

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

DISSERTATION

Einfluss von arterieller Hypertonie und chronischer Niereninsuffizienz
auf die Gefäßeigenschaften und Methylierung der TRPC3- und TRPC6-
Promotorstelle

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kamen Ivanov

aus Sofia, Bulgarien

Datum der Promotion: 12.09.2014

Abstract.....	6
1. Einleitung.....	10
1.1 Arterielle Hypertonie	10
1.2 Niereninsuffizienz.....	11
1.3 Epigenetik.....	12
1.3.1 DNA-Methylierung	12
2. Geräte und Materialien	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Materialien	15
2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut	15
2.2.2 Isolierung von DNA	16
2.2.3 Bisulfitbehandlung der DNA	16
2.2.4 Methylierungsspezifische PCR	17
3. Methoden	20
3.1 Charakterisierung der Patienten	20
3.2 Applanationstonometrie	27
3.3 Digitale Photoplethysmographie	29
3.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut.....	32
3.5 Isolierung von DNA.....	33
3.6 Analyse der DNA Methylierung.....	34
3.6.1 Bisulfitbehandlung der DNA	34
3.6.2 Methylierungsspezifische PCR	34
3.6.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.6.2.2 Grundlagen der Real-Time PCR mit SYBR Green I.....	36
3.6.2.3 Durchführung der Real-Time PCR	36
3.7 Statistik.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1 Allgemein.....	38
4.2 Arterielle Steifigkeitsmessung.....	42
4.2.1 Applanationstonometrie	42
4.2.2 Reflektiver Index	45
4.3 Analyse der DNA Methylierung.....	46
4.3.1 Methylierungsspezifische PCR	46
4.3.1.1 Methylierung der TRPC3-Promotorstelle.....	46

4.3.1.2	Methylierung der TRPC6-Promotorstelle.....	49
5.	Diskussion	52
5.1	Arterielle Gefäßsteifigkeit.....	52
5.2	Reflektiver Index.....	53
5.3	Methylierungszustand der TRPC3- und TRPC6-Promotorregionen	54
6.	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	57
	Eidesstattliche Versicherung	68
	Lebenslauf	69
	Danksagung.....	70

Abkürzungen

bp	Basenpaare
C1	Compliance der großen Gefäße
C2	Compliance der kleinen Gefäße
CET	cardiac ejection time (Herzauswurfzeit)
CO	Herzzeitvolumen
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRF	Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDHF	endothelium derived hyperpolizing factor
EDRF	endothelium derived relaxing factor, Synonyme: NO oder Stickstoffmonoxid
GC-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HF	Herzfrequenz
HT	essentielle Hypertonie bzw. Patienten mit essentieller Hypertonie
Kb	Kilo-Basenpaare
KÖF	Körperoberfläche
M	methylierte Sequenz
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (mean arterial pressure)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP-PCR	methylierungsspezifische PCR
NKF	National Kidney Foundation
NT	normoton (Kontrollgruppe)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RI	reflektiver Index
RI _{15sec}	reflektive Indizes als Mittel aller Pulswellen der ersten 15 Sekunden nach Stau
rpm	Rotationen pro Minute
RR	Blutdruck
PP	Pulsdruck (pulse pressure)

RR _{sys}	systolischer Blutdruckwert
S1	arterielle Steifigkeit der großen Gefäße ($S1 = 10/C1$)
S2	arterielle Steifigkeit der kleinen Gefäße ($S2 = 100/C2$)
SV	Schlagvolumen
SVR	systemic vascular resistance (totaler peripherer Widerstand)
TRPC3	Transient receptor potential cation channel 3
TRPC6	Transient receptor potential cation channel 6
U	unmethylierte Sequenz
WHO	World Health Organisation

Abstract

Einleitung. Die arterielle Hypertonie und die chronische Niereninsuffizienz stellen zwei häufige Erkrankungen des modernen Zeitalters dar. Beide gehören zu den wichtigsten Risikofaktoren für arteriosklerotische Gefäßveränderungen und kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Studien in Nagetiermodellen und in diversen menschlichen Geweben haben gezeigt, dass die TRPC3- und TRPC6-Expression bei Hypertonie signifikant verändert ist. Epigenetische Veränderungen in der Promotorregion können zu einer Veränderung der Genexpression führen. Die DNA-Methylierung von CpG-Inseln stellt dabei eine der bedeutsamsten epigenetischen Regulationsmechanismen dar. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Methylierung der TRPC3- und der TRPC6-Promotorstelle mit essentieller Hypertonie assoziiert ist.

Methodik. Die Gefäßsteifigkeit der großen und kleinen Gefäße (S1 und S2) wurde mittels Applanationstonometrie ermittelt. Der reflektive Index (RI) und die endotheliale Funktion wurden mit Hilfe der digitalen Photoplethysmographie bestimmt. Der Methylierungszustand der TRPC3- und TRPC6- Promotorstellen wurde durch Methylierungsspezifische PCR (MSP) in humanen Monozyten untersucht (TRPC3 n=121, TRPC6 n=44).

Ergebnisse. Die Patienten mit essentieller Hypertonie hatten signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe in Bezug auf die arterielle Steifigkeit der großen (S1) und kleinen Gefäße (S2). Zwischen den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und der Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich S1 und S2. Es zeigte sich eine positive Korrelation sowohl zwischen S1 als auch zwischen S2 und dem Pulsdruck. Es ergab sich keine Korrelation zwischen S1, sowie S2 und der Kreatinin-Clearance.

Der RI war unter den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die endotheliale Funktion gemessen an der reflektiven Hyperämie war bei der Kontrollgruppe signifikant besser als bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem Methylierungszustand der vermuteten TRPC3- und TRPC6-Promotorstellen zwischen Patienten mit essentieller Hypertonie, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und der normotensiven Kontrollgruppe (bei der TRPC6 wurden nur die Patienten mit essentieller Hypertonie und die normotensive Kontrollgruppe untersucht). Die Patienten, bei denen das vermutete TRPC3- bzw. TRPC6-Promotorregion methyliert war (unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit), hatten signifikant höhere diastolische Blutdruckwerte.

Schlussfolgerung. Die arterielle Gefäßsteifigkeit war bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Gefäßsteifigkeit zeigte aber keine Korrelation mit der Nierenfunktion.

Die endotheliale Funktion war bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant reduziert im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

In dieser Arbeit konnte keine Assoziation zwischen dem Methylierungszustand der TRPC3- und TRPC6-Promotorstellen und essentieller Hypertonie beobachtet werden. Methylierungen in der TRPC3- bzw. TRPC6-Promotorregion könnten jedoch mit erhöhten diastolischen Blutdruckwerten in Verbindung stehen.

Abstract

Introduction. Arterial hypertension and chronic kidney disease are two common modern age diseases. Both are major risk factors for arteriosclerotic vessel changes and cardiovascular morbidity and death.

TRPC3 and TRPC6 expression is significantly altered in hypertension in rodents and humans in monocytes, endothelial cells and vascular smooth muscle cells. Epigenetic changes of the promoter region of genes are a well established cause for altered gene expression. A very common form of epigenetic attenuation is methylation of cytidin-residues of cytosine-guanosine-dinucleotides by DNA-methyltransferase. In the present study, we hypothesized that methylation of the predicted promoter region of TRPC3 and TRPC6 is associated with essential hypertension.

Methods. The arterial stiffness (S1 and S2) was measured using applanation tonometry. For the measurement of the reflective index (RI) und the reactive hyperaemia we used digital photoplethysmography. TRPC3 and TRPC6 promoter methylation was evaluated by using methylation-specific PCR (MSP) in human monocytes (TRPC3 n=121, TRPC6 n=44).

Results. Patients with essential hypertension had significantly stiffer vessels (S1 and S2) compared with the control group. There was no significant difference between the arterial stiffness of the patients with chronic renal failure and the control group. We saw a positive correlation between S1, S2 and the pulse pressure, but no correlation between S1, S2 and the creatinine clearance.

The reflective index showed no significant difference between the groups. The endothelial function was reduced in patients with chronic kidney disease compared to the control group.

Promoter methylation of TRPC3 was not altered in monocytes of patients with arterial hypertension in comparison to patients with chronic kidney disease or in comparison to patients with normal blood pressure. Promoter methylation of TRPC6 was also not altered in monocytes of patients with arterial hypertension in comparison to patients with normal blood pressure. Patients with methylated TRPC3 or TRPC6 promoter had significantly higher diastolic blood pressure.

Conclusion. The arterial stiffness (S1, S2) was significantly higher in patients with essential hypertension compared to the control group. There was no correlation between the arterial stiffness and the kidney function.

The endothelial function was significantly reduced in patients with chronic renal disease compared to the control group.

The present study did not find evidence that arterial hypertension is associated with altered TRPC3 or TRPC6 promoter methylation in humans.

1. Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie

Der arterielle Blutdruck wird als Produkt von Herzzeitvolumen und Gefäßwiderstand definiert. Eine Hypertonie ist Folge eines erhöhten Herzzeitvolumen, eines erhöhten peripheren Widerstandes oder beider Faktoren. Nach Definition der WHO (World Health Organisation) gelten systolische Blutdruckwerte von über 140mmHg und diastolische Blutdruckwerte von über 90mmHg als Hypertonie (Tabelle 1).

Tabelle 1: Deutsche Hochdruckliga DHL (2008): Definitionen und Klassifikation der Blutdruckwerte aus der Leitlinie "Behandlung der arteriellen Hypertonie". (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013.pdf)

<u>Kategorie</u>	<u>Systolisch</u>	<u>Diastolisch</u>
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Hoch Normal	130-139	85-89
Grad 1 Hypertonie (leicht)	140-159	90-99
Grad 2 Hypertonie (mittelschwer)	160-179	100-109
Grad 3 Hypertonie (schwer)	≥ 180	≥ 110
Isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	<90

In Europa liegt die Prävalenz der arteriellen Hypertonie bei ca. 50%. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, bei denen aber eine postmenopausale Zunahme der Inzidenz festzustellen ist. Bis zu 50% der Erkrankten wissen nicht, dass sie einen zu hohen Blutdruck haben. Unter den bekannten Hypertonikern sind mehr als 50% unzureichend oder gar nicht therapiert (Herold, 2012).

Man unterscheidet zwischen der häufigen essentiellen Hypertonie (ca. 90% aller Hypertoniker) und den seltenen sekundären Hypertonieformen (ca. 10% aller Hypertoniepatienten). Bei den sekundären Formen sind organische Störungen als Auslöser festzustellen. Dazu gehören diverse renoparenchymatöse Erkrankungen (z.B. Glomerulonephritis, autosomal dominante polyzystische Nephropathie), die renovaskuläre Hypertonie (Nierenarterienstenose) und die

endokrine Hypertonie (Conn-Syndrom, Phäochromozytom). Weitere Ursachen können eine Aortenisthmusstenose sowie das Schlaf-Apnoe-Syndrom sein. Die essentielle Hypertonie dagegen stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar. Begünstigende Faktoren sind Übergewicht, Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum, vermehrte Kochsalzaufnahme, zunehmendes Alter, Immobilität, psychosozialer Stress (Herold, 2012).

Die arterielle Hypertonie stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar (Domanski et al., 2002). Die arterielle Hypertonie führt zu frühzeitigen arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und damit zum Elastizitätsverlust und zur Endotheldysfunktion. Weitere Komplikationen dieser Erkrankung sind unter anderem die hypertensive Krise, die hypertensive Retinopathie, die hypertensive Kardiomyopathie, die koronare Herzkrankheit, die zerebrale Ischämie, die hypertensive Hirnmassenblutung, die hypertensive Nephropathie, das Bauchaortenaneurysma (10% der männlichen Hypertoniker über 65 Jahre) und die Aortendissektion, bei der 80% der Patienten Hypertoniker sind (Herold, 2012).

1.2 Niereninsuffizienz

Eine chronische Niereninsuffizienz ist Folge einer irreversiblen Einschränkung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen der Nieren. In Westeuropa liegt die Inzidenz bei ca. 10/100.000 pro Jahr (Herold, 2012). Die chronische Niereninsuffizienz wird nach der National Kidney Foundation (NKF) in 5 Stadien eingeteilt. Im Stadium 0 besteht ein erhöhtes Risiko für eine Niereninsuffizienz und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beträgt über 90 ml/min. Die Überwachung der Retentionsparameter sowie die Prophylaxe der Niereninsuffizienz ist bei diesen Patienten ausreichend. Das Stadium 1 ist charakterisiert durch eine Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion. Die GFR beträgt über 90 ml/min. In diesem Fall wird die Behandlung von Begleiterkrankungen und die Verminderung des kardiovaskulären Risikos empfohlen. Im Stadium 2 besteht eine Nierenschädigung mit milder Niereninsuffizienz. Die GFR liegt zwischen 60 und 89 ml/min, aber die therapeutischen Maßnahmen sind dieselben wie im Stadium 1. Das Stadium 3 ist charakterisiert durch eine mittelschwere Niereninsuffizienz mit einer GFR von 30-59 ml/min. Die Therapie und die Diagnostik beziehen sich auf eventuelle Komplikationen der Erkrankung. Im Stadium 4 besteht eine schwere Niereninsuffizienz. Die GFR liegt zwischen 15 ml/min und 29 ml/min. In diesem Stadium sollte man den Patienten zur Nierenersatztherapie vorbereiten. Das Stadium 5 ist definiert als Nierenversagen mit einer GFR von unter 15 ml/min. In diesem Fall besteht die

Behandlung in der Nierenersatztherapie. Die häufigsten Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz sind die diabetische Nephropatie (ca. 35%), primäre und sekundäre Glomerulonephritiden (ca. 15%), chronische tubulo-interstitielle Erkrankungen, hypertensive Nephropathien und polyzystische Nierenerkrankungen (Herold, 2012).

Die chronische Niereninsuffizienz stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar (Locatelli et al., 2000; Sarnak et al., 2003; Saw et al., 2004; London et al., 2005). Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz dar. Die hohe Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen lässt sich dadurch erklären, dass diese Patientengruppe häufig andere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus in der Vorgeschichte hat. Daneben werden weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beobachtet: erhöhter oxidativer Stress (Becker et al., 1997; Himmelfarb et al., 2003; Yeun et al., 2000), Hyperhomocysteinämie (Bachmann et al., 1995; Yeun et al., 2000), erhöhte reaktive Sauerstoffradikale (Tepel et al., 2000; Viziri et al., 2002) und gesteigertes CRP (Yeun et al., 2000).

1.3 Epigenetik

Die Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren, reversiblen DNA-Modifikationen, die die Genexpression regulieren, wobei die DNA-Sequenz unverändert bleibt (Feinberg, 2004). Die verschiedenen Zelltypen eines multizellulären Organismus, die aus einer befruchteten Eizelle entstanden sind, haben das gleiche Genom, aber unterschiedliche Funktionen. Der Grund dafür sind epigenetische Unterschiede. Diese können auch teilweise erklären, warum eineiige Zwillinge phänotypisch unterschiedlich sein können (Fraga et al., 2005). Eine der bedeutsamsten epigenetischen Regulationsmechanismen ist die DNA-Methylierung.

1.3.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung erfolgt durch die Übertragung einer Methylgruppe mit Hilfe von DNA-Methyltransferasen an die C5 Position des Cytosins eines CpG-Dinukleotids. Das Produkt dieser Reaktion ist 5-Methylcytosin. Etwa 70% der CpGs im humanen Genom beinhalten diese Base. 2

bis 5% aller Cytosine liegen methyliert vor. Die CpG-Dinukleotide im Genom kommen zu nur ca. 20% der theoretisch berechneten Häufigkeit vor. Dies lässt sich durch das hohe Mutationspotential dieses Basenpaares erklären (Klose & Bird, 2006). Wegen der chemischen Instabilität von 5-Methylcytosin kann es leicht zu einer spontanen Desaminierung und Entstehung von Thymin kommen (**Abbildung 1**). Diese Base wird nicht als DNA-fremd erkannt und demzufolge auch nicht repariert. Im Genom gibt es jedoch Bereiche mit einer deutlich höheren Dichte von CpG-Dinukleotiden. Diese Regionen werden als CpG-Inseln bezeichnet. Laut der Definition von Gardiner-Garden und Frommer sollen diese mindestens 200 bp lang sein und einen GC-Gehalt von über 50% aufweisen (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Die CpG-Dinukleotide, die nicht in einer CpG-Insel liegen, sind meist methyliert. Umgekehrt sind CpGs, die in einer CpG-Insel liegen, in der Regel nicht methyliert (Klose & Bird, 2006; Eckhardt et al., 2006). Bei einer spontanen Desaminierung von unmethyliertem Cytosin entsteht Uracil - eigentlich eine RNA-Base (**Abbildung 2**). Die zellulären Reparatursysteme erkennen diese als DNA-fremd und ersetzen diese wieder durch Cytosin.

