

Aus dem  
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie  
Medizinische Klinik für Nephrologie  
Campus Benjamin Franklin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Walter Zidek

## **Habilitationsschrift**

# **Einfluss der veränderten Transkript- und Protein- Expression der Transient Rezeptor Potential (TRP) Kationen Kanäle auf die Pathogenese der Hypertonie, des Diabetes mellitus und der chronischen Niereninsuffizienz**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

**Dr. med. Florian Nikolaus Thilo, MBA**  
geboren am 20.4.1973 in Berlin

Eingereicht: November 2011  
Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Bernhard K. Krämer  
2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Boye L. Jensen, PhD

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	3
1. Einleitung.....	4
1.1. Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen als Folge der Arteriosklerose.....	4
1.2. Bedeutung der Monozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen bei der Arteriosklerose.....	4
1.3. Bedeutung der Transient Rezeptor Potential (TRP) Kationen Kanäle für die Zellfunktion .....	5
2. Expression der TRP Kationen Kanäle bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	6
2.1. TRP Kanal Expression bei arterieller Hypertonie .....	6
2.1.1. TRP Kanal Expression in Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie .....	6
2.1.2. TRP Kanal Expression im Gefäßendothel von Patienten mit maligner Hypertonie .....	14
2.1.3. TRP Kanal Expression im Nierenkortexgewebe von Patienten mit Hypertonie .....	22
2.1.4. TRP Kanal Expression in zerebralen Gefäßen von Patienten mit Hypertonie .....	30
2.2. TRP Kanal Expression bei Diabetes mellitus.....	37
2.2.1. TRP Kanal Expression in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus	37
2.2.2. TRP Kanal Expression in Podozyten von Patienten mit Diabetes mellitus	46
2.3. TRP Kanal Expression bei chronischer Niereninsuffizienz.....	57
2.3.1. TRP Kanal Expression als Funktion der extrazellulären Calcium Konzentration .....	57
2.3.2. TRP Kanal Expression als Funktion des zellulären Redox-Zustands.....	65
3. Diskussion.....	73
4. Zusammenfassung .....	75
5. Literaturangaben.....	76
Danksagung.....	83
Erklärung.....	84

## Abkürzungen

ACC	Acetylcystein
ACTB	Beta-Aktin
CNI	chronische Niereninsuffizienz
EET	Epoxyeicosatrien-Säuren
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HC	Homocystein
HEK	Human embryonic kidney
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IP3	Inositol trisphosphat
LDL	Low density lipoprotein
ONOO	Peroxynitrit
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TBP	TATA-Box Binde-Protein
TMP	Tempol
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TRP	Transient Rezeptor Potential
TRPC	Transient Rezeptor Potential Kationen Kanal, Unterfamilie C
TRPM	Transient Rezeptor Potential Kationen Kanal, Unterfamilie M
TRPV	Transient Rezeptor Potential Kationen Kanal, Unterfamilie V
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR-2	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor Typ 2

# **1. Einleitung**

## **1.1. Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen als Folge der Arteriosklerose**

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der führenden Ursachen der Morbidität und Mortalität in unserer Gesellschaft dar. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen gehören die koronare Herzerkrankung, zerebrovaskuläre Erkrankungen, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die aortale Arteriosklerose sowie die thorakalen und abdominellen Aneurysmen. Kardiovaskuläre Erkrankungen werden in erster Linie durch Arteriosklerose verursacht, für die Risikofaktoren etabliert sind, zu denen Rauchen, Dyslipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, abdominelle Adipositas, aber auch psychosozialer Stress, seltener Verzehr von Früchten und Gemüse, Alkoholgenuss und physische Inaktivität zählen (1). Auch die chronische Niereninsuffizienz stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Arteriosklerose dar. Zur Pathogenese der Arteriosklerose gehören die endotheliale Dysfunktion, die Dyslipidämie ebenso wie die Entzündung (2). Auf zellulärer Ebene spielen bei der Arteriosklerose Monozyten, Endothelzellen, aber auch glatte Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle. All diese Zellen verändern ihre Funktion während des Krankheitsprozesses.

## **1.2. Bedeutung der Monozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen bei der Arteriosklerose**

In der Entwicklung der Arteriosklerose spielen Monozyten eine ganz entscheidende Rolle (3). Die Aktivierung der Monozyten stellt einen wichtigen Schritt in der frühen Pathogenese der Arteriosklerose dar. Der erste Gefäßschaden während der Pathogenese der Arteriosklerose ist rein entzündlicher Natur und besteht aus von Monozyten abgeleiteten Makrophagen und T-Lymphozyten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung vermitteln diese Zellen die übermäßige Entzündungsreaktion des Endothels, die die Arteriosklerose ganz wesentlich mitbestimmt. Es entsteht eine endotheliale Dysfunktion. Diese ist mit oxidativem Stress assoziiert und wird durch oxidierte Low Density Lipoproteine (LDL) hervorgerufen. Bei Patienten, bei denen Arteriosklerose

und endotheliale Dysfunktion auftritt, scheint auch die Funktion der glatten Gefäßmuskelzellen eingeschränkt zu sein, und zwar unabhängig von der endothelialen Dysfunktion (4). Die arteriosklerotische Entzündung stimuliert glatte Gefäßmuskelzellen zur Migration und Proliferation, und es entsteht eine Fibrose.

### **1.3. Bedeutung der Transient Receptor Potential (TRP) Kationen Kanäle für die Zellfunktion**

Transient Receptor Potential (TRP) Kationen Kanäle sind nicht-selektive Kationen Kanäle, die in zahlreichen Zellen unterschiedlicher Spezies exprimiert werden. Die TRP Überfamilie beinhaltet über zwanzig verwandte Kationen Kanäle, die eine wichtige Rolle in solch diversen Funktionen wie der sensorischen Physiologie, der Relaxation von Gefäßen oder der männlichen Fertilität spielen (5). Wichtige Unterfamilien der TRP Kanäle stellen die TRPC, TRPV und TRPM Unterfamilie dar.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Bedeutung der TRP Kanäle bei Erkrankungen wie der Hypertonie, dem Diabetes mellitus und der chronischen Niereninsuffizienz zu untersuchen, Erkrankungen, die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Es wurde die Transkript- und Protein-expression der TRP Kanäle in Monozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, in vivo und in vitro, im Menschen sowie im Tiermodell analysiert. Dahinter lag die Hoffnung, molekulare Zielstrukturen für eine pharmakologische Intervention des arteriosklerotischen Prozesses identifizieren zu können.

