

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Hämodialyse bei terminaler Niereninsuffizienz

Chronische Niereninsuffizienz ist Folge einer irreversiblen Verminderung glomerulärer, tubulärer oder endokriner Funktionen beider Nieren. Sie verläuft in vier Stadien, die fließend in einander übergehen. Chronische Niereninsuffizienz beginnt mit einem zunächst symptomlosen, kompensierten Dauerstadium mit eingeschränkter Kreatininclearance (GFR 70-120 ml/min). In diesem Stadium liegen die Retentionsparameter noch im Normbereich. Es folgt das Stadium der kompensierten Retention (GFR 20-70 ml/min) mit Kreatininwerten von 1.5 bis 4 mg/dl sowie das Stadium der präterminalen Niereninsuffizienz (GFR 5-20 ml/min) mit Kreatininwerten von 4 bis 7 mg/dl. Das letzte Stadium ist die terminale Niereninsuffizienz oder auch Urämiestadium (GFR < 5 ml/min) mit Kreatininwerten >7 mg/dl. In diesem Stadium wird eine Nierenersatztherapie für das Überleben des Patienten erforderlich.

Die Prävalenz der chronischen Nierenersatztherapie in Deutschland lag 2004 bei 998 Patienten pro 1 Millionen Einwohner (Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland, QuaSiNiere, Dezember 2004). Davon erhielten 739 Patienten pro 1 Millionen Einwohner Dialysetherapie (Hämodialyse plus Peritonealdialyse) und 258 Patienten pro 1 Millionen Einwohner eine Nierentransplantation.

Die Anzahl der Dialysepatienten ist in den letzten Jahren um rund 5 bis 6% gestiegen. Die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz lag im Jahr 2004 bei 194 Patienten pro 1 Millionen Einwohner. Zu den häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz zählt der Diabetes mellitus (35%) mit stark ansteigender Tendenz, und die hypertensive Nephropathie (30%). Weiterhin können chronische Glomerulonephritiden, zystische oder interstitielle Nephropathien sowie Analgetikaabusus oder autoimmune Systemerkrankungen zur terminalen Niereninsuffizienz führen. In bis zu 15% der Fälle ist die Ursache für die entstehende Dialysepflichtigkeit unbekannt.

Unabhängig von der Ätiologie der Grunderkrankung ist die Folge der terminalen Niereninsuffizienz die Einschränkung bis hin zum Verlust der ex- und inkretorischen Nierenfunktionen. Dies führt einerseits durch Retention der harnpflichtigen Substanzen zum urämischen Syndrom bis hin zum terminalen, urämischen Koma, andererseits

manifestieren sich renale Anämie aufgrund des Erythropoetinmangels, renaler Hypertonus durch den Mangel an Renin und ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, der auf eine reaktive Hyperplasie der Nebenschilddrüse aufgrund der Niereninsuffizienz-bedingten Hyperphosphatämie zurückzuführen ist.

## 1.2 Gefäßstatus von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben trotz ständig verbesserter Nierenersatztherapieverfahren eine verminderte Überlebenschance gegenüber der Normalbevölkerung. Die jährliche Todesrate liegt bei fast 25%. Zurückzuführen ist diese vor allem auf die unzureichende Clearance von Retentionsparametern während der Nierenersatztherapie und die damit einhergehende urämiebedingte Malnutrition (Iseki et al., 1993; Kalantar-Zadeh et al., 2004a; Owen et al., 1993), chronische Anämie (Locatelli et al., 2004; Stenvinkel et al.; 2002) oder Eisenmangelzustände (Kalantar-Zadeh et al., 2004b), die Akkumulation von speziellen Urämietoxinen wie z.B. Plasma-Homocystein (Bachmann et al., 1995) oder asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (Mittermayer et al., 2005; Zoccali et al., 2001), entzündliche Gefäßveränderungen und Gefäßverkalkungen (Block et al., 1998; Goodman et al., 2000) oder Salz- und Wasserüberschuss. Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen gehäuft erhöhte Serumspiegel C-reaktiven Proteins (CRP) (Yeun et al., 2000) sowie reaktiver Sauerstoffradikale (ROS, reaktive Sauerstoffspezies) (Drai et al., 2001; Tepel et al., 2000) auf. Diese Zeichen der Mikroinflammation sowie des oxidativen Stresses gelten als Kofaktoren bei der Entstehung der Arteriosklerose (Himmelfarb et al., 2002). Weitere Ursachen der Arteriosklerose sind die traditionellen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, fortgeschrittenes Lebensalter oder Nikotinabusus, für die Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine überdurchschnittlich häufige Komorbidität neben ihrer prädisponierenden Nierenerkrankung aufweisen. Viele Anzeichen deuten darauf hin, dass die Entstehung der Arteriosklerose durch renale Dysfunktion besonders forciert wird (Amann et al., 2004; London et al., 2005). Arteriosklerose ist Hauptursache der koronaren Herzerkrankung. Nicht nur das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gesteigert (Ritz, 2003), sondern auch die Mortalität nach ischämisch kardialen Ereignissen ist erhöht und die Langzeitprognose nach stattgehabten Myokardinfarkten schlechter (Anavekar et al., 2004, Herzog et al., 1998).

Die erhöhte Todesrate von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz kann somit vor allem auf eine gesteigerte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zurückgeführt werden (Locatelli et al., 2000; London et al., 2005; Parfrey 2000; Sarnak et al., 2003; Saw et al., 2004).

