

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TRPC Kanäle und ihre mögliche Beteiligung an der Regulation
von Reninhaushalt und Kreislauf der Maus**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Plattner

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TRPC Kanäle und ihre mögliche Beteiligung an der Regulation
von Reninhaushalt und Kreislauf der Maus**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Plattner

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Schweda

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dierk Endemann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	7
1.1	Arterielle Hypertonie als Volkskrankheit	7
1.2	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	8
1.3	Regulation der Reninfreisetzung	11
1.3.1	Systemische Regulation	11
1.3.2	Zelluläre Regulation	13
1.4	TRPC: Canonical transient receptor potential channel	18
1.4.1	Einordnung in die Familie der TRP Kanäle	18
1.4.2	Expression in Säugetieren	19
1.4.3	Funktionen: Zusammenhänge SOC-TRPC-STIM1-Orai	20
1.4.4	Knockoutmäuse als geeignetes Versuchsmodell.....	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit	25
2	<i>Material und Methoden</i>	27
2.1	Material	27
2.1.1	Versuchstiere	27
2.1.2	Primer	27
2.1.3	Chemikalien.....	28
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.2	In vivo Methoden	29
2.2.1	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung	29
2.2.2	Plasmareninbestimmung	30
2.2.3	Untersuchung der Nierenfunktion	31
2.3	In vitro Methoden	32
2.3.1	Mikrodissektion zur Isolierung von Glomerula	32
2.3.2	Isolierung von JG-Zellen.....	32
2.3.3	As4.1 Zellkultur.....	33
2.3.4	mRNA-Bestimmung.....	33
2.3.4.1	RNA-Isolierung.....	33
2.3.4.2	Reverse Transkription	34
2.3.4.3	Qualitative Messung durch PCR mit dem Thermocycler.....	35

2.3.4.4	Semiquantitative Messung durch Real Time PCR	35
2.3.5	Genotypisierung	36
2.4	Statistik.....	36
3	<i>Ergebnisse</i>	37
3.1	Genotypisierung.....	37
3.2	Nachweis von TRPC-mRNA im Nierengewebe der Maus.....	38
3.2.1	Gesamtniere.....	38
3.2.2	Glomerula.....	38
3.2.3	JG-Zellen und As.4.1 Zellen	40
3.3	Vergleich der Plasmareninspiegel von Wildtyp- und TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen.....	42
3.4	Messung von Renin-mRNA aus der Niere von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos... 	43
3.5	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos.....	44
3.5.1	unter Normalbedingungen.....	44
3.5.2	nach Gabe von Propranolol	45
3.6	Vergleich der Nierenfunktion von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos	47
3.6.1	Wasserausscheidung.....	48
3.6.2	Na ⁺ - und K ⁺ -Ausscheidung	49
4	<i>Diskussion</i>	50
5	<i>Zusammenfassung</i>	57
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	59
7	<i>Anhang</i>	65
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	65
7.2	Erklärung.....	68
7.3	Lebenslauf	69
7.4	Danksagung.....	70

1 Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie als Volkskrankheit

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache (World Health Organisation, 2008). Im Jahr 2008 starben allein in Deutschland 356.729 Menschen an den Folgen von Krankheiten des Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt, 2008). Unter den Risikofaktoren für Herzinfarkt, Schlaganfall und andere mit dem Gefäßsystem assoziierte Erkrankungen ist die arterielle Hypertonie einer der wichtigsten. Dass gerade die Prävalenz dieses Risikofaktors in der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland im internationalen Vergleich mit am höchsten ist (Tabelle 1.1) (Wolf-Maier et al., 2003), zeigt den Handlungsbedarf, der hier auf dem Gebiet der präventiven Gesundheitsvorsorge herrscht.

Land	Prävalenz ^a in %			Hypertoniker unter Therapie in %
	Gesamt	Männer	Frauen	
Nordamerika	27,6	30,4	24,8	44,4
USA	27,8	29,8	25,8	52,5
Kanada	27,4	31,0	23,8	36,3
Europa	44,2	49,7	38,6	26,8
Italien	37,7	44,8	30,6	32,0
Schweden	38,4	44,8	32,0	26,2
England	41,7	46,9	36,5	24,8
Spanien	46,8	49,0	44,6	26,8
Finnland	48,7	55,7	41,6	25,0
Deutschland	55,3	60,2	50,3	26,0

Tabelle 1.1 Prävalenz der Hypertonie in sechs europäischen Ländern, Kanada und den USA (adaptiert nach Wolf-Maier et al., 2003) ^aHypertonie definiert als Blutdruck \geq 140/90 mmHg und/oder antihypertensive Behandlung

Da für die Beziehung zwischen Blutdruckwerten und dem Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden, ein direkter logarithmisch-linearer Zusammenhang gezeigt werden konnte (World Health Organisation, 2002), geht man heute immer weniger von einer binären Einteilung in gesund/krank aus. Umso wichtiger werden gut verträgliche Medikamente, mit deren Hilfe der Blutdruck der Menschen optimal eingestellt werden kann. Ein Blick in die Verordnungsblöcke der Ärzte in Deutschland verrät, wo die pathophysiologischen Hauptansatzpunkte im Kampf gegen den Hochdruck liegen und welche finanziellen Ausmaße dies für das Gesundheitssystem annimmt. Die Arzneimittelgruppe mit der größten Zahl an Verordnungen (46,2 Mio.), dem höchsten Verordnungsvolumen gemessen an definierten Tagesdosen (6178,0 Mio.) und dem höchsten erzielten Umsatz (1888,6 Mio. €) überhaupt war im

Jahr 2008 die Gruppe der Angiotensin-Hemmstoffe (Schwabe, 2009). Zu dieser gehören neben den Inhibitoren des Angiotensin Converting Enzyms (ACE-Hemmer) die Blocker der Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 (AT₁-Blocker) und seit kurzem auch die Renininhibitoren.

1.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein endokrines System, an welchem Leber, Niere, Lunge und Gefäßsystem beteiligt sind und das einen wichtigen Regulator der Homöostase des Natrium- und des Wasserhaushalts, des intra- und extrarenalen Gefäßwiderstands und nicht zuletzt des arteriellen Blutdrucks darstellt. Gemäß dieser klassischen Definition wird die Aspartatprotease Renin über die enzymatisch inaktive Vorstufe Prorenin von den juxtaglomerulären (JG) Epitheloidzellen, welche in der Tunica media der afferenten Arteriolen der Glomerula liegen, gebildet und auf verschiedene Reize hin, aber auch konstitutiv, in das Vas afferens sezerniert (siehe Abb. 1.1).

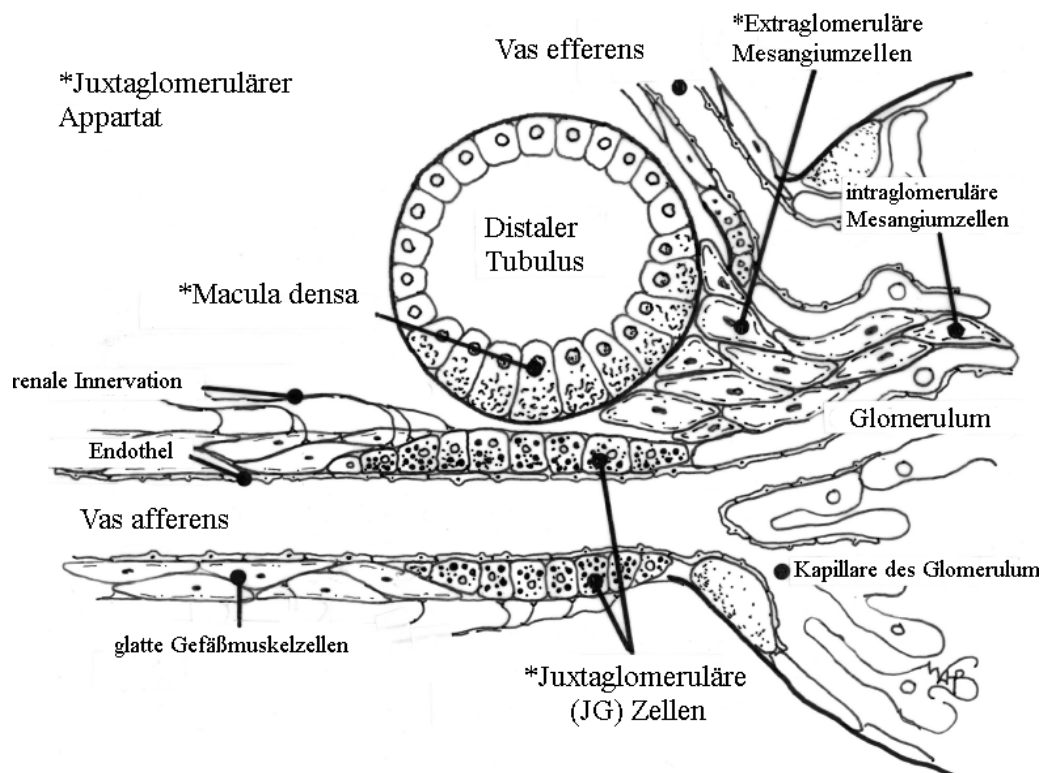


Abbildung 1.1 Schematische Zeichnung des Juxtaglomerulären Apparats und seiner benachbarten Strukturen [adaptiert nach (Beierwaltes, 2010)]

Das Substrat des Renins, Angiotensinogen, wird in der Leber gebildet und freigesetzt und in der Zirkulation zum Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) gespalten. Der nächste Schritt der Kaskade erfolgt durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), welches überwiegend in den Endothelzellen des Gefäßsystems der Lunge exprimiert wird und durch eine erneute Abspaltung von zwei Aminosäuren das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) bildet. ANG II, der vermeintliche Haupteffektor des RAAS, wirkt an spezifischen Angiotensin II Typ 1 (AT₁) Rezeptoren, was u. a. zur Konstriktion glatter Gefäßmuskelzellen, Stimulation renaler Natriumresorption, zu verstärkter Ausschüttung von Katecholaminen, Antidiuretischem Hormon (ADH) und Aldosteron und zu einer Steigerung von Durst und Salzappetit führt (Schweda & Kurtz, 2009). All diese Einzelwirkungen bewirken letztendlich eine Steigerung des arteriellen Blutdrucks, führen jedoch im Zuge von negativen Feedback-Schleifen z. T. wieder zur Hemmung der Reninfreisetzung (siehe Abb. 1.2).

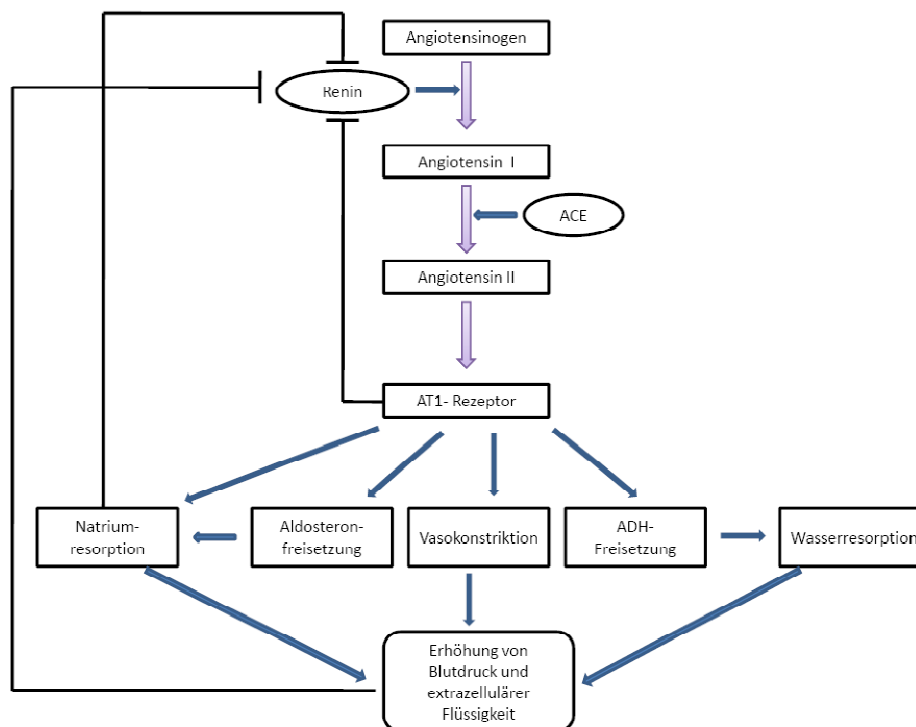


Abbildung 1.2 Regelkreis des „klassischen“ RAAS ACE=Angiotensin Converting Enzyme, ADH=Antidiuretisches Hormon, AT1-Rezeptor= Angiotensin II Typ 1 Rezeptor

Dieser überschaubare Regelkreis erklärt die Hauptwirkung des RAAS, nämlich die Blutdruckstabilisierung. Neuere Erkenntnisse deuten jedoch auf einen sehr viel komplexeren Sachverhalt hin. So wurden verschiedene andere Signalwege der Angiotensinbildung, neue aktive Komponenten, Metaboliten und Rezeptoren in verschiedenen Lokalisationen im ganzen Körper und viele unterschiedliche Effekte der neuen Spieler im RAAS entdeckt (Rosivall, 2009).

Beispielsweise kann ANG II von Aminopeptidasen zu ANG III und ANG IV weiter metabolisiert werden, welches dann an einen eigenen Angiotensin IV-Rezeptor oder, im Falle von ANG III, an den AT₁-Rezeptor bindet und so verschiedene Wirkungen entfaltet. Des Weiteren kann aus ANG I und II mittels ACE2 ein anderes bioaktives Peptid entstehen, nämlich das aus sieben Aminosäuren bestehende Angiotensin(1-7). Auch existieren neben den Angiotensin-Rezeptoren noch andere, an denen Bestandteile des RAAS Effekte bewirken, wie z. B. der Renin/Prorenin-Rezeptor, an dem sowohl Prorenin als auch Renin binden können und so von ihrer Enzymfunktion unabhängig möglicherweise zu prosklerotischen Veränderungen an Geweben führen (Nguyen & Danser, 2008). Diese und weitere Beispiele sind in Abb. 1.3 und Tab. 1.2 nochmals zusammengefasst.

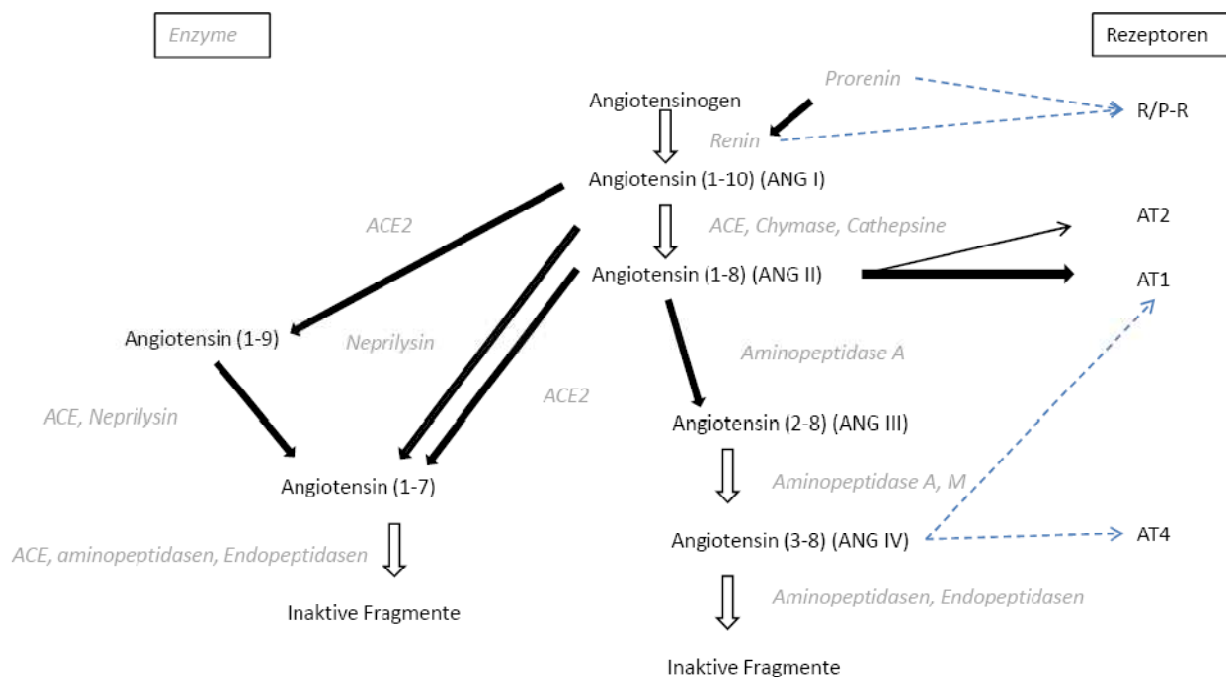


Abbildung 1.3 Vereinfachter Überblick über Proteine, Peptide, Enzyme und Rezeptoren des RAAS [adaptiert nach(Schmieder et al., 2007)] ANG=Angiotensin, ACE=Angiotensin Converting Enzyme, R/P-R=Renin/Prorenin Rezeptor, AT1=Angiotensin II Typ1 Rezeptor

	Voller Name	Ligand	Funktion
AT₁	Angiotensin II Typ 1Rezeptor	Angiotensin II Angiotensin III	Vasokonstriktion, Stimulation von Sympathikus und Aldosteronfreisetzung, Förderung von Zellwachstum, Matrixablagerungen und Entzündung
AT₂	Angiotensin II Typ 2Rezeptor	Angiotensin II	Antagonismus zu den Effekten von AT1, Förderung von Apoptose, Protektion von Nervengewebe, möglicherweise Synergismus mit AT1 bei Entzündungsförderung
AT₄	Angiotensin IV Rezeptor	Angiotensin IV	Vasodilatation, herabgesetzter Natrium-Transport im Tubulus, verbessertes Gedächtnis, möglicherweise proinflammatorisch

R/P-R	Renin/Prorenin Rezeptor	Renin Prorenin	Anstieg von Angiotensinbildung, unabhängige Förderung von Matrixablagerungen
--------------	-------------------------	-------------------	--

Tabelle 1.2 Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [adaptiert nach(Schmieder et al., 2007)]

Ausgangspunkt all dieser immer mehr im Detail erforschten Schritte ist jedoch die Bildung und Freisetzung des Renins und auch des Prorenins aus den JG-Zellen. Deshalb ist es, auch im Hinblick auf die etwaige Entwicklung von neuen Wirkstoffen, die modulierend in das RAAS eingreifen und an ganz neuen Angriffspunkten ansetzen könnten, unabdingbar, die Regulationsmechanismen der Reninfreisetzung im Detail zu verstehen. Obwohl viele Fortschritte auf dem Weg dorthin in den letzten Jahren gemacht wurden, gibt es noch immer einige wichtige Details, über die wenig bekannt ist.

1.3 Regulation der Reninfreisetzung

1.3.1 Systemische Regulation

Wie teilweise bereits aus Abb. 1.2 zu ersehen ist, gibt es zahlreiche Faktoren, die auf systemischer Ebene die Bildung und Freisetzung von Renin modulieren. Die drei wichtigsten davon sind der systemische arterielle Blut- und damit verbunden der renale Perfusionsdruck, die Salzbelastung des Körpers und die Aktivität des sympathischen Nervensystems.

In verschiedenen Versuchsaufbauten, wie der isoliert perfundierten Niere (IPN), isoliert perfundierten Glomerula oder auch isolierten JG-Zellen, konnte gezeigt werden, dass die Reninfreisetzung in inverser Beziehung zum **renalen Perfusionsdruck** steht, so dass ein Abfall des Drucks die Freisetzung stimuliert, wohingegen ein Anstieg sie hemmt (Schweda & Kurtz, 2009). Dabei kann die Druckänderung vermutlich direkt von den JG-Zellen selbst und unabhängig von der Macula densa detektiert werden, da sowohl bei nicht-filternden Nieren (Scholz & Kurtz, 1993), als auch isoliert perfundierten Glomerula ohne Macula densa (Bock et al., 1992), und isolierten JG-Zellen dieser Zusammenhang zu sehen war (Hirota et al., 2002). Die Verbindung zwischen Druck und Sekretion von Renin wird wohl über einen Kalziumeinstrom und damit eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ hergestellt, da bei fehlendem extrazellulärem Kalzium der erwartete Effekt ausblieb (Wagner et al., 2007). Eine erhöhte mechanische Belastung der JG-Zellen durch einen Anstieg des Perfusionsdrucks führt zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} und hemmt auf diese Weise die Reninfreisetzung. Dagegen bewirkt der verminderte mechanische Stress auf die JG-Zellen bei einem Druckabfall eine Verminderung des Kalziumeinstroms, was wiederum die Reninfreisetzung fördert. Was genau $[Ca^{2+}]_i$ in den JG-Zellen bewirkt, wird später noch genauer erläutert werden. Neben diesem eben

beschriebenen Signalweg spielt auch die Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) mit seiner anschließenden Degradierung zu Adenosin und die A1-Adenosin-Rezeptoren (A1AR) eine Rolle (Schweda et al., 2005).

Für die Beleuchtung des zweiten systemischen Regulators, der **Salzbelastung** im Körper, sollte man sich zunächst die anatomischen Verhältnisse der Niere nochmals vor Augen führen. Bei jedem Nephron kommt der dicke Teil der aufsteigenden Henle-Schleife mit seinen Zellen der Macula densa in engen Kontakt mit dem Gefäßpol seines zugehörigen Glomerulums, und hier v. a. dem Vas afferens mit den darin enthaltenen glatten Muskel- und JG-Zellen (siehe Abb. 1.1). An dieser Stelle, die Teil des Juxtaglomerulären Apparats ist, kommt es mittels der gerade genannten Zellen zu einer Interaktion zwischen tubulärer Flüssigkeit auf der einen und Gefäßtonus und Reninfreisetzung auf der anderen Seite. Eine hohe Konzentration an Natriumchlorid [NaCl] im distalen Tubulus führt dabei zu einer Hemmung der Reninsekretion und einer Erhöhung des Gefäßtonus in der afferenten Arteriole mit einer sich daraus ergebenden Senkung der Filtrationsrate im Glomerulum. Andererseits bewirkt eine Erniedrigung von [NaCl] eine vermehrte Freisetzung von Renin. Allgemein anerkannt ist, dass die Salzkonzentration in den Zellen der Macula densa mittels des apikalen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters registriert wird. Welche im Signalweg weiter unten liegenden Signalmoleküle dann jedoch die Effekte genau bewirken, ist weniger sicher. So ist etwa eine durch niedrige Salzkonzentrationen getriggerte Hochregulierung der Cyclooxygenase 2 (COX2) in der Macula densa denkbar, was dann mittels Bildung von Prostaglandin E2 (PGE2) und Bindung an den zugehörigen PGE2-Rezeptoren zu einer Stimulation der Adenylatzyklasen und einer gesteigerten Reninfreisetzung in den JG-Zellen führt (Harrison-Bernard, 2009). Auch für die Signalkaskade bestehend aus ATP, Adenosin und A1-Adenosinrezeptor konnte gezeigt werden, dass sie den Gefäßtonus und die Ausschüttung von Renin mit dem Salzgehalt an der Macula densa verbindet (Castrop, 2007).

Schließlich wäre noch der Einfluss des **sympathischen Nervensystems** auf das RAAS zu nennen. Sowohl zirkulierende Katecholamine, als auch an den JG-Zellen ansetzende sympathische Nervenfasern vermitteln über β_1 -adrenerge Rezeptoren eine gesteigerte Reninausschüttung (DiBona & Kopp, 1997). Die Bedeutung dieses nervalen Einflusses konnte u. a. mit Hilfe von Doppelknockoutmäusen gezeigt werden, denen β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren fehlten und bei denen die gemessenen Plasmareninspiegel um mehr als 80% im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe reduziert waren (Kim et al., 2007). Neben dieser direkten Wirkung efferenter Anteile des sympathischen Nervensystems auf die JG-Zellen hat dieses darüberhinaus über andere Mechanismen Einfluss auf den renalen Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate, den tubulären Wasser- und Salztransport und somit auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von Bluthochdruck. So wurde interessanterweise gezeigt, dass bei Patienten, die an einer

medikamentös mit Angiotensin-Hemmstoffen nicht einstellbaren Hypertonie litten, durch eine Denervierung der Nieren der Blutdruck deutlich gesenkt werden konnte (DiBona & Esler, 2010). Neben diesen drei eben beschriebenen Hauptregulatoren gibt es noch einige andere Hormone und parakrin wirkende Botenstoffe, die Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von Renin haben. Der Vollständigkeit halber seien hier das bei erhöhter Druckbelastung in den Vorhöfen des Herzen gebildete atriale natriuretische Peptid (ANP), platelet-activating factor (PAF) und auch Angiotensin II (ANG II) mit hemmender Wirkung für die Reninfreisetzung genannt. Stimulierend wirken vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), das Neuropeptid PACAP, Adrenomedullin, Stickstoffmonoxid (NO) und auch die Prostaglandine E₂ und I₂. Für weitere Informationen sei an dieser Stelle auf diverse Reviews verwiesen (Hackenthal et al., 1990), (Schweda et al., 2007), (Schweda & Kurtz, 2009).