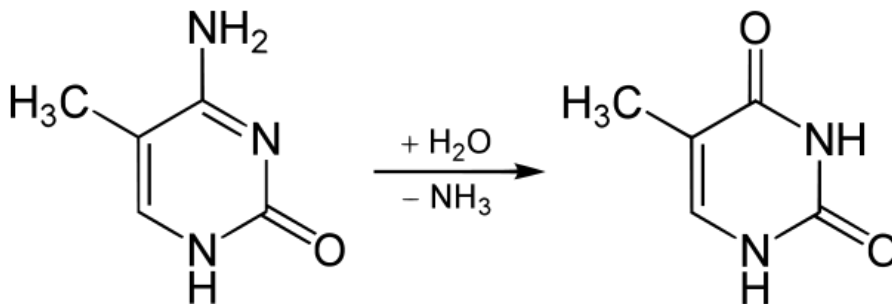


Abbildung 1: Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin

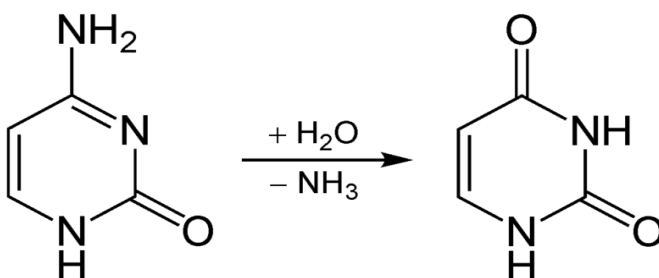


Abbildung 2: Desaminierung von Cytosin zu Uracil

Viele der CpG-Inseln befinden sich in Promotorregionen (Larsen et al., 1992; Gardiner-Garden & Frommer, 1987).

Eine Hypermethylierung der CpG-Inseln führt in den meisten Fällen zu einer Inaktivierung des betroffenen Gens (Klose & Bird, 2006; Eckhardt et al., 2006; Jeltsch, 2010; Zemach et al., 2010). Bekannte Beispiele, bei denen die DNA-Methylierung eine Rolle spielt, sind die X-chromosomale Inaktivierung (Chang et al., 2006), die Geninaktivierung während der Zelldifferenzierung (Dean, Lucifero & Santos, 2005), das Imprinting (Li, Beard & Jaenisch, 1993) und die Karzinogenese (Jones & Baylin, 2002). Heutzutage vermutet man, dass die Methylierung von CpG-Inseln bestimmter Gene in Verbindung mit Hypertonie stehen kann (Frey et al., 2005; Millis, 2011). Neue Studien haben gezeigt, dass epigenetische Alterationen zu pulmonal-arterieller Hypertonie und Präeklampsie führen können (Archer et al., 2010; Chelbi et al., 2007).

2. Geräte und Materialien

2.1 Geräte

Die für alle Methoden verwendeten Geräte sind nachstehend tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2: Geräte

HDI/Pulsewave Research CardioVascular Profiling Instrument	Model CR-2000, Hypertension Diagnostics
Pulsoximeter	Vitaguard VG 3000; getemed, Teltow
Sensor (zu dem Pulsoximeter gehörig)	LNOP Adult SpO2 Sensor, Masimo Corporation, CA, USA
Feinwaage	Sartorius®, Göttingen, Deutschland
Vortexer	Vibrofix VF 1 Electronic, IKA®, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Biometra, UNO II
Rotor-Gene 2000 Real-Time Cycler	Corbett Research, Australia

2.2 Materialien

Alle Materialien sind hier einzeln für die jeweilige Methode aufgeführt.

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut

Histopaque®-1077

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

HBSS (siehe **Tabelle 3**)

Alle Chemikalien zur Herstellung vom HBSS-Puffer wurden über folgende Firmen bezogen: FLUKA Chemika, Steinheim, Deutschland und Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland.

Tabelle 3: Zusammensetzung des HBSS-Puffers (Hank´s Balanced Salt Solution)

	Konzentration (g/l)	molare Masse (mM)
NaCl ₂	7,94	136,00
KCl	0,40	5,40
KH ₂ PO ₄	0,06	0,44
Na ₂ HPO	0,06	0,34
D-Glucose	1,00	5,60
CaCl ₂	0,147	1,00
MgCl ₂	0,203	1,00
HEPES	2,383	10,00

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 1 M Natronlauge (NaOH) auf 7,4 eingestellt.

2.2.2 Isolierung von DNA

QIAamp DNA Mini Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

Reagenzien: Proteinase K, AL-Puffer, AE-Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer, Ethanol (96–100%).

2.2.3 Bisulfitbehandlung der DNA

Epitect Bisulfit Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2.4 Methylierungsspezifische PCR

QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

Primer

Metabion®, Martinsried, Deutschland

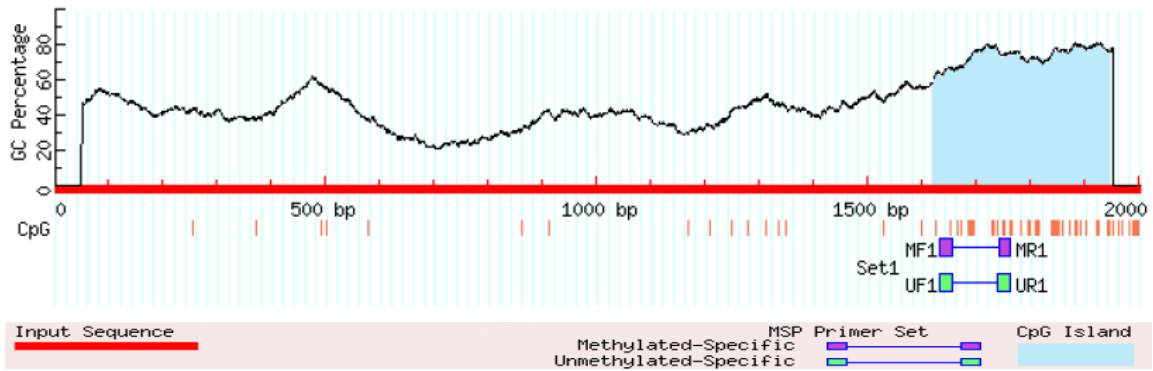
Tabelle 4: TRPC3-Primer

	Sequenz	Größe in Basenpaaren (bp)
Vorwärts M Primer	5' TTGTTTTAGTAAGTGATGTTGTCGG3'	25
Rückwärts M Primer	5' GTAAC TACGACGAAAAA CCG3'	22
Vorwärts U Primer	5' TTGTTTTAGTAAGTGATGTTGTTGG3'	25
Rückwärts U Primer	5' CATAACTACAACAAAAA ACCCAA3'	25

Tabelle 5: TRPC6-Primer

	Sequenz	Größe in Basenpaaren (bp)
Vorwärts M Primer	5' GATTTTGATTTGAGTAGGTTAGGTC3'	25
Rückwärts M Primer	5' GAAAAATACGAAAAATAAAAACGAA3'	25
Vorwärts U Primer	5' TTTTGATTTGAGTAGGTTAGGTTGA3'	25
Rückwärts U Primer	5' AAAAAATACAAAAATAAAAACAAA3'	25

Die vermutete TRPC3-Promotorstelle, 2 kb stromaufwärts (3'-5') von der Transkriptionsstartstelle auf Chromosom 4: 122.872.811-122.874.836 wurde mit Hilfe des Programms Methprimer (www.urogene.org/methprimer/index1.html) (Li et al., 2002) auf CpG-Inseln untersucht. CpG-Inseln wurden dabei über ein GC-Dinukleotidgehalt von mindestens 50% definiert (Rosenberg et al., 2004) (**Abbildung 3**). Dabei wurde eine CpG-Insel mit einer Größe von 329 bp, Start bp 1618 – bp 1946 entdeckt. Die Primer zur Untersuchung der CpG-Inseln wurden mithilfe von Methprimer entworfen.



A

Abbildung 3: TRPC3: Inselregion und Primer

Die vermutete TRPC6-Promotorstelle, 2 kb stromaufwärts (3'-5') von der Transkriptionsstartstelle auf Chromosom 11:101.454.210-101.456.235 (Yu et al., 2009) wurde mit Hilfe des Programms Methprimer (www.urogene.org/methprimer/index1.html) (Li et al., 2002) auf CpG-Inseln untersucht. CpG-Inseln wurden dabei über ein GC-Dinukleotidgehalt von mindestens 50% definiert (Rosenberg et al., 2004) (**Abbildung 4**). Dabei wurden drei CpG-Inseln entdeckt. Insel 1 mit einer Größe von 134 bp, Start bp 47 – bp 180, Insel 2 mit einer Größe von 185 bp, Start bp 190 – bp 374 und Insel 3 mit einer Größe von 111 bp, Start bp 380 – bp 490. Für die weitere Analyse der Methylierung wurde Insel 1 ausgewählt. Die Primer zur Untersuchung der CpG-Inseln wurden mithilfe von Methprimer entworfen.

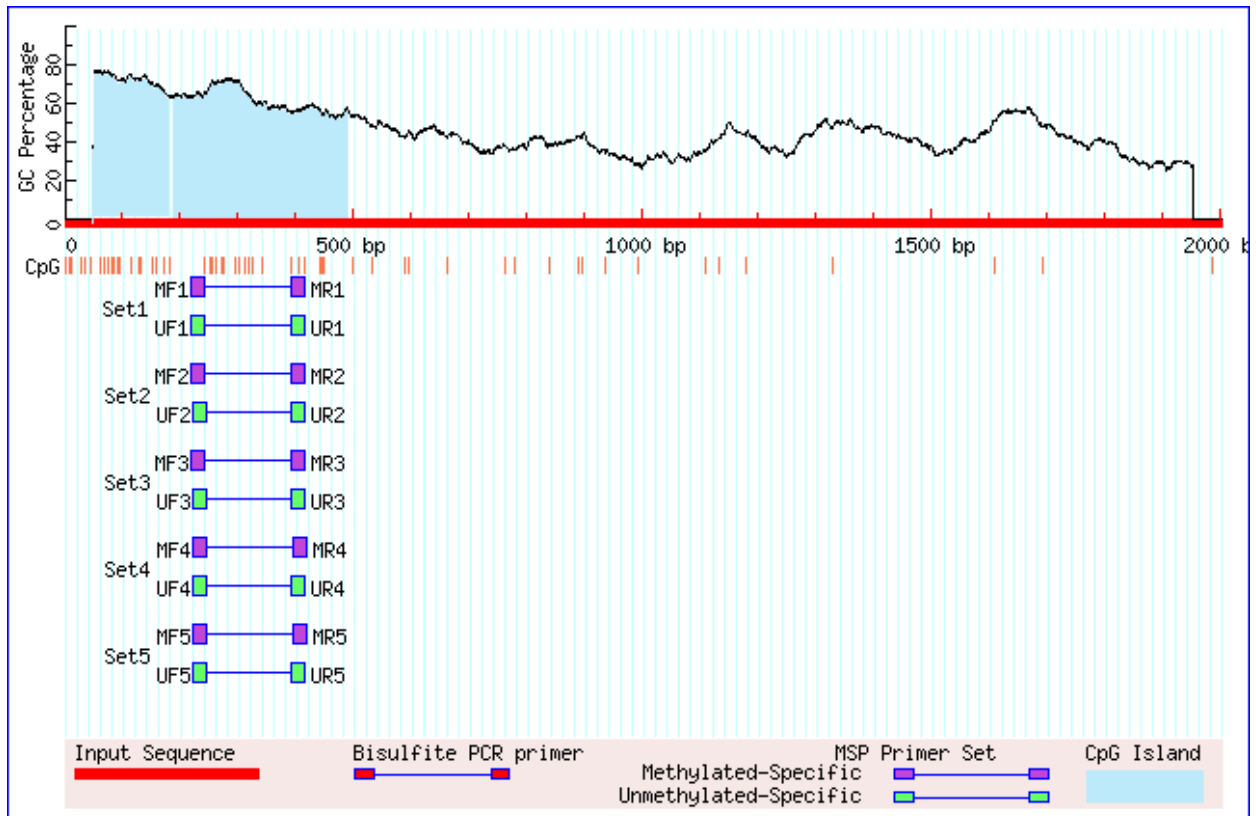


Abbildung 4: TRPC6: Inselregionen und Primer

3. Methoden

3.1 Charakterisierung der Patienten

An der Untersuchung nahmen 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (92 Männer und 63 Frauen), 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (16 Männer und 29 Frauen) und 39 nierengesunde, normotensive Kontrollpersonen (23 Männer und 16 Frauen) teil. Zu den Einschlusskriterien gehörten die Zustimmungsfähigkeit sowie die schriftliche und mündliche Zustimmung (informed consent). Ausschlusskriterium war die fehlende Zustimmung. Die Untersuchung wurde durch die zuständige Ethikkommission der Charité -Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, geprüft und genehmigt.

Eine chronische Nierenkrankheit liegt vor, wenn im Urin eine Proteinurie oder Mikroalbuminurie nachweisbar sind, oder wenn die glomeruläre Filtrationsrate weniger als 60% des Normalwertes beträgt, oder wenn bei bildgebenden Verfahren einschließlich Sonographie, Computertomographie oder MRT pathologische Veränderungen an den Nieren festgestellt werden, und wenn dieser Zustand länger als drei Monate anhält (K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. American Journal of Kidney Diseases, 2002). Dabei wurde das Stadium der chronischen Niereninsuffizienz nach der National Kidney Foundation (NKF) in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Deswegen variiert der Niereninsuffizienzschweregrad dieser Patientengruppe vom Stadium der vollen Kompensation bis hin zum Nierenversagen.

Die hypertensiven Patienten entsprachen den Kriterien der WHO (World Health Organisation). Nach Definition der WHO gelten systolische Blutdruckwerte von über 140mmHg und diastolische Blutdruckwerte von über 90mmHg als Hypertonie. Die Diagnose der essentiellen Hypertonie wurde erst nachdem alle sekundären Hypertonieformen ausgeschlossen waren, gestellt.

Die Methylierungsspezifische PCR zur Untersuchung des Methylierungszustandes der TRPC3-Promotorstelle wurde bei 77 der niereninsuffizienten Patienten, 27 der Patienten mit essentieller Hypertonie und 17 der Kontrollpersonen durchgeführt. Die Methylierungsspezifische PCR zur Untersuchung des Methylierungszustandes der TRPC6-Promotorstelle wurde ausschließlich bei den 27 Patienten mit essentieller Hypertonie und den 17 Kontrollpersonen durchgeführt.

Die klinische und laborchemische Charakterisierung der Probanden ist in **Tabelle 6**, **Tabelle 7**, **Tabelle 8** und **Tabelle 9** schematisch dargestellt. Die besonders wichtigen Parameter werden zusätzlich im Ergebnisteil auf Signifikanz untersucht bzw. in der Diskussion detaillierter besprochen.

Tabelle 6: Klinische und laborchemische Charakterisierung der normotensiven Kontrollpersonen (NT), der Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) sowie der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF). Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Charakteristika	NT(n=39)	HT(n=45)	CRF(n=155)
Alter (Jahre)	60 \pm 3	66 \pm 2	60 \pm 1
Mann/ Frau (Anzahl)	23/16	16/29	92/63
Körpergewicht (kg)	72,9 \pm 3,0	79,3 \pm 3,5	77,4 \pm 1,5
Körperoberfläche (m ²)	1,85 \pm 0,04	1,88 \pm 0,04	1,87 \pm 0,02
Body Maß Index (kg/m ²)	24,59 \pm 0,90	27,85 \pm 1,01	26,2 \pm 0,44
Herzfrequenz (/min)	72 \pm 2	69 \pm 2	74 \pm 1
Systolischer Blutdruck (mmHg)	120 \pm 2	140 \pm 4	135 \pm 2
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	67 \pm 2	73 \pm 2	72 \pm 1
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	87 \pm 2	102 \pm 3	97 \pm 2
Pulsdruck (mmHg)	52 \pm 2	67 \pm 3	63 \pm 1
Leukozyten (/nl)	7,71 \pm 0,64	7,27 \pm 0,30	9,18 \pm 0,35
Hämoglobin (g/dl)	12,8 \pm 0,4	13,2 \pm 0,3	11,2 \pm 0,2
Thrombozyten (/nl)	278 \pm 15	251 \pm 12	242 \pm 7

Serum Kreatinin (mg/dl)	0,82±0,41	0,83±0,03	3,72±0,21
Serum Harnstoff (mg/dl)	30±9	35±2	96±4
Serum Natrium (mmol/l)	137±1	136±1	137±1
Serum Kalium (mmol/l)	4,0±0,1	4,0±0,1	4,3±0,1
Serum Calcium (mmol/l)	2,20±0,05	2,30±0,05	2,24±0,02
Serum Phosphat (mmol/l)	1,06±0,20	1,00±0,09	1,40±0,07
Glucose (mg/dl)	112±14	113±8	122±7
Cholesterin gesamt (mg/dl)	157±18	205±9	195±10
Triglyceride (mg/dl)	126±22	160±24	174±15
HDL-Cholesterin (mg/dl)	41±4	48±3	44±2
LDL-Cholesterin (mg/dl)	90±13	130±6	111±7
C-reaktives Protein (mg/l)	2,4±1,2	1,7±0,7	4,5±0,7
AST (U/l)	32±8	39±12	35±3
ALT (U/l)	28±7	28±5	34±4
Gamma GT (U/l)	95±23	83±26	76±9
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,62±0,23	0,92±0,45	0,65±0,10
Ferritin (µg/l)	296±130	530±260	485±62
Transferrin (mg/dl)	191±18	208±31	192±10
Eisen (µmol/l)	10,3±1,5	10,8±2,6	10,7±0,8
Gesamt-Eiweiß (g/dl)	6,4±0,2	6,9±0,2	6,4±1,1
Albumin (g/dl)	3,46±0,17	3,76±0,22	3,47±0,08
Diabetes mellitus (%)	18	24	25

koronare Herzerkrankungen (%)	15	18	25
Insult (%)	3	11	8
Periphere arterielle Verschluß- krankheit (%)	8	7	8

Tabelle 7: Medikation der Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF).

