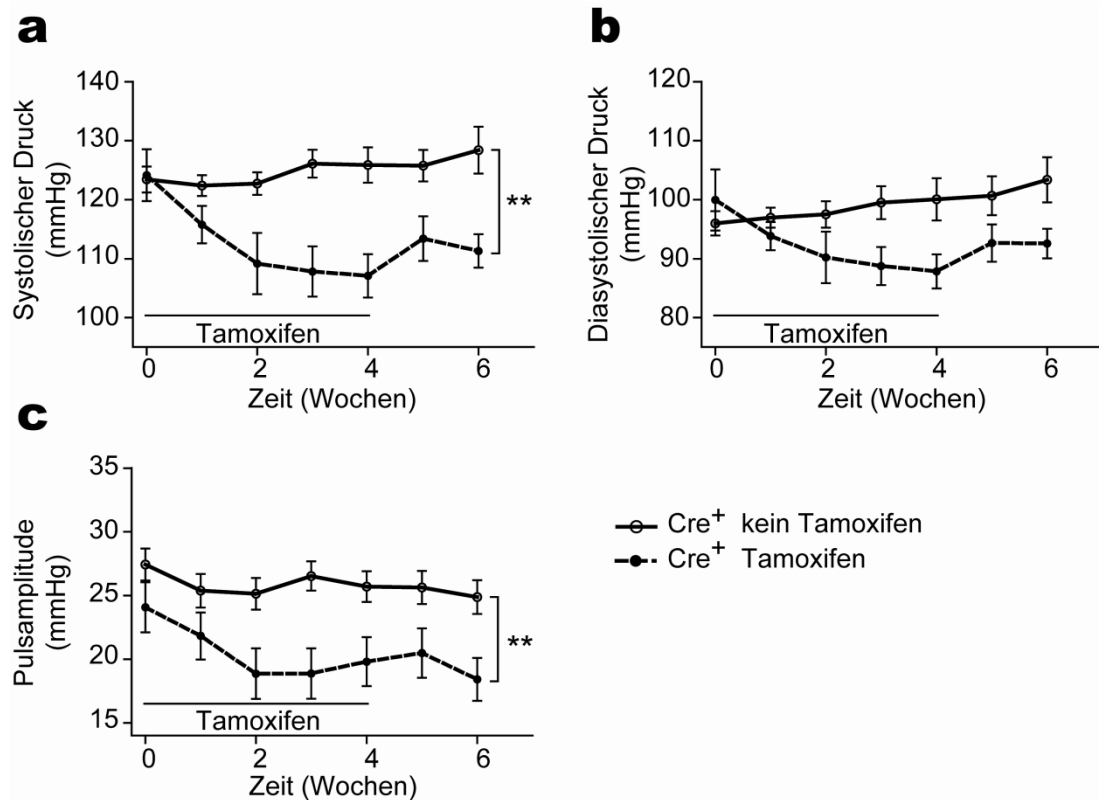


Abb.29: Zeitlicher Verlauf des systolischen und diastolischen arteriellen Druckes sowie der Pulsamplitude. Durch die Tamoxifenbehandlung sinkt der systolische Blutdruck (a) stärker als der diastolische (b) in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (Cre^+ Tamoxifen, $n=14$), während in nicht-induzierten Kontrolltieren (Cre^+ kein Tamoxifen, $n=15$) die Werte auf einem gleichen Niveau bleiben. (c) Die Pulsamplitude in den induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren fällt in den ersten zwei Wochen auf ein niedrigeres Niveau gegenüber den nicht-induzierten-Tieren und bleibt signifikant darunter. 2-wege ANOVA; ** $p<0,01$.

Zur Abklärung der Herzfunktion wurden verschiedene Parameter mit der Herzechokardiographie bestimmt, die Informationen über die myokardiale Kontraktilität widerspiegeln. Bestimmt wurde dabei zum einen die systolische Verkürzungsfraction (engl. *fractional shortening*), die prozentuale Verkürzung des Herzdurchmessers zwischen Systole und Diastole. Zum anderen erfolgte die Bestimmung des Herzauswurfvolumens (engl. *cardiac output*) und die Ejektionsfraction (engl.: *ejection fraction*), die den prozentualen Anteil des Blutes aus dem linken Ventrikels beschreibt, der ausgeworfen wird. Hierbei blieben die genannten Parameter vor Beginn (0 Wochen) und 2 Wochen nach vierwöchiger Tamoxifeninduktion (insgesamt 6 Wochen) auf dem gleichen Niveau. Es konnte kein Unterschied zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren nach sechs Wochen festgestellt werden (Abb.30). Dies deutet

darauf, dass eine veränderte Herzfunktion nicht die Ursache für den verringerten Blutdruck nach 6 Wochen ist.

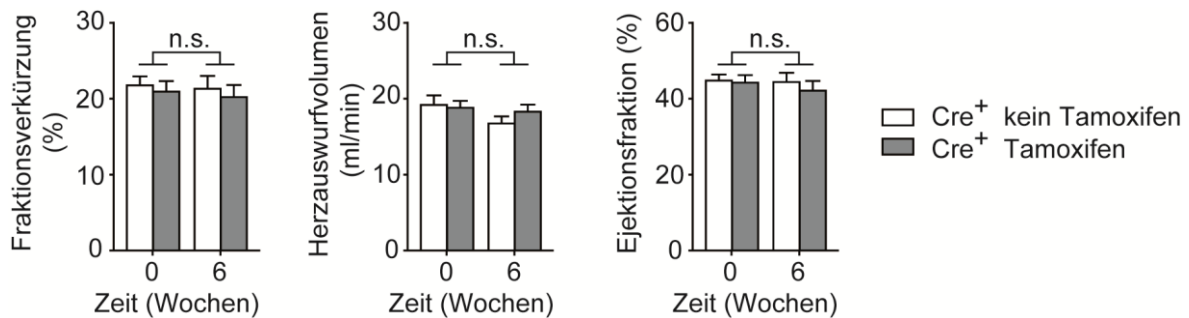


Abb.30: Transthorakale Herzechographie vor und nach tamoxifeninduzierter Rekombination. Herz-Ultraschalluntersuchung von induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (Cre⁺ Tamoxifen, n=11) vor der tamoxifeninduzierten Rekombination (0 Wochen) und zwei Wochen nach der vierwöchigen Behandlung mit Tamoxifen (6 Wochen). Als Kontrolle dienten nicht-induzierte Tiere (Cre⁺ kein Tamoxifen, n=10). Bestimmt wurden die Parameter Fractionsverkürzung, Herzauswurfvolumen und Ejektionsfraktion. Zwischen beiden Gruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Student's t-Test; n.s. p>0,05.

Um anschließend die Bedeutung von TMEM16A unter hypertensiven Bedingungen zu untersuchen, wurde den Tieren nach vorangegangener tamoxifeninduzierter Rekombination eine osmotische Minipumpe unter die Haut implantiert, die kontinuierlich Angiotensin II an das Tier abgab (Abb.31). Bei diesem etablierten Hypertensionsmodell (Harrison-Bernard *et al.* 1999) konnte beobachtet werden, dass der mittlere arterielle Druck in beiden Gruppen stieg. Die im Vorfeld induzierten-*Tmem16a*-ko-Tiere (Cre⁺ Tamoxifen) blieben mit $98,7 \pm 8,1$ mmHg zu Beginn und $124,7 \pm 7,3$ mmHg nach 8 Tagen über den gesamten Zeitverlauf signifikant unter dem Niveau der nicht-induzierten Kontrolltieren. Der Blutdruck in dieser Kontrollgruppe stieg von $116,7 \pm 8,0$ mmHg auf $155,8 \pm 7,8$ mmHg (Cre⁺ kein Tamoxifen).

Ergebnisse

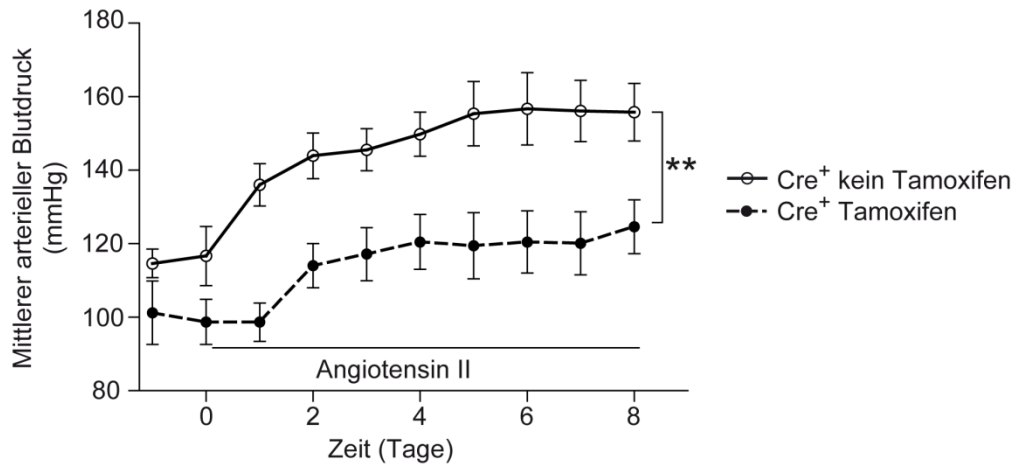


Abb.31: Zeitlicher Verlauf der telemetrischen Messung unter Angiotensin II Gabe. Dargestellt ist der mittlere arterielle Blutdruck von induzierten-*Tmem16a*-ko (Cre⁺ Tamoxifen, n=6) und Kontrollen (Cre⁺ kein Tamoxifen, n=7) unter Angiotensin II Zufuhr. Zusätzlich sind die Werte eine Woche vor der Implantation der osmotischen Minipumpen (0 Tage) gezeigt. 2-wege ANOVA; ** p<0,01.

Um die Abhängigkeit des Blutdrucks von der Salzzufuhr zu untersuchen, wurden die Tiere zunächst auf eine Niedrig-Salz- und anschließend auf eine Hoch-Salz-Diät gesetzt (Abb.32). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Niedrig-Salz-Diät die bestehende Blutdruckdifferenz zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren nicht weiter beeinflusste, was auf einen renal unabhängigen Mechanismus deutet. Hingegen führte die Umstellung auf die Hoch-Salz Diät zu einer Kompensation und Angleichung der Drücke.

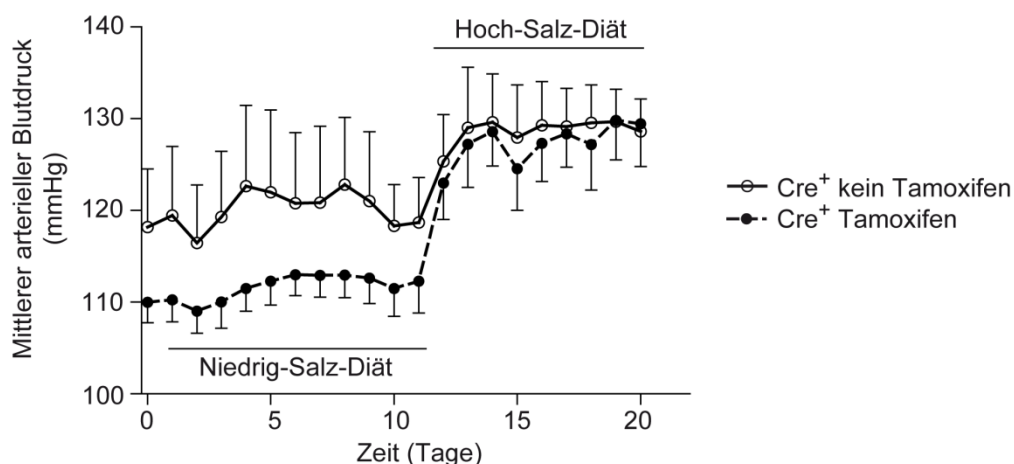


Abb.32: Zeitlicher Verlauf der telemetrischen Messung unter Niedrig-Salz- und anschließender Hoch-Salz-Diät. Induzierte-*Tmem16a*-ko (Cre⁺ Tamoxifen, n=4) und Kontrollen (Cre⁺ kein Tamoxifen, n=4) wurden zunächst auf Niedrig-Salz-Diät und anschließend auf Hoch-Salz-Diät gesetzt.

5.6 Analyse von Blutplasmaparametern

Zur Abklärung des möglichen Einflusses veränderter Blutgaswerte und Elektrolyte auf den Blutdruck wurden verschiedenste Parameter 6 Wochen nach Beginn der Tamoxifen-induzierten Rekombination bestimmt und mit nicht-induzierten Kontrollen verglichen (Tabelle 5). Dabei konnten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Werte der ermittelten Parameter für die Kontrolltiere waren vergleichbar mit bereits publizierten Daten (Boehm *et al.* 2007, Wolthuis *et al.* 2009).

