

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Medizinischen Klinik IV Endokrinologie und Nephrologie

Direktor: Professor Dr. Walter Zidek

**Expression und Funktion von Transient Receptor Potential Kanälen TRPC3
und TRPC5 bei primärer Hypertonie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

Doctor rerum medicarum

der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Daoyan Liu

aus Chongqing (China)

Gutachter: Prof. Dr. M. Tepel

Gutachter: Prof. Dr. M. Schaefer

Gutachter: Prof. Dr. F. Hoffmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 15.12.2006

Abstract

Canonical Transient Receptor Potential (TRPC) Kanäle sind nicht-selektive Kationen-Kanäle und in viele Signaltransduktionsprozesse eingeschaltet. Die Bedeutung von TRPC Kanälen bei der essentiellen Hypertonie ist bislang noch nicht untersucht worden.

TRPC-Kanäle wurden bei 51 Patienten mit essentieller Hypertonie und 51 altersgleichen normotensiven Kontrollpersonen untersucht. Die Expression von TRPC-Kanälen wurde mit Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), mit Immunoblotting und mit quantitativem in-cell Western Assay bestimmt. Gen-silencing erfolgte mit spezifischer small-interfering RNA (siRNA). Der Calcium- und der Gadolinium-Einstrom in Monozyten wurden mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie bestimmt.

In humanen Monozyten wurden die Transkripte für TRPC3 und TRPC5 mittels RT-PCR nachgewiesen. TRPC3- und TRPC5-Kanal-Proteine wurden in Monozyten mittels Immunoblots nachgewiesen. Es zeigte sich eine gesteigerte Expression von TRPC3 und TRPC5 bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen (normalisierte TRPC3 Expression: $3,21 \pm 0,59$ versus $1,36 \pm 0,07$ jeweils $n = 20$; $p < 0,01$; normalisierte TRPC5 Expression: $2,10 \pm 0,28$ versus $1,40 \pm 0,52$; jeweils $n = 12$; $p < 0,05$). Bei Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie ergab sich ein signifikant gesteigerter Kationen-Einstrom im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen (Gadolinium/Calcium-Einstrom, $125 \pm 14\%$ versus $80 \pm 7\%$; jeweils $n = 51$; $p < 0,01$). Nach dem Einsatz von small interfering RNA gegen TRPC5 kam es zu einer signifikanten Verminderung der TRPC5-Kanal-Expression und zur Verminderung des Calcium- und des Gadolinium-Einstroms. Weiterhin zeigte sich auch eine gesteigerte Expression von TRPC3 sowie ein gesteigerter Calcium-Einstrom in Monozyten von spontanhypertensiven Ratten im Vergleich mit normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten.

Diese Ergebnisse weisen auf eine wesentliche Bedeutung von TRPC-Kanälen in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie hin.

Abstract

Canonical transient receptor potential (TRPC) channels are nonselective cation channels which are involved in cellular signal transduction. The role of TRPC channels has not yet been investigated in the pathogenesis of essential hypertension.

We studied TRPC channels in 51 patients with essential hypertension and 51 age-matched and sex-matched normotensive control subjects. The expression of TRPC was measured using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), immunoblotting, and quantitative in-cell western assay. Gene silencing by small interfering RNA for specific TRPC knockdown was also performed. The influx of calcium and gadolinium into monocytes was determined using the fluorescent dye technique.

TRPC3 and TRPC5 mRNA was detected in human monocytes using RT-PCR. The expression of TRPC3- and TRPC5-channel protein in human monocytes was confirmed using immunoblotting. We observed a significant increase of TRPC3 and TRPC5 protein expression in essential hypertensive patients compared with normotensive control subjects (normalized TRPC3 expression, 3.21 ± 0.59 versus 1.36 ± 0.07 ; each $n = 20$; $p < 0.01$; normalized TRPC5 expression, 2.10 ± 0.28 versus 1.40 ± 0.52 ; each $n = 12$; $p < 0.05$). We observed an increased gadolinium/calcium-influx ratio in essential hypertensive patients compared with normotensive control subjects (gadolinium/calcium influx ratio, $125 \pm 14\%$ versus $80 \pm 7\%$; each $n = 51$; $p < 0.01$). Knockdown of TRPC5 using small interfering RNA reduced channel expression and caused a significant attenuation of calcium and gadolinium influx. The calcium-influx was significantly increased in monocytes from spontaneously hypertensive rats compared to normotensive Wistar-Kyoto-rats. This study points to an important role of TRPC channels in essential hypertension.

Einleitung

Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration sind beteiligt an der Signaltransduktion, Kontraktion, Sekretion und vielen anderen lebenswichtigen Regulationsvorgängen. Eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ist ein Signaltransduktionsweg, der von einer Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren oder Mediatoren genutzt wird. Damit die verschiedenen Prozesse adequat ablaufen können, muss die intrazelluläre Calcium-Konzentration sehr eng eingeregelt werden. Eine Reihe von Systemen mit unterschiedlichen Transportproteinen und Rezeptoren regeln die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration kann durch die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern oder durch transplasmamembranösen Calcium-Einstrom bewirkt werden. Der transplasmamembranöse Calcium-Einstrom erfolgt unter anderem über unterschiedliche Calcium-Kanäle (Berridge et al., 2000; Halling et al., 2005; Hofmann et al., 2000; Montell et al., 2002; Ramsey et al., 2006; Wamhoff et al., 2006). Zu den nicht-selektiven Kationen-Kanälen, über die es zu einem Calcium-Einstrom kommt, gehören die Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle (Clapham et al., 2003; Montell, 2005; Owsianik et al., 2006). Aufgrund ihres molekularen Aufbaus und ihrer Funktionen werden unter anderem Canonical (TRPC), Vanilloid (TRPV) und Melastatin (TRPM) TRP-Kanäle unterschieden. Diese TRP-Kanäle stellen eine Familie von Kanälen dar, die 6 transmembranäre Domänen und eine Porenbildung zwischen der fünften und sechsten Domäne aufweisen. TRP-Kanäle wurden in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, sowohl in erregbaren Zellen (excitable cells) als auch in nicht-erregbaren Zellen (nonexcitable cells). TRP-Kanäle wurden im Zentralnervensystem, in Herz, Lunge, Endothel, glatten Muskelzellen und auch in peripheren Blutzellen nachgewiesen (Albert & Large, 2003; Freichel et al., 2001; Gamberucci et al., 2002; Groschner et al., 1998; Riccio et al., 2002; Vazquez et al., 2004).