1.3.2 Zelluläre Regulation

Auf zellulärer Ebene sind es in erster Linie drei Signalmoleküle, die die Freisetzung des Renins regulieren: die intrazelluläre freie Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$, zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Schweda & Kurtz, 2004). Während der Botenstoff cAMP die zentrale Rolle bei der Freisetzung des Renins einnimmt und $[Ca^{2+}]_i$ hemmenden Einfluss besitzt, kann die Wirkung von cGMP sowohl aktivierend, als auch inhibierend sein.

Die Tatsache, dass **cAMP** die Ausschüttung von Renin stimuliert, ist allgemein anerkannt und konnte in vielen verschiedenen Versuchen gezeigt werden. So bewirkten die oben erwähnten stimulatorischen Substanzen wie PGE₂ und PGI₂ (Jensen et al., 1996), Adrenomedullin (Jensen et al., 1997), CGRP (Kurtz et al., 1988) oder Stimulatoren des β_1 -Rezeptors wie Isoproterenol (Hackenthal et al., 1990) in isolierten JG-Zellen nicht nur eine erhöhte Freisetzung von Renin, sondern führten gleichzeitig über eine Rezeptor vermittelte Aktivierung von Adenylatzyklen (ACs) zu erhöhten cAMP-Spiegeln. Auch direkte Aktivierung der ACs mit Forskolin führte sowohl bei der reninproduzierenden Zelllinie As 4.1 als auch bei isolierten JG-Zellen zu einem starken Anstieg der Reninausschüttung (Grünberger et al., 2006). Ebenso führte die direkte Applikation von cAMP in das Zytosol von JG-Zellen mittels einer Patch-Pipette zu einer raschen Freisetzung von Renin (Friis et al., 1999). Wie cAMP letztendlich zur Freigabe von Renin führt, ist bis heute kaum verstanden. So ist zwar bekannt, dass die Ausschüttung via Exozytose erfolgt und der Proteinkinase A (PKA) dabei eine entscheidende Rolle zukommt (Friis et al., 1999), wie genau dies jedoch vermittelt wird, ist unklar. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird nicht nur durch die gebildete Menge, sondern auch durch das Ausmaß seines Abbaus bestimmt. Dieser

wird im Falle von cAMP von Phosphodiesterasen (PDEs) bewerkstelligt, die cAMP zu 5'-AMP hydrolysieren. Unselektive Hemmung von PDEs, beispielsweise durch 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) oder Theophyllin, stimulieren folglich die Reninausschüttung. In Experimenten zur Expression der verschiedenen PDE-Isoformen in JG-Zellen stellte sich heraus, dass in diesen Zellen v. a. die Isoformen PDE-3 und PDE-4 vorkommen (Friis et al., 2002). In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis zeigte sich dann sowohl in vivo als auch in vitro eine deutliche Stimulation der Reninfreisetzung durch eine spezifische Hemmung von PDE-3 und PDE-4. Für eine der beiden vorkommenden Isoformen, nämlich PDE-3, wurde gezeigt, dass ein intrazellulärer Anstieg von cGMP diese inhibiert (Beavo, 1995). Auf diese Weise bewirkt z. B. das von der löslichen Guanylatzyklase (sGC) nach Aktivierung durch NO gebildete cGMP indirekt über einen Anstieg von cAMP eine Stimulation der Reninausschüttung, was in vivo (Beierwaltes, 2006) und auch in Patch Clamp Experimenten an einzelnen JG-Zellen nachgewiesen wurde (Friis et al., 2002).

Wie oben bereits erwähnt, wurde für **cGMP** jedoch nicht nur dieser stimulierende Einfluss gezeigt, sondern auch ein hemmender, und zwar unabhängig davon, ob NO oder die Bindung von ANP an seinen Rezeptor der Trigger zur Bildung waren (Kurtz & Wagner, 1998). Diese inhibierende Wirkung wird über die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) vermittelt, welche in JG-Zellen hauptsächlich in der Nähe von Renin-Speichervesikeln nachgewiesen wurde (Gambaryan et al., 1996). In Versuchen mit transgenen Mäusen wurde gefunden, dass stabile cGMP-Analoga zwar in isolierten JG-Zellen von Wildtyp- und cGKI-, jedoch nicht von cGKII-Knockoutmäusen die Reninausschüttung hemmen konnten (Wagner et al., 1998). Aus diesen Versuchen kann gefolgert werden, dass cGKII die hemmende Wirkung von cGMP vermittelt. Die molekularen Effekte der cGKII sind allerdings unklar. Auch die Frage, ob mehr die stimulatorischen oder die inhibitorischen Effekte die Wirkung von cGMP bestimmen, ist bis heute wenig verstanden. Aufgrund der Tatsache, dass die Affinität von cGMP zu PDE-3 höher ist als die zu cGKII und dass cGKII in der Lage ist, den stimulatorischen Effekt von cAMP abzuschwächen, kann man vermuten, dass ein moderater Anstieg von cGMP die Reninsekretion zwar stimuliert, ein starkes Ansteigen der Konzentration sie jedoch inhibiert (Schweda & Kurtz, 2004). Außerdem erscheint es einleuchtend, dass die intrazelluläre Lokalisation von cGMP-bildenden Enzymen und den Zielmolekülen von cGMP in verschiedenen Kompartimenten einen wichtigen Faktor für die Gesamtwirkung von cGMP darstellt. Lösliche Guanylatzyklase (sGC), die durch NO aktiviert wird, befindet sich genauso wie PDE-3 im Zytosol. Daher stimuliert das von sGC stammende cGMP die Reninfreisetzung über den cAMP-Signalweg. Membran gebundene partikuläre Guanylatzyklase (pGC), welche von ANP aktiviert wird, befindet sich in enger Nachbarschaft zu den Vesikeln mit cGKII. Dies legt nahe, dass von pGC gebildetes cGMP in erster Linie die Abgabe von Renin hemmt (Schweda & Kurtz, 2009).

Hemmende Wirkung hat auch der dritte Botenstoff der intrazellulären Regulatoren der Reninfreisetzung, die intrazellulären freien **Kalziumionen**. Klassische Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Norepinephrin oder Vasopressin verursachen in JG-Zellen einen Einstrom von Kalziumionen und hemmen gleichzeitig deren Reninausschüttung, was mit Versuchen an isolierten JG-Zellen nachgewiesen werden konnte (Kurtz et al., 1986), (Grünberger et al., 2006). Auch eine Rezeptor-unabhängige Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, z. B. durch Zugabe von Thapsigargin, eines Hemmers der sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), welche für den Transport von Ca^{2+} aus dem Zytosol in interne Speicher verantwortlich ist, hemmt die Abgabe von Renin (Schweda et al., 2000). Andererseits führte bei isolierten JG-Zellen ein Absenken der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Einsatz des intrazellulären Ca^{2+} -Chelators BAPTA-AM zu einer gesteigerten Ausschüttung von Renin (Ortiz-Capisano et al., 2007b). Ganz im Gegensatz zu fast allen anderen sekretorischen Zellen, in denen ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ die Exozytose von Substanzen auslöst und fördert, stellt das Ansteigen von $[Ca^{2+}]_i$ also für JG-Zellen den stärksten Inhibitionsmechanismus dar. Die Erklärung dieser inversen Beziehung zwischen Ca^{2+} und Reninfreisetzung, die als „Kalzium Paradoxon“ bezeichnet wird und sonst nur noch bei Zellen der Nebenschilddrüse gefunden werden konnte (Cohen et al., 1997), ist seit langer Zeit Gegenstand der Forschung. Zahlreiche Hypothesen mit verschiedenen Ansatzpunkten wurden in den letzten Jahren aufgestellt, von denen zumindest drei in der Tat zutreffend für dieses Phänomen zu sein scheinen: 1) Ein Ca^{2+} /Calmodulin abhängiger Prozess, der zu einer Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase führt, könnte eine verminderte Exozytose bewirken (Della Bruna et al., 1992). 2) Über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch klassische Vasokonstriktoren wie ANG II wird Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP_3 bewirkt dann über Bindung an intrazellulären IP_3 -Rezeptoren die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, was wiederum zur Aktivierung sog. „store-operated channels“ (SOCs) führt, über die Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol einströmt. Zur gleichen Zeit bewirkt das gebildete DAG eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), für welche gezeigt werden konnte, dass sie bei Anwesenheit von Ca^{2+} die Freisetzung von Renin hemmen kann (Kurtz et al., 1986). 3) Ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ könnte über eine Modulation von Ionenkanälen in der Zellmembran oder der Membran der Renin-Speichervesikel zu einer Hemmung der Ausschüttung führen (Schweda & Kurtz, 2004). Eine vierte Hypothese, für die vor kurzem, von zwei Arbeitsgruppen unabhängig, eindrucksvolle Belege geliefert werden konnten, besagt, dass die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Hemmung der Adenylatzyklen 5 und/oder 6 führt, und auf diese Weise über die verminderten cAMP-Spiegel die Reninfreisetzung gehemmt wird. Es konnte an isolierten JG-Zellen gezeigt werden, dass eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch ANG II, Thapsigargin oder Endothelin-1 in gleichem Maße die intrazelluläre Konzentration von cAMP

und die Freisetzung von Renin erniedrigte. Die Wirkung war aufgehoben, sobald der cAMP-Spiegel durch cAMP-Analoga konstant gehalten wurde. Andererseits führte eine Erniedrigung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Zugabe des Chelators BAPTA-AM zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und gleichzeitiger Stimulierung der Reninausschüttung. Dieser Effekt konnte wiederum unterbunden werden, indem die Aktivität der ACs blockiert wurde (Grünberger et al., 2006), (Ortiz-Capisano et al., 2007b). Ganz im Einklang mit diesen funktionellen Ergebnissen konnte auch die Expression von AC5- und AC6-mRNA in JG-Zellen nachgewiesen werden (Grünberger et al., 2006), (Ortiz-Capisano et al., 2007a). Abb. 1.4 stellt alle im Text beschriebenen Mechanismen nochmals im Überblick dar. Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Daten eine elegante Erklärung des lange Zeit nicht erklärbaren „Kalzium Paradoxons“ liefern, was allerdings einen zumindest modulierenden Einfluss der vorher genannten Thesen und auch weiterer Mechanismen nicht ausschließt.

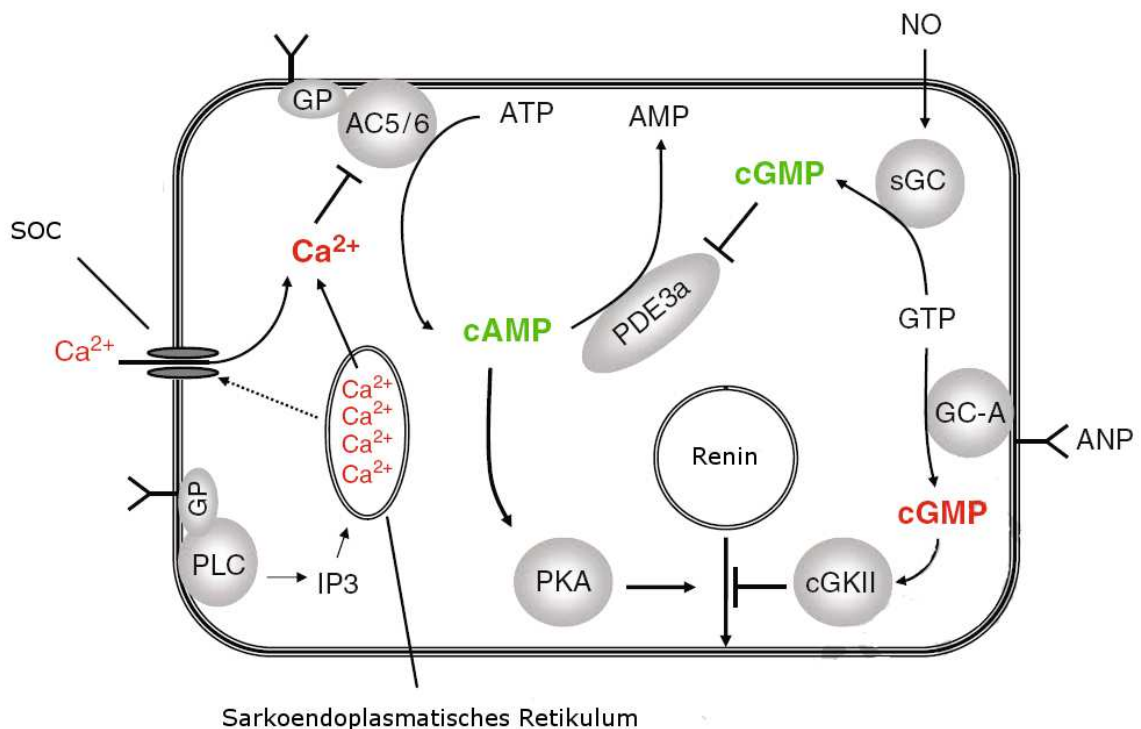


Abbildung 1.4 Zelluläre Kontrolle der Reninfreisetzung [adaptiert nach (Schweda & Kurtz, 2009)] GP= G-Protein, AC= Adenylatzyklase, PLC= Phospholipase C, IP₃= Inositoltriphosphat, PKA= Proteinkinase A, PDE3a= Phosphodiesterase 3a, sGC= lösliche Guanylatzyklase, GC-A= partielle Guanylatzyklase A, weitere Erklärungen können dem Textabschnitt „zelluläre Regulation“ entnommen werden

Ca²⁺ hemmt also in zentraler Position die Reninfreisetzung. Wie das Ca²⁺ in die Zelle kommt, ist allerdings unklar. Aufgrund der zentralen Bedeutung des intrazellulären Ca²⁺, waren die Mechanismen, mit denen die JG-Zellen $[Ca^{2+}]_i$ regulieren, Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. JG-Zellen exprimieren viele unterschiedliche Ionenkanäle. So wurden bis heute drei verschiedene K⁺-Kanäle, ein Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanal, ein Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporter (NKCC), ein spannungsgesteuerter L-Typ Ca²⁺-Kanal und gemäß funktionellen Hinweisen auch

sog. store-operated Channels (SOCs), deren Aktivität durch den Füllungsstand intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher getriggert ist, nachgewiesen (Schweda et al., 2007), (Schweda & Kurtz, 2009), (Castrop et al., 2005), (Friis et al., 2004), (Friis et al., 2003), (Schweda et al., 2000).

Schon früh konnte gezeigt werden, dass Vasokonstriktoren zu einer Depolarisierung der JG-Zellen führen (Bührle et al., 1986). Als Ursache für diese depolarisierende Wirkung wurde eine direkte oder Rezeptor-gekoppelte Modulation von Kanälen diskutiert, die letztlich zu einem Ausstrom von Cl^- oder einem Einstrom von K^+ führen (Kurtz & Penner, 1989). Als man noch nicht wusste, dass Ca^{2+} über eine Hemmung von AC5 und/oder AC6 die Reninfreisetzung hemmt, wurde spekuliert, ob nicht die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur zur Depolarisierung der JG-Zellen führt und in Wirklichkeit dieses positivere Membranpotential die Hemmung der Reninausschüttung bedingt. Und tatsächlich konnte in zahlreichen Experimenten nachgewiesen werden, dass depolarisierende Manöver die Ausschüttung von Renin inhibieren und hyperpolarisierende diese stimulieren (Kurtz et al., 2000), (Jensen & Skøtt, 1996), (Castrop et al., 2005). Auch für die in JG-Zellen mittels RT-PCR und Immunfluoreszenz nachgewiesenen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (L-Typ Ca_v), die in JG-Zellen erst bei sehr positiven Membranpotentialen aktiviert wurden (Friis et al., 2003), wurde anfangs eine verbindende Rolle zwischen Membranpotential und Ca^{2+} -Konzentration angedacht. Da eine derart ausgeprägte Depolarisation in JG-Zellen jedoch aufgrund gleichzeitiger Aktivierung hyperpolarisierend wirkender Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle unter physiologischen Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist (Friis et al., 2004), konnte bisher keine funktionelle Rolle der L-Typ Ca_v in der Kontrolle der Reninfreisetzung gezeigt werden (Kurtz et al., 1990). So führten weder die Blockade von spannungsabhängigen Kalziumkanälen mit verschiedenen Kalziumantagonisten noch ihre Aktivierung zu einer veränderten Reninfreisetzung in der isoliert perfundierten Niere (Scholz & Kurtz, 1992). Da Ca^{2+} nun anscheinend nicht über spannungsabhängige Kanäle in die Zelle gelangen kann, muss es einen anderen Weg geben.

Ein möglicher Kandidat für einen funktionell relevanten Ca^{2+} -Kanal sind die weiter oben bereits erwähnten store-operated Calcium Channels (SOCs). In Versuchen an der isoliert perfundierten Niere zeigte sich, dass eine Hemmung der sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), welche für den Transport von Ca^{2+} aus dem Zytosol in das sarkoendoplasmatische Retikulum verantwortlich ist, die Freisetzung von Renin hemmte. Durch die Blockade von SERCA mittels der Substanz Thapsigargin kann das einmal aus den intrazellulären Kalziumspeichern in das Zytosol freigesetzte Ca^{2+} nicht mehr dorthin zurück befördert werden. Dies führt sukzessive zu einer Entleerung der Speicher, was wiederum eine Aktivierung der SOC's und somit einen Ca^{2+} -Einstrom in die JG-Zelle zur Folge hat. Auf diese Weise wurde sowohl die

basale Sekretionsrate von Renin abgesenkt als auch die Freisetzung nach Stimulation vermindert. Agonisten der β -Adrenorezeptoren, Blockade des Salztransports in der Macula densa und auch die Absenkung des Perfusionsdrucks konnten nach vorheriger Zugabe von Thapsigargin die Freigabe von Renin deutlich weniger steigern als sie dies ohne Thapsigargin taten. Eine Absenkung der extrazellulären Kalziumkonzentration konnte diese Wirkung innerhalb von Sekunden wieder aufheben. Die Zugabe von bekannten SOC-Blockern, wie Flufenamat, Gadolinium (Schumann et al., 1994) oder Lanthan (Jan et al., 1999), veränderte die Wirkung von Thapsigargin jedoch nicht (Schweda et al., 2000). Obwohl die Existenz von SOCs in zahlreichen Zellen nachgewiesen wurde, ist die molekulare Identität weiterhin nicht völlig geklärt. Ein möglicher Protagonist bzw. eine Gruppe von Protagonisten, die bei der Bildung von SOCs und/oder der Regulation des Kalziumeinstroms in die JG-Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten, sind die nichtselektiven Kationenkanäle aus der Familie der kanonischen oder klassischen transienten Rezeptor Potential (TRPC) Kanäle (Schweda & Kurtz, 2009).

1.4 TRPC: Canonical transient receptor potential channel

1.4.1 Einordnung in die Familie der TRP Kanäle

Transiente Rezeptor Potential (TRP) Kanäle bilden eine Superfamilie von Kationen-permeablen Kanälen. Das zuerst entdeckte Mitglied, und damit Begründer der Familie, wurde als ein Genprodukt von *Drosophila* identifiziert, das diese zur visuellen Signaltransduktion benötigt. Der Name transient receptor potential begründet sich auf der flüchtigen (engl.: transient) im Gegensatz zur anhaltenden Antwort auf Licht von Fliegen, die eine Mutation auf dem *trp* locus besitzen. (Montell & Rubin, 1989). Basierend auf Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz werden die kanalbildenden TRP-Proteine in Säugetieren in sechs Unterfamilien eingeteilt: die klassischen oder kanonischen TRPs (TRPCs), welche die größte Ähnlichkeit zu *Drosophila* TRP aufweisen; die Vanilloidrezeptor TRPs (TRPCVs), die beispielsweise den scharfen Geschmack von Chili-Pfeffer vermitteln (Caterina et al., 1997); die Melastatin TRPs (TRPMs); die Mucolipin TRPs (TRPMLs); die Polycystin TRPs (TRPPs) und die Ankyrin Transmembranprotein 1 TRPs (TRPA1). Die Kristallstruktur von TRP-Proteinen wurde noch nicht entschlüsselt, jedoch weiß man, dass alle TRP-Proteine sechs Transmembrandomänen enthalten (siehe Abb. 1.5) und dabei in ihrer Grundstruktur spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen ähneln (Flockerzi, 2007). Innerhalb der TRP Unterfamilien ist die Gruppe der TRPC dahingehend einzigartig, dass sie nicht nur verantwortlich ist für Agonisten-aktivierte unselektive Kationenströme, sondern auch eine entscheidende Rolle beim sogenannten "slow sustained mode of Ca^{2+} signaling" spielt, bei dem länger anhaltende Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ benötigt werden,

um beispielsweise Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (Birnbaumer, 2009). Die Unterfamilie der TRPC besteht bei der Maus aus sieben Mitgliedern, nämlich TRPC1 – TRPC7. Beim Menschen dagegen existieren nur sechs verschiedene TRPCs, da hier TRPC2 lediglich ein Pseudogen zu sein scheint. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Proteine innerhalb einer Unterfamilie, jedoch großer Unterschiede zwischen den Unterfamilien, geht man bis dato davon aus, dass sich nur Mitglieder derselben Unterfamilie zu heteromeren Kanalstrukturen zusammenfügen können (Flockerzi, 2007).

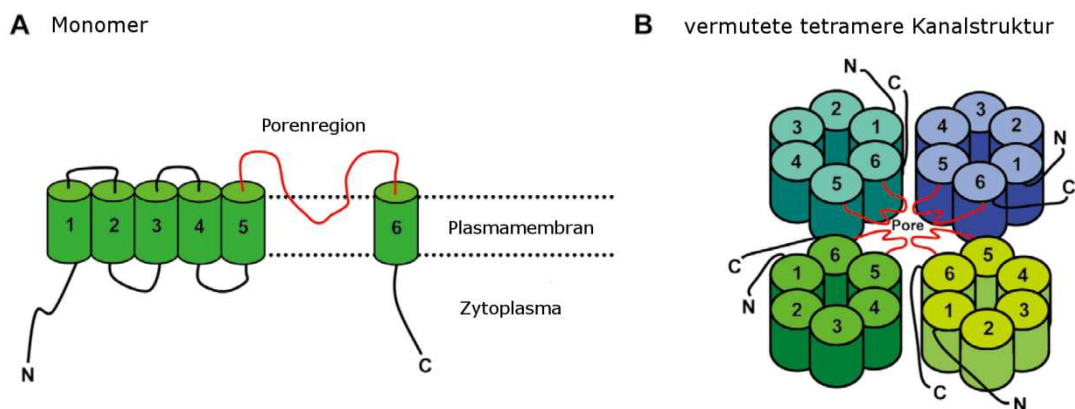


Abbildung 1.5 Aufbau von TRP und den von ihnen gebildeten Kanälen [adaptiert nach (Watanabe et al., 2009)

A) TRP-Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen und einer porenbildenden Schleife zwischen der fünften und sechsten Domäne **B)** Vier TRP-Proteine bilden vermutlich homotetramere und/oder heterotetramere Kanäle

1.4.2 Expression in Säugetieren

Nahezu keine Zelle unseres Körpers ist frei von TRPs. Und so kommen auch TRPCs nahezu ubiquitär in Säugetieren vor. Sie wurden im Nervensystem, im kardiovaskulären System, in der Niere und der Leber, in Zellen aus Epithel-, Endothel- und Knochenmarksgewebe nachgewiesen (Nilius, 2007), (Abramowitz & Birnbaumer, 2009). Die genaue Lokalisation der TRPCs in der Niere war Gegenstand früherer Untersuchungen. In renalen präglomerulären Widerstandsgefäßen der Ratte wurde mittels RT-PCR und real time PCR mRNA von TRPC1, -3, -4, -5 und -6 nachgewiesen. Die Menge an TRPC3 mRNA war dabei im Vergleich zur mRNA von TRPC1, -4, -5 und -6 ungefähr um das Dreifache höher. Des Weiteren wurden die Versuche zum Vergleich auch mit Aortengewebe durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass hier zwar die gleichen Kanäle gefunden werden konnten, allerdings die Menge an mRNA von TRPC1 und TRPC6 dominierte (Facemire et al., 2004). In einem anderen Versuchsaufbau wurde die Expression von TRPC in einer Zellkultur muriner Mesangiumzellen untersucht. Dabei konnte durch RT-PCR ausschließlich mRNA von TRPC1 und TRPC4 gefunden werden. Eine im Anschluss durchgeführte immunhistochemische Färbung konnte außerdem zeigen, dass TRPC1 überwiegend

im Zytoplasma, wohingegen TRPC4 in erster Linie in der Zellmembran exprimiert wird (Wang et al., 2004). In einer etwas aufwändigeren Studie an Rattennieren, in der mittels konfokaler Bildgebung auch die Expression innerhalb der Zelle genauer differenziert wurde, konnten auf Proteinebene ausschließlich TRPC1, -3 und -6 nachgewiesen werden. TRPC1 war dabei in der Konfokalmikroskopie im Glomerulum, in der apikalen Membran des proximalen Tubulus und in kultivierten Mesangiumzellen zu sehen. TRPC3 und TRPC6 waren ebenfalls im Glomerulum, aber auch in den proximalen Anteilen des Sammelrohrs zu sehen, wobei sich TRPC3 im Gegensatz zu TRPC6, das apikal und basolateral vorkam, auf die apikale Membran beschränkte (Goel et al., 2006). Schließlich wurden auch humane Mesangiumzellen auf ihre Expression von TRPC hin untersucht. Dabei gelang auf Proteinebene mittels Western Blot und Fluoreszenzimmunhistochemie der Nachweis von TRPC1, -3, -4 und -6, wobei die Untersucher auf die mangels optimaler TRPC-Antikörper nur schwere Durchführbarkeit der Immunblots hinwiesen. TRPC1 und 4 waren bei diesen Versuchen überwiegend in der Zellmembran zu finden, TRPC6 schien v. a. in der Nähe des Zellkerns exprimiert zu sein. In Versuchen zur Koimmunopräzipitation konnte eine Interaktion von TRPC1 mit TRPC4 und von TRPC1 mit TRPC6 nachgewiesen werden. Auch in menschlichen Glomerula und denen von Ratten konnten diese vier TRPCs (1, 3, 4, 6) gefunden werden (Sours et al., 2006).