## **2. Expression der TRP Kationen Kanäle bei kardiovaskulären Erkrankungen**

### **2.1. TRP Kanal Expression bei arterieller Hypertonie**

#### **2.1.1. TRP Kanal Expression in Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie**

TRPC ist mit der primären Hypertonie in Tiermodellen und beim Menschen assoziiert (6,7,8). Bei spontan hypertensiven Ratten ist die Expression des TRPC3 Proteins gesteigert (6). Dietrich et al. zeigten, dass konstitutiv aktivierte TRPC3 Kanäle, die bei TRPC6-defizienten Mäusen vermehrt exprimiert werden, für einen erhöhten Blutdruck und eine gesteigerte Kontraktilität isolierter Aortenringe bzw. zerebraler Arterien verantwortlich sind (8). Zahlreiche Untersucher haben bei Patienten mit essentieller Hypertonie angeregte Monozyten und einen gesteigerten Calciumeinstrom in Zellen des peripheren Blutes beschrieben (9,10,11,12). Allerdings ist nicht bekannt, ob eine gesteigerte Expression von TRPC3 gleichbedeutend mit einer vermehrten Aktivierung von Monozyten ist. Bekannt ist dagegen, dass proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) von aktivierten Monozyten gebildet werden.

Mit quantitativer RT-PCR wurde nun die Expression von TRPC3, IL-1 $\beta$ , und TNF- $\alpha$  in Monozyten bei 15 Patienten mit essentieller Hypertonie und 16 Kontrollpatienten analysiert.

Bei den Untersuchungen fand sich ein signifikanter Anstieg der Transkripte von TRPC3, IL-1 $\beta$ , und TNF- $\alpha$  in Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu normotensiven Kontrollpatienten. Dieser signifikante Unterschied blieb bestehen, wenn verschiedene Haushaltsgene, z.B. GAPDH, ACTB und TBP, als Referenz verwendet wurden.

In den Monozyten korrelierte die Expression der TRPC3 Transkripte signifikant mit der

Expression der Transkripte der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ .

Weiterhin wurde eine signifikante Korrelation zwischen TRPC3 Transkripten und dem systolischen Blutdruck, aber nicht dem diastolischen Blutdruck beobachtet.

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Untersuchung bei Menschen dar, in der die funktionelle Bedeutung einer gesteigerten TRPC3 Expression in Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie ausgewertet wurde. Monozyten sind unmittelbar an entzündlichen Prozessen wie z.B. der Arteriosklerose beteiligt. Die in der Arbeit beobachtete gesteigerte TRPC3 Expression sowie der nachfolgend vermehrte Calcium Einstrom könnte für die Aktivierung der Monozyten verantwortlich zeichnen, der bei Patienten mit essentieller Hypertonie beschrieben wurde (9,12). Die vorliegende Arbeit deutet auch darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine bei Patienten mit essentieller Hypertonie gesteigert sind. Gudipaty et al. berichteten, dass Calcium die Expression von IL-1 $\beta$  in Monozyten, Makrophagen und HEK-293 Zellen steigert (13). Zhou et al. zeigten, dass Calcium die Bildung von TNF- $\alpha$  in Makrophagen steigert (14).

Zusammenfassend stützen die beschriebenen Ergebnisse die These, dass ein gesteigerter Calcium Einstrom durch vermehrt exprimierte TRPC3 Kanäle bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu einer besseren Aktivierung von Monozyten führt.

Seite 8 – 13: Thilo F, Scholze A, Liu DY, Zidek W, Tepel M. Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;471:57-62.

### **2.1.2. TRP Kanal Expression im Gefäßendothel von Patienten mit maligner Hypertonie**

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse, die eine gesteigerte Expression von TRPC3 Kanal Transkripten in Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu normotensiven Kontrollpatienten zeigten, wurde eine Studie durchgeführt, um die Expression des TRPC3 Kanals in humanem Gefäßendothel bei Hypertonie zu untersuchen.

Hierzu wurde mit Hilfe der Immunhistochemie die Expression des TRPC3 Kanals in humanem Gefäßendothel in präglomerulären Arteriolen aus Nierenbiopsien von Patienten mit maligner Hypertonie mit der von Patienten mit Diarrhö-assoziertem Hämolytisch-urämischem Syndrom verglichen.

Die maligne Hypertonie stellt einen hypertensiven Notfall mit schwerer Blutdruckerhöhung, einer Keith-Wagener-Barker Grad III oder IV hypertensiven Retinopathie, und in den meisten Fällen auch einer akuten Nierenfunktionseinschränkung dar. Bei Kaukasiern bedingt die essentielle Hypertonie ungefähr 30 % der malignen Hypertonie, während bei Afroamerikanern die essentielle Hypertonie den überwiegenden Teil, nämlich ungefähr 82 %, aller Fälle von maligner Hypertonie ausmacht. Die charakteristische pathologische Veränderung bei der malignen Hypertonie ist der Endothelschaden. Die Pathophysiologie der malignen Hypertonie beinhaltet mechanischen Stress auf die Gefäßwand, eine proliferative Endarteriitis in kleinen Arterien und Arteriolen sowie eine fibrinoide Nekrose mit hyalinen Thromben (15,16).

Das Diarrhö-assozierte Hämolytisch-urämische Syndrom wird definiert durch das Vorhandensein von (17,18) prodromaler Diarrhö, mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, d.h. einer Hämoglobin Konzentration unter 10 g pro Deziliter und einer nicht-immunogenen Hämolyse mit fragmentierten Erythrozyten oder Schistozysten im peripheren Blutausschlag, einer erhöhten Laktatdehydrogenase, einem reduzierten Haptoglobin, einer Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl von weniger als

150 pro Nanoliter sowie einer akuten Niereninsuffizienz mit einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate von weniger als 30 ml pro Minute pro 1,72 m<sup>2</sup> ohne vorangegangene chronische Niereninsuffizienz. Nach Daten aus der Literatur entwickelt sich ein Hämolytisch-urämisches Syndrom meist 14 Tage nach Einsetzen der Diarrhöen (18).

