

Aus der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Regulation von Transient Receptor Potential Canonical  
Typ 3-Kanälen (TRPC3) bei chronischer  
Niereninsuffizienz**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Anahit Hovsepian

aus Eriwan, Armenien

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M.Tepel  
2. Prof. Dr. med. C. Doberauer  
3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Henning

Datum der Promotion: 8.12/9.12.2009

Datum der Urkundenverleihung: 19.03.2010

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
	Chronische Niereninsuffizienz.....	1
	Hämodialyse.....	2
	Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle.....	5
	TRP-Unterfamilien.....	7
	Transient Receptor Potential Typ Canonical (TRPC)-Subfamilie.....	7
	Strukturelle Eigenschaften der TRPC-Kanäle.....	10
	Monozyten.....	11
	Calcium.....	12
	Natriumchlorid.....	14
	Magnesiumchlorid.....	16
	Barium.....	16
	Kardiovaskuläre Morbität und Mortalität.....	18
1.2	Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Materialien.....	20
	Geräte.....	20
	Software.....	20
	Chemikalien.....	20
	Antikörper.....	21
	Lösungen.....	21
	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2	Methoden.....	22
	Monozytenisolierung aus Vollblut.....	22
	In-cell Western assay.....	23
	Fluoreszenzspektrophotometrie.....	27
	1-Oleoyl-2-Acety-sn-Glycerol (OAG).....	29
2.3	Datenverarbeitung und Statistik.....	30

3 Ergebnisse.....	31
Patientencharakterisierung.....	31
4 Diskussion.....	39
5 Zusammenfassung.....	41
6 Summary.....	42
7 Abkürzungsverzeichnis.....	43
8 Literaturverzeichnis.....	45
9 Danksagung.....	48
10 Erklärung.....	49

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Einleitung

### **Chronische Niereninsuffizienz**

Bei chronischer Niereninsuffizienz handelt es sich um einen langsamen, über Monate oder Jahre voranschreitenden Verlust der Nierenfunktion. Im engeren Sinn bezeichnet der Begriff chronisches Nierenversagen das Terminal- oder Endstadium einer chronischen Nierenkrankheit, das gekennzeichnet ist durch eine Nierenleistung von 15 % der Norm oder darunter (entsprechend einer glomerulären Filtrationsrate von unter 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie in Form von Dialysebehandlung oder Nierentransplantation.

Ein chronisches Nierenversagen (chronische Niereninsuffizienz) liegt vor, wenn sich über Monate und Jahre eine Verminderung der Nierenfunktion entwickelt. Dies führt dazu, dass die Niere ihre Aufgaben nicht mehr richtig wahrnehmen kann.

Sie erfüllt viele verschiedene Aufgaben und ist an unterschiedlichen Vorgängen – zum Beispiel dem Knochenstoffwechsel, der Blutbildung, dem Kortison- oder dem Säure-Basen-Haushalt – beteiligt. Ihre Hauptaufgabe besteht in ihrer Funktion als Ausscheidungsorgan: Sie regelt den Flüssigkeitshaushalt und entgiftet den Körper, indem sie viele Abbau- oder Abfallprodukte, die dem Organismus in zu hoher Konzentration schaden würden (so genannte harnpflichtige Substanzen), über den Harn ausscheidet. Wird das Nierengewebe geschädigt, kann die Niere ihre Aufgaben noch lange Zeit ausführen. Erst wenn etwa die Hälfte des Gewebes beeinträchtigt ist, vermindert sich die Ausscheidungskapazität. Um ein chronisches Nierenversagen mit typischer Symptomatik zu entwickeln, müssen die Nieren daher bereits stark geschädigt sein.

In einer gesunden Niere werden in jeder Minute etwa 125 Milliliter Primärharn gebildet (dieser Vorgang wird, da er in den so genannten Glomeruli der Niere stattfindet, **glomeruläre Filtration** genannt).

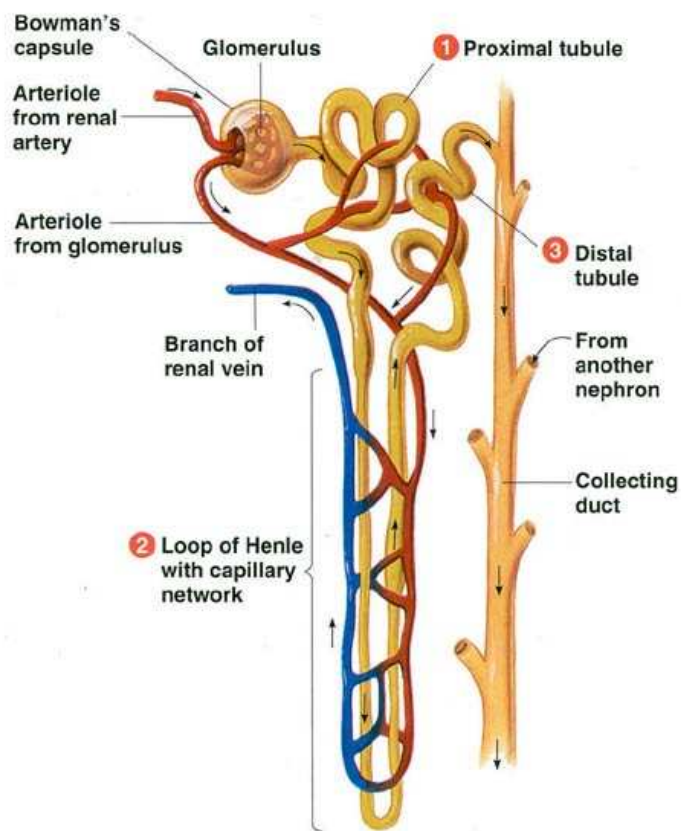


Abbildung 1: Die glomeruläre Filtration

Quelle: <http://www.cic-caracas.org/departments/science/images/08nephron1.jpg>

Bei einem chronischen Nierenversagen wird fortschreitend funktionsfähiges Gewebe geschädigt, sodass immer weniger Primärharn gebildet wird (weniger als 50 Milliliter pro Minute). Ein vollständiges Nierenversagen mit völligem Ausfall der Harnproduktion wird als **terminale Niereninsuffizienz** bezeichnet. In diesem Stadium werden dann weniger als 15 Milliliter Primärharn pro Minute gebildet. Substanzen, die normalerweise im Harn ausgeschieden werden, sammeln sich im Blut an – es kommt zur Harnvergiftung (Urämie).

### Hämodialyse

Die Dialyse ist ein Blutreinigungsverfahren, das bei Nierenversagen als Ersatzverfahren zum Einsatz kommt. Die Dialyse ist neben der Nierentransplantation die wichtigste Nierenersatztherapie bei chronischem Nierenversagen und eine der Behandlungsmöglichkeiten bei akutem Nierenversagen.

Unter Dialyse wird dabei ein Stoffaustausch über eine Membran verstanden, wobei auf der einen Seite Blut/Plasma und auf der anderen Seite der Membran eine Dialyselösung anliegt.

Die weltweit erste „Blutwäsche“ über semipermeable Membranen beim Menschen wurde 1924 von Georg Haas in Gießen durchgeführt. Den Durchbruch brachte jedoch erst Willem Kolff 1945 in Kampen (Niederlande) mit seinem Trommeldialysegerät mit Zellophan-Schläuchen als Dialysemembran. Diese Membran erlaubte eine kontrollierte Blutreinigung von definierten Stoffmengen. Eine technisch überlegene Parallelentwicklung von Nils Alwall in Lund (Schweden) 1946 erlaubte auch die Ausschwemmung von Ödemflüssigkeit aus Lungen und Gewebe (Ultrafiltration).

Es werden extrakorporale (außerhalb des Körpers erfolgende) und nicht-extrakorporale Verfahren unterschieden. Das gebräuchlichste extrakorporale Verfahren ist die Hämodialyse, darüber hinaus werden die Hämofiltration und Hämodiafiltration angewendet. Das nicht-extrakorporale Verfahren ist die Peritonealdialyse. Beide Verfahren werden in Deutschland bei chronischem Nierenversagen im Verhältnis von 20: 1 durchgeführt. Zu den extrakorporalen Verfahren zählen auch die Hämoperfusion (bei bestimmten akuten Vergiftungen) und die Apherese-Verfahren, die jedoch keine Nierenersatzverfahren darstellen, sondern zur Behandlung anderer Krankheitsbilder (z.B. Leberersatztherapie) eingesetzt werden. Da für die Durchführung der Verfahren umfassende Kenntnisse der möglichen Nebenwirkungen erforderlich sind, werden diese meist von Nephrologen oder Intensivmedizinern angewendet.

Hier wird nach dem Prinzip des Konzentrationsausgleichs kleinmolekularer Substanzen zweier Flüssigkeiten verfahren, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind (Osmose). Von der Filtermembran getrennt befindet sich auf der einen Seite das Blut mit Nephrotoxinen, Elektrolyten wie Kalium und Phosphat sowie harnpflichtigen Substanzen. Auf der anderen Seite der Membran befindet sich eine keimarme, aufbereitete Lösung (Dialysat), deren Wasser bei Online-Zubereitung durch Umkehrosmose aufbereitet wurde, die keine Abfallprodukte enthält und einen an den jeweiligen Bedürfnissen des Patienten orientierten Anteil an Elektrolyten aufweist. Die semipermeable Filtermembran (Dialysemembran) zwischen Blut und Dialyselösung besitzt Poren, die kleine Moleküle wie Wasser, Elektrolyte und harnpflichtige Substanzen (z. B. Harnstoff, Harnsäure) durchlassen, aber große Moleküle wie Eiweiße und Blutzellen zurückhalten.

Grundvoraussetzung für die Durchführung einer Hämodialyse ist eine ausreichende Kreislaufstabilität, ein ausreichendes Blutvolumen und ein guter (arterieller, venöser) Zugang am Patienten. Letzteres wird durch die operative Anlage eines arteriovenösen Shunts am Unter- oder Oberarm erreicht. Bei problematischen Eigengefäßen werden dabei auch Gefäßprothesen (Goretex) verwendet. In sehr seltenen Fällen wird der Shunt am Oberschenkel oder zwischen der Arteria subclavia und der Vena subclavia (wegen der Lage auch Collier- oder Dekolletéshunt genannt), mit oder ohne Verwendung von künstlichen Gefäßen, angelegt. Eine weitere Möglichkeit ist das Einbringen eines Dialysekatheters in eine entsprechend große Körpervene (selten über die Leiste: Vena femoralis, meist über den Hals: Vena jugularis interna oder die Schlüsselbeingrube Vena subclavia für die Akutdialyse (Shaldon-Katheter), dauerhaft nur bei multimorbiden Patienten mit sehr schlechter Gefäßsituation oder schwerer Herzinsuffizienz (Demers-Vorhofkatheter).

Während einer Behandlung wird über den Patientenzugang Blut aus dem Patienten gepumpt, im Dialysator (Filter) an der Dialysemembran vorbeigeführt und gereinigt dem Patienten wieder zurückgegeben. Giftstoffe (Stoffwechselabbauprodukte) und Niedermolekulare Stoffe (Membrangängig Stoffe) werden aus dem Blut durch Konzentrationsgradienten (Diffusion) durch die Membran auf die andere Filterseite in die Dialyselösung (Dialysat) gefördert und kann entfernt werden. Der Dialysator wird dabei ständig von frischem Dialysat durchströmt (ca. 500 ml/min). Die Hämodialysebehandlung wird in der Regel ca. 4–5 Stunden (Nachtdialyse bis 8 Stunden) pro Behandlung und min. dreimal in der Woche durchgeführt (abhängig von Körpergewicht, Nierenrestfunktion, Herzleistung), was einer min. notwendigen Behandlungszeit darstellt.

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz leiden häufig auch unter Überwässerung. Das überschüssige Wasser wird dem Blut durch Anlegen eines Druckgradienten (Unterdruck auf Dialysatseite) entzogen. Dadurch wird geregelt, wie viel Flüssigkeit dem Blut entzogen wird und hiermit die natürliche diuretische Funktion der Niere nachgeahmt. Der Flüssigkeitsentzug ist jedoch dadurch beschränkt, dass im Körper die Flüssigkeit (gilt ebenfalls auch für die Giftstoffe) nicht beliebig schnell in die Blutbahn nachdiffundieren kann, um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen, wodurch ein lebensgefährlicher Blutdruckabfall droht. Außerdem geben verschiedene Gewebe Flüssigkeit unterschiedlich schnell ab, so kann es z.B. zu einem Krampf der Muskulatur kommen, obwohl noch zu viel Flüssigkeit im Körper vorhanden ist. Durch diese Effekte ist der erreichbare Flüssigkeitsentzug durch die Dialyse beschränkt und die Patienten dürfen daher nicht nach Belieben trinken. Da andererseits viele



Patienten aufgrund der Häufung harnpflichtiger Substanzen im Körper unter ständigem starken Durst leiden, wird die geringe erlaubte Trinkmenge (Restausscheidung in 24 Stunden plus 500 ml) häufig als belastend empfunden.

### **TRP-Kanäle – transient receptor potential channels**

Die Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle sind eine umfangreiche Gruppe membranständiger nichtselektiver Kationenkanäle. Obwohl es sich dabei um Kationenkanäle mit hoher Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit handelt, variieren sie stark in ihrer Ionenselektivität und Art der Aktivierung [Montell C et al., 2002]. Sie werden sowohl in erregbaren als auch in nichterregbaren Zellen exprimiert [Clapham DE et al., 2001].

TRP-Kanäle wurden in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, u.a. im Zentralnervensystem, Herz, Lunge, Endothel, in glatten Muskelzellen und peripheren Blutzellen [Albert AP & Large WA, 2003; Gamberucci A et al., 2002; Groschner K et al., 1998; Riccio A et al., 2002; Vazquez G et al., 2004].