1.4.3 Funktionen: Zusammenhänge SOC-TRPC-STIM1-Orai

$[Ca^{2+}]_i$ wird bestimmt durch die Summe des Einstroms von Ca^{2+} in das Zytoplasma hinein und seines Transports aus ihm heraus. Aufgrund des großen Konzentrationsgefälles zwischen Extra- und Interzellularraum muss das Hinaus-Befördern von Kalzium aktiv, u. a. mit Hilfe der beiden Pumpen Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), erfolgen. Kalzium kann dabei sowohl ganz aus der Zelle hinaus als auch in intrazelluläre Speicher gepumpt werden. Genau aus diesen beiden Kompartimenten erfolgt auch auf bestimmte Signale hin der Einstrom von Ca^{2+} . Dabei wird eines der Hauptsignale über den weiter oben schon einmal erwähnten Rezeptor- G_q /TKR-PLC-Signalweg vermittelt. Durch Binden verschiedener Agonisten (z. B. ANG II) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) bzw. einen Tyrosinkinase-Rezeptor (TKR) wird durch die PLC- β bzw. PLC- γ Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP_3 bewirkt dann über Bindung an intrazelluläre IP_3 -Rezeptoren die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Ferris et al., 1989). Der Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum, der daraufhin folgt, und der Austritt von Ca^{2+} aus den Speichern wird zusammen als Rezeptor gesteuerter Ca^{2+} Einstrom (ROCE) bezeichnet. Jedoch auch die

Speicherentleerung an sich führt unabhängig von Rezeptoren zur Aktivierung sog. „store-operated channels“ (SOCs), über die Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum in das Zytosol einströmt (SOCE). SOCE muss dabei nicht notwendigerweise durch einen einzelnen Ca^{2+} -Kanal vermittelt werden. Vielmehr kann jeder Ionenkanal, dessen Aktivität vom Füllungsstatus interner Ca^{2+} -Speicher abhängt, zu den SOCen gezählt werden (Smyth et al., 2006). Darüberhinaus führt auch das gebildete DAG zur direkten Aktivierung der nichtselektiven Kationenkanäle TRPC3 und TRPC6 (Hofmann et al., 1999). Abb. 1.6 zeigt nochmals die Zusammenhänge im Überblick. Wie genau SOCen aufgebaut sind, ist nicht abschließend geklärt. Der am besten verstandene SOCE ist ein selektiver, streng einwärts gerichteter Kalziumeinstrom mit der Bezeichnung I_{CRAC} . Mit Hilfe von Experimenten an Zellkulturen konnte von verschiedenen Forschergruppen vor kurzem

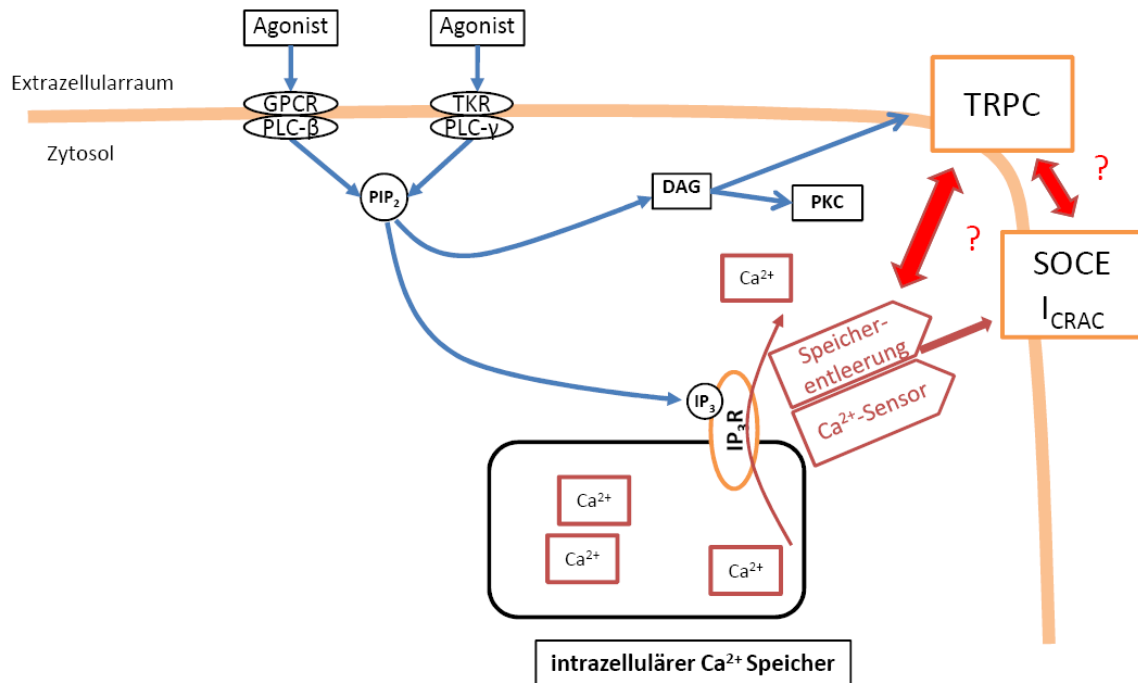


Abbildung 1.6 Rezeptor-Gq/TKR-PLC-Signalweg. Für eine eingehende Beschreibung sei auf den Textabschnitt „Funktionen: Zusammenhänge SOC-TRPC-STIM1-Orai“ verwiesen. GPCR=G-Protein gekoppelter Rezeptor, PLC=Phospholipase C, TKR=Tyrosinkinase-Rezeptor, PIP₂= Phosphatidylinositolbisphosphat, IP₃=Inositoltriphosphat, DAG=Diacylglycerol, IP₃R=Inositoltriphosphat Rezeptor, TRPC=kanonischer transienter Rezeptor Potential Kanal, SOCE= Ca^{2+} -Speicher gesteuerter Ca^{2+} -Einstrom, I_{CRAC} =durch Ca^{2+} Freisetzung aktivierter Ca^{2+} Einstrom, ?=mögliche bis dato ungeklärte Interaktion

ein Durchbruch im Verständnis dieses Ca^{2+} -Kanals erreicht werden. Sie fanden heraus, dass zwei verschiedene Moleküle die Hauptspieler von I_{CRAC} sind, nämlich das sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) befindende stromale Interaktionsmolekül 1 (STIM1) und das in der Zellmembran lokalisierte Protein Orai (ehemals CRACM für Calcium Release-activated Calcium Modulator). Es konnte gezeigt werden, dass Koexpression von STIM1 und Orai in HEK293 Zellkulturen zu 10-100-fach höherem Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation mit Thapsigargin führte (Peinelt et al., 2006), (Mercer et al., 2006). Ein Verlust von Ca^{2+} aus den internen

Speichern im Zuge der Speicherentleerung führt dabei vermutlich zu einer Dimerisation von STIM (Stathopoulos et al., 2006), (Luik et al., 2008) welches anschließend vom ER ausgehend Kontakt zu bestimmten Mikrodomänen der Zellmembran (Lipid Rafts) herstellt und dort die Bildung des SOCE-Kanalkomplexes mit membranständigen Orai- Proteinen und/oder TRPC vermittelt (Birnbaumer, 2009). Ob nun TRPC an der Regulation von SOC-Kanälen beteiligt ist oder gar ein Bestandteil von ihnen ist, wird bis dato kontrovers diskutiert. Einen Hinweis für eine Beteiligung lieferten Experimente zur Koimmunopräzipitation, in denen sich herausstellte, dass TRPC1, -4 und -5 Verbindungen mit STIM1 eingehen konnten (Yuan et al., 2007). Eine andere Gruppe fand ebenfalls Präzipitate von STIM1 mit diesen drei TRPCs (1, 4, 5) und zusätzlich noch mit TRPC2. TRPC3 und TRPC6 konnten zwar keine direkte Bindung zu STIM1 eingehen, jedoch wird für diese beiden Kanäle eine indirekte Regulation durch STIM1 postuliert, indem STIM1 die Heteromerbildung mit anderen TRPCs vermittelt. Für TRPC1 wurde darüberhinaus gezeigt, dass eine Ausschaltung von STIM1 mit Hilfe von siRNA sowohl die Aktivität von TRPC1 als auch von SOC im Allgemeinen hemmte (Worley et al., 2007). *Worley et al.* schlagen aus diesem Grund als neue Definition für SOC vor, dass unter diesen Begriff alle Kanäle fallen, die von STIM1 reguliert werden und die Komplexbildung von STIM1 infolge einer Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu ihrer Aktivierung benötigen. Wieder andere Gruppen sprechen TRPC dagegen jedwede Beteiligung an SOC oder I_{CRAC} ab. So konnte in HEK293 Zellen mit transienter Expression von TRPC1, -3, -5 und -6 der durch Gabe von Carbachol, einem Parasympathomimetikum, induzierte Einstrom von Ca^{2+} nicht durch gleichzeitige Koexpression von STIM1 gesteigert werden. Ferner war die Aktivität von TRPC5 exprimierenden Zellen unbeeinflusst von einer Ausschaltung von STIM1. Auch in glatten Muskelzellen blieben TRPC6 zugeschriebene unselektive Kationenströme nach Gabe von Arginin-Vasopressin unverändert nach Ausschaltung von STIM1 mittels siRNA (DeHaven et al., 2009). Eine Ursache für die konträren Ergebnisse liegt wohl an den unterschiedlichen Versuchsaufbauten. Während Daten, die mit Hilfe von visueller Kalziumkonzentrationsmessung generiert werden, meist für die Rolle von TRPC als SOC sprechen, kommen Patch Clamp Experimente häufig zu gegenteiligen Ergebnissen. Angesichts der vielen Störgrößen, die bei der visuellen Ca^{2+} -Konzentrationsmessung auftreten können, wie z. B. unkontrollierbaren Änderungen von Spannungspotentialen - der Hauptantriebskraft für den Einstrom von Kalzium ins Zytoplasma -, sollte vielleicht eher die Elektrophysiologie zur Identifizierung von SOCE herangezogen werden (Clapham, 2003). Zusammenfassend erscheint dennoch die in Abb. 1.7 dargestellte Arbeitshypothese von *Birnbaumer* als geeignete Grundlage für weitere Untersuchungen.

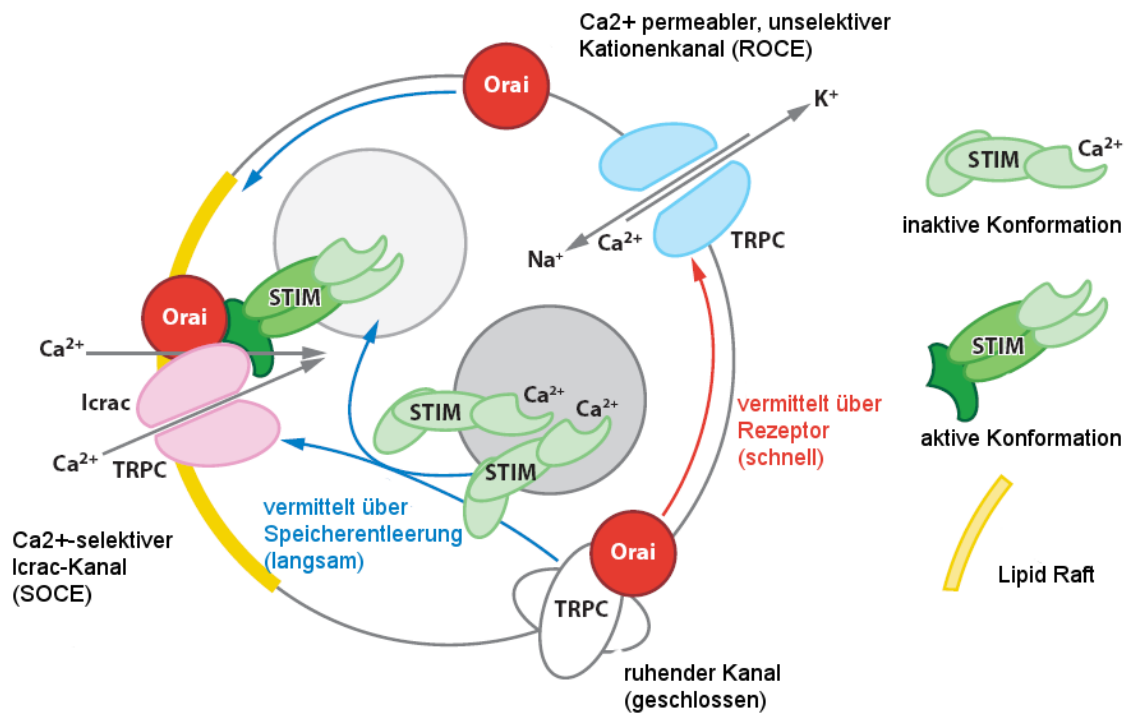


Abbildung 1.7 Mögliches Zusammenspiel zwischen TRPC, Orai und STIM. [verändert aus (Birnbaumer, 2009)] Der Rezeptor-G_q-PLC-Signalweg aktiviert schnell TRPCs, was zu einem Ca²⁺-Einstrom über ROC führt. Außerdem bewirkt das von der PLC gebildete IP₃ über Bindung an seinen Rezeptor die Entleerung interner Ca²⁺-Speicher, was STIM in seine aktive Konformation bringt. Aktiviertes STIM bildet dann mit Orai und TRPC innerhalb einer Mikrodomäne in der Zellmembran (Lipid Raft) den SOCE-Kanal. Dies führt zum Einstrom von Ca²⁺ und zur Entwicklung von Icrac. Einige (-C3 und -C6), aber nicht alle TRPCs, könnten in ihrem Bestreben zu spontaner Aktivität gehemmt werden, indem sie von Orai in ihrem ruhenden Zustand stabilisiert werden

1.4.4 Knockoutmäuse als geeignetes Versuchsmodell

Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von TRPC-Kanälen gestalten sich schwierig, da selektive Werkzeuge, mit deren Hilfe man einzelne TRPC-Kanäle gezielt modulieren oder auch nur valide markieren könnte, größtenteils fehlen. Aus diesem Grund gibt es bisher nur wenige in vivo Studien und die allermeisten bis heute gewonnenen Erkenntnisse beruhen auf Versuchen an Zellkulturen (Nilius, 2007). Aufgrund dieses Mangels an Kanalblockern mit ausreichender Potenz und Spezifität, um TRPC-gesteuerte Ca²⁺-Einstrome in Primärzellen verhindern oder aktivieren zu können, ist es nicht möglich, die funktionelle Relevanz einzelner TRPC-Kanäle in komplexeren Organsystemen und integrativen Systemfunktionen in einem Gesamtorganismus zu untersuchen. Um dieses Defizit zu umgehen, benutzten verschiedene Arbeitsgruppen die Möglichkeit der gezielten Geninaktivierung in Stammzellen und generierten so Knockoutmäuse, denen ein bestimmter TRPC-Kanal fehlte. Bei diesen Mäusen können nun die unterschiedlichsten

funktionellen Parameter bestimmt und mit denen einer Wildtyp-Vergleichsgruppe verglichen werden. Auf diese Weise können sehr elegant Rückschlüsse über den Einfluss der einzelnen TRPC-Kanäle auf verschiedene Organsysteme gezogen werden (Freichel et al., 2004). Daten zu Versuchen mit TRPC Knockoutmäusen wurden bisher für TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC5 und TRPC6 veröffentlicht. Mit Hilfe dieser transgenen Tiere konnten viele Erkenntnisse über die Funktionen der einzelnen Kanäle gewonnen werden. So stellte sich TRPC1 beispielsweise als unabdingbare Voraussetzung für die Ausbildung einer Herzhypertrophie bei Belastung heraus (Seth et al., 2009). TRPC2 zeigte sich als wichtiger Regulator des Sexualverhaltens der Tiere (Leypold et al., 2002), (Stowers et al., 2002), TRPC4 als entscheidender Bestandteil bei der Steuerung der Permeabilität von Endothelzellen in Gefäßen (Freichel et al., 2001). Eine Beteiligung an Funktionen der Amygdala und Angst-assoziiertem Verhalten von Mäusen konnte für TRPC5 herausgefunden werden (Ricchio et al., 2009) und TRPC6 scheint an der Regulation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt zu sein, wenngleich die Ergebnisse bei diesen Tieren wohl durch die kompensatorische Hochregulation von TRPC3 beeinflusst waren (Dietrich et al., 2005). *Dietrich et al.* stellten fest, dass bei den von ihnen untersuchten TRPC6^{-/-}-Mäusen arterieller Blutdruck, durch Agonisten stimulierte Kontraktilität und basaler Tonus der Zerebralgefäße und die TRPC-getragenen Kationenströme in isolierten glatten Muskelzellen überraschenderweise erhöht waren. Und dies obwohl bei früheren in vitro Versuchen, bei denen TRPC6 in kultivierten Zerebralarterien von Ratten mittels antisense Oligodesoxynukleotiden ausgeschaltet worden war, eine deutliche Verminderung der reaktiven Vasokonstriktion der Arterien in Folge einer induzierten Druckerhöhung zu verzeichnen war (Welsh et al., 2002). Die daraufhin erfolgte quantitative Messung der mRNA der Kanäle TRPC1-7 in den Zerebralarterien ergab, dass die gemessene Menge an TRPC3-mRNA im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe um das Drei- bis Fünffache erhöht war. *Dietrich et al.* folgerten, dass die erhöhte TRPC3-mRNA wohl zur Bildung von homooligomeren TRPC3-Kanälen geführt habe, die im Gegensatz zu TRPC6 nicht streng Rezeptor-reguliert sind, sondern auch eine relativ hohe konstitutive Aktivität aufweisen. Und tatsächlich zeigte sich in weiteren Untersuchungen, dass der erhöhte Kationeneinstrom in den glatten Muskelzellen durch Transfektion der Zellen mit TRPC3-spezifischer siRNA komplett aufgehoben werden konnte (Dietrich et al., 2005). Zur Frage, ob die Ausschaltung einzelner TRPC-Kanäle auch eine Auswirkung auf den Reninhaushalt der Tiere hatte, sind bis heute allerdings noch keine Daten verfügbar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Rolle TRPC möglicherweise im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System der Maus spielen könnte. Aufgrund der weiter oben bereits beschriebenen Problematik fehlender spezifischer Pharmaka, welche die einzelnen TRPC-Kanäle gezielt hemmen oder aktivieren können, wurde dafür das Versuchsmodell der Knockoutmäuse herangezogen. Nun haben frühere Untersuchungen an Tieren, bei denen Gene für ein einzelnes TRPC-Protein ausgeschaltet worden waren, gezeigt, dass die gewonnenen Ergebnisse sehr stark durch die kompensatorische Hochregulation anderer TRPC-Proteine beeinflusst werden können (Dietrich et al., 2005). Außerdem ist auch bekannt, dass die kanalformenden Bestandteile der TRPC-Kanäle nicht nur aus homotetrameren, sondern auch aus heterotetrameren Kombinationen von Mitgliedern innerhalb der TRPC-Unterfamilie bestehen können (Flockerzi, 2007). Diese Kombinationen scheinen allerdings nicht wahllos zwischen allen TRPCs gebildet zu werden, sondern eher innerhalb von Untergruppen, in die sich die verschiedenen TRPCs aufgrund struktureller Ähnlichkeit auf Ebene der Aminosäuren einteilen lassen. TRPC3, -6 und -7 formen dabei die eine Gruppe und TRPC4 und -5 die andere. TRPC1 und -2 lassen sich aufgrund ihres einzigartigen Aufbaus keiner dieser Gruppen so richtig zuordnen (Hofmann et al., 2002). Genauso Gruppen überschreitend ist auch das Bindungsverhalten von TRPC1. Nicht nur zu TRPC4 und -5 (Hofmann et al., 2002) sondern auch zu TRPC3, -6 und -7 (Zagranichnaya et al., 2005), (Liu et al., 2005) konnte TRPC1 in vergangenen Versuchen mit Zellkulturen und verschiedenen isolierten Gewebeproben Verbindungen eingehen. Und auch an Kombinationen aus drei verschiedenen TRPC-Proteinen in HEK293-Zellen war TRPC1 beteiligt (Strübing et al., 2003). Wegen dieser heteromeren Komplexe, in denen TRPC-Kanäle physiologischerweise vorkommen, und der Tendenz zur kompensatorischen Hochregulation noch vorhandener TRPCs in Knockoutmäusen, erschien es sinnvoll, diese Problematik durch die gleichzeitige Ausschaltung von zwei TRPC-Genen zu umgehen oder zumindest abzuschwächen.

Die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von TRPC1 zusammen mit der bisherigen Datenlage zum Expressionsmuster der verschiedenen TRPCs im Nierengewebe der Säugetiere ließ die Generierung und Verwendung von TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen als vielversprechenden Versuchsaufbau erscheinen, um die Beteiligung dieser beiden Proteine und auch von TRPC-Proteinen im Allgemeinen am RAAS der Maus zu untersuchen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob Mäuse, denen TRPC1 und TRPC6 komplett fehlen, im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe Unterschiede in ihren Plasmeninspiegeln und nachfolgend auch in den Vitalparametern Herzfrequenz und Blutdruck aufweisen. Ferner sollten etwaige Unterschiede in der Nierenfunktion der beiden Gruppen durch Vergleich der Wasser-, Na⁺- und K⁺-Ausscheidung aufgedeckt werden.

Es ist bekannt, dass Ca^{2+} die Reninfreisetzung hemmt. Der Mechanismus, wie das Kalzium allerdings genau in die Zelle gelangt, ist unklar. In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass „store-operated channels“ eine Rolle bei der Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels spielen. Der molekulare Aufbau dieser Kanäle ist bis dato nicht völlig geklärt. Die im Vorfeld aufgestellte Hypothese war, dass, falls TRPC1 und/oder TRPC6 wichtige Regulatoren oder gar Bestandteile der store-operated Ca^{2+} channels in JG-Zellen sind, ein Einfluss auf die Reninfreisetzung zu sehen sein müsste. Durch den Wegfall oder zumindest die Hemmung dieser Eintrittspforte für Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum würden weniger Kalziumionen in das Zytosol gelangen, wodurch die Reninfreisetzung gesteigert werden müsste. Aufgrund der gesteigerten Plasmareninspiegel würde man wiederum eine Erhöhung des Blutdrucks bei den Knockout-Tieren erwarten. Der Fokus dieser Arbeit lag also weniger auf der genauen Entschlüsselung zellulärer oder gar molekularer Prozesse, sondern vielmehr auf den Auswirkungen für den Gesamtmechanismus, den eine Ausschaltung der beiden Gene für TRPC1 und TRPPC6 mit sich bringt. Sollten sich relevante Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen der Knockout- und der Wildtyp-Vergleichsgruppe zeigen, wäre dies ein Anlass für weitere Studien, dann natürlich auch auf zellulärer Ebene.