In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit maligner Hypertonie und Patienten mit Diarrhö-assoziiertem Hämolytisch-urämischem Syndrom verglichen. Diese Erkrankungen sind mit akutem Nierenversagen und einem Endothelschaden in den renalen Arteriolen assoziiert. Die beiden Erkrankungen zugrunde liegende Pathogenese ist allerdings verschieden. Die maligne Hypertonie wird in der Regel durch eine schwere Blutdruckerhöhung ausgelöst, während das Diarrhö-assoziierte Hämolytisch-urämische Syndrom in erster Linie durch bakterielle Endotoxine verursacht wird (19,20).

Die schwere systolische Blutdruckerhöhung sowie die höheren Thrombozytenzahlen sind als Kriterien vorgeschlagen worden, um die maligne Hypertonie vom Hämolytisch-urämischem Syndrom unterscheiden zu können (20).

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass Patienten mit maligner Hypertonie eine stärkere Expression von TRPC3 in präglomerulären Arteriolen aufweisen als Patienten mit Hämolytisch-urämischem Syndrom. Die Expression des TRPC6 Kanals war zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich.

Bei der malignen Hypertonie scheint die essentielle Hypertonie einen wichtigen zugrunde liegenden Faktor darzustellen. Demzufolge könnte die Beobachtung, dass die Expression des TRPC3 Kanals im Gefäßendothel von Patienten mit maligner Hypertonie gesteigert ist, darauf hindeuten, dass eine höhere TRPC3 Kanal Expression eine wichtige Rolle bei der essentiellen Hypertonie spielt, insbesondere, da der akute Calcium Einstrom durch TRPC3 Kanäle einen entscheidenden Signalmechanismus für die Calcium-abhängige Freisetzung zahlreicher vom Endothel abgeleiteter vasokonstriktiver Wirkstoffe wie Endothelin, Urotensin oder Epoxyeicosatrien-Säuren (EET) darstellt (21,22,23).

Last but not least stellt die Beobachtung einer gesteigerten TRPC3 Expression in humanem Gefäßendothel von Patienten mit maligner Hypertonie ein diagnostisches Hilfsmittel dar, um die teilweise schwierig voneinander zu differenzierenden Krankheitsbilder der malignen Hypertonie und des Diarrhö-assoziierten Hämolytisch-urämischen Syndroms trennen zu können.

Seite 17 – 21: Thilo F, Loddenkemper C, Berg E, Zidek W, Tepel M. Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension. *Modern Pathology*. 2009;22:426-30.

### **2.1.3. TRP Kanal Expression im Nierenkortexgewebe von Patienten mit Hypertonie**

Die bisher geschilderten Studienergebnisse und neuere Literatur (24) deuten darauf hin, dass TRPC3 Kanäle eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation spielen. Die Expression des TRPC3 Kanals in humanem Nierenkortexgewebe wurde bisher allerdings nicht mit der Blutdruckregulation in Verbindung gebracht.

Deshalb wurden Transkripte des TRPC3 Kanals, des von Willebrand Faktors, und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptors Typ 2 (VEGFR-2) in humanem Nierenkortexgewebe von 50 konsekutiven Patienten, die sich einer Tumornephrektomie unterzogen, mit Hilfe der RT-PCR quantifiziert.

Dabei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von VEGFR-2 und TRPC3. Weiterhin fand sich, dass die Expression der TRPC3 Transkripte bei Patienten mit einem systolischen Blutdruck von mehr als 140 mmHg signifikant höher lag als bei Patienten mit einem systolischen Blutdruck von 140 mmHg oder weniger. Ein Sachverhalt, der sich wie o. a. dadurch erklären könnte, dass ein gesteigerter Calcium Einstrom durch TRPC3 Kanäle die Ausschüttung zahlreicher vom Endothel gebildeter vasokonstringierender Wirkstoffe auslöst, wie z.B. Endothelin, Urotensin oder Epoxyeicosatrien-Säuren (EET) (21,22,23).

Eine Beschränkung der Studie besteht darin, dass das Gefäßendothel möglicherweise nicht die einzige Quelle für die TRPC3 Expression im Nierenkortexgewebe darstellt. Es sollte deshalb in Betracht gezogen werden, dass die Expression des TRPC3 Kanals in anderen Zellen, z.B. in Tubuluszellen, ebenfalls zur Blutdruckregulation beiträgt, z.B. durch eine Interaktion mit dem Natriumchlorid Haushalt.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Studie erstmals unmittelbare Belege dafür gefunden, dass die TRPC3 Expression in humanem Nierenkortexgewebe mit der Blutdruckregulation vergesellschaftet ist.

Seite 23 – 29: Thilo F, Baumunk D, Krause H, Schrader M, Miller K, Loddenkemper C, Zakrzewicz A, Krueger K, Zidek W, Tepel M. Transient receptor potential canonical type 3 channels and blood pressure in humans. *Journal of Hypertension*. 2009;27:1217-23.

#### **2.1.4. TRP Kanal Expression in zerebralen Gefäßen von Patienten mit Hypertonie**

Jüngste Studien in Tiermodellen deuten darauf hin, dass TRP Kanäle auch bei der Vasokonstriktion von zerebralen Arterien beteiligt sind. Beobachtungen an Hunden zeigen, dass ein gesteigerter Calcium Einstrom durch TRP Kanäle einen Vasospasmus nach Subarachnoidal Blutung hervorrufen kann (25). Xi et al. (26) zeigten, dass IP3 zerebrale Arterien durch eine IP3 Rezeptor-vermittelte TRPC3 Kanal Aktivierung konstringiert.

Nun wurde die Hypothese geprüft, dass die TRPC3 Expression in humanen zerebralen Gefäßen, die von 11 konsekutiven Patienten gewonnen wurden, die sich einer routinemäßigen neurochirurgischen Operation unterzogen, verändert ist. Sieben Patienten litten dabei an einer hypertensiven intrazerebralen Blutung und vier normotensive Patienten an einem Gehirntumor (Glioblastom).