Charakteristika/ Medikation (%)	HT (n=45)	CRF (n=155)
Beta-Blocker	58	60
ASS	27	32
HMG-CoA- Reduktase- Inhibitoren	18	28
Diuretika	44	69
Immunsuppressiva	2	41
Vitamine	13	26
Phosphatbinder	0	6
ACC	0	3
Eisen	0	7
EPO	0	12
Angiotensin Converting - Enzyme Inhibitor	47	29

Calcium- Antagonisten	38	35
--------------------------	----	----

Tabelle 8: Klinische und laborchemische Charakterisierung der normotensiven Kontrollpersonen (NT), der Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) sowie der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF), bei denen eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt wurde. Kontinuierliche Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Charakteristika	NT(n=17)	HT(n=27)	CRF(n=77)
Alter (Jahre)	57 \pm 4	68 \pm 2	57 \pm 2
Mann/Frau (Anzahl)	12/5	9/18	45/32
Körpergewicht (kg)	76,0 \pm 3,3	78,3 \pm 5,2	76,6 \pm 2
Körperoberfläche (m ²)	1,90 \pm 0,05	1,86 \pm 0,06	1,88 \pm 0,03
Body-Mass-Index (kg/m ²)	25,01 \pm 0,67	27,61 \pm 1,47	26,24 \pm 0,64
Herzfrequenz (/min)	74 \pm 2	70 \pm 3	74 \pm 2
Systolischer Blutdruck (mmHg)	123 \pm 3	140 \pm 5	140 \pm 3
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	71 \pm 3	74 \pm 3	76 \pm 2
Pulsdruck (mmHg)	52 \pm 2	66 \pm 3	64 \pm 2
Leukozyten (/nl)	6,92 \pm 0,57	7,15 \pm 0,42	8,40 \pm 0,38
Hämoglobin (g/dl)	13,4 \pm 0,5	13,1 \pm 0,4	11,0 \pm 0,2
Thrombozyten (/nl)	257 \pm 15	256 \pm 18	243 \pm 11
Serum Kreatinin (mg/dl)	0,82 \pm 0,05	0,82 \pm 0,03	3,72 \pm 0,31
Serum Harnstoff (mg/dl)	29 \pm 3	36 \pm 3	99 \pm 6
Serum Natrium (mmol/l)	137 \pm 1	136 \pm 1	137 \pm 0

Serum Kalium (mmol/l)	3,9±0,1	4,0±0,1	4,4±0,1
Serum Calcium (mmol/l)	2,24±0,06	2,33±0,08	2,25±0,04
Serum Phosphat (mmol/l)	1,10±0,08	1,01±0,13	1,42±0,10
Glucose (mg/dl)	103±5	114±10	108±4
Cholesterin gesamt (mg/dl)	161±15	214±13	202±9
Triglyceride (mg/dl)	138±15	175±40	187±32
HDL-Cholesterin (mg/dl)	40±4	54±5	42±3
LDL-Cholesterin (mg/dl)	92±14	133±9	116±7
C-reaktives Protein (mg/l)	1,8±0,6	2,2±1,1	3,5±0,6
AST (U/l)	34±4	48±22	35±6
ALT (U/l)	29±4	30±7	38±7
Gamma GT (U/l)	83±29	99±39	66±10
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,56±0,09	1,15±0,66	0,64±0,15
Ferritin (µg/l)	316±148	399±204	533±108
Transferrin (mg/dl)	198±27	215±66	184±13
Eisen (µmol/l)	8,8±2,4	11,0±5,0	10,7±1,2
Gesamt-Eiweiß (g/dl)	6,6±0,2	6,8±0,3	6,4±0,1
Albumin (g/dl)	3,45±0,30	3,86±0,25	3,43±0,11
Diabetes Mellitus (%)	12	30	21
koronare Herzerkrankungen (%)	24	11	22
Insult (%)	0	11	6
Periphere arterielle	6	4	6

Verschlußkrankheit (%)			
------------------------	--	--	--

Tabelle 9: Medikation der Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF), bei denen eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt wurde.

Charakteristika/ Medikation (%)	HT (n=27)	CRF (n=77)
Beta-Blocker	56	68
ASS	26	27
HMG-CoA- Reduktase- Inhibitoren	15	29
Diuretika	44	69
Immunsuppressiva	0	53
Vitamine	15	14
Phosphatbinder	0	4
ACC	0	3
Eisen	0	4
EPO	0	10
Angiotensin Converting - Enzyme Inhibitor	48	25
Calcium- Antagonisten	48	34

3.2 Applanationstonometrie

Die Messung der Gefäßcompliance und der arteriellen Steifigkeit wurde mit einem HDI/Pulsewave Research CardioVascular Profiling Instrument (Model CR-2000) nach den Empfehlungen des Herstellers (Hypertension Diagnostics) durchgeführt. Diese Methode wurde schon mehrfach beschrieben und publiziert (Thies, Inauguraldissertation, 2010; Wittrock, Inauguraldissertation, 2010; Maier, Inauguraldissertation, 2007). Die Studie von Wittrock et al., 2009 hat gezeigt, dass die Ergebnisse, die durch die nicht-invasive Applanationstonometrie erzielt wurden, mit den Ergebnissen von invasiven Messmethoden korrelieren.

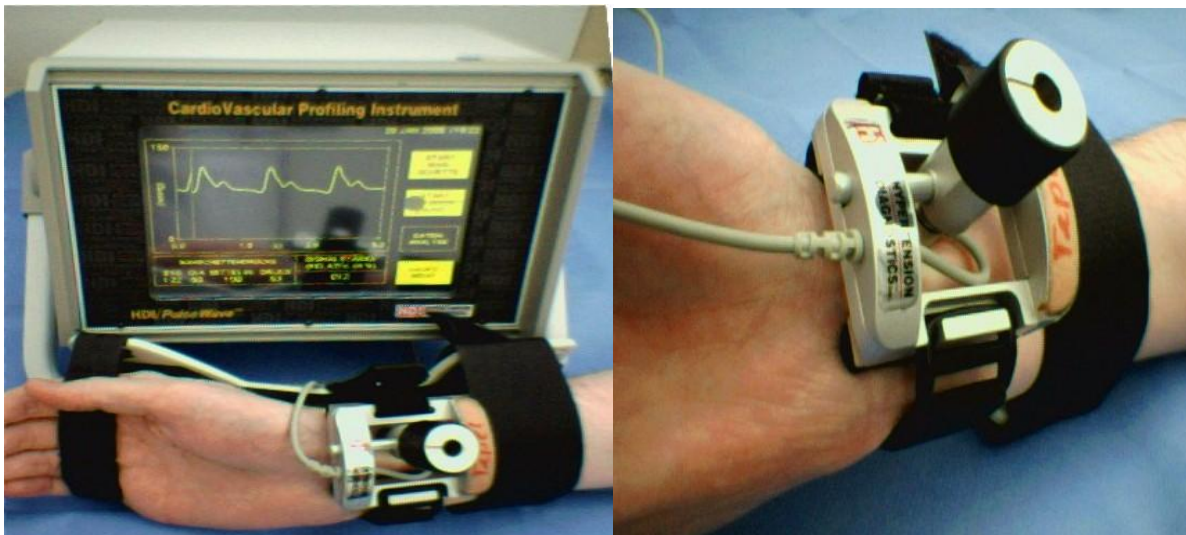


Abbildung 5: HDI/Pulsewave Research CardioVascular Profiling Instrument. Abbildung des Messgeräts mit dem am Handgelenk angelegten Sensor. Die Blutdruckmanschette, die zu dem Gerät gehört, ist nicht abgebildet (linke Abbildung: Maier, Inauguraldissertation, 2007; rechte Abbildung: Thies, Inauguraldissertation, 2010)

Man braucht den systolischen und diastolischen Blutdruckwert, um die Pulswelle der Arteria radialis zu erhalten. Der Blutdruck wurde mit Hilfe einer mit dem Gerät verbundenen Blutdruckmanschette oszillometrisch gemessen. Ein Software-Algorithmus bestimmt den systolischen, mittleren und diastolischen Druck sowie die Herzfrequenz. Der Pulsdruck ist die Differenz zwischen dem systolischen und diastolischen Druck in mmHg.

Die nicht-invasiven Pulswellenmessungen erfolgten mittels eines speziellen Sensors (Applanationstonometers), in dem sich ein piezoelektrisches Element zur Verstärkung des

Wellensignals befand. Eine Haltevorrichtung wurde am Handgelenk der Probanden befestigt, so dass der Applanationstonometer senkrecht über der Arterie an der Stelle der stärksten tastbaren Pulsation angebracht werden konnte. Um eine optimale Signalqualität zu erzielen, wurde der Sensor mit mäßigem Druck aufgesetzt, so dass er einen möglichst engen Kontakt zur Arterie hatte. Durch eine gewinkelte Handgelenksschiene wurde der Unterarm während der Messung fixiert. Bei Patienten mit arterio-venösen Shunts erfolgte die Pulswellenmessung am kontralateralen Arm. Die Pulswellen wurden durch eine oszillometrische Blutdruckmessung am Oberarm geeicht und unmittelbar danach 30 Sekunden lang aufgezeichnet.

Ein Computer-Algorithmus errechnet durch Schätzung des Schlagvolumens (SV) den Abfall des diastolischen Druckes der gemessenen Pulswelle. So wird die Compliance einerseits als eine Eigenschaft des Volumenfassungsvermögens der großen Arterien ($C1$ in $\text{ml}/(\text{mmHg} \times 10)$), andererseits als Eigenschaft der Reflexionen oder Oszillationen in den distalen arteriellen Gefäßkompartimenten ($C2$ in $\text{ml}/(\text{mmHg} \times 100)$) beschrieben. Das Volumenfassungsvermögen findet sich vorwiegend in den großen Arterien, die sensitiv gegenüber Alterungsprozessen sind, und die Oszillationen finden vorwiegend in den kleinen Gefäßen statt, die vor allem sensitiv gegenüber Hypertonie, Diabetes mellitus und Atherosklerose sind (Arnett et al., 2001; Finkelstein & Cohn, 1992; McVeigh et al., 1999; Rietzschel et al., 2001). Die $C1$ -, $C2$ - und SVR-Werte werden aus den Mittelwerten aller Pulswellen während der 30 Sekunden dauernden Messung berechnet. Die arterielle Steifigkeit der großen ($S1$) und kleinen Gefäße ($S2$) wird als $S1 = 10/C1$ bzw. als $S2 = 100/C2$ definiert.

Das Schlagvolumen (SV) kann anhand des Alters (in Jahren), der Herzfrequenz (HF, pro Minute), Körperoberfläche (KÖF in m^2) und der Herzauswurfzeit (cardiac ejection time, CET in ms, bestimmt aus der Radialispulswelle) nach folgender Formel berechnet werden:

$$SV = -6,6 + 0,25 \times (CET - 3,5) - 0,62 \times (HF) + 40,4 \times (KÖF) - 0,51 \times (\text{Alter}).$$

Die Körperoberfläche (KÖF in m^2) wird nach folgender Formel berechnet:

$$0,007184 \times \text{Körpergröße}^{0,725} \times \text{Körpergewicht}^{0,425}.$$

Das Herzzeitvolumen (in l/min) wird nach folgender Formel berechnet:

$$(CO) = (SV) \times (HF).$$

Der totale periphere Widerstand (systemic vascular resistance, SVR) errechnet sich aus dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) dividiert durch das Herzzeitvolumen (CO).

Der Elastizitätsindex der großen ($C1$) und der kleinen Gefäße ($C2$) lässt sich durch nichtlineare Kurvenanpassung aus dem Kurvenverlauf des diastolischen Flusses errechnen.

3.3 Digitale Photoplethysmographie

Die nicht-invasive Methode der digitalen Photoplethysmographie wurde mit einem Pulsoximeter (VitaGuard VG 3000; getemed, Teltow) durchgeführt. Dabei wurde der dazugehörige Sensor (LNOP Adult SpO2 Sensor, Masimo Corporation, CA, USA) auf die Fingerkuppe des Mittelfingers aufgeklebt. Die digitale Photoplethysmographie wurde schon mehrfach beschrieben (Abraha, Inauguraldissertation, 2005; Thies, Inauguraldissertation, 2010; Wittrock, Inauguraldissertation, 2010)

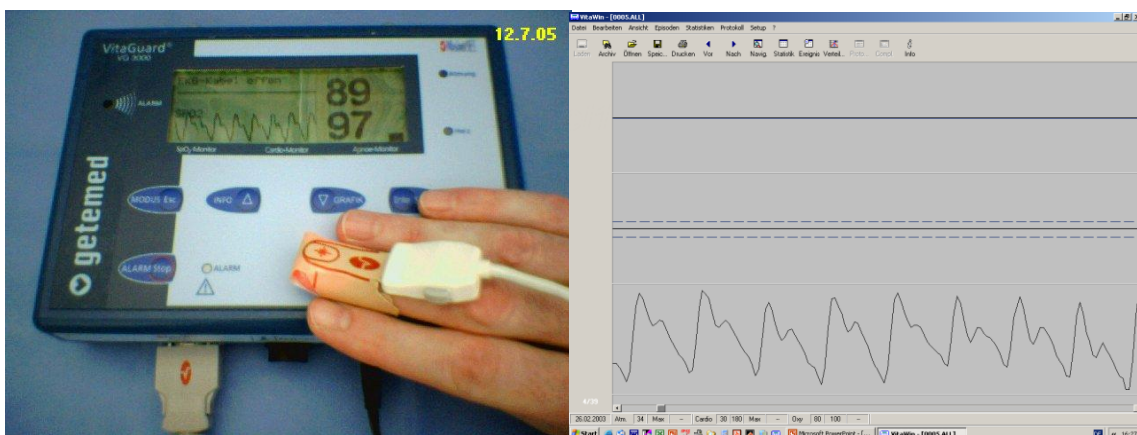


Abbildung 6: Pulsoximeter (VitaGuard VG3000; getemed, Teltow)
(Thies, Inauguraldissertation, 2010)

Die Grundlage der Methode ist, dass infrarotes Licht stärker vom Blut als vom umliegenden Gewebe absorbiert wird (Goldmann et al., 2000). Durch eine Leuchtdiode wird infrarotes Licht in den zu untersuchenden Körperteil (z.B. Fingerbeere) gesendet. Gegenüber der Leuchtdiode befindet sich ein Fotosensor, der das transmittierte Licht misst. Je stärker das Untersuchungsgebiet durchblutet ist, desto mehr infrarotes Licht wird vom Blut absorbiert und umso weniger Licht wird übertragen. Der Zusammenhang zwischen der sich mit dem Pulsschlag ändernden Durchblutung und dem am Fotosensor eingehenden Impuls wird verrechnet und als Volumenpulswelle dargestellt. Das verwendete Gerät zeichnet 32 Daten pro Sekunde auf und speichert diese in Episoden von 2,5 Minuten.