Grundsätzlich können TRP-Kanäle über verschiedene Mechanismen aktiviert werden, und zwar nach Rezeptor-Aktivierung oder durch Liganden-Aktivierung. Die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt zur Aktivierung der Phospholipase C mit Bildung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat und Diacylglycerol. Endogene Substanzen, wie beispielsweise Diacylglycerol, Eicosanoide, Anandamide, Adenosindiphospho-Ribose, und auch exogene organische Moleküle, wie beispielsweise Capsaicin, können TRP-Kanäle aktivieren. Viele Befunde in der Literatur zeigen, dass Diacylglycerol oder dessen membran-permeables Analogon 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol TRPC3 oder TRPC5-Kanäle aktivieren können (Hofmann et al., 1999; Kanaki et al., 2001; Lee et al., 2003; Okada et al., 1999; Schaefer et al., 2000). Weitere Befunde in der Literatur sprechen dafür, dass einzelne TRP-Kanal-Subtypen Speicher-aktivierte Calcium-Kanäle (store-operated channels, SOC) sind (Ambudkar et

al., 2006; Birnbaumer et al., 2000; Kiselyov et al., 1998; Liu et al., 2005; Vazquez et al., 2003). Speicher-aktivierte Calcium-Kanäle sind verantwortlich für den sogenannten kapazitiven Calcium-Einstrom. Der kapazitative Calcium-Einstrom sorgt für den lang-anhaltenen Calcium-Einstrom nach Entleerung der intrazellulären Speicher und ermöglicht damit deren Wiederauffüllung (Parekh & Putney, 2005; Putney & Ribeiro, 2000). Die Entleerung der intrazellulären Speicher wird experimentell typischerweise durch eine Hemmung der sarco-endoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA) durch Thapsigargin hervorgerufen (Neusser et al., 1999). TRPC3 und TRPC5 wurden als Speicher-aktivierte Calcium-Kanäle beschrieben (Groschner et al., 1998; He et al., 2005; Kiselyov et al., 1998; Liu et al., 2005; Trebak et al., 2002; Venkatachalam et al., 2003; Warnat et al., 1999; Wu et al., 2000; Xu et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Zagranichnaya et al., 2005).

TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationen-Kanäle. Sowohl ein Calcium- als auch ein Natrium-Einstrom durch TRP-Kanäle wurde für eine Reihe von verschiedenen Geweben beschrieben (Kunze et al., 1997; Lapointe et al., 2003). Zur Charakterisierung von TRP-Kanälen wurden auch Lanthanide, wie z.B. Gadolinium, häufig eingesetzt (Halaszovich et al., 2000). Jung et al. konnten kürzlich zeigen, dass TRP-abhängige Ionenströme durch Gadolinium Dosis-abhängig gesteigert werden können (Jung et al., 2003). Als typische Hemmstoffe der TRP-Kanäle werden 1-[β -[3-(4-Methoxyphenyl) propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazol (SKF-96365; Takenada et al., 2002; Thebault et al., 2003) oder auch 2-Aminoethoxydiphenyl-boran (2-APB; Dobrydneva et al., 2001; Ma et al., 2001; Prakriya et al., 2001) eingesetzt.

Es ist lange bekannt, dass Veränderungen der Calcium-Regulation bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie eine Rolle spielen. Beschrieben wurden Veränderungen der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration, der intrazellulären Calcium-Speicher, des Calcium-Natrium-Austauschers, der membranständigen Calcium-ATPase oder von Calcium-Kanälen (Blaustein et al., 1986; Resnick, 1992; Touyz & Schiffrin, 1997; Wilde et al., 1994; Zhu et al., 2005). Aufgrund ihrer Funktionen sind TRP-Kanäle mögliche Kandidaten, um diese Veränderungen der Calcium-Regulation bei der arteriellen Hypertonie zu erklären, Weitergehende Untersuchungen stehen dazu aber bislang noch aus. Eine Vielzahl von Literatur-Befunden bestätigt das Vorkommen von präaktivierten Monozyten mit gesteigertem Calcium-Einstrom bei Patienten mit essentieller Hypertonie (Dorffel et al., 1999; Rivera et al., 1996; Touyz & Schiffrin, 1993; Wirtz et al., 2004). Daher erscheinen Monozyten als geeignete Modellzellen, um Veränderungen von TRP-Kanälen bei der arteriellen Hypertonie aufzuklären,

Zielstellung

Veränderungen der Calcium-Homeostase sind in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie lange bekannt. Aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften können die neuerlich beschriebenen nicht-selektiven Kationen-Kanäle aus der Familie der Canonical Transient Receptor Potential (TRPC)-Kanäle eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie spielen. Bislang wurden noch keine Untersuchungen über die Bedeutung von TRPC-Kanälen bei essentieller Hypertonie durchgeführt. Für die jetzt erfolgten Untersuchungen ergab sich somit die Frage, ob Veränderungen der Expression und / oder der Funktion von TRPC-Kanälen bei Patienten mit essentieller Hypertonie oder bei Tiermodellen der primären Hypertonie bestehen. Die jetzt erfolgten Untersuchungen ergaben eine signifikant gesteigerte Expression von TRPC3- und TRPC5-Kanälen und einen signifikant gesteigerten Kationen-Einstrom bei Patienten mit essentieller Hypertonie

Methoden

Patienten-Charakterisierung

Die Untersuchungen wurden bei 51 Patienten mit essentieller Hypertonie und 51 normotensiven Kontrollpersonen durchgeführt. Für die Untersuchung liegt ein positives Votum der zuständigen Ethik-Kommission vor. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Bei den Patienten wurde die arterielle Hypertonie festgestellt, wenn bei mehrfacher Messung unter Ruhebedingungen ein systolischer Blutdruck >140 mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck >90 mmHg gemessen wurde. Die Blutdruckmessung erfolgte dabei im Sitzen nach einer Ruhephase von 10 Minuten am Oberarm in Herzhöhe mit einer an den Oberarmumfang angepassten Manschette. Der systolische Blutdruck wurde als Manschettendruck beim ersten Korotkoff-Geräusch (Phase I) und dem Nachweis eines palpablen Pulses im Bereich der Arteria radialis bestimmt. Der diastolische Blutdruck wurde als Manschettendruck beim Verschwinden des Korotkoff-Geräusches (Phase V) bestimmt. Sekundäre Hypertonieursachen wurden durch entsprechende klinische Untersuchungen ausgeschlossen. Die klinischen und biochemischen Charakteristika der gesunden Kontrollpersonen und der Patienten mit essentieller Hypertonie sind in der **Tabelle 1** aufgeführt. Die Gruppen wiesen hinsichtlich Alter und Geschlecht und der biochemischen Parameter keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 1. Klinische und biochemische Charakteristika von normotensiven gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit essentieller Hypertonie. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0,01$ für den Vergleich zwischen den beiden Gruppen. (Mann-Whitney-Test).