Zwischen der TRPC3 Expression und dem systolischen Blutdruck wurde eine signifikante negative Korrelation gefunden. Die TRPC3 mRNA Expression war in den zerebralen Gefäßen der Patienten nach hypertensiver intrazerebraler Blutung signifikant vermindert. Die gewonnen Daten könnten auf Mechanismen und Faktoren hindeuten, durch die die TRPC3 Expression in zerebralen Arterien reguliert wird. Einer dieser Faktoren scheint die Hypoxie zu sein. Um den Effekt der Hypoxie auf die Expression der TRP Kanäle zu untersuchen, wurde die Expression des Hypoxie induzierten Faktors (HIF) in den zerebralen Gefäßen analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung des HIF in der Gruppe der Patienten nach hypertensiver intrazerebraler Blutung. Folglich könnte die Hypoxie in den Patienten mit Gehirntumor stärker ausgeprägt sein als in Patienten nach hypertensiver intrazerebraler Blutung. Es wurde außerdem eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression der HIF mRNA und der Expression der TRPC3 mRNA beobachtet. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Untersuchungen, die zeigten, dass HIF die Expression des TRPC1 und des TRPC6 Kanals als Reaktion auf eine chronische Hypoxie in glatten Gefäßmuskelzellen in Pulmonalarterien steigert (27). Vor kurzem

berichteten Yang et al. (28), dass in HEK-293 Zellen, die einer akuten Hypoxie über 10 min ausgesetzt waren, die elektrophysiologische Aktivität der TRPC3 Kanäle gesteigert ist, die TRPC3 Protein Expression aber nicht verändert ist.

Zusammenfassend stützen die gewonnenen Daten die Hypothese, dass TRPC3 mit dem Blutdruck und der Hypoxie vergesellschaftet ist.

Seite 32 – 36: Thilo F, Suess O, Liu Y, Tepel M. Decreased Expression of Transient Receptor Potential Channels in Cerebral Vascular Tissue from Patients After Hypertensive Intracerebral Hemorrhage. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2011;33:533-7.

## **2.2. TRP Kanal Expression bei Diabetes mellitus**

### **2.2.1. TRP Kanal Expression in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus**

Kardiovaskuläre Erkrankungen durch Arteriosklerose bilden eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus (29). Studien haben gezeigt, dass Hyperglykämie einen unmittelbaren und unabhängigen Risikofaktor für die Arteriosklerose darstellt (30). Die Arteriosklerose ist eine entzündliche Erkrankung, bei der es zu einer Akkumulation von Monozyten in der Arterienwand kommt (3). Monozyten sind Übergangszellen, die eine kurze Halbwertszeit aufweisen weil sie sich rasch in Makrophagen weiter differenzieren, und die zügig zu Entzündungsherden rekrutiert werden (31,32). Die Aktivierung der Monozyten, deren Adhäsion ans Endothel und deren Auswanderung in den subendothelialen Raum stellen wesentliche Schritte während der frühen Pathogenese der Arteriosklerose dar. Die Mechanismen, durch die die beim Diabetes mellitus vermehrte Glukose die Monozyten-assoziierte Arteriosklerose unterstützt, sind nur teilweise bekannt. Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus bilden aufgrund chronisch erhöhter Glukose-Spiegel auch verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (33,34,35). Zusätzlich ist eine verstärkte Aktivierung der Monozyten bei Patienten mit Diabetes mellitus mit einer erhöhten Aktivität der Protein Kinase C und gesteigerten zytosolischen Calcium Konzentrationen vergesellschaftet (36,37,38). Nur wenige Studien haben bisher die Expression der TRPC Kanäle unter diabetischen Bedingungen untersucht. Eine Studie berichtet über die Regulation von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 Kanälen und einem beeinträchtigten kapazitativen Calcium Einstrom in Gefäßen von diabetischen Patienten im Vergleich zu Gefäßen von nicht-diabetischen Patienten (39).

Es wurde nun eine Studie durchgeführt, bei der humane Monozyten unter Kontrollbedingungen (5.6 mmol/L D-Glukose), unter erhöhter Glukose (30mmol/L D-Glukose oder L-Glukose), unter 100 µmol/L Peroxynitrit (ONOO), oder unter erhöhter Glukose in Anwesenheit des Superoxiddismutase Mimetikums Tempol (TMP; 100 µmol/L) kultiviert wurden. Die Expression der TRPC mRNA und der TRPC Proteine wurde mit Hilfe der quantitativen real-time RT-PCR bzw. des quantitativen

in-cell Western Assays untersucht. Der Calcium Einstrom und intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies wurden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt.

Die dabei gefundenen Daten zeigen, dass durch oxidativen Stress, der durch erhöhte D-Glukose induziert wird, die Expression der TRPC3 und TRPC6 mRNA und die Expression des TRPC3 und TRPC6 Kanal Proteins in Monozyten gesteigert wird. Der stimulierende Effekt der erhöhten Glukose konnte durch gleichzeitige Gabe von TMP geblockt werden, was die Bedeutung des verstärkten oxidativen Stresses durch erhöhte D-Glukose noch unterstreicht. Kürzlich zeigten Shanmugam et al., dass erhöhte Glukose die Expression von zahlreichen inflammatorischen Zytokinen in Monozyten in einer vom oxidativen Stress abhängigen Weise steigert (40). Die nun gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Daten von Shanmugam et al., indem sie zeigen, dass die durch erhöhte Glukose gesteigerte Expression der TRPC Kanäle mit einer Vermehrung des inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor einhergeht. Erhöhte Glukose steigert die Expression des Tumornekrosefaktors sogar noch stärker als ONOO. Dies könnte darauf hindeuten, dass unabhängig vom oxidativen Stress auch andere Signalwege, wie z.B. der Polyol Signalweg, zur verstärkten Entzündungsreaktion bei Diabetes mellitus beitragen (41).

Es lässt sich also festhalten, dass oxidativer Stress, der durch erhöhte Glukose induziert wird, Monozyten aktiviert, und zwar einerseits durch vermehrte inflammatorische Zytokine und andererseits durch gesteigerte TRPC Kanal Expression mit konsekutiv verbessertem transmembranären Calcium Einstrom.