Diese Daten implizieren die gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auf der Basis eines stark arteriosklerotisch veränderten Gefäßstatus. Die Manifestation der Arteriosklerose wird in zwei Stadien unterteilt, die frühen funktionellen und die späten strukturellen Veränderungen. Die strukturellen Veränderungen umfassen mikro- oder makroskopisch erkennbare Veränderungen von Intima und/oder Endothelzellschicht. Es handelt sich um Einlagerungen von Mukopolysacchariden, Lipoproteinen, Fibrinogen und Albumin, um Proliferation von Muskel- und Bindegewebszellen und gesteigerte Kollagen- und Elastinsynthese (Fibrose, Elastose). Es folgen Kalzifikationen, Ulzerationen und Nekrosen. In Folge dieser strukturellen Veränderungen der Gefäße kommt es zur Gefäßverhärtung mit Elastizitätsverlust und mangelnder Gefäßcompliance. Die Pulsdruckamplitude (pulse pressure) steigt an, d.h. die Differenz von systolischem und diastolischem Blutdruck nimmt zu (Marchais et al., 1993). Diesbezüglich konnten Klassen et al. (2002) zeigen, dass der erhöhte Pulsdruck einen eigenständigen Risikofaktor für die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz darstellt. Das terminale pathomorphologische und klinische Korrelat der Arteriosklerose stellt die Gefäßlumeneinengung bis zur vollständigen Gefäßstenose mit absoluter Ischämie des nachgeschalteten Versorgungsgebietes dar. Diese strukturellen Gefäßveränderungen kennzeichnen das irreversible Stadium der Arteriosklerose.

Die frühfunktionelle Störung der Endothelzellschicht im Rahmen der Arteriosklerose wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet (Kelm et al., 1999). Die Endothelzellen sind strukturell noch intakt. Bei rechtzeitigem Ausschalten der Noxen in diesem frühen Stadium können die arteriosklerotischen Veränderungen vollständig reversibel sein. Eine frühzeitige Erkennung ist für das rechtzeitige therapeutische Eingreifen essentiell (Bonetti et al., 2003).

Der Begriff endotheliale Dysfunktion fasst eine Vielzahl von Störungen zusammen, die das Endothel betreffen. Das Endothel ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von wesentlicher Bedeutung. Es moduliert den aktuellen, bedarfsgerechten Gefäßtonus

und somit die Hämodynamik, die antithrombotische und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, die Architektur der Gefäßwand sowie deren Permeabilität (Kelm et al., 1999).

Auf molekularer Ebene handelt es sich bei der endothelialen Dysfunktion vor allem um Störungen des endothelialen L-Arginin-NO-Stoffwechsels (Kelm et al., 1999). Das vasoaktive Stickstoffmonoxid (NO; identisch mit Endothelium derived relaxing factor, EDRF) ist als Signalstoff bei der Vermittlung der wichtigsten Endothelfunktionen ausschlaggebend. Ein NO-Mangel führt zu einem Ungleichgewicht zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren, zwischen koagulierenden und antikoagulierenden Mediatoren sowie wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen (Rubanyi, 1993).

Das rechtzeitige Erkennen der endothelialen Dysfunktion ist essentiell für ein erfolgreiches therapeutisches Eingreifen zur Vermeidung der Manifestation des irreversiblen Stadiums der Arteriosklerose (Bonetti et al., 2003; Nakanishi et al., 2002). Als nicht-invasive Methode zur Überprüfung der Endothelfunktion steht die Erzeugung endothelialer Vasodilatation zur Verfügung. Unter endothelialer (endothelabhängiger) Vasodilatation versteht man die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur aufgrund endogener, aus dem Endothel freigesetzter, vasoaktiver Substanzen (vor allem NO). Hormone, Neurotransmitter, PDGF, ischämische Metabolite oder Scherstress können eine endotheliale Vasodilatation provozieren. Die verbreitetste nicht-invasive Methode, endotheliale Vasodilatation hervorzurufen, ist der Test der reaktiven Hyperämie, der erstmals mit dieser Intention von Celermajer et al. (1992) angewandt wurde. Durch temporäre Unterbindung des Blutflusses entsteht Ischämie-induzierte reaktive Hyperämie und ein daraus resultierender Anstieg des Scherstresses in den folgenden Gefäßabschnitten. Scherstress ist die Folge einer Veränderung des Reibungswiderstandes am Gefäßendothel, das als Mechanorezeptor fungiert, und führt zu endothelialer, flussabhängiger Vasodilatation (Scherkraft-vermittelte Vasodilatation, flussabhängige Vasodilatation) (Moens et al., 2005). Für diese flussabhängige Vasodilatation ist endotheliales NO neben anderen Vasodilatoren wie Prostaglandin I<sub>2</sub>, Endothelium-derived hyperpolizing Faktor, Endothelin oder Acetylcholin der wichtigste Mediator (Joannides et al., 1995, Pyke et al., 2005). Weitere Faktoren wie die Freisetzung ischämischer Metabolite Kalium, Adenosin oder ATP, die Ischämie-bedingte Änderung des pH-Wertes sowie der Verlust des Muskeltonus distal der Stauung spielen ebenfalls eine Rolle bei der reaktiven Hyperämie-bedingten