Tabelle 5: Blutgasanalyse und Plasma-Elektrolyte von TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}

	kein Tamoxifen	n	Tamoxifen	n	
Na ⁺ (mmol/l)	149,15 ± 0,68	(10)	147,70 ± 1,22	(10)	n.s.
K ⁺ (mmol/l)	5,37 ± 0,19	(10)	5,21 ± 0,15	(10)	n.s.
Cl ⁻ (mmol/l)	119,30 ± 0,68	(10)	119,30 ± 1,07	(10)	n.s.
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,21 ± 0,004	(11)	1,21 ± 0,01	(11)	n.s.
Blut pH	7,4 ± 0,005	(11)	7,39 ± 0,01	(11)	n.s.
pCO ₂ mmHg	38,32 ± 0,661	(11)	37,53 ± 0,74	(11)	n.s.
BE (mmol/l)	-1,01 ± 0,499	(11)	-1,95 ± 0,66	(11)	n.s.
HCO _{3(std)} (mmol/l)	23,17 ± 0,355	(11)	22,58 ± 0,47	(11)	n.s.
Glucose (mg/dl)	215,36 ± 6,23	(11)	222,91 ± 9,96	(11)	n.s.
Laktat (mmol/l)	3,82 ± 0,885	(11)	45,06 ± 0,73	(11)	n.s.
Hct (%)	47,3 ± 1,362	(11)	36,04 ± 1,26	(11)	n.s.

Bestimmung der Blutplasmaparameter der Elektrolyte Natrium (Na⁺), Kalium (K⁺), Chlorid (Cl⁻), Calcium (Ca²⁺), der Blut pH-Wert, der Kohlendioxid-Partialdruck, Basendefizit (BE, Basenabweichung, engl.: *base excess*), Standard Bicarbonat (HCO_{3(std)}), Glucose, Laktat, sowie der Hämatokritwerte (Hct) von induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren. n.s.: nicht signifikant, Student's t-Test; p > 0.05

Da verschiedene Hormone eine wichtige regulatorische Bedeutung bei der Gestaltung des Blutdrucks besitzen, wurden relevante Hormonwerte mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren im Blutplasma bestimmt. Eine Übersicht ist in Tabelle 6 dargestellt. Die gemessenen Hormonwerte waren mit den Angaben in der Literatur und der Herstellerangaben vergleichbar. (Bohlender *et al.* 1998, Sakai *et al.* 2008, Sun *et al.* 2010, Saegusa *et al.* 2005). Zwischen beiden Gruppen wurde kein Unterschied festgestellt.

Tabelle 6: Plasma Hormonlevel von TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}

	kein Tamoxifen	n	Tamoxifen	n	
Renin (ng Angiotensin I ml/hr)	25,25 ± 4,89	(19)	26,40 ± 4,57	(21)	n.s.
Angiotensin II (pg/ml)	4,27 ± 1,14	(11)	3,74 ± 1,49	(9)	n.s.
Aldosterone (pg/ml)	22,51 ± 9,06	(18)	15,61 ± 4,84	(20)	n.s.
ANP (ng/ml)	4,83 ± 0,23	(14)	4,20 ± 0,45	(14)	n.s.

Bestimmung der Plasmahormonwerte von Renin, Angiotensin II, Aldosteron und ANP (Atriales natriuretisches Peptid) in induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren. Student's t-Test; $p > 0.05$

5.7 Bestimmung renaler Parameter

Zur Untersuchung einer veränderten Nierenfunktion wurde der Urin induzierter-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierter Kontrolltiere mit Hilfe metabolischer Käfige gesammelt. Anschließend folgte die Bestimmung der Werte für Kreatinin, Natrium, Kalium und Chlorid. Mit den Vergleichswerten aus dem Plasma konnte die Kreatinin *clearance*, sowie die fraktionelle Ausscheidung der Elektrolyte bestimmt werden (Tabelle 7). Die Werte wiesen nicht auf eine Änderung der Filtrationsleistung der Niere hin.

Tabelle 7: Renale Funktion von TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}

	kein Tamoxifen	n	Tamoxifen	n	
Kreatinin <i>clearance</i> (ml/24 h)	2288,67 ± 1139,78	(9)	2023,66 ± 642,17	(10)	n.s.
Na ⁺ FE (%)	0,174 ± 0,055	(9)	0,206 ± 0,051	(10)	n.s.
K ⁺ FE (%)	5,48 ± 1,25	(9)	6,91 ± 1,47	(10)	n.s.
Cl ⁻ FE (%)	0,0385 ± 0,0101	(9)	0,0545 ± 0,0146	(10)	n.s.

Bestimmung der renalen Parameter Kreatinin *clearance* (Ausscheidung) und der fraktionellen Ausscheidung (FE, engl.: *fractional excretion*) von Natrium, Kalium und Chlorid in induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren. n.s.: nicht signifikant, Student's t-Test; $p > 0.05$

5.8 Konstriktionsmessungen an arteriellen Gefäßen

Um die möglichen Ursachen für den verminderten Blutdruck feststellen zu können, wurden verschiedene arterielle Gefäßabschnitte mit verschiedenen konstriktiven Substanzen behandelt und die Konstriktionskraft durch einen Myographen und die

Verkürzung des Gefäßdurchmessers mittels Videomikroskopie bestimmt (Abb.33). Dabei konnten in den induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren eine verminderte Konstriktionskraft in der Aorta gegenüber den nicht-induzierten Kontrollen für die Konstriktiva Angiotensin II, dem synthetischen Prostaglandinanalogen U46619 und Phenylephrin (Abb.33a-c) beobachtet werden. In den größeren Mesenterialgefäßen hingegen (1. und 2. Ordnung) sowie in den kleineren Mesenterialgefäßen (3. und 4. Ordnung) wurde kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt (Abb.33d-i).

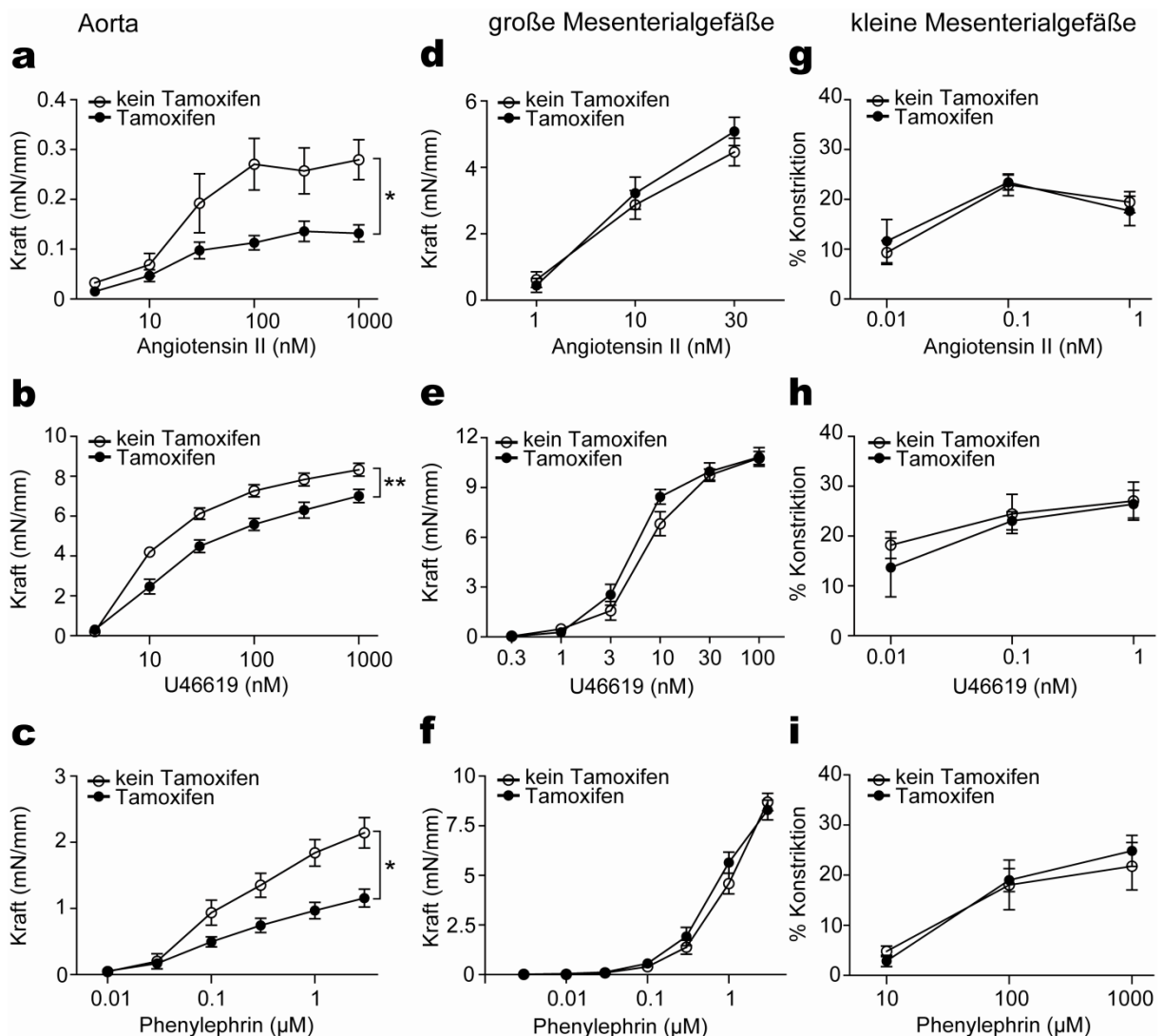


Abb.33: Konstriktionsmessung arterieller Gefäße. Grafische Darstellung der Kraftmessungen induzierter-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen) und nicht-induzierter Kontrolltiere (kein Tamoxifen). Gemessen wurden Aortenringe (a-c, jeweils n=6) und große Mesenterialgefäße (d-f, jeweils n= 16-24) mit einem Myographen und kleine Mesenterialgefäße (g-i, jeweils n=4-6) mit Hilfe der Videomikroskopie nach Behandlung mit verschiedenen konstriktiven Substanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen. 2-wege ANOVA; * p<0,05; ** p<0,01.

Um eine Konstriktion bedingt durch eine kaliumvermittelte Membrandepolarisation zu untersuchen (Karaki *et al.*, 1988), wurden Konstriktionsmessungen mit KCl durchgeführt (Abb.34). Dabei konnte in der Aorta kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (Abb.34a,b) festgestellt werden. Des Weiteren zeigten auch große und kleine Mesenterialgefäße keine Unterschiede in der Konstriktion unter 60 mM KCl (Abb.34c,d).

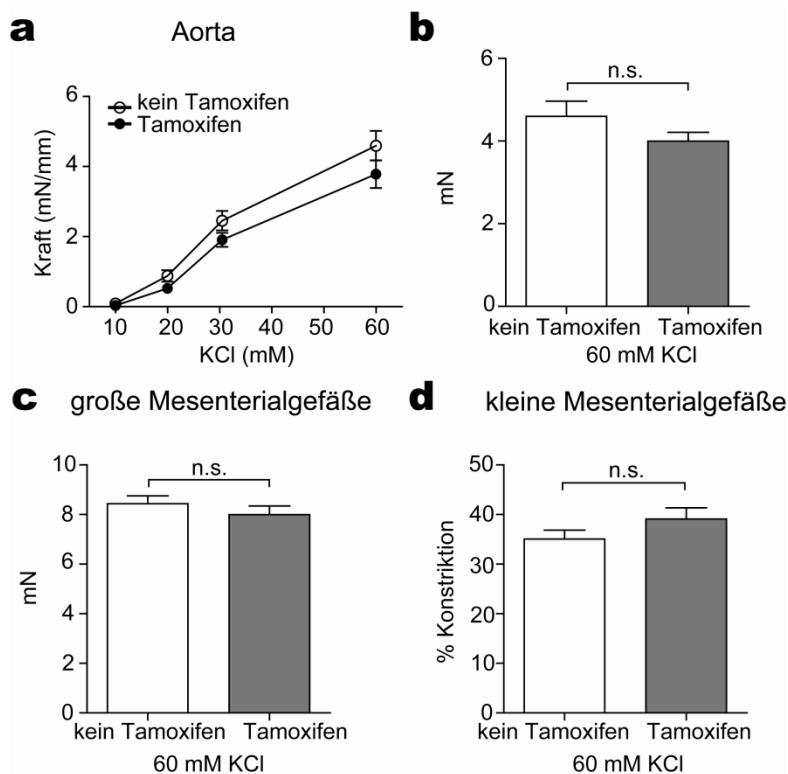


Abb.34: Konstriktionsmessung arterieller Gefäße durch KCl. Grafisch dargestellt sind die Kraftmessungen an induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren (Tamoxifen) und Kontrollen (kein Tamoxifen). Bestimmt wurde die Konstriktionskraft von Aortenringen (**a,b**, n=6-8) und großen Mesenterialgefäßen (**c**, n= 24) mit Hilfe eines Myographen. Bei kleine Mesenterialgefäße (**d**, n=4-6) geschah dies durch Videomikroskopie. Student's t-Test; n.s. p>0,05.

5.9 Die Expression von TMEM16A in mikrovaskulären Systemen

Vergleicht man die Konstriktionsstärken von Aorten und großen Mesenterialgefäßen (Abb. 33a,d) wird deutlich, dass die Mesenterialgefäße stärker kontrahieren. Weiterhin ist der periphere Widerstand kleiner Gefäße ausschlaggebender für den Blutdruck als größere Gefäße. Um den hypotensiven Effekt in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren besser zu verstehen, wurden die verschiedenen mikrovaskulären Gefäßbereiche der Netzhaut, des Kleinhirns und

des Skelettmuskels ausgewählt und immunhistochemisch markiert. Als Marker für die Gefäße wurde SMA (engl. *smooth muscle actin*) bzw. CD31 verwendet. Bei der Übersichtsaufnahme der Netzhaut (Abb.35) waren die Gefäße gut zu erkennen. Aufgrund der Verzweigungsmuster konnte zwischen Arterien (A) und Venen (V) unterschieden werden. Bei der Analyse der TMEM16A-Markierung war zu erkennen, dass die kleineren verzweigten Gefäße ein stärkeres Signal für TMEM16A zeigten als die größeren.