Da in früheren Versuchen zur Expression von TRPCs im Nierengewebe von Säugetieren die Ergebnisse durchaus unterschiedlich ausfielen, sollte außerdem in Vorversuchen an C57BL/6 Mäusen mittels RT-PCR gezeigt werden, welche TRPCs in JG-Zellen der Maus vorkommen. Ein Verfahren zur reinen Isolierung von JG-Zellen ist jedoch nicht bekannt, weshalb die nachgewiesene mRNA auch von verschiedenen anderen in den Präparationen enthaltenen Zelltypen stammen könnte. Daher erfolgte die Eingrenzung der möglichen TRPC-Isoformen in JG-Zellen mit Hilfe des Ausschlussprinzips durch die Untersuchung von Gesamtnieren, Glomerula, isolierten JG-Zellen und Renin-produzierenden As4.1-Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden neun TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse und neun in Alter und Geschlecht gut gematchte Wildtypmäuse als Kontrollgruppe verwendet. Die Zucht der TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse erfolgte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Homburg (Prof. Dr. M. Freichel). Die Mäuse wurden als homozygote Doppelknockoutmäuse oder Wildtypmäuse übergeben. Um eine mögliche Beeinflussung der Messwerte von Seiten des Untersuchers auszuschließen, waren diesem die Genotypen unbekannt. Nach Versuchsende wurden die Genotypen der beiden Gruppen bekanntgegeben und zusätzlich eine Kontroll-Genotypisierung durchgeführt. Alle Mäuse wurden in Einzelkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

Für die Versuche der RT-PCR zum Nachweis von mRNA in verschiedenen Geweben wurden C57BL/6 Mäuse unterschiedlichen Alters und Geschlechts verwendet.

2.1.2 Primer

Zum Nachweis der TRPC-Kanäle wurden sogenannte intron-spanning Primer verwendet. Bei diesen wurde die Basenabfolge so gewählt, dass sie nicht kodierende Abschnitte des betreffenden Gens (Intron) mit einschließen. Auf diese Weise kann verhindert werden, dass bei DNA-Verunreinigung der isolierten RNA die DNA in derselben Amplifikatlänge vervielfältigt wird. Zum einen wird dies dadurch erreicht, dass das DNA-Fragment eine andere Länge als das entsprechende RNA-Transkript besitzt, bei dem im Zuge des Splicings ja die Intron-Stücke herausgeschnitten werden, und zum anderen die Zeit eines Zyklus nicht ausreicht, um das viel längere DNA-Fragment vollständig zu amplifizieren. In Vorversuchen wurden mit Hilfe eines Gradientencyclers die optimalen Annealing Temperaturen aller Primer bestimmt. Sie lagen für TRPC1, -2, -3, -5, -6 und -7 bei 60° C, für TRPC4 bei 62,5° C.

Für die Genotypisierung wurden zum Nachweis der Wildtypgruppe Primer in der Sequenz des Exons 7 des TRPC6-Gens verwendet, welches bei der Herstellung der TRPC1/6-Doppelknockoutmäuse (Dokos) entfernt wurde. Zum Nachweis der genetisch veränderten Tiere wurden Primer für ein eingebrachtes Neomycin-Resistenzgen verwendet (Dietrich et al., 2005). Die genauen Basenabfolgen und erwarteten Amplifikatslängen können Tabelle 2.1 entnommen

werden. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Elektrophorese auf 2% Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

Verwendung	Sequenz	Amplifikat
TRPC1 sense TRPC1 antisense	5'-TCTGGGAATGTTCCCTCCTTG-3' 5'-GCTCGAGCAAACCTCCATTC-3'	374 bp
TRPC2 sense TRPC2 antisense	5'-AGATTGCCAGCTGCTTATG-3' 5'-CTCACTCTGATTTCCGGCACA-3'	325 bp
TRPC3 sense TRPC3 antisense	5'-ATTCTTCGAAGCCCCTTCAT-3' 5'-CTCCTGCACGTGACTATCCA-3'	389 bp
TRPC4 sense TRPC4 antisense	5'-ACGCCATCAGAAAAGAGGTG-3' 5'-GAGTTCTTGCAGCTCCCAAC-3'	385 bp
TRPC5 sense TRPC5 antisense	5'-CCAACAATTGCTAGCCACCT-3' 5'-AAATCCATCAGGTTCCACCA-3'	398 bp
TRPC6 sense TRPC6 antisense	5'-GCAAAGGTTAGCGACAAGC-3' 5'-CCTTGCCTGCATAGACAGC-3'	413 bp
TRPC7 sense TRPC7 antisense	5'-CTCTGCCCAATGAGACCTTC-3' 5'-GAGATGATCTGGGGGTCTGA-3'	375 bp
Renin sense Renin antisense	5'-TGGGTGCCCTCCACCAAGTG-3' 5'-CTCCCAGGGCTTGCATGATCA-3'	
TRPC6 WT sense TRPC6 WT antisense	5'-CAGATCATCTCTGAAGGTCTTTATGC-3' 5'-TGTGAATGCTTCATTCTGTTTTGCGCC-3'	234 bp
Neomycin RG sense Neomycin RG antisense	5'-GGGTTTAATGTCTGTATCACTAAAGCCTC-3' 5'-ACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC-3'	339 bp

Tabelle 2.1 Verwendete Primerpaare. RG= Resistenzgen, bp Länge in Basenpaaren

2.1.3 Chemikalien

Die für die Reverse Transkription benötigten Reagenzien wurden von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen. Reagenzien für die PCR kamen von Invitrogen (Carlsbad, USA).

2.1.4 Puffer und Lösungen

- TNES-Puffer Tris pH 7,5 10mM, NaCl 400mM, EDTA pH 8,0 100mM, SDS 0,6%
- Lösung D Guanidiniumthiocyanat 250g, DEPC-H₂O (1:1000) 293ml, Trinatriumcitrat Dihydrat 17,6ml, Natriumlauroylsarcosinat 8,8ml, ad 1l dd H₂O
- 10x PBS 80g NaCl, 2g KCl, 26,8g Na₂HPO₄ x 7H₂O, 2,4g KH₂PO₄, ad 1l dd H₂O
- 10x TBE 108g Tris, 55g Borsäure, 40ml Na₂EDTA (pH8,0) 0,5mM, ad 1l dd H₂O
- Maleatpuffer 4,05g Tris, 5,8g Maleinsäure, 2,96g EDTA, ad 1l dd H₂O

- MEM mit NaOH auf pH 6 einstellen
- MEM Minimum Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich)
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom)
- FCS Fötale Kälberserum
- BSA 1% Bovines Serum Albumin 1% in MEM gelöst
- Lösung 1 10x KCl 50mM, CaCl₂ 20mM, NaCl 1300mM, D-Glucose 100mM, Saccharose 200mM, Tris 100mM
- Verdauung für Iso- 0,96mg Trypsin-Inhibitor, 7,52mg Glycin, 10,4mg Collagenase
lierung Glomerula Typ II, ad 20ml MEM
- Verdauung für 75mg Trypsin (1643BAEE units/mg Feststoff, SIGMA)
JG-Zellpräparation 53mg Collagenase A (Roche), ad 30ml Lösung 1

2.2 In vivo Methoden

2.2.1 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

Die Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz erfolgte nach einer unblutigen und seit vielen Jahren etablierten Methode (van Nimwegen et al., 1973). Dazu wurden die Mäuse einzeln auf eine vorgeheizte Messstation gesetzt und mit einem ca. 10x4x3 cm (LxBxH) Deckel so abgedeckt, dass nur noch der Schwanz durch eine vorgefertigte Öffnung nach außen ragte. Auf diese Weise wurde die Bewegungsmöglichkeit der Maus ausreichend eingeschränkt und außerdem eine bestmögliche Abschirmung gegenüber äußeren Reizen erreicht, die zu erhöhter Unruhe beim Tier führen könnten. Über den Schwanz wurde dann eine Manschette gestreift, die mit Hilfe eines mit einer luftgefüllten Spritze beladenen Perfusors sehr genau dosiert aufgepumpt werden konnte. Der Druck innerhalb der Manschette konnte mittels eines dazwischen geschalteten Manometers abgelesen werden. Der sich von der Maus aus betrachtet distal der Manschette gelegene Teil des Schwanzes wurde dann in einer Messeinrichtung fixiert. In dieser befand sich eine in einen Brückenkreis geschaltete Widerstandszelle, die durch den Schwanz hindurch mit einer kleinen elektrischen Lampe beleuchtet wurde und so die Pulsationen in den Schwanzarterien der Maus in ein elektrisches Signal umwandelte. Mit Hilfe eines angeschlossenen Computers mit entsprechender Software konnte dieses dann in Form einer mehr oder weniger gleichmäßigen Sinuskurve visualisiert werden. Die Herzfrequenz wurde von dem Programm in Echtzeit angezeigt und musste nur abgelesen werden. Zur Bestimmung des Blutdrucks wurde nun der Druck in der Manschette so lange erhöht, bis der Blutfluss in den Schwanzarterien zum Erliegen kam und auf diese Weise folglich auch das Signal am Monitor verschwand. Der niedrigste am

Manometer abgelesene Wert, bei dem keine Kurve mehr zu erkennen war, stellte den systolischen Blutdruckwert dar und wurde als vergleichende Messgröße verwendet. Da diese Prozedur anfangs für die Tiere eine enorme Stresssituation darstellte, wurden alle Mäuse zur Eingewöhnung an fünf aufeinander folgenden Tagen für je 30 Minuten an den Messplatz gesetzt, ohne dass Werte erhoben wurden. In der darauffolgenden Woche wurden dann an fünf Tagen bei jeder Maus nach einer jeweils 20minütigen Aufwärmzeit innerhalb weiterer 20 Minuten je acht Blutdruckwerte mit den dazugehörigen Herzfrequenzen ermittelt, so dass für jedes Tier 40 Messpunkte erhoben wurden, aus denen dann der Mittelwert gebildet wurde.

Nach einer Woche Ruhe für die Tiere wurden ihre Trinkflaschen mit dem Beta-Blocker *Propranolol* in der Konzentration 0,5g/L H₂O befüllt. Einen Tag später folgten dann für fünf Tage die Blutdruckmessungen nach gewohntem Schema.

Nach erneut einer Woche Ruhe wurde die Blutdruck- und Herzfrequenzbestimmung an einem Tag zwei bis drei Stunden nach intraperitonealer Gabe von 10mg/kg Körpergewicht *Propranolol* durchgeführt.

2.2.2 Plasmareninbestimmung

Zur Bestimmung der Reninkonzentration im Plasma (PRC) wurden den Mäusen einige Tropfen Blut aus ihrem submandibulären Venenplexus entnommen. Dies geschah durch kurzes Stechen mit einer Lanzette und anschließendem Aufsaugen des Blutes mit einer heparinisierten Glaskapillare. Diese wurden anschließend mit einer Kittsubstanz verschlossen und bis zur weiteren Bearbeitung sofort auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation der Röhrchen für 5 Minuten bei 8.000 rpm wurden diese kurz oberhalb der Hämatokritgrenze abgebrochen, anschließend das Plasma in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und bei -20 Grad Celsius eingefroren.

Die PRC spiegelt die intrinsische proteolytische Fähigkeit des Plasmas wider, Angiotensin I (ANG I) aus Angiotensinogen zu generieren, wenn dieses aus exogener Quelle im Überschuss vorhanden ist (Kurtz & Schweda, 2001). Dies erklärt sich dadurch, dass dann das vorhandene Renin der limitierende Schritt bei der Bildung von ANG I ist. So kann anhand der Menge von ANG I, die mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) (DiaSorin©) gemessen wird, die Reninaktivität indirekt bestimmt werden. Die benötigten Mengen Angiotensinogen gewinnt man durch Isolierung des Plasmas binephrektomierter Ratten. Dieses wird aufgrund seines hohen Gehalts an Angiotensinogen im Folgenden als Reninsubstrat bezeichnet.

Im Detail wurden die Proben als erstes 1:50 mit Maleatpuffer verdünnt und 25µl dieser Verdünnung mit 11,1µl Reninsubstrat, 13,9µl RIA-Reaktionspuffer und 1µl PMSF vermischt.

Anschließend wurden je 25µl dieses Gemisches für 90 Minuten im Wasserbad bei 37 Grad Celsius inkubiert (Warmwert) bzw. für den gleichen Zeitraum in Eiswasser gestellt (Kaltwert). Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion des Warmwertes auf Eis gestoppt und je 20µl von allen Proben wurden in anti-ANG I-Antikörper beschichtete Röhrchen transferiert, mit 500µl ¹²⁵Iod-markierten Angiotensin I Tracer vermischt und für weitere 3 - 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung sorgfältig aus den Röhrchen abgesaugt und die Strahlungsaktivität mit einem Gamma-Zähler gemessen. Die Reninaktivität errechnete sich dann aus dem Vergleich mit einer aus Standardproben im selben Versuchslauf gewonnenen Eichkurve in [ng ANG I/ ml*h]. Als PRC wurde die Differenz aus Warmwert und Kaltwert bestimmt.

2.2.3 Untersuchung der Nierenfunktion

Bei diesem Versuchsaufbau wurde jedes Tier für sechs Tage in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt, welcher zur Umgebung lediglich einen Austausch von Luft zuließ. Für alle Mäuse war freier Zugang zu Trinkwasser und einer einheitlichen Tagesportion Trockenfutter gewährleistet. Der abgegebene Urin wurde kontinuierlich in einem Sammelgefäß aufgefangen und einmal täglich immer zur selben Uhrzeit zusammen mit dem Kot aus dem Käfig entnommen. Der Kot wurde entfernt und der Urin von jedem Tag in Eppendorf Cups bis zur weiteren Untersuchung bei -20 Grad Celsius eingefroren. Die erste Sammlung 24 Stunden nach Einsetzen der Tiere wurde verworfen.

Nach Beendigung des Versuchs wurde das Gewicht von allen Urinproben bestimmt, 400µl in ein neues Cup überführt und für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert, um etwaige Kot- und Futterrückstände vom Urin zu trennen. Anschließend wurden die Proben 1:5.000 bzw. 1:10.000 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und zur flammenphotometrischen Bestimmung der Na⁺- bzw. K⁺-Konzentration eingesetzt. Bei der Flammenphotometrie macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass manche Atome bei Verbrennung in einer Flamme Licht von ganz bestimmter Wellenlänge ausstrahlen. Detektiert man nun mittels eines Monochromators nur Licht der spezifischen Wellenlänge des zu messenden Elements und vergleicht die Werte mit einer vorher erstellten Eichkurve, kann man die Konzentration der eingesetzten Probe bestimmen. Jede Probe wurde zweimal vermessen und daraus der Mittelwert gebildet.

Durch Multiplikation der gemessenen Konzentration mit dem vorher bestimmten Gesamtgewicht des Urins (vereinfacht wurde ein spezifisches Gewicht von 1g/ml angenommen) wurde dann die tägliche Na⁺- bzw. K⁺-Ausscheidung berechnet. Zudem wurde von allen Proben mit einem Osmometer mittels Gefrierpunktserniedrigung die Osmolarität bestimmt.

2.3 In vitro Methoden

2.3.1 Mikrodissektion zur Isolierung von Glomerula

Zur Gewinnung von Glomerula wurden je einer C57BL/6 Maus nach Tötung durch Genickbruch beide Nieren möglichst steril entnommen und in Minimum Essential Medium (MEM) gewaschen. Nach Entfernung der Nierenkapsel und des Nierenmarks wurde die Rinde von beiden Nieren in ca. 1mm³ große Stücke geschnitten und in einem kleinen Glasfläschchen in 2ml bereits vorgewärmter Verdaulösung (siehe Puffer und Lösungen) für 15 Minuten verdaut. Anschließend wurde die Verdaulösung abgesaugt und durch frische ersetzt. Nach erneuten 15 Minuten Verdauzeit wurde die Lösung mit den gelösten Anteilen, jedoch ohne die Kortexstücke, zusammen mit 2ml 1% BSA in MEM in ein Falcontube überführt und dort für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen, damit sich die durch den Verdau herausgelösten zellulären Anteile absetzen konnten. Auf die Nierenrindenstücke wurde wieder 2ml neue Verdaulösung gegeben. Nach Absinken der Zellen wurde der Überstand bis auf ca. 500µl Rest abgesaugt und verworfen. Auf den im Tube verbleibenden Anteil kamen erneut 2 ml 1% BSA in MEM hinzu. Der ganze Inhalt wurde dann in kleine Petrischalen, in denen 1 ml MEM vorgelegt war, überführt und war bereit zum Mikroskopieren. Alle Arbeitsschritte inklusive des Mikroskopierens erfolgten möglichst RNase-frei unter ständiger Kühlung auf Eis und wurden für jede Maus vier bis fünf Mal wiederholt. Unter dem Mikroskop wurden dann je 500 Glomerula für die TRPC-mRNA Bestimmung von den Tubulusanteilen separiert und in Cups mit 400µl Lösung D mit 0,72% Mercaptoethanol bei -80 Grad Celsius bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Dabei wurde nicht zwischen Glomerula mit und ohne anhaftendem Gefäß unterschieden.

2.3.2 Isolierung von JG-Zellen

Die Isolation der JG-Zellen aus Mäusenieren erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Kurtz & Schweda, 2001). Jeweils zwei C57BL/6 Mäusen wurden nach Tötung durch Genickbruch beide Nieren möglichst steril entnommen. Diese wurden anschließend nach Entfernung der Nierenkapsel in einer mit wenigen Tropfen Lösung 1 gefüllten Petrischale mit einem Skalpell dispergiert. Der Nierenbrei wurde dann in ein mit 30ml vorgewärmter Verdaulösung (75mg Trypsin, 53mg Collagenase A in Lsg. 1) gefülltes Becherglas überführt und für ca. 50min bei 37 Grad Celsius unter ständigem Rühren verdaut. Nach visuell verifiziertem Nierenverdau wurde die Suspension durch einen 22,4µm Sieb filtriert und das Filtrat mit den Einzelzellen gesammelt. Dieses wurde dann mit 2200 rpm für 7 min bei Raumtemperatur pelletiert und zweimal mit 50 ml Lösung 1 gewaschen. Danach wurden die pelletierten Zellen in 4 ml Lösung 1 resuspendiert, die

gereinigte Zellsuspension mit 26ml 30 % isoosmotischer Percolllösung vermischt und für 30 Minuten mit 11.000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Von den nach der Dichtegradientenzentrifugation typischerweise erscheinenden 4 Banden akkumulierter Zellen wurde die unterste, welche sich kurz überhalb der Erythrozyten befand, mit der höchsten spezifischen Reninaktivität (Dichte: 1.07g/ml) abgesaugt und die gewonnenen Zellen dreimal in je 50ml Lösung 1 gewaschen. Zum Schluss wurde das Zellpellet in 3,5ml Lösung D mit 0,72% Mercaptoethanol aufgenommen, in 400µl Aliquots auf acht Eppendorf Cups verteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C eingefroren.

2.3.3 As4.1 Zellkultur

As4.1-Zellen sind eine Renin exprimierende Zelllinie, die aus dem Nierentumor einer transgenen Maus gewonnen wurde (Sigmund et al., 1990). Die Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC No. CRL-2193) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM Medium (Biochrom) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für die reverse Transkription wurden ca. 20.000 Zellen in jeweils 400µl Lösung D mit 0,72% Mercaptoethanol gelöst.

2.3.4 mRNA-Bestimmung

2.3.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA aus den gesammelten Glomerula wurde den Cups mit Lösung D und Mercaptoethanol, in denen sich die Glomerula bzw. As4.1-Zellen befanden, als erstes 2µl tRNA, 40µl Natriumacetat 2M, 400µl wassergesättigtes Phenol pH4 und 80µl Chloroform hinzugegeben. Nach Zugabe jeder neuen Substanz wurden die Cups gevortext. Nachdem die Cups 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und 20 Minuten mit 12.000 rpm bei 4 Grad Celsius zentrifugiert wurden, wurden 400µl der oberen Phase mit 400µl Isopropanol 100% vermischt und für mindestens eine Stunde bei -20 Grad Celsius aufbewahrt. Dann wurden die Proben erneut für 20 Minuten mit 12.000 rpm bei 4° C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen, das zurückgebliebene kleine weißliche Pellet mit 500µl Ethanol 70% gewaschen und ein drittes Mal für 20 Minuten mit den gleichen Parametern zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und verworfen und das Cup bei 50° C und geöffnetem Deckel für 10 Minuten stehen gelassen, damit der restliche Alkohol noch verdunsten konnte. Zurück blieb die isolierte RNA, die im letzten Schritt in 10µl DEPC-Wasser resuspendiert wurde und bereit war für die sich anschließende reverse Transkription.

Bei den Gesamtnieren kam das Protokoll zur RNA Isolierung mittels Guanidinthiocyanat-phenol-chloroform unter Verwendung von Trizol[®] zur Anwendung. Dazu wurde je eine der nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und anschließend bei -80° C aufbewahrten Nieren in ein in Eis stehendes und mit 1ml Trizol gefülltes Gefäß gegeben und mittels eines Dispergiergeräts zerkleinert. Danach wurde der Mix in ein 2ml fassendes Eppendorf Cup überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, in denen sich die vorhandenen Proteine denaturieren und im Phenolanteil lösen sollten. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Cups vorsichtig geschüttelt und für 20 Minuten mit 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Auf diese Weise entstanden drei Phasen: unten eine rötliche Phenolphase mit den gelösten Proteinen und der DNA, in der Mitte eine weiße Interphase mit den relativ hydrophilen Proteinen und oben ein wässriger Überstand von ca. 500µl mit der gelösten RNA, der vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Cup überführt wurde. Zur Fällung der RNA wurden 500µl Isopropanol 100% dazugegeben, die Cups kurz gevortext, für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 10 Minuten mit 12.000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Im Anschluss konnte der Überstand abgekippt, und das zurückgebliebene glasige Pellet mit 1ml Ethanol 75% gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten mit 7.500 rpm bei 4° C, erneutem Abkippen des Überstands und Trocknung des geöffneten Cups bei Raumtemperatur wurden 300µl DEPC-Wasser dazugegeben, alles gevortext, für maximal zwei Minuten in den Schüttler bei 65° C gestellt, erneut gevortext und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden 2µl der Probe in 98µl Wasser gelöst und mit Hilfe eines Photometers die RNA-Konzentration bestimmt. Als Zeichen für eine gelungene Isolierung musste die Ratio der Absorption bei den Wellenlängen 260nm/280nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen, da Werte <1,8 einen hohen Grad an Verunreinigung mit aromatischen Aminosäuren angezeigt hätten, deren Absorptionsmaximum bei 280nm liegt.

2.3.4.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden jeweils 2µg RNA, 1µl oligo(dT) und Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtvolumen von 10µl vermischt. Da bei der aus den Glomerula isolierten RNA von einer eh schon geringen Konzentration ausgegangen wurde, wurden dort 9 µl des Gemisches in dem sich die RNA nach der Isolierung befand, mit 1µl oligo(dT) vermengt. Die Reaktionsgefäße wurden dann fünf Minuten lang in den Thermoblock bei 65°C gestellt und anschließend wieder auf Eis. Zu den Proben wurden je 1µl Reverse Transkriptase (RT), 4µl dNTPs (2,5mM), 4µl First Strand Puffer und 3µl H₂O gegeben und das fertige Gemisch im Thermocycler mit dem eingestellten Programm von 37° C für eine Stunde mit sich

anschließenden 94° C für zwei Minuten inkubiert. Für die spätere Verwendung als Negativkontrollproben wurde zu jedem Ansatz noch ein zusätzlicher gemacht, bei dem anstelle der RT zusätzlich 1µl H₂O eingesetzt wurde.

2.3.4.3 Qualitative Messung durch PCR mit dem Thermocycler

Die RT-PCR erfolgte standardmäßig mit folgendem Ansatz: 4µl 5x Puffer (GoTaq), 1,2µl dNTPs (2,5mM), 0,1µl DNA Polymerase (GoTaq), 1,2µl Primer sense, 1,2µl Primer antisense, 10,3µl H₂O und 2µl der bei der reversen Transkription gewonnenen cDNA. Die Amplifikation erfolgte je nach verwendetem Template und verwendeter Primer mit unterschiedlicher Zyklenzahl und unterschiedlicher Annealing Temperatur.

Für die Bestimmung der TRPC-mRNA aus den Glomerula, den isolierten JG-Zellen und den As.4.1-Zellen erfolgte die PCR bei 40 Zyklen mit 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Annealing bei 60°C bzw. 62,5°C und 1 Minute Elongation bei 72°C.