Der erste TRP-Kanal wurde 1969 im Zusammenhang mit der visuellen Wahrnehmung eines PLC-abhängigen Vorgangs, bei der Taufliegenart *Drosophila melanogaster* beschrieben [Hotta Y & Benzer S, 1969] und 1989 molekularbiologisch identifiziert [Montell C et al., 1989]. Einige Taufliegenmutanten (*trp*-Mutanten) fielen phänotypisch durch ein verändertes Elektroretinogramm auf [Cosens DJ, 1969], was im Gegensatz zu nicht mutierten Artgenossen, bei einem kontinuierlich andauernden Lichtreiz, ein transient verlaufendes statt ein persistierendes Rezeptorpotential zeigte. Daher stammt die Bezeichnung der Proteingruppe als „transient receptor potential“-Kanäle. Der Elektroretinogrammbefund korrelierte mit dem Fehlen eines anhaltenden Calciumeinstroms in die Lichtsinneszellen. Die genetische Charakterisierung dieser *trp*-Mutanten führte zur Identifizierung des TRPGens, das für eine porenbildende Untereinheit eines nichtselektiven calciumpermeablen Kationenkanals in der Zellmembran der Lichtsinneszellen codiert.

Name	Regulationsmodelle	prädominante Expression
TRPC1	ROC (TRPC1/5-Heteromultimer), SOC	Herz, Gehirn, Hoden, Ovar
TRPC2	DAG, SOC	vomeronasales Organ, Hoden, Herz, Gehirn, Spermien
TRPC3	DAG, InsP <sub>3</sub> R, SOC	Gehirn, Plazenta, Herz, Muskel
TRPC4	ROC, SOC	Gehirn, Hoden, Retina, Nebennierenrinde, Endothelzellen
TRPC5	SOC, ROC	Gehirn
TRPC6	DAG	Lunge, Gehirn, Muskeln
TRPC7	DAG, SOC	Herz, Muskeln, Lunge, Auge, Gehirn
TRPV1	Hitze (>43°C), Vanilloide Anandamid, Protonen, PIP <sub>2</sub>	Gehirn, TG, DRG
TRPV2	Hitze (>52°C), Exocytose (WF)	DRG, Rückenmark, Gehirn, Milz, Dünn- und Dickdarm, Myocyten
TRPV3	Wärme (>30°-39°C)	DRG, TG, Keratinocyten, Zunge, Rückenmark, Gehirn
TRPV4	Osmolarität, 5',6'-EET, Phorbolster, Wärme (>27°C)	Niere, Lunge, Milz, Hoden, Leber Endothelzellen, Herz, DRG
TRPV5	Hyperpolarisation, niedrige [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Niere, Dünndarm, Plazenta, Pankreas
TRPV6	Hyperpolarisation, niedrige [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> I <sub>CRAC</sub>	Dünndarm, Pankreas, Plazenta, Prostata

Tabelle 1: Regulationsmechanismen und Expressionsorte der TRPC- und TRPV-Kanäle DAG: Diacylglycerol; 5',6'-EET: 5',6'-Epoxyeicosatetraensäure; ICRAC: „calcium release-activated calcium current“; InsP<sub>3</sub>R: Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor; PIP<sub>2</sub>: Phosphoinositol-4,5 biphosphat; ROC: rezeptorgesteuert („receptor-operated channel“); SOC: speichervermittelt reguliert („store-operated channels“); WF: Wachstumsfaktor.

## **Transient receptor potential (TRP)-Unterfamilien**

Nach heutigem Wissensstand existieren sieben TRP-Unterfamilien, welche man anhand ihrer Sequenzhomologien in zwei Gruppen einteilt [Montell C et al., 2002a; Montell C et al., 2002b]. Zur ersten Gruppe der TRP-Kanäle zählen die Canonical bzw. Classical (TRPC), Vanilloid (TRPV), Melastatin (TRPM), no mechanoreceptor potential C (TRPN) und Ankyrin (TRPA) Kanäle, die substantielle Sequenzgemeinsamkeiten in den Transmembrandomänen aufweisen. Zur zweiten Gruppe gehören die Polycystin (TRPP) und Mucolipin (TRPML) Kanäle, die aufgrund von geringen Sequenzgemeinsamkeiten und einer großen extrazellulären Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne, nur entfernt mit den Vertretern der ersten Gruppe verwandt sind [Montell C, 2005]. Die TRPC und TRPM Familien setzen sich aus sieben (TRPC 1 – TRPC 7) bzw. acht (TRPM 1 – TRPM 8) Kanälen zusammen. Die TRPV Familie besteht aus sechs Mitgliedern (TRPV 1 – TRPV 6), die TRPML aus drei und die TRPP Familie aus drei kanalähnlichen und weiteren fünf Mitgliedern, die keine Kanalproteine darstellen. Die TRPA Familie enthält nur ein in Säugern vorkommendes Mitglied (TRPA 1) und die siebte Familie, TRPN, wurde bislang nur in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* und *Danio rerio* nachgewiesen. [Pedersen SF et al., 2005].

## **Transient receptor potential Canonical (TRPC)-Subfamilie**

Innerhalb der TRPC-Subfamilie sind 7 Säugerhomologe, TRPC1 bis TRPC7, kloniert worden.

Die TRPC-Kanäle sind nicht-selektive,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle und werden nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen aktiviert („receptor-operated channel“; ROC), was sie somit zu molekularen Korrelaten des rezeptorvermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms macht. Die zugrundeliegenden direkten Aktivierungsmechanismen werden zur Zeit noch sehr kontrovers diskutiert. Dabei scheint es nicht unerheblich zu sein, dass von allen TRPC-Isoformen, außer bei TRPC5, Spleißvarianten existieren, die sich meist durch Deletionen im N- oder C-Terminus unterscheiden.

Für TRPC1 konnte bislang kein eindeutiger Aktivierungsmechanismus nachgewiesen werden. Erste Arbeiten deuteten auf eine speicherabhängige Aktivierung hin (Zitt et al., 1996), die jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnte (Sinkins et al., 1998; Brereton et al., 2000). In Studien, bei der die Antisense-Strategie genutzt wurde, konnte jedoch eine Reduktion des durch Speicherentleerung ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms gezeigt

werden (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000; Brough et al., 2001). In der Arbeit von Hofmann et al. (2002) lag TRPC1 jedoch im heterologen Expressionssystem retiniert vor und konnte lediglich durch Coexpression mit TRPC4 bzw. TRPC5 an die Plasmamembran gesteuert werden. In HEK293- Zellen konnten heterooligomere Kanalkomplexe aus TRPC1 und TRPC5 durch Gq-koppelnde Rezeptoren, nicht aber durch Entleerung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher aktiviert werden, wobei sich TRPC1/TRPC5-Heteromere durch eigenständige biophysikalische Eigenschaften auszeichnen (Strübing et al., 2001). Eine funktionelle Bedeutung könnten TRPC1/TRPC5- Kanalkomplexe im ZNS besitzen, da in Hirnhomogenaten der Ratte durch Immunpräzipitation entsprechende Heteromere nachgewiesen werden konnten (Strübing et al., 2001; Goel et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TRPC1 bei der Sekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas beteiligt ist (Sakura und Ashcroft, 1997) und in Purkinje Zellen des Cerebellums sowie in dopaminergen Neuronen nach Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren als wichtiger Modulator der synaptischen Aktivität fungiert (Bengtson et al., 2004; Kim et al., 2003; Tozzi et al., 2003).

TRPC2 liegt im Menschen und beim Rind als Pseudogen vor (Wes et al., 1995; Wissenbach et al., 1998). Bei Nagetieren konnte jedoch für TRPC2 eine Expression im Vomeronasalorgan (VNO) und eine Bedeutung bei der Pheromonperzeption nachgewiesen werden (Liman et al., 1999; Leybold et al., 2002). Das Ausschalten des TRPC2-Gens in Mäusen führte bei ihrem Paarungsverhalten zu einem Verlust der Geschlechtsspezifität (Stowers et al., 2002; Keverne, 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TRPC2 in vomeronasalen Neuronen durch Diacylglycerole aktiviert wird (Lucas et al., 2003). Weiterhin wurde TRPC2 eine Rolle in Spermien bei der Eizellbefruchtung zugewiesen (Jungnickel et al., 2001), jedoch konnte bei Mäusen keine Expression von TRPC2 in Testis nachgewiesen werden und die Fertilität in TRPC2-defizienten Tieren war unverändert (Stowers et al., 2002). Für TRPC2 wurde sowohl eine Aktivierung durch Rezeptorstimulation als auch durch Speicherentleerung gezeigt (Chu et al., 2002; Vannier et al., 1999). In verschiedenen heterologen Expressionssystemen konnte hingegen nur eine intrazelluläre Retention von TRPC2 und keine signifikante Funktion nachgewiesen werden (Hofmann et al., 2000). Die subzelluläre Zielsteuerung von nativ exprimiertem TRPC2 in VNO-Neuronen der Ratte erfolgte jedoch korrekt und zwar in den sensorischen Zilien (Liman et al., 1999). In den sensorischen Mikrovilli des VNO sind aber keine internen  $Ca^{2+}$ -Speicher vorhanden, so dass hier eine speichervermittelte Aktivierung von TRPC2 ausgeschlossen werden kann.

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 bilden aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandtschaft eine eigene Untergruppe und zeigen auch funktionell eine große Übereinstimmung. Alle drei Kanäle werden durch  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  blockiert. Erste Arbeiten zu TRPC3 beschrieben einen speicherabhängigen Aktivierungsmechanismus (Zhu et al., 1996; Preuss et al., 1997). Wenig später wurde jedoch eine Stimulation und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Potenzierung von TRPC3 unabhängig von der Entleerung intrazellulärer Speicher gezeigt (Zitt et al., 1997). Darauf folgende Untersuchungen zur Regulation dieser Kanalfamilie bestätigten diesen Befund und ergaben weiterhin, dass TRPC3, TRPC6 und TRPC7 unabhängig von Proteinkinasen C durch Stimulation der PLC und durch Diacylglycerole aktiviert werden (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999; McKay et al., 2000). Die Mitglieder dieser Kanaluntergruppe werden u.a. in glatter Muskulatur, Gehirn, Herz und Lunge exprimiert (Tabelle 1). Weitere Arbeiten zeigten, dass TRPC6 in glatten Gefäßmuskelzellen wahrscheinlich den nichtselektiven Kationenstrom nach Stimulation des  $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptors vermittelt (Inoue et al., 2001) und in glatten Muskelzellen aus Ratten (A7r5-Zellen) beim rezeptorvermittelten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  involviert ist (Jung et al., 2002).

TRPC4 und TRPC5 bilden ebenfalls aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten eine weitere Kanaluntergruppe innerhalb der TRPC-Subfamilie. Die erste funktionelle Charakterisierung von heterolog exprimiertem bovinem TRPC4 ließ auf einen durch Speicherentleerung aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kationenkanal schließen (Warnat et al., 1999; Philipp et al., 1996; Philipp et al., 2000). Auch für TRPC5 wurde zunächst eine Aktivierbarkeit durch Speicherentleerung beschrieben (Philipp et al., 1998). In anderen Arbeiten konnten jedoch nicht-selektive Kationenströme in TRPC4- oder TRPC5-exprimierenden Zellen nach Stimulation Gq-kopplender Rezeptoren aufgezeigt werden (Okada et al., 1998; Obukhov und Nowycky, 2002; Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte bei Expression von humanem TRPC4 in CHO-Zellen konstitutiv aktive Kationenströme (McKay et al., 2000). Mit Hilfe von Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung speicher vermittelt regulierter Kanalkomplexe (SOCs) und die endotheliale Relaxation der Blutgefäße in der Abwesenheit von TRPC4 verändert sind (Freichel et al., 2001).

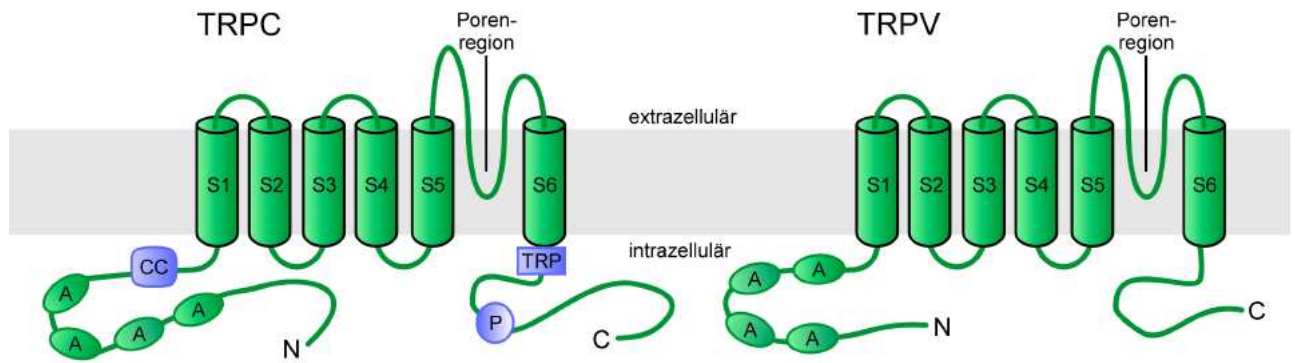


Abbildung 1: Schematische Darstellung der postulierten Domänenstruktur der TRPC- und TRPV Subfamilie

Alle TRPC- und TRPV-Kanaluntereinheiten enthalten 6 Transmembransegmente (S1-S6) mit einer putativen Porenregion zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment und drei bis vier Ankyrinhomologe Wiederholungen (A). Die Mitglieder der TRPC-Subfamilie besitzen weiterhin eine coiled-coil Domäne (CC) im N-Terminus sowie eine TRP-Box (TRP) und eine prolinreiche Region (P) im C-Terminus.