flussabhängigen Vasodilatation (Doshi et al., 2001). Das heißt, genau genommen repräsentiert die Vasodilatation nach reaktiver Hyperämie nicht ausschließlich die NO-Bioverfügbarkeit im Endothel, hat sich aber aufgrund der Einfachheit der Durchführung als Test der endothelialen Vasodilatation etabliert. Die Scherkräfte bewirken am Endothel eine vermehrte Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin (Corretti et al., 2002; Govers et al., 2001). Vasoaktives NO diffundiert in die benachbarte glatte Gefäßmuskelzelle und bindet an die zytoplasmatische Guanylatcyclase, wodurch die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) induziert wird. Der cGMP-Spiegel steigt an. Das Zielprotein der cGMP-vermittelten Vasorelaxation ist die cGMP-Kinase (Koeppen et al., 2004), die sich in besonders hoher Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen, in Thrombozyten und dem Kleinhirn befindet. Durch Phosphorylierung stimuliert die cGMP-Kinase einerseits Kaliumkanäle in der Plasmamembran, wodurch es zum Kaliumionenausstrom und zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen und somit zum Verschluss spannungsabhängiger Calciumkanäle kommt. Der Calciumioneneinstrom über die Plasmamembran reißt ab und die zytosolische Calciumionenkonzentration fällt ab (Archer et al., 1994; Sausbier et al., 2000). Andererseits führt die Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors am sarkoplasmatischen Retikulum zu einem verminderten Calciumionenausstrom aus den intrazellulären Speichern (Schlossmann et al., 2000) und zu einer erhöhten Affinität von Calciumionen gegenüber der SERCA, die zu einer verstärkten Aufnahme von zytosolischen Calciumionen in die intrazellulären Speicher führt, wodurch weiterhin die zytosolische Calciumionenkonzentration vermindert wird. Der Calcium-abhängige Kontraktionsmechanismus der glatten Gefäßmuskulatur wird so unterbunden. Es kommt zur Vasodilatation (Jaggar et al., 2000).

Vasodilatation ist durch Zunahme der Gefäßcompliance gekennzeichnet und somit durch einfache, nicht-invasive und reproduzierbare digitale Pulswellenanalyse darstellbar (Millasseau et al., 2000; Takazawa et al., 1998).

### 1.3 Funktion des Calciums in der Zelle

Calcium ist als universeller, intrazellulärer Botenstoff an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Als Zellaktivierung bezeichnet man die Stimulation einer Zelle zur Ausübung ihrer spezifischen Funktion, z.B. Kontraktion oder Relaxation, Biosynthese und

Sekretion, transzellulärer Ionentransport, Bereitstellung von Glukose oder Photorezeption. Bei diesen Prozessen wie auch beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung, Organisation des Zytoskelettes, Apoptose und Nekrose sowie der Genexpression besitzt Calcium eine wichtige Signalfunktion, da es Informationen auf Rezeptormoleküle innerhalb der Zelle überträgt (Second Messenger) (Parekh, 2005).

Calciumionen finden sich in erregbaren wie auch in nicht-erregbaren Körperzellen einerseits als freie zytosolische Calciumionen (100nmol/l), andererseits eingelagert in den intrazellulären Calciumspeichern (endoplasmatisches Retikulum oder seine Muskelzellvariante, das sarkoendoplasmatische Retikulum) (> 1mmol/l). Die zytosolische Calciumionenkonzentration ist etwa 10.000fach niedriger als die Calciumionenkonzentration im Extrazellularraum (Vennekens et al., 2002). Calciumionen entfalten ihre vielfältigen Funktionen nach Bindung an Calcium-bindende Proteine. In der Muskelzelle steht dafür vor allem Troponin zur Verfügung, wohingegen in Nicht-Muskelzellen Calciumionen vor allem an Calmodulin binden. Diese erfahren durch die Calciumbindung eine Konformationsänderung und interagieren dann mit den Zielproteinen, Enzymen oder Ionenkanälen, die daraufhin ihre biologische Aktivität ändern (Clapham, 1995).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Plasmamembran (PMCA), das  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Antiportsystem sowie die sarkoendoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase (SERCA) sind für die Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration verantwortlich. Sie gewährleisten die Beibehaltung der physiologischen intrazellulären Calciumionenkonzentrationen im Ruhezustand.

Bei Zellaktivierung bedarf es einer schnellen Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Um diesen Konzentrationsanstieg zu erzielen, werden folgende Mechanismen unterschieden (Clapham et al., 2003; Putney et al., 1999):

- 1) Ein erster, kurzfristiger Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums (transient peak) ist auf die Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher zurückzuführen:  
Dieser Mechanismus geht von einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder der Rezeptortyrosinkinasen aus. PLC spaltet Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-

Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> induziert die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern über den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor an der Membran des sarkoendoplasmatischen Retikulums (Bandyopadhyay et al., 2005; Clapham, 1995; Harteneck et al., 2000; Putney et al., 1993). Die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den Speichern ist im Allgemeinen transient und nach einigen Sekunden vollständig deaktiviert.

- 2) Ein zweiter, langfristiger Konzentrationsanstieg des intrazellulären Calciums (sustained peak) ist auf einen Calciumioneneinstrom über die Plasmamembran zurückzuführen:

Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom entlang seines Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma kann durch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Felix, 2005) und durch spannungsunabhängige Kationenkanäle erfolgen. Zu den spannungsunabhängigen Kationenkanälen gehören ligandengesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (LGCCs, ligand-gated Ca<sup>2+</sup> channels), Second Messenger-gesteuerte (SMOCs, second messenger-operated channels) und Speicher-vermittelte (SOCs, store-operated channels) Ionenkanäle (Parekh et al., 2005; Putney, 1997). Es wird angenommen, dass diese zweite Phase dem Auffüllen der in der ersten Phase entleerten intrazellulären Calciumspeicher sowie der Verlängerung des Agonisteneffektes dient (Harteneck et al., 2000).