Für die Bestimmung der TRPC-mRNA aus der Gesamtniere erfolgte die PCR bei 34 Zyklen mit 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Annealing bei 60°C und 1 Minute Elongation bei 72°C. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Elektrophorese auf 2% Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

2.3.4.4 Semiquantitative Messung durch Real Time PCR

Die semiquantitative Bestimmung der Renin-Expression in den Gesamtnieren von Wildtyp- und TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen erfolgte an cDNA im Light Cycler (Roche) mit dem Light Cycler DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Molecular Biochemicals). Pro Ansatz wurden 2 µl cDNA, 3,0 mM MgCl₂, je 1 pmol des sense und des antisense Primers und 2 µl des Fast Starter Mix (Puffer, dNTPs, SYBR Green, Taq) eingesetzt. Das Amplifikationsprogramm im Light Cycler bestand aus 1 Zyklus 95 °C für 10 min gefolgt von 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing bei 60 °C für 5 s und Elongation bei 72 °C für 15 s. Die relativen cDNA-Konzentrationen wurden anhand des Verhältnisses zu einer Verdünnungsreihe eines aus allen eingesetzten Proben gebildeten Pools berechnet und durch Bildung des Quotienten mit der gleichzeitig gemessenen Menge der mRNA des Haushaltgens β-Aktin normiert.

2.3.5 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurden von beiden Gruppen je 2 Tiere zufällig ausgewählt. Von ihnen wurden je 0,5cm der Schwanzspitze abgeschnitten und diese dann über Nacht in je 600µl TNES und 10µl Proteinase K (10mg/ml) bei 56°C und leichtem Schütteln verdaut. Nachdem am nächsten Tag je 166,7µl NaCl 6M zu den Proben dazugegeben, diese für 15 Minuten stark geschüttelt und für 15 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert wurden, wurde 500µl vom Überstand zusammen mit 500µl Ethanol 100% in ein frisches Eppendorf Cup gegeben, dieses gekippt und nochmals mit 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 500µl Ethanol 80% gewaschen, wieder zentrifugiert für 5 Minuten mit 13.000 rpm und der Überstand abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von 500µl Ethanol 80% wurde die Probe diesmal für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Cup nach gründlichem Absaugen des Überstands für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Es folgte die Zugabe von 150 µl H₂O, welches bei 55°C für 1 Stunde Zeit hatte das DNA-Pellet aufzulösen. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration der Proben von 36-54 ng/µl wurden je 2 µl für die folgende PCR-Reaktion eingesetzt. Für die Bestimmung des Genotyps erfolgte die PCR mit den unter Materialien beschriebenen Primern bei 34 Zyklen mit 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Annealing bei 55°C und 1 Minute Elongation bei 72°C. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte wieder mittels Elektrophorese auf 2% Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

2.4 Statistik

Bei der Blutdruck- und Herzfrequenzmessung unter Normalbedingungen und unter oraler β -Blocker Gabe wurden bei 7 Wildtyp- bzw. 8 TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen 5 Tage lang täglich je 8 Werte erhoben. Daraus wurden je 5 Tagesmittelwerte gebildet, aus denen wiederum der Gesamtmittelwert für jedes Tier bestimmt wurde. Bei der Messung nach intraperitonealer Gabe von Propranolol wurden bei 8 Wildtypen und 5 Dokos je 8 Werte erhoben.

Die Plasmarenin-Bestimmung erfolgte in Ruhe bei 8 Wildtypen und 9 Dokos und nach intraperitonealer β -Blocker Gabe an 7 Wildtypen und 4 Dokos. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Der Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde mittels Student t-Test bestimmt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl der Einzelexperimente einer Versuchsreihe wurde mit „N“ bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung

Die Zucht der TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse erfolgte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Homburg (Prof. Dr. M. Freichel). Die Mäuse wurden als homozygote Doppelknockoutmäuse oder Wildtypmäuse übergeben. Um eine mögliche Beeinflussung der Messwerte von Seiten des Untersuchers auszuschließen, waren diesem die Genotypen der beiden Gruppen während der Versuche unbekannt. Nach Versuchsende wurden die Genotypen bekanntgegeben und zusätzlich eine Kontroll-Genotypisierung durchgeführt. Es wurden die unter 2.1.2 erläuterten Primer verwendet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz, bei dem anstelle der Probe die gleiche Menge Wasser eingesetzt wurde. Es zeigte sich bei beiden zufällig ausgewählten Tieren der WT-Gruppe eine kräftige Bande für TRPC6 bei 234bp und keine beim Neomycin-Resistenzgen. Bei den Mäusen aus der KO-Gruppe verhielt es sich genau umgekehrt mit einer Bande für das Neomycin-Resistenzgen bei 339bp, jedoch keiner bei TRPC6. Die Negativkontrollen zeigten keine spezifischen Amplifikate (Abb. 3.1). Die Tiere der einen Gruppe konnten somit eindeutig als Wildtyp-Vergleichsgruppe und die der anderen als TRPC1/6 Doppelknockout-Tiere identifiziert werden.

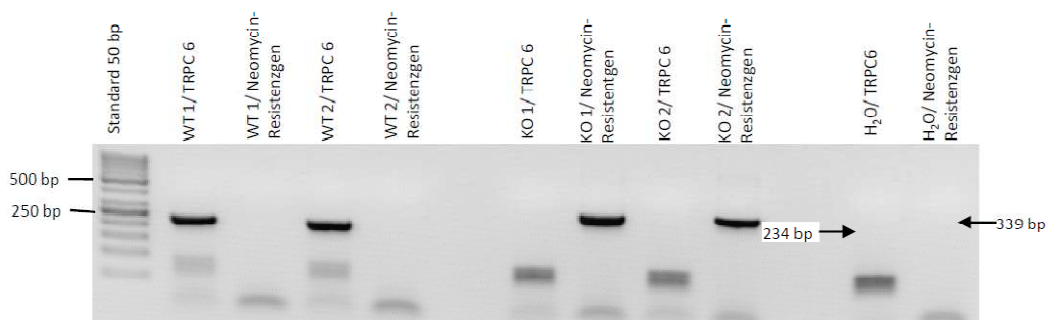


Abbildung 3.1 Genotypisierung WT 1/2= Tier aus der Wildtyp-Gruppe; KO 1/2= Tier aus der Doppelknockout-Gruppe; H₂O= Negativkontrollprobe; TRPC6= Primer für TRPC6; Neomycin-Resistenzgen= Primer für Neomycin-Resistenzgen; 50bp Std DNA Molekulgewichtsstandard; Kleine Pfeile (→) deuten die erwartete Lage der Amplifikate an

3.2 Nachweis von TRPC-mRNA im Nierengewebe der Maus

3.2.1 Gesamtniere

Zunächst wurde untersucht, ob die Nieren von C57BL/6 Mäusen mRNA der verschiedenen TRPC-Isoformen exprimieren. Die Primer wurden wie unter 2.1.2 beschrieben eingesetzt. Es zeigte sich bei jeweils beiden Ansätzen eine kräftige Bande der erwarteten Länge zwischen 325bp und 413bp für die Isoformen TRPC1, -2, -3, -4, -5 und -6, nicht jedoch für TRPC7 (Abb. 3.2). Die Funktionstüchtigkeit des Primers für TRPC7 wurde mit Hilfe von Proben aus Mäusegehirnen überprüft, in denen TRPC7 exprimiert wird (Abb.3.4).

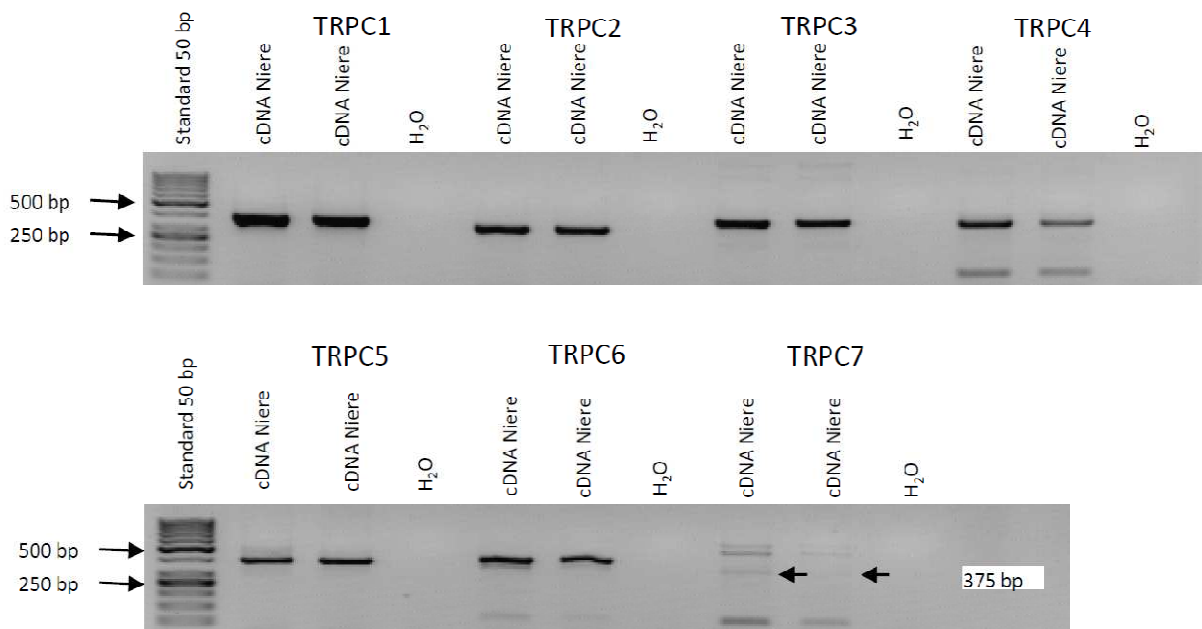
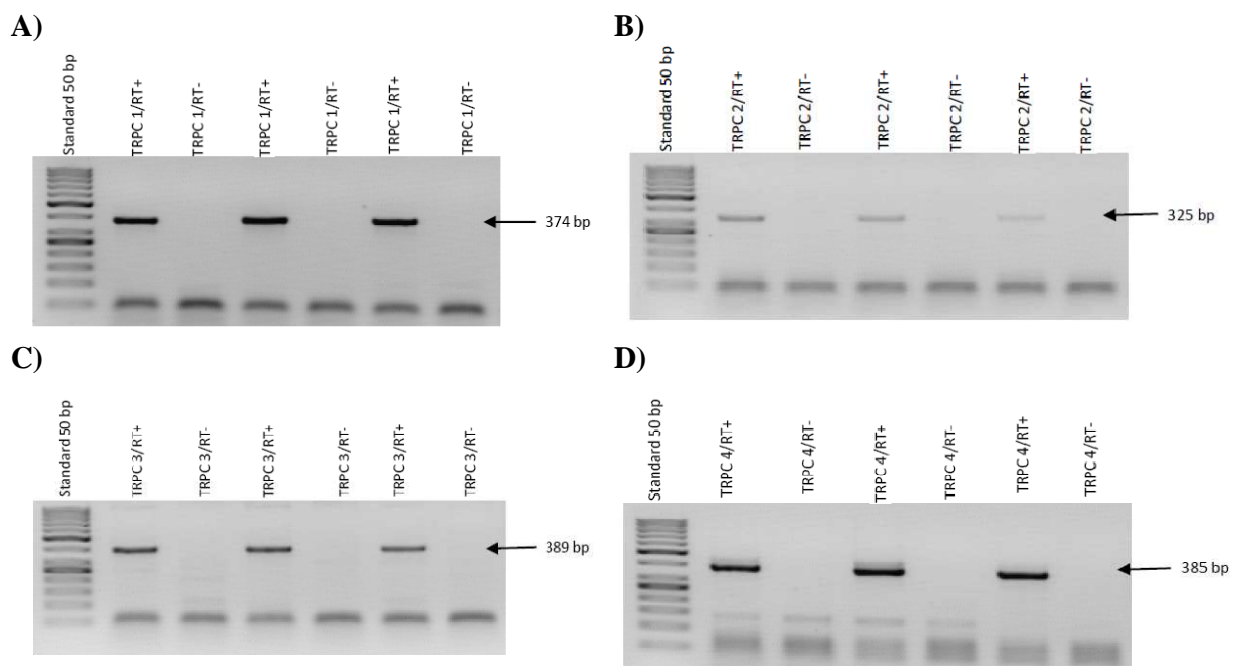


Abbildung 3.2 Expression von TRPC-Isoformen in der Gesamtniere von C57BL/6 Mäusen. H₂O=Negativkontrolle; Kleine Pfeile (→) deuten die erwartete Lage der Banden für TRPC7 an

3.2.2 Glomerula

Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss von TRPC auf die Regulation der Reninfreisetzung zu beleuchten. Dafür war es notwendig, herauszufinden, welche TRPC-Isoformen in den JG-Zellen exprimiert werden. Es existiert kein Verfahren, mit dem JG-Zellen zu 100% von sämtlichen anderen Zelltypen isoliert werden können. Dieses wäre jedoch notwendig, um das TRPC-Expressionsmuster mittels mRNA-Bestimmung eindeutig klären zu können. Deshalb erfolgte als erster Schritt der Annäherung ein Screening auf TRPC-mRNA in Glomerula,

in denen der prozentuale Anteil an JG-Zellen um ein Vielfaches höher liegt als in der Gesamtniere. Zwar enthalten Glomerula neben JG-Zellen noch andere Zelltypen, jedoch kann zumindest eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Tubuluszellen bei diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden. Es wurden die in 2.1.2 aufgeführten Primer verwendet. Als Negativkontrolle wurden Proben verwendet, bei denen bei der reversen Transkription von mRNA in cDNA keine reverse Transkriptase hinzugegeben wurde und die deshalb keine cDNA enthalten können (RT-). Der Nachweis von Renin-mRNA diente als Positivkontrolle für eine erfolgreiche reverse Transkription. Es zeigten sich deutliche Banden bei den Primern für TRPC1, -3, -4 und -6 und für Renin. Die Banden bei TRPC2 waren allenfalls schwach zu erkennen. Keine spezifischen Amplifikate zeigten sich bei den Ansätzen für TRPC5 und TRPC7. Auch bei den Negativkontrollproben (RT-) waren keine spezifischen Banden zu sehen (Abb. 3.3), so dass man anhand dieser Ergebnisse von der Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 in Glomerula ausgehen kann. TRPC2 ist möglicherweise vorhanden. Nicht exprimiert dürften TRPC5 und TRPC7 sein. Die deutlichen Banden bei den zusätzlich durchgeführten Reninansätzen zeigen außerdem, dass die Isolierung der Glomerula und die reverse Transkription erfolgreich waren und ferner reninproduzierende JG-Zellen einen beträchtlichen Teil der Zellen aus dem gewonnenen Ausgangsmaterial ausmachten.



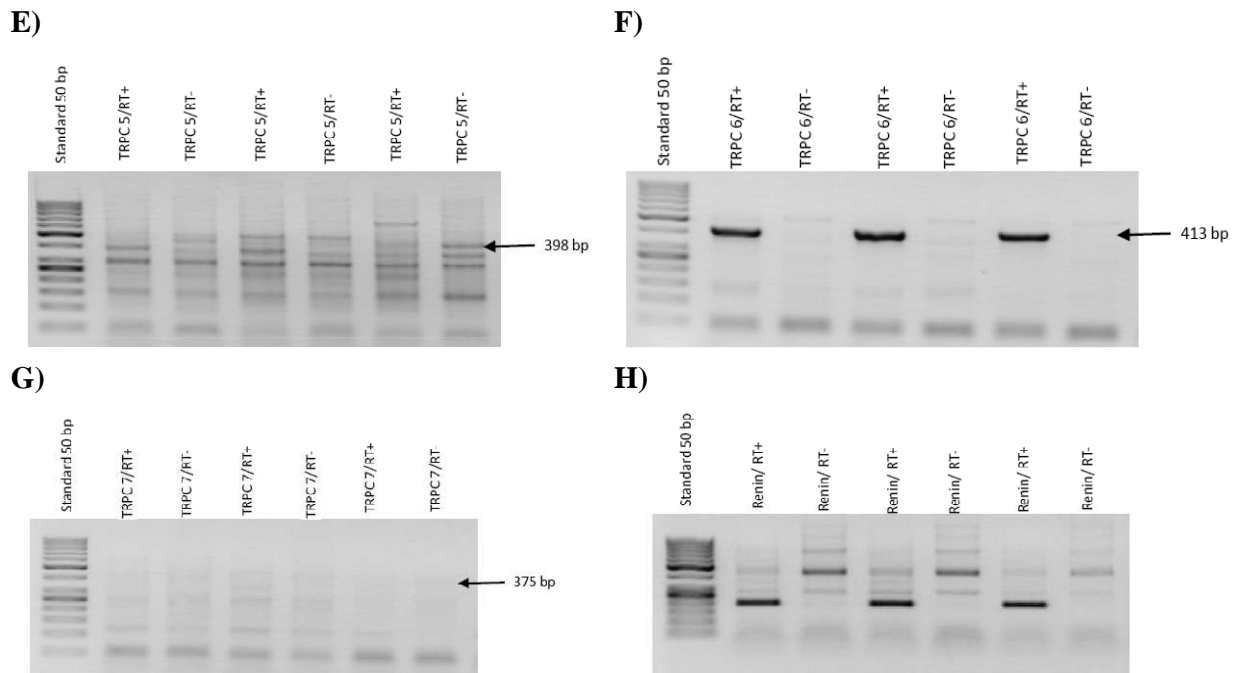
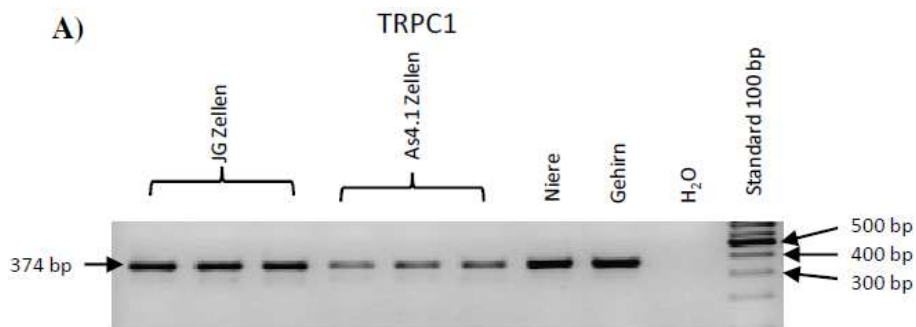


Abbildung 3.3 Expression von TRPC Isoformen und Renin in Glomerula von C57BL/6 Mäusen. Eingesetzte Primer waren für: A) TRPC1; B) TRPC2; C) TRPC3; D) TRPC4; E) TRPC5; F) TRPC6; G) TRPC7; H) Renin; RT+=Probe mit RT; RT-=Negativkontrolle ohne RT; Kleine Pfeile (→) deuten die erwartete Lage der Amplifikate an

3.2.3 JG-Zellen und As.4.1 Zellen

Als nächstes wurde in isolierten JG-Zellen nach TRPC-mRNA gesucht. Hier wurden die Isoformen TRPC1, -4 und -6 nachgewiesen. In der Renin produzierenden Zelllinie As4.1 konnte die Expression von TRPC1 und -6 gezeigt werden. Amplifikate von TRPC4-cDNA waren bei den As4.1-Zellen allenfalls sehr schwach zu erkennen. In keiner der beiden Präparationen wurde mRNA der Isoformen TRPC3, -5 oder -7 gefunden. Ebenfalls auf dem Gel zu erkennen sind nochmals die Amplifikate bei den Ansätzen für TRPC1, -3, -4, -5, und -6 aus der Gesamtniere. Im Gehirn der Maus konnte mRNA sämtlicher TRPC-Isoformen gezeigt werden. Insbesondere auch TRPC7-mRNA, die im Nierengewebe nicht vorhanden war, wurde hier vorgefunden (Abb.3.4).



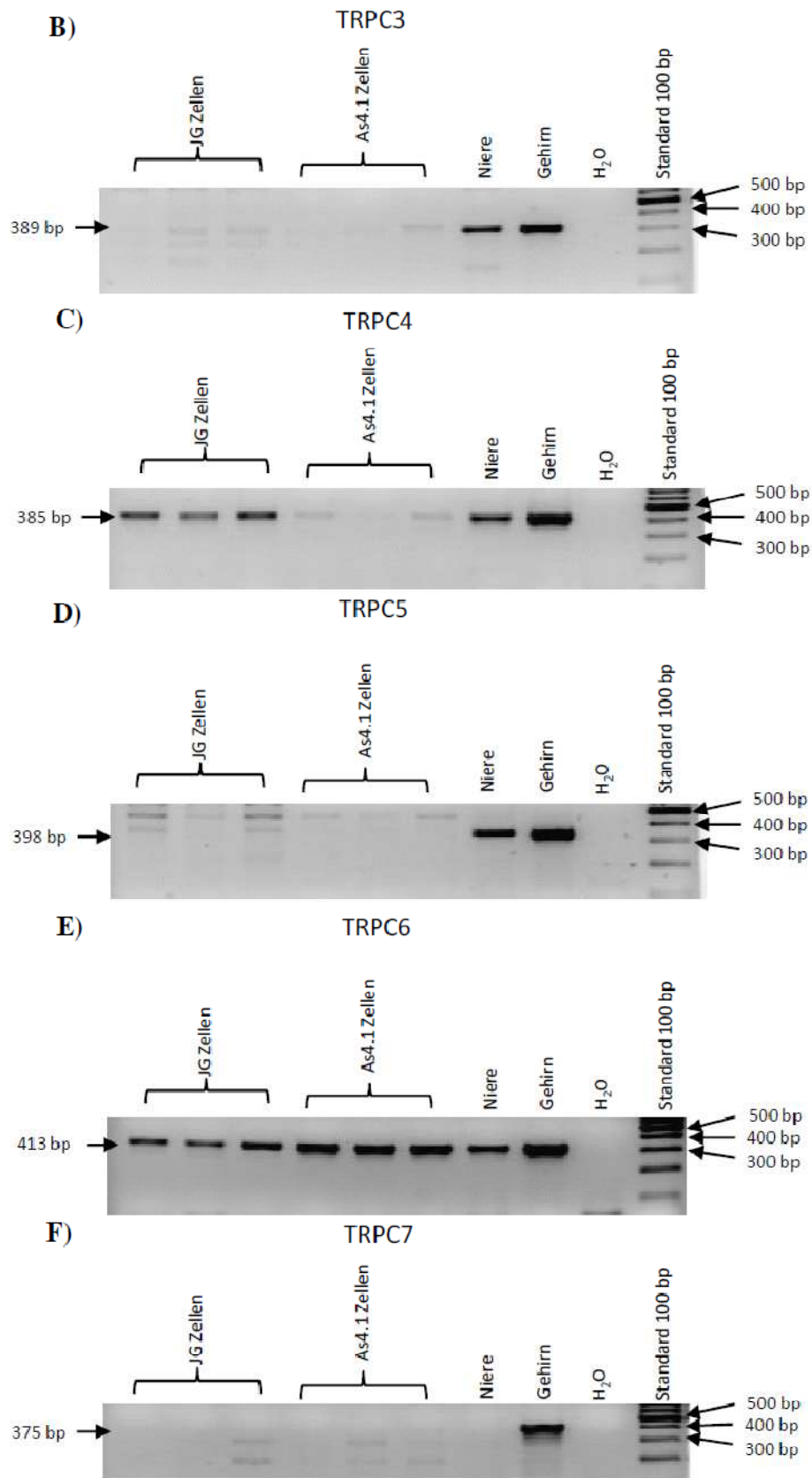


Abbildung 3.4 Expression von TRPC-Isoformen in JG Zellen, As4.1-Zellen, Niere und Gehirn von C57BL/6 Mäusen. Eingesetzte Primer waren für: A) TRPC1; B) TRPC3; C) TRPC4; D) TRPC5; E) TRPC6; F) TRPC7; H₂O=Negativkontrolle; Kleine Pfeile (→) deuten die erwartete Lage der Amplifikate an.

Obwohl bei allen Präparationen aus nativem Nierengewebe neben JG-Zellen auch andere Zellen in den Proben vorhanden waren, kann man mittels Ausschlussprinzip festhalten, dass in den JG-Zellen nur die Isoformen TRPC1, TRPC4 und TRPC6 exprimiert sein können, da nur mRNA dieser drei TRPCs sowohl in der Gesamtniere als auch in den Glomerula und den isolierten JG-Zellen nachgewiesen werden konnten. Als Ca^{2+} permeable Kationenkanäle könnten sie dort an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt sein.