Charakteristikum	Normotensive Kontrollpersonen	Patienten mit essentieller Hypertonie
Alter (Jahre)	65 \pm 3	66 \pm 2
n (Mann/Frau)	27 / 24	26 / 25
Systolischer Blutdruck (mmHg)	123 \pm 2	158 \pm 2**
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	70 \pm 1	84 \pm 2**
Body mass index (kg/m ²)	26 \pm 1	28 \pm 1**
Hämoglobin (g/L)	126 \pm 3	134 \pm 3
Leukozyten (G/L)	8,8 \pm 0,6	8,0 \pm 0,4
Serum Calcium (mmol/L)	2,3 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0
Serum Natrium (mmol/L)	137 \pm 1	138 \pm 1
Serum Kalium (mmol/L)	4,2 \pm 0,0	4,1 \pm 0,0
Kreatinin (μ mol/L)	86 \pm 4	84 \pm 3

Messungen an Monozyten und Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen

Monozyten wurden aus dem Blut von normotensiven Kontrollpersonen und von Patienten mit essentieller Hypertonie mittels CD14-gekoppelter superparamagnetischer Polystyrenkügelchen (DynaL Biotech, Hamburg) isoliert und in Hanks balanced salt solution (Zusammensetzung: NaCl 136 mmol/L, KCl 5,40 mmol/L, KH_2PO_4 0,44 mmol/L, Na_2HPO_4 0,34 mmol/L, D-glucose 5,6 mmol/L, CaCl_2 1 mmol/L, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 10 mmol/L, pH 7.4) resuspendiert. TRPC3-transfizierte Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) wurden freundlicherweise von Privatdozent Dr. C. Harteneck, Berlin, zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurde die Expression von TRP-Kanälen in Monozyten von spontanhypertensiven Ratten und normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten, die freundlicherweise von Professor Dr. Kretz, Berlin, zu Verfügung gestellt worden waren, untersucht.

Fluoreszenz-spektrophotometrische Bestimmungen des Kationen-Einstroms

Für die Messung des Calcium- oder Gadolinium-Einstroms wurden die Zellen mit 2 $\mu\text{mol/L}$ des Membran-gängigen Fluoreszenz-Farbstoffs 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzo-furan-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methyl-phenoxy)-ethane-N,N,N'N'-tetraacetic acid penta acetoxymethyl ester (fura2-AM, Merck Biosciences, Schwalbach) bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert, gewaschen und in Calcium-freier Hanks balanced salt solution resuspendiert. Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten entsprechend der hier etablierten Methodik mit einem 96well-fluorescent plate reader (Fluoroskan Ascent Fluorometer/Luminometer mit Ascent software 2.4.2; Thermo LabSystems Oy, Helsinki, Finnland) bei 510 nm Emission mit Exzitationswellenlängen von 340 nm (Calcium-sensitive Wellenlänge) und 480 nm (Calcium-insensitive Wellenlänge) und die Fluoreszenz-Ratio (F340 nm / F480 nm) wurde gebildet. Die Messungen erfolgten nach Zugabe von Calcium (1 mmol/L) oder Gadolinium (50 $\mu\text{mol/L}$) bei Abwesenheit oder Anwesenheit von 1-[β -[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole (SKF-96365; 10 $\mu\text{mol/L}$; Merck Biosciences). Um den Speicher-abhängigen Kationen-Einstrom zu untersuchen, wurde der Einstrom von Calcium- oder Gadolinium in Fura2-beladene Monozyten bei Anwesenheit von Thapsigargin zur Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher gemessen.

Immunoblotting von TRPC3 und TRPC5 aus Monozyten

In Monozyten wurden TRPC3- und TRPC5-Kanäle mittels Immunoblotting nachgewiesen. Dazu wurden Monozyten mit Phosphate-buffered saline gewaschen und mit eiskaltem Lyse-Puffer (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8; 1 mol/L NaCl, 200 mmol/L Ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mol/L β -Mercaptoethanol, 1 mol/L Sodium fluoride, Complete mini protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostics) versetzt, durch eine dünne Spritzenkanüle mehrfach aspiriert und für 3 Minuten bei

90°C erhitzt. Die Proteine wurden durch 10% Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-Gelelectrophorese (SDS-PAGE) bei 150 V über 90 Minuten aufgetrennt und dann auf Nitrozellulose Membranen (NEN Life Sciences Products, Boston) bei 100mA über 3 Stunden transferiert. Nach Blockierung mit blocking buffer (Licor biosciences, Bad Homburg, Germany) für 24 Stunden bei 4°C erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (rabbit-anti-TRPC3-Antikörper oder rabbit-anti-TRPC5-Antikörper, 1:500 Lösung mit 0,1% Tween 20; alomone labs, Jerusalem) für 60 Minuten. Nach 3 Wasch-Schritten mit Puffer und 0.1% Tween 20 erfolgten die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (IRDye800CW-infrared fluorescent dye-labelled sheep-anti-rabbit-Antikörper (1:1000 Lösung mit 0,1% Tween 20; biomol, Hamburg) für 60 Minuten und erneute 3 Wasch-Schritte. Die Fluoreszenz wurde bei 810 nm bei einer Exzitationswellenlänge von 780 nm gemessen. Das Molekulargewicht von TRPC3 mit 848 Aminosäuren beträgt 97 kDa. Das Molekulargewicht von TRPC5 mit 973 Aminosäuren beträgt 111 kDa. Der Immunoblot bestätigte diese Molekulargewichte für TRPC3 und TRPC5 und zeigte darüber hinaus, dass mit den genutzten Antikörpern diese Kanäle spezifisch auf Monozyten nachgewiesen werden können.

Quantifizierung der TRPC3 und TRPC5 Expression mittels in-cells Western Assay

Weiterhin wurden TRPC3 und TRPC5 Kanäle in humanen Monozyten mittels in-cell Western Assay und spezifischen Antikörpern quantifiziert. Dazu wurden die Monozyten nach Permeabilisierung mit einem rabbit-anti-TRPC3-Antikörper oder rabbit-anti-TRPC5-Antikörper (primärer Antikörper, 1:1000, alomone labs, Jerusalem) und einem IRDye800CW-infrared Fluoreszenz-markierten goat-anti-rabbit-Antikörper (sekundärer Antikörper, 1:1000, biomol, Hamburg) inkubiert und die Fluoreszenz mit einem infrared imaging system (Licor biosciences, Bad Homburg) bei 810 nm Emission und einer Exzitationswellenlänge von 780 nm bestimmt. Kontroll-Experimente wurden ohne Zell-Permeabilisierung oder in Abwesenheit der primären Antikörper durchgeführt. Monoklonale rat-anti-CD11a (anti-leukocyte-function-associated antigen-1; 1:1000; Serotec Düsseldorf) wurden immer als interne Referenz mitgeführt. Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten mit Alexa Fluor680-allophycocyanin-Fluoreszenz-markiertem goat-anti-rat-Antikörpern (1:1000; MoBiTec, Göttingen) bei 700 nm Emission und einer Exzitationswellenlänge von 680 nm.