### Strukturelle Eigenschaften der TRPC Kanäle

Alle TRPC- und TRPV-Kanaluntereinheiten besitzen eine Proteinstruktur mit cytosolischen N und C-Termini, sechs putativen Transmembransegmenten und einer putativen Porenregion, welche aus einem kurzen hydrophoben Abschnitt zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment besteht (Vannier et al., 1998; Clapham et al., 2003). Die Struktur ähnelt somit jener der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, der durch zyklische Nukleotide regulierten Kanäle (CNG) und der „hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels“ (HCN). Dem 4. Transmembransegment fehlen allerdings die positiv geladenen Aminosäurereste, die in den spannungsgesteuerten Ionenkanälen als Spannungssensor fungieren. Die Kanaluntereinheiten der TRPC- und TRPV-Subfamilien besitzen am N-Terminus mehrere Ankyrin-homologe Wiederholungen („ankyrin-repeats“), deren Funktion innerhalb der TRP-Kanäle noch nicht aufgeklärt ist. Einige der Ankyrin-homologen Wiederholungen können durch Bildung von coiled-coil Strukturen, die Interaktion zwischen TRP-Kanaluntereinheiten und der Ausbildung von Kanalkomplexen vermitteln. In Analogie zu den spannungsgesteuerten 12 Kaliumkanälen und CNG-Kanälen werden funktionelle TRP-Kanalkomplexe durch eine homo bzw. auch heteromere Quartärstruktur aus vier

Kanaluntereinheiten aufgebaut, wie dies bereits für Vertreter der TRPC- und einige Mitglieder der TRPV-Familie gezeigt werden konnte (Kedei et al., 2001; Hofmann et al., 2002; Hoenderop et al., 2003). Welche Domänen für die Zusammenlagerung erforderlich sind, ist bislang noch unbekannt. Zu den hochkonservierten Regionen innerhalb der TRPC-Subfamilie zählen zudem eine coiled-coil Domäne im cytosolischen N-Terminus, ein kurz hinter dem 6. Transmembransegment befindliches Motiv aus sechs Aminosäuren, das als TRP-Box bzw. nach der Abfolge der Aminosäuren als EWKFAR Motiv bezeichnet wird sowie ein prolinreiches Motiv im zytosolischen C-Terminus.

**Monozyten** sind eine Untergruppe der Leukozyten, die im Knochenmark aus ihren Stammzellen, den Monoblasten entstehen. Nach einem bis drei Tagen verlassen sie die Blutbahn und reifen im Gewebe zu Makrophagen heran. Im gefärbten Blutausschlag sind sie an ihrem großen, eingekerbten oder gefalteten Kern zu erkennen. Die Aufgabe der Monozyten ist die Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose und die Aktivierung der erworbenen Immunabwehr mittels Antigenpräsentation. Sie haben eine Lebensdauer von 1 bis 3 Tagen, bevor sie ausdifferenzieren und in die Gewebe einwandern. Dort leben sie als Makrophagen für mehrere Wochen bis Monate weiter.

Mit einem Durchmesser von 5–20 µm gehören Monozyten zu den größten der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und machen ca. 3–8 % der Leukozyten-Population aus. Sie besitzen einen charakteristischen (von griech. *monos*, „einzig“) großen Kern von meist bohnenartiger Form und verhältnismäßig wenig Zytoplasma. Monozyten sind keine homogene Zellpopulation, sondern es werden verschiedene Subpopulationen unterschieden. Neben dem für Monozyten typischen Oberflächenmarker CD14 gibt es Subpopulationen, die zusätzlich den Marker CD16 tragen. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung können vermehrt CD16+ Monozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind CD16+ Prädiktoren zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten. Da bisher kein Oberflächenmarker bekannt ist, der ausschließlich auf Monozyten exprimiert wird, müssen Kombinationen von Oberflächenmarkern verwendet werden, um die Monozyten im Durchflusszytometer eindeutig zu identifizieren.

Bisher werden beim Menschen mindestens fünf Subpopulationen unterschieden:

- $CD14^{++}CD16^{-}$
- $CD14^{+}CD16^{+}$
- $CD14^{++}CD16^{+}$
- $CD14^{+}CD16^{-}CD33^{dim}$
- $CD14^{+}CD16^{-}CD33^{high}$
- $CD14^{++}CD16^{-}CD56$

Die beiden Subpopulationen, die  $CD14^{+}CD16^{-}$  sind, differenzieren zu Dendritischen Zellen. Die zur Identifikation herangezogenen Oberflächenmarker auf den Monozyten anderer Säugetiere unterscheiden sich zum Teil von denen des Menschen. Bei Ratten werden ED9, CD43 und CD62, bei Schweinen CD163 verwendet.

## Calcium

Das divalente Calciumkation ( $Ca^{2+}$ ) ist ein ubiquitär in eukaryoten Zellen genutzter intrazellulärer Botenstoff, der diverse physiologische Prozesse kontrolliert. Hierzu gehören u.a. die Ausschüttung von Neurotransmittern, die Kontraktion von Muskelzellen, die Sekretionstätigkeit endo- und exokriner Drüsen, die Gentranskription, die Zellproliferation, die Regulation von Ionenkanälen sowie einer Reihe von  $Ca^{2+}$ -abhängigen enzymatischen Stoffwechselprozessen (Ebashi, 1972; Llinás, 1982; Eckert und Chad, 1984; Carafoli und Penniston, 1986; Rasmussen, 1989; Rogers, 1989; Somlyo und Himpens, 1989; Pietrobon et al., 1990; Sheng et al., 1991; Bading et al., 1993; Ghosh und Greenberg; 1995; van Haasteren et al., 1999). Diese zellulären Effekte werden über einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) hervorgerufen, der auch als  $Ca^{2+}$ -Signal bezeichnet wird.

Die internen  $Ca^{2+}$ -Quellen befinden sich innerhalb des interzellulären Membransystems, im endoplasmatischen Retikulum (ER), welches bei Muskelzellen als sarcoplasmatisches Retikulum (SR) bezeichnet wird. Im Lumen des ER bzw. SR wird  $Ca^{2+}$  durch Speicherproteine wie Calsequestrin und Calreticulin gepuffert, die eine geringe  $Ca^{2+}$ -Affinität jedoch eine hohe Kapazität mit ca. 50 Calciumionen pro Speicherprotein besitzen. Die



Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus diesen internen Speichern wird durch verschiedene Kanäle kontrolliert, wobei die TRPC Kanäle eine bedeutende Rolle spielen.

In ruhenden Zellen beträgt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um 50-100 nM. Nach Stimulation der Zelle kann extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  über plasmamembranäre Kationenkanäle in das Cytosol gelangen. Hierzu gehören spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle („voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels“, VOC), Liganden-gesteuerten Kanäle („ligand-operated channels“, LOC), über sekundäre Botenstoffe gesteuerte Kanäle („second messenger-operated channels“, SMOC) und speichervermittelt regulierten Kanäle („store-operated channels“, SOC).

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Medium in das Cytosol wird über  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle gesteuert.

**Calciumchlorid** (auch Kalziumchlorid) ist ein Chlorid des Erdalkalimetalls Calcium mit der Summenformel  $\text{CaCl}_2$ . Calcium liegt dabei in der Oxidationsstufe +2 vor, Chlor hat die Oxidationsstufe -1. Calciumchlorid kommt in der Natur gelöst in Salzsolen vor. Calciumchlorid ist ein Salz. Calcium und Chlor liegen aufgrund des großen Elektronegativitätsunterschiedes als Ionen vor. Die Bindung erfolgt somit über elektrostatische Wechselwirkungen. Calciumchlorid bildet farblose Kristalle, die eine verzerrte Rutil-Struktur ausbilden. Calciumchlorid bildet in Reinform farblose Kristalle und ist in wasserfreiem Zustand stark hygroskopisch. Es nimmt leicht Wasser aus seiner Umgebung auf und bildet dabei einen Hydrat-Komplex. Das Auflösen in Wasser ist exotherm. Calciumchlorid reagiert mit Wasser unter Bildung eines Hexahydrat-Komplexes und starker Wärmeentwicklung (exotherm,  $\Delta H < 0$ ):

Die Kristalle des Hexahydrats lösen sich bei ungefähr 30 °C im eigenen Kristallwasser. Erhitzen auf ungefähr 200 °C setzt das gebundene Wasser wieder frei. Das Auflösen in Wasser führt im Gegensatz zu wasserfreiem Calciumchlorid zu einer starken Abkühlung. Beide Calciumchlorid-Formen sind zudem gut löslich in Ethanol.

Wasserfreies Calciumchlorid ist aufgrund seiner Hygroskopie ein wichtiges Trocknungsmittel im Labor, beispielsweise im Exsikkator, und in der technischen Chemie für verschiedenste Gase und Flüssigkeiten. Anwendungsfelder sind die Trocknung von Wohnräumen, der Einsatz als Frostschutzmittel, im speziellen als Frostschutzmittel und Abbindebeschleuniger im Beton, sowie als Staubbindemittel (z.B. auf Baustellen).

Es wird als Festigungsmittel, Geschmacksverstärker und Stabilisator eingesetzt (unter anderem bei der Trinkwasseraufbereitung, Oberflächenbehandlung von Obst). Es ist in der EU als Lebensmittelzusatzstoff der Nummer E 509 zugelassen.

Unter Ausnutzung der exothermen Hydratation bei der Reaktion mit Wasser findet Calciumchlorid Einsatz zur Erwärmung von Fertiggetränken. Darüber hinaus kommt es als Streusalz sowie zur Herstellung von Kältemischungen zum Einsatz.

Weiterhin dient es zur Gerinnung von Eiweißen in der Lebensmitteltechnologie und findet Anwendung bei der Herstellung von Produkten wie Tofu oder künstlichem Kaviar.

Zudem dient es in der Molekularbiologie zur Herstellung kompetenter Zellen. Calciumionen verändern hierbei die Permeabilität der Zellmembran und steigern so das Aufnahmepotenzial der Zelle für DNA.

### **Natriumchlorid**

Natriumchlorid (Kochsalz) ist das Natriumsalz der Salzsäure mit der chemischen Formel NaCl.

Natriumchlorid ist in der Natur in großer Menge vorhanden, größtenteils gelöst im Meerwasser mit einem Gehalt von ca. 3 %, insgesamt  $3,6 \times 10^{16}$  Tonnen, außerdem als Mineral Halit mit einem Gehalt von bis zu 98 % in den häufigen Steinsalzlagerstätten, die in erdgeschichtlicher Zeit in austrocknenden Meeresbuchten sedimentierten. Steinsalzsichten sind plastisch und werden neben anderen geologischen Prozessen, denen sie unterliegen, vielfach verformt, u. a. zu leichter abbaubaren Salzstöcken und Salzkissen. Wenn eine Salzlagerstätte im Gebirge an die Oberfläche austritt, kann sogar ein Salzgletscher entstehen. Allein die unterirdischen Salzvorkommen in Deutschland werden auf etwas mehr als 100.000 Kubikkilometer geschätzt.

Da Natriumchlorid der wichtigste Mineralstoff für Menschen und Tiere ist (der menschliche Körper besteht zu etwa 0,9 % aus Salz und verliert davon täglich 3–20 Gramm), wurde es schon in vorgeschichtlicher Zeit gewonnen und blieb lange Zeit ein teures Handelsgut.

Natriumchlorid bildet farblose Kristalle, die eine Natriumchlorid-Struktur ausbilden (Abbildung 6). Diese Kristalle sind, im Gegensatz zu vielen anderen Kristallen, nicht doppelbrechend. Hierbei ist jeder Natrium- sowie jeder Chlorkern oktaedrisch vom jeweils anderen Kern umgeben. Es ist sehr gut wasserlöslich. Natriumchlorid besitzt den typischen Salzgeschmack.

Die wässrige Lösung sowie die Schmelze leiten auf Grund der (elektrolytischen bzw. thermischen) Dissoziation von Natriumchlorid in seine Ionen elektrischen Strom, reines kristallines Natriumchlorid hingegen nicht.

Mit einem Gehalt von 23,3 % Natriumchlorid in wässriger Lösung bildet es ein eutektisches Gemisch. Dieses erstarrt am eutektischen Punkt von  $-21,3\text{ °C}$  homogen und ohne Entmischung. Diese Lösung wird Kryohydrat genannt.

Als Speisesalz ist Natriumchlorid schon seit Alters her ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung. Es wird zum Würzen von fast allen Speisen benutzt. Seit der Zeit der Industrialisierung spielt jedoch mengenmäßig die industrielle Verwendung die weitaus größere Rolle. Je nach der Anwendung werden unterschiedliche Zusatzstoffe beigemischt.

Nach der Verwendung wird unterschieden zwischen Industriesalz als Rohstoff der chemischen Industrie, Auftausalz für winterlichen Straßendienst, Gewerbesalz für die verschiedensten industriellen und gewerblichen Zwecke und Speisesalz zum menschlichen Genuss.

In der modernen Medizin wird nach starkem Blutverlust, etwa bei einer Operation oder einem Unfall, eine 0,9%ige Lösung von Natriumchlorid in Wasser zur Auffüllung des Blutvolumens intravenös verabreicht (isotonische Kochsalzlösung, auch physiologische Kochsalzlösung). Sie ist isoosmotisch mit dem Blutplasma.

In der Antike und im Mittelalter galten Medikamente auf Salzbasis als reine Wundermittel. Die Haut Neugeborener wurde zu deren Stärkung mit Salz abgerieben. Es wurde in Wundverbänden, Pflastern, Salben, Pudern und Bädern eingesetzt. Besondere Bedeutung maß man der trocknenden und wärmenden Wirkung des Salzes bei.

Man streute Salz in Wunden, um Entzündungen zu verhindern – eine mitunter sehr schmerzhafteste Prozedur, die in einer entsprechenden Redewendung („Salz in offene Wunden streuen“) Einzug in die deutsche Sprache gefunden hat.<sup>[9]</sup> Reines Salz zerstört über Osmose alle Zellen - also auch krankmachende Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze, allerdings die Zellen des Verwundeten ebenso. Diese Art der Desinfektion ist also zweischneidig wie das ebenso praktizierte Ausbrennen von Wunden. Der gleiche Wirkmechanismus verhinderte, dass in Kochsalz konservierte Lebensmittel verdarben – also von Mikroorganismen zersetzt wurden.