Ein Abfall der intrazellulären Calciumionenkonzentration zur Rückkehr der Zelle in den Ausgangszustand kann auf folgende Mechanismen zurückgeführt werden (Clapham, 1995):

- 1) SERCAs (sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase) pumpen Calcium zurück in die Speicher
- 2) PMCAs (Plasmamembran Calcium-ATPase) pumpen zytosolisches Calcium zurück in den Extrazellularraum
- 3) Mitochondrien nehmen Calcium über Calcium-Kanäle auf
- 4) Bindung von Calcium an Metabolite und Proteine

Für die folgende Arbeit ist die Auswirkung der Calciumionen auf die myogene Reaktion des Gefäßsystems von besonderer Bedeutung. Im Folgenden sollen die Funktionen von

Calcium in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen im Speziellen erläutert werden. Im Endothel bindet Calcium an das Calcium-bindende Protein Calmodulin und aktiviert derart die endotheliale NO-Synthetase (Govers et al., 2001). Diese ist für die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung von L-Citrullin verantwortlich. NO ist ein hochdiffusibles Gas mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Es diffundiert in die benachbarten glatten Gefäßmuskelzellen, wo es an die zytoplasmatische Guanylatcyclase bindet. Der cGMP-Spiegel steigt an. Zielprotein von cGMP ist die cGMP-Kinase, die über Phosphorylierung den transplasmamembranären Calciumioneneinstrom sowie die Freisetzung von Calciumionen aus den intrazellulären Calciumspeichern in glatten Gefäßmuskelzellen verhindert und so zur Vasorelaxation beiträgt (Koeppen et al., 2004). Ein Anstieg der Calciumionenkonzentration im Myoplasma glatter Gefäßmuskelzellen führt über  $Ca^{2+}$ -abhängige Phosphorylierung zur Aktivierung der leichten Kette des Myosins, woraus die Myosin-Aktin-Interaktion resultiert, die zur Verkürzung der Muskelfasern und so zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle beiträgt.

Unter gegebenen Umständen wirkt also die Calcium-abhängige Bildung von NO in der Endothelzelle dem ebenfalls Calcium-abhängigen Kontraktionsmechanismus in der glatten Gefäßmuskelzelle entgegen. Bei gestörter Endothelfunktion wie z.B. im Rahmen arteriosklerotischer Gefäßveränderungen und endothelialer Dysfunktion ist dieser gegenseitige Mechanismus gestört, was zu einem Übergewicht der kontrahierenden Komponente von Calcium führt. Es entsteht ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität.

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

Die folgende Betrachtung der *transient receptor potential*-Proteine soll einen kurzen Ein- und Überblick hinsichtlich der komplizierten Thematik geben. Die diesbezügliche momentane Datenlage ist sehr umfangreich und bisher noch außerordentlich widersprüchlich.

Die *transient receptor potential*-Kanäle stellen eine große Gruppe der verschiedenen Ionenkanäle dar, die für den Austausch geladener Ionen über die impermeable Plasmamembran aller Körperzellen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus verantwortlich sind. Obwohl es sich bei den TRP-Kanälen um Kationenkanäle mit hoher

Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit handelt, variieren sie stark in ihrer Ionenselektivität und Art der Aktivierung (Montell et al., 2002). Sie werden sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert (Clapham et al., 2001).

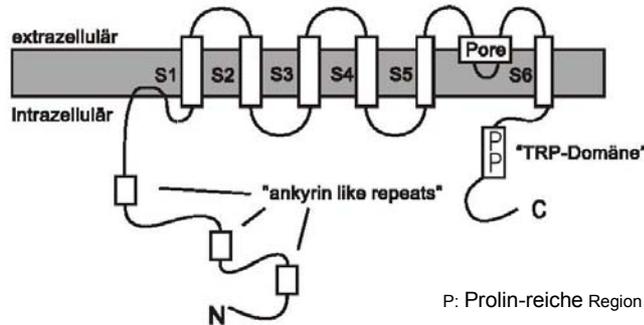
Beim Menschen spielen TRP-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Sinnesreizen (Geschmack, Temperatur, Schmerz, Pheromonen), bei der Vasorelaxation, bei den Vorgängen von Nekrose und Apoptose, pH- und Osmoregulation, in Verbindung mit oxidativem Stress und der Fertilität. Defekte in den TRP-Proteinen können zu einem gestörten Wachstumsreiz mit folgender Tumorentstehung führen oder an der Ausbildung der Polycystischen Nierenerkrankung oder Mukopolipidosen beteiligt sein. TRP-Kanäle spielen auch eine wichtige Rolle in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen, in denen sie für den Calciumioneneinstrom mitverantwortlich sind und somit eine besondere Bedeutung für die Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks einnehmen (Clapham et al., 2001; Minke et al., 2002; Montell et al., 2002).

Der erste TRP-Kanal wurde 1969 im Zusammenhang mit der visuellen Wahrnehmung, eines PLC-abhängigen Vorganges, bei *Drosophila melanogaster* beschrieben (Hotta et al., 1969) und 1989 molekularbiologisch identifiziert (Montell et al., 1989). Die Bezeichnung *transient receptor potential* erhielt die Proteingruppe von einer Mutation des *trp*-Gens im Signaltransduktionskomplex von Photorezeptoren der *Drosophila melanogaster*, die zu einer nur transienten Rezeptorpotentialantwort auf einen kontinuierlichen Lichtreiz führte. Diese Mutanten mit nicht-funktionellen TRP-Kanälen zeigen einen defekten Licht-induzierten Calciumioneneinstrom und sind infolgedessen blind (Minke et al., 2002; Montell et al., 2002).