Small interfering RNA (siRNA) knock-down von TRPC5

Um nachzuweisen, dass TRP-Kanäle für den Kationen-Einstrom in humane Monozyten eine wesentliche Rolle spielen wurde die Expression von TRPC5 mittels spezifischer small interfering

RNA knock-down Technik herabgesetzt. Dazu wurden 1 μ L pre-designed siRNA (final concentration, 20 nmol/L; Ambion, USA) mit doppelsträngiger RNA (TRPC5; sense: 5-GGAGGCUGAGAUCUACUAUtt-3; antisense: 5-AUAGUAGAUCUCAGCCUCctg-3) und siPort Amine (1:10) des Silencer siRNA transfection kits (Ambion) für 20 Minuten versetzt und dann die Monozyten für 20 Stunden transfiziert. Veränderungen von TRPC5 oder von TRPC6 in den Kontrollzellen und in den siRNA-transfizierten Zellen wurden mittels in-cell Immunoblotting gemessen.

Nachweis von TRPC3 und TRPC5-Transkripten in Monozyten

Mittels RT-PCR wurden die Transkripte von TRPC3, TRPC5 und GAPDH (als Referenz) in humanen Monozyten nachgewiesen. Die RNA wurde aus den Monozyten mit RNeasy mini kit und RNase-free DNase set (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Die RNA wurde zur Synthese von cDNA mit Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) eingesetzt. Dazu wurden 300 ng der mRNA revers transkribiert in Anwesenheit von oligo dT (12 to 18) und 5 U AMV reverse transcriptase bei 42°C für 60 Minuten, danach Erhitzung auf 99°C für 5 Minuten. Zu 2 μ L der 1:10 verdünnten single stranded cDNA wurden 20 μ L PCR mix und Fast start DNA masterplus SYBR green I (Roche Diagnostics) zugegeben. Die PCR begann mit Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten. Dann folgten 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 100 Sekunden, Annealing bei 54°C für 120 Sekunden und Extension bei 72°C für 105 Sekunden. Die eingesetzten Primer waren für TRPC3 (NM_003305; forward, CAAGAATGACTATCGGAAGC; reverse, GCCACAAACTTTTTGACTTC), für TRPC5 (NM_012471) forward, CCACCAGCTATCAGATAAGG; reverse, CGAAACAAGCCACTTATAACC; und für GAPDH (NM_002046; forward, AACTGCTTAGCACCCCTGGC; reverse, ATGACCTTGCCCACAGCCTT). Die PCR Produkte wurden auf 1.5% Agarose Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid in einen imaging analyzer (Gel Doc 2000, BioRad) dargestellt. Die Größe der Produkte waren 203 bp für TRPC3, 161 bp für TRPC5 und 202 bp für GAPDH. Die PCR wurde durchgeführt mit RNA plus reverse Transkription (TRPC3; TRPC5 oder GAPDH), RNA ohne reverse Transkription (-RT) und ohne RNA plus reverse Transkription (-RNA). Um die Identität der PCR Produkte mit den GenBank Sequenzen nachzuweisen, erfolgte die Sequenzierung der PCR Produkte. Die Sequenzierung erfolgte von beiden Seiten mit DYEnamic ET-terminator cycle sequencing kits und ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit Lasergene software package (Lasergene, Madison, USA). Die Sequenzierung bestätigte die Identität der PCR-Produkte mit den GenBank Sequenzen für TRPC3, TRPC5 und GAPDH.

Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikanter Unterschied erachtet. Alle p-Werte wurden im zweiseitigen Test ermittelt.

Resultate

Die **Abb. 1** zeigt den Kationen-Einstrom in TRPC3-transfizierte Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen. Im Vergleich zu Kontrollzellen war in TRPC3-transfizierten Zellen ein signifikanter stärkerer Calcium- oder Gadolinium-Einstrom nachweisbar. Diese Versuche bestätigen, dass TRPC3-Kanäle nicht-selektive Kationen-Kanäle darstellen. Da der Gadolinium-Einstrom im Vergleich zum Calcium-Einstrom stärker ausgeprägt ist, deuten die Untersuchungen weiterhin darauf, dass Gadolinium besonders die TRPC3-Kanäle nutzt.

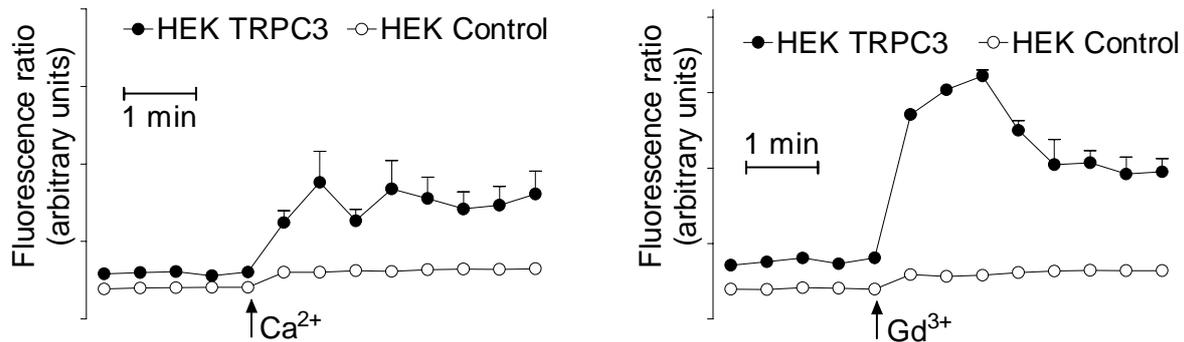


Abb. 1. Calcium-Einstrom und Gadolinium-Einstrom in Fura2-beladene Canonical Transient Receptor Potential Kanal Typ 3 (TRPC3)-transfizierte Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen. TRPC3-transfizierte HEK-293-Zellen oder HEK-Kontroll-Zellen wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura2 inkubiert und in Calcium-freier Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mmol/L Calcium (linke Abbildung) oder 50 μmol/L Gadolinium (rechte Abbildung) kam es in den TRPC3-transfizierten HEK-293-Zellen zu einem deutlich stärkeren Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich mit den Kontroll-Zellen. Daten sind Mittelwerte ± SEM aus 8 Messungen.

Jetzt wurde der Nachweis von TRPC3 und TRPC5 in humanen Monozyten geführt. Die Transkripte für TRPC3 und TRPC5 wurden in humanen Monozyten mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen (**Abb. 2**). Die TRPC3- und TRPC5-Kanal-Proteine wurden in humanen Monozyten mittels Immunoblotting nachgewiesen (**Abb. 3**). Der Immunoblot bestätigte das Molekulargewicht von TRPC3 mit 97 kDa und von TRPC5 mit 111 kDa. Weiterhin bestätigten diese Versuche, dass diese TRPC-Kanäle mit den eingesetzten Antikörpern spezifisch auf Monozyten nachgewiesen werden können.