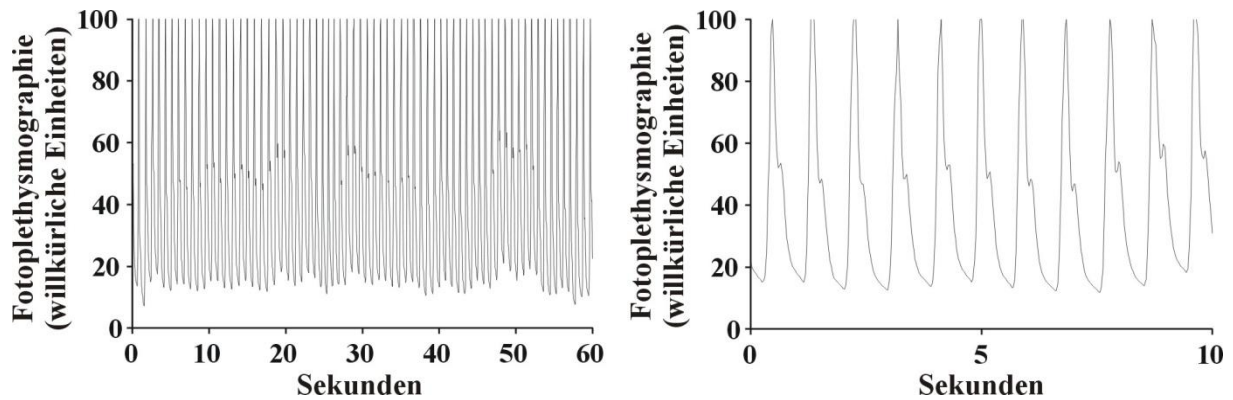


Abbildung 7: Beispiel für kontinuierliches Monitoring durch digitale Photoplethysmographie. Dargestellt sind die Pulswellen, die über einen Zeitraum von 60 Sekunden (Bild links) bzw. 10 Sekunden (Bild rechts) aufgezeichnet wurden (Wittrock, Inauguraldissertation, 2010)

Die digitale Volumenpulswelle besteht aus zwei Teilen. Der erste systolische Anteil wird von der voranschreitenden Pulswelle bestimmt. Der folgende diastolische Anteil entsteht durch die Reflexion der Volumenpulswelle in der Peripherie (Chowienzyk et al., 1999; Millasseau et al., 2003).

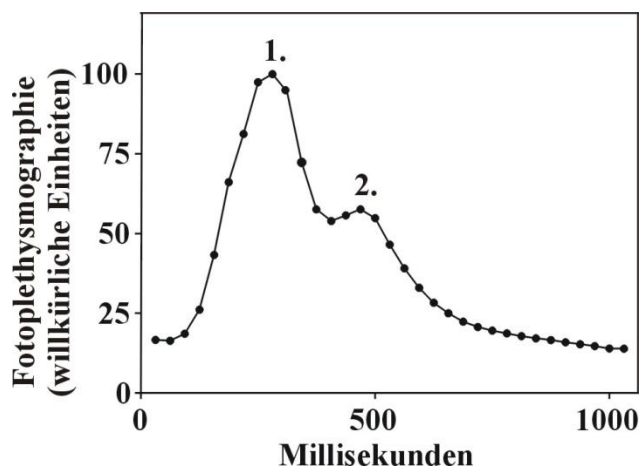


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Pulswellenkurve (Wittrock, Inauguraldissertation, 2010).

1. Der systolische Anteil
2. Der diastolische Anteil

Um den reflektiven Index zu berechnen wurde für jede Pulswelle die erste Ableitung berechnet (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Das lokale Minimum der ersten

Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Pulswellenkurve. Die Mittelwerte der Daten des dritten bis siebten Punktes nach dem Wendepunkt der Pulswellenkurve wurden analysiert. Aus der maximalen Amplitude der Pulswellenkurve wurde der Mittelwert in Prozent berechnet, dieser Wert wurde als reflektiver Index bezeichnet.

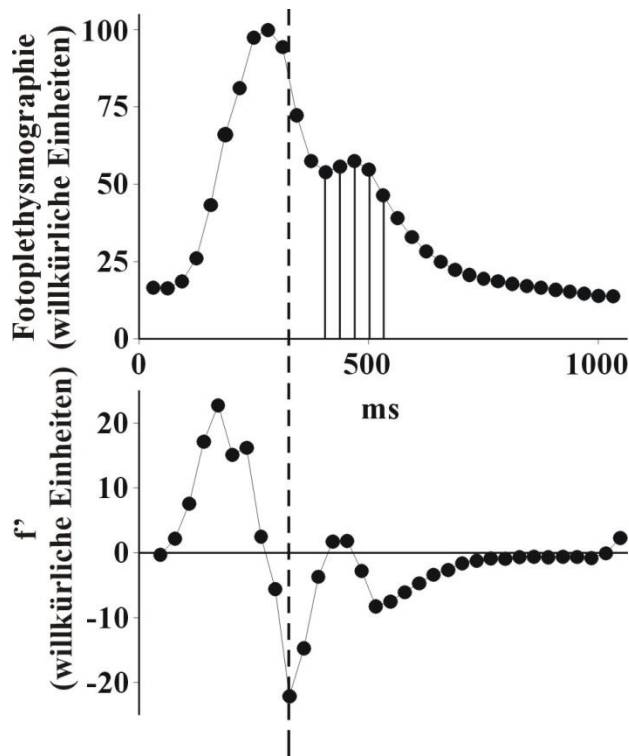


Abbildung 9: Analyse des diastolischen Anteils einer Pulswelle (Wittrock, Inauguraldissertation, 2010).

Oben: Darstellung der Pulswellenkurve.

Unten: Die erste Ableitung (f') der Pulswellenkurve.

Die oben genannten Punkte liegen in einem Intervall zwischen 93 Millisekunden bis 218 Millisekunden nach dem Wendepunkt der Pulswelle und beschreiben sehr genau die sogenannte "Schulterregion" im diastolischen Teil der Pulswelle, die überwiegend durch die Pulswellenreflexion in der Peripherie zustande kommt. Der reflektive Index wurde als Mittelwert aller innerhalb einer Episode von 150 Sekunden aufgezeichneten Pulswellen, also typischerweise mehr als 150 Pulswellen, angegeben.

Durch eine 5 minütige Kompression des ipsilateralen Oberarms mit einer Blutdruckmanschette über dem systolischen Blutdruckwert und ein nachfolgendes Lösen der Stauung kommt es

zur reaktiven Hyperämie, sogenannten „flow mediated dilation“ (Corretti et al., 2002). Der wichtigste Mediator dieser Vasodilatation neben Prostaglandine I₂ (Koller et al., 1993) und EDHF (Endothelium derived hyperpolizing faktor) (Busse et al., 2002) ist das Stickstoffmonooxid, früher EDRF (endothelium derived relaxing factor) genannt. Dabei kommt es zu einer Reaktion von calciumaktivierten Kaliumkanälen des Endothels auf Scherkräfte (Cooke et al., 1991; Miura et al., 2001). Der vermehrte Kaliumausstrom führt zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen und zum Calciumeinstrom. Calcium aktiviert die endotheliale NO-Synthase und führt so zur NO-vermittelten Dilatation, „flow mediated dilation“ (Joannides et al., 1995; Pohl et al., 1985).

Als Maß für die Vasodilatation gilt die Differenz zwischen dem reflektiven Index (RI) nach Stau und dem reflektiven Index (RI) vor Stau. Der reflektive Index ist das Mittel aller in der Episode von 150 Sekunden vor bzw. nach Stau gemessenen Pulswellen. Die reflektiven Indices nach Stau werden zusätzlich als Mittel aller Pulswellen der ersten 15 Sekunden angegeben und RI_{15sec} benannt.

3.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut

Bei den Dialysepatienten wurden aus dem arteriellen Schenkel des Hämodialysesystems 20 ml Vollblut in eine heparinisierte Einmalspritze entnommen. Bei den niereninsuffizienten Patienten, die keine Nierenersatztherapie erhielten, bei den Hypertonikern und bei den gesunden Kontrollpersonen wurden 20 ml Blut mittels heparinisierte Einmalspritze und Kanüle aus dem venösen System abgenommen.

Zuerst wurde das Blut 10 Minuten lang bei 2100 Rotationen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Dadurch wurde es in Hämatokrit und Plasma aufgeteilt. Von jedem Patienten wurden jeweils 1,5 ml Plasma im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Das restliche Plasma wurde verworfen. Zu dem verbleibenden Hämatokrit wurden 3 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution in mmol/l: NaCl 136, KCl 5.4, KH₂PO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, D-Glukose 5.6, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.0, Hepes 10, pH 7.4) hinzugefügt. Dieses Zellgemisch wurde sorgfältig geschüttelt und anschließend vorsichtig auf 3 ml Histopaque® 1077 aufgetragen. Histopaque ist ein Zentrifugationsmedium, das Polysucrose und Natriumdiatrizoat enthält. Es wird zur Dichte-Gradienten Zentrifugation benutzt. Zellen haben die Eigenschaft, in einem starken Zentrifugationsfeld zu sedimentieren und sich entsprechend ihrer Größe entlang eines linearen Gradienten, der hier durch das Histopaque® erzeugt wurde, anzuordnen. Demzufolge war es bei der anschließenden 15-

minütigen Zentrifugation (bei 2300 rpm) möglich, die Zellen nach ihrem spezifischen Dichtegradienten aufzuteilen. Nach der Zentrifugation entstanden drei Zellschichten, die man mit dem bloßen Auge erkennen konnte. Unter dem Histopaque® befanden sich die Erythrozyten und darüber entstand eine Schicht, die hauptsächlich Granulozyten enthielt. In der obersten Schicht war ein milchig-weißer Ring aus mononukleären Zellen (Lymphozyten, „natürliche“ Killerzellen, Monozyten und Makrophagen) zu finden. Ganz oben befand sich Plasma. Dieses Verhalten wird in **Abbildung 10** verdeutlicht.

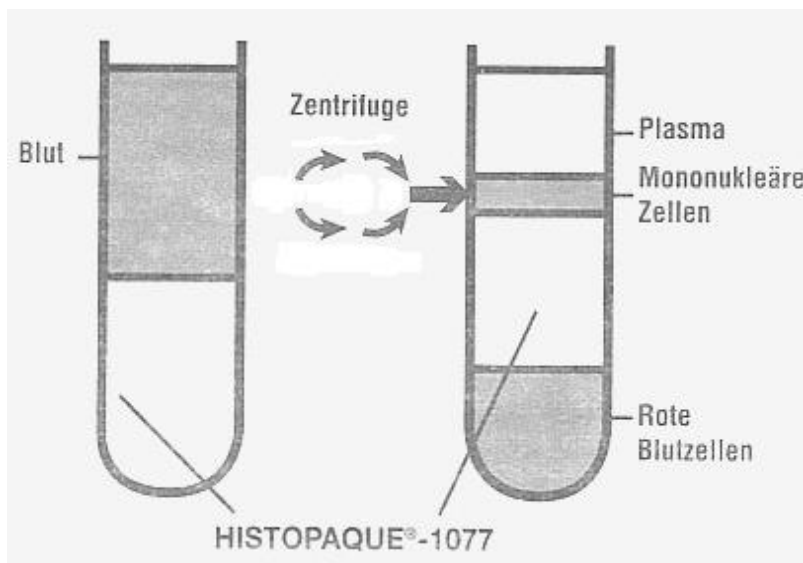


Abbildung 10: Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®) (Barrie, Inauguraldissertation, 2010)

Danach wurden nur die Zellen des mononukleären Rings in ein neues Röhrchen pipettiert. Diese wurden 5 Minuten lang bei 3500 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes blieb eine Ansammlung von mononukleären Zellen an der Basis des Zentrifugenröhrchens übrig, welche mit 1 ml HBSS resuspendiert wurde. Dieses Zellgemisch wurde nachher im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3.5 Isolierung von DNA

Zur DNA-Isolierung aus den mononukleären Zellen wurde das QIAamp DNA Mini Kit von der Firma Qiagen aus Hilden verwendet. Die Durchführung erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Nach der enzymatischen Zellyse mit Proteinase K bindet die DNA an eine Silica-Gel-Membran.

In zwei Waschschriften mit den Puffern AW1 und AW2 werden Proteine und sonstige unerwünschte zelluläre Bestandteile entfernt. Anschließend wird die DNA mit Hilfe vom AE-Puffer von der Membran eluiert. Die isolierte DNA wird als nächstes bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Reagenzien: Proteinase K, AL-Puffer, AE-Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer, Ethanol (96–100%).

3.6 Analyse der DNA Methylierung

3.6.1 Bisulfitbehandlung der DNA

Die Bisulfitbehandlung von DNA führt zu einer Umwandlung von unmethylierten Cytosinbasen in Uracilbasen. Die methylierten Cytosinbasen bleiben hingegen unverändert. Auf diese Weise wird die epigenetische Information der DNA-Methylierung in eine Basenänderung umgewandelt. So können durch eine DNA-Sequenz-Analyse Informationen über den Methylierungszustand der DNA gewonnen werden.

Die DNA-Bisulfitbehandlung wurde mit dem Epiect Bisulfit Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. In ein 250 μl PCR Röhren wurden 20 μl DNA, 85 μl Bisulfit Mix und 35 μl DNA Protect Buffer eingesetzt. Danach wurde das Gemisch kurz gevortext und unter folgenden Bedingungen in den Thermocycler (Biometra, UNO II) gegeben: 5 min Denaturierung bei 95°C , 25 min Inkubation bei 60°C , 5 min Denaturierung bei 95°C , 85 min Inkubation bei 60°C , Denaturierung für 5 min bei 95°C , 175 min Inkubation bei 60°C und abschließend durchgehend 20°C bis zur Probenentnahme.

3.6.2 Methylierungsspezifische PCR

Bei der methylierungsspezifischen PCR (MSP-PCR) wird die Polymerasekettenreaktion benutzt um den Methylierungszustand einzelner CpG-Dinukleotide in der DNA zu untersuchen. Zunächst wird die DNA mit Bisulfit behandelt (siehe 3.6.1). Danach werden zwei Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Dabei werden zwei Paar Primer verwendet. Diese sollen im Promotorbereich liegen. Das erste Primerpaar bindet an die methylierte DNA, also an

die Cytosinbase. Das zweite Primerpaar bindet an das unmethylierte CpG-Dinukleotid. Dabei wird die umgewandelte Uracilbase als Thymin vom Primer gebunden.

3.6.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, die der exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten in vitro dient. Diese Reaktion besteht aus mehreren, sich zyklisch wiederholenden Schritten. Im ersten Schritt kommt es durch eine Temperaturerhöhung zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Der zweite Schritt ist durch eine Temperaturemniedrigung charakterisiert. Dabei kommt es zur Anlagerung der synthetischen Oligonucleotid-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Als nächstes synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase zu jedem vorhandenen DNA-Einzelstrang einen neuen komplementären Strang (Elongation). Durch zyklische Wiederholung dieser Reaktion bei ausreichender Primermenge wird eine exponentielle Amplifikation der DNA-Zielsequenz erreicht (Mullis et al., 1986).

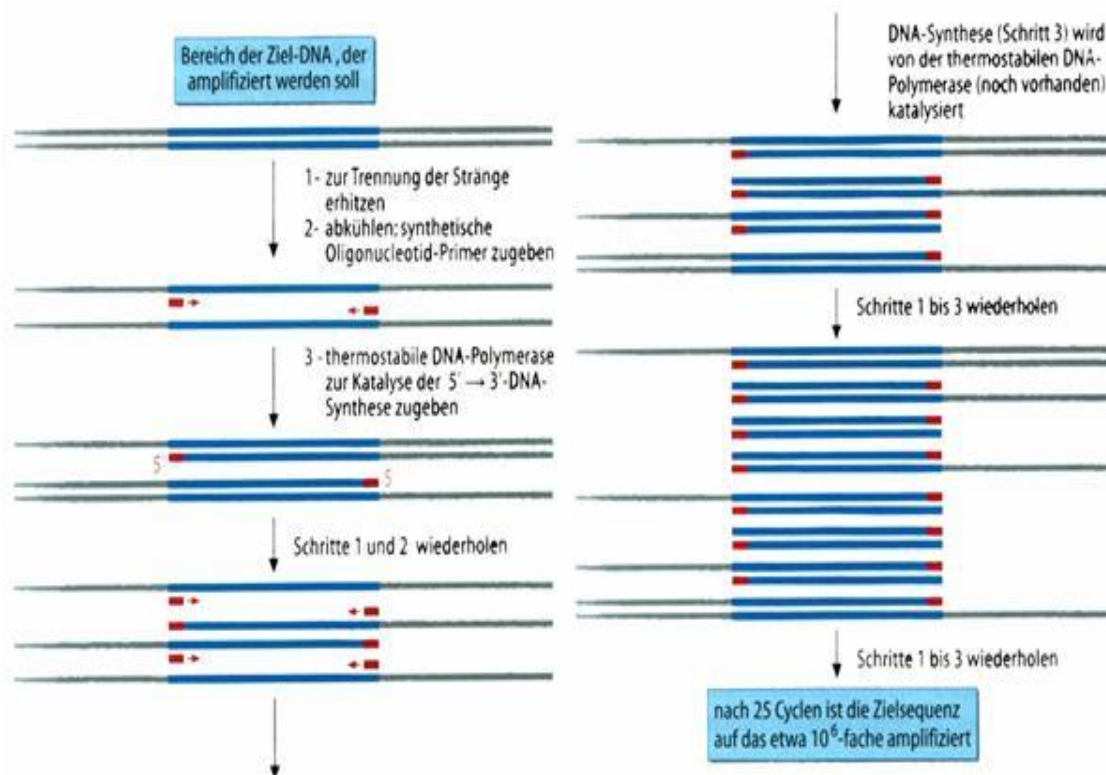


Abbildung 11: Prinzip der PCR (Löffler, 2001).