Um außerdem abschätzen zu können, ob eine gesteigerte TRPC mRNA Expression ein Charakteristikum des Diabetes mellitus darstellt, wurde die TRPC mRNA Expression in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Kontrollpatienten gemessen. Dabei wurde beobachtet, dass die Expression der TRPC6 mRNA in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu Kontrollpatienten gesteigert ist.

Zusammenfassend zeigt die beschriebene Studie also, dass oxidativer Stress, der durch erhöhte Glukose induziert wird, die Expression des TRPC3 und TRPC6 Kanals sowie

den Calcium Einstrom in humanen Monozyten steigert. Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf einen neuen Signalweg zur Aktivierung der Monozyten und damit der Arteriosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus hin.

Seite 40 – 45: Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes*. 2010;59:844-9.

### **2.2.2. TRP Kanal Expression in Podozyten von Patienten mit Diabetes mellitus**

Podozyten sind von entscheidender Bedeutung für die glomeruläre Filterfunktion der Niere. Änderungen der Podozytenfunktion sind von pathogenetischer Relevanz bei proteinurischen Nierenerkrankungen des Menschen. Die Fußfortsätze der Podozyten formen die Schlitzmembran, die ein komplexes Gitter mit Schlitzen darstellt, die durch extrazelluläre Protein-Protein Kontakte überbrückt werden (42). TRPC6 Kanäle werden in den Fußfortsätzen der Podozyten exprimiert. Änderungen der TRPC Kanal Expression werden mit Gefäß- und Nierenerkrankungen assoziiert (43). Als orientierende Regel, scheint eine gesteigerte TRPC Kanal Expression mit einem vermehrten Calcium Einstrom und einer erhöhten Zell-Aktivität vergesellschaftet zu sein. Bei der familiären fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) wurden sieben verschiedene Mutationen im TRPC6 Kanal in sieben unterschiedlichen Familien identifiziert. Vier dieser sieben Mutationen (R895C, E897K, P112Q und Q889K) zeichnen für einen signifikant höheren Calcium Einstrom im Vergleich zum TRPC6 Wildtyp verantwortlich (44). Diese gain-of-function Mutanten des TRPC6 Kanals in Podozyten waren mit Proteinurie und chronischer Niereninsuffizienz vergesellschaftet (45,44). Mutationen des TRPC6 Kanals scheinen jedoch eine große Ausnahme darzustellen. Santin et al. analysierten TRPC6 Mutationen bei 130 spanischen Patienten aus 115 nicht-verwandten Familien mit FSGS. Dabei fanden sich nur drei Fälle einer missense-Mutation, also einer Mutation bei der eine andere Aminosäure kodiert wird, was darauf hindeutet, dass in einer Kohorte von Patienten mit proteinurischer Nierenerkrankung TRPC6 Kanal Mutationen nur in ungefähr 2 % der betroffenen Patienten zu finden sind (46).

In einer Studie wurde nun die Expression der TRPC Kanäle in Nierengewebe und insbesondere in Nierenglomerula und Podozyten bei Patienten mit diabetischer Nierenerkrankung und Kontrollpatienten mit Hilfe der Immunfluoreszenz und Immunhistochemie untersucht.

Dabei fand sich eine gesteigerte Expression des Wildtyp TRPC6 Kanal Proteins in

Podozyten von Patienten mit diabetischer Nephropathie im Vergleich zu Kontrollpatienten. Die in der Studie gewonnenen Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Expression des TRPC6 Kanals bei der diabetischen Nierenerkrankung verändert ist.

Seite 48 – 56: Thilo F, Liu Y, Loddenkemper C, Schuelein R, Schmidt A, Yan Z, Zhu Z, Zakrzewicz A, Gollasch M, Tepel M. VEGF regulates TRPC6 channels in podocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27:921-9.

## **2.3. TRP Kanal Expression bei chronischer Niereninsuffizienz**

### **2.3.1. TRP Kanal Expression als Funktion der extrazellulären Calcium Konzentration**

Alterationen der extrazellulären Calcium Konzentration treten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) häufig auf. Dabei lassen sich z.B. Veränderungen im Vitamin D Metabolismus, ein erniedrigter Calcitriol Spiegel oder eine verminderte Calcium Konzentration im Serum beobachten (47). Eine erniedrigte Calcium Konzentration im Serum verändert die Calcium Homöostase und kann an der Pathogenese der Hypertonie, der Arteriosklerose, an Gefäßkalkifikationen und an kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein, die bei Patienten mit Urämie häufig auftreten (48,49,50). Die zytosolische freie Calcium Homöostase wird engmaschig reguliert. Zytosolisches Calcium kann durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und den Calcium Einstrom über die Zellmembran gesteigert werden (51). Der Calcium Einstrom wiederum kann über nicht-selektive Kationen Kanäle vermittelt werden, zu denen die TRP Kanäle gehören (43). Kürzlich veröffentlichte experimentelle Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des Calciumsensitiven Rezeptors die Expression des TRPC3 Kanals in Kardiomyozyten in Ratten erhöht (52).

Mithilfe des quantitativen in-cell Western Assays wurde nun die Expression des TRPC3 Kanals in Monozyten von 20 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und 19 Kontrollpatienten gemessen. Dabei wurden die TRPC3 Kanäle durch Immunoblotting unter Verwendung spezifischer Antikörper identifiziert und die Identität der TRPC3 Kanäle zusätzlich durch Massenspektrometrie bestätigt.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten in vivo und in vitro deuten darauf hin, dass extrazelluläres Calcium die Expression des TRPC3 Kanals in humanen Monozyten steigert. So war einerseits in vivo der Anstieg des Serum Calciums während der Hämodialyse Sitzung über 4 h mit einem Abfall der TRPC3 Kanal Expression vergesellschaftet. Andererseits reduzierten in vitro höhere extrazelluläre

Calcium Konzentrationen über 4 h die TRPC3 Kanal Expression in ähnlicher Weise wie zuvor in vivo untersucht. Dabei lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass auch andere Faktoren die TRPC3 Kanal Expression beeinflussen könnten.

Wieso steigert eine niedrige extrazelluläre Calcium Konzentration die Expression des TRPC3 Kanal Proteins?