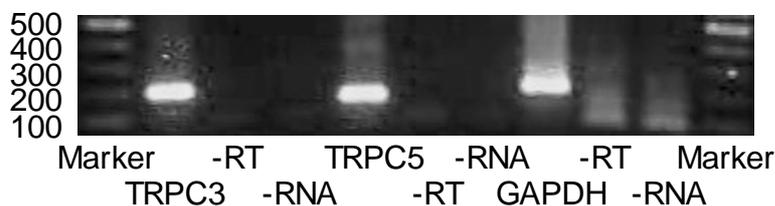


Abb. 2. Repräsentative PCR Produkte von TRPC3, TRPC5 oder GAPDH (als Referenz) in humanen Monozyten. Die PCR wurde durchgeführt mit RNA plus reverse Transkription (TRPC3 oder TRPC5 oder GAPDH), RNA ohne reverse Transkription (-RT) und ohne RNA plus reverse Transkription (-RNA). Marker bezeichnet die 100-bp ladder. Die Untersuchung bestätigt die Größe des TRPC3-Produkts mit 203 bp, des TRPC5-Produkts mit 161 bp und des GAPDH-Produkts mit 202 bp.

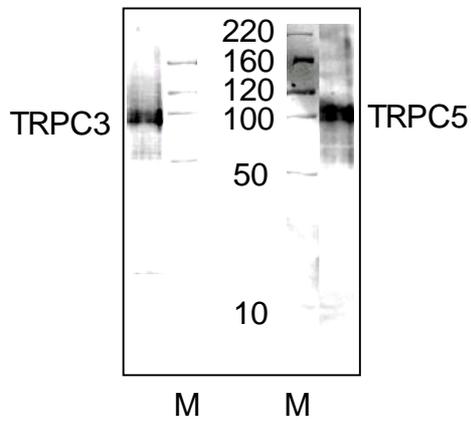


Abb. 3. Nachweis von TRPC3 und TRPC5 in humanen Monozyten mittels Immunoblotting. M zeigt die Auftragung des Proteinmarkers. Der Immunoblot bestätigt das Molekulargewicht von TRPC3 mit 97 kDa und von TRPC5 mit 111 kDa.

Mittels quantitativem in-cell Western Assay wurden jetzt die Expression von TRPC3- und TRPC5-Kanälen bei Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Kontrollpersonen verglichen. Als interne Referenz wurde dabei immer das Leucocyte-Function-Associated Antigen-1 (CD11a) mitgeführt. Die **Abb. 4** zeigt ein typisches Beispiel für den in-cell Western Assay bei einer normotensiven Kontrollperson und bei einem Patienten mit essentieller Hypertonie. Es zeigte sich eine gesteigerte Expression von TRPC3 und TRPC5 bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen (normalisierte TRPC3 Expression: $3,21 \pm 0,59$ versus $1,36 \pm 0,07$ jeweils $n = 20$; $p < 0,01$; normalisierte TRPC5 Expression: $2,10 \pm 0,28$ versus $1,40 \pm 0,52$; jeweils $n = 12$; $p < 0,05$; **Abb. 5**).

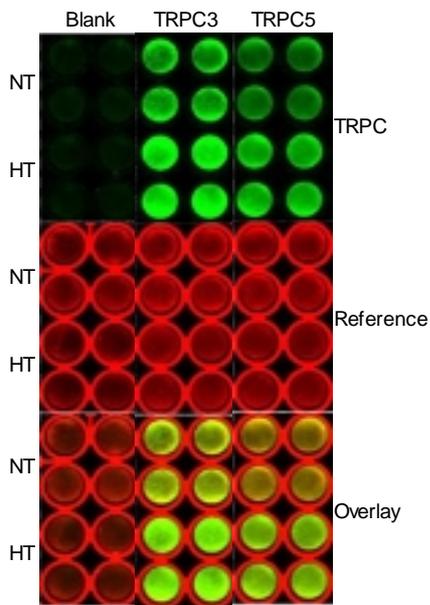


Abb. 4. Quantitativer in-cell Western Assay zum Nachweis von TRPC3- und TRPC5-Kanälen im humanen Monozyten bei einer normotensiven Kontrollperson (NT) und bei einem Patienten mit essentieller Hypertonie (HT). Die Monozyten in einer 96well Mikrotiterplatte (Ausschnitt) wurden mit einem spezifischen rabbit-anti-TRPC3-Antikörper oder rabbit-anti-TRPC5-Antikörper (primärer Antikörper) und dem Fluoreszenz-markierten goat-anti-rabbit-Antikörper (grüne Fluoreszenz) versetzt. Als Referenz wurde das Leukocyte-function-associated antigen-1 (CD11a) mit einem spezifischen rat-anti-CD11a (primärer Antikörper) und Fluoreszenz-markiertem goat-anti-rat-Antikörpern (rote Fluoreszenz) gemessen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Infrared fluorescence imaging system gemessen und zusätzlich auch als Overlay dargestellt. Blank bedeuten Messungen bei Abwesenheit des primären Antikörpers. Dargestellt sind jeweils Vierfach-Bestimmungen pro Probe und TRPC-Kanal.

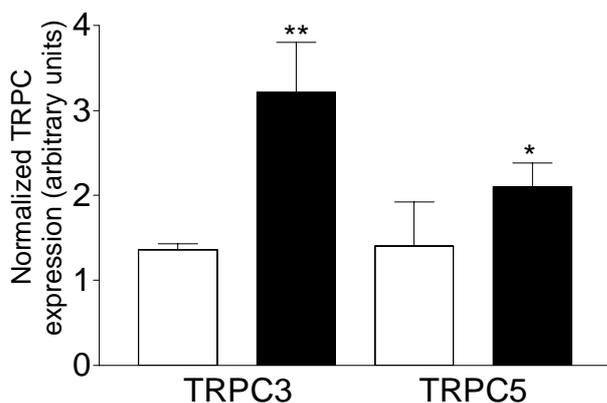


Abb. 5. Expression von TRPC3 und TRCP5 bei Monozyten von normotensiven Kontrollpersonen und Patienten mit essentieller Hypertonie. Dargestellt ist die Expression von TRPC bezogen auf die Expression von CD11a als Referenz (normalisierte TRPC-Expression). Jeweils $n = 20$ für TRPC3 und jeweils $n = 12$ für TRPC5. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$ zwischen den Gruppen.

Die **Abb. 6** zeigt den typischen Calcium- und Gadolinium-Einstrom in Monozyten. Bei Anwesenheit des Blockers SKF-96365 war der Anstieg der Fluoreszenz in den Monozyten nach

Zugabe von Calcium auf $43 \pm 8\%$ des Kontrollwertes und nach Zugabe von Gadolinium auf $56 \pm 7\%$ des Kontrollwertes signifikant reduziert (jeweils $n = 12$; $p < 0.01$).