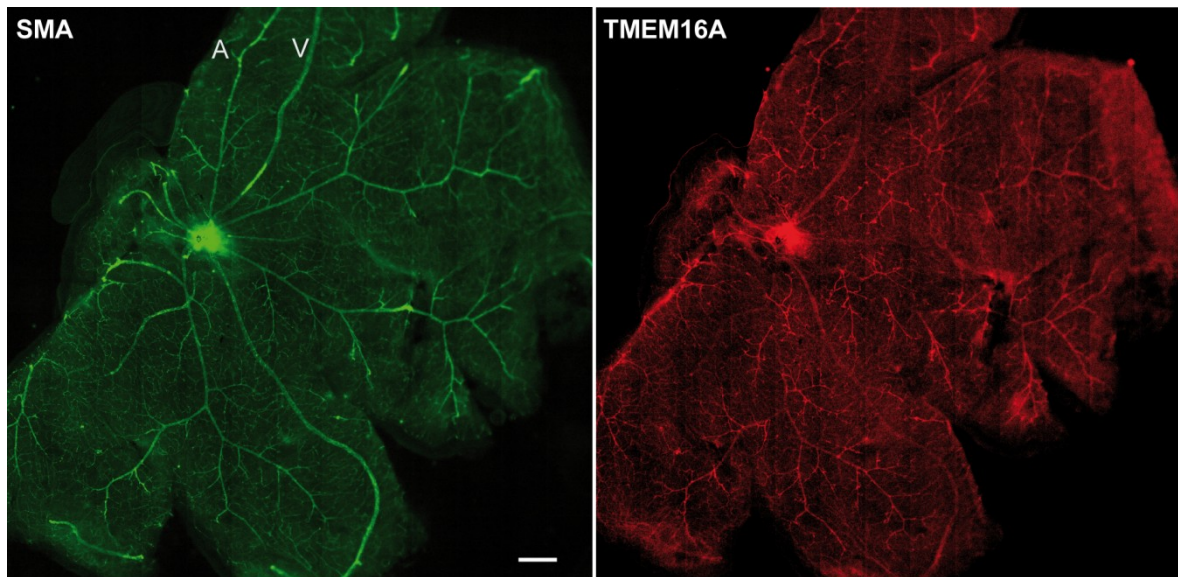


Abb.35: Übersichtsaufnahme immunhistochemischer Färbungen der Netzhaut. Markiert wurden SMA (engl. *smooth muscle actin*) und TMEM16A. Aufgrund der Gefäßverzweigung konnte zwischen Arterien (A) und Venen (V) unterschieden werden. Der Maßstab beträgt 300 μm .

Bei näherer Betrachtung konnte festgestellt werden, dass die primären Gefäße (Pfeilspitze in Abb.36) weniger markiert waren und eine strake Expression an den sphinkterartigen Verzweigungen zu den kleineren Gefäßen beobachtet werden (Pfeile in Abb.36). Dieses Muster, das eine starke Expression in den arteriellen Gefäßendigungen zeigt, konnte ebenfalls in den anderen mikrovaskulären Bereichen wie Kleinhirn und Skelettmuskel gefunden werden.

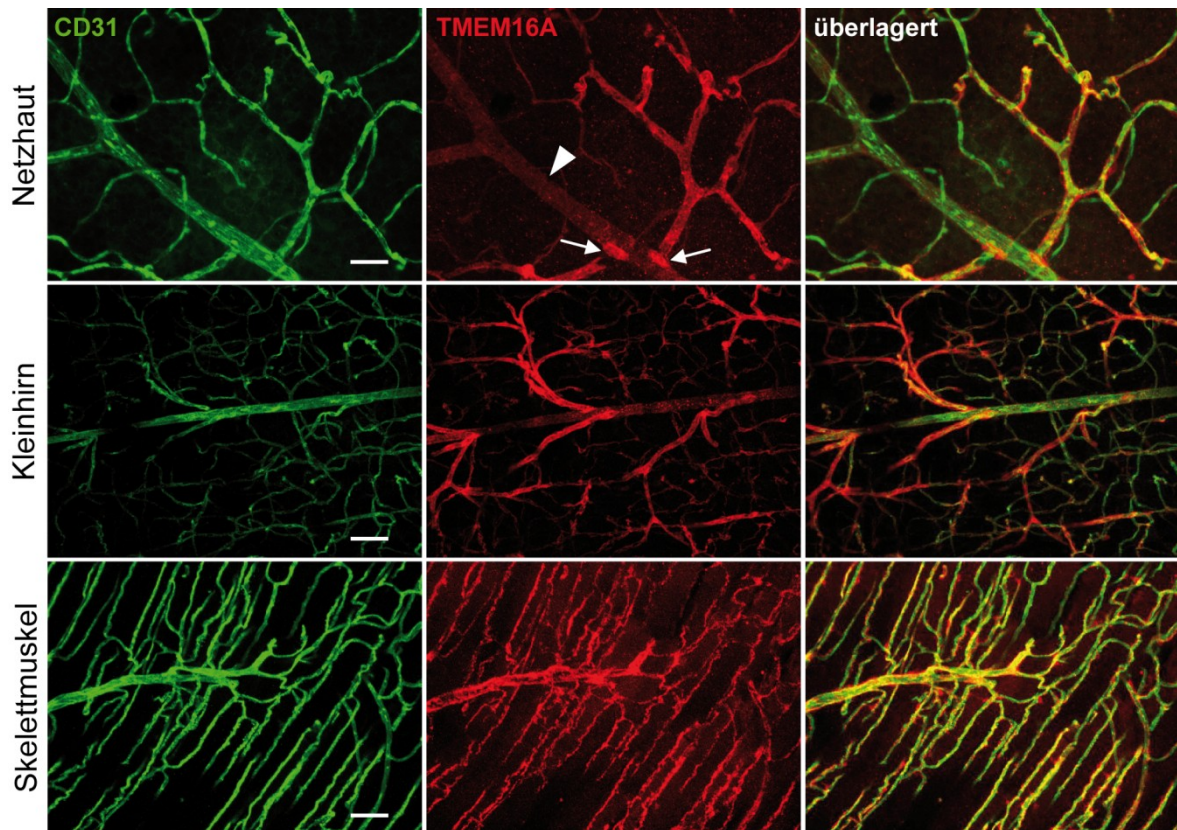


Abb.36: Immunhistochemische Markierung von Netzhaut, Kleinhirn- und Skelettmuskelschnitten. Markiert wurden CD31 (engl. *cluster of differentiation 31*) als Gefäßzellmarker und TMEM16A. Ein Primärgefäß der Netzhaut ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet, die sphinkterartigen Verzweigungspunkte durch Pfeile. Der Maßstab beträgt 30 μm .

5.10 TMEM16A vermittelt CaCCs in Perizyten im murinen Hirn

Aufgrund der nachgewiesenen Expression von TMEM16A in mikrovaskulären Systemen wurden Perizyten aus dem Hirn isoliert und auf CaCCs untersucht (Abb.37). Perizyten sind kontraktile Zellen und Bestandteil der Außenwände von Kapillaren und haben verschiedenste Differenzierungspotentiale (Dellavalle *et al.* 2007, Crisan *et al.* 2008) und können als glatte Muskelzellvorläufer fungieren (Corselli *et al.* 2010). In Perizyten aus nicht-induzierten Kontrolltieren konnten bei + 100 mV Ströme mit $110,0 \pm 8,0$ pA/pF gemessen werden, die in induzierten-*Tmem16a*-ko stark vermindert waren ($7,0 \pm 1,0$ pA/pF, Abb. 37c).

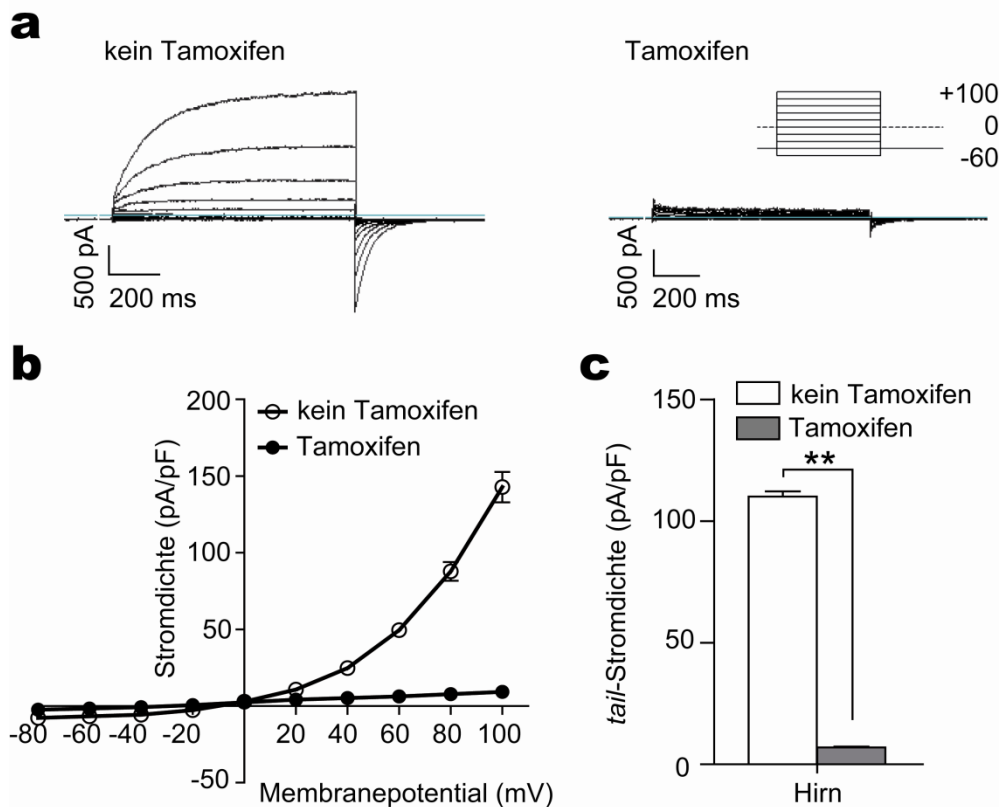


Abb.37: Elektrophysiologie von CaCCs in zerebralen Perizyten. (a) Repräsentative Ströme von Perizyten aus nicht-induzierten Kontrolltiere (kein Tamoxifen) und induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen) Tieren. (b) Strom-Spannungskurve bei verschiedenen angelegten Membranpotentialen (kein Tamoxifen n=14, Tamoxifen n=13) und (c) Gegenüberstellung der *tail*-Stromdichte bei + 100 mV (jeweils n=14) Student's t-Test; ** p<0,01

5.11 TMEM16A vermittelt CaCCs und Konstriktion in kleinen retinalen Gefäßen

Als weiteres zu untersuchendes mikrovaskuläres System wurde die Netzhaut näher analysiert. Hierfür wurden Zellen aus retinalen Gefäßen auf CaCCs untersucht (Abb.38). Es konnte – entsprechend dem Expressionsmusters von TMEM16A – nahezu kein Strom in Zellen aus Arteriolen 1.Ordnung gemessen ($3,9 \pm 1,2$ pA/pF bei + 100 mV Membranpotential). Hingegen zeigten die Zellen aus Arteriolen 2./3. Ordnung charakteristische Ströme, die in induzierten-*Tmem16a*-ko stark reduziert waren (Abb.38b,c). Bei der Gegenüberstellung der *tail*-Stromdichten bei + 100 mV wird der Unterschied am deutlichsten ($128,5 \pm 19,9$ pA/pF in nicht-induzierten Kontrolltieren gegenüber $11,5 \pm 5,7$ pA/pF in induzierten-*Tmem16a*-ko).