Es mag spekuliert werden, dass das verminderte extrazelluläre Calcium eine rasche Translokation der TRPC Kanäle aus direkt unter der Plasmamembran in Reserve gehaltenen Vesikeln initiiert. Immerhin sind gegenwärtig die Mechanismen des intrazellulären Transports der TRPC Kanäle in einigen Geweben bekannt (53,54). Eine rasche Translokation von TRPC Kanälen ist nach Aktivierung von HEK-293 Zellen oder Neuronen durch Wachstumsfaktoren beobachtet worden (55). Die These, dass vermindertes extrazelluläres Calcium eine schnelle Translokation von TRPC Kanälen aus direkt unter der Plasmamembran befindlichen Vesikeln bedingt, wird durch die Kürze des Zeitabschnitts gestützt, während dessen die extrazelluläre Calcium Konzentration die TRPC3 Expression beeinflusst. So deuten die in vivo wie in vitro erhobenen Daten darauf hin, dass extrazelluläres Calcium die TRPC3 Expression in humanen Monozyten innerhalb von 4 h beeinflusst. Eine gesteigerte TRPC3 Kanal Protein Expression würde den Calcium Einstrom fördern und ein Wiederauffüllen der intrazellulären Calciumspeicher bedingen (56).

Wie könnte die Erkenntnis, dass erniedrigtes extrazelluläres Calcium mit einem Anstieg der TRPC3 Expression in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vergesellschaftet ist, bei der Behandlung von Patienten helfen?

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Expression des TRPC3 Kanals mit Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie in Verbindung steht. Maßnahmen um eine Steigerung der Expression des TRPC3 Kanals zu verhindern, z.B. durch strenge Kontrolle des Calcium-Spiegels und ggf. adäquater Therapie eines niedrigen Calcium-Spiegels, könnten eine wichtige Ursache für hohen Blutdruck beseitigen.

Seite 59 – 64: Liu Y, Krueger K, Hovsepian A, Tepel M, Thilo F. Calcium-dependent expression of transient receptor potential canonical type 3 channels in patients with chronic kidney disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;514:44-9.

### **2.3.2. TRP Kanal Expression als Funktion des zellulären Redox-Zustands**

Es ist bekannt, dass Homocystein (HC) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant erhöht ist und die Arteriosklerose fördert (57). Bislang ist unklar, ob HC die Arteriosklerose durch etwaige Effekte auf die Expression des TRPC6 Kanals in Monozyten fördert. HC und ACC sind dafür bekannt, die Funktion der Monozyten zu beeinflussen (58,59), und beide enthalten Cysteinreste, die den intrazellulären Redox-Zustand beeinflussen.

Es wurde nun untersucht, ob HC oder ACC die TRPC6 Expression in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Monozyten von Kontrollpatienten verändert. Um zu beurteilen, ob vermehrte Cysteinreste mit einem Anstieg der TRPC6 Transkripte assoziiert sind, wurde zunächst die TRPC6 mRNA in Monozyten von 17 Patienten mit CNI und 19 Patienten ohne CNI verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten mit CNI signifikant höhere HC Spiegel im Vergleich zu Patienten ohne CNI aufweisen. Die Expression der TRPC6 mRNA war signifikant höher in Monozyten von Patienten mit CNI im Vergleich zu Patienten ohne CNI.

Anschließend wurden die Effekte von HC und ACC auf die TRPC6 Kanal Expression in vitro untersucht. Dabei steigerte HC und ACC signifikant die Expression des TRPC6 Kanal Proteins in Monozyten von Patienten mit CNI im Vergleich zu Kontrollbedingungen. In Monozyten von Patienten ohne CNI ließ sich ein ähnlicher Effekt beobachten.

Dabei war der Effekt zumindest von ACC auf die TRPC6 Kanal Expression Zeit- und Konzentrations-abhängig.

Möglicherweise wird die posttranslationale Prozessierung von TRPC6 durch die im HC und ACC enthaltenen Cysteinreste beeinflusst. In der Literatur finden sich Hinweise, dass HC und ACC unterschiedliche Redox Aktivitäten aufweisen, in Abhängigkeit vom lokalen Redox-Zustand (60). Der lokale Redox-Zustand des zellulären Milieus hängt z.B. davon ab, wieviel Serum das Zellkulturmedium enthält.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse an, dass Cysteinreste die TRPC6 Kanal Expression beim Menschen steigern. Bei zukünftigen Untersuchungen an TRPC6 und anderen TRP Kanälen gilt es diesen Sachverhalt zu berücksichtigen, wenn veränderte Expressionsmuster vor dem Hintergrund von Unterschieden im zellulären Redox-Zustand interpretiert werden.

Seite 67 – 72: Thilo F, Liu Y, Krueger K, Foerste N, Wittstock A, Scholze A, Tepel M. Do cysteine residues regulate transient receptor potential canonical type 6 (TRPC6) channel protein expression? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012;16:452-7.

### 3. Diskussion

Die Forschung an Transient Rezeptor Potential (TRP) Kationen Kanälen begann mit der Entdeckung der TRP Kanäle in *Drosophila*. Eine der ersten Entdeckungen war, dass eine Spontanmutation im TRP Gen zu einer blinden Mutante während verlängertem intensiven Lichteinfluss führte (61). Später wurde herausgefunden, dass die TRP Kanäle in sehr vielen Spezies konserviert sind. Es stellte sich heraus, dass TRP Kanäle eine wichtige Rolle u.a. bei der Initiierung von Schmerzreizen, der Thermoregulation, der Speichelsekretion, aber auch bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen spielen und mit kardiovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet sind. Letzteres stellt den Fokus der vorgestellten Arbeiten dar.

Die über die TRP Kanäle bei verschiedenen Erkrankungen und in unterschiedlichen Zelltypen gesammelten Daten, unterstreichen die Bedeutung der TRP Kanäle durch die schiere Vielzahl der Prozesse, bei denen diese Kanäle beteiligt sind (43). Die Studien verdeutlichen auch, dass eine krankheitsspezifische Überexpression der TRP Kanäle ein diagnostisches Kriterium darstellen kann. So hat sich in der Arbeit über die maligne Hypertonie gezeigt, dass die gesteigerte Expression des TRPC3 Kanals in präglomerulären Arteriolen bei der malignen Hypertonie ein nützliches Kriterium darstellt, um diese Erkrankung vom Hämolytisch-urämisches Syndrom zu differenzieren.