3.3 Vergleich der Plasmareninspiegel von Wildtyp- und TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen

Während TRPC4 in früheren Untersuchungen v. a. mit Endothelzellen assoziiert schien (Freichel et al., 2001), wurde für TRPC1 und -6 eine Rolle bei der Funktion von Herz- und Gefäßmuskelzellen nachgewiesen (Seth et al., 2009), (Dietrich et al., 2005). Da sich JG-Zellen aus glatten Muskelzellen entwickeln können (Hackenthal et al., 1990), erschien es am vielversprechendsten, den Einfluss der TRPC-Kanäle auf den Reninhaushalt der Maus mit Hilfe von TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen (Dokos) zu untersuchen. Falls die beiden Kanäle TRPC1 und TRPC6 alleine oder in Form von Heteromeren eine relevante Rolle bei der Bildung oder Steuerung von store- und/oder receptor-operated Channels einnehmen, müsste das Fehlen der zwei Kanäle bei den Dokos zu einer Veränderung der Reninfreisetzung führen.

Zur Messung der Reninfreisetzung wurde bei 9 Dokos und 8 Wildtypmäusen die Plasmareninkonzentration (PRC) unter Normalbedingungen bestimmt. Die PRC betrug bei den TRPC1/6 Dokos $236,2 \pm 33,3$ ng Ang I/ ml*h, was im Vergleich zu $164,7 \pm 19,7$ ng Ang I/ ml*h bei der Vergleichsgruppe zwar in der Tendenz höher war, sich jedoch aufgrund der relativ großen Streuung der einzelnen Werte nicht signifikant von der Wildtypgruppe unterschied.

Wie in der Einleitung bereits geschildert, ist das sympathische Nervensystem einer der Hauptregulatoren der Reninfreisetzung auf systemischer Ebene. Es ist durchaus denkbar, dass die Aktivität dieses Anteils des autonomen Nervensystems sich aufgrund der Ausschaltung zweier fast ubiquitär vorkommender Kationenkanäle bei den TRPC1/6 Dokos grundlegend von derjenigen der Wildtyp-Vergleichsgruppe unterscheidet. Dieser unterschiedliche Sympathikotonus könnte etwaige Unterschiede in der Ausschüttung des Renins maskieren. Aus diesem Grund wurde die Messung der PRC nochmals unter Hemmung der β -adrenergen Wirkung des Sympathikus mittels des Beta-Blockers *Propranolol* wiederholt. Propranololhydrochlorid ist ein lipophiler nicht-kardioselektiver Betarezeptorenblocker mit membranstabilisierender Wirkung ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität (ISA). Propranololhydrochlorid hemmt sowohl die Beta-1- als auch die Beta-2-Rezeptoren. Bei der Messung der Plasmareninkonzentration von

4 Dokos und 7 Wildtypmäusen einen Tag nach intraperitonealer Gabe von 10mg/kg KG *Propranolol* war der Wert bei der Wildtyp-Vergleichsgruppe ($163,7 \pm 23,53$ ng Ang I/ ml*h) so gut wie unverändert im Vergleich zur Messung unter Normalbedingungen. Bei den Knockouts zeigte sich dagegen ein signifikanter Abfall auf $88,3 \pm 17,33$ ng Ang I/ ml*h. Doch auch unter diesen Bedingungen war aufgrund der großen Streuung und der kleinen Fallzahl die Reninkonzentration im Plasma zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3.5).

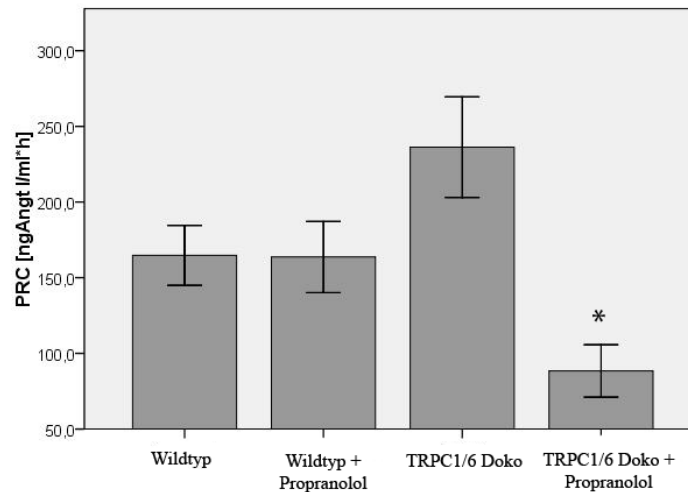


Abbildung 3.5 Plasmareninkonzentration von WT und TRPC1/6 Doko unter Normalbedingungen und nach intraperitonealer Propranolol Gabe (10mg/kg KG) die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM * $p < 0,05$ im Vergleich zum Doko Wert unter Normalbedingungen

3.4 Messung von Renin-mRNA aus der Niere von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos

Zur Messung der Renin-mRNA und damit zur Beurteilung der Renin-Synthese in den Gesamtnieren der TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse im Vergleich zur Synthese der Wildtypen wurde die Methode der real time PCR herangezogen. Dabei wurde von 4 Doppelknockout- und 7 Wildtypieren die relative Menge an Renin-mRNA mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines aus allen eingesetzten Proben gebildeten Pools berechnet. Zur Normierung wurden die errechneten Werte durch die gleichzeitig gemessene Menge an β -Aktin-mRNA geteilt. β -Aktin ist ein typisches Haushaltsgen und sollte bei beiden Gruppen im selben Maße exprimiert werden. Bei einem berechnetem Renin/Aktin-Verhältnis von $1,039 \pm 0,137$ bei den Knockouts und $1,051 \pm 0,083$ bei den Wildtypen, kann man davon ausgehen, dass bei beiden Gruppen relativ zur

Gesamtsyntheseleistung gleich viel Renin produziert wird (Abb. 3.6).

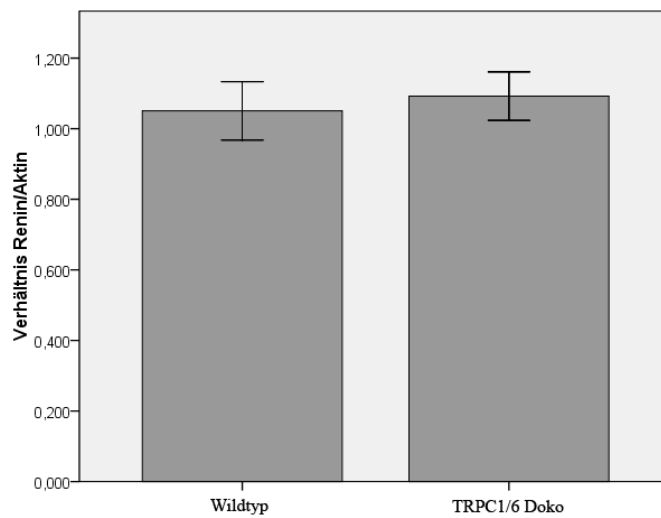


Abbildung 3.6 Bestimmung der relativen Renin-Expression in der Gesamtniere von TRPC1/6 Dokos und Wildtypen anhand des Renin/Aktin-Verhältnisses. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM; WT: N=7; Doko: N=4

3.5 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos

Eine der Hauptfunktionen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist die Regulation des Blutdrucks. Im Zusammenhang damit hat das RAAS auch Einfluss auf die Herzfrequenz. Gleichzeitig wird aber andererseits die Reninfreisetzung selbst von diesen beiden Parametern reguliert. Es ist deshalb unklar, ob die in der Tendenz leicht höhere PRC der TRPC1/6 Dokos durch das Fehlen der beiden TRPC-Proteine in den JG-Zellen und einen damit verbundenen verminderten Ca^{2+} -Einstrom verursacht wird, welcher wiederum zu einer Hemmung der inhibitorischen Signalkaskade der Reninfreisetzung und einer vermehrten Freisetzung von Renin führt. Oder aber die unterschiedlichen PRCs der beiden Gruppen werden durch Unterschiede in der systemischen Regulation verursacht, wie etwa einem unterschiedlichen Sympathikotonus. Auch eine aufgrund des Fehlens von TRPC1 und -6 verursachte myogene Dysregulation der Gefäße mit nachfolgend erniedrigtem Blutdruck könnte die erhöhte Reninkonzentration im Plasma der Dokos verursachen.

3.5.1 unter Normalbedingungen

Deshalb wurden der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz der TRPC1/6 Dokos im Vergleich zur Wildtypgruppe unter Normalbedingungen bestimmt. Dazu wurden bei je acht

Knockout- (N=8) und sieben Wildtypmäusen (N=7) an fünf aufeinander folgenden Tagen je 8 Werte erhoben. Für den Blutdruck ergab der Mittelwert aus allen Einzelerperimenten \pm der Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) für die Dokos $132,8 \pm 2,87$ mmHg und für die Wildtypen $136,7 \pm 2,07$ mmHg, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Allerdings fand sich ein signifikanter Unterschied bei den Herzfrequenzen. Während diese bei den Tieren ohne TRPC1 und -6 bei $593,7 \pm 10,7$ Schlägen pro Minute (bpm) lag, betrug sie bei der Wildtyp-Vergleichsgruppe $672,7 \pm 14,8$ bpm ($p < 0,001$) (Abb.3.7).

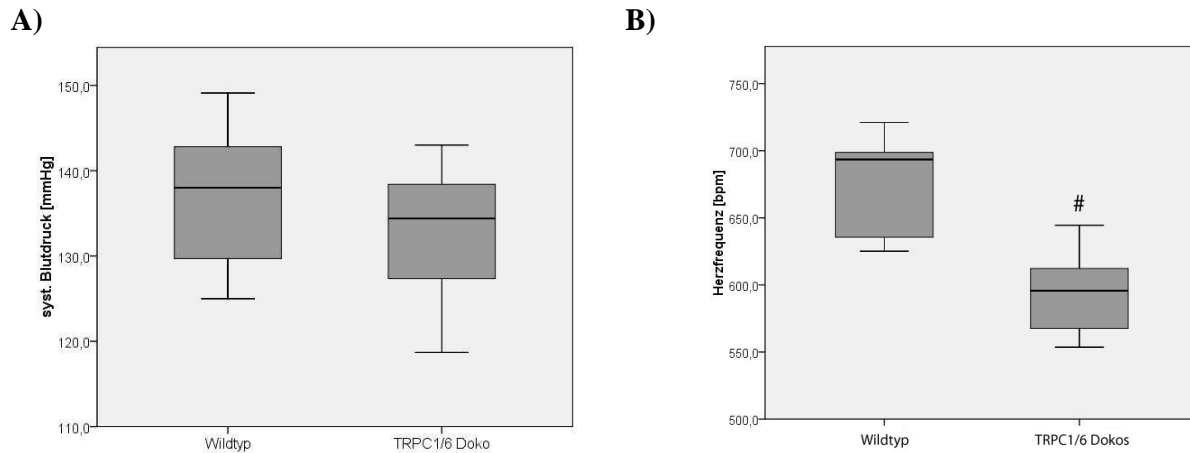


Abbildung 3.7 Blutdruck und Herzfrequenz von WT und TRPC1/6 Doko unter Normalbedingungen A) syst. Blutdruck B) Herzfrequenz dargestellt sind größter und kleinster Wert, Median, oberes und unteres Quartil; WT: N=7; Doko: N=8; # $p < 0,001$ im Vergleich der Mittelwerte zur Wildtyp-Kontrollgruppe

3.5.2 nach Gabe von Propranolol

Auch hier wurde im Anschluss wieder die mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch einen unterschiedlichen Sympathikotonus der beiden Gruppen untersucht, indem der Versuch nochmals unter Gabe von *Propranolol* durchgeführt wurde. Die Verabreichung des Medikaments erfolgte über das Trinkwasser ($0,5\text{gPropranolol/L H}_2\text{O}$).

Es zeigte sich, dass bei oraler Gabe der syst. Blutdruck entgegen der eigentlichen Erwartung bei den TRPC1/6 Dokos um fast 10 mmHg von $132,8 \pm 1,19$ auf $141,4 \pm 2,9$ mmHg anstieg wobei er sich bei den Wildtypmäusen kaum veränderte (von $136,7 \pm 1,53$ auf $137,6 \pm 1,5$ mmHg). Auch unter diesen Bedingungen war der vermeintliche Unterschied nicht signifikant. Die Herzfrequenz erniedrigte sich bei beiden Gruppen (Doko: von $590,2 \pm 4,5$ auf $558,5 \pm 9,1$ bpm; Wildtyp: von $672,7 \pm 6,6$ auf $626 \pm 14,8$ bpm) und blieb weiterhin signifikant unterschiedlich (Abb. 3.8).

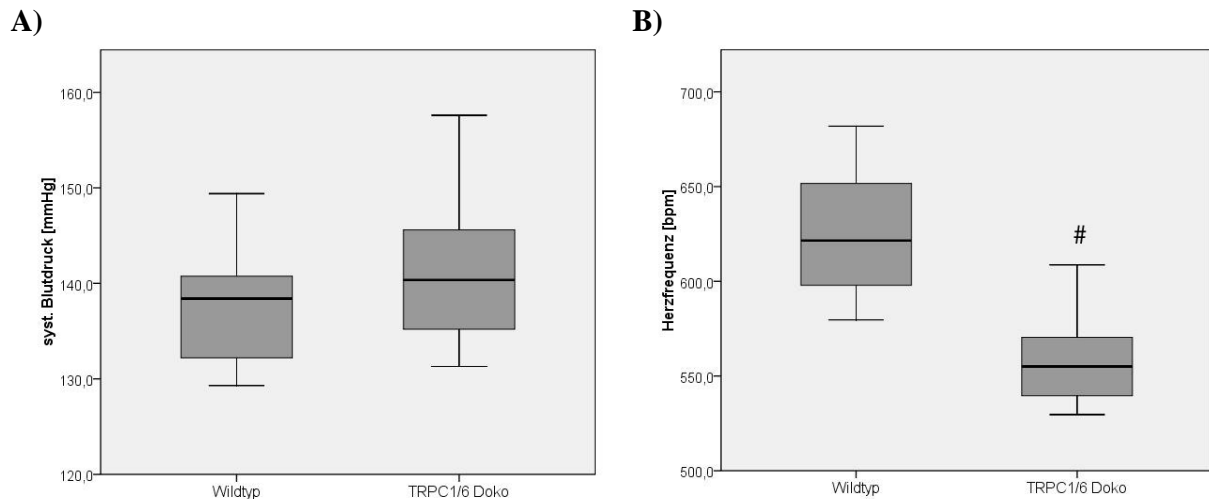


Abbildung 3.8 Blutdruck und Herzfrequenz von WT und TRPC1/6 Doko während oraler Propranolol-Gabe (0,5 g/l H₂O) A) syst. Blutdruck; B) Herzfrequenz dargestellt sind größter und kleinster Wert, Median, oberes und unteres Quartil; WT: N=7; Doko: N=8; # p<0,001 im Vergleich der Mittelwerte zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Auch die akute intraperitoneale Applikation von 10mg/kg KG *Propranolol* führte zu einem Anstieg des Blutdrucks bei beiden Tiergruppen eine Stunde nach Gabe des Medikaments. Auf im Mittel 155,5±9,8mmHg stieg er bei den TRPC1/6 Dokos und auf 161,0±5,8mmHg bei der Vergleichsgruppe. Auch der Abfall der Herzfrequenz war bei dieser Applikationsform ausgeprägter: auf 530±10,1bpm bei den Dokos und 587,9±12,9bpm bei den Wildtypen (Abb. 3.9).

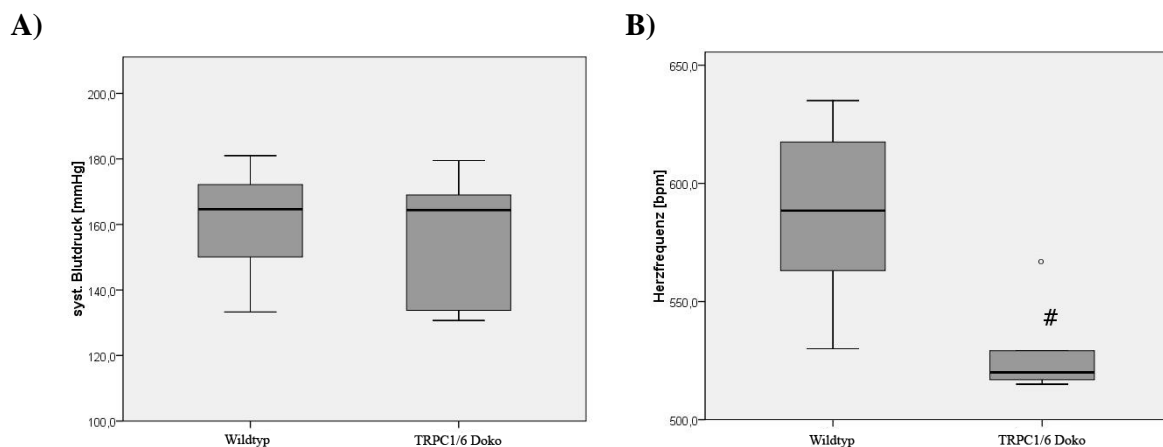
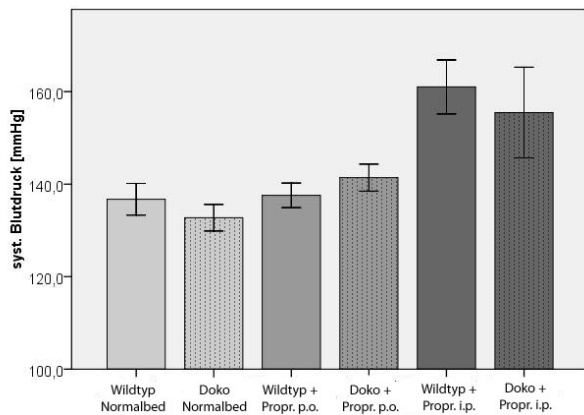


Abbildung 3.9 Blutdruck und Herzfrequenz von WT und TRPC1/6 Doko nach intraperitonealer Propranolol Gabe (10mg/kg KG) A) syst. Blutdruck B) Herzfrequenz dargestellt sind größter und kleinster Wert, Median, oberes und unteres Quartil; WT: N=8; Doko: N=5; ° Ausreißer: Werte die um mehr als das 1,5fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen; # p<0,01 im Vergleich der Mittelwerte zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich Knockout- und Wildtypmäuse bei keiner Versuchsanordnung signifikant in ihrem Blutdruck unterscheiden. Die Herzfrequenz lag bei den TRPC1/6 Dokos ca. 10-12% oder zwischen 50 und 80 Schlägen pro Minute unterhalb der Wildtyp-Vergleichsgruppe. Die Behandlung der Tiere mit dem Beta-Blocker *Propranolol* führte

zu einem überraschenden Anstieg des Blutdrucks und einer erwartungsgemäßen Absenkung der Herzfrequenz (Abb.3.10).

A)



B)

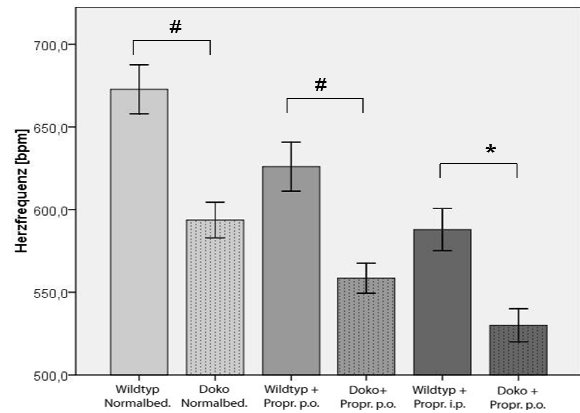


Abbildung 3.10 Blutdruck und Herzfrequenz von WT und TRPC1/6 Doko unter Normalbedingungen, während oraler (0,5 g/l H₂O) und nach intraperitonealer Propranolol-Gabe (10mg/kg KG) A) syst. Blutdruck B) Herzfrequenz Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM # $p < 0,001$ im Vergleich der Mittelwerte zur Wildtyp-Kontrollgruppe; * $p < 0,01$ im Vergleich der Mittelwerte zur Wildtyp-Kontrollgruppe; die jeweilige Stichprobengröße N kann den Beschriftungen der weiter oben gezeigten Boxplots entnommen werden.

3.6 Vergleich der Nierenfunktion von Wildtypen und TRPC1/6 Dokos

Die Regulation der Na⁺- und Wasserhomöostase ist neben der Blutdruckregulation eine weitere wichtige Aufgabe des RAAS. Umgekehrt könnten sich sowohl Unterschiede in der Salz- als auch in der Wasserausscheidung zwischen den TRPC1/6 Doppelknockout- und den Wildtypmäusen auf die Regulation der Reninfreisetzung und des Blutdrucks auswirken. Interessanterweise wurde sowohl für TRPC1, als auch für TRPC6 die Expression in direkter Beziehung zu Strukturen des Tubulussystems der Niere gezeigt, die maßgeblich an der Regulation der Wasser- und Salzausscheidung beteiligt sind. So stimmte die Lokalisierung von TRPC1 bei immunhistochemischen Färbungen von Rattennieren sehr genau mit der von Aquaporin 1 (AQP1) überein, einem typischen Protein des proximalen Tubulus und der dünnen absteigenden Henle Schleife, das in vielen Zellen, auch außerhalb der Nieren, den Transport von Wasser durch Zellmembranen vermittelt. Mit Aquaporin 2 (AQP2), welches im Verbindungstubulus und im Sammelrohr vorzufinden ist, konnte jedoch keine Kolo-kalisierung gefunden werden. Diese Beziehung zu AQP2 konnte dagegen für TRPC3 und TRPC6 gezeigt werden (Goel et al., 2006). Es ist also durchaus vorstellbar, dass TRPC1 eine Rolle bei der Regulation des allgemeinen Wassertransports durch Zellmembranen und TRPC3 und -6 speziell bei der ADH-gesteuerten Rückresorption von Wasser im Sammelrohr einnehmen. Sollten sich nun Doppelknockout- und Wildtypiere in diesem Bereich unterscheiden, so müsste man dies beim Vergleich ihrer Wasser-, Na⁺- und K⁺-Ausscheidung im Urin erkennen. Aus diesem Grund wurden 8 TRPC1/6

Doppelknockout- und 7 Wildtypmäuse für jeweils knapp eine Woche in Stoffwechselfkäfige gesetzt und es wurde an jeweils fünf Tagen immer zur gleichen Uhrzeit der gesamte Urin entnommen. Daraus wurde jeweils der Mittelwert gebildet, so dass sich jedes N aus 5 Einzelwerten zusammensetzt.

3.6.1 Wasserausscheidung

Die Diurese wurde anhand des Gewichts des täglich gesammelten Urins bestimmt. Dabei ergab sich bei den Dokos eine durchschnittliche Ausscheidung von $2,0 \pm 0,05$ g/Tag. Bei der Wildtyp-Vergleichsgruppe war der Wert mit $2,0 \pm 0,08$ g/Tag nahezu identisch (Abb.3.11).

Offensichtlich sind die beiden Kanäle TRPC1 und TRPC6 nicht von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase. Der Einbau von AQP2 im Sammelrohr scheint, trotz der in früheren Untersuchungen gefundenen Kolo-kalisierung mit TRPC6, nicht von der Anwesenheit von TRPC1 oder -6 abhängig zu sein.

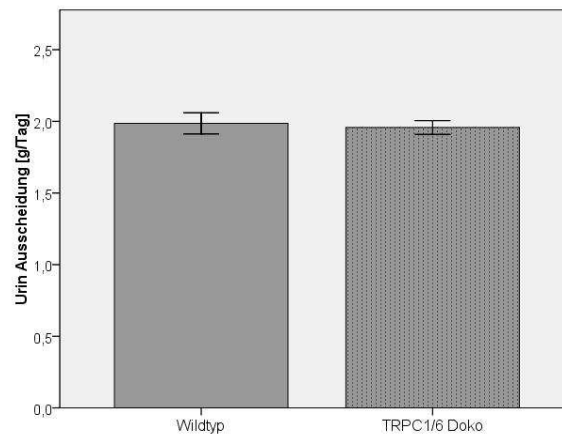


Abbildung 3.11 Vergleich der täglichen Urin Ausscheidungsmenge von WT und TRPC1/6 Dokos. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM; WT: N=7; Doko: N=8

3.6.2 Na⁺- und K⁺-Ausscheidung

Die Messung der Na⁺-Ausscheidung ergab für beide Gruppen ähnliche Werte (Doko: 199,6±15,1µmol/Tag, WT: 224,9±7,8µmol/Tag), die sich nicht signifikant unterschieden. Allerdings zeigte sich bei der Menge an ausgeschiedenem Kalium ein geringer, jedoch statistisch signifikanter Unterschied (p<0,01). Während die Mäuse ohne TRPC1 und -6 pro Tag 590,2±17,2µmol ausschieden, waren es bei den Wildtypen 667,1±17,8µmol (Abb.3.12).