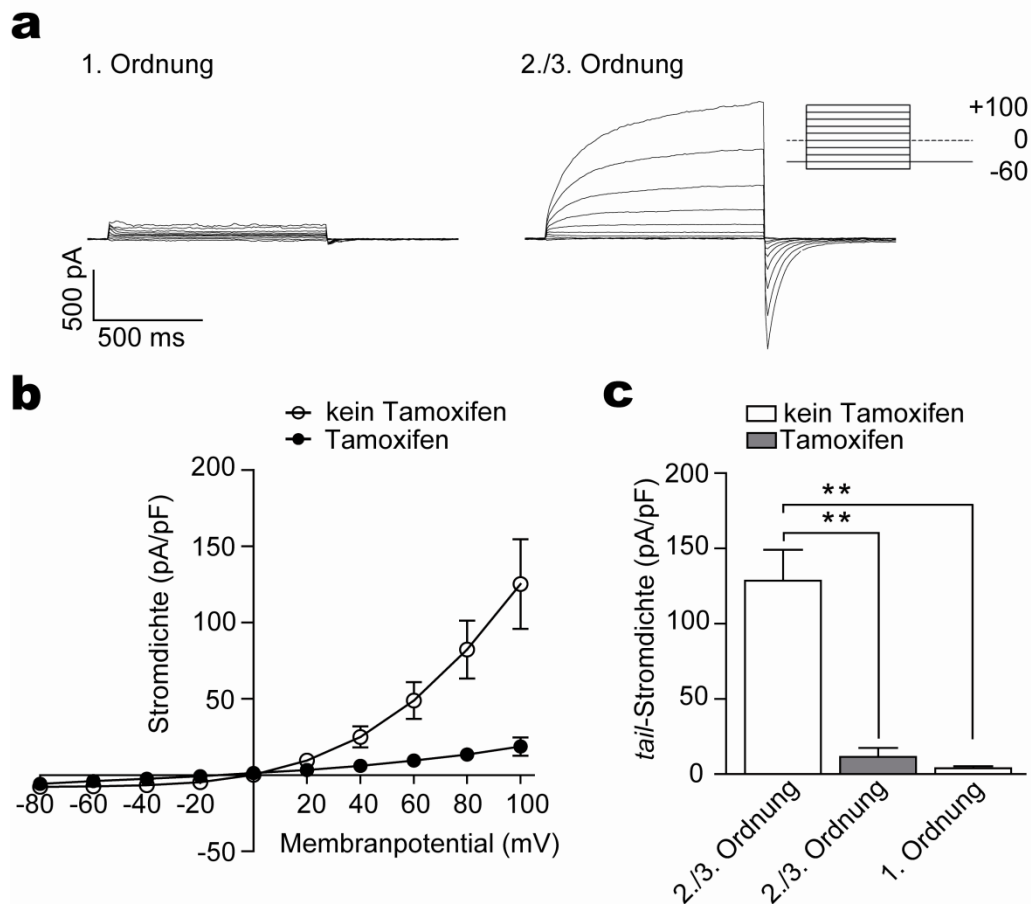


Abb.38: Elektrophysiologie von CaCCs aus retinaler Gefäße. (a) Repräsentative CaCCs retinaler Zellen aus Arteriolen 1.Ordnung und 2./3. Ordnung. (b) Stromdichte bei verschiedenen angelegten Membranpotential und (c) Vergleich der *tail*-Stromdichte bei + 100 mV von Zellen aus Arteriolen 2./3. Ordnung nicht-induzierter (n=15) und induzierter-*Tmem16a*-ko (n=17) Tiere. Student's t-Test; ** p<0,01.

Um den Einfluss von TMEM16A-vermittelten CaCCs in retinalen Arteriolen auf die Konstriktion zu untersuchen, wurden Messungen mittels Videomikroskopie durchgeführt (Abb.39). Dafür wurden die Gefäßdurchmesser von Arteriolen 2./3. Ordnung (Abb.39 Pfeil) bei verschiedenen Konzentrationen des synthetischen Prostaglandinanalogs U46619 gemessen. Es lässt sich konstatieren, dass retinale Gefäße in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren nicht in dem Maße Kontrahieren, wie es nicht-induzierte Kontrolltiere vermögen.

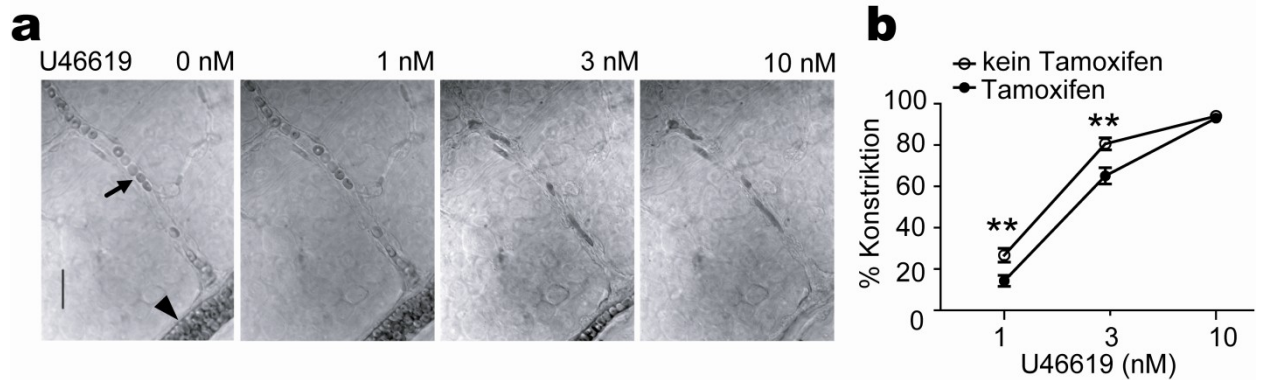


Abb.39: Konstriktionsmessung retinale Arteriolen. (a) Videomikroskopieaufnahmen retinaler Arteriolen unter verschiedenen U46619 Konzentrationen. Die primäre Arteriole ist gekennzeichnet durch eine Pfeilspitze. Der Maßstab beträgt 20 μm . (b) Vergleich der Konstriktion von Arteriolen 2./3. Ordnung (Pfeil) von nicht-induzierten (kein Tamoxifen) und induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen) Tieren (n= jeweils 60 Gefäße). 2-wege ANOVA; ** $p < 0,01$.

5.12 TMEM16A vermittelt CaCCs in Perizyten des Skelettmuskels und beeinflusst den peripheren Widerstand

Für den Skelettmuskel, als weiteres mikrovaskuläres System, wurden die hinteren Gliedmaßen untersucht. Die daraus isolierten Perizyten zeigten stark reduzierte CaCCs in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren gegenüber den nicht-induzierten Kontrollen (Abb.40a,b *tail*-Stromdichte bei + 100 mV 26 ± 22 pA/pF in induzierten-*Tmem16a*-ko und Kontrollen 129 ± 12 pA/pF). Dabei unterschied sich das Membranruhepotential in beiden Gruppen nicht wesentlich ($-71,2 \pm 1,6$ mV in nicht-induzierten Kontrollen und -68 ± 3 mV in induzierten-*Tmem16a*-ko, Abb.40c). Durch Applikation des konstriktiv wirkenden Prostaglandinanalogs U46619 konnte eine positive Verschiebung des Membranpotentials in den Perizyten aus nicht-induzierten Kontrolltieren beobachtet werden, die sich bei einer erniedrigten extrazellulären Chloridkonzentration – erreicht durch Ersetzen von Chlorid gegen Methansulfonat – noch verstärkte (Differenz von $\Delta 25,1 \pm 3,3$ mV) bei U46619 auf $\Delta 64,0 \pm 3,2$ mV bei U46619 Chlorid gering, Abb.40d). In induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren veränderte sich das Potential nur gering bzw. wurde sogar negativer (Differenz von $\Delta -4,3 \pm 3,1$ mV bei U46619 auf $\Delta -14,7 \pm 1,5$ mV bei U46619 Chlorid gering, Abb.40d).

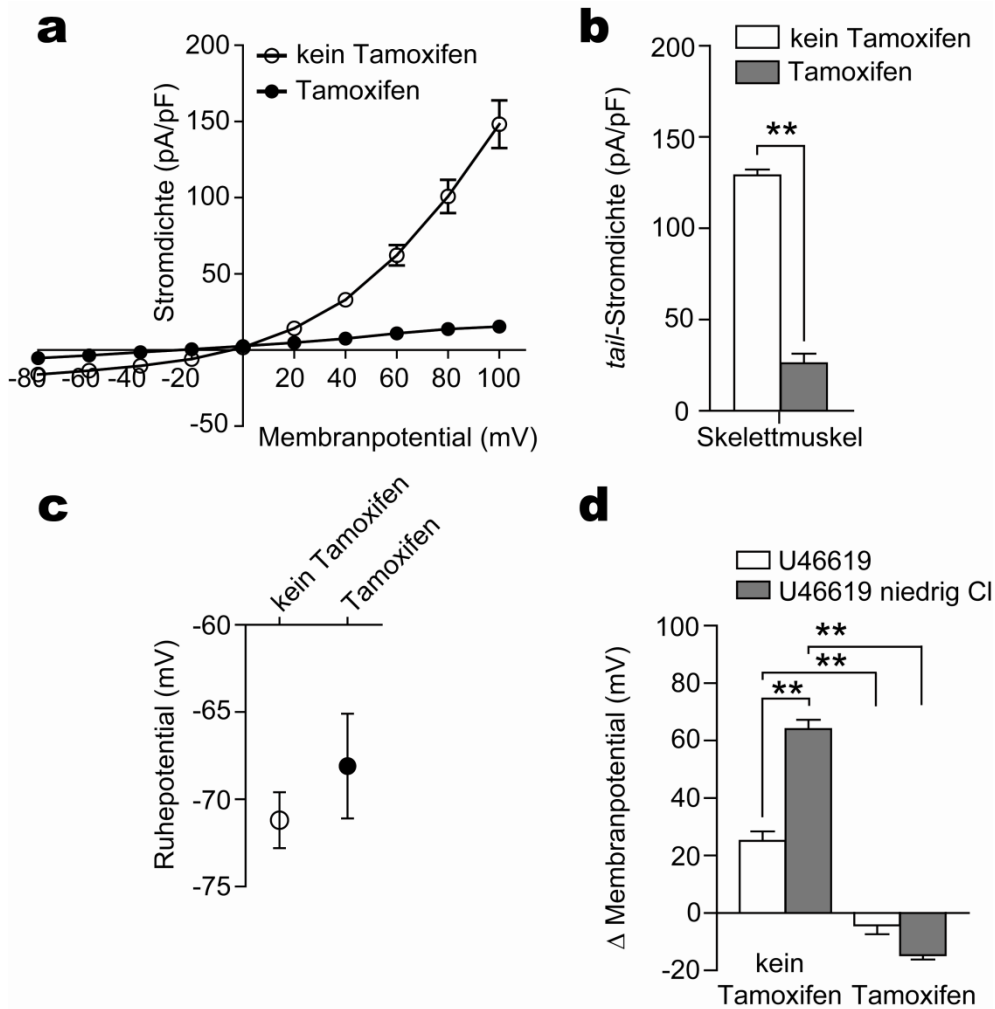


Abb.40: Elektrophysiologie von CaCCs an Perizyten des Skelettmuskels. (a) Strom-Spannungskurve bei verschiedenen angelegten Membranpotentialen und (b) Vergleich der *tail*-Stromdichte bei + 100 mV induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen, n= 17) und nicht-induzierten (kein Tamoxifen, n=15) Kontrolltieren. (c) Messungen der Membranruhepotentiale an Perizyten aus induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren (jeweils n=6). (d) Differenz der Membranpotentiale nach Applikation von U46619 und U46619 bei erniedrigtem Chlorid (jeweils n=6). Student's t-Test; ** p<0,01.

Um die Auswirkungen der stark verminderten CaCCs in den Perizyten des Skelettmuskels auf den Blutdruck zu untersuchen, wurde an die Femoralarterie präparierter Hintergliedmaßen mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe ein Perfusionsdruck von 80 mmHg angelegt und verschiedene U46619-Konzentrationen appliziert und der resultierende Druck gemessen (Abb.41a). Anschließend wurde die Druckdifferenz des Peaks nach Applikation zum Ausgangswert bestimmt und verglichen (Abb.41b). Dabei war die Differenz in nicht-induzierten Kontrolltieren größer als in Tamoxifen-induzierten und zeigte bei der Bolusinjektion für 60 pmol U46619 einen signifikanten Unterschied ($\Delta 12,86 \pm$

3,29 mmHg in induzierte-*Tmem16a*-ko und $\Delta 25,06 \pm 4,29$ mmHg in Kontrollen). Somit konnte demonstriert werden, dass TMEM16A in den Perizyten einen Einfluss auf den peripheren Widerstand hat.

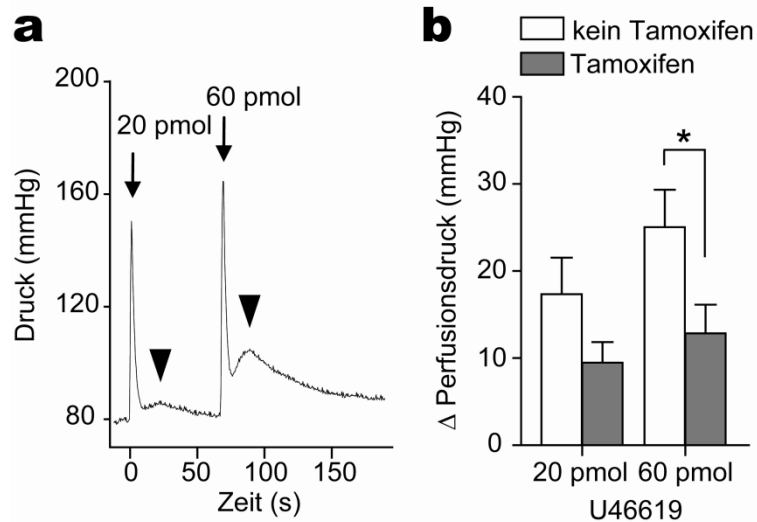


Abb.41: Perfusionsdruckmessungen an isolierten Hintergliedmaßen. (a) Repräsentativer Druckverlauf perfundierter Hintergliedmaßen bei Bolusinjektionen von 20 und 60 pmol U46619 (Pfeile). (b) Differenzvergleich der gemessenen Perfusionsdrücke nach der Applikation (Pfeilspitze) von 20 und 60 pmol U46619 zum Ausgangswert von induzierten-*Tmem16a*-ko (Tamoxifen, n=21) und nicht-induzierten (kein Tamoxifen, n=20) Kontrolltieren. Student's t-Test; * p<0,05.