Nach heutigem Wissensstand gibt es sechs Untergruppen der TRP-Kanäle:

TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPN. Alle diese TRP-Kanäle verfügen über sechs Transmembrandomänen. Zwischen dem fünften und sechsten Segment befindet sich eine hydrophobe Schleife, die den Kanal mit Selektivitätsfilter bildet. C- und N-terminales Ende liegen intrazellulär. Je nach TRP-Subgruppe weist das N-terminale Ende eine verschiedene Anzahl von Ankyrin-Sequenzen auf, wohingegen das C-terminale Ende über unterschiedlich Prolin-reiche Regionen verfügt (**Abbildung 1**). Die Peptidlänge der Proteine variiert von 500 Aminosäuren bei Mitgliedern der TRPC-

Familie bis zu 2000 Aminosäuren bei Mitgliedern der TRPM-Familie (Clapham, 2003; Minke et al., 2002; Montell, 2001).



**Abbildung. 1:** Molekulare Struktur von TRP-Kanälen. TRP-Kanäle haben 6 Transmembrandomänen. Zwischen dem 5. und 6. Segment ist eine hydrophobe Schleife, die den Kanal bildet. C- und N-terminales Ende liegen intrazellulär (Zitt et al., 2002).

Die Entdeckung der TRP-Familie als Ionenkanalproteine führte zu einem erweiterten molekularen Verständnis der Calcium-regulierten Signalübertragungsmechanismen. Folgende funktionelle Eigenschaften der TRP-Proteine tragen dazu bei (Clapham, 2003): TRP-Kanäle sind nicht nur permeabel für monovalente, sondern auch für divalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen (Dietrich et al., 2005). Sie sind wenig selektiv für Calciumionen gegenüber Natriumionen mit  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \leq 10$ . Ausnahmen bilden TRPM4 und TRPM5, die ausschließlich selektiv für monovalente Kationen sind sowie TRPV5 und TRPV6, die nur für  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \geq 100$  durchlässig sind. Sie zeigen im Gegensatz zu spannungsabhängigen (voltage-gated) Calcium- oder Natriumkanälen keine Spannungsabhängigkeit, sondern depolarisieren die Zellen nach dem Öffnen vom jeweiligen Ruhepotential (bei den meisten Säugetierzellen um  $-70$  mV) auf annähernd  $0$  mV. Durch diese Depolarisation erhöhen sie den einwärtsgerichteten Ionenstrom und führen so zum Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und/oder  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Der initiale Öffnungsmechanismus der TRP-Kanäle ist uneinheitlich. Es existieren zwei mögliche Mechanismen, der Speicher-unabhängige und der Speicher-gesteuerte Öffnungsmechanismus. Beide wurden teilweise für dasselbe TRP-Protein beschrieben (Harteneck et al., 2000). Im Folgenden sollen die

molekularen Mechanismen der Speicher-unabhängigen sowie der Speicher-gesteuerten Kanalöffnungsvorgänge gegenüber gestellt werden:

- 1) Der Speicher-unabhängige (store-independent) Öffnungsmechanismus:  
Bei diesem Modell erfolgt die Aktivierung oder Modulation der TRP-Kanäle unabhängig von der Leerung intrazellulärer Calciumspeicher G-Protein- oder Tyrosinkinase-vermittelt, was zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. PLC führt zur Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Beide dieser Second Messenger sind in der Lage, einerseits über Interaktion mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor, andererseits direkt Second-Messenger-vermittelt TRP-Kanäle zu öffnen. Der genaue Mechanismus ist unbekannt (Clapham et al., 2001; Minke et al., 2002; Hofmann et al., 1999; Montell, 2001).
  
- 2) Der Speicher-gesteuerte (store-operated) Öffnungsmechanismus:  
Bei diesem Modell kommt es zur Kanalaktivierung in Abhängigkeit vom Füllungszustand der intrazellulären Calciumspeicher (Birnbaumer et al., 1996; Putney, 1977; Putney et al., 1999).  
Folgende drei Theorien für den Mechanismus der Speicher-gesteuerten Kanalöffnung bestehen (Clapham, 2003; Putney et al., 1999, Zitt et al. 2002):
  1. In der einen Theorie wird davon ausgegangen, dass ein *Calcium Influx Faktor* (CIF) existiert, der bei Speicherentleerung freigesetzt wird, zur Plasmamembran diffundiert und dort die TRP-Kanäle aktiviert.
  2. Eine weitere Theorie beinhaltet das *Secretion-like coupling Model*, das besagt, dass ein TRP-Protein über einen IP<sub>3</sub>-Rezeptor an den Calciumspeicher gebunden ist, bei Bindung von IP<sub>3</sub> abgespalten wird, zur Plasmamembran diffundiert und dort als Kanal in diese eingebaut wird.
  3. Die dritte Theorie, das *conformation coupling model*, besagt, dass Calciumspeicher und TRP-Kanal über einen IP<sub>3</sub>-Rezeptor miteinander verbunden sind. Bindet IP<sub>3</sub> an den Rezeptor, wird Speichercalcium freigesetzt und der TRP-Kanal erfährt eine Konformationsänderung, die zur Kanalöffnung und so zum Einstrom der Ionen über die Plasmamembran führt.