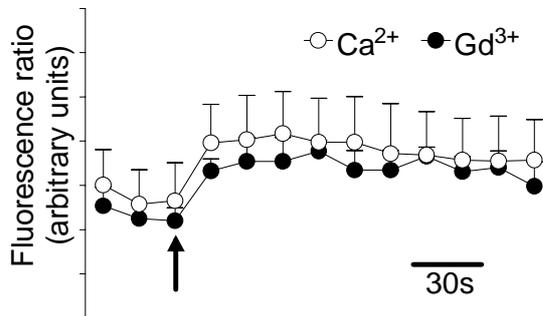


Abb. 6. Calcium- und Gadolinium-Einstrom in Fura2-beladene Monozyten von einer normotensiven Kontrollperson. Monozyten wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura2 inkubiert und in Calcium-freier Lösung resuspendiert. Nach Zugabe (Pfeil) von 1 mmol/L Calcium oder 50 μ mol/L Gadolinium kam es zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 Messungen.

Um den Kationen-Einstrom zwischen Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Kontrollpersonen zu vergleichen, wurde immer das Verhältnis von Gadolinium-Einstrom zu Calcium-Einstrom gebildet. Dazu wurden Fluoreszenz-Veränderungen des Plateau-Wertes nach Zugabe von Gadolinium im Verhältnis zu den Veränderungen nach Zugabe von Calcium als Gadolinium/Calcium-Einstrom in Prozent berechnet. Bei Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie ergab sich ein signifikant gesteigerter Gadolinium/Calcium-Einstrom im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen (Gadolinium/Calcium-Einstrom, $125 \pm 14\%$ versus $80 \pm 7\%$; jeweils $n = 51$; $p < 0,01$; **Abb. 7**). Zusammen mit dem Nachweis der gesteigerten Expression von TRPC3 und TRPC5 bei Patienten mit essentieller Hypertonie deutet der gesteigerte Gadolinium/Calcium-Einstrom auf die funktionelle Bedeutung der TRPC-Kanäle bei essentieller Hypertonie hin.

Auch in Anwesenheit des L-Typ Calcium-Kanal-Blockers Nimodipin war bei Patienten mit essentieller Hypertonie ein signifikant gesteigerter Gadolinium/Calcium-Einstrom im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen nachweisbar (Gadolinium/Calcium-Einstrom, $91 \pm 20\%$, $n = 19$; versus $36 \pm 6\%$, $n = 14$; $p < 0,05$). Dagegen war in Anwesenheit von SKF-96365 der Gadolinium/Calcium-Einstrom bei Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Kontrollpersonen nicht signifikant unterschiedlich (Gadolinium/Calcium-Einstrom, $12 \pm 23\%$, $n = 6$; versus $7 \pm 33\%$, $n = 6$; $p = \text{n.s.}$). Diese Befunde weisen darauf hin, dass für die essentielle Hypertonie Veränderungen an TRPC-Kanälen mehr bedeutsam sind als Veränderungen an L-Typ Calcium-Kanälen.

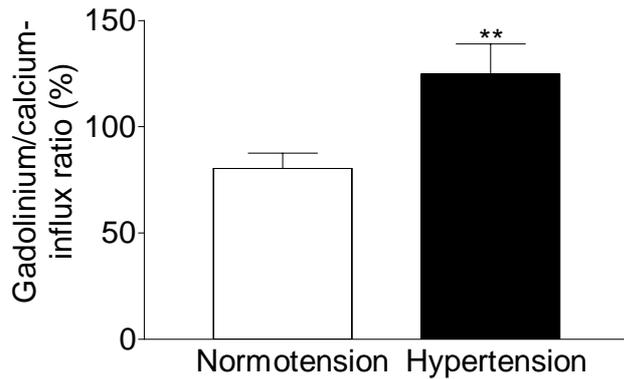


Abb. 7. Gesteigerter Gadolinium/Calcium-Einstrom in Fura2-beladene Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie. Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie (Hypertension, n = 51, gefüllte Säule) und von normotensiven Kontrollpersonen (Normotension, n = 51, offene Säule) wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura2 inkubiert, in Calcium-freier Lösung resuspendiert, 1 mmol/L Calcium oder 50 μ mol/L Gadolinium zugegeben und die Veränderungen der Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenz-Veränderungen des Plateau-Wertes nach Zugabe von Gadolinium im Verhältnis zu den Veränderungen nach Zugabe von Calcium wurde als Gadolinium/Calcium-Einstrom in Prozent berechnet. **p<0,01 zwischen den Gruppen.

Um den Zusammenhang zwischen TRPC-Kanälen und dem Kationen-Einstrom weiter zu prüfen, erfolgte der Einsatz von small interfering RNA. Nach TRPC5 knock-down mittels TRPC5 small interfering RNA kam es zu einer signifikanten Verminderung der TRPC5-Kanal-Expression auf $71 \pm 3\%$ des Kontrollwertes (n = 16; p < 0.01), wohingegen die TRPC6-Kanal-Expression nicht verändert war ($92 \pm 4\%$ des Kontrollwertes; n = 11; p = n.s.). Nach TRPC5 knock-down kam es zu einer signifikanten Verminderung des Calcium-Einstroms auf $54 \pm 2\%$ des Kontrollwertes und des Gadolinium-Einstroms auf $24 \pm 4\%$ des Kontrollwertes (jeweils n = 12; p < 0,05; **Abb. 8**).

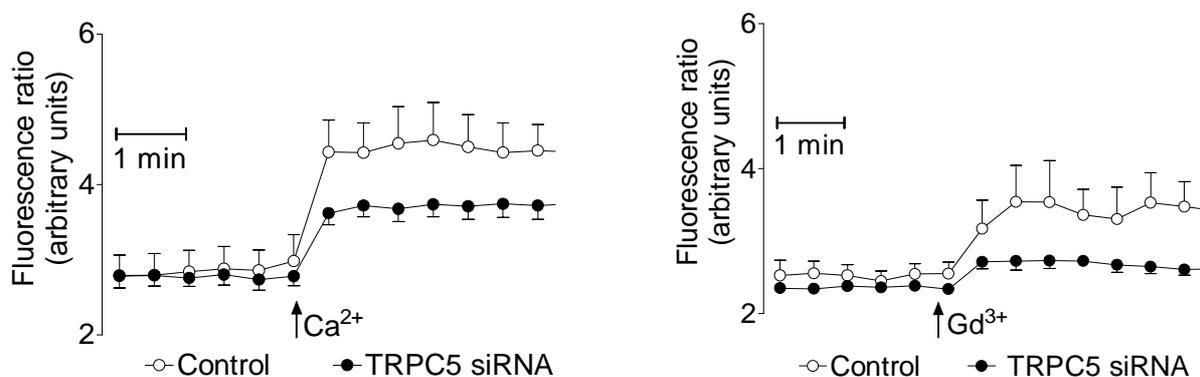


Abb. 8. siRNA-Gen-knock-down von TRPC5 vermindert den Kationen-Einstrom in Monozyten. Dargestellt ist der Calcium-Einstrom (linke Abbildung) und der Gadolinium-Einstrom (rechte

Abbildung) in Fura2-beladene Monozyten unter Kontrollbedingungen (offene Kreise) oder nach Transfektion mit small interfering RNA gegen TRPC5 (gefüllte Kreise). Die Monozyten wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura2 inkubiert und in Calcium-freier Lösung resuspendiert. Nach Zugabe (Pfeil) von 1 mmol/L Calcium oder 50 μ mol/L Gadolinium kam es zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 Messungen.