3.6.2.2 Grundlagen der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Nach der Denaturierung liegt die DNA in Form von Einzelsträngen vor. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet kaum an Einzelstrang-DNA, deshalb ist die Fluoreszenz zu diesem Zeitpunkt gering. Nach Anlagerung der Primer erfolgt die Synthese von DNA-Doppelsträngen. SYBR Green I kann sich an diese Doppelstränge anlagern, was zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz führt. Während der Elongation werden immer mehr Fluoreszenzfarbstoffmoleküle an der doppelsträngigen DNA gebunden, wodurch die Fluoreszenz weiter ansteigt. Am Ende der Elongationphase wird die maximale Fluoreszenz, die im Real-Time Cycler bei 530 nm gemessen wird, erreicht.

3.6.2.3 Durchführung der Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR wurde mit Hilfe vom QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. In die PCR-Kapillaren wurden jeweils 10 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 µl RNase freies Wasser, 4 µl Primer Mix (jeweils 0,5 µM Forward- und Reverseprimer) und zuletzt 4 µl bisulfitbehandelte DNA reinpipettiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert.

Der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthält HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix (including dUTP), SYBR Green I, ROX passive reference dye und 5 mM MgCl₂.

Die Real-Time PCR wurde in einem Rotor-Gene 2000 Real-Time Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung (°C)	94
Primer Annealing (°C)	56
Elongation (°C)	72
Anzahl der Zyklen	45

3.7 Statistik

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwerte±Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Bei nominalen Daten sind Anzahl (und Prozentanteil) angegeben.

Zur Analyse von Unterschieden zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Zur Analyse von Unterschieden zwischen drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt.

Die Assoziation zwischen zwei Variablen wurde mit Spearman correlation untersucht.

Ein $p < 0,05$ im zweiseitigen Test wurde als signifikanter Unterschied erachtet.

Zur Analyse der Daten wurde Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software for Science, San Diego, CA) genutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemein

Alter und Herzfrequenz waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (Abbildungen 12 und 13).

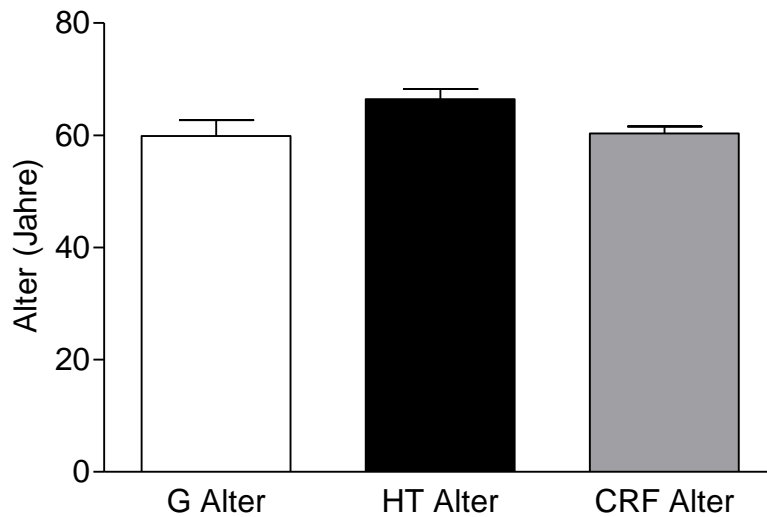


Abbildung 12: Mittelwerte \pm SEM des Alters bei 39 Kontrollpersonen (G Alter), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT Alter) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF Alter). $p > 0,05$.

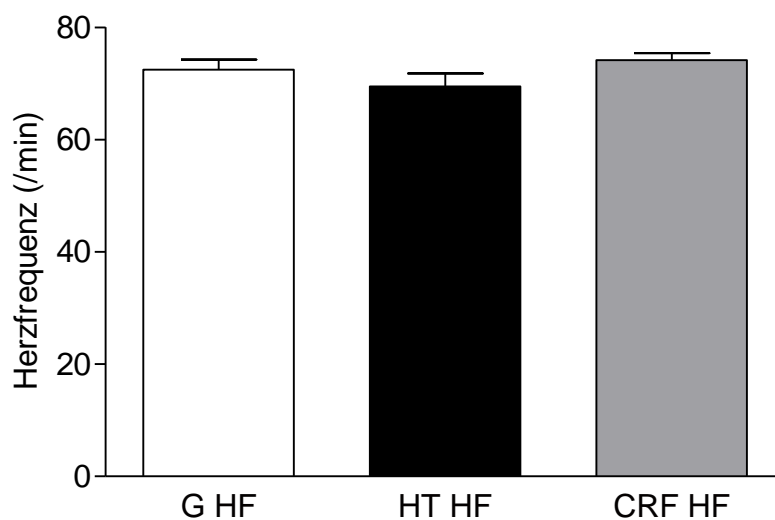


Abbildung 13: Mittelwerte \pm SEM der Herzfrequenz bei 39 Kontrollpersonen (G HF), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT HF) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF HF). $p > 0,05$.

Die Untersuchung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den systolischen Blutdruckwerten zwischen den Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und der Kontrollgruppe (G), sowie zwischen den niereninsuffizienten Patienten und der Kontrollgruppe. Die Patienten mit essentieller Hypertonie und diese mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere systolische Blutdruckwerte im Vergleich zu den Kontrollpersonen (G 120 ± 2 , HT 140 ± 4 , CRF 135 ± 2). $p < 0,001$ (HT vs G) $p < 0,01$ (CRF vs G) (**Abbildung 14**).

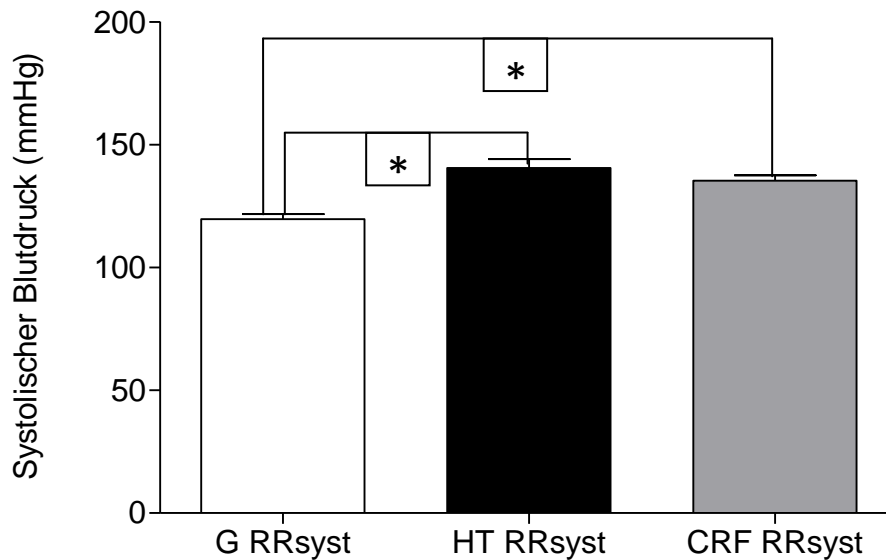


Abbildung 14: Systolischer Blutdruck bei 39 Kontrollpersonen (G RRsystem), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT RRsystem) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF RRsystem).

Die diastolischen Blutdruckwerte waren zwischen den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Die mittleren arteriellen Blutdruckwerte zwischen den Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und der Kontrollgruppe (G), sowie zwischen den niereninsuffizienten Patienten und der Kontrollgruppe waren signifikant unterschiedlich. Die Patienten mit essentieller Hypertonie und diese mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere mittlere arterielle Blutdruckwerte als die Kontrollpersonen (G 87 ± 2 , HT 102 ± 3 , CRF 97 ± 2). $p < 0,001$ (HT vs G). $p < 0,01$ (CRF vs G) (**Abbildung 15**).

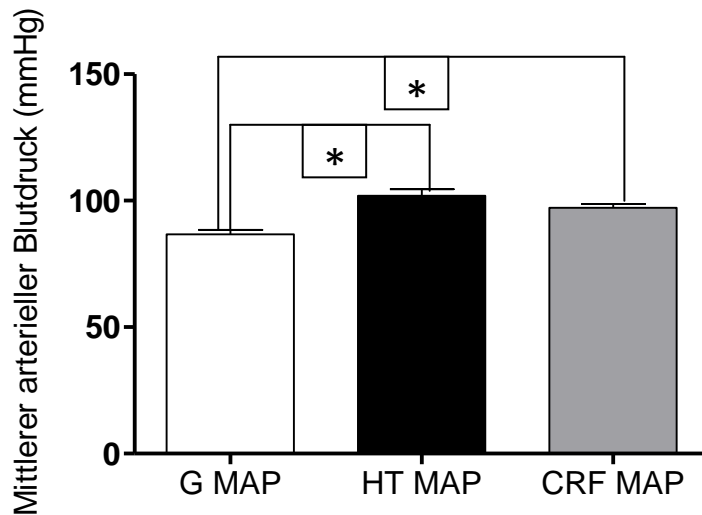


Abbildung 15: Mittlerer arterieller Blutdruck bei 39 Kontrollpersonen (G MAP), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT MAP) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF MAP).

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Pulsdruckwerte zwischen den Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und der Kontrollgruppe (G), sowie zwischen den niereninsuffizienten Patienten und der Kontrollgruppe. Die Patienten mit essentieller Hypertonie und jene mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere Pulsdruckwerte im Vergleich zu den Kontrollpersonen (G 52 ± 2 , HT 67 ± 3 , CRF 63 ± 1). $p < 0,001$ (HT vs G). $p < 0,001$ (CRF vs G) (**Abbildung 16**).

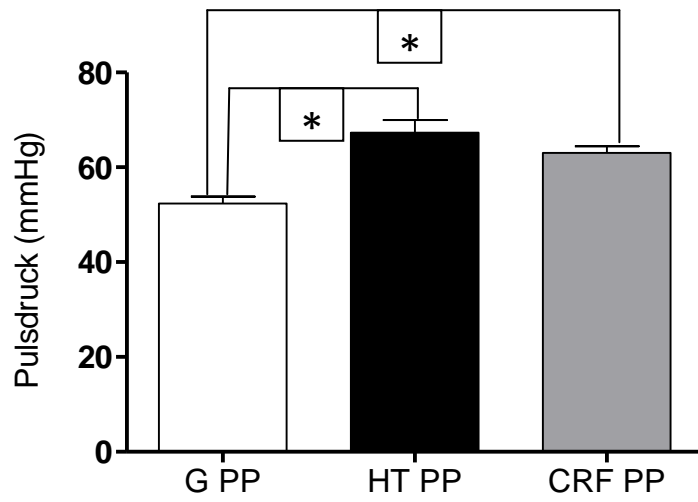


Abbildung 16: Pulsdruck bei 39 Kontrollpersonen (G PP), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT PP) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF PP).

4.2 Arterielle Steifigkeitsmessung

4.2.1 Applanationstonometrie

Die Messung der Gefäßcompliance und der arteriellen Steifigkeit wurde mit einem HDI/Pulsewave Research CardioVascular Profiling Instrument (Model CR-2000) nach den Empfehlungen des Herstellers (Hypertension Diagnostics) durchgeführt. Die nicht-invasiven Pulswellenmessungen erfolgten mittels eines speziellen Sensors (Applanationstonometers), der auf die Arteria radialis aufgesetzt wurde.

Die arterielle Steifigkeit der großen Gefäße (S1) war $1,02 \pm 0,11$ mmHg/ml bei den Kontrollpersonen, $1,32 \pm 0,11$ mmHg/ml bei den Patienten mit essentieller Hypertonie und $1,23 \pm 0,05$ mmHg/ml bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Die Patienten mit essentieller Hypertonie hatten signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe in Bezug auf die arterielle Steifigkeit der großen Gefäße (S1) ($p < 0,05$; **Abbildung 17**).

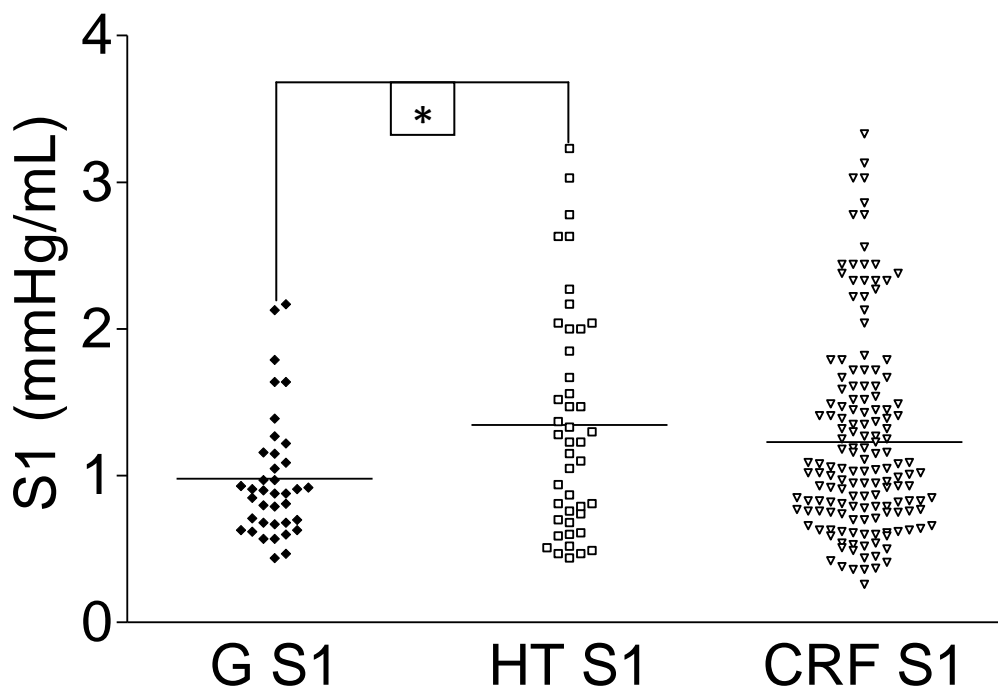


Abbildung 17: Arterielle Steifigkeit der großen Gefäße (S1) bei 39 Kontrollpersonen (G S1), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT S1) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF S1).

Die arterielle Steifigkeit der kleinen Gefäße (S2) war $24,85 \pm 3,68$ mmHg/ml bei den normotensiven Kontrollpersonen, $38,01 \pm 3,85$ mmHg/ml bei den Patienten mit essentieller Hypertonie und $31,43 \pm 1,92$ mmHg/ml bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Die Werte der arteriellen Steifigkeit der kleinen Gefäße (S2) waren signifikant höher bei den Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu den Kontrollpatienten ($p < 0,05$; **Abbildung 18**).

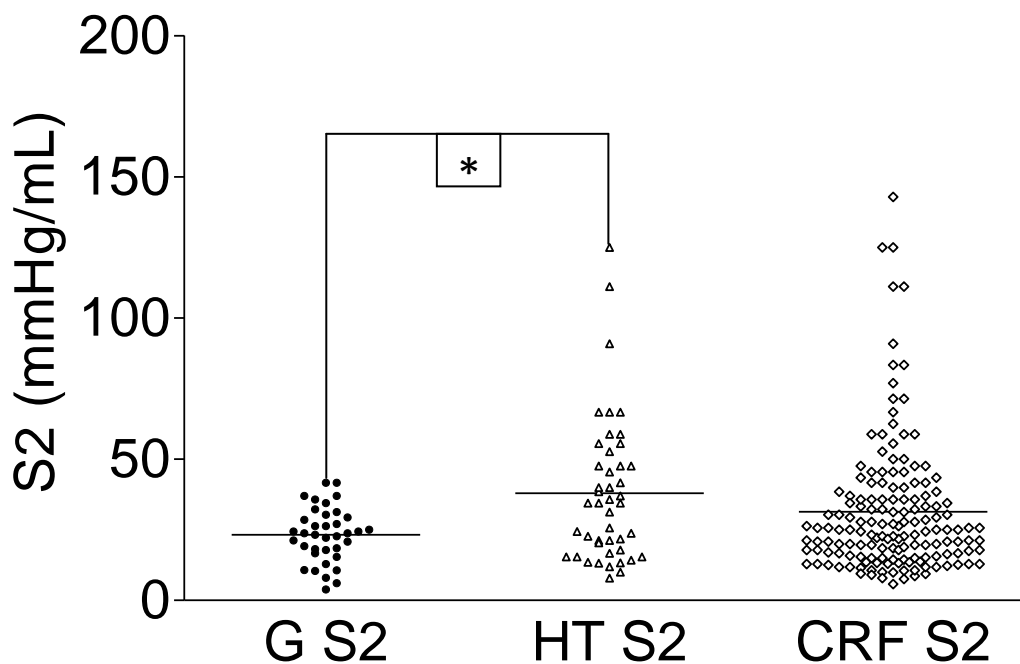


Abbildung 18: Arterielle Steifigkeit der kleinen Gefäße (S2) bei 39 Kontrollpersonen (G S2), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT S2) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF S2).