Im Folgenden wird ein zusammenfassender Überblick über die charakteristischen Besonderheiten der Mitglieder der 6 TRP-Kanaluntergruppen gegeben.

Die menschliche TRP-Familie mit der größten Ähnlichkeit zu den Drosophila-TRPs ist die so genannte klassische *TRPC-Subfamilie* (Canonical). Die TRPC-Gruppe ist die am häufigsten und bisher besten untersuchte TRP-Subgruppe und Schwerpunkt dieser Arbeit. Man unterscheidet 4 Untergruppen anhand ihrer Sequenzhomologie und funktionellen Ähnlichkeiten: TRPC 1, TRPC 4,5, TRPC 3,6,7 und TRPC 2 (Clapham et al., 2001; Vennekens et al., 2002).

TRPC 1 ist das erste humane TRP-Protein, das identifiziert wurde und zeigt wie auch die folgenden TRP-Proteine ein ubiquitäres Vorkommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TRPC1 alleine keine messbaren Ionenströme auslöst sondern erst in Verbindung mit anderen TRPC-Proteinen.

TRPC 4, 5 beinhalten eine C-terminale Sequenz, die in anderen TRP-Molekülen nicht isoliert werden konnte und dafür spricht, dass diese Kanäle Teile noch wenig verstandener multimolekularer Signalkomplexe sind.

TRPC 3,6,7 zeigen eine besonders hohe Expression in glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen. Mit immunhistochemischen Verfahren sowie in situ-Hybridisation konnte die Expression von TRPC1 sowie 3, 4, 5 und 6 in Endothelzellen sowie in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, wohingegen TRPC7 sich nur in Endothelzellen zeigt (Yip et al., 2004). An Endothelzellen von TRPC6-Knock-out-Mäusen stellte sich die besondere Funktion dieses Proteins bezüglich der Regulation des Gefäßtonus dar. Bei ausgeschaltetem TRPC6-Protein zeigte sich eine Hoch-Regulation des TRPC3-Proteins. Damit einher ging ein Anstieg des basalen TRPC-abhängigen Kationeneinstromes, eine verstärkte Vasokonstriktion nach Agonistengabe sowie erhöhte Blutdruckwerte (Dietrich et al., 2005; Bergdahl et al., 2005). Diesbezüglich zeigten Liu et al. (2005) eine verstärkte Expression von TRPC3 in Monozyten hypertensiver Ratten.

TRPC2 ist das TRPC-Protein mit der geringsten Ähnlichkeit zu den anderen Mitgliedern dieser Proteingruppe. Es wurde als humanes Pseudogen eingeordnet (Vannier et al., 1999). In anderen, nicht-humanen Säugetierspezies wurde TRPC2 mit den Funktionen des Vomeronasalorganes und der Spermafunktion in Verbindung gebracht (Hofmann et al., 2000).

Die *TRPV-Untergruppe* (Vanillin) ähnelt dem Vanillin-Rezeptor und wird durch Liganden wie Capsaicin, das in Chili enthalten ist oder dem Cannabinoid-Rezeptorliganden Anandamid aktiviert. Weitere Aktivierungsmechanismen sind Temperaturerhöhung über einen Schwellwert von 42°C oder niedrige pH-Werte (Montell et al., 2002). Sie weist die stärkste Ähnlichkeit aller weiteren Untergruppen zu den TRPC-Proteinen auf (Minke et al., 2002).

Die *TRPM-Gruppe* (Melastatin) wurde initial durch ihre verminderte Expression in Zellen mit Melanommetastasen entdeckt. Sie stellt eine Kanalgruppe mit nur geringer Ähnlichkeit zu den klassischen TRPC-Kanälen dar. Interessant ist der TRPM2-Kanal, dessen Aktivität über oxidativen Stress reguliert wird. Hara et al. (2002) charakterisierten ihn als Redoxstatus-abhängigen Calcium-permeablen Kationenkanal. Er trägt die Bezeichnung eines *Chanzyme*, was seine Funktion als Ionenkanal mit 6-Transmembrandomänen sowie C- und N-terminalem Ende und der am C-terminalen Ende assoziierten Hydrolaseaktivität hervorhebt (Perraud et al., 2001). Die zu erwähnende Besonderheit des TRPM8-Kanals ist sein Aktivierungsreiz durch Temperaturen unter 25° C und Substanzen wie Menthol oder Icilin (Peier et al., 2002). Er zeigt eine verstärkte Expression im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorformen wie Prostata-, Brust- oder Darmkrebs (Vennekens et al., 2002).

Zwei weitere Untergruppen mit nur wenigen Gemeinsamkeiten mit den TRP-Kanälen der *Drosophila melanogaster* und den klassischen humanen TRPC-Kanälen sind TRPP und TRPML. Die Proteine der polyzystischen Nierenerkrankung PKD2, PKD2L1 und PKD2L2 sind Calcium-permeable Kanäle aus der *TRPP-Familie* und werden als TRPP2, TRPP3 und TRPP5 bezeichnet (Montell, 2001). Die *TRPML-Gruppe* (Mukolipin) ist beschränkt auf intrazelluläre Vesikel. Mutationen in TRPML1 sind mit dem Krankheitsbild der Mukolipidose Typ IV, einer autosomal-rezessiv vererbten neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankung, assoziiert (Qian et al., 2005).

Die sechste Gruppe der TRP-Kanäle ist die *TRPN-Gruppe*, die bisher nur als Proteine von Fliegen und Würmern identifiziert werden konnte (Montell et al., 2002).