Noch heute werden Solebäder als Heilmittel eingesetzt. Kuraufenthalte am Meer oder in salzhaltiger Luft bei Salinen und früher auch in Salzbergwerken dienen der Behandlung von Atemwegserkrankungen. Wo dies nicht möglich oder zu teuer ist, werden Inhalationsgeräte eingesetzt, bei denen Salz-Aerosol eingeatmet wird.

Kochsalz-Lösung wird auch zur Nasenspülung und zum Gurgeln verwendet. Für die Nasenspülung verwendet man isotonische Kochsalzlösung, da normales Wasser aufgrund der Osmose die Schleimhäute aufquellen lassen würde.

### **Magnesiumchlorid**

Magnesiumchlorid,  $\text{MgCl}_2$ , ist das Magnesiumsalz der Salzsäure. Es bildet mehrere Hydrate. Magnesiumchlorid kommt in der Natur im Mineral Carnallit ( $\text{KMgCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) als Doppelsalz vor. Eine weitere natürliche Quelle ist das Meerwasser. In manchen Salzseen ist Konzentration an Magnesium-Ionen sogar höher als die der Natrium-Ionen.

Die technische Gewinnung von Magnesiumchlorid erfolgt durch Eindampfen der Endlaugen aus der Produktion von Kaliumchlorid. Dabei wird zuerst das Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) erhalten. Weiteres Eindampfen liefert ein wasserärmeres Produkt. Wasserfreies Magnesiumchlorid wird durch Umsetzung von Magnesiumoxid mit Koks und Chlor gewonnen.

Magnesiumchlorid ist stark hygroskopisch. Seine Neigung zur Hydrolyse ist weniger ausgeprägt als beim Aluminiumchlorid ( $\text{AlCl}_3$ ). Wasserfreies Magnesiumchlorid kristallisiert im  $\text{CdCl}_2$ -Gittertyp.

Magnesiumchlorid-Hexahydrat besitzt eine molare Masse von  $203,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , eine Dichte von  $1,57 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  und einen Schmelzpunkt von ca.  $117 \text{ }^\circ\text{C}$  (Zersetzung). Die Löslichkeit des Hexahydrates beträgt  $1700 \text{ g/L}$  (bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### **Barium**

Barium ist ein silberweiß glänzendes Leichtmetall, das an der Luft grauschwarz anläuft. Beim Anlaufen verbindet es sich mit dem Kohlenstoffdioxid der Luft zu schwarzem Bariumcarbonat. Es wird daher unter Luftabschluss aufbewahrt. Barium ist relativ weich, aber etwas härter als Blei. Barium ist eines der unedelsten Metalle und ein sehr starkes Reduktionsmittel. Feines Bariumpulver ist pyrophor, d.h. es entzündet sich von selbst und

verbrennt mit grüner Flamme zu Bariumoxid und Bariumnitrid. Beim Erhitzen lässt sich auch das kompakte Metall verbrennen. Mit Wasser reagiert es heftig unter Bildung von Wasserstoff und Bariumhydroxid. Die Reaktion mit Wasser verläuft heftiger als beim Calcium oder beim Strontium, aber schwächer als beim Natrium. Barium reagiert auch mit fast allen Säuren unter Bildung von Wasserstoff und der entsprechenden Salze. Gegen konzentrierte Schwefelsäure ist es beständig, da sich dabei eine Schutzschicht aus Bariumsulfat auf der Oberfläche des Metalls bildet. Das Metall verbindet sich auch leicht mit den Halogenen und mit Schwefel und bei höheren Temperaturen auch mit Stickstoff und Wasserstoff. Bei 1300°C reagiert es mit Kohlenstoff zu Bariumcarbid, das ähnlich wie Calciumcarbid mit Wasser Ethin bildet. Bariumsalze erzeugen bei der Flammprobe eine typische, gelbgrüne Flammenfarbe.

### **Verwendung:**

Das Metall Barium besitzt nur einen geringen technischen Nutzen. In geringem Umfang wird es in Fernschröhren oder als Zusatz in Bleilegierungen zur Härtung verwendet. Von größerer Bedeutung sind die Bariumverbindungen. Bariumnitrat erzeugt in Feuerwerkskörpern und Signalaraketen die grüne Farbe. Der Zusatz von Bariumoxid in Gläsern und optischen Instrumenten ("Barytgläser") verändert die Brechkraft und das Dispersionsvermögen. Barytweiß (Bariumsulfat) ist ein beliebtes weißes Pigment für Malerfarben. Es wird auch als Füllstoff in Papieren und Kunststoffen eingesetzt. In der Medizin ist es ein bekanntes Röntgen-Kontrastmittel. Barytgelb (Bariumchromat) ist ein gelbes Pigment für Farben und keramische Erzeugnisse. Aufgrund seiner Giftigkeit wird es heute jedoch nur noch selten eingesetzt. Bariumchlorid dient im analytischen Labor zum Nachweis von Sulfationen. Es spielt auch bei der Stahlhärtung eine bedeutende Rolle.

### **Bariumbromid (BaBr<sub>2</sub>)**

Wie Bariumchlorid löst sich Bariumbromid gut im Wasser auf und ist in wässrigen Lösungen giftig. BaBr<sub>2</sub> wird in der Fotografie benutzt. In der Geschichte wurde Bariumbromid benutzt, um Radium im Prozess der Fraktionskristallisation zu reinigen.

## **Kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz**

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben eine erheblich gesteigerte Morbidität und Mortalität, besonders aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen. Veränderungen des Calcium-Haushalts spielen bei der chronischen Niereninsuffizienz eine herausragende Rolle (London et al., 2005; Slatopolsky et al., 1999). Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird durch eine Reihe von Systemen strikt geregelt. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann durch Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern oder durch transplasmamembranösen Calcium-Einstrom bewirkt werden. Der Calcium-Einstrom erfolgt unter anderem über Calcium-Kanäle (Berridge et al.) in den nicht-selektiven Kationen Kanälen, über die es zu einem Calcium-Einstrom kommt, gehören die Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)-Kanäle ( Hoffmann et al., 2000; Montell et al., 2002; Nilius et al., 2007). Bei einzelnen Fällen ist beschrieben, dass eine Mutation von TRPC6 Kanälen in der Niere zur fokal segmentalen Sklerose und zur Niereninsuffizienz führt (Winn et al., 2005). Weiterhin wurden TRPC Kanäle in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, einschliesslich peripherer Blutzellen wie Monozyten (Gamberucci et al., 2002; Liu et al., 2006; Liu et al., 2007; Liu et al., 2008; Thilo et al., 2008).

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurden Veränderungen der intrazellulären Calciumregulation mehrfach nachgewiesen. Beschrieben wurde unter anderem Veränderungen der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration oder der intrazellulären Calcium-Speicher (Raine et al., 1993; Smogorzewsky & Massry, 2001). Die Bedeutung von TRPC Kanälen für diese Veränderungen der Calciumregulation bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurde bislang nicht untersucht.

## 1.2 Fragestellung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben eine erheblich gesteigerte Morbidität und Mortalität, besonders aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen. Veränderungen des Calcium-Haushalts spielen bei der chronischen Niereninsuffizienz eine herausragende Rolle. Aufgrund ihrer Eigenschaften können die neuerlich beschriebenen Transient Receptor Potential Canonical Kanäle (TRPC)-Kanäle dabei ursächlich beteiligt sein.

In den eigenen experimentellen Vorbefunden konnte schon eine gesteigerte TRPC3 Kanal-Protein Expression bei chronischer Niereninsuffizienz nachgewiesen werden. Weiterhin ergaben diese Untersuchungen *in vivo* als auch *in vitro* erstmalig Hinweise auf die fundamentale Bedeutung der extrazellulären Calciumkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit sollen die für die TRPC3 Expression zugrundeliegenden Signaltransduktionswege und die unmittelbaren Auswirkungen auf die zelluläre Funktion mittels biochemischer und molekularer Methodik aufgeklärt werden. Dazu erfolgt die Charakterisierung der TRPC-Kanal-Proteine mittels Immunoblotting und *in-cell* Western assay. Die Funktion der TRPC Kanäle wird Fluoreszenz-spektrophotometrisch in einem high-throughput System bestimmt.

Neben grundlegenden Erkenntnissen zur Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz lassen sich aus der Untersuchung möglicherweise auch neue Wege für eine therapeutische Beeinflussung der chronischen Niereninsuffizienz ableiten.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Fragen untersucht:

1. Bestehen Veränderungen der Expression von TRPC-Kanälen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz?
2. Gibt es einen Einfluss der Dialysetherapie auf die Expression von TRPC Kanälen?
3. Welchen Einfluss haben Veränderungen von extrazellulären Elektrolyten auf die Expression von TRPC Kanälen *in vitro*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

GERÄTE	HERSTELLER
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Helsinki
Magnetic Particle Concentrator	Dynal, Biothech ASA , Oslo
Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 766 Valimatic	Knick, Berlin
Schüttler	
Waage LE 623S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Homburg

#### Software

Ascent Software Version 2.4.2

Odyssey In-Cell Western Plug-In Version 1.2.15

Microsoft Excel 2007

GraphPad PRISM 5.0

Chemikalien	Hersteller
Barium	
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dnabeads®CD14	Invitrogen, Groningen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd.Lösung 35%	Hedinger, Stuttgart
Fura-2/AM	Calbiochem, San Diego



HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Histopaque®-1077	Fluka, Buchs
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Licor Blocking Buffer	Li-Cor GmbH, Bad Homburg
LY294009	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Fluka, Buchs
Natrumchlorid	Fluka, Buchs
Odyssey Blocking Buffer	
Peroxyinitrit	Calbiochem, San Diego
PDTC	
Tempol	Calbiochem, San Diego
TWEEN ® 20 Detergent	Calbiochem, San Diego
TRITON X-100	Calbiochem, San Diego
Urea	Calbiochem, San Diego
Wortmannin	Calbiochem, San Diego

Antikörper	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>	
Anti TRPC3	Alamone labs
Anti TRPC5	Alamone labs
<b>Sekundärantikörper</b>	
Donkey Anti-goat (H+L) IgG 680	Alexa Fluor®
(Sheep) Anti-RABBIT (H+L) IgG 800	ROCKLAND
<b>Housekeeping Gen</b>	
GAPDH (V-18)	Santa Cruz Biotechnology

Lösungen	Hersteller	g/l
<b>HBSS ( Hank´s balanced salt solution)</b>		
NaCl	Fluka	7.94
KCl	Fluka	0.40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	Fluka	0.06
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK	0.06
D-Glucose	SIGMA	1.00
CaCl <sub>2</sub>	SIGMA	0.147
MgCl <sub>2</sub>	Fulka	0.203
HEPES	SIGMA	2.383

Lösungen	Hersteller	
<b>Fixing Solution</b>		
Formaldehyd-Lösung 35%	DAB 10 AUG. HEDINGER	500 ml
HBSS	Eigene Herstellung	4500 ml
<b>TWEEN washing solution</b>		
TWEEN® 20	Detergent	0,25 ml
HBSS	Eigene Herstellung	49,75 ml

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorfgefäße	Nalge Nunc International, Rochester Belliver Industrial Estate, Plymouth neoLab, Heidelberg Molecular BioProducts, San Diego
96-Well-Mikrotiterplatten	
11 ml BD Vacutainer® Z Reagenzröhrchen	
Pasteurpipetten Medi Pastette NS (2,4ml)	
Pipettenspitzen	

## 2.2 Methoden

### Monozytenisolierung aus Vollblut

Zunächst wurden Monozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz isoliert. Das venöse heparinisierte Blut wurde 10 min bei 2100 rpm zentrifugiert, um die Blutbestandteile vom Blutplasma zu trennen. Danach wurde das Plasma mit einer Einwegpipette abgenommen und verworfen. Der Hämatokrit wurde in 3 ml HBSS resuspendiert und auf 3 ml Histopaque-1077 aufgeschichtet. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation für 15 min bei 2300 rpm. Durch Polysaccharose wurden Erythrozyten und Granulozyten beim Zentrifugieren aggregiert und sedimentiert. Die mononukleären Zellen verblieben als milchiger (trüber) Ring an der Plasma-Histopaque-1077 Grenzfläche (Abbildung 3). Dieser milchige Ring wurde mit einer Plastikpasteurpipette entnommen und 5 min bei 2900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Zellpellet wurde anschliessend in 1 ml HBSS resuspendiert und zur

Isolation von CD14-positiven Monozyten mit 25µl CD-14 Dynabeads inkubiert, deren Oberfläche mit spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet ist. Die Zellsuspension wurde 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Mittels eines Magneten wurden die CD-14 Zellen getrennt.

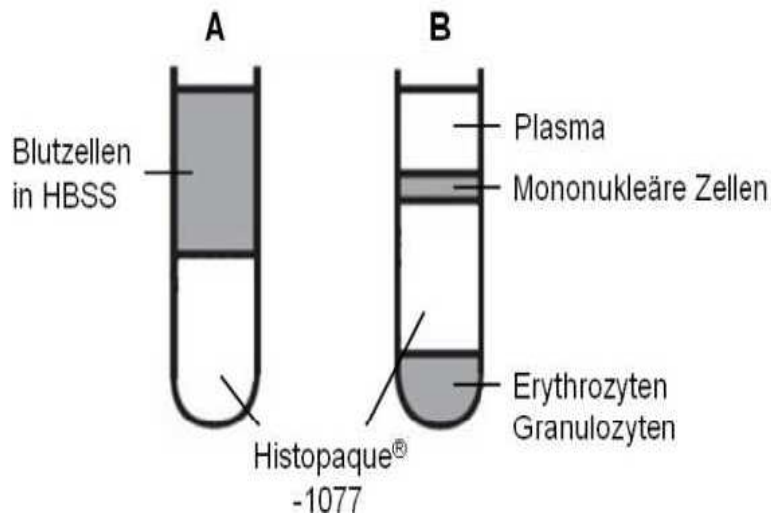


Abbildung 3: A) Vor der Zentrifugation: Histopaque-1077 überschichtet mit Blutzellen; B) nach dem Zentrifugieren entsteht eine trübe Schicht in Form eines Ringes, welcher die mononukleären Zellen enthält.