Weiterhin wurden die Befunde für TRP-Kanäle bei einem Tiermodell der primären Hypertonie überprüft. Die Expression von TRPC3 war signifikant größer in Monozyten von spontanhypertensiven Ratten im Vergleich mit Wistar-Kyoto-Ratten ($7,7 \pm 0,3$ vs. $2,9 \pm 0,5$; jeweils $n = 4$; $p < 0,05$). Weiterhin war ein gesteigerter Calcium-Einstrom in Monozyten von spontanhypertensiven Ratten im Vergleich mit normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten nachweisbar (Fluoreszenz-Anstieg, $0,81 \pm 0,13$; $n = 9$; versus $0,34 \pm 0,10$; $n = 8$; $p < 0,05$).

Diskussion

Der Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis einer gesteigerten Expression von Canonical Transient Receptor Potential (TRP)-Kanälen der Subtypen 3 (TRPC3) und 5 (TRPC5) bei Patienten mit essentieller Hypertonie (Liu et al., 2006). Die gesteigerte Expression von TRPC-Kanälen ist assoziiert mit einem gesteigerten Kationen-Einstrom bei essentieller Hypertonie. Ein weiterer Hauptbefund ist der Nachweis einer gesteigerten Expression von TRPC3 auch bei einem Tiermodell der primären Hypertonie, nämlich bei spontanhypertensiven Ratten im Vergleich mit normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (Liu et al., 2005). Eine Reihe von Befunden in der Literatur unterstützen die Ergebnisse, dass ein erhöhter Calcium-Einstrom über TRP-Kanäle mit der primären Hypertonie assoziiert ist.

a) Sowohl Cox et al. als auch Wellmann et al. zeigten kürzlich einen gesteigerten Calcium-Einstrom in Cerebralarterien und kleinen Mesenterialarterien von hypertensiven Ratten (Cox et al., 2003; Wellman et al., 2001).

b) Der Speicher-aktivierte Calcium-Einstrom war erhöht in glatten Gefäßmuskelzellen der Arteria carotis oder Arteria femoralis bei hypertensiven Ratten (Nomura et al., 1997; Segikuchi et al., 1996).

c) Kumar et al. zeigten, dass eine Hyperplasie von glatten Gefäßmuskelzellen durch TRPC1 aktiviert wird (Kumar et al., 2006).

d) Kürzlich berichteten Welsh et al., dass es durch TRPC6-Antisense-Oligonucleotide zu einer Verminderung der TRP-Kanalexpression, der Druck-induzierten Depolarisation und zur Verminderung der Vasokonstriktion in Hirngefäßen der Ratte kommt, was wiederum auf die Bedeutung von TRP-Kanälen für die Gefäßregulation hindeutet (Welsh et al., 2002).

e) Bei TRPC6 $-/-$ Mäusen, die eine gesteigerte Expression von TRPC3 aufweisen, waren eine gesteigerte Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen, gesteigerte Kontraktilität von Aortenringen und erhöhter Blutdruck mit der gesteigerten TRPC3-Aktivität assoziiert (Dietrich et al., 2005).

Die jetzigen Befunde wurden an Monozyten erhoben. Es zeigte sich eine gesteigerte Expression von TRPC3 und TRPC5 zusammen mit einem gesteigerten Kationen-Einstrom bei Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich mit normotensiven Kontrollpersonen. Aufgrund der Bedeutung von Monozyten für die Pathogenese der Atherosklerose, der Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotische Plaques und der Aktivierung und Umwandlung in Gewebe-Makrophagen, erscheint eine gesteigerte Aktivierung dieser Zellen für die bekannten Gefäßkomplikationen bei der essentiellen Hypertonie bedeutsam zu sein. Die jetzigen Befunden

ergänzen frühere Beobachtungen über präaktivierte Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie (Dorffel et al., 1999).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine wesentliche Bedeutung von TRPC-Kanälen in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie hin.

Literatur

- Albert AP, Large WA. Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 2003;33:345-356.
- Ambudkar IS. Ca²⁺ signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:25-32.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*. 2000;287:1604-1605.
- Birnbaumer L, Boulay G, Brown D, Jiang M, Dietrich A, Mikoshiba K, Zhu X, Qin N. Mechanism of capacitative Ca²⁺ entry (CCE): interaction between IP₃ receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:127-161.
- Blaustein MP, Ashida T, Goldman WF, Wier WG, Hamlyn JM. Sodium/calcium exchange in vascular smooth muscle: a link between sodium metabolism and hypertension. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;488:199-216.
- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels. Transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:591-596.
- Cox RH, Lozinskaya I, Dietz NJ. Calcium exerts a larger regulatory effect on potassium⁺ channels in small mesenteric artery myocytes from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens* 2003;16:21-27.
- Dietrich A, Mederos Y, Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaya G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6980-6989.
- Dobrydneva Y, Blackmore P. 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol Pharmacol*. 2001;60:541-552.
- Dorffel Y, Latsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1999;34:113-117
- Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 2001;3:121-127.
- 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.
- Groschner K, Hingel S, Lintschinger B, Balzer M, Romanin C, Zhu X, Schreibmayer W. Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1998;437:101-106.
- Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A. Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2000;275:37423-37428.
- Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci STKE*. 2005;315:re15.
- He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem*. 2005;280:10997-11006.
- 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, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med* 2000;78:14-25.
- Jung S, Mühle A, Schaefer M, Strotmann R, Schultz G, Plant TD. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem*. 2003;278:3562-3571.
- Kanki H, Kinoshita M, Akaike A, Satoh M, Mori Y, Kaneko S. Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse TRP5 channels. *Mol Pharmacol*. 2001;60:989-998.
- Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*. 1998;396:478-482.
- Kumar B, Dreja K, Shah SS, Cheong A, Xu SZ, Sukumar J, Naylor J, Forte A, Cipollaro M, McHugh D, Kingston PA, Heagerty AM, Bergdahl A, Hultgardh-Nilsson A, Gomez MF, Porter KE, Hellstrand P, Beech DJ. Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006;98:557-563.
- Kunze DL, Sinkins WG, Vaca L, Schilling WP. Properties of single *Drosophila* Trpl channels expressed in Sf9 insect cells. *Am J Physiol*. 1997;272:C27-C34.
- Lapointe JY, Bell PD, Sabirov RZ, Okada Y. Calcium-activated nonselective cationic channel in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F275-F280.
- Lee YM, Kim BJ, Kim HJ, Yang DK, Zhu MH, Lee KP, So I, Kim KW. TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G604-G616.
- Liu D, Scholze A, Zhu Z, 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;18:1503-1507.
- Liu D, Scholze A, Zhu Z, 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.
- Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS. Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem*. 2005;280:21600-21606.
- Ma HT, Venkatachalam K, Li HS, Montell C, Kurosaki T, Patterson RL, Gill DL. Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels. *J Biol Chem*. 2001;276:18888-18896.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005(272):re3
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 2002;108:595-598.
- Neusser M, Golinski P, Zhu Z, Zidek W, Tepel M. Thapsigargin-insensitive intracellular calcium pools in vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Hypertens* 1999;21:395-405.
- Nomura Y, Asano M, Ito K, Uyama Y, Imaizumi Y, Watanabe M. Potent vasoconstrictor actions of cyclopiazonic acid and thapsigargin on femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1997;120:65-73.
- Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca⁽²⁺⁾-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 1999;274:27359-27370.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of trp channels. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:685-717.
- Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 2005;85:757-810.

- Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol.* 2001;536:3-19.
- Putney JW Jr, Ribeiro CM. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1272-1286.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:619-647.
- Resnick LM. Cellular ions in hypertension, insulin resistance, obesity, and diabetes: a unifying theme. *J Am Soc Nephrol.* 1992;3(Suppl):S78-S85.
- Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;109:95-104.
- Rivera A, Conlin PR, Williams GH, Canessa ML. Elevated lymphocyte cytosolic calcium in a subgroup of essential hypertensive subjects. *Hypertension* 1996;28:213-218.
- Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem.* 2000;275:17517-1726.
- Sekiguchi F, Shimamura K, Akashi M, Sunano S. Effects of cyclopiazonic acid and thapsigargin on electromechanical activities and intracellular Ca²⁺ in smooth muscle of carotid artery of hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1996;118:857-864.
- Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Inoue T, Kanno Y, Ozawa Y, Hayashi K, Saruta T. Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: actions of angiotensin II. *Kidney Int* 2002;62:558-565.
- Thebault S, Roudbaraki M, Sydorenko V, Shuba Y, Lemonnier L, Slomianny C, Dewailly E, Bonnal JL, Mauroy B, Skryma R, Prevarskaya N. Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest* 2003;111:1691-1701.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of angiotensin II and endothelin-1 on platelet aggregation and cytosolic pH and free Ca²⁺ concentrations in essential hypertension. *Hypertension.* 1993;22:853-862.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyperresponsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1997;15:1431-1439.
- Trebak M, Bird GS, McKay RR, Putney JW Jr. Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J Biol Chem.* 2002;277:21617-21623.
- Vazquez G, Wedel BJ, Trebak M, St John Bird G, Putney JW Jr. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J Biol Chem.* 2003;278:21649-21654.
- Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 2004;1742:21-36.
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem.* 2003;278:29031-2940.
- Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res.* 2006;98:868-878.
- Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A. Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca²⁺. *J Physiol* 1999;518:631-638.
- Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, Stevenson AS, Saundry CM, Lederer WJ, Nelson MT. Membrane depolarization, elevated Ca(2+) entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2559-H2567.

- Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 2002;90:248-250.
- Wilde DW, Furspan PB, Szocik JF. Calcium current in smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;24:739-746.
- Wirtz PH, Von Kanel R, Frey K, Ehlert U, Fischer JE. Glucocorticoid sensitivity of circulating monocytes in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17:489-494.
- Wu X, Babnigg G, Villereal ML. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C526-C536.
- Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol*. 2005;145:405-414.
- Yoshida J, Ishibashi T, Imaizumi N, Takegami T, Nishio M. Capacitative Ca²⁺ entries and mRNA expression for TRPC1 and TRPC5 channels in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Eur J Pharmacol*. 2005;510:217-222.
- Zagranichnaya TK, Wu X, Villereal ML. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem*. 2005;280:29559-29569.
- Zhu Z, Zhu S, Liu D, Cao T, Wang L, Tepel M. Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. *Hypertension* 2005;45:1-7.

Curriculum vitae

NAME: Daoyan Liu
SEX: Female
DATE OF BIRTH: 21.09.1964
CITIZENSHIP: P.R. China

EDUCATION

1993-1996 Undergraduate, Third Military Medical University Department of Experimental Medicine
1998-2003 Undergraduate, Third Military Medical University Department of Clinical Medicine, B.S. (Medicine)
2003-2005 Graduate, Third Military Medical University School of Preventive Medicine, M.S. (Public Health)

PROFESSIONAL APPOINTMENT

1984-1992 Technician, Laboratory of Internal Medicine, Daping Hospital, Chongqing
1996-2003 Assistant Instructor and Instructor, Center for Hypertension and Metabolic Disease, Department of Hypertension and Endocrinology, Daping Hospital, Chongqing
2003-2006 Charite, Campus Benjamin Franklin

Publikationsliste

1. Zhu Z, Zhu S, Wu Z, Liu D, Yang Y, Wang X, Zhu J, Tepel M:
Effects of sodium on blood pressure, cardiac hypertrophy and angiotensin receptor expression in rats
Am J Hypertens 2004 ; 17 : 21-24.
Impact factor 2.613
2. Liu D, Scholze A, Zhu Z, 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 ; 18 : 1503-1507.
Impact factor 3.382
3. Zhu Z, Zhu S, Liu D, Cao T, Wang L, Tepel M:
Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase
Hypertension 2005 ; 45 : 1-7.
Impact factor 5.630
4. Zhu Z, Zhu S, Liu D, Yu Z, Yang Y, van der Giet M, Tepel M:
GATA4-mediated cardiac hypertrophy induced by D-myo-inositol 1,4,5-tris-phosphate
Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 338 : 1236-1240.
Impact factor 2.904
5. Zhong J, Yan Z, Ni X, Zhao Z, Zhu S, Liu D, Tepel M, Zhu Z:
Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene A/G polymorphism and elevated blood pressure in Chinese patients with metabolic syndrome
J Lab Clin Invest 2006 ; 147 : 91-95.
Impact factor 1.829
6. Liu D, Scholze A, Zhu Z, 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 : 1115-1124.
Impact factor 4.871

Erklärung

„Ich, Daoyan Liu, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Expression und Funktion von Transient Receptor Potential Kanälen TRPC3 und TRPC5 bei primärer Hypertonie" ("Expression and function of transient receptor potential channels TRPC3 and TRPC5 in primary hypertension") 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.“

Berlin, den 07.07.2006

Unterschrift