6. Diskussion

6.1 TMEM16A und seine Funktion als calciumaktivierter Chloridkanal

Mit Hilfe der durchgeführten Überexpressionsversuche der IRES-Plasmide für das native und das trunkierte TMEM16A in HEK293T Zellen konnte immunhistochemisch bestätigt werden, dass das native TMEM16A in der Plasmamembran lokalisiert ist (Ferrera *et al.* 2009). Ein Vergleich der Proteinsequenzen ergab, dass Exon 21 zwischen den Mitgliedern der Genfamilie hoch konserviert ist. Nach Deletion des von Exon 21 kodierten Abschnitts im TMEM16A lokalisierte das trunkierte Protein vorwiegend intrazellulär.

Proteinlysate von transfizierten HEK293T Zellen wurden für Western Blot Analysen des nativen TMEM16A verwendet. Die Analyse zeigte zwei Banden ähnlicher Größe von ca. 120 kDa, was auf unterschiedliche Spleißvarianten, Isoformen oder Glykosylierungszustände zurückzuführen sein könnte (Ferrera *et al.* 2009, Fallah *et al.* 2011). Hingegen ergab die Analyse von Lysaten aus HEK293T Zellen nach Transfektion mit dem Deletionskonstrukt für Exon 21 eine Bande, die ein verringertes Molekulargewicht zeigte. Basierend auf der Kalkulation der primären Aminosäuresequenz (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) führt der Verlust von Exon 21 zu einer Reduktion der Proteingröße von TMEM16A um 5,74 kDa. Jedoch scheint die Differenz des Molekulargewichtes im Western Blot größer zu sein. Eine mögliche Ursache könnten fehlende Glykosylierungen im extrazellulären Abschnitt zwischen TM7 und TM8 sein (Fallah *et al.* 2011). Bedingt durch das Fehlen von TM6 könnten diese beiden Transmembrandomänen in falscher Orientierung in die Plasmamembran inseriert sein, was die N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum verhindern könnte (Abeijon *et al.* 1992).

Die elektrophysiologischen Analysen ergaben, dass die Expression des nativen TMEM16A in HEK293T Zellen calciumaktivierte Chloridströme induziert. Die Größe und Kinetik der Ströme entsprach den bereits publizierten Werten (Adomaviciene *et al.* 2013). Die Transfektion des Deletionskonstruktes für Exon 21 hingegen bewirkte praktisch keine Chloridleitfähigkeit. Demzufolge ist das Exon 21 ein wichtiger Bestandteil der Membranintegrität des Gesamtproteins und essentiell für die Wirkungsweise von TMEM16A als CaCC.

Das trunkierte *Tmem16a* ohne Exon 21 wurde in den Zellen exprimiert und die mRNA nicht durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) abgebaut (Chang *et al.* 2007). Daher kann ein dominant negativen Effekt oder eine regulatorische Restfunktion des trunkierten TMEM16A nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur ist ein ähnliches Beispiel für eine unerwartete Restfunktion in einem anderen Zusammenhang beschrieben (Mijimolle *et al.* 2005). Dabei wurde bei einem konditionalen Knockout-Mausmodell für die β -Untereinheit der Protein-Farnesyltransferase (FNTB) zwar eine stark reduzierte Farnesyltransferase-aktivität beobachtet, jedoch blieben andere Funktionen in den Knockout-Tieren erhalten, die eigentlich durch FNTB vermittelt werden. Weiterhin stellten Mijimolle *et al.* (2005) fest, dass der Knockout von *Fntb* keinen Effekt auf die Tumorgenese hat, obwohl Inhibitoren der Farnesyltransferase nachweislich das Tumorstadium verzögern (Barrington *et al.* 1998). Yang *et al.* (2009) konnten später zeigen, dass in diesem konditionalen Knockout-Modell durch einen nichtvorhersehbaren Spleißvorgang ein verkürztes Protein mit einer *in-frame* Deletion entsteht, welches nicht abgebaut wird und die unerwarteten Beobachtungen erklären könnte.

6.2 Induzierbare konditionale Inaktivierung von TMEM16A in vaskulären glatten Muskelzellen

Der beobachtete Phänotyp des konstitutiven *Tmem16a*-Knockouts, der aus dem konditionalen generiert wurde, entsprach dem in Rock *et al.* (2008) beschriebenen. Somit bot das konditionale Modell eine gute Grundlage für die Untersuchung der Funktion von TMEM16A im murinen Organismus. Die konditionale Linie wurde mit der induzierbaren SMMHC-CreER^{T2} Cre-Rekombinase Linie verpaart (Wirth *et al.* 2008). Die Spezifität dieser Cre-Linie wurde mit Hilfe einer EYFP-Reporterlinie an verschiedenen Gefäßen überprüft und bestätigt. In Anwesenheit von Tamoxifen gelangt die Cre-Rekombinase, die ein Fusionsprotein mit einem modifizierten Östrogenrezeptor darstellt, in den Zellkern der glatten Muskelzellen. Dort ermöglicht sie die Exzision des Polyadenylierungsabschnittes der Reporterengenkassette, welcher sonst die Translation von EYFP verhindert (Srinivas *et al.* 2001). Somit gab das detektierte EYFP Rückschlüsse auf die gewebsspezifische Expression der Cre-Rekombinase.

Die Expressionsuntersuchungen in arteriellen Gefäßen von induzierten-*Tmem16a*-ko- und nicht-induzierten Kontrolltieren ergaben im Western Blot Signale, die mit denen der *in vitro* Analysen und des konstitutiven Knockouts korrelieren. Bei der Gegenüberstellung von Gefäßen verschiedener Größe im Western Blot konnte zusätzlich die Abnahme der Signalstärke in kleineren arteriellen Gefäßen gezeigt werden. Diese Beobachtungen wurden durch immunhistochemische Markierungen bestätigt. Daher ist die Expression von *Tmem16a* in arteriellen Gefäßen offenbar nicht homogen und TMEM16A könnte bei der Konstriktion kleinerer arterieller Gefäße weniger von Bedeutung sein. Die immunhistochemischen Signale für TMEM16A waren im gesamten Zellkörper der vaskulären glatten Muskelzellen vorhanden und ähnlich denen, die für andere Ionenkanäle beschrieben sind (Davis *et al.* 2010). Dabei werden bedingt durch posttranslationale Prozesse im endoplasmatischem Retikulum, im Golgi-Apparat und beim intrazellulären Transport Signale innerhalb der gesamten Zelle detektiert. Die beobachteten Signale für TMEM16A in glatten Muskelzellen sind zudem vergleichbar mit anderen bereits publizierten Markierungen muriner Gefäßschnitte (Davis *et al.* 2010) oder frisch isolierten glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie von Ratten (Forrest *et al.* 2012). Eine geringere Expression von TMEM16A in kleineren arteriellen Gefäße konnte ebenfalls bereits beobachtet werden (Davis *et al.* 2010). Dabei zeigten Davis *et al.* (2010) niedrigere Expressionslevel von TMEM16A in der Karotis im Vergleich zur Aorta.

Aus der Literatur sind auch andere Beispiele für eine derartig heterogene Expression in vaskulären glatten Muskelzellen arterieller Gefäße bekannt. Die Arbeitsgruppe Osborn *et al.* (1981) fand heraus, dass das Intermediärfilamentprotein Desmin in der Aorta im Bereich des *Truncus brachiocephalicus* in sehr geringem Maße und vom distalen Teil der Aorta über die *Arteria iliaca communis* und den Mesenterialgefäßen zunehmend exprimiert wird. Osborn *et al.* (1981) schlussfolgerten, dass eine geringe Anzahl Desmin-positiver Zellen typisch für elastische Arterien ist, während Mesenterial- und andere Blutgefäße charakteristischerweise eine hohe Anzahl Desmin-positiver Zellen besitzen. Diese Hypothese konnten Wede *et al.* (2002) bestätigen. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die Kontraktion der Aorta und großer Mesenterialgefäße in Desmin-Knockout-Tieren unverändert waren, während kleine Arterien eine verminderte Kontraktionskraft aufwiesen. Somit besitzen TMEM16A

und Desmin eine gegenläufige Expression in arteriellen Gefäßen und könnten die Gefäßkontraktion und -elastizität unterschiedlich beeinflussen.

Die Arbeitsgruppe Wang *et al.* (2012) zeigte eine weitere Funktion von TMEM16A als negativer Regulator der Zellproliferation auf. Sie fanden heraus, dass sich in hypertensiven Ratten die Expression von TMEM16A umgekehrt proportional zur Proliferation glatter Muskelzellen der Basilararterie verhält. Um eventuelle Hinweise auf eine morphologische Veränderung in arteriellen Gefäßen von induzierten-*Tmem16a*-ko zu bekommen, wurden diese histologisch analysiert. Jedoch ergaben die Untersuchungen keine strukturellen Veränderungen der Gefäßwände im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrolltieren. Somit könnte die beobachtete Proliferation in den induzierten hypertensiven Ratten, gezeigt durch Wang *et al.* (2012), anderweitig bedingt sein oder das trunkierte TMEM16A könnte weiterhin diese regulatorische Funktion vermitteln.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an isolierten aortalen Muskelzellen aus Wildtyp- und nicht-induzierten Kontrolltieren zeigten calciumaktivierte Chloridströme. Diese sind mit denen vergleichbar, die in isolierten glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie von Ratten beschrieben wurden (Manoury *et al.* 2010). Diese Ströme konnten durch das Entfernen von Calcium oder durch Zugabe von Niflumic Acid in der Elektrodenlösung inhibiert werden, was eine charakteristische Eigenschaft der CaCCs ist (Kitamura & Yamazaki 2001). Im Gegensatz dazu waren in Zellen induzierter-*Tmem16a*-ko-Tiere diese Ströme nur noch als unspezifische Hintergrundströme in sehr geringem Maße vorhanden. Das bedeutet, dass CaCCs in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren nicht mehr zur Kontraktion der Muskelzellen beitragen können. Der Vergleich von CaCCs aus vaskulären glatten Muskelzellen mit weiteren arteriellen Gefäßen zeigte schwächere Ströme in Gefäßen geringerer Größe. Wobei diese in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren ebenfalls drastisch reduziert waren. Diese Daten sind analog dem Expressionsmusters von TMEM16A und deuten darauf, dass TMEM16A und seine CaCCs weniger Einfluss auf die Kontraktion dieser Gefäße haben könnte.

6.3 Konditionale Inaktivierung von TMEM16A in Gefäßmuskelzellen verringert den mittleren arteriellen Blutdruck

Für die Analyse des Blutdrucks wurde den Tieren ein Telemetriesystem implantiert, das nach einer postoperativen Regenerationsphase die direkte Analyse des Blutdrucks erlaubte (Plehm *et al.* 2006). Durch diese Methode war es möglich, den mittleren arteriellen Druck der Tiere über den Verlauf der vierwöchigen Tamoxifeninduktion zu beobachten. Eine Alternative zur telemetrischen Analyse stellt die Blutdruckmessung an den großen Schwanzgefäßen mit Hilfe einer Manschette dar (engl. *tail-cuff* Methode, Feng *et al.* 2008). Dem operativen Eingriff und der damit verbundenen Belastung für das Tier bei der telemetrischen Methode steht der direkte Kontakt des Experimentators zum Versuchstier bei der Messung mit der Manschette gegenüber. Letzteres könnte die Resultate aufgrund des damit verbundenen Stresses verfälschen. Zwar gelingt eine gewisse Eingewöhnung der Tiere an die Apparatur, situationsbedingte Einflüsse während der Messung können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Deshalb ist die telemetrische Messung die Methode der Wahl.

Die Analyse ergab, dass der mittlere arterielle Druck in TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}-Tieren während der Tamoxifeninduktion über vier Wochen signifikant sank, verglichen mit den Kontrollgruppen. Nach Absetzen der Tamoxifenapplikation erhöhte sich der Druck etwas, blieb aber weiterhin signifikant erniedrigt. Möglicherweise ist diese leichte Erhöhung des Blutdrucks auf kardiale Einflüsse zurückzuführen. Denn die Herzfrequenz war am Ende der Tamoxifenbehandlung signifikant verringert und kehrte anschließend auf ihr Ausgangsniveau zurück. Überraschenderweise konnte dieser Effekt nach Tamoxifenapplikation ebenfalls in der Kontrollgruppe beobachtet werden, die das SMMHC-CreER^{T2} nicht besaß. Daraus ist zu schlussfolgern, das Tamoxifen möglicherweise selbst einen Effekt auf den Blutdruck hat. Ein weiteres Indiz dafür ist der Kurvenverlauf des mittleren arteriellen Drucks, der in dieser Gruppe ähnlich dem der induzierten-*Tmem16a*-ko-Tiere verläuft. Weitere Hinweise für kardiovaskuläre Effekte von Tamoxifen finden sich zusätzlich in der Literatur. Beispielsweise inhibiert Tamoxifen reversibel volumenregulierte Chloridströme (Zhang *et al.* 1994, Valverde *et al.* 1993). Die entsprechenden Kanäle sind in vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben worden (Yamazaki *et al.* 1998) und

könnten nach dem Absetzen von Tamoxifen zur Erhöhung des Blutdrucks beitragen. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, die den direkten Einfluss von Tamoxifen auf den Kreislauf – insbesondere bei der Verwendung Tamoxifen-induzierter Cre-Rekombinase Mausmodelle – aufklären (Li *et al.* 2013, Wendling *et al.* 2009).