Die Existenz von TRP-Proteinen, ihre molekularen Eigenschaften und Funktion als Ionenkanal hat sich etabliert. Ihr Aktivierungsmechanismus auf molekularer Ebene und

ihr detailliertes Aufgabenfeld, besonders der Zusammenhang ihrer Calciumpermeabilität und der Regulation und Beeinflussung des Gefäßstatus, sind dagegen noch wenig verstanden.

### 1.5 Wirkung von Acetylcystein

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben und durch Studien belegt, weisen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffradikale und oxidativer Metabolite auf (Drai et al., 2001; Tepel et al., 2000), die als Risikofaktoren bezüglich kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität gelten (Becker et al., 1997). Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) sind wie oxidative Metabolite Nebenprodukte physiologischer Stoffwechselforgänge. Sie können in jedem Zelltyp vorliegen, z.B. in Monozyten, Endothelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen. In geringer Konzentration wirken sie als physiologische Mediatoren, wohingegen sie sich in höheren Konzentrationen zellschädigend auswirken und funktionelle Störungen hervorrufen (Irani, 2000). Oxidative Nebenprodukte können für arteriosklerotische Veränderungen (Ivanovski et al., 2005) sowie die Entstehung von Diabetes mellitus (Wolff, 1993), arteriellem Hypertonus (Swei et al., 1997) oder inflammatorischen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. Die Erhöhung des Blutdruckes durch oxidative Nebenprodukte kann durch folgende Mechanismen erklärt werden: Reaktive Sauerstoffradikale inaktivieren NO und vermindern dessen Bioverfügbarkeit in glatten Gefäßmuskelzellen, was zur Erhöhung des systemischen Widerstandes führt (Rubanyi et al., 1986); durch Oxidation der Arachidonsäure in der Zellmembran entstehen vasokonstringierende Metabolite, die zur Erhöhung des systemischen Widerstandes führen (Takahashi et al., 1992); nicht zuletzt weisen reaktive Sauerstoffradikale auch direkte vasokonstringierende Eigenschaften auf (Lin et al., 1991). Neben der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativer Metabolite spielt auch die Verminderung antioxidativ wirksamer Enzymkomplexe wie Superoxiddismutase, Gluthationperoxidase und Katalase eine Rolle bei der Entstehung oxidativen Stresses bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Durak et al., 1994). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich eine antioxidative Therapie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz günstig auf die Verminderung des kardiovaskulären Risikos auswirkt (Gordon et al., 2004). Sowohl für die Gabe des antioxidativ wirksamen Vitamin E (Boaz et al., 2000) als auch für die antioxidative

Therapie mit Acetylcystein (Tepel et al., 2003) konnte ein vermindertes Auftreten kardiovaskulärer Ereignissen bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz nachgewiesen werden.

Acetylcystein ist ein synthetisiertes Derivat einer Aminosäure, dem L-Cystein. Die chemische Bezeichnung lautet N-acetyl-L-cystein (NAC). Es ist ein weißes kristallines Pulver mit säuerlichem Geruch, das sich leicht in Wasser und Alkohol löst.

Acetylcystein wirkt durch Reduktion freier Sauerstoffradikale (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ) und Bindung chemischer Radikale an seine freie SH-Gruppe direkt antioxidativ. Die SH-Gruppen von Acetylcystein können freie SH-Gruppen von Proteinen und Enzymen binden und so deren Zerstörung durch Peroxide und freie Radikale entgegenwirken (Sochman et al., 1990). Die daraus resultierende Membranstabilisierung verhindert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus der Zelle und erklärt unter anderem den entzündungshemmenden Effekt von Acetylcystein im Rahmen der antioxidativen Wirkeigenschaft (Allegra et al., 1991).

Die indirekte antioxidative Wirkung von Acetylcystein beruht auf dessen Effekt, als SH-Gruppen-Donator zur Auffüllung erschöpfter Glutathionreserven zu fungieren. Glutathion ist eines der wichtigsten nukleophilen und antioxidativen Wirksysteme des Organismus und ist deshalb für den Schutz desselben von großer Bedeutung. Glutathion kann unter anderem die bei bestimmten Vergiftungen (z.B. Paracetamolintoxikation) entstehenden toxischen, reaktiven, elektrophilen Metabolite durch Bildung inerter Komplexen inaktivieren.

Die antioxidative Wirkung von Acetylcystein beruht folglich auf der direkten und indirekten Inaktivierung elektrophiler und oxidierender Verbindungen. Elektrophile Verbindungen werden durch Konjugation inaktiviert, oxidative Verbindungen durch Reduktion neutralisiert (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendiums der Schweiz®).

Seine mukolytische Eigenschaft entfaltet Acetylcystein durch reduktive Spaltung von Disulfidbrücken in Mukoproteinen durch seine freie SH-Gruppe (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendiums der Schweiz®). Durch die Spaltung der Disulfidbrücken in Glykoproteinen werden diese depolymerisiert und die Viskosität des Sputums wird herabgesetzt. Kleinere Moleküle sind weniger viskös und können nicht mehr gut an

entzündetem Gewebe binden. Acetylcystein findet weit verbreitet Anwendung als oraler Schleimlöser.

Eine weitere Eigenschaft von Acetylcystein ist sein vasodilatierender Effekt, der unter anderem darauf beruht, dass Acetylcystein in den Endothelzellen zu S-Nitrosocystein metabolisiert wird, das ein Vorläufer von NO ist (Scharfstein et al., 1994).