Es gab eine Korrelation zwischen der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße (S1) und dem Pulsdruck (Spearman $r = 0,394$, $p < 0,0001$; **Abbildung 19**), sowie zwischen der arteriellen Steifigkeit der kleinen Gefäße (S2) und dem Pulsdruck (Spearman $r = 0,286$, $p < 0,0001$; **Abbildung 20**).

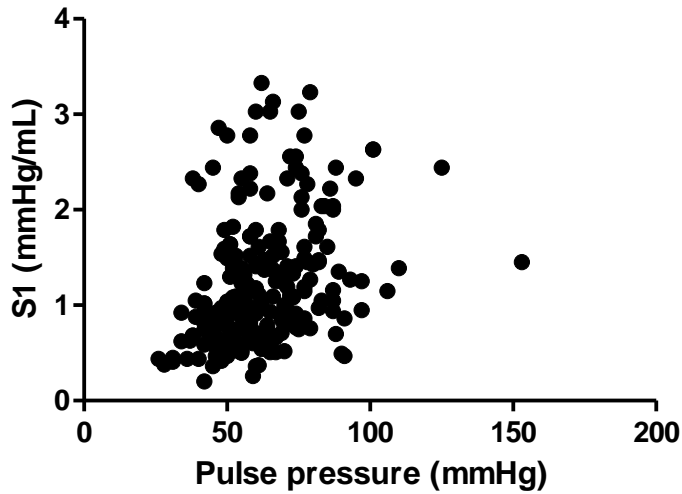


Abbildung 19: Korrelation von Pulsdruck (Pulse pressure) und arterieller Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße (S1). Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = 0,394$; $p < 0,0001$.

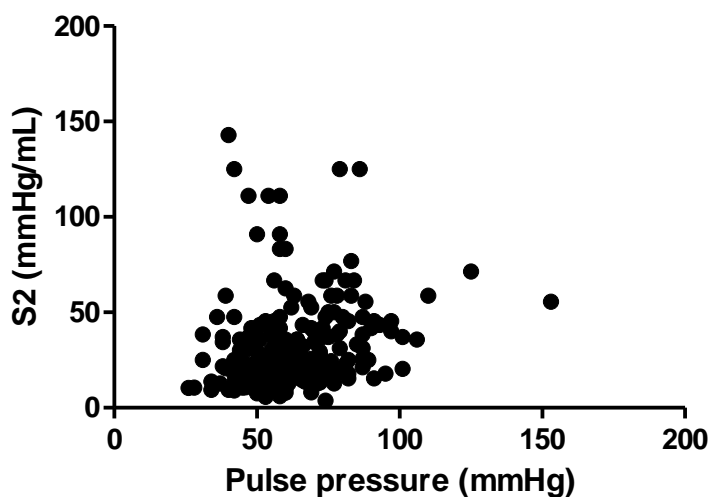


Abbildung 20: Korrelation von Pulsdruck (Pulse pressure) und arterieller Gefäßsteifigkeit der kleinen Gefäße (S2). Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = 0,286$; $p < 0,0001$.

Weder die arterielle Gefäßsteifigkeit der großen Gefäße (S1) noch die der kleinen (S2) wies eine Korrelation mit der Kreatinin-Clearance auf.

4.2.2 Reflektiver Index

Die nicht-invasive Methode der digitalen Photoplethysmographie wurde mit einem Pulsoximeter (Vitaguard VG 3000; getemed, Teltow) durchgeführt. Dabei wurde der dazugehörige Sensor (LNOP Adult SpO2 Sensor, Masimo Corporation, CA, USA) auf die Fingerkuppe des Mittelfingers aufgeklebt.

Der reflektive Index war unter den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$; **Abbildung 21**).

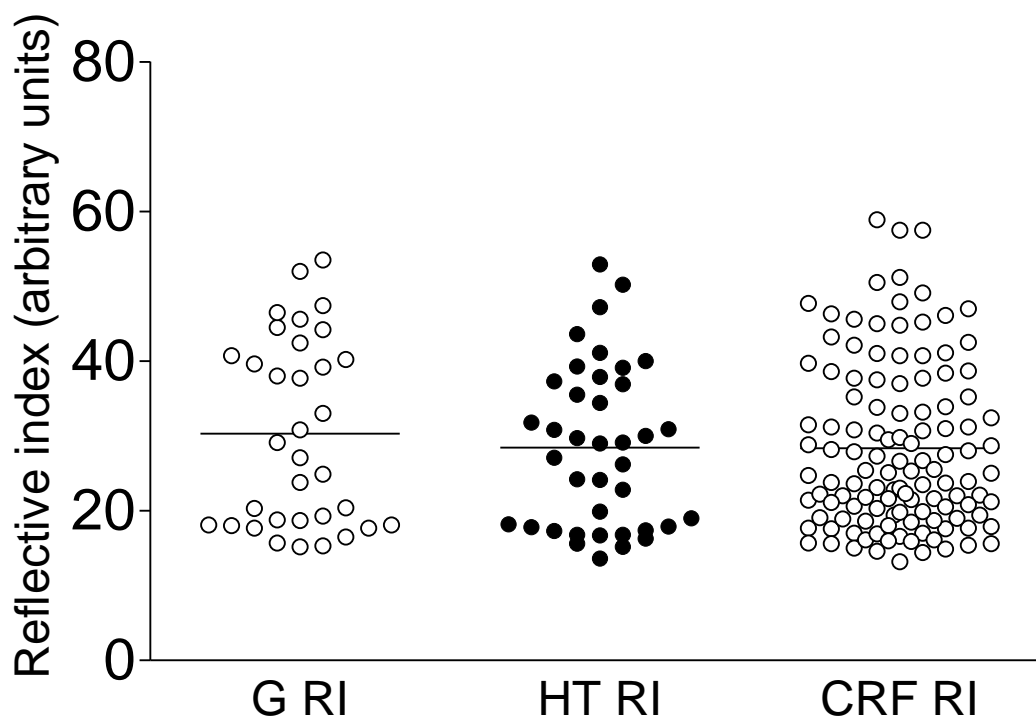


Abbildung 21: Reflektiver Index (RI) bei 39 Kontrollpersonen (G RI), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT RI) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF RI).

Um die endotheliale Funktion zu untersuchen, wurde eine reaktive Hyperämie ausgelöst. Dabei wurde der ipsilaterale Oberarm 5 Minuten lang mit einer Blutdruckmanschette über dem systolischen Blutdruckwert komprimiert. Das Lösen der Stauung bewirkt dann eine endothelvermittelte Vasodilatation. Die endotheliale Funktion wurde durch die RI-Differenz nach und vor der Stauung dargestellt. Die Differenz zwischen dem $RI_{15\text{sec}}$ -Wert (reflektive

Indices als Mittel aller Pulswellen der ersten 15 Sekunden nach Stau) und dem RI-Wert vor Stau war zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; **Abbildung 22**).

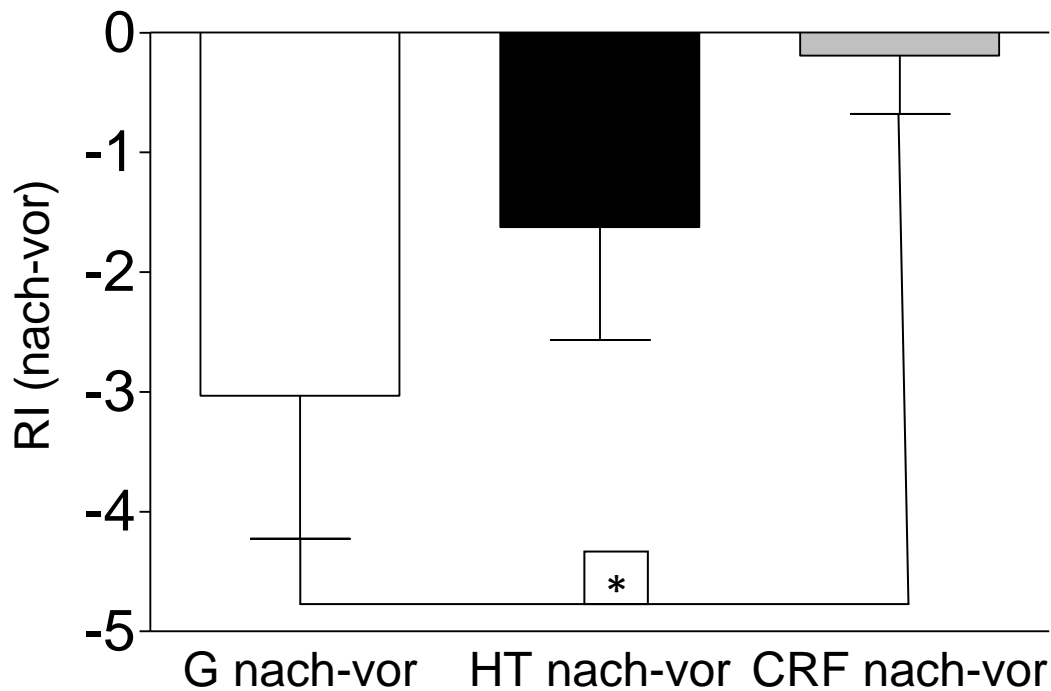


Abbildung 22: Differenz zwischen dem $RI_{15\text{sec}}$ -Wert und dem RI-Wert vor Stau bei 39 Kontrollpersonen (G nach-vor), bei 45 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT nach-vor) und bei 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF nach-vor).

4.3 Analyse der DNA Methylierung

4.3.1 Methylierungsspezifische PCR

4.3.1.1 Methylierung der TRPC3-Promotorstelle

Der Anteil an methylierten TRPC3-Promotorstellen war unter den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$; **Abbildung 23**).

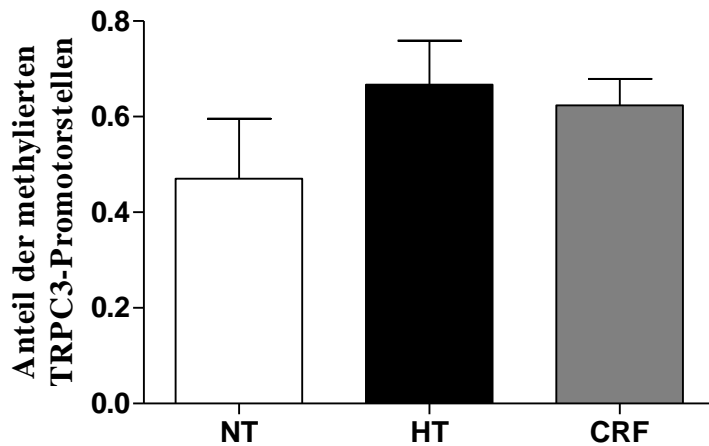


Abbildung 23: Anteil an methylierten TRPC3-Promotorstellen bei 17 Kontrollpersonen (NT), bei 27 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und bei 77 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CRF).

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den systolischen Blutdruckwerten, dem mittleren arteriellen Blutdruck und dem Pulsdruck zwischen den Patienten, bei denen die Promotorstelle methyliert war und den Patienten, bei denen keine Methylierung nachgewiesen wurde ($p > 0,05$; **Abbildung 24**, **Abbildung 25** und **Abbildung 26**).

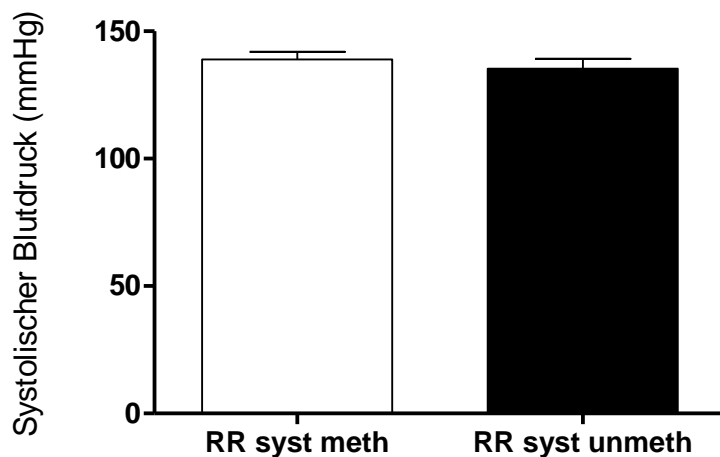


Abbildung 24: Systolischer Blutdruck bei 74 Patienten mit methylierter TRPC3-Promotorstelle (RR syst meth) und 47 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (RR syst unmeth).

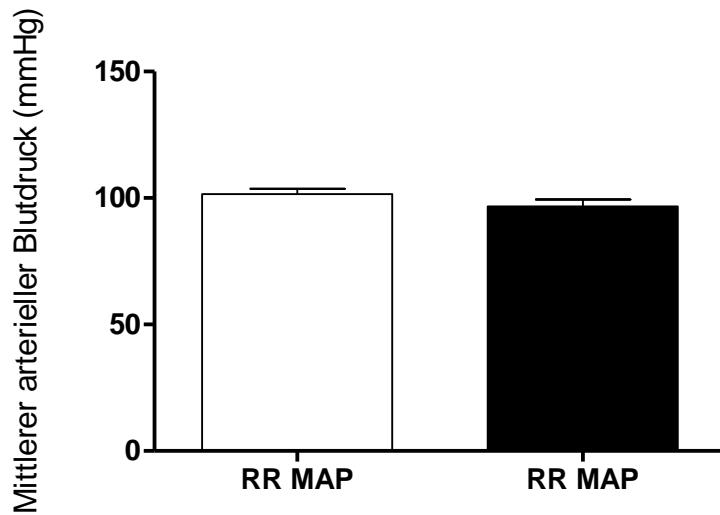


Abbildung 25: Mittlerer arterieller Blutdruck bei 74 Patienten mit methylierter TRPC3-Promotorstelle (RR MAP) und 47 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (RR MAP).

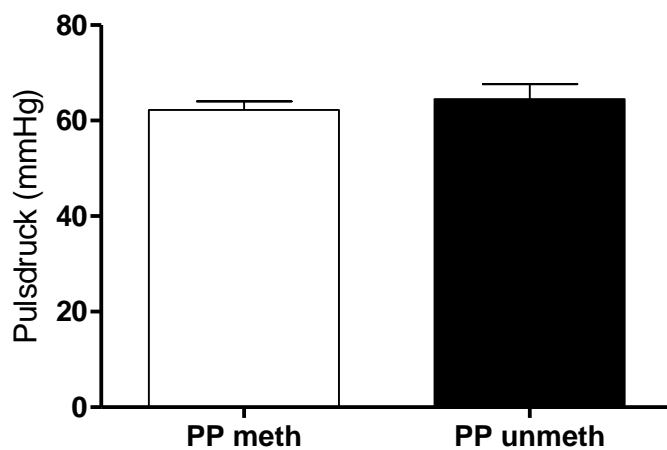


Abbildung 26: Pulsdruck bei 74 Patienten mit methylierter TRPC3-Promotorstelle (PP meth) und 47 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (PP unmeth).

Die Patienten, bei denen die TRPC3-Promotorstelle methyliert war, hatten signifikant höhere diastolische Blutdruckwerte als die Patienten, bei denen keine Methylierung vorlag ($p < 0,05$; **Abbildung 27**).

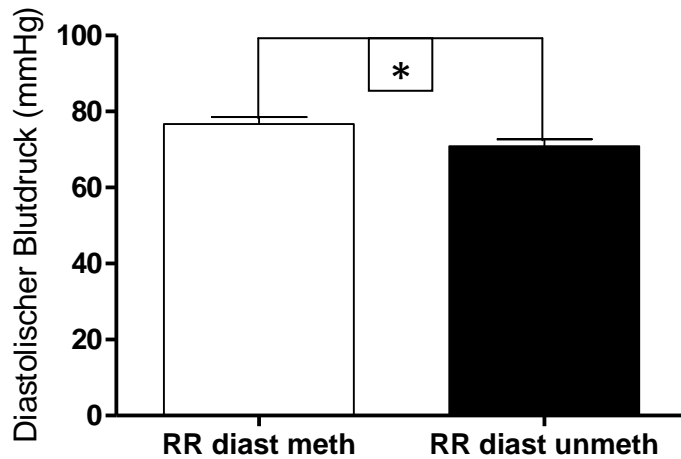


Abbildung 27: Diastolischer Blutdruck bei 74 Patienten mit methylierter TRPC3-Promotorstelle (RR diast meth) und 47 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (RR diast unmeth).