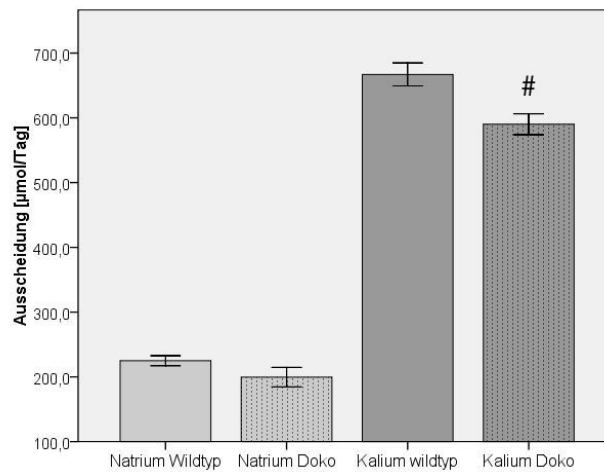


Abbildung 3.12 Vergleich der täglichen Na⁺- und K⁺-Ausscheidungsmenge von Wildtyp- und TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± SEM; WT: N=7; Doko: N=8; # p<0,01 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

4 Diskussion

Die Reninfreisetzung aus JG-Zellen wird über die intrazellulären Signalmoleküle cAMP und Ca^{2+} gesteuert. Während cAMP die Freisetzung des Renins stimuliert, führt Ca^{2+} zu einer Inhibition der Ausschüttung. Dieser inhibitorische Effekt der zytosolischen freien Ca^{2+} -Konzentration wird dabei von den Kalzium-gehemmten Adenylatzyklasen (AC5, AC6) vermittelt, was in der Folge zu erniedrigten Konzentrationen von cAMP und einer verminderten Ausschüttung von Renin führt (Grünberger et al., 2006), (Ortiz-Capisano et al., 2007b). Über die Regulationsmechanismen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration besteht allerdings Unklarheit. Eine Eintrittspforte, deren Existenz und Relevanz auf funktioneller Ebene nachgewiesen ist, sind die sog. „store-operated Ca^{2+} Channels“ (SOCs). Es zeigte sich, dass eine Blockade der sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zu einer Hemmung der Reninausschüttung führte. Durch die Hemmung von SERCA können zytosolische Kalziumionen nicht mehr zurück in die intrazellulären Speicher gepumpt werden, was konsekutiv zu einer Rezeptor-unabhängigen Entleerung dieser Speicher führt und so eine Aktivierung von SOCs mit anschließendem Ca^{2+} -Einstrom nach sich zieht (Schweda et al., 2000). Die molekulare Identität der SOC-Kanäle und der genaue Mechanismus ihrer Regulation sind jedoch bis heute unklar.

Seit vielen Jahren wird darüber diskutiert, ob die nichtselektiven Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle aus der Familie der kanonischen transienten Rezeptor Potential (TRPC) Kanäle Bestandteile der SOCs darstellen, oder zumindest an deren Regulation beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit Hilfe von Knockoutmäusen, bei denen die Gene für TRPC1 und TRPC6 ausgeschaltet worden waren, den Einfluss dieser Kanäle auf den Reninhaushalt und den Kreislauf der Maus zu beleuchten.

Als Schweda et al. die inhibierende Wirkung von Thapsigargin auf die Reninfreisetzung an isoliert perfundierten Rattennieren untersuchten und so den funktionellen Nachweis für eine Beteiligung von SOCE in JG-Zellen erbrachten, stellten sie fest, dass die vermeintlichen SOC-Blocker Flufenamat, Gadolinium (Gd^{3+}) und Lanthan (La^{3+}) diesen hemmenden Einfluss nicht beeinflussen konnten (Schweda et al., 2000). Unterstellt man, dass TRPC-Proteine ein Teil der Signalkaskade oder gar die vermittelnden Kanäle des durch Entleerung intrazellulärer Speicher vermittelten KalziumEinstroms sind, so hätte man einen Einfluss der drei verwendeten Substanzen auf die Reninfreisetzung erwarten müssen, da alle diese Substanzen eigentlich als Effektoren an TRPC-Kanälen bekannt sind (Rychkov & Barritt, 2007), (Eder et al., 2007), (Cavalié, 2007), (Beech, 2007), (Dietrich & Gudermann, 2007). Die fehlende Wirkung erscheint allerdings nachvollziehbar, wenn man die verwendeten Konzentrationen und deren in früheren

Experimenten untersuchte Wirkung auf die TRPC-Kanäle differenzierter betrachtet. Schweda *et al.* verwendeten La^{3+} und Gd^{3+} in einer Konzentration von jeweils $50\mu\text{M}$ und Flufenamat in einer Konzentration von $100\mu\text{M}$. Während La^{3+} und Gd^{3+} in dieser Konzentration TRPC1 in früheren Zellkulturversuchen blockierten (Eder *et al.*, 2007), waren bei TRPC3 $150\mu\text{M}$ La^{3+} für die komplette Hemmung notwendig (Zhu *et al.*, 1998). TRPC4 und -5 wurden von La^{3+} und Gd^{3+} bei Konzentrationen $<100\mu\text{M}$ sogar stimuliert (Jung *et al.*, 2003). TRPC6 wurde wiederum von La^{3+} und Gd^{3+} geblockt, von Flufenamat dagegen stimuliert (Dietrich & Gudermann, 2007). Betrachtet man die mögliche Expression von TRPC1, -4 und -6 in den JG-Zellen, stellt man fest, dass alle Stoffe in ihrer bei Schweda *et al.* eingesetzten Konzentration zwar einzelne Isoformen blockierten, diese Wirkung jedoch durch die gleichzeitige Stimulation anderer Isoformen wieder aufgehoben wurde. Eine Auswirkung auf die Reninfreisetzung erscheint so sehr unwahrscheinlich. Hier zeigt sich das Problem der fehlenden spezifischen Pharmaka, welche die verschiedenen TRPCs gezielt beeinflussen könnten. Knockout und Knockdown von einzelnen oder mehreren Isoformen gleichzeitig könnte hier zur Lösung des Problems beitragen.

Frühere Untersuchungen zur Expression der TRPC-Kanäle im Nierengewebe brachten zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Ein Grund dafür könnte der Umstand sein, dass die Versuche an Geweben von unterschiedlichen Spezies durchgeführt wurden. Deshalb sollte zu Beginn der Studie mittels RT-PCR nach mRNA der verschiedenen TRPCs in der Maus gesucht werden. Da in erster Linie das Expressionsmuster der TRPC-Isoformen in den JG-Zellen interessierte, eine reine Isolation dieser Zellen jedoch nicht möglich ist, wurden die möglichen Isoformen der TRPC-Expression durch Untersuchungen an Glomerula, isolierten bzw. genauer gesagt aufgereicherten JG-Zellen und auch an der Renin produzierenden Zelllinie As4.1. eingegrenzt. Die Ergebnisse zeigen, dass in den Glomerula, in denen neben den JG-Zellen noch verschiedene andere Zellen vorkommen, die Beteiligung von Tubuluszellen jedoch ausgeschlossen ist, die Isoformen TRPC1, -3, -4 und -6 exprimiert werden. In der JG-Zellpräparation, in der auch Tubuluszellen mit vorliegen, zeigte sich mRNA für TRPC1, -4 und -6. Die As4.1-Zellen wiederum exprimierten lediglich TRPC1 und TRPC6, wobei bei diesen immortalisierten Zellen nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich deren Expressionsmuster mit steigender Zahl der Passagen im Vergleich zu dem nativer JG-Zellen verändert hat. Festzuhalten ist, dass in den Präparationen, in denen native JG-Zellen enthalten sind, nur die Isoformen TRPC1, -4 und -6 immer enthalten sind, so dass man aufgrund des Ausschlussprinzips davon ausgehen kann, dass nur diese drei Isoformen in JG-Zellen exprimiert sein können.

Diese Ergebnisse sind konform mit früheren Daten von Sours *et al.*, die in Glomerula von Ratten und Menschen ebenfalls die gleichen vier TRPCs (1, 3, 4, 6) nachweisen konnten (Sours *et al.*, 2006). TRPC5, welches zusätzlich in präglomerulären Widerstandsgefäßen der Ratte nachgewiesen werden konnte (Facemire *et al.*, 2004), ist in Glomerula nicht enthalten.

Abweichend sind die gewonnenen Ergebnisse zu den Befunden von *Goel et al.*, die in Rattennieren zwar ebenfalls TRPC1, -3, und -6, nicht jedoch TRPC4 nachweisen konnten (Goel et al., 2006). Auch frühere Untersuchungen in murinen Mesangiumzellen unterscheiden sich, da in diesen Zellen ausschließlich TRPC1 und -4 gezeigt werden konnten (Wang et al., 2004). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kanäle TRPC1 und TRPC6, deren Funktion für die Reninfreisetzung in dieser Arbeit untersucht wurde, im jetzigen und in nahezu allen früheren Versuchsaufbauten nachgewiesen werden konnten. Außerdem erschienen diese beiden Kanäle in Anbetracht ihrer Funktionen im glatten Muskel (Seth et al., 2009), (Dietrich et al., 2005) und der Abstammung der JG-Zellen aus glatten Muskelzellen am ehesten für eine Beteiligung an der intrazellulären Regulation der Reninfreisetzung in Frage zu kommen, weswegen sie bei den verwendeten Knockoutmäusen ausgeschaltet wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Fehlen von TRPC1 und -6 bei den phänotypisch unauffälligen Doppelknockoutmäusen weder zu einem signifikantem Unterschied in der Höhe des Plasmareninspiegels, noch in der Höhe des systolischen Blutdrucks im Vergleich zur Wildtyp-Vergleichsgruppe führte. Obwohl in Voruntersuchungen an C57BL/6 Mäusen die Expression von TRPC1 und -6 neben weiteren Isoformen sowohl in den Glomerula als auch in isolierten JG-Zellen und As4.1. Zellen gezeigt werden konnte, scheinen diese beiden Kanäle keine entscheidende Rolle beim Eintritt von Ca^{2+} in das Zytosol der JG-Zellen und somit bei der Regulierung der Reninfreisetzung zu spielen. Da bei der Ausschaltung von zwei fast ubiquitär exprimierten Proteinen eine Beeinflussung des sympathischen Nervensystems, welche etwaige Unterschiede in der Steuerung der Reninfreisetzung und des Blutdrucks zwischen den beiden Gruppen maskieren könnte, nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Versuche unter Gabe des nichtselektiven Beta-Blockers *Propranolol* wiederholt. Hier zeigte sich überraschenderweise, v. a. nach intraperitonealer Gabe, eine deutliche Erhöhung des Blutdrucks bei beiden Gruppen. Dieser Anstieg könnte zum Einen dadurch erklärt werden, dass ein unselektiver Beta-Blocker neben den β_1 -Rezeptoren, die für die typische Blutdruck- und Herzfrequenz senkende Wirkung verantwortlich sind, ebenfalls die u. a. in der glatten Gefäßmuskulatur exprimierten und für deren Relaxation mitverantwortlichen β_2 -Rezeptoren blockiert. Zum anderen könnte eine Blockierung der Bindungsstellen an den β -Rezeptoren zu einer verstärkten Bindung der im Kreislaufsystem vorhandenen Katecholamine an die α_1 -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur führen, was eine Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße und einen Anstieg des Blutdrucks zur Folge hätte. Dieser Mechanismus wäre in den ersten Stunden nach Applikation am ausgeprägtesten, da in so kurzer Zeit keine Gegenregulation, wie etwa eine Internalisierung von Rezeptoren, erfolgen kann. Die drastischer erhöhten Blutdruckwerte wenige Stunden nach intraperitonealer Gabe im Vergleich zu den Werten unter kontinuierlicher oraler Gabe sind damit gut in Einklang zu bringen.

Zu bedenken ist ferner, dass die intraperitoneale Applikation eines Wirkstoffs bei der Maus sicherlich kurzzeitig Schmerzen verursacht, was wiederum ihren Stresspegel steigert und eine damit einhergehende Erhöhung des Blutdruck ebenfalls erklären kann.

Der Plasmaninospiegel wurde durch dieses Manöver nur bei den Dokos beeinflusst, wo er sich um über 60% verringerte. Scheinbar spielt die β -adrenerge Aktivierung der Reninfreisetzung bei den Knockouts eine sehr viel größere Rolle als bei den Wildtypen. Dies könnte Zeichen eines gesteigerten Sympathikotonus bei den genetisch veränderten Tieren sein.

Dass die Tiere ohne TRPC1 und -6 unter allen Versuchsbedingungen eine um ca. 10% niedrigere Herzfrequenz hatten als ihre Vergleichsgruppe, scheint jedoch dieser These entgegen zu stehen, da bei einer erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems eher eine erhöhte Herzfrequenz zu erwarten gewesen wäre. Diese wird im Wesentlichen durch die Schrittmacherzellen des Sinusknoten im rechten Vorhof bestimmt. Diese spezialisierten Zellen besitzen nicht wie andere Zellen ein konstantes Ruhemembranpotential, sondern ein autonom funktionierendes Schrittmacherpotential, das nach jeder Repolarisation bis zum maximalen diastolischen Potential (MDP) wieder langsam und stetig bis zum Erreichen des Schwellenpotentials (SP) ansteigt, wo dann das nächste Aktionspotential (AP) ausgelöst wird. Der primäre langsame Anstieg wird als Präpotential (PP) bezeichnet und wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Kanälen vermittelt. Darunter sind auch nichtselektive Kationenkanäle, die den sog. „funny current“ (I_f) vermitteln (Schram et al., 2002). Eine durch β_1 -Rezeptoren vermittelte Erhöhung der Herzfrequenz wird dadurch bewirkt, dass das MDP positivere Werte annimmt und die Anstiegssteilheit des PP zunimmt, wodurch wiederum das SP schneller erreicht wird. Kürzlich konnte auch für die Schrittmacherzellen des Sinusknotens ein Einfluss von store-operated Ca^{2+} Channels (SOCs) nachgewiesen werden. In isolierten murinen Sinusknoten führte eine Blockade der sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase mittels Cyclopiazonsäure zu einer für SOC typischen Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und auch einem Anstieg der Schlagfrequenz. Beides konnte durch Zugabe der SOC-Antagonisten Gd^{3+} (Schumann et al., 1994) und SKF-96365 (Flemming et al., 2003) wieder deutlich abgeschwächt werden (Ju et al., 2007). Um auch hier eine mögliche Beteiligung von TRPC an den SOCs zu beleuchten, wurde die Expression der verschiedenen TRPC-Isoformen im Sinusknoten der Maus untersucht. Mittels RT-PCR wurden in isolierten Sinusknoten (SAN) der Maus die TRPCs -1, -2, -3, -4, -6, und -7 nachgewiesen. Auf Proteinebene wurden in den SAN die Formen TRPC1, -3, -4 und -6 gefunden. Diese vier (-1, -3, -4, -6) konnten ferner immunhistochemisch in isolierten Schrittmacherzellen gezeigt werden (Ju et al., 2007).

In Anbetracht all dieser Daten scheint es möglich, die erniedrigte Herzfrequenz der TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse auch trotz eines möglicherweise erhöhten Sympathikotonus zu erklären: Der Einstrom von Ca^{2+} über die store-operated Channels stellt neben anderen Kationenkanälen

einen wichtigen Signalweg für die Generierung des Schrittmacherpotentials der Zellen des Sinusknotens dar. TRPC1 und TRPC6, deren Expression neben TRPC3 und -4 in den Schrittmacherzellen nachgewiesen werden konnte, könnten an deren Aktivierung maßgeblich beteiligt oder sogar ein Bestandteil der SOCs sein. Das sympathische Nervensystem führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, indem es die Negativität des MDP vermindert und die Anstiegssteilheit des Präpotentials erhöht. Dies geschieht in erster Linie durch Bindung von Noradrenalin an G_s -Protein-gekoppelte β_1 -Rezeptoren. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von Adenylatzyklasen, einem Anstieg von cAMP und einer Aktivierung der Proteinkinase A, was schließlich zu einer Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} und einem erhöhtem Herzantrieb führt. Darüber hinaus könnte aber auch die verstärkte Aktivierung von SOCs an der Vermittlung des erhöhten Herzantriebs beteiligt sein, indem sich der Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle erhöht und akut Ca^{2+} schneller in die Zelle strömen kann. Fehlen nun bei den Doppelknockouts zwei möglicherweise wichtige Proteine für die Funktionsfähigkeit der SOCs, nämlich TRPC1 und TRPC6, ist die Herzfrequenz in Ruhe und auch der sympathisch vermittelte Anstieg vermindert.

Eine zusätzliche Rolle für SOC/TRPC und eine vom direkten Einfluss des vegetativen Nervensystems unabhängige Erklärung der niedrigeren Herzfrequenz der Dokos könnte eine Studie liefern, die TRPC1 als einen durch mechanische Reizung aktivierten Kationenkanal zeigt (Maroto et al., 2005). Seit langem ist bekannt, dass eine Dehnung des Vorhofs zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz des Herzens führt, was als mechano-elektrisches Feedback bezeichnet wird (Bainbridge, 1915). Der genaue molekulare Mechanismus für diesen Effekt ist allerdings unbekannt (Kohl et al., 1999). Angenommen TRPC1 bildet auch in den Zellen des Sinusknoten einen mechano-sensitiven Kationenkanal, könnte dieser Kanal alleine oder in Verbindung mit SOC das Verbindungsstück zwischen Druckbelastung des Vorhofs und Erhöhung der Herzfrequenz darstellen. Auch mit dieser Hypothese wäre der langsamere Puls der Knockouts konform, da durch das Fehlen von TRPC1 eine Druckbelastung des Vorhofs nicht mehr in eine gesteigerte Schlagzahl umgewandelt werden könnte.

Obwohl sich die Plasmaninspiegel beider Tiergruppen nicht signifikant unterschieden, so schien er doch bei den TRPC1/6 Dokos unter Normalbedingungen zumindest tendenziell höher zu liegen. Trotzdem hatten die Knockouts keinen höheren, sondern sogar einen in der Tendenz leicht niedrigeren Blutdruck. Eine mögliche Stimulation der Reninfreisetzung durch einen aus welchen Gründen auch immer stark erniedrigten Blutdruck bei den Knockouts konnte aufgrund der fast gleichen Blutdruckwerte als Ursache für die erhöhte PRC der Dokos ausgeschlossen werden. Warum aber der Blutdruck der TRPC1/6 Doppelknockoutmäuse trotz höherem PRC nicht erhöht ist, könnte sich dadurch erklären, dass TRPC-Kanäle nicht nur im Nierengewebe vorkommen, sondern u. a. auch in der glatten Gefäßmuskulatur und dort eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Gefäßtonus besitzen. *Welsh et al.* fanden heraus, dass TRPC6 ein wichtiger Protagonist in der

druckabhängigen Regulierung des myogenen Tonus von Widerstandsgefäßen - auch bekannt als Byliss-Effekt - ist. An zerebralen Arterien wiesen sie zuerst mit Hilfe von RT-PCR und auch immunhistochemisch sowohl TRPC3 als auch TRPC6 in den Gefäßen nach. Anschließend behandelten sie die kultivierten Arterien mit TRPC6 sense- und antisense Oligodesoxynukleotiden (ODN). Auf diese Weise erreichten sie eine Verringerung der TRPC6-Proteinexpression um 60% bei unveränderter TRPC3 Expression. Bei den folgenden Versuchen konnten sie zeigen, dass die mit TRPC6 antisense ODNs vorbehandelten Gefäße bei Druckbelastung eine um 65% verringerte Depolarisation und eine um 75% verringerte Vasokonstriktion im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Auch die druckinduzierten Kationenströme waren auf die Hälfte reduziert (Welsh et al., 2002). Dabei scheint TRPC6 seine Wirkung nicht über eine Beeinflussung von SOCE zu vermitteln, da die Perfusion isolierter glatter Muskelzellen von TRPC6^{-/-}-Mäusen mit IP₃, welches normalerweise nach Bindung an seinen IP₃-Rezeptor zur Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher führt und so SOCE induziert, zu keinem signifikant unterschiedlichen Anstieg der Stromdichte im Vergleich zur Wildtyp-Vergleichsgruppe führte (Dietrich et al., 2005). Da sowohl für TRPC3 als auch für TRPC6 eine direkte Aktivierung durch DAG gezeigt wurde (Hofmann et al., 1999) und bekannt ist, dass bei Druckerhöhung im Gefäß sowohl die PLC-Aktivität (Osol et al., 1993) als auch die DAG-Konzentration steigt (Narayanan et al., 1994), schlugen *Welsh et al.* vor, dass das in Folge der Druckbelastung gebildete DAG zu einer Aktivierung von TRPC führt, was wiederum zu einer Membrandepolarisation und einem Einstrom von Kalzium via spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle führt. Das erhöhte [Ca²⁺]_i bewirkt schließlich die Steigerung des Gefäßtonus (Welsh et al., 2002). In diesem Fall würde TRPC als receptor-operated Channel (ROC) fungieren. Es ist vorstellbar, dass die Ausschaltung von TRPC6 bei den Doppelknockoutmäusen zu einer Abschwächung der DAG-induzierten Depolarisation und so zu einer Relaxation der Widerstandsgefäße führt, die den niedrigeren Blutdruck erklären würde.

Die Untersuchung der TRPCs gestaltet sich aufgrund der funktionellen Überlappung der einzelnen Unterformen äußerst schwierig. Auch die kompensatorische Hochregulation anderer TRPCs nach dem Knockout einzelner Isoformen erschwert die Entschlüsselung der Funktion der einzelnen Kanäle enorm. *Dietrich et al.* stellten fest, dass bei den von ihnen untersuchten TRPC6 Knockoutmäusen arterieller Blutdruck, Kontraktilität und basaler Tonus der Zerebralgefäße und die TRPC-getragenen Kationenströme in isolierten glatten Muskelzellen überraschenderweise erhöht waren. Die daraufhin folgende Messung der mRNA der Kanäle TRPC1-7 in den Zerebralarterien ergab, dass die Menge an TRPC3-mRNA im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe um das Drei- bis Fünffache erhöht war. Das Ausschalten von TRPC6 hatte anscheinend zur vermehrten Expression von TRPC3 und zur Bildung von homooligomeren TRPC3-Kanälen geführt. Durch Transfektion der glatten Muskelzellen mit TRPC3-spezifischer siRNA konnte der erhöhte Kationeneinstrom in die Zellen komplett aufgehoben werden (Dietrich

et al., 2005). Während TRPC6 ein streng regulierter Rezeptor-aktivierter Kationenkanal ist, wurde für TRPC3 aufgrund eines unterschiedlichen Glykosilierungsmusters eine beachtliche konstitutive Aktivität in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Dietrich et al., 2003). Der daraus resultierende permanent erhöhte Einstrom von Ca^{2+} und anderen Kationen in die Gefäßmuskelzellen erklärte die erhobenen Befunde.

Da die in der vorliegenden Arbeit unter Normalbedingungen gemessenen Blutdruckwerte der Knockoutmäuse unter denen der Wildtypen liegen, ist zumindest in der Gefäßmuskulatur von keiner stark erhöhten konstitutiven Aktivität anderer Kationenkanäle auszugehen. Obwohl durch gleichzeitige Ausschaltung zweier Isoformen dem Phänomen der kompensatorischen Hochregulation entgegengetreten werden sollte, ist auch bei den hier verwendeten Mäusen eine verstärkte Expression anderer TRPCs nicht auszuschließen.

Trotz der unzähligen Faktoren, die bei in vivo Untersuchungen die Ergebnisse beeinflussen und verfälschen können, ist diese Art der Untersuchung dennoch am besten geeignet, um die wahre Funktion bestimmter Zellbestandteile und Moleküle für den Gesamtorganismus zu bestimmen. Die am Anfang der Arbeit aufgestellte Hypothese, dass TRPC1- und TRPC6-Kanäle eine entscheidende Rolle beim Eintritt von Ca^{2+} in die JG-Zellen und somit bei der Regulation der Reninfreisetzung spielen, konnte nicht bestätigt werden. Auch eine zentrale Position der beiden Proteine für die Ausscheidungs- und Konzentrationsfähigkeit der Niere ist aufgrund der unauffälligen Ergebnisse bei der Untersuchung des Urins der TRPC1/6 Dokos unwahrscheinlich. Zweifelsfrei spielen die ausgeschalteten TRPCs jedoch eine Rolle bei der Regulation des Kreislaufs. Die erniedrigte Herzfrequenz der Knockouts untermauert die Vermutung für deren Beteiligung an der Erregungsbildung des Herzens in den Zellen des Sinusknotens.