(Abbildung aus den Verfahrensangaben des Herstellers Sigma)

### In-cell Western assay

Die quantitative Bestimmung von TRPC Kanal-Proteinen in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen erfolgte durch quantitativen in-cell Western assay unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Bioscience) (Abbildung 4). Bei dieser Methode werden die Proteine direkt in den Zellen nachgewiesen. Der sekundäre Antikörper ist fluoreszenzmarkiert. Mehrere sekundäre Antikörper können gleichzeitig an einen Primärantikörper binden, was zu einer Signalverstärkung führt. Laut Hersteller fallen im Infrarotbereich unspezifische Hintergrundsignale deutlich geringer aus.

Die Monozyten wurden in 96well Platten mit Triton X 100 permeabilisiert, anschließend mit rabbit-anti-human TRPC3-Antikörpern (1:1000, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) wie schon vielfach beschrieben, (Clarson et al., 2003; Dalrymple et al., 2004; Kwan et al., 2004; Liu et al., 2007) 2 Stunden inkubiert, gewaschen und dann mit IRDye800CW-infrared fluorescent dye

conjugated sheep-anti-rabbit Antikörpern (1:1000, bimol, Hamburg) eine Stunde bei 4°C inkubiert.



Abbildung 4: Odyssey Infrared Imager Li-Cor Biosciences (Quelle: [www.licor.com](http://www.licor.com))

Nach viermaligen Waschen mit TWEEN® 20 washing solution (Detergent) erfolgten die Fluoreszenz-Mesungen bei 810 nm Emission mit einer Exzitationswellenlänge von 780 nm. Kontrollversuche wurden in Abwesenheit des primären Antikörpers durchgeführt. Als interner Standard wurden monoclonale goat-anti-human GAPDH-Antikörper (1:1000, Santa Cruz Biotechnology; USA) eingesetzt, welche mit AlexaFluor-680-allophycocyanin-fluoreszent dye-conjugated donkey-anti-goat Antikörpern (1:1000, MoBiTe, Göttingen) dargestellt wurden.



**Zweifarbige Darstellung**    700 nm, rotes Signal    800 nm, grünes Signal  
**Overlay**                                = GAPDH                                = TRPC3  
**700 und 800 nm**

Abbildung 5: Beispiel eines durch das Odyssey® System gescannten In-Cell Western.

Eine Normalisierung der Signalintensitäten gegen ein anderes Protein, ein so genanntes „housekeeping“ Protein ist wichtig, da dadurch Unterschiede, zum Beispiel in der Zellkonzentration der verschiedenen Wells oder auch kleine Unterschiede bei Inkubationszeiten, korrigiert werden können. Diese Referenzproteine gelten als unregulierte Proteine, von denen man annimmt, dass sie in allen Zellen etwa gleich stark exprimiert werden. Das untersuchte Protein wird zum Referenzproteinen ins Verhältnis gesetzt.

Ausgehend von den isolierten Monozyten, wurden nun je 100µl der präparierten Monozytenlösung in die einzelnen Wells von 96well Platten verteilt, und mit 150µl Fixing Solution (4,5ml PBS + 0,5ml 35 % Formaldehyd) durch 20 minütiges Inkubieren an der Platte fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch viermaliges Waschen mit je 200µl Washing Solution (49,5ml HBSS + 0,5ml 10 % Triton X100) für jeweils 5 Minuten permeabilisiert und damit für die spätere Zugabe der Antikörper vorbereitet. Mittels eines Magneten, können, durch die superparamagnetische Dynabeads, welche die Monozyten festhalten, die zugegebenen Lösungen wieder entfernt werden, ohne dabei die am Boden haftenden Zellen zu verlieren.

Nach Aufnahme in 150µl Blocking Buffer über Nacht, zur Absättigung frei gebliebener unspezifischer Bindungsstellen, wurde dieser am 2. Tag wieder mittels des Magneten entfernt. Vor der anschließenden Behandlung der Platte mit den Antikörpern folgte eine Einteilung in verschiedene Abschnitte. Im ersten Abschnitt sollen die unspezifische Hintergrundsignale erfasst werden, der Background 1. In diesem Abschnitt wird den Zellen mit den Proteinen nur der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben, nicht aber der primäre, an den der sekundäre sich spezifisch binden sollte. Jedes Signal, das in diesem Abschnitt gemessen wird, resultiert aus der ungezielten Bindung des 2. Antikörpers zum Beispiel direkt an ein Protein oder das Kunststoff der Platten. Diese Signale gelten als Hintergrund und müssen, da sie in jedem Well entstehen, auch von den Messergebnissen der Proteine abgezogen werden.

In einem zweiten Abschnitt soll ein weiterer Hintergrund ermittelt werden, der Background 2. Dabei handelt es sich um einen Bereich, in den wiederum die Zellen und diesmal der primäre Antikörper gegeben wurde, aber kein fluoreszenzmarkierter Antikörper vorhanden ist. Es handelt sich hierbei um eine Kontrolle der Reinheit der Reagenzien und Platten des jeweiligen Versuches. Dieser Wert wird nicht von den Proteinwerten abgezogen.

Vom 1. Antikörper wurden jeweils 50µl in einer Verdünnung von 1:1000 (mit Blocking Buffer/PBS 1:1 verdünnt) auf die Zellen gegeben, wobei die Wells, die als Background 1 gewertet werden sollten, ausgespart wurden. Für diese Wells wurde stattdessen die Antikörper-freie Mischung von Blocking Buffer/PBS im Verhältniss 1:1 verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 2h, wurden die Wells mit 200µl Tween washing solution (9,95ml HBSS + 50µl 20 % Tween20), unter Zuhilfenahme des Magneten, viermal mal 5 Minuten gewaschen wodurch nicht gebundene Antikörper wieder entfernt werden sollten. Anschließend erfolgte die Reaktion mit 50µl des 2. Antikörper, in gleicher Verdünnung wie bereits beim Erstantikörper beschrieben, unter Zugabe von 0,125 % Tween 20 zur Verringerung der Hintergrundsignale. Der 2. Antikörper wurde dafür in jedes Well, mit Ausnahme der Wells des 2. Backgrounds gegeben. Während der Inkubationszeit von einer Stunde musste die Platte wegen der Lichtempfindlichkeit des 2. Antikörpers vor Licht geschützt behandelt werden. Im darauf folgenden letzten Schritt wurden abermals unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen von je 5 Minuten mit Tween washing solution entfernt. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde die Fluoreszenz der trockenen Platte durch den Odyssey® Scanner bei 700 und 800 nm gemessen und mit der zugehörigen Software ausgewertet. (Abbildung)

Für die anschließende Auswertung wurden die Messergebnisse in eine Excel-Tabelle umgewandelt und die Konzentration der Proteine berechnet.

Bei der Auswertung eines In-cell Western gilt es, vor der schon beschriebenen Normalisierung der Proteinkonzentrationen, die unspezifische Hintergrundmessung für jedes Protein abzuziehen.

### **Fluoreszenzspektrophotometrie**

Die Untersuchung der intrazellulären Calciumhomöostase am Beispiel isolierter Monozyten erfolgte durch Fluoreszenzspektrophotometrie. Es wurde ein Fluoreszenzspektrophotometer Fluoroskan Ascent FL von Labsystems, Helsinki, Finnland verwendet. Bei dem angewandten Verfahren handelt es sich um ein optisches Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Substanzen anhand ihrer Absorption bzw. Extinktion monochromatischen Lichtes. Farbstoffmoleküle, die durch eine Lichtquelle wie z.B. eine Xenon-Lampe angeregt werden, absorbieren Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Das Xenon-Licht wird durch einen Exzitationsfilter auf eine spezifische Wellenlänge reduziert. Wird die spezifische Wellenlänge von den Farbstoffmolekülen absorbiert, überführt es diese in einen energiereicheren Zustand (Exzitationsstrahlung).

Bei der Rückkehr der Moleküle aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird die entsprechende Differenzenergie in Form von Photonen freigesetzt, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Haeckel et al., 1989). Erfolgt diese Rückkehr vom angeregten Zustand in den Grundzustand über mittlere Energiezustände, entsteht ein vollständiges Fluoreszenzspektrum (Holleman et al., 1985). Ein Teil der Strahlungsenergie, die von den Molekülen absorbiert wird, geht als Bewegungsenergie verloren. Dies erklärt, dass die Fluoreszenz, die von dem Molekül emittiert wird, eine längere Wellenlänge als die Exzitationsstrahlung hat. Die Intensität der von dem Fluoreszenzspektrophotometer in dem Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl der in der Probe befindlichen Moleküle und somit eine Bestimmung der Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit sollte die intrazelluläre, zytosolische Calciumionenkonzentration am Beispiel isolierter Monozyten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz fluoreszenzspektrophotometrisch bestimmt werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$  Messungen wurden mit der fluoreszenzphotometrischen Fura-2-Imaging Methode durchgeführt [Gryniewicz G et al., 1985]. Fura-2 ist ein Calciumchelator, welcher durch die Bindung von Calciumionen sein Absorptionsmaximum ändert. Das Absorptionsmaximum liegt für die calciumgebundene Form von Fura-2 bei  $\lambda_1=340$  nm, für die calciumfreie Form bei  $\lambda_2=380$  nm; die maximale

Emission erfolgt in beiden Fällen bei  $\lambda E=510$  nm. Fura-2 ist als Pentakalium- oder als Pentanatriumsalz erhältlich.

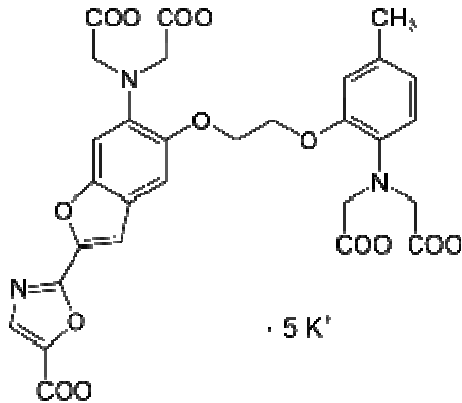


Abbildung 6: Fura-2, hier als Pentakaliumsalz

Die fluoreszierende Eigenschaft des Calcium-sensitiven Farbstoffes Fura-2 Pentaacetoxymethylester (Calbiochem, San Diego, CA, USA) wurde sich zunutze gemacht. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde in Form von lipophilem Acetoxymethylester (AM), der zellmembranpermeabel und insensitive für Ionen ist, appliziert. Im Zytosol der Monozyten wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch die freie Säure des Fluoreszenzfarbstoffes gebildet wird, die ionensensitiv und nicht mehr zellmembranpermeabel ist (Moore et al., 1990).

1 ml der isolierten Monozyten wurde nach Resuspension in physiologischer Elektrolytlösung mit vier verschiedenen Calciumkonzentrationen: 0.5, 1.0, 1.5 und 2.0 mmol/L 3 Stunden, im Anschluss eine weitere Stunde mit 2  $\mu$ l Farbstoff Fura-2-AM im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend bei einer Exzitationsstrahlung von 340 bzw. 485 nm mit einer Emission von 510 nm fluoreszenzspektrophotometrisch gemessen. Zur Quantifizierung der intrazellulären Calciumionenkonzentration Fura-2-AM beladener Monozyten wurde die Fluoreszenz-Ratio-Methode angewandt (Rodland et al., 1997; Scholze et al., 2005). Hierbei wird der Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz bei 340 nm und 485 nm gebildet. Bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm wird die calciumgebundene Form des Farbstoffes angeregt. Mit steigender Calciumionenkonzentration kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz bei 340 nm. Bei 485 nm dagegen ist die Fluoreszenz, die vom Farbstoff ausgeht, Calcium-unabhängig. Eventuelle Fehlerquellen, wie z.B. Unterschiede in der Farbstoffkonzentration oder Farbstoffverteilung innerhalb der Zellen, unterschiedliche



Zelldurchmesser, Ausbleichen oder Ausströmen des Farbstoffs werden mit Hilfe dieser Ratio-Messung eliminiert. Jede Fura-2-AM beladene Monozytenprobe wurde in vier 100 µl umfassende Wells aufgeteilt. Zu den Wells wurde eine Calciumlösung dazugeben und 180 s fluorenszenzspektrophotometrisch gemessen. Nach 180 s wurden die Monozyten mit 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol (OAG) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) stimuliert und für weitere 360s fluorenszenzspektrophotometrisch gemessen.

Die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Exzitationswellenlänge von 380 nm bei einer Emission von 510 nm durchgeführt.

### 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol (OAG)

OAG ist ein Analog von Diacylglyceride (DAG). Diacylglyceride sind Bestandteile von Glycerolipiden in der Zellmembran (z.B. als Vorstufe der Triglyceride). Bei der Spaltung des Phosphoinositids durch Phosphoinositidase (Phospholipase C) entstehen Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bewirkt die rasche Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem sarkoplasmatischem Retikulum glatter Muskelzellen. Dadurch erhöht sich der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel.