Da TRP Kanäle sich in Form von Homo- oder Heterotetrameren organisieren, geht die veränderte Expression einer TRPC Kanal Klasse wohl Hand in Hand mit der geänderten Expression einer anderen. In dieser Hinsicht deuten die gewonnenen Ergebnisse z.B. auf eine inverse Beziehung zwischen der Expression des TRPC3 Kanals und des TRPC6 Kanals, zumindest beim Krankheitsbild der Hypertonie und in Hinblick auf die Stimulierung durch VEGF. Tatsächlich bildet die heterotetramere Erscheinungsform der TRPC Kanäle ein Charakteristikum, das die Forschung an TRPC Kanälen herausfordernd und die Interpretation der experimentellen Daten schwierig macht.

Das Wissen um spezifische Aktivatoren oder Inhibitoren der TRP Kanäle ist bislang

rar. In den durchgeführten Studien wurde als spezifischer Aktivator des TRPC6 Kanals z.B. nur Hyperforin verwendet (62). In dieser Hinsicht sind dringend mehr Studien erforderlich. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse bietet sich dabei insbesondere das Krankheitsbild des Diabetes mellitus als attraktives Forschungsgebiet an.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, obgleich die vorgelegten Arbeiten einen eindeutigen Imperativ zur Aktivierung oder Hemmung der TRP Kanäle bei verschiedenen Krankheiten schuldig bleiben müssen, sie nichtsdestoweniger wichtige experimentelle Daten zur Planung zukünftiger Studien auf dem Gebiet der TRP Kanal Forschung bieten.

## 4. Zusammenfassung

Die zusammenfassende Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass eine veränderte Transkript- und Protein-Expression der Transient Receptor Potential (TRP) Kationen Kanäle einen Einfluss auf die Pathogenese der Hypertonie, des Diabetes mellitus und der chronischen Niereninsuffizienz hat.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie verbessert ein gesteigerter Calcium Einstrom durch vermehrt exprimierte TRPC3 Kanäle die Aktivierung der Monozyten. Die seltene maligne Hypertonie ist beim Menschen mit einer gesteigerten Expression des TRPC3 Kanals in präglomerulären Arteriolen vergesellschaftet und grenzt sich dadurch vom Diarrhö-assoziierten Hämolytisch-urämischen Syndrom ab. Die TRPC3 Expression in Nierenkortexgewebe und in zerebralen Gefäßen ist eine Funktion des Blutdrucks.

Beim Diabetes mellitus steigert der durch erhöhte D-Glukose induzierte oxidative Stress die Expression der TRPC Kanäle und den Calcium Einstrom in Monozyten. Dies stellt einen neuen Signalweg zur Aktivierung der Monozyten und zur Pathogenese der Arteriosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus dar. Bei Patienten mit Diabetes mellitus und proteinurischer Nierenerkrankung ist die Expression des TRPC6 Kanals in Podozyten gesteigert und wird durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) reguliert.

Vermindertes extrazelluläres Calcium, wie es z.B. bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auftritt, steigert die Expression des TRPC3 Kanal Proteins in Monozyten. Acetylcystein und Homocystein erhöhen die Expression der TRPC6 Kanäle in Monozyten, insbesondere bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine veränderte Transkript- und Protein-Expression der TRP Kanäle in der Tat die Pathogenese der Hypertonie, des Diabetes mellitus und der chronischen Niereninsuffizienz beeinflussen.

## 5. Literaturangaben

- 1 Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-52.
- 2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
- 3 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
- 4 Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:123-7.
- 5 Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 2002;108:595-8.
- 6 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;18:1503-7.
- 7 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;24:1105-14.
- 8 Dietrich A, Mederos Y, Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja 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<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6980-9. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2005;25:11191.
- 9 Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1999;34:113-7.

- 10 Poch E, Botey A, Gaya J, Darnell A, Rivera F, Revert L. Intracellular calcium concentration and activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in essential hypertension. *Kidney Int.* 1994;45:1037-43.
- 11 Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of angiotensin II and endothelin-1 on platelet aggregation and cytosolic pH and free Ca<sup>2+</sup> concentrations in essential hypertension. *Hypertension.* 1993;22:853-62.
- 12 Wirtz PH, von Känel R, Frey K, Ehlert U, Fischer JE. Glucocorticoid sensitivity of circulating monocytes in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2004;17:489-94.
- 13 Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubyak GR. Essential role for Ca<sup>2+</sup> in regulation of IL-1beta secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C286-99.
- 14 Zhou X, Yang W, Li J. Ca<sup>2+</sup>- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281:31337-47.
- 15 Kitiyakara C, Guzman NJ. Malignant hypertension and hypertensive emergencies. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:133-42.
- 16 van den Born BJ, Honnebier UP, Koopmans RP, van Montfrans GA. Microangiopathic hemolysis and renal failure in malignant hypertension. *Hypertension.* 2005;45:246-51.
- 17 Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, Igarashi T, Tarr PI. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2002;346:23-32. Erratum in: *N Engl J Med* 2002;346:715.
- 18 Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis.* 1990;162:553-6.
- 19 Ruggenenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic

- uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int.* 2001;60:831-46.
- 20 Shibagaki Y, Fujita T. Thrombotic microangiopathy in malignant hypertension and hemolytic uremic syndrome (HUS)/ thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): can we differentiate one from the other? *Hypertens Res.* 2005;28:89-95.
- 21 Fleming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension.* 2006;47:629-33.
- 22 Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res.* 2006;29:375-87.
- 23 Thijssen DH, Rongen GA, Smits P, Hopman MT. Physical (in)activity and endothelium-derived constricting factors: overlooked adaptations. *J Physiol.* 2008;586:319-24.
- 24 Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, Ito Y. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res.* 2006;99:119-31.
- 25 Xie A, Aihara Y, Bouryi VA, Nikitina E, Jahromi BS, Zhang ZD, Takahashi M, Macdonald RL. Novel mechanism of endothelin-1-induced vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1692-701.
- 26 Xi Q, Adebisi A, Zhao G, Chapman KE, Waters CM, Hassid A, Jaggar JH. IP3 constricts cerebral arteries via IP3 receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res.* 2008;102:1118-26. Erratum in: *Circ Res.* 2009;105:e1.
- 27 Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res.* 2006;98:1528-37.
- 28 Huang JH, He GW, Xue HM, Yao XQ, Liu XC, Underwood MJ, Yang Q. TRPC3 channel contributes to nitric oxide release: significance during normoxia and hypoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Res.* 2011;91:472-82.