4.3.1.2 Methylierung der TRPC6-Promotorstelle

Der Anteil an methylierten TRPC6-Promotorstellen war zwischen der Gruppe der Kontrollpersonen und diese der Patienten mit essentieller Hypertonie nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; **Abbildung 28**).

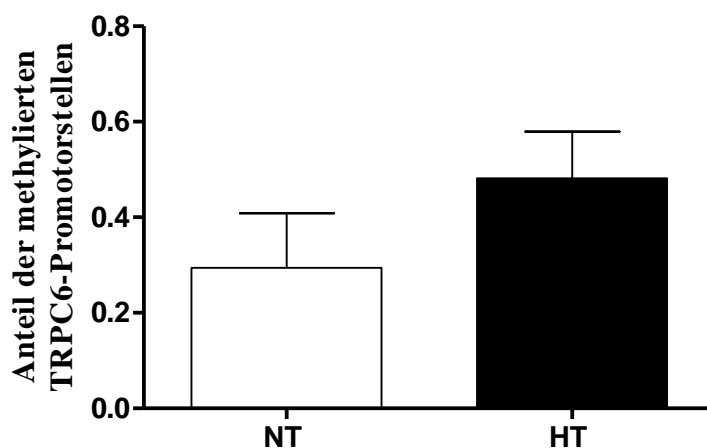


Abbildung 28: Anteil an methylierten TRPC6-Promotorstellen bei 17 Kontrollpersonen (NT) und bei 27 Patienten mit essentieller Hypertonie (HT).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den systolischen Blutdruckwerten, dem mittleren arteriellen Blutdruck und dem Pulsdruck zwischen den Patienten, bei denen die TRPC6-Promotorstelle methyliert war und den Patienten, bei denen keine Methylierung nachgewiesen wurde ($p > 0,05$; **Abbildung 29**, **Abbildung 30** und **Abbildung 31**).

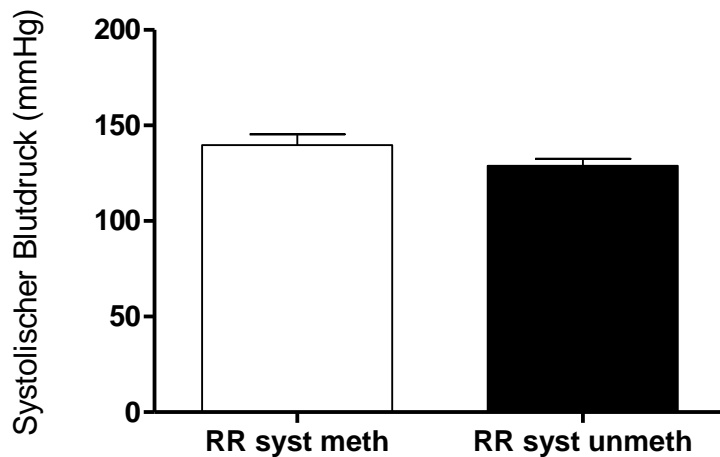


Abbildung 29: Systolischer Blutdruck bei 18 Patienten mit methylierter TRPC6-Promotorstelle (RR syst meth) und 26 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (RR syst unmeth).

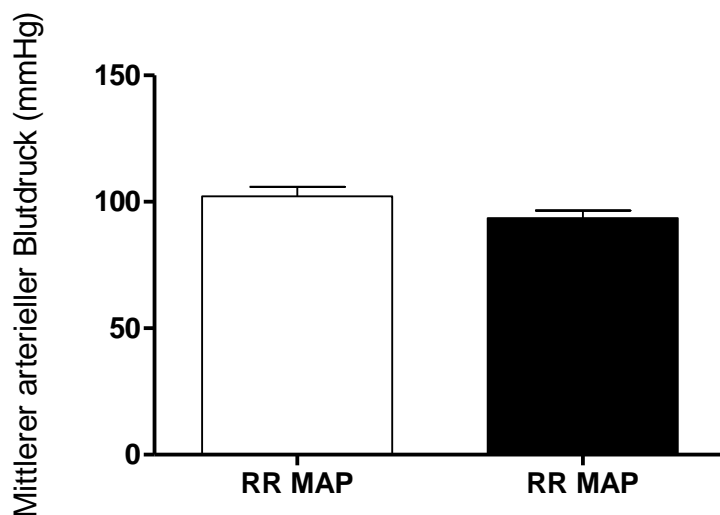


Abbildung 30: Mittlerer arterieller Blutdruck bei 18 Patienten mit methylierter TRPC6-Promotorstelle (RR MAP, weißer Balken) und 26 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (RR MAP, schwarzer Balken).

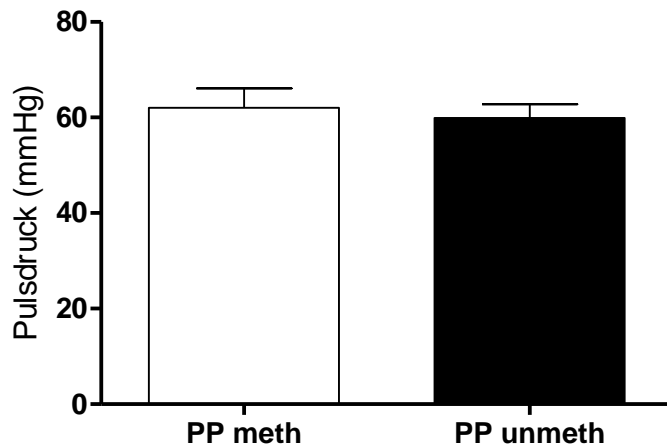


Abbildung 31: Pulsdruck bei 18 Patienten mit methylierter TRPC6-Promotorstelle (PP meth) und 26 Patienten mit nicht methylierter Promotorstelle (PP unmeth).

Die diastolischen Blutdruckwerte der zwei bezüglich des Methylierungszustandes der TRPC6-Promotorstelle untersuchten Gruppen ergaben einen signifikanten Unterschied. Die Patienten, bei denen eine Methylierung vorlag, hatten signifikant höhere diastolische Blutdruckwerte ($p < 0,05$; **Abbildung 32**).

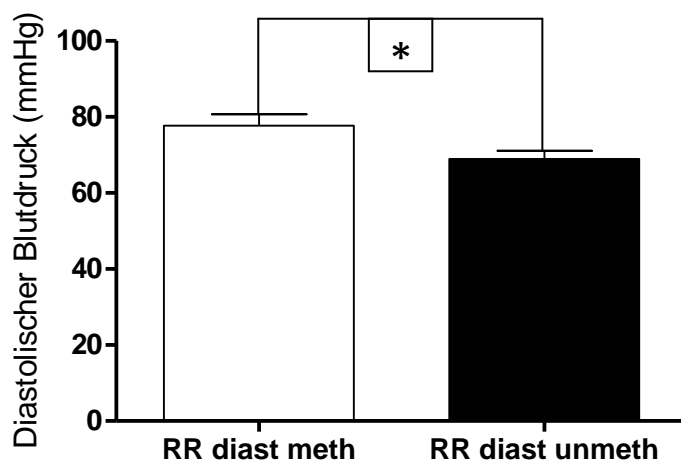


Abbildung 32: Diastolischer Blutdruck bei 18 Patienten mit methylierter TRPC6-Promotorstelle (RR diast meth) und 26 Patienten, bei denen keine Methylierung nachgewiesen wurde (RR diast unmeth).

5. Diskussion

5.1 Arterielle Gefäßsteifigkeit

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie sowie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kommt es oft zu Gefäßveränderungen, die zu einem Elastizitätsverlust führen. Die arterielle Gefäßsteifigkeit kann nicht-invasiv mittels Applanationstonometrie bestimmt werden. Dabei wird der Applanationstonometer auf die Arteria radialis aufgesetzt. Danach erfolgt eine Pulswellenmessung. Die Compliance der großen Gefäße (C1), die Compliance der kleinen Gefäße (C2) und der totale periphere Widerstand (SVR) werden aus den Mittelwerten aller Pulswellen während der 30 Sekunden dauernden Messung durch einen Algorithmus berechnet (Arnett et al., 2001; Finkelstein & Cohn, 1992; McVeigh et al., 1999; Rietzschel et al., 2001). Die arterielle Steifigkeit der großen (S1) und kleinen Gefäße (S2) wird als $S1 = 10/C1$ bzw. als $S2 = 100/C2$ definiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die arterielle Gefäßsteifigkeit von 39 normotensiven Kontrollpersonen, 45 Patienten mit essentieller Hypertonie und 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz untersucht.

Die Patienten mit essentieller Hypertonie hatten signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe in Bezug auf die arterielle Steifigkeit der großen und kleinen Gefäße (S1 und S2; $p < 0,05$). Das bedeutet, dass sowohl die großen als auch die kleinen Gefäße bei Patienten mit essentieller Hypertonie steifer sind.

Es gab eine positive Korrelation zwischen der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße (S1) und dem Pulsdruck, sowie zwischen der arteriellen Steifigkeit der kleinen Gefäße (S2) und dem Pulsdruck. Daraus kann man schlussfolgern, dass je höher der Pulsdruck ist, desto steifer sind die großen und kleinen Gefäße. Die Studien von Marchais et al., 1993 haben ebenfalls gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Gefäßelastizität bzw. der Gefäßsteifigkeit und dem Pulsdruck besteht. Die Studien von Ryan et al., 1995, Avolio et al., 1998 und Hiromoto et al., 1996 haben einen erhöhten Pulsdruck als Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose beschrieben.

Es ergab sich keine Korrelation zwischen der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße (S1), sowie der der kleinen Gefäße (S2) und der Kreatinin-Clearance. Die S1- und S2-Werte bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz waren auch nicht signifikant höher als bei den

Kontrollpersonen. Die Gefäßsteifigkeit zeigte somit in dieser Arbeit keine Korrelation mit der Nierenfunktion. Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick überraschend, da man bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz steifere Gefäße erwartet (Covic et al., 2005). Eine mögliche Erklärung ist die hohe Anzahl an Kontrollpersonen in dieser Arbeit, die an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind. In der Kontrollgruppe hatten 46% der Patienten einen Diabetes mellitus Typ 2. Als Vergleich dazu hatten nur 16% der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz diese Erkrankung. Sowohl Diabetes mellitus Typ 2 als auch eine möglicherweise vorhandene diabetische Neuropathie sind mit vaskulärer Dysfunktion und erhöhter arterieller Steifigkeit assoziiert (Aoun et al., 2001; Yokoyama et al., 2007; Meyer et al., 2004).

5.2 Reflektiver Index

Die digitale Photoplethysmographie wurde schon mehrfach als nicht-invasive und reproduzierbare Methode zur Gefäßuntersuchung in wissenschaftlichen Studien benutzt (Takazawa et al., 1998; Chowienzyk et al., 1999; Millasseau et al., 2000; Scholze et al., 2004).

Die digitale Volumenpulswelle besteht aus einem systolischen und einem diastolischen Teil. Der erste systolische Anteil wird von der voranschreitenden Pulswelle bestimmt. Der diastolische Anteil entsteht durch die Reflexion der Volumenpulswelle in der Peripherie (Chowienzyk et al., 1999; Millasseau et al., 2003). Der reflektive Index wird durch einen Algorithmus berechnet und gilt als Maß für den Gefäßtonus. Ein Abfall des Gefäßtonus (z.B. nach systemischer Nitrogabe) führt zu einem Abfall des reflektiven Index (Takazawa et al., 1998; Chowienzyk et al., 1999; Scholze et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 39 normotensiven Kontrollpersonen, 45 Patienten mit essentieller Hypertonie und 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz die Volumenpulswellenmessung innerhalb einer Episode von 150 Sekunden photoplethysmographisch durchgeführt. Der reflektive Index wurde als Mittelwert aller innerhalb einer Episode aufgezeichneten Pulswellen angegeben. Dabei war der reflektive Index unter den drei untersuchten Gruppen erstaunlicherweise nicht signifikant unterschiedlich. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil die arterielle Hypertonie (Domanski et al., 2002) und die chronische Niereninsuffizienz (Locatelli et al., 2000; Sarnak et al., 2003; Saw et al., 2004; London et al., 2005) zwei der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität darstellen, wobei man aufgrund vorbestehender Gefäßveränderungen einen erhöhten Gefäßtonus erwarten würde.

In der Untersuchung von Scholze et al., 2007 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit essentieller Hypertonie signifikant höhere RI-Werte bei kontinuierlicher Messung in der Nacht im Vergleich zu den normotensiven Kontrollpersonen aufweisen. Im Gegensatz dazu wurden die Messungen in dieser Arbeit während des Tages durchgeführt. Daraus kann man ableiten, dass der Gefäßtonus von Hypertonikern eher in den Nachtstunden erhöht ist. Dadurch kann man das gehäufte Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in den frühen Morgenstunden erklären (Muller et al., 1985; Smolensky et al., 2001). Ein weiterer Unterschied sind die 150-Sekunden dauernden Messepisoden in dieser Arbeit im Gegensatz zu den kontinuierlichen Aufzeichnungen bei der Studie von Scholze et al., 2007.

Die endotheliale Funktion wurde durch eine 5 minütige Kompression des ipsilateralen Oberarms mit einer Blutdruckmanschette über dem systolischen Blutdruckwert und ein nachfolgendes Lösen der Stauung untersucht. Dadurch kommt es physiologischerweise zu einer endothelvermittelten Vasodilatation (Corretti et al., 2002; Koller et al., 1993; Busse et al., 2002; Cooke et al., 1991; Miura et al., 2001; Joannides et al., 1995; Pohl et al., 1985). Dabei kommt es zu einem RI-Abfall auf Werte kleiner als die vor der Kompression.

Eine gestörte endothelvermittelte Vasodilatation wurde sowohl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Nakanishi et al., 2002; Joannides et al., 1997; Pannier et al., 2000) als auch bei Patienten mit essentieller Hypertonie (Joannides et al., 1995; Iwatubo et al., 1997; Higashi et al., 2000) beschrieben und korreliert mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (Al Suwaidi et al., 2000; Schächinger et al., 2000; Perticone et al., 2001; Heitzer et al., 2001).

Die Differenz zwischen dem $RI_{15\text{sec}}$ -Wert und dem RI-Wert vor Stau war bei der Kontrollgruppe im Betrag betrachtet signifikant höher als bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Das ist auch gut mit der Erkenntnis, dass chronische Niereninsuffizienz ein Risikofaktor für die Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen ist, vereinbar (Domanski et al., 2002). Erstaunlich war es, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten.

5.3 Methylierungszustand der TRPC3- und TRPC6-Promotorregionen

Die Untersuchung des Methylierungszustandes der TRPC3- und TRPC6-Promotorregionen wurde mit Hilfe von methylierungsspezifischer PCR (MSP) durchgeführt. Dabei wurde die DNA als Erstes mit Bisulfit behandelt. Danach wurden methylierungsabhängige Sequenzunterschiede

von CpG-Dinukleotiden analysiert (Eads et al., 2000). Vorteile der MSP sind die hohe Sensitivität, die leichte Handhabung und die schnelle Durchführung. Eine exogene DNA-Kontamination ist auch kein signifikantes Problem, weil die MSP-Primer kaum an native DNA binden, da die Umwandlung von Cytosin in Uracil noch nicht stattgefunden hat. Eine größere Gefahr der Kontamination besteht darin, PCR-Produkte von vorigen Experimenten zu übertragen.

Frühere Studien haben in Nagetiermodellen und in diversen menschlichen Geweben gezeigt, dass die TRPC3- und TRPC6-Expression bei Hypertonie signifikant verändert ist (Dietrich et al., 2005; Liu et al., 2005, 2006, 2007, 2009; Thilo et al., 2008, 2009, 2009; Chen et al., 2010; Zulian et al., 2010; Noorani et al., 2011). In den genannten Studien wurde eine TRPC3-Überexpression bzw. eine TRPC6-Unterexpression beobachtet. Die Frage, ob diese Veränderungen die Ursache oder die Folge von Hypertonie, oder ob diese nur ein Epiphänomen sind, ist noch nicht geklärt.