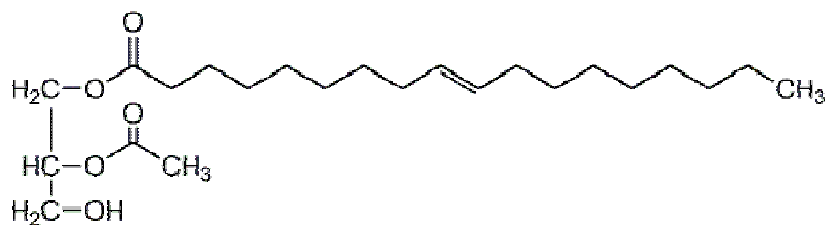


Abbildung 7: Strukturformel von 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol (OAG)

Der von IP<sub>3</sub> kontrollierte Ionenkanal ist ein sehr großes Molekül mit mehreren transmembranen Segmenten. Zur Bildung des Kanals lagern sich vier Untereinheiten zusammen; zur Öffnung des Kanals müssen mindestens drei IP<sub>3</sub>-Moleküle an Bindungsstellen auf der cytosolischen Seite des Kanals binden.

IP<sub>3</sub> ist ein kurzlebiger Botenstoff; er wird innerhalb weniger Sekunden (in Nervenzellen des Riechsystems innerhalb von 100 ms) weiter abgebaut und verhindert so eine zu lange Öffnung der Kanäle. IP<sub>3</sub> kann zu Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat phosphoryliert oder auch von Phosphatasen zu Inositol abgebaut werden.

## 2.3 Datenverarbeitung und Statistik

Auswertungen und Berechnungen der erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel und OpenOffice.org Calc 2.3 sowie mit GraphPad Prism 5.0 durchgeführt.

Textverarbeitung erfolgte mit OpenOffice.org writer 2.3, Grafiken wurden unter der Verwendung von Prism, Abbildungen durch OpenOffice.org Draw erstellt. Die Ergebnisse der Messdaten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Als statistische Tests wurden der parametrische t-Test, sowie der nicht-parametrische Mann Whitney-Test zur Anwendung.

Beim Vergleich von mehr als 2 gepaarten Stichproben wurde der nichtparametrische Friedman-Test, bei ungepaarten Daten der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei Vorhandensein einer Normalverteilung der Daten wurde auf die Varianzanalyse nach ANOVA zurückgegriffen.

Alle Tests nach Signifikanz sind zweiseitig. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  definiert.

### 3 Ergebnisse

#### Patientencharakterisierung

Um Veränderungen von TRPC3 Kanälen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen zu untersuchen wurde zunächst die TRPC Kanal-Expression an Monozyten aus peripherem Blut bei 20 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (16 Männer, 4 Frauen) und 19 altersgleichen gesunden Kontrollpersonen (13 Männer, 6 Frauen) bestimmt.

Die chronische Niereninsuffizienz war durch entsprechende pathologische Serum-, Urin- (einschließlich Proteinurie und renal-bedingte Mikrohämaturie), Sonographie-, oder histologische Befunde definiert. Die glomeruläre Filtrationsrate, ermittelt aus der MDRD-Formel aus Serumkreatinin, Alter und Geschlecht, war unter  $60\text{mL}/\text{min}/1.73/\text{m}^2$  in einem Zeitraum von mehr als 3 Monaten, (eGFR; Levey et al. 1999).

Ausschlusskriterien waren Lebensalter unter 18 Jahren, Schwangerschaft oder fehlende Zustimmung zur Untersuchung. Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz waren diabetische Nephropathie (n=6; 30%), Nephrosklerose (n=6; 30%), chronische Glomerulonephritis (n=5; 25%) und unbekannt (n=3; 15%). Der Blutdruck wurde dreimal mit einem Sphygmomanometer nach 10 Minuten Ruhe gemessen. Der systolische und diastolische Blutdruck wurden in der Korotkoff Phase I und V bestimmt. Die Patienten oder Kontrollpersonen hatten keine Schmerzen, erhöhte Temperatur oder andere akute Beschwerden. Alle Patienten und Kontrollpersonen hatten ihre schriftliche Zustimmung zur Durchführung der Untersuchung gegeben. Die Untersuchung war von der lokalen Ethik Kommission befürwortet worden.

Tabelle 2. Klinische und biochemische Charakteristika der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und der gesunden Kontrollpersonen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. \* $p < 0.05$ , im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen.

Charakteristikum	Gesunde Kontrollpersonen	Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz
Alter (Jahre)	63 ± 3	64 ± 3
Anzahl (Männer/Frauen)	13 / 6	16 / 4
Systolischer Blutdruck(mmHg)	120 ± 1	129 ± 6
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	69 ± 2	69 ± 4
Pulsdruck (mmHg)	51 ± 2	60 ± 3
Pulsfrequenz (pro Minute)	78 ± 3	79 ± 4
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26.5 ± 0.8	27.8 ± 1.4
Hemoglobin (g/L)	131 ± 3	114 ± 4*
Leukozyten (G/L)	9.0 ± 1.0	10.5 ± 0.9
Blutplättchen (G/L)	222 ± 16	269 ± 29
Serum-Natrium (mmol/L)	136 ± 1	137 ± 1
Serum-Kalium (mmol/L)	3.9 ± 0.1	4.2 ± 0.2
Serum-Calcium (mmol/L)	2.25 ± 0.02	2.16 ± 0.03*
Serum-Phosphat (mmol/L)	0.84 ± 0.05	1.48 ± 0.12*
Cholesterin (mg/dL)	168 ± 12	202 ± 21
Glukose (mg/dL)	114 ± 6	132 ± 11
Kreatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.0	3.7 ± 0.6*
Glomeruläre Filtrationsrate (mL/Min/1.73m <sup>2</sup> )	84 ± 4	27 ± 4*

Abbildung 8 zeigt den Nachweis von TRPC3 in humanen Monozyten mittels Immunoblot. Das Molekulargewicht von TRPC3 beträgt 97 kDa. Der Immunoblot bestätigt, das Molekulargewicht von TRPC3 und zeigt darüberhinaus, dass die eingesetzten Antikörper geeignet sind, um TRPC3 Kanäle in den humanen Monozyten nachzuweisen.

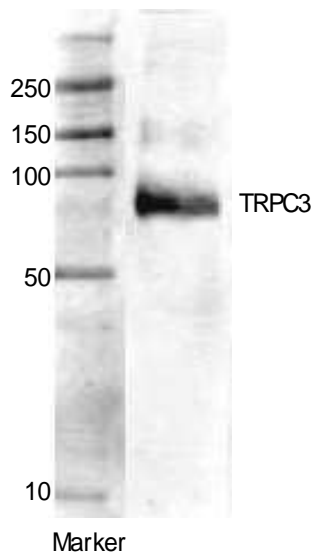


Abbildung 8: Nachweis von TRPC3 in humanen Monozyten mittels Immunoblotting. Marker zeigt die Auftragung des Proteinmarkers. Der Immunoblot bestätigt das Molekulargewicht von TRPC3 mit 97 kDa.

Die quantitative Bestimmung von TRPC3 Kanal-Proteinen in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen erfolgte nun durch quantitativen in-cell Western assay unter Verwendung des Odyssey infrared imaging system (Licor Bioscience). Humane Monozyten wurden in 96well Platten mit rabbit-anti-human TRPC3-Antikörpern für 2 Stunden inkubiert, gewaschen und dann mit IRDye800CW-infrared fluorescent dye-conjugated sheep-anti-rabbit Antikörpern für eine Stunde bei 4°C inkubiert (1: 1000). Nach dreimaligem Waschen erfolgten die Fluoreszenz-Messungen bei 810 nm Emission mit einer Exzitationswellenlänge von 780 nm. Kontrollversuche wurden in Abwesenheit des primären Antikörpers durchgeführt. Als interner Standard wurden monoclonale goat-anti-human GAPDH-Antikörper (1: 1000, Santa-Cruz Biotechnology; USA) eingesetzt, welche mit Alexa Fluor-680-allophycocyanin-fluorescent dye-conjugated donkey-anti-goat Antikörpern (1:1000, MoBiTec, Göttingen) dargestellt wurden, die Emission war 700 nm bei einer Exzitationswellenlänge von 680 nm.

Abbildung 9 zeigt den Vergleich der TRPC3 Kanal-Protein-Expression in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen. Die TRPC3 Kanal-Protein-Expression war signifikant höher in den Zellen von Patienten mit chronischer

Niereninsuffizienz im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen ( $0,42 \pm 0,06$ ;  $n=20$ ; vs.  $0,19 \pm 0,03$ ;  $n=19$ ;  $p < 0,01$  im Vergleich mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test).

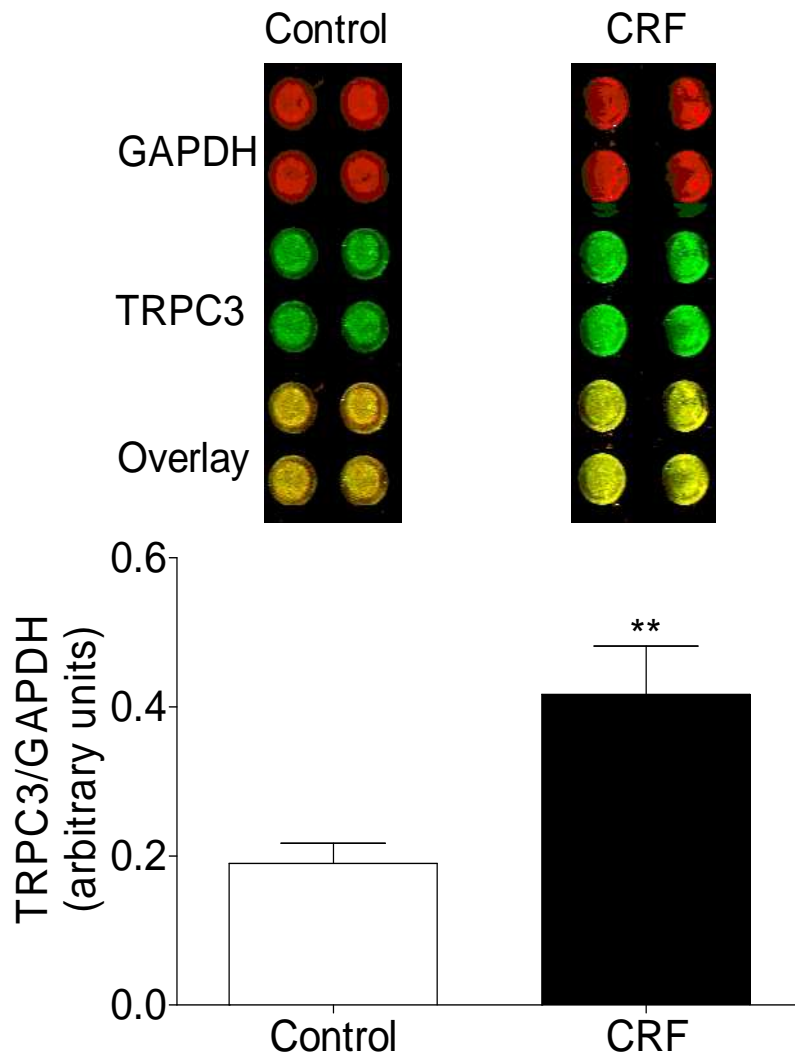


Abbildung 9: Gesteigerte TRPC3 Kanal-Protein-Expression in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF) im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen (Control). Die obere Abbildung zeigt einen repräsentativen quantitativen in-cell Western assay mit Monozyten bei einem Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF) im Vergleich mit einer gesunden Kontrollperson (Control). Jeweils Vierfachbestimmungen der Expression von TRPC3 (grün), normalisiert zu GAPDH (interner Standard, rot) und overlay (gelb) sind dargestellt. Die untere Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes für die TRPC3 Kanal-Protein-Expression bei 20 CRF (gefüllte Balken) im Vergleich mit 19 Control (offene Balken). \*\*  $p < 0,01$  zwischen den beiden Gruppen.

Die nicht-parametrische Spearman Korrelation zeigte eine signifikante inverse Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der TRPC3 Kanal-Protein-Expression auf den Monozyten (Spearman  $r = -0,41$ ; 95% Konfidenz-Intervall,  $-0,65$  bis  $-0,10$ ;  $p < 0,05$ ). Dies weist darauf hin, dass eine zunehmend eingeschränkte Nierenfunktion mit einer Steigerung der TRPC3 Kanal-Protein-Expression einhergeht (Abbildung 9). Weiterhin ergab sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Serum-Calcium-Konzentration und der TRPC3 Kanal-Protein-Expression (Spearman  $r = -0,34$ ; 95% Konfidenz-Intervall,  $-0,60$  bis  $-0,02$ ;  $p < 0,05$ ). Erwartungsgemäß ergab sich auch eine signifikante positive Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der Serum Calcium-Konzentration (Spearman  $r = 0,33$ ; 95% Konfidenz-Intervall,  $0,00$  bis  $0,59$ ;  $p < 0,05$ ), was die Assoziation einer zunehmend eingeschränkten Nierenfunktion mit erniedrigten Serum Calcium-Konzentrationen belegt.

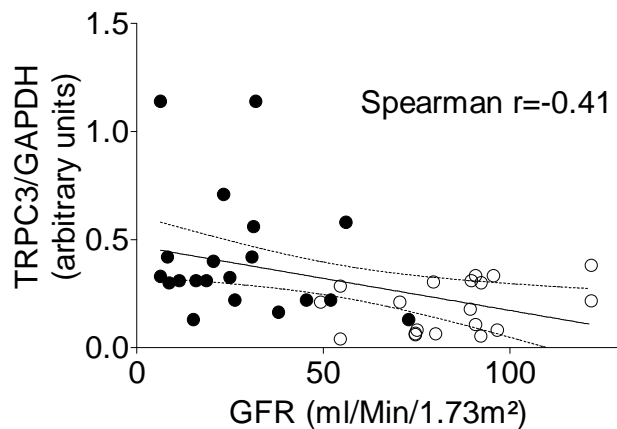


Abbildung 10: Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der TRPC3 Kanal-Protein-Expression auf den Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (gefüllte Kreise) und gesunden Kontrollpersonen (offene Kreise). Spearman  $r = -0,41$ ; 95% Konfidenz-Intervall,  $-0,65$  bis  $-0,10$ ;  $p < 0,05$ .