- 29 Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med.* 2004;141:413-20.
- 30 Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes.* 2005;54:1-7.
- 31 Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71-82.
- 32 Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard XY, Ma R, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, Ballantyne CM. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation.* 2009;119:2708-17.
- 33 Orié NN, Zidek W, Tepel M. Increased intracellular generation of reactive oxygen species in mononuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus type 2. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108:175-80.
- 34 Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes.* 1988;37:832-7.
- 35 Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2970-3.
- 36 Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes.* 2005;54:2779-86.
- 37 Ceolotto G, Gallo A, Miola M, Sartori M, Trevisan R, Del Prato S, Semplicioni A, Avogaro A. Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes.* 1999;48:1316-22.
- 38 Caimi G, Canino B, Ferrara F, Montana M, Meli F, Catania A, Lo presti R. Leukocyte flow properties, polymorphonuclear membrane fluidity, and cytosolic Ca<sup>2+</sup> content in subjects with vascular atherosclerotic disease with and without noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Angiology.* 1996;47:757-63.

- 39 Chung AW, Au Yeung K, Chum E, Okon EB, van Breemen C. Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. *Eur J Pharmacol.* 2009;613:114-8.
- 40 Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes.* 2003;52:1256-64.
- 41 Gleissner CA, Sanders JM, Nadler J, Ley K. Upregulation of aldose reductase during foam cell formation as possible link among diabetes, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1137-43.
- 42 Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83:253-307.
- 43 Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007;87:165-217.
- 44 Heeringa SF, Möller CC, Du J, Yue L, Hinkes B, Chernin G, Vlangos CN, Hoyer PF, Reiser J, Hildebrandt F. A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One.* 2009;4:e7771.
- 45 Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science.* 2005;308:1801-4.
- 46 Santín S, Ars E, Rossetti S, Salido E, Silva I, García-Maset R, Giménez I, Ruíz P, Mendizábal S, Luciano Nieto J, Peña A, Camacho JA, Fraga G, Cobo MA, Bernis C, Ortiz A, de Pablos AL, Sánchez-Moreno A, Pintos G, Mirapeix E, Fernández-Llama P, Ballarín J, Torra R; FSGS Study Group, Zamora I, López-Hellin J, Madrid A, Ventura C, Vilalta R, Espinosa L, García C, Melgosa M, Navarro M, Giménez A, Cots JV, Alexandra S, Caramelo C, Egido J, San José MD, de la Cerda F, Sala P, Raspall F, Vila A, Daza AM, Vázquez M, Ecija JL, Espinosa M, Justa ML, Poveda R, Aparicio C, Rosell J, Muley R, Montenegro

- J, González D, Hidalgo E, de Frutos DB, Trillo E, Gracia S, de los Ríos FJ. TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:3089-96.
- 47 Moe SM, Drüeke TB. Management of secondary hyperparathyroidism: the importance and the challenge of controlling parathyroid hormone levels without elevating calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product. *Am J Nephrol*. 2003;23:369-79.
- 48 Mazzaferro S, Pasquali M, Pugliese F, Barresi G, Carbone I, Francone M, Sardella D, Taggi F. Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol*. 2007;27:75-83.
- 49 London GM, Marchais SJ, Guérin AP, Métivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:525-31.
- 50 Scholze A, Maier A, Stocks F, Karamohamad F, Vetter R, Zidek W, Tepel M. Sustained increase of extracellular calcium concentration causes arterial vasoconstriction in humans. *J Hypertens*. 2005;23:2049-54.
- 51 Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*. 2000;287:1604-5.
- 52 Feng SL, Sun MR, Li TT, Yin X, Xu CQ, Sun YH. Activation of calcium-sensing receptor increases TRPC3 expression in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:278-84.
- 53 Gees M, Colsoul B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a003962.
- 54 Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*. 2011;12:218.
- 55 Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol*. 2004;6:709-20.
- 56 Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 2005;85:757-810.

- 57 Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation*. 2004;109:369-74.
- 58 Jensen T, Kharazmi A, Schiøtz PO, Nielsen H, Stenvang Pedersen S, Stafanger G, Koch C, Høiby N. Effect of oral N-acetylcysteine administration on human blood neutrophil and monocyte function. *APMIS*. 1988;96:62-7.
- 59 Splaver A, Lamas GA, Hennekens CH. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *Am Heart J*. 2004;148:34-40.
- 60 Chan ED, Riches DW, White CW. Redox paradox: effect of N-acetylcysteine and serum on oxidation reduction-sensitive mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:627-32.
- 61 Minke B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet*. 2010;24:216-33.
- 62 Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J*. 2007;21:4101-11.

## **Danksagung**

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Betreuer, Mentoren und Unterstützer, Professor Martin Tepel und Professor Walter Zidek.

Dass es über all die Jahre so viel Spaß gemacht hat und dass die Arbeit jetzt in dieser Form vorliegt, ist in allererster Linie Martin Tepels Verdienst.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die über die Jahre wesentlich zu diesem Projekt beigetragen haben, insbesondere: Yoland Anistan, Daniel Baumunk, Erika Berg, Thomas Burmeister, Nora Förste, Ulrich Gergs, Maik Gollasch, Christian Harteneck, Anahit Hovsepian, Waltraut Jekabsons, Katharina Krüger, Daoyan Liu, Ying Liu, Christoph Loddenkemper, Knut Mai, Antje Schmidt, Alexandra Scholze, Ralf Schülein, Nico Schulz, Simone Spieckermann, Olaf Süß, Antje Wittstock, Tilo Wunsch, Andreas Zakrzewicz und Zhiming Zhu.

Ohne meine Familie und Freunde hätte diese Arbeit keinen Sinn gemacht.

Und überhaupt.

## **Erklärung**

### **ERKLÄRUNG**

#### **§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité**

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 23. November 2011

Dr. med. Florian Thilo, MBA