Eine abnorme Methylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion korreliert mit einer verringerten Genexpression und führt zu einer Inaktivierung des betroffenen Gens (Klose & Bird, 2006; Eckhardt et al., 2006; Jeltsch, 2010; Zemach et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Methylierung der TRPC3- und der TRPC6-Promotorstelle mit essentieller Hypertonie assoziiert ist. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in dem Methylierungszustand der vermuteten TRPC3- und TRPC6-Promotorstellen zwischen Patienten mit essentieller Hypertonie und der normotensiven Kontrollgruppe. Die Patienten, bei denen die vermutete TRPC3- bzw. TRPC6-Promotorregion methyliert war, hatten aber signifikant höhere diastolische Blutdruckwerte.

6. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Patienten mit essentieller Hypertonie sowie Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität aufweisen.

In dieser Arbeit wurden mittels nicht-invasiver Gefäßmessungen, nämlich der digitalen Photoplethysmographie und der Applanationstonometrie, die Gefäßeigenschaften von 39 normotensiven Kontrollpersonen, 45 Patienten mit essentieller Hypertonie und 155 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz untersucht. Aufgrund der bekannten Veränderungen von TRPC3 und TRPC6 bei Hypertonie wurde die Methylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion dieser Kanäle an Blutzellen untersucht.

Die Bestimmung der Gefäßsteifigkeit der großen und kleinen Gefäße erfolgte mittels Applanationstonometrie. Patienten mit essentieller Hypertonie hatten signifikant höhere Werte für die arterielle Steifigkeit der großen Gefäße (S1) und der kleinen Gefäße (S2) jeweils im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der arteriellen Steifigkeit der großen Gefäße (S1), beziehungsweise der kleinen Gefäße (S2), und dem Pulsdruck.

Die Volumenpulswelle wurde mittels digitaler Photoplethysmographie aufgezeichnet und ausgewertet. Der reflektive Index (RI) als Maß für den Gefäßtonus wurde aus der Volumenpulscurve bestimmt. Der basale RI war zwischen den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Hingegen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wenn man die Veränderung des RI während einer reaktiven Hyperämie als Ausdruck der Endotheldysfunktion betrachtete. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zeigten eine signifikant eingeschränkte Endothelfunktion.

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) zur Untersuchung des Methylierungszustandes der TRPC3-Promotorstelle wurde bei 77 der niereninsuffizienten Patienten, 27 der Patienten mit essentieller Hypertonie und 17 der Kontrollpersonen durchgeführt. In Bezug auf die TRPC6-Promotorstelle wurde diese Untersuchung ausschließlich bei den 27 Patienten mit essentieller Hypertonie und den 17 Kontrollpersonen durchgeführt.

Die Anteile an methylierten TRPC3- und TRPC6-Promotorstellen waren zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings hatten Patienten, bei denen die TRPC3- bzw. TRPC6-Promotorregion eine gesteigerte Methylierung zeigte, signifikant höhere diastolische Blutdruckwerte.

Literaturverzeichnis

Abraha J. Inauguraldissertation: Veränderung der Gefäßeigenschaften unter Hämodialysetherapie. 2005; <http://www.diss.fu-berlin.de> (letzter Zugriff 04.04.2013).

Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano S. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-954.

Aoun S, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Diabetes mellitus and renal failure: effects on large artery stiffness. *J Hum Hypertens* 2001 Oct; 15(10): 693-700.

Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JR, Gombert-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010 Jun 22; 121(24): 2661-2671. Epub 2010 Jun 7.

Arnett DK, Glasser SP, McVeigh G, Prineas R, Finkelstein S, Donahue R, Cohn JN, Sinaiko A. Blood pressure and arterial compliance in young adults: the Minnesota children's blood pressure study. *Am J Hypertens*. 2001 Mar; 14(3): 200-5.

Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* 1998 Jul; 32(1): 170-175.

Bachmann J, Tepel M, Raidt H, Riezler R, Graefe U, Langer K, Zidek W. Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(1): 121-125.

Barrie L. Inauguraldissertation: Untersuchungen zur Expression von Proteinen des oxidativen Stress und der antioxidativen Abwehr bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. 2010; <http://www.diss.fu-berlin.de> (letzter Zugriff 04.04.2013).

Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in

chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Mar; 8(3): 475-486.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AM.

EDHF: bringing the concepts together. *Trends pharmacol sci.* 2002 Aug; 23(8): 374-380.

Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ. Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci.* 2006 Jan 1; 11: 852-66.

Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, Buffat C, Mignot TM, Tost J, Busato F, Gut I, Rebourcet R, Laissue P, Tsatsaris V, Goffinet F, Rigourd V, Carbonne B, Ferré F, Vaiman D. Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 2007 Jan; 49(1): 76-83. Epub 2006 Nov 6.

Chen X, Yang D, Ma S, He H, Luo Z, Feng X, Cao T, Ma L, Yan Z, Liu D, Tepel M, Zhu Z. Increased rhythmicity in hypertensive arterial smooth muscle is linked to transient receptor potential canonical channels. *J Cell Mol Med.* 2010 Oct; 14(10): 2483-94.

Chowienczyk PJ, Kelly RP, MacCallum BN, Millasseau SC, Andersson TLG, Gosling RG, Ritter JM, Anggard EE. Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Dec; 34(7): 2007-2014.

Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest.* 1991 Nov; 88(5): 1663-1671.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jan 16; 39(2): 257-265.

Covic A, Gusbeth-Tatomir P, Goldsmith DJ. Arterial stiffness in renal patients: an update. *Am J Kidney Dis.* 2005 Jun; 45(6): 965-77.

Dean W, Lucifero D, Santos F. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005 Jun; 75(2): 98-111.

Deutsche Hochdruckliga DHL 2008. Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046-001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013.pdf (letzter Zugriff 24.04.2013).

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^{-/-} mice. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug; 25(16): 6980-9.

Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, Svendsen K, Grimm R, Cohen J, Stamler J; MRFIT Research Group. Pulse pressure and cardiovascular disease-related mortality: follow-up study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 2002 May 22-29; 287(20): 2677-2683.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15; 28(8): E32.

Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet.* 2006 Dec; 38(12): 1378-85. Epub 2006 Oct 29.

Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Seminars in Cancer Biology* 2004 Dec; 14(6): 427-32.

Finkelstein SM, Cohn JN. First- and third-order models for determining arterial compliance. *J Hypertens Suppl.* 1992 Aug; 10(6): 11-4.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005 Juli 26; 102(30): 10604-10609.

Frey FJ. Methylation of CpG islands: potential relevance for hypertension and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2005 May; 20(5): 868-869.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* 1987 Jul 20; 196(2): 261-82.

Goldman JM, Petterson MT, Kopotic RJ, Barker SJ. Masimo signal extraction pulse oximetry. *J Clin Monit Comput.* 2000; 16(7): 475-483.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001 Nov 27; 104(22): 2673-2678.

Herold G und Mitarbeiter, *Innere Medizin*, 2012

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. A comparison of angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium antagonists, beta-blockers and diuretic agents on reactive hyperemia in patient with essential hypertension: a multicenter study. *J Am Coll cardiol.* 2000 Feb; 35(2): 284-291.

Himmelfarb J, Hakim RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003 Nov; 12(6): 593-598.

Hiromoto M, Tomo Y, Tomochika Y, Umemoto S, Matsuzaki M. Echographical assessment of the early stage of experimental atherosclerosis of the descending aorta in rabbits. *Jpn Circ J.* 1996 Sep; 60(9): 691-698.

Iwatubo H, Nagano M, Sakai T, Kumamoto K, Morita R, Higaki J, Ogihara T, Hata T. Converting enzyme inhibitor improves forearm reactive hyperemia in essential hypertension. *Hypertension* 1997 Jan; 29(1 Pt 2): 286-290.

Jeltsch A. Molecular biology. Phylogeny of methylomes. *Science* 2010 May 14; 328(5980): 837-8.

Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995 Mar 1; 91(5): 1314-1349.

Joannides R, Bakkali EH, Le Roy F. Altered flow-dependent vasodilatation of conduit arteries in maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Dec; 12(12): 2623-2628.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun; 3(6): 415-28.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006 Feb; 31(2): 89-97.

Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilatation of arterioles in vitro. *Circ Res.* 1993 Jun; 72(6): 1276-1284.

Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992 Aug; 13(4): 1095-1107.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993 Nov 25; 366(6453): 362-5.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002 Nov; 18(11): 1427-31.

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 Nov; 18(11): 1503-7.

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 Jun; 24(6): 1105-14.

Liu D, Yang D, He H, Chen X, Cao T, Feng X, Ma L, Luo Z, Wang L, Yan Z, Zhu Z, Tepel M. Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats. *Hypertension* 2009 Jan; 53(1):70-6.

Liu DY, Scholze A, Kreutz R, Wehland-von-Trebra M, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M. Monocytes from spontaneously hypertensive rats show increased store-operated and second messenger-operated calcium influx mediated by transient receptor potential canonical Type 3 channels. *Am J Hypertens*. 2007 Oct; 20(10): 1111-8.

Liu DY, Thilo F, Scholze A, Wittstock A, Zhao ZG, Harteneck C, Zidek W, Zhu ZM, Tepel M. Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2007 Apr; 25(4): 799-808.

Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D' Amico M, DelVecchio L, Limido A, Malberti F, Spotti D. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 69-80.

London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14: 525-531.

Maier A, Inauguraldissertation: Bestimmung arterieller Gefäßeigenschaften mittels nichtinvasiver Gefäßmessung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz Stadium 5. 2007; <http://www.diss.fu-berlin.de> (letzter Zugriff 04.04.2013).

Marchais SJ, Guerin AP, Pannier BM, Delavaud G, London GM. Arterial compliance and blood pressure. *Drugs* 1993; 46: 82–87.

McVeigh GE, Bratteli CW, Morgan DJ, Alinder CM, Glasser SP, Finkelstein SM, Cohn JN. Age-related abnormalities in arterial compliance identified by pressure pulse contour analysis: aging and arterial compliance. *Hypertension* 1999 Jun; 33(6): 1392-1398.

Meyer C, Milat F, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2004 Jul; 21(7): 746-51.

Millasseau SC, Guigui FG, Kelly RP, Prasad K, Cockcroft JR, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Noninvasive assessment of the digital volume pulse. Comparison with the peripheral pressure pulse. *Hypertension* 2000 Dec; 36(6): 952-956.

Millasseau SC, Kelly RP, Ritter JM, Chowienczyk PJ. The vascular impact of aging and vasoactive drugs: comparison of two digital volume pulse measurements. *Am J Hypertens*. 2003 Jun; 16(6): 467-472.

Millis RM. Epigenetics and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2011 Feb; 13(1): 21-28.

Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circulation* 2001 Apr 17; 103(15): 1992-1998.

Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, Poole WK, Passamani E, Roberts R, Robertson T, et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985 Nov 21; 313(21): 1315-1322.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992; 24: 17-27.

Nakanishi T, Ishigami Y, Otaki Y, Izumi M, Hiraoka K, Inoue T, Takamitsu Y. Impairment of vascular responses to reactive hyperemia and nitric oxide in chronic renal failure. *Nephron*. 2002; 92(3): 529-535.

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002 Feb; 39(2 Suppl 1): S1–266.

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/toc.htm (letzter Zugriff 12.04.2011).

Noorani MM, Noel RC, Marrelli SP. Upregulated TRPC3 and Downregulated TRPC1 Channel Expression during Hypertension is Associated with Increased Vascular Contractility in Rat. *Front Physiol*. 2011 Jul 22; 2: 42.

Pannier B, Guérin AP, Marchais SJ, Metivier F, Safar ME, London GM. Postischemic vasodilatation, endothelial activation and cardiovascular remodeling in endstage renal disease. *Kidney Int*. 2000 Mar; 57(3): 1091-1099.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001 Jul 10; 104(2): 191-196.

Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of the endothelium in the vasodilator response to flow in vivo. *Hypertension* 1986 Jan; 8(1): 37-44.

Rietzschel ER, Boeykens E, De Buyzere ML, Duprez DA, Clement DL. A comparison between systolic and diastolic pulse contour analysis in the evaluation of arterial stiffness. *Hypertension* 2001 Jun; 37(6): 15-22.

Rosenberg P, Hawkins A, Stiber J, Shelton JM, Hutcheson K, Bassel-Duby R, Shin DM, Yan Z, Williams RS. TRPC3 channels confer cellular memory of recent neuromuscular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 22; 101(25): 9387-92.

Ryan SM, Waack BJ, Weno BL, Heistad DD. Increases in pulse pressure impair acetylcholine-induced vascular relaxation. *Am J physiol.* 1995 Jan; 268(1 Pt 2): 359-363.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raji L, Spinosa DJ, Wilson PW; American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003 Oct 28; 108(17): 2154-2169.

Saw J, Levin A, Gin K. Coronary artery disease in chronic kidney disease patients: assessing the evidence for diagnosis, screening and revascularization. *Can J Cardiol.* 2004 Jun; 20(8): 807-813.

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse Long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000 Apr 25; 101(16): 1899-1906.

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 Jan 27; 109(3): 369-374.

Scholze A, Burkert A, Mardanzei K, Suvd - Erdene S, Hausberg M, Zidek W, Tepel M. Increased arterial vascular tone during the night in patient with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007 Jan; 21(1): 60-7. Epub 2006 Oct 5.

Smolensky MH, Haus E. Circadian rhythms and clinical medicine with applications to hypertension. *Am J Hypertens.* 2001 Sep; 14(9 Pt 2): 280S-290S.

Takazawa K, Tanaka N, Fujita M, Matsuoka O, Saiki T, Aikawa M, Tamura S, Ibukiyama C. Assessment of vasoactive agents and vascular aging by the second derivative of photoplethysmogram waveform. *Hypertension* 1998 Aug; 32(2): 365-370.

Tepel M, Echelmeyer M, Orié NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int.* 2000 Aug; 58(2): 867-872.

Thies C, Inauguraldissertation: Die nicht invasiv gemessene Gefäßsteifigkeit ist ein Prädiktor für die Mortalität bei Dialysepatienten. 2011; <http://www.diss.fu-berlin.de> (letzter Zugriff 04.04.2013).

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. *J Hypertens.* 2009 Jun; 27(6): 1217-23.

Thilo F, Loddenkemper C, Berg E, Zidek W, Tepel M. Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension. *Mod Pathol.* 2009 Mar; 22(3): 426-30.

Thilo F, Scholze A, Liu DY, Zidek W, Tepel M. Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Mar 1; 471(1): 57-62.

Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int.* 1998 Jun; 53(6): 1748-1754.

Wittrock M, Scholze A, Compton F, Schaefer JH, Zidek W, Tepel M. Noninvasive pulse wave analysis for the determination of central artery stiffness. *Microvasc Res.* 2009 Mar; 77(2):109-12. Epub 2008 Oct 21.

Wittrock M, Inauguraldissertation: Nichtinvasive Bestimmung des Herzeitvolumens und verschiedener vaskulärer Parameter im Vergleich zu invasiv erhobenen Parametern bei intensivpflichtigen Patienten. 2010; <http://www.diss.fu-berlin.de> (letzter Zugriff 04.04.2013).

Yeun JY, Kaysen GA. C-reactive protein, oxidative stress, homocysteine, and troponin as inflammatory and metabolic predictors of atherosclerosis in ESRD. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000 Nov; 9(6): 621-630.

Yokoyama H, Yokota Y, Tada J, Kanno S. Diabetic neuropathy is closely associated with arterial stiffening and thickness in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2007 Dec; 24(12): 1329-35. Epub 2007 Oct 17.

Yu Y, Keller SH, Remillard CV, Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang JY, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan MD, Rubin LJ, Yuan JX. A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009 May 5; 119(17): 2313-22.

Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 2010 May 14; 328(5980): 916-9. Epub 2010 Apr 15.

Zulian A, Baryshnikov SG, Linde CI, Hamlyn JM, Ferrari P, Golovina VA. Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca²⁺ homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Sep; 299(3): H624-33. Epub 2010 Jul 9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kamen Ivanov, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Einfluss von arterieller Hypertonie und chronischer Niereninsuffizienz auf die Gefäßeigenschaften und Methylierung der TRPC3- und TRPC6 Promotorstelle] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum : 05.02.2014

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Martin Tepel für die hervorragende Betreuung und die Geduld, mit der er mir bei sämtlichen Problemen, die im Rahmen dieser Arbeit auftauchten, geholfen hat. Weiterhin bedanke ich mich beim nephrologischen Team des Campus Benjamin Franklin für die Unterstützung bei meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Florian Thilo für die gründliche Einarbeitung im Labor und für seine ständige Hilfsbereitschaft bei Schwierigkeiten im experimentellen Verlauf bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Alexander Bolwin für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für den finanziellen und emotionalen Rückhalt.

Außerdem danke ich in großem Maße auch meiner Lebensgefährtin Veneta Vasileva für ihren stetigen Beistand.