Die Wege des Kalziums in die JG-Zellen bleiben also weiterhin unklar. Um die mögliche Beteiligung der TRPC-Kanäle daran zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Angesichts der vielfältigen Funktionen der Kanäle im gesamten Körper, die eine Zuordnung der Entstehungsorte für gefundene funktionelle Veränderungen äußerst schwierig machen, und des Fehlens spezifischer Antikörper, mit deren Hilfe man die Lokalisation der TRPC-Isoformen genau bestimmen könnte, gestaltet sich dies jedoch schwierig. Versuche an isolierten JG-Zellen oder an der isoliert perfundierten Niere von Knockoutmäusen, bei denen zur Vermeidung der kompensatorischen Hochregulation anderer Isoformen mehrere TRPC Gene gleichzeitig ausgeschaltet werden, scheinen den erfolgversprechendsten Ansatz für die Zukunft darzustellen. Die mögliche Zahl der gleichzeitig ausgeschalteten Gene wird dabei wahrscheinlich durch die zunehmende Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Tiere beschränkt sein.

5 Zusammenfassung

Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration stellt den Hauptsignalweg für die Hemmung der Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären (JG) Zellen dar. Die molekularen Mechanismen, wie Ca^{2+} in die Zelle gelangt, sind nicht genau bekannt. Man weiß, dass der Einstrom von Ca^{2+} über sog. „store-operated Ca^{2+} channels“ (SOCs) einen Einfluss auf die Ausschüttung des Renins hat. Wie diese möglicherweise heterogene Gruppe von lediglich funktionell beschriebenen Kanälen aufgebaut und reguliert ist, ist ebenfalls unklar. Die Gruppe der kanonischen transienten Rezeptor Potential (TRPC) Kanäle könnte am Aufbau und/oder der Steuerung der SOCs beteiligt sein. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit Hilfe von TRPC1/6 Doppelknockoutmäusen (Doko) zu untersuchen, welche Rolle diese Kanäle bei der Regulation des Reninhaushalts und des Kreislaufs haben.

In Vorversuchen konnten mittels RT-PCR in den Gesamtnieren von C57BL/6 Mäusen mRNA der Proteine TRPC1, -2, -3, -4, -5 und -6 nachgewiesen werden. Während sich in isolierten Glomerula der Mäuse mRNA der Isoformen TRPC1, -3, -4, und -6 fand, wurden in isolierten JG-Zellen nur die Isoformen TRPC1, -4 und -6 mittels RT-PCR nachgewiesen. In den Renin produzierenden As4.1. Zellen zeigte sich nur die Expression von TRPC1 und TRPC6. Mittels Ausschlussprinzip kann man folgern, dass in JG-Zellen also nur die Isoformen TRPC1, TRPC4 und TRPC6 exprimiert sein können.

Bei der Bestimmung des Plasmapreninspiegels konnte zwischen der Knockout- und der Wildtyp- (WT) Gruppe kein Unterschied festgestellt werden. Nach Gabe des nichtselektiven Beta-Blockers Propranolol blieb die gemessene Reninkonzentration bei der WT Gruppe unverändert, während sie bei den Dokos um 60% absank. Der β -adrenerge Einfluss auf die Reninfreisetzung scheint bei den TRPC1/6^{-/-}-Mäusen einen deutlich größeren Stellenwert zu haben als bei den Wildtypen.

Auch der Blutdruck war bei den WTs und Dokos gleich. Auffällig war ein deutlicher Anstieg bei beiden Gruppen wenige Stunden nach Gabe von Propranolol. Mögliche Erklärungen dafür sind eine Blockade der Gefäß relaxierend wirkenden β_2 -Rezeptoren und die wegen des Wegfalls möglicher Bindungsstellen an β -Rezeptoren verstärkte Bindung von Katecholaminen an α_1 -Rezeptoren, was in der Folge zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstands und des Blutdrucks führt. Auch eine kurzzeitige schmerzbedingte Erhöhung des Sympathikotonus nach intraperitonealer Verabreichung des Wirkstoffs ist zu bedenken.

Die Herzfrequenz der TRPC1/6^{-/-}-Tiere lag sowohl in Ruhe als auch nach Gabe des Betablockers um ca. 10% unter der Vergleichsgruppe. Es ist denkbar, dass TRPC1 und/oder -6 an der Erregungsbildung im Herzen beteiligt sind. Dieser Einfluss könnte über SOCs oder auch direkt

durch TRPC1 in den Zellen des Sinusknotens vermittelt werden, in denen bei früheren Untersuchungen die Expression der Isoformen TRPC1, -3, -4, und -6 nachgewiesen wurde.

Bei der Ausscheidungsfunktion der Nieren zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

TRPC1 und TRPC6 scheinen keine entscheidende Rolle beim Ca^{2+} -Eintritt in die JG-Zellen und somit beim inhibitorischen Signalweg der Reninfreisetzung zu haben. Eine Beteiligung der beiden Kanäle an der Regulation des Schrittmacherpotentials erscheint wahrscheinlich, bedarf zur endgültigen Klärung jedoch weitergehender Untersuchungen. Welche Rolle TRPC1 und TRPC6 bei der Regulation des Blutdrucks spielen, ist angesichts der bekannten Tendenz zur Hochregulation anderer, nicht ausgeschalteter Isoformen und eines unklaren Sympathikotonus anhand dieses Versuchsaufbaus nicht zu beurteilen.

6 Literaturverzeichnis

- Abramowitz, J., & Birnbaumer, L.** (2009). Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J.*, 23(2), 297–328.
- Bainbridge, F. A.** (1915). The influence of venous filling upon the rate of the heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 50(2), 65–84.
- Beavo, J. A.** (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, 75(4), 725–748.
- Beech, D. J.** (2007). Canonical transient receptor potential 5. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 109–123.
- Beierwaltes, W. H.** (2006). cGMP stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 290(6), F1376-81.
- Beierwaltes, W. H.** (2010). The role of calcium in the regulation of renin secretion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298(1), F1-F11.
- Birnbaumer, L.** (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 49, 395–426.
- Bock, H. A., Hermle, M., Brunner, F. P., & Thiel, G.** (1992). Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int.*, 41(2), 275–280.
- Bührle, C. P., Scholz, H., Hackenthal, E., Nobiling, R., & Taugner, R.** (1986). Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 45(1), 37–47.
- Castrop, H.** (2007). Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)*, 189(1), 3–14.
- Castrop, H., Lorenz, J. N., Hansen, P. B., Friis, U., Mizel, D., Oppermann, M., et al.** (2005). Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl-cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289(6), F1185-92.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D.** (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824.
- Cavalié, A.** (2007). Ionic channels formed by TRPC4. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 93–108.
- Clapham, D. E.** (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517–524.
- Cohen, Y., Rahamimov, R., Naveh-Manly, T., Silver, J., & Rahamimoff, R.** (1997). Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells? *Am. J. Physiol.*, 273(3 Pt 1), E631-7.
- DeHaven, W. I., Jones, B. F., Petranka, J. G., Smyth, J. T., Tomita, T., Bird, G. S., et al.** (2009). TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *J. Physiol. (Lond.)*, 587(Pt 10), 2275–2298.
- Della Bruna, R., Pinet, F., Corvol, P., & Kurtz, A.** (1992). Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis in vitro. *Am. J. Physiol.*, 262(3 Pt 2), F397-402.
- DiBona, G. F., & Esler, M.** (2010). Translational medicine: the antihypertensive effect of renal denervation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 298(2), R245-53.
- DiBona, G. F., & Kopp, U. C.** (1997). Neural control of renal function. *Physiol. Rev.*, 77(1), 75–197.
- Dietrich, A., & Gudermann, T.** (2007). TRPC6. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 125–141.
- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., & Gudermann, T.** (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J. Biol. Chem.*, 278(48), 47842–47852.

- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., et al.** (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol. Cell Biol.*, 25(16), 6980–6989.
- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., et al.** (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol. Cell Biol.*, 25(16), 6980–6989.
- Eder, P., Poteser, M., & Groschner, K.** (2007). TRPC3: a multifunctional, pore-forming signalling molecule. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 77–92.
- Facemire, C. S., Mohler, P. J., & Arendshorst, W. J.** (2004). Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286(3), F546–51.
- Ferris, C. D., Haganir, R. L., Supattapone, S., & Snyder, S. H.** (1989). Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature*, 342(6245), 87–89.
- Flemming, R., Xu, S. Z., & Beech, D. J.** (2003). Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 139(5), 955–965.
- Flockerzi, V.** (2007). An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 1–19.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., et al.** (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat. Cell Biol.*, 3(2), 121–127.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., et al.** (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat. Cell Biol.*, 3(2), 121–127.
- Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Hoffmann, M., Müller, C., Stolz, S., et al.** (2004). Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(4), 1352–1358.
- Friis, U. G., Jensen, B. L., Aas, J. K., & Skøtt, O.** (1999). Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ. Res.*, 84(8), 929–936.
- Friis, U. G., Jensen, B. L., Sethi, S., Andreasen, D., Hansen, P. B., & Skøtt, O.** (2002). Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ. Res.*, 90(9), 996–1003.
- Friis, U. G., Jørgensen, F., Andreasen, D., Jensen, B. L., & Skøtt, O.** (2004). Membrane potential and cation channels in rat juxtaglomerular cells. *Acta Physiol. Scand.*, 181(4), 391–396.
- Friis, U. G., Jørgensen, F., Andreasen, D., Jensen, B. L., & Skøtt, O.** (2003). Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BKCa potassium channels (ZERO variant) and L-type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. *Circ. Res.*, 93(3), 213–220.
- Gambaryan, S., Häusler, C., Markert, T., Pöhler, D., Jarchau, T., Walter, U., et al.** (1996). Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J. Clin. Invest.*, 98(3), 662–670.
- Goel, M., Sinkins, W. G., Zuo, C.-D., Estacion, M., & Schilling, W. P.** (2006). Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 290(5), F1241–52.
- Goel, M., Sinkins, W. G., Zuo, C.-D., Estacion, M., & Schilling, W. P.** (2006). Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 290(5), F1241–52.
- Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A., & Schweda, F.** (2006). The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ. Res.*, 99(11), 1197–1206.

- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., & Taugner, R.** (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.*, 70(4), 1067–1116.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., & Taugner, R.** (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.*, 70(4), 1067–1116.
- Harrison-Bernard, L. M.** (2009). The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ*, 33(4), 270–274.
- Hirota, N., Ichihara, A., Koura, Y., Hayashi, M., & Saruta, T.** (2002). Phospholipase D contributes to transmural pressure control of prorenin processing in juxtaglomerular cell. *Hypertension*, 39(2 Pt 2), 363–367.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G.** (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259–263.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., & Gudermann, T.** (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(11), 7461–7466.
- Jan, C. R., Ho, C. M., Wu, S. N., & Tseng, C. J.** (1999). Mechanism of rise and decay of thapsigargin-evoked calcium signals in MDCK cells. *Life Sci.*, 64(4), 259–267.
- Jensen, B. L., & Skøtt, O.** (1996). Blockade of chloride channels by DIDS stimulates renin release and inhibits contraction of afferent arterioles. *Am. J. Physiol.*, 270(5 Pt 2), F718–27.
- Jensen, B. L., Krämer, B. K., & Kurtz, A.** (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension*, 29(5), 1148–1155.
- Jensen, B. L., Schmid, C., & Kurtz, A.** (1996). Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.*, 271(3 Pt 2), F659–69.
- Ju, Y.-k., Chu, Y., Chaulet, H., Lai, D., Gervasio, O. L., Graham, R. M., et al.** (2007). Store-operated Ca²⁺ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ. Res.*, 100(11), 1605–1614.
- Jung, S., Mühle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G., & Plant, T. D.** (2003). Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J. Biol. Chem.*, 278(6), 3562–3571.
- Kim, S. M., Chen, L., Faulhaber-Walter, R., Oppermann, M., Huang, Y., Mizel, D., et al.** (2007). Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension*, 50(1), 103–109.
- Kohl, P., Hunter, P., & Noble, D.** (1999). Stretch-induced changes in heart rate and rhythm: clinical observations, experiments and mathematical models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71(1), 91–138.
- Kurtz, A., & Penner, R.** (1989). Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(9), 3423–3427.
- Kurtz, A., & Schweda, F.** (2001). Measuring Renin Secretion from Juxtaglomerular Cells. *Methods in Molecular Medicine*, 51.
- Kurtz, A., & Schweda, F.** (2001). Measuring Renin Secretion from Juxtaglomerular Cells. *Methods in Molecular Medicine*, 51.
- Kurtz, A., & Wagner, C.** (1998). Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol.*, 275(6 Pt 2), F849–62.
- Kurtz, A., Hamann, M., & Götz, K.** (2000). Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflugers Arch.*, 440(6), 889–895.
- Kurtz, A., Muff, R., Born, W., Lundberg, J. M., Millberg, B. I., Gnädinger, M. P., et al.** (1988). Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J. Clin. Invest.*, 82(2), 538–543.

- Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Hutter, A., Bührle, C., Nobiling, R., Taugner, R., et al.** (1986). Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J. Physiol.*, 250(4 Pt 1), C563-71.
- Kurtz, A., Skott, O., Chegini, S., & Penner, R.** (1990). Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.*, 416(3), 281–287.
- Leybold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., & Axel, R.** (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(9), 6376–6381.
- Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Singh, B. B., Groschner, K., & Ambudkar, I. S.** (2005). Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J. Biol. Chem.*, 280(22), 21600–21606.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., & Lewis, R. S.** (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203), 538–542.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., & Hamill, O. P.** (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.*, 7(2), 179–185.
- Mercer, J. C., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., et al.** (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J. Biol. Chem.*, 281(34), 24979–24990.
- Montell, C., & Rubin, G. M.** (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323.
- Narayanan, J., Imig, M., Roman, R. J., & Harder, D. R.** (1994). Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Am. J. Physiol.*, 266(5 Pt 2), H1840-5.
- Nguyen, G., & Danser, A. H. J.** (2008). Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp. Physiol.*, 93(5), 557–563.
- Nilius, B.** (2007). TRP channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1772(8), 805–812.
- Ortiz-Capisano, M. C., Ortiz, P. A., Harding, P., Garvin, J. L., & Beierwaltes, W. H.** (2007a). Adenylyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension*, 49(3), 618–624.
- Ortiz-Capisano, M. C., Ortiz, P. A., Harding, P., Garvin, J. L., & Beierwaltes, W. H.** (2007b). Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension*, 49(1), 162–169.
- Osol, G., Laher, I., & Kelley, M.** (1993). Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. *Am. J. Physiol.*, 265(1 Pt 2), H415-20.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J. S., Koblan-Huberson, M., et al.** (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat. Cell Biol.*, 8(7), 771–773.
- Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K.-S., Smith, K. S., Rudolph, U., et al.** (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell*, 137(4), 761–772.
- Rosivall, L.** (2009). Intrarenal renin-angiotensin system. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 302(2), 185–192.
- Rychkov, G., & Barritt, G. J.** (2007). TRPC1 Ca(2+)-permeable channels in animal cells. *Handb Exp Pharmacol*, (179), 23–52.
- Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P., & Schmidt, B. M. W.** (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet*, 369(9568), 1208–1219.
- Scholz, H., & Kurtz, A.** (1992). Disparate effects of calcium channel blockers on pressure dependence of renin secretion and flow in the isolated perfused rat kidney. *Pflugers Arch.*, 421(2-3), 155–162.

- Scholz, H., & Kurtz, A.** (1993). Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney. *J. Clin. Invest.*, *91*(3), 1088–1094.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., & Nattel, S.** (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ. Res.*, *90*(9), 939–950.
- Schumann, S., Greger, R., & Leipziger, J.** (1994). Flufenamate and Gd³⁺ inhibit stimulated Ca²⁺ influx in the epithelial cell line CFPAC-1. *Pflugers Arch.*, *428*(5-6), 583–589.
- Schwabe, U.** (2009). Arzneiverordnungen 2008 im Überblick. In U. Schwabe & P. Paffrath (Eds.), *Arzneiverordnungsreport 2009* (pp. 3–45). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Schweda, F., & Kurtz, A.** (2004). Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol. Scand.*, *181*(4), 383–390.
- Schweda, F., & Kurtz, A.** (2009). Regulation of Renin Release by Local and Systemic Factors. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*.
- Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., & Kurtz, A.** (2007). Renin release. *Physiology (Bethesda)*, *22*, 310–319.
- Schweda, F., Riegger, G. A., Kurtz, A., & Krämer, B. K.** (2000). Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, *279*(1), F170-6.
- Schweda, F., Segerer, F., Castrop, H., Schnermann, J., & Kurtz, A.** (2005). Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors. *Hypertension*, *46*(4), 780–786.
- Seth, M., Zhang, Z.-S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., et al.** (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ. Res.*, *105*(10), 1023–1030.
- Seth, M., Zhang, Z.-S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., et al.** (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ. Res.*, *105*(10), 1023–1030.
- Sigmund, C. D., Okuyama, K., Ingelfinger, J., Jones, C. A., Mullins, J. J., Kane, C., et al.** (1990). Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.*, *265*(32), 19916–19922.
- Smyth, J. T., DeHaven, W. I., Jones, B. F., Mercer, J. C., Trebak, M., Vazquez, G., et al.** (2006). Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim. Biophys. Acta*, *1763*(11), 1147–1160.
- Sours, S., Du, J., Chu, S., Ding, M., Zhou, X. J., & Ma, R.** (2006). Expression of canonical transient receptor potential (TRPC) proteins in human glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, *290*(6), F1507-15.
- Sours, S., Du, J., Chu, S., Ding, M., Zhou, X. J., & Ma, R.** (2006). Expression of canonical transient receptor potential (TRPC) proteins in human glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, *290*(6), F1507-15.
- Stathopulos, P. B., Li, G.-Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., & Ikura, M.** (2006). Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.*, *281*(47), 35855–35862.
- Statistisches Bundesamt, D.** (2008). *Todesursachen: Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2008*, from <http://www.destatis.de>.
- Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., & Koentges, G.** (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, *295*(5559), 1493–1500.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E.** (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem.*, *278*(40), 39014–39019.

- van Nimwegen, C., van Eijnsbergen, B., Boter, J., & Mullink, J. W.** (1973). A simple device for indirect measurement of blood pressure in mice. *Lab. Anim.*, 7(1), 73–84.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., & Kurtz, A.** (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J. Clin. Invest.*, 102(8), 1576–1582.
- Wagner, C., Wit, C. de, Kurtz, L., Grünberger, C., Kurtz, A., & Schweda, F.** (2007). Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ. Res.*, 100(4), 556–563.
- Wang, X., Pluznick, J. L., Wei, P., Padanilam, B. J., & Sansom, S. C.** (2004). TRPC4 forms store-operated Ca²⁺ channels in mouse mesangial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 287(2), C357–64.
- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., & Ito, H.** (2009). The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ. J.*, 73(3), 419–427.
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., & Brayden, J. E.** (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ. Res.*, 90(3), 248–250.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R. S., Banegas, J. R., Giampaoli, S., Hense, H.-W., Joffres, M., et al.** (2003). Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*, 289(18), 2363–2369.
- World Health Organisation** (2002). *The World Health Report 2002 – reducing risks, promoting healthy life: Quantifying selected major risks to health.*
- World Health Organisation** (2008). *The Top Ten Causes Of Death* (Fact sheet No 310). Retrieved April 06, 2010, from <http://www.who.int>.
- Worley, P. F., Zeng, W., Huang, G. N., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Lee, M. G., et al.** (2007). TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium*, 42(2), 205–211.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., & Muallem, S.** (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol.*, 9(6), 636–645.
- Zagranichnaya, T. K., Wu, X., & Villereal, M. L.** (2005). Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.*, 280(33), 29559–29569.
- Zhu, X., Jiang, M., & Birnbaumer, L.** (1998). Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.*, 273(1), 133–142.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
n	Nano- (10^{-9})
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Milli- (10^{-3})
g	Gramm
l	Liter
M	Molar
nm	Nanometer
-/-	Knockout
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
[NaCl]	Natriumchlorid Konzentration
A1AR	Ligand-A1 Adenosin Rezeptor
AC	Adenylatzyklase
ACE	angiotensin converting enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
ANG	Angiotensin
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
AQP	Aquaporin
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BAEE	Na-Benzoyl-L-Arginin-Ethyl-Ester Lösung
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
bpm	Schläge pro Minute
BSA	bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene-related peptide

COX2	Cyclooxygenase 2
CRACM	calcium release-activated Calcium Modulator
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Doko	Doppelknockout
dT	Desoxythymidin
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G _q	G-Protein Untereinheit q
HEK293	human embryonic kidney Zelllinie
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
I _{CRAC}	calcium-release activated Ca ²⁺ Einstrom
I _f	„funny current“
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat Rezeptor
IPN	isoliert perfundierte Niere
JG	juxtaglomerulär
L-Typ Ca _v	spannungsabhängiger Ca ²⁺ Kanal vom L-Typ
MDP	maximales diastolisches Potential
MEM	Minimum Essential Medium
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Kotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAF	platelet-activating factor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A

PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Präpotential
PRC	Plasma Renin Konzentration
R/P-R	Renin/Prorenin-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
ROC	receptor-operated Channel
ROCE	receptor-operated Channel vermittelter Ca^{2+} Einstrom
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
SAN	isolierte Sinusknoten
SERCA	sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SOC	store-operated Channel
SOCE	store-operated Channel vermittelter Ca^{2+} Einstrom
STIM1	stromales Interaktionsmolekül 1
TKR	Tyrosinkinase Rezeptor
tRNA	Transport Ribonukleinsäure
TRPC	kanonischer oder klassischer transienter Rezeptor Potential Kanal
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WT	Wildtyp

7.2 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 29.06.2012

Michael Plattner

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Michael Plattner

Geburtsdatum 13.01.1986

Geburtsort Regensburg

Staatsangehörigkeit deutsch

Berufliche Erfahrung

seit 09.2012 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie am Klinikum Dritter Orden, München

Praktisches Jahr

10.2011 – 01.2012

08.2011 – 10.2011 und Cirugía y Traumatología, HHA, Temuco, Chile
02.2011 – 04.2011 Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Krankenhaus St. Josef Regensburg

07.2011 – 08.2011

Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg

04.2011 – 07.2011

Innere Medizin, Triemli Stadtspital Zürich, Schweiz

Famulaturen

09.2010

FHK und Geburtshilfe, Krankenhaus St. Josef, Regensburg

08.2009

Terapia Intensiva, Hospital Civil de Guadalajara, Mexico

03.2009

Unfallchirurgie, KH Barmherzige Brüder, Regensburg

Unfallchirurgie, Klinikum Passau

03.2008

Innere Medizin, Klinikum Passau

Hochschulausbildung

2005 – 2012

Studium der Humanmedizin an der **Universität Regensburg**

06.2012

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04.2010 – 08.2010

Freisemester zur Fertigstellung der Dissertation

10.2007

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,

Schulbildung

1996 – 2005

Gymnasium Neutraubling, Abschluss: Abitur

1992 - 1996

Grundschule Alteglofsheim

Sprachen

Englisch, Spanisch, Latein

Stipendien

10.2011 – 01.2012

Programm zur Stärkung der Mobilität von deutschen Studierenden (PROMOS), Universität Regensburg

04.2010

DAAD, Stipendium zur wissenschaftlichen Aus- und Fortbildung im Ausland

08.2009

Ifmsa/bvmd professional exchange-Programm

2005 – 2007

e-fellows.net, "Online-Stipendium und Karrierenetzwerk"

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein größter Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med. Frank Schweda** für die hervorragende Betreuung und geduldige Einführung in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens. Nicht nur seine exzellente fachliche Kompetenz, von der ich in großem Maße beim Erstellen der Arbeit profitieren konnte, sondern auch seine herzliche Art mit Menschen umzugehen waren stets inspirierend für meine persönliche und berufliche Weiterentwicklung.

Danken möchte ich auch dem Leiter des Lehrstuhls für Physiologie der Universität Regensburg, Herrn **Prof. Dr. med. Armin Kurtz**, für die Möglichkeit in einem so angenehmen Arbeitsumfeld promovieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Univ.-Prof. Dr. Marc Freichel**, Leiter der Abteilung Experimentelle Pharmakologie der Universität des Saarlands in Homburg, für die Herstellung und freundliche Überlassung der TRPC1/6 Doppelknockout- und Wildtypmäuse.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physiologie bedanken, die mir bei allen kleineren und größeren Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen voran danke ich Frau **Gerda Treuner**, von der ich einen Großteil der praktischen Fertigkeiten der Laborarbeit erlernen konnte, Frau **Katharina Ehm** und Frau **Marlies Hamann**, für die so wichtige Hilfestellung bei organisatorischen Problemen während der Durchführung der Versuche.

Schließlich gilt es auch noch meiner Familie und meiner Freundin einen Dank auszusprechen, die mich bei Rückschlägen aufgebaut haben und auf diese Weise ebenfalls sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.