Um jetzt den Effekt der extrazellulären Calcium-Konzentration in vivo auf die TRPC3 Expression nachzuweisen, wurden TRPC3 Kanal-Proteine auf den Monozyten am Start und am Ende einer regulären Hämodialysebehandlung untersucht. Bei diesen Hämodialysepatienten bestand die Dialysepflichtigkeit seit mehr als 3 Monaten. Die Biokarbonat-Dialyse wurde mit einer biokompatiblen Membran routinemäßig dreimal wöchentlich für 4 Stunden durchgeführt. Das Standarddialysat enthielt  $1,75$  mmol/l Calcium. Die Dialyse-Dosis, routinemäßig gemessen als  $kT/V$ , war größer als  $1,2$ .

Wie in der Abbildung 11 gezeigt, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Serum Calcium-Konzentration von  $2,15 \pm 0,10$  mmol/L am Start der Dialyse auf  $2,58 \pm 0,09$  mmol/L am Ende der Dialyse ( $n = 8$ ;  $p < 0,01$ ). Gleichzeitig kommt es zu einer signifikanten Minderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression von  $0,43 \pm 0,07$  am Start der Dialyse auf  $0,29 \pm 0,06$  am Ende der Dialyse ( $n = 8$ ;  $p < 0,05$ ). Dies deutet darauf hin, dass eine Steigerung der extrazellulären Calcium-Konzentration *in vivo* zu einer down-Regulation der TRPC3 Expression führt.

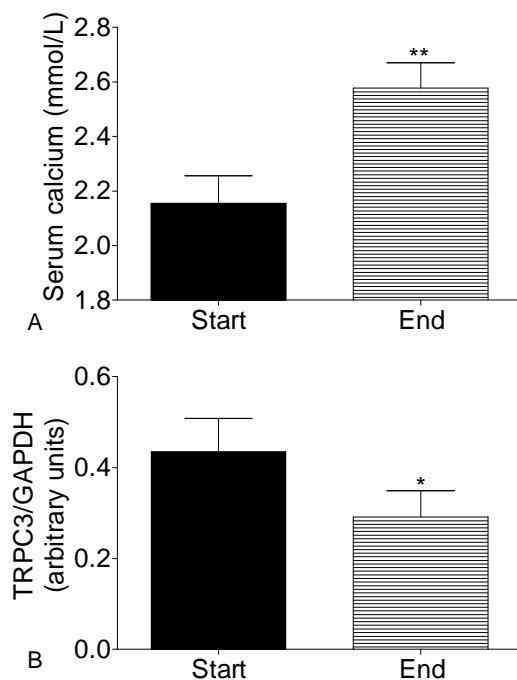


Abbildung 11: Effekt der extrazellulären Calcium-Konzentration *in vivo* auf die TRPC3 Expression. (A) Die Serum Calcium-Konzentrationen und (B) die Expression von TRPC3 Kanal-Protein in humanen Monozyten wurden bei Hämodialysepatienten am Start und am Ende einer regulären Hämodialyse gemessen. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der down-Regulation der TRPC3 Expression durch erhöhte Calcium-Konzentrationen auch *in vitro* näher zu charakterisieren, wurden Monozyten mit verschiedenen extrazellulären Konzentrationen von Calcium, Magnesium, Barium oder Natrium für 4 Stunden inkubiert (Abbildung 12). Die Steigerung der extrazellulären Calcium-Konzentration von  $0,5$  mmol/l auf  $2,0$  mmol/l führte zu einer signifikanten Verminderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression von  $0,32 \pm 0,07$  auf  $0,16 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ). Dagegen führte



eine Veränderung der Magnesium-, Barium- oder Natrium-Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression.

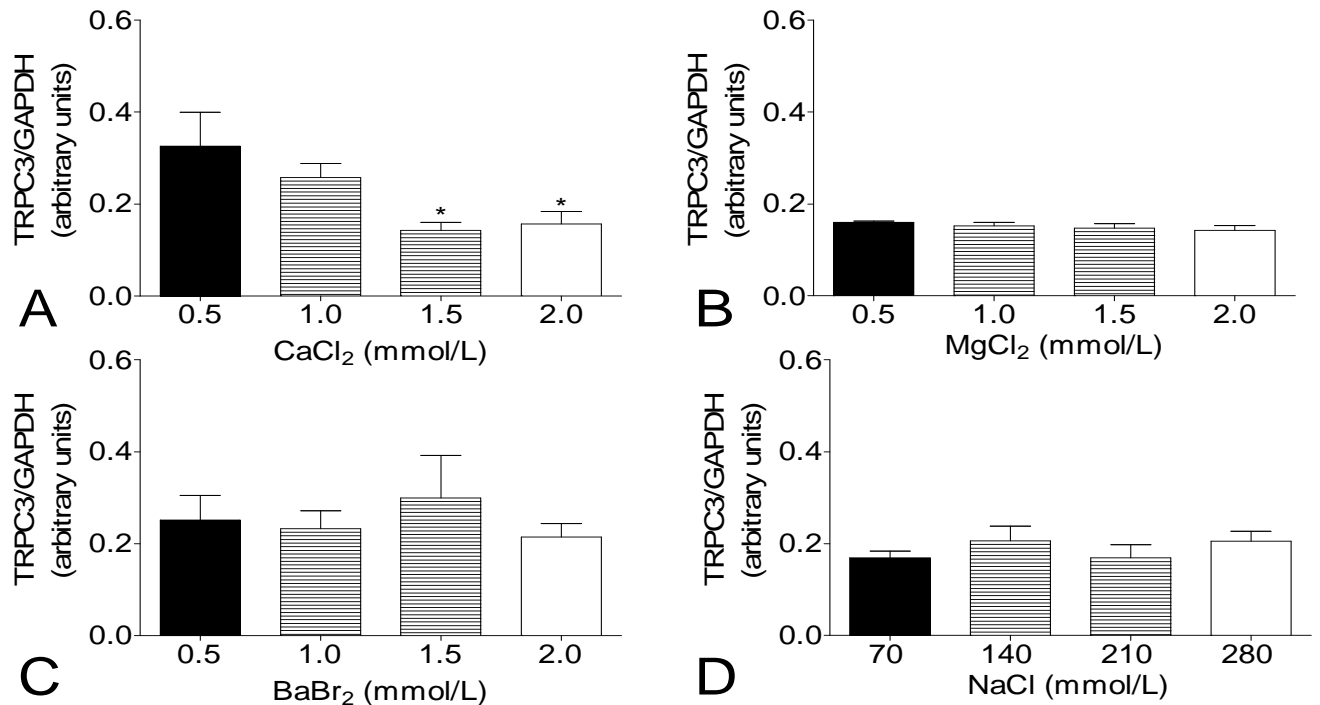


Abbildung 12. Effekt der extrazellulären Calcium-Konzentration in vitro auf die TRPC3 Expression. Dosis-abhängige Wirkung von steigenden extrazellulären Kationen-Konzentrationen von Calcium (A), Magnesium (B), Barium (C) oder Natrium (D) in vitro auf die Expression des TRPC3 Kanal-Proteins in humanen Monozyten. \*  $p < 0,05$  Kruskal-Wallis-test mit Dunn`s multiple comparison post-test.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine signifikante Steigerung der TRPC3 Kanal-Protein Expression aufweisen. Die Untersuchungen in vivo als auch in vitro weisen darauf hin, dass als ursächlicher Mechanismus eine Regulation von TRPC3 durch die extrazelluläre Calcium-Konzentration besteht.

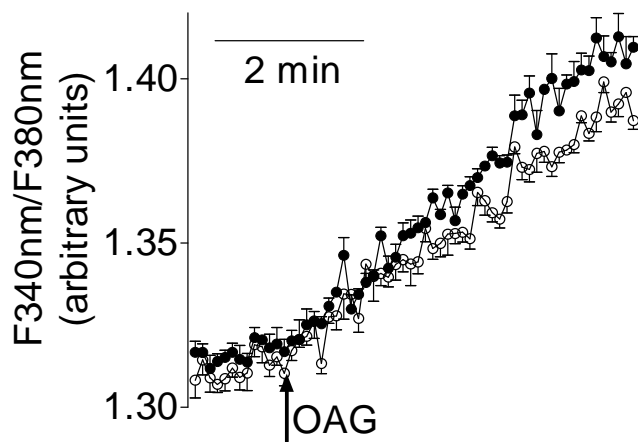


Abbildung 13: OAG-induzierter Calcium-Influx in Monozyten mit vorheriger Inkubation in 0.5 und 2.0 mmol/l extrazellulärer Calciumlösung.

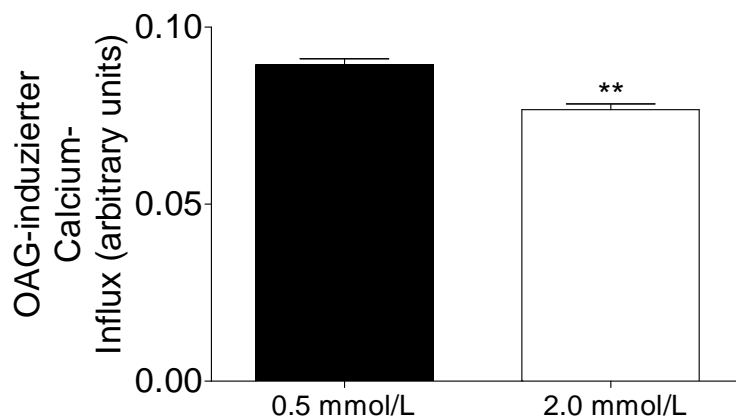


Abbildung 14: Calcium-Einstrom in Monozyten mit einer Vor-Inkubation mit extrazellulärem Calcium in 0.5 und 2.0 mmol/L Konzentration. \*\*  $p < 0,01$ .

## 4 Diskussion

Die Rolle der TRPC Kanäle wurde bereits in unzähligen Studien beschrieben, wie z. B die TRPC Kanäle bei Nierenerkrankungen: [Woudenberg-Vrenken TE et al.,2009, Hsu YJ, et al.,2007, Jordt SE et al., Ehrlich BE et al.,2007, Montell C et al.,2001, Tepel M., et al.,2001 Nilius et al., 2007, Menè P 2006; Venkatachalam K, Montell C.2007, Maier A, et al.,2009, Wittstock A. et al.,2009, Scholze A, et al.,2009]. Nach dem heutigen Wissensstand könnte eine Mutation im TRPC 6-Gen als verantwortlich für die Entstehung/Ausbildung der Primär Fokal Segmentalen Glomerulosklerose identifiziert werden, die sich durch segmentale und/oder globale Vernarbug von Glomeruli auszeichnet: [Reiser et al.,2005, Winn MP et al., 2006]. Auch in anderen Disziplinen, wie in der Pulmonologie Kardiologie u.a. wurden die TRPC Kanäle erfolgreich experimentiert: [Wang J, et al.,2006, Thilo F, et al.,2009, Liu D, et al.,2006]. Laut einer Studie sind die TRPC6-Kanäle essentiell für hypoxische pulmonale Vasokonstriktion und den alveolaren Gasaustausch: [Weissmann, N t al.,2006]. Eine erhöhte TRPC3 Kanalexpression wurde z.B. in humanen Monozyten bei essentieller Hypertonie festgestellt: [Liu D, et al., 2006, Liu D, et al., 2007 Thilo F, et al., 2009]. Die Monozyten zeigten nicht nur einen Anstieg der TRPC3-Kanalexpression, sondern auch einen gesteigerten Calciumeinstrom nach der TRPC Kanalaktivierung. Über die variable Selektivität der TRP Kanäle liegen ebenfalls interessante Studien vor: [Golovina VA, et al.,2001, Menè P,2006, Huang CL,2007]. Bei Erkrankungen der Atemwege, wie z.B. Überempfindlichkeitsreaktionen bei allergischem Asthma bronchiale wird eine verstärkte TRPC6-Kanalexpression beobachtet. Dies hat Auswirkung auf den Tonus und den Depolarisationszustand der glatten Muskulatur der Atemwege: [Welsh DG et al.,2002, Chiba Y&Masawa M.1995]. Bei pulmonaler Hypertonie wurde ebenfalls eine Veränderung der TRPC- Kanalexpression in Form einer TRPC6- Überexpression festgestellt, die sich auf den Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen auswirkt und die Vasokonstriktion fördert: [Yu Y et al.,2004, Wang J. et al., 2005]. Allerdings wurde die Expression der TRPC3 Kanäle in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bislang noch nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte TRPC3 Kanal-Protein- Expression aufweisen. Die Arbeit wurde an humanen Monozyten aus Vollblut durchgeführt, die vorher mittels Dynabeads isoliert wurden. Die quantitative Bestimmung von TRPC3 Kanal-Proteinen in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und

gesunden Kontrollpersonen erfolgte nun durch quantitativen in-cell Western assay unter Verwendung des Odyssey infrared imaging system (Licor Bioscience). Die TRPC3 Kanal-Protein-Expression war signifikant höher in den Zellen von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen. Dies weist darauf hin, dass eine zunehmend eingeschränkte Nierenfunktion mit einer Steigerung der TRPC3 Kanal-Protein-Expression einhergeht.