Ullian et al. (2005) konnten eine weitere Erklärung für den vasodilatierenden Effekt von Acetylcystein aufweisen. Der antioxidative Effekt von Acetylcystein vermindert die Stimulation des AT-1-Rezeptors, wodurch dem vasokonstringierenden und zellproliferativen Angiotensin II-Effekt entgegen gewirkt wird. Acetylcystein fängt einerseits die freien Sauerstoffradikale, die das Angiotensinsystem stimulieren und andererseits verhindert es direkt durch Interaktion mit dem AT-1-Rezeptor und Reduktion von dessen zwei Disulfidbindungen zwischen C18-C274 und C101-180 die Bindung von Angiotensin II an diesem AT-1-Rezeptor.

Neben der intravenösen Intervention mit physiologischer Kochsalzlösung zur Vermeidung der Kontrastmittel-induzierten Nephropathie bei Patienten mit bereits eingeschränkter Nierenfunktion hat sich ebenfalls die intravenöse Anwendung von Acetylcystein bewährt. Als ein möglicher Mechanismus dafür wird die Reduktion des intrazellulären oxidativen Stresses durch Acetylcystein diskutiert (Drager et al., 2004; Tepel et al., 2002).

Neben der Verwendung von Acetylcystein zur Vermeidung der Kontrastmittel-induzierten Nephropathie bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion konnte für dieses Patientenkollektiv auch ein Nutzen von Acetylcystein bezüglich der Verminderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität nachgewiesen werden (Ivanovski et al., 2005; Tepel et al., 2003). Der genaue Mechanismus ist nicht aufgeklärt. Ein Ansatz ist die Interferenz von oxidativem Stress durch Acetylcystein (Drager et al., 2004; Ivansovski et al., 2005). Ein weiterer Ansatz ist die Verminderung von Plasma-Homocystein. Homocystein ist als ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bekannt (Moustapha et al., 1998; Wald et al., 1998). In verschiedenen Studien konnte eine signifikante Reduktion der Plasma-Homocysteinkonzentration durch Acetylcysteinmedikation gezeigt werden (Scholze et al., 2004).

Neben der Reduktion der Plasma-Homocysteinkonzentration und der Bildung von NO-Vorstufen zur Verbesserung des Gefäßstatus bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz durch Acetylcystein ist auch eine Beeinflussung der intrazellulären Calciumionenkonzentration denkbar. Hierbei könnte eine Interaktion von Acetylcystein mit TRP-Kanälen eine Rolle bei der Verminderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität spielen.

## 1.6 Fragestellung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität auf, was mit gestörter Endothelfunktion einhergeht. Das rechtzeitige Erkennen dieser endothelialen Dysfunktion und deren adäquate Therapie sind von großer Wichtigkeit. Ein nicht-invasives Verfahren zur Beurteilung reflektiver Eigenschaften des Gefäßsystems während der Hämodialyse sowie zur Überprüfung der Endothelfunktion soll gefunden werden. In der folgenden Arbeit wird dazu nicht-invasive digitale Photoplethysmographie zur kontinuierlichen, Untersucher-unabhängigen, automatischen Aufzeichnung der digitalen Pulskurve verwendet. Aus den photoplethysmographisch erhobenen Daten wird der Reflective Index als ein Maß für den Gefäßtonus bzw. der reflektiven Eigenschaften des Gefäßsystems definiert. Darüber hinaus wird das Verfahren der digitalen Photoplethysmographie bezüglich seiner Validität und Reliabilität analysiert.

Mit Hilfe der digitalen Photoplethysmographie wird der Einfluss von intravenös verabreichtem, antioxidativem Acetylcystein während einer vierstündigen Hämodialyse auf das Gefäßsystem von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz überprüft. Des Weiteren wird klinisch die Verbesserung der endothelialen Funktion unter Acetylcysteinmedikation beobachtet. Um den direkten Einfluss von Acetylcystein auf Zellebene nachzuweisen, werden die intrazelluläre Calciumhomöostase am Beispiel isolierter Monozyten mittels Fluoreszenzspektrophotometrie sowie die membranäre Expression von TRPC-Proteinen mittels in-cell Western Assay untersucht. Im Speziellen soll gezeigt werden, dass Acetylcystein über Interaktion mit TRPC-Kanälen die intrazelluläre Calciumhomöostase beeinflusst und derart seinen positiven und protektiven Effekt auf das Gefäßsystem von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz entfalten kann.

Folgende Fragen ergeben sich im Einzelnen:

1. Eignet sich das Verfahren der Pulswellenanalyse mittels digitaler Photoplethysmographie zur nicht-invasiven Darstellung reflektiver Eigenschaften des Gefäßsystems bei gesunden Probanden wie auch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz während der Hämodialyse?
2. Eignet sich das Verfahren der Pulswellenanalyse mittels digitaler Photoplethysmographie zur nicht-invasiven Bestimmung der Endothelfunktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz?
3. Verändern sich die digital photoplethysmographisch ermittelten Gefäßeigenschaften von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz durch Intervention mit antioxidativ wirksamen Acetylcystein während der Hämodialyse im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, Plazebo-kontrollierten Studie?
4. Stellt sich mittels in-vitro Fluoreszenzspektrophotometrie eine Veränderung der intrazellulären Calciumhomöostase während der Hämodialysetherapie in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein dar?
5. Stellt sich mittels in-cell Western Assay eine Veränderung der Expression membranärer TRPC-Kanäle während der Hämodialysetherapie in Abwesenheit und Anwesenheit von Acetylcystein dar?