Die Betrachtung des systolischen und des diastolischen arteriellen Druckes der induzierten-*Tmem16a*-ko-Tiere verdeutlicht, dass sich der systolische Druck stärker erniedrigte als der diastolische. Dies lässt indirekt eine verringerte Konstriktionsstärke vermuten. Größere Gefäße besitzen die Eigenschaft, das ausgeworfene Schlagvolumen in einer Art elastischem Reservoir temporär zu speichern und zeitverzögert abzugeben (Belz *et al.* 1995). Diese als Windkesselfunktion bezeichnete Eigenschaft gewährleistet einen kontinuierlicheren Blutfluss und eine bessere Versorgung der Peripherie. Aus der Differenz von systolischen und diastolischen Druck ergibt sich die Pulsamplitude, die einen Rückschluss auf die Steifheit der Gefäße zulässt. Eine geringere Steifheit der Gefäße resultiert in einer kleineren Pulsamplitude (Safar *et al.* 2005). Somit kann die erniedrigte Pulsamplitude in den induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren als begünstigender Faktor angesehen werden, der verbunden mit einer besseren Elastizität der Gefäße, zu einem niedrigeren Blutdruck beitragen könnte.

Um die Bedeutung von TMEM16A auf den Blutdruck weiter zu untersuchen, wurde durch kontinuierliche Zufuhr von Angiotensin II experimentell eine Hypertonie in den Tieren erzeugt. Dabei stieg der mittlere arterielle Druck der im Vorfeld mit Tamoxifen induzierten TMEM16A-SMMHC-CreER^{T2}-Tiere auf ein Niveau, das über den gesamten Verlauf der Messung signifikant unter dem der nicht-induzierten Kontrolltiere blieb. Dies deutet weiter auf einen verminderten Gefäßtonus hin, bedingt durch den Funktionsverlust von TMEM16A in Gefäßmuskelzellen. Auch eine Niedrig-Salz-Diät hatte keine weitere Veränderung des Blutdrucks zur Folge. Dies könnte auf einen renal unabhängigen Mechanismus schließen lassen, bei dem das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System (RAAS) in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren nicht kompensatorisch aktiviert wird. Hingegen verschwand der Blutdruckunterschied durch eine anschließende Hoch-Salz-Diät, bei der möglicherweise das RAAS unterdrückt wird und die Filtrations- und Resorptionsleistung der Nieren den Blutdruck in beiden Gruppen auf ein gleiches maximales Druckniveau ansteigen lässt. Dies deutet darauf hin,

dass die Nierenfunktion nicht durch die gefäßmuskelspezifische Deletion von TMEM16A beeinflusst wurde. Außerdem wurden hormonelle Einflüsse, Parameter der Filtrationsrate, sowie Elektrolyt- und Blutbestandteile in induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren sechs Wochen nach Induktionsbeginn überprüft, wobei keine Veränderungen festgestellt werden konnten.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass CaCCs an der Reninsekretion juxtaglomerulärer Zellen beteiligt sein könnten, indem CaCC einen membrandepolarisationsbedingten Calciumeinstrom bewirken und die Sekretion verhindern (Kurtz 2011). Eine Blockade der Chloridkanäle verringert die durch Angiotensin II vermittelte Inhibierung der Reninfreisetzung (Nabel et al. 1999). Renin-sezernierenden Zellen sind spezialisierte glatte Muskelzellen (Freeburg et al. 2004). Wichtige Hinweise, dass TMEM16A als CaCC möglicherweise an der Sekretion beteiligt sein könnte und diese vermindert, lieferten Faria et al. (2014). Sie zeigten zum einen durch immunhistochemische Markierungen, dass TMEM16A dominant im proximalen tubulären Nierenepithel exprimiert wird und dass tubuläre *Tmem16a*-Knockout-Tiere eine Proteinurie und erniedrigte Elektrolyte im Urin aufweisen. Zum anderen konnten sie durch den gezielten tubulären Knockout erhöhte Serumkonzentrationen von Renin und dem im RAAS nachgeschaltetem Aldosteron beobachten (Faria et al. 2014). Somit wäre eine gesteigerte Reninsekretion in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren denkbar. Allerdings exprimieren die Renin-sezernierenden Zellen laut Sequeira Lopez et al. (2001) nicht die glatten Muskelzell-Marker α -SMA und SMMHC. Letzterer Marker reguliert die CreER^{T2}-Inaktivierung von TMEM16A in dem für diese Arbeit verwendeten konditionalen Mausmodell. Die Ergebnisse von Sequeira Lopez et al. (2001) deuten auf einen Entwicklungsprozess hin, sodass diese glatten Muskelzellen erst zu einem späteren Zeitpunkt beginnen, die typischen Muskelzell-Marker zu exprimieren, bei dem sie Renin nicht mehr produzieren. Auch Kurtz (2011) beschreibt eine inverse Korrelation zwischen der Reninexpression und der Expression der Marker glatter Muskelzellen, sodass eine hohe Expression von Markerproteinen mit einer geringen Expression von Renin assoziiert ist. Demzufolge wäre es möglich, dass eine über SMMHC regulierte CreER^{T2}-Inaktivierung von TMEM16A nicht in Renin-sezernierenden Zellen zustande kommt. Dies könnte erklären, weshalb keine veränderte Reninkonzentration im Serum induzierter-*Tmem16a*-ko-Tiere zu finden war.

Eine andere Theorie setzt eine SMMHC-CreER^{T2} induzierte Inaktivierung von TMEM16A in Renin-sezernierenden Zellen voraus. Hierbei besitzt das somit entstandene trunkierte TMEM16A weiterhin seine regulatorische Funktion bei der Reninsekretion und die durch TMEM16A vermittelten CaCCs sind für die Sekretionsregulation nicht notwendig. Denn bei der olfaktorische Signalweiterleitung sind CaCCs durch TMEM16B trotz starker Expression auch nicht essentiell (Billig *et al.* 2011). Somit steht die Frage offen, ob TMEM16A eine Chloridleitfähigkeit vermittelt, die bei der Reninsekretion von Bedeutung ist.

6.4 TMEM16A ist an der aortalen – jedoch nicht an der mesenterialen – Konstriktion beteiligt

Um den verringerten Gefäßwiderstand bzw. die Gefäßkontraktilität zu untersuchen, wurden Kraftmessungen an isolierten arteriellen Gefäßringen bzw. -abschnitten vorgenommen. Dabei konnten die Aortenringe aus induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren nach Behandlung mit verschiedenen Agonisten für G-Proteingekoppelte-Rezeptoren (GPCR) nicht die Konstriktionskraft aufbringen, welche die nicht-induzierten Kontrolltiere zeigten. Nachfolgend wurde Kaliumchlorid appliziert, da Kaliumchlorid in hohen Konzentrationen spannungsgesteuerte Calciumkanäle öffnet und dadurch eine Gefäßkonstriktion bewirkt (Karaki *et al.* 1986). Hierfür liegt ein anderer Mechanismus zu Grunde, bei dem Kaliumchlorid die Membrandepolarisation durch GPCR und CaCCs umgeht (Ratz *et al.* 2005). Nach dieser Behandlung mit Kaliumchlorid wurde kein Unterschied in der Konstriktionskraft der Aorta festgestellt. Dies spricht für eine TMEM16A-vermittelte Konstriktion, bei dem die Aktivierung von Signalwegen über GPCR zu einer Calciumfreisetzung aus zellinternen Speichern führt, was wiederum einen Chloridstrom durch TMEM16A ermöglicht (Jin *et al.* 2013). Die Beteiligung von TMEM16A an der Konstriktion der Aorta stützt zudem die Beteiligung von TMEM16A bei der Windkesselfunktion.

Im Gegensatz dazu konnte in großen und kleinen Mesenterialgefäßen kein Unterschied bei der Konstriktion durch die verschiedenen Behandlungen zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Tatsache bestätigt die bei den proteomischen und elektrophysiologischen Untersuchungen aufgestellte Vermutung, dass TMEM16A und CaCCs eine

untergeordnete Rolle bei Konstriktion dieser arteriellen Gefäße zuzuschreiben ist. Dem widersprechend zeigten Dam *et al.* (2013) eine reduzierte Konstriktion kleiner Mesenterialarterien, erniedrigte CaCCs und eine geringere Kontraktionskraft der glatten Muskelzellen in den Gefäßen durch *in vivo* siRNA Transfektion gegen *Tmem16a* in Ratten. Zudem beobachteten sie eine reduzierte kaliuminduzierte Kontraktion durch die Herunterregulation von TMEM16A, obwohl die durch Kalium bedingte Membrandepolarisation nicht verändert war (Dam *et al.* 2013). Für die veränderte kaliumvermittelte Kontraktion schlussfolgerten sie, dass eine verminderte Expression der Calciumkanäle dafür verantwortlich sein könnte. Möglicherweise unterbindet die siRNA Transfektion auch übergeordnete regulatorische Prozesse durch TMEM16A, bspw. bei der Sekretion von Hormonen wie Renin, sodass additive Effekte die beobachteten Kontraktionsunterschiede von Dam *et al.* (2013) bewirkten.

Da die Mesenterialgefäße wesentlich stärker kontrahieren als die Aorta, deutet die abnehmende Expression von TMEM16A und die damit verbundene verringerte CaCCs in diesen Gefäßen auf einen Konstriktionsmechanismus hin, der unabhängig von TMEM16A und dadurch vermittelte CaCCs sein könnte. Bestrophine werden auch mit CaCCs und Gefäßkontraktion in Verbindung gebracht, jedoch scheinen diese mehr an der rhythmischen Synchronisation der Gefäßkonstriktion beteiligt zu sein als an der Konstriktion selbst (Broegger *et al.* 2011). Daher bedarf es weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Bedeutung der CaCCs bei der Konstriktion von kleinen Mesenterialgefäßen.

6.5 TMEM16A in mikrovaskulären Systemen vermittelt Kontraktilität kleinster Arteriolen durch CaCCs und beeinflusst den peripheren Widerstand

Der hypotensive Effekt in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren kann nicht nur durch die verminderte Kontraktionskraft der Aorta bedingt sein. Da die Mesenterialgefäße in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren scheinbar keinen Einfluss auf den systemisch erniedrigten Blutdruck haben, könnte die Ursache in der Peripherie der arteriellen Gefäße liegen. Dabei ist die Mikrozirkulation des Blutes in kleinen Arteriolen mit einem Gefäßdurchmesser <150 µm von besonderer Bedeutung (Levy *et al.* 2001). Die Mikrozirkulation umfasst die Kapillaren, die

terminalen Arteriolen, die postkapillären Venolen und die terminalen Lymphgefäße (Huppelsberg & Walter, 2013). Dabei nehmen die terminalen Arteriolen durch die Gefäßweite Einfluss auf die Durchblutungsregulation und somit auf den Blutdruck (Levy *et al.* 2001). Um die Rolle von TMEM16A in der Peripherie zu untersuchen, wurden mikrovaskuläre Bereiche verschiedener Gewebe analysiert. Dabei konnte die Expression von TMEM16A in den terminalen arteriellen Strombahnen der Gefäßsysteme festgestellt werden. Während größere Arteriolen kaum TMEM16A exprimieren, zeigten kleinere ab den sogenannten präkapillären Sphinkteren deutlich stärkere Signale für TMEM16A. Präkapilläre Sphinkter regulieren mit ihrer ringförmigen Verschlussmechanik aus glatter Muskulatur den nachgeschalteten Blutfluss der Arteriolen und des Kapillarbettes (Busse *et al.* 2007, Sakai & Hosomyamada 2013). Die Außenwände dieser kleinen Arteriolen werden von Perizyten umschlossen (Mandarino *et al.* 1993). Diese perivaskulären Zellen sind Teil der kontraktiven Funktion der mikrovaskulären Gefäße (Rucker *et al.* 2000) und folglich mit typischen kontraktiven Proteinen wie bspw. α -SMA, Tropomyosin und Myosin ausgestattet (Bergers *et al.* 2005). Außerdem können Perizyten als Vorläufer für glatte Muskelzellen fungieren (Corselli *et al.* 2010). Darüber hinaus beobachtet Wu *et al.* (2003), dass die Kontraktion retinaler Perizyten durch CaCCs vermittelt wird. Somit ist eine tamoxifeninduzierte Rekombination von *Tmem16a* in diesen mikrovaskulären Gefäßen und den präkapillären Sphinkteren durch SMMHC-CreER^{T2} möglich und ein TMEM16A und CaCCs bedingter Kontraktionsmechanismus denkbar.

Die Untersuchungen der Perizyten aus Hirn, Retina und Skelettmuskel ergaben zudem, dass diese wesentlich stärkere CaCCs aufwiesen als vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta. Diese waren in induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren drastisch reduziert und führten zu einer verringerten Konstriktion retinaler Arteriolen. Die Bestimmungen der Membranruhepotentiale isolierter Perizyten aus dem Skelettmuskel zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen induzierten-*Tmem16a*-ko und nicht-induzierten Kontrolltieren und lagen etwas niedriger als typische Membranpotentiale für vaskuläre glatte Muskelzellen (Chen & Wagoner 1991). Durch Applikation des auf GPCR agonistisch wirkenden U46619 konnte jedoch nur in nicht-induzierten Kontrolltieren eine positiv-Verschiebung des Membranpotentials auf etwa -45 mV beobachtet werden, was auf die Aktivierung von TMEM16A und dessen Chloridleitfähigkeit in den Kontrolltieren

zurückzuführen ist. Eine Depolarisation auf etwa -40 mV bewirkt eine Kontraktion glatter Muskelzellen (Kitamura & Yamazaki 2001). Somit scheint der Kontraktionsmechanismus von Perizyten dem von vaskulären glatten Muskelzellen sehr ähnlich zu sein. Hingegen blieb in Perizyten aus induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren das Membranpotential unverändert bzw. führte zu einer weiteren Hyperpolarisation der Zelle, welche durch einen Kaliumausstrom durch calciumaktivierte Kaliumkanäle bedingt sein könnte (Berridge 2008). Der Austausch von Chlorid gegen Methansulfonat, welches Chloridkanäle nicht passieren kann und somit den Chloridauswärtsstrom verstärkt, führte zu einer stärkeren positiv-Verschiebung des Membranpotentials in Zellen aus nicht-induzierten Kontrolltieren. Dies lässt den Schluss zu, dass U46619 den TMEM16A-bedingten Auswärtsstrom von Chlorid benötigt, um durch eine Membrandepolarisation die Kontraktion der Zelle zu unterstützen. Damit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass TMEM16A der CaCC ist, der in diesen Perizyten – bzw. in intermediären Zellen – CaCCs vermittelt und an der Konstriktion beteiligt ist.

Dem Chlorid ist somit eine zentrale Rolle bei dem Mechanismus der Kontraktion glatter Muskelzellen zuzuschreiben. Die Chloridtransporter NKCC1 und AE2 führen zur Anreicherung von Chlorid in vaskulären glatten Muskelzellen (Matchkov *et al.* 2013, Brosius *et al.* 1997), was eine Membrandepolarisation und den Calciumeinstrom erst ermöglicht. Ein weiteres Argument für die wichtige Rolle des Chlorids ist, dass die Kontraktilität von Gefäßen konstitutiver *Nkcc1*-Knockout-Tiere vermindert ist (Garg *et al.* 2007). Somit führt sehr wahrscheinlich die geringere intrazelluläre Chloridkonzentration zu einer abgeschwächten Kontraktion der glatten Muskelzellen. Konstitutive *Nkcc1*-Knockout-Tiere zeigen ebenfalls einen verminderten Blutdruck (Meyer *et al.* 2002, Flagella *et al.* 1999, Wall *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang zeigen *Nkcc1*-Knockout-Tiere auch eine hormonelle Veränderungen der Reninkonzentration (Castrop *et al.* 2005), was auch auf eine Beteiligung an der Reninsekretion zurückzuführen sein könnte (Orlov *et al.* 2010). Da jedoch *Nkcc1*-Knockout-Tiere eine Reihe andere phänotypischer Veränderungen aufweisen wie Taubheit (Flagella *et al.* 1999), Gleichgewichtsstörungen (Delpire *et al.* 1999) und auch eine gestörte Spermatogenese (Pace *et al.* 2000), wäre eine gezielte Inaktivierung von NKCC1

und auch von AE2 in vaskulären glatten Muskelzellen hilfreich, um die zentrale Rolle des Chlorids bei der Kontraktion dieser Zellen weiter zu belegen.

Die Perfusionsuntersuchungen an isolierten Hintergliedmaßen von induzierten-*Tmem16a*-ko-Tieren ergaben, dass die Bolusinjektionen von U46619 eine kleinere Druckdifferenz im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrolltieren bewirkten. Somit beeinflusst TMEM16A durch seine CaCCs in mikrovaskulären Perizyten die Mikrozirkulation und den peripheren Widerstand im Skelettmuskel und der Haut.

7. Schlussfolgerung

Dem calciumaktivierten Chloridkanal TMEM16A ist eine wichtige Rolle bei der Kontraktilität großer arterieller Gefäße und kleinster Arteriolen zuzuschreiben. Dadurch beeinflusst TMEM16A den peripheren Widerstand und den Blutdruck. In manchen Gefäßen wie bspw. den Mesenterialgefäßen scheint TMEM16A keine wesentliche Rolle beim Kontraktionsmechanismus zu spielen und es bedarf weiterer Untersuchungen der Kontraktion dieser Gefäße.

Davis *et al.* (2013) konnten bereits einen potentiellen Inhibitor für TMEM16A identifizieren, der CaCCs in vaskulären glatten Muskelzellen hemmt und zur Gefäßrelaxation führt. Dieser könnte möglicherweise auch therapeutisch speziell bei pulmonaler Hypertonie genutzt werden, da Ratten mit pulmonaler Hypertonie eine Hochregulation von TMEM16A in der Pulmonalarterie aufweisen (Forrest *et al.* 2012). Die Hemmung von TMEM16A in mikrovaskulären Gefäßen verschiedener Gewebe könnte sich möglicherweise auch begünstigend für die Versorgung nach Ischämie auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass Perizyten die zerebrale Blutversorgung regulieren (Hall *et al.* 2014). Somit wäre es denkbar, dass durch Blockade von TMEM16A nach Schlaganfall oder Herzinfarkt die Blutzufuhr in den betroffenen Bereichen verbessert werden kann. Durch die verminderte Kontraktion der Perizyten könnten akute Gewebeschädigungen weniger stark sein und Folgeschäden abgemildert werden (Dalkara *et al.* 2011).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz könnte die Anwendung von Inhibitoren für TMEM16A bei Asthma darstellen. Die Blockade des Kanals könnte in der glatten Muskulatur bzw. den Perizyten der Lunge (Weibel 1974) bei einem asthmatischen Anfall zu einer verminderten Konstriktion der Alveolen führen und eine bessere Sauerstoffversorgung ermöglichen. In diesem Zusammenhang konnte bereits in einem Mausmodell für chronisches Asthma gezeigt werden, dass eine Hochregulation von TMEM16A in diesen Zellen zu einer erhöhten Reaktivität der Atemwege führt (Zhang *et al.* 2013).

Bei der therapeutischen Anwendung von potentiellen Pharmaka sollte jedoch ebenfalls die systemische Bedeutung von TMEM16A beachtet werden. Für TMEM16A ist beispielsweise eine starke Expression in Cajal-Zellen des Verdauungstraktes beschrieben (Hwang *et al.* 2009). CaCCs in diesen spezialisierten Schrittmacherzellen unterstützen die Darmperistaltik, die nach

systemischer Applikation von Antagonisten oder auch Agonisten vermindert bzw. erhöht sein könnte – Obstipation oder auch Diarrhoe wären mögliche Folgen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TMEM16A bei der Schmerzweiterleitung der Spinalganglien beteiligt ist, die durch Blockade gestört sein könnte (Cho *et al.* 2012). In azinären Zellen der Speicheldrüse tragen die durch TMEM16A vermittelten CaCCs zur Flüssigkeitssekretion bei (Romanenko *et al.* 2010). Somit wäre ebenfalls Mundtrockenheit ein denkbarer Nebeneffekt einer systemischen Blockade von TMEM16A.

Angesichts der aufgezeigten vielfältigen Funktionen von TMEM16A ist es notwendig, die Funktion von TMEM16A im Kontext des Gesamtorganismus zu untersuchen.

8. Literaturverzeichnis

- Abeijon C, Hirschberg CB. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* Jan 1992;17(1):32-36.
- Adomaviciene A, Smith KJ, Garnett H, Tammaro P. Putative pore-loops of TMEM16/Anoctamin channels affect channel density in cell membranes. *J Physiol.* Jun 2013.
- Antikainen R, Jousilahti P, Tuomilehto J. Systolic blood pressure, isolated systolic hypertension and risk of coronary heart disease, strokes, cardiovascular disease and all-cause mortality in the middle-aged population. *J Hypertens.* May 1998;16(5):577-583.
- Barreras A, Gurk-Turner C. Angiotensin II receptor blockers. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* Jan 2003;16(1):123-126.
- Barrington RE, Subler MA, Rands E, et al. A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice harboring multiple oncogenic mutations by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol Cell Biol.* Jan 1998;18(1):85-92.
- Belz GG. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther.* Feb 1995;9(1):73-83.
- Benetos A, Safar M, Rudnichi A, et al. Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension.* Dec 1997;30(6):1410-1415.
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* Oct 2005;7(4):452-464.
- Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* Nov 2008;586(Pt 21):5047-5061.
- Billig GM, Pál B, Fidzinski P, Jentsch TJ. Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nat Neurosci.* Jun 2011;14(6):763-769.

- Boehm O, Zur B, Koch A, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem.* May 2007;388(5):547-554.
- Bohlender J, Ménard J, Edling O, Ganten D, Luft FC. Mouse and rat plasma renin concentration and gene expression in (mRen2)²⁷ transgenic rats. *Am J Physiol.* May 1998;274(5 Pt 2):H1450-1456.
- Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet.* Feb 2010;86(2):213-221.
- Broegger T, Jacobsen JC, Secher Dam V, et al. Bestrophin is important for the rhythmic but not the tonic contraction in rat mesenteric small arteries. *Cardiovasc Res.* Sep 2011;91(4):685-693.
- Brosius FC, Pisoni RL, Cao X, et al. AE anion exchanger mRNA and protein expression in vascular smooth muscle cells, aorta, and renal microvessels. *Am J Physiol.* Dec 1997;273(6 Pt 2):F1039-1047.
- Busse R et al. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, hg. von Schmidt RF und Lang F – 30. Auflage – Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007: 619-680.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science.* Oct 2008;322(5901):590-594.
- Carles A, Millon R, Cromer A, et al. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. *Oncogene.* Mar 2006;25(12):1821-1831.
- Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* Jan 2000;101(3):329-335.

- Castrop H, Lorenz JN, Hansen PB, et al. Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dec 2005;289(6):F1185-1192.
- Cereda V, Poole DJ, Palena C, et al. New gene expressed in prostate: a potential target for T cell-mediated prostate cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. Jan 2010;59(1):63-71.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:51-74.
- Chen C, Wagoner PK. Endothelin induces a nonselective cation current in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Aug 1991;69(2):447-454.
- Cho H, Yang YD, Lee J, et al. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci*. Jul 2012;15(7):1015-1021.
- Craig R, Mindell J. Health Survey for England, 2006. Volume 1, Cardiovascular disease and risk factors in adults.
- Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 2010;30(6):1104-1109.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. Sep 2008;3(3):301-313.
- Dalkara T, Gurosoy-Ozdemir Y, Yemisci M. Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol*. Jul 2011;122(1):1-9.
- Dam VS, Boedtker DM, Nyvad J, Aalkjaer C, Matchkov V. TMEM16A knockdown abrogates two different Ca²⁺-activated Cl⁻ currents and contractility of smooth muscle in rat mesenteric small arteries. *Pflugers Arch*. Oct 2013.
- Davis AJ, Forrest AS, Jepps TA, et al. Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. Nov 2010;299(5):C948-959.

- Davis AJ, Shi J, Pritchard HA, et al. Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A(inh) -A01. *Br J Pharmacol*. Feb 2013;168(3):773-784.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. Mar 2007;9(3):255-267.
- Dickinson HO, Mason JM, Nicolson DJ, et al. Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hypertens*. Feb 2006;24(2):215-233.
- Duran C, Hartzell HC. Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin*. Jun 2011;32(6):685-692.
- Elmer PJ, Obarzanek E, Vollmer WM, et al. Effects of comprehensive lifestyle modification on diet, weight, physical fitness, and blood pressure control: 18-month results of a randomized trial. *Ann Intern Med*. Apr 2006;144(7):485-495.
- Fallah G, Römer T, Detro-Dassen S, Braam U, Markwardt F, Schmalzing G. TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels. *Mol Cell Proteomics*. Feb 2011;10(2):M110.004697.
- Faria D, Rock JR, Romao AM, et al. The calcium-activated chloride channel Anoctamin 1 contributes to the regulation of renal function. *Kidney Int*. Jan 2014.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 1997;237(3):752-757.
- Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens*. Dec 2008;21(12):1288-1291.

- Ferrera L, Caputo A, Ubbby I, et al. Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *J Biol Chem*. Nov 2009;284(48):33360-33368.
- Flagella M, Clarke LL, Miller ML, et al. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem*. Sep 1999;274(38):26946-26955.
- Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, et al. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. Dec 2012;303(12):C1229-1243.
- Freeburg PB, Abrahamson DR. Dissecting the JGA: new functions for JG cells? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Mar 2004;286(3):R449-450.
- Galiotta LJ. The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? *Biophys J*. Dec 2009;97(12):3047-3053.
- Garg P, Martin CF, Elms SC, et al. Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systemic blood pressure and smooth muscle tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2007;292(5):H2100-2105.
- Gorre F, Vandekerckhove H. Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiol*. Oct 2010;65(5):565-570.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. Apr 2014;508(7494):55-60.
- Harrison-Bernard LM, El-Dahr SS, O'Leary DF, Navar LG. Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. Jan 1999;33(1 Pt 2):340-346.
- Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien LT, Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol*. May 2009;587(Pt 10):2127-2139.

- Huang F, Wang X, Ostertag EM, et al. TMEM16C facilitates Na(+)-activated K⁺ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. *Nat Neurosci*. Sep 2013;16(9):1284-1290.
- Huppelsberg J, Walter K, Kurzlehrbuch Physiologie – 4.Auflage – Stuttgart ; New York : Thieme, 2013:83-86
- Hwang SJ, Blair PJ, Britton FC, et al. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol*. Oct 2009;587(Pt 20):4887-4904.
- Jaggard JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. Feb 2000;278(2):C235-256.
- Jin X, Shah S, Liu Y, et al. Activation of the Cl⁻ channel ANO1 by localized calcium signals in nociceptive sensory neurons requires coupling with the IP3 receptor. *Sci Signal*. Aug 2013;6(290):ra73.
- Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens*. Mar 2008;26(3):381-391.
- Karaki H, Nagase H, Ozaki H, Urakawa N, Weiss GB. Effects of the calcium channel facilitator, CGP 28,392, on different modes of contraction in smooth muscle of rabbit and rat aortae and guinea-pig taenia caeci. *Br J Pharmacol*. Oct 1986;89(2):423-429.
- Karaki H, Sato K, Ozaki H. Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca²⁺-tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. *Eur J Pharmacol*. Jul 1988;151(2):325-328.
- Kiermayer C, Conrad M, Schneider M, Schmidt J, Brielmeier M. Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate. *Genesis*. Jan 2007;45(1):11-16.
- Kitamura K, Yamazaki J. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature. *Jpn J Pharmacol*. Apr 2001;85(4):351-357.

- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. Sep 1995;269(5229):1427-1429.
- Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:377-399.
- Large WA, Wang Q. Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am J Physiol*. Aug 1996;271(2 Pt 1):C435-454.
- Lawes CMM et al. Comparative Quantification of Health Risk; Global and Regional Burden Of Disease Attributable To Select Major Risk Factors, edited by Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL – Volume 1 – Geneva: World Health Organisation, 2004: 281-390.
- Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*. Aug 2001;104(6):735-740.
- Li A, Knutsen RH, Zhang H, et al. Hypotension due to Kir6.1 gain-of-function in vascular smooth muscle. *J Am Heart Assoc*. Aug 2013;2(4):e000365.
- Lin SH, Yu IS, Jiang ST, et al. Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 2011;108(42):17538-17543.
- Liu B, Linley JE, Du X, et al. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest*. Apr 2010;120(4):1240-1252.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. Jul 2013;31(7):1281-1357.

- Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell HR. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res.* Nov 1993;57(5):609-621.
- Manoury B, Tamuleviciute A, Tammaro P. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol.* Jul 2010;588(Pt 13):2305-2314.
- Matchkov VV. Mechanisms of cellular synchronization in the vascular wall. Mechanisms of vasomotion. *Dan Med Bull.* Oct 2010;57(10):B4191.
- Matchkov VV, Secher Dam V, Bødtkjær DM, Aalkjær C. Transport and function of chloride in vascular smooth muscles. *J Vasc Res.* 2013;50(1):69-87.
- Mijimolle N, Velasco J, Dubus P, et al. Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development. *Cancer Cell.* Apr 2005;7(4):313-324.
- Milenkovic VM, Brockmann M, Stöhr H, Weber BH, Strauss O. Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins. *BMC Evol Biol.* 2010;10:319.
- Mizuta K, Tsutsumi S, Inoue H, et al. Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* May 2007;357(1):126-132.
- Moosmang S, Schulla V, Welling A, et al. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J.* Nov 2003;22(22):6027-6034.
- Nabel C, Schweda F, Riegger GA, Krämer BK, Kurtz A. Chloride channel blockers attenuate the inhibition of renin secretion by angiotensin II. *Pflügers Arch.* Oct 1999;438(5):694-699.
- Ohshiro J, Yamamura H, Saeki T, Suzuki Y, Imaizumi Y. The multiple expression of Ca(2+)-activated Cl(-) channels via homo- and hetero-dimer formation of

- TMEM16A splicing variants in murine portal vein. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 2013.
- Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. NKCC1 and hypertension: a novel therapeutic target involved in the regulation of vascular tone and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Mar 2010;19(2):163-168.
- Osborn M, Caselitz J, Weber K. Heterogeneity of intermediate filament expression in vascular smooth muscle: a gradient in desmin positive cells from the rat aortic arch to the level of the arteria iliaca communis. *Differentiation.* 1981;20(3):196-202.
- Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *J Clin Invest.* Feb 2000;105(4):441-450.
- Plehm R, Barbosa ME, Bader M. Animal models for hypertension/blood pressure recording. *Methods Mol Med.* 2006;129:115-126.
- Puro DG. Retinovascular physiology and pathophysiology: new experimental approach/new insights. *Prog Retin Eye Res.* May 2012;31(3):258-270.
- Rasche S, Toetter B, Adler J, et al. Tmem16b is specifically expressed in the cilia of olfactory sensory neurons. *Chem Senses.* Mar 2010;35(3):239-245.
- Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* Apr 2005;288(4):C769-783.
- Rock JR, Futtner CR, Harfe BD. The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea. *Dev Biol.* Sep 2008;321(1):141-149.
- Rock JR, Harfe BD. Expression of TMEM16 paralogs during murine embryogenesis. *Dev Dyn.* Sep 2008;237(9):2566-2574.

- Romanenko VG, Catalán MA, Brown DA, et al. Tmem16a encodes the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. *J Biol Chem.* Apr 2010;285(17):12990-13001.
- Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull.* Mar 2000;51(5):363-369.
- Safar ME, Boudier HS. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. *Hypertension.* Jul 2005;46(1):205-209.
- Sakai N, Wada T, Matsushima K, et al. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens.* Apr 2008;26(4):780-790.
- Sakai T, Hosoyamada Y. Are the precapillary sphincters and metarterioles universal components of the microcirculation? An historical review. *J Physiol Sci.* Sep 2013;63(5):319-331.
- Schrader J, Lehrbuch der Physiologie, hg. von Klinke R und Silbernagl S – 3.Auflage – Stuttgart ; New York : Thieme, 2001:109-143.
- Schreiber R, Uliyakina I, Kongsuphol P, et al. Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem.* Mar 2010;285(10):7838-7845.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell.* Sep 2008;134(6):1019-1029.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* Dec 1995;23(24):5080-5081.
- Scudieri P, Sondo E, Caci E, Ravazzolo R, Galletta LJ. TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels. *Biochem J.* Jun 2013;452(3):443-455.

- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 2001;281(2):F345-356.
- Silbernagl S, Despopoulos A, Taschenatlas Physiologie – 8.Auflage – Stuttgart ; New York : Thieme, 2012:46-81
- Singh BN. The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications. *Br J Clin Pharmacol*. 1986;21 Suppl 2:109S-121S.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*. 2001;1:4.
- Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, Cygnar KD, Reisert J, Zhao H. ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 2009;106(28):11776-11781.
- Sun M, Manolopoulou J, Spyroglou A, et al. A microsphere-based duplex competitive immunoassay for the simultaneous measurements of aldosterone and testosterone in small sample volumes: validation in human and mouse plasma. *Steroids*. Dec 2010;75(13-14):1089-1096.
- Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. Dec 2010;468(7325):834-838.
- Thomas-Gatewood C, Neeb ZP, Bulley S, et al. TMEM16A channels generate Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2011;301(5):H1819-1827.
- Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, et al. Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB J*. Mar 2011;25(3):1058-1068.
- Tien J, Lee HY, Minor DL, Jan YN, Jan LY. Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 2013;110(16):6352-6357.

- Valverde MA, Mintenig GM, Sepúlveda FV. Differential effects of tamoxifen and I- on three distinguishable chloride currents activated in T84 intestinal cells. *Pflugers Arch.* Dec 1993;425(5-6):552-554.
- Vermeer S, Hoischen A, Meijer RP, et al. Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* Dec 2010;87(6):813-819.
- Vocke K, Dauner K, Hahn A, et al. Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels. *J Gen Physiol.* Oct 2013;142(4):381-404.
- Wall SM, Knepper MA, Hassell KA, et al. Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* Feb 2006;290(2):F409-416.
- Wang M, Yang H, Zheng LY, et al. Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* Feb 2012;125(5):697-707.
- Weibel ER. On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc Res.* Sep 1974;8(2):218-235.
- Wendling O, Bornert JM, Chambon P, Metzger D. Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis.* Jan 2009;47(1):14-18.
- Wede OK, Löfgren M, Li Z, Paulin D, Arner A. Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice. *J Physiol.* May 2002;540(Pt 3):941-949.
- West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* Jul 2004;165(1):107-113.

- Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*. 2009 Mar-Apr 2009;3(2):84-95.
- Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*. Jan 2008;14(1):64-68.
- Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*. 2009;13(1):R1.
- Wu DM, Kawamura H, Sakagami K, Kobayashi M, Puro DG. Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2003;284(6):H2083-2090.
- Yamazaki J, Duan D, Janiak R, Kuenzli K, Horowitz B, Hume JR. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol*. Mar 1998;507 (Pt 3):729-736.
- Yang H, Kim A, David T, et al. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*. Sep 2012;151(1):111-122.
- Yang SH, Bergo MO, Farber E, Qiao X, Fong LG, Young SG. Caution! Analyze transcripts from conditional knockout alleles. *Transgenic Res*. Jun 2009;18(3):483-489.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*. Oct 2008;455(7217):1210-1215.
- Zhang CH, Li Y, Zhao W, et al. The transmembrane protein 16A Ca(2+)-activated Cl⁻ channel in airway smooth muscle contributes to airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. Feb 2013;187(4):374-381.

Zhang JJ, Jacob TJ, Valverde MA, et al. Tamoxifen blocks chloride channels. A possible mechanism for cataract formation. *J Clin Invest.* Oct 1994;94(4):1690-1697.

Anhang

Curriculum vitae

Persönliche Informationen

Name: Christoph Heinze
Anschrift: Neugasse 26
07743 Jena
Geburtsdatum: 25.01.1984
Geburtsort: Weimar

Ausbildungsweg

Datum: Oktober 2009 bis Dezember 2013
Beschäftigung: Promotionsstudent, wissenschaftlicher Mitarbeiter
Ausbildungsstätte: Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Datum: Oktober 2005 bis Juni 2009
Abschluss: Diplom (Note 1,3)
Schwerpunktfächer: Hauptfach: Biochemie
Nebenfächer: Genetik, Pharmakologie
Ausbildungsstätte: Friedrich-Schiller-Universität Jena

Datum: Oktober 2003 bis September 2005
Abschluss: Vordiplom (Note 1,5)
Ausbildungsstätte: Friedrich-Schiller-Universität Jena

Datum: Oktober 2002 bis Juli 2003
Beschäftigung: Grundwehrdienst

Datum: Juni 2002
Abschluss: Abitur (Note 2,2)
Ausbildungsstätte: Lyonel-Feininger Gymnasium Mellingen

Publikationen

Heinze C, Seniuk A, Sokolov MV, Huebner AK, Klementowicz AE, Szijártó IA, Schleifenbaum J, Vitzthum H, Gollasch M, Ehmke H, Schroeder BC, Hübner CA. Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure *J Clin Invest.* Feb 2014;124(2):675-686.

.....

Jena, den 08.07.2014

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Hübner bedanken, für die Bereitstellung des spannenden und interessanten Projektes und der Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation, sowie die Betreuung während meiner Promotionszeit.

Für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten, danke ich meinen Zweit- und Drittgutachtern.

Bei Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke, Dr. Anika Seniuk und ihren Mitarbeitern des Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich besonders für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung bei der telemetrischen Analyse und allen Untersuchungen rund um den Blutdruck der Tiere, ohne sie wäre dieses Projekt nicht durchführbar gewesen. Danke für die netten Telefonate, es war mir immer eine Freude.

Maxim Sokolov, Agnieszka Klementowicz und der gesamten Arbeitsgruppe Signal- und Transportprozesse des Max-Delbrück Centrums für Molekulare Medizin in Berlin um Herrn Dr. Björn Schröder gehört ebenfalls besonderer Dank für die elektrophysiologischen Experimente, der Aufklärung der Bedeutung von TMEM16A in den kleinsten Bereichen des Gefäßsystems und bei der hilfreichen Unterstützung von Herrn Dr. Björn Schröder bei der Bearbeitung dieses Themas.

Großer Dank gilt überdies Herrn Prof. Dr. Maik Gollasch, Johanna Schleifenbaum, István A. Szijártó und der Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin in Berlin für die Kontraktilitätsuntersuchungen der arteriellen Gefäße.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, den Arbeitsgruppen Funktionelle Genetik I und II, sowie der Molekulargenetik, die mich unterstützt und ermutigt haben. Dr. Lutz Liebmann danke ich für die Korrekturarbeiten meiner Arbeit und „konzeptionellen Äquilibrierungszeiten“. Katrin Schorr und Dr. Antje Hübner möchte ich meinen Dank für die Generierung und hilfreiche Unterstützung des TMEM16A Tiermodells aussprechen, ebenso allen Tierpflegern und dem Team der Service-Einheit Kleinnager um Dr. Michael van der Wall, bei denen ich Frau Maria Zimmermann, Petra Schroth, Volker Dix und Sabine Dolke besonders hervorheben möchte. Bei meinen Laborkollegen und Freunden Theresa Heinrich, Melanie Gerth, Katrin

Schorr, Dr. Anne Sinning, Cecilia Tomni, Sebastian Gießelmann, Martin Voigt, Ralf Dittmann, Dr. Christopher Hennings, Dr. Lutz Liebmann, Dr. Mukhran Khundadze, Dr. Rizwan Mumtaz und PD Dr. Ingo Kurth bedanke ich mich für die angenehme Laboratmosphäre, den netten Kaffee immer und zu jeder möglichen Zeit und die unterhaltsamen Spieleabende am Institut und wünsche ihnen viel Erfolg auf ihren Wegen zu ihren angestrebten Zielen. In diesen Zusammenhang möchte ich mich auch besonders bei Sophie Bartsch und Florian Kraft aus der Arbeitsgruppe Molekulargenetik bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich auch besonders großen Dank meiner Familie und all meinen Freunden aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit in jeder Hinsicht unterstützt und mir durch so manch schwierige Phasen geholfen haben.

DANKE!

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. C.A. Hübner und Dr. L. Liebmann,

die Hilfe eines Promotions-beraters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

.....

Jena, den 08.07.2014