Weiterhin ergab sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Serum-Calcium-Konzentration und der TRPC3 Kanal-Protein-Expression. Erwartungsgemäß ergab sich auch eine signifikante positive Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der Serum Calcium-Konzentration, was die Assoziation einer zunehmend eingeschränkten Nierenfunktion mit erniedrigten Serum Calcium-Konzentrationen belegt. Um den Effekt der extrazellulären Calcium-Konzentration in vivo auf die TRPC3 Expression nachzuweisen, wurden TRPC3 Kanal-Proteine auf den Monozyten am Start und am Ende einer regulären Hämodialysebehandlung untersucht. Es kam zu einem signifikanten Anstieg der Serum Calcium-Konzentration von  $2,15 \pm 0,10$  mmol/L am Start der Dialyse auf  $2,58 \pm 0,09$  mmol/L am Ende der Dialyse ( $n = 8$ ;  $p < 0,01$ ). Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten Minderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression von  $0,43 \pm 0,07$  am Start der Dialyse auf  $0,29 \pm 0,06$  am Ende der Dialyse ( $n = 8$ ;  $p < 0,05$ ). Dies deutet darauf hin, dass eine Steigerung der extrazellulären Calcium-Konzentration in vivo zu einer down-Regulation der TRPC3 Expression führt. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der down-Regulation der TRPC3 Expression durch erhöhte Calcium-Konzentrationen auch in vitro näher zu charakterisieren, wurden Monozyten mit verschiedenen extrazellulären Konzentrationen von Calcium, Magnesium, Barium oder Natrium für 4 Stunden inkubiert. Die Steigerung der extrazellulären Calcium-Konzentration von  $0,5$  mmol/l auf  $2,0$  mmol/L führte zu einer signifikanten Verminderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression von  $0,32 \pm 0,07$  auf  $0,16 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ). Dagegen führte eine Veränderung der Magnesium-, Barium- oder Natrium-Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung der TRPC3 Kanal-Protein Expression.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine signifikante Steigerung der TRPC3 Kanal-Protein Expression aufweisen. Die Untersuchungen in vivo als auch in vitro weisen darauf hin, dass als ursächlicher Mechanismus eine Regulation von TRPC3 durch die extrazelluläre Calcium-Konzentration besteht.

## 5 Zusammenfassung

Bei chronischer Niereninsuffizienz handelt es sich um einen langsamen, über Monate oder Jahre voranschreitenden Verlust der Nierenfunktion. Chronisches Nierenversagen wird als das Terminal- oder Endstadium einer chronischen Nierenkrankheit bezeichnet, das durch eine Nierenleistung von 15 % der Norm oder darunter gekennzeichnet ist.

Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)-Kanäle sind membranständige Kationenkanäle und beeinflussen zahlreiche zelluläre Prozesse, indem sie den Calciumeinstrom ermöglichen. Calcium ist als universeller, intrazellulärer Botenstoff an der Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Zellfunktionen beteiligt. TRPC-Kanäle wurden in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, u.a. in peripheren Monozyten.

Die vorliegende Arbeit soll sich mit der Regulation von Transient Receptor Potential Canonical Typ 3-Kanälen bei chronischer Niereninsuffizienz, d.h. mit der Expression der TRPC3-Kanäle in humanen Monozyten sowie deren Einfluss auf die extrazelluläre Calciumkonzentration befassen. Mit der vorliegenden Arbeit soll u.a. die Frage beantwortet werden ob ein Dialysetherapieverfahren die Expression der TRPC3-Kanäle beeinflusst.

Die quantitative Bestimmung von TRPC Kanal-Proteinen in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Kontrollpersonen erfolgte durch quantitativen in-cell Western assay unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Bioscience). Die extrazelluläre Calciumkonzentration wurde durch Anwendung von Fura-2 mittels Fluoreszenzspektrophotometrie bestimmt.

Es wurde eine erhöhte TRPC3 Kanal-expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beobachtet. Zugleich wurde unter Stimulation mit OAG ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen festgestellt. In dieser Arbeit ergab sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Serum-Calcium-Konzentration und der TRPC3 Kanal-Protein-Expression, sowie auch eine signifikante positive Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Serum Calcium-Konzentration.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine erhöhte TRPC3 Kanalexpression bei chronischer Niereninsuffizienz, sowie eine positive Korrelation zwischen der glomerulären Filtrationsrate und der Serum Calcium-Konzentration.

Schlüsselwörter: Transient Receptor Potential Canonical Kanäle, intra/extrazelluläres Calcium, chronisches Nierenversagen.

## 6 Summary

**Objective:** It is unknown whether extracellular calcium may regulate the expression of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channels in patients with chronic kidney disease.

**Methods:** Using quantitative in-cell Western assay we compared the expression of TRPC3 channel protein in monocytes from in 20 patients with chronic kidney disease and 19 age- and sex-matched healthy control subjects.

**Results:** We observed a significant increase of TRPC3 channel protein expression in patients with chronic kidney disease compared to healthy control subjects (normalized expression,  $0.42 \pm 0.06$  vs.  $0.19 \pm 0.03$ ;  $p < 0.01$ ). Expression of TRPC3 was significantly inversely correlated with estimated glomerular filtration rates (Spearman  $r = -0.41$ ) or serum calcium concentration (Spearman  $r = -0.34$ ). During a hemodialysis session serum calcium concentration significantly increased whereas the expression of TRPC3 significantly decreased. In vitro studies confirmed that higher calcium concentrations but not magnesium, barium or sodium concentrations significantly decreased TRPC3 expression in human monocytes.

**Conclusion:** This study indicates that reduced extracellular calcium concentrations upregulate TRPC3 channel protein expression in patients with chronic kidney disease.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ba	Barium
BaBr <sub>2</sub>	Bariumbromid
BB	Blocking Buffer
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CRF	Chronic renal failure
CNG	Cyclic nucleotide-gated channels
DAG	Dyacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EET	Epoxyeicosatriensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EZR	Extrazellulärraum
Fura-2	1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCN	Hyperpolarization-activated channels
HD	Hämodialyse
Icrac	Calcium released-activated calcium current
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
InsP3R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
NF-κB	Nuklearfaktor-kappaB
ns.	nicht significant

OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol
ONOO	Peroxynitrit
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4,5-biphosphat
PLC	Phospholipase C
ROCs	receptor operated channels
rpm	rounds per minute
SEM	Standartfehler
SOCs	store operated channels
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TMP	Tempol
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical/ Classical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucoipin
TRPN	Transient Receptor Potential no mechanoreceptor potential
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
WF	Wachstumsfaktor



## 8 Literaturverzeichnis

- Albert AP, Saleh SN, Large WA. Identification of canonical transient receptor potential (TRPC) channel proteins in native vascular smooth muscle cells. *Curr Med Chem*. 2009;16(9):1158-65. Review.
- Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA. Ca<sup>2+</sup> handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Sep;295(3):C779-90. Epub 2008 Jul 2.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 2000;287:1604-1605.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jun;2(6):387-96. Review.
- Cosens DJ, Manning A., Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969 Oct 18;224(5216):285-7. No abstract available.
- Ebashi, S. Calcium ions and muscle contraction. *Nature*. 1972 Nov 24;240(5378):217-8
- Eder P, Groschner K. TRPC3/6/7: Topical aspects of biophysics and pathophysiology. *Channels (Austin)*. 2008 Mar 29;2(2). [Epub ahead of print].
- Gamberucci A, Giurisato E, Pizzo P, Tassi M, Giunti R, McIntosh DP, Benedetti A. Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T-lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous TRP6 gene products. *Biochem J* 2002;364:245-254.
- Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Estacion M, Schilling WP., Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 May;290(5):F1241-52. Epub 2005 Nov 22.
- Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Hopfer U, Schilling WP. Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Nov;293(5):F1476-88. Epub 2007 Aug 15.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999;397:259-263.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):259-63.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T., Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med*. 2000;78(1):14-25. Review.
- Hsu YJ, Chang YJ, Su LH, Hsu YL., TRP channels in kidney disease. *Biochem Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):928-36. Epub 2007 Feb 12. Review.
- Jordt SE, Ehrlich BE. TRP channels in disease. *Subcell Biochem*. 2007;45:253-71. Review.
- Koch K, Nachweis vom Oxidativen Stress, Dissertation. 2009 Feb.

- Liu DY, Maier A, Scholze A, Rauch U, Boltzen U, Zhao ZG, Zhu ZM, Tepel M. High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:746-751. Impact factor 6.883.
- Liu DY, Scholze A, Kreutz R, Wehland von Trebra M, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M: Spontaneously hypertensive rats show increased store-operated and second messenger-operated calcium influx mediated by transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channels. *Am J Hypertens* 2007;20:1111-1118. Impact factor 3.496
- Liu DY, Scholze A, Zhu ZM, Kreutz R, Wehland von Trebra M, Zidek W, Tepel M. Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2005; *Am J Hypertens* 2005;18:1503-1507. Impact factor 3.382.
- Liu DY, Scholze A, Zhu ZM, Krueger K, Thilo F, Burkert A, Streffer K, Holz S, Harteneck C, Zidek W, Tepel M. Transient receptor potential channels in essential hypertension. *J Hypertens.* 2006;24:1105-1114. Impact factor 5.218.
- Liu DY, Thilo F, Scholze A, Wittstock A, Zhao Z, Harteneck C, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M. Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2007;25:799-808. Impact factor 5.218.
- Liu DY, Yang DC, He HB, Chen XP, Cao TB, Feng X, Ma L, Luo Z, Wang L, Zhu ZM, Tepel M: Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats. *Hypertension* 2009;53:70-76. Impact factor 7.194.
- Llinas, RR, Calcium in synaptic transmission, *Sci Am.* 1982 Oct;247(4):56-65.
- London GM, Marchais SJ, Guérin AP, Métivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14:525-531.
- Menè P., Transient receptor potential channels in the kidney: calcium signaling, transport and beyond. *J Nephrol.* 2006 Jan-Feb;19(1):21-9. Review.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 2002;108:595-598.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007;87:165-217.
- Nilius B., TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1772(8):805-12. Epub 2007 Feb 12. Review.
- Philipp S, Strauss B, Hirnet D, Wissenbach U, Mery L, Flockerzi V, Hoth M. TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):26629-38. Epub 2003 May 6.
- Raine AE, Bedford L, Simpson AW, Ashley CC, Brown R, Woodhead JS, Ledingham JG. Hyperparathyroidism, platelet intracellular free calcium and hypertension in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1993;43:700-705.
- Riccio A, Mattei C, Kelsell RE, Medhurst AD, Calver AR, Randall AD, Davis JB, Benham CD, Pangalos MN. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):12302-9. Epub 2002 Jan 22.
- Schilling WP, Goel M., Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Novartis Found Symp.* 2004;258:18-30; discussion 30-43, 98-102, 263-6. Review.
- Scholze A, Maier A, Stocks F, Karamohamad F, Vetter R, Zidek W, Tepel M. Sustained increase of extracellular calcium concentration causes arterial vasoconstriction in humans. *J Hypertens.* 2005;23:2049-2054. Impact factor 5.218.

- Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V, Hoth M. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium*. 2006 Feb;39(2):163-73. Epub 2005 Dec 13.
- Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int Suppl*. 1999;73:S14-19.
- Smogorzewski M, Massry SG. Defects in B-cell function and metabolism in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl*. 2001;78:S186-S189.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE., TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*. 2001 Mar;29(3):645-55.
- Thilo F, Baumunk D, Krause H, Schrader M, Miller K, Loddenkemper C, Zakrzewicz A, Krueger K, Zidek W, Tepel M: Transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channels and blood pressure in humans *J Hypertens* 2009 ; (in press). Impact factor 4.364
- Thilo F, Loddenkemper C, Berg E, Zidek W, Tepel M: Increased transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel in preglomerular arterioles in patients with malignant hypertension. *Modern Path* 2009; 22:426-430. Impact factor 4.286.
- Thilo F, Scholze A, Liu DY, Zidek W, Tepel M. Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines. *Arch Biochem Biophys*. 2008;471:57-62. Impact factor 2.969.
- Venkatachalam K, Montell C., TRP channels. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:387-417. Review.
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. 2005;308:1801-1804.
- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB., A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. 2005 Jun 17;308(5729):1801-4. Epub 2005 May 5.
- Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V., TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca<sup>2+</sup> channel expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 1;322(4):1359-63. Review.
- Wittstock A, Burkert M, Zidek W, Tepel M, Scholze A., N-acetylcysteine improves arterial vascular reactivity in patients with chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract*. 2009;112(3):c184-9. Epub 2009 May 13.
- Woundenberg-Vrenken TE, Bindels RJ, Hoenderop JG. transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2009 Aug; 5(8): 441-9. Epub.
- Wünsch T, Einfluss von Hyperglykämie und oxidativem Stress auf die Expression von Transient Receptor Potential Canonical Kanälen
- Zhang LL, Liu DY, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, Wang LJ, Zhao ZG, Zhu SJ, Schrader M, Thilo F, Zhu ZM, Tepel M. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res*. 2007;100:1063-1070. Impact factor 9.408.
- Zitt C, Obukhov AG, Strübing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G. Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *Cell Biol*. 1997 Sep 22;138(6):1333-41.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. Martin Tepel für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Ich konnte mich immer auf seine Unterstützung verlassen. Ganz besonders möchte ich Ihnen danken, dass Sie immer ansprechbar waren und mir bei diversen Schwierigkeiten behilflich waren. Vielen Dank, dass Sie während der Entstehung dieser Arbeit Geduld gezeigt haben.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich vielmals für die Vergabe meines Stipendiums, ohne welches meine Arbeit in Berlin nicht möglich gewesen wäre.

Katharina Krüger möchte ich danken, weil sie mir die Arbeit im Labor so leicht gemacht hat. Ich konnte mich jederzeit auf ihre Hilfe verlassen. Danke, dass du mir soviel beigebracht hast und viel Geduld mit mir hattest.

Familie Kesal danke ich ganz besonders, denn ohne ihre liebevolle Unterstützung wäre mein Aufenthalt in Berlin undenkbar gewesen.

Ich möchte meiner lieben Familie herzlichst danken, dass sie immer an mich geglaubt haben und mich stets motiviert und mir trotz der enormen Entfernung immer Kraft gegeben haben.

Meinem Ehemann möchte ich ganz besonders für seine Liebe und Fürsorge danken. Gott sei Dank, dass es dich gibt!

Zu allerletzt möchte ich allen Menschen danken, die mich in schwierigen Situationen niemals alleine gelassen haben.

## **10 Erklärung**

„Ich, Anahit Hovsepian, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Regulation von Transient Receptor Potential Canonical Typ 3-Kanälen bei chronischer Niereninsuffizienz selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum:

Unterschrift: